



T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CDNF VE MANF BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN OPTİK SİNİR
HASARI SONRASI RETİNAL GANGLİYON HÜCRE
HASARINA OLAN ETKİ VE MEKANİZMALARI**

REYDA KARAÇAY

TIBBİ FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. ERTUĞRUL KILIÇ

İSTANBUL-2019

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Tıbbi Fizyoloji
Tez Sahibi : Reyda KARAÇAY
Tez Başlığı : CDNF ve MANF Büyüme Faktörlerinin Optik Sinir Hasarı
Sonrası Retinal Gangliyon Hücre Hasarına Olan Etki ve
Mekanizmaları
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi
Sınav Tarihi : 08.01.2019

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

Danışman

Prof.Dr.Ertuğrul KILIÇ

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza



Sınav Jüri Üyeleri

Dr.Öğr.Üyesi Birsen ELİBOL

Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Dr.Öğr.Üyesi Taha KELEŞTEMUR

İstanbul Medipol Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun 17/01/2019 tarih ve 2019/03/01 sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Neslin EMEKLİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışım 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 yazdığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Reyda KARAÇAY



“Bu tez
aileme ithaf edilmiştir...”



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim sürecim boyunca elini hiç üzerimden çekmeyen, çalışma disiplini ve zekası ile kendisine hayranlık duyduğum saygıdeğer danışman hocam sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ' a beni ekibinin bir parçası yaptığı, bilimsel hayat yolumu çizdiği ve üzerimdeki emekleri için teşekkürlerimi sunarım.

REMER araştırma merkezimizin yöneticisi Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e bize sunduğu imkanlardan dolayı teşekkür ederim.

Bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, her türlü zorlukta yardım eli uzatan, sabırla sorularıma cevap veren ve beni eğiten Ahmet Burak Çağlayan, Mustafa Çağlar Beker, Berrak Çağlayan ve Taha Keleştemur' a teşekkür ederim. Her zaman arkamda olduklarını hissettirdikleri için hepsine minnettarım.

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim, laboratuvarı enerjisiyle donatan ve birlikte olunca herşeyin üstesinden gelebileceğimiz Elif Sertel, Aysun Dilden, Nilay Ateş'e, bitmek bilmeyen sakinliği ve bilgisiyle hep yanımda olan Arman Dalay'a ve değerli ekip arkadaşlarım Serdar Altunay, Mehmet Özgen Altıntaş ve Zeynep Balçıkanlı' ya teşekkür ederim.

Yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen MEDİTAM ailesine; başta Ali Şenbahçe ve M. Ekrem Özdemir olmak üzere çok teşekkür ederim.

Hayatta yaşadığım tüm zorlukların üstesinden gelebilmemin tek sebebi olan aileme; annem Ferzan Karaçay, babam Selçuk Karaçay ve kardeşim Nart Yelkan Karaçay'a tüm destekleri için minnettarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No.
TEZ ONAYI	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
TABLoların LİSTESİ	x
1-ÖZET	1
2-ABSTRACT	2
3-GİRİŞ VE AMAÇ	4
4-GENEL BİLGİLER	5
4.1. Merkezi Sinir Sistemi	5
4.2. Görme sistemi	5
4.3. Göz anatomisi	7
4.4. Retina	7
4.5. Optik sinir	8
4.6. Optik sinir aksotomisi patofizyolojisi	9
4.7. Retinal gangliyon hücreleri	9
4.8. Hücre ölümü; apoptoz	11
4.9. Optik sinir kesisinde muhtemel klinik tedaviler	12
4.10. Nörotrofik faktörler	12
4.10.1. Beyin türevli nörotrofik faktör (BKNF, BDNF)	13
4.10.2. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)	13
4.10.3. Serebral dopamin nörotrofik faktör ve mezensefalik astrosit türevli nörotrofik faktör	13
4.11. Klinik yaklaşımlar	15
5-MATERYAL VE METOT	16
5.1. Deney dizaynı ve deneysel gruplar	16
5.2. Optik sinir aksotomi modeli	17
5.3. Tracer enjeksiyonu	18
5.4. Göz içi enjeksiyon	19

5.5.	Deney sonlandırılması.....	19
5.6.	RGC sağ kalımı	19
5.7.	Proteomiks.....	20
	5.7.1. Protein ekstraksiyon protokolü.....	20
	5.7.2. FASP ptotokolü	20
	5.7.3. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (Lc-Ms/Ms)	21
5.8.	İstatistiksel analizler	21
6-BULGULAR	20
6.1.	Retinal gangliyon hücrelerinde sağ kalım.....	20
6.2.	Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile protein tanımı ...	22
6.3.	Proteinlerin rol aldıkları yolların analizleri	24
7-TARTIŞMA	31
8-SONUÇ	39
9-KAYNAKLAR	40
10-ETİK KURUL ONAYI	54
11-ÖZGEÇMİŞ	55

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

RGC	Retinal Ganglion Cell
CDNF	Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor
MANF	Mesencephalic Astrocyte Derived Neurotrophic Factor
MSS	Merkezi Sinir Sistemi
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
PD	Parkinson's Disease
AD	Alzheimer's Disease
ALS	Amyolateralsclerosis
NGF	Nörotrofin Büyüme Faktörü
VEGF	Vascular Endotelial Growth Factor

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.2.1. Görme sistemi.....	6
Şekil 4.4.1. Retinal katmanlar ve hücre tipleri	8
Şekil 4.7.1. Retinal gangliyon hücresinin aksonu.....	10
Şekil 4.8.1. Apoptoz	11
Şekil 5.1.1. Deney dizaynı.....	17
Şekil 5.2.1. Optik sinir.....	18
Şekil 5.3.1. Beyin içi enjeksiyon	19
Şekil 6.1.1. CDFN ve MANF tedavisi sonrası retinal gangliyon hücrelerinde sağkalım	20
Şekil 6.1.2. Retinal gangliyon hücrelerinde bölgeye göre sağkalım	21
Şekil 6.3.1. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen Peroxiredoxin 1 proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.....	25
Şekil 6.3.2. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen Ras related Rab 5 C proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.....	25
Şekil 6.3.3. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen Excitatory amino acid transporter 1 proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.	26
Şekil 6.3.4. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen Glucose phosphatase isomerase proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.....	26
Şekil 6.3.5. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen Otubain 1 proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.....	27
Şekil 6.3.6. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen Non specific lipid transfer proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.....	27
Şekil 6.3.7. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen ATP synthase subunit d proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.....	28
Şekil 6.3.8. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen Calumenin proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.....	28
Şekil 6.3.9. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated protein 1 proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.....	29
Şekil 6.3.10. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen Voltage dependent anion selective channel protein 3 proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.....	29

Şekil 6.3.11. MANF tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen Guanine nucleotide binding protein subunit gamma 13 proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.....30

Şekil 6.3.12. MANF tedavisi sonrası istatistiksel olarak değişen Succinate dehydrogenase iron sulfur subunit proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler.....30



TABLULARIN LİSTESİ

Tablo 6.2.1. CDNF ve MANF tedavisi görmüş hayvanların retinalarında istatistiksel olarak anlamlı değişime uğramış proteinlerin listesi	25
---	----



1. ÖZET

CDNF VE MANF BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN OPTİK SİNİR HASARI SONRASI RETİNAL GANGLİYON HÜCRE HASARINA OLAN ETKİ VE MEKANİZMALARI

Sinir sisteminde nöronal sağkalım, nörogenez ve plastisite gibi önemli görevleri olan nörotrofik faktörlerin varlığı nöronal hücreler için vazgeçilmezdir. Nörotrofik faktörlerin yokluğu hatta seviyelerindeki farklılıklar bile bir çok nörodejeneratif hastalığı tetiklemektedir. Serebral Dopamin Nörotrofik Faktör (CDNF) ve Mezensefalik Astrosit-Kökenli Nörotrofik Faktör (MANF) adlı iki nörotrofik faktör yapısal özellikleri ile diğer nörotrofik faktörlerden ayrılmaktadırlar. Bu farklılık sonucunda ise diğer nörotrofik faktörlerle kıyaslandıklarında daha farklı sinyal yolları üzerinden farklı etkilere yol açtıkları düşünülmektedir. Bu sebeplerden dolayı bu iki nörotrofik faktörün araştırılması nörodejeneratif hastalıkların işleyişlerinin daha iyi anlaşılabilmesi ve sonucunda yeni tedaviler üretilebilmesi için uygun bir seçenek olarak gözükmektedir. Bu tezde CDFN ve MANF tedavilerinin optik sinir hasarı sonrası in vivo şartlarda nöronal sağkalım, protein sinyal iletim yolları ve ek olarak protein profil analizi üzerine incelemeler yapılmıştır. Tüm bu mekanizmaları inceleyebilmek adına optik sinir aksotomisi modeli ile farelere hasar verilmiştir. Bu hasar modeli ile hasar kan beyin bariyerini bozmayarak bölgesel kalmakta ve retinal gangliyon hücrelerine in vivo çalışılabilme olanağı sağlamaktadır. Hasar sonrası CDFN tedavisinin MANF tedavisine oranla daha fazla olacak şekilde iki tedavinin de hücre ölümünü azalttığı, yeni nöron oluşumunu arttırdığı ve protein profil analizi ile de hücrelerin hasara karşı verdiği tepkileri arttırarak hücreleri hayatta kalmaya yönlendirdikleri gözlemlenmiştir. Elde edilen bulguların bir çok nörodejeneratif hastalığın tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar bulunmasına yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Optik sinir aksotomisi, CDFN, MANF, Hücre sağkalımı, Proteomiks

2. ABSTRACT

EFFECTS AND EFFECT MECHANISMS OF CDNF AND MANF GROWTH FACTORS ON RETINAL GANGLION CELL DEATH AFTER OPTIC NERVE AXOTOMY

Neurotrophic factors are a must for the central nervous system. They are important factors for neuronal survival, neurogenesis and also neuronal plasticity. The absence of neurotrophic factors or even their low levels can trigger many neurodegenerative diseases. Two factors named Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF) and Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor (MANF) differ from all other neurotrophic factors because of their unique structures. Because of this difference it is believed that they work along different signalling pathways and so have different outcomes. As a result, deeper understanding of these two factors is an appropriate option in order to find new approaches for better understanding and possibly treating various neurodegenerative diseases. This thesis focuses on the effects of CDNF and MANF treatment in vivo on optic nerve axotomy. Neuronal survival, protein signalling pathways and protein profile analysis were investigated. In order to study these mechanisms, optic nerve axotomy was performed. Both CDNF and MANF had restorative effects on neuronal survival and increased neurogenesis and also had a positive effect on increasing the cellular stress responses of retinal ganglion cells. It is believed that the acquired results will lead to finding new approaches of therapeutic solutions for neurodegenerative diseases.

Keywords: Optic nerve axotomy, CDNF, MANF, Neuronal survival, Proteomics

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Grubumuzun yaptığı ön çalışmalarda serebral dopamin nörotrofik faktör (CDNF) ve mezensefalik astrosidik türevli nörotrofik faktör (MANF) lerinin beyin felci sonrası nöroprotektif olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmamızda ise CDFN ve MANF nörotrofik faktörlerinin optik sinir aksotomisi sonrası retinal gangliyon hücre sağ kalımına olan etkileri protein seviyesinde araştırılması amaçlandı.



4. GENEL BİLGİLER

Merkezi sinir sistemi (MSS) yaralanmaları beyin ve omurilik gibi organlarda meydana gelen hasar sonucu oluşan ve bir çok insanın ölümüne ve sakatlanmasına yol açan bir sağlık problemidir. Her yıl Amerika’da yaklaşık 2 milyon insan travmatik beyin hasarı, 500.000 insan beyin felci ve 10.000 insan omurilik hasarı gibi MSS yaralanmalarına maruz kalmaktadır. MSS’ de meydana gelen yaralanmaların periferik sistemdekine oranla daha yavaş bir iyileşme süreci vardır [70]. Dolayısı ile MSS yaralanmalarında iyileşme sürecini arttıracak olan ajanların bulunması yeni tedavi süreçlerinin gelişmesini sağlayacak ve iyileşme sürecini hızlandırarak kaybolan iş kaybını azaltacaktır.

4.1. Merkezi Sinir Sistemi

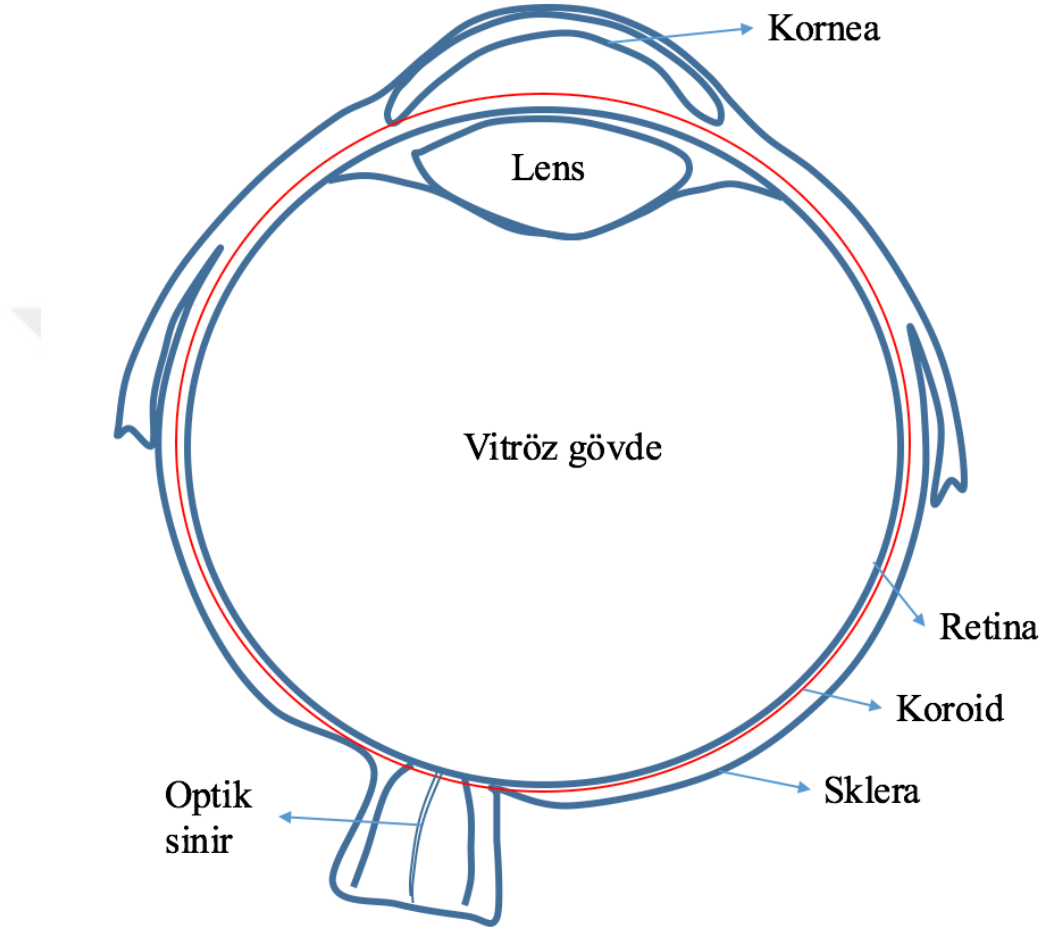
Göz çukuruna ait tüm yapılar kranial sinirler (CN) tarafından innerve edilir. Çizgili kaslardaki motor fonksiyonlar okülomotor sinir CN III, troklear sinir CN IV, abduzens sinir CN VI, yüz siniri CN VII tarafından kontrol edilir. Trigeminal sinir CN V ise orbital yapılardan duyu verileri taşır. Optik sinir CN II ise görsel iletiyi taşımakla sorumludur.

Optik sinirler embriyonik kökenleri ve hücresel yapıları sebebiyle merkezi sinir sisteminin önemli parçalarından biridir. Tüm merkezi sinir sistemi yaralanmalarında olduğu gibi, hasar sonrası rejenerasyon özellikleri yoktur. Retinal gangliyon hücrelerinin uzantısı olarak kabul edilirler [4].

4.2. Görme Sistemi

Görme sistemi çevreden bilgiyi ışık formunda alarak analiz eder ve bu bilgiyi işler. Görme ve görülen bilgiyi algılama işlemleri bir çok farklı yapının ortak çalışmasıyla meydana gelir. Göz, ışınları karşılayan ve bu ışınları nöronal sinyallere dönüştüren elementleri içeren organdır ve kemik içerisindeki konumu çok korunaklıdır. Göz kapakları gözün ön bölgesini koruma görevini üstlenirken aynı zamanda göz yaşının üretildiği bezleri içerirler. Gözün dış katmanında bulunan kaslar, göz küresinin hareketini kontrol ederken iki gözün de koordinasyonunu sağlarken birlikte çalışmalarını ve görüş düzgünlüğünü gerçekleştirir. Göz içerisinde kan damar ağları göze gerekli besinleri getirmeye yararken, sinirler de göz ve göz çevresindeki

dokuların duysal ve motor innervasyonunu sağlamaktadır. Görsel iletiyi taşıyan nöronal sinyal merkezi sinir sistemi içerisindeki yollardan geçerek çevreyi düzgün bir şekilde görebilmeyi sağlar. Bu görsel ileti de görsel algı adı verilen bir süreç ile değerlendirilir.



Şekil 4.2.1. Görme sistemi

4.3. Göz Anatomisi

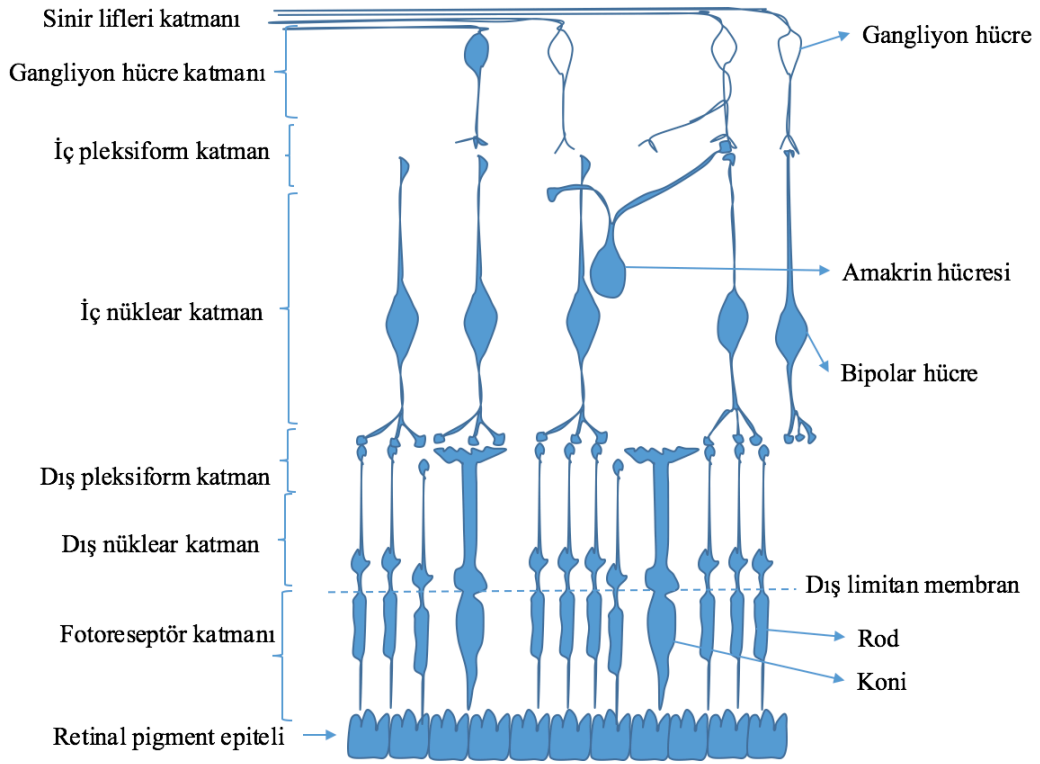
Göz üç katmandan oluşan bir organdır. Bu katmanlar sırasıyla; dış, lif ve bağ dokudan oluşan ve kornea ile sklera'yı bünyesinde bulunduran katman, orta damar içeren ve iris, siliyer cisimleri ve koroidi kapsayan katman, iç nöral yani retinayı içeren katman.

4.4. Retina

Retina ışık enerjisinin nöronal sinyale dönüştüğü bölgedir. Çevreden alınan görsel iletinin analiz edilmek üzere beyine iletilmesinin gerçekleştiği görme yolağındaki ilk üç hücre tipini (fotoreseptör, bipolar, gangliyon) içerir. Fotoreseptör hücreleri ışık fotonlarını fototransdüksiyon ile nöronal sinyale çevirdikten sonra bu sinyali bipolar hücrelere iletirler. Bipolar hücreler gangliyon hücreleri ile sinaps yaparak gözden gelen bu sinyali iletir. Diğer retinal hücreler ise (horizontal, amakrin, interpleksiform nöronlar) iletilen bu sinyalin gözden çıkmadan önce modifiye edilmesinden sorumludur.

Kimyasal sinapslar içerisinde nörotransmitter bulunduran veziküller içerir ve bu nörotransmitterler presinaptik terminalden sinaptik boşluğa ileti sırasında salınır. Postsinaptik membrandaki reseptörlere bağlanan transmitterler o nöronda uyarıcı veya inhibe edici değişikliklere sebep olabilir. Görsel iletiyi yorumlama *striat korteks* 'te gerçekleşse de uyarıcı ve inhibe edici yollarda nöral iletilerin işlenmesi sırasında gerçekleşen organizasyon retinada gerçekleşir ve görsel iletiyi yorumlayabilmek adına önemli bir basamaktır.

Retinanın mikroskop altında görüntülenmiş 10 katmanı bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla; 1.retinal pigment epitel katman, 2.fotoreseptör katmanı, 3.dış limitan membran, 4.dış nüklear katman, 5.dış pleksiform katman, 6.iç nüklear katman, 7.iç pleksiform katman, 8.gangliyon hücre katmanı, 9.sinir lifleri katmanı, 10. iç limitan membran.



Şekil 4.4.1. Retinal katmanlar ve hücre tipleri

4.5. Optik Sinir

Optik sap gelişim süreci sonunda optik sinire dönüşür ve optik vezikülü ön beyine bağlar. Optik sapta bulunan yarı gelişmiş optik sapı iki katmanlı bir yapıya dönüştürür. Optik sapın dış katmanı optik siniri çevreleyen nöroglial kılıfı oluşturur. Optik sapın iç katmanı ise programlanmış hücre ölümünün gerçekleştiği katmandır ve gangliyon hücrelerinden çıkan aksonların optik sapa girene kadar geçtikleri bölge olarak bilinir. İç katmanda bulunan diğer hücreler de optik sinirin glial hücreleri olarak görev yaparlar. Gangliyon hücre popülasyonunda apoptoz sonucu gerçekleşen hücre ölümleriyle birlikte optik sinirde bulunan akson sayısı kısa sürede hızlı bir düşüş yaşar. Bu hızlı düşüş optik sinirde gerçekleşen glial ve bağ doku işlemlerinin artmasına yol açar.

Retinal sinirler lifleri optik diskte 90° dönüş yaparak optik sinir olarak dışarı çıkar. Bu sinirler görsel liflerden oluşur ve %90'ı lateral geniculate nükleusta biterken

kalan %10'u gözbebeği refleksini ve sirkadyen ritmi regüle eder. Optik sinir 5 ila 6 cm uzunluğundadır ve intraoküler, intraorbital, intrakanaliküler ve intrakraniyel olarak buldukları yere göre 4'e ayrılırlar.

4.6. Optik Sinir Aksotomisi Patofizyolojisi

Gözün arka kısmına yakın uygulanan optik sinir kesisi, beyinde ödem, iskemi veya lokal kanama gibi yan etkiler göstermeden hızlı bir nöronal dejenerasyon ile sonuçlanır. Bu dejenerasyon sonucu ortaya çıkan hücre ölümleri ve fonksiyon kayıpları geri döndürülemezdir. Optik sinir hasarı, MSS araştırmalarında rejenerasyon, iskemi, glokoma ve retinal dejenerasyon konularında çalışmak için uygun bir hasar modelidir [5].

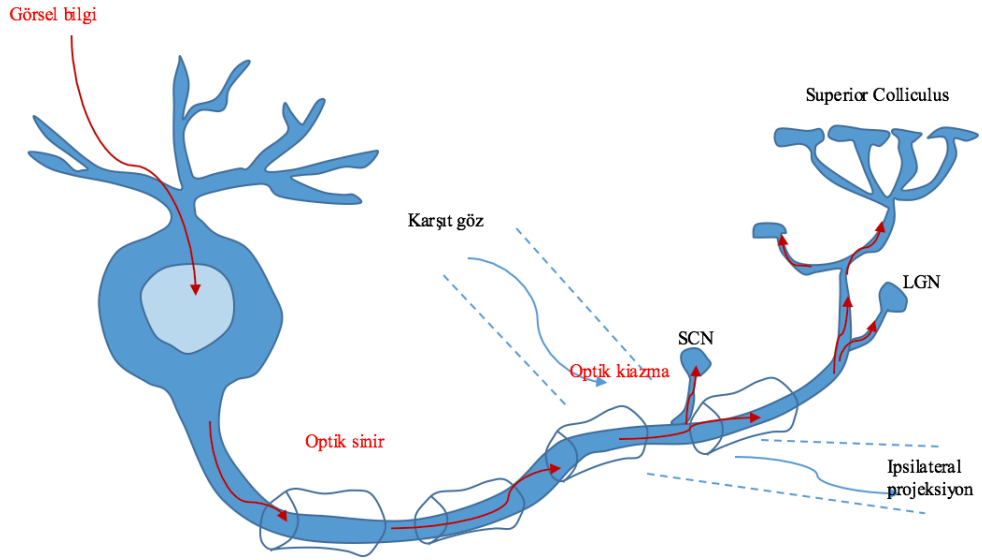
Gözün optik sinirlerine ulaşabilmek için öncelikle sağ orbital kenarına yakın deri insizyonundan sonra sağ orbita açılır. Supraorbital ven sağlam bırakılarak lakrimal bez subtotal olarak çıkartılır. Sonrasında üst ekstraoküler kaslar ayrılarak optik sinirlere ulaşılır. Optik sinirlerin açığa çıkarılmasıyla mikroskopi altında gözün arka ucuna bir kesi atılarak optik sinir kesisi oluşturulur. Bu kesi ile birlikte retinal gangliyon hücrelerinde dejenerasyon ve ölüm meydana gelir [42].

4.7. Retinal Gangliyon Hücreleri

Retinal gangliyon hücreleri retinadan çıkan tek nöron hücreleridir. Her hücrenin hücre gövdesinden çıkan bir aksonu vardır; bu akson retinanın iç yüzeyine paralel şekilde ilerler ve sinaptik yarıta glutamat salınımını gerçekleştirir.

Optik sinirlerden çıkan aksonlar, retinal gangliyon hücrelerinin farklı türevlerinden meydana gelir ve görme yolaklarında değişik işlevleri vardır. Bu aksonlar, beyin sapına yönelerek görüntüyü oluşturan bilgiyi kortekse iletir ve retinal görüntüyü sabitleme, sirkadyen ritmi düzenleme gibi işlevleri yönetir [8].

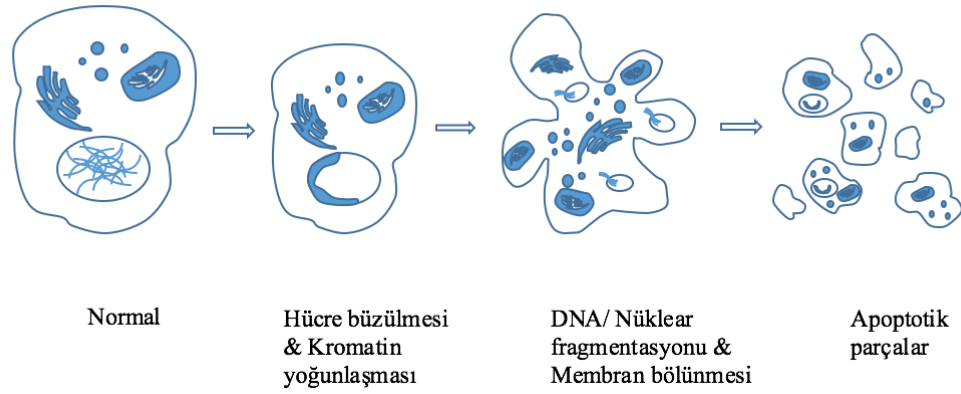
Optik sinir aksonları optik siniri oluşturduğu için, optik sinirde oluşan bir hasar, retinal gangliyon hücrelerini direkt olarak etkilemektedir. Retinal gangliyon hücrelerinin travma veya hastalığa karşı verdikleri cevabı araştırabilmek veya nöroprotektif tedavilerin etkilerini araştırabilmek için bu hücreleri tanımlamak gereklidir [58].



Şekil 4.7.1. Retinal gangliyon hücresinin aksonu. Retinal gangliyon hücresinin aksonu beyindeki optik sinir vasıtasıyla yayılır. (SCN= Suprachiasmatic Nucleus, LGN= Lateral Geniculate Nucleus)

4.8. Hücre ölümü; apoptoz

Doğal hücre ölümü veya diğer adıyla apoptoz, sinir sisteminin gelişimi süresince hep gerçekleşen bir fenomendir. Apoptotik hücre ölümü, hücrenin erken gelişim süresi boyunca nöron ölümünü gerçekleştirmekle birlikte travma, iskemi, inme ve amiyotrofik lateral skleroz (ALS), Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklardan kaynaklı patolojik nöron ölümlerinin de asıl sebebidir. Apoptozu belirleyen özellikleri; hücrenin büzülmesi, kromatin yoğunlaşması ve internükleozomal DNA'nın kırılmasıdır.



Şekil 4.8.1. Apoptoz

Aksonal hasar sonrası merkezi sinir sistemi nöronlarında kayıplar oluşmakta ve bu kayıplar retinal gangliyon hücrelerini de içermektedir. Hasar sonrası ortaya çıkan hücre homeostazisindeki akut değişimler, eksitotoksisite ve serbest radikallerin lokal üretimi sinir hücrelerine zarar vermekte ve onları ölüme götürmektedir. Bu hücre ölümü programlı hücre ölümü olarak kabul etmektedir [5]. Bu mekanizmalar bilinmesine rağmen hücre ölümünün sebepleri kesin olarak belirlenmemiştir. Bazı çalışmalarda ise aksotomi sonrası retinal gangliyon hücrelerinin nörotrofik faktör yokluğundan dolayı ya da ortamdaki glutamat fazlalığından dolayı ölüme yolaklarına girdiğini söylemektedir [23].

4.9. Optik sinir kesisinde muhtemel klinik tedaviler

Optik sinir hasarı sonrasında gerçekleşen hücre ölümlerini azaltmak ve hücre sağkalımını arttırmak amacıyla çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda anti apoptotik Bcl ailesi proteinlerinin artırılması veya kaspaz kırılmasının engellenmesi gibi yöntemler denenmiştir. Ayrıca hücre ölümlerini azaltma veya geciktirmek için nörotrofik faktörler ile çalışılmış; özellikle BDNF'nin (beyin türevli nörotrofik faktör) hasar sonrası hücreyi koruma etkileri olduğu gözlenmiştir. Bu konuda araştırmalar devam etmektedir [75].

4.10. Nörotrofik Faktörler

Nörotrofik faktörlerin nöronlar üzerinde bir çok yararlı etkisi vardır ve bu yüzden Parkinson (PD), Alzheimer (AD), amiyotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için potansiyel tedavi yöntemi olarak

kullanılabilecek olmakla beraber, spinal kord hasarı, iskemi gibi nöronal travmaların tedavisinde de kullanılabileceği düşünülmektedir [58].

Şimdiye kadar nörotrofik faktör olarak tanımlanmış bir çok protein bulunmaktadır; nörotrofin büyüme faktörü (NGF), beyin türevli nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin 3 ve nörotrofin 4, glia hücre türevli nörotrofik faktör (GDNF) bunlardan bazılarıdır [27]. Nörotrofik faktör teorisi temel olarak ilk tanımlanan nörotrofik faktör olan sinir büyüme faktörü (NGF) üzerinden kurulmuştur (Levi-Montalcini 1987). Bu çalışmalarda ise sadece yeteri kadar nörotrofik faktöre ulaşabilen nöronların hayatta kalarak hedef dokuyla sinaptik iletişime devam edebildiği, yeteri kadar ulaşamayan nöronların ise apoptoza girdiği gözlenmiştir.

Son çalışmalar sonucu bu nörotrofik faktörlere yenileri de eklenmiş ve mezensefalik astrosit türevli nörotrofik faktör (MANF) ile serebral dopamin nörotrofik faktör (CDNF) olarak adlandırılmışlardır. MANF ve CDFN'nin hücre sağkalımına pozitif etkileri olduğu kanıtlanmış [68] ve bu yüzden bir çok nörodejeneratif hastalık üzerindeki etkileri araştırılmaya başlanmıştır.

4.10.1. Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BKNF,BDNF)

Etkisi en çok çalışılan büyüme faktörü Beyin Türevli Nörotrofik Faktör (BDNF)'dir. BDNF, nörotrofin ailesinin üyesidir ve merkezi sinir sisteminde; sinaptik plastisiteyi, hücre sağkalımını, uzun dönem hafızayı ve hücre çoğalmasını regüle etmekte rol oynar. BDNF'nin Alzheimer, Parkinson, Huntington, iskemi, travmatik beyin hasarı gibi nörodejeneratif hastalıkların işleyişinde ve ayrıca şizofreni, depresyon ve ilaç bağımlılığı gibi psikolojik rahatsızlıkların tedavisinde de yeni bir çözüm olarak görülmeye başlanmıştır [26].

Yapılan çalışmalar doğrultusunda BDNF' nin optik sinir hasarı sonrasında retinal gangliyon hücrelerinin sağ kalımını arttırdığı gözlemlenmiştir (Mansour-Robaey et.al.).

4.10.2. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEBF) endotel hücreye özgü bir şekilde hücre bölünmesini tetiklerken aynı zamanda dimerik bir protein olarak bir çok farklı yoldan damarlaşmayı arttırmaktadır. Damarlaşmayı artırma rolünün gelişimsel süreçte, rejenerasyon sürecinde, doku restorasyonunda ve tümör formasyonunda etkili olduğu

düşünülmektedir. VEBF ile ilgili olan sinyal mekanizmalarının aktivasyonunun damarlaşmayı arttırmaklar beraber, hasar sonrası nöronal iyileşmeyi de pozitif yönde etkilediği gözlemlenmiştir [79].

4.10.3. Serebral Dopamin Nörotrofik Faktör ve Mezensefalik Astrosit Türevli Nörotrofik Faktör

Memeli canlılarda CDFN ve MANF proteinlerinin yapısı diğer nörotrofik faktörler ve büyüme faktörleri ile karşılaştırıldığında özeldir.

CDFN ve MANF proteinlerinin karakteristik özelliği yapısal olarak 8 tane sistein bulundurmalarıdır; yapılarında bulunan sistein sayısı ise protein katlanma miktarını belirtir. Moleküler ağırlıkları 18 kDa olan bu proteinlerin kristal yapılarının analizi sonucunda CDFN ve MANF' in yapısal olarak iki bölümden oluştuğu belirlenmiştir ve bu iki bölüm; membranlar arası etkileşimde rol alan amino ucu bulduran bölüm ve hücreleri endoplazmik retikulum stresinden koruma işlevini sağlayan karboksi ucu bulduran bölüm' den oluşmaktadır. CDFN ve MANF' in bu kristal yapısı endoplazmik retikulumda (ER) gerçekleşen protein katlanmasında yardımcı rolleri olduğunu göstermektedir. Bu görevlerinin sonucu olarak da yanlış protein katlanmasını azaltarak ER stresini azaltmakta dolaylı olarak etkileri vardır. CDFN ve MANF proteinlerinin beyindeki dopaminerjik nöronları koruma ve motor fonksiyonları geri yerine getirmekte rolü olduğu yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır [55]. Nörotrofinlerden ve GDNF' den farklı olarak CDFN ve MANF proteinlerinin pro-sekansları olmadığı gösterilmiştir; bu da aktivasyonları için enzimatik kesime ihtiyaç duymadıklarını göstermektedir. Ancak, CDFN ve MANF sekresyonunun fizyolojik uyarım veya hasar sonucu meydana gelip gelmediği hala tam olarak anlaşılamamıştır. MANF proteinleri salınımlarına rağmen endoplazmik retikulumda da kısmen bulunmaya devam etmektedir [54].

Mezensefalik astrosit türevli nörotrofik faktör (MANF)' in bir ER stres tepki proteini olduğu düşünülmektedir. Fonksiyonu ise ER' daki homeostaziyi sürdürmek ile birlikte hücreleri ER strese bağlı hücre ölümlerinden koruyabilmek olarak belirlenmiştir [55].

Serebral dopamin nörotrofik faktör (CDFN) ER-Golgi yolağından salgılanan bir büyüme faktörüdür. CDFN, MANF' in bir paralogu olarak kabul edilir. Aynı MANF gibi ER-Golgi yolağından salınan bir büyüme faktörüdür (Apostolou et al. 2008).

4.11. Klinik yaklaşımlar

Bazı yürütölen çalışmalar erken dönemde retinadaki değişikliklerin Alzheimer hastalığının tedavisinde yol gösterici olacağını düşünmektedir. Retinada yaşanan nöron kaybı özellikle gangliyon hücreleri ve glia hücrelerinin ölümlü bazı nörodejeneratif hastalıklarda kaydedilmiştir. Bu sebeple merkezi sinir sistemi hastalıklarının araştırılmasında retina ve optik sinirlerin katkısı olabileceği düşünölmektedir [75].



5. MATERYAL VE METOT

5.1. Deney Grupları

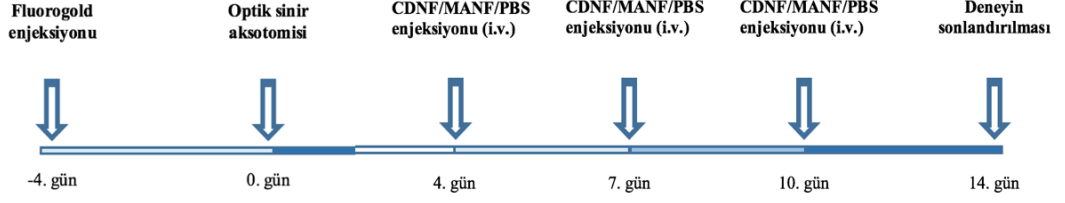
Deneyleer süresince yapılan tüm işlem ve müdahaleler, İstanbul Medipol Üniversitesi, Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu onayı alınarak yapılmıştır. Deneyleerde 8-12 haftalık 20-25 gram ağırlığında erkek Balb/c fareler kullanılmıştır. Fareler alıma için 6 gruba ayrılmıştır. Gruplara ayırma işlemi rastgele olacak Şekilde yapılmıştır. Deneyleer iki set olarak dizayn edilmiştir. Set-I: Hücre sağ kalım deney seti ve Set-II: Protein deney seti çalışmalarını göstermektedir.

Deney grupları;

- Hücre sağ kalım deney seti, Kontrol Grubu
- Hücre sağ kalım deney seti, CDFN Grubu
- Hücre sağ kalım deney seti, MANF Grubu
- Protein deney seti, Kontrol Grubu
- Protein deney seti, CDFN Grubu
- Protein deney seti, MANF Grubu

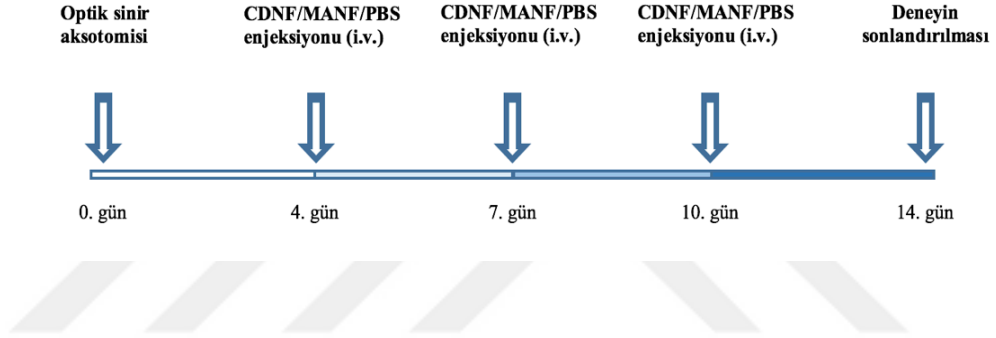
SET I:

Hücre sağ kalım deney seti:



SET II:

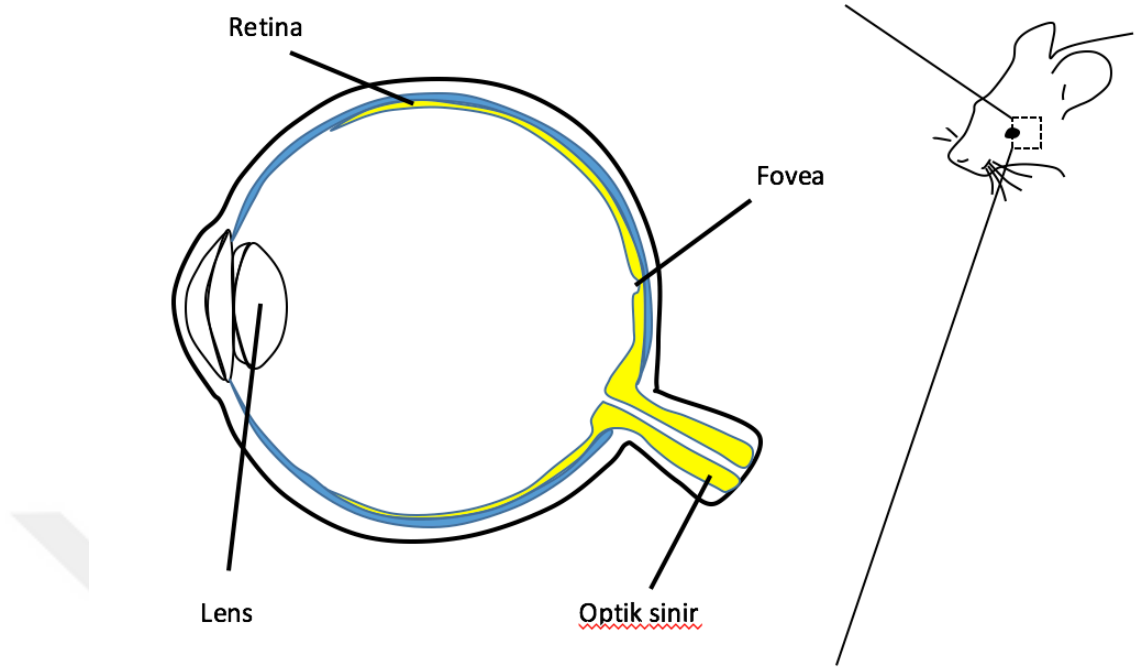
Protein analizleri deney seti:



Şekil 5.1.1. Deney dizaynı

5.2. Optik sinir hasarı modeli

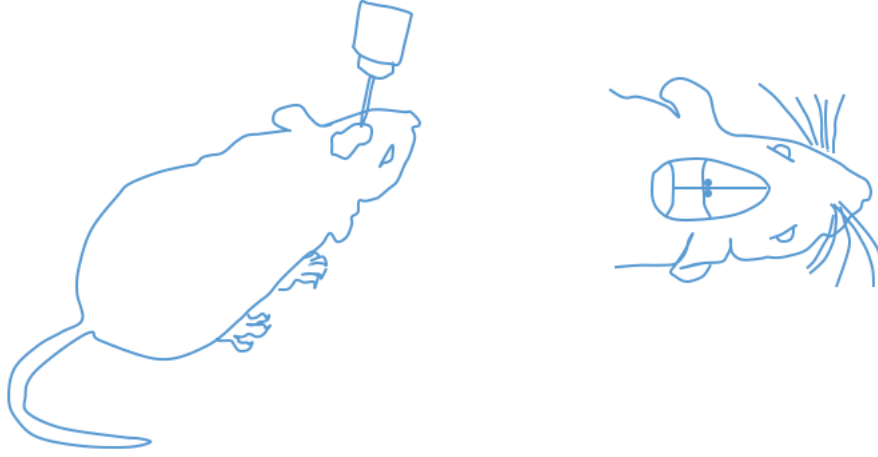
Optik sinir aksotomi modeli için 8-12 haftalık fareler izofloran gaz anestezisi ile anestezisi altına alındı. Üst sağ orbital kenara yakın deri insizyonundan sonra sağ orbita açıldı ve supraorbital ven sağlam bırakılarak lakrimal bez subtotal olarak çıkarıldı. Üst ekstraoküler kasların ayrılmasının ardından, sağ optik sinirde, mikroskop altında gözün arka ucuna yaklaşık 0,5 mm uzaklıkta bir kesi oluşturuldu.



Şekil 5.2.1. Optik sinir

5.3. Tracer Enjeksiyonu

RGC'lerin retrograd işaretlenebilmesi için, 12-14 haftalık fareler intraperitoneal verilmiş %7'lik kloral hidrat ile anestezide alındı ve stereotaksik sabitleyiciye (World Precision Instruments, Kanada) yerleştirildi. Bu farelere Hamilton iğnesi (Hamilton® Microliter™ 701, Sigma Aldrich; ABD) ile enjeksiyon yapıldı. Lateral ventriküle (bregma 3, lateral 0.7 mm) retrograd taşıyıcı olan fluorogold verildi. Enjeksiyondan sonra, fluorogold maddesinin taşmasını önlemek amacıyla Hamilton iğnesi 2 dk boyunca dokunun içerisinde bekletildi.



Şekil 5.3.1. Beyin içi enjeksiyon

5.4. Göz içi enjeksiyon

Optik sinir kesisinden sonra göz boşluğunun içerisine göz içi enjeksiyon ile proteinler verildi. Kesi sonrası ve 4,7 ve 10. günlerde göz içi enjeksiyon ile 1 μ l hacim içerisinde 1 μ g CDFN, 1 μ g MANF veya çözücü olarak PBS verildi.

5.5. Deneyin Sonlandırılması

Optik sinir kesildikten 14 gün sonra fareler yüksek doz anestezi ile anesteziye alınıp sakrifiye edildi ve her iki gözleri çıkarıldı. Hücre sağ kalım deney seti için retinalar çıkartılarak cam lamlara yerleştirildi ve %4 paraformaldehid (PFA) çözeltisi ile fikse edildi. Protein deney seti için ise retinalar PBS solüsyonu içerisinde çıkartılıp, daha sonra protein izolasyonu yapılmak üzere saklandı.

5.6. RGC Sağkalımı

Retinal gangliyon hücrelerinin sağkalımının analizi, whole-mount olarak çıkarılmış retinalara rodamin filtresi(546/590 nm) kullanılarak flüoresan mikroskobu altında incelendi. RGC yoğunluğu ise, tracer ile etiketlenmiş RGC'leri rastgele 12 ROI'de (her retina çeyrek dairesi için ;her biri 62,500 μ m² boyutunda olacak şekilde; retina

yarıçapından birbirinden farklı dış merkezler alınarak) sayarak belirlendi. Ortalama değerleri hem farklı dış merkezler için ayrı ayrı hem de ortak paydada hesaplandı.

5.7. Proteomiks

5.7.1. Protein ekstraksiyon protokolü

Retinalardan alınan doku örnekleri tartıldı. Kullanılacak olan UPX kitinin (Universal Protein Extraction Kit, Expedeon, Almanya) içine proteaz ve fosfataz inhibitör karışımı (5782, Cell Signaling, Amerika Birleşik Devletleri) eklenerek bir solüsyon elde edildi ve bu solüsyon her bir dokunun üzerine 500 µl olacak şekilde eklendi. Dokular bu şekilde homojenize edildi ve sonrasında 95°C'de 5 dk inkübe edilen örneklerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Örnekler oda sıcaklığına ulaştıktan sonra yaklaşık 1 saat boyunca +4°C'de bekletilip, 1 saatin sonunda 15,000g'de 10dk süresince santrifüj edildi. Süpernatant kullanılmak üzere ayrı bir tüpe aktarıldı ve -80°C'de saklandı.

5.7.2. FASP Protokolü

Optik sinir hasarı sonrasında retinadan alınan dokular homojenize edildikten sonra Qubit cihazı ile protein konsantrasyonları ölçüldü. Bütün gruplar için (Vehicle Kontrol, CDFN Kontrol, MANF Kontrol, Vehicle Aksotomi, CDFN Aksotomi, MANF Aksotomi) 100 µg protein 30 µl LC-su içerisinde hazırlandı. 200 µl üre çözeltisi ile örnekler karıştırılarak filtreli tüplere eklenen örnekler, 14,000g'de 15 dk santrifüj edildi. Sıvı kısım atılarak filtrede kalanların üzerine 100 µl 50 mM amonyum bikarbonat eklendi ve filtre tekrardan 14,000 g'de 10dk santrifüj edildi. Filtreye 75 µl tripsin solüsyonu eklenerek kısa bir vorteks yapıldı. Parafilm ile üzeri kapatılan örnekler 1 dk boyunca çalkalayıcıda inkübe edildi. Bir sonraki adım olarak, filtre bir gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Ertesi gün filtre yeni bir tüpe alınarak üzerine 40 µl 50 mM amonyum bikarbonat eklendi ve filtre 14,000g'de 10 dk santrifüj edildi. Bu aşama daha sonra bir kez daha tekrarlandı. Sonrasında filtrenin üzerine 50 µl 0.5 mM Sodyum Klorit solüsyonu ilave edildi ve filtre 14,000 g'de 10dk santrifüj edildi. Solüsyon içerisinde gruplara ait peptit karışımları elde edildi.

5.7.3. Sıvı kromatografisi-Kütle spektrofotometresi (Lc-Ms/Ms) Analizi

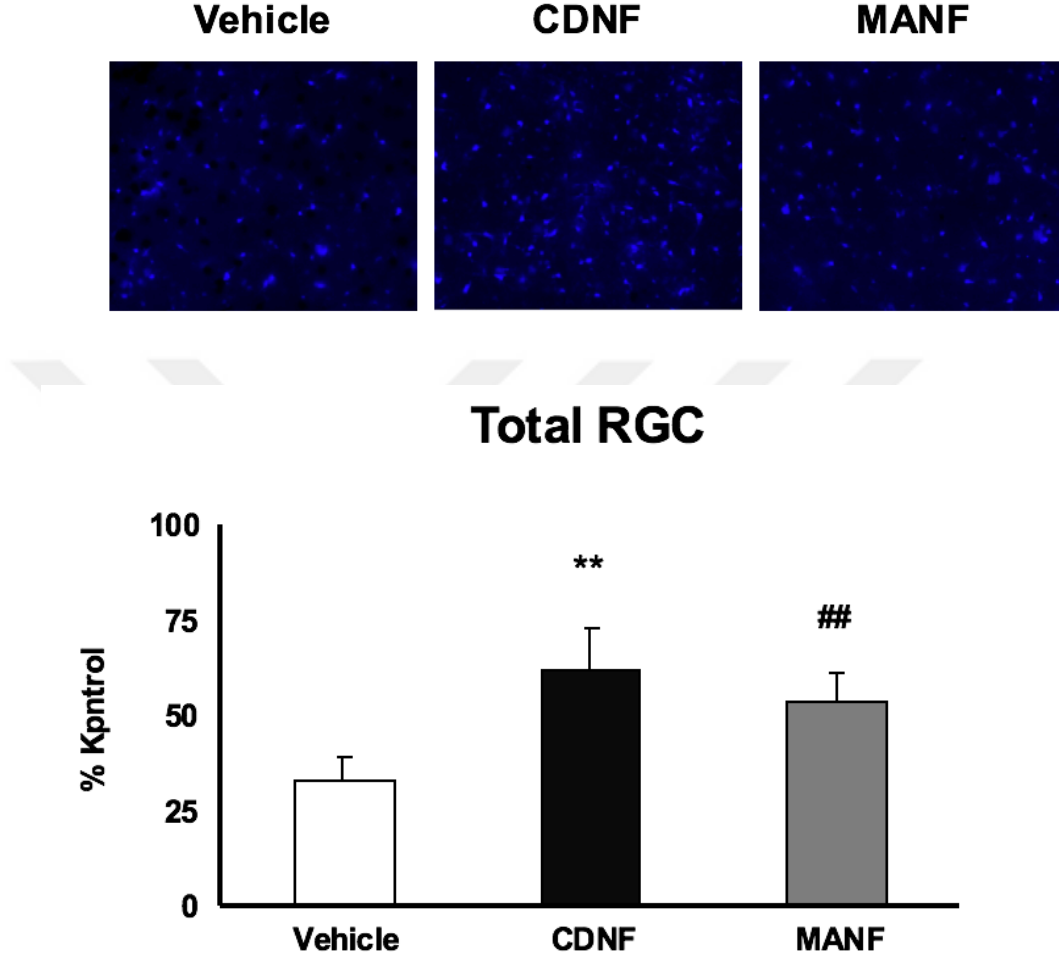
LC-MS/MS analiz ve ilerisindeki protein tanımlamaları daha önce yayınlanmış bir protokole göre yapılmıştır. Triprik peptitler SYNAPT-G-Si yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi ile birleştirilmiş ACQUITY UPLC M sınıfına yüklenerek hesaplanmıştır. Kolonlar %97 mobil faz A (%0.1 FA içeren UHPLC'li su) ya ayarlanarak sıcaklık da 55°C'ye sabitlenmiştir. Peptitler analitik kolona trap kolondan (Symmetry C18, 5 µm, 180 µm i.d. x 20 mm, Waters), analitik kolonda 90 dk dereceli ayırıştırma ile trap kolondan (CSH C18, 1,7 µm, 75 µm i.d. x250 mm, Waters) ayırıştırılmıştır. Bu ayırıştırma işlemi %0.1 FA (v/v) içeren, gradyenti %4'ten %40'a olan ACN ile dakikada 0.400 µl akış hızıyla yapılmıştır. MS ve MS/MS taramalarının pozitif iyon modu ile 0.7 saniye aralıklı döngüler ile taramalar yapılmıştır. Düşük çarpışma enerjisi olarak 10V, yüksek çarpışma enerjisi olarak ise 30V ayarlanmıştır. Dalga hızı, tam IMS döngüsü boyunca 1000'den 55 m/s'ye yükseltilerek, hareket kabiliyeti için serbest bırakma süresi 500 µs, trap yüksekliği ise 15 V olarak ayarlanmıştır. IMS dalga gecikme değeri, kapanın serbest bırakılmasından sonra hareketlilik ayırımı için 1000 µs olarak ölçülmüştür. Prekürsör iyon ön seçimi yapmadan, 50-1900 m/z aralığındaki tüm iyonlar çözünürlük modunda parçalanmıştır. Ayrıca, 100 fmol/ µl Glu-1-fibrino peptit B, 60 saniyelik aralıklarla kilitli kütle referansı olarak verilmiştir. Peptidleri tanıyabilmek ve teşhis edebilmek için ise proteomik yazılım olarak Progenesis-QI (Waters) kullanıldı (Hacariz ve ark. 2014, Serhatli ve ark. 2014).

5.8. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel data karşılaştırmaları için yazılım olarak SPSS (SPSS for Windows; SPSS Inc., USA) kullanıldı. Nöronal sağkalım ve Western blot verileri tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi ve gruplar arasındaki farklılık LSD testi ile analiz edildi. LC-MS/MS verileri için ise bağımsız örneklem t testi kullanıldı. Bütün bulgular ortalama ± standart sapma şeklinde sunuldu. P değeri 0.05'den olanlar veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Retinal Gangliyon Hücrelerinde Sağkalım

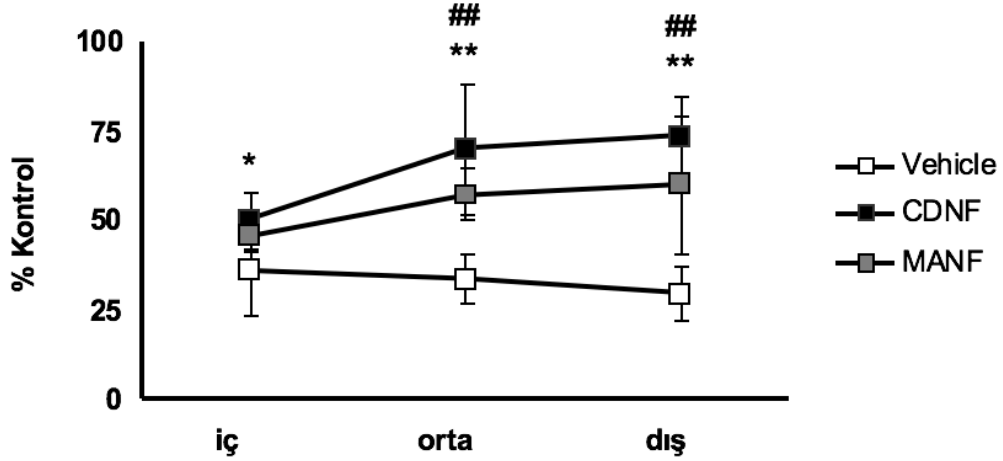


**p<0.01/ *p<0.05 CDNF vehicle ile karşılaştırıldığında;
<0.01 MANF vehicle ile karşılaştırıldığında.

Şekil 6.1.1. CDNF ve MANF tedavisi sonrası retinal gangliyon hücrelerinde sağkalım

Merkezi sinir sistemi hasarı ardından zamana bağlı hücre ölümleri gerçekleşmektedir. Hücresel sağkalımın incelenmesi adına wholemout olarak çıkartılmış retina örneklerine bir daha önceden verilmiş tracer olan fluorogold ile

İşaretleme yapılmıştır (Şekil 6.1.1.A). İşaretleme sonrası retina örnekleri görüntüleme yapabilmek için 405 nm dalga boyunda lazer kullanılarak konfokal lazer mikroskop ile fotoğraflanarak daha sonra değerlendirilmesi yapılmıştır. Nöronal sağkalım hesaplanabilmesi için her biri 62,500 µm² olacak şekilde, retinaların iç, orta ve dış bölgelerinden rastgele alanlar belirlenerek fluorogold ile işaretlenmiş hücrelerin yoğunluğu hesaplanmıştır. Tracer ile işaretlenen sağlıklı hücre gövdelerinin CDNF ve MANF tedavisi sonrasında incelendiğinde kontrole oranla yoğunluğunun daha fazla olduğu görülmüştür. Tedavi görmeyen grubun hasar sonrası hücrelerinin yaklaşık %70'lik bir kayıp olduğu gözlemlenmiştir. CDNF tedavisi gören gruptaki hücre yoğunluğu tedavi görmeyen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. MANF tedavisi gören gruptaki hücrelerin ise CDNF tedavisi kadar yüksek olmasa da tedavi görmeyen kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hücre sayısının istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görülmüştür.



Şekil 6.1.2. Retinal gangliyon hücrelerinde bölgeye göre sağkalım

Bölgelere göre değerlendirildiğinde ise iç bölgede bulunan hücrelerde yaklaşık %70'lik bir hücre kaybı gözlemlenirken, CDNF tedavisi sonrasında hücrelerdeki kayıp kontrole oranla istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. MANF ise

kontrol ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hücre kaybını azaltmıştır.

Orta ve dış bölgeleri incelediğimiz zaman ise hücre ölümlerinin iç bölgeye göre daha fazla olduğu aynı zamanda CDNF ve MANF tedavilerinin de daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Orta ve dış bölgeye bakıldığı zaman hücresel sağkalımda her iki tedavinin de etkili olduğu, CDNF tedavisinin ise istatistiksel olarak anlamlı şekilde sağkalımı arttırdığı gözlemlenmiştir.

6.2. Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) ile Protein Tanımı

Tablo 6.2.1. CDNF ve MANF tedavisi görmüş hayvanların retinalarında istatistiksel olarak anlamlı değişime uğramış proteinlerin listesi

ERİŞİM KODU	ANOVA (P)	DK	GRUP	PROTEİN ADI, GEN ADI
P47962	0,002	5,07	CDNF	60S Ribosomal Protein L5, Rpl5
O35887	0,002	2,94	CDNF	Calumenin, Calu
P32020	0,001	17,14	CDNF	Non-specific lipid-transfer protein, Scp2
Q7TQI3	0,008	5,49	CDNF	Ubiquitin thioesterase OTUB1, Otub1
P35278	0,007	2,58	CDNF	Ras related protein Rab 5-C, Rab5c
P56564	0,001	7,02	CDNF	Excitatory amino acid transporter 1, Slc1a3
Q60749	0,009	25,02	CDNF	KH domain containing, RNA-binding, signal transduction associated protein 1, Khdrbs1
Q9R1Q8	0,009	2,09	CDNF	Transgelin-3, Tgln3
Q9JLZ3	0,008	6,99	CDNF	Methylglutaconyl-CoA hydratase, Auh
Q61792	0,004	5,40	CDNF	LIM and SH3 domain protein 1, Lasp1
Q61171	0,009	3,52	CDNF	Peroxiredoxin-2, Prdx2
Q61656	0,008	1,66	CDNF	Probable ATP-dependent RNA Helicase DDX5, ddx5

P06745	0,007	4,58	CDNF	Glucose-6-phosphate isomerase, Gpi
P08553	0,008	3,37	MANF	Neurofilament medium polypeptide, Nefm
P61358	0,008	3,48	CDNF	60S Ribosomal Protein L27, Rpl27
Q9DCS9	0,001	4,15	CDNF	NADH Dehydrogenase 1 beta subcomplex subunit 10, Ndufb10
Q9WVQ0	0,004	2,38	MANF	Polyamine-modulated factor 1-binding protein 1, Pmfb1
Q9CPV4	0,005	2,86	CDNF	Glyoxalase domain containing protein 4, Glod4
Q8BPN8	0,004	3,98	MANF	DmX -like protein 2, Dmxl2
Q9DCX2	0,001	1,50	CDNF	ATP synthase subunit d, Atp5pd

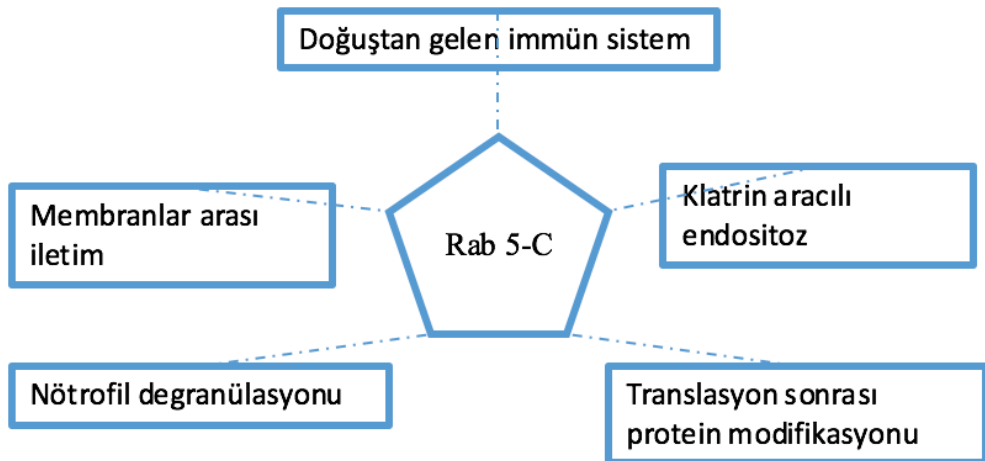
6.3. Proteinlerin rol aldıkları yolların analizleri

Protein yolak analizi gruplar arası değişen proteinlerin UNIPROT kodlarına göre proteinleri rol aldıkları yollara göre analiz eden REACTOME programı ile yapılmıştır. REACTOME programı literatürde yer alan bilgi kütüphanesinden yola çıkarak değişim gösteren proteinleri belli başlıklar altında gruplara ayırmıştır [39]. CDFN ve MANF tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı bir değişim gösteren proteinlerin REACTOME analizine göre rol aldığı yollar şunlardır; transkripsiyon, translasyon, hücrenin strese karşı verdiği tepki, gen

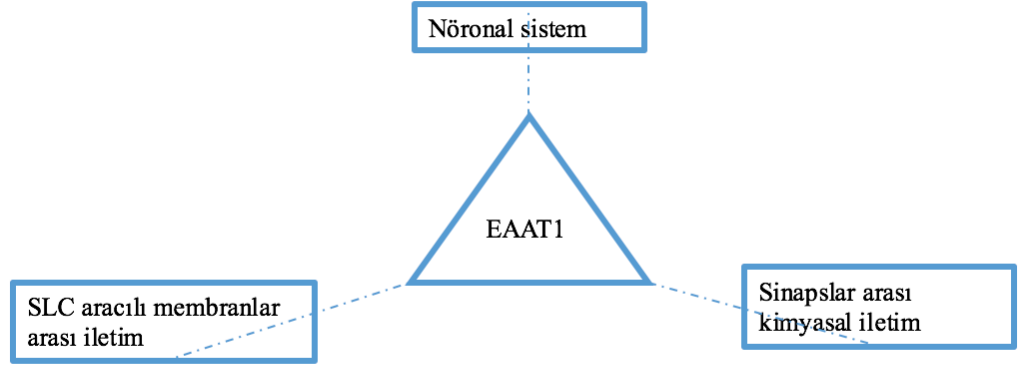
ekspresyonu, RNA polimeraz II transkripsiyonu, doğuştan olan immün sistem, membranlar arası iletim, nötrofil degranülasyonu, translasyon sonrası protein modifikasyonu, klatrin aracılı endositoz, nöronal sistem, SLC aracılı membranlar arası iletim, sinapslar arası kimyasal iletim ve deubikitinasyon.



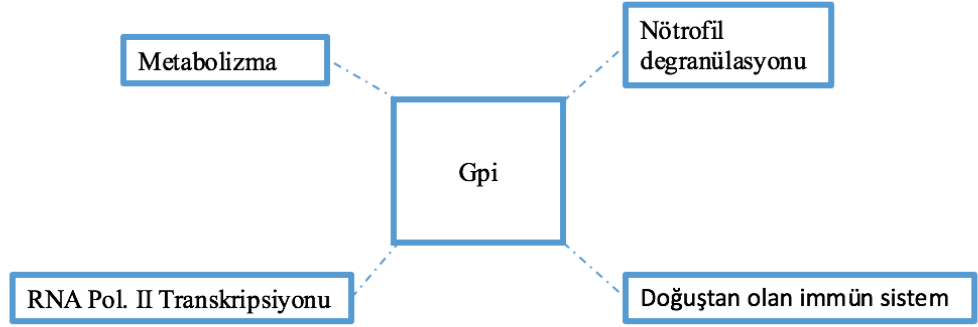
Şekil 6.3.1. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen Peroxiredoxin 1 proteininin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler



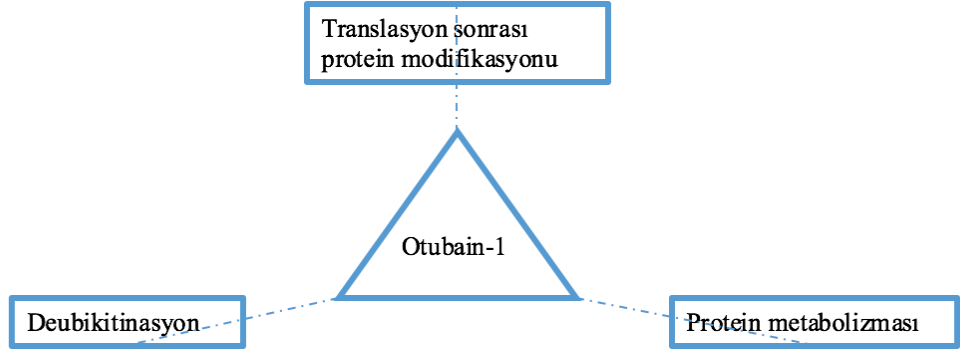
Şekil 6.3.2. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen Ras related rab 5 C proteininin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler



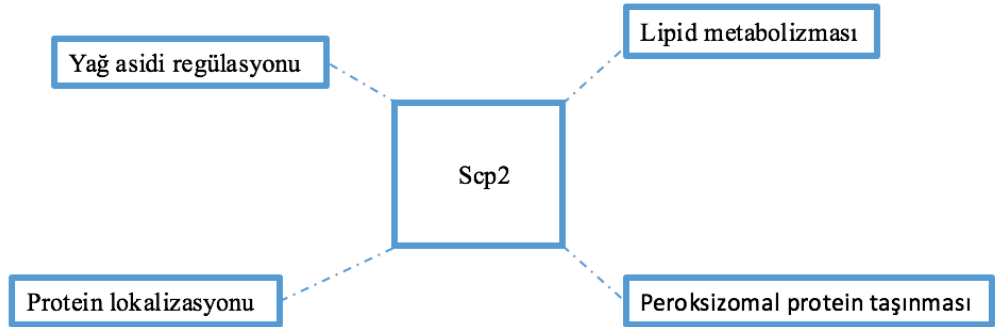
Şekil 6.3.3. CDNF tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen excitatory amino acid transporter 1 proteininin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler



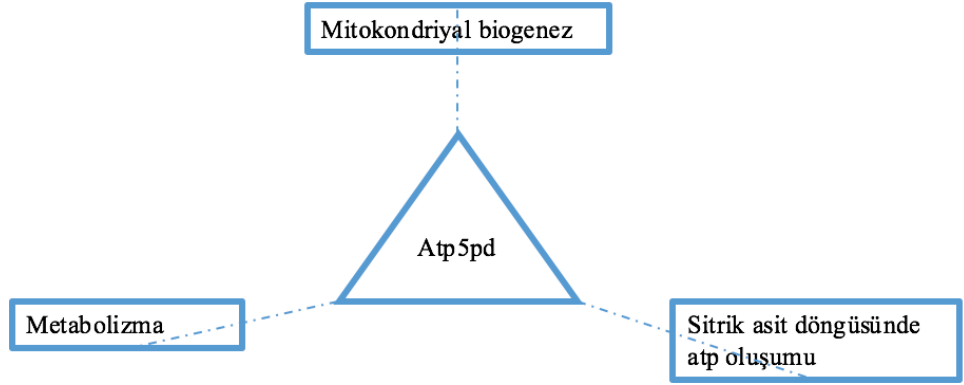
Şekil 6.3.4. CDNF tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen Glucose phosphatase isomerase 6 proteininin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler



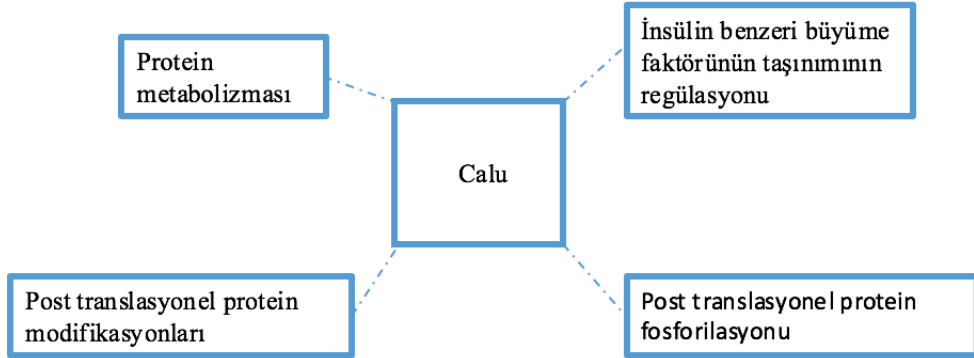
Şekil 6.3.5. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen Otubain 1 proteinin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler



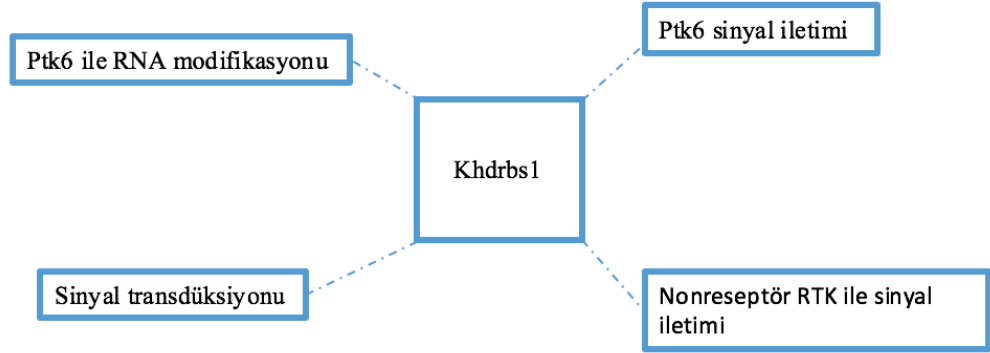
Şekil 6.3.6. CDFN tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen non specific lipid transfer proteininin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler



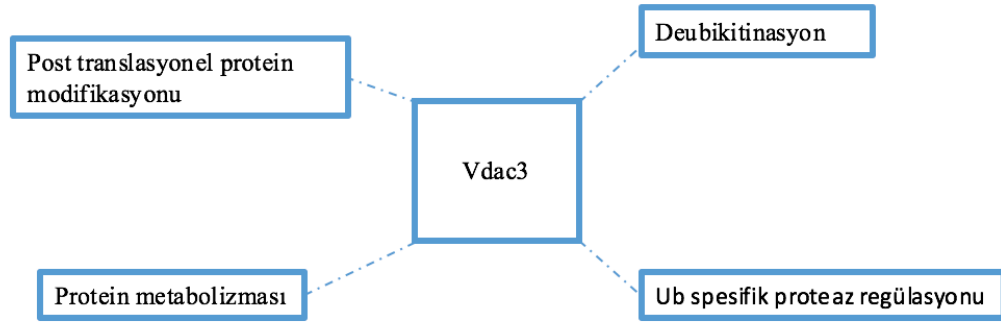
Şekil 6.3.7. CDMF tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen ATP synthase subunit d proteininin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler



Şekil 6.3.8. CDMF tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen calumenin proteininin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler



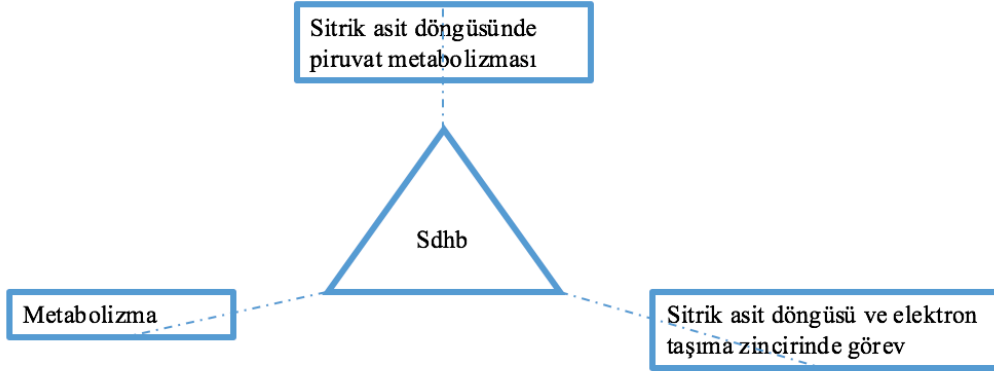
Şekil 6.3.9. CDNF tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated protein 1 proteininin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler



Şekil 6.3.10. CDNF tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen voltage dependent anion selective channel protein 3 proteininin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler



Şekil 6.3.11. MANF tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen guanine nucleotide binding protein subunit gamma 13 proteininin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler



Şekil 6.3.12. CDNF tedavisi sonrası istatistiksel olarak anlamlı değişen succinate dehydrogenase iron sulfur subunit proteininin reactome analizi sonucuna göre rol aldığı görevler

7. TARTIŞMA

Merkezi sinir sistemi hasarı sonucu ortaya çıkan bir çok nörodejeneratif hastalık ve komplikasyon vardır. Bu hasar mekanizmaları beyin ve omurilikte, çeşitli sebeplerden dolayı meydana gelmektedir ancak hepsinin sonucunda hücre ölümü gerçekleşmektedir. Nöronal hücre ölümü Alzheimer, Parkinson, Huntington, Amiyotrofik Lateral Skleroz ve beyin felci gibi nörodejeneratif hastalıkların mutlak sonucudur. Nöronlarda gerçekleşen hücre ölümünü tetikleyen bir çok faktör vardır; metabolik stres, oksidatif stres, glutamat reseptörlerinin fazla çalışması ve nörotrofik faktörlerin eksikliği bu faktörlere örnektir [60]. Merkezi sinir sistemi yaralanmalarını araştırmak için bir çok model üzerinde çalışılmıştır; optik sinir aksotomisi de bu modellerden biridir. Bu modelin tercih edilmesinin sebeplerinden ilki tekrarlanabilir nöronal dejenerasyon modellenmesi yapılabilmesidir. Bir diğer sebebi ise incelenen hücrelerin yani retinal gangliyon hücrelerinin kafatasının dışında kalması ve bu hücrelerde indüklenen nöronal hasarın in vivo çalışmaya olanak vermesidir. Optik sinire verilen hasar retinal gangliyon hücrelerinin aksonlarına verildiği için hücre gövdesinde bir hasar meydana gelmemektedir ve verilen hasar sadece aksonlarda kalmakta, başka bir yan etki göstermemektedir [42]. Aynı zamanda nörodejeneratif hastalıkların bir çoğunda kan beyin bariyeri bozulmakta ve buna bağlı komplikasyonlar da ortaya çıkmaktadır. Optik sinir kesisi ile ise bu problem ortadan kalkarken kan beyin bariyerinin bütünlüğü korunarak sadece verilen hasarın sonuçları ile çalışılmaktadır. Tüm bu sebeplerden dolayı optik sinir aksotomisi nörodejeneratif hastalıkların patofizyolojisi ve sonrasında açığa çıkan hücre ölümlerini incelemeye uygun bir modeldir.

Nörodejeneratif hastalıkları tedavi edebilmek adına bir çok yöntem farklı modeller üzerinden denenmiştir. Bunlar arasında gen terapisi, kök hücre terapisi [53], büyüme faktörleri [49], transkripsiyon faktörleri ve dışarıdan verilen çeşitli proteinler [20] gibi yöntemler denenmiş ancak kesin bir sonuca henüz ulaşılamamıştır [75]. Merkezi sinir sistemi travmaları sonucu ortaya çıkan hücre ölümlerinin bir çok sebebi vardır bunlar; hücrede fazla glutamat birikimi, oksidatif stres sonucu serbest radikallerin ortaya çıkarak hücrede birikmesi veya nörotrofik

faktörlerin eksikliği gibi sebepler olabilir. Nörotrofik faktörlerin eksikliği dolaylı yoldan hücre ölümüne sebep olmakla beraber bir çok yolak mekanizmalarının da aksamasına sebep olabilmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda tedavi amacıyla üzerinde çalışılan nörotrofik faktörlerin merkezi sinir sistemi hasarı sonrası nöronal sağkalımı desteklediği, hücre ölüm yüzdesini azalttığı gözlemlenmiştir [42]. Nörotrofik faktörler arasında CDNF ve MANF'ın ise iskemik beyin felci sonrası nöroprotektif olduğu gösterilmiştir.

CDNF ve MANF nörotrofik faktörleri diğer nörotrofik faktörlerden yapıca ayrılmaktadırlar. Yapılarına bakıldığında iki bölümden oluşmaktadır; birincisi amino ucunu bulunduran ve membranlar arası etkileşimde rol alan bölüm ve ikinci olarak karboksi ucunu bulunduran ve hücreleri endoplazmik retikulum stresinden koruma görevini üstlenen bölüm. CDNF ve MANF'ın bu yapısı endoplazmik retikulumda gerçekleşen protein katlanmasında yardımcı rolleri olduğunu göstermektedir. Yanlış protein katlanmasının azalmasıyla birlikte endoplazmik retikulum stresi de azalmaktadır. Ayrıca CDNF ve MANF harici diğer nörotrofik faktörler için birer reseptör belirlenmişken CDNF ve MANF için henüz böyle bir reseptör tanımlanamamıştır. Diğer nörotrofik faktörlerin membrandaki reseptörlerle iletişime geçerek etki mekanizmalarını gerçekleştirdiği görülmüşken, CDNF ve MANF'ın ise etki mekanizmalarını direk hücre içine girerek göstererek endoplazmik retikulum stresini baskıladıkları düşünülmektedir. Bu sebeplerden dolayı CDNF ve MANF ile çalışmanın önemli sonuçlar vereceği düşünülmüştür.

Bu tezde CDNF ve MANF nörotrofik faktörlerinin hasar sonrası etkilerinin in vivo şartlarda i) nöronal hücre sağkalımı, ii) hücre ölümü ve sağkalımında rol oynayan proteinler, iii) sinyal iletim mekanizmaları ve iv) protein profili farklılıkları üzerine etkilerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu etkilerin araştırılması amacıyla optik sinir aksotomisi modeli kullanılmıştır.

Kullanılan optik sinir aksotomisi modelinde hasar, kan beyin bariyerinin bütünlüğü korunarak, optik sinirlerin aksonlarına yapılan bir kesi ile meydana gelir. Hasar indüklendikten sonra CDNF ve MANF nörotrofik faktörlerinin protektif etkilerini görmek adına hasar sonrası 4.,7. ve 10. günlerde maddeler göz içi enjeksiyon ile verilmiştir. Hasarın protein seviyesindeki incelemelerini

yapabilmek için hücre ölümü maksimum seviyesini ulaştığı 14.günde [36] deney sonlandırılmış ve retinalardan örnekler toplanmıştır.

Tüm deney grupları için, optik sinir hasarı sonrasında sağ kalan retinal gangliyon hücre sayısını belirlemek ve sonrasında gruplar arasında karşılaştırma yapabilmek amacıyla fluorogold ile işaretlenmiş retinal gangliyon hücrelerinin yoğunluğu değerlendirilerek analiz yapılmıştır. Tracer ile yapılan işaretleme, hem CDFN hem MANF' ın hücre sağkalımına pozitif yönde bir etkisi olduğunu göstermiştir. CDFN tedavisinin MANF tedavisine oranla daha yüksek bir sağlıklı hücre popülasyonu sağladığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında hem CDFN hem MANF verilen deney gruplarında hücre sağkalımının istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 6.1.1.).

Tüm gruplar arasındaki hücre sağkalımı ayrıca bölgelere göre de değerlendirilmiştir. Retina örnekleri çıkartılırken wholemout yöntemi kullanıldığından dolayı hücre sayımı yaparken retinanın her bölgesinin değerlendirmeye alındığından emin olunması gerekir. Bu sebepten dolayı iç orta ve dış bölgeler olarak ayrıca değerlendirme yapılmış ve optik sinirin geçtiği her bölge göz önüne alınarak değerlendirme yapılmıştır. Bu değerlendirme sonucunda hem CDFN hem de MANF tedavisinin her üç bölgede de hücre kaybını azalttığı gözlemlenmiştir. CDFN ve MANF' ın retinada incelenen her bölge için benzer şekilde nöroprotektif etkisinin olduğu belirlenmiştir [42]. İç bölgeye bakıldığında CDFN tedavisi sonrasında hücrelerdeki sağkalım kontrole göre karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. MANF tedavisi sonrasında da istatistiksel olarak anlamlı olarak kontrol ile kıyaslandığında hücre kaybının azaldığı gözlemlenmiştir. Retinanın orta ve dış bölgelerindeki hücre sağkalımını incelediğimiz zaman ise dış bölgedeki hücre sağkalımının orta bölgeye göre daha yüksek olduğu hem CDFN hem de MANF grubunda gözlemlenmiştir. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında her iki tedavinin de hücre sağkalımını arttırdığı, ve hücre ölümünü istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalttıkları görülmüştür (Şekil 6.1.2.).

CDFN ve MANF tedavisi sonrası optik sinir aksotomisi geçiren hayvanların retinalarından geniş ölçekli proteomik analizi yapılmıştır. Sıvı

kromatografisi kütle spektrometresi ile yapılan proteomik analizi sonucunda tedavi grupları arasında farklılık gösteren, $p < 0,05$ veya $p < 0,01$ istatistiksel olarak anlamlılık gösteren proteinlerin tanımlaması yapılmıştır. Bu tanımlama sonucu elde edilen protein listesindeki proteinlerin analizi REACTOME programı ile rol aldıkları görev ve yolları belirleyerek yapılmıştır (Tablo 6.3.1.). REACTOME programı ile analizi yapılan proteinlerin optik sinir hasarı sonrası önemli rolleri olduğu belirlenmiştir. Bunlardan bazıları; transkripsiyon, translasyon, hücrenin strese karşı verdiği tepki, gen ekspresyonu, RNA polimeraz II transkripsiyonu, doğuştan olan immün sistem, membranlar arası iletim, nötrofil degranülasyonu, translasyon sonrası protein modifikasyonu, klatriin aracılı endositoz, nöronal sistem, SLC aracılı membranlar arası iletim, sinapslar arası kimyasal iletim ve deubikitinasyon' dur.

Yapılan protein tanımlamaları sonucu önemli yollarda rol alan proteinlerden yapılan tablodaki proteinler daha detaylı incelenerek grafik halinde analiz edilmiştir. CDNF tedavisi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde ifadesi değişen ve katlanması yüksek derecede artan proteinlerin MANF tedavisinden elde edilen proteinlere göre daha fazla olduğu gözlemlenmiştir. CDNF tedavisinin MANF tedavisine oranla daha pozitif etkisi proteomik analizi sonucunda da gözlemlenmiştir.

Tanımlanan proteinlerden grafik haline getirilmiş birkaçı aşağıda açıklanmıştır;

Peroxiredoxin 1 tanımlanan proteinler arasında bir çok önemli yolda rol alan bir kaçından biridir. CDNF tedavisi sonucu katlanma sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişmiş bir proteindir. Peroxiredoxin 1 proteininin ifadesinin artmış olması REACTOME programı tarafından strese karşı verilen hücre tepkileri, gen ekspresyonu kontrolü ve RNA Polimeraz II transkripsiyonu ile ilişkilendirilmiştir. Retinada peroxiredoxin 1 proteininin genellikle retinanın iç nükleer tabakasındaki nöronlarda bulunduğu [13] ve hücreleri oksidatif strese karşı koruduğu yapılan çalışmalar sonucu belirlenmiştir [73]. Optik sinir hasarı gibi stres faktörleri sonucu serbest radikallerin birikimi ortaya çıkmakta ve beraberinde oksidatif stresi getirmekte ve retinal gangliyon hücrelerinin ölümüne yol açtığı düşünülmektedir.

Peroxioredoxin 1 proteininin ise ortaya çıkan bu oksidatif stresten retinal gangliyon hücrelerini korumakta olduğu düşünülmektedir [83].

Rab5 proteininin tanımlanan proteinler arasında önemli rolleri olduğu düşünülmektedir. CDFN tedavisi sonucu katlanma sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişmiş bir proteindir. Rab5 protein ifadesinin artmış olması REACTOME programı tarafından membranlar arası iletim, kltrin aracılı endositoz, translasyon sonrası protein modifikasyonu, nötrofil degranülasyonu ve doğuştan gelen immün sistemde rol aldığı belirlenmiştir. Membranlar arası iletimini genellikle endozomlardan gerçekleştiren Rab proteinleri nöronal gelişim, homeostazi ve nöronal sinaptik iletim de de büyük rol oynar [24]. Reseptör aracılı endositozdaki rolü yüzünden Rab5 proteini önemli bir hedefdir çünkü büyüme faktörlerinden gelen sinyalleri değiştirme kapasitesi vardır ve nöronların membranlar arası iletimdeki bozukluklara karşı daha hassas oldukları bilinmektedir [30].

Excitatory amino acid transporter 1 proteini sıvı kromatografisi kütle spektrometresi analizi sonucu tanımlanan proteinler arasında ifadesinin değişimi büyük olan ve önemli yollarda rol alan proteinlerden biridir. CDFN tedavisi sonucu katlanma sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişmiş bir proteindir. Yapılan REACTOME analizi sonucu bu proteinin nöronal yollarda, sinapslar arası kimyasal iletimde ve SLC aracılı membranlar arası iletimde rol aldığı belirlenmiştir. Bu proteinin sinaptik iletim sırasında sinaptik boşlukta biriken glutamatın dışarı atılmasında görev alarak döngüyü devam ettirmekte çok önemli bir rol oynamaktadır. Nöronlarda biriken fazla glutamatın toksik olduğu ve bir çok komplikasyona sebep olduğu bilinmektedir. Excitatory amino acid transporter 1 proteini sayesinde döngü devam ederek fazla glutamat sinaptik boşluktan dışarı atılmaktadır. Retinada hasara bağlı olarak gerçekleşen değişimler sonucu excitatory amino acid transporter proteinlerinin aktivitelerinin değişime uğradığı yapılan çalışmalarca belirtilmiştir [85].

Yapılan proteomik analizi sonucunda tanımlanan bir başka protein ise Glucose 6 phosphate isomerase'dır. CDFN tedavisi sonrası ifadesinde büyük değişim gözlenmiştir ve bir çok yolda önemli rolleri vardır. Yapılan REACTOME analizi

sonucuna göre nötrofil degranülasyonu, RNA Polimeraz II transkripsiyonu, metabolizma regülasyonu ve doğuştan olan immün sistemindeki rolü bunlardan bir kaçıdır. Bu proteinin en önemli özelliği ise hücrede ihtiyaç olduğu zaman bir nörotrofik faktör gibi hareket ederek nöronal hücrelerin sağkalımında rol alabilme kapasitesidir [51].

Tanımlanan proteinler arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişime uğramış ve önemli yollarda görev alan bir başka protein de Otubain 1 proteindir. CDFN tedavisi sonucunda ifadesinde büyük bir değişim gözlenmiştir. Translasyon sonrası protein modifikasyonu, protein metabolizması regülasyonu ve deubikitinasyon gibi önemli yollarda rol almakta olduğu yapılan REACTOME analizi sonucunda belirlenmiştir. Otubain 1 proteinin ana görevinin deubikitinasyon olduğu belirlenmiş ancak daha tam olarak hücre içerisindeki rollerinin tümü keşfedilmemiştir [18].

Non specific lipid transfer protein (Scp2) katlanma sayısı diğer proteinlere göre daha az ancak yine de istatistiksel olarak anlamlı değişime uğramış bir proteindir. CDFN tedavisi sonucu katlanma sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişmiş bir proteindir. Yağ asitlerinin metabolizmasında, lipitlerin metabolizmasında, protein lokalizasyonunda ve peroksizomal protein taşınmasında rol almaktadır. Peroksizomlar sitoplazmik organellerdir ve membranlarında bir çok enzim taşıyarak metabolik reaksiyonlarda görev almaktadırlar. Bunlardan biri de uzun yağ asidi zincirlerini kırarak yağ asitlerini kullanıma hazır hale getirmeleridir [89].

ATP Synthase subunit d (Atp5pd) proteini katlanma sayısının diğerlerine göre daha az olan ancak yine de istatistiksel olarak anlamlı değişime uğramış bir proteindir. CDFN tedavisi sonucu katlanma sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişime uğramıştır. Organellerin biyogenezi ve dengelerinin sağlanmasında, mitokondriyal biyogeneze, metabolizmada ve sitrik asit döngüsü ve oksijenli solunumda kemiozmotik bağlanma aracılığıyla atp oluşumunda görev almaktadır [90]. Bu protein mitokondride atp üretiminde rol alarak hücreye enerji sağlamaktadır. Yokluğunda ise ATP synthase eksikliğinden oluşan bir çok defekt meydana gelir. Bunların en önemlisi ise serbest radikal oluşumudur. Serbest

radikal oluşumu sonucunda hücre oksidatif strese girebilmektedir. Bu sebeplerden dolayı bu proteinin hasar sonucu artmış olması pozitif bir etkiyi işaret edebilir [93].

Calumenin (Calu) proteini katlanma sayısının diğerlerine göre daha az olduğu ancak yine de istatistiksel olarak anlamlı değişime uğramış proteinlerden biridir. CDFN tedavisi sonucu katlanma sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişime uğramıştır. Translasyon sonrası protein modifikasyonlarında, protein metabolizmasında, translasyon sonrası protein fosforilasyonunda ve insülin benzeri büyüme faktörünün taşınımı ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlanma proteinleri tarafından hücre içine alınımında rol almaktadır [91]. Calu protein seviyesinin hasar sonrası artış gösterdiği ve immün sistemde rol aldığı bilinmektedir. Protein sentezinde görev alarak protein katlanması regülasyonunda işlevi olduğu düşünülürken daha kesin bir sonuç elde edilememesine rağmen sinir rejenerasyonunda da rol aldığı düşünülmektedir [94].

KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated protein 1 (Khdrbs1) proteininin CDFN tedavisi sonucunda katlanma sayısının diğerleri kadar yüksek olmasa da istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişime uğradığı gözlemlenmiş proteinlerden biridir. Sinyal transdüksiyonunda, non reseptör tirozin kinazlar ile sinyal iletiminde, ptk6 ile sinyal iletiminde ve ptk6 proteinleri ile RNA modifikasyonlarında görev almaktadır. Optik sinir hasarı sonrası sinyaller arası iletimde gerçekleşen bozukluklarda rol aldığı düşünülmektedir [92].

Voltage dependent anion selective channel protein 3 (Vdac3) proteininin katlanma sayısının diğerlerine az olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişime uğradığı gözlemlenmiştir. CDFN tedavisi sonucu katlanma sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişime uğramış proteinlerin sonuncusudur. Ubikitin spesifik proteazların işlenmesinde, deubikitinasyonda, translasyon sonrası protein modifikasyonlarında ve protein metabolizmasında işlevleri vardır. Bu proteinin dolaylı yoldan olsa da apoptoz yollarında rolü vardır, optik sinir hasarı sonrası apoptoz yolağında rol alan bir proteinin ekspresyonunun değişmesi de beklenmektedir [95].

Guanine nucleotide subunit binding protein subunit gamma 13 (Gng13) proteini katlanma sayısı diğerlerine göre daha az olan ancak halen istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişime uğramış bir proteindir. MANF tedavisi sonucu katlanma sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişime uğramış bir proteindir. Kainat reseptörlerinin presinaptik fonksiyonlarında, G proteinlerinin aktivasyonunda ve sinyal amplifikasyonlarında rol almaktadır. G proteinlerinin işleyişlerinde meydana gelen bozukluklar sonucu nörodejeneratif süreçlerin de etkilendiği yapılan çalışmalarca belirlenmiştir. G protein aktivasyonunda rol alan Gng13 proteininin de bu yollarda görev alabileceği düşünülmektedir [96].

Son olarak succinate dehydrogenase iron sulfur subunit (Sdhb) proteini katlanma sayısı diğerlerine göre daha az olan ancak istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişime uğramış bir proteindir. MANF tedavisi sonucu katlanma sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış göstermiş bir proteindir. Piruvat metabolizmasında ve sitrik asit siklusunda, deubikitinasyonda, translasyon sonrası protein modifikasyonlarında ve protein metabolizmalarında rolleri vardır. Yeni çalışmalar ışığında bu proteinin krebs siklusundaki rolleri dışında yeni fizyolojik rollere sahip olduğu belirlenmiştir. Sdhb proteininin nöroretinal anjiyogenezde rol aldığı düşünülmektedir. Hipoksik durumdaki retinaya köprü görevi üstlenerek damarlaşmayı yönettiği ve retinal gangliyon hücrelerinin suksinat moleküllerinin birincil karşılık veren hücreleri olduğu belirlenmiştir. Retinal gangliyon hücrelerinin hayatta kalmasında rol oynamaktadırlar [97].

8. SONUÇ

Elde edilen tüm dataların incelemesi sonucu hem CDFN hem de MANF tedavilerinin hücre ölümünü azalttığı, yeni nöron oluşumunu arttırdığı ve protein profil analizi ile de hücrelerin hasara karşı verdiği tepkileri arttırarak hücreleri hayatta kalmaya yönlendirdikleri görülmüştür.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, CDFN ve MANF adlı diğer nörotrofik faktörlerden yapısal özelliklerinden dolayı ayrılan iki nörotrofik faktörün optik sinir aksotomisi üzerinden retinal gangliyon hücreleri üzerindeki etki mekanizmalarının araştırılması hedeflenmiştir. Hasar üzerindeki etki mekanizmalarının araştırılmasıyla açığa çıkan bilgilerle bu nörotrofik faktörlerin tedavi çalışmalarında kullanılabileceği düşünülmektedir. Protein profil analizi sonuçları ışığında açığa çıkan değişim göstermiş proteinlerin daha detaylı araştırılması nörotrofik faktörlerin etkilerini daha net anlayabilmemizi sağlayacaktır.

9. KAYNAKLAR

- [1] Alonzi, T., Middleton, G., Wyatt, S., Buchman, V., Betz, U. A., Müller, W., ... & Davies, A. M. (2001). Role of STAT3 and PI 3-kinase/Akt in mediating the survival actions of cytokines on sensory neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 18(3), 270-282.
- [2] Bähr, M., Vanselow, J. & Thanos, S. (1988) In vitro regeneration of adult rat ganglion cell axons from retinal explants. *Exp. Brain. Res.*, 73, 393–401.
- [3] Battle, T. E., & Frank, D. A. (2002). The role of STATs in apoptosis. *Current molecular medicine*, 2(4), 381-392.
- [4] Benowitz, L. I., He, Z., & Goldberg, J. L. (2017). Reaching the brain: advances in optic nerve regeneration. *Experimental neurology*, 287, 365-373.
- [5] Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1994). Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *Journal of Neuroscience*, 14(7), 4368-4374.
- [6] Bernard D, Dieni S, Rees S, Bernard O (1998) Physiological and induced neuronal death are not affected in NSE-bax transgenic mice. *J Neurosci Res* 52:247–259.
- [7] Brunet, A., Datta, S. R., & Greenberg, M. E. (2001). Transcription-dependent and-independent control of neuronal survival by the PI3K–Akt signaling pathway. *Current opinion in neurobiology*, 11(3), 297-305.
- [8] Camelo, S., Kezic, J., & McMenamin, P. G. (2005). Anterior chamber-associated immune deviation: a review of the anatomical evidence for the afferent arm of this unusual experimental model of ocular immune responses. *Clinical & experimental ophthalmology*, 33(4), 426-432.

- [9] Cen, L.P., Luo, J.M., Zhang, C.W., Fan, Y.M., Song, Y., So, K.F., Van Rooijen, N., Pang, C.P., Lam, D.S.C. & Cui, Q. (2007) Chemotactic effect of ciliary neurotrophic factor on macrophages in retinal ganglion cell survival and axonal regeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Res.*, **48**, 4257–4266.
- [10] Cenni, M. C., Bonfanti, L., Martinou, J. C., Ratto, G. M., Strettoi, E., & Maffei, L. (1996). Long-term survival of retinal ganglion cells following optic nerve section in adult bcl-2 transgenic mice. *The European journal of neuroscience*, *8*(8), 1735-1745.
- [11] Chaudhary, P., Ahmed, F., Quebada, P., & Sharma, S. C. (1999). Caspase inhibitors block the retinal ganglion cell death following optic nerve transection. *Molecular brain research*, *67*(1), 36-45.
- [12] Cheng, L., Sapielha, P., Kittlerová, P., Hauswirth, W.W. & Di Polo, A. (2002) TrkB gene transfer protects retinal ganglion cells from axotomy-induced death in vivo. *J. Neurosci.*, **22**, 3977–3986.
- [13] Chidlow, G., Wood, J. P., Knoops, B., & Casson, R. J. (2016). Expression and distribution of peroxiredoxins in the retina and optic nerve. *Brain Structure and Function*, *221*(8), 3903-3925.
- [14] Coffey, P. J., Jing, J. I. N., & Woodgett, J. R. (1998). Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochemical Journal*, *335*(1), 1-13.
- [15] Dietz, G. P., Kilic, E., Bähr, M., & Isenmann, S. (2001). Bcl-2 is not required in retinal ganglion cells surviving optic nerve axotomy. *Neuroreport*, *12*(15), 3353-3356.
- [16] Dolcet, X., Soler, R.M., Gould, T.W., Egea, J., Oppenheim, R.W. & Comella, J.X. (2001) Cytokines promote motoneuron survival through the janus kinase-

dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Mol. Cell. Neurosci.*, **18**, 619–631.

[17] Dubois-Dauphin, M., Frankowski, H., Tsujimoto, Y., Huarte, J. and Martinou, J. C. (1994) Neonatal motoneurons overexpressing the *bcl-2* protooncogene in transgenic mice are protected from axotomy-induced cell death. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 3309-3313.

[18] Edelman, M. J., Iphöfer, A., Akutsu, M., Altun, M., Di Gleria, K., Kramer, H. B., ... & Kessler, B. M. (2009). Structural basis and specificity of human otubain 1-mediated deubiquitination. *Biochemical Journal*, *418*(2), 379-390.

[19] Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Viteri, G., Forner, O., Marin-Garcia, P., Arnau, V., ... & Hermjakob, H. (2017). Reactome pathway analysis: a high-performance in-memory approach. *BMC bioinformatics*, *18*(1), 142.

[20] Fortun, J., Hill, C. E., & Bunge, M. B. (2009). Combinatorial strategies with Schwann cell transplantation to improve repair of the injured spinal cord. *Neuroscience letters*, *456*(3), 124.

[21] Franke, T. F., Kaplan, D. R., & Cantley, L. C. (1997). PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, *88*(4), 435-437.

[22] Garcia-Valenzuela, E., Sharma, S.C. & Pina, A.L. (2005) Multilayered retinal microglial response to optic nerve transection in rats. *Mol. Vis.*, **11**, 225–231.

[23] Garcia-Valenzuela, E., Gorczyca, W., Darzynkiewicz, Z., & Sharma, S. C. (1994). Apoptosis in adult retinal ganglion cells after axotomy. *Journal of neurobiology*, *25*(4), 431-438.

[24] Ginsberg, S. D., Mufson, E. J., Counts, S. E., Wu, J., Alldred, M. J., Nixon, R. A., & Che, S. (2010). Regional selectivity of rab5 and rab7 protein upregulation in

mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 22(2), 631-639.

[25] Goldberg, J.L., Espinosa, J.S., Xu, Y., Davidson, N., Kovacs, G.T. & Barres, B.A. (2002) Retinal ganglion cells do not extend axons by default: promotion by neurotrophic signalling and electrical activity. *Neuron*, 33, 689–702.

[26] Gyárfás, T., Knuuttila, J., Lindholm, P., Rantamäki, T., & Castrén, E. (2010). Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF) by anti-parkinsonian drug therapy in vivo. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(3), 361-368.

[27] Han, B. H., & Holtzman, D. M. (2000). BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *Journal of Neuroscience*, 20(15), 5775-5781.

[28] Harris, N. M., Ritzel, R., Mancini, N. S., Jiang, Y., Yi, X., Manickam, D. S., ... & Verma, R. (2016). Nano-particle delivery of brain derived neurotrophic factor after focal cerebral ischemia reduces tissue injury and enhances behavioral recovery. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 150, 48-56.

[29] Hendriks, J.A., Teunissen, C.E., De Vries, H.E. & Dijkstra, C.D. (2006) Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res. Rev.*, 48, 185–195.

[30] Hutagalung, A. H., & Novick, P. J. (2011). Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological reviews*, 91(1), 119-149.

[31] Immenschuh, S., & Baumgart-Vogt, E. (2005). Peroxiredoxins, oxidative stress, and cell proliferation. *Antioxidants & redox signaling*, 7(5-6), 768-777.

[32] Irving EA, Bamford M (2002) Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:631– 647.

- [33] Isenmann, S., Wahl, C., Krajewski, S., Reed, J. C., & Bähr, M. (1997). Up-regulation of Bax protein in degenerating retinal ganglion cells precedes apoptotic cell death after optic nerve lesion in the rat. *European Journal of Neuroscience*, 9(8), 1763-1772.
- [34] Jehle, T., Dimitriu, C., Auer, S., Knoth, R., Vidal-Sanz, M., Gozes, I., & Lagreze, W. A. (2008). The neuropeptide NAP provides neuroprotection against retinal ganglion cell damage after retinal ischemia and optic nerve crush. *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 246(9), 1255-1263.
- [35] Kermer, P., Klöcker, N., Labes, M., Thomsen, S., Srinivasan, A., & Bähr, M. (1999). Activation of caspase-3 in axotomized rat retinal ganglion cells in vivo. *FEBS letters*, 453(3), 361-364.
- [36] Kermer, P., Klöcker, N., Labes, M., & Bähr, M. (2000). Insulin-like growth factor-I protects axotomized rat retinal ganglion cells from secondary death via PI3-K-dependent Akt phosphorylation and inhibition of caspase-3 in vivo. *Journal of Neuroscience*, 20(2), 722-728.
- [37] Kermer, P., Klöcker, N., & Bähr, M. (1999). Long-term effect of inhibition of ced 3-like caspases on the survival of axotomized retinal ganglion cells in vivo. *Experimental neurology*, 158(1), 202-205.
- [38] Khalin, I., Alyautdin, R., Kocherga, G., & Bakar, M. A. (2015). Targeted delivery of brain-derived neurotrophic factor for the treatment of blindness and deafness. *International journal of nanomedicine*, 10, 3245.
- [39] Kikuchi, M., Tenneti, L., & Lipton, S. A. (2000). Role of p38 mitogen-activated protein kinase in axotomy-induced apoptosis of rat retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience*, 20(13), 5037-5044.

- [40] Kilic, E., Dietz, G. P., Hermann, D. M., & Bähr, M. (2002). Intravenous TAT–Bcl-Xl is protective after middle cerebral artery occlusion in mice. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 52(5), 617-622.
- [41] Kilic, E., Hermann, D. M., Isenmann, S., & Bähr, M. (2002). Effects of pinealectomy and melatonin on the retrograde degeneration of retinal ganglion cells in a novel model of intraorbital optic nerve transection in mice. *Journal of pineal research*, 32(2), 106-111.
- [42] Kilic, Ü., Kilic, E., Järve, A., Guo, Z., Spudich, A., Bieber, K., ... & Hermann, D. M. (2006). Human vascular endothelial growth factor protects axotomized retinal ganglion cells in vivo by activating ERK-1/2 and Akt pathways. *Journal of Neuroscience*, 26(48), 12439-12446.
- [43] Kilic, U., Kilic, E., Matter, C. M., Bassetti, C. L., & Hermann, D. M. (2008). TLR-4 deficiency protects against focal cerebral ischemia and axotomy-induced neurodegeneration. *Neurobiology of disease*, 31(1), 33-40.
- [44] Kilic, U., Kilic, E., Soliz, J., Bassetti, C. I., Gassmann, M., & Hermann, D. M. (2005). Erythropoietin protects from axotomy-induced degeneration of retinal ganglion cells by activating ERK-1/-2. *The FASEB journal*, 19(2), 249-251.
- [45] Kilic, E., Reitmeir, R., Kilic, Ü., Caglayan, A. B., Beker, M. C., Kelestemur, T., ... & Hermann, D. M. (2014). HMG-CoA reductase inhibition promotes neurological recovery, peri-lesional tissue remodeling, and contralesional pyramidal tract plasticity after focal cerebral ischemia. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 422.
- [46] Kilic, E., Kilic, U., Wang, Y., Bassetti, C. L., Marti, H. H., and Hermann, D. M. (2006). The phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway mediates VEGF's neuroprotective activity and induces blood brain barrier permeability after focal cerebral ischemia. *FASEB J.* 20, 1185–1187. doi:10.1096/fj.05-4829fje

[47] Kim, I. J., Drahushuk, K. M., Kim, W. Y., Gonsiorek, E. A., Lein, P., Andres, D. A., & Higgins, D. (2004). Extracellular signal-regulated kinases regulate dendritic growth in rat sympathetic neurons. *Journal of Neuroscience*, 24(13), 3304-3312.

[48] Klo ¨cker N, Kermer P, Weisshaupt JH, Labes M, Ankerhold R, Ba ¨hr M (2000) Brain-derived neurotrophic factor-mediated neuroprotection of adult rat retinal ganglion cells *in vivo* does not exclusively depend on phosphatidylinositol-3 - kinase/protein kinase B signaling. *J Neurosci* 20:6962– 6967.

[49] Kolb, B., Morshead, C., Gonzalez, C., Kim, M., Gregg, C., Shingo, T., & Weiss, S. (2007). Growth factor-stimulated generation of new cortical tissue and functional recovery after stroke damage to the motor cortex of rats. *Journal of cerebral blood flow & metabolism*, 27(5), 983-997.

[50] Kretz, A., Schmeer, C., Tausch, S. & Isenmann, S. (2006) Simvastatin promotes heat shock protein 27 expression and Akt activation in the rat retina and protects axotomized retinal ganglion cells *in vivo*. *Neurobiol. Dis.*, 21, 421–436.

[51] Kugler, W., & Lakomek, M. (2000). Glucose-6-phosphate isomerase deficiency. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 13(1), 89-101.

[52] K ¨ultz, D. (2005). Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response. *Annu. Rev. Physiol.*, 67, 225-257.

[53] Lerou, P. H., & Daley, G. Q. (2005). Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood reviews*, 19(6), 321-331.

- [54] Lindahl, M., Saarma, M., & Lindholm, P. (2017). Unconventional neurotrophic factors CDNF and MANF: structure, physiological functions and therapeutic potential. *Neurobiology of disease*, *97*, 90-102.
- [55] Lindholm, P., & Saarma, M. (2010). Novel CDNF/MANF family of neurotrophic factors. *Developmental neurobiology*, *70*(5), 360-371.
- [56] Luo, J. M., Cen, L. P., Zhang, X. M., Chiang, S. W. Y., Huang, Y., Lin, D., ... & Cui, Q. (2007). PI3K/akt, JAK/STAT and MEK/ERK pathway inhibition protects retinal ganglion cells via different mechanisms after optic nerve injury. *European Journal of Neuroscience*, *26*(4), 828-842.
- [57] MacLaren, R. E., Pearson, R. A., MacNeil, A., Douglas, R. H., Salt, T. E., Akimoto, M., ... & Ali, R. R. (2006). Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature*, *444*(7116), 203.
- [58] Mansour-Robaey, S., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., & Aguayo, A. J. (1994). Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(5), 1632-1636.
- [59] Martinou, J. C., Dubois-Dauphin, M., Staple, J. K., Rodriguez, I., Frankowski, H., Missotten, M., Albertini, P., Talabot, D., Catsicas, S., Pietra, C. and Huarte, J. (1994) Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*, **13**, 1017-1030.
- [60] Mattson, M. P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature reviews Molecular cell biology*, *1*(2), 120.
- [61] McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (1995). The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*, *21*(2), 195-218.

- [62] Morgan, J. E., Uchida, H., & Caprioli, J. (2000). Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma. *British Journal of Ophthalmology*, 84(3), 303-310.
- [63] Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Cánovas-Martínez, I., Salinas-Navarro, M., ... & Agudo, M. (2009). Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(8), 3860-3868.
- [64] Nadal-Nicolás, F. M., Sobrado-Calvo, P., Jiménez-López, M., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2015). Long-term effect of optic nerve axotomy on the retinal ganglion cell layer. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(10), 6095-6112.
- [65] Namikawa, K., Honma, M., Abe, K., Takeda, M., Mansur, K., Obata, T., ... & Kiyama, H. (2000). Akt/protein kinase B prevents injury-induced motoneuron death and accelerates axonal regeneration. *Journal of Neuroscience*, 20(8), 2875-2886.
- [66] Nakazawa, T., Tamai, M., & Mori, N. (2002). Brain-derived neurotrophic factor prevents axotomized retinal ganglion cell death through MAPK and PI3K signaling pathways. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(10), 3319-3326.
- [67] Noshita, N., Sugawara, T., Hayashi, T., Lewén, A., Omar, G., & Chan, P. H. (2002). Copper/zinc superoxide dismutase attenuates neuronal cell death by preventing extracellular signal-regulated kinase activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Journal of Neuroscience*, 22(18), 7923-7930.
- [68] Park, K., Luo, J. M., Hisheh, S., Harvey, A. R., & Cui, Q. (2004). Cellular mechanisms associated with spontaneous and ciliary neurotrophic factor-cAMP-induced survival and axonal regeneration of adult retinal ganglion cells. *Journal of Neuroscience*, 24(48), 10806-10815.

- [69] Quigley, H. A., Nickells, R. W., Kerrigan, L. A., Pease, M. E., Thibault, D. J., & Zack, D. J. (1995). Retinal ganglion cell death in experimental glaucoma and after axotomy occurs by apoptosis. *Investigative ophthalmology & visual science*, 36(5), 774-786.
- [70] Ransohoff, R. M., & Engelhardt, B. (2012). The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, 12(9), 623.
- [71] Reitmeir, R., Kilic, E., Kilic, Ü., Bacigaluppi, M., ElAli, A., Salani, G., ... & Hermann, D. M. (2010). Post-acute delivery of erythropoietin induces stroke recovery by promoting perilesional tissue remodelling and contralesional pyramidal tract plasticity. *Brain*, 134(1), 84-99.
- [72] Rhee, S. G., Chae, H. Z., & Kim, K. (2005). Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(12), 1543-1552.
- [73] Sacca SC, Roszkowska AM, Izzotti A (2013) Environmental light and endogenous antioxidants as the main determinants of non-cancer ocular diseases. *Mutat Res* 752:153–171
- [74] Seal, R. P., & Amara, S. G. (1999). Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39(1), 431-456.
- [75] Shoichet, M. S., Tate, C. C., Baumann, M. D., & LaPlaca, M. C. (2008). Strategies for regeneration and repair in the injured central nervous system.
- [76] Skaper, S.D., Facci, L. & Strijbos, P.J. (2001) Neuronal protein kinase signalling cascades and excitotoxic cell death. *Ann. NY Acad. Sci.*, **939**, 11–22.

- [77] Stanciu, M., Wang, Y., Kentor, R., Burke, N., Watkins, S., Kress, G., Reynolds, I., Klann, E., Angiolieri, M.R., Johnson, J.W. & DeFranco, D.B. (2000) Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J. Biol. Chem.*, **275**, 12200–12206.
- [78] Stein, M. P., Dong, J., & Wandering-Ness, A. (2003). Rab proteins and endocytic trafficking: potential targets for therapeutic intervention. *Advanced drug delivery reviews*, *55*(11), 1421-1437.
- [79] Storkebaum E, Carmeliet P (2004) VEGF: a critical player in neurodegeneration. *J Clin Invest* *113*:14 –18.
- [80] Subramaniam, S. & Unsicker, K. (2006) Extracellular signal-regulated kinase as an inducer of non-apoptotic neuronal death. *Neuroscience*, **138**, 1055–1065.
- [81] Sun, Z. P., Gong, L., Huang, S. H., Geng, Z., Cheng, L., & Chen, Z. Y. (2011). Intracellular trafficking and secretion of cerebral dopamine neurotrophic factor in neurosecretory cells. *Journal of neurochemistry*, *117*(1), 121-132.
- [82] Thomas, C. N., Berry, M., Logan, A., Blanch, R. J., & Ahmed, Z. (2017). Caspases in retinal ganglion cell death and axon regeneration. *Cell death discovery*, *3*, 17032.
- [83] Tulsawani, R., Kelly, L. S., Fatma, N., Chhunchha, B., Kubo, E., Kumar, A., & Singh, D. P. (2010). Neuroprotective effect of peroxiredoxin 6 against hypoxia-induced retinal ganglion cell damage. *BMC neuroscience*, *11*(1), 125.
- [84] Vicki Waetzig, Yi Zhao, Thomas Herdegen, The bright side of JNKs—Multitalented mediators in neuronal sprouting, brain development and nerve fiber regeneration, *Progress in Neurobiology*, Volume 80, Issue 2, 2006, Pages 84 97, ISSN 0301-0082, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2006.08.002>.

- [85] Yoles E, Schwartz M. Elevation of Intraocular Glutamate Levels in Rats With Partial Lesion of the Optic Nerve. *Arch Ophthalmol*. 1998;116(7):906–910. doi:10.1001/archopht.116.7.906
- [86] Yoshida, K., Behrens, A., Le-Niculescu, H., Wagner, E. F., Harada, T., Imaki, J., ... & Karin, M. (2002). Amino-terminal phosphorylation of c-Jun regulates apoptosis in the retinal ganglion cells by optic nerve transection. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(5), 1631-1635.
- [87] Zhang, C., Lam, T.T. & Tso, M.O. (2005) Heterogeneous populations of microglia/macrophages in the retina and their activation after retinal ischemia and reperfusion injury. *Exp. Eye Res.*, **81**, 700–709.
- [88] Zhou, Y., Pernet, V., Hauswirth, W.W. & Di Polo, A. (2005) Activation of the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway by AAV gene transfer protects retinal ganglion cells in glaucoma. *Mol. Ther.*, **12**, 402–412.
- [89] Xu, H. E., Lambert, M. H., Montana, V. G., Parks, D. J., Blanchard, S. G., Brown, P. J., ... & Kliewer, S. A. (1999). Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator–activated receptors. *Molecular cell*, 3(3), 397-403.
- [90] Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. *Biological Reviews*, 41(3), 445-501.
- [91] Lee, J. H., & Kwon, E. J. (2013). Calumenin has a role in the alleviation of ER stress in neonatal rat cardiomyocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 439(3), 327-332.
- [92] Wang, W., van Niekerk, E., Willis, D. E., & Twiss, J. L. (2007). RNA transport and localized protein synthesis in neurological disorders and neural repair. *Developmental neurobiology*, 67(9), 1166-1182.

[93] Houštěk, J., Pícková, A., Vojtíšková, A., Mráček, T., Pecina, P., & Ješina, P. (2006). Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(9-10), 1400-1405.

[94] Jiménez, C. R., Stam, F. J., Li, K. W., Gouwenberg, Y., Hornshaw, M. P., De Winter, F., ... & Smit, A. B. (2005). Proteomics of the injured rat sciatic nerve reveals protein expression dynamics during regeneration. *Molecular & Cellular Proteomics*, 4(2), 120-132.

[95] Nickells, R. W. (1999). Apoptosis of retinal ganglion cells in glaucoma: an update of the molecular pathways involved in cell death. *Survey of ophthalmology*, 43, S151-S161.

[96] Borroto-Escuela, D. O., Tarakanov, A. O., Guidolin, D., Ciruela, F., Agnati, L. F., & Fuxe, K. (2011). Moonlighting characteristics of G protein-coupled receptors: Focus on receptor heteromers and relevance for neurodegeneration. *IUBMB life*, 63(7), 463-472.

[97] Sapiéha, P., Sirinyan, M., Hamel, D., Zaniolo, K., Joyal, J. S., Cho, J. H., ... & Leduc, M. (2008). The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nature medicine*, 14(10), 1067.

10. ETİK KURUL ONAYI



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

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.35289
Konu : Etik Kurulu Kararı

31/08/2018

Sayın Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “CDNF ve MANF Büyüme Faktörlerinin Optik Sinir Hasarı Sonrası Retinal Gangliyon Hücre Hasarına Olan Etki ve Mekanizmaları” isimli başvurunuz incelenmiş olup etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

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

Ek:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 31.08.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden E021A9D8X9 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

Kavacık Mah. Ekinçiler Cad. No.19 Kavacık Kavşağı - Beykoz
34810 İstanbul

Tel: 444 85 44

İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : bilgi@medipol.edu.tr



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
31/08/2018	52		Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ

“CDNF ve MANF Büyüme Faktörlerinin Optik Sinir Hasarı Sonrası Retinal Gangliyon Hücre Hasarına Olan Etki ve Mekanizmaları” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi:3 yıl

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

11. ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

1. **Adı Soyadı** : REYDA KARAÇAY
2. **Doğum Tarihi** : 02.08.1993
3. **Unvanı** : Biyomühendis
4. **Öğrenim Durumu** : Yüksek Lisans
5. **Çalıştığı Kurum** : İstanbul Medipol Üniversitesi

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Moleküler Biyoloji,Genetik ve Biyomühendislik	SABANCI ÜNİVERSİTESİ	2016
Y. Lisans	TIBBİ FİZYOLOJİ	İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ	-
Doktora			

5. **Akademik Unvanlar**
Yardımcı Doçentlik Tarihi :
Doçentlik Tarihi :
Profesörlük Tarihi :
6. **Yönetilen Yüksek Lisans ve Doktora Tezleri**
6.1. Yüksek Lisans Tezleri
6.2. Doktora Tezleri
7. **Yayınlar**
7.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI,SSCI,Arts and Humanities)
7.2. Uluslararası diğer hakemli dergilerde yayınlanan makaleler
7.3. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. Poster- Altunay S, Dalay A, Dilden A, Sertel E, Balçıklı Z, Tancan E, **Karaçay R**, Kılıç E, “Diyet Kısıtlaması Sonrası Önkoşullandırmanın Fare Beyin Felci Modeli Üzerindeki Nöroprotektif Etkileri” 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, PS074/94, Denizli, 2017.
2. Sözlü Poster- Beker MC, Sertel E, **Karaçay R**, Altunay S, Dilden A, Çağlayan AB, Keleştemur T, Çağlayan B, Yalçın E, Kılıç E, “Sirkadyen Ritim Proteini BMAL 1’in Nöronal Hasar Üzerine Etkisi” 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, PS043/79, Denizli, 2017.
3. Sözlü Poster- Çağlayan AB, Yalçın E, Altunay S, Sertel E, Dilden A, **Karaçay R**, Beker MC, Keleştemur T, Çağlayan B, Kutlu S, Kılıç Ü, Kılıç E, “Tekrarlayan Transkraniyal Manyetik Stimulasyonun Beyin Felci Sonrası Hasara Etkisi” 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, PS045/80, Denizli, 2017.
4. Poster- Sertel E., Beker MC, Çağlayan AB, Yalçın E., Çağlayan B., Keleştemur T., Dilden A., **Karaçay R.**, Kılıç E. “Yaşlı ve Genç Farelerde Serebral İskemi Sonrası Protein Ekspresyon Profili” 43. Ulusal Fizyoloji Kongresi, Denizli, 2017.

7.7. Diğer yayımlar

8. Projeler

9. İdari Görevler

10. Bilimsel ve Mesleki Kuruluşlara Üyelikler

- Türk Fizyolojik Bilimler Derneği (TFBD)

11. Ödüller

12. Son iki yılda verdiğiniz lisans ve lisansüstü düzeydeki dersler için aşağıdaki tabloyu doldurunuz.

Akademik Yıl	Dönem	Dersin Adı	Haftalık Saati		Öğrenci Sayısı
			Teorik	Uygulama	
	Güz				
	İlkbahar				
	Güz				
	İlkbahar				

Not: Açılmışsa, yaz döneminde verilen dersler de tabloya ilave edilecektir.