



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**LENTİVİRAL VEKTÖR ARACILIKLI GDNF UYGULAMASININ  
OMURİLİK HASARI SONRASI PATOFİZYOLOJİK  
SÜREÇLERDEKİ ROLLERİ**

REYHAN ZEYNEP GÜNDOĞDU ÖZDEMİR

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL-2019

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi  
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora (X)  
Anabilim Dalı : Sinirbilim  
Tez Sahibi : Reyhan Zeynep GÜNDOĞDU ÖZDEMİR  
Tez Başlığı : Lentiviral Vektör Aracılıklı GDNF Uygulamasının Omurilik Hasarı Sonrası Patofizyolojik Süreçlerdeki Rollerini  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 05.08.2019

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve nitelik yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

### Tez Danışmanı

Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ

### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

### İmza

### Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr.Ülkan KILIÇ

Dr.Öğr.Üyesi Birsen ELİBOL

Dr.Öğr.Üyesi Ahmet Burak  
ÇAĞLAYAN

Dr.Öğr.Üyesi Mustafa Çağlar  
BEKER

### Kurumu

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

İstanbul Medipol Üniversitesi

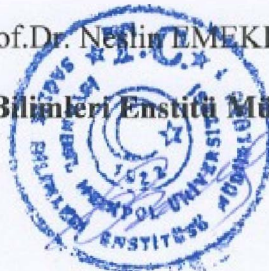
İstanbul Medipol Üniversitesi

### İmza

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 08./08./2019 tarih ve 2019.../25... - 05... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslihan EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü V.



## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Reyhan Zeynep GÜNDOĞDU ÖZDEMİR





*“Bu tez başta annem ve babam,  
Havva Gündoğdu ve Kâşif Gündoğdu olmak üzere  
eşim Ekrem Musa Özdemir’e  
ve tüm aileme ithaf edilmiştir...”*

## TEŞEKKÜR

Bu teşekkür imkânını ilk olarak derin saygılarımı ve şükranlarımı sunduğum tez danışmanım Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç'a sunuyorum. Kendisi gibi mükemmel bir bilim adamının öğrencisi olmaktan her zaman gurur duymaktayım. Öğrencisi olduğum andan itibaren mezun olana kadar yolumu aydınlattığı için ve her sıkıştığımda bana hep yol gösterip örnek teşkil ettiği için kendisine sonsuz minnetlerimi arz ederim. Birlikte çalışmaktan edindiğim eşsiz tecrübe ve sadece bilimsel alanda değil hayat yolunda da verdiği öğütleri hep yanımda taşıyacak olmaktan çok müteşekkirim.

Ayrıca tez komitesi üyelerimden ve çok kıymetli ek danışmanım olan Prof. Dr. Ülkan Kılıç'a tez sürecimde desteğini hiç eksik etmediği ve bir kadın olarak bana bilimsel alanda yaptıklarıyla hep örnek olup yol gösterdiği için sonsuz teşekkürlerimi iletiyorum. Tez jürimde bulunmayan ancak REMER bünyesinde çalışmalarına yaptığı katkıdan dolayı Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Öte yandan, yurtdışında lisans eğitimimi aldıktan sonra ülkemde bilimsel alanda işleyiş ile ilgili hiçbir fikrim yok iken yüksek lisans ve doktora sürecimde bana tüm edindiğim kıymetli bilgileri öğreten, her ihtiyacım olduğunda yanımda olan, yol gösteren birbirinden kıymetli laboratuvar danışmanlarım Berrak Çağlayan, Ahmet Burak Çağlayan, Mustafa Çağlar Beker ve Taha Keleştemur'a teşekkürü bir borç bilirim. Bir araştırmacının sahip olabileceği tüm çarpıcı özelliklere sahip örnek bilim adamları ile birlikte çalışmaktan her zaman onur duymaktayım. Onların yol göstericiliği olmadan bu tez projesini tamamlamak imkânsız olacağı için ve bana kattıkları tecrübeler için kendilerine sonsuz teşekkürlerimi iletiyorum.

Bu vesile ile, akademik hayatımın başlangıcında tanıştığım hem bilimsel alanda hem de yol arkadaşı olarak birçok bilgiyi birlikte öğrendiğim ve hala öğrenip eğlenmeye devam ettiğim, benden desteğini eksik etmeyen arkadaşım Aysun Çağlayan'a, öte yandan doktora tezimin son yılında tanıştığım ve bu son dönemi dolu dolu geçirmemi sağlayan moral desteğini benden eksik etmeyen arkadaşım Nilay Ateş'e varlıkları için çokça teşekkür ederim.

Aynı danışman çatısı altında bulunduğum tez projemin yapım aşamasında görüşleriyle ve yardımlarıyla beni destekleyen Arman Dalay, Özgen Altıntaş, Zeynep Balçıkanlı ve Serdar Altunay'a bunun dışında tez projemin farklı alanlarında çeşitli yardımları olan Elif Sertel ve diğer Kılıç grup üyelerine teşekkürlerimi arz ederim.

Araştırmalarım boyunca laboratuvar araç gereçleri ve tez işleyişi açısından desteklerini eksik etmeyen Büşra Batği, Hilmi Kaan Alkan'a ve İstanbul Medipol Üniversitesi REMER birimine ayrıca teşekkür ederim.

Hayvan deneylerim boyunca çalışmamı başarı ile tamamlamamda büyük ölçüde katkısı olan, imkanlarını cömertçe kullanımına sunan ve güler yüzlülükleriyle çalışmama destek veren Ekrem Musa Özdemir, Ali Şenbahçe ve MEDİTAM ekibine sonsuz teşekkürlerimi iletiyorum.

En son ve en anlamlı teşekkürü hayatımın her evresinde yanımda olan, sevgilerini benden esirgemeyen, öğütleri ile sadece sosyal hayatımda değil doktora sürecimde de yoluma ışık tutup beni cesaretlendiren çok kıymetli annem ve babama sunmaktan şeref duyarım. Öte yandan, varlıklarıyla hayatıma anlam katan kız kardeşlerime, abilerime ve sonsuz sevgi kaynağım olup hayatımı neşelendiren biricik yeğenlerime teşekkür ederim. Doktora sürecini kendilerinin sevgisi ilgisi ve desteği olmadan tamamlamam imkânsız olurdu bu nedenle göstermiş oldukları sevgi, anlayış ve moral desteği için ailemin tüm üyelerine teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>TEZ ONAYI</b> .....	i
<b>BEYAN</b> .....	ii
<b>İTHAF</b> .....	iii
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	iv
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	x
<b>ŞEKİLLERİN LİSTESİ</b> .....	xi
<b>TABLoların LİSTESİ</b> .....	xiii
<b>RESİMLERİN LİSTESİ</b> .....	xiv
<b>1- ÖZET</b> .....	1
<b>2- ABSTRACT</b> .....	3
<b>3-GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	4
<b>4-GENEL BİLGİLER</b> .....	7
4.1 Nörotrofik faktörler.....	7
4.2 GDNF Ailesi (Glial-hücre türevli nörotrofik faktör ailesi) .....	7
4.2.1 GDNF Yapısı.....	8
4.2.2 GDNF sinyal yolağı.....	9
4.2.3. GDNF'in omurilik hasarındaki rolü .....	12
4.3 Omurilik yapısı .....	13
4.3.1 Omurilik yolakları .....	14
4.3.2 Omurilik hasarı.....	15
4.3.3 Omurilik hasarı patofizyolojisi.....	16
<b>5-MATERYAL ve METOT</b> .....	20
5.1. Deney grupları .....	20

5.2. Deney Dizaynı .....	21
5.3. GDNF Lentivirüs Üretimi.....	22
5.3.1. Hücreden RNA izolasyonu.....	22
5.3.2. cDNA sentezi.....	22
5.3.3. Primer dizaynı .....	23
5.3.4. GDNF üretimi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	24
5.3.5. Agaroz jelden GDNF DNA ürünü izolasyonu .....	26
5.3.6. PZR ürünü GDNF DNA ve pLenti kesme reaksiyonu.....	26
5.3.7. GDNF ve PLenti Plazmid DNA Pürifikasyonu.....	27
5.3.8. GDNF VE pLenti vektörünün bağlanma reaksiyonu .....	28
5.3.9. Kompotent bakteri üretimi .....	28
5.3.10. Transformasyon.....	29
5.3.11. Plazmid İzolasyonu .....	29
5.3.12. DNA'nın varlığının restriksiyon enzimleriyle doğrulanması.....	30
5.3.13. Plazmid vektörlerinin amplifikasyonu .....	31
5.3.14. Lenti-virüs paketlenmesi ve üretilmesi .....	31
5.3.15. Virüs Titrasyonunun belirlenmesi .....	32
5.4. Lentiviral Virüs Enjeksiyonu.....	33
5.5. Spinal Kord Hasar Modeli .....	36
5.6. Davranış Deneyleri .....	39
5.6.1. Açık alan testi .....	39
5.6.2. Basso Lokomotor Testi (Basso Mouse Scale).....	39
5.6.3. Merdivende yürüme testi.....	41
5.6.4. Arka Ayak Açısı Testi .....	43
5.7. Traser Enjeksiyonu .....	45
5.8. Elektrofizyolojik ölçüm .....	45



5.9. Omurilik İzolasyonu .....	47
5.10. Omurilik örneklerinin dondurulması ve kesitlerinin alınması .....	47
5.11. Cresyl violet boyaması ve Değerlendirilmesi .....	48
5.12. BDA boyaması.....	49
5.13. Western Blot Analizi .....	50
5.14. İstatistiksel Analiz.....	51
<b>6-BULGULAR.....</b>	<b>52</b>
6.1.GDNF Protein Analizi .....	52
6.2.Elektrofizyolojik Ölçüm .....	53
6.3.Omurilik Hasarı Sonrası Fonksiyonel İyileşme Değerlendirmesi .....	54
6.3.1. Açık alan testi sonucu hareketlilik sürelerinin değerlendirilmesi .....	54
6.3.2. Açık alan testinde sarf edilen hızların değerlendirilmesi .....	55
6.3.3. Açık alan testinde kat edilen mesafenin değerlendirilmesi .....	56
6.3.4. Açık alan testi ile anksiyetenin ölçülmesi .....	57
6.3.5. Omurilik hasar sonrasında gerçekleşen motor koordinasyon kaybının zamana bağlı olarak değerlendirilmesi.....	58
6.3.6. Omurilik hasarı sonrasında yürüme becerilerinin zamanı bağlı olarak geri kazanımının değerlendirilmesi.....	59
6.3.7. Omurilik hasarı sonrası ayak açısını motor becerilerine olan etkisinin ölçülmesi .....	60
6.4. Omurilik Hasarı Sonrası Hücresel Sağ Kalımın Değerlendirilmesi .....	61
6.4.1. Torakal ve Lumbal alan kesitlerinde yapılan nöron sayımının gruplara göre değerlendirilmesi.....	62
6.4.2. Torakal ve Lumbal alan kesitlerinde yapılan motor nöron sayımının gruplara göre değerlendirilmesi .....	64
6.5. Omurilik Hasarı Sonrası Atrofinin Değerlendirilmesi.....	65

6.5.1. Omurilik hasarı sonrasında torakal ve lumbal bölge kesitlerinde atrofinin gösterilmesi .....	66
6.5.2. Torakal ve Lumbal bölgelerde dorsal-ventral alan ayrımının değerlendirilmesi.....	67
6.5.3. Torakal ve Lumbal bölgelerde funikulus alanlarının değerlendirilmesi	68
6.5.4. Torakal ve Lumbal alan kesitlerinde total omurilik alanı değerlendirilmesi.....	70
6.6. Omurilik Hasarı Sonrası Aksonal Projeksiyon.....	71
<b>7-TARTIŞMA.....</b>	<b>72</b>
<b>8-SONUÇ .....</b>	<b>84</b>
<b>9-KAYNAKLAR .....</b>	<b>85</b>
<b>10-ETİK KURUL ONAYI.....</b>	<b>99</b>
<b>11-ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>101</b>

## KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

APAF-1	Apoptotik Protez Aktive Eden Faktör
ARTN	Artemin
BDNF	Beyin Kökenli Nörotrofik Faktör
CREB	Siklik AMP Tepki Elemanı Bağlayıcı Protein
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DRG	Dorsal Kök Ganglionu
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
EPO	Eritropoetin
FAS	Hücre Yüzeyi Ölüm Reseptörü
Fyn	Proto Onkogen Tirozin Protein Kinaz
GDNF	Glial Türevli Nörotrofik Faktör
GFR $\alpha$ 1	GDNF Reseptörü Alfa 1
GFR $\alpha$ 2	GDNF Reseptörü Alfa 2
GFR $\alpha$ 3	GDNF Reseptörü Alfa 3
GFL	GDNF Ailesi Ligandları
GPI	Glikozil Fosfatidilinositol
HIV	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
MAPK	Mitojen Tarafından Aktive Edilen Protein Kinaz
NCAM	Nöral Hücre Adezyon Molekülü
NO	Nitrik Oksit
NT-3	Nörotrofin-3
NRTN	Neurturin
PI3K	Fosfatidilinositol 3 Kinaz
PKC	Protein Kinaz C
PSPN	Persephin
Ras	Proto Onkogen
RTK	Ras GTPaz
RET	Reseptör Tirozin Protein Kinaz
TGF- $\beta$	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil 4.2.1.1. GDNF molekülü yapısı, N terminal .....	8
Şekil 4.2.1.2. GDNF molekülü yapısı, sistein .....	9
Şekil 4.2.2.1. GDNF sinyal yolağı; RET bağımlı, RET bağımsız.....	10
Şekil 4.3.3.1. Omurilik hasarı patofizyolojisi .....	18
Şekil 5.2.1 Deney dizaynı .....	21
Şekil 5.3.3.1. pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektör .....	23
Şekil 5.3.4.1. GDNF Agaroz jel görüntüsü.....	25
Şekil 5.3.8.1 pLenti vektörünün bağlanma reaksiyonu miktarları.....	28
Şekil 5.3.12.1 Plazmid ve GDNF Agaroz jel görüntüsü.....	31
Şekil 6.1.1. Omurilik dokusunda GDNF ekspresyonunun gösterilmesi.....	52
Şekil 6.2.1. Omurilik yarı kesi hasar modeli sonrası elektromiyografi değerlendirilmesi.....	53
Şekil 6.3.1.1. Omurilik yarı kesi hasar modeli sonrası arka ekstremitede fonksiyon kaybının GDNF uygulaması ile açık alan testine göre değerlendirilmesi.....	54
Şekil 6.3.2.1. Omurilik hasarı sonrasında sarf edilen maksimum hızların gruplara göre değerlendirilmesi.....	55
Şekil 6.3.3.1. Omurilik hasarı sonrası kat edilen mesafenin değerlendirilmesi.....	56
Şekil 6.3.4.1. Omurilik hasarı sonrası kenar bölgesinde geçirilen zamanın değerlendirilmesi.....	57
Şekil 6.3.5.1. Basso motor skorlarına uygun olarak motor koordinasyonu değerlendirmesi.....	58

<b>Şekil 6.3.6.1.</b> Merdivende yürüme testi .....	59
<b>Şekil 6.3.7.1.</b> Arka ayakta adım atılırken yapılan retraksiyon ve protaksiyon mesafesinin mediyan orta çizgi ile yaptığı açının değerlendirilmesi .....	60
<b>Şekil 6.4.1.1.</b> Cresyl violet boyaması ile torakal ve lumbal alanlardan alınan kesitlerde hesaplanan nöron sayıları .....	62
<b>Şekil 6.4.2.1.</b> Cresyl violet boyaması ile torakal ve lumbal alanlardan alınan kesitlerde hesaplanan motor nöron sayıları. ....	64
<b>Şekil 6.5.1.1.</b> Cresyl violet boyaması ile GDNF ve Kontrol gruplarından torakal ve lumbal alanlardan alınan kesitlerin şekilleri .....	66
<b>Şekil 6.5.2.1.</b> Cresyl violet boyaması ile torakal lumbal bölgelerden alınan kesitlerde dorsal- ventral alan ayrımının değerlendirilmesi .....	67
<b>Şekil 6.5.3.1.</b> Cresyl violet boyaması sonrası T8 ve L3 bölgelerinden alınan kesit görüntülerinde funikulus alanlarının değerlendirilmesi .....	68
<b>Şekil 6.5.4.1.</b> Cresyl violet boyaması sonrasında torakal ve lumbal bölgelerden alınan kesitlerde GDNF ve Kontrol grupları için total omurilik alanı hesaplanması .....	70
<b>Şekil 6.6.1.</b> BDA boyaması sonrasında T8 bölgesinden alınan kesitlerde GDNF ve Kontrol grupları için total omurilikte BDA (+) hücrelerin hesaplanması.....	71

## TABLolarIN LİSTESİ

<b>Tablo 5.3.3.1.</b> GDNF klonlama ürünleri .....	24
<b>Tablo 5.3.4.1.</b> PZR reaksiyon koşulları.....	25
<b>Tablo 5.3.6.1</b> Çift kesme reaksiyonu ürünleri .....	27
<b>Tablo 5.3.8.1.</b> Plazmid ekspresyonu için gerekli olan ürünler ve oranları.....	28
<b>Tablo 5.4.1</b> Lentivirüs enjeksiyon miktarları .....	34
<b>Tablo 5.6.2.</b> Basso skorlaması değerler ve anlamları.....	40-41

## RESİMLERİN LİSTESİ

<b>Resim 5.4.1.</b> Virüs enjeksiyonu bölgeleri.....	35
<b>Resim 5.5.1.</b> Omurilik Torakal 12 bölgesinin belirlenme yöntemi. (A) Vertebra ve Torakal ve Lumbal sınırı. (B) 13. Kosta ve T13 hizası.....	36
<b>Resim 5.5.2.</b> Omurilik hasarı yarı kesi modeli .....	38
<b>Resim 5.6.3.</b> Merdivende yürüme testi.....	42
<b>Resim 5.6.4.</b> Ayak Açısı Testi .....	44
<b>Resim 5.7.1</b> Elektromyografi kayıt anı görüntüsü.....	46
<b>Resim 5.8.1.</b> Omurilik izolasyonu. ....	47

## 1. ÖZET

### **LENTİVİRAL VEKTÖR ARACILIKLI GDNF UYGULAMASININ OMURİLİK HASARI SONRASI PATOFİZYOLOJİK SÜREÇLERDEKİ ROLLERİ**

Nörotrofik faktörler, merkezi sinir sistemi hasarlarından sonra artış göstererek nöronların canlı kalmasına ve iyileşme sürecine katkıda bulunan endojenöz proteinlerdir. Diğer özelliklerinin yanı sıra, nörotrofik faktörlerin sinir sistemi üzerindeki en etkin görevlerinden biri de nörojenez, aksonların yeniden sinaps yapması, olayına etki göstermeleridir. Glial Türevli Nörotrofik Faktör (GDNF) ailesinin üyesi olan GDNF molekülü, ailenin diğer üyelerinden (neurturin, artemin ve persephin) yapısal olarak farklılık gösterir. GDNF molekülü Reseptör Tirozin Protein Kinaz (RET) yokluğunda da diğer üyelerden farklı olarak GFR $\alpha$ 1 reseptörü ile birlikte sinyal oluşturmaya devam etmektedir. Bu özellik sayesinde GDNF molekülü RET'den bağımsız olarak da sinyal oluşturmaya devam ederek motor nöronların canlılığını desteklemesinin yanında sempatik ve parasempatik nöronlarda ise büyümeyi düzenlemektedir. Yapılan çalışmalar, özellikle omurilik hasarı sonrasında, GDNF molekülünün akson rejenerasyonu üzerinde pozitif etkilerinin olduğunu göstermektedir. Bütün bu özellikler ve elde edilen veriler ışığında GDNF molekülünün omurilik hasarı ve diğer nörodejeneratif rahatsızlıklarda terapötik bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir. Bu tezde, GDNF molekülünün lentiviral yöntemlerle dokuda ifadesinin artırılmasının, omurilik hasarı üzerinde uzun dönem etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, travmatik omurilik hasarını taklit eden bir model olan yarı kesi hasar modeli kullanılmıştır. Deneylerde 8-10 haftalık Balb/c farelere Torakal 9 (T9) ve Lumbal 2 (L2) seviyelerinden virüs enjeksiyonu yapılmasının ardından T12 seviyesinde omurilik hasarı oluşturulmuştur. Hasar sonrasında farelerin fonksiyonel iyileşmeyi ölçen testler ile, hücresel sağ kalımı ve oluşan atrofi miktarlarını gösteren analizler yapılmıştır. Bunların sonucunda, GDNF molekülünün özellikle hasar sonrasında, uzun dönemde motor koordinasyonu düzenleyip fonksiyonel iyileşmesini arttırdığı gibi hücresel sağ kalımda da etkili olduğunu destekleyen bulgulara ulaşılmıştır.



**Anahtar sözcükler:** Travmatik Omurilik Hasarı, GDNF, Aksonal Rejenerasyon, Fonksiyonel Geri Kazanım, Hücresel Sağ Kalım.



## **2. ABSTRACT**

### **THE EFFECTS OF LENTIVIRAL VECTOR MEDIATED GDNF TRANSMISSION ON PATHOPHYSIOLOGICAL PROCESSES FOLLOWING SPINAL CORD INJURY**

Neurotrophic factors are endogenous proteins that contribute to help neuronal survival and functional recovery processes after brain and spinal cord injuries. Among all the other substantial roles of neurotrophic factors, the most prominent one is to affect the neurogenesis. Glial Cell Line- Derived Neurotrophic Factor (GDNF) family of ligands (GFL) consist of four neurotrophic factors, including neurturin, artemin, persephin and GDNF. Herein, GDNF molecule vary from the other members structurally by having a Receptor Tyrosine Protein Kinase (RET) independent signalling pathway. Having this property, by continuous signalling even in the absence of RET, GDNF can support motor neurons survival, regulate sympathetic, parasympathic structural development. Studies elucidated that GDNF molecule possesses positive effects on axon regeneration specifically following spinal cord injury. Considering all these aspects, studies give us clues that GDNF molecule may be used as a therapeutic agent for the treatments of spinal cord injuries and other neurodegenerative diseases. In this project, it was aimed to investigate the long-term effects of GDNF expression, which was increased by lentiviral vectors in mice spinal cord tissue. Depending on this aim, spinal cord injury model that mimics the traumatic spinal cord injury was applied to 8-10 weeks old Balb/c mice. Virus injection was applied from Thoracic 9 (T9) and Lumbar 2 (L2) levels and after 12 days spinal cord injury was performed from the T12 level of mice spinal cord. Experiments analysing functional recovery, neuronal survival and atrophy amount were applied following the injury. In consequence of these results, indications support that GDNF molecule can regulate functional recovery as well as affecting the neuronal survival during the long terms of spinal cord injury.

**Keywords:** Traumatic Spinal Cord Injury, GDNF, Axonal Regeneration, Functional Recover, Neuronal Survival.

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Omurilik hasarı travmatik ve travmatik olmayan sebepler sonucu omurilik çevresindeki motor ve duyu sinirlerinin zarar gördüğü ve sonrasında bu zararın zamanla birlikte tüm santral sinir sistemini ve dolaylı olarak periferik sinir sistemini etkilediği bir durumdur. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı güncel veriler dünya çapında her yıl 250.000 ile 500.000 arasında insanın omurilik hasarı geçirdiğini göstermektedir. Omurilik hasarının yol açtığı ölüm riski direkt olarak hasarın türü (travmatik veya travmatik olmayan), seviyesi ve özellikle hasar sonrasında yapılan ilk ve uzun dönemli bakım gücü ile doğru orantılı olarak değişkenlik göstermektedir. Travmatik omurilik hasarında hastaneye ulaştırma biçiminden yapılan ilk müdahaleye kadar olan aşamaların ölüm riskinde önemli roller oynadığı Dünya Sağlık Örgütü tarafından duyurulmuştur. Ölüm riskini atlatan hastalarda, kişinin yaşam kalitesi büyük ölçüde düşmektedir ve kişi iş gücü kaybı yaşanmaktadır. Bunların yanında, hasarı geçiren kişinin bakımı çevresine maddi manevi büyük sorumluluklar yüklemektedir. Travmatik veya travmatik olmayan omurilik hasarı sonrasında oluşan ekonomik yük 1.4 milyon \$ ile 3.03 milyon \$ arası değişiklik göstermektedir (1, 2).

Travmaya bağlı meydana gelen omurilik hasarı genellikle kaza sonrasında görülmektedir. Türkiye'de yapılan çalışmalar travmatik omurilik hasarının neredeyse %50'sinin trafik kazaları sonucu meydana geldiğini bilinmektedir (3, 4). Travmaya bağlı olmaksızın gelişen omurilik hasarı genellikle 40 yaş üstü bireylerde omuriliğin akut hasardan farklı olarak zamana bağlı dejenere olmasından kaynaklanmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde travmatik omurilik hasarı vakalarında parapleji veya kuadripleji içeren durumlarda hastaların büyük çoğunluğu hastaneye varmadan ve geri kalanı ise hastane müdahalesi aşamasında hayatını kaybetmiştir (5, 6).

Akut omurilik hasarı patofizyolojisi birincil ve ikincil olmak üzere iki aşamalı bir süreçtir. Yapılan çalışmalarla, omurilik hasarının patofizyolojisi bu iki süreç, özellikle ikincil mekanizmalar, incelenerek hasarın oluşturduğu moleküler değişiklikler, subaraknoid hemoraj, ve omurilik iskemisinin doğurduğu etkiler araştırılarak anlaşılmaya çalışılmaktadır.

Birincil omurilik hasarı mekanizması genellikle hasarın ilk etapta hangi yolla oluştuğunu, oluşma sürecini kapsamakta ve lokal deformasyon aşamalarını içermektedir (7). İkincil omurilik hasarı mekanizması ise birincil mekanizma sonrasında gelişen biyokimyasal ve hücrel süreçleri, hasarları ve bütün bunların sonucu olarak meydana gelen hücre ölümü durumlarını açıklamaktadır. Yapılan güncel çalışmalarla ikincil mekanizmaları önlemeyi amaçlayan araştırmalar ölüm riskini azaltmakta etkili olduğu ipucunu vermektedir. Ancak ikincil mekanizmayı önleyen tedaviler gelir seviyesi yüksek ülkelerde omurilik hasarı ölüm riskini iyi yönde etkilerken, gelir seviyesi düşük olan ülkelerde ise önlenemeyen ikincil mekanizmalar hala ölüme yol açan esas sebepleri oluşturmaktadır (6, 8, 9).

Omurilik hasarının patofizyolojik süreçleri ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde, tedavi sürecinin birincil ve ikincil patofizyolojik mekanizmaları hedef aldığı dikkat çekmektedir. Bu alanda yapılan çalışmalarda kullanılan terapötik ajanlar klinik düzeyde bütünüyle bir geri döndürücü etkiye ulaşamamıştır. Özellikle hasar sonrası sinir hücresi rejenerasyonunu amaçlayan yeni tedaviler ile ilgili araştırmalar büyük ilgi görmektedir (10, 11). Hasar patofizyolojisini de göz önünde bulundurarak yapılan çalışmalar öncelikle hücrel iyileşmeyi ve sinir hücrelerinin tekrar akson uzatarak sinirsel iletimi gerçekleştirmesini hedeflemektedir.

Omurilik hasarı da dahil olmak üzere merkezi sinir sistemi hasarlarında, hasar sonrası nörotrofik faktör artışının nöronal sağ kalım ile ilişkili olduğu literatürde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (12). Omurilik hasarı sonrasında hücre içinde, sitokinlerin harekete geçmesiyle birlikte omurilik yapısında etkili olan nörotrofik faktörlerin yapısal değişime uğradığı bilinmektedir (13). Bu yapısal değişiklikler reseptörlerin ve hücre membranında bulunan ilgili moleküllerin bağlantı noktalarında oluşan bozuklukları oluşturur. Nörotrofik faktörlerin hasar sonrasında çeşitli yöntemlerle artırılmasının hücre sağ kalımına pozitif etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Yapılan araştırmalarda, omurilikte sorumlu dopaminerjik nöronların canlılığını arttırdığı bilinen, önemli bir nörotrofik faktör olan GDNF'in (glial cell line-derived neurotrophic factor, glial hücre hattı türevli nörotrofik faktörler) omurilik hasarı sonrasındaki ikincil mekanizma süreçlerinde rolü olabileceği düşünülmektedir (13, 14).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda çeşitli moleküler biyoloji yöntemleri ile ilgili nörotrofik ajan canlı içerisine istenilen ölçülerde tedavi amaçlı aktararak ekspresyonu arttırılmıştır. Bu yöntemler genellikle adenoviral ve lentiviral vektörler aracılığı ile istenilen genin merkezi sinir sistemi içerisine aktarılmasıdır. Bu yöntemlerle istenilen ajanın etkileri aktarıldığı organizmada efektif olarak gösterilmektedir (15).

Spesifik olarak lentivirüsler, genellikle *HIV* (Human Immunodeficiency Virus)'den türetilerek elde edilmiştir ve 1990'lı yıllardan beri gen transferinde ve daha sonrasında da gen tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (16). Lentivirusler yetişkin memeli beyinde bulunan nöronlar, glialar ve bölünme özelliği olmadığı düşünülen hücre gruplarında gen transferine aracılık eden etkin özellikleri ile merkezi sinir sistemine hasar sonrası nörotrofik faktör gen ekspresyonu arttırması amacıyla merkezi sinir sistemi hasarı tedavilerinde kullanılmaktadır (16, 17). Son zamanlarda, literatürde yapılan çalışmalar omurilik hasarı tedavisinde nörotrofik faktörlerin, özellikle GDNF, ajan olarak kullanılarak farelere aktarıldığında tedavi sürecini pozitif olarak etkilediği yönünde ipucu vermektedir (18).

Tüm bu durumlar göz önüne alınarak, bu tezin amacı GDNF nörotrofik faktörünün tedavi ajanı olarak kullanılarak omurilik hasarı sonrası patofizyolojik süreçlerdeki etkilerini görmektir. Bu tezde, GDNF'in lentiviral vektör aracılığıyla farelere aktarılmasının *in vivo* olarak oluşturulan omurilik hasarı sonrasında; 1) hücresel sağ kalım 2) duyu iletim yollarındaki aksonal yayılma, 3) elektrofizyolojik parametrelerdeki değişim, 4) motor aktivitelerindeki fonksiyonel iyileşme gibi süreçler üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1 Nörotrofik faktörler

Nörotrofik faktörler nöronal gelişim ve büyümede etkili olan endojen proteinlerdir. Bu faktörler büyüme, canlılık, sinaptik plastisite ve nörogenezde rol almaktadırlar. Nörotrofik faktörlerinin özellikle sinir sisteminde, rejenerasyon sürecinde nöroprotektif etkileri bulunmaktadır (19). Nörotrofik faktörlerin araştırmalarda en çok dikkat çeken üyeleri BDNF, NGF, Nörotrofinler, GDNF ailesi ve nöropoietik sitokinlerdir (20). Tüm bu farklı üyeleri ile birlikte nörotrofik faktörler sinir sisteminde; gelişim, farklılaşma, remiyelinizasyon, sinaptik plastisite ve hücre canlılığı gibi çeşitli görevler üstlenmektedirler (12, 21). Nöroprotektif faktörlerden BDNF (beyin türevli nörotrofik faktör), uzun dönemli strese bağlı olarak hipokampüste oluşan bozulma ile ilişkilidir ve birçok çalışmada depresyon tedavisinde kullanılmıştır (22, 23). Nörotrofik faktörler yapısal olarak incelendiğinde nörotrofinler, glial türevli faktörler (GDNF) ve nöroprotektif sitokinler olmak üzere üç ayrı gruba ayrılmaktadır (24). Nörotrofinler grubunda BDNF, GDNF grubunda GDNF, nöroprotektif sitokinler grubunda ise EGF ve EPO gibi moleküller yer almaktadır (25, 26).

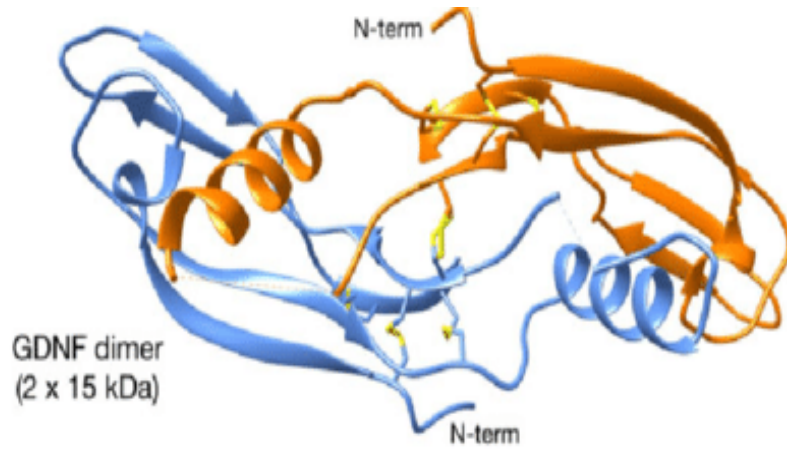
### 4.2 GDNF Ailesi (Glial hücre türevli nörotrofik faktör ailesi)

GDNF ailesi ilk defa 1993 yılında Parkinson hastalığı ile yapılan bir çalışmada dopaminerjik nöronların canlılığını koruyan ve arttıran bir büyüme faktörü olarak bulunmuştur. GDNF ailesinin kendi içinde 4 üyesi bulunmaktadır (27, 28). Bunlar neurturin (NRTN), artemin (ARTN), persephin (PSPN) ve GDNF faktör molekülleridir (29, 30). Daha sonra yapılan çalışmalarda motor nöronların rejenerasyonunda da kuvvetli etkileri olduğu gözlemlenmiştir. (14, 26). GDNF ailesinin üyeleri dopamin nöronları ve motor nöronlarının canlılığını desteklediği bunun yanı sıra bazı üyelerin sempatik ve parasempatik nöronlarda büyümeyi regüle ettiği düşünülmektedir. GDNF ailesi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda ailenin üyelerinin duyuşal akson rejenerasyonunda da rolü olduğunu göstermiştir (31, 32).

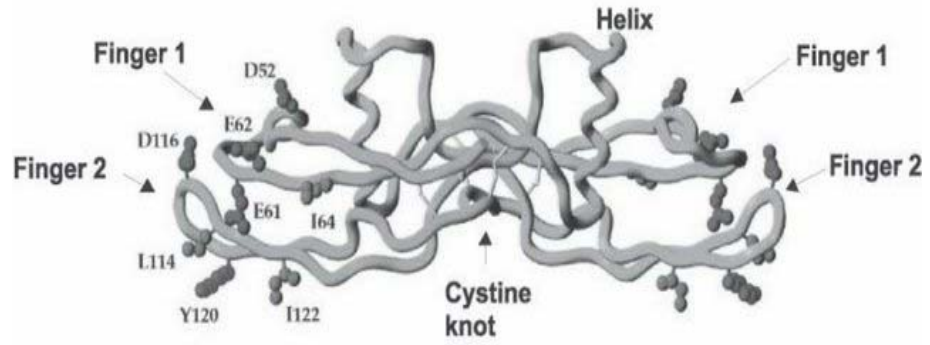
#### 4.2.1 GDNF'in Yapısı

GDNF üyeleri yapısal olarak sınıflandırıldığında, yapısında 7 adet sistein rezidüsü bulundurduğu için TGF- $\beta$  (Transform yapan beta büyüme faktörü) süper ailesinin altında yer almaktadır. GDNF ailesindeki üyeler aminoasit dizilimi açısından birbirlerine %50 benzerlik gösterir. Bu benzerlik TGF- $\beta$  ailesindeki diğer üyeler ile 20% oranındadır (33).

TGF- $\beta$  ailesindeki diğer üyeler serin treonin kinaz üzerinden sinyal iletirler fakat GDNF ailesi bu durumun aksine hücreler arası sinyal yollama işlevini membranda bulunan RET reseptörü ( tirozin kinaz reseptörü) üzerinden yapmaktadırlar (34-36). GDNF ailesi üyeleri her biri kendileri için farklı ve özelleşmiş şekilde membranda bulunan reseptörler içerirler. Bu reseptörler plazma membranında lipitlere bağlı halde bulunurlar (36). GDNF ailesinin her bir üyesi spesifik bir reseptöre bağlanır. (37, 38). GFR $\alpha$ 1 reseptörü GDNF'e, GFR $\alpha$ 2 neurturin'e, GFR $\alpha$ 3 artemin'e ve GFR $\alpha$ 4 ise persephin molekülüne bağlanır (39). GDNF ailesi molekülleri ilk olarak glikozilfosfatidilinositol (GPI) ankorlu bir reseptör olan kendilerine özgü olan GFR $\alpha$  reseptörüne bağlanarak sinyal iletimine başlarlar (32). GFR $\alpha$  reseptörüyle bir kompleks oluşturan GDNF ailesi molekülü plazma membranında RET molekülüne bağlanarak RET'in otofosforilasyonunu stimüle ederler (34, 40). RET aktivasyonu yapan tek TGF- $\beta$  üyesi GDNF ailesidir (41). GDNF ailesi üyelerinden bir tek GDNF molekülü ortamda RET olmadan da GFR $\alpha$ 1 reseptörü ile birlikte sinyal oluşturabilir (42, 43).



Şekil 4.2.1.1. GDNF molekülü yapısı, N terminal (44).



**Şekil 4.2.1.2.** GDNF molekülü yapısı, sistein düğümü (45, 46).

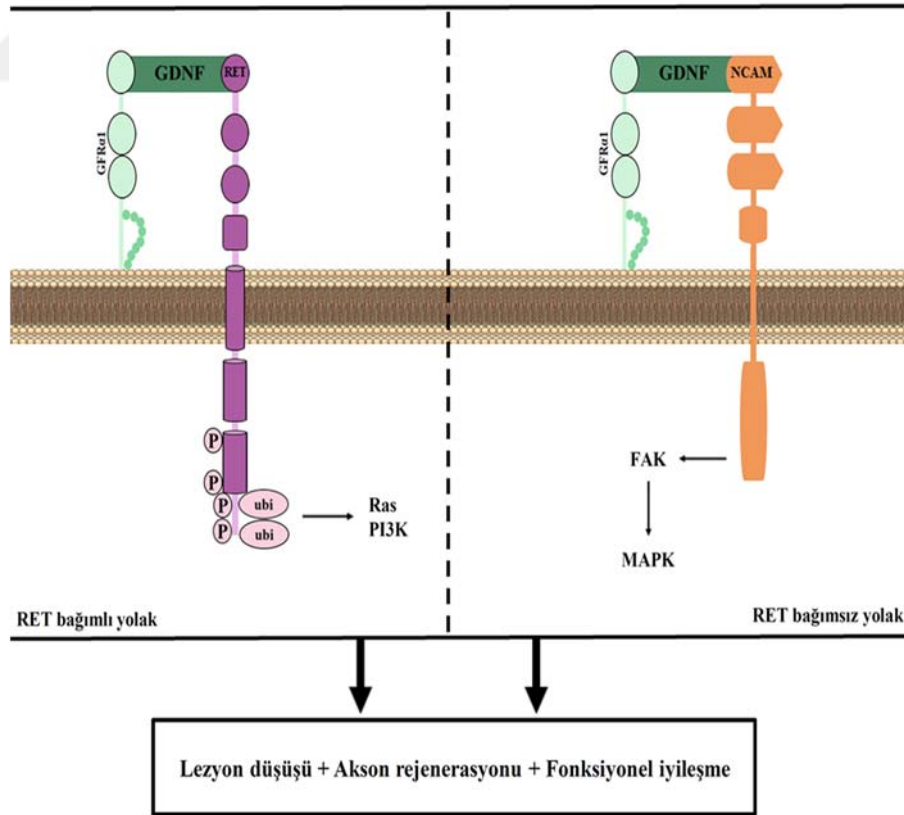
GDNF molekülü yapısal olarak beta yaprak sarmalından ve alfa heliksinden oluşan birbirine geçmiş iki parmaklı bir motiften oluşur (34, 42). Bu iki parmak ve heliks yapısı birbirine 3 tane disulfat köprüleriyle bağlı olan sisteinler ile bağlanmıştır. GDNF yapısındaki monomerler merkezde yer alan bu sistein düğümü sayesinde birleşirler (34). Yapılan çalışmalarda özellikle şekilde (şekil 4.2.2) gösterilen 2. parmak yapısının  $GFR\alpha 1$  reseptörüne bağlanma ve RET aktivasyonunda görevi olduğu tespit edilmiştir (35).

#### 4.2.2 GDNF sinyal yolağı

GDNF reseptörleri RET reseptörü olan serin tirozin kinaz (RTK) reseptörüne bağlanarak RET molekülünü plazma membranında aktive ederek sinyal yolağını başlatmış olur (29). GDNF ailesine ait her bir molekül kendi  $GFR\alpha$  reseptörüyle birlikte RET reseptörüne bağlanır. Burada, GDNF ailesinin içerisinde bir tek GDNF molekülü hem kendi reseptörü  $GFR\alpha 1$  ile oluşturduğu kompleks yoluyla RET'i aktive ederek sinyal oluşturur hem de bu kompleks kendi başına plazma membranında sinyal oluşturur (38, 43). GDNF molekülünün bu yönü ile diğer GDNF ailesi moleküllerinden farklı olma özelliği ile araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Yapılan çalışmalarda  $GFR\alpha 1$  kompleks bağlanmasında eksiği olan GDNF mutant içeren bir çalışmada mutantların RET aktivasyonunu hala gerçekleştirdiği görülmüştür.



Diğer bir çalışmada ise, ortamda GDNF molekülü yok iken RTK-RET kompleksi hücre ölümünü destekliyor ve ortamda GDNF olduğunda ise hücre ölümü gerçekleşmiyor (32, 47). Bu çalışmada GDNF'in yokluğunda GFR $\alpha$ 1 reseptörü serbest kaldığından RET'e bağlanıp RET'in proapoptotik bir faktör olarak rol almasını sağlamaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, GDNF molekülünden bağımsız bir RET ve GFR $\alpha$ 1 reseptörü birleşmiş kompleksi olduğunu ve bu kompleksin GDNF'in yokluğunda RET otofosforilasyonu yapabildiğini göstermiştir (47, 48). Öte yandan bu veriler aynı zamanda, GDNF molekülü üzerinde hem GFR $\alpha$ 1 reseptörüne hem de RET'e bağlanan bağımsız iki ayrı bağlanma bölgesi olduğunu da göstermektedir (49). Bu iki farklı bağlanma bölgesiyle ilgili olarak, GDNF molekülünün GFR $\alpha$ 1 reseptörüne RET olmadan bağlanması için N terminalindeki 1. ve 2. kolda bulunan negatif yüklü ve hidrofobik bir rezidünün bulunması gerekmektedir (50). Diğer bir yandan, GDNF molekülünün GFR $\alpha$ 1 ve RET bağlanmış kompleksine bağlanması ise yapısal olarak sadece 1. koldaki negatif yüklü rezidülerin olmasını gerektirir (51).



Şekil 4.2.2.1. GDNF sinyal yoluğu; RET bağımlı, RET bağımsız.

GDNF molekülü sinyal yolağı RET bağımsız ve RET ile birlikte çalışan olmak üzere ikiye ayrılır. RET ile birlikte çalışan yolakta, GPI (glikozilfosfatidilinozitol) ankorlu GFR $\alpha$ 1 reseptörü plazma membranı üzerindeki lipit yapılarına lokalize olmuştur (52).

GDNF ve GFR $\alpha$ 1 reseptörü bağlanması RET'in fosforile olmasını ve Src tirozin kinaz molekülü ile birleşmesini sağlar (34, 53). Bu birleşme GDNF sinyal yolağının plazma membranından hücre içerisine geçip hücre içinde devam etmesini sağlayan aşamadır (51). GDNF sinyal yolağı Src molekülünü çalıştırarak hücre içi mekanizmalar sayesinde nöronal sağ kalımı artırır. Bu sinyal yolağı hücre içi PI3K ve Ras, PKC ve Ca<sup>++</sup> mekanizmalarını tetikler (29). Bu olayların sonucunda ise nöronal sağ kalım, farklılaşma, migrasyon ve hücre proliferasyonu durumları gerçekleşir.

RET bağımsız GDNF sinyal yolağında ise, GDNF molekülü GFR $\alpha$ 1 reseptörünün RET'e bağlanmasından bağımsız olarak da GDNF ve GFR $\alpha$ 1 birleşmiş kompleksi oluşturarak plazma membranında bulunan NCAM aracılığıyla sinyali hücre içine geçirir ve burada Src'ye benzeyen bir kinaz olan Fyn'i aktif hale getirir (54-56). Sonrasında, Fyn hücre içinde Met molekülünü aktifleştirerek hücre içinde MAPK ve CREB fosforilasyonunu tetikler (57). Bu olayların sonucunda ise nörit büyümesi ve hücre migrasyonu görülmektedir. Merkezi sinir sistemi rahatsızlıklarında (hasarlarında), her iki GDNF sinyal yolağı çeşitli hücre içi mekanizmaları tetikleyerek lezyon oluşumunun düşüşüne, akson rejenerasyonun artması ve büyümesine, fonksiyonel iyileşmenin artmasına yardımcı olur (54, 58).

#### **4.2.3. GDNF'in omurilik hasarındaki rolü**

GDNF ailesi üyeleri merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemi rahatsızlıklarında rol alan önemli bir büyüme faktörüdür. Sinir sisteminde gelişim, nöral farklılaşma, nöral prekürsör hücre olma ve özellikle farklı hücre tiplerini nöral prekürsör hücrelere ve omurilik lateral motor kolon hücrelerine dönüştürmeyi başlatan kemoatraktan görevi görme gibi rolleri vardır. (37, 59). Genel olarak tüm GDNF'in birincil rolü aksonal dallanma ve sinaps formasyonunu başlatmaktır. GDNF ailesi üyeleri (GFL) memeli gelişim sürecinde yüksek konsantrasyonlarda görülür ancak yetişkin dönemde azalır (60, 61).

GFL'ler nöral tüpün gelişim sürecinde özellikle tüpün taban kısmında (floor-plate) yüksek konsantrasyonlarda görülmektedir ve aksonal gelişim, aksonal göçte etkili görevleri bulunmaktadır (62, 63).

GFL'lerden spesifik olarak GDNF'in omurilik hasarı sonrası hasarın olduğu bölgenin caudal bölümünde fonksiyonel iyileşmeyi arttırdığını açıklayan çalışmalar yapılmıştır (64, 65). GDNF kan-omurilik bariyerinin geçirgenliğini azaltır ve nöroprotektif bir ajan olarak nitrik oksit (NO) sentezini baskılar (26, 66). GDNF'in omurilik hasarı sonrası oluşan ikincil mekanizma üzerinde etkilerinin olduğu ve ikincil hasarın yol açtığı olumsuz etkileri azalttığı bilinmektedir (65).

GDNF'in omurilik hasarı sonrasındaki ödemi azaltıcı etki gösterdiği ve hücre sağ kalımını arttırdığı yapılan araştırmalarda gösterilmiştir (52). Bunun yanı sıra GDNF akson rejenerasyonu, aksonal yüzey alanı ve densite artışına yol açtığı bilinmektedir (66).

Tüm bu nöroprotektif özellikleri sayesinde GDNF omurilik hasarının tedavisinde kullanılmak üzere dikkat çekmektedir. GDNF'nin omurilik hasarı üzerinde etkileri araştırılırken GDNF'i hayvana aktarmada farklı yöntemler kullanılmıştır (65). Bunlardan bir tanesi GDNF'in başka nörotrofik faktörlerle birlikte hayvana aktarılmasıdır. Yapılan bir çalışmada GDNF nörotrofin (NT-3) ile birlikte ve omurilik hasarı sonrasında verilmesi nöronların filizlenmesini ve NGF ile birlikte verilmesi de aksonal dallanmayı arttırdığı gösterilmiştir (31, 37). Omurilik hasarı tedavisinde GDNF kullanılmasında dikkat edilmesi gereken diğer bir durum ise GDNF molekülünün verildiği zaman dilimidir. GDNF nörotrofik faktörünün hasardan hemen önce veya hasardan 1 saat sonraki zaman diliminde verildiğinde omurilik hasarı sonrası oluşan ikincil faz mekanizmalarının sebebiyet verdiği zararları azaltmış olduğu gözlemlenmiştir. Buna karşın olarak hasar oluştuktan 24 saat sonra verildiğinde ise benzer etkiler gözlemlenmemiştir (13, 28, 52). Bu çalışmalar GDNF molekülünün omurilik hasarı öncesinde verilmesinin daha etkin bir yöntem olduğunu destekleyici yöndedir.

### 4.3 Omurilik yapısı

Merkezi sinir sistemi birden fazla çeşitte sinir hücresi grubunu içerir. Bu hücre gruplarından en fazla bulunanı nöroglialardır (67, 68). Glia hücreleri de birkaç çeşittir. Bunlar astrositler, oligodendrositler, ependim hücreleri ve mikroglialardır. Astrositler ise iki formdadır. Beyaz cevherdeki ve gri cevherdeki astrositlerdir (68, 69).

Embriyolojik dönemde nöral tüp kök hücreleri iki tip hücre oluşturur daha sonra sinir sisteminin çoğunu oluşturur. Bunlar nöronlar ve glialardır. Nöral tüp nöroepitel hücrelerden oluşur ve nöral tüp kapanmasından sonra bu hücreler bölünerek nöroblastları oluştururlar (68, 70). Nöroblastlar kendi etraflarında birikerek manto tabakası (mantle layer) adı verilen nöroepitel bir katman oluştururlar ve bu manto tabakası embriyolojik gelişimin sonuna doğru omuriliğin gri cevherine dönüşür (67). Manto tabakasındaki nöroblastlar gelişerek marjinal katmanı oluştururlar. Marjinal katman omuriliğin lateral katmanıdır ve aynı zamanda bu katman embriyolojik süreçte beyin ve omuriliği kaplayan dıştan içe doğru sırasıyla dura, araknoid ve pia zarlarına dönüşür (71).

Marjinal katman sinir fiberleri içerir ve bu fiberler gelişim sürecinde miyelin kılıf ile kaplanır. Bu kaplanma marjinal katmana beyaz rengini verir ve daha sonra bu alan da omuriliğin beyaz cevherini oluşturur. Omurilik ortada kelebeksi yapıda bulunan gri cevher ve gri cevheri kenarlarda kapsayan beyaz cevher alanlarından oluşur. Beyaz cevheri contra ve ipsi bölgeler birbirlerinin simetriklerini oluşturacak şekilde dorsal funikulus, lateral funikulus ve ventral funikulus alanlarını bulundurur (70, 72, 73).

#### 4.3.1 Omurilik yolları

Omuriliğin beyin ile omurilik arasında duyuşal bağlantıyı sağlayan yolları vardır ve bunlara propriospinal bağlantılar denir. Omurilik ile merkezi sinir sisteminin diğer bölümleri ile bağlantıyı sağlayan bu yollar inen yollar ve çıkan yollar olmak üzere ikiye ayrılır (8) (74).

Çıkan yollar duyu ve motor stimulusu periferi taşıyan yollarıdır. Bu yollardan en önemlileri dorsal kolon yolları, spinotalamik yolak ve spinoserebral yollarıdır.

Dorsal kolon yolakları fasikulus grasil ve fasikulus küneat olmak üzere ikiye ayrılır. Çıkan yolaklar dorsal kök ganlion hücrelerinin merkezi aksonlarının dorsal kökten omuriliğe girişiyle oluşur (74, 75). Grasil ve kuneat yolaklar duyuşal görevlerden ve hareket etme, hareket yönü belirleme, hareket hızından sorumludur. Spinotalamik yolak ağrı ve termal uyarının iletilmesinden, dokunma ve basınç hissinden sorumludur. Spinoserebral yolak kas ve tendonlardan gelen duyunun serebelluma taşınmasından sorumludur (76).

Grasil yolak ile taşınan sinyaller merkezi sinir sistemine vücudun alt ekstremitesindeki dorsal kökten girer ve dorsal kök ganglion (DRG) aksonları ile birlikte fasikulus grasilisten geçerek taşınır (74, 77). Aksonlar medulla oblangatadaki grasilis nükleusundan geçerek medial lemniskusa gelmeden çapraz yaparak karşı tarafa geçerler (78). Yolağın rotası, talamustaki ventral posterolateral nükleusa girerek burada son bulur. Kuneat yolak ise merkezi sinir sistemine vücut alt ve üst ekstremitelerindeki dorsal köklerden girer ve fasikulus kuneatusu geçerek taşınır. Kuneat yolak medulla oblangatada kuneat nükleusuna girer ve aksonlar medial lemniskusa geçmeden çapraz yapıp karşıya geçerek talamusun ventral posterolateralinde son bulur (79, 80).

Spinotalamik yolak bütünüyle ağrının iletilmesinden sorumludur ve uyarı merkezi sinir sistemine dorsal kökten girer. Aksonlar burada posterior gri cevhere geçerek anterior veya posterior olarak yukarı doğru devam ederek talamusun ventral posterolateral nükleusunda son bulur (81). Spino serebral yolakta da uyarı merkezi sinir sistemine dorsal kökten girer ve devamında birbirine karşılıklı bulunan posterior veya anterior spinoserebral yolaklardan geçer (82). Spinoserebral yolak ventro corso funikuluslarını kullanarak serebelluma çıkar ve burada sonlanır (8, 83).

İnen yolaklar, beyinden aldıkları sinyali omuriliğe doğru kaudale taşırlar. İnen yolakların en bilinen çeşitleri kortikospinal yolak, rubrospinal yolak ve vestibülospinal yolaktır (84, 85). Kortikospinal yolak omurilik refleksi motor nöron aktivitesi ve istekli distal kas hareketi ile ilgili uyarıyı taşımaktan sorumludur (86). Kortikospinal yolak serebral korteksin 5. katman piramidal nöronlarından başlar, medulla oblangatada çapraz yaparak karşı tarafa geçer (86-88).

Buradan da lateral veya dorsal olarak hareket ile ilgili organa giderek kortikospinal yolak son bulur (89). Rubrospinal yolak lokomotor hareket ve istekli motor hareketini oluşturmak için uyarıyı ileten yolaktır (85, 90). Rubrospinal yolak red nükleusta başlar, ventral tegmental bölgesinde çapraz yaparak omurilik dorsolateraline geçer ve kaudale doğru inerek son bulur (91, 92). Vestibüspinal yolak ise postürel hareket ve uzuvlarda oluşan ekstansör hareketin oluşumundan sorumludur. Vestibüspinal yolak kaudale gitme lateral veya medial vestibüler yolak ile gerçekleşir (93, 94). Lateral vestibüler yolakta uyarı lateral vestibüler nükleustan çıkar ve aksonlar çapraz yapmadan direkt olarak sorumlu organa iner. Medial vestibüler yolakta ise uyarı medial vestibüler nükleustan çıkarak aksonlar çapraz yaparak sorumlu organa inerler (84, 85).

#### **4.3.2 Omurilik hasarı**

Omurilik hasarı travmatik veya travmatik olmayan çeşitli sebepler sonunda omuriliğin zedelenmesi durumudur. Travmatik olan omurilik hasarları motor kazaları, düşmeler, sporla ilgili yaralanmalar, medikal durumlar ve saldırıları oluşturur. Travmatik omurilik hasarının oluşma nedenlerinin büyük çoğunluğunu motor kazaları oluşturur. Travmatik olmayan omurilik hasarı yavaş ilerleyen ve içerden oluşan bir zarar durumudur (8). Travmatik olmayan omurilik hasarını omurilik kolon dejenerasyonu, omurilik iltihapları, kanser ve tümörler oluşturur.

Travmatik omurilik kazalarında omurilik üzerinde kesilmeler, kopmalar ve zedelenmeler görülür. Bu kesikler inen çıkan yollardaki aksonların iletiyi iletmesini engeller (4, 91). Bunun sonucunda da duyu ve motor fonksiyonlarında kayıplar meydana gelir. Travmatik omurilik hasarlarında vertebra kemiklerinden bir veya fazlasının kırılması sonucu omuriliğin kesilmesi veya hasar görmesi sonucu oluşur (95, 96).

Oluşan hasar sonucu omurilik bütünlüğü bozulur ve tamamlanmış veya tamamlanmamış hasara yol açar. Tamamlanmış hasarda canlı paralize olur ve tamamen bir his kaybı gerçekleşir (97). Tamamlanmamış hasarda ise her zaman paralize olunmaz ve biraz his kalır. Omurilik hasarının yol açtığı his kaybı ve paralize olma durumu hasarın omurilikte gerçekleştiği seviye ile de ilişkilidir (98).

Yapılan çalışmalarda servikal bölgede (C1-C7) gerçekleşen hasarın fonksiyonel iyileşmeyi en çok gösteren hasar tipi olduğu gösterilmiştir. Hasar seviyesi, nörolojik eksikliğin şiddetiyle korale edildiğinde, servikal ve lumbal (L1-L5) seviyelere kıyasla, torakal (T1-T12) seviyede gerçekleşen hasarların direkt olarak tamamlanmış omurilik hasarı oluşturduğu gösterilmiştir (8, 99, 100).

#### **4.3.3 Omurilik hasarı patofizyolojisi**

Omurilik hasarı iki aşamalı olarak gerçekleşen bir süreçtir ve bu aşamalar birinci, ikinci faz olarak adlandırılırlar. Birinci faz, omurilikte lokal bölgede oluşan deformasyon sonucu hasarın mekanik hasara dönüştüğü ilk aşamayı içerir (101, 102).

İkinci faz ise birinci faz sayesinde başlayan biyokimyasal ve hücrel süreçleri ve hatta bu süreçlerin hücre ölümü ile sonlandığı aşamaları içerir (103). Bu iki aşamalı gerçekleşen fazlar sayesinde omurilik hasarının patofizyolojisi, subaraknoid hemoraj, serebral ve omurilik iskemisi anlaşılmış bulunmaktadır (104, 105).

Omurilik hasarının birinci fazı hasarda ilk gerçekleşen olayları oluşturur. İlk aşamada akut olarak sıkışma, kırılma, parçalanmış vertebra veya omuriliğe gelen darbe ya da disklerin kayması gibi nedenler ile omurilik kesilir ve omurilik dokusu bütünlüğünü kaybederek bozulmaya başlar (106, 107). Hasarın olduğu bölgede aksonlar zarar görür ve nöronlar ölmeye başlar. Birinci fazın ileri evrelerinde omuriliği besleyen damarlar zarar görür ve ölen nöronlar çeşitli faktörler salgılayarak çevre nöronların ölümünü tetikleyerek hemoraj oluşmaya başlar. Bunların sonucunda membran potansiyeli bozulur, nöral dokular parçalanmaya başlar ve bu evreden sonrasında ikinci faz mekanizmaları etkilerini göstermeye başlamaktadır (108, 109). Omurilik hasarının ikinci fazı birbirini takip eden birden çok patofizyolojik olaydan oluşur. Bu patofizyolojik değişimler birkaç başlık altında kategorileştirildiğinde şu alt başlıklara ulaşılmıştır (103).

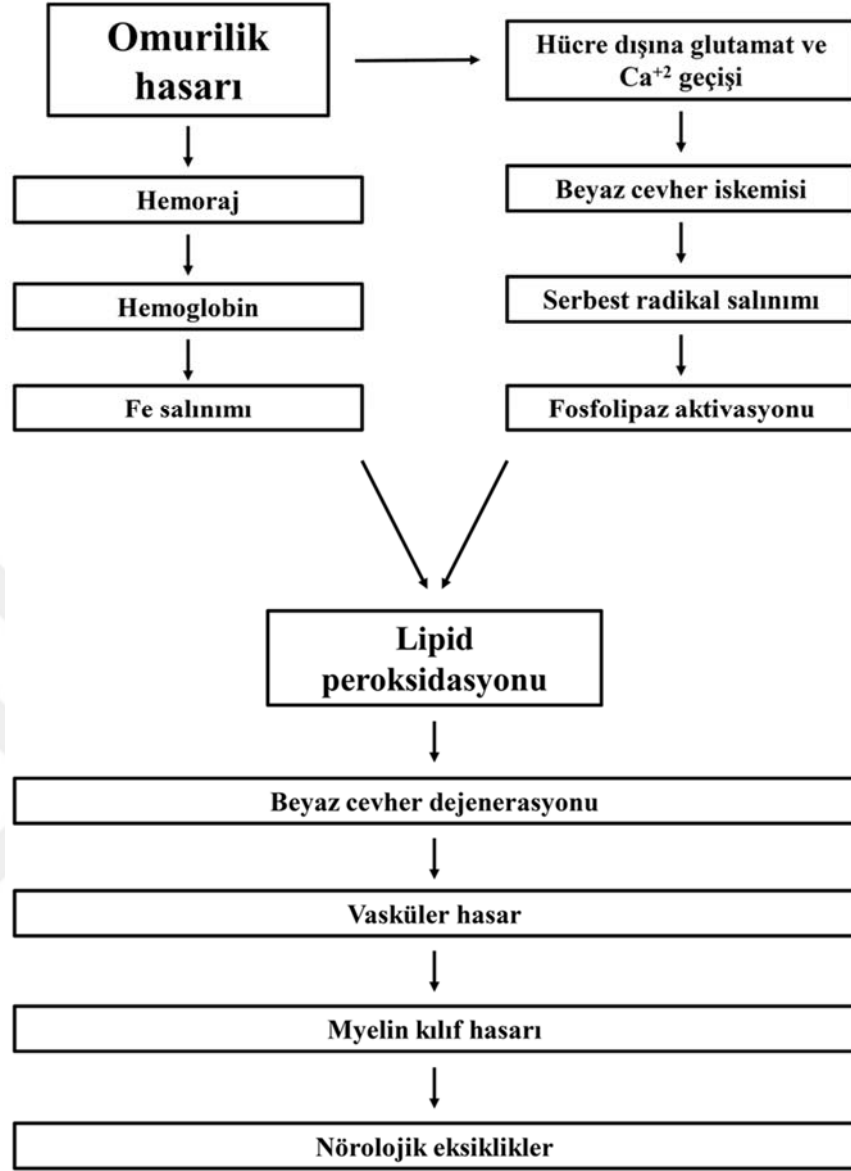
Bunlar; damar yapısındaki değişiklikler, (nörojenik şok, hemoraj, tromboz, vazospazm), iyonik değişimler (hücre içi kalsiyum artışı, hücre dışı potasyum artışı, soydum geçirgenliğinin artması), nörotransmitter birikmesi (serotonin/katekolamin artması, hücre dışı glutamat artışı, eksitotik hücre hasarı), serbest radikal üretimi ve araknoid asit salınımı (yağ peroksidasyonu), endojenöz opioid artışı, ödem oluşumu, inflamasyon, adenozin trifosfat (ATP) bağımlı hücresel süreçlerin bozulması ve son olarak da ve apoptoz oluşumudur.

İkinci faz aşamaları arasından en çok dikkati damar yapısındaki değişiklikler, serbest radikal salınımı ve apoptoz aşamaları çekmektedir (105, 110-112).

Merkezi sinir sistemi hasarlarında serbest oksijen radikallerinin oluşması ve hücre zarında yağ peroksidasyonu oluşumu en çok rastlanan moleküler süreçlerdir. Serbest radikaller ortamda bulunan moleküller oksijen sayesinde oluşurlar. Mitokondrideki tamamlanmayan elektron taşıma sistemi sırasında süperoksitler ( $O_2\cdot$ ) oluşur. Süperoksitler, süperoksit dismutaz enzimi ile birlikte toksik olan hidrojen peroksit'e ( $H_2O_2$ ) dönüşür (113, 114).

Bunu takiben,  $H_2O_2$  katalaz enzimleriyle  $H_2O$  ve Oksijene parçalanır. Ortamda hemoglobin, transferin ve ferritinden salınan serbest demir bulunduğunda düşük pH seviyesi veya oksijen radikalleri sayesinde  $H_2O_2$  yüksek reaktif hidroksil ( $HO\cdot$ ) radikallerini oluşturur. Oluşan hidroksil molekülleri kontrol altına alınmazsa, yağ peroksidasyonuna, fosfolipit enzimlerinin bozulmasına, iyonik gradiyent işleyişinin bozulmasına ve membran lizisine yol açar (113, 114).





**Şekil 4.3.3.1.** Omurilik hasarı patofizyolojisi

Serbest radikallerin salınımı ve artması ile birlikte son bulan membranda gerçekleşen yağ peroksidasyonu omurilik hasarının ilk beş dakikasında oluşmaya başlayan bir bozukluktur (115).

Omurilik hasarının birinci fazında oluşan mekanik hasar sonucu vazoaaktif amin sayesinde vazospasm gerçekleşir. Sonrasında da endotel şişerek bozulur ve vasküler damarların geçirgenliği artar (104).

Oluşan hemoraj iskemiye destekler ve bunların sonucunda da eksitatör amino asitler ve glutamat ortamda çoğalır. Glutamatlar hücre dışına çıkar ve glutamatın aracılık ettiği eksitotoksinite oluşur. Omurilikde lokal ödem oluşumunda iskemi rol oynar. Damar yapılarında gerçekleşen bu değişiklikler merkezi gri cevherin periferik gri cevhere göre daha şiddetli bir biçimde etkilenmesini sağlar (105, 116, 117).

Hücre ölümü nekroz veya apoptoz ile olur. Apoptoz ökaryotik hücrelerde gerçekleşen programlanmış hücre ölümüdür. Apoptozun merkezi sinir sistemi hasar ve rahatsızlıklarında iskemi, travma, inflamasyon ve nörodejeneratif durumlar ile ilişkisi birçok çalışma ile kanıtlanmıştır. Sistein proteinlerinden kaspazların apoptozla önemli rolü vardır (118, 119). Kaspaz-3 apoptoz yolaklarında rol alan önemli baskılayıcı substratları ayırır ve bunlar PAK2, fodrin ve gelsolindir. Kaspaz-3 aktivasyonu mitokondriden sitokrom c salınımı ve Apaf-1 ile prokaspaz-9 transaktivasyonunu gerçekleştirir (95).

Bu şekilde devam eden kaspaz-3 apoptotik yolağının üst ve alt elemanları travmatik omurilik hasarı sonrasında aktive olmuştur. Bu aktivasyon ilk olarak hasar alanındaki nöronlarda, ilerleyen saat ve günlerde de hasar alanından uzakta olan oligodendrositlerde görülmektedir (120). Oligodendrositlerin omurilik hasar sonrasında gerçekleşen apoptozun en çok gerçekleştiği nöron hücre tipi olduğu ve Wallerian dejenerasyonun gerçekleştiği alanlarda hasardan yaklaşık 24 saat ile 3 hafta arasında oluştuğu bilinmektedir (121). Bu olaylar ve Wallerian dejenerasyon aksonal demiyelinizasyona yol açar ve mikroglyalar aktive olarak oligodendrosit ölümleri oluşmaya başlar (122, 123). Burada, en çok oligodendrosit ölümü hasardan yaklaşık sekiz gün sonrasında görülür FAS ve p-75 ölüm reseptörlerinin oligodendrositlerin apoptozundan sorumlu ve aksonal dejenerasyona yol açtığı Fehlings ve arkadaşları tarafından açıklanmıştır (112, 124).

Omurilik hasarı sonrasında ikinci faz mekanizmalarından biri olarak gerçekleşen apoptoz bölgesel olarak omuriliğin inen, çıkan yolaklarında oluşan lezyonun merkezinde ve Wallerian dejenerasyon alanlarında gerçekleşmektedir (103, 125).

## 5. MATERYAL METOD

### 5.1 Deney grupları

Tez kapsamında deney hayvanlarına yapılan bütün müdahaleler ve deneyler, İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınarak yapılmıştır. Deneylerde toplam 8-12 haftalık 25-30 g ağırlığında 30 adet erkek Balb/c fareler kullanılmıştır. Deneyler boyunca her fareye aynı standart koşullar altında bakım ve müdahaleler yapılmıştır. Fareler deney öncesinde ve sonrasında uygun ortam ve koşullar içeren odalarda tutulmuştur. Bu odalar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık olacak şekilde ayarlanmış olup farelerin yem ve su erişimleri kafes içerisinde serbest olacak şekilde ayarlanmıştır.

Deney grupları farelere enjekte edilen maddelere göre şekillendirilmiştir. Projede kullanılan gruplar lentivirüs içerisinde, paketlenmiş olarak bulunan, GDNF (Glial türevli nörotrofik faktör) enjekte edilen grup ve bu grubun kontrol grubu olmak üzere boş lentivirüs (konjuge biçimde GFP içeren) enjekte edilen grup olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Her grup için n=15 adet hayvan kullanılmıştır. Kafes dizilimleri yapılırken bir kafeste üç gruptan karışık olarak hayvan olmasına dikkat edilmiştir ve kafes içerisinde hayvan sayısı n=5 olarak sabit tutulmuştur. Toplam 6 kafes olarak hayvanlar bu düzende rastgele seçilerek oluşturulmuştur. Grup adlandırılmaları enjekte edilen maddeler ile doğru orantılıdır. Grup içerikleri aşağıdaki gibidir;

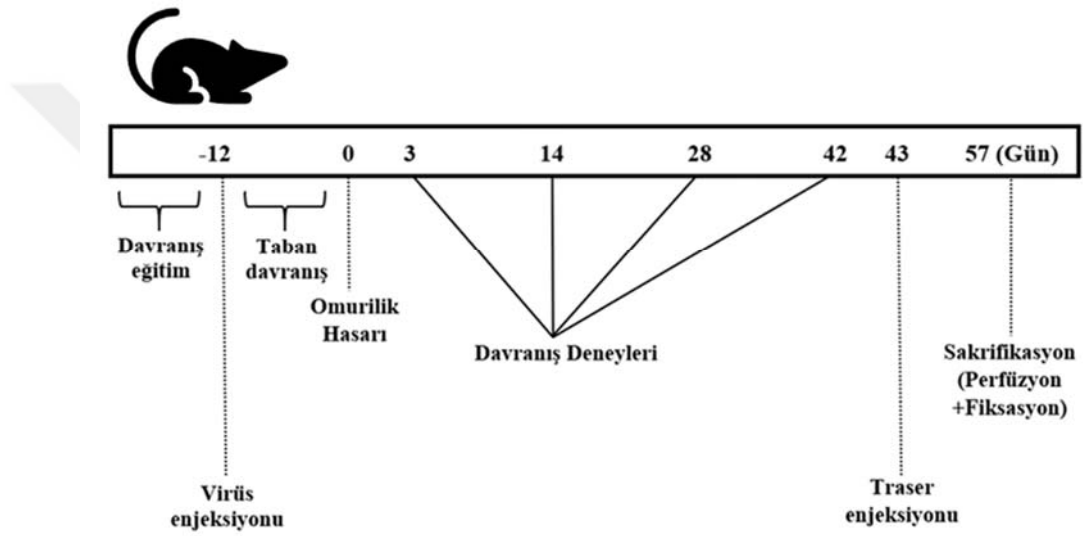
Deneylerde GDNF protein seviyesini arttırmak amacıyla GDNF'nin gen kodlama bölgesi p-Lenti-CMV lentiviral vektöre klonlanmış ve virüs üretilmiştir. Bu amaçla, farelerde GDNF seviyesi artırılarak omurilik hasarı sonrası uzun dönem etkisini inceleyebilmek amacıyla bu tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerde iki farklı grup oluşturulmuştur. Bu gruplar;

**GDNF (Glial türevli nörotrofik faktör) grubu:** Bu grup hayvanlarına GDNF molekülü, p-Lenti vektör içerisine yerleştirilmiş olarak 4µl/hayvan miktarında cam mikroiğne kullanılarak enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir.

**Kontrol grubu:** Bu grup GDNF grubunun kontrolü olması için oluşturulmuştur. GDNF lentivirüsünün içerisinde vektöre konjuge biçimde bulunan GFP molekülünün tek başına beklenen etkiyi yapıp yapmadığını anlamak için dizayn edilmiştir. Kontrol grubu hayvanlarına da 4µl/hayvan olacak şekilde cam mikroenjeksiyon iğneleri (Hamilton) kullanılarak enjeksiyon yapılmıştır.

## 5.2 Deney Dizaynı

Deney planının ve gidişatının şematige uyarlanmış hali aşağıdaki gibidir;



**Şekil 5.2.1 Deney dizaynı.** Yukarıdaki şekil projenin yalnızca virüs, enjeksiyonu, omurilik hasar modeli ve davranış deneyi aşamalarının günlere göre planlanmış halini gösterir. Davranış eğitim bölümü sadece merdiven yürüme testi için bir gün öğrenmeyi takiben iki gün eğitim olmak üzere peş peşe 3 gün boyunca yapılmıştır. Virüs enjeksiyonu hasardan 12 gün önce yapılmıştır ve davranış eğitimleri virüs enjeksiyonundan önce verilmiştir. Virüs enjeksiyonu ile hasar arasında taban davranış deneyleri yapılmıştır. Omurilik hasarından itibaren 3, 14, 28 ve 42. günlerde davranış deneyleri yapılmıştır. 43. günde traser enjeksiyonu yapılarak 14 gün sonra hayvanlar sakrifiye edilmiştir.

### 5.3. GDNF Lentivirus üretimi

pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektöründe GFP entegre halde bulunduğu için GFP deney gruplarında kullanılan virüs pLenti virüsünün boş halde paketlenmiş halidir. Bu sebeple lentivirüs üretim aşamaları sadece GDNF-pLenti virüs için açıklanmıştır.

#### 5.3.1. Hücreden RNA izolasyonu

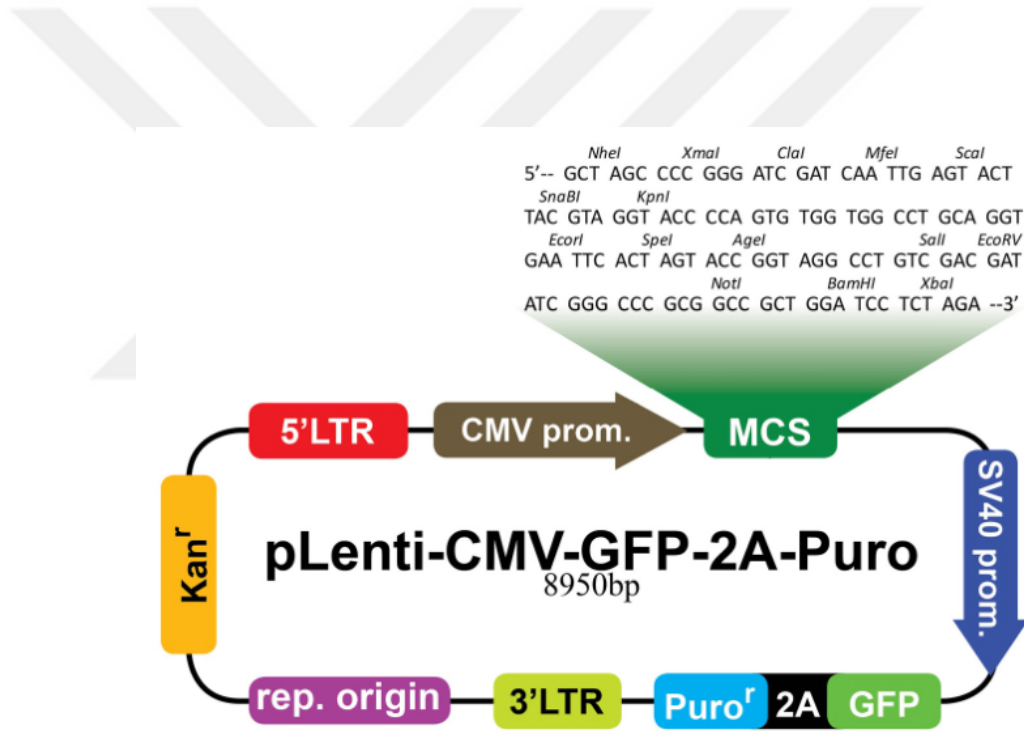
Hücre kültürü için SH-SY5Y hücreleri kullanılarak ilk etapta bu hücrelerden RNA izolasyonu (11828665001; High pure RNA isolation kit, Roche, Switzerland) gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; yaklaşık  $10^6$  hücre 500 µl TRIzol (15596026; Thermo Fisher Scientific, USA) ile muamele edilmiştir. Bu aşamayı takiben mekanik bir etki oluşturmak için, hücrelere pipetleme işlemi yapılmıştır. Daha sonra bu solüsyona kloroform (288306; Sigma Aldrich, USA) eklenmiştir ve çok güçlü bir şekilde pipetleme işlemi yapılmıştır. Bu solüsyon 14.000 rpm'de ve 4 °C 'de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonunda süpernatant (çözeltinin üst fazı) ayrı bir tüpe alınmıştır. Sonrasında, 600 µl absolute ethanol eklenerek bu solüsyon DNA ayrıştırıcı kolonlara aktarıldıktan sonra oda sıcaklığında 14.000 rpm'de 3 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Yıkama ve santrifüj işlemlerinden sonra 100 µl nükleaz içermeyen H<sub>2</sub>O ile RNA ayrıştırılmıştır. İzole edilen RNA konsantrasyonu spektrofotometre (51119200; Multiskan<sup>TM</sup> go microplate reader, Thermo Fisher Scientific, USA) ile ölçülmüştür. Elde edilen RNA'lar 1µg/µl olacak şekilde hesaplanmış ve bir sonraki adımda 1 µg/µl RNA cDNA sentezi için kullanılmıştır.

#### 5.3.2. cDNA sentezi

Bu aşamada elde edilen RNA örneklerinden (04896866001; Roche, Switzerland) cDNA sentezi reaksiyonu termal döngü cihazı (T100<sup>TM</sup>; Bio-Rad, USA) ile gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon için kullanılan ürünler ve miktarları: 10,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 4,0 µl 5X Ters transkriptaz polimeraz, 0,5 µl RNaz inhibitörü, 2,0 µl dNTP karışımı, 0,5 µl Oligo dT primerleri, 1,0 µl random primerler, 0,5 µl ters transkriptaz, 1,0 µl RNA (1 µg/ µl). Hazırlanan reaksiyon örneklerinden termal döngü cihazı kullanılarak (50 °C' de 60 dakika sonra 85 °C'de 5 dakikada inkübe) cDNA elde edilmiştir ve 4 °C'de kullanılabilecek kadar muhafaza edilmiştir.

### 5.3.3. Primer dizaynı

Bu çalışmada *Homo sapiens* GDNF (NCBI referans sekans NM\_000514.3) geninin kodlama bölgesi SH-SY5Y cDNA'sından ileri primer ve geri primer kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu vasıtasıyla çoğaltılması amaçlanmıştır. Elde edilen GDNF gen dizisi pLenti-CMV-GFP-2A-Puro (şekil 5.3.3.1) (pLenti-CMV-GFP-2A-Puro; Applied Biological Materials, Canada) vektörüne klonlanmıştır. Bu amaçla pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektörünün çoklu klonlama bölgesinde yer alan uygun restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Bu bilgiler dahilinde dizayn edilen primerler ve restriksiyon enzim kesme bölümleri aşağıda gösterilmiştir (tablo 5.3.3.1).



Şekil 5.3.3.1. pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vektör

**Tablo 5.3.3.1.** GDNF klonlama ürünleri.

	<b>Forward Primer</b>	<b>Reverse Primer</b>
<b>Sekans</b>	5'-AGTCA GGTACC ATG AAG TTA TGG GAT GTC GTGG- 3'	5'-AGTCA CGGCCGC GGAG TCA GAT ACA TCC ACA CC- 3'
<b>Restriksiyon Enzimi</b>	KpnI	NotI
<b>Restriksiyon Enzim sekansı</b>	5'-ATG AAG TTA TGG GAT GTC GTGG -3'	5'-GGAG TCA GAT ACA TCC ACA CC- 3'
<b>Toplam uzunluk (bp)</b>	33	34
<b>GC yüzde miktarı</b>	45	52
<b>T<sub>m</sub> değeri (°C)</b>	64	64

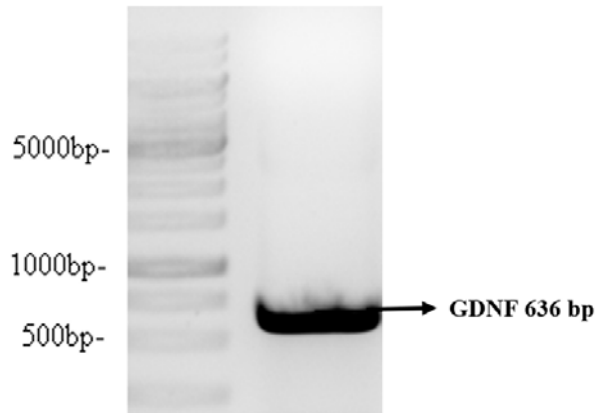
#### **5.3.4. GDNF üretimi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) karışımı için iProof High-Fidelity PCR kiti (172-5330, Bio-Rad, USA) kullanılmıştır. Reaksiyonda kullanılan ürünler ve miktarları şu şekildedir; cDNA 2,0 µl, Primer forward 0,4 µl, Primer reverse 0,4 µl, iProof Polymerase 0,2 µl, 5x High Fidelity Buffer 4,0 µl, dNTP mix 0,4 µl, H<sub>2</sub>O 12,6 µl. Reaksiyonda kullanılan ürünlerin toplam hacimi 20,0 µl'dir. PZR reaksiyonu için kullanılan termal döngü (T100TM; Bio-Rad, USA) ise tablo 5.3.4.1.'de gösterildiği gibidir.

**Tablo 5.3.4.1.** PZR reaksiyon koşulları.

Aşama	Zaman	Isı
İlk denatürasyon	30 saniye	98°C
Denatürasyon	15 saniye	98°C
Ayrıştırma	30 saniye	98°C
Geniřletme	2 dakika	72°C
Son geniřletme	5 dakika	72°C
Son bekleme	Ürün kullanılana kadar	4°C

PZR ürünleri elde edildikten sonra bu ürünler 6x yükleme boyası (R0631; Thermo Fisher Scientific, USA) ile karıştırılarak yüzde bir oranında hazırlanan agaroz jel'e (Invitrogen, 16500500) yüklenmiştir. Burada 1kb DNA işaretleyici (SM1173; O'GeneRuller-ready to use, Thermo Fisher Scientific, USA) GDNF ölçüsüne referans vermesi için GDNF ürününün soluna yüklenmiştir. Agaroz jel 120V voltajında boya yaklaşık olarak tüm jelin yukarıdan aşağı yüzde 75'ini geçecek kadar yürütölmüştür. Daha sonra agaroz jel Biorad Chemidoc görüntü cihazında (1708280; Biorad Life Sciences Research, USA) görüntölenmiştir.



**şekil 5.3.4.1.** GDNF Agaroz jel görüntüsü



### **5.3.5 Agaroz jelden GDNF DNA ürünü izolasyonu**

Bu aşamada agaroz jel üzerinde görüntülenen 636 bp büyüklüğünde GDNF ürünü jelden kesilerek DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu izolasyon aşağıda açıklanan protokol ile gerçekleştirilmiştir.

İlk önce jel üzerinde GDNF bantlarının bulunduğu alanlar kesilmiştir. Bu jel parçacıkları tartılarak ağırlıklarına göre değişken miktarlarda jel çözücü sıvı (K2100-12; Thermo Fisher, USA) eklenerek 50 °C su banyosunda jeller tamamen çözünene kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında jel çözücü solüsyon ile aynı miktarda olacak şekilde isopropanol (marka vs) eklenmiştir. Elde edilen karışım; içerisinde kolonlar bulunan toplayıcı tüplere aktarılmıştır ve 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda kolonlar yıkama solüsyonu ile yıkanmıştır ve tekrar 14.000 g'de 1 dakika süresince santrifüj edilmiştir. Bu işlem santrifüj miktarlarında değişiklik yapılmadan 2 kez daha uygulanmıştır. Son olarak, kolonlara DNA ayrıştırıcı solüsyon eklenerek 14.000 g'de 2 dakika süresince santrifüj edildikten sonra DNA izole edilmiştir.

### **5.4.6. PZR ürünü GDNF DNA ve Plenti vektörünün çift kesme reaksiyonu**

Bu aşamada elde edilen GDNF DNA ürünü ile Plenti vektörünün birbirine entegre edilmesi için ilk önce bu iki ürün çift kesme reaksiyona sokulmuştur. GDNF PZR ürünü ve pLenti-CMV-GFP-2A-Puro vector çift kesme için NotI-Yüksek uygunlukta (FD0593, ThermoFisher Scientific, USA) ve KpnI-Yüksek uygunlukta (FD0524, ThermoFisher Scientific, USA) bulunan restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Reaksiyonda kullanılan ürünler tablo 5.3.6.1'de gösterilmiştir. Tablodaki ürünler oluşturulduktan sonra 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Son olarak inkübasyondan sonra 80°C'de 5 dakika süreyle ısı inaktivasyonu gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 5.3.6.1** Çift kesme reaksiyonu ürünleri

	<b>pLenti (µl)</b>	<b>GDNF (µl)</b>
<b>Ürün</b>	5,0 (1 µg/ µl)	12,0
<b>10X Solüsyon</b>	2,0	2,0
<b>Not I</b>	1,0	1,0
<b>KpnI</b>	1,0	1,0
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	11,0	4,0
<b>Toplam</b>	20,0	20,0

### **5.3.7 GDNF ve pLenti Plazmid DNA Pürifikasyonu**

Bu bölümde ilk başta daha önceki bölümde kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri ve reaksiyon solüsyonlarının eliminasyonu yapılmıştır. Bu işlem için spesifik bir kit K310001; Thermo Fischer, USA kullanılmıştır. GDNF PZR ürünü ve pLenti vektörüne başlangıç hacimlerinin çeyreği kadar olacak miktarda bağlanma solüsyonu eklenerek süreç başlamıştır. Daha sonra solüsyonlar filtrelili tüplere koyularak 14.000 g'de 1 dakika oda sıcaklığında sentrifüj edilmiştir. Bu süreci takiben filtrelili kolonlara yıkama solüsyonu eklenerek ilk başta 14.00 g'de 1 dakika ve devamında 14.000 g'de 2 dakika olmak üzere yıkama aşamaları gerçekleştirilmiştir.

Son olarak ürünü ayırtırmak için distile su eklenerek 14.000 g'de 1 dakika sentrifüj edilmiştir. Elde edilen pürifike olmuş ürünlerin konsantrasyonunu ölçmek için NanoFotometre (P300, Implen, Germany) kullanılmıştır. GDNF konsantrasyonu 150 ng/µl ve pLenti konsantrasyonu ise 91 ng/µl miktarında ölçülmüştür.

### **5.3.8 GDNF VE pLenti vektörünün bağlanma reaksiyonu**

Pürifikasyon sonucu elde edilmiş olan GDNF ve pLenti-CMV-GFP-2A-Puro T4 DNA ligaz enzimi (M0202S; New England Biolabs, UK) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Burada ihtiyaç duyulan DNA miktarları Nebiocalculator (Version 1.9.0; New England Biolabs, UK) yardımıyla hesaplanmıştır. Şekil 5.3.8.1. hesaplanan miktarları göstermektedir.

Insert DNA length	<input type="text" value="636"/> kb	Required insert DNA mass	<input type="text" value="3.553 ng (1:1)"/>
Vector DNA length	<input type="text" value="8950"/> kb		<input type="text" value="7.106 ng (2:1)"/>
Vector DNA mass	<input type="text" value="50"/> ng		<input type="text" value="10.66 ng (3:1)"/>
			<input type="text" value="17.77 ng (5:1)"/>
			<input type="text" value="24.87 ng (7:1)"/>

### Şekil 5.3.8.1 pLenti vektörünün bağlanma reaksiyonu miktarları

Bu hesapları göz önünde bulundurarak aşağıdaki tabloda gösterilen oranlarda ürünler oluşturulmuştur.

**Tablo 5.3.8.1.** Plazmid ekspresyonu için gerekli olan ürünler ve oranları

	1:1	3:1	5:1	7:1
pLenti	1,10 µl	1,10 µl	1,10 µl	1,10 µl
GDNF	0,47 µl	1,42 µl	2,36 µl	3,31 µl
T4 ligaz	0,50 µl	0,50 µl	0,50 µl	0,50 µl
5x Solüsyon	2,00 µl	2,00 µl	2,00 µl	2,00 µl
ddH <sub>2</sub> O	6,03 µl	4,98 µl	4,04 µl	3,09 µl
Toplam	10,00 µl	10,00 µl	10,00 µl	10,00 µl

Tablo 5.3.8.1' deki ürünler oluşturulup 22°C' de 5 dakika inkübasyonları yapılmıştır.

### 5.3.9 Kompetent bakteri üretimi

Çözülmüş *Escherichia coli* hücreleri antibiyotik içermeyen katı LB agar (A8523, Biomatik, USA) üzerine yayılmıştır. Oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 37 °C inkübatörde gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün agar yüzeyinden bir koloni seçilerek 5 ml LB sıvı besiyerine (A8523, Biomatik, USA) eklenmiştir. Hücreler 37 °C'de 150 rpm çalkalayıcı üzerinde gece boyunca inkübe edildi.

Elde edilen hücre süspansiyonundan 1 ml alınarak 100 ml yeni hazırlanmış LB besiyerine eklenerek 37 °C'de 150 rpm'de çalkalayıcı üzerinde de 2,5 saat inkübe edilmiştir. Bu işlem sonunda optikal densite (OD) 600 nm ve 0,3 olarak ölçülmüştür. Bu değer onaylanan bir değer olarak kabul edilmiştir. Devamı olarak, bakteri süspansiyonu 50 ml falkon tüplerine bölünerek ve buz üzerinde 5 dakika inkübe edilmiştir. Falkon tüpleri 5.000 rpm'de 5 dakika sentrifüj edilerek elde edilen supernatant atılmıştır.

Geride kalan pellet'e pipetaj yapılmıştır ve buzda soğutulmuş CaCl<sub>2</sub> (100 mM) ile tekrar süspansiyon edilerek yeni falkon tüpüne alınarak süspansiyon 20 ml CaCl<sub>2</sub> (100 mM) ile tamamlanmıştır. Bu hücre solüsyonu +4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Sonraki gün, hücre solüsyonu 3000g'de 5 dakika boyunca sentrifüj edilmiştir. Tüplerde elde edilen supernatant atılarak pellet buzda soğutulmuş 2 ml CaCl<sub>2</sub> (100 mM) ile çözülmüştür.

### **5.3.10 Transformasyon**

Elli µl kompotent bakteri solüsyonu ve 1 µl GDNF ligasyon karışımı 1.5 ependorf tüplerine eklenerek buz üzerinde 30 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Hemen sonrasında hücreler 42°C sıcaklığında su banyosunda 60 saniye tutularak ısı şokuna sokulmuştur. Bu işlemin sonunda örnekler buz üzerinde 2 dakika boyunca soğutulmuştur. Devamı olarak, 250 µl LB besiyeri süspansiyon üzerine eklenerek 37 °C 'de 1 saat boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Sonra, bakteri süspansiyonları kanamisin (14100; Pan Biotech, Germany içeren) LB agar tabaklarına eklenip 37 °C' de gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün 5 pozitif koloni seçilerek içinde kanamycin bulunan 5ml LB besiyerine eklenmiştir.

Bakteri miktarını arttırmak amacıyla, süspansiyon gece boyunca inkübe edilmiştir. Ertesi gün, bakterilerden plazmid izolasyonu kit (11754777001; High pure plazmid isolation kit, Roche, Switzerland) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **5.3.11 Plazmid İzolasyonu**

Bir önceki aşamada elde edilen bakteriler +4°C'de 5.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir.

Sonrasında elde edilen üründe supernatant atılarak pellet 250 µl süspansiyon çözeltisinde (#11754777001; High pure plazmid isolation kit, Roche, Switzerland) tekrar çözülmüştür. Hücre solüsyonuna 250 µl lysis tampon solüsyonu eklenerek çözelti 1,5 ml ependorf tüplerine aktarılmıştır. Elde edilen ürün oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiş ve bu sürede yavaş bir şekilde çalkalanmıştır. Sonrasında, 350 µl bağlayıcı tampon solüsyonu eklenmiştir ve tüpler yavaşça çalkalanarak 5 dakika boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. Devam eden aşamada, tüpler oda sıcaklığında, 14.000 g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve elde edilen supernatantlar toplama tüplerindeki kolonlara transfer edilmiştir.

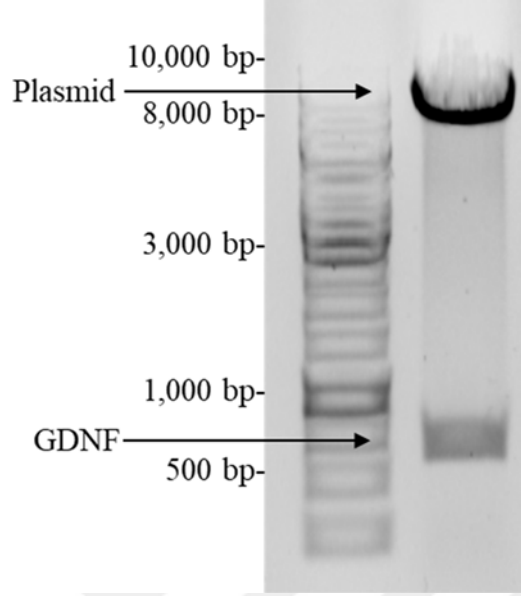
Bir dakikalık bir inkübasyondan sonra oda sıcaklığında, 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpler temizlenerek 500 µl yıkama 1 tampon solüsyonu eklenmiştir ve oda sıcaklığında 14.000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, tüpler temizlenerek bu sefer 700 µl yıkama 2 tampon oda sıcaklığında 14.000 g'de 2 dakika santrifüj edilmiştir. Plazmid DNA içeren tüplerin içindeki kolonlar temiz ependorf tüplere alınmıştır ve kolonların üzerlerine 50 µl ayrıştırıcı tampon solüsyon eklenip 1 dakika süresince inkübe edilmiştir. Tüplerin içindeki kolonlar 14.000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu santrifüj sonunda tüpte toplanan ürün tekrardan kolona eklenerek 14.000 g'de 2 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonunda tüpte toplanan solüsyon artık plazmid DNA 'sını içermektedir.

### **5.3.12 DNA'nın varlığının restriksiyon enzimleri ile doğrulanması**

Moleküler klonlama çalışmaları sonrasında *Homo sapiens* GDNF transkriptinin varlığını doğrulamak için tekrar bir çift kesme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonda, 6,0 µl plazmid, 0,5 µl KpnI, 0,5 µl NotI, 2,0 µl 10x tampon solüsyonu, 11,00 µl ddH<sub>2</sub>O kullanılmıştır. Bu reaksiyonun toplam miktarı 20,0 µl olmuştur.

Bir saat inkübasyon sonucunda ürünler 6x yükleme boyası (R0631; Thermo Fisher Scientific) ile karıştırılarak yüzde 1'lik agaroz jel'e yüklenmiştir. GDNF ve pLenti vektörüne referans olması için agaroz jel'de sol tarafa 1 kb'lık DNA marker (Thermo Scientific O'GeneRuller- ready to use) yüklenmiştir. Agaroz jel 120V voltajında yüklenen ürünlerdeki boyalar agaroz jel'in yaklaşık yüzde 75'ine gelecek kadar yürütülmüştür.

Agaroz jel Biorad Chemidoc cihazı (1708280; Biorad Life Sciences Research, USA) kullanarak görüntülenmiştir. Şekil 5.3.12.1. gösterildiği gibi bu aşama sonucunda plazmidlerin GDNF içerdiği büyüklüğü belirtilerek gösterilmiştir.



Şekil 5.3.12.1 Plazmid ve GDNF Agaroz jel görüntüsü

### 5.3.13. Plazmid vektörlerinin amplifikasyonu

Lenti-virüs paketlemesi için ikinci nesil lenti-viral vektör sistemi kullanılmıştır; VSV-G proteinini kodlayan pMD2.G ve sadece regülasyon bölümü olan psPAX (12259; 12260, Addgene, UK). Plazmid üretimi ve izolasyonu protokolleri yukarıda bölüm 5.3.11' de açıklandığı gibi kullanılmıştır.

### 5.3.14. Lenti-virüs paketlenmesi ve üretilmesi

İlk olarak  $3.5 \times 10^6$  293T hücre hattı 10 cm doku kültürü flasklarına 12 ml besiyeri Dulbecco's modified medium (DMEM; P04-01158, Pan Biotech, Germany) eklenerek inkubatöründe CO<sub>2</sub> (%5 CO<sub>2</sub>, 37 °C) gece boyunca inkübe edilmiştir. Sonraki gün, Lipofectamine 3000 reagent (3000001; Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak transfeksiyon yapılmıştır. Reaksiyon karışımı Opti-MEM hücre kültür besiyeri (31985062, Thermo Fisher Scientific, USA) içerisinde hazırlanmıştır. A ve B olmak üzere iki tüp hazırlanmıştır.

A tüpünde, 41,0 µl Lipofectamin 3000 (L3000) reagent ve 1.459,0 µl Optimem olmak üzere toplam 1.500,0 µl ürün bulunmaktadır. B tüpünde ise, 7,0 µl (0.5 µg/ µl) pMD2.G, 7,0 µl (1.0 µg/ µl) psPAX, 7,0 µl (1.0 µg/ µl) pLenti, 35,0 µl P3000 reagent ve 1.444,0 µl Optimem olmak üzere toplam 1.500,0 µl ürün bulunmaktadır.

A tüpü B tüpüne transfer edilerek karıştırılıp 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 10 cm doku kültür flask'ından 6 ml besiyeri alınarak atılmıştır. Hazırlanan karışım 10 cm doku kültür flask'ına yavaşça damlatarak eklenmiştir ve CO<sub>2</sub> inkübatöründe 6 saat inkübe edilmiştir. 6 saat sonunda flask içindeki besiyeri 12 ml temiz DMEM besiyeri ile değiştirilerek flask CO<sub>2</sub> inkübatörüne geri konarak 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatin sonunda flasktan tüm besiyer çekilerek 4 °C'de saklanmıştır. Flask üzerine temiz 12 ml DMEM aktarılmıştır ve yaklaşık 52 saat boyunca CO<sub>2</sub> inkübatörüne koyulmuştur. Bu süreç sonunda tekrar tüm besiyeri çekilmiştir ve bir önceki çekilen ve 4 °C'de saklanan besiyeri ile birleştirilmiştir. Tüm ürün 2.000 rpm de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Sonrasında, 0,45 µm düşük bağlanma filtresinden geçilerek hücre artıklarından arındırılmıştır.

Elde edilen virüs karışımı ultrasantrifüj (Beckman Coulter, SW28) tüplerine aktarılarak 100.000 g'de 2 saat boyunca santrifüj edilmiştir. Virüs parçacıklarını içeren pellet kalsiyum ve magnezyum içermeyen DPBS Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (DPBS; P04-3650, Pan Biotech, Germany) içerisinde çözülmüştür. Bu aşamalar sonucunda GDNF entegre olmuş pLenti virüs elde edilmiştir.

### **5.3.15. Virüs Titrasyonunun belirlenmesi**

HeLa hücreleri bir kuyusunda  $4 \times 10^5$  olacak şekilde 12-kuyulu plakaya ekilmiştir ve CO<sub>2</sub> inkübatöründe yaklaşık 20 saat süresince inkübe edilmiştir. Sonraki gün, virüs parçacıklarını içeren 10 aşamalı ( $10^{-1}$  - $10^{-4}$ ) birbirini takip eden ve total hacmi 2ml olan dilüsyonlar koni şeklindeki viyallerde gerçekleştirilmiştir. Dilüe edilen örnekler viyal tüpler el ile ters-düz yapılarak iyice karıştırılmıştır. Bu dilüsyon örneklerinin her birinden 1 ml alınarak 12-kuyulu kültür plakasına eklenmiştir ve CO<sub>2</sub> inkübatöründe yaklaşık 20 saat inkübe edilmiştir. Örneklerden GFP (Green-Fluorescent-Protein) ekspresyonu gözlemleninceye kadar her 2.3 günde bir 12-kuyulu plate içerisindeki besi yeri değiştirilip temiz besi yeri eklenmiştir.

GFP ekspresyonu gözlemlendiğinde hücrelere tripsin (GIBCO, 3197) eklenerek besi yeri inaktif hale getirilmiştir. 12-kuyuluk plakalardan tripsin ile kaldırılıp toplanan hücreler soğuk PBS içerisinde çözülmüştür. Sonrasında PBS içinde çözülmüş olan hücrelere FACS (fluorescence activated cell sorting) analizi uygulanmıştır (BD influx cell sorter with bioprotect IV safety cabinet, BD Bioscience).

Devam eden aşamada, buz soğukluğunda %2 formaldehit solüsyonundan 500 µl alınarak hücrelere eklenmiştir. Hücreler 4°C 'de 10-60 dakika inkübe edilmiştir ve sonrasında 4°C'de 1.000 rpm' de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda oluşan supernatant atılarak hücreler PBS ile yıkanmıştır ve üzerlerine 1ml miktarında ve 70% konsantrasyonunda etanol eklenerek 4 °C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Sonraki gün, GFP ekspresyonu analizi akış sitometrisi ile hücrelerdeki GFP pozitif hücrelerin yüzdesini ölçerek yapılmıştır. Virüs titrasyonunu saptamak için GFP ekspresyonunu 1 ile 20 yüzdesinde bulunduran kuyular kullanılmıştır.

Bu işlemler sonucunda pLenti-GDNF vektörüne kodlanmış GFP proteinini ifade eden 293T hücreleri elde edilerek virüs titrasyonu gerçekleştirilmiştir.

#### **5.4 Lentiviral Virüs Enjeksiyonu**

Lentiviral virüs enjeksiyonu tüm deney dizaynının ve sıralamasının ilk basamağını oluşturmaktadır. Enjeksiyon için hayvanlar anestezide alınmıştır. 25-30 g ağırlığında 8-12 haftalık erkek Balb/c farelere 400 mg/kg olacak şekilde kloral hidrat (Fluka, 23100 2509) anestezisi intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve fareler anestezide alınmıştır. Anestezi altındaki farelerin öncelikle sırt bölgesindeki tüyler tıraşlanıp batikon ile dezenfekte edilmiştir. Hayvanlar hemen sonrasında stereotaksik sabitleyiciye (World Precision Instruments) torokal vertebra seviyesi sabit tutulacak şekilde yerleştirilmiştir. Fareler dorsal median hat üzerinde dışarıdan el ile gözlemlendiğinde en sivri gözüken Processus spinosus baz alınarak deriye 2-3 cm kesik atılarak deri altına geçiş yapılmıştır. Enjeksiyon yapılacak bölgeler hasar bölgesi olacak olan bölge (T12) ortada kalacak şekilde rostralde T9 ve caudalde L2 olarak kararlaştırılmıştır. T9 vertebra seviyesinin lokalizasyonu, on üçüncü yüzen kostanın el ile kontrol edilip belirlenmesinin ardından bu kostaya karşılık gelen vertebra T13 olmak üzere bu seviyeden 4 vertebra seviyesi yukarı çıkılarak bulunmuştur.



Aynı şekilde yüzen kostaya karşılık gelen T13 vertebra aşağı inilerek de L2 vertebraşının lokalizasyonu bulunmuştur.

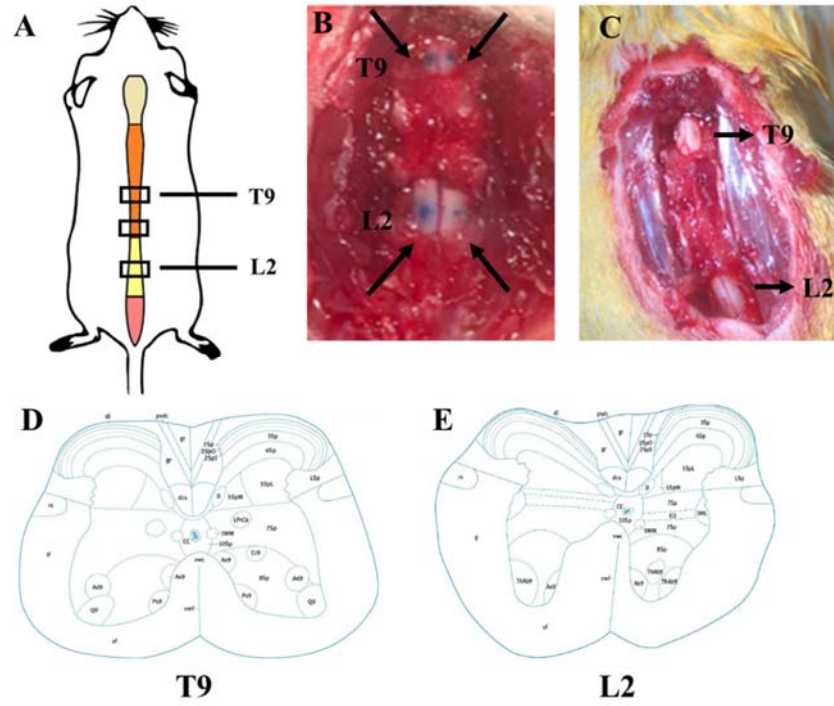
Deri altına geçiş yapıp, lokalizasyonlar belirlendikten sonra ilk olarak T9 bölgesinden sırasıyla Thoracolumbar fascia, Latissimus dorsi ve Erector spinae ensize edilmiştir. Daha sonra vertebraları birbirine bağlayan Lig. Supraspinale ve Lig.flavum 11 numaralı bistüri ucuyla dissekte edilip T9 vertebraşına laminektomi uygulanarak medulla spinalisi çevreleyen dura mater'e ulaşılmıştır.

Aynı aşamalar ve dokular ensize edilerek L2 seviyesindeki omuriliğe de L2 vertebraşını laminektomisi ile ulaşılmıştır.

Enjeksiyon işlemin cam mikroenjeksiyon iğneleri (Hamilton) kullanılarak ve spinal kord üzerine dorsal spinal ven'in hem sol hem sağ lateral kısımlardan yapılmak üzere T9 seviyesi için iki tarafa ve aynı şekilde L2 seviyesi için iki tarafa olmak üzere toplamda 4 lateral bölgeye enjeksiyon yapılmıştır.

**Tablo 5.4.1** Lentivirüs enjeksiyon miktarları.

	<b>Omurilik sağ lateral</b>	<b>Omurilik sol lateral</b>
<b>Kontrol</b>	<b>2µl</b>	<b>2µl</b>
<b>GDNF</b>	<b>2µl</b>	<b>2µl</b>

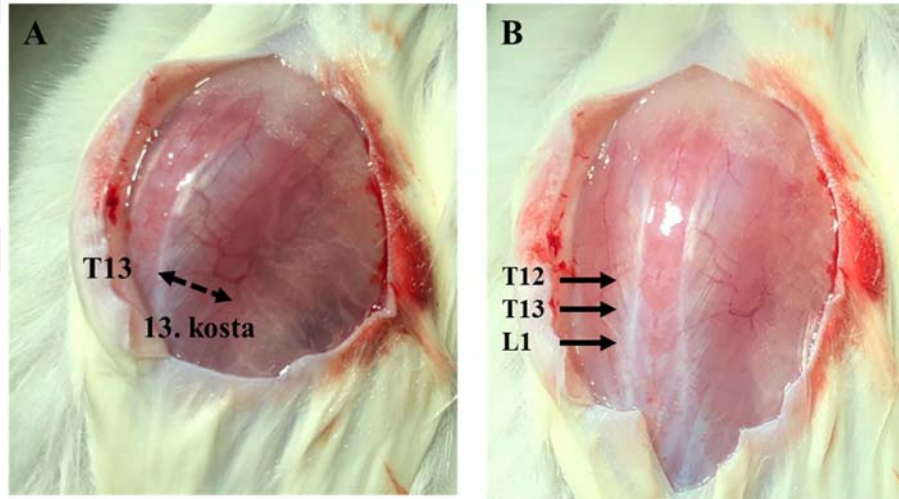


**Resim 5.4.1.** Virüs enjeksiyonu bölgeleri. (A) Virüs enjeksiyonu bölgeleri şematik, T9: Torakal 9 L2: Lumbal 2. (B) Virüs enjeksiyonu T9 ve L2 için BBG (Brilliant Blue G) boyası ile sol ve sağ lateral bölgelerini deneme aşaması (C) T9 ve L2 için yapılan gerçek enjeksiyondan bir görüntü. (D) T9 bölgesinin fare omurilik atlasındaki enine görüntüsü. (E) L2 bölgesinin fare omurilik atlasındaki enine görüntüsü (126).

GDNF ve Kontrol grup enjeksiyonları sağ ve sol lateral bölgelere dakikada 1 ul olacak biçimde tablo 5.4.1’de açıklandığı miktarlarda gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyonlar sonunda laminektomi ile açılan vertebra ve insize edilen kas dokuları omuriliğe zarar vermeyecek şekilde dikkatlice kapatılmıştır. Enjeksiyon bölgeleri ve enjeksiyonun nasıl yapıldığı şekil 5.4.1’de gösterildiği biçimdedir. İç kısımda dokular vikril iplik (W9561, Ethicon) ile deri ise 5.0 ipek iplik (S2160, Doğan) ile dikilmiştir. Enjeksiyon sonrasında hayvanlar ısıtıcılı battaniye (yaklaşık olarak 37°C sıcaklığına ayarlanmış) üzerindeki kafeslere alınmıştır ve uyanana kadar gözlemlenmişlerdir. Hayvanlar uyandıktan sonra besin ve sularına rahat erişebilmeleri amacıyla kafesleri, kafes altlığı fazla olan ve uzanma mesafesi uzun olan suluklar kafeslere alınmışlardır.

## 5.5. Spinal Kord Hasar Modeli

Spinal kord hasarı lentiviral virüs enjeksiyonunu takiben 12 gün sonra yapılmıştır. Spinal kord yarı kesik modeli için 25-30 g ağırlığında 8-12 haftalık erkek Balb/c farelere 400 mg/kg olacak şekilde %7 kloral hidrat (Fluka 23100) çözeltisi intraperitonel olarak enjekte edilmiş ve fareler anestezide alınmıştır. Anestezide altındaki farelerin öncelikle sırt bölgesindeki tüyler tıraşlanıp batikon ile dezenfekte edilmiştir. Hayvanlar hemen sonrasında stereotaksik sabitleyiciye (World Precision Instruments) torakal vertebra seviyesi sabit tutulacak şekilde yerleştirilmiştir. Fareler dorsal median hat üzerinde dışarıdan el ile gözlemlendiğinde en sivri gözüken Processus spinosus baz alınarak deriye 2-3 cm kesik atılarak deri altına geçiş yapılmıştır.

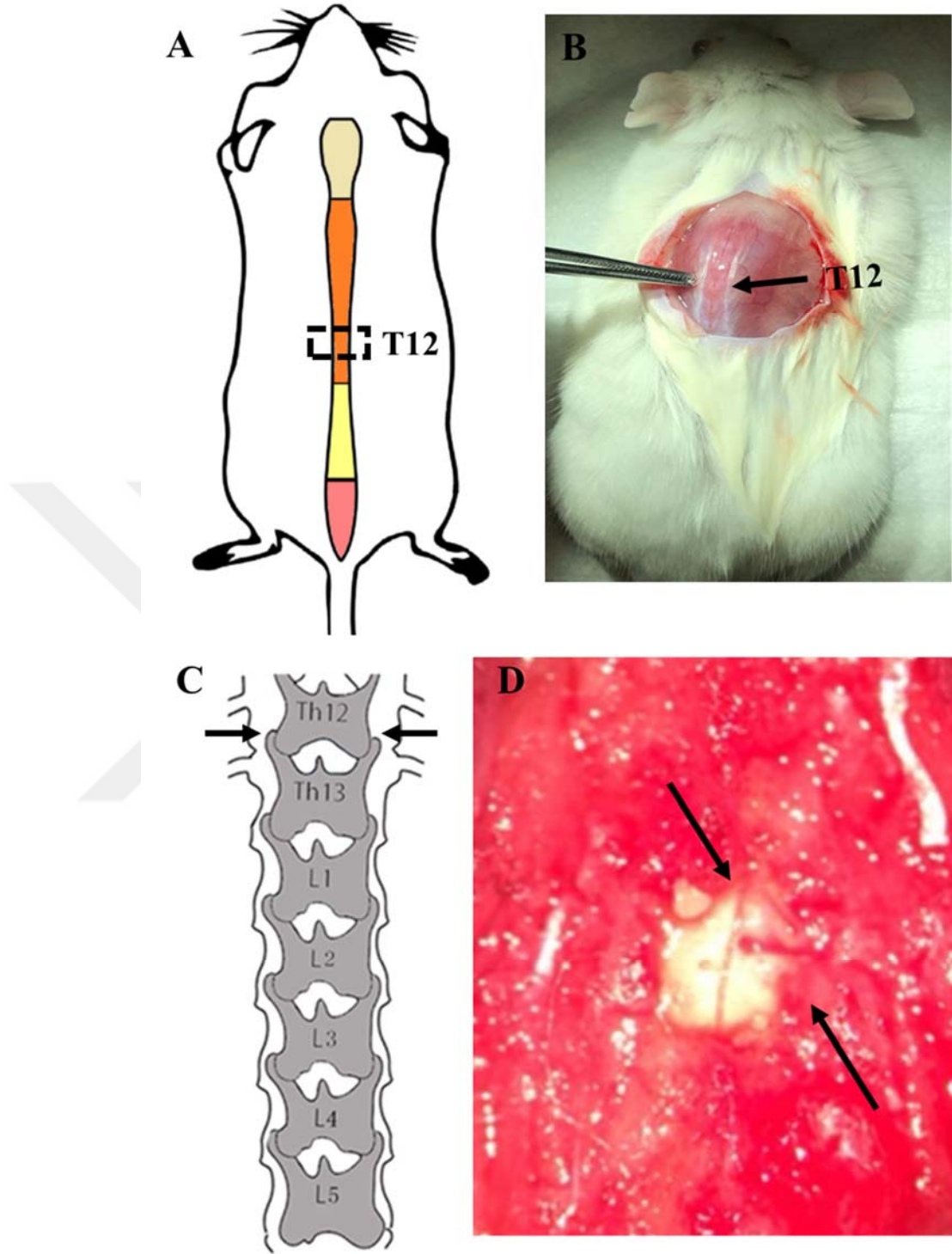


**Resim 5.5.1.** Omurilik Torakal 12 bölgesinin belirlenme yöntemi. (A) Vertebra ve Torakal ve Lumbal sınırı. (B) 13. Kosta ve T13 hizası.

Tüm farelerde hasar Torakal 12 (T12) vertebra seviyesinde oluşturulmuştur. T12 vertebra seviyesinin lokalizasyonu, on üçüncü yüzen kostanın el ile kontrol edilip belirlenmesinin ardından bu kostanın bağlı olduğu vertebra T13 olmak üzere bu seviyeden 1 vertebra seviyesi yukarı çıkılarak bulunmuştur (Şekil 5.5.1.). Deri altına geçişi takiben M. Trapezius tendonlarının birbirine yaklaştıkları noktadan sırasıyla Thoracolumbar fascia, Latissimus dorsi ve Erector spinae ensize edilmiştir.

Daha sonra vertebraları birbirine bağlayan Lig. Supraspinale ve Lig.flavum 11 numaralı bistüri ucuyla dissekte edilip T12 vertebrasına laminektomi uygulanarak medulla spinalisi çevreleyen dura matere ulaşılmıştır. T12 seviyesinde hasar omuriliğin sağ kısmına ve dorsal spinal venin hemen altından başlayacak şekilde 26G insülin enjektör iğnesi (Hayat Tıbbi Aletler A.Ş.) ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 5.5.2.).

Hasar verildikten hemen sonra ensize edilmiş kaslar omuriliğin üzerini kaplayacak şekilde kapatılarak vikril iplik (W9561, Ethicon) ile iç kısımlar ve 5.0 ipek iplik (S2160, Doğsan) ile de deri dikilmiştir. Operasyon sonrasında hayvanlar ısıtıcı battaniye (yaklaşık olarak 37°C sıcaklığına ayarlanmış) üzerindeki kafeslere alınmıştır ve uyanana kadar gözlemlenmişlerdir. Hayvanlar uyandıktan sonra kafesleri, besin ve sularına rahat uzanabilmeleri amacıyla, kafes altlığı fazla ve uzanma mesafesi uzun olan suluklar içeren kafeslere alınmışlardır.



**Resim 5.5.2.** Omurilik hasarı yarı kesi modeli. (A) Omurilik hasarının yapıldığı bölgenin şematik olarak gösterilişi. (B) Omurilik hasarının yapıldığı bölgenin hayvanda gösterilişi. (C) Fare vertebrasında kemiklerinin dizilişi ve T12 bölgesinin gösterilişi (127, 128). (D) Omurilik yarı kesi modeli yapılma şekli.

## **5.6. Davranış Deneyleri**

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen tüm davranış deneyleri İstanbul Medipol Üniversitesi bünyesinde bulunan Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Merkezi'nde (MEDİTAM) gerçekleştirilmiştir. MEDİTAM' da bulunan davranış odalarının tamamı davranış deneyleri için uygun ışık, sıcaklık ve ses yalıtımına sahiptir. Davranış deneyleri yapılacak olan fareler test başlangıcından itibaren en az 30 dakika öncesinden davranış odalarına getirilerek ortama alışmaları sağlanmıştır.

### **5.6.1. Açık Alan Testi**

Açık alan testi farelere hem hasar öncesinde hem de hasar sonrası 3., 14., 28. ve 42. günlerde uygulanmıştır. Bu test farelerin spontan motor aktivitelerinin ve alandaki araştırma benzeri davranışlarının değerlendirildiği bir metottur. Bu test için geliştirilmiş ve içerisinde test aparatlarının olduğu davranış deneyleri için uygun bir odada ve sessiz ortam koşullarında yapılmaktadır. Farelerin, 150 cm çapında ve 35 cm yüksekliğinde ucu kapalı bir silindirden oluşan bir alanda 10 dakika boyunca hareketleri gözlemlenerek kamera ile kayıt altında tutulmuştur. Kameraya bağlı bir bilgisayar ile Anymaze (ANY-maze Behavioural tracking software) programı kullanılarak silindir sanal olarak 3 bölgeye ayrılmış ve farelerin hem bu bölgelere giriş çıkış süreleri ile birlikte bu bölgelerde geçirdikleri süreler hesaplanmıştır. Operasyon öncesi ve operasyon sonrası 3., 14., 28. ve 48. günlerde elde edilen veriler gruplar arasında karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir.

### **5.6.2. Basso Lokomotor Testi (Basso Mouse Scale)**

BBB skorlaması, Basso ve arkadaşları Beatti, Bresnahan (BBB) ile birlikte omurilik hasarını takiben arka ekstremite motor fonksiyonlarında koordinasyon bozuklukları oluşmasından sonra girilen iyileşme fazında farelerin motor fonksiyonlarında adım adım gelişen iyileşmeyi skorlayan bir yöntemdir. BBB skorlaması ilk olarak sıçanlarda uygulanmış bir davranış deneyidir, daha sonra farelerde de denenmiştir.

Fakat BBB skorlaması farelerin motor fonksiyonlarındaki iyileşme sürecini kusursuz olarak yansıtmadığı için Basso ve arkadaşları spesifik olarak fareler için olan bir Basso fare skalası (Basso mice scale, BMS) hazırlamışlardır (129).

Basso lokomotor testi bu Basso fare skalasını kullanarak yapılan bir motor hareket skorlama testidir. Bu testte farenin arka ekstremitesinde görülen koordinasyon bozuklukları nedeniyle oluşan sağ arka ayak bileğinin motor hareketleri yaklaşık olarak 4 dakika boyunca gözlemlenmiştir. Burada, yürüme esnasında çalışan eklemler, hareketin koordinasyon düzeyi ve ayak tabanı pozisyonu gibi (Tablo 5.6.2.) değişkenler göz önünde bulundurularak farelerin iyileşme evrelerine göre 0 ile 9 arası değerler verilerek bir skorlama yapılmıştır.

Bu değerlerin detaylı olarak açıklamaları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir (Tablo 5.6.2.). Farelerde hasar öncesindeki skorlama değeri tüm farelerde 9 olarak kabul edilmiştir. Hasar sonrası 1., 2., 3., 14., 28. ve 42. günlerde yukarıda açıklanan Basso fare skalası (BMS) referans alınarak farelerin arka ayak motor hareketleri iki ayrı gözlemci tarafından incelenip tarafsız bir biçimde skorlanmıştır.

**Tablo 5.6.2.** Basso skorlaması değerler ve anlamları

<b>Skor</b>	<b>Motor Hareketler</b>
0	Ayak bileğinde hiçbir hareket görülmediği durumdur
1	Ayak bileğinde biraz hareket gözlemlendiği durumdur
2	Ayak bileğinde kapsamlı hareketin gözlemlendiği durumdur
3	Ağırlık destekli, desteksiz bir şekilde yapılan plantar adım veya nadir atılan dorsal adım atma durumudur
4	Nadiren atılan plantar adım atma durumudur
5	Koordinasyonsuz veya biraz koordinasyonlu bir şekilde sık atılan plantar adım durumudur. Adımların kalkış ve inişte rotasyon gözlemlenmektedir
6	Sık olarak atılan biraz koordinasyonlu plantar adım ve adımların kalkış, inişte paralel durması durumudur veya sık olarak atılan

	oldukça koordinasyonlu plantar adım ve adımların kalkış, inişte rotasyon yapması durumudur
7	Sık olarak atılan oldukça koordinasyonlu plantar adım ve adımların kalkışta paralel, inişte rotasyon yapması durumudur veya sık olarak atılan oldukça koordinasyonlu plantar adım ve adımların kalkışta paralel, inişte ise gövdede gözlenen şiddetli stabil olamama durumudur
8	Sık olarak atılan oldukça koordinasyonlu plantar adım ve adımların kalkışta paralel, inişte gövdede gözlenen hafif stabil olamama durumudur veya sık olarak atılan oldukça koordinasyonlu plantar adım ve adımların kalkışta paralel, inişte gövdede gözlenen normal stabil olma ve kuyruğun yukarıda, aşağıda veya sadece aşağıda durması durumudur
9	Sık olarak atılan oldukça koordinasyonlu plantar adım ve adımların kalkışta paralel, inişte gövdede gözlenen normal stabil olma ve kuyruğun her zaman yukarıda durması durumudur

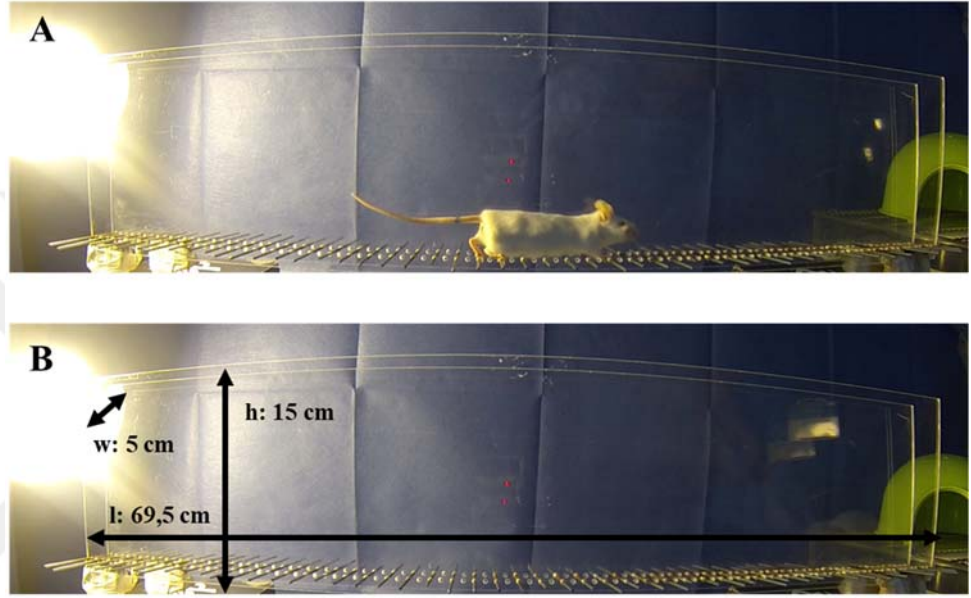
### 5.6.3. Merdivende yürüme testi

Merdivende yürüme testi ile ön ve/veya arka ayaklarda spinal kord hasarı ile kaybolan motor koordinasyonun farelerin yürüme becerilerine olan etkisi ölçülmektedir. Fareleri merdivende yürütme amacı ile hazırlanmış düzenek 69,5 cm uzunluğunda ve 15 cm boyunda iki pleksiglas levhaya 0,2 cm çapında 0,5 cm aralıklarla delikler açılarak ve bu deliklerden metal çubuklar geçirilerek oluşturulmuştur (Şekil 5.6.3.).

Bu merdiven yapısındaki düzenek içerisinden farenin rahatlıkla geçebileceği ancak geri dönemeyeceği biçimde olmak üzere 3-4 cm genişliğinde tutulmuştur.



Düzenek iki uç noktasından destekler dikilerek yerden 30 cm olacak şekilde yükseltilmiştir. Burada, farelerin uyarılıp yürümesini başlatmak amacıyla düzeneğe giriş yaptıkları bölgeye sabit olarak parlak (sarı ışık) ışık ile aydınlatılmış ve çıkış yaptıkları bölgeye de kendi kafesleri ve kafeslerinin üzerine iglo evleri (hali hazırda kendi kafeslerinin içinde bulunan ve içlerinde yaşadıkları) konulmuştur.



**Resim 5.6.3.** Merdivende yürüme testi. (A) Merdivende yürüme aparatı.  $l$ : pleksilerin eni,  $h$ : pleksilerin yüksekliği  $w$ : iki pleksi arası genişlik. (B) Merdivende yürüme testinde hayvan varken örnek görüntü.

Bu düzenlemenin amacı farelerin merdiven üzerinde hızlı ve duraksamadan yürümelerini sağlamaktır. Omurilik hasarı modelinde gösterilen ve davranış deneyleri günlerinden (taban değer dahil) gününden önce yer alan davranış eğitim bölümünde Merdiven yürüme testinin eğitimi ilk gün öğrenme ve devam eden iki gün eğitim olacak şekilde üç gün boyunca yapılmıştır.

Burada, ilk etapta yer alan öğrenme sürecinde farelerin sadece gezinerek ve koklayarak düzeneği tanımaları ve bitiş alanında konumlanan iglo evi fark etmeleri sağlanmıştır.

Devam eden iki günlük eğitim evresinde ise giriş bölgesinden bırakılan farelerin duraksamadan yürüyerek bitiş ucundaki iglo evlerine ulaşmaları sağlanmıştır.

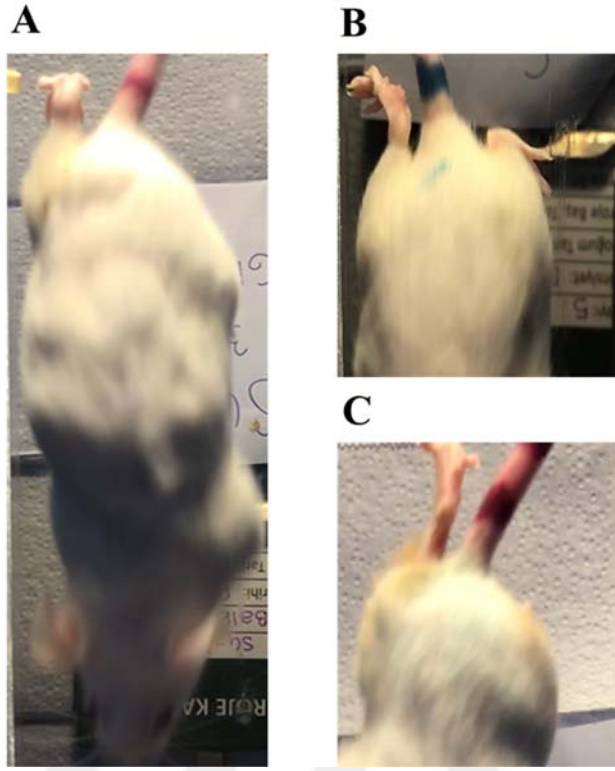
Taban değer davranış deneyi gününde fareler yine açıklanan koşullar sağlanmış biçimde yürüme alanına bırakılarak yürüme hızları yüksek hızlı kamera (Gopro Hero 2) ile kayıt altına alınmıştır. Aynı şekilde bu test 3., 14., 28. ve 42., günlerde de kayıt altına alınmıştır. Daha sonra tüm bu kayıt altına alınan görüntüler izlenerek hasardan sonraki süreçte yapılan hatalı adım sayıları hesaplanmıştır ve bu hesaplar baseline verileri ile kıyaslanmıştır. Üçüncü gün omurilikte oluşan şok sebebiyle arka ayakta adım görülmeyip sadece basamaklar arasında ayak sürümeden dolayı doğru adım yüzdesi %0 olarak alınmıştır.

Atılan yanlış adım sayısını doğru adım sayısına oranlamada kullanılan formül şu şekildedir;

$$\text{Doğru adım sayısı yüzdesi \%} = \frac{\text{Atılan doğru adım sayısı} \times 100}{\text{Atılan toplam adım sayısı}}$$

#### 5.6.4. Arka Ayak Açısı Testi

Omurilik hasarı sonrasında farelerin adımlarında bozulmalar gözlemlenmektedir. Özellikle arka ekstremitede arka ayaklarda retraksiyon ve protaksiyon mesafesinin değişmesi ile yürüme motor koordinasyonunda bozulmalar meydana gelir. Farelerde arka ayaklarda adım atma sırasında hiperabduksiyon meydana gelir ve ayağın yerden teması kesilip diğer adım için uzanmadan hemen önce arka ayak sagittal vücut eksenine yaklaşarak ekstansiyon yapma eğilimi gösterir. Burada, Kinematik Analiz testi ile sağ arka ayağın sagittal vücut eksenine olan rotasyon açısı ölçülmek amacıyla bir düzenek oluşturulmuştur. Bu düzenek iki adet 69,5 cm uzunluğunda pleksiglasın altta 5 cm genişliğinde bir koridor oluşturacak şekilde birleştirilmesinden oluşmaktadır.



**Resim 5.6.4.** Ayak Açısı Testi. (A) Ayak açısı testinde hayvanların ne şekilde gözlemlendiğini gösteren görüntü. (B) (C) Hayvanların arka ekstremitelerinde ayak açılarından örnek görüntüler.

Fareler bu düzeneğin içine bir ucundan bırakılarak yürüme hareketleri lateral ve dorsal bölgeler gözükerek şekilde yüksek çözünürlük ve yüksek hızla çekim yapabilen (Gopro Hero 2) iki kamera yardımı ile kayıt altına alınmıştır. Daha sonra çekilen bu görüntüler ağır çekimde incelenerek tüm farelerin arka sağ ayağının tam yerden teması kesilmeden hemen önce görüntüleri alınmıştır. Arka ayak açısı, bu görüntülerin sagittal vücut eksenine yaptığı açı vücut eksenine bir doğru çizilerek ve sonra pelvisten başlayıp parmak ucuna bir doğru çizilip bu iki doğru arasındaki açı ölçülerek bulunmuştur. Adımlardaki fleksiyon yapan ayağın açısına bağlı bozulmalar sadece spinal kord hasarı geçirmiş hayvanlarda gözlemleneceğinden bu test için bir taban değeri bulunmamaktadır. Tüm davranış deneyi günlerinde (3., 14., 28. ve 42.) yapılan açı ölçümlerindeki değişimi 3. gün açı ölçümlerine göre yorumlanmıştır.

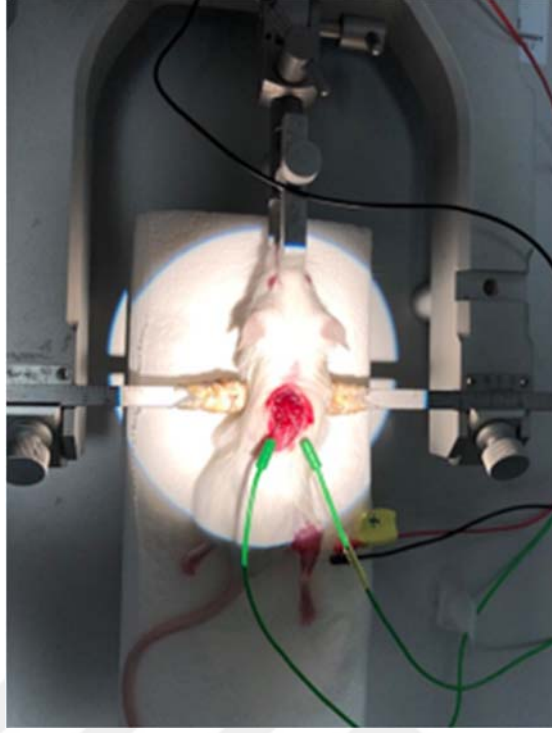
## 5.7. Traser Enjeksiyonu

Traser enjeksiyonu lentiviral enjeksiyonuna benzer olarak laminektomi ile omuriliğe yapılmaktadır. Bu enjeksiyonun amacı GDNF virüs enjeksiyonundan sonra oluşabilecek aksonal rejenerasyon ve aksonlardaki kollateral dallanma miktarını anterograd ve retrograd olarak taşınan bir traser madde yardımıyla ölçmektir.

Hem anterograd hem de retrograd özelliği gösteren biyotinlenmiş dekstran amin (BDA) maddesi farelere traser madde olarak enjekte edilmiştir (130). Spinal kord yarı kesik modeli için 25-30 g ağırlığında 8-12 haftalık erkek Balb/c farelere 400 mg/kg olacak şekilde %7 kloral hidrat (Fluka 23100 250 gr) çözeltisi intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve fareler anestezide alınmıştır. Anestezi altındaki farelerin öncelikle sırt bölgesindeki tüyler tıraşlanıp batikon ile dezenfekte edilmiştir. Hayvanlar hemen sonrasında stereotaksik sabitleyiciye (World Precision Instruments) torokal vertebra seviyesi sabit tutulacak şekilde yerleştirilmiştir. BDA traser enjeksiyonunda farelere dorsalden erişim sağlanıp laminektomi yapılarak kaudal bölgede Lumbal 4 bölgesi civarında dorsal venin solu ve sağından olmak üzere iki bölgeye enjeksiyon gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyon işlemi cam mikroenjeksiyon iğneleri (Hamilton) kullanılarak ve omurilik üzerine dorsal spinal ven'in hem sol hem sağ lateral kısımlardan 1'er µl, totalde 2µl/hayvan olacak şekilde yapılmıştır.

## 5.8. Elektrofizyolojik ölçüm

Deney dizaynı şeklinde (Şekil 5.2.1.) gösterildiği gibi Traser enjeksiyonu 43. günde yapıldıktan 14 gün sonra (57. günde) fareler önce elektromyografi (EMG) kaydı yapıp sonrasında sakrifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. EMG kaydı alınarak sinyal iletiminin efektör organa ulaşması ve hasar sonrasında aksonların yeni sinapslar yaparak fonksiyonel bir iyileşme gerçekleştirilmesi gözlemlenmiştir. Fareler 57. Günde sakrifikasyon öncesinde fareler 400 mg/kg olacak şekilde %7 kloral hidrat (Fluka 23100 250 gr) çözeltisi intraperitoneal olarak enjekte edilmiş ve fareler anestezide alınmıştır (Bölüm 5.4.).



**Resim 5.7.1** Elektromyografi kayıt anı görüntüsü.

Öncelikle fareler dorsal kısımları işlem görecektir şekilde düz bir zemine sabitlenmiştir ve vertebraların intervertebral foramenine uyarıcı iğne uçlu elektrot yerleştirilmiştir. Daha sonra fareler sağ arka ayağın derisi tüyden arındırılmak üzere traşlanmıştır ve kas dokusuna zarar vermemek üzere deri kesilmiştir. Burada, pozitif ve negatif iğne elektrotları m. gastrocnemius kasına yerleştirilmiştir. EMG düzeneğindeki stimülator paneli 2V uyarı şiddeti, 0.2 Hz frekansında sabit akımlı ve 10 tekrar olacak şekilde ayarlanmıştır. Kayıtlar düzeneğe bağlı olan bilgisayardaki PowerLab (ADInstruments, PowerLab 16/35) ile alınmıştır. Daha sonra uyarının kasa ulaşması ve kasın kasılması sürelerindeki gecikmeyi ölçmek için alınan bu kayıtlarda uyarı artifaktı/gürültü sonrası gelen en büyük ilk ve ikinci 19 pozitif veya negatif dalganın arasında geçen gecikme süresi ölçülmüştür. Bu şekilde motor ve duyu tepkisel potansiyellerinin EMG uygulanarak ölçümüyle kortikospinal yolak ve spinotalamik yolak elektrofizyolojik olarak değerlendirilmiştir.

## 5.9. Omurilik İzolasyonu

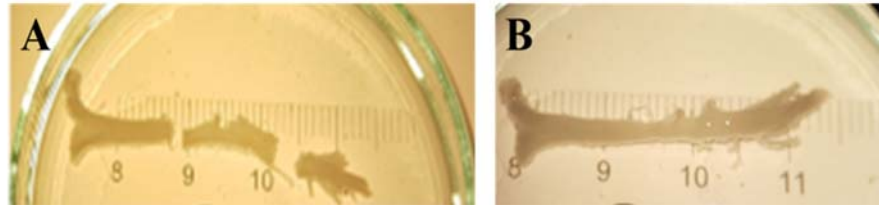
EMG kaydı alındıktan hemen sonra (hasar sonrası 57. Günde) fareler anestezi altındayken serum fizyolojik ile kardiyak perfüzyon işlemi yapılmıştır. Perfüzyon işlemini takiben %4'lük paraformaldehit (PFA; 158127 -500G, Sigma-Aldrich) ile fiksasyon yapılmıştır.

Omurilikler ulaşılabilen en torakal ve en lumbal kısımlardan çıkartılmıştır. Çıkartılan omurilikler öncelikle 4 °C'de 2 saat %4'lük PFA çözeltisinde inkübe edilmiş ve sonrasında ise yine 4 °C'de %30'luk sükroz (800-081-LG, Multicell) çözeltisinde tüm omurilikler dibe çökene kadar bekletilmiştir.

## 5.10. Omurilik örneklerinin dondurulması ve kesitlerinin alınması

Yüzde otuzluk sükroz çözeltisinde çöken omurilikler mikroskop (Carl Zeiss Meditec AG S100/ OPMI p100) altına alınmıştır ve yarı kesili hasar bölgesi mikroskop altında bulunmuştur.

Omurilikler T 12 hasar bölgesi merkezde kalacak şekilde her biri yaklaşık birer cm olan üç eşit parçaya bölünmüştür.



**Resim 5.8.1.** Omurilik izolasyonu. (A) Omurilik izole edildikten sonraki görüntüsü. (B) Omurilik dondurulmadan önceki üç ayrı bölüme ayrılmış görüntüsü.

Bu bölgeler torakal, hasar ve lumbal olmak üzere üç isimde adlandırılma yapılarak ayrı ayrı doku dondurma solüsyonu (tissue freezing medium; Leica 14020108926-125 ml) içerisine gömülerek ayrı ayrı dondurulmuştur.

Burada, 15'lik enjektörler silindir şeklinde 1-2'şer cm lik kesilerek içerlerinde dondurma solüsyonuna gömülmüş olarak omurilik dokuları dondurulmuştur. Dondurulan örnekler -20 °C 'de saklanmıştır.

Kryostat (Leica CM 1950) kesitlerinin alınması için izole edilen örnekler teker teker yapılmak üzere -20 °C'den alınarak kesit alma işlemi gerçekleştirilmiştir. Örnekler enjektör içinde doku dondurma solüsyonuna gömülü olduğundan öncelikle buradan izole edilmiştir. Kesitler kesit kalınlığı 50 µm ve kesit gidişat yönü kaudalden rostrale doğru olacak şekilde 40 °C'ye ayarlı ısıtıcı tabla (Wisetherm hp-Lp1) üzerinde ısıtılmış olan pozitif yüklü (Isotherm, Objecttrager) slaytlara alınmıştır. Kesitler bir slaytda 5 tane kesit olacak şekilde alınmıştır. Kesitler daha sonra 30 dakika boyunca aynı ısıtıcı tabla üzerinde üzerinde bekletilerek fikse edilmiştir.

Toplam olarak her hayvandan sırasıyla lumbal, hasar ve torakal bölge olmak üzere üç bölge slaytları boyama yapılana kadar -80 °C'de saklanmıştır.

### **5.11. Cresyl violet Boyaması ve Değerlendirilmesi**

Spinal kord hasarının sonucu olarak beyaz cevherdeki funikuluslarda oluşacak atrofinin ölçülmesi için her hayvandan alınan torakal ve lumbal bölge kesitlerinden 2'şer tane seçilerek cresyl violet boyaması yapılmıştır. Bu boyama için, fare omurilik atlasına baz alınarak, torakalde T8 ve lumbalde L3 bölgeleri civarında olacak slaytlar seçilmiştir.

Cresyl violet boyası 0.5 g cresyl violet acetate ile 1.25 ml glacial asetik asit ile karıştırılıp 500 ml su içinde kristaller çözünene kadar 60°C de çalkalanıp PH 7.4' e ayarlanarak hazırlanmıştır.

80 °C'den çıkarılan kesitler 40 dakika 45°C' ye ayarlanmış olan etüv içerisinde inkübe edilmiştir. Sonrasında, bir kere fosfat tamponlu salin (PBS) çözeltisinde çalkalayıcı üzerinde (Heidolph unimax 1010) yıkandıktan sonra 2 dakika masa üzerinde, sonrasındaki 3 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde cresyl violet (C5042-10G) boyası ile muamele edilmiştir. Kesitler cresyl violet boyama aşamasından hemen sonra her birine sadece batırılıp çıkartılacak şekilde 3 ayrı distile H<sub>2</sub>O serisinden geçirilmiştir.

Bu aşamayı takiben, her birine sadece batırılıp çıkartılacak şekilde (aynı bir önceki aşama gibi) sırasıyla %70, %90, %95 ve %100'lük etanol serisinden geçirilmiştir. Alkol serisinden sonra boyanın fikse olması için kesitler, ayrı şalelerde bulunan, ilk olarak 3 dakika ve sonra 1 dakika inkübe edilmek üzere ksilen solüsyonuna alınmıştır. Kesitler son ksilen aşamasından sonra üzeri uygun kapatma sıvısı olan Entellan (Merck 1.07.961.0500) ve lamelle kapatılmıştır.

Görüntüleme bu kapatma işleminden minimum 2 saat sonrasında, ışık mikroskobu (Axiozoom V16, Zeiss) kullanılarak yapılmıştır. Burada görüntüleme işlemi, üzerinde 5 kesit bulunan her slayttan en efektif olan görüntüyü seçerek ve her slayttan bir görüntü çekerek gerçekleştirilmiştir.

Daha sonra her bir grup için omuriliğin T8 ve L3 bölgelerinden alınan kesitlerde zen blue programı ile hücre sayımı ve alan ölçümleri yapılmıştır. Hücre sayımı olarak nöron sayımı ve motor nöron sayımı hesaplanmıştır. Motor nöron sayımı dorsal ventral ayrımı yapılan noktanın ventral bölümündeki motor nöronları sayarak gerçekleştirilmiştir. Dorsal ventral ayrımı T8 ve L3 seviyelerinin fare omurilik atlas görüntülerinde gri cevher boynuzlarının son bulunduğu lamineden yukarı yönde her seviye için farklılık gösteren laminelere arası mikron hesabı ölçümü yapıldıktan sonra çizgi çekerek bulunmuştur. Burada, üst kısım dorsal ve alt kısım ventral olarak kabul edilmiştir. Alan hesabı olarak da dorsal, lateral ve ventral funikulusların alanları, dorsal ve ventral alanlar, total omurilik alanları ölçülmüştür ve bu alanlar kontralaterali ile karşılaştırılarak atrofi değişimi incelenmiştir.

## **5.12. BDA Boyaması**

BDA boyaması için T8 seviyesinden alınmış olan kesitler kullanılmıştır. Bu slaytlar öncelikle etüvde 40-45 dakika süresince 45 °C'de bekletilmiştir. Örnekler etüvden sonra şale içerisinde 1X PBS'te 5 dakika yıkanmıştır. PBS'ten alınan slaytlar örneklerle değmeden kurutulup örneğin etrafı PAP-PEN (Liquid blocker super pap pen) ile çizilmiştir. %10 NGS (Normal Goat Serum, Sigma, G9023) (40 µl) ve PBS-T (360 µl) içeren bloklama solüsyonu her bir örnek üzerine 50 µl gelecek şekilde eklenmiştir. Daha sonra nemlendirme haznesi oluşturularak 60 dakika boyunca çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.



Bloklama solüsyonundan geçen slaytlar örneklere değmeden kurutulularak PBS-T (388 µl), %2 NGS (8 µl) ve ikincil antikor (4 µl; 1:200 oranında) (555 Strep-Avidin Secondary antibody. Ref No: 52138, ThermoScientific)\_solüsyonu her bir örneğe 50 µl gelecek şekilde örneklerin üzerine aktartılmıştır. Nemlendirme haznesinde 90 dakika süresince inkübe edilmiştir. Sonrasında 1X PBS ile 4 dakika boyunca yıkanmıştır ve yıkanma sonunda örnekler kurutulmuştur. Kurutma işlemini takiben mounting medium Fluoromount (F4680, Sigma, ABD) eklenerek slaytlar lamel (Deckglaser 100st pcs 24x60 mm) ile kapatılır. Slaytlar bu şekilde gece boyunca inkübe edildikten sonra örneklerin kurumaması için lamellerin etrafı oje ile kapatılmıştır. Bu aşamadan sonra slaytlar görüntüleme işlemine hazır hale getirilmiştir. PBS yıkamaları, Bloklama solüsyonu ve ikincil antikor gibi tüm inkübasyon içeren süreçler çalkalayıcı üzerinde (Heidolph unimax 1010) gerçekleştirilmiştir.

### **5.13. Western Blot Analizi**

Western blot çalışmaları için n=3 olacak şekilde iki grup hayvan kullanılmıştır. Analizler virus enjeksiyonu yapıldıktan 12 gün sonra hasardan önce yapılmıştır. Western blot analizi için örnekler Any kD™ Mini-PROTEAN jelin (456-9036, Bio-Rad, ABD) her bir kuyucuğuna 20 µg/10 µl olacak şekilde yüklenerek 50 V'da 5 dakika, daha sonra 100 V'da bir saat ve en son 150 V'da bir saat daha yürütülmüştür. Ardından Bio-Rad Transblot Turbo sistemi ve RTA Mini PVDF Transfer Kiti kullanılarak (170-4272; Bio-Rad, ABD) jeller poliviniliden diflorit (PVDF) membranlara transfer edilmiştir. Membranlar, tris tamponlu salin-Triton-X-100 (TBS-T) ile hazırlanmış % 5'lik yağsız süt tozu çözeltisinde (sc-2325; ChemCruz, ABD) 1 saat bloklamının ardından +4°C'de gece boyu bloklama solüsyonunda seyreltilen primer antikor (GDNF, Santa Cruz sc398555 veya Beta Actin, Cell Signaling 4970) ile inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün TBS-T ile 3 kere beşer dakika boyunca yıkanan membranlara bloklama solüsyonunda hazırlanan sekonder antikor (Goat anti rabbit, Santa Cruz sc31460) ilave edilmiş ve membranlar oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bantların görüntülenmesi için deteksiyon solüsyonu (Clarity™ Western ECL Substrate, 1705060, Bio-Rad, ABD) eklenmiş ve membranlar, ChemiDoc MP (Biorad) görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülenmiştir.

#### 5.14. İstatistiksel Analiz

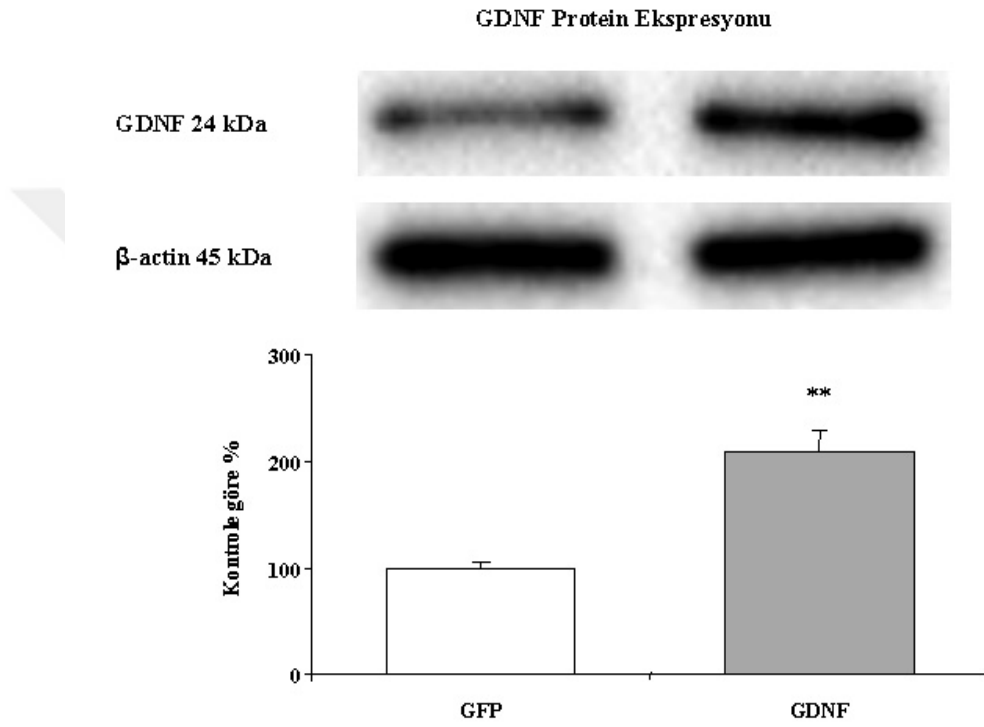
Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesi amacıyla SPSS programı kullanılarak istatistiksel testler yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklar t-test (Student's t-distribution) ve F test (Repeated measures) testleri kullanılarak analiz edilmiştir. Bütün değerler ortalama  $\pm$  standart hata olarak verilmiş, \* $p < 0.05$  ve \*\* $p < 0.01$  istatistiksel anlamlı olarak kabul edilmiştir (131).



## 6. BULGULAR

### 6.1 GDNF Protein Analizi

GDNF'in omurilik dokusunda ifade edildiğini gösterebilmek için Western blot protein çalışmaları yapılmıştır.

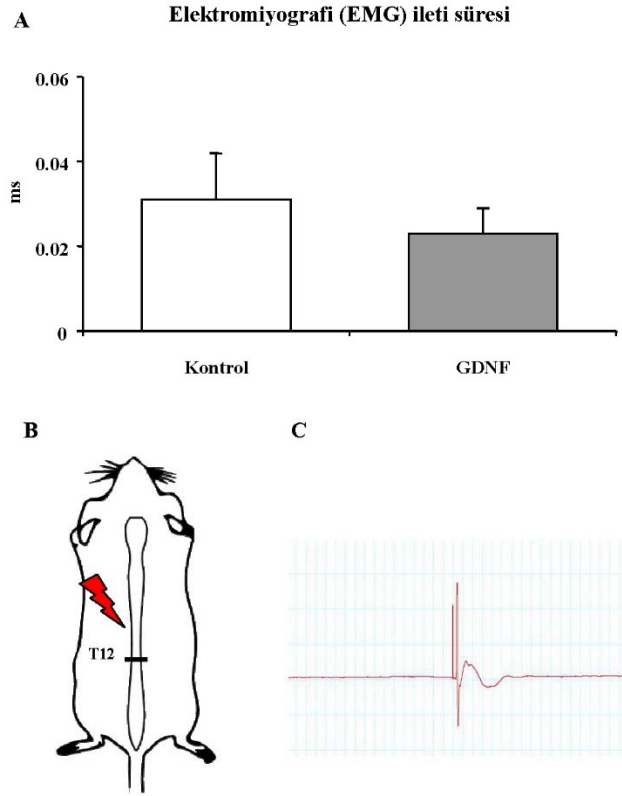


**Şekil 6.1.1.** Omurilik dokusunda GDNF ekspresyonunun gösterilmesi ( $p < 0.01$ ).

Western blot analizinin sonucuna göre GDNF ekspresyonu içerisinde GDNF'in klonlandığı lentivektör enjekte edilen farelerde kontrol göre yüksek ifade ile ve istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde gözlemlenmiştir.

## 6.2 Elektrofizyolojik Ölçüm

Elektrofizyolojik ölçümler sonucunda sinyal iletiminin süresi GDNF grubunda kontrol grubuna oranla azalmıştır. Değerlendirme sonrasında iki grup arasında istatistiksel olarak bir anlamlılık görülmemiştir.

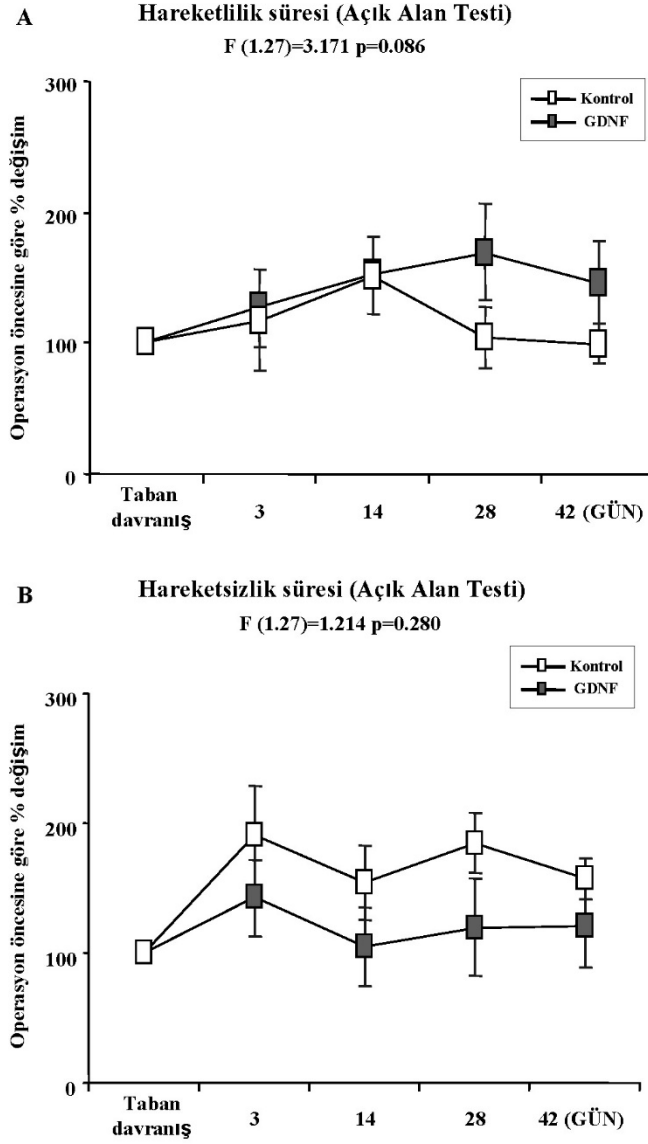


**Şekil 6.2.1.** Omurilik yarı kesi hasar modeli sonrası elektromiyografi değerlendirilmesi. (A) İleti süresi,  $p>0.05$ . (B) Omurilikte elektrotların yerleştirildiği bölge (C) Pozitif ve negatif pik görüntüsü.

## 6.3 Omurilik Hasarı Sonrası Fonksiyonel İyileşme Değerlendirmesi

Omurilik yarı kesi modeli T12 bölgesine yapıldıktan sonra fonksiyonel iyileşme yorumunu katan tüm deneyler davranış 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan davranış testleri ile yapılmıştır. Burada, hasar öncesi olarak bildirilen veriler omurilik hasarından önce yapılan ilk taban (*baseline*) davranış verilerine referans etmektedir.

### 6.3.1 Açık alan testi sonucu hareketlilik sürelerinin değerlendirilmesi

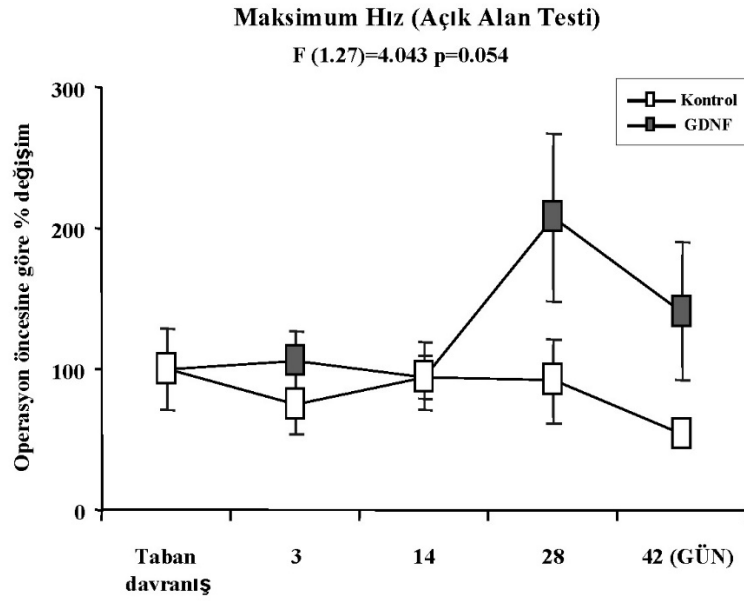


**Şekil 6.3.1.1.** Omurilik yarı kesi hasar modeli sonrası arka ekstremitelerde fonksiyon kaybının GDNF uygulaması ile açık alan testine göre değerlendirilmesi. (A) Hareketlilik süresi,  $p>0.05$ . (B) Hareketsizlik süresi,  $p>0.05$ .

Omurilik hasarı yarı kesi modeli ile hayvanların geçirdikleri travma sonrasında 3, 14, 28 ve 42. günlerde açık alan testi yapılmıştır.

Açık alan testinde hareketliliği gösteren parametrelerin verdiği sonuçlara bakıldığında GDNF içeren grupta 28. ve 42. günlerde artış olduğu tespit edilmiştir. Her iki grup (GDNF ve kontrol) taban verileri ile kıyaslandığında GDNF grubunun hareketlilik süresi uzun dönemde (28. ve 42. günlerde) artış göstermektedir. Hareketlilik bulgularını tam ters açıdan değerlendiren hareketsizlik testi bulgularına göre kontrol grubunun değerleri yükseklik göstermiştir.

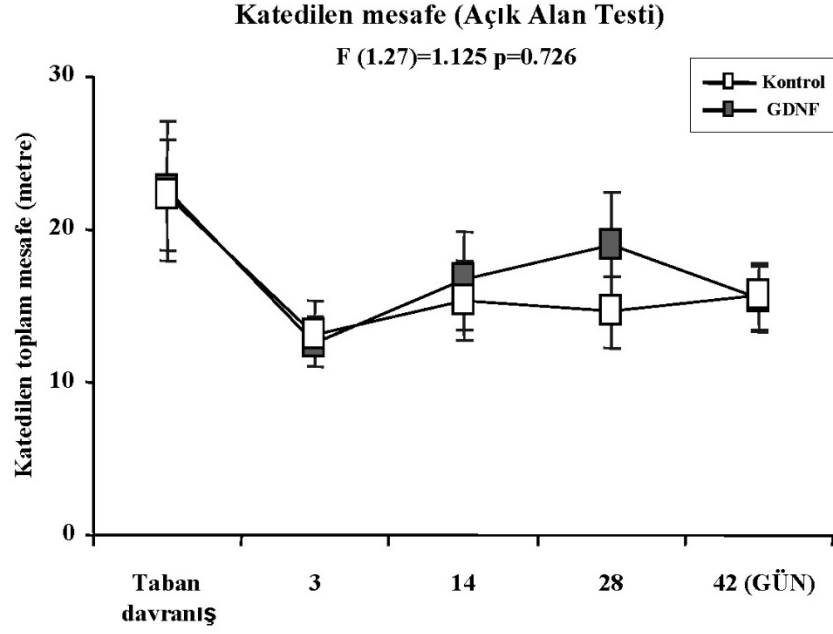
### 6.3.2 Açık alan testinde sarf edilen hızların değerlendirilmesi



**Şekil 6.1.2.1.** Omurilik hasarı sonrasında sarf edilen maksimum hızların gruplara göre değerlendirilmesi,  $p>0.05$ .

Farelerin omurilik hasarı sonrasında spontan motor aktivitelerini ölçmek için açık alan testinde sarf ettikleri maksimum hızlar değerlendirilmiştir. Maksimum hız verilerine bakıldığında GDNF grubunun hız seviyesi 28. günde artış göstermektedir. 42. günde iki grupta orantılı bir şekilde düşüş gözlemlenmektedir.

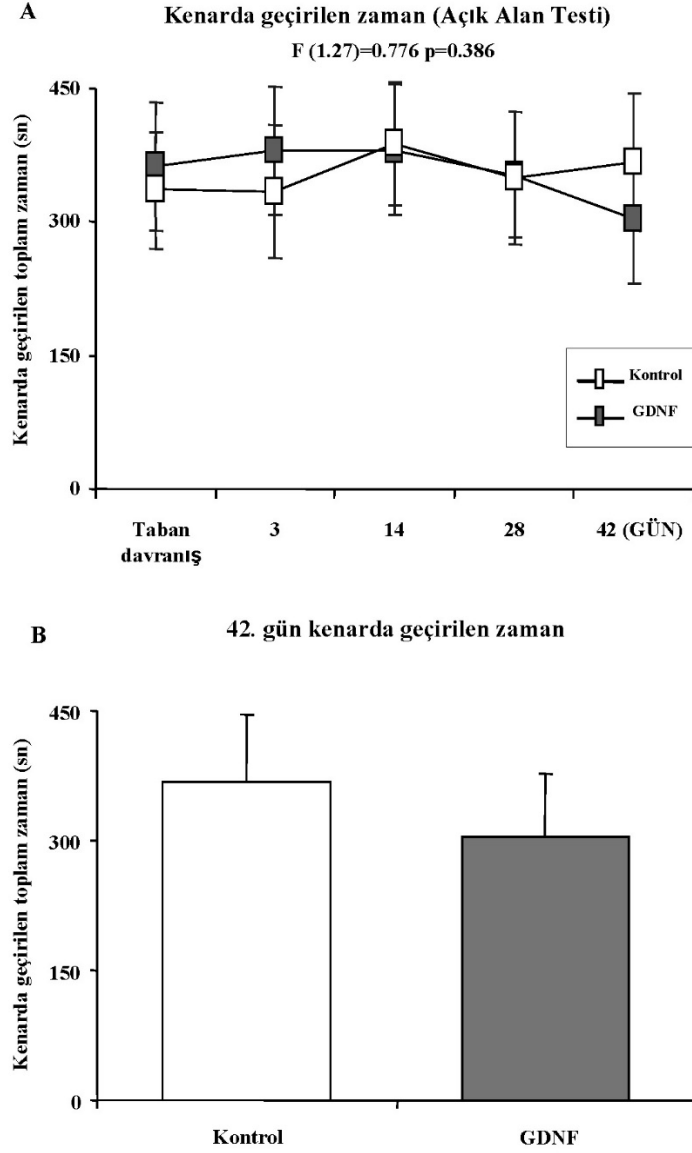
### 6.3.3. Açık alan testinde kat edilen mesafenin değerlendirilmesi



Şekil 6.3.3.1. Omurilik hasarı sonrası katedilen mesafenin değerlendirilmesi,  $p>0.05$ .

Farelerin omurilik hasarı sonrasında kat ettikleri mesafe hasar öncesi verileri ile kıyaslandığında sadece 28. günde GDNF grubunda artış gözlemlenmiştir. Uzun dönemde 42. güne bakıldığında ise GDNF ve kontrol grubunun kat ettiği mesafe değerleri birbirine oldukça yakın gözlemlenmektedir.

### 6.3.4 Açık alan testi ile anksiyetenin ölçülmesi



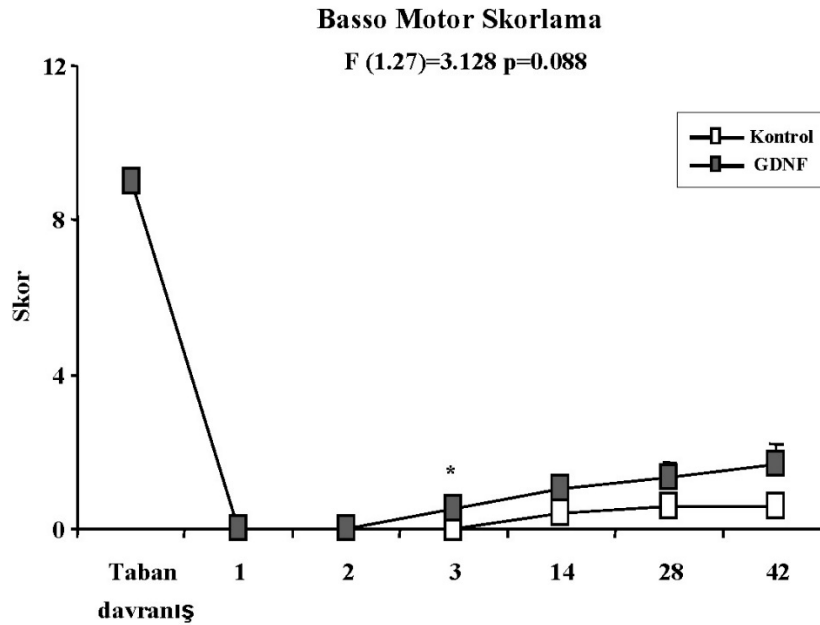
**Şekil 6.3.4.1.** Omurilik hasarı sonrası kenar bölgesinde geçirilen zamanın değerlendirilmesi. (A) Hasar öncesi ile sonrası verileri içeren kenarda geçirilen zaman grafiği,  $p>0.05$ . (B) Uzun dönem, 42. günde kenar bölgesinde geçirilen zamanın gruplara göre karşılaştırılması,  $p>0.05$ .

Omurilik hasarından sonra yapılan açık alan davranış testinde anksiyete seviyelerini anlayabilmek için iki grupta da kenarlarda geçirdiği süreler hesaplanmıştır.



Hasar öncesi süresi ve hasar sonrasındaki sürelerde (3, 14, 28, 42. gün) kenar alanda geçirdikleri süreler Şekil 6.1.4.'de gösterildiği gibidir. Bu süreler hasar öncesi veriler ile kıyaslandığında kontrol grubunun kenarda geçirdiği sürenin daha fazla olduğu saptanmıştır. Özellikle 42. günde uzun dönemde bakıldığında GDNF uygulaması içeren grubunun kenarda geçirdiği sürenin azaldığı gözlemlenmiştir.

### 6.3.5. Omurilik hasar sonrasında gerçekleşen motor koordinasyon kaybının zamana bağlı olarak değerlendirilmesi



**Şekil 6.3.5.1.** Basso motor skorlarına uygun olarak motor koordinasyonu değerlendirmesi, 3. gün  $p<0.05$ .

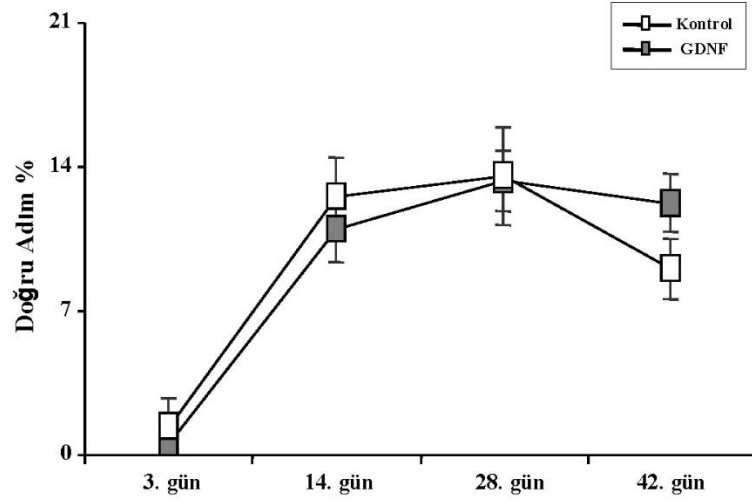
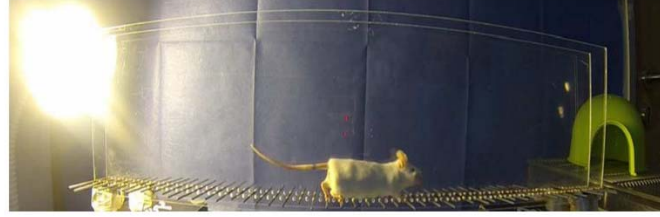
Farelerde omurilik hasarı öncesi skor değerini 9 kabul etmek ile birlikte, sonrasında 1., 2., 3., 14., 28. ve 42. günlerde yapılan skor değerleri sonucunda 3. Günden itibaren 28. Güne kadar motor kabiliyetlerin iki grupta da arttığı fakat GDNF tedavisi içeren grupta bu artışın kontrol grubundan fazla bir ölçüde olmadığı saptanmıştır.

Spesifik olarak 42. güne bakıldığında ise motor koordinasyonların GDNF içeren grubun kontrol grubundan düşük bir oranda yüksek olduğu saptanmıştır.

### 6.3.6 Omurilik hasarı sonrasında yürüme becerilerinin zamanı bağlı olarak geri kazanımının değerlendirilmesi

#### Merdivende Yürüme Testi

F (1.16)=2.312 p=0.148

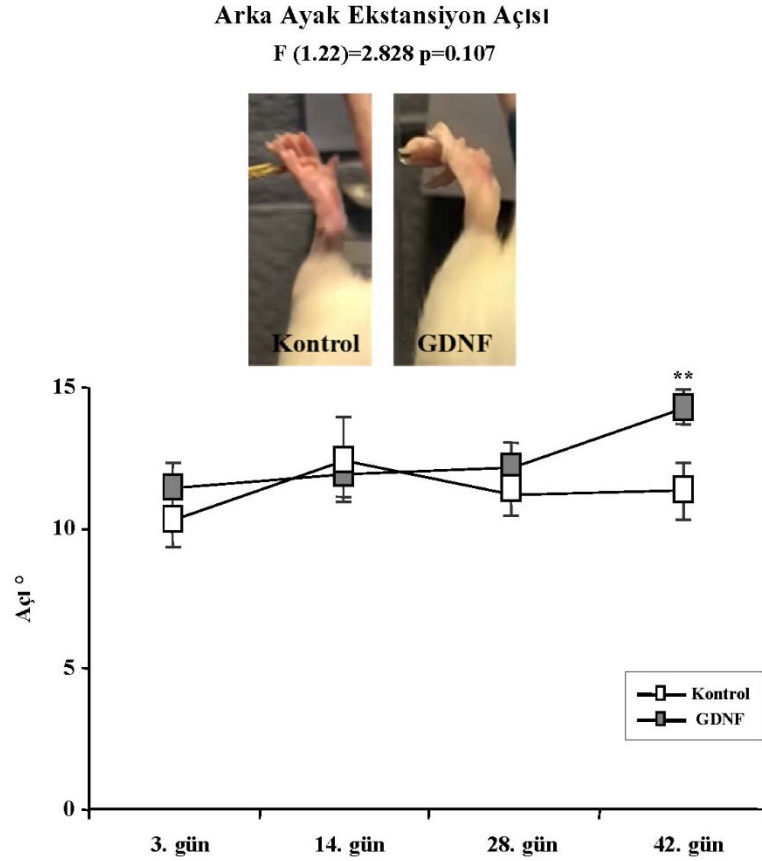


Şekil 6.3.6.1. Merdivende yürüme testi,  $p > 0.05$ .

Omurilik hasarı sonrasında 3., 14., 28. ve 42. günlerde fareler merdivende yürüme aparatında yürütülmüştür. Merdivende yürüme testi arka ayaklarda omurilik hasarı ile kaybolan motor koordinasyonun farelerin yürüme becerilerine olan etkisini ölçmek için gerçekleştirilir. Zamana bağlı olarak hazırlanan grafikte (Şekil 6.1.6.1.) GDNF uygulaması içeren grubun motor koordinasyonlarının takibi uzun dönem içerisinde fonksiyonel iyileşmeyi destekleyen veriler göstermektedir.

Özellikle 42. günde GDNF grubunun yürüme becerileri kontrol grubuna kıyasla yükseliş göstermektedir.

### 6.3.7. Omurilik hasarı sonrası ayak açısını motor becerilerine olan etkisinin ölçülmesi



**Şekil 6.3.7.1.** Arka ayakta adım atılırken yapılan retraksiyon ve protaksiyon mesafesinin medyan orta çizgi ile yaptığı açının değerlendirilmesi, 42. gün p<0.01.

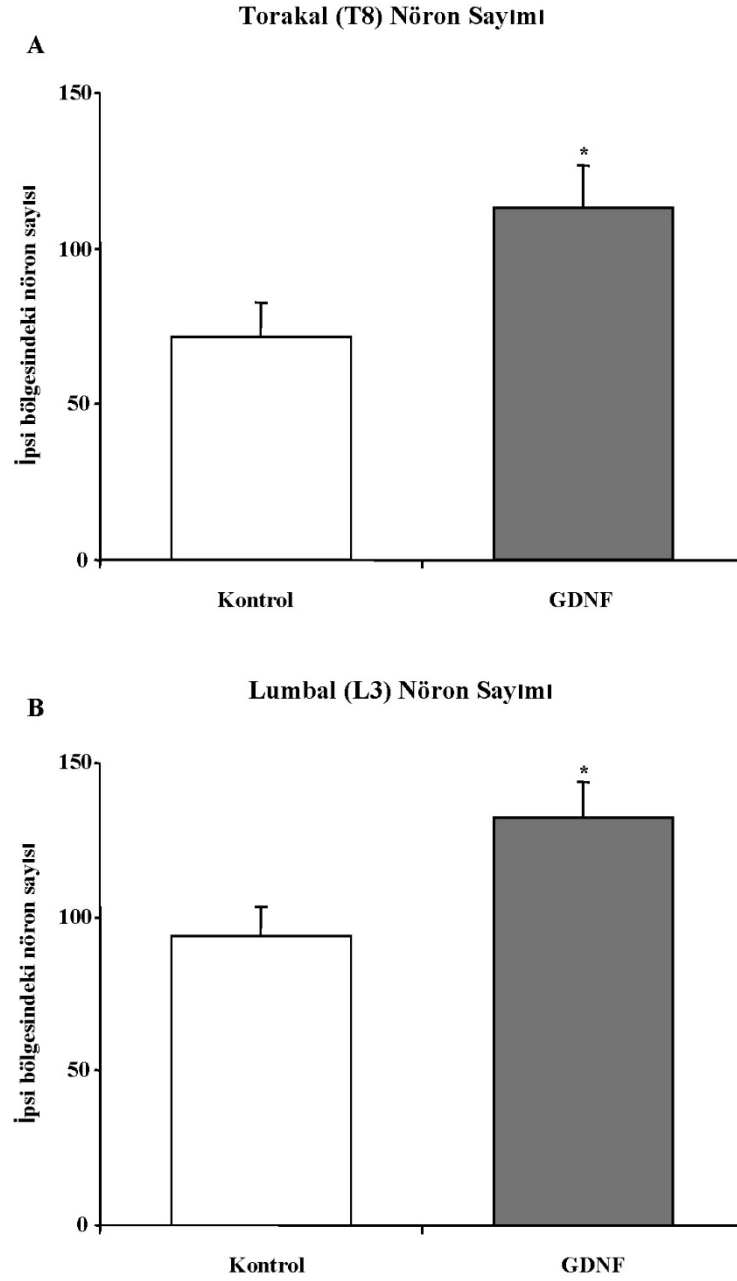
Ayak açısı testinde farelerde arka ekstremitede arka ayaklarda retraksiyon ve protraksiyon mesafesinin değişmesinin medyan orta hat ile yaptığı açıyı ölçmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Burada medyan orta hat ile yapılan açı mesafesi fazlaştıkça attığı adımın motor koordinasyonuna katkısına da doğru orantılı olarak artmaktadır.

Grafikte (Şekil 6.1.7.1.) uzun dönemde 42. günde GDNF uygulaması içeren grubun açısının kontrol grubunda daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Diğer bir deyişle, GDNF içeren grup yürüme ve motor becerilerini düzgün adım atma statüsünde uzun dönemde arttırmıştır.

#### **6.4. Omurilik Hasarı Sonrası Hücresel Sağ Kalımın Değerlendirilmesi**

Hücresel sağ kalımın belirlenmesi için Cresyl violet boyaması yapılan kesitlerin virüs enjeksiyon bölgelerine yakın olan alanları (Torakal T8 ve Lumbal L3) ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Bu bölümdeki tüm grafikler, bu görüntüler kullanılarak her iki grup ve bu grupların T8 ve L3 bölgeleri olmak üzere, zen blue programı üzerinde kontra (sağlam bölge) ve ipsi (hasarlı bölge) alanlarındaki nöronlar ve motor nöronlar sayılarının ipsi bölgesinin kontra bölgesine göre yüzde hesaplamasını içermektedir.

#### 6.4.1. Torakal ve Lumbal alan kesitlerinde yapılan nöron sayımının gruplara göre değerlendirilmesi

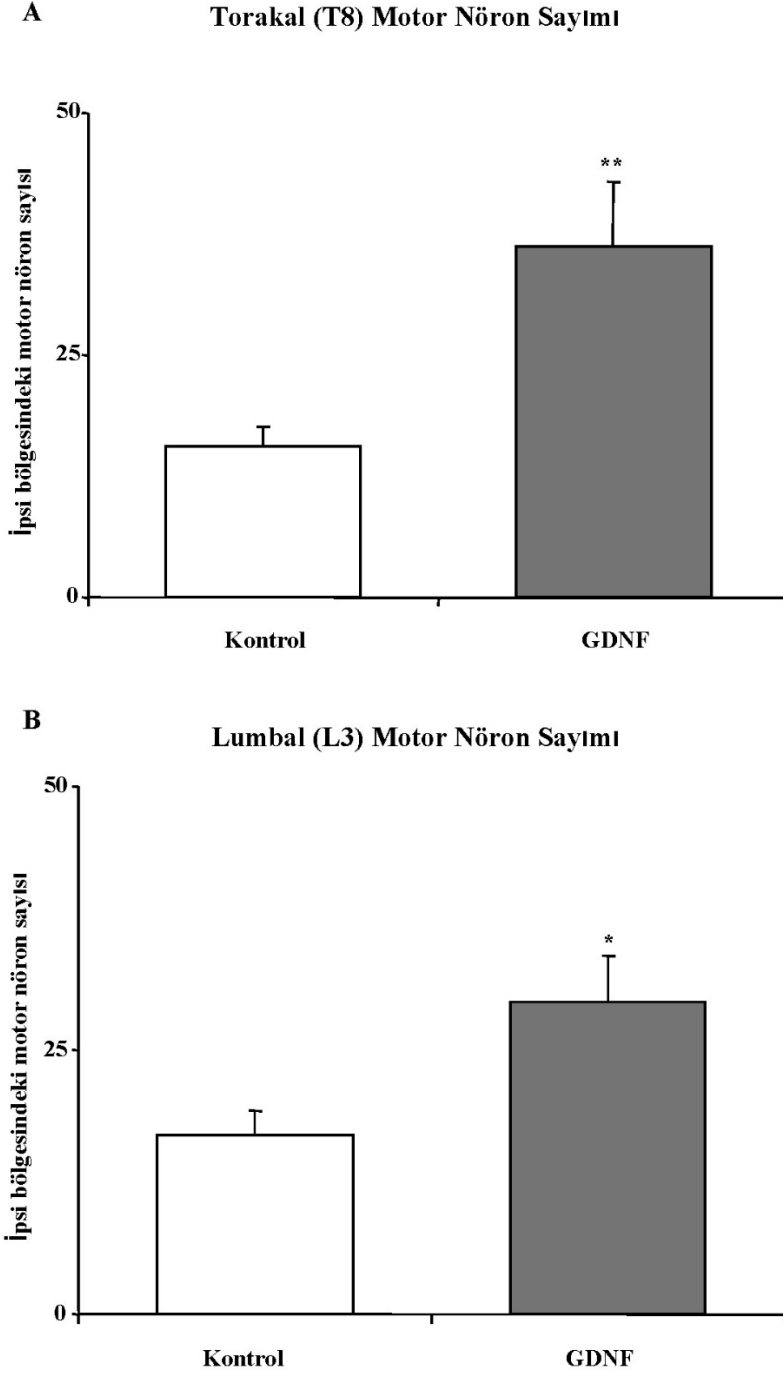


**Şekil 6.4.1.1.** Cresyl violet boyaması ile torakal ve lumbal alanlardan alınan kesitlerde hesaplanan nöron sayıları. (A) Torakal T8 alanındaki nöron sayımı,  $p < 0.05$ . (B) Lumbal L3 alanındaki nöron sayımı,  $p < 0.05$ .

Cresyl violet boyaması yapılan kesitler zen blue programı kullanılarak T8 ve L3 bölgelerinden alınan görüntülerde GDNF ve kontrol grupları için nöron sayımları yapılmıştır. Şekil 6.2.1.1. ipsi alanlarındaki nöron sayılarının kontra alanlarındaki nöron sayılarına olan oranlanmış verilerini içermektedir. Bu verilere göre, GDNF uygulaması içeren grupta torakal ve lumbal alanların her ikisinde de daha fazla nöron sayısına ulaşılmıştır.



6.4.2. Torakal ve Lumbal alan kesitlerinde yapılan motor nöron sayımının gruplara göre değerlendirilmesi



**Şekil 6.4.2.1.** Cresyl violet boyaması ile torakal ve lumbal alanlardan alınan kesitlerde hesaplanan motor nöron sayıları. (A) Torakal T8 alanındaki motor nöron sayısı,  $p < 0.01$ . (B) Lumbal L3 alanındaki motor nöron sayısı,  $p > 0.05$ .

Cresyl violet boyaması sonrasında T8 ve L3 bölgelerinden alınan kesitlerde GDNF ve Kontrol grupları için ventral alanlardaki motor nöronlar sayılarak hesaplanmıştır.

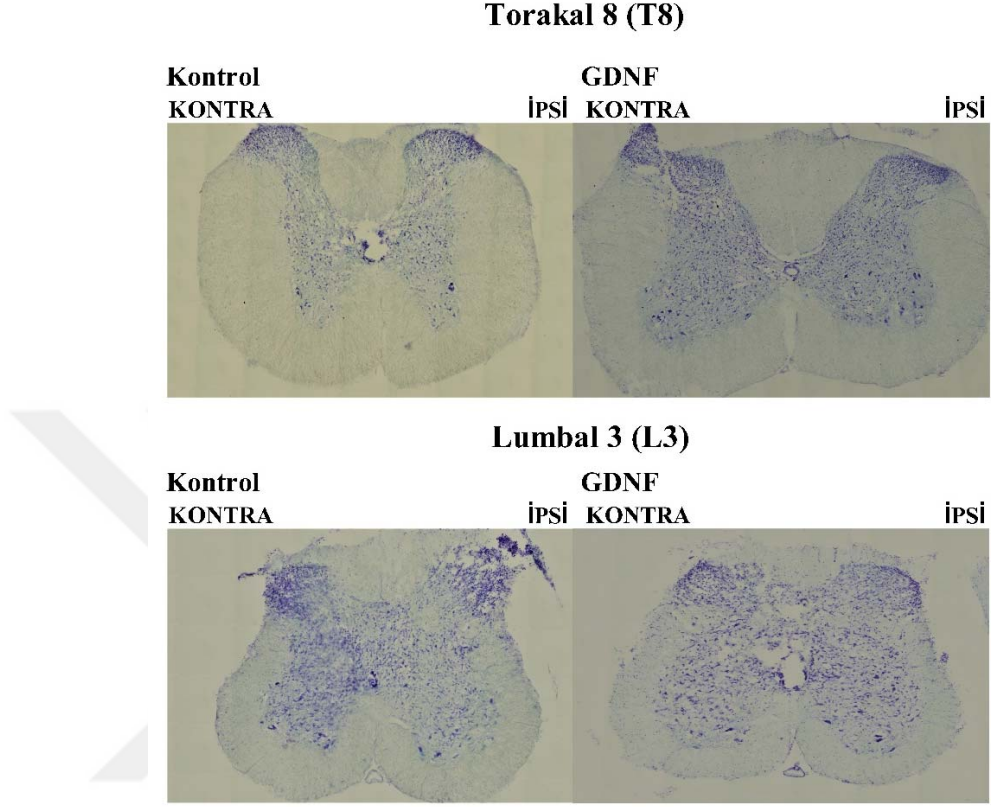
Gruplar içerisinde kontra ve ipsi alanları kıyaslanarak hesaplanan grafiklerde, T8 ve L3 bölgelerinin ikisinde de motor nöron sayımları GDNF grubunda kontrol grubuna göre ölçüde fazlalık göstermektedir.

### **6.5. Omurilik Hasarı Sonrası Atrofinin Değerlendirilmesi**

Omurilik hasarı sonrasında gruplara göre değişen atrofinin belirlenmesi için Cresyl violet boyaması yapılan kesitlerin virüs enjeksiyon bölgelerine yakın olan alanları (Torakal T8 ve Lumbal L3) ışık mikroskobu ile görüntülenmiştir. Bu bölümdeki tüm grafikler, bu görüntüler kullanılarak her iki grup ve bu grupların T8 ve L3 bölgeleri olmak üzere, zen blue programı üzerinde kontra (sağlam bölge) ve ipsi (hasarlı bölge) dorsal ventral alanlar, funikulus alanları ve total omurilik alanları ölçümlerinin ipsi bölgesinin kontra bölgesine göre yüzde hesaplamasını içermektedir.



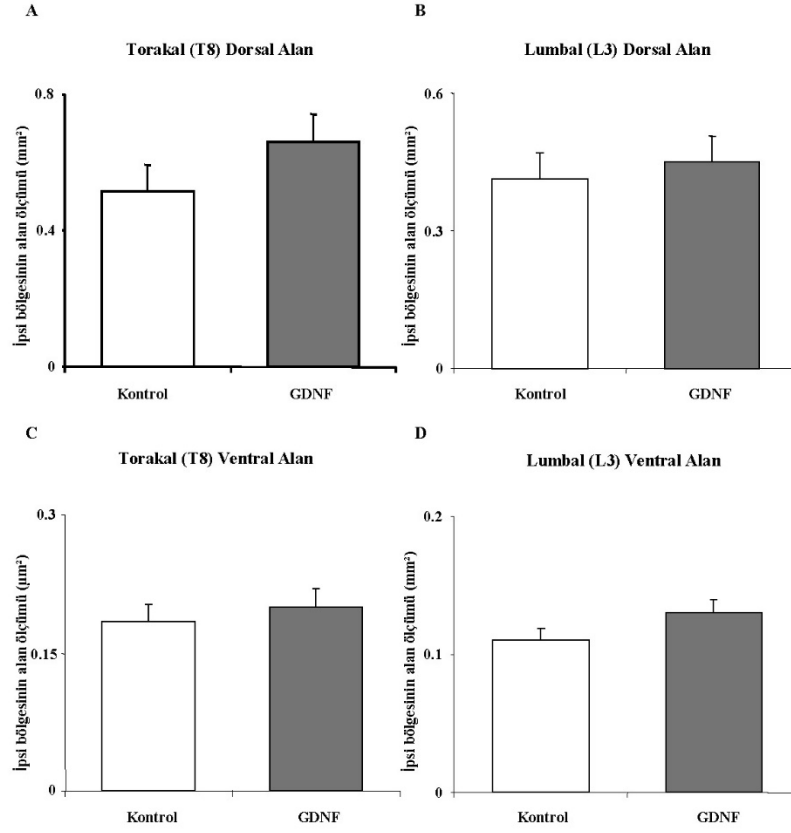
### 6.5.1. Omurilik hasarı sonrasında torakal ve lumbal bölge kesitlerinde atrofinin gösterilmesi



**Şekil 6.5.1.1.** Cresyl violet boyaması ile GDNF ve Kontrol gruplarından torakal ve lumbal alanlardan alınan kesitlerin şekilleri. Kontra: sağlam bölge, ipsi: hasarlı bölge.

Cresyl violet boyaması sonrasında GDNF ve Kontrol grupları için T8 ve L3 bölgelerinden alınan kesitler Şekil 6.3.1.1’de gösterilmektedir. Kontra bölümleri, ipsi ile kıyaslandığında T8 seviyesinde kontrol grubunda hafif bir atrofi gözlemlenmektedir, ancak bu düzeyde bir atrofi T8 seviyesinde GDNF grubunda bulunmamaktadır. L3 seviyesinde kontrol grubunda keskin bir atrofi gözlenmemektedir. L3 seviyesinde GDNF grubu ile kontrol grubunda atrofi alanları farklılıklarına bakıldığında belirgin bir değişiklik saptanmamıştır.

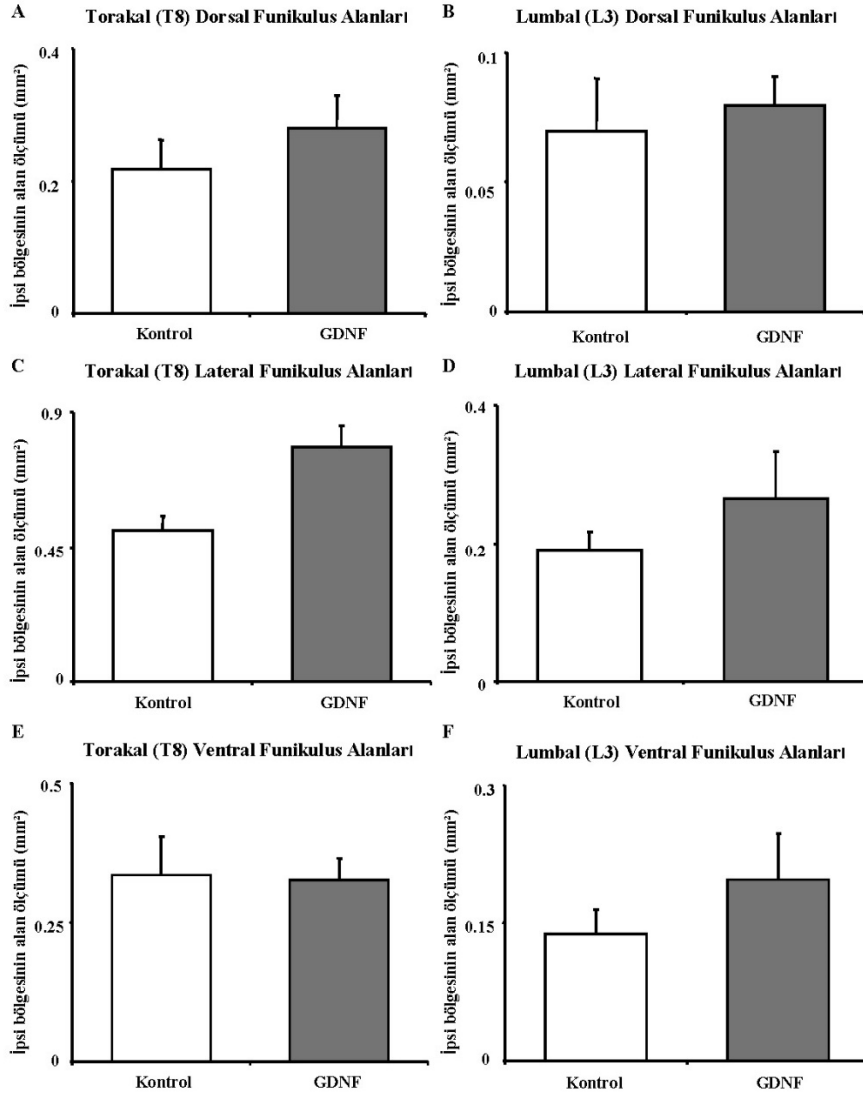
## 6.5.2. Torakal ve Lumbal bölgelerde dorsal-ventral alan ayrımının değerlendirilmesi



**Şekil 6.5.2.1.** Cresyl violet boyaması ile torakal lumbal bölgelerden alınan kesitlerde dorsal- ventral alan ayrımının değerlendirilmesi. (A) T8 bölgesinde GDNF, Kontrol grupları için dorsal alanlar,  $p>0.05$ . (B) L3 bölgesinde GDNF, Kontrol grupları için dorsal alanlar,  $p>0.05$ . (C) T8 bölgesinde GDNF, Kontrol grupları için ventral alanlar,  $p>0.05$ . (D) L3 bölgesinde GDNF, Kontrol grupları için ventral alanlar,  $p>0.05$ .

Cresyl violet boyaması yapılan kesitler T8 ve L3 bölgelerinde fare omurilik seviye atlası kullanılarak dorsal ventral ayrımı yapılmıştır. GDNF ve Kontrol grupları için T8 ve L3 bölgeleri için dorsal alan ve ventral alanlar zen blue programında hesaplanmıştır. T8 bölgesinde dorsal ve ventral alanlar kontra ile ipsi atrofileri kıyaslandığında, GDNF grubunda Kontrol grubuna göre alanların ölçümünün arttığı gözlemlenmiştir. Buna karşın, L3 bölgesinde dorsal ve ventral alanlar kontra ve ipsi atrofileri kıyaslandığında ise GDNF grubunda alanlarda artış gözlenmemiştir.

### 6.5.3. Torakal ve Lumbal bölgelerde funikulus alanlarının değerlendirilmesi

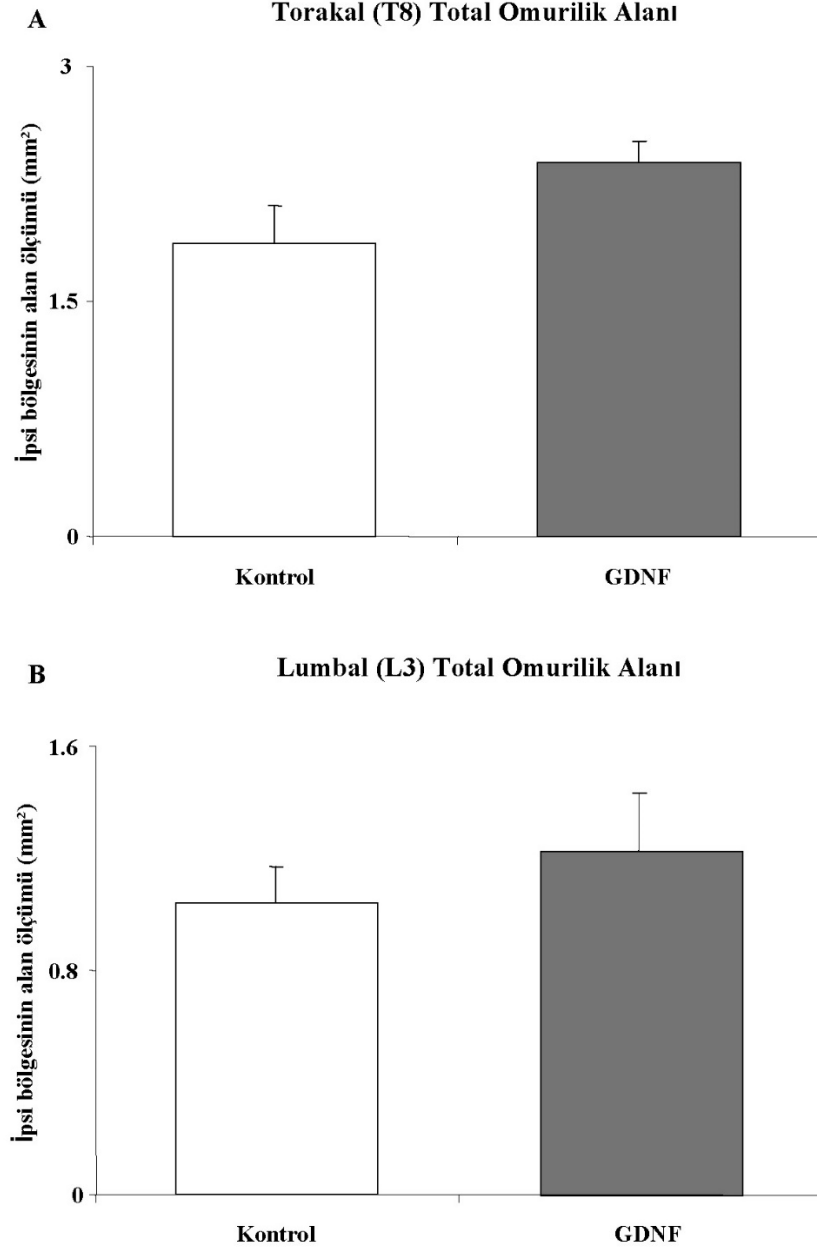


**Şekil 6.5.3.1.** Cresyl violet boyaması sonrası T8 ve L3 bölgelerinden alınan kesit görüntülerinde funikulus alanlarının değerlendirilmesi. (A) T8 bölgesinde GDNF, Kontrol grupları için dorsal funikulus alanları,  $p>0.05$ . (B) L3 bölgesinde GDNF, Kontrol grupları için dorsal funikulus alanları,  $p>0.05$ . (C) T8 bölgesinde GDNF, Kontrol grupları için lateral funikulus alanları,  $p<0.05$ . (D) L3 bölgesinde GDNF, Kontrol grupları için lateral funikulus alanları,  $p>0.05$ . (E) T8 bölgesinde GDNF, Kontrol grupları için ventral funikulus alanları,  $p>0.05$ . (F) L3 bölgesinde GDNF, Kontrol grupları için ventral funikulus alanları,  $p>0.05$ .

Cresyl violet boyaması sonrasında T8 ve L3 bölgelerinden alınan kesitlerde her bir bölge ve GDNF, Kontrol grupları için üç ayrı alan (dorsal, lateral, ventral) ölçülmüştür. Bu ölçümlerde T8 bölgesinde sadece lateral funikulus alanında GDNF grubunun artış gösterdiği istatistiksel olarak anlamlı bir ölçüde gözlemlenmiştir. Dorsal ve ventral funikuluslarda ise GDNF grubunda artış göstermemektedir. L3 bölgesinde bakıldığında ise, dorsal ve ventral funikulus alanlarında GDNF grubunda az oranda bir artış gözlemlenmektedir. Burada, lateral funikulusta GDNF grubunda artışa rastlanılmamıştır.



#### 6.5.4. Torakal ve Lumbal alan kesitlerinde total omurilik alanı değerlendirilmesi

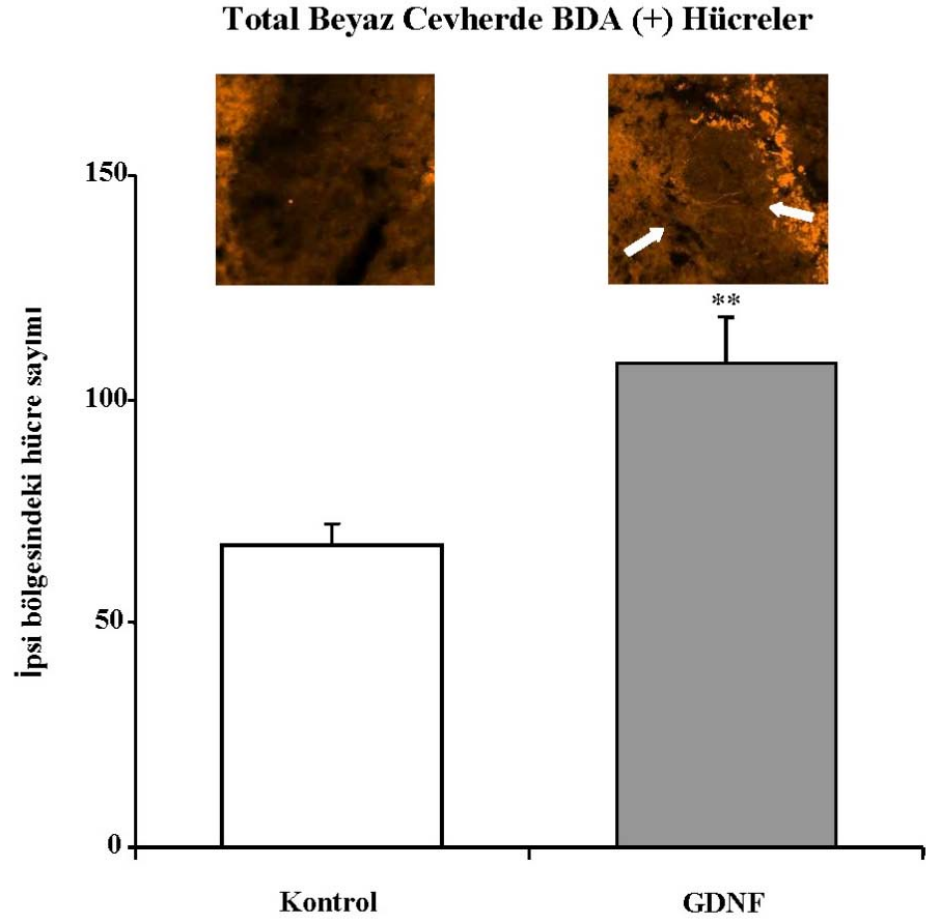


**Şekil 6.5.4.1.** Cresyl violet boyaması sonrasında torakal ve lumbal bölgelerden alınan kesitlerde GDNF ve Kontrol grupları için total omurilik alanı hesaplanması. (A) T8 bölgesinde total omurilik alanı hesaplanması,  $p>0.05$ . (B) L3 bölgesinde total omurilik alanı hesaplanması,  $p>0.05$ .

Total omurilik alanlarına bakıldığında T8 ve L3 bölgelerinde GDNF grubunda Kontrol grubuna göre daha yüksek alanlar elde edilmiştir.

### 6.6 Omurilik Hasarı Sonrası Aksonal Projeksiyon

Omurilik kesisi sonrası 43. günde L4 bölgesine BDA traser enjeksiyonu yapılarak aksonların lumbal bölgeden torakal bölgeye uzamaları ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonucunda GDNF grubunda kontrol grubuna göre ipsi bölgesindeki BDA (+) hücre sayılarının istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde daha yüksek olduğu saptanmıştır.



**Şekil 6.6.1.** BDA boyaması sonrasında T8 bölgesinden alınan kesitlerde Kontrol ve GDNF grupları için total beyaz cevherde ipsi bölgesindeki BDA (+) hücrelerin sayısı,  $p < 0.01$ .

## 7. TARTIŞMA

Bu tezde, GDNF nörotrofik faktörünün lentiviral vektör aracılığıyla farelere aktarılmasının *in vivo* olarak oluşturulan omurilik hasarı sonrasında; 1) hücresel sağ kalım, 2) duyu iletim yollarındaki aksonal yayılma, 3) elektrofizyolojik parametrelerdeki değişim, 4) motor aktivitelerindeki fonksiyonel iyileşme gibi süreçler üzerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç ile travmatik olarak gerçekleşen omurilik hasarının farelerde oluşturabilmek için yarı kesi modeli kullanılmıştır.

Omurilik yarı kesi hasar modelinde esas, travmatik olarak gerçekleşen omurilik hasarının ikincil fazında oluşan mekanizmaları oluşturmak ve bu yönüyle klinik olarak gerçekleşen travmatik omurilik hasarı vakalarını taklit etmektir. Bu modelde omurilik, T12 seviyesindeki median hattın geçen damarın sağ lateralinden kesilerek omurilik dokusu bu bölgede birbirinden üçgen şeklinde bir görüntü ile ayrıştırılır. Bu uygulamanın amacı omuriliğe inen ve omurilikten çıkan yolların arasındaki aksonal bağlantıyı zedeleyip motor ve duyu fonksiyonlarında işlevsizlik oluşturmaktır. Omurilik hasarı şayet bu şekilde bir hasar ile torakal bölgenin kaudal kısımlarından (T10-T13 arası) oluşturulmaz ise travmatik hasar taklit edilememiş olup fareler hasardan sonra 1. ve 2. günlerde hızlı bir şekilde yürüme becerilerini normale döndürmektedirler. Burada, omurilik hasarının düzeyi nörolojik hasar ile korale edildiğinde torakal (Özellikle T10-T13) bölgeden oluşturulan hasar modelinin hasarı bütünüyle taklit ettiği kabul edilmektedir (100). Genel olarak yapılan çalışmalarda yarı kesi hasar modeli olarak T10 seviyesi seçilmektedir. Bunun sebebi, klinik olarak gerçekleşen travmatik omurilik hasarlarında yaralanmaların büyük bir çoğunluğunun servikal bölge ve torakolumbal yani torakal bölgenin kaudalinde oluşmasıdır. Bunun yanı sıra torakolumbal seviyede oluşan hasarlar tamamlanmış hasardan ziyade tamamlanmamış hasar kuadripilejisine yol açar. Bu senaryoda da hayvanlarda merkezi sinir sisteminde, motor fonksiyon işlevi bozuklukları oluşur ancak hayati önem taşıyan bir senaryo gerçekleşmemektedir (132). Bunun aksine servikal bölgede gerçekleşen hasar özellikle solunum yetmezliği sonucu ölümlere yol açmaktadır (129, 133). Bu nedenle, bu tezde torakolumbal seviye hasar oluşturulmuştur.

T10 seviyesinin yerine T12 seviyesinin seçilmesinin nedeni deney dizaynında virüs enjeksiyonlarının hasar bölgesini ortalayacak şekilde planlanması ve hasarın üst seviyesindeki virüs enjeksiyonu noktasının torakoservikal bölgeye yaklaşmasını önlemektir. Öte yandan model olarak tam kesi modeli yerine yarı kesi modeli kullanılmasının amacı ise tam kesi modelinin hayvanların hareketlerinin kısıtlanması ve beslenmelerinin aksaması gibi engellerinin bulunmasıdır. Ayrıca omurilik hasarı yarı kesi modelinin T12 seviyesinde sağ lateral kısımda gerçekleştirilmesinin nedeni ise sol ayağın motor becerilerini koruyarak işlevi bozulan sağ ayağa davranış deneylerinde kontrol görevi görmesini sağlamaktır.

GDNF molekülünün omurilik yarı kesi modeli sonrası hasara uğramış aksonların aldıkları uyarıyı efektör kasa iletimi üzerine etkisinin incelenmesi için bütün deney gruplarındaki herbir hayvandan elektromiyografi kaydı alınmıştır. Bunun için uyarı hasarın bulunduğu T12 bölgesine göre rostral bir bölgeden gönderilmiş ve hayvanın sağ arka ayağında bulunan gastroknemius kasından ise kayıt alınmıştır. Uyarının hasarın üst segmentinden verilmesinin amacı, uyarının yeni oluşan sinapslar sayesinde hasarlı bölgeyi ne kadar sürede geçip kasa iletiildiğini inceleyebilmektir. EMG analizinin amacı oluşturulan uyarı zamanı ile uyarının gastroknemius kasına ulaşması arası geçen gecikme süresinin motor fonksiyonlarında gerçekleşen iyileşme açısından incelemektir. Burada, T12 bölgesinden geçen ve hasar oluşması ile kaybolan beyinden omuriliğe inen ve hareketi kontrol eden inen yollardan kortikospinal yolların tekrardan işlev kazanıp iletinin bacağa iletilip tepki oluşturabildiğini göstermektedir (134). Literatürde insanda yapılmış olan klinik çalışmalarda EMG kayıtlarının sonuçlarına bakıldığında, uyarana karşı oluşturdukları tepki süresi omurilik hasarı geçiren bireylerde normal bireylere göre daha fazla olduğu ve bu sürenin yaklaşık olarak 0.4 ms ile 0.7 ms arasında değiştiği gösterilmiştir (135). Yaptığımız çalışmada lentiviral yöntemlerle GDNF ifadesi arttırılmış hayvanların verilen uyarıyı kontrol grubuna göre daha kısa sürede kasa ilettiği görülmüştür.

Bu sonuç GDNF ifadesi arttırılmış hayvanların hasar bölgesinden geçen aksonların kontrol grubuna nazaran daha fazla sinaps yapıp kortikospinal yolları kullanarak uyarıyı kasa ilettiği hakkında fikir vermektedir.



Farelerde yapılan bir çalışmada omurilik hasarı sonrası fonksiyonel iyileşmenin beyinden gelen aksonal projeksiyonların rejenerasyona uğramaksızın hasarı geçerek inen yolaklar üzerinden propriospinal bağlantılar oluşturması ile de gerçekleştiğini göstermektedir (136).

Omurilik hasarı sonrasında zarar görmüş aksonlarda belirli bir dozda fonksiyonel iyileşme gerçekleştiği, yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir. Bu fonksiyonel iyileşme sürecinde hasar sonrasında 3.-4. günde ve sonrasında yarı kesinin üstünde ve altında sağlıklı kısımda kalan propriospinal nöronlar sayesinde kesi bölgesi etrafında yeni bağlantılar kurularak beyin ile omurilik arası ilişki tekrardan kurulabilmektedir (98, 137, 138). Öte yandan, hasar sonrası hücre içi gerçekleşen ikincil mekanizmaların bir parçası olan membran potansiyelinin bozulması sonucu hücre dışına glutamat salınımı ve artan glutamat düzeyinin diğer hücrelerin yüzeyindeki NMDA reseptörleriyle etkileşerek hücre ölümünü tetiklediği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (139-141).

Omurilik yarı kesi modeli hasarı sonrası oluşan ikincil mekanizmalar üzerinde çalışarak hasarın hem hücresel süreçleri onarmak hem de devamında fonksiyonel iyileşme sürecini hızlandırmak amacıyla GDNF kullanılmıştır. Nörotrofik faktörler merkezi sinir sistemi hasarları sonrasında ortamda hasarlı nöronlar üzerinde etki ederek aksonların işlevlerini tekrar kazanmaları için gerekli kimyasal olayları desteklemektedirler. GDNF nörotrofik faktörü GDNF ailesinin bir üyesi olmasının yanı sıra nörodejeneratif hastalıklarda terapatik ajan olarak kullanılabilme özelliği ile bilinmektedir (29, 32). Bu tezde GDNF lentivirüs vektörün içerisine uygulanıp dokuda ifadesi artırılarak farelere enjekte edilmiştir. Bu enjeksiyon hasardan 12 gün önce enjeksiyon yapılmıştır. Literatürde yapılan bir çalışmada hasardan 24 saat sonra enjekte edilen genetik olarak işlenerek hücrelere aktarılmış GDNF' in ikincil hasar mekanizmalarına bir etkide bulunmadığı açıklanmıştır (142).

Bunun yanı sıra, hasardan hemen önce enjekte edilen GDNF senaryosunda ise ikincil hasar oluşumunda azalma gözlemlenmiştir (142). Burada bu durumu etkileyen parametrelerden biri enjekte etme zamanı olduğu kadar diğer faktör de GDNF' in işlenme biçimidir. GDNF direkt olarak enjekte edilebildiği gibi genetik olarak dokuda işlenerek de enjekte edilebilir (143).

Bu tezde lentivirüs ile paketlenen GDNF' in hasardan 12 gün önce verilmesinin nedeni yapılan diğer araştırmaların ışığıyla, lentivirüsün konak fare metabolizmasında GDNF ifadesini arttırarak fareyi hasar olmadan belirli bir nörotrofik faktör seviyesine ulaştırmaktır.

Bu sebepler bir bütün olarak bu tezde omurilik hasarının yarı kesi modeli kullanılarak T12 seviyesinden ve virüs enjeksiyonlarının ise GDNF nörotrofik faktörünün lentivirüs uygulaması ile birlikte T9 ve L2 seviyelerinden oluşturulması ile gerçekleştirilmiştir.

Fonksiyonel iyileşme açık alan davranış testi, basso motor skorlaması, merdivende yürüme testi ve arka ayak açısı testi ile değerlendirilmiştir. Bu testler omurilik hasarından sonra 3. 14. 28. ve 42. günlerde gerçekleştirilmiştir ve her birinin fonksiyonel iyileşmeyi analiz etme yöntemi farklılıklar göstermektedir.

Açık alan testi farelerin spontan motor hareketlerini belirli bir süre içerisinde çeşitli parametreler ile ölçüp değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Açık alan davranış testinin ilki taban davranış (baseline) olarak hasardan önce yapılmaktadır ve diğer günlerde yapılan açık alan testleri bu taban davranış testi ile kıyaslanarak grafiklere anlam yüklenmektedir. Açık alan testi parametrelerinden hareketlilik süresinde, farelerin açık alan içerisinde belirli bir sürede hareketli geçirdiği zamanların taban davranış verilerine göre yüzdeleri hesaplanmıştır. Bu testin sonucunda elde edilen grafik, farelerin hasardan önce taban davranış ve hasardan sonra 3., 14., 28. ve 42. günlerde hareketli geçirdikleri sürelerin GDNF ve Kontrol gruplarına göre farklılıklarını göstermektedir. Yaptığımız çalışmada, açık alan testi ile farelerin hareketlilik sürelerine omurilik hasarı sonrasında 3., 14., 28. ve 42. günlerde bakıldığında hareketlilik GDNF grubunda Kontrol grubuna göre uzun dönemde (28. ve 42. günler) artış göstermektedir. Bu durumda, GDNF tedavisi gören hayvanların mobiliteleri artarken, buna bağılı olarak Kontrol grubunda ise uzun dönemde hareketsizliğin GDNF' e göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 6.3.1.1.).

Bu veriler fonksiyonel geri kazanım olarak bütünüyle değerlendirildiğinde, omurilikte oluşturulan hasar sonrası arka ayakta meydana gelen koordinasyon bozukluğunun uzun dönemde düzelerek hayvanların hareket edebilme becerilerini hasarsız olan sol arka ayak gibi normale döndürüp hareketlilik sürelerini arttırmıştır.

Açık alan testi parametrelerinden biri olan maksimum hız verileri ile farelerin belirli bir sürede açık alan sisteminde sarf ettikleri maksimum hızlar ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonucu farelerin hasardan önce taban davranış ve hasardan sonra 3., 14., 28. ve 42. günlerde sarf ettikleri maksimum hız miktarlarının GDNF ve Kontrol gruplarına göre gösterdiği değişikliği göstermektedir. Yapılan çalışmada, hayvanların açık alan testinde belirli bir süre içerisinde sarf ettikleri maksimum hızlara bakıldığında, GDNF grubunun uzun dönemde 28. günde en yüksek hızı sarf ettikleri gözlemlenmektedir. Kontrol grubunun ise 28. ve 42. günlerde maksimum hız değerleri GDNF grubuna göre düşük miktardadır. GDNF ve Kontrol grupları 28. günden sonra maksimum hız değerlerini düşürmektedir. Bu durum GDNF grubunun kontrol grubuna göre yüksek olması yönünden anlamlı fakat 42. günde 28. güne göre tüm gruplarda düşüş olması yönünden beklenilenin dışında gerçekleşmiştir.

Açık alan testinde kat edilen mesafenin ölçümü bu testin bir diğer verisini oluşturmaktadır. Burada, farelerin açık alanda belirli bir sürede kat ettikleri mesafe hesaplanmaktadır. Bu testin sonucunda farelerin hasardan önce taban davranış ve hasardan sonra 3., 14., 28. ve 42. günlerde kat ettikleri mesafelerin GDNF ve Kontrol gruplarına göre sergiledikleri farklılıklar yorumlanmaktadır. Bu sonuçlara bakıldığında (Şekil 6.1.3.1), hayvanların belirli bir açık alanda kat ettikleri mesafeler karşılaştırıldığında, GDNF grubu ile Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak herhangi anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. Fakat, 28. günde kontrol grubuna göre artış göstermektedir ve bu artış 42. günde tekrar kontrol grubunun seviyelerine inmektedir. Burada, 28. günde elde edilen farklılık GDNF enjeksiyonu yapılan farelerin açık alanda daha fazla mesafe kat ederek GDNF enjeksiyonunun hasardan sonra oluşan arka ayak fonksiyon bozukluğunun iyileşmesinde pozitif yönde etki ettiği vurgusunu oluşturmaktadır.

Hayvanların açık alanda kat ettikleri mesafe verilerini, hayvanların maksimum hız verileri ile birlikte yorumladığımızda ise, sarf edilen maksimum hızlar düşünüldüğünde GDNF grubundaki hayvanların, her ne kadar hayvanların kat ettikleri mesafeler uzun dönemde eşit gibi gözükse de daha hareketli bir biçimde mesafe aldıkları gözden kaçmamaktadır.

Burada, açık alanda sarf edilen mesafe sonuçlarına literatürde diğer örneklerle de bakıldığında, bu durumun sebebinin hayvanların belirli bir alanda hızlarını düşürmeyip ve hatta arttırıp, sadece mesafe olarak ölçüsü uzak bölgelere hareket etmek yerine daha kısıtlı bir bölgede hareket etmeyi tercih ettikleri yönünde olduğu düşünülmektedir (144).

Açık alan testi parametrelerinden bir diğeri ise kenar bölgede geçirilen zaman ölçümüdür. Bu ölçümde farelerin açık alanda belirli bir sürede açık alan aparatının kenar bölgelerinde geçirdikleri süreler hesaplanmaktadır. Bu testin sonucunda farelerin hasardan önce taban davranış ve hasardan sonra 3., 14., 28. ve 42. günlerde kenar bölgede geçirdikleri sürelerin GDNF ve Kontrol gruplarına göre sergiledikleri farklılıklar yorumlayarak bu sürenin farelerin anksiyete seviyeleri ile gösterdikleri fonksiyonel iyileşme arasındaki bağlantıyı kurmak amaçlanmaktadır. Yapılan çalışmalar ile farelerde açık alan testinde kenar alanda geçirilen süre farelerin içinde buldukları anksiyete ile doğru orantılı olduğu tespit edilmiştir (145, 146). Yapılan çalışmada bu testin sonucunda, hayvanların omurilik hasarı sonrasında 3., 14., 28. ve 42. günlerde açık alan testinin kenar bölgelerinde geçirdikleri zamanlara bakıldığında uzun dönemde 42. günde kontrol grubunun GDNF grubuna göre kenar bölgelerde daha fazla zaman geçirdiği gözlemlenmektedir. Bu veri, kontrol grubunun GDNF grubuna göre oluşturulan omurilik hasarı sonrası spinal şoku daha az tolere ederek uzun dönem 42. güne gelindiğinde bile hala açık alanda serbestçe gezinmek yerine kenar bölgelerde gezinerek daha yüksek anksiyete belirtisi gösterdiği bilgisini vermektedir (147-149).

Basso motor fare skorlaması testinin amacı omurilik hasarı sonucunda farelerde arka ekstremitede ayak hareketlerinin belirli bir hareket skalası baz alınarak motor kabiliyetlerin gelişiminin puan verilerek gözlemlenmesidir (129) . Bu testte hasar öncesi taban davranış yapılmaksızın skoru 9 olarak kabul edilmektedir (Tablo 5.6.2.). Bu test sonucunda farelerin hasar önceki skoru ve hasardan sonra 1., 2., 3., 14., 28. ve 42. günlerde hesaplanan skorlarının GDNF ve Kontrol gruplarında oluşan farklılıklar gözlemlenmektedir. Yapılan çalışmada, hasar sonrası ilk iki gün boyunca iki grupta da motor becerilerin düzeldiğini destekleyecek bir veriye ulaşılmamıştır.

Omurilik hasarı uygulanmış hayvanlarda yapılan basso motor skorlaması, ilk iki gün arka ayakları kullanabilme becerisi ve hasarla birlikte oluşan spinal şoka bağlı olarak oldukça düşüktür [142]. Bizim çalışmamızda da şekil 6.3.5.1.'e bakıldığında literatürle paralel olarak 3. ile birlikte iki grupta da skorlamada artışlar başlamaktadır fakat bu artış 3. gün ( $p < 0,05$ ) haricinde anlamlı bir şekilde gözlemlenmemektedir. Uzun dönem olarak 42. günde GDNF grubunun skoru kontrol grubuna göre artmıştır. Bu veriler sonucunda basso motor skorlamasında GDNF'in omurilik hasarı sonrasında uzun dönemde etkisini gösterdiğine dair bir ışık görmüş bulunmaktayız fakat nörolojik davranış testi ile bakıldığında bu bulgu anlamlılık taşımamaktadır.

Merdivende yürüme testinin amacı arka ayaklarda omurilik hasarı ile kaybolan motor koordinasyonun farelerin yürüme becerilerine olan etkisini ölçmektir (150, 151). Bu testte fareler 2 günlük bir süre boyunca yürüme aparatına alıştırılmaktadır ve bu aşamadan sonra taban davranış testi uygulanmaktadır. Bu uygulamanın farelerin merdivende yürüme aparatını tanıyıp taban veri kayıtlarında duraksamadan yürümelerini sağlamaktır. Bu testin sonucunda farelerin hasardan önce taban davranış ve hasardan sonra 3., 14., 28. ve 42. günlerde sergiledikleri merdivende yürüme kabiliyetleri, adım atma becerileri, hesaplanarak GDNF ve Kontrol grupları arasındaki farklılıklar analiz edilmiştir. Bu analizlere göre, uzun dönem 42. günde GDNF grubunun merdiven aparatında doğru attığı adım yüzdesi kontrol grubuna göre daha yüksek olarak ölçülmüştür. Bu veri, GDNF uygulaması yapılan farelerin uzun dönemde arka sağ ayaklarında omurilik hasarı ile kaybolan motor koordinasyonunun geri kazanılarak yürüme becerilerini arttırdığını göstermektedir (151, 152). Hasar sonrasında analiz yapılan diğer günlere bakıldığında anlam oluşturacak bir bulguya ulaşılmamıştır. Bu sonuç, GDNF molekülünün omurilik hasarı patofizyolojisinde etkisini uzun dönemde gösterdiğine dair bilgi vermektedir. Bu durum aynı zamanda ileride yapılacak çalışmalara da yorum katmaktadır. Şöyle ki; bu çalışmada 42. Günde istatistiksel olarak bir fark görülmemiştir ancak hayvanlar daha ileri bir sürede sakrifiye edilip daha uzun bir dönem davranış testleri uygulanarak GDNF'in uzun dönem etkileri incelenebilir.

Arka ayak açışı testinin amacı farelerde arka ekstremitede ayaklarda oluşan retraksiyon ve protraksiyon mesafe değişikliğini hesaplayarak bu değişikliğin motor koordinasyon aksamalarına olan etkisini analiz etmektir (152).

Farelerde arka ekstremitede hasar olmadığında, sağlam olduklarında, orta median hattın daha fazla açı yaparak adım attıkları tespit edilmiştir. Bu test sonucunda farelerin hasardan sonra 3., 14., 28. ve 42. günlerde hesaplanan arka ayak açılarının GDNF ve Kontrol gruplarında oluşan farklılıklar hesaplanarak bu farklılıkların motor koordinasyonlara etkisi analiz edilmiştir. Bu analiz hasar görmemiş farelerin ayak açılarını daha fazla açı yaparak gerçekleştirdiği baz alınarak gerçekleştirilmiştir.

Bu analizler sonucunda, operasyondan sonra 3. gün ile 14. gün arasında GDNF ve Kontrol grupları arasında farelerin arka ayaklarında oluşan retraksiyon ve protaksiyon hareketlerinin orta median hat ile yaptığı açılarda anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Şekil 6.3.7.1.). Öte yandan 28. günden itibaren GDNF grubu kontrol grubuna göre açı ortalamasını arttırmıştır. Özellikle uzun dönemde 42. günde GDNF grubunda gözle görülür ölçüde bariz bir farklılık gözlemlenmektedir. Burada, farelerde omurilik hasarı sonrasında geçirilen gün sayısı arttıkça adım atarken orta median hat ile yapılan açı da arka ayak eklemlerinde oluşan fonksiyonel iyileşmeler sonucu, artmaktadır (153). Omurilik hasarı sonrasında, hayvana aktarım yönteminden bağımsız olarak, GDNF uygulamasının yapılan diğer çalışmalarda lokomotor geri kazanımını arttırdığı tespit edilmiştir (14). Oluşturulan omurilik hasar sağ arka ayakta fonksiyon kaybına yol açarken bu fonksiyon kaybı sağlam olan sol ayak kontrol olarak kullanılarak da incelenebilmektedir. Hasarla birlikte sağ ayakta oluşan fonksiyon kaybının geri kazanım, hasar sonrasında oluşan ikincil mekanizmaların etkisinde olarak, hasarsız olan sol ayak gibi hareket edebilmesi uzun bir süreç ile oluşmaktadır. Bu tezde yapılan GDNF enjeksiyonu ve omurilik hasarı sonrasında sadece 42 günlük bir süreçte hayvanlar gözlemlenmiştir ve 43. günde traser verilerek sakrifikasyon işlemi yapılmıştır. Dolayısıyla, ileride yapılacak olan çalışmalarda, GDNF' in pozitif etkilerini daha keskin bir biçimde görmek için hayvanları gözleme süresi uzun dönemde 42. günden sonrasında da devam ettirilmesi gerekebilir.

Projenin bu bölümünde açıklanan analizler, omurilik hasarı sonrası 57. günde hayvanlar sakrifiye edildikten sonra omurilik dokularından kesitler alınarak, bu kesitler üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Hücre sel sağ kalımı ölçmek için bu kesitlerde Cresyl violet boyaması yapılmıştır. Aksonal uzamayı göstermek için ise BDA immün boyaması yapılmıştır.

Cresyl violet boyamasında virüs enjeksiyon bölgelerinin (T9 ve L2) rostral ve kaudalinde olacak şekilde T8 ve L3 alanlarından her fare için ikişer kesit alınarak yapılan boyama sonucunda hasarsız olan kontra (sol) ve hasarlı olan ipsi (sağ) bölgelerinde belirli ölçümler yapılmıştır. Bu ölçümleri içeren grafiklerin hepsi T8 ve L3 seviyelerinden alınan kesitlerde ipsi bölgelerini içeren alanlar incelenerek hesaplanmıştır.

Cresyl violet boyamasının amacı içerisinde Nissl cisimciği bulunan nöronları boyayarak dokuda nöron sayılarının ve büyüklüklerinin analiz edilmesini kolaylaştırmaktır. Bu boyama sonucunda nöron sayımı, motor nöron sayımı, dorsal-ventral alanlarının ölçümü, funikulus alanlarının ölçümü ve total omurilik alanlarını ölçümü hesaplanabilmektedir (154).

Omurilik hasarı sonrasında Cresyl violet boyaması yapılan kesitler T8 ve L3 seviyelerinde GDNF ve Kontrol grupları için kontra ve ipsi bölgelerindeki nöronlar ZEN programı kullanılarak sayılmıştır. İpsi bölgesinde hesaplanan nöron sayıları hesaplanarak Şekil 6.4.1.1.' deki grafik oluşturulmuştur. Nöron sayısının hesaplanması, hasar öncesinde enjekte edilen maddelerin enjeksiyon bölgelerine yakın kesimlerde hasar sonrasında nöronal sağ kalıma olan etkilerini, hücre sayısı olarak, göstermek amacıyla yapılmaktadır. Bu testin sonucu GDNF ve Kontrol gruplarının hasar sonrasında hücresel sağ kalımı pozitif veya negatif yönde etkilediğini göstermektedir. Burada, yapılan analizde, T8 ve L3 seviyelerinin her ikisinde de GDNF grubunun nöron sayıları kontrol grubunun nöron sayılarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir ölçütte ( $p < 0.05$ ) artış göstermektedir (Şekil 6.4.1.1.). Bu veri hücresel anlamda omurilik hasarı sonrasında farelerin omuriliklerinde hasar sonucu oluşan nöron ölümünün GDNF uygulaması olan farelerde kontrol grubu olan farelere göre daha az olduğunu göstermektedir. Yapılan diğer çalışmaların sonucuna bakıldığında bu sonuç GDNF' in omurilik hasarının ikincil hasarı azaltarak hücresel sağ kalımı artırıcı etki yaptığı bulgusunu destekleyici yönde bulunmaktadır (143).

Nöron sayımlarına benzer olarak, motor nöron sayımları da T8 ve L3 seviyelerinde ipsi ve kontra kısımlarındaki motor nöronlar sayılarak hesaplanmıştır. Burada, motor nöron sayıları dorsal ventral ayrımı yapılan bölgenin ventral kısmındaki alanı 200-micron üstünde olan hücre gruplarını sayarak hesaplanmıştır.

Motor nöron sayımı analizi GDNF ve Kontrol gruplarında motor nöronlarında hasar sonrasında oluşan miktar değişikliğini göstermeyi amaçlamaktadır. Bu analizin sonucu nöron sayımına ek olarak motor nöronların miktarlarının da gruplara göre göre farklılıklarını göstererek, yapılan GDNF uygulamasının pozitif veya negatif etkilerini ifade etmektedir. Yapılan analizde (Şekil 6.4.2.1.), motor nöron sayılarının T8 ve L3 seviyelerinde GDNF grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde (T8;  $p<0.01$ , L3;  $p<0.05$ ) artış gösterdiği gözlemlenmiştir. Bu sonuç, GDNF uygulamasının sadece nöron sağ kalımını arttırmadığını, aynı zamanda spesifik olarak motor nöronların sağ kalımına da pozitif etkisi olduğunu göstermektedir. Motor nöronlar gri cevherin ventral bölümünde bulunarak doğrudan veya dolaylı olarak kas hareketinin kontrolünde görev yapmaktadırlar. Bir durum karşısında hareketi gerçekleştirmek için motor nöronlar omurilikten çıkarak bilgiyi kaslara iletip hareket oluşmasına katkıda bulunurlar (155). Bu bilgi göz önünde bulundurulduğunda, GDNF içeren grubun motor nöron sayısının omurilik hasarı sonrasında hücre ölümüne rağmen kontrol grubuna göre fazla olması GDNF'in motor nöronlar üzerinden kas kontrolünü arttırarak motor becerilerini ve fonksiyonel iyileşmeyi de arttırdığını da göstermektedir. Bu sonuç, GDNF'in motor nöronların canlılığını arttırdığını gösteren diğer çalışmaları da destekleyici yönde bulunmaktadır (13, 32).

Omurilik hasarı sonrasında ipsi bölgesindeki atrofinin değerlendirilebilmesi amacıyla, Cresyl violet boyalı T8 ve L3 seviye kesitlerinde gri ve beyaz cevherde çeşitli bölgelerin alanları hesaplanmıştır. Şekil 6.5.1.1. GDNF ve Kontrol gruplarının T8 ve L3 seviyelerindeki Cresyl violet boyaması resimlerini göstermektedir. Bu şekil atrofi alan hesaplarının uygulandığı şekillere referans olması için yapılmıştır ve herhangi bir alan hesabı yapılmaksızın atrofi miktarını analiz etmek için oluşturulmuştur. Şekilde, T8 seviyesinde, Kontrol grubunun GDNF grubuna göre atrofi miktarının daha fazla olduğu görülmektedir. Ancak benzer gözleme L3 seviyesinde rastlanılmamıştır. L3 seviyesinde iki grup arasında fazla bir fark görülmemiştir.

Dorsal ventral ayırım omurilik kesitleri üzerinde gerçekleştirilen ve laminelere bakılarak dorsal hattı ventral hattın bir çizgi ile ayırmak için yapılmaktadır. Bu ayırımı yapmanın amacı dorsal ve ventral alanlar birbirine bağımsız olarak ölçülebilmektedir.



T8 ve L3 seviyelerinden alınan kesitlerde yapılan dorsal ve ventral alan hesapları sonucunda, GDNF grubu, Kontrol grubuna göre hem dorsal hem de ventral alanlarda torakal ve lumbal seviyelerinde artış göstermektedir. Ancak bu artış istatistiksel olarak bir anlamlılık içermemektedir ( $p>0.05$ ). Bu bulgular GDNF' in omurilik hasarı sonrası oluşan atrofiyi torakal bölge ve lumbal bölge kesitlerinde tolere edip kontrol grubuna göre fazla alan ölçüsüne sahip olduğunu göstermektedir.

Omurilik hasarı sonrası Cresyl violet ile boyanan kesitlerde yapılan funikulus alan ölçümleri gri cevheri kapsayan beyaz cevherin belirli alanlarının, omuriliğin hasarlı tarafının sağlam tarafına oranla değişimini ve oluşan atrofiyi anlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Burada T8 ve L3 seviyelerinin beyaz cevherleri dorsal, lateral ve ventral funikuluslar olmak üzere üç farklı alana ayrıştırılarak bu alanların alanları birbirinden bağımsız olarak ölçülmüştür. Yapılan bu çalışmada, T8 seviyesinde sadece dorsal ve lateral funiculus alanlarında GDNF grubu kontrol grubuna göre artış göstermektedir. Ancak yalnızca lateral funikulus alanlarında GDNF grubu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ( $p<0.05$ ) bir artış göstermektedir.

Öte yandan, L3 seviyesinde ise, tüm funikulus alanlarında istatistiksel olarak anlamlı olmaksızın ( $p>0.05$ ) GDNF grubu Kontrol grubuna göre artış göstermektedir. Bu bulgular; GDNF'in lumbal seviye kesitlerindeki alanlarda atrofiyi azaltıcı pozitif bir etkisi olmadığını göstermektedir. Ancak torakal seviye kesitlerindeki alanlardan lateral funikulus alanında hasar sonrası oluşan atrofiyi kontrol grubuna göre dikkat çekici yönde azaltmıştır. Bu sonuç GDNF'in omurilik hasarı sonrası hücre ölümüne bağlı olarak gerçekleşen beyaz cevher doku kaybını azalttığını destekler yönde bulunmaktadır.

Total omurilik alanı ölçümü gri ve beyaz cevherin bütünüyle ölçülerek ipsi kısmının kontra kısmına göre oluşturduğu atrofik değişikliği anlamak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu ölçümde Cresyl violet ile boyanan kesitlerde T8 ve L3 seviyelerinin sol (kontra) ve sağ (ipsi) kısımlarının alanları gri cevher ve beyaz cevheri içerecek bütünlükte birbirinden bağımsız olarak ölçülmüştür. Yapılan bu ölçümlerin sonucunda, istatistiksel olarak anlamlı olmaksızın, T8 ve L3 seviyelerinde ipsi alanlarının GDNF grubunda, Kontrol grubuna göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu trend istatistiksel olarak bir anlamlılık içermemektedir ( $p>0.05$ ). Bu bulgular,

GDNF' in total omurilik alanında da (beyaz cevher ve gri cevher) omurilik hasarı sonrasında oluşan atrofiyi tolere edip doku kaybını önleyici bir etki gösterdiğini anlatmaktadır. Torakal seviye total omurilik alanında istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde GDNF grubunun Kontrol grubuna göre daha yüksek alana sahip olması sonucu, diğer alan ölçümü analizlerinin sonuçları ile bütünleştiğinde GDNF' in etkisini spesifik olarak torakal seviyede daha anlamlı olarak gösterdiğine dair bir bulguya da ışık tutmaktadır. Ancak torakal seviyedeki bazı alan ölçümlerinde GDNF' in anlamlı sonuç göstermemesi sonucu bu yorum tüm veriler tarafından desteklenmemektedir.

Omurilik hasarından sonra 43. günde traser olarak BDA enjeksiyonu omurilik L4 seviyesine yapılmış ve hayvanlar bu enjeksiyonu takiben 57. günde sakrifiye edilmiştir. Sonrasında elde edilen omurilik kesitlerinden T12 hasar seviyesinin üst bölgesinde T8 seviyesi kesitlerine BDA boyaması gerçekleştirilmiştir. Bu boyamanın amacı traser olarak enjekte edilen BDA maddesini içeren aksonların hasarın rostrale doğru anterograd olarak projeksiyon yapma kabiliyetini ölçmektir (156). Yapılan boyama sonucunda kontrol ve GDNF grupları kesitlerinde T8 seviyesinde hasarın gerçekleştirilmiş olduğu ipsilateral bölgesindeki beyaz cevher alanlarında BDA (+) hücre sayıları hesaplandığında edildiğinde, GDNF grubunun kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak ( $p < 0,01$ ) daha yüksek BDA (+) hücre sayısı içerdiği gözlemlenmiştir. Elde edilen verilerin ışığında, L4 seviyesinden enjekte edilen BDA maddesinin T12 hasar seviyesini geçip T8 seviyesinde BDA (+) aksonların bulunması bu aksonal uzamanın omurilikten çıkan yolaklar ile gerçekleştirildiği yönünde fikir vermektedir. Ancak, bu aksonların spesifik olarak dorsal kolon medial- lemniskal yolak ya da spinotalamik yolak gibi çıkan yolakların hangisini kullandığı bilinmemektedir. Literatürde Yang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, C4 seviyesinden yapılan enjeksiyon ile BDA maddesinin retrograd özelliğini kullanarak hasar sonrasında kortikospinal yolak aracılığıyla omuriliğin hasara göre kaudal segmentlerinde BDA (+) aksonlar bulunduğu gözlenmiştir (157).

## 8. SONUÇ

Sonuç olarak, bütün verilerin bulguları bir araya getirildiğinde, lentiviral yöntemle farelere aktarılan GDNF' in omurilik hasarı sonrasında farelerin uzun dönemde motor koordinasyonlarının düzelmesini ve lokomotor becerilerinin artmasını sağlayarak fonksiyonel iyileşmeye katkıda bulunduğu görülmüştür. Öte yandan, GDNF' in omurilik hasarı sonrası ikincil mekanizmalar ile azalan nöron ve motor nöron sayılarını arttırarak hücrel sağ kalımında kontrolünü sağladığı görülmüştür. Bu tez sonucunda GDNF molekülünün omurilik hasarı sonrası uzun dönem sürecinde hasar patofizyolojine olan etkileri incelenmiş bulunmaktadır. Yapılan analizler ışığında, sonraki çalışmalarda GDNF molekülünün terapötik bir ajan olarak kullanılarak 42 günden daha uzun bir süreçteki etkilerinin incelenmesinin, GDNF ile ilgili elde edilen tüm bu bulgulara katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

## 9. KAYNAKLAR

1. Kang Y, Ding H, Zhou H, Wei Z, Liu L, Pan D, et al. Epidemiology of worldwide spinal cord injury: a literature review. *J Neurorestoratol*. 2017;6:1-9.
2. Chen Y, DeVivo MJ, Richards JS, SanAgustin TB. Spinal Cord Injury Model Systems: Review of program and national database from 1970 to 2015. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 2016;97(10):1797-804.
3. Karacan I, Koyuncu H, Pekel Ö, Sümbüloğlu G, Kırnay M, Dursun H, et al. Traumatic spinal cord injuries in Turkey: a nation-wide epidemiological study. *Spinal cord*. 2000;38(11):697.
4. Center NSCIS. Facts and figures at a glance. Birmingham, AL: University of Alabama at Birmingham. 2016:1-2.
5. Fehlings MG, Sekhon LH, Tator C. The role and timing of decompression in acute spinal cord injury: what do we know? What should we do? *Spine*. 2001;26(24S):S101-S10.
6. Jazayeri SB, Beygi S, Shokraneh F, Hagen EM, Rahimi-Movaghar V. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review. *European spine journal*. 2015;24(5):905-18.
7. Orlando C, Raineteau O. Integrity of cortical perineuronal nets influences corticospinal tract plasticity after spinal cord injury. *Brain Struct Funct*. 2015;220(2):1077-91.
8. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2001;26(24 Suppl):S2-12.
9. Fehlings MG, Sekhon LH. Acute interventions in spinal cord injury: what do we know, what should we do? *Clin Neurosurg*. 2001;48:226-42.
10. Lang C, Bradley PM, Jacobi A, Kerschensteiner M, Bareyre FM. STAT3 promotes corticospinal remodelling and functional recovery after spinal cord injury. *EMBO reports*. 2013;14(10):931-7.
11. Orlando C, Raineteau O. Integrity of cortical perineuronal nets influences corticospinal tract plasticity after spinal cord injury. *Brain Structure and Function*. 2015;220(2):1077-91.

12. Bregman BS, McAtee M, Dai HN, Kuhn PL. Neurotrophic factors increase axonal growth after spinal cord injury and transplantation in the adult rat. *Experimental neurology*. 1997;148(2):475-94.
13. Satake K, Matsuyama Y, Kamiya M, Kawakami H, Iwata H, Adachi K, et al. Up-regulation of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) following traumatic spinal cord injury. *Neuroreport*. 2000;11(17):3877-81.
14. Hashimoto M, Nitta A, Fukumitsu H, Nomoto H, Shen L, Furukawa S. Inflammation-induced GDNF improves locomotor function after spinal cord injury. *Neuroreport*. 2005;16(2):99-102.
15. Colin A, Faideau M, Dufour N, Auregan G, Hassig R, Andrieu T, et al. Engineered lentiviral vector targeting astrocytes in vivo. *Glia*. 2009;57(6):667-79.
16. Hughes SM, Parr-Brownlie LC, Bosch-Bouju C, Schoderboeck L, Sizemore R, Abraham W. Lentiviral vectors as tools to understand central nervous system biology in mammalian model organisms. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2015;8:14.
17. Wong L-F, Goodhead L, Prat C, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Mazarakis ND. Lentivirus-mediated gene transfer to the central nervous system: therapeutic and research applications. *Human gene therapy*. 2006;17(1):1-9.
18. Guo J-D, Li L, Shi Y-m, Wang H-D, Yuan Y-L, Shi X-X, et al. Genetic ablation of receptor for advanced glycation end products promotes functional recovery in mouse model of spinal cord injury. *Molecular and cellular biochemistry*. 2014;390(1-2):215-23.
19. Russo SJ, Mazei-Robison MS, Ables JL, Nestler EJ. Neurotrophic factors and structural plasticity in addiction. *Neuropharmacology*. 2009;56:73-82.
20. Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging and disease*. 2015;6(5):331.
21. Burnett MG, Zager EL. Pathophysiology of peripheral nerve injury: a brief review. *Neurosurgical focus*. 2004;16(5):1-7.
22. Schwab ME. Repairing the injured spinal cord. *Science*. 2002;295(5557):1029-31.

23. Jones LL, Oudega M, Bunge MB, Tuszynski MH. Neurotrophic factors, cellular bridges and gene therapy for spinal cord injury. *The Journal of physiology*. 2001;533(1):83-9.
24. Markus A, Patel TD, Snider WD. Neurotrophic factors and axonal growth. *Current opinion in neurobiology*. 2002;12(5):523-31.
25. Henderson CE. Role of neurotrophic factors in neuronal development. *Current opinion in neurobiology*. 1996;6(1):64-70.
26. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*. 1993;260(5111):1130-2.
27. Mendell LM. REVIEW■: Neurotrophic Factors and the Specification of Neural Function. *The Neuroscientist*. 1995;1(1):26-34.
28. Zhang L, Ma Z, Smith GM, Wen X, Pressman Y, Wood PM, et al. GDNF-enhanced axonal regeneration and myelination following spinal cord injury is mediated by primary effects on neurons. *Glia*. 2009;57(11):1178-91.
29. Airaksinen MS, Saarma M. The GDNF family: signalling, biological functions and therapeutic value. *Nature Reviews Neuroscience*. 2002;3(5):383.
30. Hanna A, Thompson DL, Hellenbrand DJ, Lee JS, Madura CJ, Wesley MG, et al. Sustained release of neurotrophin-3 via calcium phosphate-coated sutures promotes axonal regeneration after spinal cord injury. *Journal of neuroscience research*. 2016;94(7):645-52.
31. Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, et al. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science*. 1994;266(5187):1062-4.
32. Saarma M. GDNF—a stranger in the TGF- $\beta$  superfamily? *European journal of biochemistry*. 2000;267(24):6968-71.
33. Eigenbrot C, Gerber N. X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 Å resolution and implications for receptor binding. *Nature structural biology*. 1997;4(6):435-8.
34. Leppänen VM, Bespalov MM, Runeberg-Roos P, Puurand Ü, Merits A, Saarma M, et al. The structure of GFR $\alpha$ 1 domain 3 reveals new insights into GDNF binding and RET activation. *The EMBO journal*. 2004;23(7):1452-62.

35. Woodbury D, Schaar DG, Ramakrishnan L, Black IB. Novel structure of the human GDNF gene. *Brain research*. 1998;803(1-2):95-104.
36. Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, et al. GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR- $\alpha$ , a novel receptor for GDNF. *Cell*. 1996;85(7):1113-24.
37. Airaksinen MS, Titievsky A, Saarma M. GDNF family neurotrophic factor signaling: four masters, one servant? *Molecular and Cellular Neuroscience*. 1999;13(5):313-25.
38. Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson A-S, Sieber B-A, Grigoriou M, et al. Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret proto-oncogene. *Nature*. 1996;381(6585):785.
39. Buj-Bello A, Adu J, Piñón LG, Horton A, Thompson J, Rosenthal A, et al. Neurturin responsiveness requires a GPI-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature*. 1997;387(6634):721.
40. Bespalov MM, Saarma M. GDNF family receptor complexes are emerging drug targets. *Trends in pharmacological sciences*. 2007;28(2):68-74.
41. Irala D, Bonafina A, Fontanet PA, Alsina FC, Paratcha G, Ledda F. The GDNF-GFR $\alpha$ 1 complex promotes the development of hippocampal dendritic arbors and spines via NCAM. *Development*. 2016;143(22):4224-35.
42. Saarma M, Sariola H. Other neurotrophic factors: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). *Microscopy research and technique*. 1999;45(4-5):292-302.
43. Eketjäll S, Fainzilber M, Murray-Rust J, Ibáñez CF. Distinct structural elements in GDNF mediate binding to GFR $\alpha$ 1 and activation of the GFR $\alpha$ 1-c-Ret receptor complex. *The EMBO journal*. 1999;18(21):5901-10.
44. Albert K, Airavaara M. Neuroprotective and reparative effects of endoplasmic reticulum luminal proteins–mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor and cerebral dopamine neurotrophic factor. *Croatian medical journal*. 2019;60(2):99.
45. Broadrick K. Characterizing The Controlled Release Of Glial Cell-Line Derived (gdnf) Neurotrophic Factor From Encapsulated Schwann Cells. 2010.
46. Nielsen J, Gotfryd K, Li S, Kulahin N, Soroka V, Rasmussen KK, et al. Role of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)–neural cell adhesion molecule

(NCAM) interactions in induction of neurite outgrowth and identification of a binding site for NCAM in the heel region of GDNF. *Journal of Neuroscience*. 2009;29(36):11360-76.

47. Schober A, Hertel R, Arumäe U, Farkas L, Jaszai J, Krieglstein K, et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor rescues target-deprived sympathetic spinal cord neurons but requires transforming growth factor- $\beta$  as cofactor in vivo. *Journal of Neuroscience*. 1999;19(6):2008-15.

48. Durbec P, Marcos-Gutierrez CV, Kilkenny C, Grigoriou M, Wartiovaara K, Suvanto P, et al. GDNF signalling through the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature*. 1996;381(6585):789.

49. Takahashi M. The GDNF/RET signaling pathway and human diseases. *Cytokine & growth factor reviews*. 2001;12(4):361-73.

50. Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, et al. Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature*. 1996;382(6586):80.

51. Sariola H, Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci*. 2003;116(19):3855-62.

52. Mills CD, Allchorne AJ, Griffin RS, Woolf CJ, Costigan M. GDNF selectively promotes regeneration of injury-primed sensory neurons in the lesioned spinal cord. *Molecular and Cellular Neuroscience*. 2007;36(2):185-94.

53. Abe N, Cavalli V. Nerve injury signaling. *Current opinion in neurobiology*. 2008;18(3):276-83.

54. Boyd J, Gordon T. Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. *Experimental neurology*. 2003;183(2):610-9.

55. Cheng H, Wu JP, Tzeng SF. Neuroprotection of glial cell line-derived neurotrophic factor in damaged spinal cords following contusive injury. *Journal of neuroscience research*. 2002;69(3):397-405.

56. Paratcha G, Ledda F, Ibáñez CF. The neural cell adhesion molecule NCAM is an alternative signaling receptor for GDNF family ligands. *Cell*. 2003;113(7):867-79.



57. Natarajan D, Marcos-Gutierrez C, Pachnis V, de Graaff E. Requirement of signalling by receptor tyrosine kinase RET for the directed migration of enteric nervous system progenitor cells during mammalian embryogenesis. *Development*. 2002;129(22):5151-60.
58. Taraviras S, Marcos-Gutierrez CV, Durbec P, Jani H, Grigoriou M, Sukumaran M, et al. Signalling by the RET receptor tyrosine kinase and its role in the development of the mammalian enteric nervous system. *Development*. 1999;126(12):2785-97.
59. Poteryaev D, Titievsky A, Sun YF, Thomas-Crusells J, Lindahl M, Billaud M, et al. GDNF triggers a novel Ret-independent Src kinase family-coupled signaling via a GPI-linked GDNF receptor  $\alpha 1$ . *Febs Letters*. 1999;463(1-2):63-6.
60. Deng L-X, Deng P, Ruan Y, Xu ZC, Liu N-K, Wen X, et al. A novel growth-promoting pathway formed by GDNF-overexpressing Schwann cells promotes propriospinal axonal regeneration, synapse formation, and partial recovery of function after spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*. 2013;33(13):5655-67.
61. Iannotti C, Li H, Yan P, Lu X, Wirthlin L, Xu X-M. Glial cell line-derived neurotrophic factor-enriched bridging transplants promote propriospinal axonal regeneration and enhance myelination after spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2003;183(2):379-93.
62. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine*. 2001;26(24S):S2-S12.
63. Ansorena E, De Berdt P, Ucakar B, Simón-Yarza T, Jacobs D, Schakman O, et al. Injectable alginate hydrogel loaded with GDNF promotes functional recovery in a hemisection model of spinal cord injury. *International journal of pharmaceutics*. 2013;455(1-2):148-58.
64. Blesch A, Tuszynski MH. Cellular GDNF delivery promotes growth of motor and dorsal column sensory axons after partial and complete spinal cord transections and induces remyelination. *Journal of Comparative Neurology*. 2003;467(3):403-17.
65. Deng L-X, Hu J, Liu N, Wang X, Smith GM, Wen X, et al. GDNF modifies reactive astrogliosis allowing robust axonal regeneration through Schwann cell-seeded guidance channels after spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2011;229(2):238-50.

66. Zhou L, Shine HD. Neurotrophic factors expressed in both cortex and spinal cord induce axonal plasticity after spinal cord injury. *Journal of neuroscience research*. 2003;74(2):221-6.
67. Yang Qq, Zhou Jw. Neuroinflammation in the central nervous system: symphony of glial cells. *Glia*. 2019;67(6):1017-35.
68. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the Central Nervous System: Structure, Function, and Pathology. *Physiological reviews*. 2019;99(3):1381-431.
69. Van Horn MR, Ruthazer ES. Glial regulation of synapse maturation and stabilization in the developing nervous system. *Current opinion in neurobiology*. 2019;54:113-9.
70. RUBENSTEIN JL, PUELLES L. 7 Development of the Nervous System. *Epstein's Inborn Errors of Development: The Molecular Basis of Clinical Disorders of Morphogenesis*. 2016:63.
71. O'Kane R, Begg T. *The Brain and Central Nervous System. Clinical Embryology*: Springer; 2019. p. 213-35.
72. Blaess S, Ang SL. Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*. 2015;4(2):113-34.
73. Watson C, Paxinos G, Puelles L. *The mouse nervous system*: Academic Press; 2012.
74. Gernandt BE, Megirian D. Ascending propriospinal mechanisms. *Journal of Neurophysiology*. 1961;24(4):364-76.
75. Oakley JC, Prager JP. Spinal cord stimulation: mechanisms of action. *Spine*. 2002;27(22):2574-83.
76. Brown AG. Review article the dorsal horn of the spinal cord. *Quarterly Journal of Experimental Physiology*. 1982;67(2):193-212.
77. Brown A. Ascending and long spinal pathways: dorsal columns, spinocervical tract and spinothalamic tract. *Somatosensory system*: Springer; 1973. p. 315-38.
78. Villanueva L, Peschanski M, Calvino B, Le Bars D. Ascending pathways in the spinal cord involved in triggering of diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *Journal of neurophysiology*. 1986;55(1):34-55.

79. Lundberg A, Oscarsson O. Three ascending spinal pathways in the dorsal part of the lateral funiculus. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1961;51(1):1-16.
80. Lundberg A, Oscarsson O. Two ascending spinal pathways in the ventral part of the cord. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1962;54(3-4):270-86.
81. Giesler Jr G, Yezierski R, Gerhart K, Willis W. Spinothalamic tract neurons that project to medial and/or lateral thalamic nuclei: evidence for a physiologically novel population of spinal cord neurons. *Journal of Neurophysiology*. 1981;46(6):1285-308.
82. Kerr FW. The ventral spinothalamic tract and other ascending systems of the ventral funiculus of the spinal cord. *Journal of Comparative Neurology*. 1975;159(3):335-55.
83. Ferrington D, Sorkin L, Willis W. Responses of spinothalamic tract cells in the superficial dorsal horn of the primate lumbar spinal cord. *The Journal of physiology*. 1987;388(1):681-703.
84. Deumens R, Koopmans GC, Joosten EA. Regeneration of descending axon tracts after spinal cord injury. *Progress in neurobiology*. 2005;77(1-2):57-89.
85. Kuypers HGJM, Martin GF. *Descending pathways to the spinal cord*: Elsevier; 2011.
86. Nudo R, Masterton R. Descending pathways to the spinal cord, III: Sites of origin of the corticospinal tract. *Journal of Comparative Neurology*. 1990;296(4):559-83.
87. Steeves JD, Jordan LM. Localization of a descending pathway in the spinal cord which is necessary for controlled treadmill locomotion. *Neuroscience letters*. 1980;20(3):283-8.
88. Coulter J, Bowker R, Wise S, Murray E, Castiglioni A, Westlund K. Cortical, tectal and medullary descending pathways to the cervical spinal cord. *Progress in brain research*. 50: Elsevier; 1979. p. 263-79.
89. Kuypers HG. The descending pathways to the spinal cord, their anatomy and function. *Progress in brain research*. 11: Elsevier; 1964. p. 178-202.
90. Schwab ME. Increasing plasticity and functional recovery of the lesioned spinal cord. *Progress in brain research*. 137: Elsevier; 2002. p. 351-9.

91. Novikov LN, Novikova LN, Mosahebi A, Wiberg M, Terenghi G, Kellerth J-O. A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury. *Biomaterials*. 2002;23(16):3369-76.
92. Ten Donkelaar H. Evolution of the red nucleus and rubrospinal tract. *Behavioural brain research*. 1988;28(1-2):9-20.
93. Wilson VJ, Peterson BW. Vestibulospinal and reticulospinal systems. *Handbook of physiology The nervous system Sect*. 1981;1:667-702.
94. Peterson BW. Reticulospinal projections to spinal motor nuclei. *Annual Review of Physiology*. 1979;41(1):127-40.
95. Liu XZ, Xu XM, Hu R, Du C, Zhang SX, McDonald JW, et al. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *Journal of Neuroscience*. 1997;17(14):5395-406.
96. Westgren N, Levi R. Quality of life and traumatic spinal cord injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 1998;79(11):1433-9.
97. Waters R, Adkins R, Yakura J. Definition of complete spinal cord injury. *Spinal Cord*. 1991;29(9):573.
98. Raineteau O, Schwab ME. Plasticity of motor systems after incomplete spinal cord injury. *Nature Reviews Neuroscience*. 2001;2(4):263.
99. Marino RJ, Barros T, Biering-Sorensen F, Burns SP, Donovan WH, Graves DE, et al. International standards for neurological classification of spinal cord injury. *The journal of spinal cord medicine*. 2003;26(sup1):S50-S6.
100. Tator CH. Spine-spinal cord relationships in spinal cord trauma. *Neurosurgery*. 1983;30(CN\_suppl\_1):479-94.
101. Collins W. A review and update of experiment and clinical studies of spinal cord injury. *Spinal Cord*. 1983;21(4):204.
102. Rivlin A, Tator C. Effect of duration of acute spinal cord compression in a new acute cord injury model in the rat. *Surgical neurology*. 1978;10(1):38-43.
103. Oyinbo CA. Secondary injury mechanisms in traumatic spinal cord injury: a nugget of this multiply cascade. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2011;71(2):281-99.
104. Tator CH, Koyanagi I. Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury. *Journal of neurosurgery*. 1997;86(3):483-92.

105. Tator CH, Fehlings MG. Review of the secondary injury theory of acute spinal cord trauma with emphasis on vascular mechanisms. *Journal of neurosurgery*. 1991;75(1):15-26.
106. Kwon BK, Tetzlaff W, Grauer JN, Beiner J, Vaccaro AR. Pathophysiology and pharmacologic treatment of acute spinal cord injury. *The spine journal*. 2004;4(4):451-64.
107. Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advances in physiology education*. 2002;26(4):238-55.
108. Koberne A. The neuronal theory of experimental traumatic spinal cord dysfunction. *Surgical neurology*. 1975;3(5):261-4.
109. Tator CH. Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain pathology*. 1995;5(4):407-13.
110. McEwen ML, Sullivan PG, Rabchevsky AG, Springer JE. Targeting mitochondrial function for the treatment of acute spinal cord injury. *Neurotherapeutics*. 2011;8(2):168-79.
111. Yeziarski RP. Spinal cord injury: a model of central neuropathic pain. *Neurosignals*. 2005;14(4):182-93.
112. Casha S, Yu W, Fehlings M. Oligodendroglial apoptosis occurs along degenerating axons and is associated with FAS and p75 expression following spinal cord injury in the rat. *Neuroscience*. 2001;103(1):203-18.
113. Demopoulos H, Flamm ES, Pietronigro D, Seligman M. The free radical pathology and the microcirculation in the major central nervous system disorders. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1980;110(Suppl. 492):91-119.
114. Hall E, Braughler J. Free radicals in CNS injury. *Research publications-Association for Research in Nervous and Mental Disease*. 1993;71:81-105.
115. Bracken MB, Shepard MJ, Holford TR, Leo-Summers L, Aldrich EF, Fazl M, et al. Administration of methylprednisolone for 24 or 48 hours or tirilazad mesylate for 48 hours in the treatment of acute spinal cord injury: results of the Third National Acute Spinal Cord Injury Randomized Controlled Trial. *Jama*. 1997;277(20):1597-604.
116. De La Torre J. Spinal cord injury: review of basic and applied research. *Spine*. 1981;6(4):315-35.

117. Němecek S. Morphological evidence of microcirculatory disturbances in experimental spinal cord trauma. *Advances in neurology*. 1978;20:395.
118. ARENDS MJ, WYLLIE AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *International review of experimental pathology*. 32: Elsevier; 1991. p. 223-54.
119. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature*. 2000;407(6805):802.
120. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, et al. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*. 2001;60(5):422-9.
121. Zhang N, Yin Y, Xu S-J, Wu Y-P, Chen W-S. Inflammation & apoptosis in spinal cord injury. *The Indian journal of medical research*. 2012;135(3):287.
122. Rowland JW, Hawryluk GW, Kwon B, Fehlings MG. Current status of acute spinal cord injury pathophysiology and emerging therapies: promise on the horizon. *Neurosurgical focus*. 2008;25(5):E2.
123. Dusart I, Schwab M. Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*. 1994;6(5):712-24.
124. Casha S, Yu W, Fehlings M. FAS deficiency reduces apoptosis, spares axons and improves function after spinal cord injury. *Experimental neurology*. 2005;196(2):390-400.
125. Emery E, Aldana P, Bunge MB, Puckett W, Srinivasan A, Keane RW, et al. Apoptosis after traumatic human spinal cord injury. *Journal of neurosurgery*. 1998;89(6):911-20.
126. Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G, Heise C. Atlas of the mouse spinal cord. *The spinal cord*: Elsevier; 2009. p. 308-79.
127. Zhang Z-J, Jing P-B, Gao Y-J. Microinjection of Virus into Lumbar Enlargement of Spinal Dorsal Horn in Mice. 2016.
128. Treuting PM, Dintzis SM, Liggitt D, Frevert CW. *Comparative anatomy and histology: a mouse and human atlas (expert consult)*: Academic Press; 2011.
129. Basso DM, Fisher LC, Anderson AJ, Jakeman LB, Mctigue DM, Popovich PG. Basso Mouse Scale for locomotion detects differences in recovery after spinal cord injury in five common mouse strains. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(5):635-59.

130. Reiner A, Veenman CL, Medina L, Jiao Y, Del Mar N, Honig MG. Pathway tracing using biotinylated dextran amines. *Journal of neuroscience methods*. 2000;103(1):23-37.
131. Kilic E, Reitmeir R, Kilic Ü, Caglayan AB, Beker MC, Kelestemur T, et al. HMG-CoA reductase inhibition promotes neurological recovery, peri-lesional tissue remodeling, and contralesional pyramidal tract plasticity after focal cerebral ischemia. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2014;8:422.
132. Vogelaar CF, Estrada V. Experimental spinal cord injury models in rodents: anatomical correlations and assessment of motor recovery. *Recovery of Motor Function Following Spinal Cord Injury*. 2016:3-35.
133. Scheff SW, Rabchevsky AG, Fugaccia I, Main JA, Lumpp Jr JE. Experimental modeling of spinal cord injury: characterization of a force-defined injury device. *Journal of neurotrauma*. 2003;20(2):179-93.
134. Topka H, Cohen LG, Cole RA, Hallett M. Reorganization of corticospinal pathways following spinal cord injury. *Neurology*. 1991;41(8):1276-.
135. Curt A, Keck ME, Dietz V. Functional outcome following spinal cord injury: significance of motor-evoked potentials and ASIA scores. *Archives of physical medicine and rehabilitation*. 1998;79(1):81-6.
136. Courtine G, Song B, Roy RR, Zhong H, Herrmann JE, Ao Y, et al. Recovery of supraspinal control of stepping via indirect propriospinal relay connections after spinal cord injury. *Nature medicine*. 2008;14(1):69.
137. Hiersemenzel L-P, Curt A, Dietz V. From spinal shock to spasticity: neuronal adaptations to a spinal cord injury. *Neurology*. 2000;54(8):1574-82.
138. Menet V, Prieto M, Privat A, y Ribotta MG. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(15):8999-9004.
139. Abramov AY, Duchen MR. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. 2008;1777(7-8):953-64.
140. Plaitakis A, Constantakakis E, Smith J. The neuroexcitotoxic amino acids glutamate and aspartate are altered in the spinal cord and brain in amyotrophic lateral

- sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*. 1988;24(3):446-9.
141. Johnson J. Glutamic acid as a synaptic transmitter in the nervous system. A review. *Brain Research*. 1972;37(1):1-19.
142. Rosich K, Hanna BF, Ibrahim RK, Hellenbrand DJ, Hanna A. The effects of glial cell line-derived neurotrophic factor after spinal cord injury. *Journal of neurotrauma*. 2017;34(24):3311-25.
143. Ortmann SD, Hellenbrand DJ. Glial cell line-derived neurotrophic factor as a treatment after spinal cord injury. *Neural regeneration research*. 2018;13(10):1733.
144. Horev G, Benjamini Y, Sakov A, Golani I. Estimating wall guidance and attraction in mouse free locomotor behavior. *Genes, Brain and Behavior*. 2007;6(1):30-41.
145. Binder E, Droste SK, Ohl F, Reul JM. Regular voluntary exercise reduces anxiety-related behaviour and impulsiveness in mice. *Behavioural Brain Research*. 2004;155(2):197-206.
146. Lamprea M, Cardenas F, Setem J, Morato S. Thigmotactic responses in an open-field. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2008;41(2):135-40.
147. Hall CS. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative psychology*. 1934;18(3):385.
148. Ahmed RU, Alam M, Zheng Y-P. Experimental spinal cord injury and behavioral tests in laboratory rats. *Heliyon*. 2019;5(3):e01324.
149. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*. 2003;463(1-3):3-33.
150. Cummings BJ, Engesser-Cesar C, Cadena G, Anderson AJ. Adaptation of a ladder beam walking task to assess locomotor recovery in mice following spinal cord injury. *Behavioural brain research*. 2007;177(2):232-41.
151. Pajooresh-Ganji A, Byrnes KR, Fatemi G, Faden AI. A combined scoring method to assess behavioral recovery after mouse spinal cord injury. *Neuroscience research*. 2010;67(2):117-25.



152. Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. *Journal of neurotrauma*. 1995;12(1):1-21.
153. Zörner B, Filli L, Starkey ML, Gonzenbach R, Kasper H, Röthlisberger M, et al. Profiling locomotor recovery: comprehensive quantification of impairments after CNS damage in rodents. *Nature methods*. 2010;7(9):701.
154. Alvarez-Buylla A, Ling C-Y, Kirn JR. Cresyl violet: a red fluorescent Nissl stain. *Journal of neuroscience methods*. 1990;33(2-3):129-33.
155. Jones TA, Chu CJ, Grande LA, Gregory AD. Motor skills training enhances lesion-induced structural plasticity in the motor cortex of adult rats. *Journal of Neuroscience*. 1999;19(22):10153-63.
156. Veenman CL, Reiner A, Honig MG. Biotinylated dextran amine as an anterograde tracer for single-and double-labeling studies. *Journal of neuroscience methods*. 1992;41(3):239-54.
157. Yang Q, Ramamurthy A, Lall S, Santos J, Ratnadurai-Giridharan S, Lopane M, et al. Independent replication of motor cortex and cervical spinal cord electrical stimulation to promote forelimb motor function after spinal cord injury in rats. *Experimental neurology*. 2019;320:112962.

## 10. ETİK KURUL ONAYI



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İmü-Hadyek) Kararı

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
17/03/2017	66		Reyhan Zeynep GÜNDOĞDU

“Slit-Robo Yolaklarının Omurilik Hasarı Sonrası Patofizyolojik Süreçlerdeki Rollerini” Başlıklı Bilimsel Araştırma Etik Kurulumuzda Görüşülmüş Olup, Çalışmanın Etik Kurallara Uygun Olduğuna “Oybirliği” İle Karar Verilmiştir.
Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Prof. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet OZANSOY	
Üye	Öğr. Gör. Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	



T.C.  
**İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ**  
**Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı**

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.7919  
Konu : Etik Kurulu Hk.

07/03/2018

**Sayın Reyhan Zeynep GÜNDOĞDU ÖZDEMİR**

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 10.11.2017 tarihli 66 karar no ile onay verilen “Slit-Robo Yolaklarının Omurilik Hasarı Sonrası Patofizyolojik Süreçlerdeki Roller” isimli çalışma başlığının “Lentiviral Vektör Aracılıklı GDNF Uygulamasının Omurilik Hasarı Sonrası Patofizyolojik Süreçlerdeki Roller” olarak değiştirilmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu  
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 07.03.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden B2541E87X5 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

**İstanbul Medipol Üniversitesi**

Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810  
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44  
İnternet: [www.medipol.edu.tr](http://www.medipol.edu.tr)  
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto:bilgi@medipol.edu.tr)

## 11. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Reyhan Zeynep	<b>Soyadı</b>	Gündoğdu
<b>Doğum Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğum Tarihi</b>	25.10.1988
<b>Uyruğu</b>	Türkiye Cumhuriyeti	<b>TC Kimlik No</b>	35476992634
<b>E-mail</b>	reyhanzeygundogdu@gmail.com	<b>Tel</b>	05305927881

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora/Uzmanlık</b>	İstanbul Medipol Üniversitesi	-
<b>Yüksek Lisans</b>	Yeditepe Üniversitesi	2014
<b>Lisans</b>	University of York	2011
<b>Lise</b>	Çamlıca Kız Lisesi	2006

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl – Yıl)</b>
1.	Bursiyer	İstanbul Medipol Üniversitesi	2013-2015

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>Okuduğunu Anlama</b>	<b>Konuşma</b>	<b>Yazma</b>
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi

Yabancı Dil Sınavı Notu								
YÖKDİL	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
		6.5	109					

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	69,262	70,687	67,109
(Diğer) Puanı			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanım becerisi
Microsoft Word, Excel, Powerpoint	İyi
Corel draw	Orta

### Uluslararası ve Ulusal Yayınları/Bildirileri/Sertifikalari/Ödülleri/Diğer

#### Uluslararası Yayınlar

1. Kilic U, Caglayan AB, Beker MC, Gunal MY, Caglayan B, Yalcin E, Kelestemur T, **Gundogdu RZ**, Yulug B, Yılmaz B, Kerman BE, Kilic E. Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. Redox Biol. 2017 Aug;12:657-665. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.006. Epub 2017 Apr 5.

2. Kelestemur T, Yulug B, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Caglayan B, Yalcin E, **Gundogdu RZ**, Kilic E. Targeting different pathophysiological events after traumatic brain injury in mice: Role of melatonin and memantine. *Neurosci Lett.* 2016 Jan 26;612:92-7. doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.043.

### **Uluslararası Bildiriler**

1. Poster- Kelestemur T, Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Altunay S, Caglayan B, Yalcin E, **Gundogdu RZ**, Kilic E, “Effects of normobaric oxygen treatment on brain injury after hypoxia-ischemia in newborn mice” Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2015. Online.
2. Poster- Caglayan AB, Beker MC, Kilic U, Caglayan B, Kelestemur T, **Gundogdu RZ**, Kilic E “Roles of P2X7 receptors in neuronal injury after optic nerve transection and focal cerebral ischemia” The 5th EMBO Meeting, 2013.

### **Sertifikalar**

1. Deneş hayvanları kullanım sertifikası