

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA OLUŞTURULAN FOKAL SEREBRAL
İSKEMİ VE REPERFÜZYON MODELİNDE İNSAN
TROFOBLAST PROGENİTÖR HÜCRELERİNİN
BEYİNDEKİ GLUKOZ TRANSPORT
MEKANİZMASINA ETKİLERİ**

Türkan YANIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda destek olup yol göstericiliği ile yanımda olan ve tez projemin gerçekleştirilmesinde önemli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN'a,

En az danışman hocam kadar üzerimde emeği olan Prof. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN'a,

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve çalışanlarına,

İhtiyaç duyduğum her an bana yardımcı olan çok sevgili çalışma arkadaşlarıma (Erhan CEBECİ, Emre ÇETİNDAG, Gizem KORKMAZ, Kerem YANAR, Rıza Can ÇAKMAKCI, Selin KISAR, Ezgi AKAN ve Mehmet DOĞAN),

Yardımlarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm değerli çalışanlarına,

Eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili Anneme, Babama, Kardeşlerime ve bu süreçte her zaman yanımda olan Rıdvan PORTAKAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada amacımız, sıçanlar ile oluşturulan fokal serebral iskemi (FSİ) ve reperfüzyon modeli sonrasında insan trofoblast progenitor hücre (iTPH) enjeksiyonunun sıçanların beyindeki glukoz transport mekanizması ve glukoz metabolizmasını nasıl etkilediğini belirlemektir. Bu mekanizmalara bağlı olarak iTPH'ler ile alternatif bir hücresel tedavi yönteminin geliştirilmesi konusunda literatüre katkı sağlamaktır.

Yöntem: Wistar sıçan beyinlerinde geçici orta serebral arter tıkanıklığı ile FSİ-reperfüzyon modeli oluşturulmuştur. Sıçanların kuyruk venlerinden iTPH enjekte edilip hayvanlar kurban edilerek dokuları üzerinde analizler gerçekleştirilmiştir. GLUT1, GLUT3, GLUT4, IR ve IGF-1R protein miktarlarının FSİ durumunda ve iTPH enjeksiyonuyla birlikte nasıl değiştiği Western Blot analizleri ile incelenmiştir ve ekspresyonları immünofloresan yöntemi ile gösterilmiştir.

Bulgular: GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 protein miktarları FSİ 1. günde artış gösterirken, FSİ'nin ilerleyen günlerinde sham gruplarına benzer protein miktarına sahiptirler. FSİ-iTPH 3. günde ise FSİ 3. gün gruplarına göre azaldıkları tespit edilmiştir. GLUT1 ve GLUT4 proteinlerinin FSİ-iTPH 11. günde FSİ-11'inci gün ile benzer miktarda olduğu belirlenmiştir. GLUT3 proteini ise FSİ-iTPH 11. günde FSİ-11. güne kıyasla daha fazla miktardadır. IR protein miktarı FSİ 3. günde azalırken, FSİ 11. günde artış göstermiştir. Ancak FSİ 11. günde sham gruplarına göre düşük seviyededir. iTPH enjeksiyonu ile birlikte IR protein miktarı FSİ gruplarına göre artmıştır. IGF-1R protein miktarı FSİ 1. günde artarken, FSİ'nin ilerleyen günlerinde sham gruplarına yaklaşmıştır ve iTPH enjeksiyonu ile birlikte FSİ gruplarına kıyasla artış göstermiştir. GLUT1, GLUT3, GLUT4, IR ve IGF1R için gerçekleştirilen immünofloresan boyanmaları bu sonuçları destekler niteliktedir.

Sonuç: FSİ durumunda beyindeki glukoz transport mekanizması ve glukoz metabolizması etkilenmektedir. iTPH'ler FSİ durumunda beyindeki glukoz transportunu ve metabolizmasını düzenleyebilirler.

Anahtar Kelimeler: fokal serebral iskemi, trofoblast, glukoz transport, glukoz metabolizması

ABSTRACT

Objective: Our aim in this study is to determine the changes in glucose transport mechanism and glucose metabolism after human hTPC injection to ischemic rats to develop an alternative cellular therapy method with hTPCs and to contribute to the literature on this subject.

Method: The FCI-reperfusion model was established with temporary MCAO on the brains of Wistar rats. After hTPCs injection from the tail veins of rats, animals were sacrificed and analyzes were performed on their tissues. The amounts of GLUT1, GLUT3, GLUT4, IR, and IGF-1R proteins after FSI and hTPCs enjection were examined by Western Blot analysis and the expression intensities were shown by immunofluorescence method.

Results: While the protein amounts of GLUT1, GLUT3 and GLUT4 increased on FSI-1st-day, they approached to the sham groups in the following days of FSI. On FSI-hTPC-3rd-day, they decreased compared to FSI-3rd-day groups. The amounts of GLUT1 and GLUT4 on the day 11 of FSI-hTPC were similar to FSI-11th-day groups. The amount of GLUT3 protein was higher on the day 11 of FSI-hTPC compared to FSI-11th-day group. While the amount of IR protein decreased at FSI-3rd-day, it increased at FSI-11th-day. However, it was lower compared to sham groups. With hTPC injection, the amount of IR protein increased compared to FSI groups. While the amount of IGF-1R protein increased on the 1st day of FSI, it approached sham groups in the following days of FSI. With hTPC injection, the amount of IGF-1R increased compared to FSI groups. Immunofluorescence staining for GLUT1, GLUT3, GLUT4, IR and IGF1R supported these results.

Conclusion: In the FCI state, glucose transport mechanism and glucose metabolism in the brain are affected. hTPCs can regulate glucose transport mechanism and the glucose metabolism of the brain in the FCI state.

Key words: focal cerebral ischemia, trophoblast, glucose transport, glucose metabolism

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TABLolar DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın hipotezi	2
1.2. Çalışmanın amacı	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Fokal Serebral İskemi (FSİ)	3
2.2. Glukoz Transport Proteinleri	4
2.2.1. Serebral İskemide GLUT proteinleri	6
2.3. İnsülin, İnsülin Büyüme Faktörü ve Reseptörleri	7
2.3.1. İnsülin ve İnsülin Reseptör	7
2.3.2. Tip 1 İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü ve Reseptörü	8
2.3.3. Serebral İskemide İnsülin, IR, IGF-1 ve IGF-1R	9
2.4. İskemi Tedavisinde Kök Hücre Yaklaşımları	11
2.5. Trofoblast Progenitör Hücreler	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1. Denekler	15
3.2. Geçici Fokal Serebral İskemi Modelinin Oluşturulması	15
3.2.1. Geçici Orta Serebral Arter Tıkanıklığı (MCAO)	15
3.2.2. Reperfüzyon	16
3.3. iTPH Uygulaması	16
3.4. SDS-PAGE Western Blot Protokolü	17
3.4.1. Lizat Hazırlama	17
3.4.2. Örnek Hazırlama	17

3.4.3. SDS-PAGE Western Blot Protokolünde Kullanılan Solüsyonlar	17
3.4.4. SDS-PAGE Western Blot Analizi	19
3.5. İmmünofloresan Yöntemi	20
3.5.1. İmmünofloresan Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar	20
3.5.2. İmmünofloresan Protokolü	20
4. BULGULAR	22
4.1. Western Blot Analizi Sonuçları	22
4.1.1. GLUT1 Protein Miktarındaki Değişimler	22
4.1.2. GLUT3 Protein Miktarındaki Değişimler	23
4.1.3. GLUT 4 Protein Miktarındaki Değişimler	24
4.1.4. IR Protein Miktarındaki Değişimler	25
4.1.5. IGF-1R Protein Miktarındaki Değişimler	26
4.2. İmmünofloresan Boyanma Sonuçları	28
4.2.1. GLUT1 İmmünofloresan Boyanmaları	28
4.2.2. GLUT3 İmmünofloresan Boyanmaları	29
4.2.3. GLUT4 İmmünofloresan Boyanmaları	30
4.2.4. IR İmmünofloresan Boyanmaları	31
4.2.5. IGF-1R İmmünofloresan Boyanmaları	32
5. TARTIŞMA	34
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
6.1. FSİ'nin Beyindeki Glukoz Transport Mekanizması Üzerindeki Etkileri	41
6.2. İskemi Durumunda Beyindeki Glukoz Transport Mekanizmasına iTPH'lerin Etkileri	42
6.3. FSİ'nin Beyindeki Glukoz Metabolizması Üzerindeki Etkileri	42
6.4. İskemi Durumunda Beyindeki Glukoz Transport Mekanizmasına iTPH'lerin Etkileri	43
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1. Western Blot sonuçlarının özet gösterimi	27
Tablo 4.2. İmmünofloresan görüntülerinin semikantitatif analizleri	33



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Serebral iskemi tiplerinin şematik gösterimi	3
Şekil 2.2. Bir beyin kapillerinin, ilişkili bir astrositin ve ilgili glikoz taşıyıcıları ile etkileşim halindeki bir nöronun şematik tasviri	5
Şekil 2.3. İnsülin/IGF sistemi: ligand-reseptör bağlanma afiniteleri	9
Şekil 2.4. İnsülin/IGF sinyallemesinin basitleştirilmiş şematik bir temsili	9
Şekil 2.5. Yetişkin beyninin ana nörogenik alanları	12
Şekil 2.6. İmplantasyon sonrası plasentada koryonik mezenşimdeki potansiyel trofoblast progenitör hücreleri	14
Şekil 3.1. İnsan trofoblast progenitör hücrelerinin invert mikroskop altında farklı büyütmelerdeki fotoğrafları	16
Şekil 4.1. GLUT1 Western Blot sonuçları	22
Şekil 4.2. GLUT3 Western Blot sonuçları	23
Şekil 4.3. GLUT4 Western Blot sonuçları	24
Şekil 4.4. IR Western Blot sonuçları	25
Şekil 4.5. IGF-1R Western Blot sonuçları	26
Şekil 4.6. Serebral kortekste GLUT1 immünofloresan boyanmaları	28
Şekil 4.7. Serebral kortekste GLUT3 immünofloresan boyanmaları	29
Şekil 4.8. Serebral kortekste GLUT4 immünofloresan boyanmaları	30
Şekil 4.9. Serebral kortekste IR immünofloresan boyanmaları	31
Şekil 4.10. Serebral kortekste IGF-1R immünofloresan boyanmaları	32

SİMGELER ve KISALTMALAR

AMP	: Adenozin Monofosfat
AMPK	: AMP-Aktive Edici Protein Kinaz
ATP	: Adenozin Trifosfat
CCA	: Ortak Karotid Arter
ECA	: Ekstrenal Karotid Arter
EKH	: Embriyonik Kök Hücre
FDA	: Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
FSİ	: Fokal Serebral İskemi
GABA	: γ -aminobütirik asit
GLUT	: Glukoz Transport Proteini
GLUT1	: Glukoz Transport Proteini 1
GLUT2	: Glukoz Transport Proteini 2
GLUT3	: Glukoz Transport Proteini 3
GLUT4	: Glukoz Transport Proteini 4
GLUT5	: Glukoz Transport Proteini 5
HLA-A	: İnsan Lökosit Antijeni A
HLA-B	: İnsan Lökosit Antijeni B
ICA	: İnternal Karotid Arter
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1
IR	: İnsülin Reseptör

iPKH	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
iTPH	: İnsan Trofoblast Progenitör Hücre
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
M6P/IGF-2R	: Mannoz 6-Fosfat/İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-2 Reseptörü
MCA	: Orta Karotid Arter
MCAO	: Orta Karotid Arter Tıkanıklığı
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NKH	: Nöronal Kök Hücre
RMS	: Rostral Göç Akışı
SCL2A	: Çözünen Taşıyıcı Ailesi 2
SCL2A1	: Çözünen Taşıyıcı Ailesi 2, Kolaylaştırılmış Glukoz Taşıyıcı Üye 1
SCL2A3	: Çözünen Taşıyıcı Ailesi 2, Kolaylaştırılmış Glukoz Taşıyıcı Üye 3
SCL2A4	: Çözünen Taşıyıcı Ailesi 2, Kolaylaştırılmış Glukoz Taşıyıcı Üye 4
SGZ	: Subgranüler Bölge
SKA	: Serebral Kan Akışı
SVZ	: Subventriküler Bölge
TIA	: Geçici (Trans) İskemik Atak
tPA	: Doku Plazminojen Aktivatörü
VEGF	: Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

1. GİRİŞ

İnme, her yıl yaklaşık 6.7 milyon kişinin ölmesine sebep olan, tüm dünyada sıralamada en önde gelen ikinci ölüm nedenidir. Bu hastaların %80'den fazlası, serebral iskemi sonucu hayatlarını kaybetmektedir (Jia ve ark., 2017) İskemi durumunda, beyne giden zengin kan akışı desteği kaybolur ve beyin yeterince beslenemediği için hasar görür. Yetişkinlerin merkezi sinir sisteminde (MSS) nörogenezin oldukça sınırlı olması, iskemik koşullarda, tamir mekanizmasının yeterli olmadığı durumlarda ölümcül veya hayatı olumsuz yönde etkileyecek kalıcı hasarlar oluşmasına sebep olmaktadır. Günümüzde uygulanan tedaviler, kalıcı hasarları giderememekle birlikte, çoğunlukla hastalığın ilerlemesini ve tekrarlanmasını önlemeye yöneliktir. Bu sebeple, serebral iskemik hastalar için en umut verici çalışmalar, kaybedilen nöronal hücrelerin yerini alabilecek veya iskemiye yanıt olarak gelişen immün cevabı düzenleyebilecek kök hücre odaklı çalışmalardır.

Çoğunlukla kemirgenler üzerinde gerçekleştirilen, tedaviye yönelik araştırmaların birçoğu başlıca; embriyonik kök hücreler (EKH'ler) indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH'ler), nöronal kök hücreler (NKH'ler) ve mezenkimal kök hücreler (MKH'ler) üzerine odaklanmaktadır. Bu hücrelerle yapılan çalışmalar sonucunda birçok olumlu sonuç elde edilse de, kullanılan kök hücrelerin tipine bağlı olarak halen bazı riskler ve sınırlamalar mevcuttur. Bu nedenle serebral iskemik inme tedavisi için farklı ve güvenilir bir hücre tipine gerek duyulmaktadır. İnsan trofoblast progenitör hücreleri (iTPH'ler), trofektoderm kökenli olup, insan plasentasında mevcut olan hücrelerdir. Trofoblast progenitör hücrelerden köken alan trofoblast hücrelerinin çeşitli büyüme faktörleri ve anjiyogenik faktörler salgıladıkları bilinmektedir (Cooper ve ark., 1995; Han ve ark., 1996). Diğer taraftan, iTPH'lerin indüklenerek nöronal kök hücrelere farklılaşabildikleri de tespit edilmiştir (T. T. Lee ve ark., 2012). iTPH'ler, bilinen özellikleri sebebiyle, serebral iskemik hastalar için ideal kök hücre tipi olabilir.

Glukoz beyin için primer enerji kaynağıdır ve nöron hücrelerinin fonksiyonlarını sürdürmesi için esastır. Glukoz, kan-beyin bariyeri boyunca nöronlara glukoz taşıyıcıları tarafından iletilir (Simpson ve ark., 2007). Glukoz taşıyıcı proteinler (GLUT'lar) bir glikoprotein ailesidir. Beyinde, esas olarak GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 proteinleri rol oynar (Vannucci ve ark., 1997; Vannucci ve ark., 1998)

GLUT1 (SCL2A1 geni) hem kan-beyin bariyerini oluşturan endotel hücrelerinde hem de astrositlerde eksprese edilirken, GLUT3 (SCL2A3 geni) nöronlarda yüksek oranda eksprese edilir (Benarroch, 2014). İnsüline duyarlı glukoz taşıyıcısı olan GLUT4 (SCL2A4 geni) ise, beynin belirli bölgelerinde; mikrovasküler endotel hücrelerde ve serebellum, hipokampus ve hipotalamustaki nöronlarda dağılım gösterir (McCall ve ark., 1997; Grillo ve ark., 2009). Bu taşıyıcıların ekspresyonu, beyin gelişimine bağlı olarak serebral glukoz kullanımındaki artış ile birlikte artar.

İnsülin, pankreasta bulunan β hücreleri tarafından sentezlenir ve esas olarak glikoz, yağ ve protein metabolizması üzerindeki etkileriyle bilinir. Beynin glukoz alımı da insülin sinyallerine bağlı olarak gerçekleşir (Stockhorst ve ark., 2004). İnsülin sinyal yollarının, insülinin insülin reseptöre (IR) (Grillo ve ark.) bağlanmasıyla etkinleştirildiği (Hubbard, 1999; Li ve ark., 2005) ve insülinin beyne IR aracılığı ile kan beyin bariyerini (KBB) geçerek girdiği bilinmektedir (Schwartz ve ark., 1992). Sinir sisteminde IR'ler, hipotalamus, olfaktör bulbus ve hipokampüste heterojen bir şekilde dağılım gösterir (Unger ve ark., 1989; Schulingkamp ve ark., 2000).

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), normal beyin gelişimi ve olgunlaşması sırasında hücre proliferasyonunu ve farklılaşmasını teşvik etmede önemli rol oynayan bir nörotrofik faktördür. IGF-1 Reseptörü (IGF-1R) ve IR (Grillo ve ark.) yakından ilişkilidir ve yapıları yüksek oranda benzerlik gösterir (Garrett ve ark., 1998; Xu ve ark., 2018). IGF reseptörleri hem glia hem de nöronlarda mevcuttur (Bergstedt ve Wieloch, 1993; W. H. Lee ve Bondy, 1993).

1.1. Çalışmanın hipotezi: Fokal serebral iskemi ve reperfüzyon modelinde iTPH'lerin terapötik kullanımı, iyileştirici bir etki göstererek beyindeki glukoz transportunu ve metabolizmasını düzenleyebilir.

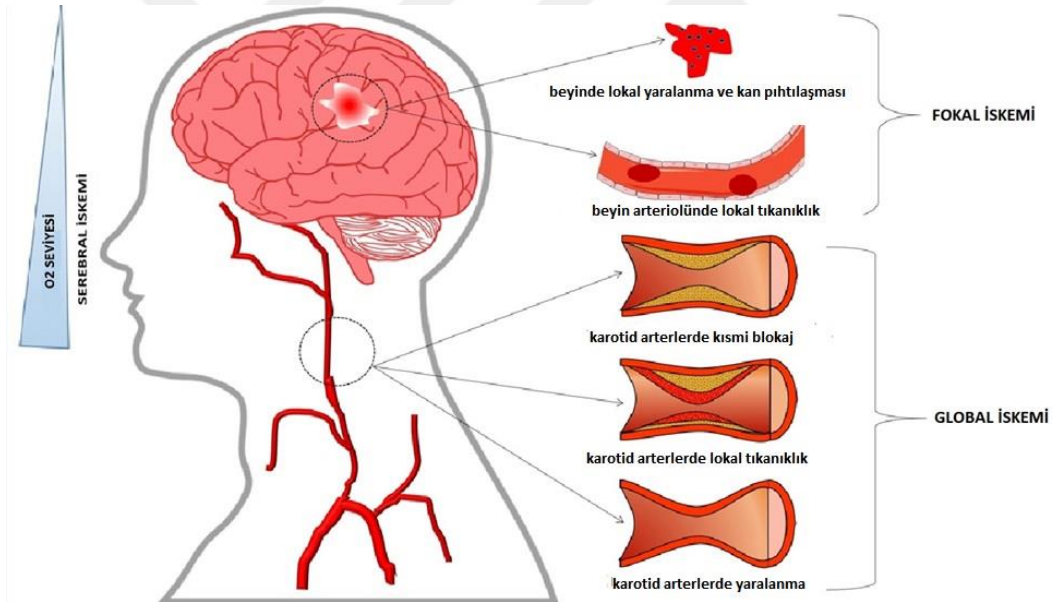
1.2. Çalışmanın amacı: Fokal serebral iskemik sıçanlara yapılan iTPH enjeksiyonunun, sıçanların beynindeki glukoz transport mekanizmasındaki ve glukoz metabolizmasındaki etkilerini belirlemek, iTPH'ler ile alternatif bir hücresel tedavi yöntemi geliştirmek ve bu konuda literatüre katkı sağlamaktır. Bu amaç doğrultusunda: GLUT1, GLUT3, GLUT4, IR ve IGF-1R proteinlerinin miktarlarının FSİ durumunda ve iTPH enjeksiyonu sonrasında nasıl değiştiği Western Blot analizi ile belirlenmiştir ve ekspresyonları immünofloresan yöntemi ile gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fokal Serebral İskemi (FSİ)

İnme, kan damarları kan pıhtısı tarafından tıklandığında veya arteriyovenöz malformasyonlar veya anevrizmalar nedeniyle kan damarlarında rüptür olduğunda ortaya çıkar. Beyin en yüksek enerji tüketen organlardan biri olduğundan, inme ile ortaya çıkan oksijen ve besin kaynağı eksikliği, nörolojik bozukluklara yol açan beyin hasarına neden olabilir (Lee ve ark., 2018).

Serebral iskemi, serebral kan akışının (SKA) beynin tamamında (global) ya da belirli bir bölgesinde (fokal) kritik bir eşik değerinin altına düşmesi durumudur. Serebral kan damarı tıkanması, fokal serebral kan akışını engelleyerek; fokal beyin iskemisine ve enfarktüse neden olur (Şekil 2.1). SKA normalin %25 altına düşerse enfarktüs oluşur.



Şekil 2.1. Serebral iskemi tiplerinin şematik gösterimi (Sarkar ve ark., 2019).

Yetişkinlerde nörogenez, normal koşullar altında, iki spesifik “nörogenik” beyin bölgesi ile sınırlıdır. Bunlar hipokampüsün dentat girusundaki, yeni dentat granül hücrelerinin üretildiği subgranüler bölge (SGZ) ve nöron haline gelmek için rostral göç akışı (RMS) yoluyla bulbus olfaktoryusa göç eden yeni nöronların üretildiği lateral ventriküllerin subventriküler (SVZ) bölgesidir (Drapeau ve Nora Abrous, 2008). Yetişkinlerde diğer MSS bölgelerinde nörogenezin normal fizyolojik koşullar altında sınırlı olduğuna inanılmaktadır, ancak yaralanmalardan sonra nörogenezin indüklenebileceği düşünülmektedir (Gould, 2007). Nörogenezin bu şekilde sınırlı

olması, tamir mekanizmasının da yeterli olmadığı durumlarda iskemiden kaynaklı oluşabilecek hasarları kalıcı hale getirebilir.

Serebral iskemiye karşı terapötik stratejiler sınırlıdır. Günümüzde uygulanmakta olan tedaviler, kan akışını geri kazandırabilmek ve inmenin tekrarlamasını engellemek amacıyla, pıhtıyı bozan doku plazminojen aktivatörü (tPA) uygulamasına yöneliktir. Akut iskemik inme için tek FDA onaylı tedavi tPA ile intravenöz trombolizdir (Gould, 2007; Farbu ve ark., 2011; Chu ve ark., 2015). Bununla birlikte, tPA'nın dar terapötik zaman penceresi (inmenin başlamasından 4,5 saat sonra), iskemik inmeye karşı tedavide terapötik etkinliği önemli ölçüde azaltır. Tedavi amacıyla pıhtının mekanik olarak çıkartılabilmesi gibi bazı cerrahi yöntemler de mevcuttur. Ancak bu yöntemler de kendi içinde riskler taşımaktadır ve uygulamalar, kalıcı hasarın yok edilmesini sağlayamamaktadır. Geçici (trans) iskemik atak (TIA) ve kalp durmasına karşı tedavilerle alakalı olarak ise, hipotermi dışındaki tüm tedaviler nöronal hasarı azaltmada başarısız olmuştur. Bu nedenle, tedavilerin amacı temel olarak TIA ve kalp durması için risk faktörlerinin (yüksek tansiyon, hiperlipidemi, sigara içme ve kalp hastalığı) önlenmesine odaklanmakta ve bu da serebral iskemiye karşı yeni tedavilerin geliştirilmesine büyük ölçüde ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir (Lee ve ark., 2018).

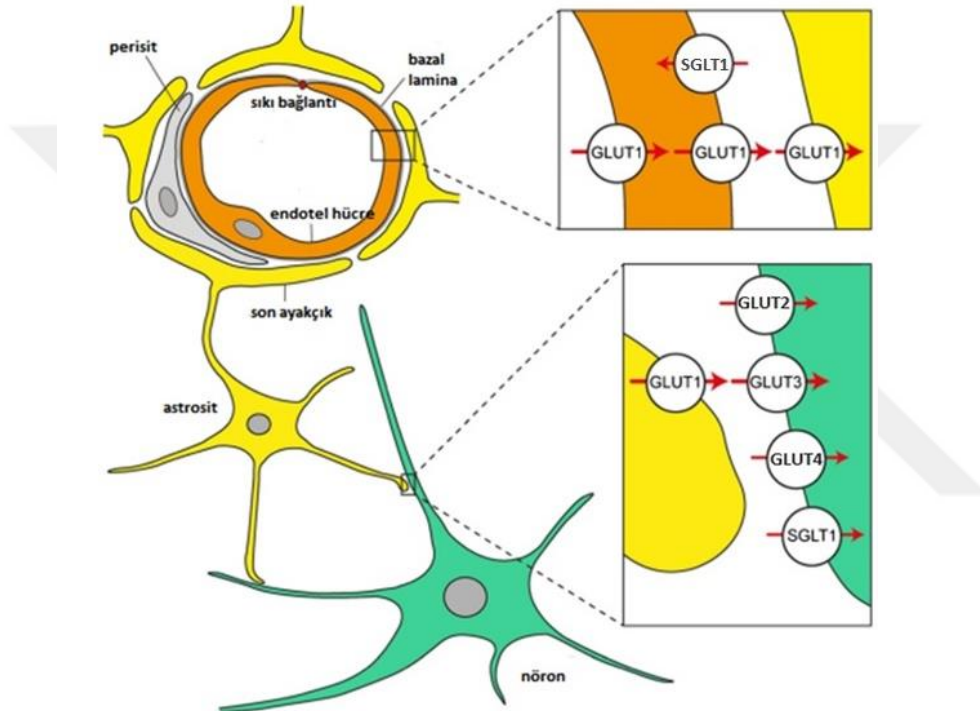
2.2. Glukoz Transport Proteinleri

Glukoz beyin için primer enerji kaynağıdır ve nöronal fonksiyonların sürdürülmesi için esastır. Glukoz, nöronlara glukoz taşıyıcıları tarafından iletilir (Simpson ve ark., 2007). GLUT proteinleri, 14 üyeli (GLUT1-GLUT14) SCL2A sodyum bağımsız kolaylaştırılmış heksoz taşıyıcı ailesine aittir:

GLUT1, eritrositlerle ilişkilidir. Testis ve plasental dokuda çok miktarda mevcuttur (Harik ve ark., 1990; Hayano ve ark., 1990). GLUT3; plasenta, karaciğer, böbrek (G. W. Gould ve ark., 1992; Burant ve Davidson, 1994), spermatozoa ve testiste (Burant ve Davidson, 1994) tespit edilmiştir. GLUT4, kalp, iskelet kasları ve yağ dokusu gibi insüline duyarlı dokularla ilişkilidir (Charron ve ark., 1989; James ve ark., 1989). Aynı zamanda beynin belirli bölgelerinde; mikrovasküler endotel hücrelerde ve serebellum, hipokampus ve hipotalamustaki nöronlarda dağılım gösterir (McCall ve ark., 1997; Grillo ve ark., 2009). GLUT4'ün plazma membranına translokasyonu,

insülin etkisi ile veya AMPK aracılığıyla (insülin bağımsız olarak) gerçekleşir. Böylece glikozun hücre içine alımı sağlanmış olur (Shaw, 2011; O'Neill, 2013).

Beyinde, esas olarak GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 önemli miktarlarda bulunmuştur (Rayner, 1996; Vannucci ve ark., 1997; Vannucci ve ark., 1998) (Şekil 2.2). Bununla birlikte, GLUT2 ve GLUT5, beyin ayrı bölgelerinde nispeten az miktarlarda; GLUT2, astrositlerde (Leloup ve ark., 1994) ve GLUT5, küçük damarlarda ve mikrogliyalarda (Mantych ve ark., 1993; Payne ve ark., 1997) tespit edilmiştir.



Şekil 2.2. Bir beyin kapillerinin, ilişkili bir astrositin ve ilgili glikoz taşıyıcıları ile etkileşim halindeki bir nöronun şematik tasviri. Kapiller endotel hücreleri sıkı bağlantılarla birbirine bağlanmıştır. Belirtilen zarlar boyunca D-glikoz taşınmasına aracılık eden glikoz taşıyıcıları gösterilmektedir. D-glikoz translokasyonunun ana yönü kırmızı oklarla gösterilmiştir. **SGLT1:** Sodyum-Glukoz Taşıyıcı Protein 1 (Koepsell, 2020).

GLUT1 (SCL2A1 geni) hem kan beyin bariyerini oluşturan endotel hücrelerinde hem de astrositlerde eksprese edilirken, GLUT3 (SCL2A3 geni) nöronlarda yüksek oranda eksprese edilir (Benarroch, 2014). GLUT3'ün spesifik olarak nöronlarda eksprese edildiği bilinse de sıçanların, köpeklerin ve insanların GLUT3 proteinini KBB'de de eksprese ettikleri bilinmektedir (Mantych ve ark., 1992). GLUT1 ekspresyonu, prenatal beyindeki GLUT3 ekspresyonundan çok daha yüksektir. GLUT4 özellikle mikrovasküler endotel hücrelerde eksprese edilirken, beyin belirli bölgelerindeki nöronlarda da ekspresyonu mevcuttur (McCall ve ark., 1997; Grillo ve ark., 2009).

2.2.1. Serebral İskemide GLUT proteinleri

İnme sırasında kandaki değişken glukoz konsantrasyonunun azalmasına rağmen, beyne yeterli glukoz transferini sağlamak esastır. GLUT proteinleri, periferel kan ile beyindeki hücrelere glukoz taşınmasına aracılık eden esas proteinlerdendir (Thorens ve Mueckler, 2010).

Önceki yıllarda yapılan bir çalışmada, iskemi esnasında beyindeki GLUT1 ve GLUT3 ekspresyonunun upregüle olduğu tespit edilmiştir (Lee ve Bondy, 1993; Gerhart ve ark., 1994). Benzer şekilde bir başka çalışmada, FSİ modelinde reperfüzyondan 48 saat sonra sıçan beyinde GLUT3 mRNA ve protein seviyelerinin arttığı belirtilmiştir (Urabe ve ark., 1996).

2009 yılında yapılan bir başka araştırmada ise yine, diyabetik sıçanlarda iskemi/reperfüzyon hasarı sonrası hipokampus ve serebral kortekste GLUT1 mRNA ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir (W. W. Zhang ve ark., 2009). Bu çalışmalarla paralel olarak, Huang ve ark. kemirgenler ile yapılan bir fokal serebral iskemi modelinde, GLUT3 ekspresyonunun, iskemi sonrası 24. saatte 10 kat arttığını bildirmişlerdir (Huang ve ark., 2010). 45 dakikalık hipoksik iskemi sonrasında, reperfüzyondan 4 saat sonra beyin her iki tarafında ve kontralateral taraflarında GLUT3 ekspresyonunda önemli bir artış gözleendiği ve yeniden oksijenizasyondan 24 saat sonra bazal seviyelere geri döndüğü de bir başka çalışmada bildirilmiştir (Fung ve ark., 2010).

Son olarak, 2016 yılında yine kemirgenlerle yapılan bir çalışmada ise, iskemiden 24 saat sonra hipokampal CA1 bölgesinin piramidal nöronlarında GLUT3 immünoreaktivitesinde anlamlı bir artış gözleendiği belirtilmektedir. Bu sonuç, beyindeki iskemiye cevap olarak artmış GLUT3 seviyelerini bildiren önceki çalışmalarla örtüşmektedir (Gerhart ve ark., 1994; Urabe ve ark., 1996; Fung ve ark., 2010; Huang ve ark., 2010; S. Zhang ve ark., 2014).

Bu bulgular iskemik beyinde GLUT1 ve GLUT3 proteinleri aracılığıyla beyne daha fazla glukoz taşınımı sağlanmaya çalışıldığını ve glukoz eksikliğinin bu proteinler aracılığıyla kompanse edilmeye çalışıldığını göstermektedir.

Fokal serebral iskemi modellerinde GLUT4 proteininin rolü, GLUT1 ve GLUT3 proteinleri kadar araştırılmamıştır. Bu sebeple bu proteinlerin fokal serebral iskemi

durumunda tam olarak nasıl değiştiği henüz bilinmemektedir. İnsülin seviyesi iskemik inme sırasında değişir ve bazen inme meydana geldikten sonra insülin direnci ortaya çıkar. Böylece insüline duyarlı bir glikoz taşıyıcısı olan GLUT4 etkilenebilir ve iskemide enerji regülasyonuna katılabilir (S. Zhang ve ark., 2014).

GLUT4'ün plazma membranına translokasyonu insülininden bağımsız olarak, AMP-aktif edici protein kinaz (AMPK) aktivasyonu yoluyla gerçekleşebilir. Serebral iskeminin temel sonuçlarından biri olan enerji tükenmesi, kendisini azalan adenosin trifosfat (ATP) ve yükselen adenosin monofosfat (AMP) (Schulingkamp ve ark.) seviyeleri ile gösterir. AMPK, ATP rezervlerini korumak için enerji stresi durumlarında aktive edilebilir. AMPK aktivasyonu enerji metabolizmasını artırır ve AMPK aktivasyonuna yanıt olarak GLUT4 translokasyonu, glikoz alımını artırır (Russell ve ark., 2004; Agnetti ve ark., 2005).

İskemik hipokampüste AMPK'nın altında yatan mekanizmayı ortaya çıkarmak için, 10 dakikalık iskemiden sonra çeşitli reperfüzyon sürelerinde (0, 10 dakika, 1, 6 ve 24 saat) Western Blot yöntemi ile plazma ve post-plazma membranındaki GLUT4 değişiminin incelendiği bir çalışmada, sonuçlar post-plazma membrandaki GLUT4 seviyesinin sham grubuna göre kademeli olarak azaldığını göstermektedir (Li ve ark., 2010).

Şimdiye kadar fokal ve global serebral iskemide GLUT1, GLUT3 ve GLUT4'ün fonksiyonlarının anlaşılması için çalışmalar yapılmıştır (Gerhart ve ark., 1994; Urabe ve ark., 1996; Fung ve ark., 2010; Huang ve ark., 2010; S. Zhang ve ark., 2014). Fakat bu proteinlerin hücrel lokalizasyonu ve iskemiye bağlı olarak değişen fonksiyonları tam olarak açıklanamamıştır. Ayrıca serebral iskemi tedavisinde oynadıkları rol bilinmemektedir.

2.3. İnsülin, İnsülin Büyüme Faktörü ve Reseptörleri

2.3.1. İnsülin ve İnsülin Reseptör

Pankreas hücreleri tarafından üretilen bir hormon olan insülin, esas olarak glikoz, yağ ve protein metabolizması üzerindeki etkileriyle bilinir. Başlangıçta, iskelet kası gibi belirli dokuların glukoz kullanımının esas olarak insülin sinyallerine bağlı olduğu (Stockhorst ve ark., 2004), beyin ise insülininden bağımsız glukoz alımına sahip olduğu düşünölmekteydi (Gerozissis, 2003). İlerleyen araştırmalar, yenidoğan

beyninin insülin ürettiğini ancak bunun daha sonraki yaşlarda tespit edilemediğini göstermiştir (Gerozissis, 2003). Hem kemirgen hem de insan beyinlerinde insülin reseptörlerinin ekspresyonunun keşfi (Havrankova ve ark., 1978; Schwartz ve ark., 1992; Schwartz ve ark., 2000; Morton ve ark., 2006) ile birlikte, insülinin IR aracılı bir yolla kan-beyin bariyerini geçtiği bildirilmiştir (Schwartz ve ark., 1992). Böylece insülin ve spesifik reseptörlerinin beyin farklı bölgelerindeki varlığı artık daha açık bir şekilde bilinmektedir.

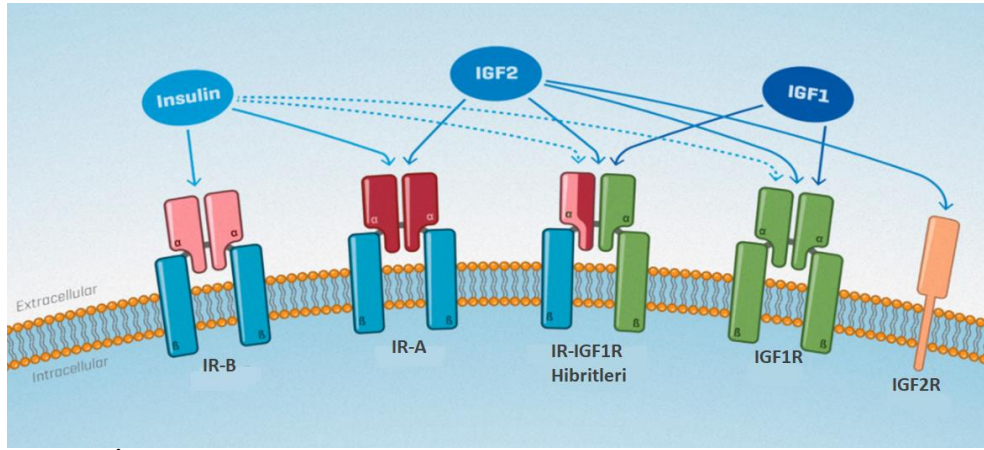
İnsülin sinyal yolları, insülinin IR'ye bağlanmasıyla etkinleştirilir (White ve Yenush, 1998; Hubbard, 1999; Li ve ark., 2005). IR, IGF reseptörünü de içeren bir reseptör tirozin kinaz ailesine aittir (Şekiller 2.3 ve 2.4). Sinir sisteminde IR'ler, hipotalamus, olfaktör bulbus ve hipokampüste heterojen bir şekilde dağılım gösterir (Unger ve ark., 1989; Schulingkamp ve ark., 2000).

2.3.2. Tip 1 İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü ve Reseptörü

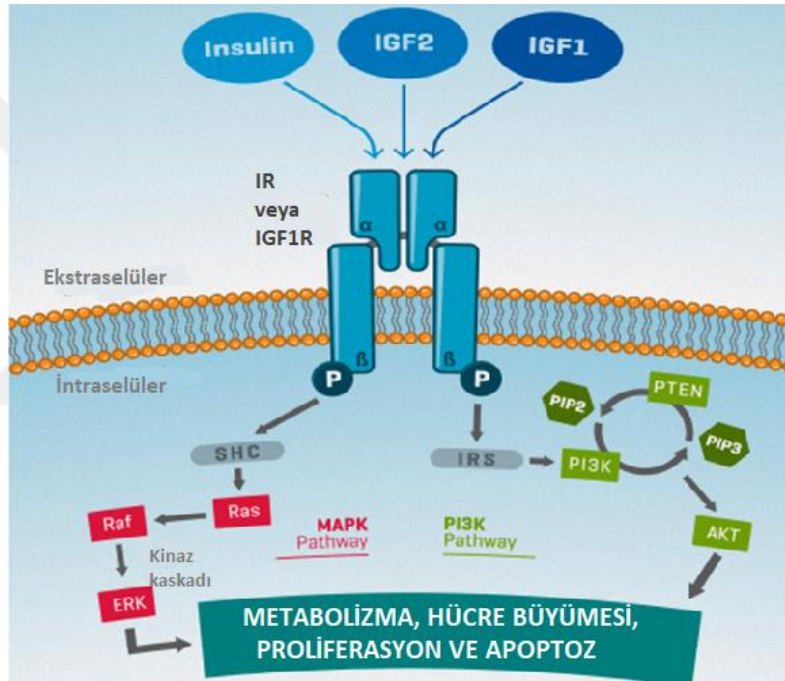
IGF ailesi, IGF-1 ve IGF-2 olmak üzere biyolojik olarak aktif iki peptit, altı tane bağlayıcı protein ve IGF-1R ve mannoz 6-fosfat/insülin benzeri büyüme faktörü-2 reseptörü (M6P / IGF-2R) olmak üzere bilinen iki reseptör içerir (Czech, 1989) (Şekil 2.3). IGF reseptörleri hem glia hem de nöronlarda mevcuttur (Bergstedt ve Wieloch, 1993; Lee ve Bondy, 1993).

Merkezi sinir sisteminde çeşitli nöronlarda ve glialarda IGF-1 aktivitesi görülür; bunlar, nöronal hayatta kalma, nörit büyümesi ve sempatik, duyuşal, kortikal ve motor nöronlarda in vitro protein sentezinin teşvik edilmesi (Aizenman ve de Vellis, 1987; Caroni ve Grandes, 1990; Knusel ve Hefti, 1991), in vitro nöronların mitozunu, farklılaşmasını ve olgunlaşmasını arttırmak (Pahlman ve ark., 1991) astrositlerde timidin birleşmesinin teşvik edilmesi (Ballotti ve ark., 1987) oligodendrositlerin proliferasyonunun, olgunlaşmasının ve miyelinasyonunun desteklenmesi (McMorris ve ark., 1993) gibi olayları içerir.

IGF-1R, hücre büyümesi ve farklılaşmasında kritik rol oynayan bir reseptör tirozin kinazdır (Adams ve ark., 2000; Chitnis ve ark., 2008). IGF-1R ve IR yakından ilişkilidir ve %57 sekans özdeşliği ve yüksek yapısal benzerliği paylaşırlar (Garrett ve ark., 1998; Xu ve ark., 2018) (Şekil 2.4).



Şekil 2.3. İnsülin/IGF sistemi: Ligand-reseptör bağlanma afiniteleri. IR ve IGF-1R proteinlerinin her biri iki $\alpha\beta$ dimerinden oluşur. IR, IR-A ve IR-B olmak üzere iki izoforma sahiptir. IR $\alpha\beta$ dimerleri, IR / IGF-R hibrit reseptörleri oluşturarak IGF-1R $\alpha\beta$ dimerlerine bağlanabilir. Her reseptörün insüline, IGF1 ve IGF2'ye göreli bağlanma afiniteleri, kesintisiz oklarla (yüksek afinite) veya kesintili oklarla (düşük afinite) gösterilmektedir (Neirijnck ve ark., 2019).



Şekil 2.4. İnsülin/IGF sinyalleşmesinin basitleştirilmiş şematik bir temsili. Reseptörlerine ligand bağlanması, β alt birimlerinin otfosforilasyonuna yol açar. IRS (insülin reseptörü substratı) veya SHC (Src homoloji alanı içeren) proteinlerin fosforilasyonu, MAPK (Ras / Raf / ERK) veya PI3K (PI3K / PTEN / AKT) sinyal yollarının aktivasyonuna sebep olur. AKT aktivasyonu, PI3K ve PTEN tarafından sırasıyla PIP3 veya PIP2 üretimi yoluyla pozitif ve negatif olarak modüle edilir. Her iki yol da hücre proliferasyonu, farklılaşması, metabolizması ve hayatta kalması ile ilişkilidir. Oklar sinyal iletimini göstermektedir (Neirijnck ve ark., 2019).

2.3.3. Serebral İskemide İnsülin, IR, IGF-1 ve IGF-1R

İnsülinin beyin içindeki etkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Nöronlarda ve glial hücrelerde IR'lerin varlığı, insülinin glukoregülasyon, devre gelişimi ve plastisite, besin alımı ve vücut ağırlığı, doğurganlık ve üreme, öğrenme, hafıza ve dikkat dahil olmak üzere çeşitli beyin fonksiyonlarını etkilediğini düşündürmektedir (Bondareva ve Chistyakova, 2007).

İnsülinin nöroprotektif etkileri birçok çalışmada gösterilmiştir:

Glutamat reseptör ailesi hızlı uyarıcı sinaptik iletimi etkilerken, γ -aminobütirik asit (GABA) reseptörleri hızlı inhibe edici sinaptik iletime aracılık eder. Sinaptik iletişimi sağlayan bu hassas sinyal dengesi, serebral iskemi ile birlikte aşırı uyarılma yönüne kayabilir. İnsülin, glutamat seviyelerini düşürebilir ve GABA seviyelerini artırabilir (Mielke ve Wang, 2005).

Sıçan hipokampal nöronlarında oksijen-glikoz yoksunluğu ile oluşturulan in vitro serebral iskemi modeli çalışmasında, hücrelere 10 dakika boyunca insülin ile muamele edildiğinde, GABA reseptörlerinin ekspresyonunun yaklaşık %20 arttığı gösterilmiştir (Vetiska ve ark., 2007). İnsülinin, hücre yüzeyinde bulunan GABA reseptörlerinin varlığını artırarak, kültürlenmiş nöronları oksijen-glikoz yoksunluğuna karşı koruduğu bildirilmiştir (Mielke ve Wang, 2005).

Beyinde glikojen neredeyse tamamen beyne dağılmış olan astrositlerde bulunur (Morgenthaler ve ark., 2006) ve insan astrositleri insülin reseptörünü eksprese ederler (Heni ve ark., 2011). Astrositler glikozu alır ve enerjiyi glikojen olarak depolar. Bu, nöron desteği için önemlidir (Heni ve ark., 2011).

İnsülin reseptörü sinyallemesi, dendritik aşırı büyüme, nöronal hayatta kalma, devre gelişimi, sinaptik plastisite ve postsinaptik nörotransmitter reseptör trafiği için önemli olarak kabul edilmektedir. Ortaya çıkan kanıtlar, insülin reseptör sinyalinin çeşitli nörolojik bozukluklarda bozulduğunu göstermiştir.

1992 ve 1993 yıllarında Lee ve Bondy tarafından IGF-1, IGF-2, reseptörleri ve bağlanma proteinlerinin MSS'deki rollerini aydınlatmak için FSI sıçan modelleriyle in situ hibridizasyon ve immünohistokimyasal yöntemler kullanarak yapılan çalışmalar sonucunda, iskemik serebral kortekste hem IGF-1, hem IGF-2 gen ekspresyonunda çarpıcı bir artış görülmüştür. Hem IGF-1 hem de IGF-2'in, beyin hasarına yanıt olarak oluşan fagositik aktivite sırasında, fagositik hücrelerde yüksek oranda eksprese edildiği bulunmuştur (Lee ve ark., 1992; Lee ve Bondy, 1993).

IGF-1, bağlayıcı proteinleri ve reseptörlerinin beyin hasarını takiben hasarlı beyin bölgelerinde yoğun bir şekilde indüklendiğinin gösterilmesi üzerine (Lee ve ark., 1992; Bergstedt ve Wieloch, 1993; Lee ve Bondy, 1993), IGF-1'in beyin

iyileşmesinde olası bir rolü olduğu düşünülmüş ve bunun üzerine araştırmacılar IGF-1'in FSİ modelleri üzerindeki terapötik etkisine yoğunlaşmışlardır.

In vitro olarak, IGF-1'in hem duyuşal hem de motor nöronları eksitotoksiste ve oksidatif strese karşı korumak için glutamat, nitrik oksit ve hidrojen peroksitle ilişkili apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (Russo ve ark., 2005). KBB'yi oluşturan endotel hücreleri de iskemi sonrasında, oksijen ve glikoz yoksunluğu sonucunda IGF-1 sekresyonunu arttırarak nöron hasarının azalmasına yardımcı olurlar (Wang ve ark., 2013). Ayrıca, inmenin sıçanlarda endojen IGF-1 ekspresyonunu arttırarak, subventriküler zon (SVZ) ve dentat girus (DG)'da nöronal ve oligodendrosit progenitörlerinin çoğalmasını sağladığı bilinmektedir (Dempsey ve ark., 2003). IGF-1'in sıçanlarda inme sonrası nörogenez ve progenitör hücre proliferasyonunun yanı sıra anjiyogenez ve miyelinasyonu da desteklediği gösterilmiştir (Dempsey ve ark., 2003; Russo ve ark., 2005).

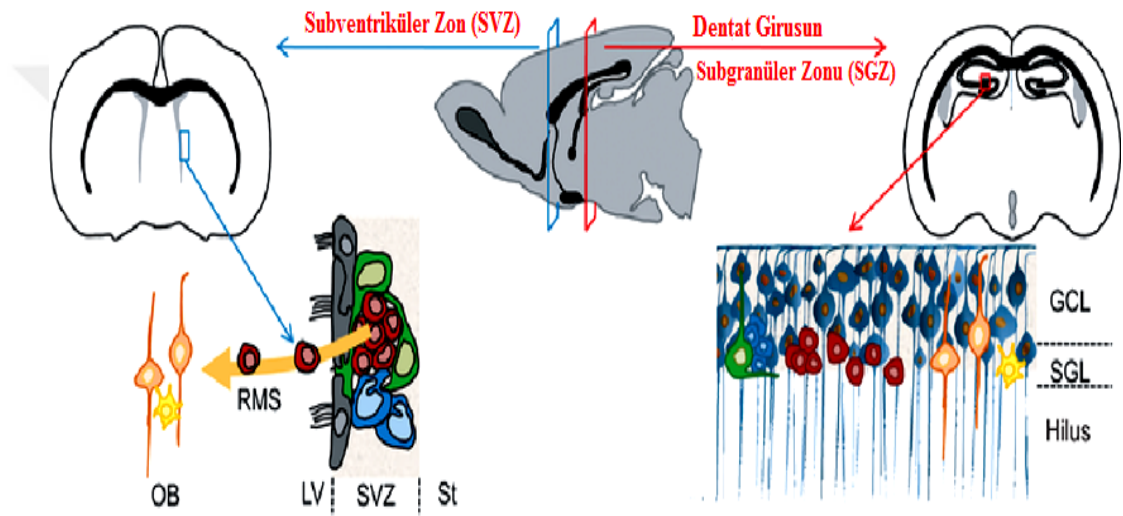
2.4. İskemi Tedavisinde Kök Hücre Yaklaşımları

Serebral iskemide hücresel tedaviye yönelik olarak, birçoğu kemirgenler üzerinde gerçekleştirilmiş olan, bugüne kadar yapılan araştırmaların çoğunluğu, embriyonik kök hücreler (EKH), indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH), nöronal kök hücreler (NKH) ve mezenkimal kök hücreler (MKH) olmak üzere başlıca dört kök hücre tipi üzerine odaklanmaktadır.

EKH'ler pluripotent hücrelerdir ve nöronlar ve glialar dahil olmak üzere herhangi bir hücre tipine farklılaşabilme yetenekleri nedeniyle terapi için ideal kabul edilmektedir. Bu hücre tipini kullanmanın en büyük dezavantajlarından biri, farklılaşmamış bir durumda enjekte edilirlse teratom oluşturabilmeleridir (Seminatore ve ark., 2010). Ayrıca etik kısıtlamalar da EKH'lerin araştırmalarda kullanımının önüne geçmektedir.

iPKH yaklaşımının da istenmeyen birtakım sonuçları mevcuttur. Örneğin, kemirgenlerde oluşturulan bir inme modeli ile yapılan bir çalışmada araştırmacılar, iPKH uygulanması sonrasında hem inmeli hem de sham opere hayvanların beyinlerinde ciddi teratom oluşumu bulmuşlardır (Kawai ve ark., 2010).

NKH'ler, embriyoların merkezi sinir sisteminden ve yetişkinlerdeki subventriküler ve subgranüler bölgelerden (Şekil 2.5) izole edilebilir ve kültürlenebilirler (Arvidsson ve ark., 2002). EKH'lerin aksine, NKH'ler pluripotent değildir, ancak hepsi olmasa da birçok MSS hücre türüne farklılaşabilirler. Nöronlara, astrositlere ve oligodendrositlere farklılaştıkları gösterilmiştir. Birçok çalışma, hem endojen hem de nakledilen NKH'lerin potansiyel terapötik faydasını gösterse de, bu tip tedavinin sınırlayıcı faktörlerinden biri nakledilen hücrelerin hayatta kalma oranının zayıf olmasıdır. Nakledilen hücrelerin %1-3'ünün hayatta kaldığı ve daha küçük bir yüzdenin nöronlara farklılaştığı gösterilmiştir (Toda ve ark., 2001).



Şekil 2.5. Yetişkin beyninin ana nörogenik alanları. Yetişkin nöroenez, subventriküler bölge (SVZ) / olfaktör bulbus (OB) ve hipokampal sistemde tanımlanmıştır. Glial fibriler asidik protein pozitif astrositler (yeşil), yavaşça bölünerek progenitörlere (mavi) dönüşürler, bunlar da sırasıyla, nöronlara (turuncu) veya glial hücrelere (sarı) farklılaşabilen olgunlaşmamış hücreler (kırmızı) üretirler. **RMS:** rostral göç akışı; **LV:** lateral ventrikül; **St:** striatum; **GCL:** granül hücre katmanı; **SGL:** subgranüler tabaka (Drapeau ve Nora Abrous, 2008).

Hücre bazlı terapi için en popüler hücre kaynaklarından biri de erişkin dokudan elde edilen kök hücrelerdir. MKH'ler dolaşımdaki kan, göbek kordon kanı, plasenta, kalp, yağ dokusu, iskelet kası, pankreas ve diş pulpası da dâhil olmak üzere memelilerdeki hemen hemen tüm dokulardan izole edilebilmektedir (Zou ve ark., 2010). Önceki çalışmalar, inmeli hayvanlarda intraserebral veya intravenöz yolla transplante edilen MKH'lerin seçici olarak iskemik sınır bölgelerine göç ettiğini, nöronlara ve glial hücrelere farklılaştığını ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklediğini göstermiştir (Li ve ark., 2002; Zhao ve ark., 2002). MKH'lerin immünosüpresif özelliklere sahip olduğu ve inflamasyonu azalttığı bilinmekle birlikte (Tse ve ark., 2003; Togel ve ark., 2005),

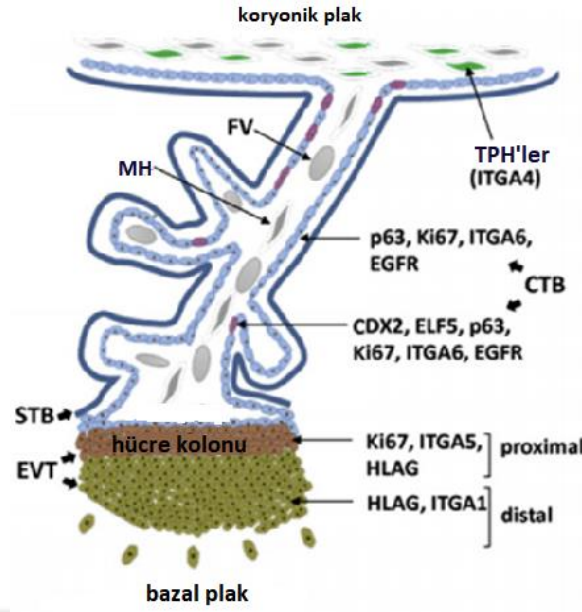
nörotrofin ve anjiyogenik özelliklere sahip olduğu önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Eaves ve ark., 1991; Villars ve ark., 2000). Ancak in vivo modeller, nakledilen MKH'lerde çok düşük bir hayatta kalma oranı göstermiştir (Coyne ve ark., 2006).

2.5. Trofoblast Progenitör Hücreler

Serebral iskemi tedavisinde yukarıda bahsedildiği gibi, birçok kök hücre ile çalışılmıştır. Bu çalışmaların bazılarında olumlu sonuçlar da elde edilmiştir ancak bu hücrelerle ilgili olarak hala bazı sınırlamalar ve riskler mevcuttur. Bu sebeple, yeni ve güvenilir alternatif kök hücre kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır. Literatür incelendiğinde, iTPH'ler serebral iskemik hastalar için umut verici adaylar arasında yer almaktadır (Cooper ve ark., 1995; Han ve ark., 1996; Lee ve ark., 2012; Molbay ve ark., 2018; Molbay ve ark., 2020; Yanar ve ark., 2021).

Plasenta, gelişmekte olan fetüsün biyoenerjetik ihtiyaçlarını karşılayabilecek maternal-fetal vasküler bir ara yüzün oluşturulması için gerekli olduğundan, memelilerde oluşan ilk organdır (Maltepe ve ark., 2010). Trofoblast kök hücreleri, trofoektoderm kaynaklıdır ve plasentadaki trofoblast hücrelerin kaynağıdır (Şekil 2.6).

Trofoblast kök hücreleri ilk olarak Tanaka ve arkadaşları tarafından 1998'de fare blastositlerinden izole edilmiştir (Tanaka ve ark., 1998). Genbacev ve arkadaşları ise ilk kez 2011'de insan trofoblast progenitör hücrelerini plasentadan elde etmişlerdir (Genbacev ve ark., 2011).



Şekil 2.6. İmplantasyon sonrası plasentada koryonik mezenşimdeki potansiyel trofoblast progenitor hücreleri. ITGA4+ hücre popülasyonları, sitotrofoblast alt popülasyonları ile ortak olarak p63, CDX2 ve ELF5'i eksprese ederler. Proksimal hücre kolonundaki trofoblastlar proliferatiftir ve invaziv ekstravillöz sitotrofoblastların öncüleri olarak kabul edilirler. **TPH:** trofoblast progenitor hücre; **CTB:** sitotrofoblast; **STB:** sinsitiyotrofoblast; **EVT:** ekstravillöz sitotrofoblast; **MH:** mezenkimal hücre; **FV:** fetal damar (Chang ve Parast, 2017).

iTPH'ler, Parkinson hastalığı ve diğer nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için potansiyel alternatif pluripotent hücreler gibi görünmektedir. Retinoik asitle indüklenmiş TPH'lerin dopaminerjik nöronlara farklılaştığı, bu hücrelerin nigrostriatal yol oluşturduğu ve hem akut hem de kronik Parkinson hastalık modeli oluşturulmuş sıçanlarda fonksiyonel motor nöron eksikliğini azalttığı gösterilmiştir (Lee ve ark., 2012). Trofoblastların, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) ve IGF gibi çok çeşitli anjiyogenik faktörler ve sitokinler salgılayabildiği bilinmektedir (Cooper ve ark., 1995; Han ve ark., 1996; Lee ve ark., 2012; Molbay ve ark., 2018; Molbay ve ark., 2020; Yanar ve ark., 2021). Ayrıca, ekstravillöz trofoblastların klasik histo-uyumluluk antijenleri HLA-A veya HLA-B'yi eksprese etmediği göz önüne alındığında, TPH nakillerinin sınırlı bir antijeniteye sahip olacağı düşünülmektedir (Hiby ve ark., 2010).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Denekler

Bu araştırmada kullanılan 300-320 gr ağırlıkları arasındaki 48 adet Wistar sıçan Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden elde edilmiştir. Tüm denekler $28 \pm 4^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında barındırılmıştır. Denekler için normal diyet ve su kullanılmıştır.

Deney Grupları

1. Grup: Sham grubu (n=16)
2. Grup: Fokal serebral iskemi oluşturulan grup (n=16)
3. Grup: Fokal serebral iskemi + iTPH enjekte edilen grup (n=16)

3.2. Geçici Fokal Serebral İskemi Modelinin Oluşturulması

3.2.1. Geçici Orta Serebral Arter Tıkanıklığı (MCAO)

Wistar sıçanlar %4 isoflurane ile anestezi edildikten sonra stereoskopik mikroskop altında, ventral orta alan insizyonu gerçekleştirilmiştir ve yüzey bağ dokusu diseke edilmiştir. Yüzeydeki bağ dokusunu altındaki glandular doku künt diseksiyonla ayırıldıktan sonra altında trakea kası görülür. Trakea kasının solundan karotid arter bulunana kadar künt diseksiyon yapılmıştır. Eksternal, internal, ve ortak karotid arterler (ECA, ICA, CCA) bu aşamada görülmüştür. ECA'nın iki dalı oksipital arter ve süperior tiroid arter, 6/0 ipek ile bağlanıp kateter ile kesilmiştir. ECA mümkün olduğunca distalden 6/0 ipek ile bağlanmıştır. Bir başka 6/0 ipek ECA'nın ICA ile birleşim yerinin yakınından gevşekçe sarılmıştır. Mikroklempler CCA ve ICA'nın birleşim yerlerinin yakınlara yerleştirilmiştir. ECA'daki iki ipek bağ arasına arteriotomi gerçekleştirilmiştir. 2.0 mm uzunluğunda 0.39 mm çapında silikon tipi 2.0-2.2 cm 4/0 monofilament naylon suture ECA lümenine CCA'ya doğru mikroklempin olduğu bölgeye doğru itilmiştir. ECA etrafındaki suture sıkılarak naylon suturen yeri stabilize edilip kanama önlenmiştir. Sonrasında ICA'daki mikroklemp yavaşça çıkarılmıştır. Naylon suture ECA'dan ICA lümenine doğru orta serebral artere (MCA) ulaşana kadar itilmeye devam edilmiştir. Bu uzunluk tipik olarak 300 gr sıçan için 1.8-2.0 cm uzunluğundadır. Suture 2 cm işaretli bölgeye kadar girilip bir direnç hissedilinceye kadar lümen içerisinde itilmiştir. 90 dk tıkanıklık süresi ölçülmüştür. CCA'daki mikroklemp çıkarılmıştır. Daha sonra deri 3/0 ipek ile

hızlıca kapatılmıştır. Kırmızı ışık altında hayvanın anesteziden uyanması beklenmiştir (Sasaki ve ark., 2009; Molbay ve ark., 2020).

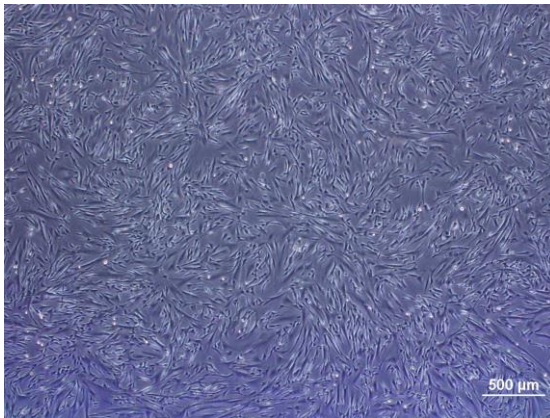
3.2.2. Reperfüzyon

Tıkanıklık periyodunun bitmesine çok az kala sıçan yeniden anestezi edilip ilk seferinde yapıldığı gibi dezenfekte edilmiştir ve dikişler kesilerek açılmıştır. CCA üzerine önceki gibi mikroklempler yerleştirilmiştir. Tıkayıcı süturu ICA boyunca çekilip suture başı ICA sonunda görünene kadar çekilmiştir. Suture ICA/ECA'dan tamamen çıkarılmamalıdır. ICA'da sutureun bittiği yere mikroklempler yerleştirildikten sonra suture tamamen çıkarılıp, ECA tamamen sıkıca bağlanmıştır. Tıkanıklığın tam giderilme saati (reperfüzyonun başlama saati) kaydedilmiştir. ICA'daki mikroklempler çıkarılmıştır. CCA'daki mikroklempler çıkarılmıştır. Alan steril serum fizyolojik (SF) ile ıslatılıp 3/0 katgut ile iç dokular ve 3/0 ipek ile deri dikilerek kapatılmıştır. İntramüsküler olarak 0,1 ml Contramal verilmiştir. İntraperitoneal olarak 5 ml SF enjekte edilmiştir. Reperfüzyon sürecinde hidrasyon sağlanmıştır. Anesteziden uyanan sıçan, davranışsal analiz için kuyruğundan kaldırılarak tutulup, hayvan her iki yöne de dönebiliyor mu diye test edilmiştir. Sağa doğru kıvrılması beklenir (Sasaki ve ark., 2009; Molbay ve ark., 2020).

3.3. iTPH Uygulaması

iTPH'lerin Eldesi

iTPH'ler, Kaliforniya Üniversitesi Pediatri Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Emin Maltepe tarafından tarafımıza gönderilmiştir.



Şekil 3.1. İnsan trofoblast projenitör hücrelerinin invert mikroskop altındaki görüntüsü. Skala bar 1 br = 500µ.

iTPH Enjeksiyonu

iTPH'ler hayvanlara 6×10^5 , 0,7 ml medyum içerisinde kuyruk veninden enjekte edilmiştir. Hayvanlara hücre verilmesinden 1 gün önce subkutan Cyclosporin A verilip, bu işlem hücre verilmesinden 7 gün sonrasına kadar devam ettirilmiştir. 100 mg Cyclosporin A, 10 ml DMSO içerisinde çözülüp, hayvan başına 1 mg/gün olmak üzere verilmiştir. Cyclosporinin verilmesindeki amaç, sıçanların insan plasentası kökenli trofoblast progenitör hücrelerini reddetmesini engellemek içindir.

3.4. SDS-PAGE Western Blot Protokolü

3.4.1. Lizat Hazırlama

Sakrifikasyon sonrası elde edilen dokular bistüri ile kıyıldıktan sonra ependorflara 0,3-0,4'er gramlık bölünmüştür. Ependorflar buza alınmıştır. Ependorflar tartılarak 0,2 gram doku başına 10 µl proteaz inhibitör kokteyli ve 600 µl lizis tamponu eklenmiştir. Tüm ependorflar 1 saat boyunca 15dk'da 1 kez vortekslenip daha sonra sonikatör cihazı ile mekanik olarak parçalanmıştır. 15000 rpm'de 10 dk santrifüj ardından süpernatant ependorflara 20'şer µl bölünmüştür.

3.4.2. Örnek Hazırlama

Lizatlardan eşit oranda protein içeren örnekler elde etmek için Thermo Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit kendi talimatları doğrultusunda kullanılmıştır. Sonuçlar doğrultusunda hesaplamalar yapıp gerekli miktarda laemmli ve distile su ile 30 mikrogram/ml oranında protein içeren örnekler hazırlanmıştır.

3.4.3. SDS-PAGE Western Blot Protokolünde Kullanılan Solüsyonlar

Sodyum Ortohoivanadate (100X)

- 0,184 g Na–ortohoivanadate
- 10 ml 0,1 M TRIS (pH:10)

Lizis Tamponu

- 10 mL 0,1 M TRIS (pH: 7,4)
- 90 mL dH₂O
- 1 mL Na–ortohoivanadate
- 1 g SDS

Ayırma Solüsyonu (pH: 8,8)

- 18,17 g TRIS
- 0,4 g SDS
- dH2O ile 100 mL'ye tamamlanır.

Toplama solüsyonu (pH: 6,8)

- 6,06 g TRIS
- 0,4 g SDS
- dH2O ile 100 mL'ye tamamlanır.

Akrilamid – Bisakrilamid

- 7,5 g hazır akrilamid – bisakrilamid 37,5:1
- dH2O ile 25 ml'ye tamamlanır.

10% Ayırma Jeli

- 1660 µl dH2O
- 1000 µl ayırma solüsyonu
- 1320 µl poliakrilamid
- 5 µl TEMED
- 30 µl 10% APS

Toplama Jeli

- 1155 µl dH2O
- 500 µl Toplama Solüsyonu
- 330 µl poliakrilamid
- 2,5 µl TEMED
- 15 µl 10% APS

Yürütme Solüsyonu (pH: 8,3-8,6) (5X)

- 9 g TRIS
- 43,2 g Glisin
- 3 g SDS
- 600 ml dH2O

Blotlama Solüsyonu (pH: 8,3-8,6)

- 3 g TRIS
- 14,3 g Glisin

- 200 mL metanol
- dH2O ile 1000 mL'ye tamamlanır.

TBS (pH) 7,4 (10X)

- 60,55 g TRIS
- 87,66 g NaCl
- dH2O ile 1000 mL'ye tamamlanır.
- 1 mL TWEEN-20 eklenirse TBS-T elde edilir.

3.4.4. SDS-PAGE Western Blot Analizi

Hazırlanan örnekler 95°C'de 5 dakika kaynatılmıştır. Çalışılacak olan proteinin kilo dalton ağırlığı dikkate alınarak uygun yüzdelerde jeller hazırlanmıştır. Her kuyucuğa 30 mikrogram/ml oranında protein içeren numuneler yüklenmiştir. Elektroforezde numuneler ilk önce 100V 30mA'de 15 dakika, sonrasında ise 80V 30mA'de jelin sonuna kadar yürütülmüştür. Elektrofezden sonra ise jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için immunoblotlama yapılmıştır. Blotlama işlemi 30V 90mA'de gece boyu +4°C'de gerçekleştirilmiştir. Proteinlerin membrana transfer olup olmadığını kontrol etmek için membran, bantlar görünene kadar Ponceau ile muamele edilmiştir. Ponceau membrandan uzaklaşınca kadar pH'sı 7.4 olan, %0.1 Tween-20 ilaveli Tris Buffer Solusyonu (TBS-T) ile yıkama yapılmıştır. Ardından membran 1 saat süre ile oda ısında TBS-T ile hazırlanan %5'lik yağsız süt tozu ile bloklanmıştır. Membran, dilüe edilmiş antikorlar (Abcam ab652 rabbit poliklonal anti GLUT1 1:1000, Abcam ab1344 rabbit poliklonal anti GLUT3 1:1000, Abcam ab654 rabbit poliklonal anti GLUT4 1:2000, Santa Cruz SC-711 rabbit poliklonal anti IR 1:1000, Santa Cruz SC-713 rabbit poliklonal anti IGF-1R 1:3000 ve Cell Signaling 4967 rabbit poliklonal anti β actin 1:5000) ile +4°C'de gece boyu karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında membran TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika yıkanmıştır. Membran, sekonder antikor (Advansta R-05072-500 goat anti-rabbit IgG H+L, HRP conjugate 1:3000) ile oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edilmiş ve inkübasyon sonrasında TBS-T ile 3 kez 10'ar dakika yıkanmıştır. Ardından Super Signal Chemiluminisans ile 5 dakika karanlıkta inkübe edilip, Azure Biosystems C280 görüntüleme cihazında bantlar incelenmiştir ve istatistiksel analizler one way ANOVA yöntemi ile yapılmıştır.

Doku Takibi

Sakrifikasyon sonrası elde edilen dokular %4 formalin içerisinde gece boyu inkübe edildikten sonra akan suda 4 saat yıkanarak temizlenmiştir. Dokular, sudan arındırılmak amacıyla %70, %80 ve %90'lık artan derecelerde alkol serisinde 1'er gün inkübe edildikten sonra %100'lük alkolde 3 saat daha inkübe edilmiştir. Dokular daha sonra şeffaflaştırma amacıyla ksilole alınarak 5 dk inkübasyon yapılmıştır. Sertleştirme amacıyla dokular 3x1 saat parafin içerisinde tutulmuştur ve son olarak parafin içerisine gömülmüşlerdir.

3.5. İmmünofloresan Yöntemi

3.5.1. İmmünofloresan Yönteminde Kullanılan Solüsyonlar

PBS (pH: 7.2 – 7.4):

- 16 gr NaCl
- 2,85 gr Na₂HPO₄
- 0,8 gr KH₂PO₄
- 2000 ml dH₂O

Sitrik Asit Çözeltisi (pH: 6.0):

- 2,1 gr sodyum sitrat (10mM)
- 900 ml dH₂O

3.5.2. İmmünofloresan Protokolü

Deneklere ait doku bloklarından alınan 5 mikrometre kalınlığındaki parafin doku kesitleri süperfrost lamlara alınarak, 1 gece boyunca 56°C'de etüvde tutulmuştur. Deparafinizasyon için parafin kesitler 2 defa 10'er dakika ksilolden geçirilmiştir ve daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinin her birinde 5'er dakika (%100, %90, %80, %70) bekletilmiştir. Kesitler, distile su ile 5 dakika muamele edilmiştir. Dokudaki antijenik maskelenmenin ortadan kaldırılması için kesitler, 200 ml sodyum sitrat solüsyonu içine alınmıştır ve üç defa 5'er dakika mikrodalga fırında (750 watt) tutulmuşlardır. Bu işlemden sonra sodyum sitrat solüsyonu içerisinde 20 dakika boyunca oda ısısında bekletilmişlerdir. Dokuların çevresi hidrofobik kalemle çizildikten sonra 3 defa 5'er dakika PBS'ten geçirilmişlerdir. Daha sonra dokulardaki özgül olmayan antikor bağlanmasını önlemek amacıyla Ultravision Protein Block ile 10 dakika muamele edilmiştir. Sonrasında dokular primer antikorlar ile (Abcam ab562 rabbit poliklonal anti GLUT1 1:1000, Abcam ab53095 rabbit poliklonal anti

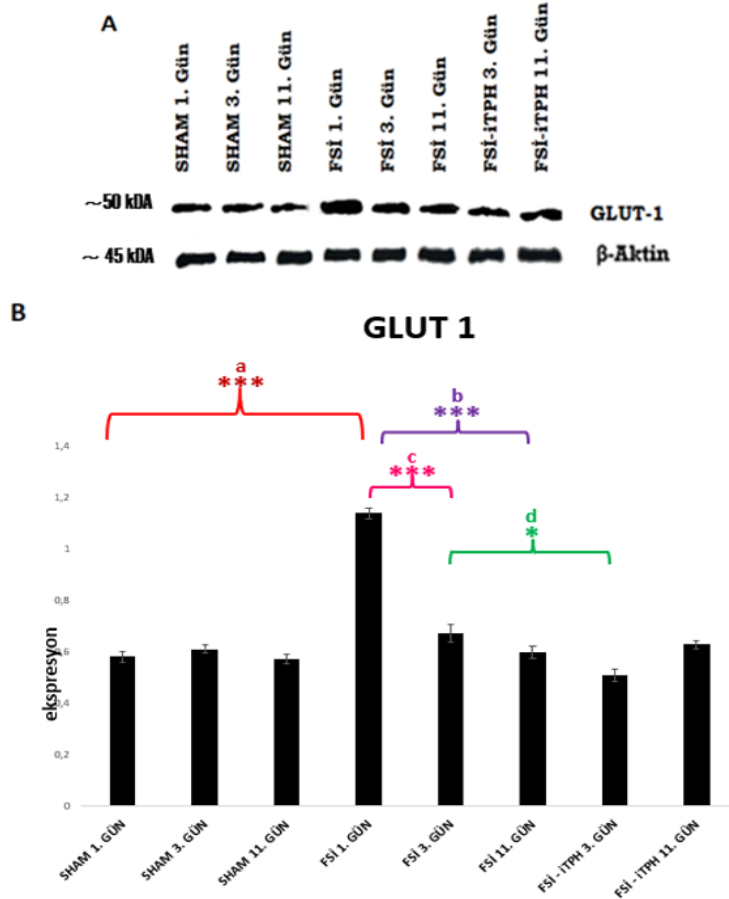
GLUT3 1:500, Abcam ab654 rabbit poliklonal anti GLUT4 1:1000, Santa Cruz SC-711 rabbit poliklonal anti IR 1:500 ve Santa Cruz SC-713 rabbit poliklonal anti IGF-1R 1:250) +4 °C’de gece boyu inkübe edilmişlerdir. Kontrol kesitlerine, uygun serum ya da izotip IgG uygulanmıştır. Kesitler primer antikorlar ile inkübasyondan sonra, 3 defa 5’er dakika PBS ile yıkanmıştır. Sekonder antikor (Life Tech 10042 alexa flour donkey anti-rabbit IgG H+L-568 4 mikrogram/ml) ile 2 saat karanlıkta inkübasyon yapılmıştır. PBS ile 3 defa 5’er dakika yıkama yapılmıştır. Son olarak kesitler, DAPI’li kapatma sıvısıyla kapatılmıştır. Değerlendirmeler floresan mikroskop ile yapılmıştır. Görüntüler 40x büyütmede fotoğraflanmıştır. Semikantitatif analiz yapılmıştır.



4. BULGULAR

4.1. Western Blot Analizi Sonuçları

4.1.1. GLUT1 Protein Miktarındaki Değişimler

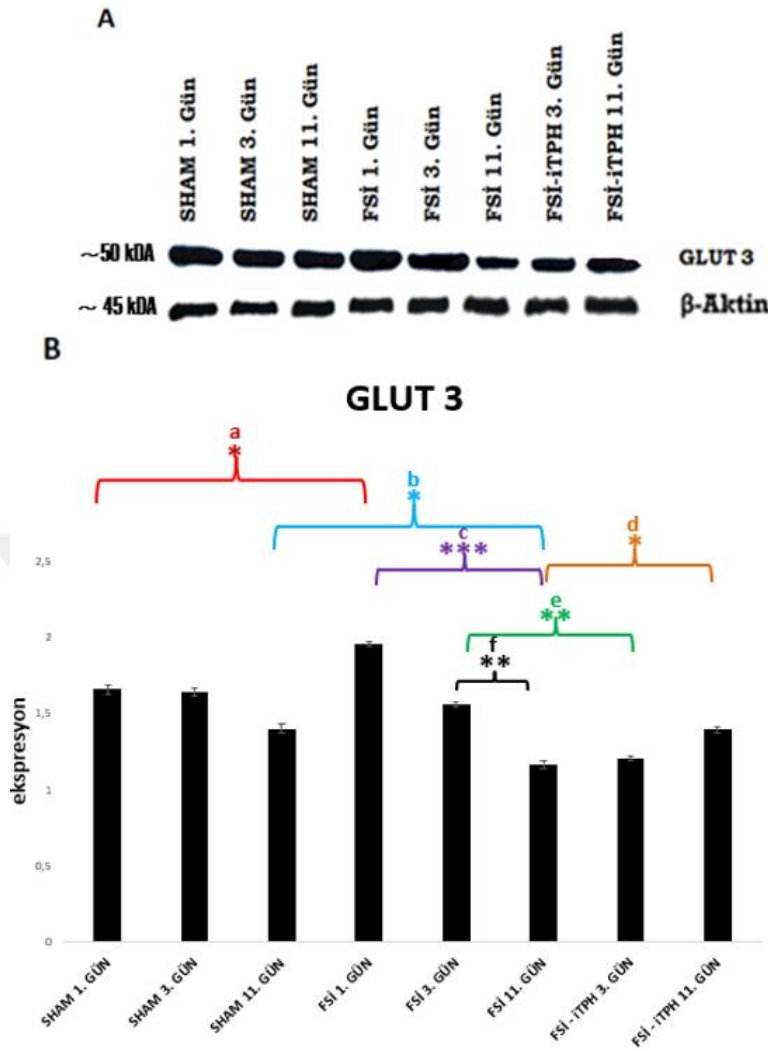


Şekil 4.1. GLUT1 Western Blot sonuçları. A) GLUT 1 Western Blot bantları. **B)** GLUT 1 protein seviyesindeki değişiklikler. **a.** Sham 1. Gün – FSİ 1. Gün, **b.** FSİ 1. Gün – FSİ 11. Gün, **c.** FSİ 1. Gün – FSİ 3. Gün **d.** FSİ 3. Gün – FSİ iTPH 3. Gün. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

FSİ 1. gün grubunda GLUT1 protein miktarı, sham 1. güne göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksektir ($p \leq 0,001$). FSİ 3. gündeki protein miktarının FSİ 1. güne kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görülmektedir ($p \leq 0,001$). FSİ 3. gündeki protein miktarı ile sham 3. gün grubu arasında anlamlı bir fark yoktur. Benzer şekilde FSİ 11. gündeki protein miktarı, FSİ 1. güne kıyasla anlamlı şekilde daha düşüktür ($p \leq 0,001$) ve FSİ 11. gündeki protein miktarı ile sham 11. gün grubu arasında anlamlı bir fark yoktur (Şekil 4.1).

FSİ-iTPH 3. gün grubundaki GLUT1 protein miktarı FSİ 3. güne kıyasla anlamlı şekilde daha düşüktür ($p \leq 0.05$). GLUT1 protein miktarı, FSİ-iTPH 11. gün ile FSİ 11. gün grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak farklı değildir (Şekil 4.1).

4.1.2. GLUT3 Protein Miktarındaki Değişimler

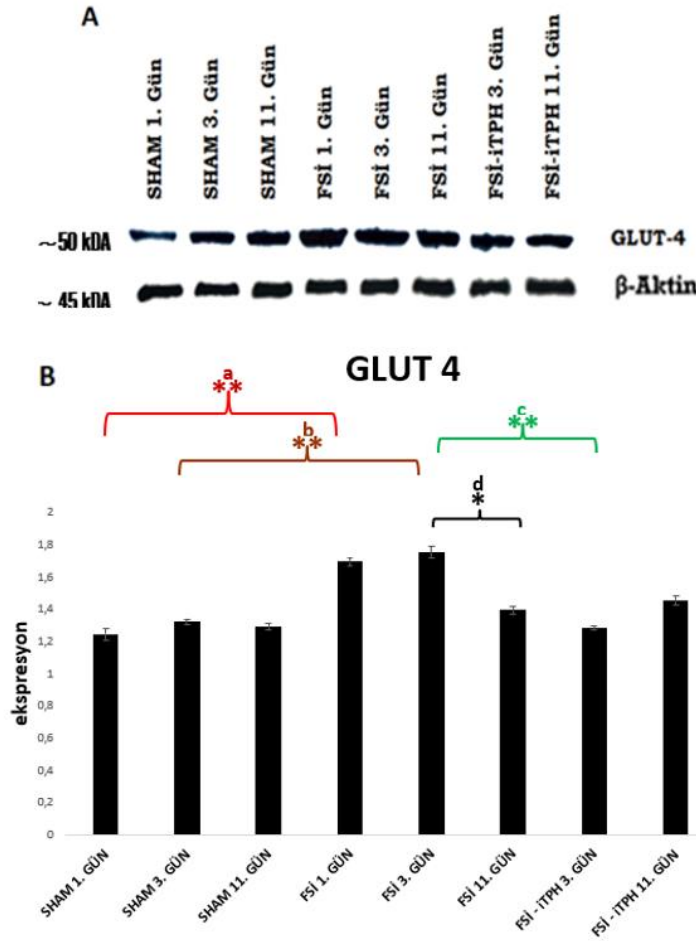


Şekil 4.2. GLUT3 Western Blot Sonuçları. A) GLUT 3 Western Blot bantları. **B)** GLUT 3 protein seviyesindeki değişiklikler. **a.** Sham 1. Gün – FSİ 1. Gün, **b.** Sham 11. Gün – FSİ 11. Gün, **c.** FSİ 1. Gün – FSİ 11. Gün, **d.** FSİ 11. Gün – FSİ iTPH 11. Gün, **e.** FSİ 3. Gün – FSİ iTPH 3. Gün, **f.** FSİ 3. Gün – FSİ 11. Gün. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

FSİ 1. gün grubunda GLUT3 protein miktarı sham 1. gün grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksektir ($p \leq 0.05$). FSİ 11. gündeki protein seviyesi FSİ 1. güne ($p \leq 0.001$) ve FSİ 3. güne ($p \leq 0.01$) kıyasla anlamlı şekilde daha düşüktür. FSİ 11. gündeki protein seviyesinin aynı zamanda sham 11. gün grubu ile kıyaslandığında da anlamlı şekilde daha düşük olduğu görülmektedir ($p \leq 0.05$) (Şekil 4.2).

FSİ-iTPH 3. gün grubundaki protein miktarı FSİ 3. gün grubuna göre istatistiksel anlamlı şekilde daha düşüktür ($p \leq 0.01$). FSİ-iTPH 11. gün grubundaki protein miktarı ile FSİ 11. gün grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Şekil 4.2).

4.1.3. GLUT 4 Protein Miktarındaki Değişimler

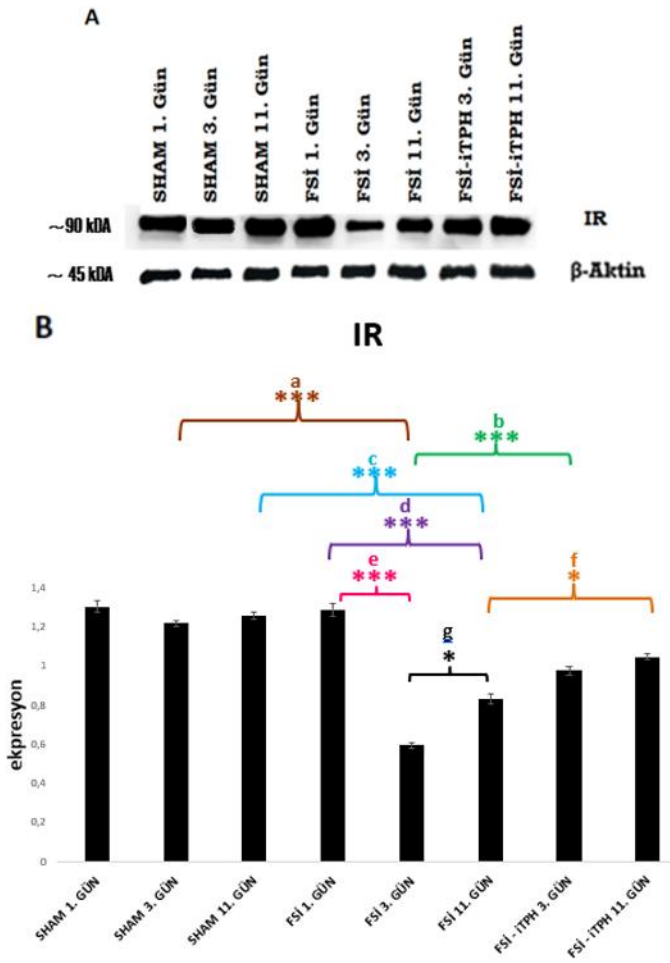


Şekil 4.3. GLUT 4 Western Blot Sonuçları. A) GLUT 4 Western Blot bantları. **B)** GLUT 4 protein seviyesindeki değişiklikler. **a.** Sham 1. Gün – FSİ 1. Gün, **b.** Sham 3. Gün – FSİ 3. Gün, **c.** FSİ 3. Gün – FSİ iTPH 3. Gün, **d.** FSİ 3. Gün – FSİ 11. Gün. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

FSİ 1. gün grubunda GLUT 4 protein miktarı sham 1. gün grubuna göre istatistiksel anlamlı şekilde daha yüksektir ($p \leq 0.01$). Benzer şekilde, FSİ 3. gün grubundaki protein ekspresyonu da sham 3. gün grubuna göre anlamlı şekilde yüksektir ($p \leq 0.01$). FSİ 11. günde ise protein seviyesi FSİ 3. güne göre anlamlı şekilde düşmüştür ($p \leq 0.05$). FSİ 11. gün ile sham grupları arasında anlamlı bir fark yoktur (Şekil 4.3).

FSİ-iTPH 3. gün grubunda protein miktarı FSİ 3. güne kıyasla anlamlı şekilde daha düşüktür ($p \leq 0.01$). FSİ-iTPH 11. gün grubu ile FSİ 11. gün grubu kıyaslandığında aralarında anlamlı bir fark yoktur (Şekil 4.3).

4.1.4. IR Protein Miktarındaki Değişimler

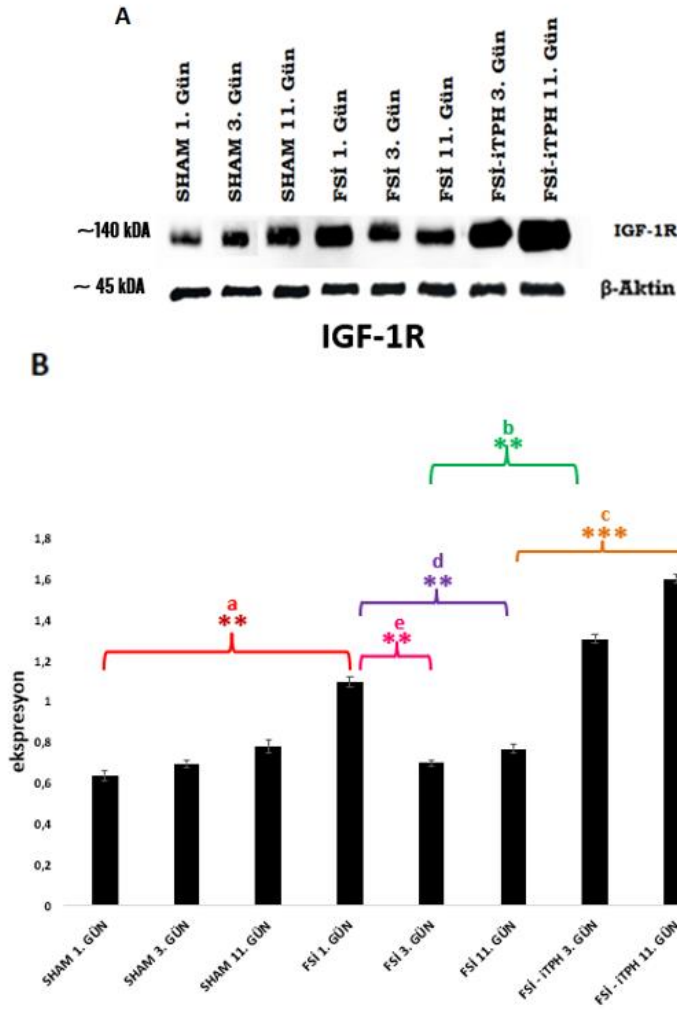


Şekil 4.4. IR Western Blot Sonuçları. A) IR Western Blot bantları. **B)** IR protein seviyesindeki değişiklikler. **a.** Sham 3. Gün – FSİ iTPH 3. Gün, **b.** FSİ 3. Gün – FSİ iTPH 3. Gün, **c.** Sham 11. Gün – FSİ 11. Gün, **d.** FSİ 1. Gün – FSİ 11. Gün, **e.** FSİ 1. Gün – FSİ 3. Gün, **f.** FSİ 11. Gün – FSİ iTPH 11. Gün, **g.** FSİ 3. Gün – FSİ 11. Gün. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

FSİ 1. gün grubundaki IR protein miktarında sham 1. güne kıyasla anlamlı bir fark yoktur. FSİ 3. gündeki protein miktarı FSİ 1. güne kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır ($p \leq 0.001$). Aynı zamanda FSİ 3. gündeki protein miktarı sham 3. güne göre anlamlı şekilde daha düşüktür ($p \leq 0.001$). FSİ 11. gün IR protein miktarı FSİ 3. güne göre anlamlı şekilde artmıştır ($p \leq 0.05$). Ancak FSİ 11. gündeki protein miktarı sham 11. güne göre anlamlı şekilde daha düşüktür ($p \leq 0.001$) (Şekil 4.4).

FSİ-iTPH 3. gün grubunda protein miktarı FSİ 3. güne kıyasla anlamlı olarak daha fazladır ($p \leq 0.001$). FSİ-iTPH 11. gündeki protein seviyesi ise FSİ 11. güne göre anlamlı şekilde daha yüksektir ($p \leq 0.05$) (Şekil 4.4).

4.1.5. IGF-1R Protein Miktarındaki Değişimler



Şekil 4.5. IGF-1R Western Blot Sonuçları. A) IGF-1R Western Blot bantları. **B)** IGF-1R protein seviyesindeki değişiklikler. **a.** Sham 1. Gün – FSİ 1. Gün, **b.** FSİ 3. Gün – FSİ iTPH 3. Gün, **c.** FSİ 11. Gün – FSİ İtph 11. Gün, **d.** FSİ 1. Gün – FSİ 11. Gün, **e.** FSİ 1. Gün- FSİ 3. Gün. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

FSİ 1. gün grubunda IGF-1R protein miktarı sham 1. güne göre anlamlı şekilde daha yüksektir ($p \leq 0.01$). FSİ 3. günde protein miktarı FSİ 1. güne kıyasla anlamlı şekilde düşmüştür ($p \leq 0.01$). FSİ 11. gün ile FSİ 3. gün arasında anlamlı bir fark yoktur. FSİ 11. gündeki protein miktarı FSİ 1. güne anlamlı şekilde daha düşüktür ($p \leq 0.01$). Sham 3. ve 11. günler ile FSİ 3. ve 11. günlerdeki protein miktarları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir (Şekil 4.5).

FSİ-iTPH gruplarındaki ekspresyon seviyeleri diğer gruplara kıyasla daha yüksek görülmektedir. FSİ-iTPH 3. gündeki protein seviyesi FSİ 3. güne kıyasla anlamlı şekilde daha yüksektir ($p \leq 0.01$). Benzer şekilde FSİ-iTPH 11. gündeki protein

seviyesi FSİ 11. güne kıyasla anlamlı şekilde daha yüksektir ($p \leq 0.001$) görülmemiştir (Şekil 4.5).

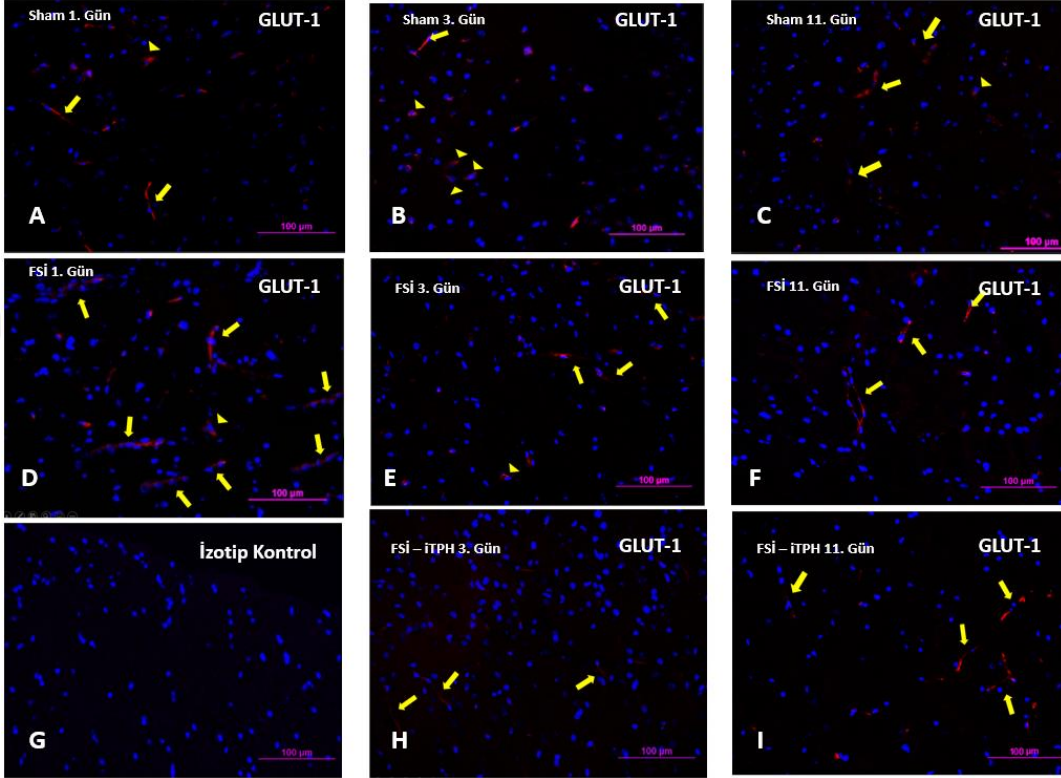
Tablo 4.1. Western Blot sonuçlarının özet gösterimi. FSİ ve sham grupları birbirleri arasında günlere göre kıyaslanmıştır. FSİ grubu kendi içerisinde kıyaslanmıştır. FSİ-iTPH ve FSİ grupları birbirleri arasında günlere göre kıyaslanmıştır. İstatistiksel anlamlılık değerleri ile birlikte artış ve azalışları oklar ile gösterilmiştir. FSİ-iTPH grubu kendi içerisinde kıyaslanmıştır ancak istatistiksel anlamlılık tespit edilmemiştir. **ad:** anlamlı değildir.

Protein Miktarlarının Karşılaştırılması	GLUT1	GLUT3	GLUT4	IR	IGF1R
FSİ 1. Gün (Sham 1. Güne kıyasla)	 $p \leq 0,001$	 $p \leq 0,05$	 $p \leq 0,01$	ad	 $p \leq 0,01$
FSİ 3. Gün (Sham 3. Güne kıyasla)	ad	ad	 $p \leq 0,01$	 $p \leq 0,001$	ad
FSİ 11. Gün (Sham 11. Güne kıyasla)	ad	 $p \leq 0,05$	ad	 $p \leq 0,001$	ad
FSİ 3. Gün (FSİ 1. Güne kıyasla)	 $p \leq 0,001$	ad	ad	 $p \leq 0,001$	 $p \leq 0,01$
FSİ 11. Gün (FSİ 1. Güne kıyasla)	 $p \leq 0,001$	 $p \leq 0,001$	ad	 $p \leq 0,001$	 $p \leq 0,01$
FSİ 11. Gün (FSİ 3. Güne kıyasla)	ad	 $p \leq 0,01$	 $p \leq 0,05$	 $p \leq 0,05$	ad
FSİ iTPH 3. Gün (FSİ 3. Güne kıyasla)	 $p \leq 0,05$	 $p \leq 0,01$	 $p \leq 0,01$	 $p \leq 0,001$	 $p \leq 0,01$
FSİ iTPH11. Gün (FSİ 11. Güne kıyasla)	ad	 $p \leq 0,05$	ad	 $p \leq 0,05$	 $p \leq 0,001$

4.2. İmmüno Floresan Boyanma Sonuçları

4.2.1. GLUT1 İmmüno Floresan Boyanmaları

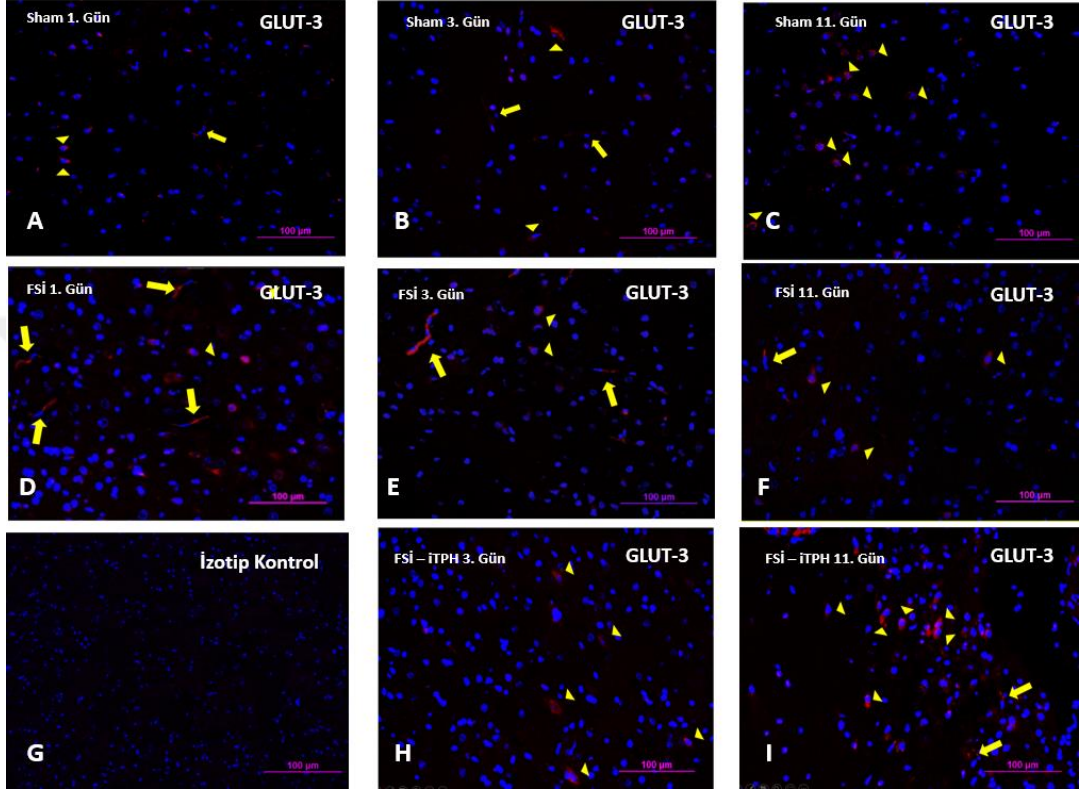
GLUT1 başlıca çok sayıda endotel hücrelerinde ve nöronal hücrelerde immunopozitif reaksiyon göstermiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Serebral kortekste GLUT1 immüno floresan boyanmaları. A) Sham 1. gün, **B)** Sham 3. gün, **C)** Sham 11. gün, **D)** FSİ-1. gün **E)** FSİ 3. gün, **F)** FSİ 11. gün, **G)** İzotip Kontrol, **H)** FSİ-iTPH 3. gün ve **I)** FSİ-iTPH 11. gün. Görüntüler 40x büyütmede fotoğraflanmıştır. Endotelial reaksiyonlar oklar ile, nöronal reaksiyonlar ise ok başları ile gösterilmiştir. **GLUT1**, **DAPI**.

4.2.2. GLUT3 İmmüno Floresan Boyanmaları

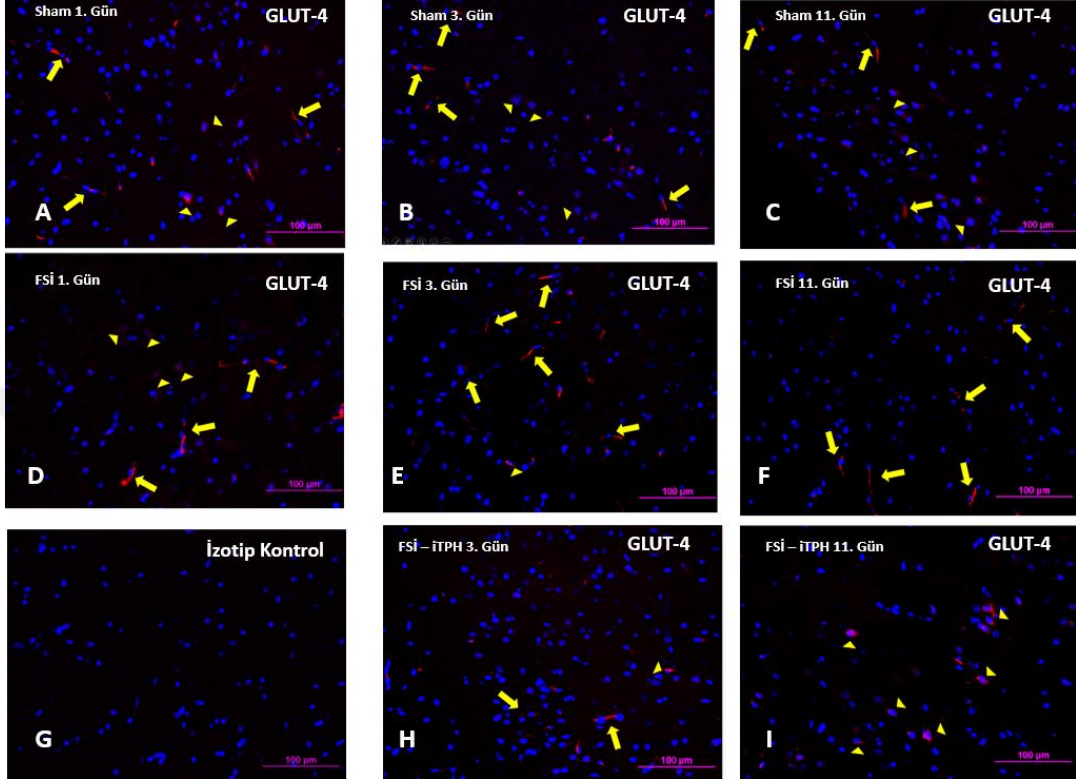
GLUT3 immün reaktivitesi GLUT1'e benzer şekilde endotel ve nöronal hücrelerde tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Serebral kortekste GLUT3 immüno floresan boyanmaları. A) Sham 1. gün, B) Sham 3. gün, C) Sham 11. gün, D) FSİ-1. gün, E) FSİ 3. gün, F) FSİ 11. gün, G) İzotip Kontrol, H) FSİ-iTPH 3. gün ve I) FSİ-iTPH 11. gün. Görüntüler 40x büyütmede fotoğraflanmıştır. Endotelial reaksiyonlar oklar ile, nöronal reaksiyonlar ise ok başları ile gösterilmiştir. **GLUT3**, **DAPI**.

4.2.3. GLUT4 İmmüno Floresan Boyanmaları

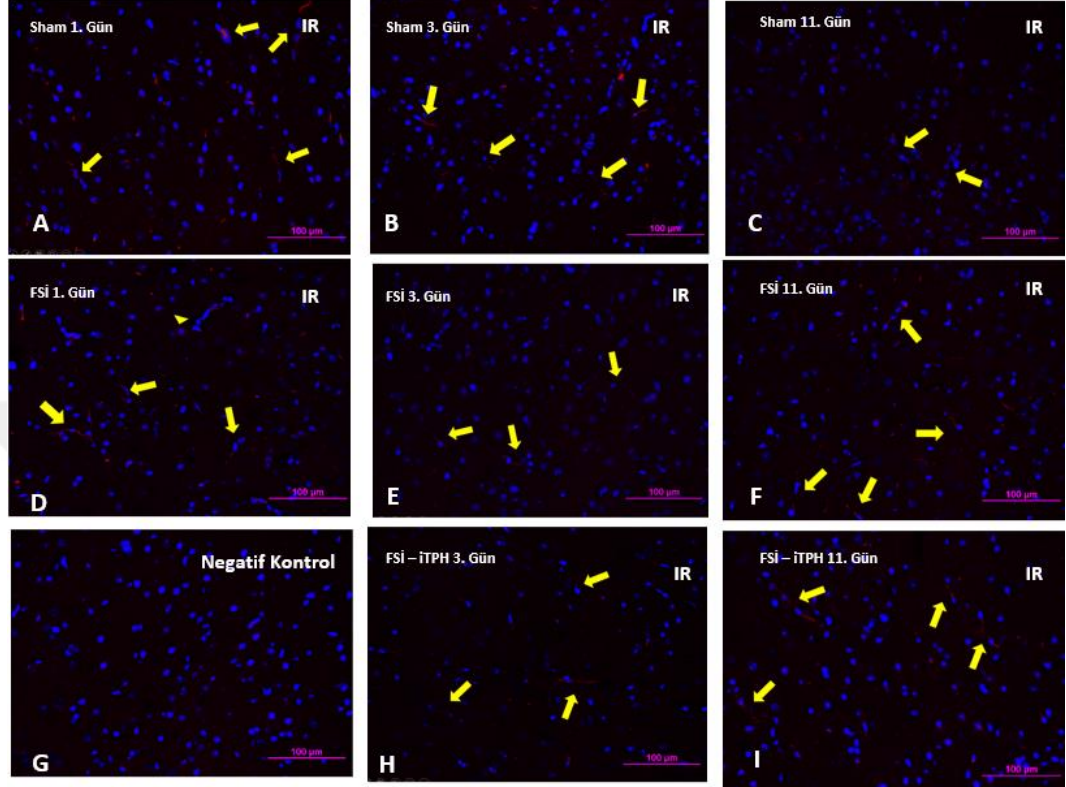
GLUT4 proteini nöronal ve endotel hücrelerinde immunopozitif reaksiyon göstermiştir. FSİ gruplarında endotelial reaksiyonlar çoğunluktadır (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Serebral kortekste GLUT4 immüno floresan boyanmaları. A) Sham 1. gün, **B)** Sham 3. gün, **C)** Sham 11. gün, **D)** FSİ-1. gün **E)** FSİ 3. gün, **F)** FSİ 11. gün, **G)** İzotip Kontrol, **H)** FSİ-iTPH 3. gün ve **I)** FSİ-iTPH 11. gün. Görüntüler 40x büyütmede fotoğraflanmıştır. Endotelial reaksiyonlar oklar ile, nöronal reaksiyonlar ise ok başları ile gösterilmiştir. **GLUT4**, **DAPI**.

4.2.4. IR İmmüno Floresan Boyanmaları

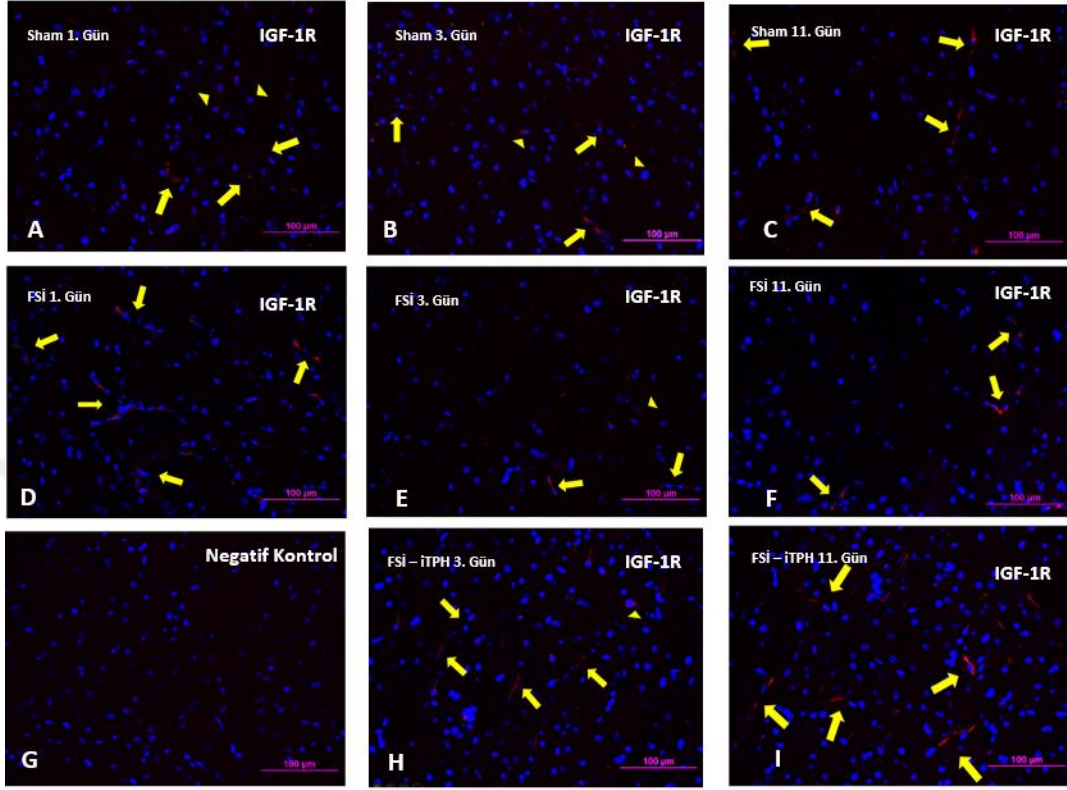
IR immüno floresan boyanmaları başlıca endotel hücrelerinde tespit edilmiştir (Şekil 4.9)



Şekil 4.9. Serebral kortekste IR immüno floresan boyanmaları. A) Sham 1. gün, B) Sham 3. gün, C) Sham 11. gün, D) FSI-1. gün E) FSI 3. gün, F) FSI 11. gün, G) Negatif Kontrol, H) FSI-iTPH 3. gün ve I) FSI-iTPH 11. gün. Görüntüler 40x büyütmede fotoğraflanmıştır. Endotelial reaksiyonlar oklar ile, nöronal reaksiyonlar ise ok başları ile gösterilmiştir. **IR**, **DAPI**.

4.2.5. IGF-1R İmmünofloresan Boyanmaları

IGF-1R immünoreaktivitesi endotel hücrelerinde yoğunluktadır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Serebral kortekste IGF-1R immünofloresan boyanmaları. A) Sham 1. gün, B) Sham 3. gün, C) Sham 11. gün, D) FSI-1. gün E) FSI 3. gün, F) FSI 11. gün, G) Negatif Kontrol, H) FSI-iTPH 3. gün ve I) FSI-iTPH 11. gün. Görüntüler 40x büyütmede fotoğraflanmıştır. Endotelial reaksiyonlar oklar ile, nöronal reaksiyonlar ise ok başları ile gösterilmiştir. **IGF-1R**, **DAPI**.

Tablo 4.2. İmmünofloresan görüntülerinin semikantitatif analizleri. Her sütun kendi içerisinde karşılaştırılmıştır. **(E):** Endotelial reaksiyonlar **(N):** Nöronal reaksiyonlar

	GLUT1		GLUT3		GLUT4		IR		IGF-1R	
	E	N	E	N	E	N	E	N	E	N
Sham 1. Gün	++	+/-	+	++	++	+	++	-	++	+
Sham 3. Gün	+	++	+	+	++	+	++	-	+	+
Sham 11. Gün	++	+/-	+/-	+++	++	+	+	-	++	+/-
FSİ 1. Gün	+++	+/-	+++	+	++	++	++	+/-	++	+/-
FSİ 3. Gün	++	+/-	++	+	+++	+/-	+	-	+	+
FSİ 11. Gün	++	+/-	+	++	++	+/-	++	-	+	+/-
FSİ-hTPC 3. Gün	+	+/-	+/-	++	+	+	+	-	++	+
FSİ-hTPC 11. Gün	++	+/-	+	+++	+/-	+++	++	-	+++	+/-

5. TARTIŞMA

İnme, dünya çapında önemli bir ölüm ve sakatlık nedenidir (Campbell ve ark., 2019). İskemik inme için yapılan müdahaleler sınırlıdır ve bunların çoğu esas olarak tıkalı damarın rekanalizasyonunu hedefler. Rekanalizasyon yoluyla serebral kan akışının düzenlenmesini hedefleyen bu tedavilerin etkili oldukları klinik sonuçlar ile kanıtlanmıştır (Prabhakaran ve ark., 2015; Goyal ve ark., 2016). Ancak sınırlı zaman penceresi nedeniyle tedavi tüm hastalar için uygun değildir (Prabhakaran ve ark., 2015). Rekombinant doku plazminojen aktivatörü ile tromboliz, ortalama olarak hastaların sadece %7-12'si için uygundur (Craig ve ark., 2020) ve bu oran, trombektomi için daha da azdır (Goyal ve Ospel, 2020). Gelişmiş ülkelerde durum bu şekilde devam etmektedir ve bu sayı daha az gelişmiş ülkelerde muhtemelen çok daha düşük olacaktır (Martins ve ark., 2020).

Kök hücre bazlı terapiler, felç (J. Zhang ve Chopp, 2013), travmatik beyin hasarı (Weston ve Sun, 2018), Parkinson hastalığı (Yasuhara ve ark., 2017) ve Alzheimer hastalığı gibi çoklu nörolojik bozuklukları tedavi etmek için umut verici yaklaşımlardır (Hunsberger ve ark., 2016). Deneysel kanıtlar, inmeli hayvan modellerinde kök hücre tedavilerinin güvenliğini ve etkinliğini göstermiştir (Borlongan, 2019). Eksojen kök hücre naklinin, inme (Gong ve ark., 2019; Liu ve ark., 2019; Yu ve ark., 2019) ve hipoksik-iskemik beyin hasarı (Wang ve ark., 2008; Zhou ve ark., 2017) olan hastaların sonuçlarını iyileştirebileceği bilinmektedir. Faz I klinik çalışmalardan elde edilen umut verici sonuçlara rağmen (Savitz ve ark., 2011; Banerjee ve ark., 2014), kök hücre bazlı büyük klinik çalışmalardan elde edilen fonksiyonel nörolojik sonuçlar, inme hastalarında kök hücre tedavisini desteklemek için yetersiz kalmıştır (Borlongan, 2019).

İnsan iPKH'leri, merkezi sinir sistemi bozuklukları ile ilgili terapötik çözümler için kullanılmıştır. Ancak bu hücre tipinin kullanımı, mutagenез veya onkogenез için potansiyel riskler, immünotoleranslı hücrelerin üretimi ve zayıf entegrasyon nedenleriyle sınırlıdır (Kooreman ve Wu, 2010; Ambasudhan ve ark., 2014).

Eksojen NKH'lerin, iskemik bölgelere göç ederek nöronlara veya astrositlere farklılaşabildikleri bilinmektedir (Cheng ve ark., 2015; Ryu ve ark., 2016; L. Huang ve Zhang, 2019). İnme sıçan modelinde insan NKH'lerinin uygulanmasının, dendritik

dallanmayı arttırdığı ve inflamasyonu inhibe ettiği de bildirilmiştir (Bacigaluppi ve ark., 2009; Andres ve ark., 2011). NKH'lerin gelecek vaat eden faydalarına rağmen, bazı sınırlamalar mevcuttur. Nakil için çok yüksek dozda hücre gereklidir. Bununla birlikte, çok yüksek yoğunlukta nakledilirlerse kümelenebilirler ve hayatta kalma oranları zayıflayabilir (Tang ve ark., 2017). Dahası, nörogenez için endojen NKH'leri düzenleyen moleküler mekanizmalar ve hastalarda endojen nörogenezi güçlendirmeye yönelik yöntemler hakkında anlayışımız sınırlı kalmaktadır (R. Zhang ve ark., 2016). NKH uygulama koşullarını optimize etmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

MKH'lerin iskemik sınır bölgelerine göç edip, nöronlara ve glial hücrelere farklanabildikleri bilinmektedir (Li ve ark., 2002; Zhao ve ark., 2002). Klinik öncesi çalışmalar, inmenin erken bir aşamasında MKH'lerin transplante edilmesinin, mikrogliya fenotiplerini düzenleyerek ve rejeneratif süreçleri uyararak nörolojik fonksiyonel sonuçları iyileştirdiğini göstermektedir (van Velthoven ve ark., 2012; Donega ve ark., 2014) Ne yazık ki, MKH'ler intravenöz uygulamadan sonra diğer organlarda, özellikle akciğerlerde birikmeye ve toplanmaya eğilimlidir ve bu da emboli veya kanamaya neden olabilir (Liao ve ark., 2017; Sugiyama ve ark., 2018).

Trofoblast hücrelerinin VEGF ve IGF çeşitli büyüme faktörleri ve anjiyogenik faktörler salgıladıkları bilinmektedir (Cooper ve ark., 1995; Han ve ark., 1996; Lee ve ark., 2012; Molbay ve ark., 2018; Molbay ve ark., 2020; Yanar ve ark., 2021). Trofoblast hücreleri pluripotent TPH'lerden köken alırlar. TPH'lerin retinoik asitle indüklendiklerinde dopaminerjik nöronlara farklılaştığı, bu hücrelerin nigrostriatal yol oluşturduğu ve hem akut hem de kronik Parkinson hastalık modeli oluşturulmuş sıçanlarda fonksiyonel motor nöron eksikliğini azalttığı gösterilmiştir (T. T. Lee ve ark., 2012). iTPH'ler, bilinen özellikleri sebebiyle serebral iskemide iyileştirici bir rol oynayabilir.

Nöron hücreleri fonksiyonlarını sürdürmek için glikoza ihtiyaç duyarlar. Bu sebeple glukoz beyinde temel enerji kaynağı olarak kabul edilmektedir. Glukoz, nöronlara kan-beyin bariyeri boyunca GLUT'lar tarafından taşınır (Simpson ve ark., 2007). Beyinde, özellikle GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 baskın olarak bulunmaktadır (Rayner, 1996; Vannucci ve ark., 1997; Vannucci ve ark., 1998). İnme sonrasında hücrelerin rejenerasyonları ve fonksiyonel aktiviteleri için glikoza ihtiyaçları vardır.

İnme sonrasında GLUT proteinlerinin ekspresyonlarında değişim olduğu bilinmektedir (Gerhart ve ark., 1994; Urabe ve ark., 1996; Fung ve ark., 2010; Huang ve ark., 2010; S. Zhang ve ark., 2014; W. H. Lee ve Bondy, 1993 W. H. Lee ve Bondy, 1993). Serebral iskemide kök hücre ile tedavi sonrasında beyinde GLUT proteinlerinin nasıl etkilendiği ile ilişkili herhangi bir bilgi mevcut değildir.

Beynin ihtiyaç duyduğu glikozun hücrelere alımı için insülin sinyalleri gereklidir (Stockhorst ve ark., 2004). İnsülin sinyal yolları insülin ve IR'nin etkileşimi ile aktifleştirilir (Hubbard, 1999; Li ve ark., 2005). Böylece insülin KBB'yi geçerek beyin hücrelerine ulaşır. IR ve IGF-1R yakından ilişkilidir ve yapıları yüksek oranda benzerlik gösterir (Garrett ve ark., 1998; Xu ve ark., 2018). IGF-1R, beynin normal gelişimi için gereklidir. Ayrıca bu süreçte beyin hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını teşvik eden önemli bir nörotrofik faktördür. IGF-1R, bu sebeple beyin hücrelerinin büyümesi ve farklılaşmasında kritik rol oynar (Adams ve ark., 2000; Chitnis ve ark., 2008). FSİ modelinde kök hücre tedavisine bağlı olarak glikoz metabolizması ile ilişkili proteinlerin etkileri bilinmemektedir.

iTPH'ler, etkilerine bağlı olarak, beyindeki glikoz metabolizmasını ve glikoz taşınımını regüle edebilir ve beyin fonksiyonlarının düzelmesini sağlayabilir.

Bu çalışmada Wistar sıçan beyinlerinde geçici MCAO ile FSİ-reperfüzyon modeli oluşturulmuştur. İskemili sıçanların kuyruk venlerinden iTPH enjekte edilmiştir. FSİ durumunda ve iTPH enjeksiyonu ardından glukoz transport mekanizmasının ve glukoz metabolizmasının nasıl değiştiğini belirlemek amacıyla dokular üzerinde Western Blot ve immünofloresan analizleri gerçekleştirilmiştir. GLUT1, GLUT3, GLUT4, IR ve IGF-1R protein miktarlarının değişimi Western Blot analizleri ile incelenmiştir ve ekspresyonları immünofloresan yöntemi ile gösterilmiştir.

Western Blot analizlerinin sonuçlarına göre, GLUT1 ve GLUT3 proteinlerinin miktarları FSİ 1. gün gruplarında sham 1. gün gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır (sırasıyla $p<0,001$; $p<0.05$) (Şekiller 4.1 ve 4.2) (Tablo 4.1). Bu bulgularımız literatür bulguları ile uyumluluk göstermektedir (Gerhart ve ark., 1994; C. Y. Huang ve ark., 2010). GLUT1 ve GLUT3 proteinlerinin immünofloresan görüntüleri de bu sonuçları doğrulamaktadır. FSİ 1. gün gruplarında özellikle endotelial hücrelerdeki reaksiyonların arttığı tespit edilmiştir (Şekiller 4.6 A, D ve 4.7 A, D) (Tablo 4.2).

Sonuçlarımıza göre, GLUT1 ve GLUT3 protein miktarları FSİ 3. günde sham gruplarına yaklaşmaktadır (Şekiller 4.6 B, E ve 4.7 B, E) (Tablo 4.2). GLUT1 ve GLUT3 protein miktarları incelendiğinde FSİ 3. gün grupları ile sham 3. gün grupları aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (Şekiller 4.1 ve 4.2). Benzer şekilde, Gerhart vd., 1994 yılında post iskemik gerbillar ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada, GLUT1 ve GLUT3 mRNA ekspresyonlarının FSİ 1. günde en yüksek seviyedeyken, FSİ 3. günde kontrol grupları seviyesine döndüklerini bildirmişlerdir (Gerhart ve ark., 1994).

Çalışmalarımızın sonuçları, GLUT1 protein miktarının FSİ 11. günde de sham grupları seviyesinde olduğunu göstermektedir (Şekil 4.1) (Şekil 4.6 C, F) (Tablo 4.2). GLUT3 miktarı ise FSİ 11. günde sham 11. güne göre istatistiksel olarak anlamlı azalış göstermiştir ($p<0.05$) (Şekil 4.2) (Tablo 4.1) (Şekil 4.7 C, F) (Tablo 4.2).

Literatürde FSİ’de GLUT4 proteininin nasıl değiştiğine dair bir çalışma yoktur. Bulgularımıza göre, GLUT 4 proteini de, GLUT 1 ve GLUT 3 proteinlerine benzer şekilde FSİ 1. günde sham 1. gün grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükselmiştir ($p<0.01$) (Şekil 4.3) (Tablo 4.1) (Şekil 4.8 A, D) (Tablo 4.2). GLUT4 protein miktarı FSİ 3. günde de yüksek seviyedeyken, FSİ 11. günde FSİ 3. güne göre anlamlı şekilde azalarak ($p<0.05$) sham grupları seviyesine dönmüştür (Şekil 4.3) (Tablo 4.1) (Şekil 4.8 E, F) (Tablo 4.2). GLUT4 Western Blot analizlerine göre, FSİ 11. gün ve sham 11. gün grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur (Şekil 4.3). GLUT4 immüno Floresan boyanmaları semikantitatif olarak incelendiğinde, sham 11. günde FSİ 11. güne kıyasla daha fazla nöronal reaksiyon görünmektedir (Tablo 4.2). Sham gruplarında nöronal ve endotelial ekspresyonlar mevcutken, FSİ gruplarında endotelial ekspresyonlar çoğunluktadır (Şekil 4.8 A-F) (Tablo 4.2).

FSİ ile birlikte GLUT proteinlerin miktarlarının artışı, iskemik beyinde bu proteinler aracılığıyla beyne daha fazla glukoz taşınımı sağlanmaya çalışıldığını ve glukoz eksikliğinin kompanse edilmeye çalışıldığını göstermektedir. İlerleyen günlerde normale dönen kan akışı ile birlikte GLUT miktarları sham grupları seviyesine dönmektedir.

GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 proteinleri, iTPH enjeksiyonu sonrası benzer şekilde değişmişlerdir. FSİ-iTPH 3. gündeki protein miktarları FSİ 3. gün gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır (sırasıyla $p<0.05$; $p<0.01$; $p<0.01$) (Şekiller 4.1; 4.2; 4.3) (Tablo 4.1) (Şekiller 4.6 E, H; 4.7 E, H; 4.8 E, H) (Tablo 4.2).

Western Blot analizlerine göre, GLUT1 ve GLUT4 protein miktarları FSİ-iTPH 11. günde FSİ 11. gün ile kıyaslandığında, gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktur (Şekiller 4.1 ve 4.3). GLUT3 proteini ise FSİ-iTPH 11. günde FSİ 11. güne kıyasla istatistiksel olarak artmıştır ($p<0.05$) (Şekil 4.2) (Tablo 4.1). İmmünofloresan boyanmaları incelendiğinde semikantitatif analizlere göre, GLUT1 protein ekspresyonu FSİ 11. günde FSİ-iTPH 11. gün grubuna göre farklı değildir (Şekil 4.6 F, I) (Tablo 4.2). Özellikle nöronlardaki GLUT3 ve GLUT4 proteinlerinin ekspresyonlarının FSİ-iTPH 11. günde FSİ 11. güne göre artış gösterdiği tespit edilmiştir (Şekiller 4.7 F, I ve 4.8 F, I) (Tablo 4.2). FSİ 11. günde GLUT4 protein ekspresyonu endotel hücrelerde çoğunlukta, FSİ-iTPH grubunda nöronal ekspresyonun daha fazla olduğu görülmektedir (Şekil 4.8 F ve I).

FSİ 1. günde gerçekleştirilen iTPH enjeksiyonu ile birlikte, Western Blot analizlerine göre GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 proteinlerinin miktarları FSİ-iTPH 3. gün gruplarında FSİ 3. gün gruplarına kıyasla azalmıştır. Bu durum, iTPH'lerin enjeksiyonu ile gerçekleştirilen terapötik müdahaleden dolayı homeostazinin geçici olarak bozulmasıyla, vücudun verdiği bir tepkinin sonucu olabilir.

GLUT1 ve GLUT4 protein miktarlarındaki değişimler incelendiğinde, iTPH enjeksiyonunun 11. günleri ile FSİ-11. günler arasında anlamlı bir fark görülmemektedir. Bu durum, iTPH enjeksiyonunun 11. gününde beyindeki GLUT1 ve GLUT4 transport mekanizmasının etkilenmediğini göstermektedir.

GLUT3 proteini ise FSİ-iTPH 11. günde FSİ 11. güne kıyasla istatistiksel olarak yüksek miktardadır ($p<0.05$). GLUT3 protein miktarının FSİ 11. günde, sham gruplarına kıyasla düşük seviyede olduğu göz önüne alındığında bu durum, iskemik doku için avantajlı olarak görülebilir. iTPH'ler glukoz transport mekanizmasını GLUT3 proteini üzerinden düzenliyor olabilir.

Literatürde FSİ durumunda IR proteininin regülasyonuna dair bir çalışma yoktur. Western Blot ve immünofloresan sonuçlarımız, FSİ 1. gün grubundaki IR protein

miktarının sham 1. güne kıyasla anlamlı farklılık içermediğini göstermektedir (Şekil 4.4) (Şekil 4.9 A, D) (Tablo 4.2). Ancak FSİ 3. günde protein miktarının FSİ 1. güne kıyasla anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir ($p \leq 0.001$) (Şekil 4.4) (Tablo 4.1) (Şekil 4.9 D, E) (Tablo 4.2). Bu azalma aynı zamanda sham 3. gün grubu ile kıyaslandığında da anlamlıdır ($p \leq 0.001$) (Şekil 4.4) (Tablo 4.1). Western Blot analizlerine göre, FSİ 11. günde IR protein miktarı FSİ 3. güne göre anlamlı şekilde artmasına rağmen ($p \leq 0.05$) (Şekil 4.4) (Tablo 4.1) (Şekil 4.9 E, F) (Tablo 4.2), sham 11. güne göre anlamlı şekilde daha düşüktür ($p \leq 0.001$) (Şekil 4.4). İmmünofloresan boyanmalarında ise sham 11. gün grubundaki IR ekspresyonu diğer sham gruplarına kıyasla da daha düşük görünmekle birlikte, FSİ 11. gün grubuna göre daha düşüktür (Şekil 4.9 C, F) (Tablo 4.2).

Sonuçlarımız FSİ-iTPH 3. gün grubundaki IR protein miktarının FSİ 3. güne kıyasla anlamlı olarak daha fazla olduğunu göstermektedir ($p \leq 0.001$). Aynı şekilde FSİ-iTPH 11. gündeki protein miktarı FSİ 11. güne göre anlamlı şekilde daha yüksektir ($p \leq 0.05$) (Şekil 4.4) (Tablo 4.1). İmmünofloresan boyanmalarında ise FSİ grupları ile FSİ-iTPH grupları arasında anlamlı bir fark görünmemektedir (Şekil 4.9 E, H ve F, I) (Tablo 4.2).

IR proteininin FSİ 3. günde iskemiden kaynaklı azalış göstermesi ve FSİ 11. günde artmasına rağmen sham gruplarına kıyasla daha az miktarda olması, glukoz metabolizmasının iskemiden kaynaklı bozulduğunu göstermektedir. iTPH enjeksiyonuyla birlikte FSİ gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artan IR protein miktarı, iTPH'lerin glukoz metabolizmasını düzenleyebileceğini göstermektedir.

IGF-1R Western Blot bulguları incelendiğinde, FSİ 1. gün grubunda protein miktarının sham 1. güne kıyasla anlamlı şekilde daha yüksek olduğu görülmektedir ($p \leq 0.01$) (Şekil 4.5) (Tablo 4.1). İmmünofloresan boyanmalarında bu iki grup arasında anlamlı bir fark görülmemektedir (Şekil 4.10 A, D) (Tablo 4.2). IGF-1R protein miktarının FSİ ile birlikte artışı, bu konu ile ilgili gerçekleştirilen diğer çalışmaları destekler niteliktedir (W. H. Lee ve ark., 1992; Bergstedt ve Wieloch, 1993).

Western Blot ve immünofloresan sonuçlarına göre, FSİ 3. günde IGF-1R protein miktarı FSİ 1. güne kıyasla anlamlı şekilde azalmıştır ($p \leq 0.01$). FSİ 11. gün grubu ile

FSİ 3. gün grubu arasında anlamlı bir fark yoktur (Şekil 4.5) (Şekil 4.10 D, E, F) (Tablo 4.2). Western Blot analizlerine göre, GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 proteinlerinde olduğu gibi, IGF-1R protein miktarının kan akışının normale dönmesiyle birlikte sham grupları düzeyine ulaştığı görülmektedir (Şekil 4.5) (Tablo 4.1). İmmünofloresan boyanmalarında ise FSİ 3. ve 11. gün gruplarındaki IGF-1R ekspresyon seviyeleri sham gruplarına kıyasla daha düşük görünmektedir (Şekil 4.10 B, E ve C, F) (Tablo 4.2).

GLUT proteinlerinden farklı olarak, Western Blot analizlerinde ve immünofloresan boyanmalarında FSİ-iTPH gruplarındaki IGF-1R protein miktarının diğer gruplara kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5) (Tablo 4.1) (Şekil 4.10) (Tablo 4.2). Western Blot analizlerinde FSİ-iTPH 3. gündeki IGF-1R protein seviyesi FSİ 3. güne kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksektir ($p \leq 0.01$). Benzer şekilde FSİ-iTPH 11. gündeki protein seviyesi FSİ 11. güne kıyasla anlamlı şekilde daha yüksektir ($p \leq 0.001$) (Şekil 4.5). Bu durum, iTPH'lerin FSİ'den kaynaklı olarak değişen IGF-1R mekanizmasını düzenleyebileceğini göstermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada Wistar sıçanlarda FSİ-reperfüzyon modeli oluşturulup iskemili sıçanlara iTPH enjekte edilmiştir. Böylelikle beyindeki glukoz transport mekanizmasının ve glukoz metabolizmasının FSİ durumunda nasıl etkilendiği ve iTPH'lerin iskemik sıçan beyinlerindeki glukoz transportunu ve metabolizmasını ne şekilde etkilediği incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir:

6.1. FSİ'nin Beyindeki Glukoz Transport Mekanizması Üzerindeki Etkileri

1. GLUT1 ve GLUT3 protein miktarları FSİ 1. günde sham gruplarına kıyasla artış göstermiştir.
2. GLUT1 ve GLUT3 protein miktarları, FSİ 3. günde FSİ 1. güne kıyasla azalarak, sham grupları seviyesine yaklaşmıştır.
3. GLUT1 protein miktarı FSİ 11. günde FSİ 3. güne göre değişmemiştir, sham grupları ile aralarında anlamlı bir fark yoktur.
4. GLUT3 protein miktarı FSİ 11. günde sham gruplarına kıyasla azalış göstermiştir.
5. FSİ'nin GLUT4 protein miktarı üzerindeki etkisi ilk kez bu çalışmada incelenmiştir.
6. GLUT 4 protein miktarı FSİ 1. günde sham gruplarına kıyasla artış göstermiştir.
7. GLUT4 protein miktarı FSİ 3. günde de sham gruplarına göre yüksek olup, FSİ 11. günde FSİ 3. güne kıyasla azalış göstermiştir.
8. FSİ 11. gündeki GLUT4 protein miktarı ile sham grupları arasında anlamlı bir fark yoktur.

Gruplar arasında belirtilen farklar istatistiksel olarak anlamlıdır. FSİ ile birlikte GLUT protein miktarlarında sham gruplarına kıyasla artış tespit edilmiştir. Bu durum, iskemi durumunda GLUT'lar aracılığıyla beyne daha fazla glukoz taşınımı sağlanmaya çalışıldığını göstermektedir. FSİ 3. ve 11. günlerde GLUT proteinlerinin sham grupları seviyesine yaklaşmaları, serebral kan akışının normale dönmesi sebebiyle olabilir.

6.2. İskemi Durumunda Beyindeki Glukoz Transport Mekanizmasına iTPH'lerin Etkileri

1. iTPH'lerin FSİ-reperfüzyon modelinde terapötik kullanımlarının glukoz transport mekanizmasına etkileri bu çalışmada ilk kez incelenmiştir.
2. iTPH'ler GLUT1, GLUT3 ve GLUT4 proteinlerini benzer şekilde etkilemiştir.
3. GLUT1, GLUT3, ve GLUT4 proteinlerinin FSİ-iTPH 3. gündeki miktarları FSİ 3. gün gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır.
4. GLUT1 ve GLUT4 protein seviyeleri FSİ-iTPH 11. günde FSİ 11. gün ile kıyaslandığında, gruplar arasında istatistiksel olarak fark yoktur. Bu durum, iTPH enjeksiyonunun 11. gününde beyindeki GLUT1 ve GLUT4 transport mekanizmasının etkilenmediğini göstermektedir.
5. GLUT3 proteini FSİ-iTPH 11. günde FSİ 11. güne kıyasla anlamlı şekilde yüksek miktardadır.
6. GLUT3 protein miktarının FSİ 11. günde, sham gruplarına kıyasla düşük seviyede olduğu göz önüne alındığında, iTPH'lerin etkisi ile artan GLUT3 protein miktarı, iTPH'lerin glukoz transport mekanizmasını GLUT3 proteini üzerinden düzenliyor olabileceğini göstermektedir.

6.3. FSİ'nin Beyindeki Glukoz Metabolizması Üzerindeki Etkileri

1. IR protein miktarının FSİ durumunda ne şekilde değiştiği ilk kez bu çalışmada incelenmiştir.
2. FSİ 1. günde IR protein miktarı sham gruplarına göre değişmemiştir. Ancak FSİ 3. günde, FSİ 1. gün ve sham 3. gün gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır.
3. FSİ 11. günde IR protein miktarı FSİ 3. güne göre anlamlı şekilde artmasına rağmen, sham 11. güne göre anlamlı şekilde daha düşüktür. Bu durum glikoz metabolizmasının iskemiden kaynaklı bozulduğunu göstermektedir.
4. IGF-1R protein miktarı FSİ 1. gün grubunda sham 1. güne kıyasla anlamlı şekilde daha yüksektir.

5. FSİ 3. günde IGF-1R protein miktarı FSİ 1. güne kıyasla anlamlı şekilde düşmüştür ve FSİ 11. günde FSİ 3. güne kıyasla değişmemiştir.

6. IGF-1R protein miktarının kan akışının düzelmesiyle birlikte sham grupları düzeyine ulaştığı görülmektedir.

6.4. İskemi Durumunda Beyindeki Glukoz Metabolizmasına iTPH'lerin Etkileri

1. iTPH'lerin FSİ-reperfüzyon modelinde terapötik kullanımlarının glukoz metabolizmasına etkileri bu çalışmada ilk kez incelenmiştir.

2. FSİ-iTPH gruplarındaki IR protein miktarı FSİ gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksektir.

3. FSİ-iTPH gruplarındaki IGF-1R protein miktarı diğer gruplara kıyasla daha yüksek seviyededir.

4. iTPH enjeksiyonu ile birlikte FSİ gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artan IR ve IGF-1R protein miktarları, iTPH'lerin glukoz metabolizmasını düzenleyebileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

Adams, T. E., Epa, V. C., Garrett, T. P., & Ward, C. W. Structure and function of the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Cell Mol Life Sci.* 2000; 57 (7): 1050-1093.

Agnetti, G., Maraldi, T., Fiorentini, D., Giordano, E., Prata, C., Hakim, G., Caldarera, C. M. Activation of glucose transport during simulated ischemia in h9c2 cardiac myoblasts is mediated by protein kinase c isoforms. *Life Sci.* 2005; 78 (3): 264-270.

Aizenman, Y., & de Vellis, J. Brain neurons develop in a serum and glial free environment: Effects of transferrin, insulin, insulin-like growth factor-i and thyroid hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Res.* 1987; 406 (1-2): 32-42.

Ambasudhan, R., Dolatabadi, N., Nutter, A., Masliah, E., McKercher, S. R., & Lipton, S. A. Potential for cell therapy in parkinson's disease using genetically programmed human embryonic stem cell-derived neural progenitor cells. *J Comp Neurol.* 2014; 522 (12): 2845-2856.

Andres, R. H., Horie, N., Slikker, W., Keren-Gill, H., Zhan, K., Sun, G., . . . Steinberg, G. K. Human neural stem cells enhance structural plasticity and axonal transport in the ischaemic brain. *Brain.* 2011; 134 (Pt 6): 1777-1789.

Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., & Lindvall, O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.* 2002; 8 (9): 963-970.

Bacigaluppi, M., Pluchino, S., Peruzzotti-Jametti, L., Kilic, E., Kilic, U., Salani, G., Hermann, D. M. Delayed post-ischaemic neuroprotection following systemic neural stem cell transplantation involves multiple mechanisms. *Brain.* 2009; 132 (Pt 8): 2239-2251.

Ballotti, R., Nielsen, F. C., Pringle, N., Kowalski, A., Richardson, W. D., Van Obberghen, E., & Gammeltoft, S. Insulin-like growth factor i in cultured rat astrocytes: Expression of the gene, and receptor tyrosine kinase. *EMBO J.* 1987; 6 (12): 3633-3639.

Banerjee, S., Bentley, P., Hamady, M., Marley, S., Davis, J., Shlebak, A., Chataway, J. Intra-arterial immunoselected cd34+ stem cells for acute ischemic stroke. *Stem Cells Transl Med.* 2014; 3 (11): 1322-1330.

Benarroch, E. E. Brain glucose transporters: Implications for neurologic disease. *Neurology.* 2014; 82 (15): 1374-1379.

Bergstedt, K., & Wieloch, T. Changes in insulin-like growth factor 1 receptor density after transient cerebral ischemia in the rat. Lack of protection against ischemic brain damage following injection of insulin-like growth factor 1. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993; 13 (5): 895-898.

Bondareva, V. M., & Chistyakova, O. V. Insulin and insulin-receptor signaling in the brain. *Neurochemical Journal.* 2007; 1 (3): 176-187.

Borlongan, C. V. Concise review: Stem cell therapy for stroke patients: Are we there yet? *Stem Cells Transl Med.* 2019; 8 (9): 983-988.

Burant, C. F., & Davidson, N. O. Glut3 glucose transporter isoform in rat testis: Localization, effect of diabetes mellitus, and comparison to human testis. *Am J Physiol.* 1994; 267 (6 Pt 2): R1488-1495.

Campbell, B. C. V., De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., & Donnan, G. A. Ischaemic stroke. *Nat Rev Dis Primers.* 2019; 5 (1): 70.

Caroni, P., & Grandes, P. Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by exposure to elevated levels of insulin-like growth factors. *J Cell Biol.* 1990; 110 (4): 1307-1317.

Chang, C. W., & Parast, M. M. Human trophoblast stem cells: Real or not real? *Placenta.* 2017; 60 Suppl 1: S57-S60.

Charron, M. J., Brosius, F. C., 3rd, Alper, S. L., & Lodish, H. F. A glucose transport protein expressed predominately in insulin-responsive tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86 (8): 2535-2539.

Cheng, Y., Zhang, J., Deng, L., Johnson, N. R., Yu, X., Zhang, N., . . . Xiao, J. Intravenously delivered neural stem cells migrate into ischemic brain, differentiate

and improve functional recovery after transient ischemic stroke in adult rats. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8 (3): 2928-2936.

Chitnis, M. M., Yuen, J. S., Protheroe, A. S., Pollak, M., & Macaulay, V. M. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res.* 2008; 14 (20): 6364-6370.

Chu, S. Y., Merkler, A. E., Cheng, N. T., & Kamel, H. Readmission for infective endocarditis after ischemic stroke or transient ischemic attack. *Neurohospitalist.* 2015; 5 (2): 55-58.

Cooper, J. C., Sharkey, A. M., McLaren, J., Charnock-Jones, D. S., & Smith, S. K. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry. *J Reprod Fertil.* 1995; 105 (2): 205-213.

Coyne, T. M., Marcus, A. J., Woodbury, D., & Black, I. B. Marrow stromal cells transplanted to the adult brain are rejected by an inflammatory response and transfer donor labels to host neurons and glia. *Stem Cells.* 2006; 24 (11): 2483-2492.

Craig, L. E., Middleton, S., Hamilton, H., Cudlip, F., Swatzell, V., Alexandrov, A. V., Alexandrov, A. W. Does the addition of non-approved inclusion and exclusion criteria for rtpa impact treatment rates? Findings in australia, the uk, and the USA. *Interv Neurol.* 2020; 8 (1): 1-12.

Czech, M. P. Signal transmission by the insulin-like growth factors. *Cell.* 1989; 59 (2): 235-238.

Dempsey, R. J., Sailor, K. A., Bowen, K. K., Tureyen, K., & Vemuganti, R. Stroke-induced progenitor cell proliferation in adult spontaneously hypertensive rat brain: Effect of exogenous igf-1 and gdnf. *J Neurochem.* 2003; 87 (3): 586-597.

Donega, V., Nijboer, C. H., van Tilborg, G., Dijkhuizen, R. M., Kavelaars, A., & Heijnen, C. J. Intranasally administered mesenchymal stem cells promote a regenerative niche for repair of neonatal ischemic brain injury. *Exp Neurol.* 2014; 261: 53-64.

Drapeau, E., & Nora Abrous, D. Stem cell review series: Role of neurogenesis in age-related memory disorders. *Aging Cell*. 2008; 7 (4): 569-589.

Eaves, C. J., Cashman, J. D., Sutherland, H. J., Otsuka, T., Humphries, R. K., Hogge, D. E., Eaves, A. C. Molecular analysis of primitive hematopoietic cell proliferation control mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 1991; 628: 298-306.

Farbu, E., Kurz, K. D., & Kurz, M. W. Ischemic stroke--novel therapeutic strategies. *Acta Neurol Scand Suppl*. 2011; (191): 28-37.

Fung, C., Evans, E., Shin, D., Shin, B. C., Zhao, Y., Sankar, R., . . . Devaskar, S. U. Hypoxic-ischemic brain injury exacerbates neuronal apoptosis and precipitates spontaneous seizures in glucose transporter isoform 3 heterozygous null mice. *J Neurosci Res*. 2010; 88 (15): 3386-3398.

Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Frenkel, M. J., Bentley, J. D., Lovrecz, G. O., . . . Ward, C. W. Crystal structure of the first three domains of the type-1 insulin-like growth factor receptor. *Nature*. 1998; 394 (6691): 395-399.

Genbacev, O., Donne, M., Kapidzic, M., Gormley, M., Lamb, J., Gilmore, J., . . . Fisher, S. J. Establishment of human trophoblast progenitor cell lines from the chorion. *Stem Cells*. 2011; 29 (9): 1427-1436.

Gerhart, D. Z., Leino, R. L., Taylor, W. E., Borson, N. D., & Drewes, L. R. Glut1 and glut3 gene expression in gerbil brain following brief ischemia: An in situ hybridization study. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994; 25 (3-4): 313-322.

Gerozissis, K. Brain insulin: Regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol Neurobiol*. 2003; 23 (1): 1-25.

Gong, B., Dong, Y., He, C., Jiang, W., Shan, Y., Zhou, B. Y., & Li, W. Intravenous transplants of human adipose-derived stem cell protect the rat brain from ischemia-induced damage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2019; 28 (3): 595-603.

Gould, E. How widespread is adult neurogenesis in mammals? *Nat Rev Neurosci*. 2007; 8 (6): 481-488.

Gould, G. W., Brant, A. M., Kahn, B. B., Shepherd, P. R., McCoid, S. C., & Gibbs, E. M. Expression of the brain-type glucose transporter is restricted to brain and neuronal cells in mice. *Diabetologia*. 1992; 35 (4): 304-309.

Goyal, M., & Ospel, J. Challenges to stroke care 5 years after endovascular therapy became the standard. *Lancet Neurol*. 2020; 19 (3): 210-211.

Goyal, M., Menon, B. K., van Zwam, W. H., Dippel, D. W., Mitchell, P. J., Demchuk, A. M., collaborators, H. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet*. 2016; 387 (10029): 1723-1731.

Grillo, C. A., Piroli, G. G., Hendry, R. M., & Reagan, L. P. Insulin-stimulated translocation of glut4 to the plasma membrane in rat hippocampus is pi3-kinase dependent. *Brain Res*. 2009; 1296: 35-45.

Han, V. K., Bassett, N., Walton, J., & Challis, J. R. The expression of insulin-like growth factor (igf) and igf-binding protein (igfbp) genes in the human placenta and membranes: Evidence for igf-igfbp interactions at the feto-maternal interface. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996; 81 (7): 2680-2693.

Harik, S. I., Kalaria, R. N., Andersson, L., Lundahl, P., & Perry, G. Immunocytochemical localization of the erythroid glucose transporter: Abundance in tissues with barrier functions. *J Neurosci*. 1990; 10 (12): 3862-3872.

Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J., & Brownstein, M. Identification of insulin in rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978; 75 (11): 5737-5741.

Hayano, J., Sakakibara, Y., Yamada, M., Kamiya, T., Fujinami, T., Yokoyama, K., Takata, K. Diurnal variations in vagal and sympathetic cardiac control. *Am J Physiol*. 1990; 258 (3 Pt 2): H642-646.

Heni, M., Hennige, A. M., Peter, A., Siegel-Axel, D., Ordelheide, A. M., Krebs, N., Staiger, H. Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PLoS One*. 2011; 6 (6): e21594.

Hiby, S. E., Apps, R., Sharkey, A. M., Farrell, L. E., Gardner, L., Mulder, A., . . . Moffett, A. Maternal activating kirs protect against human reproductive failure mediated by fetal hla-c2. *J Clin Invest.* 2010; 120 (11): 4102-4110.

Huang, C. Y., Liou, Y. F., Chung, S. Y., Pai, P. Y., Kan, C. B., Kuo, C. H., Lin, J. Y. Increased expression of glucose transporter 3 in gerbil brains following magnesium sulfate treatment and focal cerebral ischemic injury. *Cell Biochem Funct.* 2010; 28 (4): 313-320.

Huang, L., & Zhang, L. Neural stem cell therapies and hypoxic-ischemic brain injury. *Prog Neurobiol.* 2019; 173: 1-17.

Hubbard, S. R. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Prog Biophys Mol Biol.* 1999; 71 (3-4): 343-358.

Hunsberger, J. G., Rao, M., Kurtzberg, J., Bulte, J. W. M., Atala, A., LaFerla, F. M., .Doraiswamy, P. M. Accelerating stem cell trials for alzheimer's disease. *Lancet Neurol.* 2016; 15 (2): 219-230.

James, D. E., Strube, M., & Mueckler, M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature.* 1989; 338 (6210): 83-87.

Jia, J. M., Chowdary, P. D., Gao, X., Ci, B., Li, W., Mulgaonkar, A., . . . Ge, W. P. Control of cerebral ischemia with magnetic nanoparticles. *Nat Methods.* 2017; 14 (2): 160-166.

Kawai, H., Yamashita, T., Ohta, Y., Deguchi, K., Nagotani, S., Zhang, X., . . . Abe, K. Tridermal tumorigenesis of induced pluripotent stem cells transplanted in ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010; 30 (8): 1487-1493.

Knusel, B., & Hefti, F. Trophic actions of igf-i, igf-ii and insulin on cholinergic and dopaminergic brain neurons. *Adv Exp Med Biol.* 1991; 293: 351-360.

Koepsell, H. Glucose transporters in brain in health and disease. *Pflugers Arch.* 2020; 472 (9): 1299-1343.

Kooreman, N. G., & Wu, J. C. Tumorigenicity of pluripotent stem cells: Biological insights from molecular imaging. *J R Soc Interface.* 2010; 7 Suppl 6: S753-763.

Lee, R. H. C., Lee, M. H. H., Wu, C. Y. C., Couto, E. S. A., Possoit, H. E., Hsieh, T. H., . . . Lin, H. W. Cerebral ischemia and neuroregeneration. *Neural Regen Res.* 2018; 13 (3): 373-385.

Lee, T. T., Tsai, C. F., Hsieh, T. H., Chen, J. J., Wang, Y. C., Kao, M. C., . . . Lee, J. N. Ectopic pregnancy-derived human trophoblastic stem cells regenerate dopaminergic nigrostriatal pathway to treat parkinsonian rats. *PLoS One.* 2012; 7 (12): e52491.

Lee, W. H., & Bondy, C. Insulin-like growth factors and cerebral ischemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 679: 418-422.

Lee, W. H., Clemens, J. A., & Bondy, C. A. Insulin-like growth factors in the response to cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci.* 1992; 3 (1): 36-43.

Leloup, C., Arluison, M., Lepetit, N., Cartier, N., Marfaing-Jallat, P., Ferre, P., & Penicaud, L. Glucose transporter 2 (glut 2): Expression in specific brain nuclei. *Brain Res.* 1994; 638 (1-2): 221-226.

Li, M., Zhao, J., Hu, Y., Lu, H., & Guo, J. Oxygen free radicals regulate energy metabolism via ampk pathway following cerebral ischemia. *Neurol Res.* 2010; 32 (7): 779-784.

Li, Y., Chen, J., Chen, X. G., Wang, L., Gautam, S. C., Xu, Y. X., . . . Chopp, M. Human marrow stromal cell therapy for stroke in rat: Neurotrophins and functional recovery. *Neurology.* 2002; 59 (4): 514-523.

Li, Z. G., Zhang, W., & Sima, A. A. The role of impaired insulin/igf action in primary diabetic encephalopathy. *Brain Res.* 2005; 1037 (1-2): 12-24.

Liao, L., Shi, B., Chang, H., Su, X., Zhang, L., Bi, C., . . . Jin, Y. Heparin improves bmsc cell therapy: Anticoagulant treatment by heparin improves the safety and therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cell cytotherapy. *Theranostics.* 2017; 7 (1): 106-116.

Liu, K., Guo, L., Zhou, Z., Pan, M., & Yan, C. Mesenchymal stem cells transfer mitochondria into cerebral microvasculature and promote recovery from ischemic stroke. *Microvasc Res.* 2019; 123: 74-80.

Maltepe, E., Bakardjiev, A. I., & Fisher, S. J. The placenta: Transcriptional, epigenetic, and physiological integration during development. *J Clin Invest.* 2010; 120 (4): 1016-1025.

Mantych, G. J., James, D. E., & Devaskar, S. U. Jejunal/kidney glucose transporter isoform (glut-5) is expressed in the human blood-brain barrier. *Endocrinology.* 1993; 132 (1): 35-40.

Martins, S. O., Mont'Alverne, F., Rebello, L. C., Abud, D. G., Silva, G. S., Lima, F. O., . . . Investigators, R. Thrombectomy for stroke in the public health care system of brazil. *N Engl J Med.* 2020; 382 (24): 2316-2326.

McCall, A. L., van Bueren, A. M., Huang, L., Stenbit, A., Celnik, E., & Charron, M. J. Forebrain endothelium expresses glut4, the insulin-responsive glucose transporter. *Brain Res.* 1997; 744 (2):

McMorris, F. A., Mozell, R. L., Carson, M. J., Shinar, Y., Meyer, R. D., & Marchetti, N. Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Ann N Y Acad Sci.* 1993; 692: 321-334.

Mielke, J. G., & Wang, Y. T. Insulin exerts neuroprotection by counteracting the decrease in cell-surface gaba receptors following oxygen-glucose deprivation in cultured cortical neurons. *J Neurochem.* 2005; 92 (1): 103-113.

Molbay, M., Kipmen-Korgun, D., Korkmaz, G., Ozekinci, M., & Turkay Korgun, E. Human trophoblast progenitor cells express and release angiogenic factors. *Int J Mol Cell Med.* 2018; 7 (4): 203-211.

Molbay, M., Ozaydin-Goksu, E., Kipmen-Korgun, D., Unal, A., Ozekinci, M., Cebeci, E., . . . Korgun, E. T. Human placental trophoblast progenitor cells (htpcs) promote angiogenesis and neurogenesis after focal cerebral ischemia in rats. *Int J Neurosci.* 2020: 1-11.

Morgenthaler, F. D., Koski, D. M., Kraftsik, R., Henry, P. G., & Gruetter, R. Biochemical quantification of total brain glycogen concentration in rats under different glycemic states. *Neurochem Int.* 2006; 48 (6-7): 616-622.

Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., & Schwartz, M. W. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 2006; 443 (7109): 289-295.

Neirijnck, Y., Papaioannou, M. D., & Nef, S. The insulin/igf system in mammalian sexual development and reproduction. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (18).

O'Neill, H. M. Ampk and exercise: Glucose uptake and insulin sensitivity. *Diabetes Metab J*. 2013; 37 (1): 1-21

Pahlman, S., Meyerson, G., Lindgren, E., Schalling, M., & Johansson, I. Insulin-like growth factor i shifts from promoting cell division to potentiating maturation during neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88 (22): 9994-9998.

Payne, J., Maher, F., Simpson, I., Mattice, L., & Davies, P. Glucose transporter glut 5 expression in microglial cells. *Glia*. 1997; 21 (3): 327-331.

Prabhakaran, S., Ruff, I., & Bernstein, R. A. Acute stroke intervention: A systematic review. *JAMA*. 2015; 313 (14): 1451-1462.

Rayner, D. V. Glucose transporters in the brain. *Proc Nutr Soc*. 1996; 55 (1B): 209-219.

Russell, R. R., 3rd, Li, J., Coven, D. L., Pypaert, M., Zechner, C., Palmeri, M., . . . Young, L. H. Amp-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest*. 2004; 114 (4): 495-503.

Russo, V. C., Gluckman, P. D., Feldman, E. L., & Werther, G. A. The insulin-like growth factor system and its pleiotropic functions in brain. *Endocr Rev*. 2005; 26 (7): 916-943.

Ryu, S., Lee, S. H., Kim, S. U., & Yoon, B. W. Human neural stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and enhance angiogenesis in ischemic rat brain. *Neural Regen Res*. 2016; 11 (2): 298-304.

Sarkar, S., Chakraborty, D., Bhowmik, A., & Ghosh, M. K. Cerebral ischemic stroke: Cellular fate and therapeutic opportunities. *Frontiers in Bioscience-Landmark*. 2019; 24 (3): 435-450.

Sasaki, M., Honmou, O., & Kocsis, J. D. A rat middle cerebral artery occlusion model and intravenous cellular delivery. *Methods Mol Biol.* 2009; 549: 187-195.

Savitz, S. I., Misra, V., Kasam, M., Juneja, H., Cox, C. S., Jr., Alderman, S., . . . Grotta, J. C. Intravenous autologous bone marrow mononuclear cells for ischemic stroke. *Ann Neurol.* 2011; 70 (1): 59-69.

Schulinkamp, R. J., Pagano, T. C., Hung, D., & Raffa, R. B. Insulin receptors and insulin action in the brain: Review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000; 24 (8): 855-872.

Schwartz, M. W., Figlewicz, D. P., Baskin, D. G., Woods, S. C., & Porte, D., Jr. Insulin in the brain: A hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev.* 1992; 13 (3): 387-414.

Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J., & Baskin, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature.* 2000; 404 (6778): 661-671.

Seminatore, C., Polentes, J., Ellman, D., Kozubenko, N., Itier, V., Tine, S., . . . Onteniente, B. The postischemic environment differentially impacts teratoma or tumor formation after transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors. *Stroke.* 2010; 41 (1): 153-159.

Shaw, L. M. The insulin receptor substrate (irs) proteins: At the intersection of metabolism and cancer. *Cell Cycle.* 2011; 10 (11): 1750-1756.

Simpson, I. A., Carruthers, A., & Vannucci, S. J. Supply and demand in cerebral energy metabolism: The role of nutrient transporters. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; 27 (11): 1766-1791.

Stockhorst, U., de Fries, D., Steingrueber, H. J., & Scherbaum, W. A. Insulin and the cns: Effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiol Behav.* 2004; 83 (1): 47-54.

Sugiyama, Y., Sato, Y., Kitase, Y., Suzuki, T., Kondo, T., Mikrogeorgiou, A., . . . Hayakawa, M. Intravenous administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cell, but not adipose tissue-derived stem cell, ameliorated the neonatal hypoxic-

ischemic brain injury by changing cerebral inflammatory state in rat. *Front Neurol.* 2018; 9: 757.

Tanaka, S., Kunath, T., Hadjantonakis, A. K., Nagy, A., & Rossant, J. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by fgf4. *Science.* 1998; 282 (5396): 2072-2075.

Tang, Y., Yu, P., & Cheng, L. Current progress in the derivation and therapeutic application of neural stem cells. *Cell Death Dis.* 2017; 8 (10): e3108.

Thorens, B., & Mueckler, M. Glucose transporters in the 21st century. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 298 (2): E141-145.

Toda, H., Takahashi, J., Iwakami, N., Kimura, T., Hoki, S., Mozumi-Kitamura, K., . . . Hashimoto, N. Grafting neural stem cells improved the impaired spatial recognition in ischemic rats. *Neurosci Lett.* 2001; 316 (1): 9-12.

Togel, F., Hu, Z., Weiss, K., Isaac, J., Lange, C., & Westenfelder, C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005; 289 (1): F31-42.

Tse, W. T., Pendleton, J. D., Beyer, W. M., Egalka, M. C., & Guinan, E. C. Suppression of allogeneic t-cell proliferation by human marrow stromal cells: Implications in transplantation. *Transplantation.* 2003; 75 (3): 389-397.

Unger, J., McNeill, T. H., Moxley, R. T., 3rd, White, M., Moss, A., & Livingston, J. N. Distribution of insulin receptor-like immunoreactivity in the rat forebrain. *Neuroscience.* 1989; 31 (1): 143-157.

Urabe, T., Hattori, N., Nagamatsu, S., Sawa, H., & Mizuno, Y. Expression of glucose transporters in rat brain following transient focal ischemic injury. *J Neurochem.* 1996; 67 (1): 265-271.

van Velthoven, C. T., Kavelaars, A., & Heijnen, C. J. Mesenchymal stem cells as a treatment for neonatal ischemic brain damage. *Pediatr Res.* 2012; 71 (4 Pt 2): 474-481.

- Vannucci, S. J., Clark, R. R., Koehler-Stec, E., Li, K., Smith, C. B., Davies, P., . . . Simpson, I. A. Glucose transporter expression in brain: Relationship to cerebral glucose utilization. *Dev Neurosci*. 1998; 20 (4-5): 369-379.
- Vannucci, S. J., Maher, F., & Simpson, I. A. Glucose transporter proteins in brain: Delivery of glucose to neurons and glia. *Glia*. 1997; 21 (1): 2-21.
- Vetiska, S. M., Ahmadian, G., Ju, W., Liu, L., Wymann, M. P., & Wang, Y. T. Gabaa receptor-associated phosphoinositide 3-kinase is required for insulin-induced recruitment of postsynaptic gabaa receptors. *Neuropharmacology*. 2007; 52 (1): 146-155.
- Villars, F., Bordenave, L., Bareille, R., & Amedee, J. Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: Role of vegf? *J Cell Biochem*. 2000; 79 (4): 672-685.
- Wang, J., Tang, Y., Zhang, W., Zhao, H., Wang, R., Yan, Y., . . . Li, P. Insulin-like growth factor-1 secreted by brain microvascular endothelial cells attenuates neuron injury upon ischemia. *FEBS J*. 2013; 280 (15): 3658-3668.
- Wang, T., Tang, W., Sun, S., Xu, T., Wang, H., Guan, J., . . . Weil, M. H. Intravenous infusion of bone marrow mesenchymal stem cells improves brain function after resuscitation from cardiac arrest. *Crit Care Med*. 2008; 36 (11 Suppl): S486-491.
- Weston, N. M., & Sun, D. The potential of stem cells in treatment of traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2018; 18 (1): 1.
- White, M. F., & Yenush, L. The irs-signaling system: A network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998; 228: 179-208.
- Xu, Y., Kong, G. K., Menting, J. G., Margetts, M. B., Delaine, C. A., Jenkin, L. M., . . . Lawrence, M. C. How ligand binds to the type 1 insulin-like growth factor receptor. *Nat Commun*. 2018; 9 (1): 821.

Yanar, K., Molbay, M., Ozaydin-Goksu, E., Unek, G., Cetindag, E., Unal, A., & Korgun, E. T. Contribution of human trophoblast progenitor cells to neurogenesis in rat focal cerebral ischemia model. *Brain Inj.* 2021; 1-13.

Yasuhara, T., Kameda, M., Sasaki, T., Tajiri, N., & Date, I. Cell therapy for parkinson's disease. *Cell Transplant.* 2017; 26 (9): 1551-1559.

Yu, S. P., Tung, J. K., Wei, Z. Z., Chen, D., Berglund, K., Zhong, W., . . . Wei, L. Optochemogenetic stimulation of transplanted ips-npcs enhances neuronal repair and functional recovery after ischemic stroke. *J Neurosci.* 2019; 39 (33): 6571-6594.

Zhang, J., & Chopp, M. Cell-based therapy for ischemic stroke. *Expert Opin Biol Ther.* 2013; 13 (9): 1229-1240.

Zhang, R., Zhang, Z., & Chopp, M. Function of neural stem cells in ischemic brain repair processes. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2016; 36 (12): 2034-2043.

Zhang, S., Zuo, W., Guo, X. F., He, W. B., & Chen, N. H. Cerebral glucose transporter: The possible therapeutic target for ischemic stroke. *Neurochem Int.* 2014; 70: 22-29.

Zhang, W. W., Zhang, L., Hou, W. K., Xu, Y. X., Xu, H., Lou, F. C., . . . Wang, Q. Dynamic expression of glucose transporters 1 and 3 in the brain of diabetic rats with cerebral ischemia reperfusion. *Chin Med J (Engl).* 2009; 122 (17): 1996-2001.

Zhao, L. R., Duan, W. M., Reyes, M., Keene, C. D., Verfaillie, C. M., & Low, W. C. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol.* 2002; 174 (1): 11-20.

Zhou, L., Lin, Q., Wang, P., Yao, L., Leong, K., Tan, Z., & Huang, Z. Enhanced neuroprotective efficacy of bone marrow mesenchymal stem cells co-overexpressing bdnf and vegf in a rat model of cardiac arrest-induced global cerebral ischemia. *Cell Death Dis.* 2017; 8 (5): e2774.

Zou, Z., Zhang, Y., Hao, L., Wang, F., Liu, D., Su, Y., & Sun, H. More insight into mesenchymal stem cells and their effects inside the body. *Expert Opin Biol Ther.* 2010; 10 (2): 215-230.