

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
NÖROBİLİM ANABİLİM DALI

SIÇAN BEYİNLERİNDE METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN
FOLİK ASİT YETERSİZLİĞİ SONUCUNDA BOZULAN
HİPOKAMPAL NÖROGENEZE HİPERBARİK OKSİJEN
UYGULAMASININ ETKİSİ

Hazırlayan
Zeynep IŞIK

Danışman
Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ

Yüksek Lisans Tezi

Kasım 2023
KAYSERİ

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
NÖROBİLİM ANABİLİM DALI

SIÇAN BEYİNLERİNDE METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN
FOLİK ASİT YETERSİZLİĞİ SONUCUNDA BOZULAN
HİPOKAMPAL NÖROGENEZE HİPERBARİK OKSİJEN
UYGULAMASININ ETKİSİ

Yüksek Lisans Tezi

Hazırlayan
Zeynep IŞIK

Danışman
Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2023-12688 nolu proje ile desteklenmiştir.

Kasım 2023
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: Zeynep IŞIK

İmza:

X X X X

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“ Sıçan Beyinlerinde Metotreksat İle Oluşturulan Folik Asit Yetersizliği Sonucunda Bozulan Hipokampal Nörogeneze Hiperbarik Oksijen Uygulamasının Etkisi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Zeynep IŞIK

Danışman

Prof. Dr.Feyzullah BEYAZ

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr.Fusun Ferda ERDOĞAN

KABUL ve ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ danışmanlığında **Zeynep IŞIK** tarafından hazırlanan “**Sıçan Beyinlerinde Metotreksat İle Oluşturulan Folik Asit Yetersizliği Sonucunda Bozulan Hipokampal Nörogeneze Hiperbarik Oksijen Uygulamasının Etkisi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitüsü Nörobilim Anabilim Dalında **Yüksek Lisans tezi** olarak kabul edilmiştir.

24.11.2023

JÜRİ

İmza

Danışman : Prof. Dr.Feyzullah BEYAZ

Üye : Prof. Dr. Ebru KARADAĞ SARI

Üye : Doç. Dr. Gökhan Ünal

ONAY

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

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

Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bu tez projesinin planlanması, yürütülmesi ve yazılması hususlarında göstermiş olduğu destek ve Nörobilim alanında ufkumu açan değerli tez danışmanım Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ'a,

Tez çalışmamın metotrexate uygulaması aşamalarında yardımcı olan DEKAM sorumlusu Dr. Mustafa ERMİŞ'e, Hiperbarik oksijen uygulaması aşamasında bizden desteğini esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Mehmet Akif BAKTİR'a,

Çalışkanlığını ve bilime olan bakış açısını daima örnek aldığım Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitü Nörobilim Anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Füsün Ferda Erdoğan'a

Nörobilim alanına olan ilgimi arttıran, çalışma stiline hayran olduğum, her zaman yanımda olduğunu hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Münire Özlem ÇEVİK'e,

Tez çalışmamız boyunca benden desteğini esirgemeyen, bu zorlu yolu paylaştığım arkadaşım Psikolog Aysun ÇELİK'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca sürecimi kolaylaştırmama yardımcı olan Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitü sekreteri Caner GÖKDEMİR'e

Deneyleri titizlikle takip eden Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitü Yüksek Lisans öğrencisi Emel ÇOLAK'a, Anatomi Doktor Fatma KÖSE'ye, Gevher Nesibe Genom ve Kök Hücre Enstitü Doktora öğrencisi Begüm Fatma KIRYAR'a

Başta annem Necla IŞIK ve merhum babam Ekrem IŞIK olmak üzere bana her zaman inanan, her daim yanımda olduklarını hissettiren, benden desteklerini esirgemeyen, motive olmamı sağlayan aileme,

Bu süreç boyunca yanımda olan, düştüğümde beni kaldıran dostum Gülseren BİLGİÇ'e, en içten teşekkürlerimi borç bilirim.

Zeynep IŞIK, Kayseri 2023

SIÇAN BEYİNLERİNDE METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN FOLİK ASİT YETERSİZLİĞİ SONUCUNDA BOZULAN HİPOKAMPAL NÖROGENEZE HİPERBARİK OKSİJEN UYGULAMASININ ETKİSİ

Zeynep IŞIK

Erciyes Üniversitesi

Nörobilim Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Kasım 2023

Danışman: Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ

ÖZET

Nörogenez, embriyonik ve prenatal dönemde beyinde nöral kök hücrelerden işlevsel nöron oluşmasını ifade eder. Yetişkin nörogenezi hipokampusun Dentat Girus'unda ve Subventriküler zone'da gerçekleşir. Hipokampus DG'a sürekli yeni nöronların katılması sonucu hafızadan sorumlu nöral ağ sürekli değişir. Hafızadan sorumlu nöral ağın dinamik yapısı nörogenez hızı ve hipokampusla ilişkili davranışlardan etkilenir. Folik asit, nörogenezi ve programlanmış hücre ölümünü düzenlemede önemli rol oynar. Metotreksat (MTX), reversibl olarak dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek folik asidin tetrafolik aside dönüşümünü engeller. MTX, hastaların bilişini olumsuz yönde etkileyen kanserleri tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Hiperbarik oksijen tedavisi için terapötik etki mekanizmaları, hem O₂'nin kısmi basıncının hem de hidrostatik basıncı n yükselmesine dayanır. Yapılan çalışmalarda hiperbarik oksijen tedavisinin nörogenezi arttırdığı ve buna bağlı olarak merkezi sinir sistemi hasarı sonrası fonksiyonel sonucu iyileştirebileceği öne sürülmüştür. Hiperbarik oksijen, hafızayı geliştirebilen nöroprotektif etkilere sahiptir. Bu çalışmada, MTX kemoterapisinin neden olduğu bilişsel ve hipokampal nörogenez değişikliklerinde hiperbarik oksijen tedavisinin etkisini inceledik. Bu çalışmada 28 adet Sprague Dawley erkek sıçan (180-200 gr, 1 aylık) kullanıldı. Sıçanlar rastgele ve eşit olarak; Saline grubu, MTX grubu, MTX+Hiperbarik oksijen grubu ve Hiperbarik oksijen grubu olarak 4 gruba ayrıldı. Çalışmanın 8. Ve 15. Günlerinde intraperitoneal olarak 25 mg/kg MTX verildi, MTX+Hiperbarik oksijen grubunda ilaç uygulamasından sonra 15 gün Hiperbarik oksijen uygulandı. Hiperbarik oksijen tedavi grubunda ise 30 gün boyunca Hiperbarik oksijen uygulandı. Hipokampal dentat girusun subgranüler bölgesindeki (SGZ) Ki67 (çoğalan hücreler), Nestin (hayatta kalma hücreleri), doublecortin (olgunlaşmamış nöronlar, DCX) ve NeuN pozitif hücrelerin miktarı belirlendi. SGZ'deki biliş azalmalarının, çoğalan ve hayatta kalan hücrelerin sayısı ile olgunlaşmamış nöronların birlikte tedavi gruplarında iyileştiğini bulduk; bu, hiperbarik oksijen tedavisinin yetişkin sıçanlarda MTX tarafından indüklenen hafıza ve hipokampal nörojenez bozukluklarını önleyebileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Nörogenez, Hiperbarik Oksijen Tedavisi, Metotreksat, Folik Asit, Hipokampal Erişkin Nörogenez

**THE EFFECT OF HYPERBARIC OXYGEN ADMINISTRATION ON
HIPPOCAMPAL NEUROGENESIS IMPAIRED BY METHOTREXATE-
INDUCED FOLIC ACID DEFICIENCY IN RAT BRAINS**

Erciyes University

Department of Neuroscience, Master's Thesis, November 2023

Counselor: Prof. Dr. Feyzullah BEYAZ

ABSTRACT

Neurogenesis refers to the formation of functional neurons from neural stem cells in the brain during the embryonic and prenatal period. Adult neurogenesis takes place in the Dentate Gyrus of the hippocampus and the Subventricular zone. The neural network responsible for memory is constantly changing as a result of the continuous addition of new neurons to the hippocampus DG. The dynamic structure of the neural network responsible for memory is influenced by the rate of neurogenesis and hippocampus-related behaviors. Folic acid plays an important role in regulating neurogenesis and programmed cell death. Methotrexate (MTX) reversibly inhibits the conversion of folic acid to tetrafolate acid by inhibiting the enzyme dihydrofolate reductase. MTX is a chemotherapeutic drug commonly used to treat cancers that adversely affect patients' cognition. The therapeutic mechanisms of action for hyperbaric oxygen therapy are based on an increase in both the partial pressure of O₂ and hydrostatic pressure. Studies have suggested that hyperbaric oxygen therapy increases neurogenesis and may therefore improve functional outcome after central nervous system injury. Hyperbaric oxygen has neuroprotective effects that may improve memory. In this study, we examined the effect of hyperbaric oxygen treatment on MTX chemotherapy-induced changes in cognitive and hippocampal neurogenesis. 28 male Sprague Dawley rats (180-200 g, 1 month old) were used in this study. The rats were randomly and equally divided into 4 groups as Saline group, MTX group, MTX+Hyperbaric oxygen group and Hyperbaric oxygen group. On the 8th and 15th days of the study, 25 mg/kg MTX was administered intraperitoneally, and in the MTX+Hyperbaric oxygen group, hyperbaric oxygen was administered for 15 days after drug administration. In the hyperbaric oxygen treatment group, hyperbaric oxygen was applied for 30 days. The amount of Ki67 (proliferating cells), Nestin (survival cells), doublecortin (immature neurons, DCX) and NeuN positive cells were determined in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus. We found that cognition reductions in the SGZ, the number of proliferating and surviving cells, and immature neurons were improved in the co-treatment groups, suggesting that hyperbaric oxygen treatment may prevent MTX-induced memory and hippocampal neurogenesis impairments in adult rats.

Keywords: Neurogenesis, Hyperbaric Oxygen Therapy, Methotrexate, Folic Acid, Hippocampal Adult Neurogenesis

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
KABUL ve ONAY SAYFASI.....	iii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Hipokampus.....	6
2.1.1. Hipokampal Yapı ve Devre	6
2.1.2. Öğrenme ve Hafızada Hipokampusun Rolü	7
2.2. Nöral Progenitör Hücre	8
2.2.1. Yetişkin Nöral Progenitör Hücreleri.....	9
2.3. Nörogenez	9
2.3.1. Nörogenezin Düzenlenmesi.....	10
2.4. Yetişkin Beynindeki Nörojenik Nişler	11
2.4.1. Subventriküler Nörojenik Niş.....	11
2.4.2. Hipokampal Nörojenik Niş.....	15
2.5. Hipokampal Nörojenik Niş'in Mekanizması	16
2.6. DG'nin SGZ'sinde Yetişkin Nörogenezinin Epigenetik Düzenlenmesi	17
2.7. Nörogenezin Saptanmasında Kullanılan Belirteçler	18
2.7.1. Çift Kortin Belirteci (Doublecortin-DXC).....	18
2.7.2. Nöronal Çekirdek Belirteci (NeuN)	19
2.7.3. Nestin	19
2.7.4. Glial Fibril Asit Proteinini.....	19
2.8. Folik Asit.....	20

2.9. Metotreksat	20
2.9.1. Metotreksatın Mekanizması.....	20
2.9.2. Metotreksat toksisitesi	22
2.9.3. MTX nörotoksitesitesi	22
2.10. Hiperbarik Oksijen Tedavisi.....	23
2.10.1. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Tarihçesi	23
2.10.2. Oksijenin Organizmadaki Fizyolojik Rolü	24
2.10.3. Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Prensipleri	24
2.10.4. HBO tedavisinin yan etkileri	25
2.10.5. HBO tedavisi ve nörojeniz	25
3.GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereçler	27
3.1.1. Demirbaş malzemeler Aletler	27
3.1.2. Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler	28
3.2. Deneyel Prosedür	29
3.2.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi.....	29
3.2.2. Hiperbarik Oksijen Tedavisi:.....	30
3.3. Histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için doku örneklerinin alınması	30
3.3.1. Nisli boyama yöntemi (Krezil viyole boyama yöntemi)	30
3.3.2. İmmünohistokimyasal analiz (Strep-avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immünoperoksidaz tekniği)	30
3.4. İmmünohistokimyasal boyamanın kalitatif değerlendirmesi	31
3.5. İmmünohistokimyasal boyamanın kantitatif değerlendirmesi	32
4.BULGULAR	33
4.1. Histolojik bulgular	33
4.2. İmmünohistokimyasal bulgular.....	37
4.2.1. Nestin immunreaktivitesi	37
4.2.2. Doublekörtin immunreaktivitesi:	45
4.2.3. Ki67 immunreaktivitesi.....	50
4.2.4. NeuN immunreaktivitesi:	54
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	58

6. KAYNAKLAR	61
--------------------	----

EKLER

ÖZGEÇMİŞ



KISALTMALAR ve SİMGELER

AICAR	: 5-aminoimidazol 4-karboksamid ribonükleotid
BDNF	: Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BrdU	:5-bromo-2'-deoksiüridin
CREB	: cAMP-yanıt elemanı-bağlayıcı
DCX	: Mikrotübül ilişkili protein
DG	: Dentat Girus
DHF	: Dihidrofolat
DHFR	: Dihidrofolat redüktaz
dTMP	: 2-deoksitimidin-5-monofosfat
dUMP	: 2-deoksiüridin-5-monofosfat
EGL	: Dış granüler tabakası
EHN	: Erişkin hipokampal nörogenez
EkGH	: Erişkin kökenli granül hücreler
ERK	: Fosfo-hücre dışı sinyal düzenlemeli kinaz
GABA	: Gamma-aminobütirik asit
GFAP	: Glial fibrilik asit protein
GHK	: Granül hücre katmanı
GK	: Glomerüler katman
HAT	: Histon asetiltransferazlar
HBO₂	: Hiperbarik Oksijen
HBOT	: Hiperbarik oksijen tedavisi
HDAC	: Histon deasetilazlar
HIF	: Hipoksi ile indüklenebilir faktörler
IL	: Interlökin
IP	: İntraperitoneal
iPSC	: İndüklenmiş pluripotent kök hücrelerin
IT	: İventratekal

KMP	: Kemik morfogolik proteinler
LTP	: Uzun süreli potansiyasyon
MEK1/2	: Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
MSS	: Merkezi sinir sistemi
MTX	: Metotreksat
NeuN	: Nöronal Çekirdek Belirteci
NeuroD1	: Nöronal farklılaşma 1
NKH	: Nöral kök hücreler
NPH	: Nöral progenitor hücreler
OB	: Olfactor Bulbusa
PRMT1	: Protein arginin N-metiltransferaz 1
PSS	: Periferik sinir sistemi
RGA	: Rostral göç akımı
RGL	: Radial glia benzeri
RNS	: Reaktif nitrojen türleri
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SGZ	: Subgarnüler zone
Sox 2	: Cinsiyet belirleyici bölge Y-box 2
SVZ	: Subventriküler zone
THF	: Tetrahidrofolat
TrKB	: Tropomiyozin reseptör kinaz B
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VPA	: Kalproik asit
VZ	: Ventriküler zone

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1.** Yetişkin dentat girusundaki yeni doğan nöron seviyelerinin artması veya azalması ile ilişkili olduğu gösterilen hipokampal nörogenезin temel düzenleyicileri gösterilmiştir..... 11
- Şekil 2.2.** Yetişkin fare beynindeki nörojenik nişler. 14
- Şekil 4.1.** Hipokampüsün histolojik genel görünümü. DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı; P; Polimorfik katman, Nisll boyaması, Bar; 200 µm. 34
- Şekil 4.2.** Hipokampüste Dentat girusun (DG) histolojik genel görünümü. CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı, P; Polimorfik katman, H; Hilus, Nisll boyaması, Bar; 100 µm..... 34
- Şekil 4.3.** Hipokampüste Dentat girusun (DG) yakın histolojik genel görünümü. M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı, P; Polimorfik katman, Nisll boyaması, Bar; 20 µm. 35
- Şekil 4.4.** Hipokampüste Dentat girusun (DG) histolojik genel görünümü. CA; Kornu ammonis, Nisll boyaması, Bar; 100 µm..... 35
- Şekil 4.5.** Hipokampüste CA3b (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar (siyah oklar), Nisll boyaması, Bar; 20 µm. 36
- Şekil 4.6.** Hipokampüste CA3a (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar, Nisll boyaması, Bar; 20 µm. 36
- Şekil 4.7.** Hipokampüste CA1 (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar (siyah oklar), Nisll boyaması, Bar; 20 µm. 37
- Şekil 4.8.** Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm. 38
- Şekil 4.9.** Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm. 39
- Şekil 4.10.** Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm..... 39

Şekil 4.11. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.	40
Şekil 4.12. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusünün CA3 bölgesinde nestin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.	40
Şekil 4.13. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.	41
Şekil 4.14. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.	41
Şekil 4.15. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusün'de CA2 bölgesinde nestin immunreaktivitesi, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.	42
Şekil 4.16. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampusün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.	42
Şekil 4.17. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampusün'de CA2 bölgesinde zayıf nestin immunreaktivitesi, DAB, Bar; 50 µm.	43
Şekil 4.18. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampusün'de CA2 bölgesinde zayıf nestin immunreaktivitesi, DAB, Bar; 20 µm.	43
Şekil 4.19. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampusün'de CA3 bölgesinde nestin immunreaktivitesi, DAB, Bar; 20 µm.	44
Şekil 4.20. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampusün'de CA2 bölgesinde nestin immunreaktivitesi, DAB, Bar; 20 µm.	44
Şekil 4.21. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusün'de doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.	46
Şekil 4.22. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusünün DG'da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.	46

Şekil 4.23. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünün DG'da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.....	47
Şekil 4.24. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünün DG'da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.....	47
Şekil 4.25. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.....	48
Şekil 4.26. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde GD'da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.....	48
Şekil 4.27. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde GD'da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.....	49
Şekil 4.28. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde GD'da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.....	49
Şekil 4.29. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.....	51
Şekil 4.30. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.....	51
Şekil 4.31. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.....	52
Şekil 4.32. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.	52
Şekil 4.33. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.	53

Şekil 4.34. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.....	53
Şekil 4.35. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.....	54
Şekil 4.36. Saline Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde NeuN immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.....	55
Şekil 4.37. Saline Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde NeuN immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.....	56
Şekil 4.38. Hiperbarik Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde NeuN immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.....	56
Şekil 4.39. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde NeuN immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.	57
Şekil 4.40. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde NeuN immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.....	57

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nörogenez, embriyonik ve prenatal dönemde beyinde nöral kök hücrelerden işlevsel nöron oluşmasını ifade eder. Bu süreç beyinde spesifik bölgelerde gerçekleşir. Bu bölgeler, hipokampüste dentat girusun subgranuler bölgesi ve lateral ventriküllerin subventriküler bölgesidir (Kaptan ve Üzümlü, 2016). Subventriküler zone’de üretilen olgunlaşmamış nöronlar uzun mesafelere göç ederek olfaktor bulbusta granüler nöronlar ve periglomeruler nöronlara dönüşür. Bunun yanı sıra, subgranuler zone’daki nöral kök hücre popülasyonundan üretilen yeni nöronlar, DG’un granüler hücre katmanına göç eder ve dentat granüler hücre haline gelirler (Zhao ve ark., 2008). Yapılan çalışmalarda subventriküler zone’dan kaynaklanan nöronların diğer memelilerde olfaktor bulbusta entegre olduğu, insanlarda ise bu nöronların subventriküler zone’a bitişik striatuma entegre oldukları bildirilmiştir (Kaptan ve Üzümlü, 2016).

Metodolojideki ilerlemelerle birlikte, neredeyse tüm memelilerde yaşam boyu nörogenez tanımlanmıştır. (Yücel ve ark., 2020). Yetişkin memeli beyinde nörogenezin gerçekleştiğine dair elde edilen sonuçlar nörobilim alanında önemli bir adımdır. Hipokampus öğrenme ve hafıza konusunda kritik bir role sahiptir, aynı zamanda yetişkin nörogenezini hipokampüste gerçekleştirir. Bu sebeple nörogenezin hipokampus fonksiyonundaki önemi dikkat çekiyor. Hafızadan sorumlu sinir ağı, hipokampus DG’sine yeni nöronlar katıldıkça sürekli değişmektedir. Bu yüzden hipokampus ve DG dinamik bir yapılanmaya sahiptir. Hafızadan sorumlu sinir ağının dinamik yapısı, nörogenez hızından ve hipokampusla bağlantılı olan davranışlardan etkilenmektedir (Gonçalves ve ark., 2016).

Yetişkin kökenli DG granül nöronları, hipokampal devreye işlevsel olarak entegre olabilmesi için gelişimsel sırasıyla bir dizi aşamadan geçmesi gerekir. Nöral kök hücre’de devam eden proliferasyon sürecinin nasıl regüle edildiğine dair farklı sinyal

mekanizmaları ve yerel sinaptik bağlantıları saldığı nörotransmitterler üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu alışmalar sonucunda Nöral kök hücrelerin özelleşme aşaması Tip-1'den Tip-2 hücreye, Tip-2'den Tip-3 hücreye ve en sonunda olgunlaşmış granül hücrelerine dönüşme basamaklarını içerdiğini göstermiştir (Song ve ark., 2012).

Tip-1 progenitor hücreleri gene benzer bir somaya ve tek bir apikal hücre çıkıntısına sahiptir. Bu tek çıkıntı moleküler katmana ulaştığında birden çok dala ayrılır. Tip-1 hücre aşamasında, hücreye özgü birden çok sinyalleşme molekülü mevcuttur. Bu moleküllerden kemik morfogenik proteinler (KMP) kök hücre olgunlaşmasının hızını düzenlemekle görevlidir. Notch sinyali, Nöral kök hücrelerin (NKH) proliferasyonunu pozitif yönde etkileyerek Tip-1 hücrelerin sayısının artmasını sağlar. Bu aşama ilerledikçe SGZ'nin kalsiyum-bağlayıcı protein (parvalbumin) ifade eden internronları gamma-aminobtrik asit (GABA) salarak SGZ Tip-1 progenitor hücrelerinin GABAAR reseptörlerini aktive eder ve Tip-1 hücrelerin çoğalmasını durdurur (Abbott ve Nigussie., 2020; Gonçalves ve ark., 2016). Bu hücreler nestin, glial fibriler asidik protein (GFAP) ve Sry ile ilişkili yüksek mobilite grubu (HMG) kutu transkripsiyon faktörü Sox2'yi eksprese eder. Astrosit belirteci GFAP'yi eksprese etmelerine rağmen, bu hücreler morfolojik ve fonksiyonel olarak olgun astrositlerden farklıdır (Zhao ve ark., 2006).

Tip-1 hücrelerinin Tip-2 hücrelere dönüşmesinin erken aşamalarında glia hücre fenotipe sahiptir. Bu nedenden dolayı Tip-2 hücreler, Tip-2a ve Tip-2b hücreler olarak kategorize edilir. Tip-2b hücreler daha fazla nöral karakteristiğine ait özellikler gösterir (Jin ve ark., 2016; Kempermann ve ark., 2015). Bu erken dönem hücrelerin plazma zarlarında GABA reseptörleri olmasına rağmen GABAerjik sinaptik girdilere karşılık herhangi bir sinaptik yanıt üretemezler (Jin ve ark., 2016). Bu bağlamda GABAerjik sinyallerin hücrelerin aktivitesini inhibe etmek için değil, Tip-2 hücrelerin nörona doğru farklılaşma yoluna girdiği düşünülebilir (Dieni ve ark., 2013). Tip 2 hipokampal progenitorler sadece kısa süreçlere sahiptir ve GFAP'yi eksprese etmezler (Aydın, 2021). Tip 2 hücreler tip 1 hücrelerden kaynaklanabilir, ancak bu soy ilişkisini tanımlayan doğrudan kanıtlar hala eksiktir. Yapılan bir çalışma, tip 2 Sox2-pozitif hücrelerin kendi kendini yenileyebildiğini ve tek bir Sox2-pozitif hücrenin bir nöron ve bir astrosite yol açabileceğini ve

hipokampal nöral progenitörlerin kök hücre özelliklerinin ilk in vivo kanıtını sağladığını göstermiştir (Zhao ve ark., 2006).

Bu erken hücrenin hayatta kalma aşaması kemirgenlerde yaklaşık 2 hafta sürer (Jin ve ark., 2016). Tip-2b hücreleri nöroblast ya da tip-3 hücreye dönüşme yolunda farklılaşmaya devam eder. Bu hücreler farklılaşma aşamalarında morfolojik, elektrofizyolojik ve gen ifadesini içeren değişiklikler sayesinde DG hücreleri ile ilişkilendirilen karakteristik özellikler kazanırlar (Llorens ve ark., 2015). Tip-3 hücreler SGZ'ye teğet bir şekilde uzanan yönünü daha dik bir konuma getirir. Bu sayede somanın tepesindeki dendritler dentat moleküler katmanına doğru yönelebilir. Aksonlar ise somanın altından dentat hilusa ve sonunda CA3 primidal hücre katmanına uzanır (Danzer ve ark., 2008).

Diyet folik asit, sinir sisteminin normal gelişimi için gereklidir. Folik asit nörogenezi ve programlanmış hücre ölümünü düzenlemede önemli roller oynar. Örneğin, folat eksikliği olan maternal diyetler, fetal farelerin ön beyninin telensefalik kısmında nörogenezin azalmasına ve apoptozun artmasına neden olur (Zhang ve ark., 2013). Yapılan araştırmalar, yeterli miktarda tüketilen folik asit ile hafıza gelişimi arasında ilişki bulunmuştur. Kanlarında düşük folat seviyesine rastlanan insanlar ve farelerde, bilişsel işlevlerde azalma gözlenmiştir. Yüksek dozda folik asit, yaşlanmanın bilişsel gerilemesini yavaşlatmaya yardımcı olabilir. Folik asit, embriyonik nöral tüp eksplantlarında nöroepitel hücre büyümesini arttırdığından, fetal veya yenidoğan sıçan beyinlerinden kültürlenmiş nöroprogenitör hücreler, folik aside artan proliferasyonla yanıt verdiği için, çoğalan nöral progenitör hücre'lerden yeni hipokampal nöronların oluşumu bu rolün altında yatıyor olabilir. Folik asit, yetişkin farelerin hipokampusundaki nöroprogenitör hücrelerin çoğalmasını inhibe ettiği için, yetişkinlerde nöroprogenitör hücre proliferasyonu için önemlidir (Zhang ve ark., 2013).

Metotreksat (MTX), dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek folik asidin tetrafolik aside dönüşümünü geri dönüşümlü olarak engeller. Tetrafolat enziminin inhibisyonu DNA, RNA ve ATP sentezi için ihtiyaç duyulan pürin bazlarının (adenin-guanin) sentezinin sonlanmasına neden olur ve protein sentezini baskılar. Böylelikle DNA sentezi ve hücre yenilenmesi için zorunlu olan deoksiüridilatın

timidilata dönüşümü kısıtlanır. MTX S evresi hücrelerde çok daha etkindir. MTX 5-aminoimidazole4-carboxamide ribonükleotide transformilaz gibi folat bağımlı diğer enzimleri de inhibe ederek, adenosin birikimi ile lenfosit proliferasyonu, interlökin (IL) IL-1, interferon- γ ve tümör nekrozu faktörü- α gibi enflamatuvar sitokinlerin salınımını, polimorfonükleer hücrelerden serbest radikal oluşumu, bu hücrelerin adezyonunu ve nötrofil kemotaksisini baskılayarak anti-enflamatuvar etki oluşturur (Şentürk, 2016). Önceki çalışmalar, MTX'ın yeni bellek oluşumunun bozulmasına, konsantrasyon kaybına ve genel kafa karışıklığına yol açan bellek açıklarını indüklediğini bildirmiştir. Bu semptomlar, hipokampal DG'un SGZ'sindeki nörogenezdeki azalma ile ilişkilidir. MTX , folat metabolizmasında dihidrofolat redüktaz, Aminoimidazol karboksamid ribonükleotid transferaz ve Timidin sentaz gibi enzimlerin inhibitörü olarak işlev görür. Bu enzimlerin aşağı regülasyonu, hipokampusta hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve farklılaşma dahil olmak üzere nörogenezi bozan pürin ve pirimidin sentezi üzerinde olumsuz etkilere sahiptir. Ek olarak, MTX, yukarıda bahsedilenler gibi çeşitli hipokampal nörogenez tiplerini engelleyen oksidatif stres ve DNA hasarını indükler. MTX, hipokampal nörogenez ile ilgili anormallikleri indüklediğinden, hipokampusa bağlı hafıza üzerinde olumsuz bir etkisi vardır (Sirichoat ve ark., 2019).

Hiperbarik oksijen tedavisi (HBOT) için terapötik etki mekanizmaları, hem O₂'nin kısmi basıncının hem de hidrostatik basıncın yükselmesine dayanır. Erişkinlerde merkezi sinir sistemi yaralanması ile başlayan nörogenez, otolog bir onarım mekanizması sunar. Bir çalışmada hiperbarik oksijen tedavisinin nörogenezi arttırdığı ve buna bağlı olarak merkezi sinir sistemi hasarı sonrası fonksiyonel sonucu iyileştirebileceği öne sürülmüştür, hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIF'ler) ve cAMP yanıt elemanı bağlama dahil olmak üzere hücrel transkripsiyon faktörleri üzerinde Hiperbarik oksijen tedavisi'nin varsayımsal mekanizması gösterilmiştir. Çeşitli dokulardaki yüksek O₂ kısmi basınçları, hiperoksi nedeniyle reaktif O₂ türlerinin (ROS) ve ayrıca reaktif azot türlerinin (RNS) üretimini artırır (Mu ve ark., 2011). Çoğu kontrollü çalışma, Hiperbarik oksijen'den (HBO₂) klinik etkinliğini, hücre içi transdüksiyon kaskadlarının modülasyonundan kaynaklandığını, büyüme faktörlerinin sentezine yol açtığını ve yara iyileşmesini teşvik ettiğini ve iskemik sonrası ve post-inflamatuvar yaralanmaları iyileştirdiğini doğrulamıştır. Yakın

zamanda yapılan bir çalışmada, hipoksik iskemik yenidoğan sıçanlar için Hiperbarik oksijen tedavisi, SVZ'de ve hipokampal DG'ta endojen nöronal kök hücrelerin nörogenezini teşvik ederek hem 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) hem de doublecortin'deki bir artışla ölçüldü. Bu sonuca göre hiperbarik oksijen tedavisi öğrenme ve hafızada gelişim sağladı, bu sonuç hipokampal nörogenezin gelişimiyle ilgilidir. Bu sonuçlar, hipokampal DG bölgesinde nestin ve BrdU'daki bir artış ve SVZ'de Wnt-3 ve nestinin yükselmesi ile ortaya konduğu gibi, hiperbarik oksijen tedavisi'nin nöronal hücre proliferasyonunu indüklediği başka bir çalışma ile daha da desteklenmiştir. Hiperbarik oksijen tedavisi'nin Tramvatic kafadan iyileşmeye mekanik katkısını incelemeyi amaçlayan bir çalışmada, Hiperbarik oksijen tedavisi'nin nöronal kök hücre proliferasyonunu ve lezyon bölgesine göçü, ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörü VEGFR-2, Raf-1, Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz (MEK1/2) ve fosfo-hücre dışı sinyal düzenlemeli kinaz (ERK) 1/2 protein seviyelerini arttırdığı bulunmuştur. Buna göre, Hiperbarik oksijen tedavisi'nin VEGF/ERK sinyalleme yoluyla nöronal kök hücre proliferasyonunu ve muhtemelen anjiyogenezi desteklediği öne sürülmüştür. Dahası, Vasküler disfonksiyon için bir sıçan modelinde, Hiperbarik oksijen tedavisi ayrıca piriform kortekste nörogenezini uyardı ve kan akışını iyileştirdi. Hiperbarik oksijen tedavisi'nin ayrıca kemik iliği kök hücrelerinin iskemik bir alana mobilizasyonunu ve beyin ve nöronal iyileşmeyi teşvik edebilecek ve nörojenezini artırabilecek trofik faktörlerin salınımını arttırdığı gösterilmiştir. İlginç bir şekilde, akut karbon monoksit zehirlenmesinden sonra gecikmiş ensefalopatisi olan hastalarda, Hiperbarik oksijen tedavi, periferik kanda dolaşan kök hücreleri harekete geçirdi ve bu da gelişmiş biliş ile ilişkili bulunmuştur (Gottfried ve ark., 2021).

Yukarıdaki verilerden yola çıkarak bu çalışmada sıçanlarda MTX'i kullanarak folik asidin tetrafolik aside dönüşümünü engellenilecek. MTX ile oluşturulan folik asit eksikliği modelinde, hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve hipokampal nörogenezde yer alan olgunlaşmamış nöronlarla ilişkili biliş üzerindeki dezavantajlarının ve ayrıca hiperbarik oksijen tedavisinin nöroprotektif etkilerinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipokampus

Hipokampus öğrenme, hafıza ve biliş için kritik öneme sahiptir (Zeidman ve Maguire, 2016). Temporal lobun medial kısmında bulunan hipokampus, lateral ventrikülün temporal hornu ile yakın bulunmaktadır. Hipokampus hafıza, yön bulma, konumlanma ve duygulanımda önemli bir görev üstlenir. Lateral ventrikülün temporal hornu boyunca uzanan gri bir cevher tabakasıdır ve 5-8 cm uzunluğundadır. Hipokampüsteki nöral plastisite yaşam boyunca sürer. Hipokampus, singulat girus, hipotalamus ve amigdala birlikte “Limbik sistem”i meydana getirir (İzci ve Erbaş, 2015).

2.1.1. Hipokampal Yapı ve Devre

Öğrenme ve hafızada görev alan hipokampal sistemi meydana getiren subiculum ve entorhinal korteks ile beraber DG ve Cornu ammonis CA alanları gibi morfolojik olarak bir çok farklı alandan oluşan at nalı şeklinde bir yapıdır. Hipokampüste bilgiyi işlemek için monosinaptik ve trisinaptik devre olmak üzere iki devre vardır (Yılmaz, 2023).

Entorhinal korteksin ana çıktı noktası hipokampal formasyon ve birincil monosinaptik hedefi DG’dir. Monosinaptik devrede, entorhinal korteksten alınan bilgiler DG’den geçmeden doğrudan CA1 veya CA3 bölgelerine uzanır. Entorhinal korteksin üst katmanında bulunan nöronlar trisinaptik devrenin başlangıç adımını oluşturur. Trisinaptik devre, sırasıyla perforan yolak, yosunsu lifler ve Schaffer kollateral liflerinden oluşmaktadır. Perforan yolağı oluşturan entorhinal korteks tabaka II nöronları, DG granüler hücreleri ile CA3 piramidal hücrelerinin distal

dentritlerine sinaps kurar. Medial entorhinal nöronlar, medial perforan yolağı; IEK nöronları ise lateral perforan yolağı oluşturur (Amaral ve Lavenex, 2006).

Perforan yolun iki bileşeni olup, medial bileşen NMDAR'ın aracılık ettiği uzamsal bilgi işlemeden sorumluyken, lateral bileşen opioid reseptörlerinin aracılık ettiği uzamsal olmayan görsel nesne bilgisini işler. Sonunda hem trisinaptik hem de monosinaptik devreler, bilginin nihayet uzun süreli bellek temsilleri olarak birleştiği çeşitli kortikal alanlara doğrudan veya entorhinal korteksin V. katmanı yoluyla ortak bir hipokampal çıktı yapısı (CA1) üzerinde birleşir.

DG'deki uyarıcı ve inhibitör internöronlar da devreye katkıda bulunur. Granül hücreleri, hilusta bulunan uyarıcı internöronlar ve özellikle yetişkin hipokampusünde bulunan inhibitör internöronlar tarafından birbirine bağlanır, tekrarlayan inhibisyon sağlamak için GABA salgılar ve böylece nörogenezin düzenlenmesinde rol oynar (Yılmaz, 2023).

DG'un birçok girdi yolu bulunmasına rağmen, aksonları (yosunlu lifler olarak bilinir) sadece CA3 piramidal hücrelerine uzanır. Granül hücrelerinden alınan girdilere ilaveten, CA3 piramidal hücreleri de perforan yol aracılığıyla entorinal korteksten direkt girdi almaktadır. Ayrıca CA3 hücrelerinin kendi içlerinden de tekrarlayan girdileri vardır. Piramidal hücrelerin aksonları schaffer kollaterallerini oluşturarak CA1 bölgesine uzanır (Yılmaz, 2023).

2.1.2. Öğrenme ve Hafızada Hipokampusun Rolü

Hipokampus, epizodik bellek ve uzamsal bellek oluşumunda çok etkili bir oluşumdur (Kaptan ve Üzüm, 2016). Şu anki bilgilerimize dayanarak, öğrenme ve hafıza oluşumundaki hücresel ve moleküler mekanizmalar hipokampüsteki uzun süreli potansiyasyon (LTP) ile açıklanabilmektedir. LTP, presinaptik bir nöron veya nöral yolaktaki nöral aktivite sıklığındaki artışa bağlı gelişen sinaptik bağlantıların gücü ve sayısındaki kalıcı artışı belirtir. Bununla birlikte, giderek yaygınlaşan çalışmalar, öğrenme işlemi sırasında LTP'nin sadece sinaptik bağlantıları güçlendirmekle kalmayıp aynı zamanda hipokampüste yeni nöronların oluşumunu da desteklediğini ortaya koymuştur (Brüel-Jungerman ve ark., 2006). LTP'nin genç nöronlarda olgun nöronlara göre hem daha kolay indüklenmesi hem de daha yüksek genliğe sahip

olması sebebiyle yeni üretilen nöronların hipokampüste sinaptik plastisiteyi artırdığı da rapor edilmiştir (Schmidt-Hieber ve ark., 2004).

Hafızadan sorumlu sinir ağı, hipokampus DG'ye devamlı eklenen yeni nöronların bir sonucu olarak devamlı olarak değişmektedir. Bu sebeple hipokampus ve DG dinamik bir yapıdadır. Hafızadan da sorumlu olan nöral ağın dinamik yapısı, nörojeniz hızından ve hipokampusla ilgili hareketlerden etkilenir. Örnek olarak, öğrenme, egzersiz ve çevresel zenginleştirme nörojenizi artırarak hafızayı güçlendirir. Öte yandan, stres, yaşlanma ve hafıza üzerinde olumsuz etkileri olan birçok hastalık nörojenizi azaltır (Aimone ve ark., 2010)

2.2. Nöral Progenitör Hücre

"Kök hücreler", aynı özelliklere ve potansiyele sahip ilave kök hücreler üreten kendini yenileyen bölünmeler ve birden fazla hücre tipine farklılaşan yavru hücreler üreten bölünmeler geçirme kapasitesine sahiptir. Kök hücreler, bir organizma içindeki tüm hücre tiplerine yol açan "pluripotent öncü hücreler" veya hücre tiplerinin bir alt kümesine farklılaşma kapasitesine sahip "multipotent öncü hücreler" olabilmektedir. Embriyonik katmanlar ve merkezi sinir sistemi (MSS) dokusu gibi spesifik dokular, progenitör hücrelerin hücresel bölünmelerinden gelişmektedir (Martínez-Cerdeña ve Noctor, 2018).

Nöral progenitör hücreler (NPH'ler)" MSS'nin progenitör hücreleridir ve MSS'yi dolduran glial ve nöronal hücre tiplerinin hepsini olmasada çoğunu meydana getirir. NPH'ler, bağışıklık sistemi hücreleri gibi MSS'de de bulunan nöral olmayan hücreleri üretmez. NPH'ler gelişmekte olan embriyoların MSS'sinde bulunur, ancak yenidoğan ve olgun yetişkin beyinde de bulunur ve bu yüzden kesinlikle embriyonik kök hücreler olarak kabul edilmezler. "Embriyonik NPH'ler" sonuçta serebral kortekste olduğu gibi "yetişkin NPH'lere" yol açabilir (Merkle ve ark., 2004). NPH'ler beyindeki konumlarına, morfolojilerine, gen ekspresyon profillerine, zamansal dağılımlarına ve işlevlerine göre tanımlanırlar. Yaygın olarak, embriyonik NPH'ler yetişkin beyindeki NPH'lerden daha fazla potansiyele sahiplerdir. NPH'ler embriyonik kök hücrelerin veya "indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPSC)" farklılaştırılmasıyla in vitro olarak üretilir (Martínez-Cerdeña ve Noctor, 2018).

2.2.1. Yetişkin Nöral Progenitör Hücreleri

NPH'nin yetişkin memeli beyinde tanımlanmış iki niş içinde yer aldığı bilinmektedir: DG'nin "Subgranüler zone (SGZ)" ve olgun serebral korteksin lateral ventriküllerini çevreleyen "yetişkin Subventriküler zone". Yetişkin hayvanların MSS'sinde nöron üretilebilmesi fikri, 1960'larda doğum sonrası kemirgen beyinde nöron üretildiğine ilişkin raporlarla ortaya çıkmıştır. Smart, 3 günlük ve yetişkin farelere timidin-H3 enjekte etmiş ve yenidoğan farelerde subependimal tabakanın yakınında yeni doğmuş nöronlar bulmuştur. Smart aynı zamanda yetişkin beyinde nöron üretimine dair bulgular rapor etmiş ancak serebral kortekste hayatta kalan nöronlara rastlamamış ve yetişkinde yeni doğan nöronların dejenere olduğu kanısına varmıştır (Smart, 1961). Doğum sonrası nörogenez, beyinciğin dış granüler tabakasında (EGL) da meydana gelir. Bu proliferatif bölgelerdeki öncül hücreler, prenatal beyindeki öncül hücrelerden türetilir. Sidman ve meslektaşları serebellar EGL'nin embriyonik serebellar VZ/SVZ'den kaynaklandığını ve postnatal gelişim sırasında nöronlar ürettiğini göstermiştir (Miale ve Sidman, 1961; Sidman ve Rakic, 1973). Benzer şekilde, dentat SGZ'deki NPH embriyonik VZ'den köken alır. Bu bilgiler, yetişkin nöral progenitör hücrelerin, en azından kısmen, yetişkin proliferatif bölgeleri oluşturan embriyonik öncü hücrelerden türediğine dair kanıtlar sunmaktadır (Martínez-Cerdeñ ve Nocter, 2018).

2.3. Nörogenez

Kısa bir süre öncesine kadar sinir sisteminin, özellikle de beyin gelişiminin belirli bir sürede tamamlanıp, sonrasında kendini yenileyebilme özelliğinin kaybolduğu savunulmaktaydı. (Lepousez ve Lledo, 2011). Nörogenez, NKH ve progenitör hücrelerden nöronların üretildiği süreç olarak tanımlanmaktadır (Ming ve Song, 2005). Uzun bir süre nörogenezin doğum öncesi dönemle kısıtlı olduğu düşünülmüş. Yetişkinlerde nörogenez ve nörorejenerasyon olmadığı için yeni sinir hücresi üretiminin olmadığı ve beyinde ölen hücrelerin yerine yeni hücrelerin gelmediği düşünülmüştür (Akins ve Garcia, 2016). 1962'de Altman ilk kez nörogenezin yetişkin sıçan beyinde hipokampusun DG'sinde başladığını ortaya koymuştur (Altman, 1962). Erişkin hipokampal nörogeneze ait ilk raporlar uzun yıllar boyunca bilim camiası tarafından reddedilmiştir. Bu araştırmada sonuçlar, yetişkin sıçan

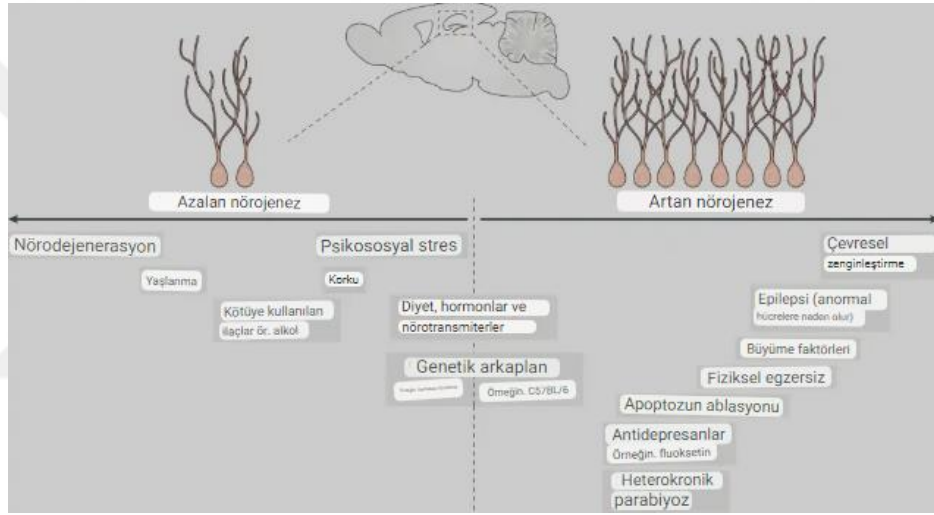
SGZ'sine 3H-timidin'in spesifik olarak dahil edildiğini gösterdi. Böylece yetişkinlerde bu şekilde doğan, çoğalan hücrelerin varlığını açıkça ortaya çıkardılar. O günden bu yana bu nöronların nasıl ve nerede oluşturulduğuna dair geniş miktarda veri üretildi. Bugüne kadar, insanlar da dahil olmak üzere birçok türde doğum sonrası yeni nöronların geliştiği rapor edilmiştir. EHN hipokampusun öğrenme, hafıza ve ruh hali düzenlemesine dahil olması nedeniyle oldukça ilgi çekmiştir ve buraya yeni nöronların eklenmesi tüm nöron devresini yeniden düzenleyebilir (Moreno-Jiménez ve ark., 2020). Erişkin nörojenezi embriyonik gelişimin bir devamı olsa da, benzersiz ve dinamik nörojenik niş ile çevrelenmiş işlevsel olarak olgun bir mikro ortamda meydana gelir (Ming and Song, 2011). Memelilerde yetişkin nörojenezi, NKH'nin bulunduğu farklı bölgelerle sınırlıdır.

Beyinde, yapısal nöron oluşumunun gözlemlendiği iki ana bölge vardır: bu bölgeler hipokampusta DG'un SGZ'si ve lateral ventriküllerin SVZ'sidir (Kaptan ve Üzüm, 2016). SVZ'de üretilen olgunlaşmamış nöronlar uzun mesafelere göç eder ve olfaktor bulbusda çeşitli yerel internöron türlerine dönüşürler. Bunun aksine, SGZ'deki nöral progenitör hücre popülasyonundan üretilen yeni nöronlar, komşu DG'nin granüler tabakasının nöronları olan uyarıcı granüler hücrelere yol açar (Zhao ve ark., 2008). Nörojenez sırasında, yeni oluşan hücrelerin beynin SVZ'sinden olfaktor bulba (OB) göç ettiği görülmüş ve bu yol rostral göç akımı (RGA) şeklinde adlandırılmıştır.

2.3.1. Nörojenezin Düzenlenmesi

Çeşitli şart, faktör ve genetik manipülasyon yetişkin nörojenezini etkileyebilir. Fakat bunlar, NKH'leri içsel olarak mı yoksa hipokampal niş aracılığıyla mı etkilediği tam olarak bilinmemektedir. Farklı genetik sapmaların yanında ilaçlar, stres ve enflamasyon gibi dışsal faktörler de nörojenezin azalmasına etki edebilmektedir (Goncalves ve ark., 2016; Morris ve ark., 2010; Snyder ve ark., 2011). Majör depresyon, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, iskemik inme ve çeşitli nörolojik ve psikiyatrik bozukluklara sahip hayvan modellerinde ve kısmen de insanlardan alınan dokularda değişmiş nörojenez gözlenmiştir (Toda ve ark., 2019). Farmakolojik müdahaleler yoluyla hipokampal nörojenez seviyelerini eski haline veya normal düzeye getirebilmek, nörodejeneratif hastalıklar veya belirli hastalık modellerinde semptomların başlamasını önlemek veya iyileştirmek için yeterli

olabilir. Bu yüzden, nöroenezdeki değişiklikleri hedeflemek, yeni terapötik yaklaşımlar için potansiyel olarak umut vaat edebilir (Cho ve ark., 2015; Li ve ark., 2016; Toda ve ark., 2019). Araştırmacıların elde ettiği farklı türler arasındaki sağlam kanıtlar, ilerleyen yaşla birlikte nöroenezde dramatik bir azalma olduğunu göstermektedir. NKH proliferasyonu, nöronal farklılaşma veya hücre sağkalımı düzeyinde olsun, nöroenezdeki değişiklikleri gözlemleyen çalışmalar, yetişkin nöroenezinin birden fazla düzeyde düzenlendiğini ve aktivasyon ile durgunluk ve farklılaşma ile sağkalım arasındaki dengenin herhangi bir şekilde bozulmasının. sonuç üzerinde zararlı etkileri olabileceğini düşündürmektedir (Denoth-Lippuner ve Jessberger, 2021).



Şekil 2.1. Yetişkin dentat girusundaki yeni doğan nöron seviyelerinin artması veya azalması ile ilişkili olduğu gösterilen hipokampal nöroenezin temel düzenleyicileri gösterilmiştir. Sistemik düzenleyiciler, yetişkin dentat girustaki nörojenik süreci, durgun nöral kök hücreleri aktive etmekten, radyal glia benzeri hücrelerin ve radyal olmayan glia benzeri progenitör hücrelerin çoğalmasını artırmaya veya bozmaya, yeni doğan granül hücrelerinin hayatta kalmasını ve entegrasyonunu değiştirmeye kadar her adımda etkileyebilir (Denoth-Lippuner ve Jessberger, 2021).

2.4. Yetişkin Beynindeki Nörojenik Nişler

2.4.1. Subventriküler Nörojenik Niş

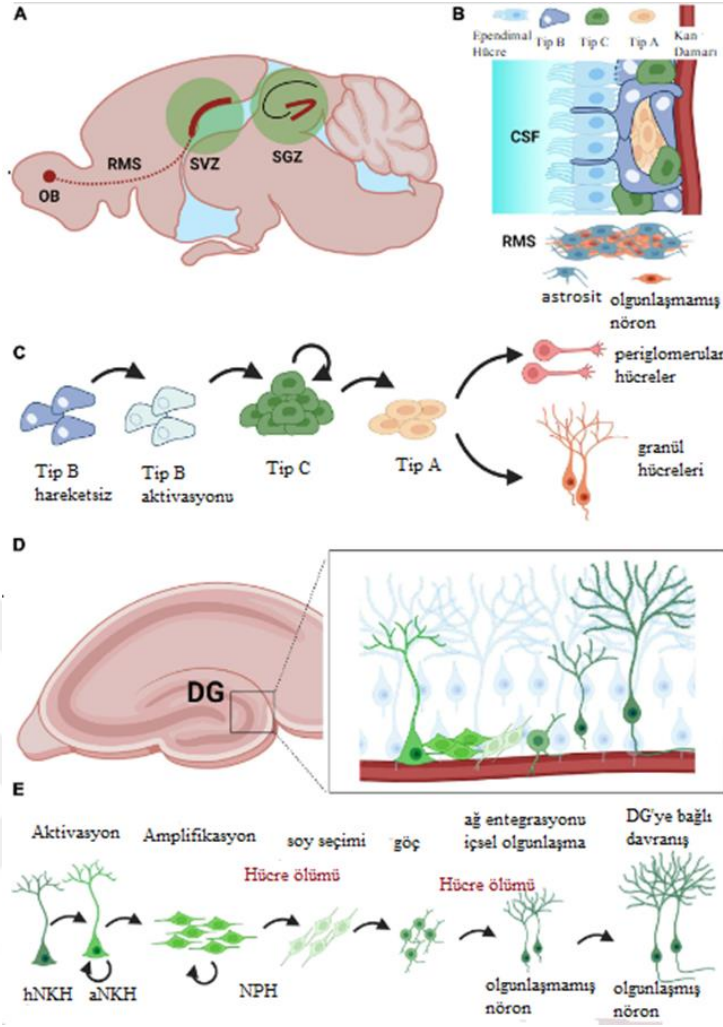
Lateral ventriküllerin SVZ'si, NKH'lerin yaşam boyunca aktive edildiği ve yeni nöronların oluşumuna katkıda bulunduğu belirlenmiş iki bölgeden biridir. Yeni nöronlar kök hücrelerin olgunlaşmamış nöronlara proliferasyonu, soy seçimi, göç, hayatta kalma, entegrasyon ve işlevsel olgunlaşma gibi farklı birçok aşamadan geçer

ve bu aşamalar birbiriyle bağlantılıdır (Ceanga ve ark., 2021). Radyal-glial benzeri morfolojiye sahip olan yerleşik nöral kök hücre olan B tipi hücreleri dinlenme durumundadır ve SVZ'deki kan damarlarıyla birlikte vasküler uçların oluşumunu gösterir. Ayrıca NKH'ler ependimal katman boyunca uzanan ve lateral ventriküllerdeki beyin omurilik sıvısı ile temas eden bir apikal uca da sahiptir (Ahn ve Joyner, 2005; Menn ve ark., 2006). Memeli beyinde yetişkinlik boyunca meydana gelen SVZ'deki nörogenezin, bu bölgedeki koku alma devresinin gelişiminde önemli bir görev aldığı bilinmektedir. Bu nörojenik nişi oluşturan temel NKH'ler tip B1 olarak bilinir. Tip B1 hücreleri astrositlere benzerler ve olfactör bulbus'u oluşturan nöronlara farklılaşırlar (Jurkowski ve ark., 2020).

Tip B1 hücreleri, glial fibriler asidik proteini, glutamat aspartat taşıyıcısını ve beyin lipid bağlayıcı proteinini eksprese eder. SVZ'deki nöron farklılaşması üç aşamaya ayrılır. Bunlardan birincisinde B1 tipi hücreler aktive edildiğinde ya Nestin'i eksprese eder ve kendini yenilemek için asimetric olarak bölünürler ya da achaete-scute homolog 1 ve distalsiz homeobox 2 eksprese eden C hücrelerine yol açarlar. İkinci olarak bu C tipi hücreler simetric olarak iki veya üç kez bölünürler. Bu bölünmenin ardından SVZ'deki nöron farklılaşmasının son aşamasını temsil eden A tipi hücrelere farklılaşır. Son olarak bu A tipi hücreler (nöroblastlar) daha sonra bir veya iki kez bölünür ve RGA boyunca OB'ye doğru göç eder (Leal-Galicia ve ark., 2021). Göç esnasında 30-40 hücrelik zincir grup oluşturular ve hemen hemen 5 gün sonunda nöroblastlar OB'ye ulaşırlar ve RGA'deki zincirden ayrılır ve granül hücre katmanına (GHK) veya glomerüler katmana (GK) ulaşmak için son konumlarına göç etmeye başlar. Astrositlerden bağımsız olarak çalışan OB'deki göç radyal göç olarak sınıflandırılabilir. RGA boyunca nöroblastların göçü teğetsel göç olarak sınıflandırılabilir (Ceanga ve ark., 2021).

Yetişkin nörogenizindeki önemli noktalardan bir diğeri yeni doğan hücrelerin hayatta kalma fonksiyonlarını düzenlenmesidir. Yeterli sayıda OB nöronunun bulunmasını sağlamak amacıyla yeni oluşan bazı hücrelerin ortadan kaldırılması gerekir bu aracı rolüyle hücre programlanmış hücre ölümünü gerçekleştirir ve bu RGA boyunca göçün düzenli sürdürülmesi için kritik öneme sahiptir (Kim ve ark., 2007). Sağ kalan nöroblastlar OB internöronlarının alt türlerinden birine farklılaşır. OB belirli bir düzen içinde oluşmuştur. Mesela, tüy hücreleri koku epitelinde yer alır

ve aksonlarını OB'nin ilk geçiş bölgesi olan glomer llere (GL) gönderir. Her bir tüy hücresi, bir glomerulus ile temsil edilen belirli bir koku reseptörüne sahiptir. Glomerüller, çoğu nörotransmitter gama-amino-bütirik asit (GABA) veya dopamin kullanan periglomerüler intern ronlarla çevrelenmiştir (Lledo ve ark., 2005; Wachowiak ve Shipley, 2006). Tüy hücrelerinden alınan bilgiler glomerüllerde, hücre somataları mitral/tufted hücre katmanında bulunan mitral ve tufted hücrelere taşınır. Her iki hücre tipi de OB'nin ana nöronlarıdır ve hücre somataları GCL'de yer alan GC'ler ile birbirlerine bağlanırlar. Yetişkin beyinde oluşan yeni nöronların son adımı, var olan nöronal ağa sinaptik entegrasyondur. Entegrasyonun düzenlenmesi ve böylece OB'de yeni oluşan nöronların hayatta kalması öncelikle tüy hücreleri aracılığıyla duyuşal sinyaller yoluyla düzenlenir (Corotto ve ark., 1994).



Şekil 2.2. Yetişkin fare beyindeki nörojenik nişler. **(A)** Yetişkin beyindeki nörojenik nişler, hipokampal DG'nin SVZ'sini ve SGZ'sini içerir. SVZ'den olgunlaşmamış nöronlar rostral göç akımı (RMS) boyunca koku ampulüne (OB) doğru göç eder **(B)** SVZ nörojenik nişinin organizasyonu. Nöral kök hücreler (Tip B) hem ependimal hücreler (EC) aracılığıyla beyin omurilik sıvısıyla (BOS) hem de humoral düzenleme mekanizması olarak kan damarlarıyla bağlantı kurar. Olgunlaşmamış nöronlar, astrositleri kılavuz olarak kullanarak RMS boyunca göç eder. **(C)** SVZ'de nörogenez sırasındaki gelişim adımları: SVZ'deki sakin astrositik kök hücreler (Tip B) aktive olur ve geçici çoğalan hücrelerden (Tip C) oluşan bir havuz aracılığıyla nöroblastlara (Tip A) yol açar. Nöroblastlar granül hücrelerine ve periglomerüler hücrelere yol açabilir. **(D)** DG'da yetişkin nörogenezi: SGZ nörojenik nişinin hipokampus içindeki lokalizasyonu. **(E)** DG'daki yetişkin nörogenezi, astrositik özelliklere sahip sakin nöral kök hücre (hNKH) popülasyonundan kaynaklanır. Aktive nöral kök hücreler (aNKH), mitoz sonrası yaklaşık 8 hafta içinde olgun granül hücreleri haline gelmeden önce soy seçimi, göç, morfolojik ve fonksiyonel olgunlaşmanın yanı sıra ağ entegrasyonuna uğrayan, çoğalan nöral öncü hücrelerden (NPH'ler) oluşan bir havuza yol açar. Yetişkin doğan granül hücrelerinin hayatta kalması erken (mitoz sonrası 24-48 saat) ve geç fazda (mitoz sonrası 12-16 gün) çoğunlukla apoptoz yoluyla düzenlenir (Ceanga ve ark., 2021).

2.4.2. Hipokampal Nörojenik Niş

Yetişkin beynindeki ikinci büyük nörojenik niş, erişkin kökenli granül hücrelerin (ekGH'ler) üretildiği, olgunlaştığı ve mevcut ağa entegre edildiği hipokampal DG'un SGZ'sidir (Van Praag ve ark., 2002). Yerel NKH'ler, astrositik moleküler özellikleri ve embriyonal nöral progenitörlere benzeyen radial glia benzeri (RGL) morfolojileri ile kendini yenileme potansiyeline sahip olarak tanımlanır (Bonaguidi ve ark., 2011; Bottes ve ark., 2021). ekGH'ler yetişkin hipokampal nörojenezi sırasında beş gelişim aşamasından geçer. Bu aşamalar şu şekildedir; ilk olarak radyal glia benzeri hücrelerle başlayan ve gelişim yoluyla progenitör hücrelere, nöroblast hücrelere, olgunlaşmamış nöronlara ve son olarak granüler hücreler olarak olgun nöronlara kadar devam eden beş ana gelişim aşamasını içerir (Ceanga ve ark., 2021).

NKH'ler çoğunlukla hareketsiz olarak bulunurlar ve aktivasyon sonucunda, RGL olmayan progenitor hücrelerini (tip 2 hücreleri) çoğaltarak populasyon oluşturmak için asimetrik olarak bölünebilir. Tip 2 hücreler ise, protein ekspresyonuna bağlı olarak tip 2a ve tip 2b hücrelerine farklılaşabilir. Nöronal soy göstermeye başlayan tip 2b hücreleri çoğunlukla simetrik bölünür fakat aynı zamanda asimetrik olarak da bölünebilir ve nöron soyuna bağlı olan tip 3 hücrelerini üretir. Nöronlar hayatta kaldıktan sonra mevcut ağa süresiz olarak entegre olurlar (Ceanga ve ark., 2021).

Yeni oluşan uyarıcı nöron olan ekGH', gelişmiş plastiteye ve fonksiyonel bir çok özelliğe sahiptir (Schmidt-Hieber ve ark., 2004). Sinaps oluşumu, yeni nöronların mevcut aksonal boğumlar için eski GH'lerle rekabet ettiği görüldüğünden ağ bütünleşmesinin esasını oluşturur. İlk sinapsların oluşumu, gelişim halindeki nöronun hücre gövdesi granüler bölgeye geldiğinde ve dendritleri moleküler bölgeye doğru büyüdüğünde meydana gelir. Sinaptogenez birkaç hafta sürer ve bu süre zarfında dendrit sayısı dendrit uzunluğu ile beraber artar. Yeni nöronların dendritleri, akson CA3 bölgesine ilerledikçe moleküler katmana doğru dallanmaktadır. Yeni oluşan GH 8 hafta içerisinde sinir ağıyla bütünleşir, fakat bu süre memelilerde ve insanlarda farklılık gösterip 6 aydan fazla sürebilir (Ceanga ve ark., 2021). Son olarak, yeni nöronların var olan hücrelerle bütünleşmesi esnek bir ağın sürdürülmesine yardımcı olan sürekli bir gelişimsel süreç olarak önerilmektedir, bu şekilde olgun nöronlar nihayetinde işlevsel ve yapısal olarak bütünleşir.

Bu süreçte farklı birçok içsel ve dışsal faktörler yeni nöronların oluşumunu olumlu ve olumsuz yönde etkiler. EHN sırasında, ekstrinsik ve intrinsik ipuçlarının bir kombinasyonu, nöronal çeşitliliği artırmak için bölgesel intrinsik programlarda etkileşime girer (Mira ve Morante, 2020).

2.5. Hipokampal Nörojenik Niş'in Mekanizması

Hipokampal nörogenez mekanizması çok katmanlı düzenleyici ağlar gibi içsel faktörler, birden fazla karmaşık transkripsiyon faktörü, epigenetik kontrol, kodlama yapmayan RNA'lar, sinyalizasyon ve metabolik yollar arasındaki ilişkilerden oluşur. Transkripsiyon faktörü cinsiyet belirleyici bölge Y-box 2 (Sox 2), çeşitli hücre içi sinyal yollarını regüle ederek bu süreçte önemli bir rol oynuyor gibi durmaktadır (Steiner ve ark., 2006). İlk önce Sox 2, Sonic hedgehog (Shh) ekspresyonunu kontrol eder ve bu da tip-1 hücrelerin çoğalmasını teşvik eder (Favaro ve ark., 2009). Ayrıca, Sox 2 Wnt sinyalini inhibe ederek hücreleri proliferatif bir durumda tutar.

Kanonik Wnt sinyali, embriyonik gelişim esnasında korteks ve hipokampusun sağlıklı gelişimi için esastır. Erken nörogenez döneminde kendini yenilemeyi ve nöral progenitörleri korumayı desteklemenin yanında, kanonik Wnt sinyali orta ve geç nörogenez döneminde ara progenitörlerin farklılaşmasını tetiklemektedir. Hipokampal hücre çoğalmasını düzenlemenin yanında Wnt sinyali, nöronal farklılaşma 1 (NeuroD1) ve prospero ile ilişkili homeobox 1 transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunu düzenleyerek nöronal hücre farklılaşmasında da görev alır (Gao ve ark., 2011; Karalay ve ark., 2011; Kuwabara ve ark., 2009). Ayrıca, birçok çalışma hipokampal astrositler ve progenitör hücreler tarafından salgılanan Wnt proteinlerinin SGZ nişinin kritik bileşenleri olduğunu göstermektedir. Ayrıca, Wnt'nin bazı ligandları EHN'yi Wnt5a gibi nonkanonik bir yolak aracılığıyla destekler. Bu yollarla EHN indüksiyonunun nöronal farklılaşma sürecinde ve hipokampüste kalsiyum/kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMKII) yoluyla yeni üretilen nöronların morfolojik gelişiminde yer alan önemli bir nörojenik faktör olduğu gösterilmiştir. Bu yolla üretilen yeni nöronlar nöronal farklılaşmayı indükler ve Wnt/JNK ve Wnt/CaMKII yollarıyla yeni nöronlardan uzanan dendritlerin gelişimini destekler. cAMP-yanıt elemanı-bağlayıcı (CREB) proteini nöronal

olgunlaşmada bir başka önemli etkidir. NeuroD1'e benzer şekilde, CREB nörit büyümesini ve dendritik dallanmayı artırırken GABAerjik sinyalizasyon yoluyla pozitif olarak düzenlenmektedir (Jurkowski ve ark., 2020).

Hücre çoğalmasını takiben, beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) erken hücre sağkalımı aşamasında önemli bir görev üstlenir. BDNF, protein kinaz C aracılığıyla hareket eden tropomiyozin reseptör kinaz B (TrKB) reseptörünü aktive ederek hücre sağkalımı ve hücre göçünde yer alan proteinleri aktive eder (Ortiz-López ve ark., 2017). Soy ilerlemesine katılan birçok faktör, karmaşık çapraz konuşma sinyal yolları aracılığıyla birbirine bağlıdır, dolayısıyla bir faktörün bozulması durumunda tüm nörojenik döngü durmaktadır (Jurkowski ve ark., 2020).

2.6. DG'nin SGZ'sinde Yetişkin Nörogenezinin Epigenetik Düzenlenmesi

Çeşitli epigenetik mekanizmaların sinir sistemi gelişimiyle bağlantılı olduğu ortaya çıkmıştır. Elde edilen kanıtlar, nörogenezin benzersiz epigenetik özelliklerle ilişkili olduğunu açığa çıkarmıştır (Chen ve ark., 2021). DNA metilasyonu, histon post-translasyonel modifikasyonları ve kromatin yeniden modellenmesi gibi epigenetik mekanizmalar, gen ifadesinin regülasyonu yoluyla yetişkin nöronal farklılaşmanın belirlenmesinde kilit rol oynamaktadır.

DNA metilasyonu, embriyonik kök hücrelerin NKH'lere nöral indüksiyonu sırasında pluripotens genlerinin susturulduğu kilit bir süreçtir. Ayrıca nörogenez sırasında DNA metilasyonunun önemini destekler. DNMT1, JAK-STAT sinyalizasyonunun düzenlenmesi yoluyla astrogliogenezin zamanlamasını kontrol ederken, DNMT3A ve DNMT3B nöron spesifikasyonu için oldukça kritik öneme sahiptir (Niklison-Chirou ve ark., 2020). DNMT3A nöronlarda eksprese edilir ve ekspresyonu postnatal olarak artar. Beyinde DNMT3A'nın ablasyonu (Nestin-Cre sistemi kullanılarak) postnatal nörogenezde bozulmaya, nöron sayısında azalmaya ve erken postnatal evrelerde fare ölümüne neden olur (Nguyen ve ark., 2007). Nörogenez sırasında DNMT3B, NPH'lerde eksprese edilir ve silinmesi, NeuroD1, Map2m ve Ncam1 dahil olmak üzere çeşitli nöronal genlerin yukarı regülasyonu ile gösterildiği gibi hızlandırılmış bir nöronal olgunlaşma ile sonuçlanır (Martins-Taylor ve ark., 2012). Bu nedenle, DNA metilasyonunun yetişkin nörojenezinde NPH'lerin bakımında ve kaderinin belirlenmesinde kritik bir rolü vardır.

Histonun asetilasyon, metilasyon, ubikitasyon, fosforilasyon, ribozilasyon ve SUMOilasyon gibi kimyasal kovalent modifikasyonları kromatin durumunun düzenlenmesinde anahtar bir rol üstlenmektedir (Bernstein ve ark., 2007). Genel olarak, spesifik amino asit kalıntılarının asetilasyonu ve histon H3 lizin 4'ün (H3K4) di- veya tri-metilasyonu aktif transkripsiyon ile bağlantılıdır. Aksine, H3K9 ve H3K27'nin di- veya tri-metilasyonu kararlı baskılayıcı işaretlerdir. Histon asetiltransferazlar (HAT'ler) ve histon deasetilazlar (HDAC'ler), sırasıyla histonun asetilasyonunu (transkripsiyonel aktivasyon) veya deasetilasyonunu (transkripsiyonel susturma) düzenleyen enzimlerdir (Niklison-Chirou ve ark., 2020). Yetişkin DG'deki pek çok çalışma, farklı HAT'lar ve HDAC'lar rolünü incelemiştir. Genel olarak, kalproik asit (VPA) gibi HDAC inhibitörlerini kullanan önceki çalışmalar, nörojenizde bir artış ve aNSPC'lerin gliojenik kader kararlarında bir azalma olduğunu ortaya koyarak histon asetilasyonunun ve HDAC'lerin önemini göstermektedir.

2.7. Nörojenizin Saptanmasında Kullanılan Belirteçler

2.7.1. Çift Kortin Belirteci (Doublecortin-DXC)

Yetişkin DG'sindeki yeni doğan granül hücreleri mikrotübül ilişkili protein DCX, polisialile nöral hücre yapışma molekülü PSA-NCAM, Tis21 ve Kalretinin gibi bir dizi geçici belirteç ifade eder. Genellikle, doublecortin ekspresyonu yapısal plastisite ve migrasyon, aksonal rehberlik ve dendrit filizlenmesi ile ilişkili morfolojik değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Gelişim esnasında, DCX hipokampusun katmanlaşması için önemlidir. Yetişkin hipokampal nörojenizde DCX, kararlı progenitor hücre evreleri (tip-2b/3) ile erken postmitotik olgunlaşma evresi arasındaki dönemi belirtir. radyal-glia benzeri kök hücrelerde (tip-1), kararsız progenitor hücrelerde (tip-2a) ve olgun nöronlarda görülmez. DG'deki DCX-pozitif (DCX+) hücreler sinaptik GABAerjik girdi alır ve granül hücre katmanının üçte birlik iç kısmına göç eder. DCX+ hücreleri ayrıca lateral ventrikülün nörojenik SVZ'sinde bulunur ve burada göç eden A hücrelerini işaretler. DCX'in yetişkin hipokampal nörojenizindeki işlevi tam olarak bilinmemektedir, ancak birçok durumda DCX ekspresyonu nörojenizin gösterge belirteci olarak kullanılmaktadır (Klempin ve ark., 2011).

2.7.2. Nöronal Çekirdek Belirteci (NeuN)

NeuN, bazı nöronlar (örneğin koku alma soğanı, beyincik ve mitral hücrelerde bulunan Purkinje hücreleri) hariç, hemen hemen sadece periferik ve merkezi sinir sisteminin olgun nöronlarında eksprese edilen bir nükleer proteindir. NeuN, omurgalı sinir sisteminin yaklaşık olarak tüm bölümlerindeki olgun nöronların çekirdeklerinde dağılmıştır. Bu sebeple, olgun nöronların ölçümünde güvenilir bir marker olarak kullanılmaktadır (Yılmaz, 2023).

2.7.3. Nestin

Ara filament (nanofilament) proteini nestin, merkezi sinir sisteminin (MSS) yanı sıra gelişmekte olan kalp, kas, böbrek ve testis dokusunda nöroepitelyal hücrelerde ve olgunlaşmamış astrositlerde ifade edilmektedir. Yetişkin beyinde nestin NSPC'lerde ve bazı astroglial hücrelerde (örneğin hipokampusta) ifade edilir ve patofizyolojik şartlar altında reaktif astrositlerde yeniden ifade edilebilir. Nestin, nöral kök hücrelerin bir belirteci olarak değerlendirilmektedir. İn vitro koşullarda, nestinin mitokondriyal yeniden şekillenmeyi ve NSPC'lerin köklülüğünü ve MAPK, EGFR ve Cdk 5 yolları aracılığıyla miyoblastların farklılaşmasını ve apoptozunu düzenleyebileceği ileri sürülmüştür (Wilhelmsson ve ark., 2019).

2.7.4. Glial Fibril Asit Proteini

GFAP, MSS'deki astrositlerde, periferik sinir sistemindeki (PSS) miyelinleşmeyen Schwann hücrelerinde ve enterik glial hücrelerde eşsiz bir şekilde görülen bir ara filament (IF) III proteinidir. GFAP mRNA ekspresyonu çeşitli nükleer reseptör hormonları, büyüme faktörleri ve lipopolisakkaritler tarafından kontrol edilir. GFAP ayrıca birçok post-translasyonel modifikasyona maruz kalır. GFAP gen aktivasyonu ve protein indüksiyonu, MSS yaralanmaları ve nörodejenerasyonu sonrasında astroglial hücre aktivasyonunda (astrogliosis) önemli bir yer tutmaktadır. Yeni ortaya çıkan kanıtlar, travmatik beyin ve omurilik yaralanmaları ve inmenin ardından GFAP ve yıkım ürünlerinin hızla biyolojik sıvılara salındığını ve bu tür nörolojik bozukluklar için güçlü aday biyolojik belirteçler haline geldiğini göstermektedir (Yang ve Wang, 2015).

2.8. Folik Asit

Folat doğal B-kompleks vitaminlerinden bir tanesidir. Tek karbon metabolizmasından sorumlu olup homosisteini metiyonine dönüştürmektedir. Homosistein seviyelerini azaltan bu işlem DNA sentezi için çok önemlidir. Folat yeni hücrelerin üretimi ve bakımı, nükleotid sentezi ve homosisteinin (Hcy) yeniden metilasyonu için gereklidir. İnsan vücudu folatı endojen olarak üretememektedir (Qiu ve ark., 2019). Diyetle alınan folik asit, nörogenez ve programlı hücre ölümünü düzenlemede önemli roller oynayarak sinir sisteminin normal gelişimi için gereklidir. Örneğin, folattan yoksun anne diyetleri, fetal farelerin ön beyinlerinin telensefalik kısmında nörogenezin azalmasına ve apoptozun artış göstermesine neden olmaktadır (Zhang ve ark., 2012).

2.9. Metotreksat

1980'lerin sonunda romatoid artrit (RA) tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmasından bu yana MTX, yeni biyolojik yanıt değiştiriciler de dahil olmak üzere bu hastalığa karşı kullanılan diğer tüm terapötik ajanların ölçüldüğü bir kriter olmuştur. MTX'in, malign hastalıkların tedavisinde etkili olduğu bilinen bir antikanser ilacı olduğu gösterilmiştir. Bu sebeple özellikle T lenfositleri gibi sinovyal enflamasyonla ilgili hücrelerde pürin ve pirimidin sentezini azaltarak hücresel proliferasyonu inhibe etme yeteneğinin anti-enflamatuar etkilerine katkıda bulunur (Chan ve Cronstein, 2010).

Bir folik asit antagonisti olan MTX, lösemi, lenfoma, osteosarkom, baş ve boyun tümörleri, akciğer kanseri, meme kanseri ve bunların dışındaki bazı kanser türlerinin yanı sıra sedef hastalığı, dermatomiyozit, sarkoidoz ve romatoid artrit gibi bazı iltihaplı hastalıklarda kemoterapötik ajan olarak kullanılmaktadır (Carneiro-Filho ve ark., 2004).

2.9.1. Metotreksatın Mekanizması

MTX bir folik asit antagonistidir. Dihidrofolat redüktaz, timidilat sentezi sürecinde önemli bir enzimdir. MTX DHFR'yi geri dönüşümlü olarak inhibe ederek, dihidrofolatın (DHF) tetrahidrofolata (THF) dönüşümünü inhibe eder (Armağan, 2015). Organizmada metilen, formil ve metil gibi monokarbon birimlerinin donörleri

olan 5,10-metilen-THF, 10-formil-THF ve 5-metil-THF gibi birkaç aktif folat formu bulunur. THF hidroksi metiltransferaz enziminin aracılığı ile 5,10-metilen-THF'ye dönüştürülür. Timidilat sentazın aracılık ettiği, 5,10-metilen-THF, 2-deoksiüridin-5-monofosfatın (dUMP) 2-deoksitimidin-5-monofosfata (dTMP) metilasyonunda koenzim ve bir karbon donorü olarak yer almaktadır. THF eksikliği de novo pirimidin sentezini direkt olarak etkilemektedir (Assaraf, 2006).

Folat, DNA sentezi ve hücre fonksiyonu için gerekli olan pürinlerin, pirimidinlerin ve metiyoninlerin sentezinde tek karbon donörüdür. MTX'in iHF sentezinin inhibisyonu sonucunda pürin sentezi ve pirimidin timidilat sentezi direkt olarak etkilenmektedir (Acıpayam, 2011). Pürin nükleotidleri ve pirimidin timidilat sentezi inhibisyona uğrar. Pürin ve pirimidin sentezindeki düşüş, başta T-lenfositleri gibi hücrelerde olmak üzere hücre çoğalmasını engeller (Malaviya, 2016). Pürin nükleotidleri ve pirimidin timidilat sentezi inhibisyonu, ATP ve hücre bölünmesi için gerekli olan DNA ve RNA moleküllerinin sentezini engeller. DNA sentezi için gerekli olan moleküllerin eksikliği sonucu hücre bölünmesinin S fazında DNA replikasyonunun inhibisyonuna sebep olur. RNA sentezi için gerekli moleküllerin yokluğunda G fazında hücredeki bazı proteinlerin sentezlenmesini engelleyerek hücre üzerinde sitotoksik etki yaptığı saptanmıştır. Bu etkileri nedeniyle MTX, birçok hastalığın tedavisinde antiproliferatif bir ajan olarak kullanılmaktadır (Barnhart ve ark., 2001)

Hücrelerde MTX ve MTX-glutamat şeklinde biriken ve pürinlerin de novo sentezinde önemli bir rol oynayan AICAR transformilaz (ATIC) enzimini inhibe eder. AICAR (5-aminoimidazol 4-karboksamid ribonükleotid) molekülünün formilasyonunu inhibe eder. Sonuç olarak, biriken AICAR hücreden adenozin salınımını uyarır ve nötrofiller ve monositler üzerindeki reseptörler aracılığıyla anti-inflamatuar bir görev üstlenir (Zhao ve ark., 2022). Adenozin, tüm dokularda ve vücut sıvılarında bulunan bir pürin nükleozitidir. Adenozin, sitokin ve kemokin salınımını baskılayarak klasik makrofaj aktivasyonunun pro-inflamatuar etkilerini engeller ve M1 makrofajları aracılığıyla anti-inflamatuar sitokin IL-10 salınımını artırır (Maksimovic ve ark., 2020).

2.9.2. Metotreksat toksisitesi

MTX'in başlıca yan etkisi, temel olarak fibrozis şeklinde ortaya çıkan hepatotoksisitedir. MTX tedavisinin toksik etkilerinin, hepatik folat stoklarının azalmasından ve MTX poliglutamatlarının karaciğerde birikmesinden ileri geldiği düşünülmektedir (Edwin ve Cronstein, 2010). MTX'in sitotoksik özellikleri kanser hücrelerine özgü değildir. Bu nedenle normal dokuları ve yüksek bölünme oranına sahip bağırsak mukozası ve kemik iliği hematopoetik hücreleri gibi pek çok organı da etkilemektedir (Çakır ve ark., 2011). Bu sebeple kemik iliği baskılanması, mukozit, gastrointestinal toksisite kusma, ishal, mide bulantısı, anoreksiya ve karaciğer fonksiyon bozuklukları gibi birçok yan etkiye neden olur. Genetik farklılıklar nedeniyle birçok hasta ilacın neden olduğu toksisiteyi tolere edemediği için MTX tedavisini bırakmak zorunda kalmaktadır. MTX'in başta karaciğer, akciğer, böbrek, beyin ve bağırsak olmak üzere birçok doku ve biyolojik sistem üzerinde olumsuz etkileri bulunmaktadır (Hamed ve ark., 2022).

2.9.3. MTX nörotoksisitesi

Kemoterapi ile tedavi edilen kanser hastalarında bilişsel bozulma sıklıkla bildirilmektedir (Chen ve ark., 2021). Klinik çalışmalar MTX kemoterapisinin beyinde hem işlevsel hem de morfolojik değişikliklere sebep olduğunu göstermektedir. Özellikle bilişsel bozukluk başta olmak üzere ciddi geç nörolojik sekillere sebep olabileceğini göstermektedir (Cohen, 2017; Vezmar ve ark., 2009). Nörotoksisite mekanizmasının, radyasyon gibi dış faktörlerin kan beyin bariyerini bozması sonucu MTX'in beyinde birikmesi olduğu iddia edilmektedir. Bir diğer önerilen mekanizma ise nükleotid sentezinin bozulması sonucu astrositlerdeki işlev bozukluğunun bir sonucu olarak nöronal aktivitenin bozulması ve nöronal hasardır (Vezmar ve ark., 2003). Yakın zamanda, Wen ve arkadaşları akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavi protokollerini örnek alan intraperitoneal (IP) ve intratekal (İT) MTX protokollerini kombine eden modeller kullanarak gelişmekte olan sıçanlarda bozulmuş hafıza, nöroinflamasyon ve bozulmuş nörogenez bulmuşlardır (Wen ve ark., 2018).

Yapılan bir araştırmada, araştırmacılar MTX kemoterapisine bağlı bilişsel bozukluğun (CRCI) altında üç-gliyal disfonksiyonun yattığını göstermiştir. Bunlar

MTX'in oligodendroglial soy düzensizliğini indüklediğini ardından nörotoksik astrosit reaktivitesini ve mikrogial aktivasyon üzerinde doğrudan etkileri olduğunu göstermiştir. Yapılan bir başka çalışmada, kombine IT ve IP MTX tedavisinin miyelin kaybına yol açtığı tespit edildi. Bu durum miyelinle ilişkili protein ekspresyonunda düşüş ve miyelinleşme süreciyle bağlantılı olduğu kabul edilen protein arginin N-metiltransferaz 1 (PRMT 1) ekspresyonunda azalmayla ortaya kondu (Chen ve ark., 2021).

2.10. Hiperbarik Oksijen Tedavisi

Hiperbarik oksijen tedavisi (HBOT), yan etkisi az ve maliyeti düşük bir tedavi yöntemidir (Ying ve ark., 2019). HBOT, yüksek basınçlı ortamda %100 oksijen uygulamasına dayalı bir tedavi metodudur. Normal koşullar altında oksijenin yalnızca %1,5-3'ü kanda çözünabilmektedir. Bu oran HBO tedavisi ile artırılabilir. Örneğin, 3 ATA'da kandaki çözülmüş haldeki oksijen içeriği %6,8'lik bir hacme çıkar. Bu nedenle oksijen çözünürlüğündeki artış nedeniyle ikincil etkiler gözlenir. Bu etkiler; yara iyileşmesinin hızlanması, antiödem etki, antibakteriyel etki, immün sistem aktivasyonu olarak sıralanabilir (Keskin, 2022).

2.10.1. Hiperbarik Oksijen Tedavisi Tarihçesi

İngiliz Doktor Henshaw 1962 yılında hiperbarik tedavi için ilk kez basınçlı hava kullanmıştır. John Priestly ise bundan yüz yıl sonra 1775'te Oksijeni keşfetti. 1789'da ise Lavoisier ve Seguin konsantre oksijenin toksik etkilerini rapor etmişler. Bu raporun ardından HBOT kullanımı ile ilgili tereddütlerde artış meydana gelmiştir. 1878 yılına gelindiğinde ise Paul Bert oksijenin merkezi sinir sistemi üzerinde nöbetler şeklinde ortaya çıkan toksik etkilerini rapor etmiştir. Tüm bunların yanı sıra aynı zamanda dünyanın çeşitli yerlerinde hiperbarik oksijen odaları inşa edilmeye başlanmıştır (Edwards, 2010).

1950'ler ve 1960'ların başlarında HBOT araştırma ve uygulamalarında bir yükselişe tanık olunmuştur. Dr. Ite Boerema hiperbarik oksijenin kan ve kalp dokusu üzerindeki etkilerini araştırmış ve oksijenin yalnızca hemoglobine değil plazmaya da nüfuz ettirilebileceğini tespit etmiştir. 1960 senesinde HBOT ile kangreni başarıyla tedavi etmiş ve 1961'de HBOT'nin kalp cerrahisinde ilk kez uygulandığını duyurmuştur (Carney, 2013).

Aynı zamanda 1960'ların ortalarında HBO'nun anesteziyle beraber kullanılması da araştırılıyordu. Basınç odalarında ameliyat yapılmasının yararları olarak oksijenlenmenin artışı ya da nitroz oksitin tek başına anestezik ajan olarak kullanılmasına destek olduğu ifade edilmiştir. Nitroz oksitin dokularda yüksek oranda çözünürlüğü, yangın tehlikesi, anestezik ajanın kalp ve akciğerlere giden kan akışı üzerindeki etkileri HBO'da anestezinin dezavantajları olarak belirtilmiştir (Carney, 2013).

2.10.2. Oksijenin Organizmadaki Fizyolojik Rolü

Hücresel solunumu desteklemek ve hücreye enerji sağlamak için oksijene gereksinim duyulur. Oksijen iletiminin azalması hücrelerin hayatta kalmasını olumsuz yönde etkileyebilir (Edwards, 2010). O₂ vücudumuza iki farklı yolla girer: gazların çevreden bronş ağacına taşındığı ventilasyon ve alveol boşluğu ile kan arasındaki O₂ dağılımında bir dengelenmenin sağlandığı difüzyon (Ortega ve ark., 2021). Yaralanma ya da hastalık vücudun dokulara oksijen taşıma kapasitesini azaltır, dokuların oksijen ihtiyacını artırır. Oksijenin kılcal damarlardan hücreye ulaşmak için kat etmesi gereken mesafe artabilir. Enfeksiyonlar ve doku iyileşmesi oksijen gereksinimini artırabilir. Ödem, perfüzyonda azalma ve mikrotromboz, oksijenin kılcal damarlardan hücrelere gitmesi gereken mesafeyi etkileyebilir (Edwards, 2010).

2.10.3. Hiperbarik Oksijen Tedavisinin Prensipleri

HBOT, saf oksijenin artırılmış basınç altında verilmesinden oluşur (Ortega ve ark., 2021). Hiperbarik oksijenasyonun terapötik temelini üç ana faktör oluşturur. Bunlardan birincisi 100% O₂ solunduğunda, pozitif bir gradyan oluşur ve böylece hiperoksijenli akciğerlerden hipoksik dokulara difüzyonu kolaylaştırır. İkinci olarak yüksek basınç nedeniyle, kandaki O₂ konsantrasyonu Henry Yasası'na göre yükselir. Üçüncü olarak Boyle-Mariotte Yasası ve Henry Yasası uyarınca kandaki gaz kabarcıklarının büyüklüğünü düşürür (Jones ve Wyatt, 2019). Saf oksijenle hiperbarik bir ortam oluşturulması, Hb'nin katkısı olmaksızın dahi kana (Hiperoksemi) ve dokulara (Hiperoksi) oksijen tedarikinde kayda değer bir artışa izin vermektedir. Bu sayede, HBOT organizmada doku hipoksisini, kronik hipoksemiye düzeltmek ve yara iyileşmesi, nekroz ya da reperfüzyon yaralanmaları gibi farklı

patolojik süreçlerin tedavisine destek olmak için kullanılabilecek çoklu etkiler sağlar (Ortega ve ark.,2021).

Moleküler düzeyde incelendiğinde dokularda yüksek miktarda bulunan PO₂, özellikle reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinin (RNS) üretimini artırarak hücresel sinyalizasyonda önemli etkilere neden olabilir. Bu etkiler, büyüme faktörlerinin sentezi neovaskülarizasyonun iyileştirilmesi veya immünomodülatör özelliklerin gösterilmesi gibi klinik etkinliğini ortaya koymaktadır (Comperessi ve Bosco, 2014; Thom, 2011). Üstelik HBOT, ROS/RNS ve Hücre Dışı Düzenlenmiş Kinazlar (ERK1/ERK2) yolağı ile HIF'i upregüle eder. Aynı şekilde, hiperoksiye bağlı aşırı ROS ve RNS üretimi oksidatif stres, DNA hasarı, metabolik bozukluklar, endotel disfonksiyonu, akut pulmoner hasar ve nörotoksitenin görülmesine neden olabilir (Amir ve Shai, 2020; Chen ve ark., 2019; Longobardi ve ark., 2021).

2.10.4. HBO tedavisinin yan etkileri

HBOT'nin çeşitli avantajları ve uygulamalarının yanı sıra, bu prosedür esnasında görülebilecek önemli yan etkiler de bulunmaktadır. HBOT esnasında ortaya çıkan en yaygın iki komplikasyon klostrofobi ve barotravmadır (Ortega ve ark., 2021). Kulak barotravması orta kulağı etkileyen durumların en sık görüleni olmakla birlikte sinüs/paranasal, dental veya pulmoner barotravma da bildirilmiştir. Bunlara ek olarak sinus ağrısı, myopi ve katarakt, oksijen krizi, genetik etkiler ve dekompresyon gibi komplikasyonlara sebep olmaktadır.

2.10.5. HBO tedavisi ve nörojeniz

Beyin hastalıkları için hayvan modelleri kullanılan çalışmalarda, hayvanların bilişsel performanslarında iyileşme gösterildi. Bu durum HBOT'nin bazı etkilerinin mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı oldu. Apoptozun inhibisyonu, mitokondriyal fonksiyonun iyileştirilmesi, kök hücre proliferasyonu, antioksidan savunma aktivitesinin artırılması, nöroinflamasyonun azaltılması ve nöroproteksiyon dahil olmak üzere çeşitli yolların bu etkiye aracılık ettiği bulundu (Gottfried ve ark., 2021).

Bilişsel iyileşme için başka bir yol da kök hücre proliferasyonu olabilmektedir. HBOT sonrasında kök hücre çoğalması birçok kez belgelenmiştir. HBOT sonrasında nöronal hücre proliferasyonuna dair bulgular son yirmi yılda ortaya çıkmıştır.

Yapılan bir çalışmada, hipoksik iskemik neonatal sıçanlar için HBOT, SVZ'de ve hipokampal DG'ta hem 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) hem de doublecortin artışıyla ölçüldüğü üzere endojen nöronal kök hücrelerin nörogenezini teşvik etmiştir (Yang ve ark., 2008). Buna deney raporuna göre, HBOT, travmatik beyin hasarlı sıçanlarda uzamsal öğrenme ve hafıza kabiliyetlerini artırmıştır ve bu durum hipokampal nöronal aktivitede bir artış ile ilişkilendirilmiştir (Liu ve ark., 2013).

Bu bulgular, HBOT'nin hipokampal DG alanında nestin ve BrdU artışı ve SVZ'de Wnt-3 ve nestin artışı ile gösterildiği gibi nöronal hücre proliferasyonunu uyardığı başka bir çalışma ile daha da desteklenmiştir (Wang ve ark., 2007; Wei ve ark., 2015). Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HBOT'nin nöronal kök hücre proliferasyonunu ve lezyon bölgesine göçü, ayrıca vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve reseptörü VEGFR-2, Raf-1, Mitojenle aktive olan protein kinaz (MEK1/2) ve fosfo-hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) 1/2 protein seviyelerini artırdığı bulunmuştur. Sonuç olarak, HBOT'nin VEGF/ERK sinyali yoluyla nöronal kök hücre proliferasyonunu ve büyük olasılıkla anjiyogenezi teşvik ettiği ileri sürülmüştür (Yang ve ark., 2017).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Demirbaş malzemeler Aletler

- Mikrotom
- IHC boyama seti
- Su banyosu
- Kurutma tablası
- Buzdolabı
- Derin dondurucu -80
- Triple boyama seti
- Araştırma mikroskobu
- Kamera ve görüntüleme Sistemi
- Stereo mikroskop
- Stero mikroskop kamerası
- Preparat saklama kutusu
- Otomatik mikropipetler
- Deney hayvanları kafes sistemi
- Hiperbarik Oksijen tüpü
- Mikrodalga fırın
- Vorteks cihazı
- Terazî
- Cerrahi set
- Etüv
- Parafin Dispenser
- Distile su cihazı

- Ph metre
- Manyetik karıştırıcı

3.1.2. Sarf Malzemeler ve Kimyasal Maddeler

- Saf oksijen gazı
- Pikrik asit
- Formaldehit
- Asetik asit
- 96 alkol
- Absol (Supelco)
- Ksilol (İsolab)
- Benzol (Merck)
- Parafin (Tudamelt)
- Ksilazin (Rompun)
- Ketamin (Alfamin)
- Metil benzoat (Merck)
- Hidrojen peroksit (Thermo Scientific)
- Protein blocking solüsyonu (Thermo Scientific)
- Avidin biotin peroksidaz (Thermo Scientific)
- Biotinli sekonder antikor (Thermo Scientific)
- DAB kromojen (Thermo Scientific)
- Hemotoksilen (Merck)
- Eldiven (Tenty)
- Enjektör (10-5-1 ml) (Beybi)
- Lam (Menzel-Glaser)
- Lamel (Menzel-Glaser)
- Entellan (Merck)
- Mikrotom bıçağı (Thermo Shandon)
- Pipet uçları (İsolap)
- Ethanol 96 (İsolab Chemicals)
- Sodyum clorid (Merck)
- Potasyum chloride (Merck)

- Potasyum dihidrojen fosfat (Merck)
- Disodyum dihidrojen fosfat dihidrat (Merck)
- Sodyum sitrat dihidrat (Merck)
- Monoklonal mouse Nestin (Abcam)
- Poliklonal rabbit Dcx (Ser47) (Abcam)
- Poliklonal Rabbit Ki-67 (Abcam)
- Monoklonal Mouse NeuN (Abcam)

3.2. DeneySEL ProsEDÜR

3.2.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi

Çalışma için ERÜ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan onay alınmış ve çalışma etik kurul yönergesine uygun bir şekilde yapılmıştır (Etik Kurul Tarih-Karar No: 01.06.2022-22/120). Bu çalışmada 28 adet Sprague-Dawley erkek sıçan (180-250 gr, 1 aylık) kullanıldı. Tüm denekler Erciyes Üniversitesi DeneySEL Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde en uygun koşullarda barındırılmış ve standart yem ve su ile beslenmiştir. DeneySEL süreç boyunca National Institute of Health (NIH) tarafından hayvan hakları ile ilgili belirlenen Laboratuvar Hayvanları Bakım İlkeleri (Principles of Laboratory Animal Care) esas alınmıştır. Sıçanlar rastgele ve eşit olarak şu 4 gruba ayrıldı;

- 1. Saline Grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 8. ve 15. günlerde intraperitoneal enjeksiyon yoluyla normal salin (%0,9 NaCl) verildi. 30. gün sonunda sakrifiye edildi
- 2. Mtx Grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara deneyin 8. ve 15. günlerinde intraperitoneal enjeksiyon yoluyla MTX (25 mg/kg) verildi. 30. gün sonunda sakrifiye edildi
- 3. Mtx + Hiperbarik oksijen Grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara deneyin 8. ve 15. günlerinde intraperitoneal enjeksiyon yoluyla MTX (25 mg/kg) verildi. Ardından, 15 gün boyunca 2 atmosfer basınç altında günde 1 saat hiperbarik oksijen uygulandı. 30. gün sonunda sakrifiye edildi
- 4. Hiperbarik Oksijen Grubu (n=7): Bu gruptaki hayvanlara 30 gün boyunca 2 atmosfer basınç altında günde 1 saat hiperbarik oksijen uygulandı. 30. gün sonunda sakrifiye edildi (Sirichoat ve ark., 2019; Welbat ve ark., 2020).

3.2.2. Hiperbarik Oksijen Tedavisi:

Erciyes Üniversitesi DEKAM’da hiperbarik ünitesinde 2 atmosfer basınç altında günde 1 saat olmak üzere hiperbarik oksijen gruba 30 gün boyunca, mtx+hiperbarik oksijen grubuna ise 15 gün boyunca, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Akif BAKTİR tarafından hiperbarik oksijen tedavisi uygulandı.

3.3. Histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için doku örneklerinin alınması

Tüm denemeler sonrası çalışmada histoloji, immünohistokimya analizleri için her bir gruba ait anestezi altındaki Saline, Mtx, Mtx + Hiperbarik oksijen ve Hiperbarik oksijen gruplarına ait hayvanlar anestezi protokolüne uygun biçimde anestezi uygulandı. Bouin tespit solüsyonu kullanılarak kardiyak perfüzyon uygulandı. Perfüzyon bitiminde hayvanların beyinleri çıkarılarak Bouin solüsyonunda 14 saat süreyle postfiksasyona maruz bırakıldı. Tespitten sonra tüm dokular sırasıyla %50, 70, 80, 96 ve absol alkoller ile metil benzoat ve benzol serilerinden sırasıyla geçirilerek parafinde bloklandı.

3.3.1. Nissl boyama yöntemi (Krezil viyole boyama yöntemi)

Beyin dokusunun genel yapısını incelemek amacıyla dokulara krezil violet asetat boyama yöntemi uygulandı. Hazır hale getirilen preparatlar deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemi bittikten sonra %0.1’lik krezil violet asetat içerisinde 5 dakika süreyle 37.0C’lik etüvde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 3 dakika süreyle distile suda bekletildi. Önce %96’lık sonra absol alkolde 3’er dk tutularak, ardından ksilen’de 2 kez 5’er dakika bekletilerek ve entellan ile kapatıldı.

3.3.2. İmmünohistokimyasal analiz (Strep-avidin Biotin Kompleks (Strept-ABC) immünoperoksidaz tekniği)

İmmünohistokimyasal incelemeler için hazırlanan preparatların deparafinizasyonu işlemi ve rehidrasyon için hazırlanan preparatlar 2’şer kez 5’er dakika ksilol içerisinde bekletildi. Daha sonra dehidratasyon işlemi için sırasıyla absol alkol I, absol alkol II, % 96 alkol, % 80 alkol ve % 70 alkol olmak üzere dereceli alkol serilerinden 3’er dakika süreyle geçirildi ve distile suda 3 dakika bekletildi. Takibinde fosfat buffer salin (PBS) de yıkandı. Takiben dokular sitrat bufferda (pH

6,0) 600W'da 4x5 dakika süreyle mikrodalga fırın içerisinde kaynatıldı ve aynı solüsyon içinde 20 dakika oda ısısında soğutuldu ve doku antijeninin yeniden kazanımı sağlandı. Tekrar PBS ile dört kez yıkamayı takiben nonspesifik bağlanmaları önlemek için kesitler 5 dakika protein bloklama solüsyonu, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış % 3' lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ile 15 dakika bekletilerek, PBS ile 4 kez 5'er dakika süreyle yıkandı. Uygun dilüsyonlarda hazırlanmış primer antikorlar (anti-DCX, anti-Neun, anti-Nestin ve anti-Ki67) kesitler üzerine eklendi ve bir gece inkübasyon için 4°C'de bekletildi. Negatif kontroller olarak alınan prefrontal korteks örnekleri ise primer antikor kullanılmadan PBS'ye maruz bırakıldı. Inkübasyonu takiben PBS'te 4x5 dakika yıkanan kesitler, biotinlenmiş sekonder antikor ile 20 dakika oda ısısında inkübe edilip, tekrar 4x5 dakika PBS ile yıkandıktan sonra da enzim konjugatlı streptavidinde 15 dakika maruz bırakıldı. Tekrar 4 kez PBS ile yıkanarak 5-10 dakika kromojen solüsyonunda (DAB) bekletildi. Gill'in Hematoksilen'inde 5 dakika boyandıktan sonra çeşme suyunda mavileşinceye kadar yıkandı ve takiben dereceli alkollerden ve ksilenlerden geçirilip üzerine yapıştırıcı damlatılıp lamelle kapatıldı. Kahverengi presipitasyonun görülmesi sonucunda reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi ve ışık mikroskopunda (Olympus, BX51) incelenerek fotoğraflandı. Elde edilen görüntüler semikantitatif ve kantitatif olarak değerlendirildi.

3.4. İmmunohistokimyasal boyamanın kalitatif değerlendirmesi

Boyalı bölümler incelendi ve dijital kamera (DP74, Olympus, Tokyo, Japonya) ile donatılmış BX51 mikroskobu (Olympus, Tokyo, Japonya) ile fotoğraflandı. Bu immün boyamalar, dört puanlık bir yoğunluk skoru (IS) kullanılarak niteliksel olarak değerlendirildi. Beyin dokularındaki DCX, Nestin, Neun, ve Ki-67 boyanma yoğunlukları, 100x ve 400x büyütmelemlerde mikroskopik olarak değerlendirildi. Bu yöntem için boyama yoğunlukları şu şekilde puanlandı: -, negatif (yüksek büyütmede bile leke yok, 400X); +, zayıf boyama (yalnızca yüksek büyütmede, 400X görünür); ++, orta boyama (düşük büyütmede kolayca görülebilir, 100X); ve +++, güçlü boyama (düşük büyütmede çarpıcı şekilde pozitif, 100X).

3.5. İmmünohistokimyasal boyamanın kantitatif değerlendirmesi

Bu çalışmada DCX, Nestin, Neun ve Ki-67 kantitatif olarak aşağıdakilere göre belirlendi: Jensen (2013) tarafından açıklanan yöntemle göre; NP'ler için boyama yoğunluklarının kantitatif analizleri, hipokampuslarından elde edilen görüntülerde yapıldı. Bu tüm görüntü için immün boyama yoğunluğu ölçüldü (400X büyütme). Bunun için, her grup için on iki görüntü kullanıldı. İçe aktardıktan sonra ilgili görüntüler yazılım ImageJ 1.51 sürümüne eklendi (Java 1.8.0_112, <https://imagej.nih.gov/ij/>), ardından görüntüler color deconvolution eklentisine gönderildi, burada hematoksilin ve DAB boyaması seçildi. Tek DAB, hematoksilin ve arka plan içeren 3 farklı panel görüntü oluştu. Ardından, yalnızca DAB görüntüleri kullanılarak elde edilen DAB görüntüleri için eşik değerler belirlendi. Bundan sonra, alan ve alan kesri parametreleri (boyama alanı yüzdesi, yani “boyama yoğunluğu”) ayarlandı. Daha sonra boyanan alanın alanı ve yüzdesi her görüntü için ölçüldü.

3.6. İstatistiksel analiz

İstatistiksel analiz GraphPad kullanılarak yapıldı. Boyama yoğunluğu verilerinin (% boyama alanı) kantitatif analizini yapmak için elde edilen boyama alanı yüzdesi sonuçları GraphPad Prism 7 (Windows için Sürüm 7.04)'e aktarıldı. Bundan sonra 4 grubun görüntü analizi miktarlarında herhangi bir anlamlı fark olup olmadığını belirlemek için unpaired student t test uygulandı. Tüm değerler ortalama $\pm$ SEM olarak gösterilir. $P < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

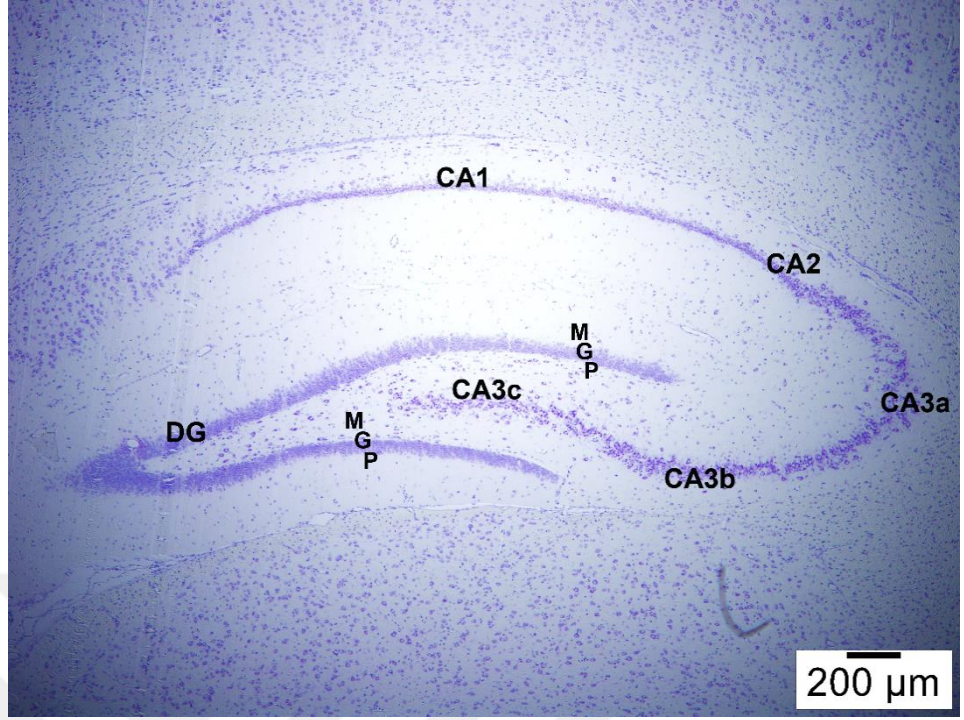
4.1. Histolojik bulgular

Hipokampus'un histolojik yapısının incelenmesi amacıyla bu dokulara Nissl boyama (Crezel violet asetat boyaması) yöntemi uygulandı.

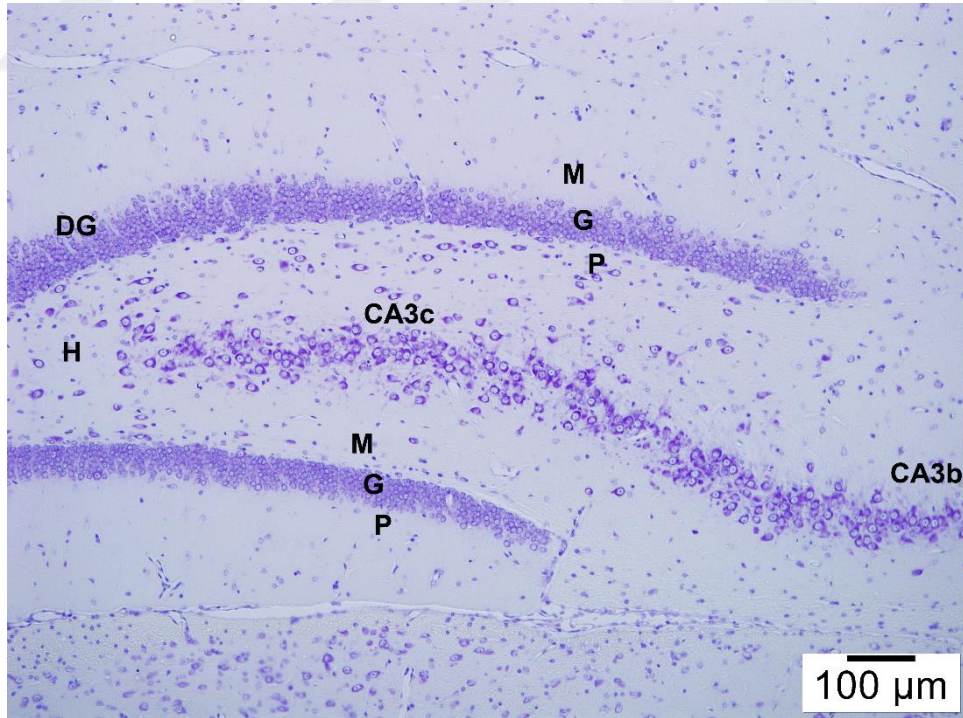
Tüm gruplara ait sıçanların beyinlerinde hipokampusun histolojik incelemesinde bu beyin yapısının kornu ammonis (CA) ve dentat girus (DG) olmak üzere iki ana unsurdan oluştuğu belirlendi. Kornu ammonisin uzantısı U veya V şeklindeki dentat girusun içine doğru uzanırken kornu ammonis CA1, CA2 ve CA3 olarak adlandırılan sıkıca paketlenmiş piramidal nöronlara sahip farklı alt bölgelere ayrılmıştı. CA3'de kendi içinde CA3a, CA3b ve CA3c olarak bilinen bölgelere ayrılarak analiz edildiler. CA3c DG'a en yakın olan hilusa giren kısım olarak tanımlandı.

Ayrıca, ventriküler yüzeyden itibaren dentat girusa gire kadar CA'nın histolojik olarak; 1. Dış pleksiform katman, 2. Stratum oriens, 3. Stratum pramidale, 4. Stratum radiatum, 5. Stratum lakunozum ve Stratum molekülere katmanlarından oluştuğu belirlendi. Dentat grusta da 1. Moleküler katman 2. Granüler hücre katmanı ve Polimorfik katman olmak üzere 3 belirlendi.

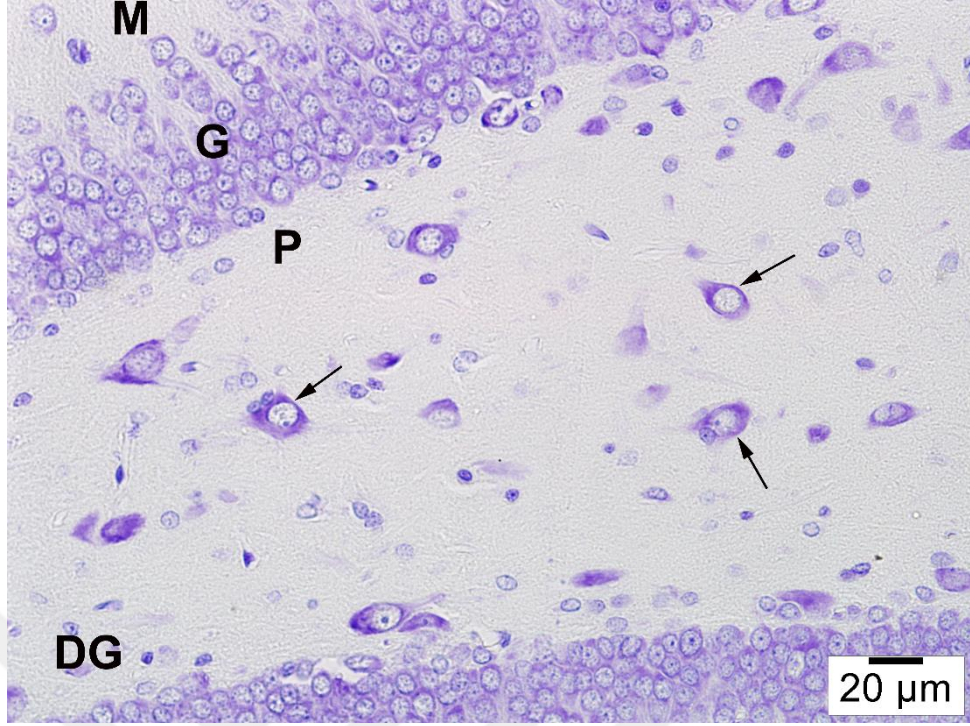
Bu boyamada gruplar arasında belirgin bir fark gözlenmedi.



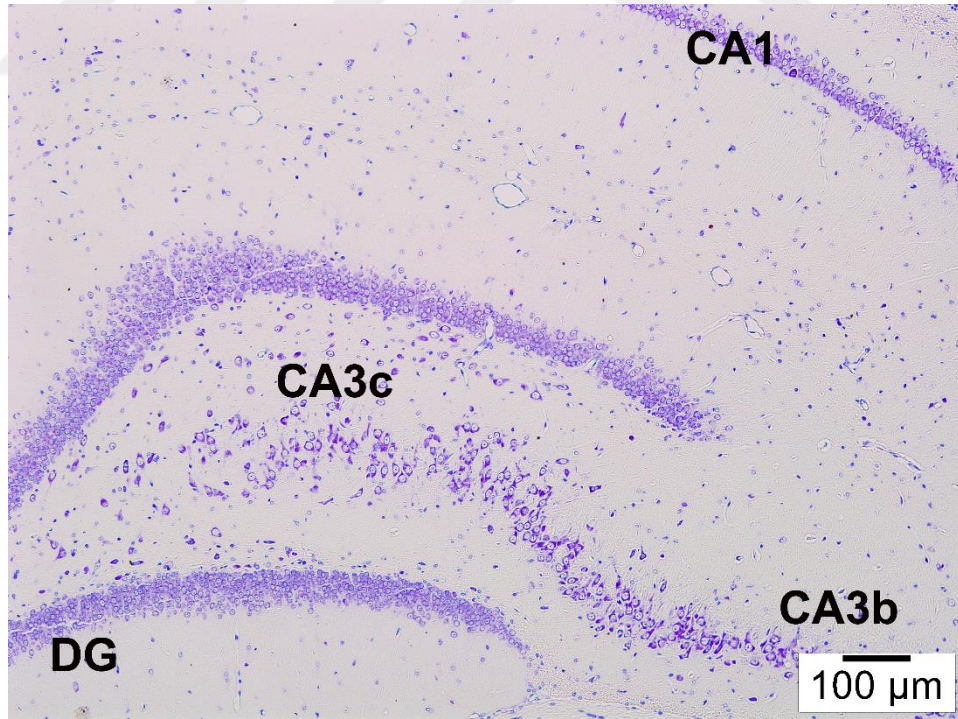
Şekil 4.1. Hipokampüsün histolojik genel görünümü. DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı; P; Polimorfik katman, Nisll boyaması, Bar; 200 µm.



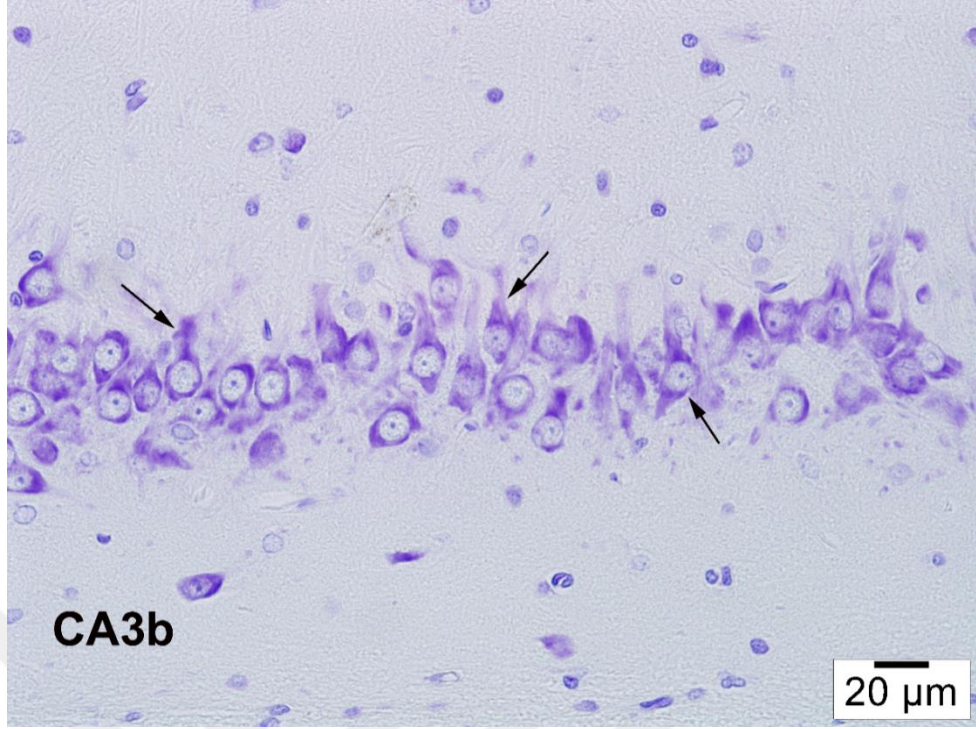
Şekil 4.2. Hipokampüste Dentat girusun (DG) histolojik genel görünümü. CA; Kornu ammonis, M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı, P; Polimorfik katman, H; Hilus, Nisll boyaması, Bar; 100 µm.



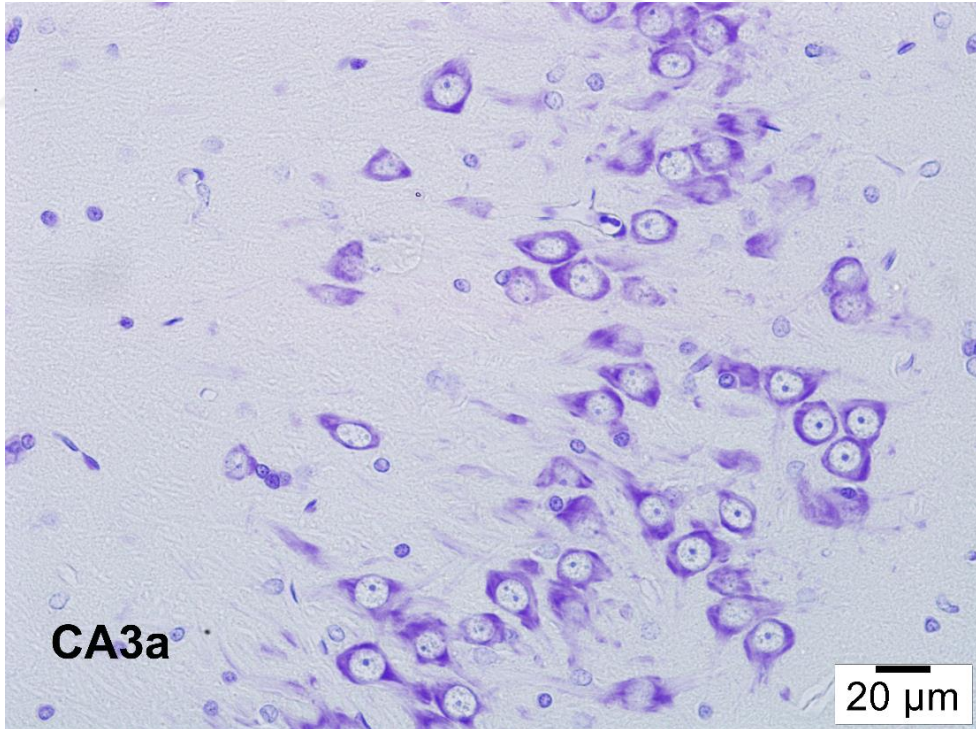
Şekil 4.3. Hipokampüste Dentat girusun (DG) yakın histolojik genel görünümü. M; Moleküler katman, G; Granüler hücre katmanı, P; Polimorfik katman, Nissl boyaması, Bar; 20 µm.



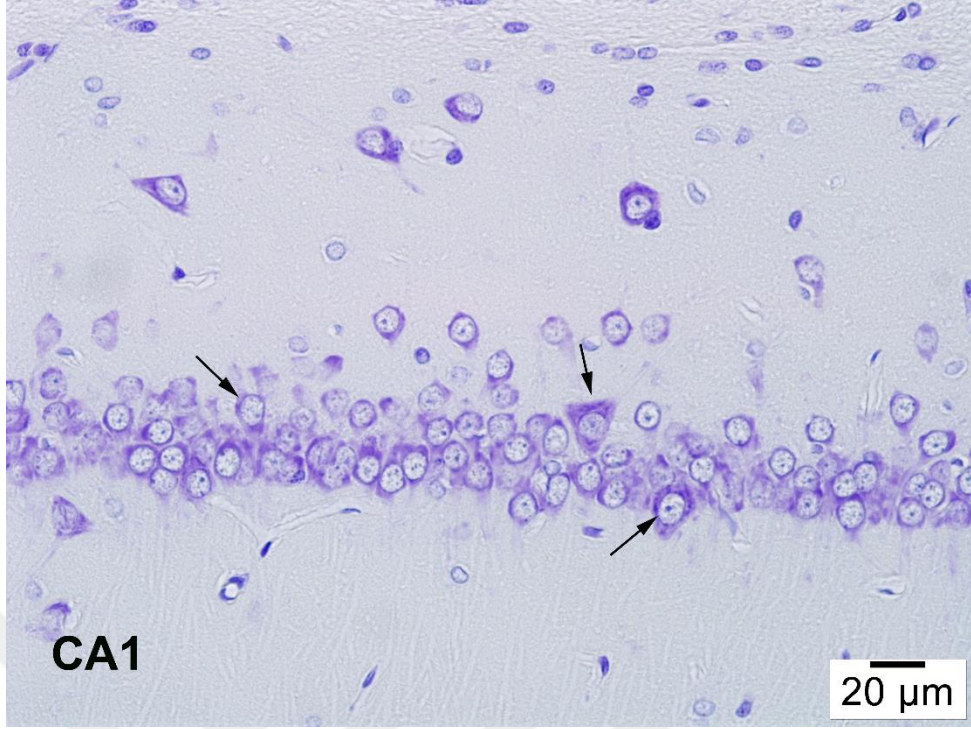
Şekil 4.4. Hipokampüste Dentat girusun (DG) histolojik genel görünümü. CA; Kornu ammonis, Nissl boyaması, Bar; 100 µm



Şekil 4.5. Hipokampüste CA3b (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar (siyah oklar), Nissl boyaması, Bar; 20 µm.



Şekil 4.6. Hipokampüste CA3a (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar, Nissl boyaması, Bar; 20 µm.



Şekil 4.7. Hipokampüste CA1 (Kornu ammonis) bölgesinde nöronlar (siyah oklar), Nissl boyaması, Bar; 20 µm.

4.2. İmmunohistokimyasal bulgular

4.2.1. Nestin immunreaktivitesi

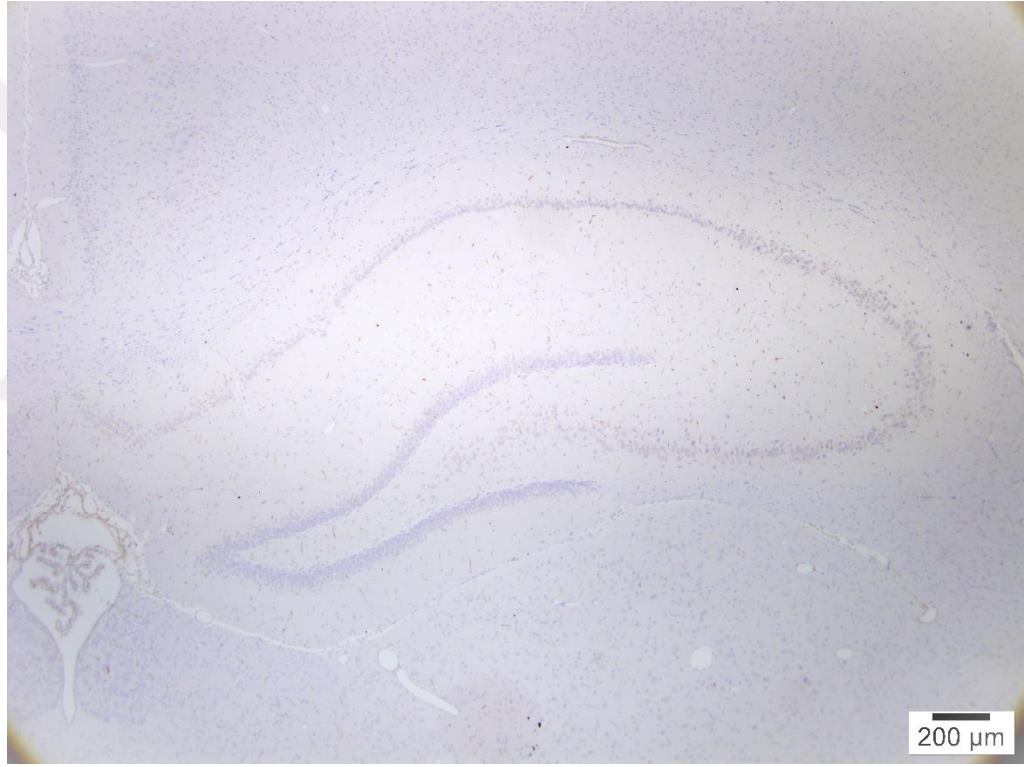
Sıçan beyin hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerinde nestin immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-nestin primer antikorları uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama gerçekleştirilmiştir.

Yapılan boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de MTX ve MTX + HB deney gruplarındaki hayvanların hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların sitoplazmalarında nestin pozitif reaksiyon gözlemlendi. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda, nestin immunreaktivitesinin MTX grubundaki nöronların sitoplazmalarında MTX + HB ve diğer kontrol gruplarına göre daha az yoğun boyandığı olduğu dikkati çekti.

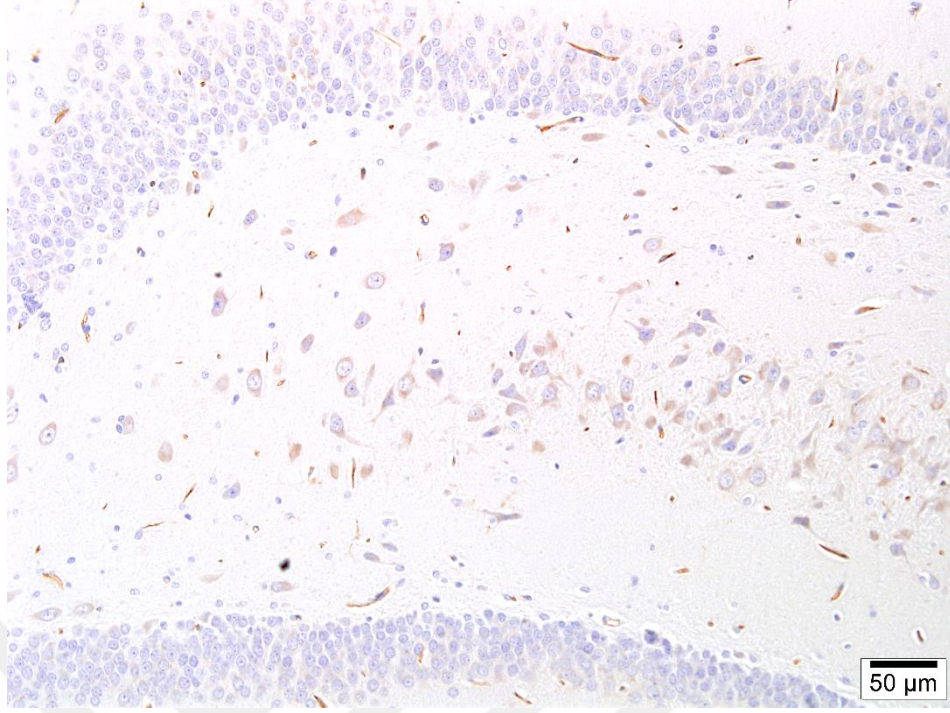
Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile değerlendirilmesi sonucunda sıçanların hipokampuslerinin girus dentatus ve hipokampus bölümlerindeki yapılarının incelenmesinde kontrol grupları ve MTX +

HB grubuna göre MTX grubunda alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlendi ($P<0,05$). Ayrıca hipokampüslerin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre MTX gruptaki hayvanların bu hipokampüs bölgelerindeki yapılarda nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti.

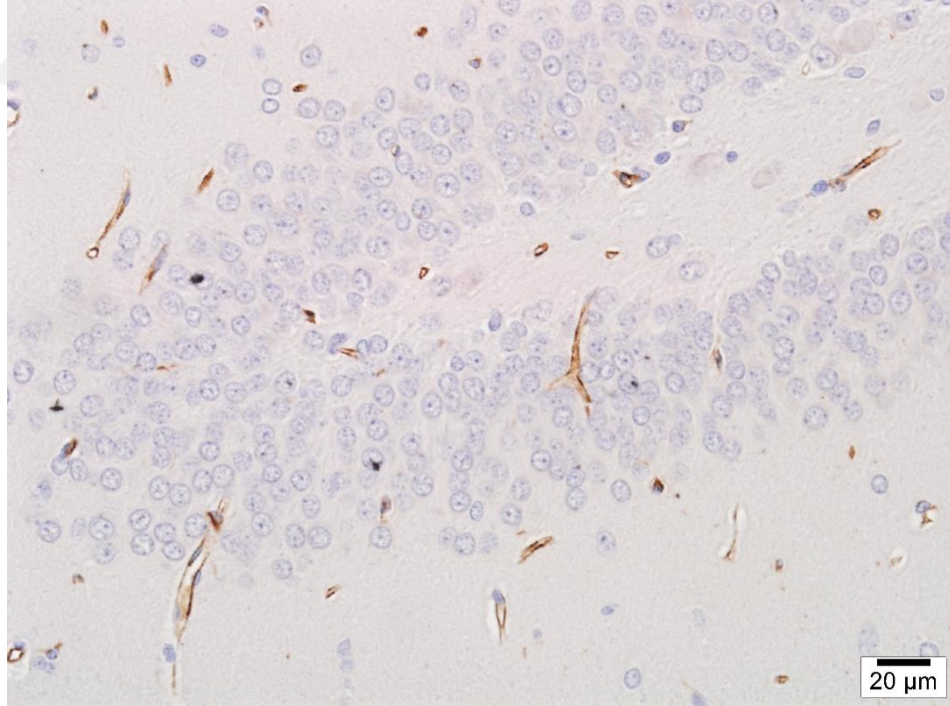
Çalışmada nestin immunoreaktivitesinin kontrolü için pozitif kontrol olarak sıçan böbrek dokusu örnekleri kullanılmıştır.



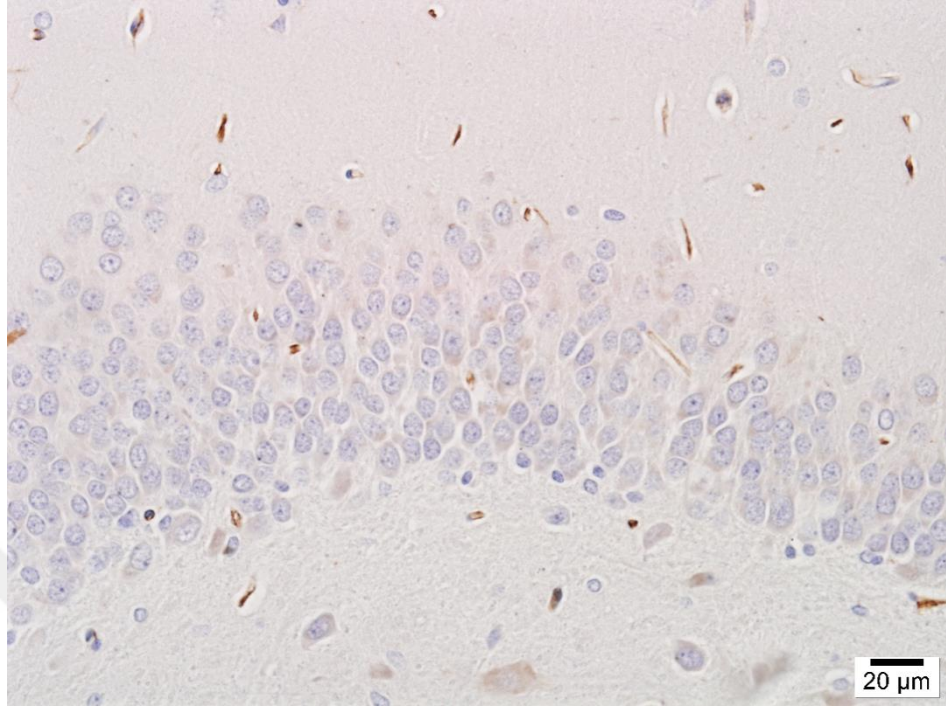
Şekil 4.8. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün’de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



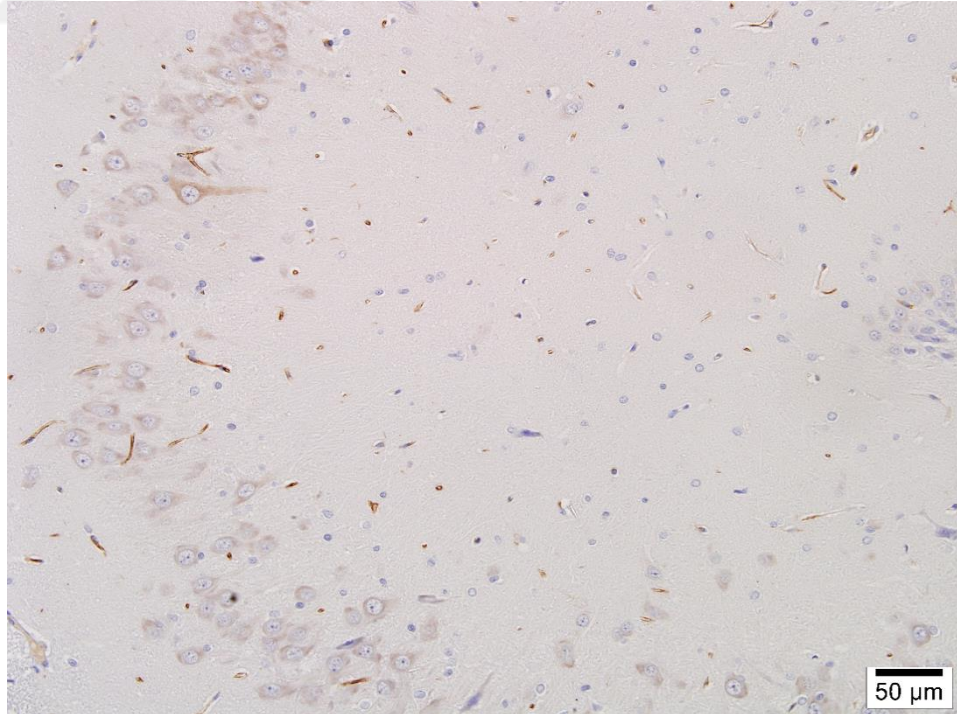
Şekil 4.9. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



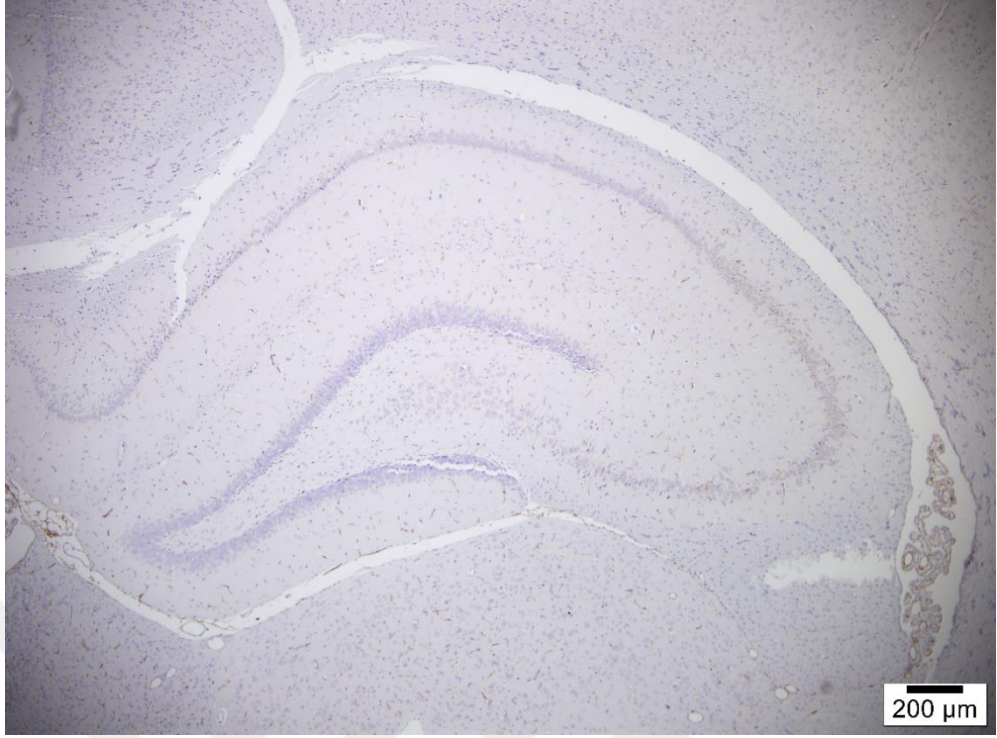
Şekil 4.10. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



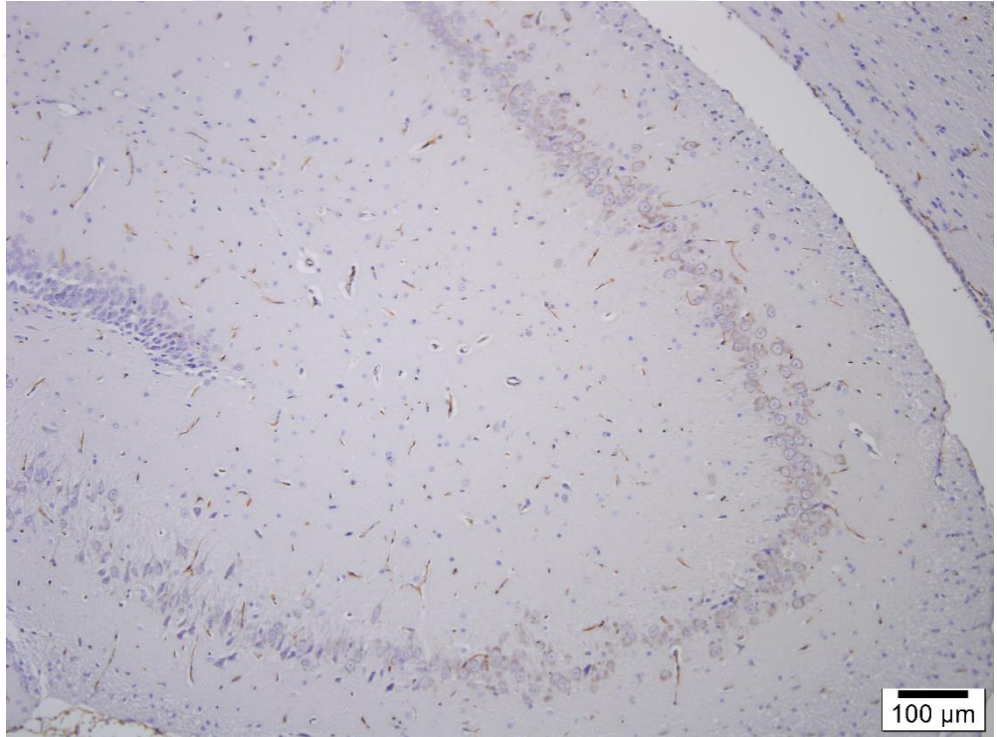
Şekil 4.11. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



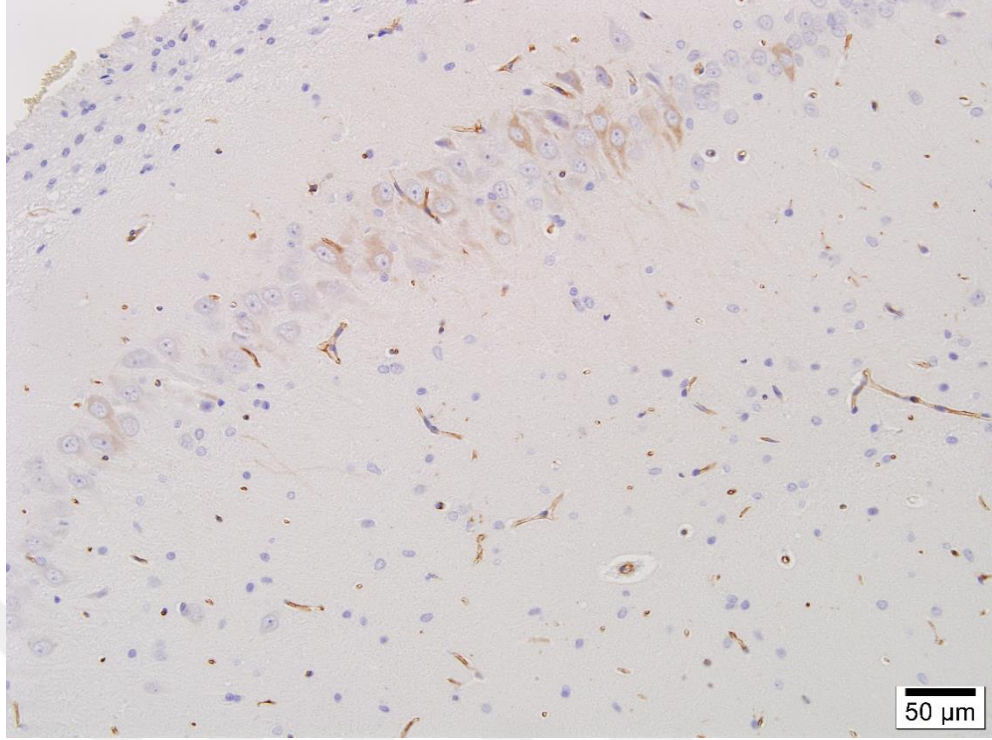
Şekil 4.12. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünün CA3 bölgesinde nestin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



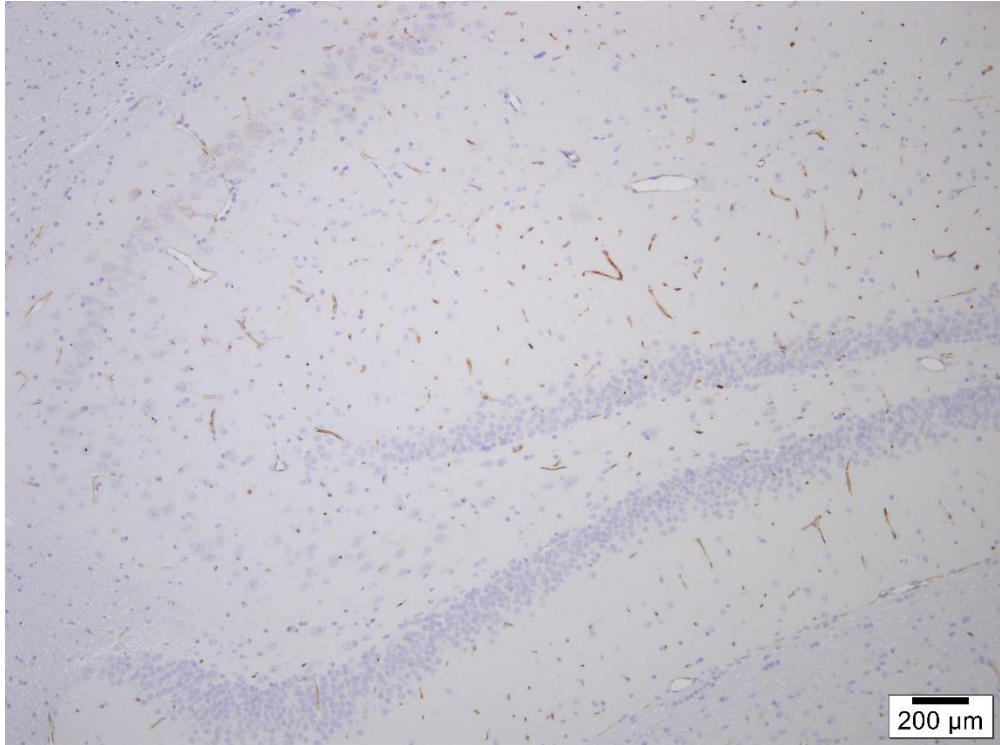
Şekil 4.13. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoxidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



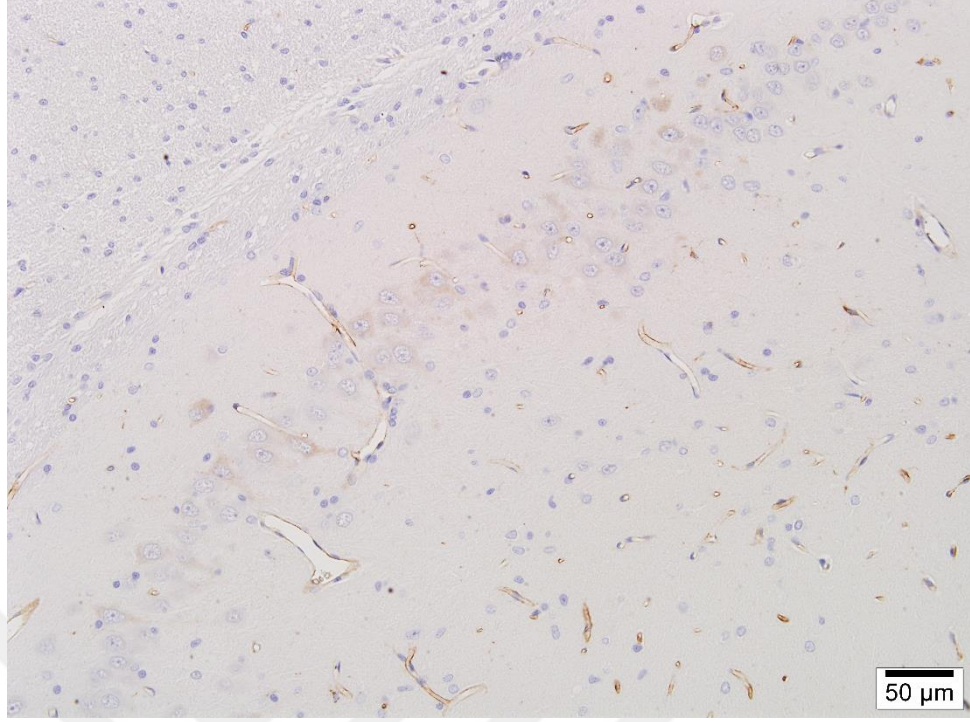
Şekil 4.14. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoxidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.



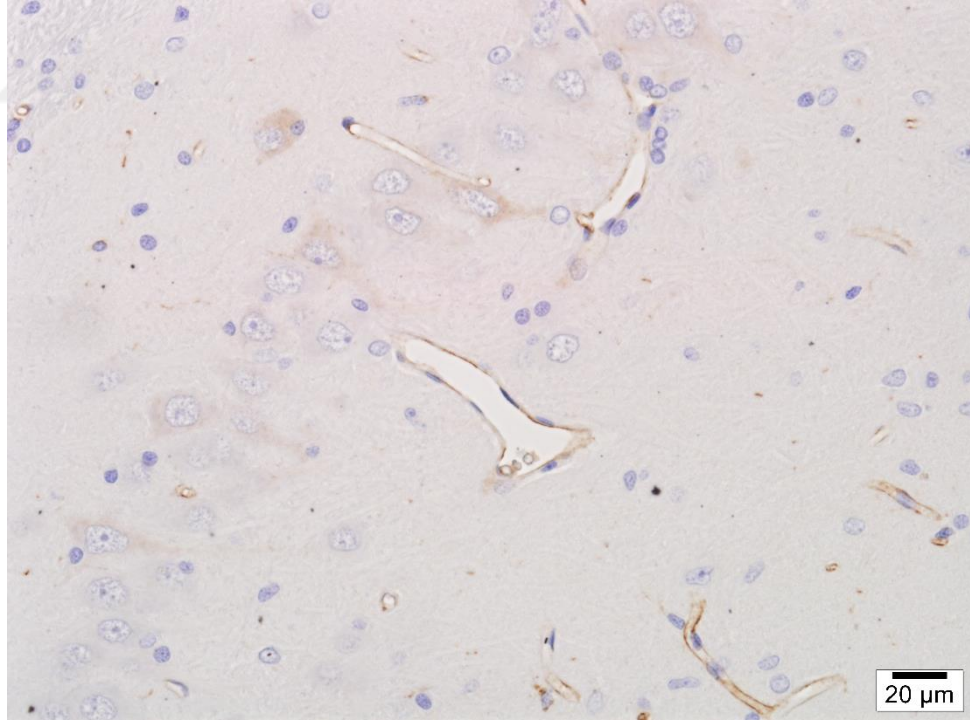
Şekil 4.15. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de CA2 bölgesinde nestin immunreaktivitesi, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



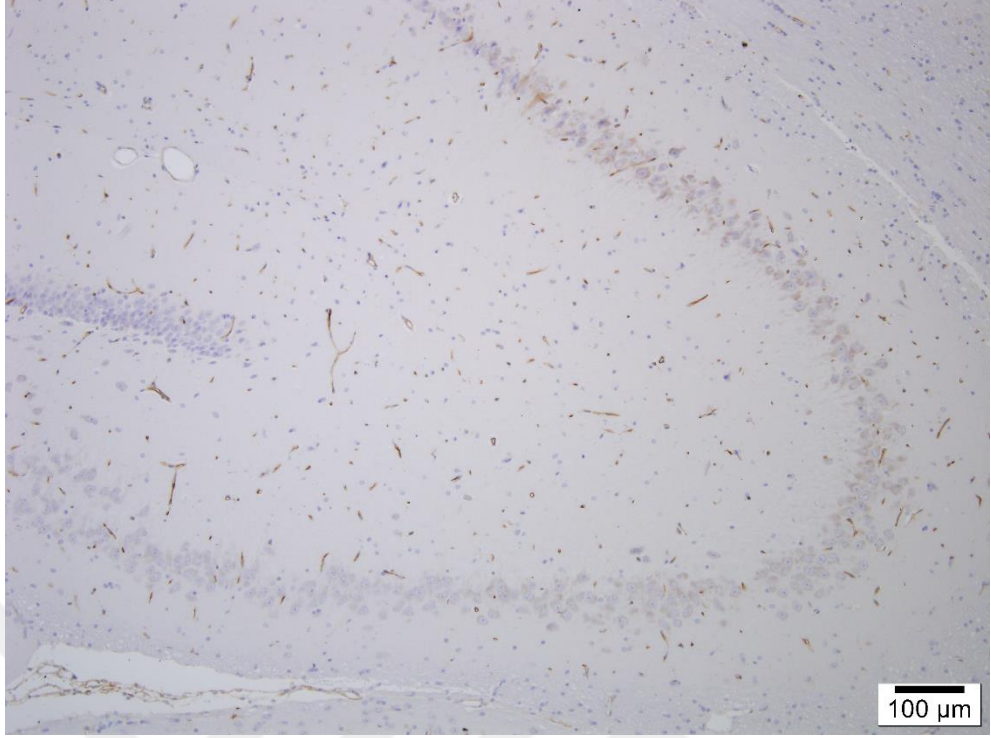
Şekil 4.16. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de nestin immunreaktivitesi, DG; Dentat girus, CA; Kornu ammonis, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



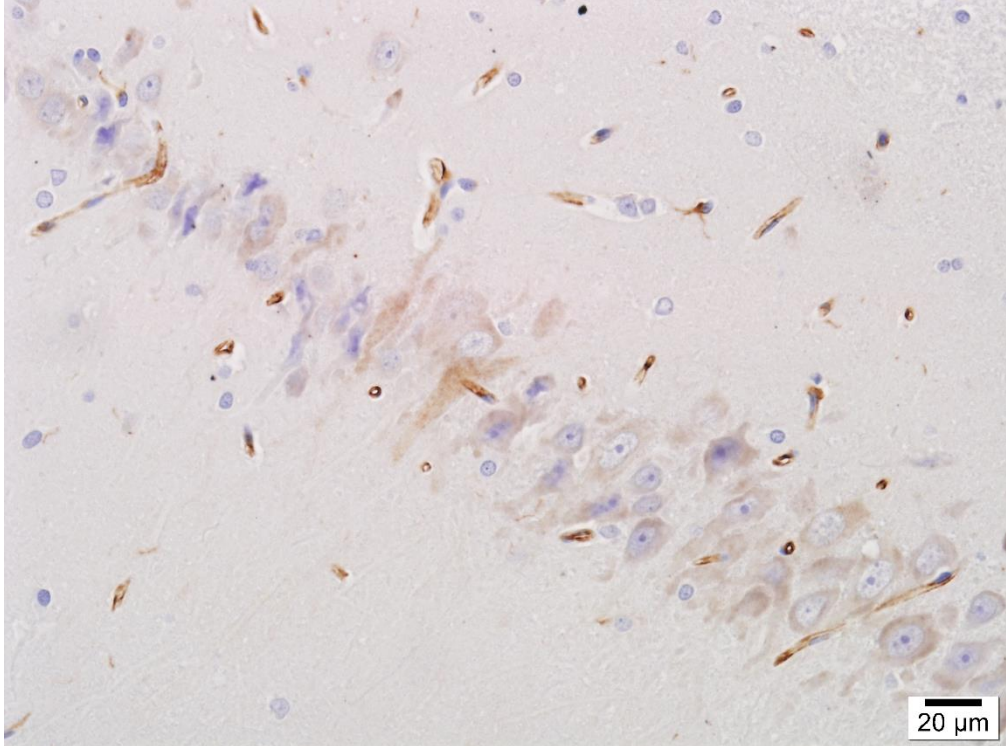
Şekil 4.17. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampusun'de CA2 bölgesinde zayıf nestin immunreaktivitesi, DAB, Bar; 50 µm.



Şekil 4.18. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampusun'de CA2 bölgesinde zayıf nestin immunreaktivitesi, DAB, Bar; 20 µm.



Şekil 4.19. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de CA3 bölgesinde nestin immunreaktivitesi, DAB, Bar; 20 µm.



Şekil 4.20. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampüsün'de CA2 bölgesinde nestin immunreaktivitesi, DAB, Bar; 20 µm.

4.2.2. Doublekortin immunreaktivitesi:

Sıçan beyin hipokampüslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerinde DC immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-DC primer antikorları uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama gerçekleştirilmiştir.

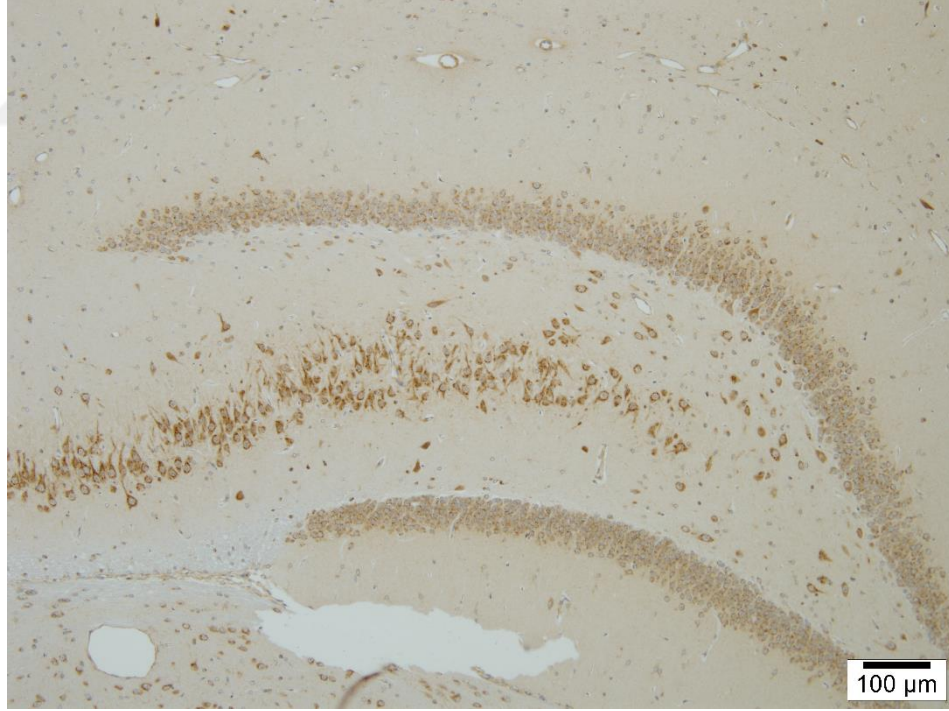
Yapılan boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de MTX ve MTX + HB deney gruplarındaki hayvanların hipokampüslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların sitoplazmalarında DC pozitif reaksiyon gözlemlendi. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda, nestin immunreaktivitesinin MTX grubundaki nöronların sitoplazmalarında MTX + HB ve diğer kontrol gruplarına göre daha az yoğun boyandığı olduğu dikkati çekti.

Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile değerlendirilmesi sonucunda sıçanların hipokampüslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki yapılarının incelenmesinde kontrol grupları ve MTX + HB grubuna göre MTX grubunda alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlendi ($P<0,05$). Ayrıca hipokampüslerin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre MTX gruptaki hayvanların bu hipokampüs bölgelerindeki yapılarda nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti.

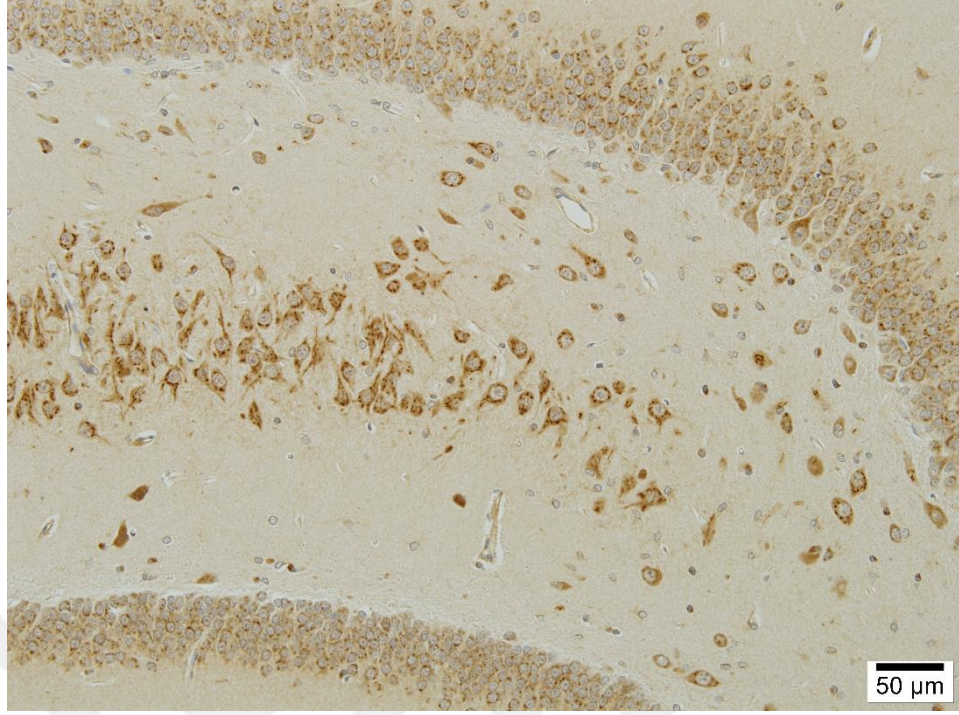
Çalışmada doublekortin immunoreaktivitesinin kontrolü için pozitif kontrol olarak sıçan testis dokusu örnekleri kullanılmıştır.



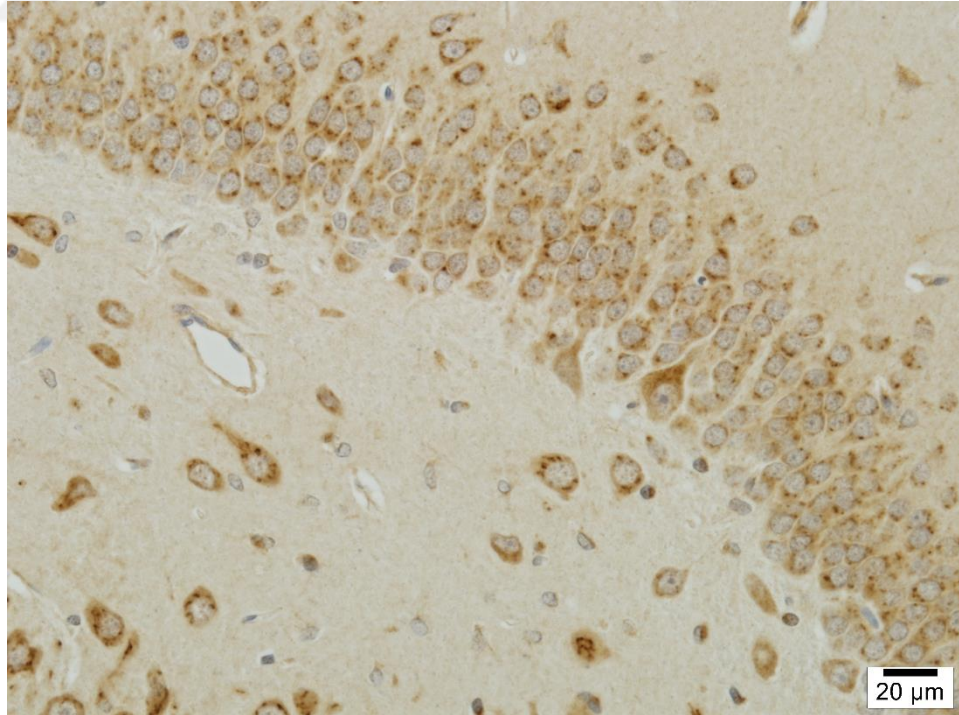
Şekil 4.21. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusun'de doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 μ m.



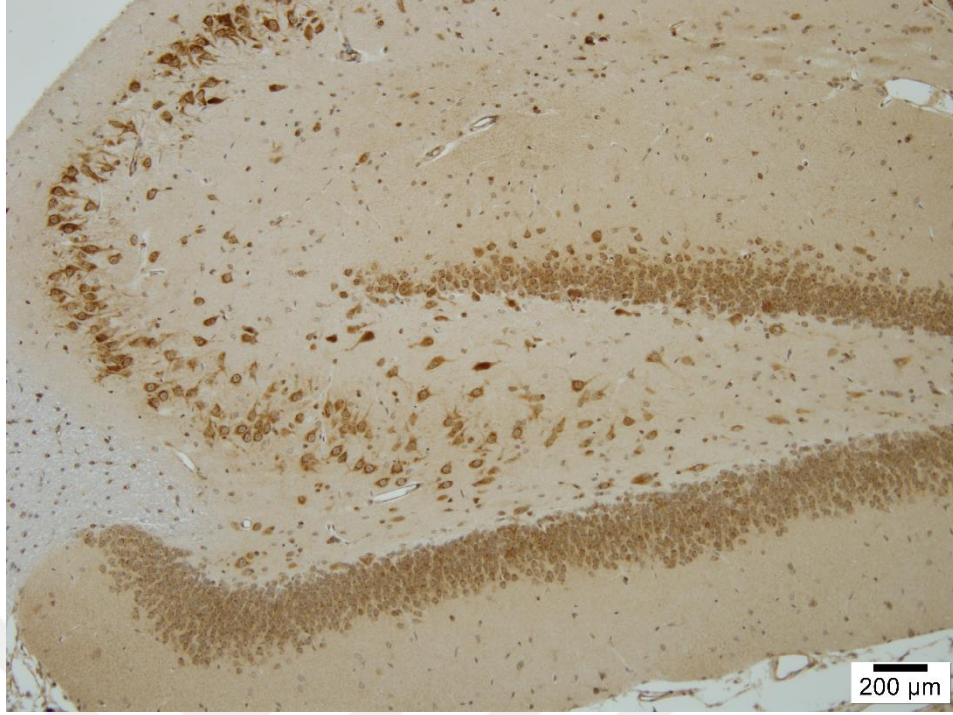
Şekil 4.22. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusünün DG'da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 μ m.



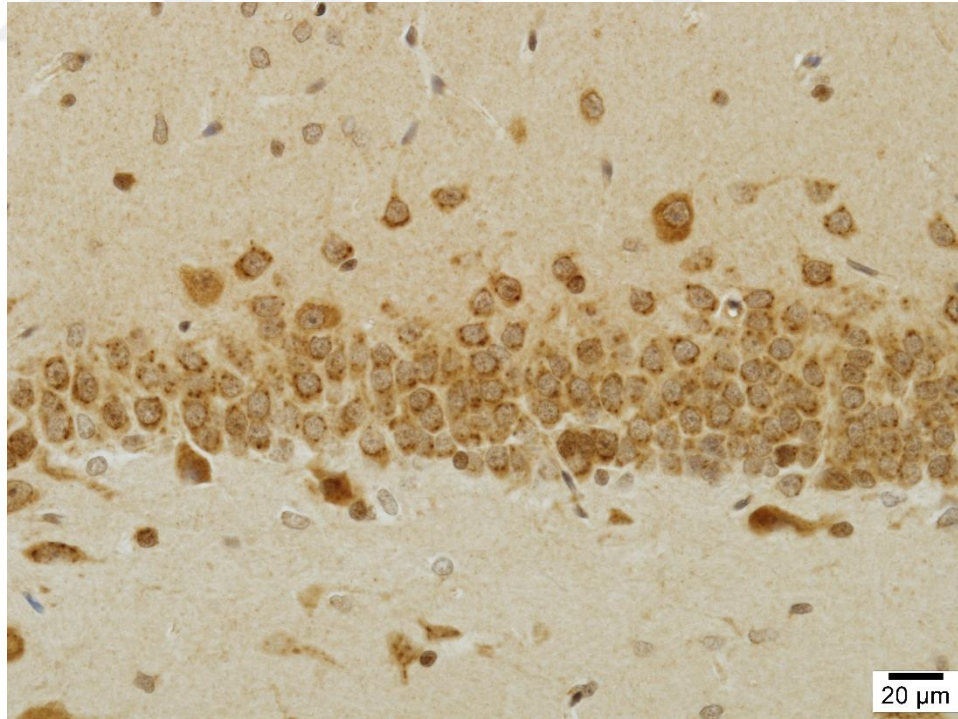
Şekil 4.23. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusünün DG'da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



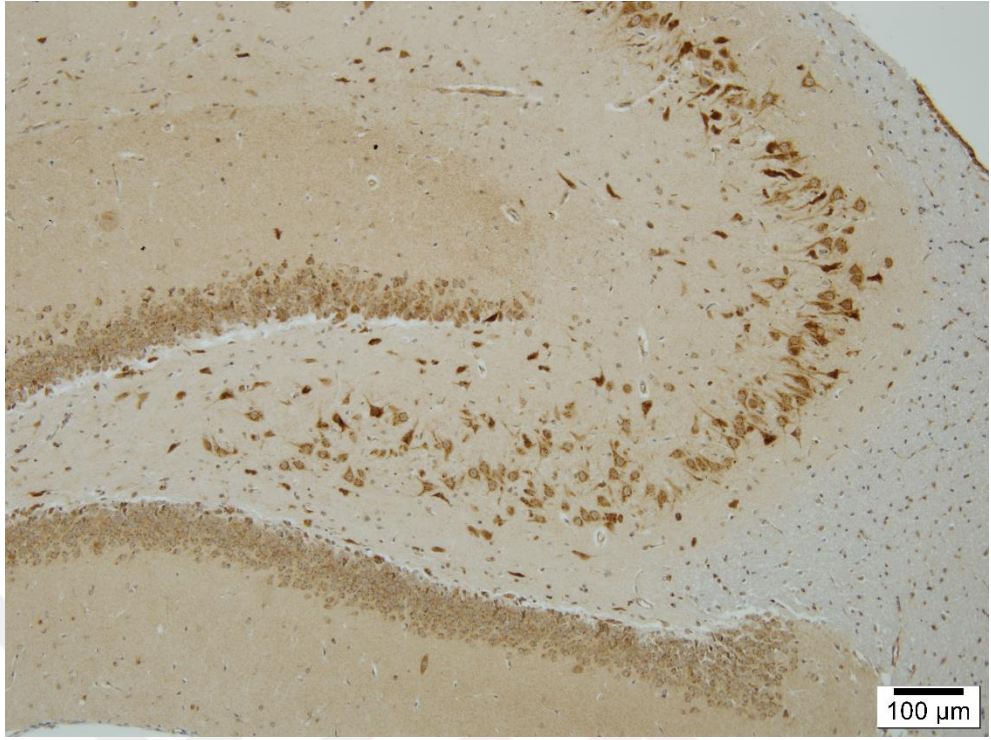
Şekil 4.24. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusünün DG'da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



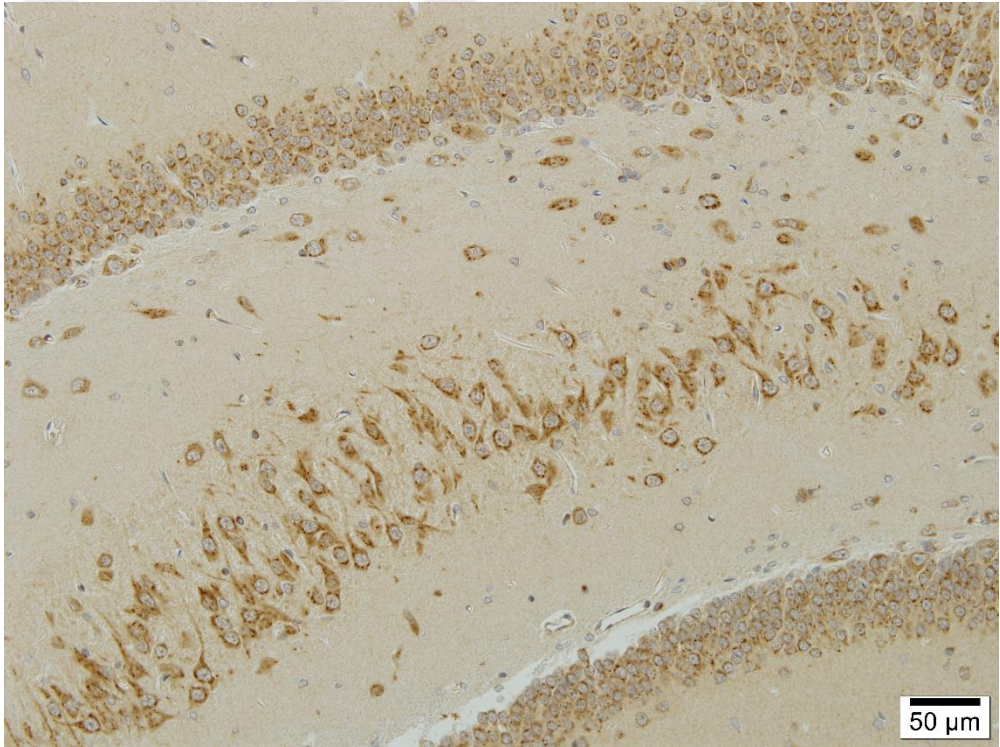
Şekil 4.25. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



Şekil 4.26. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde GD'da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 20 µm.



Şekil 4.27. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde GD’da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.



Şekil 4.28. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde GD’da doublekortin immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.

4.2.3. Ki67 immunreaktivitesi

Sıçan beyin hipokampüslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerinde Ki67 immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-Ki67 primer antikorları uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama gerçekleştirilmiştir.

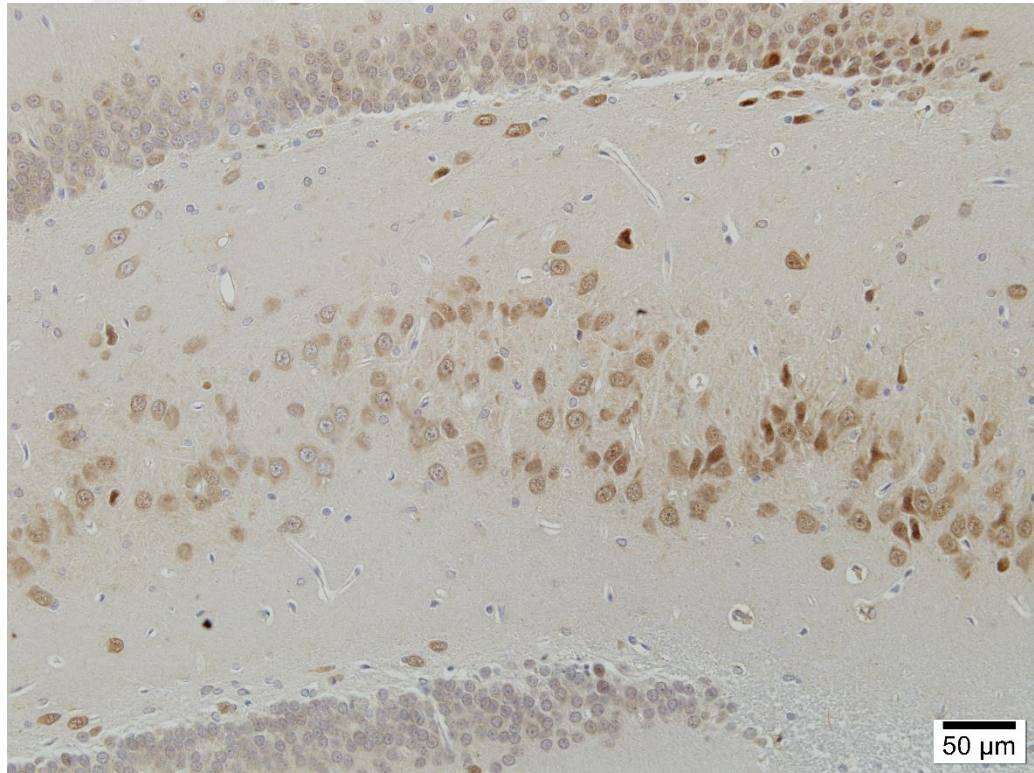
Yapılan boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de MTX ve MTX + HB deney gruplarındaki hayvanların hipokampüslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların sitoplazmalarında Ki67 pozitif reaksiyon gözlemlendi. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda, Ki67 immunreaktivitesinin MTX grubundaki nöronların sitoplazmalarında MTX + HB ve diğer kontrol gruplarına göre daha az yoğun boyandığı olduğu dikkati çekti.

Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile değerlendirilmesi sonucunda sıçanların hipokampüslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki yapılarının incelenmesinde kontrol grupları ve MTX + HB grubuna göre MTX grubunda alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir değişiklik belirlendi ($P < 0,05$). Ayrıca hipokampüslerin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre MTX gruptaki hayvanların bu hipokampüs bölgelerindeki yapılarda nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti.

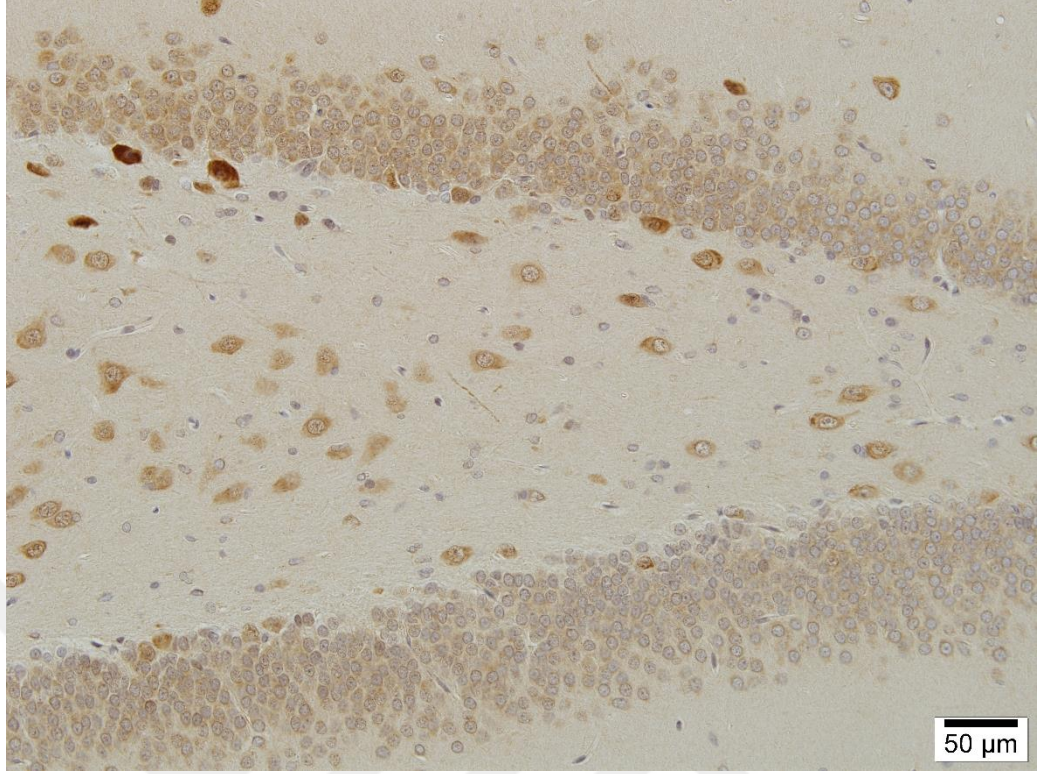
Çalışmada Ki67 immunoreaktivitesinin kontrolü için pozitif kontrol olarak sıçan akciğer ve kalp dokusu örnekleri kullanılmıştır.



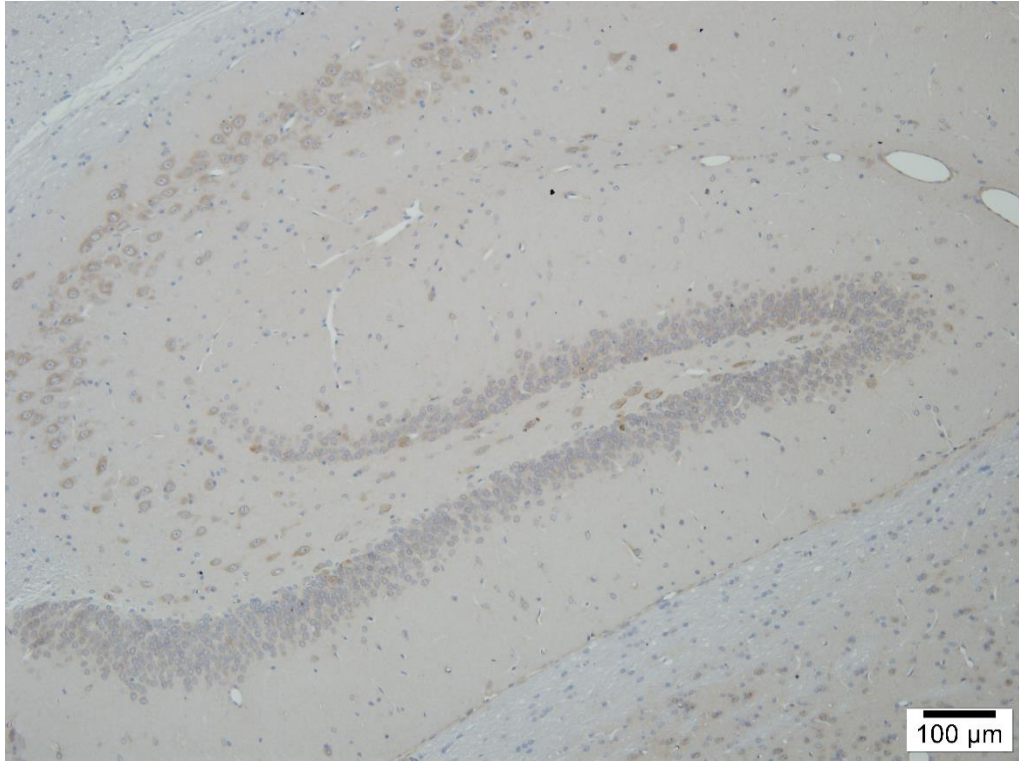
Şekil 4.29. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



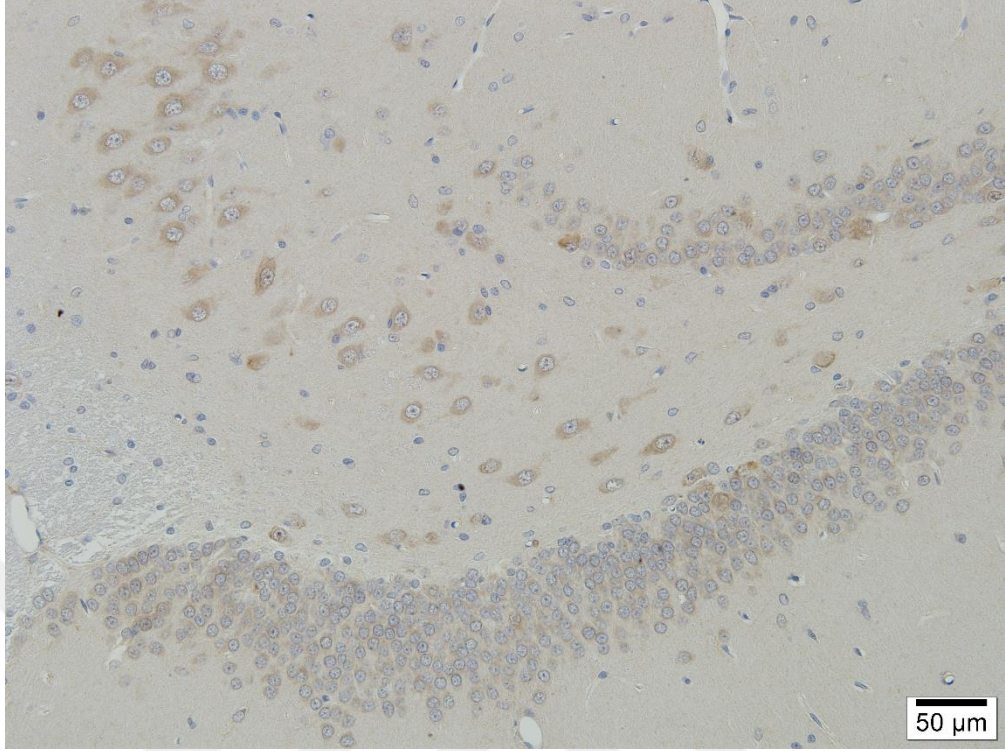
Şekil 4.30. Saline kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



Şekil 4.31. Hiperbarik kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



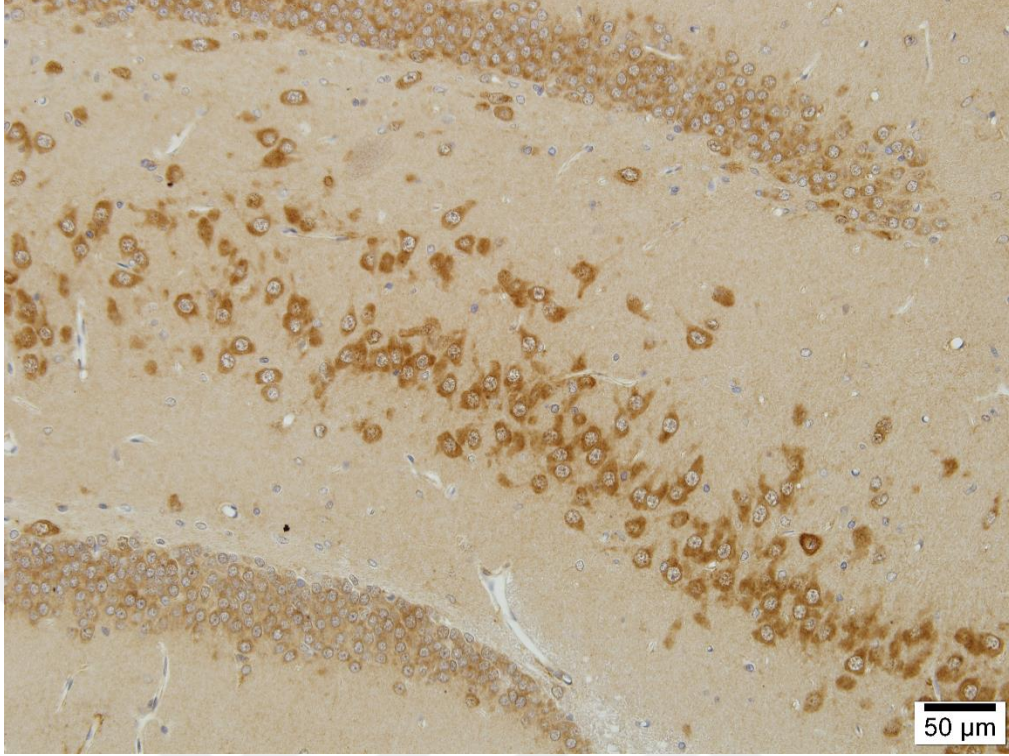
Şekil 4.32. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 µm.



Şekil 4.33. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



Şekil 4.34. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



Şekil 4.35. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampusünde Ki67 immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.

4.2.4. NeuN immunreaktivitesi:

Sıçan beyin hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerinde NeuN immunreaktivitesini ortaya koymak bu dokulara anti-NeuN primer antikorları uygulayarak Strept-avidin immunoperoksidaz boyama gerçekleştirilmiştir.

Yapılan boyamalar sonucunda hem kontrol gruplarında hem de MTX ve MTX + HB deney gruplarındaki hayvanların hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların sitoplazmalarında NeuN pozitif reaksiyon gözlemlendi. İmmunohistokimyasal boyamalar sonucunda, NeuN immunreaktivitesinin MTX grubundaki nöronların sitoplazmalarında MTX + HB ve diğer kontrol gruplarına göre daha az yoğun boyandığı olduğu dikkati çekti.

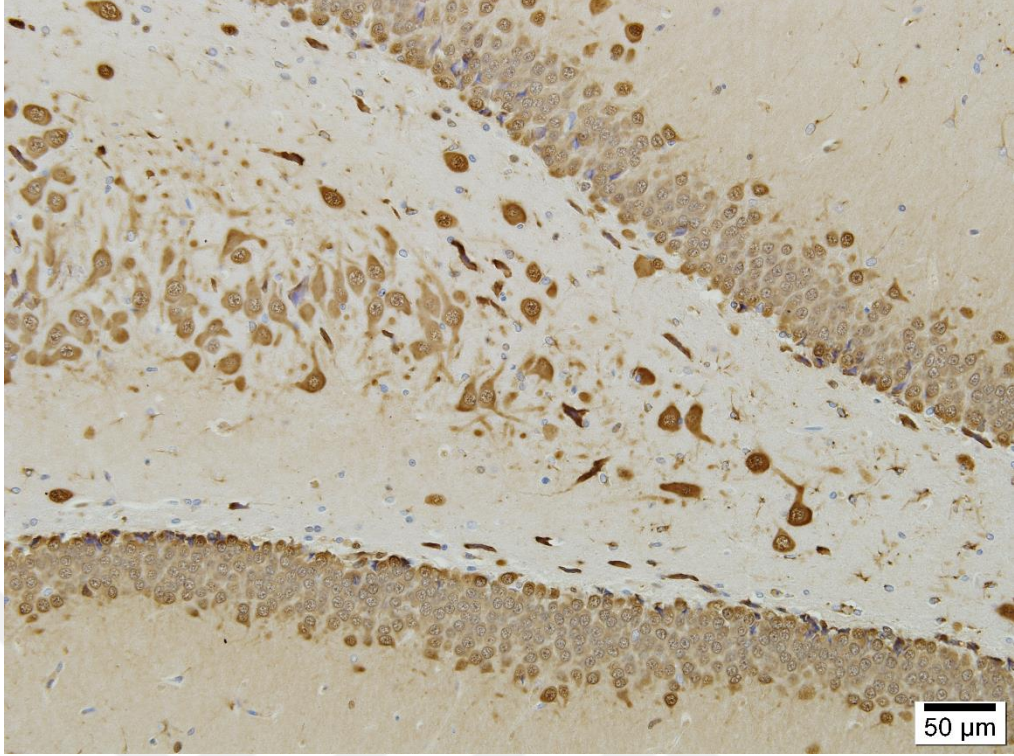
Araştırma mikroskobu ile elde edilen görüntülerin Image J programı ile değerlendirilmesi sonucunda sıçanların hipokampuslerinin girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki yapılarının incelenmesinde kontrol grupları ve MTX + HB grubuna göre MTX grubunda alan boyanma yoğunluğu açısından anlamlı bir

değişiklik belirlendi ($P<0,05$). Ayrıca hipokampusların girus dentatus ve kornu ammonis bölümlerindeki nöronların incelenmesi sırasında kontrol gruplarına göre MTX gruptaki hayvanların bu hipokampus bölgelerindeki yapılarda nörodejeneratif nöronlar ile dark nöron olarak tabir edilen normal görünümlü olmayan sinir hücrelerinin sayısının daha fazla olduğu dikkati çekti.

Çalışmada NeuN immunoreaktivitesinin kontrolü için pozitif kontrol olarak fare beyin dokusu örnekleri kullanılmıştır.



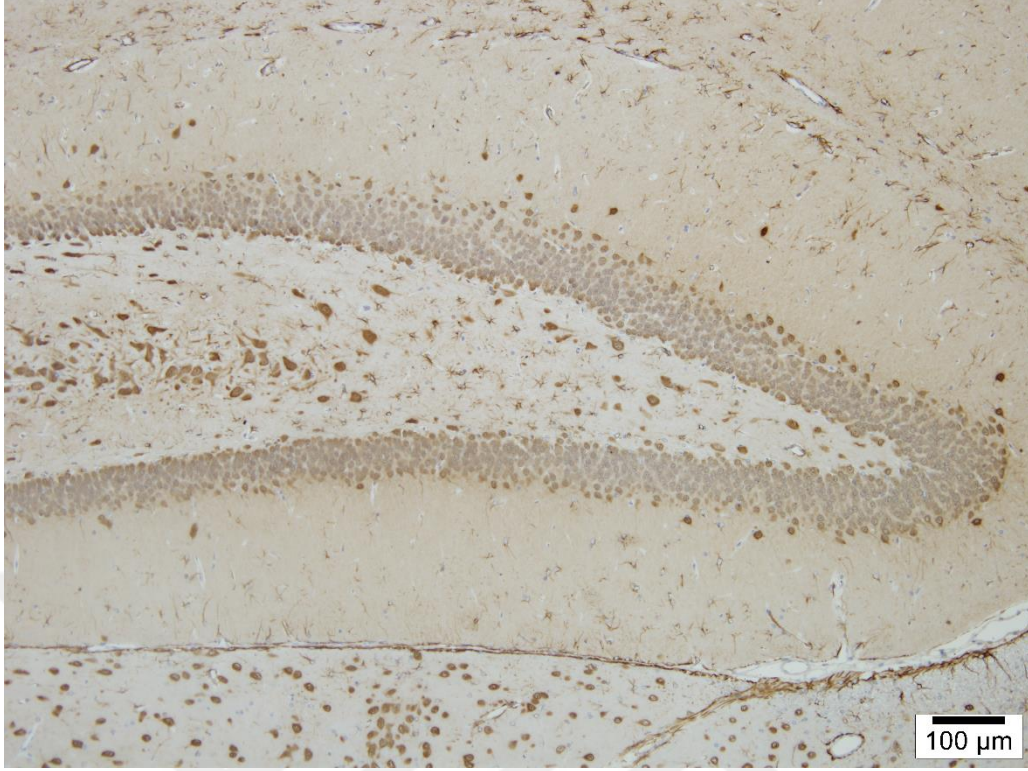
Şekil 4.36. Saline Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampusunda NeuN immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 200 µm.



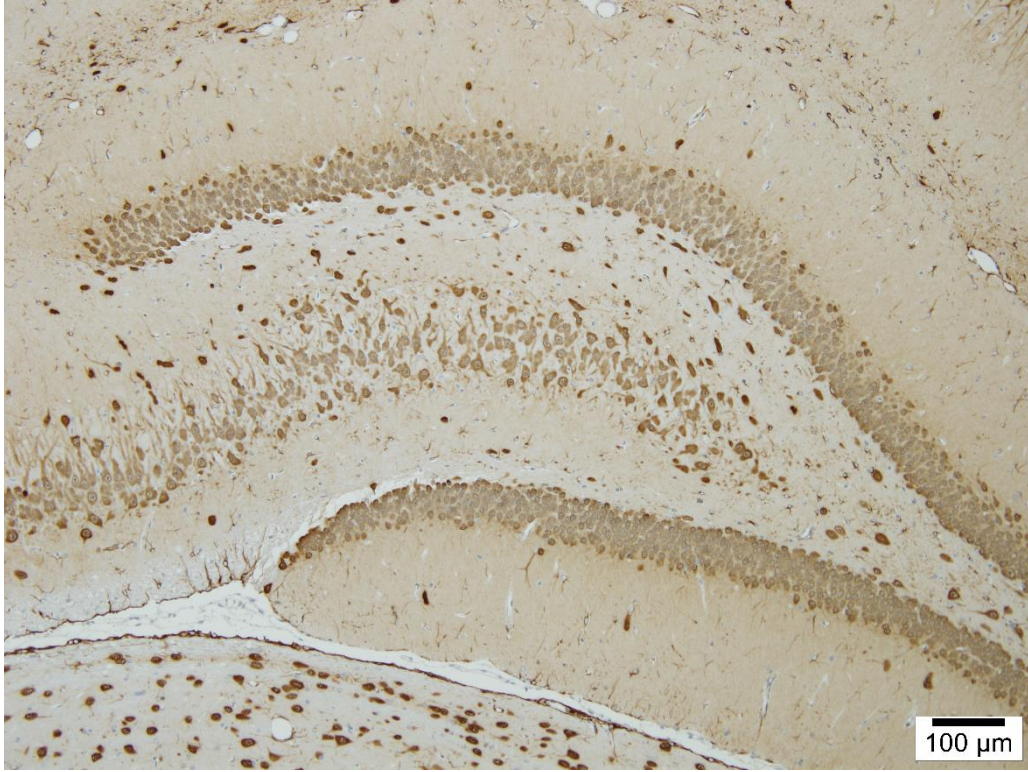
Şekil 4.37. Saline Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde NeuN immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



Şekil 4.38. Hiperbarik Kontrol grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde NeuN immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 50 µm.



Şekil 4.39. MTX grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde NeuN immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 μ m.



Şekil 4.40. MTX + HB grubuna ait bir sıçanın hipokampüsünde NeuN immunreaktivitesi, Strept-avidin immunoperoksidaz boyaması, DAB, Bar; 100 μ m.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hipokampal nörogenezle ilişkili bilişsel bozuklukları kemoterapötik ilaçlar uyarmaktadır. Memeli beynindeki nöral öncülerden yeni işlevsel nöronların üretilmesi süreci olarak tanımlanan SGZ'deki hipokampal nörogenez yaşam boyunca devam eder. Yetişkin hipokampusünde yeni nöron üretimi öğrenme ve hafıza oluşumunda etkilidir ve esas olarak yeni doğan hücrelerin hayatta kalmasına bağlıdır (Kempermann ve ark., 2015).

Kemoterapötik ilaçlar potansiyel olarak hipokampal nörogenezle ilişkili bilişsel bozuklukları uyarmaktadır. Memeli beynindeki nöral öncülerden yeni fonksiyonel nöronların üretilmesi olarak tanımlanan SGZ'deki hipokampal nörogenez süreci yaşam boyunca devam eder. Yetişkin hipokampusündeki yeni nöron üretimi, öğrenme ve hafıza oluşumunda rol oynar ve öncelikle yenidoğan hücrelerinin hayatta kalmasına bağlıdır (Chen ve ark., 2014).

Bu çalışma, hücre bölünmesi, hayatta kalma ve olgunlaşmamış nöronları ölçmek için sırasıyla Ki-67, Nestin, DCX ve NeuN immün boyama kullanılarak hipokampal nörogenez ile ilişkili olan MTX kaynaklı hafıza eksikliğini azaltmada hiperbarik oksijen tedavisinin avantajlarını belirlemek için tasarlanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları MTX'in hipokampusün SGZ'sinde Ki-67, Nestin, DCX ve NeuN pozitif hücrelerin sayısını azalttığını göstermektedir. MTX'in sıçan hipokampal DG'sinin SGZ'sinde hücre çoğalması, hayatta kalması ve farklılaşmasında azalmaya neden olması muhtemeldir (Seigers ve ark., 2008; Seigers ve ark., 2009; Lyons ve ark., 2011). Proliferasyondaki bu azalma, folat metabolizmasında dihidrofolat redüktaz (DHFR), timidin sentaz (TS) ve aminoimidazol karboksamid ribonükleotid (AICAR) transferazın inhibisyonu yoluyla gerçekleşir. Bu enzimlerdeki azalmalar folatın tetrahidrofolat aside (THFA) dönüşümünün artmasına neden olur, bu da pürin ve pirimidin sentezini azaltır, apoptozu indükler ve nörogenezi inhibe eder (Genestier ve

ark., 2000). Ayrıca MTX, mikroglia aktivitesi ve sitokin kinaz salınımı yoluyla hipokampüse kan akışının azalmasına neden olarak nöronal inflamasyon, hücre ölümü ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) çoğalmasına yol açar. Bu olumsuz etkiler hipokampal hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını büyük ölçüde engeller. MTX sadece hipokampüsteki nörojenezi olumsuz etkilemekle kalmaz, aynı zamanda uzamsal, uzamsal olmayan ve epizodik hafızayı da bozar (Genestier ve ark., 2000; Seigers ve ark., 2008).

MTX'in hafıza bozukluğunu tetiklediği ana mekanizma, hücre içi aktive edilmiş folatların azalması yoluyla olabilir, bu da DNA, RNA ve protein sentezinin bozulmasıyla sonuçlanır. Buna göre MTX, yeni üretilen hipokampal nöronların üretimini baskılayabilir ve bilişsel bozulmaya yol açabilir.

Ayrıca MTX kemoterapisinden sonra hipokampusun SGZ'sinde hücre çoğalması, hücre hayatta kalması ve yeni doğan nöronların sayısında azalmalar bulduk; bu da MTX'in hipokampal nörojenizde azalmalara neden olduğunu kuvvetle düşündürüyor. Endojen bir protein belirteci olan Ki-67, hücre bölünmesi sırasında (G1, S, G2 ve mitoz aşamaları) eksprese edilir ve yetişkin beyinde yeni nöronların üretiminin başlatılmasına yardımcı olur. İlginç bir şekilde DCX, hücre çoğalması seviyeleriyle ilişkilidir ve özellikle olgunlaşmamış nöronlarda eksprese edilir (Kremer ve ark., 2004).

Nörojeneze ilişkin sonuçlarımız, hipokampal nörojenizin MTX kemoterapisi tarafından baskılandığı önceki birkaç çalışmanın bulgularıyla paralellik göstermektedir. Bir çalışma, MTX uygulamasından sonra hipokampal hücre çoğalmasının azaldığını buldu ve bir diğeri, MTX ve 5-FU kombinasyonunun uygulandığı sıçanlarda DCX eksprese eden olgunlaşmamış nöronlarda bir azalma buldu. Ek olarak, MTX ile tedavi edilen sıçanlarda hücre çoğalmasında, hücre hayatta kalmasında ve olgunlaşmamış nöronların sayısında azalmalar bulunmuştur. Bu bulgular, yeni doğan nöronların üretiminin, hipokampusa bağlı anıların oluşumu için gerekli olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, hiperbarik oksijenin MTX ile birlikte uygulanması durumunda hipokampal nörojenizdeki bu bozuklukların düzeldiğini bulduk; bu da hiperbarik oksijenin yetişkin sıçanlarda MTX

kemoterapisinin neden olduğu hücre çoğalması, hücre sağkalımı ve olgunlaşmamış nöron sayısındaki azalmaları önlediğini gösteriyor (Brown ve ark., 2003).

Sonuç olarak; metotreksat verilen grupta salin ve hiperbarik oksijen verilen gruba göre tüm antikorlar için immunohistosal boyanma yoğunluğunun azaldığı görülmüştür. Buna karşın Mtx + hiperbarik oksijen uygulanan grupta metotreksat grubuna göre immunohistosal boyanma yoğunluğunun salin kontrol ve hiperbarik kontrol grubuna benzer olduğu görülmüştür.

Elde edilen bulgular ışığında yapılan çalışmayla hiperbarik oksijen uygulamasının metotreksat kullanımını gerektiren hastalık durumlarında hastaya destek tedavi olarak olumlu etkileri olabileceği, ileride oluşabilecek bazı nörodejeneratif hastalıkların önlenmesi için yeni bir alternatif tedavi yönteminin önünü açabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abbott LC, Nigussie F. Adult neurogenesis in the mammalian dentate gyrus. *Anat Histol Embryol*, 2020; 49; 3-16.
- Acıpayam C. MTX İle Bağırsak Epiteli Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Hesperidinin Koruyucu Etkisi. Yandal Uzmanlık Tezi, 2011
- Ahn S, and Joyner AL. In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog. *Nature*, 2005; 437: 894-897.
- Aimone JB, Deng W, Gage FH. Adult neurogenesis: integrating theories and separating functions. *Trends Cogn Sci*, 2010; 14: 325-337
- Akins MR, Garcia ADR. Neurogenesis in the Adult Brain. *Encyclopedia of Cell Biology*, 2016; 4: 134-40.
- Altman J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals. *Science*, 1962; 135(3509): 1127-1128.
- Amaral D, Lavenex P, In: Andersen P, Morris R, Amaral D, Bliss T, O'Keefe J, editors. *Hippocampal neuroanatomy. The Hippocampus Book*, Chapter 3. New York. Oxford University Press, 2006; 37-115
- Amir H, Shai E. The Hyperoxic-hypoxic Paradox. *Biomolecules*, 2020; 10: 958-969.
- Assaraf YG. The role of multidrug resistance efflux transporters in antifolate resistance and folate homeostasis. *Drug Resist Updat*, 2006; 9: 227-246.
- Aydın AA, Hipokampal nöroenez ile üretilen yetişkin doğumlu granül hücrelerinin dentat giyrustaki nöron topluluğunun dinamik ve doğrusal yanıtlarına katkısı. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 2021.
- Barnhart K, Coutifaris C, Esposito M. The pharmacology of methotrexate. *Expert Opinion on pharmacotherapy*, 2001; 2(3): 409-417.
- Bernstein BE. Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell*, 2007; 128: 669-681.

- Bonaguidi MA, Wheeler MA, Shapiro JS, Stadel RP, Sun GJ, Ming G. In vivo clonal analysis reveals self-renewing and multipotent adult neural stem cell characteristics. *Cell*, 2011; 145: 1142-1155.
- Bond AM, Ming GL, Song H. Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell*, 2015; 17: 385-395.
- Bottes S, Jaeger BN, Pilz GA, Jörg DJ, Cole JD, Kruse M. Long-term self-renewing stem cells in the adult mouse hippocampus identified by intravital imaging. *Nat Neuroscience*, 2021; 24: 225-233.
- Bruel-Jungerman E, Davis S, Rampon C, Laroche S. Long-term potentiation enhances neurogenesis in the adult dentate gyrus. *J Neurosci*, 2006; 26: 5888-5893.
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E. Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience*, 1993; 56: 337-344.
- Camporesi EM, Bosco G. Mechanisms of Action of Hyperbaric Oxygen Therapy. *Undersea Hyperb Med*, 2014; 41: 247-252.
- Carneiro-Filho BA, Lima IP, Araujo DH, Cavalcante MC, Carvalho GH, Brito GA, Lima V, Monteiro SM, Santos FN, Ribeiro RA, Lima AA. Intestinal barrier function and secretion in methotrexate-induced rat intestinal mucositis. *Dig Dis Sci*, 2004; 49(1): 65-72.
- Carney Amy Y. Hyperbaric Oxygen Therapy: An Introduction. *Critical Care Nursing Quarterly*, July/September 2013; 36(3): 274-279.
- Ceanga M, Dahab M, Witte OW, Keiner S. Adult Neurogenesis and Stroke: A Tale of Two Neurogenic Niches. *Front Neurosci Sec Neurogenesis*, 2021; 10: 15: 700297.
- Chang HC, Yang YR, Wang RY. Effects of repetitive hyperbaric oxygen therapy on neuroprotection in middle cerebral artery occlusion rats. *Brain Res*, 2020; 1748: 147097.
- Chen J, Chen YH, Lv HY, Chen LT. Effect of hyperbaric oxygen on lipid peroxidation and visual development in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain damage. *Biomed Rep*, 2016; 5: 136-140.

- Chen W, Liang X, Nong Z, Li Y, Pan X, Chen C, Huang L. The Multiple Applications and Possible Mechanisms of the Hyperbaric Oxygenation Therapy. *Med Chem*, 2019; 15: 459-471.
- Chen YC, Sheen JM, Wang SC, Hsu MH, Hsiao CC, Chang KA, Huang LT. Methotrexate Neurotoxicity Is Related to Epigenetic Modification of the Myelination Process. *Int J Mol Sci*, 2021; 4: 41-49.
- Cho KO. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. *Nat Commun*, 2015; 6: 6606-6614.
- Codega P, Silva-Vargas V, Paul A, Maldonado-Soto AR, Deleo AM, Pastrana E, Doetsch F. Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron*, 2014; 82: 545-559.
- Cohen IJ. Neurotoxicity after high-dose methotrexate (MTX) is adequately explained by insufficient folinic acid rescue. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017; 79: 1057-1065.
- Corotto FS, Henegar JR, and Maruniak JA. Odor deprivation leads to reduced neurogenesis and reduced neuronal survival in the olfactory bulb of the adult mouse. *Neuroscience*, 1994; 61: 739-744.
- Çakır T, Özkan E, Dulundu E, Topaloğlu Ü, Şehirli AÖ, Ercan F, Şener E, Şener G. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents methotrexate-induced hepatorenal oxidative injury in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2011; 63(12): 1566-1571
- Danzer SC, Kotloski RJ, Walter C, Hughes M, McNamara JO. Altered morphology of hippocampal dentate granule cell presynaptic and postsynaptic terminals following conditional deletion of TrkB. *Hippocampus*, 2008; 18: 668-678.
- Denoth-Lippuner A, Jessberger S. Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. *Nat Rev Neurosci*, 2021; 22: 223-236.
- Dieni C, Nietz AK, Panichi R, Wadiche JI, Overstreet-Wadiche L. Distinct 43 determinants of sparse activation during granule cell maturation. *Journal of Neuroscience*, 2013; 33: 19131-19142.
- Doetsch F, Alvarez-Buylla A. Network of tangential pathways for neuronal migration in adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci*, 1996; 93: 14895-14900.

- Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*, 1997; 17: 5046-5061.
- Edwards ML. Hyperbaric oxygen therapy. Part 1: history and principles, *Allegheny Veterinary Emergency Trauma and Specialty*, 2010; 20(3): 284-8.
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn A-M, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 1998; 4: 1313-1317.
- Favaro R, Valotta M, Ferri ALM, Latorre E, Mariani J, Giachino C. Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat Neurosci*, 2009; 12: 1248-1256.
- Feng Z, Liu J, Ju R. Hyperbaric oxygen treatment promotes neural stem cell proliferation in the subventricular zone of neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage. *Neural Regen Res*, 2013; 8: 1220-1227.
- Gao Z, Ure K, Ding P, Nashaat M, Yuan L, Ma J. The master negative regulator REST/NRSF controls adult neurogenesis by restraining the neurogenic program in quiescent stem cells. *J Neurosci*, 2011; 31: 9772-9786.
- Garcia-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A. Architecture and cell types of the adult subventricular zone: In search of the stem cells. *J Neurobiol*, 1998; 36: 234-248.
- Genestier L, Paillot R, Quemeneur L, Izeradjene K, Revillard JP. Mechanisms of action of methotrexate. *Immunopharmacology*, 2000; 3:247-257
- Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult neurogenesis in the hippocampus: from stem cells to behavior. *Cell*, 2016; 167: 897-914.
- Gottfried I, Schottlender N, Ashery U. Hyperbaric oxygen treatment-from mechanisms to cognitive improvement. *Biomolecules*, 2021; 11: 1520-1529.
- Gould E, Cameron HA, Daniels DC, Woolley CS, McEwen BS. Adrenal hormones suppress cell division in the adult rat dentate gyrus. *J Neurosci*, 1992; 12:3642-3650
- Hamed KM, Dighriri IM, Baomar AF, Alharthy BT, Alenazi FE, Alali GH, Alenazy RH, Alhumaidi NT, Alhulayfi DH, Alotaibi YB, Alhumaidan SS, Alhaddad

- ZA, Humadi AA, Alzahrani SA, Alzahrani S. Overview of methotrexate toxicity: A comprehensive literature review. *Cureus*, 2022; 14(9): 1-9.
- Hodge RD, Hevner RF. Expression and actions of transcription factors in adult hippocampal neurogenesis. *Dev Neurobiol*, 2011; 71: 680-689.
- Huang C, Hsu P, Hung Y, Liao Y, Liu C, Hour C, Kao M, Tsay GJ, Hung H, Liu GY. Ornithine decarboxylase prevents methotrexate-induced apoptosis by reducing intracellular reactive oxygen species production. *Apoptosis*, 2005; 10: 895-907.
- Huang L, Tissing WJ, De Jonge R, Van Zelst BD, Pieters R. Polymorphisms in folate-related genes: Association with side effects of high-dose methotrexate in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2008; 22: 1798-1800.
- Ihunwo AO, Tembo LH, Dzamalala C. The dynamics of adult neurogenesis in human hippocampus. *Neural Regen Res*, 2016; 11: 1869-1883.
- Jin J, Kim SN, Liu X, Zhang H, Zhang C, Seo JS, Kim Y, Sun T. miR-17-92 Cluster regulates adult hippocampal neurogenesis, anxiety and depression. *Cell Reports*, 2016; 16: 1653- 1663.
- Jones MW, Wyatt HA. *Hyperbaric Physics*. StatPearls Publishing Treasure Island, FL, USA, 2019.
- Jurkowski MP, Bettio L, Woo EK, Patten A, Yau S, Gil-Mohapel J. Beyond the Hippocampus and the SVZ: Adult Neurogenesis Throughout the Brain. *Front Cell Neurosci Sec Cellular Neurophysiology*, 2020; 29: 14-20.
- Kaplan MS, Bell DH. Mitotic Neuroblasts in the 9-day-old and 11-month-old rodent hippocampus. *J Neurosci*, 1984; 4:1429-1441.
- Kaptan Z, Üzümlü G. Erişkin hipokampal nörogenezin öğrenme ve hafıza fonksiyonlarındaki Rolü. *Türk J Neurol*, 2016; 22: 149-155.
- Karalay O, Doberauer K, Vadodaria KC, Knobloch M, Berti L, Miquelajauregui A. Prospero-related homeobox 1 gene (Prox1) is regulated by canonical Wnt signaling and has a stage-specific role in adult hippocampal neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci, USA* 2011; 108: 5807-5812.
- Kempermann G, Jessberger S, Steiner B, Kronenberg G. Milestones of neuronal development in the adult hippocampus. *Trends Neurosci*, 2004; 27: 447-452

- Kempermann G, Song H, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2015; 7:a018812.
- Kim WR, Kim Y, Eun B, Park O, Kim H, Kim K. Impaired migration in the rostral migratory stream but spared olfactory function after the elimination of programmed cell death in Bax knock-out mice. *J Neurosci*, 2007; 27:14392-14403.
- Klempin F, Kronenberg G, Cheung G, Kettenmann H, Kempermann G. Properties of Doublecortin-(DCX)-Expressing Cells in the Piriform Cortex Compared to the Neurogenic Dentate Gyrus of Adult Mice. *Plos One*, 2011; 6(10): e25760.
- Kremer JM. Toward a better understanding of methotrexate. *Arthritis Rheum*, 2004; 50: 1370-1382.
- Kuwabara T, Hsieh J, Muotri A, Yeo G, Warashina M, Lie DC. Wnt-mediated activation of NeuroD1 and retro-elements during adult neurogenesis. *Nat Neurosci*, 2009; 12: 1097-1105.
- Leal-Galicia P, Chávez-Hernández ME, Mata F, Mata-Luévanos J, Rodríguez-Serrano LM, Tapia-de-Jesús A, Buenrostro-Jáuregui MH. Adult Neurogenesis: A Story Ranging from Controversial New Neurogenic Areas and Human Adult Neurogenesis to Molecular Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021; 22(21): 11489.
- Lepousez G, Lledo PM. Life and death decision in adult neurogenesis: in praise of napping. *Neuron*, 2011; 71(5): 768-771.
- Li HZ, Chen JF, Liu M, Shen J. Effect of hyperbaric oxygen on the permeability of the blood-brain barrier in rats with global cerebral ischemia/reperfusion injury. *Biomed Pharmacother*, 2018; 108: 1725-1730.
- Li Y. MDM2 inhibition rescues neurogenic and cognitive deficits in a mouse model of fragile X syndrome. *Sci Transl Med*, 2016; 8: 336ra361.
- Lim DA, Alvarez-Buylla A. Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad*, 1996; 7526-7531
- Liu S, Shen G, Deng S, Wang X, Wu Q, Guo A. Hyperbaric oxygen therapy improves cognitive functioning after brain injury. *Neural Regen Res*, 2013; 8: 3334-3343.

- Lledo PM, Gheusi G, and Vincent JD. Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiol Rev.* 2005; 85: 281-317.
- Llorens-Martín M, Jurado-Arjona J, Avila J, Hernández F. Novel connection between newborn granule neurons and the hippocampal CA2 field. *Experimental Neurology*, 2015; 263: 285-292.
- Lois C, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Chain migration of neuronal precursors. *Science*, 1996; 271: 978-981.
- Lois C. Long distance neuronal migration in the adult mammalian brain. Rockefeller University, New York, 1996: 160.
- Longobardi P, Hoxha K, Perreca F. Is Hyperbaric Oxygen an Effective Treatment for the Prevention of Complications in SARS-CoV-2 Asymptomatic Patients? *Infect Microbes Dis*, 2021; 3: 109-111.
- Lyons L, ElBeltagy M, Umka J, Markwick R, Startin R, Bennett G, Wigmore P. Fluoxetine reverses the memory impairment and reduction in proliferation and survival of hippocampal cells caused by methotrexate chemotherapy. *Psychopharmacology*, 2011; 3: 105-115
- Maksimovic V, Pavlovic-Popovic Z, Vukmirovic S. Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Mol Biol Rep*, 2020; 47: 4699-4708.
- Malaviya AN. Landmark papers on the discovery of methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis and other systemic inflammatory rheumatic diseases: a fascinating story. *Int J Rheum Dis*, 2016; 19: 844-851.
- Martínez-Cerdeñ V, Noctor SC. Neural Progenitor Cell Terminology. *Front Neuroanat*, 2018; 12: 41-49.
- Martins-Taylor K, Schroeder DI, LaSalle JM, Lalande M, Xu RH. Role of DNMT3B in the regulation of early neural and neural crest specifiers. *Epigenetics*, 2012; 7:71-82.
- Matchett GA, Martin RD, Zhang JH. Hyperbaric oxygen therapy and cerebral ischemia: Neuroprotective mechanisms. *Neurol Res*, 2009; 31: 114-121.
- Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, Alvarez-Buylla A. Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci*, 2006; 26: 7907-7918.

- Merkle FT, Tramontin AD, García-Verdugo JM, and Alvarez-Buylla A. Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci*, 2004; 101: 17528-17532.
- Miale IL, and Sidman RL. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. *Exp Neurol*, 1961; 4: 277-296.
- Mich JK, Signer RA, Nakada D, Pineda A, Burgess RJ, Vue TY, Johnson JE, Morrison SJ. Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *eLife*, 2014; 3: e02669.
- Milovanova TN, Bhopale VM, Sorokina EM, Moore JS, Hunt TK, Hauer-Jensen M, Velazquez OC, Thom SR. Hyperbaric oxygen stimulates vasculogenic stem cell growth and differentiation in vivo. *J Appl Physiol*, 2009; 106: 711-728.
- Ming GL, and Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, 2011; 70 (4): 687-702.
- Ming GL, and Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*, 2005; 28: 223-250.
- Mira H, Morante J. Neurogenesis from Embryo to Adult-Lessons from Flies and Mice. *Front Cell Dev Biol*, 2020; 8: 533-539.
- Mirzadeh Z, Merkle FT, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*, 2008; 3: 265-278.
- Moreno-Jiménez EP, Terreros-Roncal J, Flor-García M, Rábano A, and Llorens-Martín M. Evidences for Adult Hippocampal Neurogenesis in Humans. *Journal of Neuroscience*, 2021; 24; 41(12): 2541-2553.
- Morris SA, Eaves DW, Smith AR, Nixon K. Alcohol inhibition of neurogenesis: a mechanism of hippocampal neurodegeneration in an adolescent alcohol abuse model. *Hippocampus*, 2010; 20: 596-607.
- Mu J, Krafft PR, Zhang JH. Hyperbaric oxygen therapy promotes neurogenesis: where do we stand? *Medical Gas Research*, 2011; 1: 14-23.
- Nguyen S, Meletis K, Fu D, Jhaveri S, Jaenisch R. Ablation of de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in the nervous system leads to neuromuscular defects and shortened lifespan. *Dev Dyn*, 2007; 236: 1663-1676.

- Niklison-Chirou MV, Agostini M, Amelio I, Melino G. Regulation of Adult Neurogenesis in Mammalian Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020; 21(14): 4869-4875.
- Ortega MA, Fraile-Martinez O, García-Montero C, Callejón-Peláez E, Sáez MA, Álvarez-Mon MA, García-Honduvilla N. Monserrat J, Álvarez-Mon M, Bujan J. A General Overview on the Hyperbaric Oxygen Therapy: Applications, Mechanisms and Translational Opportunities. *Medicina*, 2021; 57: 864-872.
- Ortiz-López L, Vega-Rivera NM, Babu H, and Ramírez-Rodríguez GB. Brain-derived neurotrophic factor induces cell survival and the migration of murine adult hippocampal precursor cells during differentiation in vitro. *Neurotox Res*, 2017; 31: 122-135.
- Phillips DC, Woollard KJ, Griffiths HR. The anti-inflammatory actions of methotrexate are critically dependent upon the production of reactive oxygen species. *Br J Pharmacol*, 2003; 138: 501-511.
- Ponti G, Obernier K, Alvarez-Buylla A. Lineage progression from stem cells to new neurons in the adult brain ventricular-subventricular zone. *Cell Cycle*, 2013; 12: 1649-1650.
- Revzin MV, Pellerito JS, Moshiri M, Katz DS, Nezami N, Kennedy A. Use of Methotrexate in Gynecologic and Obstetric Practice: What the Radiologist Needs to Know. *RadioGraphics*, 2021; (41)6: 1819-1838.
- Qui W, Gobinath AR, Wen Y, Austin J, Galea LAM. Folic acid, but not folate, regulates different stages of neurogenesis in the ventral hippocampus of adult female rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 2019; 3: 75-89.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J. Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature*, 2004; 429: 184-187.
- Seigers R, Schagen SB, Beerling W, Boogerd W, Van Tellingen O, Van Dam FS, Koolhaas J.M, Buwalda B. Long-lasting suppression of hippocampal cell proliferation and impaired cognitive performance by methotrexate in the rat. *Behav Brain Res*, 2008; 186:168-175.

- Seigers R, Schagen SB, Coppens CM, Van der Most PJ, Van Dam PS, Koolhaas JM, Buwalda B. Methotrexate decreases hippocampal cell proliferation and induces memory deficits in rats. *Behav Brain Res*, 2009; 3: 279-284
- Seremet Keskin A. Hiperbarik Oksijen Tedavisi ve Enfeksiyon Hastalıkları. *Researchgate*, 2022; 94-106
- Seri B, Garcia-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astro-cytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*, 2001; 21: 7153-7160.
- Sidman RL, and Rakic P. Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res*, 1973; 62: 1-35.
- Sirichoat A, Krutsri A, Suwannakot K, Aranarochana A, Chaisawang P, Pannangrong W, Wigmore P, Welbat JU. Melatonin protects against methotrexate-induced memory deficit and hippocampal neurogenesis impairment in a rat model. *Biochem Pharmacol*, 2019; 163: 225-233.
- Smart IH. The subependymal layer of the mouse brain and its cell production as shown by radioautography after thymidine-H3 injection. *J Comp Neurol*, 1961; 116, 325-345.
- Snyder JS, Soumier A, Brewer M, Pickel J, Cameron HA. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, 2011; 476: 458-461.
- Song J, Zhong C, Bonaguidi MA, Sun GJ, Hsu D, Gu Y, Meletis K, Huang ZJ, Ge S, Enikolopov G, Deisseroth K, Luscher B, Christian KM, Ming G, Song H. Neuronal circuitry mechanism regulating adult quiescent neural stem-cell fate decision. *Nature*, 2012; 489; 150-154.
- Steiner B, Klempin F, Wang L, Kott M, Kettenmann H, and Kempermann G. Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*, 2006; 54: 805-814.
- Sun L, Strelow H, Mies G, Veltkamp R. Oxygen therapy improves energy metabolism in focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 2011; 1415: 103-108.
- Şentürk N. Mtx. *Turkderm - Arch Turk Dermatol Venerology*, 2016; 50; 18-21.

- Taupin P, Ray J, Fischer WH, Suhr ST, Hakansson K, Grubb A, Gage FH. FGF-2-responsive neural stem cell proliferation requires CCg, anovel autocrine/paracrine cofactor. *Neuron*, 2000; 28: 385-397.
- Thom SR. Hyperbaric Oxygen: Its Mechanisms and Efficacy. *Plast Reconstr Surg*, 2011; 127: 131S-141S.
- Tian H, Cronstein BN. Understanding the mechanisms of action of methotrexate: Implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *Bull NYU Hosp Jt Dis*, 2007; 65: 168-173.
- Toda T, Parylak SL, Linker SB, Gage FH. The role of adult hippocampal neurogenesis in brain health and disease. *Mol Psychiatry*, 2019; 24, 67-87.
- Toptak F, Toprak SF, Tokdemir SS. Yetişkin Nöroenez ve Nörodejeneratif Hastalıklarda Büyüme Faktörlerinin Rolü, *Experimed*, 2021; 11(1): 57-66.
- Valero J, Paris I, Sierra A. Lifestyle Shapes the Dialogue between Environment, Microglia, and Adult Neurogenesis. *ACS Chem Neurosci*, 2016; 7: 442-453.
- Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, and Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 2002; 415: 1030-1034.
- Veltkamp R, Siebing DA, Sun L, Heiland S, Bieber K, Marti HH, Nagel S, Schwab S, Schwaninger M. Hyperbaric oxygen reduces blood-brain barrier damage and edema after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2005; 36: 1679-1683.
- Vezmar S, Schüsseler P, Becker A, Bode U, Jaehde U. Methotrexate-associated alterations of the folate and methyl-transfer pathway in the CSF of All patients with and without symptoms of neurotoxicity. *Pediatr Blood Cancer*, 2009; 52: 26-32.
- Von Bohlen Und Halbach O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus. *Cell Tissue Res*, 2011; 345: 1-19.
- Wachowiak M, and Shipley MT. Coding and synaptic processing of sensory information in the glomerular layer of the olfactory bulb. *Semin Cell Dev Biol*, 2006; 17: 411-423.

- Wang XL, Yang YJ, Xie M, Yu XH, Liu CT, Wang X. Proliferation of neural stem cells correlates with Wnt-3 protein in hypoxic-ischemic neonate rats after hyperbaric oxygen therapy. *Neuroreport*, 2007; 18: 1753-1756.
- Wei L, Wang J, Cao Y, Ren Q, Zhao L, Li X, Wang J. Hyperbaric oxygenation promotes neural stem cell proliferation and protects the learning and memory ability in neonatal hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015; 8: 1752-1759.
- Wen J, Maxwell RR, Wolf AJ, Spira M, Gulinello ME, Cole PD. Methotrexate causes persistent deficits in memory and executive function in a juvenile animal model. *Neuropharmacology*, 2018; 139: 76-84.
- Wichterle H, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Direct evidence for homotypic, glia-independent neuronal migration. *Neuron*, 1997; 18: 779-791.
- Wilhelmsson U, Lebkuechner I, Leke R, Marasek P, Yang X, Antfolk D, Chen M, Mohseni P, Lasič E, Bobnar S.T, Stenovec M, Zorec R, Nagy A, Sahlgren C, Pekna M, Pekny M. Nestin Regulates Neurogenesis in Mice Through Notch Signaling From Astrocytes to Neural Stem Cells. *Cerebral Cortex*, October 2019; (29)10: 4050-4066.
- Xinwang Ying, Wenzhan Tu, Sisi Li, Qiaoyun Wu, Xiaolong Chen, Ye Zhou, Jie Hu, Guanhu Yang, Songhe Jiang. Hyperbaric oxygen therapy reduces apoptosis and dendritic/synaptic degeneration via the BDNF/TrkB signaling pathways in SCI rats. *Life Sciences*, 2019; 229: 187-199.
- Yang L, Hei MY, Dai JJ, Hu N, Xiang XY. Effect of hyperbaric oxygenation on mitochondrial function of neuronal cells in the cortex of neonatal rats after hypoxic-ischemic brain damage. *Braz J Med Biol Res*, 2016; 49: e5187.
- Yang M, Kim J.S, Kim J, Kim S.H, Kim J.C, Kim J, Wang H, Shin T, Moon C. Neurotoxicity of methotrexate to hippocampal cells in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol*, 2011; 82: 72-80.
- Yang Y, Wei H, Zhou X, Zhang F, Wang C. Hyperbaric oxygen promotes neural stem cell proliferation by activating vascular endothelial growth factor/extracellular signal-regulated kinase signaling after traumatic brain injury. *Neuroreport*, 2017; 28: 1232-1238.

- Yang YJ, Wang XL, Yu XH, Wang X, Xie M, Liu CT. Hyperbaric oxygen induces endogenous neural stem cells to proliferate and differentiate in hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *Undersea Hyperb Med*, 2008; 35: 113-129.
- Yang Z, Wang KKW. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Published*, 2015; 11: 41-49.
- Yang ZJ, Xie Y, Bosco GM, Chen C, Camporesi EM. Hyperbaric oxygenation alleviates MCAO-induced brain injury and reduces hydroxyl radical formation and glutamate release. *Eur J Appl Physiol*, 2010; 108: 513-522
- Yılmaz E. Sıçanlarda Deneysel Beyin İskemisinde 2 Haftalık Naringin Uygulamasının Nörogenezis Ve Bdnf Düzeylerine Etkisi, Doktora Tezi, 2023
- Yin D, Zhou C, Kusaka I, Calvert JW, Parent AD, Nanda A, Zhang JH. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in a rat focal cerebral ischemic model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003; 23: 855-864.
- Yücel F, Şen K, Duran O, Özcan M, Küçükgedik G. Nörogenez insanlarda hayat boyunca devam eder mi? *Türk Tıp Öğrencileri Araştırma Dergisi*, 2020; 4: 12-15.
- Zeidman P, Maguire EA. Anterior hippocampus: the anatomy of perception, imagination and episodic memory. *Nat Rev Neurosci*, 2016; 17(3): 173-82.
- Zhang X, Huang G, Liu H, Chang H, Wilson JX. Folic acid enhances Notch signaling, hippocampal neurogenesis, and cognitive function in a rat model of cerebral ischemia. *Nutritional Neuroscience*, 2012; 15: 55-61.
- Zhao C, Deng W, Gage FH. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, 2008; 132: 645-660.
- Zhao C, Teng EM, Summers RG, Ming GL, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *Journal of Neuroscience*, 2006; 26: 3-11.
- Zhao Z, Hua Z, Luo X, Li Y, Yu L, Li M, Lu C, Zhao T, Liu Y. Application and pharmacological mechanism of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022; 150: 1-11.

EKLER



Tarih: 01.06.2022

Toplantı Sayısı: 06



Karar No:22/120

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 01.06.2022 tarihinde Prof. Dr. Gültekin ATALAN 'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi
Vehbi GÜNEŞ	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi
Fusun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Ahmet ÖZTÜRK	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
M. Betül AYCAN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Ayşe EKEN	Prof. Dr.	Eczacılık Fakültesi
Nurcan DURSUN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
İbrahim KARAMAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi
Sezer DEMİRBUĞ A	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi
Selma BÜYÜKKILIÇ BEYZİ	Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi
Zeynep CAFEROĞLU	Doç. Dr.	Sağlık Bilimleri Fakültesi
Ali İltiş AYKUN	Arş. Gör.	Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi ERÜTAM
Umut ALPMAN	Arş. Gör.	Genom ve Kök Hücre Merkezi (GENKÖK)
Mustafa ERMİŞ	Veteriner Hekim	Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Arş.Mrkz.
Ali KOÇ	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Sivil Üye
Filiz ASAN	Avukat	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi

Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji A.B.D. olan Prof.Dr.Feyzullah Beyaz tarafından sunulan "Sıçan Beyinlerinde Metotreksat İle Oluşturulan Folik Asit Yetersizliği Sonucunda Bozulan Hipokampal Bölgedeki Nörogeneze Hiperbarik Oksijen Uygulamasının Etkisi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 01.06.2022

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Gültekin ATALAN

İmza :



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Deneyisel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi
Müdürlüğü



Sayı : E-40175052-900-269832
Konu : KURUM İZNİ ZEYNEP IŞIK

01.07.2022

GEVHER NESİBE GENOM VE KÖK HÜCRE ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜNE

Enstitünüz Nörobilim Anabilim Dalı yüksek lisans programı öğrencileri Zeynep IŞIK'ın (SIÇAN BEYİNLERİNDE METOTREKSAT İLE OLUŞTURULAN FOLİK ASİT YETERSİZLİĞİ SONUCUNDA BOZULAN HIPOKAMPAL NÖROGENEZE HIPERBARİK OKSİJEN UYGULAMASININ ETKİSİ) konulu tez çalışması müdürlüğümüzce uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Vehbi GÜNEŞ
Merkez Müdürü V.



SIÇAN BEYİNLERİNDE MTX İLE OLUŞTURULAN FOLİK ASİT YETERSİZLİĞİ SONUCUNDA BOZULAN HİPOKAMPAL NÖROGENEZE HİPERBARİK OKSİJEN UYGULAMASININ ETKİSİ

ORJİNALLİK RAPORU

%8

BENZERLİK ENDEKSİ

%7

İNTERNET KAYNAKLARI

%3

YAYINLAR

%4

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

%2

2

[Submitted to Erciyes Üniversitesi](#)

Öğrenci Ödevi

%2

3

cms.galenos.com.tr

İnternet Kaynağı

%1

4

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

%1

5

openaccess.ogu.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

<%1

6

hdl.handle.net

İnternet Kaynağı

<%1

7

www.ilachakkinda.com

İnternet Kaynağı

<%1

8

www.ejonscongress.org

İnternet Kaynağı

<%1

[Submitted to Istanbul Aydin University](#)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı :Zeynep IŞIK

Uyruğu : Türkiye

EĞİTİM

DERECE

KURUM

MEZUNİYET

Yüksek Lisans

Erciyes Üniversitesi,
Gevher Nesibe Genom ve
Kök Hücre Enstitüsü,
Nörobilim, Kayseri

2020-Devam ediyor

Lisans

İnönü Üniversitesi, Fen-
Edebiyat Fakültesi,
Moleküler Biyoloji ve
Genetik, Malatya

2016-2020

Lise

Nursan Anadolu Lisesi,
Hatay

2012-2016

İŞ DENEYİMLERİ

YIL

KURUM

GÖREV

2022-2023

Uzay Biyoteknoloji A.Ş

Biyoteknolog ve Moleküler

Biyolog

YABANCI DİL

İngilizce/A2

YAYINLAR:

Güzel, A., Işık, Z., Gök, Y., Taşkın Tok, T., & Aktaş, A., (2023). N-Heterocyclic Compounds, in silico Molecular Docking Studies, and in vitro Enzyme Inhibition Effect Against Acetylcholinesterase Inhibitors. Current Topics In Medicinal Chemistry, vol.2023, 1-14.

