



Nöroşirürjide Temel Nörobilim Araştırmaları

Basic Neuroscience Research in Neurosurgery

Elif AKPINAR

Özel Körfez Marmara Hastanesi, Kocaeli, Türkiye

Yazışma adresi: Elif AKPINAR ✉ elif.akpinar@std.yeditepe.edu.tr

ÖZ

Nörobilim, insan beyninin, sinir sisteminin yapısını ve işlevini inceleyen bilim dalıdır. Her beyin cerrahı, araştırma sürecinin kavramak ve bilimsel bir yazının eleştirel değerlendirme prosedürlerini geliştirmek için araştırma yöntemlerinin temelleri hakkında bilgi sahibi olmalıdır. Bunun için de en küçük yapıtaşı olan sinir hücrelerin ve traktusların izole edilmesiyle çalışmaya başlanmalıdır. Yine nöral kök hücreler, nöronal/glial hayatta kalma ve farklılaşmanın yanı sıra nöral gelişim mekanizmalarının incelenmesi, nörodejeneratif hastalıkların araştırılması için yararlı bir in vitro modeli temsil etmektedir. Kök hücre tedavisi alanında yapılan çalışmalar bu hastalıkların tedavisinde umut vaat etmektedir. Genetik bilimi beyin gelişim aşamalarının daha fazla anlaşılması, gelişimsel bozukluklar, yetişkin yaşamın dejeneratif hastalıkları ve tümör oluşumu dahil olmak üzere birçok beyin hastalığının nedenlerinin deşifre edilmesine yardımcı olmaktadır ve olacaktır. Beyin tümörü ve dejeneratif beyin hastalıklarında gen tedavisi, hayvan modeli çalışmalarında umut vaat etmektedir. Bu derlemede; öncelikle sinir dokunun mikroskopta görüntülenebilmesi için hazırlanmasından ve hücre türüne özgü olan boyama tekniklerinden bahsettik. Akabinde, sinir ve kök hücre kültürlerinin hazırlanmasını ve nörobilim alanında yapılan güncel kök hücre ve genetik çalışmalarını ele aldık.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Nörobilim ve nöroşirürji, Nörobilim araştırmaları, Nörobilim ileri araştırma teknikleri, Nöral gen tedavisi, Nöral kök hücre tedavisi

ABSTRACT

Neuroscience is the science that studies the structure and function of the human brain and nervous system. Every neurosurgeon should have knowledge of the fundamentals of research methods to develop an understanding of the research process and procedures for critical evaluation of a scientific paper. This work should be started by isolating nerve cells which are the smallest building blocks and the tracts. Again, neural stem cells represent a useful in vitro model for investigating neurodegenerative diseases, and examining mechanisms of neural development as well as neuronal/glial survival and differentiation. Studies in the field of stem cell therapy show promise in the treatment of these diseases. A greater understanding of the stages of brain development in genetics will help decipher the causes of many brain diseases, including developmental disorders, degenerative diseases of adult life, and tumorigenesis. Gene therapy in brain tumor and degenerative brain diseases shows promise in animal model studies. In this review, we first discuss the preparation of the nerve and the staining techniques specific to each cell type in order to make the nervous system cells visible. Then, we discuss the preparation of nerve and stem cell cultures and recent stem cell and genetic studies in neuroscience.

KEYWORDS: Neuroscience and neurosurgery, Neuroscience research, Neuroscience advanced research techniques, Neural gene therapy, Neural stem cell therapy

■ GİRİŞ

Sağlık ve tıp alanındaki araştırmalar bilimsel ilerlemenin temel taşları arasındadır. Tüm tıbbi araştırma alt alanları arasında nörobilim araştırmaları en ilginç ve zorlu olanıdır (54). Nörobilim; nöroşirürji, nöroloji, nöropsikiatri ve psikoloji gibi klinik uzmanlıkların yanı sıra; nörobiyoloji ve nörokimya gibi klinik olmayan uzmanlıklarda yapılan çalışmaları da içerir. Ek olarak biyomedikal görüntüleme, fizik, bilişim teknolojileri ve yapay zekâ gibi tıbbi olmayan alanlardaki araştırmaları da içerir (1).

Yirmi birinci yüzyıl sinirbilimi, hızla büyüyen, büyük ölçekli bir bilimsel girişimdir (54). Her beyin cerrahı, araştırma sürecini kavramak ve bilimsel bir yazının eleştirel değerlendirme prosedürlerini geliştirmek için araştırma yöntemlerinin temelleri hakkında bilgi sahibi olmalıdır (23).

Genetik, bir organizmanın temelidir. Bu nedenle anlaşılması, hastalık etiyojisindeki kalıtsal unsurları keşfetmek için güçlü bir araç sağlar. Epidemiyolojik yöntem ve yaklaşımların temel genetik entegrasyonu, ailelerde ve popülasyonlarda hastalık oluşumunda genetik faktörlerin rolünü belirlemeye yardımcı olmaktadır. Beyin yapısı ve işlevi üzerindeki hastalıkları ve genetik etkilerini ortaya çıkarmak, nedensel mekanizmaları belirlemek bu hastalıkların tedavisini mümkün kılacaktır (57).

Modern laboratuvar prosedürleri ve deneysel yeteneklerle desteklenen hücre izolasyonu ve kültür teknikleri, sağlık ve hastalıkta fizyolojik ve patofizyolojik süreçleri incelemek için in vitro araştırmalar için çok çeşitli fırsatlar sunar (30). NSC'ler, sinirsel gelişim mekanizmalarının yanı sıra nöronal/gliyal hayatta kalma ve farklılaşmanın incelenmesi için yararlı bir in vitro modeli temsil eder (24). Nöral kök hücre tedavisi alanında yapılan çalışmalar nörolojik bozukluklar ve çok sayıda hastalığın tedavisi için umut verici çözümler sunmaktadır (15).

Bir nöroşirürjiyen veya sinir bilimcinin sinir sistemi hakkında daha çok şey öğrenebilmesi için öncelikle beynin yapısını bilmesi gerekmektedir. Bunun için de en küçük yapıtaşı olan sinir hücrelerinin ve traktusların izole edilmesiyle çalışmaya başlanmalıdır (9).

Bu derlemede; öncelikle sinir dokunun mikroskopta görüntülenebilmesi için hazırlanmasından, sinir sistemi hücrelerinin görünür kılınabilmesi için her hücre türüne özgü olan boyama tekniklerinden, sinir ve kök hücre kültürlerinin hazırlanmasından, nörobilim alanında yapılan kök hücre ve genetik çalışmalardan bahsettik.

■ DOKU HAZIRLANMASI

Nöral doku yumuşak, hassas ve kolay parçalanabilir bir yapıya sahiptir. Öncelikle dokunun yaşayan hâline en yakın durumda korunması gerekmektedir (9). Doku hazırlama : 1) Fiksasyon 2) Dehidratasyon 3) Saydamlaştırma 4) Dokunun gömülmesi 5) Kesit alma aşamalarını içermektedir (25).

Fiksasyon dokunun korunması, stabilize edilmesi ve sonraki histolojik prosedürler ve mikroskopik analizler için kimyasal yöntemlerle güçlendirilmesi işlemidir (9). Ölüm sonrası beyinde otoliz hemen başlayacağından ve bu da nörodejenerasyona

benzeyen artefaktlara neden olabileceğinden beyin dokusu çıkartıldıktan yaklaşık iki dakika içinde fiksasyon için formaline konulmalıdır (48). *Dehidratasyon* dokunun kesit alınabilmesi için suyunun alınması işlemidir. Bu amaçla en çok alkol ve methanol kullanılır. Nöral dokunun uzun süre %70'in üzerinde alkolde bekletilmesi özellikle beyaz cevherde vakualizasyon artefaktlarına neden olacağından bu konuda dikkatli olunmalıdır (82). *Saydamlaştırma* dokudaki alkolü alıp yerine ksilol geçirme işlemidir. Ksilol yağları eritir ve dokuyu saydamlaştırır (25). *Dokunun gömülmesi* işlemi bir beyin veya doku kesitinin, dokuya sızan ve sert bir kabuk oluşturan bir madde ile çevrenmesi işlemidir. Bu süreç dokunun yapısını stabilize eder ve kesmeyi kolaylaştırır. Standart gömme malzemeleri arasında jelatin, parafin mumu ve plastik bulunur (9,25). *Kesit alma* sonraki histolojik prosedürler veya mikroskopik inceleme için bir beyni ince dilimlere halinde kesme işlemidir. Dokuyu kesmek için mikrotom denilen cihazlar kullanılmaktadır. Kryostat ise -20 veya -30 derecede fikse edilmemiş dondurulmuş beyin dokusunun kesilmesi için kullanılan cihazdır. 5-50 µm'lik kesitler alınabilmesini sağlar. Son olarak elde edilen bu kesitlere çeşitli boyalar ve işaretleyiciler uygulanarak aranan yapılar mikroskopta görünür hâle getirilir.

Özel İşlemler ve Boyalar

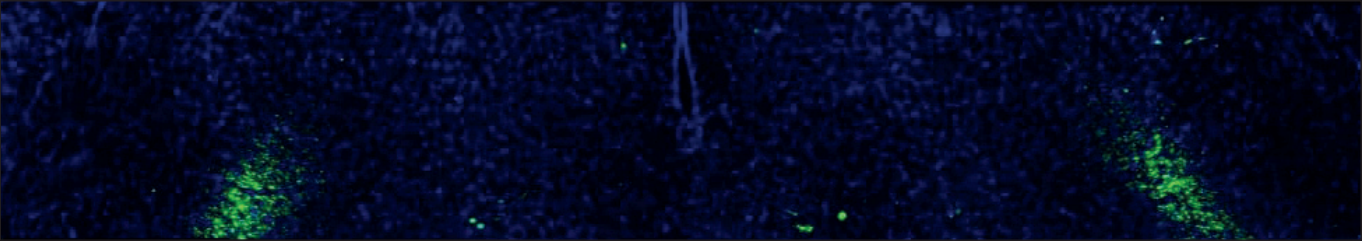
Santral sinir sistemi hücreleri temel olarak iki gruba ayrılır. Birinci grubu nöroektodermal orijinli hücreler olan; nöronlar, astrositler, oligodendrositler ve ependimositler oluşturmaktadır. İkinci grubu ise mezenkimal orijinli olan; meningesler, kan damarları, adipoz doku ve mikroglialar oluşturmaktadır (27).

Rutin değerlendirmede genellikle iyi yapılmış hematoksilen eozin (HE) boyama yeterlidir. Ancak belirli hücresel özellikleri karakterize etmek için özel boyalara ihtiyaç duyulabilir.

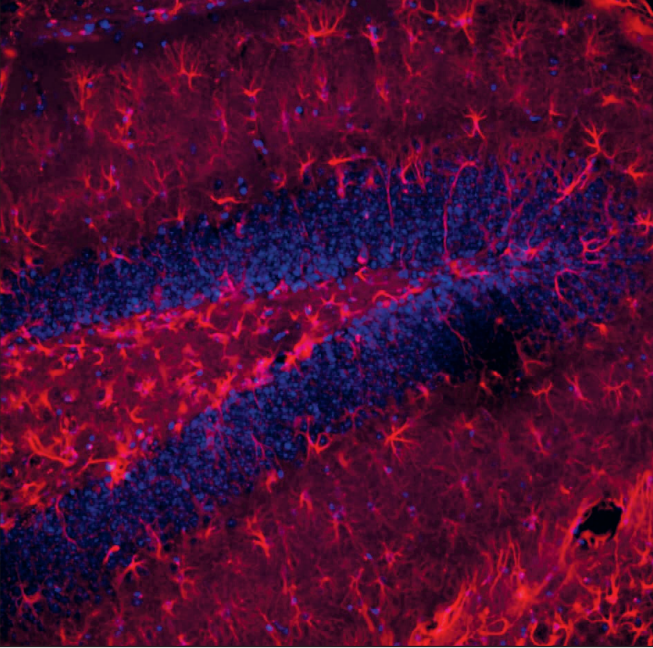
İmmünohistokimya (IHC) belirli proteinleri (antijenleri) tanıyarak, bunlara bağlanan antikorlar yoluyla aranan yapının görüntülenmesi yöntemidir. Floresan reaktiflerin kullanıldığı IHC, immünofloresan olarak adlandırılır (9). DAPI "4,6-diamidino-2'-phenylindole DNA'ya bağlanıp hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusun görünür hâle gelmesini sağlayan bir immünofloresan boyadır (31) (Şekil 1). Nöronlar için çeşitli immünohistokimyasal belirteçler mevcuttur. Bu belirteçlerden bazıları, sinaptofizin, NeuN, nörofilament proteini, nörona spesifik enolaz (NSE) ve mikrotübülle ilişkili protein 2' (MAP2)'dir (27).

Dejenere nöronların belirlenmesinde gümüş dejenerasyon boyaları ve Fluoro-Jade boyaları kullanılmaktadır (69). Ayrıca Alzheimer hastalığında beta amiloid, Parkinson hastalığında alfa-sinüklein, bir dizi nörodejeneratif hastalıkta tau proteini ve süngerimsi ensefalopatilerde prion proteinleri gibi immünohistokimyasal boyalar da kullanılmaktadır (27).

Hem dinlenme durumunda hem de aktive astrositlerin immünohistokimyasal olarak boyanmasında Glial fibriller asidik protein (GFAP) kullanılmaktadır (Şekil 2). Dopamin sentezinin birinci basamağında rol alan tirozin hidroksilaz (TH) enzimini tanıyan antikor diğer bir immünohistokimyasal belirteçtir (58).



Şekil 1: İmmüno Floresan boyama, konfokal mikroskopi görüntüsü (**Bölge:** Paraventrüküler çekirdek). **Yeşil:** Tirozin hidroksilaz nöronları gösteriyor, **Mavi:** DAPI ile çekirdek boyaması.



Şekil 2: İmmüno Floresan boyama, konfokal mikroskopi görüntüsü (**Bölge:** Hipokampus). **Kırmızı:** Glial fibriller asidik protein, **Mavi:** DAPI ile çekirdek boyaması.

CD68 antikorları ve iyonize kalsiyum bağlama adaptör molekülü 1 (Iba1), fagositik ve aktive edilmiş mikrogliaları değerlendirmek için sıklıkla kullanılır (38,42).

Miyelinle ilişkili glikoprotein (MAG) ve miyelin bazik proteini (MBP) immün boyaları, oligodendroglia'yı boyamak için kullanılmaktadır (27).

Epileptogenez gibi özel durumlarda hipokampal yosunsu liflerin filizlenmesinin anormal paternlerini incelemek için modifiye Timm boyası kullanılabilir. Modifiye Timm boyası çinko içeren glutaminerjik sinaptik veziküllerin görüntülenmesini sağlamaktadır (71).

■ HÜCRE KÜLTÜRÜ

Hücre biyolojisi konusunda yapılan çalışmalar son yıllarda hızla ilerlemiştir (80). Yeni laboratuvar prosedürleri, yöntemler, cihazlar ve deneysel koşullar sayesinde hücre kültürleri ve hücre modelleri hayvanlar ve insanlar üzerinde yapılan deneylere uygun bir alternatif oluşturmaktadır (30). Hem normal hem de tümürlü beyin dokusu hücre izolasyonu için

hayati öneme sahiptir. Beyin kesit kültürleri sayesinde belirli çalışmalar için kullanılması gereken deney hayvanı sayısı azaltılmakta ve nörodejenerasyon çalışmaları için birçok deney hayvanının yaşlandırılması gerekliliğini ortadan kaldırılmaktadır (17).

Hücre kültüründe doku kaynağı olarak laboratuvar hayvanları kullanılabildiği gibi erişkin insan beyin dokusu da kullanılabilmektedir (30).

İnsanda beyin dokusu izolasyonu için en uygun doku, tümör, travma, vasküler cerrahi ve epilepsi cerrahisi için kraniyotomi uygulanan hastaların korteksinden toplanan ve hemen izolasyonun yapıldığı hücre laboratuvarına nakledilen taze donör dokusudur (26).

Bir deney hayvanından veya herhangi bir canlı organizmada alınan hücre veya dokulardan hazırlanan kültürler "primer kültür" denir. Bölünen hücrelerden hazırlanan kültürler pasajlanıp tekrar büyüme fazına girmeleri sağlanarak sayıları artırılabilir. Glia hücreleri en azından bir kaç jenerasyona kadar pasajlanabilirken, nöronlar gibi bölünmeyen postmitotik hücreler için bu söz konusu değildir (37).

Primer kültür hazırlanmasının ilk adımı gerekli dokunun diseksiyonla çıkarılmasıdır. Genellikle dokular kalsiyum veya magnezyum içermeyen tuz ile dengelenmiş solusyonlar içinde parçalanır. Parçalanma yeterli olmadığı zaman proteazlar eklenir. Doku tek tek hücrelerine ayrılmış olur. Sonrasında kültürü yapılmak istenen hücreler istenmeyen hücrelerden ayrılır. Ekim yapılacak hücre sayısının belirlenmesi için hücreler sayılır. Hücreler kültüre ekilir (20). Üretilen hücreler ilgili çalışmalarda kullanılabilir.

Nöral Kök Hücre Kültürü

Nöral kök hücreler (NKH'ler) ilk kez 1992 yılında tanımlanmış ve erişkin memeli beyninin subventriküler bölgesinden izole edilmiştir (65). NKH'ler uzun bir süre boyunca kültürde çoğalabilen, kendini yenileyebilen; olgun ve işlevsel beyin hücreleri üretmek için kararlı bir kapasiteye sahip çok potansiyelli öncül hücrelerdir (24).

NKH'ler, nöronal/glial hayatta kalma ve farklılaşmanın yanı sıra nöral gelişim mekanizmalarının incelenmesi, nörodejeneratif hastalıkların araştırılması için yararlı bir in vitro modeli temsil etmektedir (24).

NKH'ler embriyonik bölgelerden veya normal olarak bölündükleri ve nöronları veya glia'yı oluşturdukları yetişkin beyinlerden de ekstrakte edilebilir. Embriyonik beyin birçok NKH içerirken, yetişkin beyinleri çok daha az NKH'ye sahiptir.

Ayrıca, yetişkin NKH'lerin nöron üretme yeteneği yaşla birlikte azalır (12).

NKH hatları, hipokampal dentat giristan, olfaktör bulbustan, ventrikülleri çevreleyen subventriküler bölgeden, korpus kallozumun altındaki subkallozal bölgeden ve embriyonik, yenidoğan ve yetişkin kemirgenlerin omuriliğinden alınan dokulardan türetilmektedir (12,24,49). Diseksiyondan sonra, NKH'leri içeren bölge ayrılır ve santrifüjleme yoluyla orta derecede saflaştırılabilir. NKH'ler NKH'nin hayatta kalmasını destekleyen özel besi yerlerinde pasajlanabilir. Besi yerinden büyüme faktörlerinin uzaklaştırılmasıyla, NKH'ler nöronlara, astrositlere ve oligodendrositlere farklılaştırılabilir. NKH'ler, EGF ve FGF büyüme faktörlerinin varlığında uygun olmayan koşullarda kültürlendiğinde, bölünen hücre kümeleri olan nörosferlere dönüşürler. Nörosferler sürekli kendini yenileyemeyen, bölünebilen nöral prekürsörlerdir. Nöral progenitör hücreleri ve kök hücreleri birbirinden ayırmak için fonksiyonel testler kullanılır. NKH tanımlayabilen temel özellik nöral soyun her üç tipine de farklılaşabilme (multipotensi), çoğalma yeteneği, fonksiyonel stabilite ve kendi kendini yenileyebilme yeteneğidir. Bu özellikleri belirleyen test nörosfer testidir (29,79,65,66).

■ NÖROLOJİK HASTALIKLAR ve KÖK HÜCRE TEDAVİSİ

Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı, serebrovasküler olay veya omurilik yaralanması gibi insan nörolojik bozuklukluk santral sinir sisteminde beyindeki veya omurilikteki nöronların ve glial hücrelerin kaybindan kaynaklanır (47). Kök hücre tedavisi bu hastalıkların tedavisinde ilgi duyulan bir seçenek hâline gelmiştir (55).

Nöral kök hücre tedavisi; 1)Transplantasyon yoluyla, kayıp sinir türünün doğrudan yerine konulduğu hücre replasman terapisi, 2) Etkilenen veya kalan nöronların hayatta kalmasını teşvik eden trofik destek tedavisi, 3) hastalık sürecine dahil olabilecek inflamasyon modülasyon tedavilerini içermektedir (47,51).

Deneyisel spinal kord yaralanması modelinde Lu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bu alanda yapılan çalışmalara örnek olabilecek niteliktedir. Yeşil floresan protein ekspresye eden nöral kök hücrelerini, büyüme faktörü kokteylleri içeren fibrin matrislerine gömülmüş ve ciddi omurilik yaralanması bölgelerine aşılmıştır. Aşılınmış hücreler, çok sayıda aksonu dikkate değer mesafelere uzatan nöronlar da dahil olmak üzere çoklu hücresele fenotiplere farklılaşmıştır. Genişleyen aksonlar, konak hücrelerle bol miktarda sinaps oluşturmuştur. Aşılınmış nöronlar, tam spinal transeksiyon bölgeleri boyunca elektrofizyolojik rollerin oluşumunu destekleyerek fonksiyonel iyileşme ile sonuçlanmıştır. Büyüme faktörü içeren fibrin içine gömülü iki insan kök hücre dizisi (566RSC ve HUES7) benzer büyüme sergilemiş ve 566RSC hücreleri fonksiyonel iyileşmeyi desteklemiştir. Bu nedenle, erken evre nöronlara özgü özellikler, işlevi önemli ölçüde iyileştiren yeni röle devrelerinin oluşumuyla sonuçlanan dikkate değer aksonal büyümeyi sağlamak için yararlı yetişkin omuriliğinin engelleyici ortamının üstesinden gelebileceğini düşünmüştür (52).

Yine Dai ve arkadaşlarının total, kronik servikal omurilik yaralanması olan kırk hastada yaptığı çalışmada yaralanma bölgesine otolog kemik iliği kök hücreleri verilmiştir. Ameliyat sonrası altıncı ayda tedavi grubunda on hastanın motor, hafif dokunma, iğne batması duyu ve rezidü idrar hacmi açısından önemli bir klinik iyileşmeye sahip olduğunu, dokuz hastada ise American Spinal Injury Association Impairment Skalası derecesinde değişiklikler gösterdiğini gösterdi. Nörofizyolojik muayene klinik gözlemlerle uyumluydu. Kontrol grubunda ise yukarıda belirtilen nörolojik fonksiyonların hiçbirinde düzelme gözlenmedi (18).

Kök hücreler nörodejenerasyonun moleküler mekanizmasının anlaşılması için muazzam bir potansiyeldir. Ayrıca hücre tedavisinin klinik uygulaması çoğu şu anda tedavi edilemez, AD veya inme durumunda olduğu gibi nörolojik bozukluklar, çok sayıda hastalığın tedavisi için umut verici çözümler sunmaktadır (15). Santral sinir sistemi (SSS) hastalıklarının tedavisinde daha güvenli ve verimli kök hücre tedavileri sağlamak için daha fazla klinik çalışmaya ihtiyaç vardır (55).

■ NÖROBİLİM ve GENETİK

Beyin gelişim aşamalarının daha fazla anlaşılması, gelişimsel bozukluklar, yetişkin yaşamın dejeneratif hastalıkları ve tümör oluşumu dahil olmak üzere birçok beyin hastalığının nedenlerinin deşifre edilmesine yardımcı olacaktır (36).

Günümüzde nörolojik ve psikiyatrik hastalıklara neden olan genler güvenilir bir şekilde tespit edilebilmekte, haritalanmakta ve ölçülebilmektedir (57).

Fareler genellikle sinirbilim araştırmalarında en iyi kabul edilen hayvan modellerinden biridir, çünkü insan ve fare genomu arasında önemli bir homoloji mevcuttur. Fareler nispeten kısa bir ömre sahiptir, iyi tanımlanmış genetik geçmişe sahiptir, daha fazla genetik manipülasyona açıktır, hastalık ilerlemesi sırasında davranış, biliş, beyin biyokimyası ve fizyolojisinde olan değişikliklerin değerlendirilmesini sağlamakta ve davranış ve bilişi incelemek için iyi karakterize edilmiş bir kaynak oluşturmaktadır (4,22).

Genetik tarama, bir fenotipe katkıda bulunan genleri tanımlama sürecidir. İleri genetik tarama ve ters genetik tarama olmak üzere iki çeşittir. İleri genetik tarama, biyolojik fenotip için önemli olan genlerin tanımlanması amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu taramada bilimsel olarak ilgi duyulan bir fenotip seçilir ve hangi genlerin bu fenotipin oluşmasına neden olduğu belirlenmeye çalışılır. Ters genetik taramada bir gen seçilir ve bu genin yokluğunda hangi fenotipik özelliklerin ortaya çıktığı bulunur. İleri genetik taramalarda genellikle binlerce gen üzerinde çalışılırken, ters genetik taramada sadece tek bir gen üzerinde çalışılır (10,33).

İleri genetik, fenotiplerin nasıl ortaya çıktığına dair herhangi bir ön yargılı fikirle başlamaz, daha önce araştırmacılar tarafından tespit edilmemiş olan biyolojik bir sürece dahil olan yeni moleküllerin veya yolların keşfedilmesine yol açabilir (56).

İleri genetik taramada mutant organizma hatlarını geliştirmenin üç yöntemi vardır.

1. **Kimyasal mutagenез:** Ethyl methane sulfonate veya N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) kullanılmaktadır.
2. **Işınlama mutagenезi:** Yüksek yoğunluklu ultraviyole ışık kullanılmaktadır.
3. **İnsersiyonal mutagenез:** Transpozon adı verilen mobil genetik elementler çeşitli yöntemler kullanılarak yavruların genomlarına yerleştirilir (2,10).

Yüksek mutasyon oranı olması ve zararlı hatalı aleller oluşturma yeteneğinden dolayı farelerde ENU mutasyonu tercih edilmektedir. Haftalık aralıklarla uygulanan 100 mg/kg üç intraperitoneal enjeksiyonundan sonra her erkek gamette 3.000 mutasyona neden olabildiği bildirilmiştir (4,33).

Bir genetik mutant izole edildikten sonra, belirlenen mutasyonun daha önce tanımlanmış olup olmadığını belirlemek için genellikle bir tamamlama testi yapılır. Sonrasında genin moleküler sekansının ve genomdaki konumunun belirlemek amacıyla gen haritalanır. Sonrasında gen gelecekte yapılacak olan çalışmalarda kullanmak amacıyla klonlanır (72).

Moleküler Klonlama ve Rekombinant DNA Teknolojisi

Rekombinant deoksiribonükleik asit (DNA) teknolojisi, canlı organizmalarda istenen özellikleri veya ürünleri elde etmek için istenen gen dizisine sahip çeşitli kaynaklardan DNA parçalarının uygun bir vektör yoluyla organizmanın genomuna eklenmesidir (40).

Moleküler klonlama ise gelecekte kullanılmak üzere genomdan bir DNA parçasının belirlenip kesilerek genomdam çıkarılmasıdır. Bu sayede genler izole edilebilir ve çoğaltılabilir. Moleküler klonlama iki şekilde yapılmaktadır:

1. İn vitro olarak DNA'nın kesilip, değiştirilip, birleştirilmesiyle moleküler klonlama
2. Genin vektöre yerleştirilmesi ve bu vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda hücrelerin bölünmesi sırasında vektörün de içerdiği genin birçok kopyasını oluşturması yöntemiyle moleküler klonlanması (11,41).

Öncelikle DNA sekanslarının izole edilmesi gerekmektedir. DNA sekansları iki şekilde izole edilmektedir: 1- Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın kesilmesi, 2- Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın kesilmesi

Endonükleazlar olarak da bilinen restriksiyon enzimleri kısa DNA dizilerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilere yakın bölgelerden veya bu diziler içerisindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen yapılardır (41). Bazı restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi esnasında yapışkan uçlar oluşurken, bazılarında künt uçlar oluşur. Çok büyük bir kısmı bakterilerden, çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlardan izole edilmiştir. Her enzim, yaklaşık 4-8 nükleotidlik benzersiz bir diziyi tanıyarak restriksiyon sindirimi adı verilen bir süreçte bu tanıma siteleri içindeki belirli konumlarda kesimler yapar (67).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR, seçilen küçük bir DNA fragmanını, DNA sentezleyen enzimlerin yardımıyla çoğaltmak için kontrollü ısıtma ve

soğutma kullanan biyokimyasal bir reaksiyondur. Seçilen bölge çoğaltılır, saflaştırılır ve şablon DNA'nın geri kalanından uzaklaştırılır (19).

Her PZR karışımı; şablon DNA, primerler, nükleotidler, Thermus aquaticus (taq) DNA polimeraz, dört deoksiribonükleosit trifosfatın tümü (dNTP-Adenin, Guanin, Sitozin, Timin), tampon sıvı ve magnezyum iyonu varlığını gerektirir (11,39,53). Şablon DNA, amplifiye edilmesi gereken bilinen hedef dizidir ve uzunluğu 100 ila 1000 baz çifti arasında değişir. Primerler, belirli bir nükleik asit hedefine spesifik olarak bağlanmak üzere seçilen kısa, tek iplikli nükleik asit (oligonükleotitler) dizileridir (75). Her biri 16-20 baz çifti uzunluğunda, ileri ve geri primer içeren primer çiftleri kullanılır (76). DNA polimeraz, PCR ürününü oluşturmak ve dolayısıyla hedef DNA dizilerini büyütme için tek tek nükleotitleri birbirine bağlayan DNA replikasyonu anahtar enzimidir.

DNA amplifikasyonu üç temel adımda gerçekleştirilir :

1. DNA'nın denatürasyonu – Çift sarmal DNA'nın 94°C'ye ısıtılarak ayrılması tek zincir hâline getirilmesi,
2. Primerlerin bağlanması – 50-58°C'de, primer çifti denatüre hedef DNA ile karıştırıldığında, ileri primer, zincirlerden birinin hedef dizisinin bir ucundaki belirli bir bölgeye bağlanır ve ters primer diğer tamamlayıcı zincirin karşı ucundaki hedeflenen bölgeye bağlanır.
3. Hazırlanmış DNA dizisinin uzatılması – DNA polimeraz enzimi, primerlerin 72°C'de uzatılmasıyla yeni tamamlayıcı zincirleri sentezler. Taq polimeraz, yüksek sıcaklıklarda verimli bir şekilde işlev görme yeteneği nedeniyle yaygın olarak kullanılır (39,76).

Standart bir PZR protokolü 25-30 döngüden oluşur ve her döngü hedeflenen DNA'nın miktarını bir önceki döngünün iki katına çıkarır. Sonuç olarak hedef DNA'nın birkaç milyon kopyası elde edilmiş olur (11).

Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR

Farklı örneklerde bulunan messenger ribonükleik asit (mRNA) veya DNA'nın miktarını karşılaştırmak için kullanılan bir yöntemdir. Bu teknik, DNA amplifikasyonunun her döngüsü sırasında PZR ürünü orantılı olarak üretilen bir floresan sinyalinin tespit edilmesine dayanmaktadır. PZR haznesi içine yerleştirilen hassas bir prob yardımıyla, her PZR döngüsünden sonra floresan sinyali ölçülebilir ve kaydedebilir ve çift sarmallı amplifiye DNA fragmanlarının konsantrasyonunun gerçek zamanlı bir ölçümünü üretebilir. Böylece farklı numuneler arasındaki relatif konsantrasyon farkı karşılaştırılabilir (5,14).

Reverse Transkripsiyon PZR

Reverse transkriptaz PZR (RT-PZR)'da, DNA yerine mRNA başlangıç şablonu olarak kullanılır.

İlk olarak, reverse transkriptaz enzimi, komplementer DNA (kDNA) adı verilen tamamlayıcı tek sarmallı DNA zincirini üretmek için mRNA şablonunu kullanır. Daha sonra DNA polimeraz kullanılarak tek sarmallı kDNA çift sarmallı DNA'ya dönüştürülür. Bu DNA molekülleri PZR reaksiyonu için şablon olarak kullanılabilir. RT-PZR numunenin

içinde bir mRNA türünün olup olmadığını belirlemek için veya sonraki bir deney için bir kDNA dizisini klonlanması amacıyla kullanılabilir (8,59).

DNA fragmanlarının jel elektroforezi kullanılarak tanımlanması ve saflaştırılması

Çalışılan DNA fragmanlarının, kısıtlama enzimleri veya PZR kullanılarak oluşturulduktan ve çoğaltıldıktan sonra diğer DNA parçalarından ayrılması ve saflaştırılması gerekmektedir. Agaroz jel elektroforezi, 100 bp ile 25 kb arasında değişen büyüklüklerdeki DNA fragmanlarını ayırmanın en etkili yoludur (59).

İşleme öncelikle agaroz jelin hazırlanmasıyla başlanır. Agaroz jel üzerinde kalıp kullanılarak DNA karışımının konulacağı kuyular oluşturulur. Jel elektroforez bölmesine yerleştirilir. Kuyulara DNA örnekleri konulur. Akım uygulanır. DNA (ve RNA) molekülünün fosfat omurgası negatif yüklü olduğundan, bir elektrik alanına yerleştirildiğinde, DNA fragmanları pozitif yüklü anoda göç edecektir (46). DNA'nın bir kütle/yük oranına sabit olduğundan, DNA molekülleri agaroz jel içinde boyutlarına göre ayrılır. DNA molekülünün jel içinde kat ettiği mesafe moleküler ağırlığının logaritması ile ters orantılıdır (35). Bu nedenle, daha küçük DNA fragmanları, jel boyunca büyük fragmanlardan çok daha hızlı göç edecektir (11).

Agaroz jellerdeki DNA bantları, DNA boyanmadıkça veya etiketlenmedikçe görünmezler. Agaroz jeli boyamak için en yaygın kullanılan yöntem etidyum bromür içeren bir solüsyonda inkübe etmektir. Etidyum bromür DNA'ya bağlandığında ultraviyole ışık altında floresan verir (46). DNA fragmanları tanımlandıktan sonra jelden çıkarılıp saflaştırılabilir (11).

DNA'nın Klonlanması

Bir DNA fragmanı, restriksiyon enzimleri veya PZR teknikleri kullanılarak izole edildikten sonra, gelecekte kullanılmak ve çoğaltmak üzere fragmanı bir vektörde saklamak gerekir. Bir DNA vektörü, izole edilmiş bir DNA'yı tutabilen bir nükleik asit depolama sistemidir (11).

Bir genin vektöre yerleştirilmesi ve bu vektörün bakteri hücrelerine transformasyonu sonucunda hücrelerin bölünmesi sırasında vektörün de içerdiği genin birçok kopyasını oluşturması işlemine gen klonlaması adı verilmektedir (41). Klonlamada; virus ve bakteriler, bakteriofajlar, plazmitler, nadiren de kozmid ve mayalar vektör olarak kullanılmaktadır.

Bakteriyel plazmid, bakteri için esansiyel olmayan, kendi kendine çoğalan ekstrakromozomal bir DNA türüdür (61).

Bir DNA parçasını bir vektöre yerleştirmek için, hem parça hem de vektör genellikle aynı restriksiyon enzimleri kullanılarak kesilir, böylece aynı yapışkan uçlara sahip olurlar. Sonrasında normalde DNA tamiri için kullanılan bir enzim olan DNA ligazla, DNA fragmanı vektörün genomuna yapıştırılır (11).

Genin vektöre yerleştirilmesiyle rekombinant DNA'lar oluşturulur (41).

Vektör daha sonra, kültüre dahil edilen DNA fragmanının çoklu kopyalarını üretmek için büyütülen bir konakçı organizmaya verilir ve son olarak ilgili bir DNA fragmanını içeren klonlar seçilir ve hasat edilir (78).

■ BEYİN TÜMÖRLERİ ve GENETİK

SSS tümörlerinin patogenetik mekanizmaları; onkogenler, P53 gibi tümör baskılayıcı genlerin bozuklukları, hücre siklusu ve apoptozis bozuklukları, herediter ve sporadik tümörlerdeki genlerin bozuklukları, heterozigozite kaybı, RB1, WT1, APC, DCC gen bozuklukları olarak sıralanabilir (68).

Malign beyin tümörleri, insan kanserinin en ölümcül formlarındandır. Beyin tümörlerinde tedavi zordur çünkü altta yatan biyoloji tam olarak anlaşılammıştır ve histolojik ve genetik olarak insan gliomaları ve medulloblastomları taklit eden doğru modeller tam olarak yapılamamıştır. Diğer bir neden tümör heterojenitesidir. Beyin tümörlerinin farklı moleküler anomalilerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Yine de tüm beyin tümörü tanısı alan, farklı evrelerdeki hastalar altta yatan genetik farklılıklara rağmen aynı şekilde tedavi edilmektedir (32).

Glioblastome multiforme (GBM), yetişkin insanlarda en sık görülen ve en agresif primer beyin tümörü tipidir (74). Mikroskopik görünümüne göre grade IV olarak tanımlanan bu yüksek dereceli gliomalar, yüksek mitotik indeks, çevredeki normal dokuya invazyon, mikrovasküler proliferasyon ve nekroz odakları sergiler (50). Medulloblastomalar çocuklar ve genç erişkinlerin serebellumunda oluşan malign tümörlerdir. Medulloblastomun klinik yönetimi gliomalardan daha başarılıdır, 5 yıllık sağkalım yaklaşık %70'tir (32).

Cerrahi rezeksiyon ve radyoterapiyi takiben sitotoksik ajan temozolomid (TMZ) şu anda tüm GBM hastaları için standart tedavidir. Ancak ilaca ilk yanıtın sonra tümörler her zaman nüks eder (16,44). TMZ, oral yoldan hızla emilen ve uygulama sonrası beyin omurilik sıvısı (BOS)'a iyi nüfuz eden bir alkilleyici ajandır (63). TMZ, genomik DNA'nın guaninin O6 pozisyonuna bir alkil grubu ekleyerek ve N7 pozisyonunu ek bir metilasyon yaparak etki eder. Çift sarmal DNA'nın kırılmasını ve apoptozisi indükler (73). Normalde DNA tamir enzimi olan O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) guaninin O6 pozisyonundan mutajenik eklentileri kaldırır TMZ'nin etkisini nötralize eder ve ayrıca ilaca direnç kazandırır.

İlaça özgü PZR ile MGMT metilasyonunun kapsamı belirlenebilir. MGMT gen promotörünün metilasyon durumu ve yeni tanı konulmuş GBM hastalarının hayatta kalma oranları arasında anlamlı bir ilişki kurulmuştur; genin inaktif formu olan metillenmiş MGMT'li hastaların tedaviye daha iyi yanıt verdiği görülmüştür (34).

Yapılan prelinik çalışmalarda tümör hücre kültürlerinin primer tümör hücresine göre farklı genetik ve biyolojik yapı sergilediği görülmüştür (45). Son yıllarda beyin tümörlerinin tedaviye yanıtında; tümörün içinde kendini yenileme, multipotent ve tümör başlatma kapasitesi olan kanser kök hücrelerinin varlığının önemi üzerinde durulmaktadır (6,43). Yapılan çalışmalarda CD133 (prominin-1)'ün gliomalar için bir yüzey belirteci olduğu; düşük dereceden yüksek dereceli gliomalara doğru gidildikçe bu hücrelerin %1 ile %25 arasında değişen aralıkta arttığı görülmüştür (70).

■ SSS'de GENETİK TEDAVİ

Genetik tedavi, sinir sistemini modifiye etmek için genlerin, dizi hedefli düzenleyici moleküllerin, genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin ve oligonükleotitlerin transferi yöntemlerini kapsamaktadır (7).

SSS'ne giriş, onu çevreleyen iskelet yapıları ve çoğu küçük moleküllerin ve kan dolaşımındaki proteinlerin basit difüzyonunu önleyerek SSS'nin kimyasal mikro-ortamını düzenlemede merkezi bir rol oynayan kan-beyin bariyeri (KBB) ile sınırlıdır.

BBB, gen transfer araçlarının büyük çoğunluğunun damar sistemi yoluyla SSS'ye ulaşmasını engellemede son derece etkili olduğunu kanıtlamıştır. Bu nedenle SSS gen tedavisinde vektörler kullanılmaktadır (3). SSS'ne alternatif bir giriş yolu, gen transfer vektörlerinin lateral ventriküller yoluyla doğrudan BOS'a veya intratekal boşluğa iletilmesidir (64,81).

Rekombinant viral vektör sistemleri, SSS'de uzun vadeli stabil gen ekspresyonu elde etmek için en etkili araçlardır. Yıllar boyunca, retrovirüs, herpes simpleks virüs tip 1 (HSV-1), adenovirüs, adeno ilişkili virüs (AİV), lentivirüslerden türetilenler de dahil olmak üzere birçok farklı viral vektör sistemi araştırmalarda kullanılmıştır (13,44).

Beyin tümörü tedavisinde temel strateji, tümör kütlelerinin büyük kısmını çıkarmak ve bu müdahale sırasında, genişletilmiş bir yarıçap üzerinde kalan tümör hücrelerini öldürmek için virüs vektörlerini veya hücrelerini rezeke edilen bölgeye enjekte etmektir (7,44).

Beyin tümörü tedavisi için araştırılan transgenler, ön ilaç aktive edici (veya suicid) genleri, hücre içi sinyal moleküllerini, bağışıklık modüllerini ve anjiyogenez ve hücre invazyon inhibitörlerini içerir.

Ön ilaç aktive edici (veya suicid) genler; toksik ilaç uygulamasının sistemik etkilerinden kaçınarak, zararsız ön ilaçları lokal olarak konsantrasyonla toksik metabolitlere metabolize eder (77). HSV-1 timidin kinaz/gansiklovir (TK/GCV) sistemi, bu yöntemler arasında en iyi çalışılmış olanıdır. Tümör çevresindeki endotelial hücrelere karşı toksisite yoluyla anjiyogenez etkilerine sahiptir ve bir atimik fare modelinde insan glioblastoma ksenograftlarının radyasyon duyarlılığının artmasına yol açmıştır (60).

İmmün sürveyanstan kaçış, tümörün ilerlemesi için hayati önem taşır. Tümörlere saldırmak için bağışıklık sistemini kullanmak umut vaat etmektedir, çünkü güçlü bir antitümör bağışıklık tepkisi, tüm tümör odaklarının temizlenmesi de dahil olmak üzere tamamen ortadan kaldırılmasına yol açmaktadır. Bu faktörler çeşitli mekanizmalarla bağışıklık sistemini uyarmanın yanı sıra apoptozu (IFN- β ve TNF- α) teşvik edebilir ve anjiyogenez (IL-12 ve IFN- α) olabilir. Sitokin genleri, doğrudan tümör hücrelerine dönüştürülebilir veya tümör aşılama stratejilerini geliştirmek için kullanılabilir. Çok sayıda çalışma, deneysel kemirgen beyin tümörü büyümesini engelleyebilen ve koruyucu bağışıklık oluşturabilen immün sistemi uyarıcı sitokin gen dağıtımının etkinliğini göstermiştir (21,62).

Glioblastomların %80'inde hücre içi sinyal yollarından biri mutlaka bozulmuştur. Bu yollar 1) büyüme faktörü sinyalleşmesini düzenlediği bilinen RTK/RAS/PI3K yolağı, 2) DNA hasarı yanıtından ve hücre ölümünden sorumlu p53 yolağı ve 3) Hücre bölünmesini kontrol eden CDK/siklin/CDK inhibitörü/RB yolağıdır (6). p53'ün transdüksiyonu, p53 mutasyonları olan glioma hücrelerinde apoptozu indüklerken, vahşi tip p53'ü eksprese eden hücreler büyüme durmasına uğrar. p53, hayvan modellerinde uzun hayatta kalma süreleri ile bir onkolitik adenovirüsün etkilerini artırmıştır (28).

Anjiyostatin ve endostatin, in vivo olarak güçlü antiangiyojenik özelliklere sahiptir. Yapılan bir çalışmada, her iki genle AİV tarafından fare tümör ksenograftlarına kodlandığında, tek başına kodlanandan daha uzun sağkalıma sahip olduğu görülmüştür (43).

Rekombinant DNA teknolojisi, bilimde insan hayatını çok kolaylaştıran önemli bir gelişmedir. Son yıllarda kanser tedavisi, genetik hastalıklar, diyabet ve çeşitli bitki hastalıkları başta olmak üzere viral ve fungal direnç gibi biyomedikal uygulamalar için gelişmiş stratejilere sahiptir (40). Beyin tümörü gen tedavisi, hayvan modeli çalışmalarında umut vaat etmiştir. İnsan hastalara gen aktarımı güvenli gibi görünse de, bu çalışmalar henüz klinikte faydalara çevrilmemiştir. Buradaki zorluk, bu bilgiyi insan hastalar için etkili tedavilere dönüştürmektir (44).

■ KAYNAKLAR

1. Adolphs R: The unsolved problems of neuroscience. Trends Cogn Sci 19:173-175, 2015
2. Anderson KV: Finding the genes that direct mammalian development: ENU mutagenesis in the mouse. Trends Genet 16:99-102, 2000
3. Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C: Pericytes regulate the blood-brain barrier. Nature 468:557-561, 2010
4. Arnold CN, Barnes MJ, Berger M, Blasius AL, Brandl K, Croker B, Crozat K, Du X, Eidenschenk C, Georgel P, Hoebe K, Huang H, Jiang Z, Krebs P, La Vine D, Li X, Lyon S, Moresco EMY, Murray AR, Popkin DL, Rutschmann S, Siggs OM, Smart NG, Sun L, Tabeta K, Webster V, Tomisato W, Won S, Xia Y, Xiao N, Beutler B: ENU-induced phenovariance in mice: Inferences from 587 mutations. BMC Res Notes 5:577, 2012
5. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR: Basic principles of real-time quantitative PCR. Expert Rev Mol Diagn 5(2):209-219, 2005
6. Bleau AM, Huse JT, Holland EC: The ABCG2 resistance network of glioblastoma. Cell Cycle 8:2936-2944, 2009
7. Bowers WJ, Breakefield XO, Sena-Esteves M: Genetic therapy for the nervous system. Hum Mol Genet 20:28-41, 2011
8. Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): Trends and problems. J Mol Endocrinol 29:23-39, 2002
9. Carter M, Shieh J: Visualizing Neural Structure. Guide to Research Techniques in Neuroscience, cilt 1, ikinci baskı, Oxford: Elsevier, 2015:145-166

10. Carter M, Shieh J: Identifying Genes and Proteins of Interest. Guide to Research Techniques in Neuroscience, cilt 1, ikinci baskı, Oxford: Elsevier, 2015:203-218
11. Carter M, Shieh J: Molecular Cloning and Recombinant DNA Technology. Guide to Research Techniques in Neuroscience, cilt 1, ikinci baskı, Oxford: Elsevier, 2015:219-237
12. Carter M, Shieh J : Cell Culture Techniques. Guide to Research Techniques in Neuroscience, cilt 1, ikinci baskı, Oxford: Elsevier, 2015:295-310
13. Chiocca EA, Aghi M, Fulci G: Viral therapy for glioblastoma. Cancer J 9:167-179, 2003
14. Cockerill FR: Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for diagnostic testing in the clinical microbiology laboratory. Arch Pathol Lab Med 127:1112-1120, 2003
15. Cofano F, Boido M, Monticelli M, Zenga F, Ducati A, Vercelli A, Garbossa D: Mesenchymal stem cells for spinal cord injury: Current options, limitations, and future of cell therapy. Int J Mol Sci 20(11):2698, 2019
16. Cohen MH, Johnson JR, Pazdur R: Food and drug administration drug approval summary: Temozolomide plus radiation therapy for the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme. Clin Cancer Res 11:6767-6771, 2005
17. Croft CL, Noble W: Preparation of organotypic brain slice cultures for the study of Alzheimer's disease. F1000 Res 7:592, 2018
18. Dai G, Liu X, Zhang Z, Yang Z, Dai Y, Xu R: Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of complete and chronic cervical spinal cord injury. Brain Res 1533:73-79, 2013
19. Devrim AK, Kaya N: Polimeraz zincir reaksiyonu. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 10:209-214, 2004
20. Dursun E, Gezen-Ak D, Yılmaz S: Primer nöron kültürü tekniği. Maltepe Tıp Dergisi 5(2):50-56, 2013
21. Ehtesham M, Black KL, Yu JS: Recent progress in immunotherapy for malignant glioma: Treatment strategies and results from clinical trials. Cancer Control 11:192-207, 2004
22. Ellenbroek B, Youn J: Rodent models in neuroscience research: Is it a rat race? Dis Model Mech 9(10):1079-1087, 2016
23. Esene IN, El-Shehaby AM, Baeesa SS: Essentials of research methods in neurosurgery and allied sciences for research, appraisal and application of scientific information to patient care (Part I). Neurosciences (Riyadh) 21(2):97-107, 2016
24. Ferrari D, Binda E, De Filippis L, Vescovi AL: Isolation of neural stem cells from neural tissues using the neurosphere technique. Curr Protoc Stem Cell Biol 15:1-18, 2010
25. Firdin Ş: Histolojik çalışmalar için doku örnekleri alma ve işleme prosesi. Sumae Yunus Araştırma Bülteni 4(1):15-17, 2004
26. Francis SL, Yao A, Choong PF: Culture time needed to scale up infrapatellar fat pad derived stem cells for cartilage regeneration: A systematic review. Bioengineering 7:69, 2020
27. Garman RH: Histology of the central nervous system. Toxicologic Pathology 39(1):22-35, 2011
28. Georger B, Vassal G, Opolon P, Dirven CM, Morizet J, Laudani L, Grill J, Giaccone G, Vandertop WP, Gerritsen WR, van Beusechem VW: Oncolytic activity of p53-expressing conditionally replicative adenovirus AdDelta24-p53 against human malignant glioma. Cancer Res 64(16):5753-5759, 2004
29. Gritti A, Cova L, Parati EA, Galli R, Vescovi AL: Basic fibroblast growth factor supports the proliferation of epidermal mouse factor-generated neuronal precursor cells of the adult mouse. CNS Neurosci Lett 185:151-154, 1995
30. Gradisnik L, Bonjak R, Bunc G, Ravnik J, Maver T, Velnar T: Neurosurgical approaches to brain tissue harvesting for the establishment of cell cultures in neural experimental cell models. Materials (Basel) 14(22):6857, 2021
31. Güleş Ö, Eren Ü: Apoptunuz belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Y. Y. Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi 73(2):73-78, 2008
32. Hambardzumyan D, Becher OJ, Holland EC: Cancer stem cells and survival pathways. Cell cycle (Georgetown, Tex) 7:1371-1378, 2008
33. Ha S, Stottmann RW, Furley AJ, Beier DR: A forward genetic screen in mice identifies mutants with abnormal cortical patterning. Cerebral Cortex 25(1):167-179, 2015
34. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR: Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity. J Clin Oncol 26(25):4189-4199, 2008
35. Helling RB, Goodman HM, Boyer HW: Analysis of endonuclease R-EcoRI fragments of DNA from lambda bacteriophages and other viruses by agarose-gel electrophoresis. J Virol 14:1235-1244, 1974
36. Herron BJ, Lu W, Rao C, Liu S, Peters H, Bronson RT, Justice MJ, McDonald JD, Beier DR: Efficient generation and mapping of recessive developmental mutations using ENU mutagenesis. Nat Genet 30:185-189, 2002
37. Higgins D, Banker G: Primary dissociated cell cultures. In: Banker G, Goslin K (ed). Culturing Nerve Cells. Cambridge: MIT Press, 1998:37-79
38. Ito D, Tanaka K, Suzuki S, Dembo T, Fukuuchi Y: Enhanced expression of Iba1 after transient focal cerebral ischemia in the rat brain. Stroke 32:1208-1215, 2001
39. Kahya S, Büyükcangaz E, Carlı KT: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) optimizasyonu. Uludağ Univ J Fac Vet Med 32(1):31-38, 2013
40. Khan S, Ullah MW, Siddique R, Nabi G, Manan S, Yousaf M, Hou H: Role of recombinant DNA technology to improve life. Int J Genomics 2016:2405954, 2016
41. Kuk S, Erensoy A: Gen klonlama, plazmit seçimi ve fasciola hepatica cathepsin L1 uygulamaları. Türkiye Parazitoloji Dergisi 32(1):16-22, 2008
42. Kullberg S, Aldskogius H, Ulfhake B: Microglial activation, emergence of ED1-expressing cells and clusterin upregulation in the aging rat CNS, with special reference to the spinal cord. Brain Res 899:169-186, 2001
43. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA, Dick JE: A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature 367:645-648, 1994

44. Lawler S, Peruzzi P, Chiocca E: Genetic strategies for brain tumor therapy. *Cancer Gene Ther* 13:225-233, 2006
45. Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li A, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA: Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines. *Cancer Cell* 9:391-403, 2006
46. Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH: Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *J Vis Exp* (62):3923, 2012
47. Lindvall O, Kokaia Z: Stem cells in human neurodegenerative disorders—time for clinical translation? *J Clin Invest* 120(1): 29-40, 2010
48. Li X, Elwell MR, Ryan AM, Ochoa R: Morphogenesis of postmortem hepatocyte vacuolation and liver weight increases in Sprague-Dawley rats. *Toxicol Pathol* 31:682-688, 2003
49. Lois C, Alvarez Buylla A: Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:2074-2077, 1993
50. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P: The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathologica* 114:97-109, 2007
51. Lunn JS, Sakowski SA, Hur J, Feldman EL: Stem cell technology for neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology* 70(3):353-361, 2011
52. Lu P, Wang Y, Graham L, McHale K, Gao M, Wu D, Brock J, Blesch A, Rosenzweig ES, Havton LA, Zheng B, Conner JM, Marsala M, Tuszynski MH, Long-86- Bustin SA: Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol* 29:23-39, 2002
53. Maheaswari R, Kshirsagar JT, Lavanya N: Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *J Indian Soc Periodontol* 20(2):128-135, 2016
54. Markram H: Seven challenges for neuroscience. *Funct Neurol* 28(3):145-151, 2013
55. Martinez-Morales PL, Revilla A, Ocana I, Gonzalez C, Sainz P, McGuire D, Liste I: Progress in stem cell therapy for major human neurological disorders. *Stem Cell Rev Rep* 9(5):685-699, 2013
56. McAlpine W, Russell J, Murray AR, Beutler B, Turer E: Research techniques made simple: Forward genetic screening to uncover genes involved in skin biology. *J Invest Dermatol* 139(9):1848-1853, 2019
57. Medland SE, Jahanshad N, Neale BM, Thompson PM: Whole-genome analyses of whole-brain data: Working within an expanded search space. *Nat Neurosci* 17(6):791-800, 2014
58. Minbay Z, Gören B, Eyigör Ö: 6-OHDA ile oluşturulan parkinson hastalığı modelinde astrogliozis ve glutamat taşıyıcı protein GLT1 ekspresyonu. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 46:385-394, 2020
59. Mo Y, Wan R, Zhang Q: Application of reverse transcription-PCR and real-time PCR in nanotoxicity research. *Methods Mol Biol* 926:99-112, 2012
60. Nestler U, Wakimoto H, Siller-Lopez F, Aguilar LK, Chakravarti A, Muzikansky A, Stemmer-Rachamimov A, Chiocca EA, Aguilar-Cordova E, Hochberg FH: The combination of adenoviral HSV TK gene therapy and radiation is effective in athymic mouse glioblastoma xenografts without increasing toxic side effects. *J Neurooncol* 67(1-2):177-188, 2004
61. Novick RP: Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* 51(4):381-395, 1987
62. Okada H, Pollack F: Cytokine gene therapy for malignant glioma. *Expert Opin Biol Ther* 4:1609-1620, 2004
63. Ostermann S, Csajka C, Buclin T, Leyvraz S, Lejeune F, Decosterd LA, Stupp R: Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin Cancer Res* 10:3728-3736, 2004
64. Passini MA, Watson DJ, Vite CH, Landsburg DJ, Peigenbaum AL, Wolfe JH: Intraventricular brain injection of adeno-associated virus type 1 (AAV1) in neonatal mice results in complementary patterns of neuronal transduction to AAV2 and total long-term correction of storage lesions in the brains of beta-glucuronidase-deficient mice. *J Virol* 77:7034-7040, 2003
65. Reynolds BA, Weiss S: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255:1707-1710, 1992
66. Reynolds BA, Weiss S: Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. *Dev Biol* 175:1-13, 1996
67. Roberts RJ: How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(17):5905-5908, 2005
68. Sav A: Beyin tümörlerinin tanı ve evrelemede genetik yöntemler. *Türk Nöroşirürji Dergisi* 16(1):2-5, 2006
69. Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L: Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 1035:24-31, 2015
70. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB: Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396-401, 2004
71. Sloviter RS: A simplified Timm stain procedure compatible with formaldehyde fixation and routine paraffin embedding of rat brain. *Brain Res Bull* 8:771-774, 1992
72. Stottmann RW, Moran JL, Turbe-Doan A, Driver E, Kelley M, Beier DR: Focusing forward genetics: A tripartite ENU screen for neurodevelopmental mutations in the mouse. *Genetics* 188(3):615-624, 2011
73. Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, Ludwin SK, Allgeier A, Fisher B, Belanger K, Hau P, Brandes AA, Gijtenbeek J, Marosi C, Vecht CJ, Mokhtari K, Wesseling P, Villa S, Eisenhauer E, Gorlia T, Weller M, Lacombe D, Cairncross JG, Mirimanoff RO: Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10(5):459-466, 2009
74. Surawicz TS, Davis F, Freels S, Laws Jr ER, Menck HR: Brain tumor survival: Results from the national cancer data base. *J Neurooncol* 40:151-160, 1998

75. Tille PM: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, onüçüncü baskı. Missouri: Mosby Elsevier, 2013:112-122
76. Turgeon ML: Linne's and Ringsrud's Clinical Laboratory Science: The Basics and Routine Techniques, altıncı baskı. Missouri: Mosby Elsevier; 2011:146,147
77. Vassaux G, Martin-Duque P: Use of suicide genes for cancer gene therapy: Study of the different approaches. *Expert Opin Biol Ther* 4:519-530, 2004
78. Venter M: Synthetic promoters: genetic control through cis engineering. *Trends in Plant Science* 12(3):118-124, 2007
79. Walker TL, Kempermann G: One mouse, two cultures: Isolation and culture of adult neural stem cells from the two neurogenic zones of individual mice. *J Vis Exp* (84):e51225, 2014
80. Wang A, Madden LA, Paunov VN: Advanced biomedical applications based on emerging 3D cell culturing platforms. *J Mater Chem B* 8:10487-10501, 2020
81. Watson G, Bastacky J, Belichenko P, Buddhikot M, Jungles S, Vellard M, Mobley WC, Kakkis E: Intrathecal administration of AAV vectors for the treatment of lysosomal storage in the brains of MPS I mice. *Gene Ther* 13:917-925, 2006
82. Wells GA, Wells M: Neuropil vacuolation in brain: A reproducible histological processing artifact. *J Comp Pathol* 101:355-362, 1989