



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKSOTOMİ HASARININ ARKA KÖK GANGLİYON
NÖRONLARININ MEMBRAN GERGİNLİĞİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

SADIK BAY

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İSTANBUL - 2017



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKSOTOMİ HASARININ ARKA KÖK GANGLİYON
NÖRONLARININ MEMBRAN GERGİNLİĞİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

SADIK BAY

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İSTANBUL - 2017

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Sinirbilim
Tez Sahibi : Sadık BAY
Tez Başlığı : Aksotomi Hasarının Arka Kök Gangliyon Nöronlarının
Membran Gerginliğine Etkisinin Araştırılması
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 11.01.2017

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

Danışman

Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza




Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Bayram YILMAZ

Yeditepe Üniversitesi

Prof.Dr. Ertuğrul KILIC

İstanbul Medipol Üniversitesi



Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun .19../.01../.2017. tarih ve .2017../.03... - .03... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Kılavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof.Dr. Nesrin EMEKLİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



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 haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

SADIK BAY



TEŞEKKÜR

Bütün teşekkürlerin sahibine, O'nun en sevdiğine ve O'nun en sevdiğine sonsuz teşekkür, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamda ve hayatımda bana her konuda yardımcı olan, her zaman pozitif enerjisini bize yansıtan, çok iyi bir bilim adamı ve yönetici olan danışman hocam Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Çalışmalarında bana bilgi ve deneyimlerini aktarmakta sabırlı ve kararlı davranan Betül Polat'a,

Tez çalışmamda bana yardımcı olan takım arkadaşlarım Gülsena Baydaş, Tuba Akgül Çağlar, Neşe Altuncu, Esra Nur Ekmekçioğlu ve Fazlı Kemal Bayat'a,

Desteklerinden dolayı aynı aileden olmasak da kardeşlerim olarak gördüğüm Ozan Topcu ve Esad Eseoğlu'na,

Bütün Remer çalışanlarına ve İstanbul Medipol Üniversitesi'ne,

Ekmeğini yediğim, suyunu içtiğim ve atalarımın yadigarı ülkeme,

Teşekkürü en çok hak eden, hayatım boyunca yanımda olan, sevgileri ile beni kuşatan ve kendilerinden razı olduğum babam Bahtiyar Bay'a, annem Neriman Bay'a ve kardeşim Taha Emre Bay'a,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
BEYAN	ii
TEŞEKKÜR	iii
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ	viii
1.ÖZET	1
2.ABSTRACT	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER	5
4.1.Nöron	5
4.2.Arka kök gangliyonu (AKG)	6
4.3.AKG gelişimi	8
4.4.Periferik sinir yaralanmaları.....	9
4.5.Periferik sinir hasarına yanıt mekanizmaları	9
4.6.Hücre mekaniği	12
4.7.Kuvvet uygulama ve algılama teknikleri	17
5. METOD VE MATERYAL	21
5.1.Deney hayvanları	21
5.2.Kullanılan malzemeler	21
5.3.Hücre izolasyonu öncesi hazırlıklar ve hücre eldesi	22
5.3.1. Kültür kabının hazırlanması.....	22
5.3.2.Kültürde kullanılacak besiyerlerinin hazırlanması.....	22
5.3.2.1.Diseksiyon besiyeri	22
5.3.2.Kültür besiyeri.....	22
5.3.3.Diseksiyon.....	23

5.3.4.Kültür protokolü.....	23
5.3.4.1.Kollajenaz inkübasyonu	23
5.3.4.2.Enzimin uzaklaştırılması	23
5.3.4.3.Tripsin inkübasyonu.....	23
5.3.4.4.Tritürasyon ve DNase inkübasyonu	23
5.3.4.5.Enzimin uzaklaştırılması ve aktivitesinin durdurulması	24
5.3.4.6.Hücrelerin ayrıştırılması	24
5.3.4.7.Percoll'ün uzaklaştırılması	24
5.3.4.8.Hücre ekimi	24
5.4.Kuvvet ölçümü	24
5.4.1.Kuvvet ölçümü öncesindeki hazırlıklar	24
5.4.1.1.Boncuk (bead) hazırlanması.....	24
5.4.1.2.Kalsiyumsuz besiyeri hazırlanması.....	25
5.4.2.PALM CombiSystem(Microdissectin and Microtweezer System	25
5.4.2.1.PALM RoboSoftware kuvvet ölçümü modülü	26
5.4.2.2.Tutucunun (Trap) kalibrasyonu ve kuvvet ölçümü	27
5.5.Parlaklık (İntensity) ölçümü.....	33
5.6.Analiz	33
6.BULGULAR	36
6.1.Boncuk kalibrasyonu ve hücreye yapıştırılması	36
6.2.Lateral ölçüm (2 boncukla)	38
6.3.Kortikal ölçüm (Tek boncukla).....	40
6.4.Aynı hücrede lateral kuvvet ve kortikal kuvvet ölçümü	42
6.4.1.Kuvvet ölçüm grubu.....	42
6.4.2.BDM grubu	56
6.4.3.Blebbistatin ölçüm grubu	57

6.4.4.Kalsiyumsuz ölçüm grubu.....	57
6.4.5.Kaspaz-3/7 grubu	57
6.4.6.Kontrol (sham) grubu.....	71
7.TARTIŞMA	74
8.SONUÇ.....	76
9.KAYNAKLAR	77
10.ETİK KURUL ONAYI.....	87
11.ÖZGEÇMİŞ.....	89



TABLO LİSTESİ

Tablo 4.7.AFM ve OT karşılaştırılması	20
Tablo 6.1.1.x ekseninde tutucu esnemezliği hesaplanması.....	36
Tablo 6.1.2.y ekseninde tutucu esnemezliği hesaplanması.....	37
Tablo 6.2.Kuvvet ölçümünde ikinci saniyeden sonraki değişim	39
Tablo 6.4.1.1.Hücrelerde aksotomi öncesi ve sonrası kortikal kuvvet, lateral kuvvet ve alan ölçümleri	44
Tablo 6.4.1.2.Hücrelerde lateral kuvvet değişimi, kortikal kuvvet değişimi, alan değişimi, mutlak lateral kuvvet değişimi, mutlak kortikal kuvvet değişimi ve mutlak alan değişimi verileri.....	46
Tablo 6.4.1.3.Ölçülen kuvvetlerde ve alanların ortalamaları ve t-test sonucu anlamlılık değerleri	48
Tablo 6.4.1.4.Ölçülen kuvvetler ve alanların korelasyon katsayıları ve korelasyon testi anlamlılık değerleri.....	49
Tablo 6.4.1.5.Ölçülen ve hesaplanan değerlerin korelasyon testi sonucu anlamlılık değerleri.....	49
Tablo 6.4.2.1.BDM eklenen hücrelerde aksotomi öncesi ve sonrası lateral kuvvet, kortikal kuvvet ve alan ölçüm sonuçları	56
Tablo 6.4.2.2.BDM eklenen hücrelerden ölçülen kuvvetler ve alanların ortalamaları ve t-test sonucu anlamlılık değerleri	57
Tablo 6.4.5.1.Aksotomi öncesi-sonrası ölçülen kortikal kuvvet, lateral kuvvet, alan ve Kaspaz-3/7 parlaklığı ve buna bağlı hesaplamalar	59
Tablo 6.4.5.2. Aksotomi öncesi-sonrası ölçülen kortikal kuvvet, lateral kuvvet, Kaspaz-3/7 parlaklığı ortalamaları ve t-test ve korelasyon anlamlılık değerleri	62
Tablo 6.4.5.3. Aksotomi öncesi-sonrası ölçülen ve hesaplanan tüm parametrelerin korelasyon analiz sonuçları	62
Tablo 6.4.6. Kontrol (sham) grubunda aksotomi öncesi-sonrası parlaklık değerleri ve parlaklık değişimi.....	72

ŞEKİL VE RESİM LİSTESİ

Şekil 4.1.Nöron anatomisi.....	5
Şekil 4.2.1. Sıçan L5 AKG anatomisi	7
Şekil 4.2.2.Arka kök gangliyonu iletim yolları.....	8
Şekil 4.3.AKG gelişimi.....	8
Şekil 4.5.1.Mekanik ağrı için arka boynuz devreleri	10
Şekil 4.5.2.Akson hasarında retrograd sinyal yolları	11
Şekil 4.5.3.Akson tamir bölgesinde rejenerasyon ilişkili genler.....	11
Şekil 4.6.1.Mekanik iletim	13
Şekil 4.6.2.Mekanik uyarı-algı-sinyal-gen ifadesi-fonksiyon.....	13
Şekil 4.6.3.İntegrin ve kaderin sinyal yolları	14
Şekil 4.6.4.Aktin ağlarında kuvvete cevap.....	15
Şekil 4.6.5.Mitozda meydana gelen kuvvetlerin dağılımı.....	16
Şekil 4.6.6.Membran gerginliğinin algılanması	16
Şekil 4.7.1.Kuvvet uygulama teknikleri.....	17
Şekil 4.7.2.Kuvvet algılayıcı teknikler.....	18
Resim 5.4.2.1.PALM CombiSystem.....	26
Şekil 5.4.2.1.1.Kuvvet ölçüm butonu.....	27
Şekil 5.4.2.1.2.Kuvvet ölçüm penceresi.....	27
Şekil 5.4.2.2.1.Kalibrasyon protokolleri	28
Şekil 5.4.2.2.2.Deney penceresi	29
Şekil 5.4.2.2.3.Alt deneyler kısmı.....	30
Şekil 5.4.2.2.4.Sonuç ekranı.....	30
Şekil 5.4.2.2.5.Aksotomi öncesi deney modeli.....	31
Şekil 5.4.2.2.6.Aksotomi sonrası deney modeli	32
Şekil 5.4.2.2.7.Kortikal ölçüm deney düzeneği	32

Resim 5.5.1.Zeiss Cell Observer SD Spinning Disk Time-Lapse Microscope	33
Şekil 6.1.1.Tutucu tarafından kalibrasyon için tutulan boncuk	36
Şekil 6.1.2.Boncuğun hücreye yapıştırılması.....	37
Resim 6.2.1.Aksotomi öncesi lateral kuvvet için boncuk yerleşimi	38
Resim 6.2.2.Aksotomi sonrası lateral kuvvet için boncuk yerleşimi.....	38
Şekil 6.2.1.Aksotomi öncesi ve sonrası yapılan lateral ölçümlerde ilk saniye verilerinin karşılaştırılması.	39
Şekil 6.2.2.Aksotomi öncesi ve sonrasında ikinci saniyeden önceki ve sonraki verilerin karşılaştırılması.....	40
Resim 6.3.Kortikal kuvvet ölçümü için boncuk yerleşimi.....	40
Şekil 6.3.1.Kortikal kuvvet ölçüm dağılımı (15 dakika).....	41
Şekil 6.3.2.Kortikal kuvvet ölçüm dağılımı(aksotomi öncesi 120 saniye aksotomi sonrası 300 saniye).....	41
Şekil 6.3.3.Kortikal kuvvet ölçüm dağılımı(aksotomi öncesi 300 saniye aksotomi sonrası 300 saniye).....	42
Resim 6.4.1.1.Aksotomi öncesi aynı hücre üzerinde üç boncuk yerleşimi.....	42
Resim 6.4.1.2.Aksotomi öncesi aynı hücre üzerinde üç boncuk yerleşimi.....	43
Şekil 6.4.1.1.Aksotomi öncesi kortikal kuvvet dağılımı(10 dakika).....	43
Şekil 6.4.1.2.Aksotomi sonrası kortikal kuvvet dağılımı(10 dakika).....	44
Şekil 6.4.1.3.Ölçülen kuvvetlerin korelasyonu	55
Resim 6.4.5.1.Aksotomi öncesi Kaspaz-3/7 boyası eklenmiş AKG hücresi	58
Resim 6.4.5.2.Aksotomi öncesi AKG hücresinde Kaspaz-3/7 dağılımı	58
Şekil 6.5.Çalışmanın özeti	73

1.ÖZET

AKSOTOMİ HASARININ ARKA KÖK GANGLİYON NÖRONLARININ MEMBRAN GERGİNLİĞİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Periferik sinir hasarından sonra, arka kök gangliyonundaki nöronlar ve omurilik ve beyin sapındaki motor nöronlar büyük morfolojik ve moleküler değişimlere uğrarlar. Hasar sonucu aksonal dejenerasyon ve ağrı oluşmaktadır. Periferik sinir hasarına tedavi geliştirmek için nöronlardaki morfolojik ve moleküler değişimlerin tespit edilmesi gerekmektedir. Aksonal hasar *in vitro* ortamda yapılabilmektedir (aksotomi). Aksotomiye bağlı olarak hücre boyutunda küçülme meydana gelmektedir. Aksonal hasarda kalpainler ve kalsiyum önemli işlevler yerine getirmektedir. Hasarda hücre iskeleti ile ilişkili proteinler de önemlidir. Kaspaz-3 bağımlı aktin ve tübülünin kesimi, yaralanmalardaki aksonal hasarlarda önemli bir göstergedir. Bu çalışma ile, literatürde tam olarak nasıl ölçüleceği belirlenmemiş, arka kök gangliyonu nöronlarında hücre zarı gerginliklerin (lateral gerginlik ve kortikal gerginlik) ayrı ayrı ölçülmesi, değerlendirilmesi ve hasarın altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması amaçlanmaktadır. Çalışmamızda fareden elde edilen arka kök gangliyonu nöronlarında lateral ve kortikal kuvvet ölçümü optik cımbızlar (optical tweezers) sistemi ile yapılmıştır. Aksotomi öncesi-sonrası kuvvet ölçümüne ek olarak, moleküler mekanizmayı bulmak için, canlı Kaspaz-3/7 boyası parlaklık ölçümleri hızlandırılmış (time-lapse) floresan mikroskobu ile yapılmıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre, aksotomiden sonra hücre boyutunda anlamlı küçülme meydana gelmiştir. Aksotomi öncesi lateral kuvvet, aksotomi öncesi kortikal kuvvet ve aksotomi sonrası kortikal kuvvet birbirleri ile anlamlı olarak ilişkilidir. Ayrıca aksotomi ile gerçekleşen mutlak alan değişikliği ile aksotomi sonrası lateral kuvvet, aksotomi sonrası kortikal kuvvet ve Kaspaz-3/7 parlaklık değişikliği anlamlı koreledir. Bu çalışmanın sonuçları, periferik sinir hasarının altında yatan mekanik değişikliklerin aydınlatılmasına yönelik kaynaklara katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Arka kök gangliyon nöronu, membran esnekliği, aksotomi, kuvvet ölçümü, Kaspaz-3/7.

2.ABSTRACT

THE EFFECTS OF AXOTOMY INJURY ON MEMBRANE TENSION OF DORSAL ROOT GANGLION NEURONS

After peripheral nerve injury, neurons in dorsal root ganglia and motor neurons of spinal cord and brain stem undergo fundamental morphological and molecular changes. Axonal degeneration and pain are arised from results of nerve injury. For improving treatment of peripheral nerve injury, these morphological and molecular changes must be detected. Axonal degeneration can be done *in vitro* (axotomy). Volume of cell bodies decreases with axotomy. Calcium influx into the cell body and calcium dependent molecules like calpeins are important in axonal injury. Cytoskeletal-related proteins are important in nerve injury. Caspase-3 dependent cleavage of actin and tubulin is a marker for axonal degeneration. There are less informations about mechanical changes of neurons in nerve injury. With this study, measurements and analysis of cellular tensions like lateral and cortical tensions in dorsal root ganglion neurons seperately and molecular mechanisms of peripheral nerve injury have been aimed. Cortical and lateral tensions were measured in dorsal root ganglion neurons from Balb-c mice using optical tweezer system. For understanding molecular mechanisms of nerve injury, addition to lateral and cortical measurements before and after axotomy, intensities of Caspase-3/7 were measured using time-lapse flourescence microscope. According to results of our study, Volumes of cells are significantly changed. Lateral tension before axotomy, cortical tension before axotomy and cortical tension after axotomy were correlated each other significantly. Furthermore, absolute area changes which are derived from axotomy were correlated with lateral forces after axotomy, cortical forces after axotomy and changes in Caspase-3/7 intensity significantly. Results of our study can contribute to further studies on the mechanical changes underlying peripheral nerve injury.

Key Words: Dorsal root ganglion neuron, membrane elasticity, axotomy, force measurement, Caspase-3/7.

3.GİRİŞ ve AMAÇ

Sinir sisteminin temel fonksiyonel birimine nöron adı verilmektedir. Nöronlar, elektriksel impulslar oluşturabilen ve bunları iletebilme kapasitesine sahip olan hücrelerdir. Nöronlar yapılarına ve işlevlerine göre sınıflandırılmaktadır. Nöroglialar ise nöronları destekleyen ve koruyan sinir doku elemanlarıdır (1).

Gangliyon, merkezi sinir sistemi dışında nöron gövde topluluklarını ifade etmektedir (2). Arka kök gangliyonu(AKG) duyu nöronlarının hücre gövde topluluklarıdır. Arka kök gangliyon nöronları psödonipolar yapıdadır ve periferik ve merkezi dallardan oluşmaktadır. Periferik olan periferik sinir sistemine; merkezi olan merkezi sinir sistemine ileti taşıyır (3).

Periferik sinir sisteminde yaralanmalar nöropatik ağrı ve aksonal dejenerasyon olarak dışı vurmaktadır (4-6). Sinir hasarından sonra; hedef dokular tekrar uyarılabilir hale gelebilir, yakındaki aksonların dalları ile tekrar uyarım gerçekleşebilir ya da kayıp fonksiyon ile canlılık devam edebilir (7). Aksonal hasar *in vitro* şartlarda lazer yardımı ile de yapılabilmektedir. Sinir sistemi hücrelerinin aksotomiye verdiği farklı histolojik ve biyokimyasal cevaplar vardır (8). Aksotomiden sonra AKG nöronları hacimsel olarak küçülmektedir (9). Kalsiyumun hücre içine girmesi ve kalpeinler gibi kalsiyuma bağımlı moleküller aksotomiye bağlı aksonal hasarda önemli göstergelerdendir (10). Özellikle aksotomi sonrası hücre iskeleti yıkımı görülmektedir. Kaspaz-3 yıkım sırasında etkin rol oynar (11).

Mekanobiyojoloji hücrelerin mekanik özellikleri ile biyolojik fonksiyonları arasında bağlantı kuran biyofiziğin alt dalıdır (12, 13). Mekanik etkenler hücre göçlerini (14), hücre büyümesini (15), kök hücre farklılaşması (16), hastalık durumlarının regülasyonu (17, 18) gibi konularda etkilidir. Plazma membranı gerginliği mekanik etkenlerden biridir. Plazma membran gerginliği vezikül trafığı (19), hücre hareketi (20), endositoz-ekzositoz (21) gibi olayları regüle eder. Membran gerginliğini ölçmek için birçok yöntem kullanılmaktadır (22). Bunlar arasında en yaygın olanları yüksek çözünürlükte ölçüm yapabilen atomik kuvvet mikroskobu (Atomic Force Microscopy) (23) ve optik cımbızlar (Optical Tweezer) (24) kullanılmaktadır. İnfrared lazer sistemi sayesinde hücreler taşınabilir ve

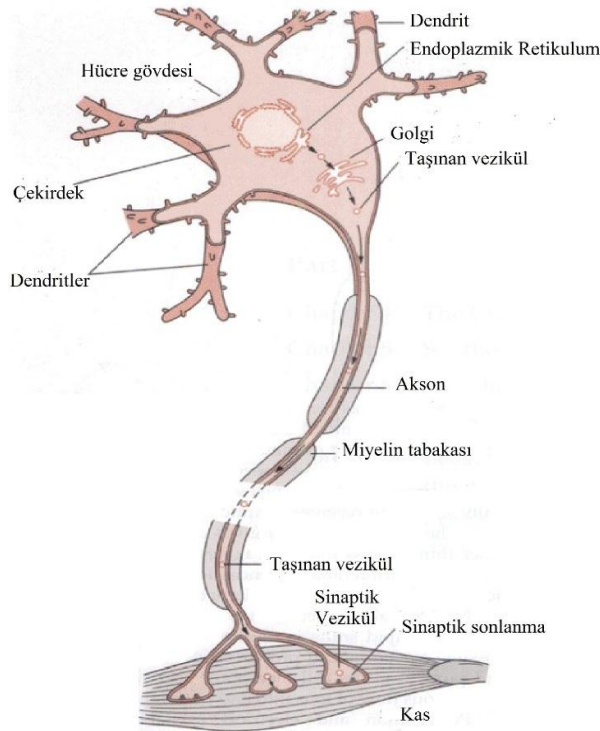
manipule edilebilir. Uygun boncuklar (bead) membrana yapıştırılır ve boncuklar vasıtası ile kuvvet ölçümü yapılabilir (25-27).

Nöronlarda hücre mekaniği çalışmaları literatürde oldukça azdır. Hücre mekaniğinde ölçülen kuvvetlerin tanımlamaları tam olarak yapılamamıştır. *İn vitro* sinir hasarının AKG nöronlarında mekanik olarak nasıl etki ettiği de bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı, aksotomi hasarı sonrası AKG nöronlarının membran mekaniğindeki farklılıkları analiz etmektir. Bu amaçla, sinir hasarı öncesi ve sonrası uygun açılarla ölçülen kuvvetlerin karşılaştırılmaları yapılarak, sinir hasarının altında yatan mekanik mekanizmaların aydınlatılması hedeflenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarının nöron mekaniği literatürüne katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

4.GENEL BİLGİLER

4.1.Nöron

Elektriksel impuls üretebilen ve impulsları iletebilen sinir sisteminin temel birimine nöron denir. Sinir sistemi, merkezi sinir sistemi ve periferal sinir sistemi olmak üzere ikiye ayrılır. Merkezi sinir sisteminde beyin ve omurilikten oluşmaktadır. Periferal sinir sistemi, otonomik sinir sistemi ve somatik sistemi olarak ikiye ayrılır. Otonomik sinir sistemi ise sempatik ve parasempatik sinir sistemlerinden oluşmaktadır. Nöronlar birbirlerine göre pozisyonlarına, yapılarına ve işlevlerine göre sınıflandırılırlar. Nöronlar birbirlerinin pozisyonlarına göre pre-sinaptik ve post-sinaptik; yapılarına göre unipolar (örneğin; vertebratların otonomik sinir sistemleri), psödounipolar (örneğin; arka kök gangliyonu), bipolar (örneğin; retinanın bipolar hücreleri) ve multipolar (örneğin; spinal kordun motor nöronları, hipokampusun piramidal hücreleri ve serebellumdaki purkinje hücreleri); işlevlerine göre ise duyuşal (sensory), motor nöron ve ara nöron (projeksiyon ve lokal ara nöronlar) (interneuron) olarak ayrılır. Nöronlar hücre gövdesi, akson ve dendrit gibi 3 ana bölümden oluşur (Şekil 4.1) (1).



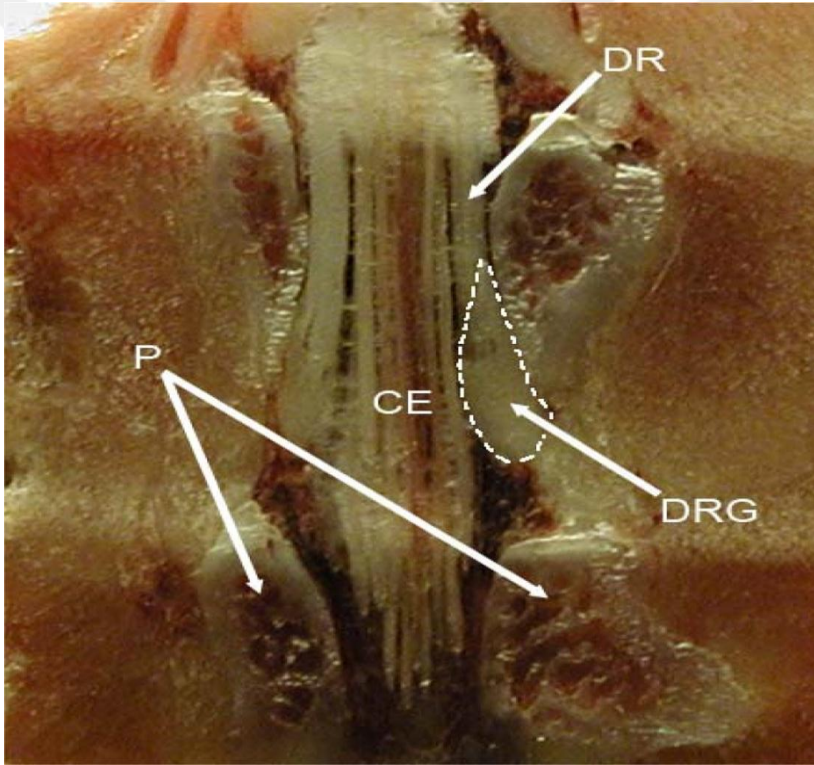
Şekil 4.1. Nöron anatomisi (1).

Nöron doktrini yılar içinde önemli yol katetmiştir. Golgi boyamasından başlayan tarihi süreci nöron mekaniği çalışmalarına kadar uzanmaktadır. Nöronlardan ilk bahsedenenler-sinirbilimin kurucuları Cajal (28) ve Sherrington'dur (29). Sinirbilimin doğmasında daha önce bulunan Golgi boyama tekniğinin bulunması önemlidir (30). Cajal'ın nöronlar arasında boşluk olduğu gözlemi yıllar sonra elektron mikroskopunun (31) verileri ile sinaptik boşluklar olarak gösterilmiştir (32, 33). Leeuwenhoek, Hooke, Schleiden, Schwann ve Waldeyer gibi bilim insanları nöronların anatomisinden, yapılarından, çoğalmalarından ve patolojilerinden bahsederek sinirbilime katkıda bulunmuştur (34, 35). Birçok beyin bölgesinde (36-39), özellikle insanlarda (40), kendiliğinden olan aktivite görülmüştür. İnsanda ilk kendiliğinden aktivite verileri EEG (electroencephalography) ile Hans Berger tarafından alınmıştır (41). İlk hayvan EEG'si ise Vladimir Vladimirovich Pravdich-Neminsky tarafından köpek üzerinde gösterilmiştir (42). Mürekkep balığı üzerindeki çalışmalarıyla Hodgkin ve Huxley aksiyon potansiyelinin başlama ve yayılmasındaki iyonik mekanizmayı açıklamışlardır (43). Nöronlar memeli beyinde nöral bağlantılar kurmaktadır (44). Örneğin memeli beyindeki piramidal nöronlar diğer hücrelerle bağlantı kurmakta ve onlardan veriler almaktadır (45). Organik voltaj indikatörleri (46) ve organik kalsiyum indikatörlerinin (47) sentezlenmesi ile nöral aktivitelerin optik kayıtları yapılabilmektedir. Genetik kodlu indikatörler de nöral ağlarda nöron aktivitesini ölçmekte faydalı olmuştur (48, 49). CCD (cooled charge-coupled device) kameralar (50) ve two-photon mikroskobu (51) gibi çok hızlı-kantitatif optik çekim yapabilen teknolojiler sayesinde derinlemesine (52) ve 3 boyutlu (53) canlı beyin görüntülemeleri yapılabilmektedir. Optik olarak nöral ağların değiştirilebildiği optogenetik tekniği son yıllarda oldukça yaygın hale gelmiştir (54). Ayrıca nöronların mekanik özelliklerinin, nöral gelişim ve tamir gibi olaylarla katkı sağladığı ortaya konulmuştur (55).

4.2.Arka Kök Gangliyonu(AKG)

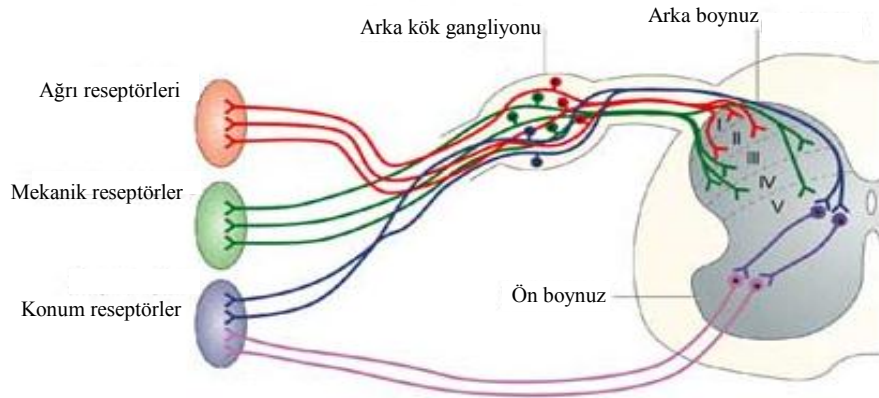
Merkezi sinir sistemi (MSS) dışında sinir hücresi gövde topluluklarına gangliyon denir (2). Vertebralarda 3 büyük gangliyon grubu vardır. Bunlar; arka kök, kranial sinir ve otonomik gangliyonlardır. Arka kök gangliyonu (AKG) duyu

nöronlarından oluşur. Arka kök gangliyon nöronları yalancı-tek kutuplu (pseudounipolar) yapıdadır. Periferik dalı periferik sinir sistemine; merkezi dal ise merkezi sinir sistemine iletileri taşımaktadır (3). AKG, arka kök ve spinal sinirler arasında bulunmaktadır (Şekil 4.2.1) (56). Sinir hasarında ya da inflamasyonda bu nöronlar nosiseptif(ağrı) sinyali artırarak nöronal uyarımının artırılması ve ektopik boşaltımların (ectopic discharges) oluşmasını artırmaktadır (57, 58). AKG, periferal sinir demetlerini koruyan ve iç ortamı düzenleyen perinöriyumdan (perineurium) farklı olarak onu çevreleyen koruyucu kapsüler membrandan yoksundur ve geçirgen bağ doku kapsülüne sahiptir (59). Bu geçirgenlik gangliyondaki yüksek yoğunluklu kan damarları ile açıklanabilir (60).



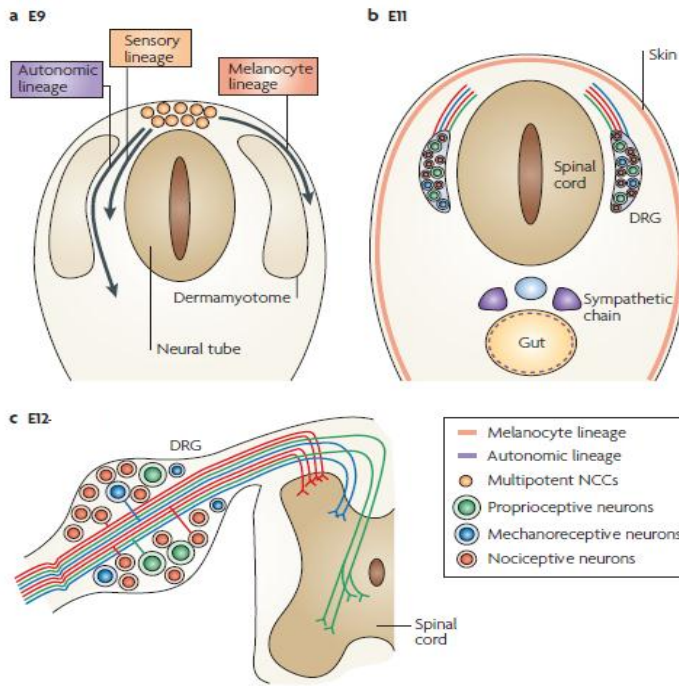
Şekil 4.2.1. Sıçan L5 AKG anatomisi (56). DRG: Arka kök gangliyonu, DR: Arka kök, CE: Caudia equina, P: Pediküller.

Arka kök gangliyonundan ağrı iletimi (nociceptors), mekanik iletim (mechanoreceptors) ve konum bilgisi (proprioceptors) geçmektedir (Şekil 4.2.2) (61). Ağrı ve ısıyı ileten nosiseptörler laminae I ve II' ye; dokunmayı ileten mekanoreseptörler laminae III, IV ve V'e; konum iletimi ise arka boynuza (dorsal horn) iletim yapmaktadır.



Şekil 4.2.2. Arka kök gangliyonu iletim yolları (61).

4.3.AKG Gelişimi



Şekil 4.3. AKG gelişimi (62). A. 9. Embriyonik gün. B. 11. Embriyonik gün. C. 12. Embriyonik gün-doğum

Nöral krest hücreler (neural crest cells) arka nöral tüpten (dorsal neural tube) katmanlara ayrılır ve nöral krest hücreler ventral yolak boyunca göç edip arka kök gangliyonu hücrelerini (AKG: duysal köken (sensory lineage)) ve sempatik ve enterik nöronlarını (otonomik köken (autonomic lineage)) oluşturur. Diğer hücreler dorsolateral yolağı kullanarak pigment hücreleri ile deride kolonize olurlar (melanocyte lineage) (Şekil 4.3a). Göç sırasında ve AKG'ye birleşmeden kısa zaman

sonra nöral krest hücreler duyusal ve nöronal kaderi ifa eder ve nosiseptif, mekanoreseptif ve nosiseptif nöronlara çeşitlendirilirler (Şekil 4.3b). Nöron alt tipleri sonlanmalar yapmaktadır (Şekil 4.3c) (62).

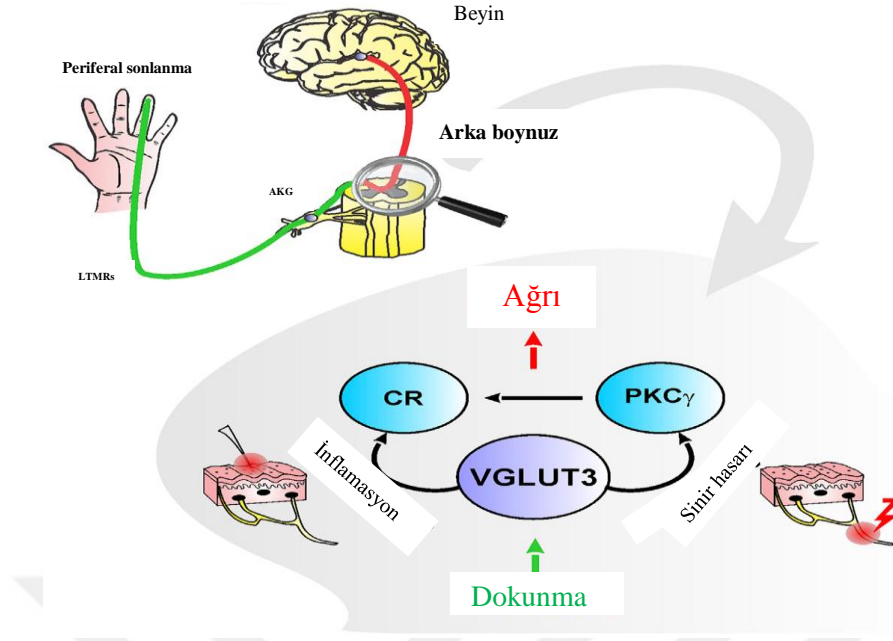
RUNX; RUNX1, RUNX2 ve RUNX3 transkripsiyon faktörlerinden (TF) oluşan bir TF ailesidir (63). Runx3-mekanoreseptif ve proprioseptif farklılaşma ve Runx1-nosiseptif farklılaşma arasındaki bağlantılar gösterilmiştir (64-68). AKG farklılaşmasında önemli adımlardan biri olan aksonal büyüme iç ve dış faktörlerden etkilenmektedir (62). Dış faktörlerden semaforinler öne çıkmaktadır. Semaforin 3A, embriyonik AKG nöronlarının aksonal yönlendirilme için neuropilin 1 (69) ve plexin A4 reseptörleri (70) ile ilişki kurar. İç faktörlerden olan Runx ifadesininin artması aksonal büyümeyi in vivo (64) ve in vitro (67) artırır.

4.4.Periferik Sinir Yaralanmaları

Periferik sinir sisteminde yaralanmalar, nöropatik ağrı ve aksonal dejenerasyona (4, 5) yol açabilir. Yaralanmadan sonra şu üç ihtimalden biri gerçekleşir: hedef dokular tekrar uyarılabilir hale gelebilir, yakındaki aksonların dalları ile tekrar uyarım gerçekleşebilir ya da kayıp fonksiyon ile canlılık devam edebilir (7). Aksonal hasar in vitro şartlarda lazer yardımı ile de yapılabilmektedir (71). İn vitroda aksonun kesilmesi işlemine aksotomi denir.

4.5.Periferik Sinir Hasarına Yanıt Mekanizmaları

AKG nöronları aksotomiye yanıt olarak hücre gövdelerinde hacimsel olarak küçülmektedir (9). AKG nöronlarında aksotomiye bağı olarak hücre içine kalsiyum girişi meydana gelmektedir. Kalsiyumun girmesi kalpeinleri aktive etmektedir (10). AKG nöronları satellit glia hücreleri tarafından sarılmaktadırlar. Duyusal gangliyonlardaki aksonların hasarı nöropatik ağrıya neden olur. Satellit glia hücrelerindeki hasar arka kök gangliyonunda patolojik değişikliklere neden olmaktadır (72). Ağrı mekanizmasını çözmek için bir çok çalışma yapılmıştır (56). 2015'te Peirs ve arkadaşları, AKG'ler üzerinde yaptıkları veziküler glutamat taşıyıcısı 3 (VGLUT3) merkezli çalışmaları ile mekanik ağrı mekanizmasında önemli yol katetmişlerdir. Sinir hasarı ve inflamasyon durumunda farklı mekanizmalar aktive olmaktadır (Şekil 4.5.1)(73).

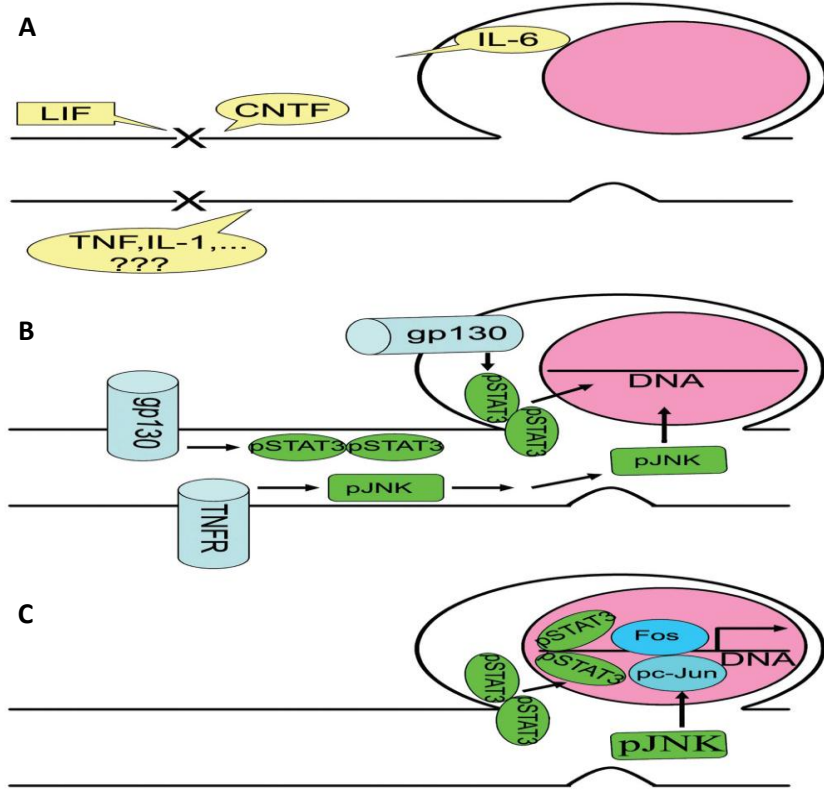


Şekil 4.5.1. Mekanik ağrı için arka boynuz devreleri (73).

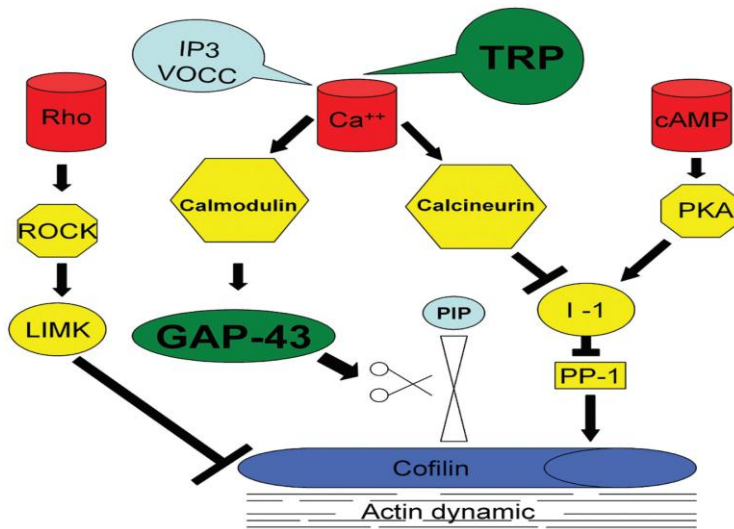
Periferel sinir hasarından sonra, AKG'deki duyusal nöronlar ve omurilik ve beyin sapındaki motor nöronlar büyük morfolojik ve moleküler değişimlere giderler. Bu değişimler hayatta kalmayı ve tamiri teşvik etmektedir (8). Sinir hasarından sonra AKG'de içinde transkripsiyon faktörlerinin de bulunduğu mesajcı RNA'lar seviyesinde değişiklikler meydana gelmektedir (74, 75). AKG'de hasarlı aksondan çıkan hasar sinyalleri retrograd aksonal taşınmayla taşınmaktadır (76). Hasarlı aksonda retrograd sinyal yolları etkilidir. Hasardan sonra schwann hücrelerinde sentezlenen lökemia-inhibe edici faktör (LIF), schwann hücrelerinden salınan siliyer nörotrofik faktör (CNTF) ve nöronlarda sentezlenen interlökin (IL)-6 hasar bölgesine yakın lokalize olmaktadır (Şekil 4.5.2A). LIF, CNTF ve IL-6 sentezlenmesi gp130 reseptörü ve TNF reseptörünü (TNFR) aktive ederek diğer molekülleri etkilemektedir (pSTAT3 ve pJNK) (Şekil 4.5.2B). STAT3 (sinyal çevirici ve transkripsiyon aktivatörü-3) dimerleri inflamasyon ve tamirler ilgili genlerin sentezlenmesini indüklemektedir (Şekil 4.5.2C) (8).

Akson hasarından sonra Rho ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) nöron rejenerasyonundaki sinyal yollarındaki mediatör moleküllerdir. Sinyal yolları aktini depolimerize eden ve yeniden modelleyen cofilin proteinini etkilemektedir (Şekil 4.5.3). Bu sinyal yolları hücre membranından hücre iskeletine kadar etkilidir

(8). Akson tamir bölgesinde mikrotübülün yeniden düzenlenmesi mikrotübül-ilişkili proteinler tarafından yapılmaktadır (77). Dolayısıyla hücrenin mekanik özellikleri hasar öncesi ve sonrasında önemlidir.



Şekil 4.5.2. Akson hasarında retrograd sinyal yolları (8). A-C. Akson hasarı ve akson yenilenmesinde meydana gelen moleküler düzenlemeler.



Şekil 4.5.3. Akson tamir bölgesinde rejenerasyon ilişkili genler (8).

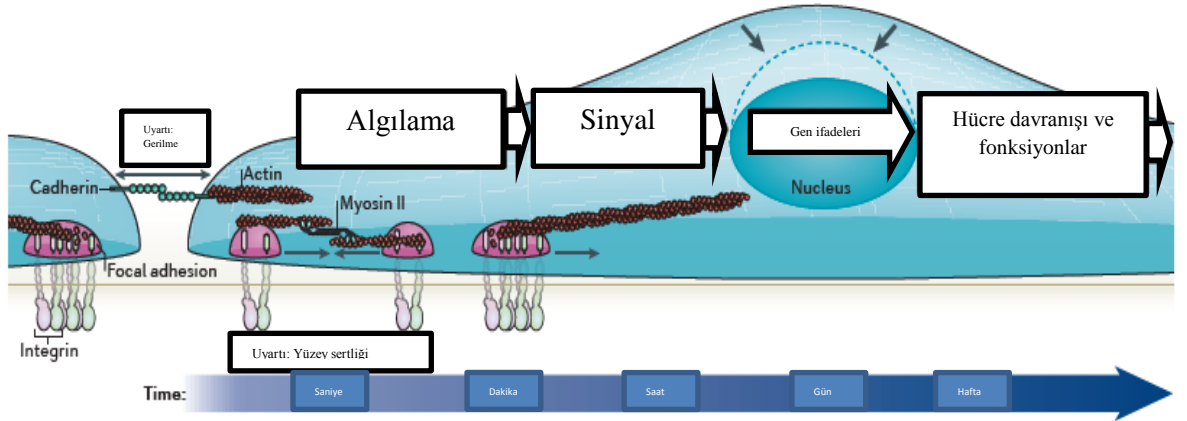
Kaspazlar apoptotik sinyaller geldiğinde katalitik olarak aktif proteazlardır (78, 79). Efektör kaspazlar (Kaspaz-2,-3,-6,-7) DNA'nın, hücre iskeleti elemanlarının ve düzenleyici enzimlerin yıkımından sorumludur (79-82). Periferal aksotomiden sonra satellit glia hücrelerinde sinir büyüme faktörü (NGF) ve nörotrofin-3 (NT3) seviyesi artmaktadır (56). NGF yokluğu da bir çeşit in vitro akson hasarıdır (83). NGF yoksunluğundaki akson dejenerasyonunda Kaspaz-3 ve Kaspaz-6'nın rolleri gösterilmiştir. (84). Fare ve sıçanlarda aksotomi sonrası Kaspaz-3 neonatal motor nöronlarda aktif olur ve hücre ölümünü indüklemektedir (11). Yetişkin farede AKG'nin motor nöronlarında Kaspaz-3 bağımlı hücre ölümleri görülmüştür (85). Kaspaz-3 ve Kaspaz-6 bağımlı aktin ve tübülünin kesimi, nörol gelişimdeki ve yaralanmalardaki aksonal dejenerasyonda önemli bir göstergedir (86).

4.6. Hücre Mekaniği

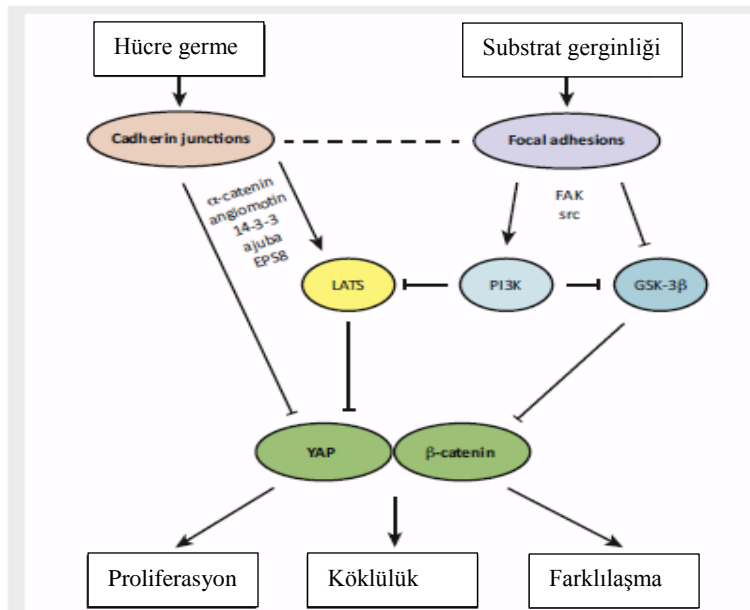
Hücre mekaniği çalışmaları hücrelerin mekanik özellikleri ile biyolojik fonksiyonları arasındaki ilişkilerle ilgilenir (12, 13). Hücredeki bu mekanik özellikleri hücre membranı, çekirdeği ve hücre iskeleti oluşturur. Mekanik özellikler hücrel kuvvetleri üretir. Hücre mekaniğini anlamak için in vitro deneyler ile in silico modeller arasında matematiksel ilişkiler kurulmalıdır. (87). Hücre popülasyonunun mekanik cevabını çalışmak için tek hücre cevaplarının ortalama değerleri çalışılmalıdır (88). Astım (89), kemik erimesi (90), damar tıkanıklığı (91), kanser (18), osteoartrit (92), glokom hastalığı (93) ve kas distrofisinde (94) hücrel ya da dokusal mekanikte bozulmalar meydana gelmektedir. 20. Yüzyılın başlarında D'Arcy Thompson tarafından yazılan 'On Growth and Form' isimli çalışma mekanobiyolojinin başlangıcı sayılmaktadır. Çalışmada biyolojik formların gelişimsel değişikliklerle nasıl şekil aldığı konusu işlenmektedir (95). Sonrasında mikromanipülasyon (96), integrin ailesinin keşfi (97), atomik kuvvet mikroskobu ve optik cımbızların (optical tweezers) kullanımı (98, 99), moleküler çalışmalar (100-102) ve ilk in vivo talin gerilimi (103) gibi çalışmalar ile hücre mekaniği çalışmaları gelişmiştir.

Mekanik kuvvetler özel proteinler tarafından integrin ve kaderin adezyon bölgelerinde algılanır. Bu mekanik kuvvetler biyokimyasal sinyallere dönüşerek hücre davranışını ve fonksiyonları değiştirmektedir. Bu olaya mekanik aktarım

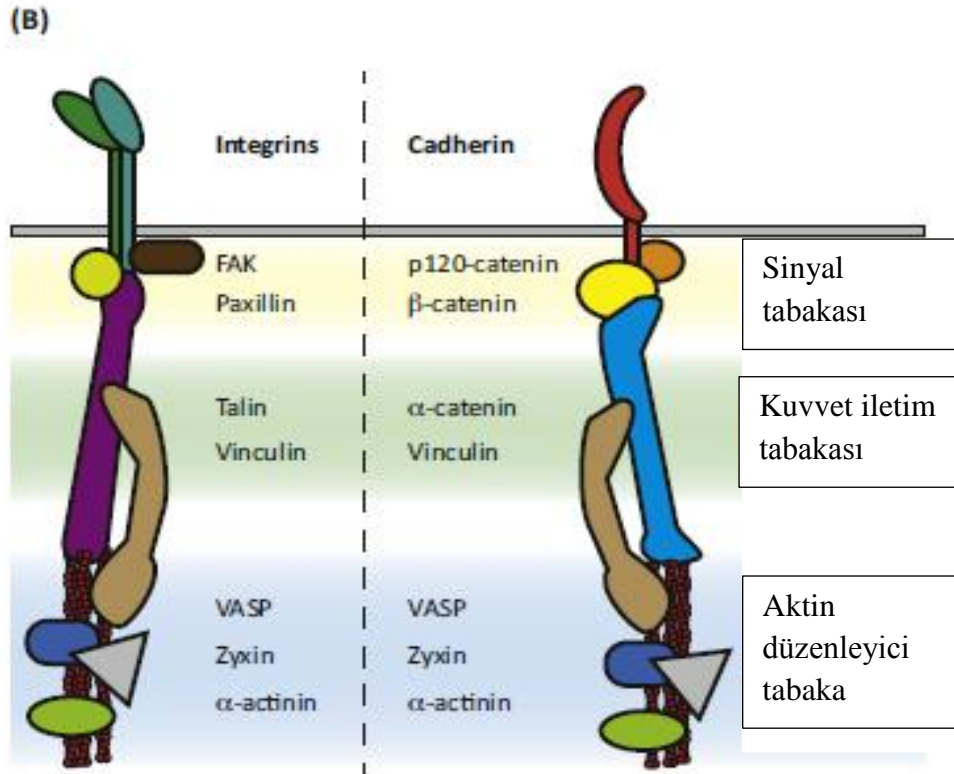
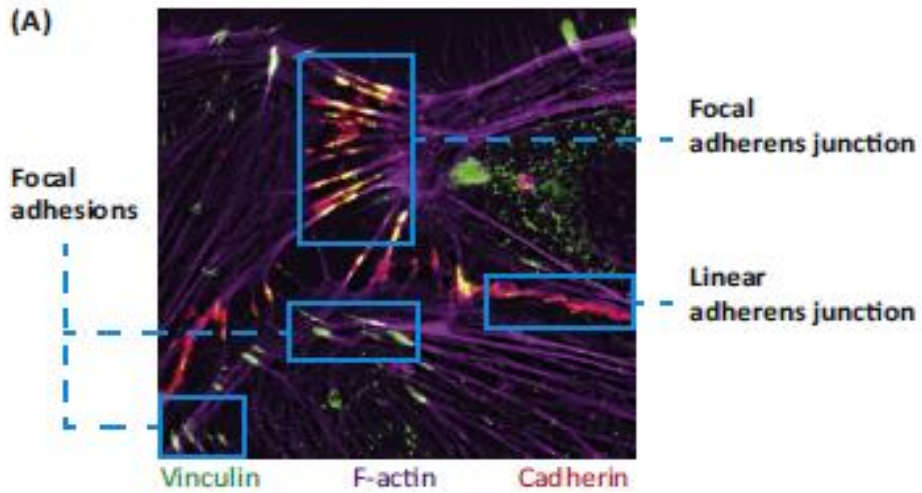
(mechanotransduction) denir. Fokal adezyonlardaki ya da hücre-hücre etkileşimlerindeki integrinler ve kaderinler üzerindeki reseptörler kasılma ya da yüzey sertliğini algılamaktadır. Mekanik algılayıcılar olarak çalışan ve esneyebilen proteinler, talin ve p130CAS, mekanik uyarıyı algılar ve MRTFA (myocardin-ilişkili transkripsiyon faktörü), YAP (Yes-ilişkili protein) gibi proteinler çekirdeğe sinyal iletimi yapar. Gen ve protein ifade düzeyi değişmektedir. Bu değişiklik farklı hücre davranışları ve fonksiyonları olarak açığa çıkmaktadır (Şekil 4.6.1 ve Şekil 4.6.2)(104). İntegrin ve kaderin adezyonlarından sonra sinyal, kuvvet iletim ve aktin düzenleyici protein tabakaları gelmektedir (Şekil 4.6.3)(105).



Şekil 4.6.1. Mekanik iletim (104).

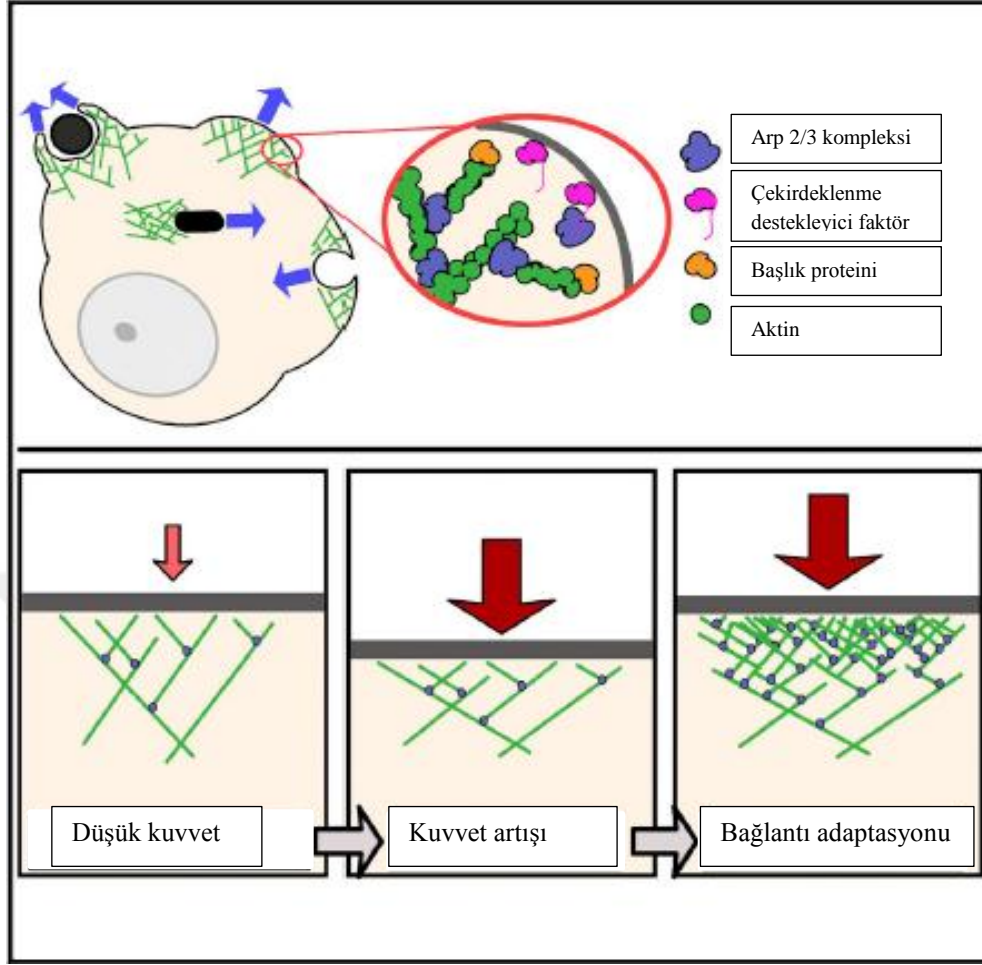


Şekil 4.6.2. Mekanik uyarı-algı-sinyal-gen ifadesi-fonsiyon (105)



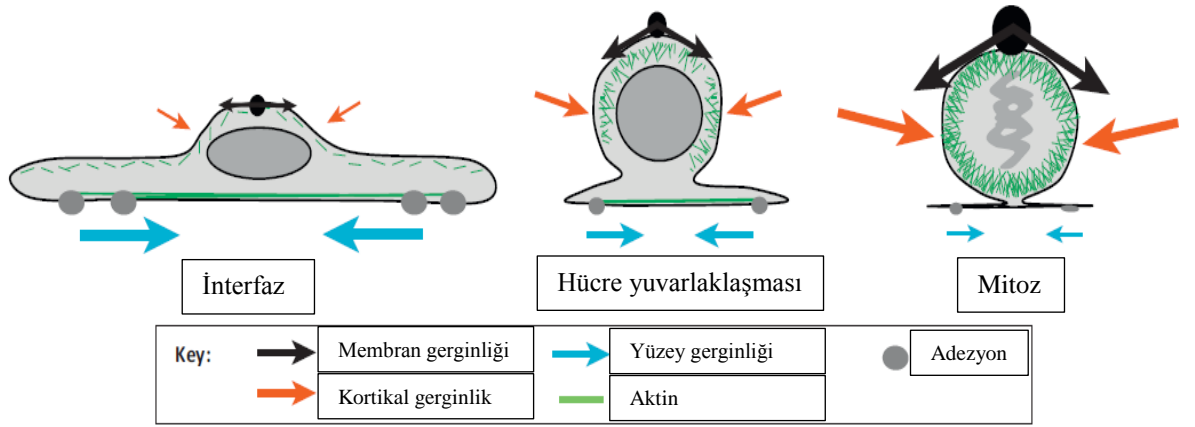
Şekil 4.6.3. A) İntegrin ve kaderinlerin immünfloresan görüntüleri. B) Sinyal tabakası, kuvvet iletim tabakası ve aktin düzenleyici bölgedeki proteinler (105).

Biyolojik olaylardaki kuvvet oluşumunda aktin ağları da çok önemlidir. Bu aktin ağları Arp2/3, WASP-ailesi çekirdeklenme destek faktörü (nucleation promoting factor(NPF)) ve kapaklama proteininden (capping protein) oluşmaktadır (106, 107). Aktin ağları mekanik değişikliklere uyum sağlamaktadır (Şekil 4.6.4). Aktin ağlarının eski halini almasında mekanik hafızadan bahsedilmektedir (108).



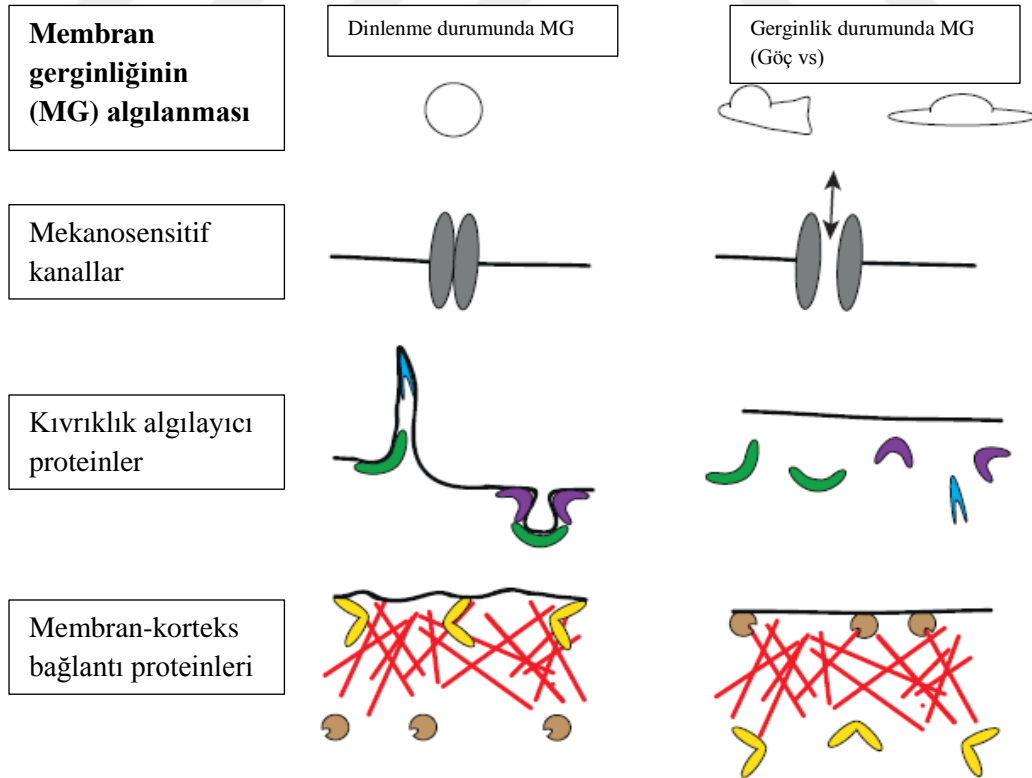
Şekil 4.6.4. Aktin ağlarında kuvvete cevap (108).

Plazma membranı gerginliği mekanik etkenlerden biridir. Membran gerginliği akıcı-mozaik model tarafından tanımlanmaktadır (109). Membran gerginliği membranı deforme edebilen kuvvetler ile ilişkilidir (110). Membran gerginliği, membran-hücre iskeleti adezyonunun ve osmotik basıncın neden olduğu gerginliktir. Kortikal gerginlik (cortical tension), aktin korteksi tarafından oluşan gerginliktir (111). Plazma membran gerginliği; vezikül trafiği, hücre hareketi, endositoz-ekzositoz gibi olayları düzenlemektedir (19-21). Kaveola (caveolae); kolesterol, sfingolipid ve caveolin bakımından zengin membran içe-göçümleridir (111). Bu fiziksel membran rezervuarı ani membran gerginliğine karşı uyumu sağlamaktadır (112, 113). Kaveola oluşurken alanın azalmasına bağlı olarak membran gerginliği artmaktadır. Hücre iskeleti gerginliği ve membran gerginliği karşılaştırılması hücre tiplerine göre değişmektedir (110). Hücrede interfazdan anafaza geçişte kortikal ve membran gerginlikleri değişmektedir (Şekil 4.6.5)(111).



Şekil 4.6.5. Mitozda meydana gelen kuvvetlerin dağılımı (111).

Hücreler membran gerginliğini 3 farklı yolla algılamaktadır (Şekil 4.6.6). Bunlardan ilki mekanosensitif kanallardır. Gerginlik durumunda bu kanallar açılmaktadır. İkincisi, gerginlik durumuna membrandan ayrılan kıvrıklık algılayıcı proteinlerdir. Üçüncüsü ise membran korteks bağımlı proteinlerdir (membrane to cortex attachment proteins). Protein lokalizasyonlarının değişmesi ile algılama yapılmaktadır (110).

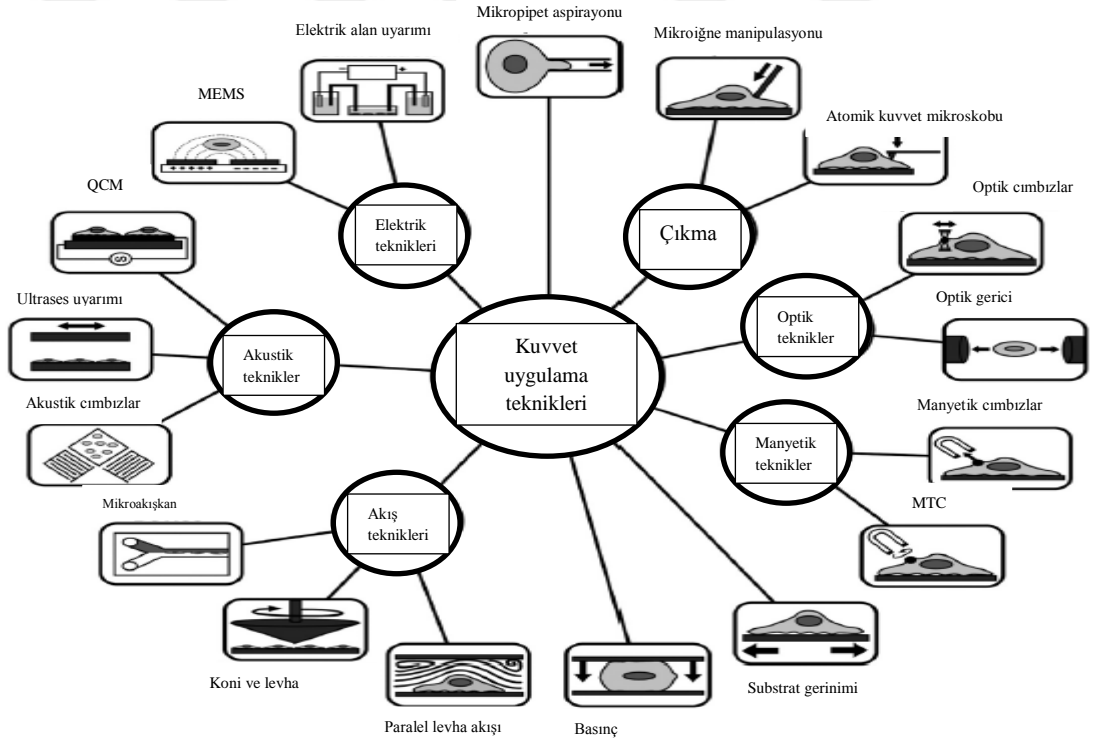


Şekil 4.6.6. Membran gerginliğinin algılanması (110).

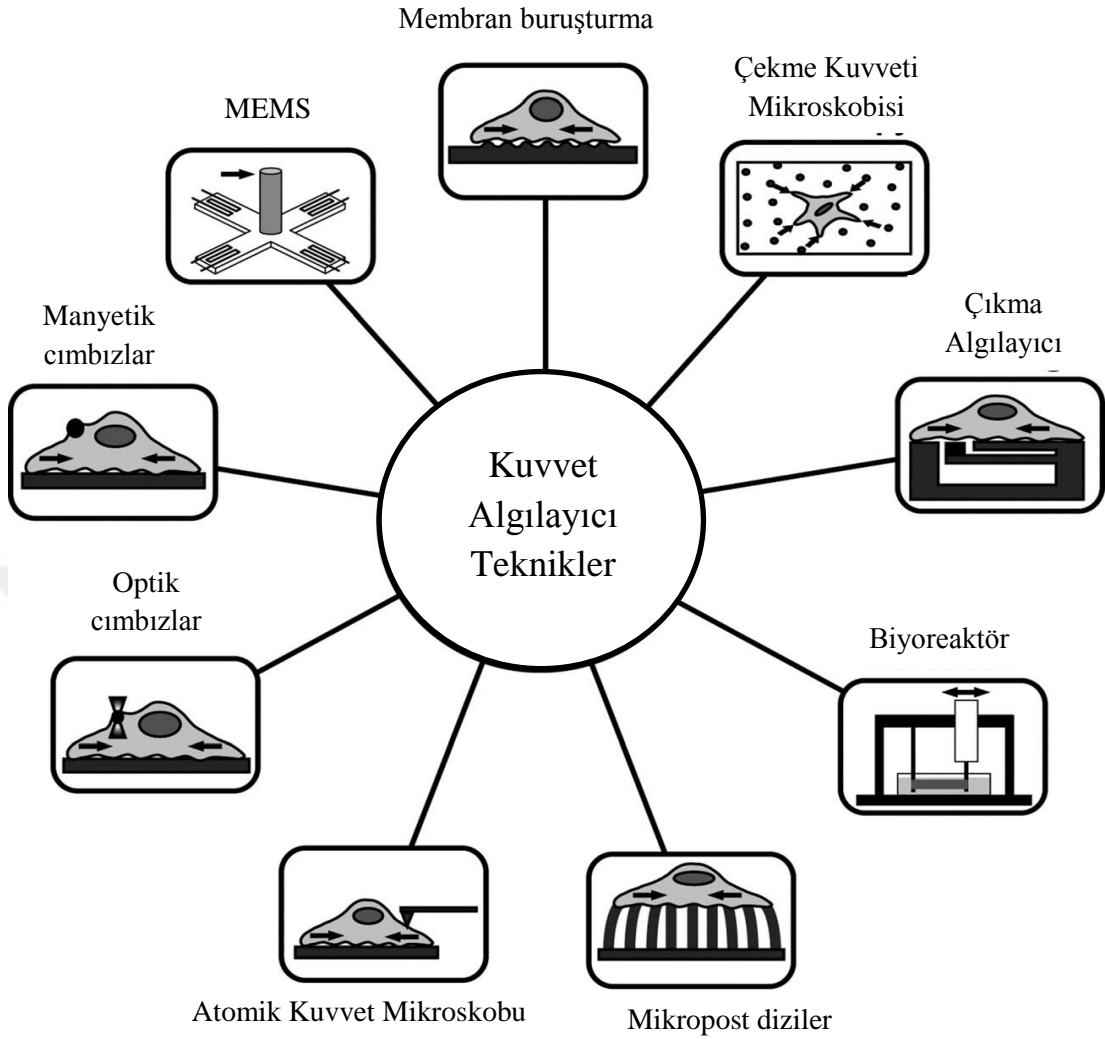
Farede Stomatin-benzeri protein-3 (STOML3) dokunmayı algılamada önemli bir proteindir (114). STOML3, mekanik bağlı Piezo kanallarının hassaslığını ayarlar (115). Arka kök gangliyonu nöronlarında patch-clamp tekniği kullanılarak mekanosensitif akımlar ölçülebilir. Bütün mekanosensitif iyon kanalları membrana gömülüdür. AKG nöronlarında STOML3, membran mekaniğini kolesterole bağlanarak ve kuvvet transferi yaparak kontrol etmektedir. AKG nöronlarında STOML3, aynı zamanda, Piezo1 ve Piezo2 kanallarının mekanik duyarlılığını ayarlamaktadır (116).

4.7.Kuvvet uygulama ve algılama teknikleri

Hücrelerin mekaniğini anlamak için genellikle iki grup uygulamalar kullanılır. Bunlar kuvvet uygulama ve kuvvet algılayıcı tekniklerdir. Kuvvet uygulama teknikleri uygulanan deformasyon ya da kuvvete karşı hücresel cevabı ölçen tekniklerdir (Şekil 4.7.1). Kuvvet algılayıcı teknikler ise hücre gelişiminde, hücre göçünde yani hücresel olaylarda ortaya çıkan kuvvetleri ölçmeye yarayan tekniklerdir (Şekil 4.7.2)(87).



Şekil 4.7.1. Kuvvet uygulama teknikleri (87).



Şekil 4.7.2. Kuvvet algılayıcı teknikler (87).

Young's modulus (Elastikiyet katsayısı) (E), materyalin deformasyona karşı direnci olarak tanımlanan değişmezdir (55). Kuvvet uygulama tekniklerinden olan mikropipet aspirasyonu (micropipette aspiration), hücre materyalinin cam pipet içindeki negatif basınca verdiği cevabı ölçmektedir. Uygulanan vakum basıncı, hücre içine giren pipetin boyu ve pipetin çapı elastikiyet katsayısı hesaplamasında etkilidir. Mikropipet aspirasyonu bir çok hücre tipinde uygulanmıştır (87). Fetal farelerden alınan AKG nöronlarında, mikropipet aspirasyon tekniği kullanılarak membran esnekliği ölçümü yapılmıştır. Membran esnekliğinin yaşlanmaya bağlı olarak azaldığı sonucuna varılmıştır (117). Mikropipet aspirasyonu kolay ve ucuzdur. Aynı zamanda kuvvet çözünürlüğü pikonewton düzeyindedir (118). Bu tekniği kullanırken hücre deformasyona uğrar ve teknikte optik görüntüleme eksiklikleri mevcuttur (87).

Atomik kuvvet mikroskobu (atomic force microscopy(AFM)), esnek konsol (cantilever) bulunduran kuvvetin uygulanabildiği ve kuvvetin algılanabildiği sistemdir. Sistem yer değiştirmeyi ölçer ve çok ileri düzeyde ölçümler yapabilmektedir. Uygulanan kuvvet, AFM ucunun şekli ve çukur derinliği, bu teknikte, elastikiyet katsayısı hesaplamasında etkilidir. AFM ile birçok tip hücrenin mekanik çalışmaları yapılmıştır. AFM pikonewton düzeyinde ölçümler yapabilmektedir. AFM hücre yapısındaki nano düzeydeki yapıların çözülmesine yardımcı olmaktadır. AFM aynı zamanda bir hücre üzerinde çok fazla bilgi verebilir. Teknikte kullanılan kuvvet hücreye zarar verebilir ve bu zarar elastikiyet katsayısını değiştirebilir. Farklı AFM’lerde uç şekli, farklı deneylerde değişebilir. Böylece sonuçlar da farklı mikroskoplarda değişebilir (87). AFM kullanılarak AKG nöronlarında membran esnekliği ölçümleri yapılmıştır (116, 119). AFM ve floresan mikroskoplarının kombinasyonuyla yaşayan nöronlarda esneklik haritaları çıkartılmıştır (120). Farelerden alınan lumbar AKG nöronlarında, periferik sinir hasarı öncesi ve sonrası, AFM ile mekanik farklılıklar tespit edilmiştir (121). AFM ile yüksek çözünürlükte ölçüm yapılabilir (23).

Optik cımbızlar (optical tweezers (OT)) ya da optik tutucu (optical trapping) Arthur Ashkin’in Bell Telephone laboratuvarlarında geliştirilmiştir (122, 123). OT, hem kuvvetin uygulanabildiği hem de kuvvetin algılanabildiği sistemdir (87). Optik cımbızlar infrared laser kullanır. Ayrıca objeyi tutmak için mikroskoba ihtiyaç duyar. Fotonların hareketlerini kontrol altına alır (124). Fotonlarda, objeyi geçtiği zaman, objenin kırılma indisinden dolayı yön değişikliği meydana gelir. Bu yön değişikliği momentumu değiştirir ve böylece objenin üzerinde kuvvet oluşur. Fotonik kuvvetler lazer ışınının merkezinde tutulur. Optik cımbızlar ile mekanik deneyleri birçok hücre tipinde yapılmıştır. Hücre çalışmaları için küresel boncuklar (bead) kullanılır. Kuvvet ölçümünde lazer ışınının yoğunluğu, boncuğun kırılma indisi ve hücre kültürü besiyerinin kırılma indisi önemlidir. Polyesterene boncukların çapının 1-5 µm arasında olması kuvvet ölçümü için idealdir . Uygun boncuklar membrana yapıştırılır ve boncuklar vasıtası ile kuvvet ölçümü yapılabilir (25-27, 125). Çalışmalarda kullanılacak boncuklar uygun proteinlerle kaplanabilir (87). Optik cımbızlar yüksek çözünürlükte 3-boyutlu ölçümler sağlamaktadır (24). Optik cımbızlarda kuvvet ölçümü Hooke’s kuralına dayanmaktadır. Kuvvet ölçümünde belirleyici olan tutulan

objenin üzerindeki kuvvet ve tutucu merkezinden sapmadır (126). Bu sapmalar, üst düzey tekniklerle belirlenmektedir (127). Optik cımbızlar sisteminde kuvvet uygulayıcı ile hücre arasında fiziksel bağlantı yoktur (126). Hücrelere ek boncuklar da eklenebilir (128). Boncukların hücreye tutturulmasında kullanılan kaplama teknikleri ile daha spesifik ölçümler yapılabilir. Yüksek lazer kuvvetleri ve lazerin yüksek yoğunluğundan kaynaklanan ısınma bu tekniğin eksik taraflarıdır (124, 127). Isınma, hücrelerin mekanik özelliklerini değiştirebilir (87).

Bu üç tekniğin dışında kuvvet uygulayıcı ve kuvvet algılayıcı teknikler vardır. Çok sık kullanılan AFM ve optik cımbızlar tekniklerinin birbirlerine göre üstünlükleri bulunmaktadır (Tablo 4.7)(87).

Tablo 4.7. AFM ve OT karşılaştırılması (87).

	AFM	OT
Kuvvet Uygulama	$10-10^7$ pN	$0.01-10^3$ pN
Kuvvet Algılama	$10-10^5$ pN	1-100 pN
Uzaysal Algılama (nm)	$1-10^5$ nm	$10-10^5$ nm

5. METOD VE MATERYAL

Balb-c farelerden izole edilen arka kök gangliyonu nöronlarında kortikal ve lateral kuvvet ölçümleri yapıldı. Kuvvetlerin oluşumunda miyozinin rolünün belirlenmesi için genel miyozin inhibitörü olan BDM kullanıldı. Hücre iskeleti yıkımında görev alan Kaspaz-3'ün alan değişimi ve kuvvetler ile ilişkisine bakıldı. Ölçülen Kaspaz-3 parlaklıklarının kontrolleri yapıldı.

5.1.Deney Hayvanları

Çalışmamız için, deney hayvanı olarak yetişkin (6-8 haftalık) Balb-c ırkı albino fareler kullanıldı. Fareler, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Araştırmaları Merkezi'nden temin edildi. Çalışma için İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı (38828770-604.01.01-E23167) alınmıştır.

5.2.Kullanılan Malzemeler

Sarf Malzemeler	Firma	Kataog Numarası
35 mm cam tabanlı petri	WPI	FD35-100
Poly-L-Lysine	Sigma	P6282
Laminin	Sigma	L2020
NBA (Without L-Glutamine, with Phenol Red)	Gibco	10888-022
RPMI 1640 1X (Without L-Glutamine, Without Sodium Pyruvate, with Phenol Red)	Multicell	350-030-CL
HBSS (With Sodium Bicarbonate, with Phenol Red)	Multicell	311-510-CL
HBSS 10X (Without Phenol Red, without sodium bicarbonate, without calcium & magnesium)	Multicell	311-506-CL
Antibiyotik antimikotik solusyon	Sigma	A5955
GlutaMAX	Gibco	35050061
B-27® Serum-Free Supplement	Gibco	17504044
Collagenase	Sigma	C7657
Tripsin	Gibco	15400-054
DNAse	Sigma	D4513
Tripsin inhibitörü	Sigma	T6522
FBS(Fetal Bovin Serum)	Sigma	F4135

Percoll	Sigma	P4937
Polystyrene Latex Beads	Sigma	LB30
BDM(2,3-Butanedione monoxime)	Sigma	B0753
Blebbistatin	Sigma	B0560
EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)	Sigma	EDS
Cell Event Caspase-3/7 Green	Life Technologies	C10423

5.3. Hücre izolasyonu öncesi hazırlıklar ve hücre eldesi

5.3.1. Kültür kabı hazırlanması

Bir gün önceden, hücrelerin ekilecekleri 35 mm'lik cam tabanlı kültür kapları hücreler için uygun hale getirilmek için Poly-L-Lysine ve laminin ile kaplandı. Poly-L-Lysine kültür kaplarının yüzeylerinin hidrofilik yapıya gelmesini sağlar. Laminin ise periferik nöronların ekstraselüler matrisinde bulunur. Poly-L-Lysin laminin ilişkisi ile kültür kapları, hücreler için uygun hale getirilir. 750 µl %10'luk Poly-L-Lysine, (75µl pll+675 µl sterile distile su) 35 mm'lik steril kültür kabının ortasına yayıldı. Petriler 2 saat oda sıcaklığında kabin içerisinde bekletildi. 2 saatin sonunda petriler 3 kere distile su ile yıkandı. Kültür kaplarının orta kısımlarına 500µl %0.1 'lik laminin (5µl laminin + 495 steril distile su) eklendi. Kültür kapları lamininde gece boyu 37 °C'de bekletildi. Hücreler eklenmeden önce 3 kere distile su ile yıkandı ve yıkamadan sonra kurumaya bırakıldı.

5.3.2. Kültürde kullanılacak besiyerlerinin hazırlanması

5.3.2.1. Diseksiyon besiyeri

Kültür yapılacağı gün diseksiyon besiyeri aseptik şartlarda hazırlandı. Diseksiyon besiyeri için RPMI 1640 kullanıldı. Besiyeri %1 antibiyotik ve %1 glutamax olacak şekilde hazırlandı. Diseksiyon işlemine kadar +4 °C'de bekletildi.

5.3.2.2. Kültür besiyeri

Kültür yapılacağı gün kültür besiyeri aseptik şartlarda hazırlandı. Diseksiyon besiyeri için Neurobasal A kullanıldı. Kültür besiyeri %1 antibiyotik, %1 glutamax ve %2 B27 olacak şekilde hazırlandı. Kültür besiyeri 37 °C'de kapağı yarım açık şekilde muhafaza edildi.

5.3.3. Diseksiyon

Fareler CO₂ solutma yöntemi ile ötenazi yapıldı. Diseksiyon besiyeri içerisinde kostalar çıkarıldı. Kostalar silikon tabanlı diseksiyon kabına alındı. En az 20 adet arka kök gangliyonu stero mikroskop altında ve aseptik koşullarda hızlı bir şekilde çıkarıldı. Kostalar ve çıkarılan gangliyonlar soğuk tablanın üzerinde ve diseksiyon besiyeri içerisinde bekletildi.

5.3.4. Kültür protokolü

5.3.4.1 Kollajenaz inkübasyonu

1 ml %1'lik kollajenaz hazırlandı (990 µl kültür besiyeri + 10 µl kollajenaz enzimi). Homojen olana dek karıştırıldı. Çıkarılan AKG'ler enzim solusyonuna eklendi. 40 dakika endorfun kapağı açık şekilde 37°C'de inkübe edildi.

5.3.4.2 Enzimin uzaklaştırılması

AKG'lerin içinde bulunduğu kolajenazlı besiyeri çekildi. 3 kez 1 ml HBSS ile serolojik pipet kullanılarak yıkama yapıldı. HBSS her eklendiğinde gangliyonlar sıvı içinde hareket edecek şekilde yıkandı. HBSS çekilmeden önce gangliyonların çökmeleri beklendi. 3 kez yıkamanın sonunda HBSS çekildi.

5.3.4.3 Tripsin inkübasyonu

500 µl Tripsin 1X (450 µl kültür besiyeri + 50 µl tripsin 10X) hazırlandı ve gangliyonların üzerine homojen olacak şekilde aktarıldı. 15 dakika kapağı açık şekilde 37°C'de inkübe edildi.

5.3.4.4 Tritürasyon ve DNase inkübasyonu

Tritürasyon, enzim inkübasyonu yapılarak gevşemiş dokunun gittikçe daralan pipet uçlarından geçirilmek suretiyle mekanik olarak ayrıştırılması demektir. Tripsin henüz ortamdayken hücreler önce ucu kesik 1000 µl'lik pipet ucu, sonra kesilmemiş 1000 µl'lik pipet ucu, sonra 200 µl'lik pipet ucu ve son olarak insülin enjektörü ile 2 kez triture edilip ayrıştırıldı. Ayrıştırılmış hücre süspansiyonuna %1 olacak şekilde 5µl DNase eklendi. 1 saat kapağı açık şekilde 37°C'de inkübe edildi.

5.3.4.5 Enzimin uzaklaştırılması ve aktivitesinin durdurulması

Hücre süspansiyonu 4°C'ye soğutulmuş santrifüjde 3 dakika 1000 RPM' de çöktürüldü. Süpernatant atılır. Böylece enzim uzaklaştırıldı. Tüm enzim aktivitesini durdurmak için 360 µl kültür besiyeri içine 40 µl FCS ve 30 µl tripsin inhibitörü ilave edildi. Bir sonraki aşama olan gradientte kullanılacak hücre tabakası oluşturuldu.

5.3.4.6 Hücrelerin ayrıştırılması

Hücrelerin büyüklükleri ve ağırlıklarına göre ayrışması için 3 tabakalı percoll gradyanı hazırlandı. En altta %60'lık (300µl Percoll + 200µl kültür besiyeri), ortada %35'lik (175 µl Percoll + 325 µl kültür besiyeri) ve en üstte %10'luk (50 µl Percoll + 450 µl kültür besiyeri) olacak şekilde falkona eklendi. Gradyanın üzerine bir önceki adımda hazırlanan hücre solüsyonu yavaşça ilave edildi. +4°C'de 20 dakika 1700 RPM'de santrifuj edildi. %60'lık tabakanın ortasından 750µl hücre solüsyonu çekildi.

5.3.4.7. Percoll'ün uzaklaştırılması

750µl hücre solüsyonuna 3 ml kültür besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonu 4 °C'ye soğutulmuş santrifüjde 3 dakika 800 RPM'de çöktürüldü. Süpernatant atıldı.

5.3.4.8. Hücre ekimi

Çöken hücrelerin üzerine deney planına uygun olarak petri başı 500 µl kültür besiyeri olacak şekilde besiyeri eklendi. Hücreler 2 saat 37 °C'de inkübe edildi. 2 saatin sonunda petri başına 1500 µl kültür besiyeri olacak şekilde besiyeri eklendi. kültür besiyeri olacak şekilde besiyeri eklendi.

5.4. Kuvvet ölçümü

5.4.1. Kuvvet ölçümü öncesindeki hazırlıklar

5.4.1.1. Boncuk (Bead) hazırlanması

Deneyden 1 gün önce 3 µm çapındaki boncuklar hücrelere yapışması için deney düzeneğine göre %1 boncuk (1 µl boncuk + 99 µl pll), %5 boncuk (5 µl

boncuk + 95 µl pll) ve %10 boncuk (10 µl boncuk + 90 µl pll) olacak şekilde hazırlandı.

5.4.1.2. Kalsiyumsuz besiyeri hazırlanması

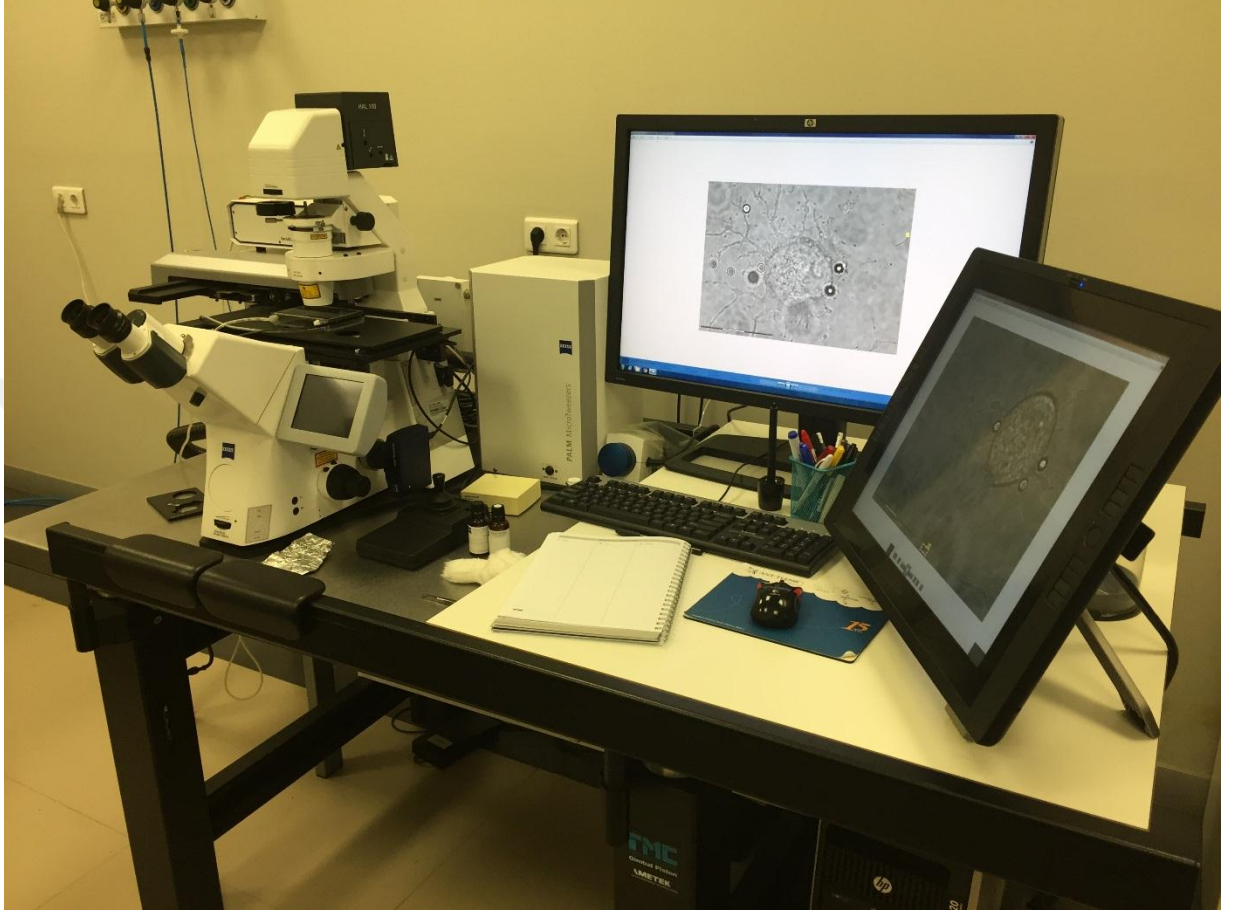
Ortamdan kalsiyumu çekmek için kalsiyumsuz HBSS ayrı deneylerde 10X ve 1X (150 µl HBSS 10X + 1350 µl steril distile su) olacak şekilde hazırlandı. 48 saat NBA içerisinde inkübe edilen hücrelere mevcut besiyerleri çekilerek HBSS 10X ve 1X eklendi. Kalsiyumu çekmek için diğer bir yöntem olarak kültür besiyeri içerisine 5 milimolar EDTA eklendi. Böylece EDTA kalsiyumlara bağlanarak onları çöktürdü.

5.4.2. PALM CombiSystem (MicroDissection and MicroTweezers System)

Arka kök gangliyonu nöronları üzerinde aksotomi modeli yapmak ve aksotomi öncesi-sonrasında esneklik ya da kuvvet ölçmek için PALM CombiSystem (Resim 5.4.2.1) kullanıldı.

Cihaz infrared lazer ve ultraviyole lazer olmak üzere iki lazer sistemine sahiptir. İnfrared lazer ile taşıma ve yerleştirme; ultraviyole lazer ile de kesim ve yerinden çıkarıp fırlatma yapılabilmektedir. Yüksek performanslı ve tamamen otomatik sistemlerdir. Cihazla hücre ayıklanması, bir yerden bir yere taşıma, partiküllerin taşınması, esneklik veya kuvvet ölçümü gibi bir çok işle yapılabilmektedir. İnfrared lazer 1W veya 3W gücünde ve 1064 nm dalga boyundadır. 10X, 20X,40X, 32X ve 100X büyütme EC-Plan-Neofluar objektiflere sahiptir. Güçlü lazeri, yüksek sayısal aralıklı objektifleri ve partikül ve besiyeri arasındaki yüksek kırılma indisi pikonewton düzeyinde kuvvet ölçümüne olanak sağlamıştır. Cihaz TwinFlex infrared yakalama lazerine sahiptir. Biyolojik maddeler ile lazer ilişkisi en iyi 1064 nm de kurulur (129). Sistem ayrıca inkübatör ünitesine, renkli ve monokromatik iki kameraya ve HXP 100V floresan üniteye sahiptir. Cihaz genişletilmiş fokus, zaman aralıklı çekim(Time Lapse), Z ekseninde çekim(Z-stack) ve çoklu kanal floresan çekimi özelliklerine de sahiptir. Cihaz PALM RoboSoftware ile çalışmaktadır. Ayrıca sistemimizde ZenBlue yazılımı da mevcuttur. PALM RoboSoftware yazılımının kullanımı son derece kolay ve basittir. Otomatik fokus, navigasyon ve fotoğraf analizi kısımları mevcuttur. Yazılımda bulunan element listesi ile seçilen objelere ulaşım kolaylaştırılmıştır. Fotoğraflar otomatik olarak

kaydedilebilir. Verilerin döküasyonu oldukça kolaydır. Cihaz her açılıp kapanmada kendini otomatik kalibre etmektedir. Cihazın OpticalTweezers kısmında kuvvetler Rayleigh ve Mie sistemleri ile tanımlanır.

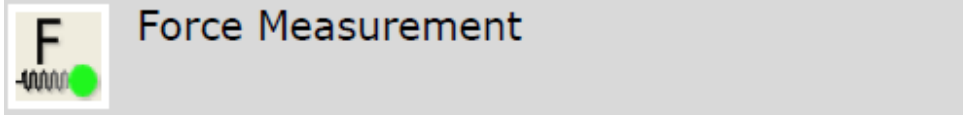


Resim 5.4.2.1. PALM CombiSystem

5.4.2.1. PALM RoboSoftware Kuvvet Ölçümü Modülü

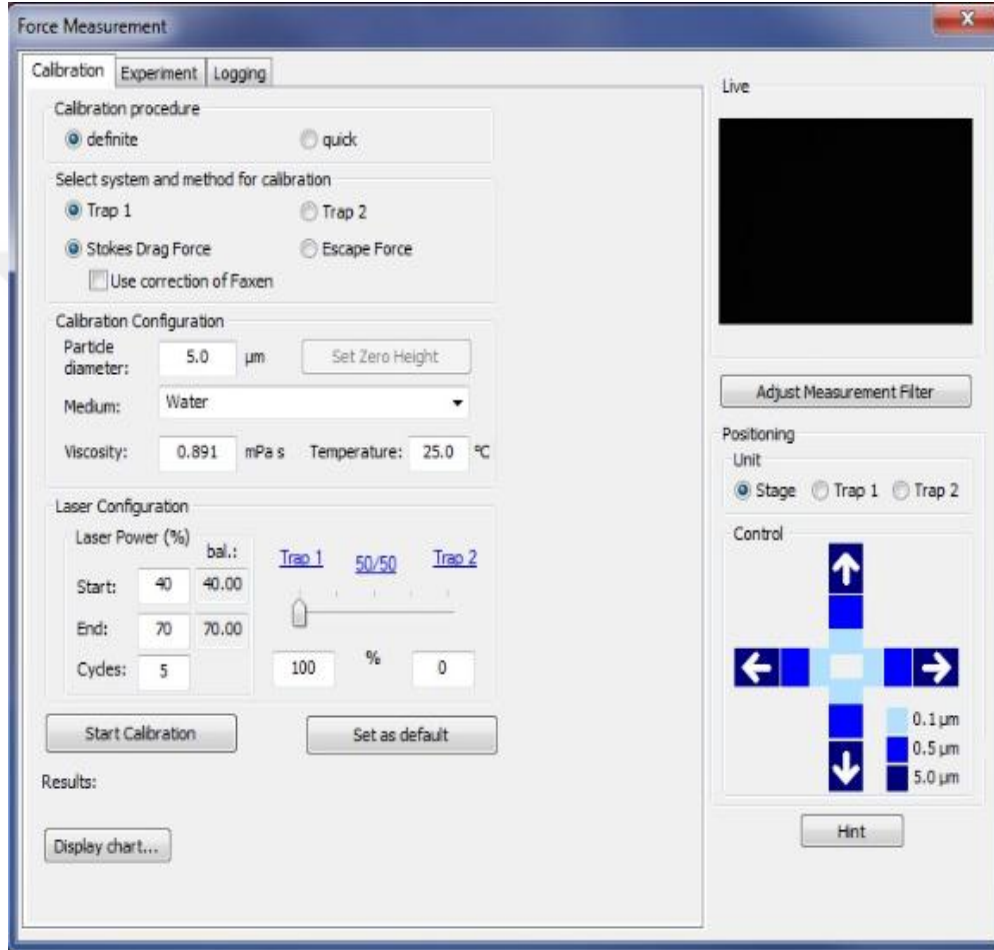
Kuvvet ölçümü modülü kantitatif olarak kuvvet ölçümü yapar. Modülü kullanarak hücre esnekliği, sperm hareketi gibi ölçümler yapılabilir. Kuvvet ölçümü deneylerinde seçilen/ölçülen objenin pozisyonu belirlenmelidir. Pozisyonun belirlenmesi için objenin merkezi ölçüt olarak kullanılır. Kuvvet ölçümü için en uygun materyal polystrene boncuklardır (bead). Bu boncukların şekli uygulanan lazer ile değişmemektedir. Floresan boncuklar da kullanılabilir. Kantitatif ölçüm yapmak için tutucular (trap) mutlaka kalibre edilmelidir.

Kuvvet ölçüm butonuna tıklanır.



Şekil 5.4.2.1.1. Kuvvet ölçüm butonu

Kuvvet ölçümü penceresi açılır.



Şekil 5.4.2.1.2. Kuvvet ölçüm penceresi

5.4.2.2. Tutucunun (Trap) Kalibrasyonu ve Kuvvet Ölçümü

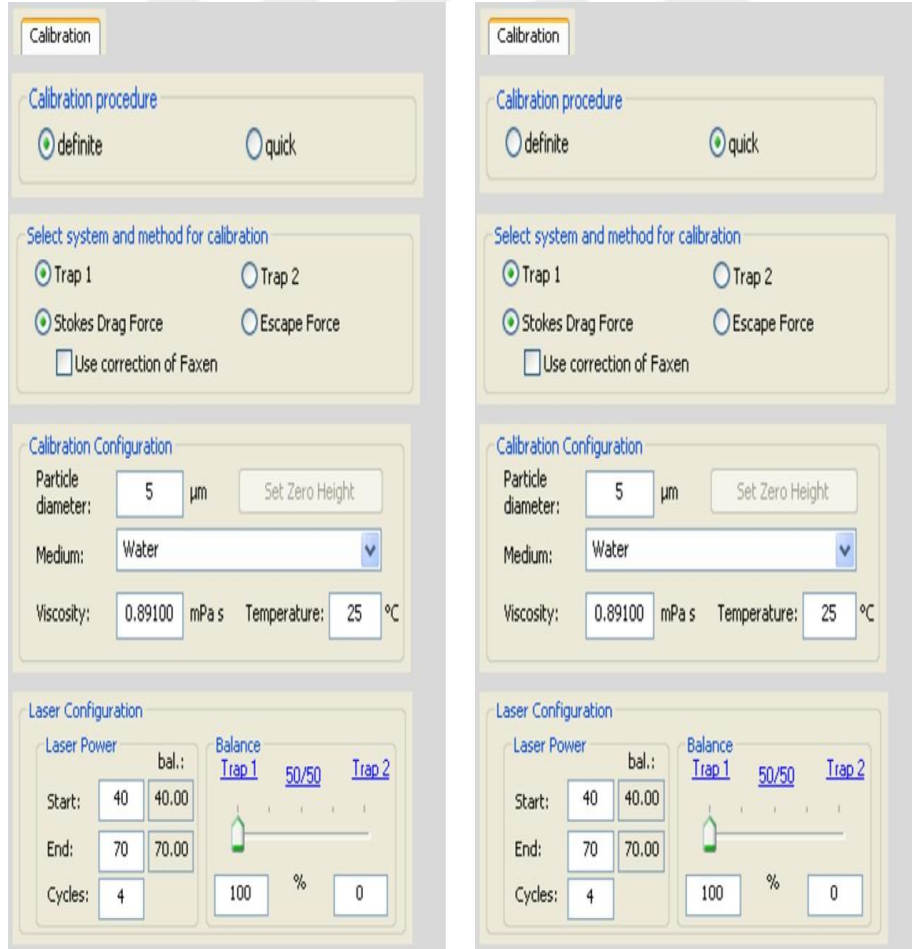
Kalibrasyon sırasında boncuklar lazer tarafından tutulur ve besiyerinin içerisinde sağa-sola ve yukarı-aşağı hareket ettirilir. Lazer ışını durağanlaşana kadar devam eder. Aşağıdaki formüller yardımıyla kuvvet sabiti/tutucu bükülmesi(force constant/trap stiffness) belirlenir(Stokes kuralı).

$$F=kx \text{ (F=kuvvet, k=kuvvet sabiti, x=sapma)}$$

$$F=6\pi r\eta v \text{ (} r=\text{boncuk çapı, } \eta=\text{besiyeri akışkanlığı, } v=\text{hız)}$$

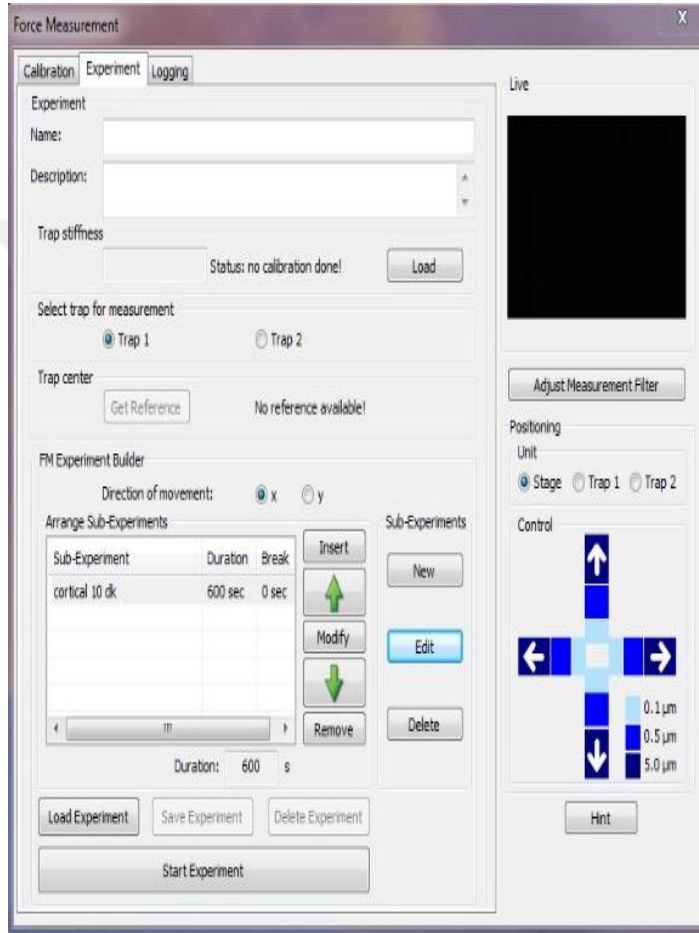
Sonuç olarak $k= 6\pi r\eta v / x$

Kuvvet ölçümü modülünde iki çeşit kalibrasyon metodu vardır. Stokes Drag Force metodu kuvvet sabitini belirler. Boncuk besiyeri içerisinde hareket ederken sabit lazer kuvveti ile hareket eder. Opsiyonel olarak düzeltme yöntemi seçeneği olarak Faxen düzeltmesi yapılabilir. Escape Force metodu da kuvvet sabitini belirler. Fakat ilk metoddan farkı sabit lazer kuvveti yerine artan lazer kuvveti kullanmasıdır. İki tutucudan (trap) biri seçilmelidir. Kalibrasyon prosedürü olarak *definite* ve *quick* seçenekleri mevcuttur. *Quick* kalibrasyon daha hızlı ve kesindir. *Quick* kalibrasyonda hareket x ve y ekseninde olurken; *Definite* kalibrasyonda hareket sadece x eksenindedir. Yukarıdaki formüllere göre seçilecek parametreler iki prosedür için ayrılmıştır (Şekil 5.4.2.2.1.).



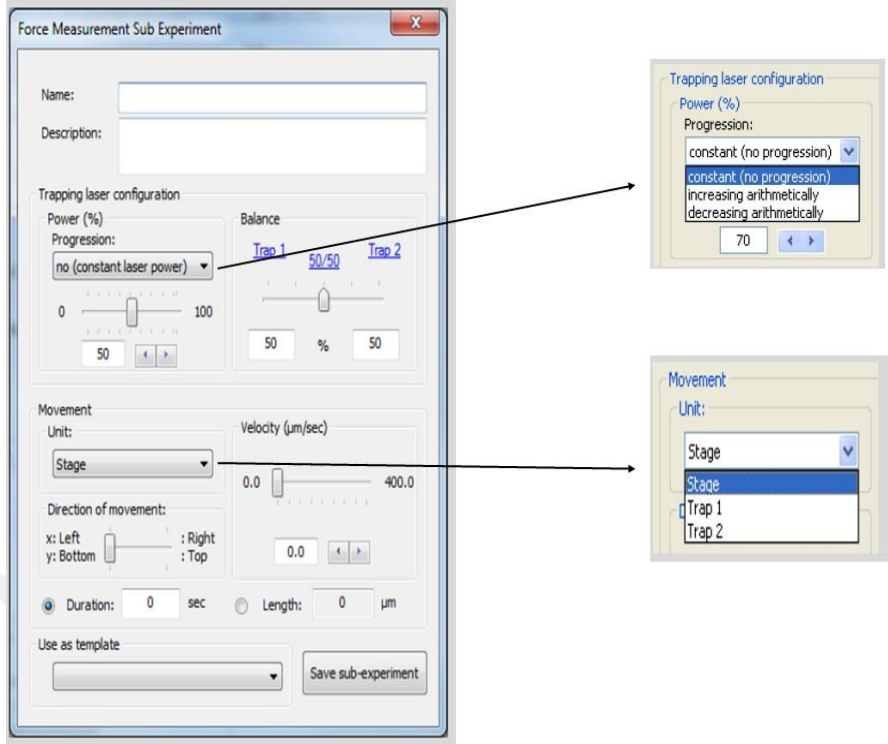
Şekil 5.4.2.2.1. Kalibrasyon protokolleri

Kalibrasyon tamamlandıktan sonra kuvvet katsayısı belirlenmiş olur. Kalibrasyon verileri sonraki deneylerde de yüklenebilir. *Definite* kalibrasyonda grafik verilirken; *quick* kalibrasyonda grafik çıktısı görülmez. Kalibrasyon kısmının yanında “Experiment”(deney) kısmına gelinir. Kalibrasyon yapılan tutucu seçilir ve “trap stiffness” kısmında kuvvet katsayısı çıkar. Deneyin ismi ve tanımı da yapılmalıdır (Şekil 5.4.2.2.2).



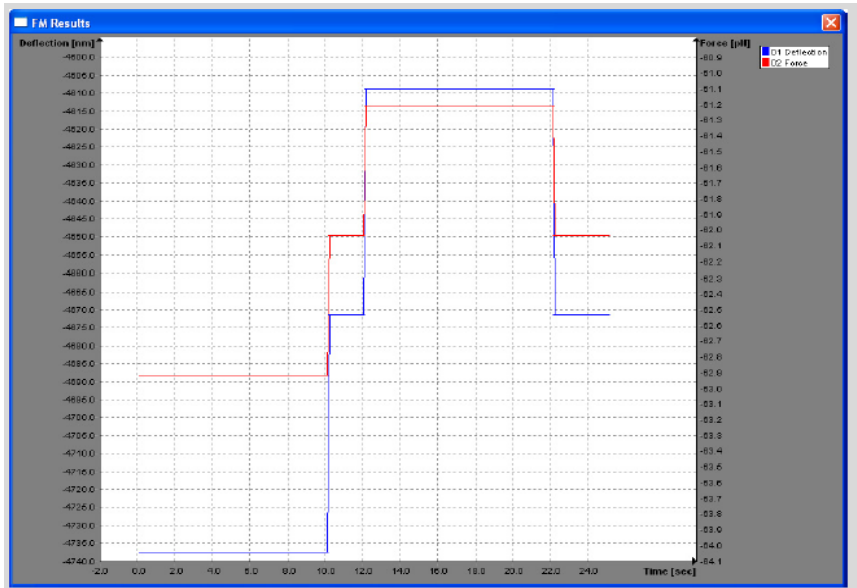
Şekil 5.4.2.2.2. Deney penceresi

Deney penceresinde en önemli kısım sub-experiments (alt-deneyler) kısmı sayılabilir. Bu kısım sayesinde istenilen deneye uygun kuvvet ölçülebilir. Alt deneyleri oluşturmak için alt deneyin adı, tanımı, lazerin kuvvetinin devamlılığı, iki tutucu arasındaki güç bölünmeleri, hareketin hızı, hareketin yönü, hareketi hangi birimin yapılacağı belirlenmelidir. Alt deneyler düzenlenir (Şekil 5.4.2.2.3). Alt deneyler sonraki deneylerde kullanılmak için kaydedilir. Sonrasında alt deneylerde değişiklikler de yapılabilir.



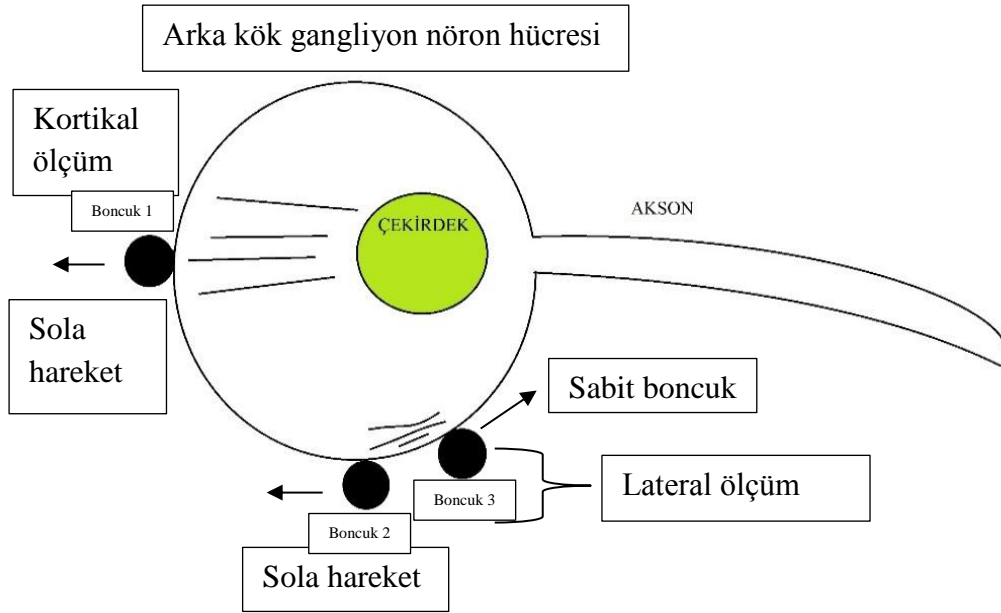
Şekil 5.4.2.2.3. Alt deneyler kısmı

Deneye başlamadan önce referans noktası belirlenmelidir. Bu özellikle hangi objenin kuvvetinin ölçüleceği belirlenir. Alt deneyler belirlendikten sonra “Get Reference” kısmına basılır. Bunun için öncelikle deney ismi girilmelidir. Son olarak “Start Experiment” kısmına basılarak sonuç ekranı gelir (Şekil 5.4.2.2.4).

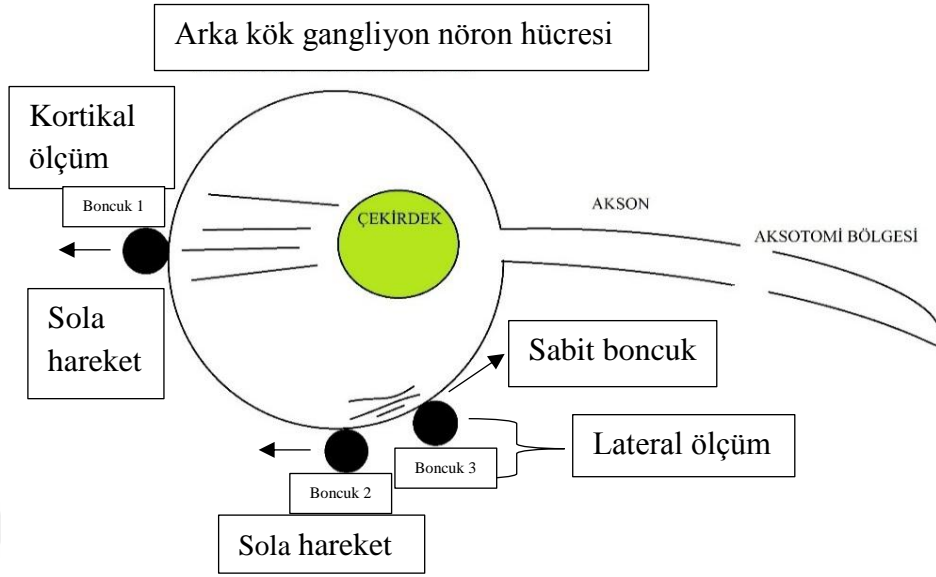


Şekil 5.4.2.2.4. Sonuç ekranı

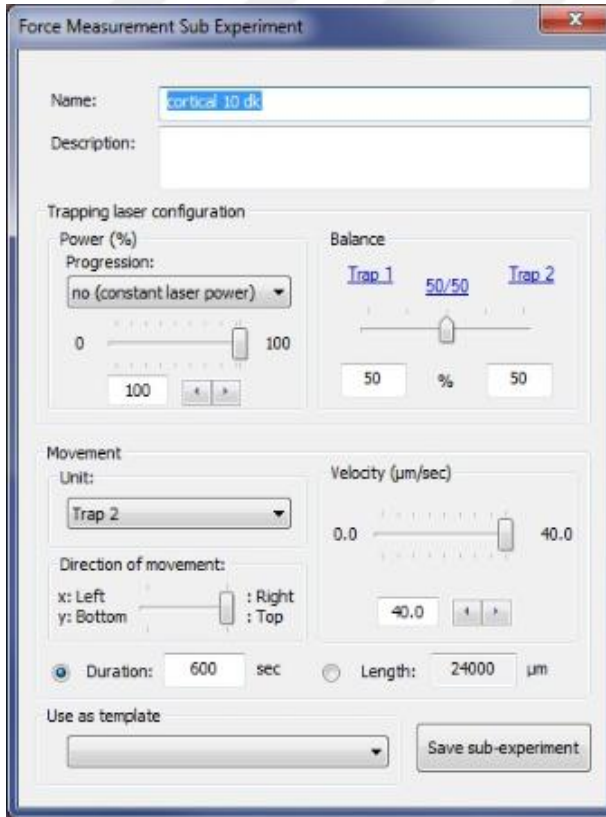
Arka kök gangliyonu hücrelerinde kortikal ve lateral kuvvet ölçümleri yapıldı. Kortikal kuvvet ölçümü tek boncuk (bead) ile 90°'lik açı ile çekildi. Lateral kuvvet ölçümü için bir boncuk sabit tutulurken diğer boncuk 180°'lik açı ile çekildi. Kuvvetleri ölçmek için pll kaplı boncuklar hücreye uygun açılarla yapıştırıldı. Yerleştirilen boncuklar hücrenin farklı yerlerinde aynı açılarla x ve/veya uygun açılarla çekildi. Aksotomi öncesi ve sonrası hücre, boncuk ve boncuk çekilme yönleri uygun açılarla belirlenmiştir (Şekil 5.4.2.2.5 ve Şekil 5.4.2.2.6). Aksotomi bölgesi bir hücre boyu kadar seçildi. Aksotomi bölgesi seçilerek akson kesim işlemi farklı güç değerleri ile yapıldı. Denemelerimizin sonucu olarak lateral ölçüm 1 dakika (Boncuk 2 hareketli-Boncuk 3 sabit); kortikal ölçüm 10 dakika yapıldı (Boncuk 1). Örnek olarak kortikal ölçümümüzdeki alt deney düzeneği verilmiştir (Şekil 5.4.2.2.7). Zaman aralığı ve yön hariç diğer parametreler sabit bırakılmıştır. Önceki ölçümlerde farklı zaman aralıkları denendi. Tutucunun kuvveti 50 pikonewton olarak ayarlandı. Ölçüm ve aksotomi 100X büyütmede yapıldı. Kuvvet ölçüm, BDM ve Kaspaz-3/7 gruplarında bu ayarlar ile ölçümler yapıldı.



Şekil 5.4.2.2.5. Aksotomi öncesi deney modeli (Boncuk yerleşimi hücreye göre değişmektedir)



Şekil 5.4.2.2.6. Aksotomi sonrası deney modeli (Boncuk yerleşimi hücreye göre değişmektedir)



Şekil 5.4.2.2.7. Kortikal ölçüm deney düzeneği

5.5. Parlaklık (Intensity) ölçümü

Arka kök gangliyonu hücrelerinde aksotomi öncesi ve sonrasında ortaya çıkan kuvvetler ile aksotomi ve öncesi sonrası Kaspaz-3/7 parlaklığı arasında korelasyonu bulmak için Zeiss Cell Observer SD Spinning Disk Time-Lapse mikroskobu (Resim 5.5.1) ile Kaspaz-3/7 parlaklığı ölçüldü.

Cihaz floresan bir mikroskoptur. Cihazda 3 adet ışık kaynağı, 3 adet kamera (2'si çok yüksek hassasiyettedir ve 2 kameradan farklı renkler alınabilir.) ve inkübatör ünitesi mevcuttur. Sistemi kullanarak çok yüksek hızda ve uzun süreli görüntüler floresan olarak alınabilir. 'Definite focus' teknolojisi ile odak sorunları minimuma indirilmiştir. 3 boyutlu görüntülemeler *z-stack* özelliği ile yapılabilir. Görüntüler milisaniye aralıklarla kontrol edilebilir. Cihaz yüksek renk düzeltmesi ve yüksek kontrast sağlar. Dinamik hücre olayları yüksek çerçeve hızı (frame rate) ile gözlemlenebilir. Cihaza spinning disk teknolojisini sağlayan kısım Yokogawa CSU-X1 kısmıdır.

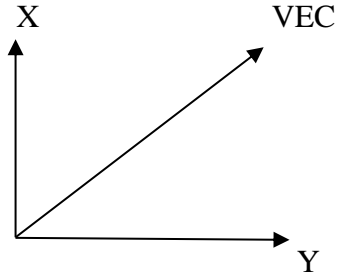


Resim 5.5.1. Zeiss Cell Observer Spinning Disk Time-Lapse Microscope

5.6. Analiz

Kuvvet ölçümü ekranında çıkan değerler “.csv” uzantılı belgede kaydedilir. Bu dosya MicrosoftExcel ile açılabilir. Dosyanın içinde fotoğraf numaraları, zamanları, x ve y eksenlerinde kütle merkezleri, lazerin gücü, hareket hızı, x ve y

eksenlerindeki yer değiştirmeler (piksel ve nanometre olarak) ve x ve y eksenlerindeki kuvvetler vardır. Analiz olarak x ve y eksenlerindeki kuvvetlerinin vektörel toplamları alındı ($x^2 + y^2 = \text{vec}^2$).



Vektörel (vec) toplamların ortalamaları alındı. Aksotomi öncesi ve sonrası kortikal ve lateral kuvvetler ayrı ayrı hesaplanıp ayrı bir dosyaya kaydedildi. Parlaklık ölçülmeyen gruplarda direk olarak değerler IBM SPSS programında korelasyon analizine tabi tutuldu. Parlaklık ölçülen gruplarda ise parlaklık ZENBlue yazılımı kullanılarak ölçüldü. Yazılım seçilen bölgedeki parlaklığı direkt olarak verdi. Parlaklık ölçülen gruplarda değerlerin yanı sıra değerlerdeki değişim de korelasyon analizine tabi tutuldu. Değişim ise

$$\frac{(\text{aksotomi sonrası değer} - \text{aksotomi öncesi değer})}{\text{aksotomi öncesi değer}}$$

formülü ile hesaplandı.

Çalışmamızda özetle arka kök gangliyonu nöronları üzerinde aşağıdaki deney grupları ile ölçümler yapıldı:

- A- Kuvvet ölçüm grubu: Besiyeri olarak kültür besiyeri kullanıldı. %10'luk pll kaplı polystrene boncuklar (bead) kullanıldı. PALM sisteminde 100X büyütmede aksotomi yapıldı. Aynı objektifle hücrelerin aksotomi öncesi ve sonrasında kuvvet ölçümleri yapıldı.
- B- BDM: 50 milimolar BDM kültür besiyerinin içine eklendi. %1'luk pll kaplı polystrene boncuklar (bead) kullanıldı. PALM sisteminde 100X büyütmede aksotomi yapıldı. Aynı objektifle hücrelerin aksotomi öncesi ve sonrasında kuvvet ölçümleri yapıldı.
- C- Blebbistatin ölçüm grubu: 100 mikromolar blebbistatin kültür besiyerinin içine eklendi. %1, %5 ve %10'luk pll kaplı polystrene boncuklar (bead) 3

ayrı grup olarak kullanıldı. PALM sisteminde 100X büyütmede aksotomi yapıldı. Aynı objektifle hücrelerin aksotomi öncesi ve sonrasında kuvvet ölçümlerinin yapılması denendi.

D- Kalsiyumsuz ölçüm grubunda, kalsiyumsuz besiyeri ve EDTA kullanımı iki ayrı grup olarak hazırlandı. Gruplarda %1, %5 ve %10'luk pll kaplı polystrene boncuklar (bead) 3 ayrı grup olarak kullanıldı. PALM sisteminde 100X büyütmede aksotomi yapıldı. Aynı objektifle hücrelerin aksotomi öncesi ve sonrasında kuvvet ölçümlerinin yapılması denendi.

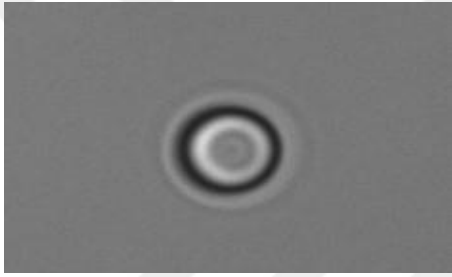
E- Kaspaz-3/7 ölçüm grubunda kültür besiyerine Kaspaz-3/7 eklendi. 30 dakika 37°'de inkübe edildi. Hücreler boyandıktan sonra %10'luk pll kaplı polystrene boncuklar (bead) eklendi. Aksotomi öncesinde Spinning Disk mikroskopta ilgilenen hücrenin parlaklığı 63X büyütmede ölçüldü. PALM sisteminde aksotomi öncesi ve sonrası kuvvet ölçüldü. Aksotomi işlemi ve kuvvet ölçümleri 100X büyütmede yapıldı. Aksotomi ve ölçüm sonrası parlaklık yine Spinning Disk sistemi ile ölçüldü.

F- Kontrol (Sham) grubunda Kaspaz-3/7 eklendikten sonra aksotomi öncesi ve sonrasında ölçüm yapılmadan Kaspaz seviyesi bakıldı.

6.BULGULAR

6.1.Boncuk kalibrasyonu ve hücreye yapıştırılması

Boncuklar(bead) tutucu(trap) tarafından tutuldu (Şekil 6.1.1). Tutulan boncuğun etrafında başka boncuklar olmamasına ve yüzeyin pürüzsüzlüğüne dikkat edildi. Tutulan boncuk cihaza girilen kalibrasyon protokolüne uygun olarak sağa-sola ve aşağı yukarı (x ve y ekseninde) hareket ettirildi. Harekete bağımlı olarak x ve y eksenlerinde sapmalar hesaplandı. Bu değerlere bağılı olarak tutucu esnemezliği(trap stiffness) x(Tablo 6.1.1) ve y(Tablo 6.1.2) eksenlerinde yazılım tarafından hesaplandı.



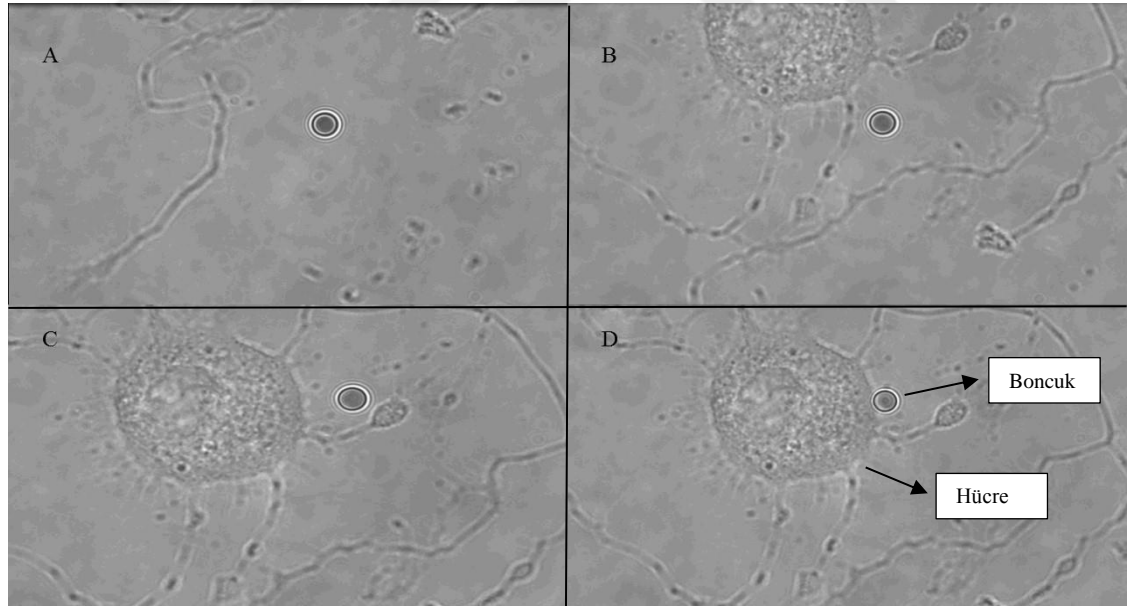
Şekil 6.1.1. Tutucu tarafından kalibrasyon için tutulan boncuk

Tablo 6.1.1. x ekseninde tutucu esnemezliği hesaplanması (nm:nanometre,F:kuvvet)

Yer değiştirme	X [piksel]	Y [piksel]	X [nm]	Y [nm]
0	0.021	0.006	0.948	0.257
1	0.064	0.005	2.892	0.212
2	0.042	0.004	1.883	0.175
3	0.055	0.004	2.450	0.180
4	0.061	0.001	2.757	0.049
5	0.058	0.007	2.588	0.305
6	0.068	0.013	3.068	0.588
7	0.056	0.014	2.508	0.636
Yer değiştirme ortalaması	0.053	0.007	2.387	0.300
Standart sapma	0.015	0.005	0.680	0.207
Trap2: pozisyon (x,y): 10771, 10126				
Normalize Tutucu esnemezliği: $k = F / x$: 10.4741 pN/ μ m * P lazer gücü için P [%]				

Tablo 6.1.2. y ekseninde tutucu esnemezliği hesaplanması (nm:nanometre,F:kuvvet)

Yer değiştirme	X [pixel]	Y [pixel]	X [nm]	Y [nm]
0	0.021	0.047	0.928	2.054
1	0.021	0.078	0.924	3.429
2	0.010	0.037	0.462	1.637
3	0.016	0.077	0.738	3.387
4	0.013	0.042	0.595	1.865
5	0.009	0.080	0.412	3.510
6	0.001	0.045	0.063	2.003
7	0.003	0.077	0.136	3.395
Yer değiştirme ortalaması	0.012	0.060	0.532	2.660
Standart sapma	0.007	0.019	0.328	0.833
Trap2: position (x,y): 10771, 10126				
Normalize Tutucu esnemezliği: $k = F / y$: 9.3988 pN/ μm * P lazer g¼c¼ için P [%]				

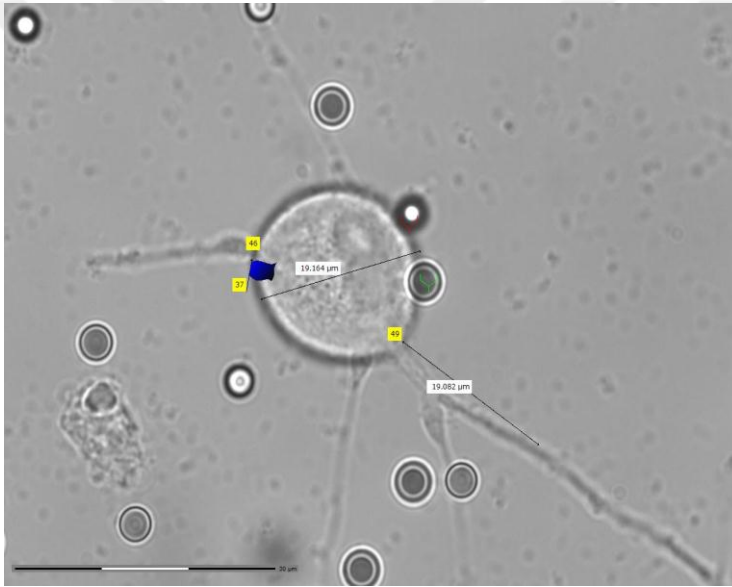


şekil 6.1.2. Boncuk tutucu tarafından tutuldu (A). Boncuk h¼crenin uygun tarafına doğru hareket ettirildi (B,C). Boncuk h¼creye yapıştırıldı (D) (100X).

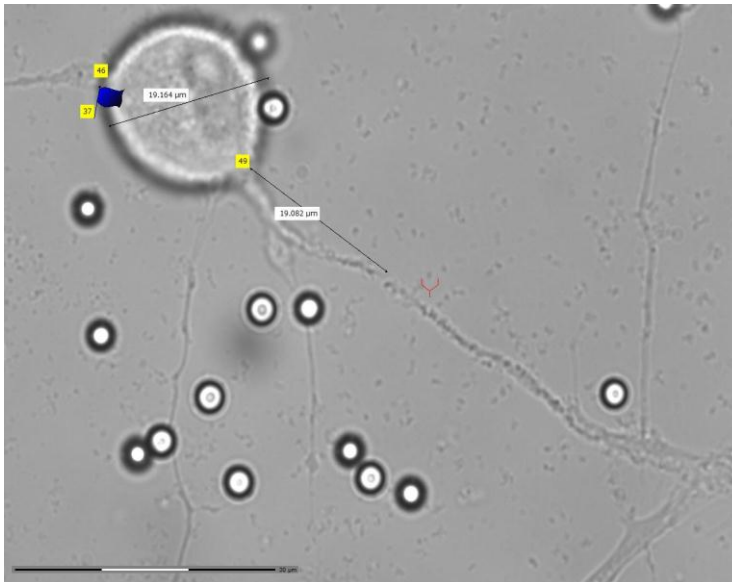
Kalibrasyon yapıldıktan sonra başka bir boncuk tutucu tarafından yakalandı. Tutucu ile hareket ettirilen boncuk hücrenin ilgilenilen yerine yapıştırıldı (Şekil 6.1.2.A-D).

6.2.Lateral ölçüm (2 boncukla)

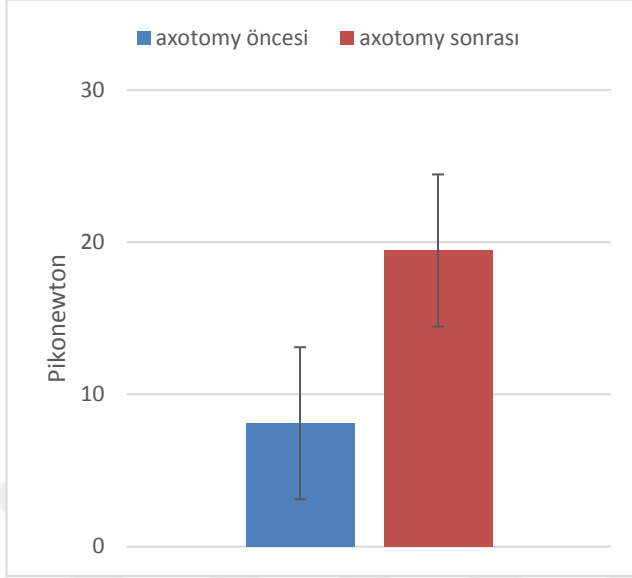
Deney grubu olarak öncelikle iki boncuk kullanıldı. Boncuk yerleşimi lateral ölçüm yapacak şekilde ayarlandı (Resim 6.2.1 ve Resim 6.2.2). Aksotomi öncesi ve sonrası ölçüm süresi için başlangıç olarak 5 saniye belirlendi. 5 saniyelik ölçümde, hücrelerin ilk saniyedeki tepkilerine bakıldı (Şekil 6.2.1). İstatistiksel olarak daha güvenilir sonuçlar almak için analiz süresinin arttırılmasına karar verildi.



Resim 6.2.1. Aksotomi öncesi lateral kuvvet ölçümü için boncuk yerleşimi(Ölçek çubuğu =30 µm)



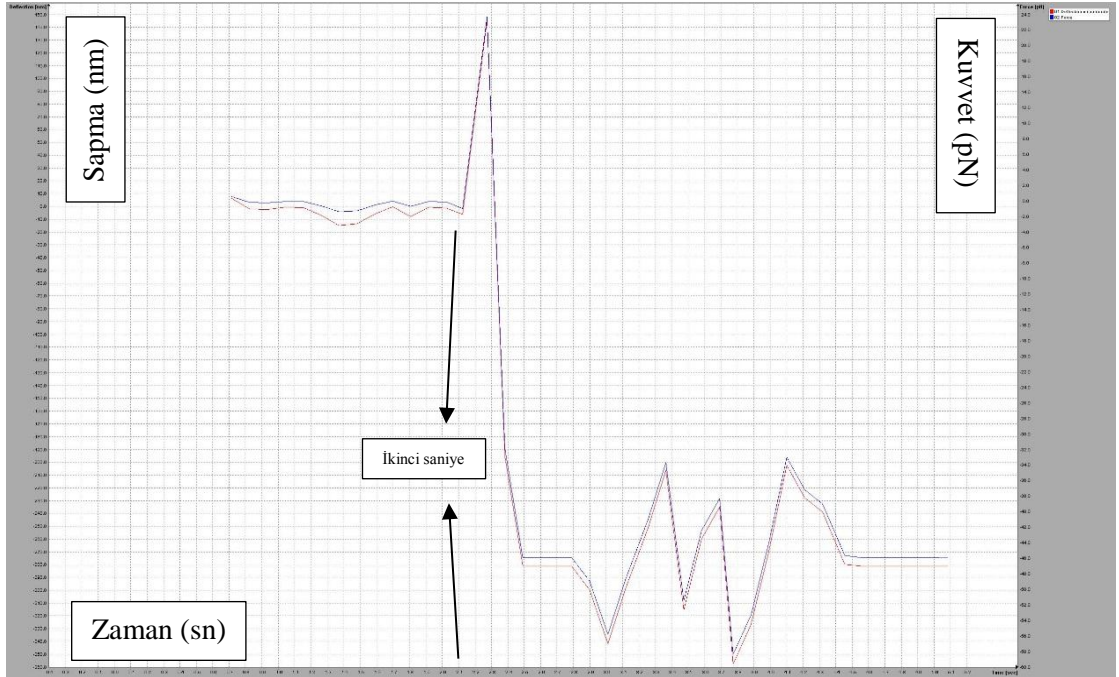
Resim 6.2.2. Aksotomi sonrası boncuk yerleşimini değiştirmeden yapılan lateral kuvvet ölçümü(Ölçek çubuğu =30 µm)

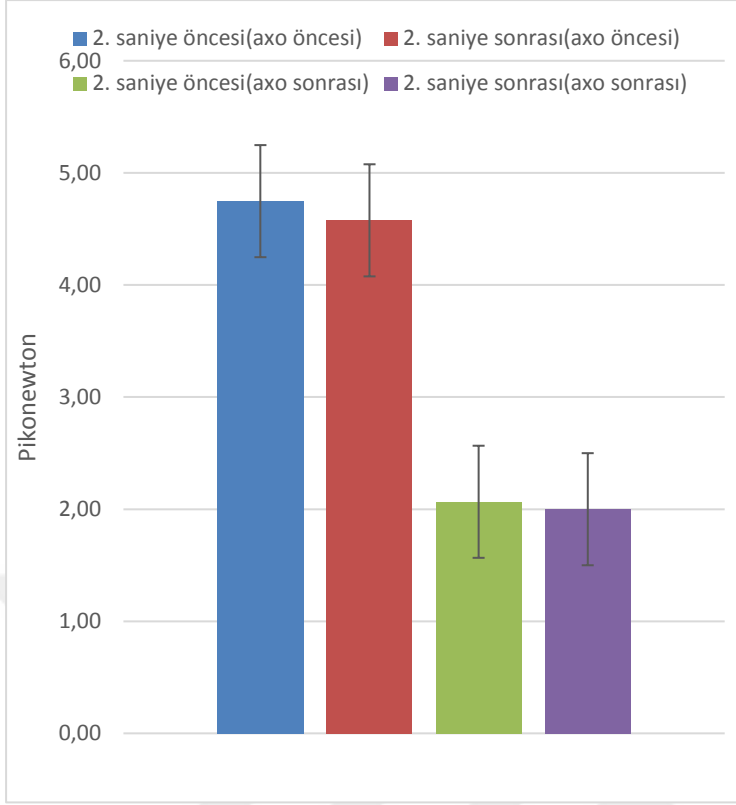


Şekil 6.2.1. Aksotomi öncesi ve sonrası yapılan lateral ölçümlerdeki ilk saniye verilerinin karşılaştırılması.

Beş saniyelik yapılan ölçümlerde ikinci saniyede kuvvetin değişmeye başladığı gözlemlendi (Tablo 6.2). Aksotomi öncesi ve sonrasında ikinci saniyeden önce ve sonra analiz yapıldı (Şekil 6.2.2). Bu verilerin de istatistiksel olarak güvenilir olmayacağı kanaatine varıldı ve kuvvet ölçümü sürelerinin uzatılmasına karar verildi.

Tablo 6.2. Kuvvet ölçümünde ikinci saniyeden sonraki değişim

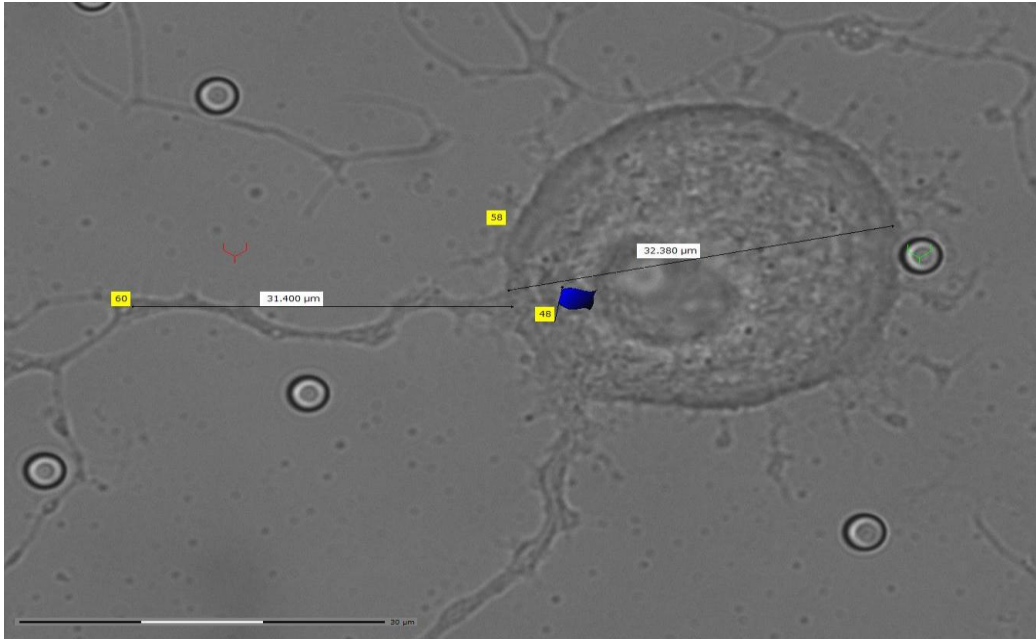




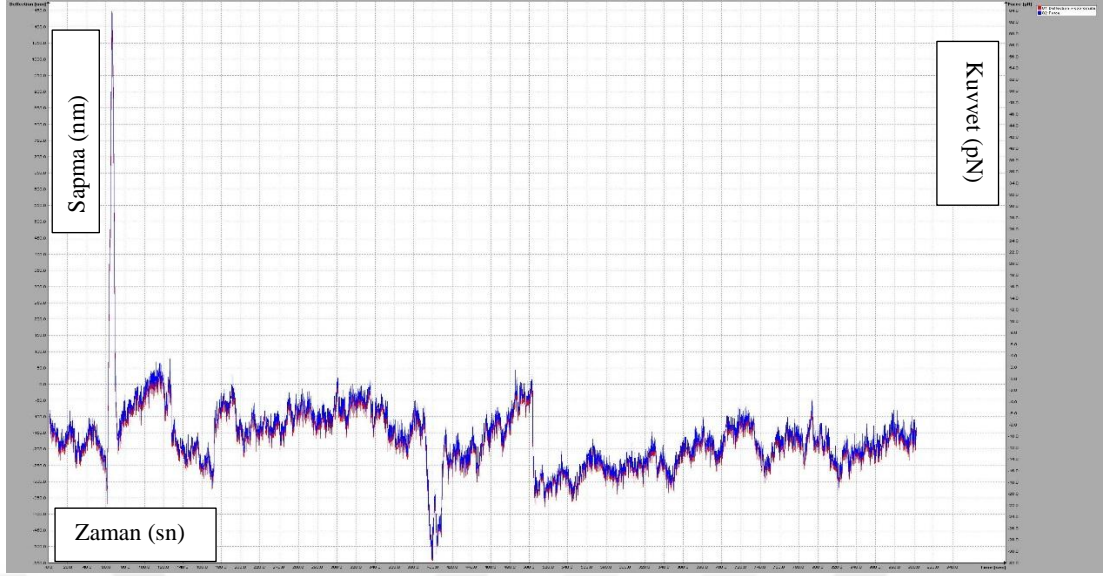
Şekil 6.2.2. Aksotomi öncesi ve sonrasında ikinci saniyeden önceki ve sonraki verilerin karşılaştırılması

6.3. Kortikal ölçüm (Tek boncukla)

Kortikal ölçüm yapmak için bir boncuk hücrenin uygun bölgesine yapıştırıldı (Resim 6.3). 15 dakika boyunca kortikal ölçüm dağılımına bakıldı (Şekil 6.3.1).

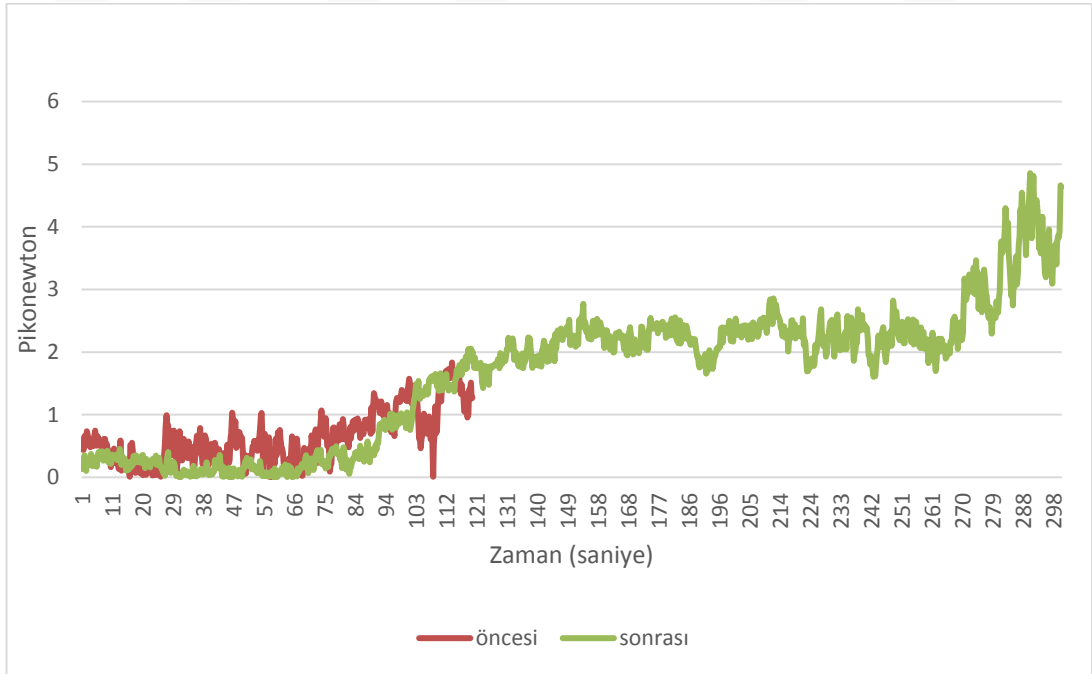


Resim 6.3. Kortikal kuvvet ölçümü için boncuk yerleşimi(Ölçek çubuğu =30 µm)

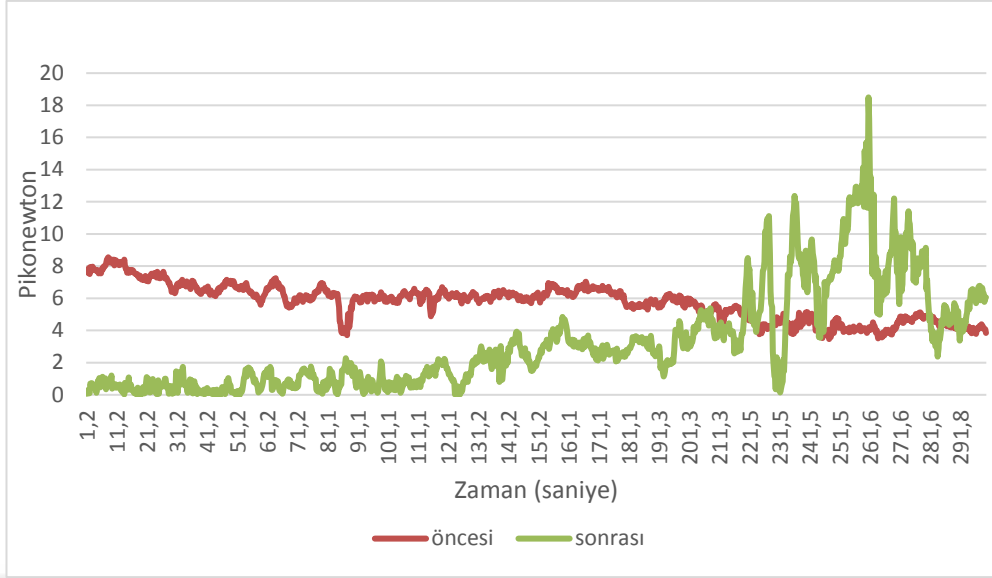


Şekil 6.3.1. Kortikal kuvvet ölçüm dağılımı (15 dakika)

Kortikal ölçüm için, tek boncukla, aksotomi öncesi 120 saniye-aksotomi sonrası 300 saniye ve aksotomi öncesi 300 saniye-aksotomi sonrası 300 saniye zaman grupları denendi. İki grubun da aksotomi öncesi ve sonrası kuvvet dağılımları karşılaştırıldı (Şekil 6.3.2 ve Şekil 6.3.3).



Şekil 6.3.2. Kortikal kuvvet ölçüm dağılımı (aksotomi öncesi 120 saniye-aksotomi sonrası 300 saniye)



Şekil 6.3.3. Kortikal kuvvet ölçüm dağılımı (aksotomi öncesi 300 saniye-aksotomi sonrası 300 saniye)

6.4. Aynı hücrede lateral kuvvet ve kortikal kuvvet ölçümü

6.4.1. Kuvvet ölçüm grubu

Daha önce yapılan deneylerde aynı hücrede kuvvetler ölçülmemişti. Aynı hücrede kortikal ve lateral kuvvet ölçmek için hücreye üç boncuk yerleştirildi (Resim 6.4.1.1 ve Resim 6.4.1.2). Lateral ölçüm için 1 dakika kortikal ölçüm için ise 10 dakika ölçüm yapılmaya karar verildi. Deney düzeneği olarak, aksotomi öncesi lateral ölçüm (1 dakika), aksotomi öncesi kortikal ölçüm (10 dakika), aksotomi, aksotomi sonrası kortikal ölçüm (10 dakika) ve aksotomi sonrası lateral ölçüm (1 dakika) olarak belirlendi.

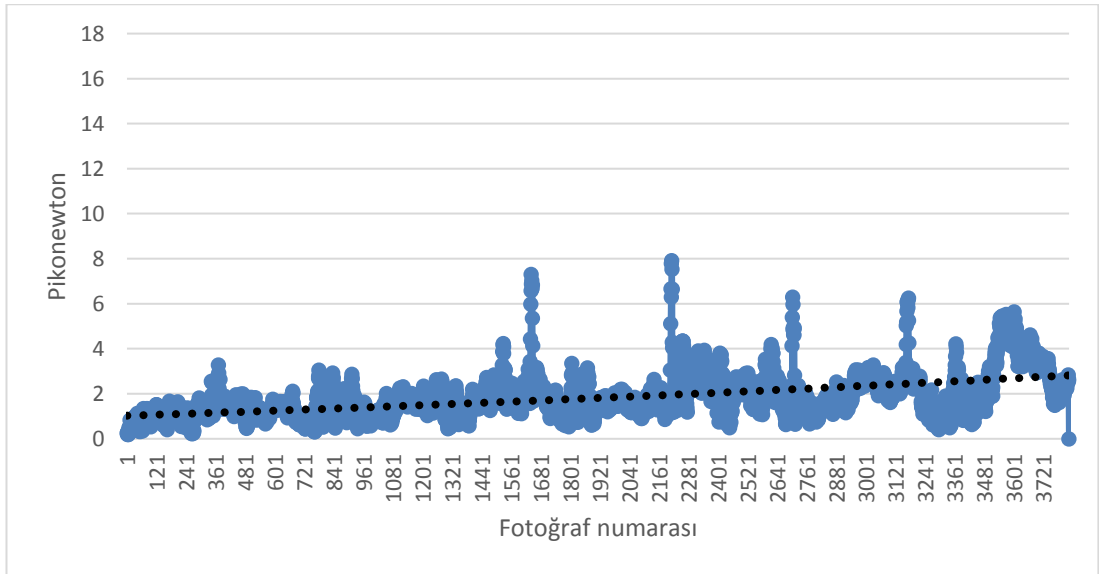


Resim 6.4.1.1. Aksotomi öncesi aynı hücre üzerinde üç boncuk yerleşimi (Ölçek çubuğu =30 μ m)

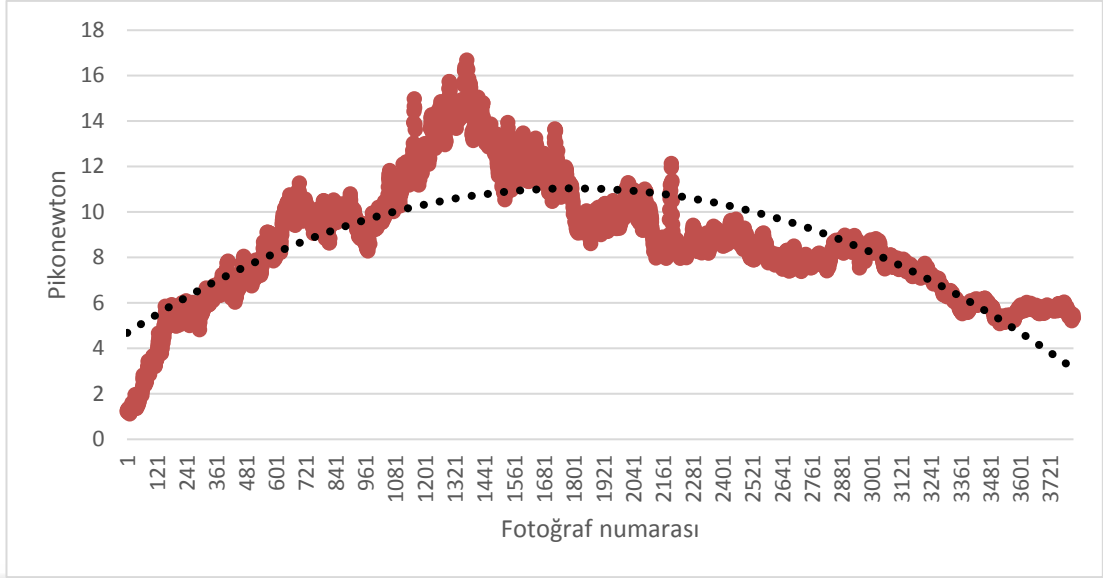


Resim 6.4.1.2.
Aksotomi sonrası aynı hücre üzerinde üç boncuk yerleşimi (Ölçek çubuğu =30μm)

Aynı hücrede lateral ve kortikal kuvvetler ölçüldü. Ölçülen kuvvetlerin vektörel toplamları alındı. Kortikal kuvvetler için aksotomi öncesi sabit değerli bir grafik beklenirken, aksotomi sonrasında ise önce artan sonra azalan bir grafik bekleniyordu (Şekil 6.4.1.1 ve Şekil 6.4.1.2). Fakat ölçülen hücrelerin %86'sı bu seyirde grafikler göstermedi (n=14). Aksotomi sonrası hücrelerin % 36'sında lateral kuvvetler artarken; aksotomi sonrası hücrelerin % 36'sında kortikal kuvvetler azalmıştır.



Şekil 6.4.1.1. Aksotomi öncesi kortikal kuvvet dağılımı (10 dakika)



Şekil 6.4.1.2. Aksotomi sonrası kortikal kuvvet dağılımı (10 dakika)

Lateral ve kortikal kuvvetler için ölçüm süreleri optimize edilmiş oldu. İlk sonuçlara göre kuvvetlerde değişim gözlemlendi. Örnek sayısının artırılmasına karar verildi. Kuvvet ölçümünün yanı sıra, hücrelerde aksotomi sonrası meydana gelen alan değişiminin de ölçülmesi gerekli idi. Hücrelerde aksotomi öncesi ve sonrası kortikal kuvvet, lateral kuvvet ve alan ölçümü yapıldı (n=48) (Tablo 6.4.1.1). Bu değerlere bağlı olarak lateral kuvvet değişimi, kortikal kuvvet değişimi, alan değişimi, mutlak lateral kuvvet değişimi, mutlak kortikal kuvvet değişimi ve mutlak alan değişimi hesaplandı (n=48) (Tablo 6.4.1.2)

Tablo 6.4.1.1. Hücrelerde aksotomi öncesi ve sonrası kortikal kuvvet, lateral kuvvet ve alan ölçümleri (n=48).

Aksotomi öncesi lateral kuvvet(pN)	Aksotomi öncesi kortikal kuvvet (pN)	Aksotomi öncesi alan (μm^2)	Aksotomi sonrası lateral kuvvet(pN)	Aksotomi sonrası kortikal kuvvet(pN)	Aksotomi sonrası alan (μm^2)
4,65	6,27	227,62	1,68	7,61	222,88
0,14	0,46	248,15	0,11	0,8	233,61
0,05	3,56	189,1	0,61	0,78	182,42
0,07	1,28	531,86	0,06	1,1	449,46
0,97	1,72	768,1	1,12	6,94	710,98

10,23	3,11	408,31	1,61	4,11	362,35
0,83	0,54	717,11	0,31	0,45	708,48
9,79	17,83	605,39	8,59	22,36	542,39
0,92	4,27	478,32	0,16	3,88	475,53
2,09	2,17	396,76	1,38	3,14	373,76
1,71	0,94	468,87	1,02	0,81	456,98
1,15	4,08	832,69	0,98	10,37	658,89
2,73	0,56	277,25	0,26	1,43	273,56
0,25	1,23	459,86	1,28	1,07	444,2
0,15	1,01	376,43	0,25	0,24	329,88
0,54	0,42	248,32	0,24	0,75	205,37
0,35	6,77	300,28	0,15	5,01	257,56
1,59	3,26	614,16	2,14	4,50	549,46
5,66	6,07	485,32	2,88	3,97	412,57
2,56	3,41	151,11	1,22	7,30	138,83
1,68	2,99	861,65	6,49	3,55	850,75
3,97	0,47	591,20	0,60	0,79	571,60
0,09	1,20	550,60	0,18	0,87	509,03
0,47	0,28	545,60	2,04	0,58	513,88
0,77	3,48	275,05	0,55	1,87	236,22
0,93	0,67	486,19	0,06	1,73	389,39
0,81	1,85	421,56	0,47	8,64	399,77
2,776168	4,702135	833,47	2,641211	6,498718	755,71
3,535339	5,127725	281,88	5,725164	7,245013	275,01
48,34357	5,151526	341,11	2,025103	7,98419	322,51
2,810002	3,825432	450,48	18,30533	2,991785	428,8
1,99838	3,898362	863,88	40,05665	6,575321	708,18
0,890625	0,734997	736,75	0,275868	1,091051	718,58
4,289047	2,805569	627,2	1,955312	9,024407	576,26
0,168757	0,25498	283,6	0,338318	0,742841	238,35
2,59876	10,01928	558,8	1,176561	2,982844	508,26

0,052131	0,029523	255,4	0,012361	0,052107	226,66
0,14442	0,141936	438,58	0,04031	0,047529	404,13
0,033737	0,416657	893,28	0,39122	0,772388	754,99
1,265126	1,477894	153,1	4,035679	2,394754	137,93
26,63273	40,11189	766,72	7,990673	38,35375	663,83
0,296491	3,663079	439,87	3,242791	1,355385	400,89
4,997652	2,468107	498,01	1,435651	0,838709	450,56
1,028966	3,966267	469,27	0,301045	2,061178	427,89
1,686029	1,080874	358,74	0,275457	0,189555	320,12
4,16772	8,389093	367,64	2,883137	5,753891	329
7,509298	4,231818	982,09	1,412231	1,534609	899,81
0,15964	0,249792	407,32	0,204796	0,383464	385,6

Tablo 6.4.1.2. Hücrelerde lateral kuvvet değişimi, kortikal kuvvet değişimi, alan değişimi, mutlak lateral kuvvet değişimi, mutlak kortikal kuvvet değişimi ve mutlak alan değişimi verileri (n=48).

Lateral kuvvet değişimi	Kortikal kuvvet değişimi	Alan değişimi	Mutlak kortikal kuvvet değişimi	Mutlak lateral kuvvet değişimi	Mutlak alan değişimi
-0,638709677	0,213716108	-0,020824181	1,34	-2,97	-4,74
-0,214285714	0,739130435	-0,058593593	0,34	-0,03	-14,54
11,2	-0,78089888	-0,035325225	-2,78	0,56	-6,68
-0,142857143	-0,140625	-0,154927989	-0,18	-0,01	-82,4
0,154639175	3,034883721	-0,074365317	5,22	0,15	-57,12
-0,842619746	0,321543408	-0,112561534	1	-8,62	-45,96
-0,626506024	-0,16666667	-0,012034416	-0,09	-0,52	-8,63
-0,122574055	0,254066181	-0,104065148	4,53	-1,2	-63
-0,826086957	-0,09133489	-0,005832915	-0,39	-0,76	-2,79
-0,339712919	0,447004608	-0,057969553	0,97	-0,71	-23

-0,403508772	-0,13829787	-0,025358841	-0,13	-0,69	-11,89
-0,147826087	1,541666667	-0,208721133	6,29	-0,17	-173,8
-0,904761905	1,553571429	-0,013309288	0,87	-2,47	-3,69
4,12	-0,1300813	-0,034053842	-0,16	1,03	-15,66
0,666666667	-0,76237624	-0,12366177	-0,77	0,1	-46,55
-0,555555556	0,785714286	-0,172962307	0,33	-0,3	-42,95
-0,571428571	-0,25997046	-0,142267217	-1,76	-0,2	-42,72
0,350126464	0,380415811	-0,105347141	1,241071	0,555971	-64,7
-0,490424805	-0,34574668	-0,149901096	-2,09904	-2,77602	-72,75
-0,523334458	1,14198143	-0,081265303	3,892898	-1,34161	-12,28
2,8538334	0,189255955	-0,012650148	0,565193	4,805877	-10,9
-0,848044475	0,656171691	-0,033152909	0,311397	-3,36431	-19,6
0,908922897	-0,27408681	-0,075499455	-0,32933	0,083738	-41,57
3,38057422	1,064744954	-0,05813783	0,296913	1,573312	-31,72
-0,295898609	-0,46146027	-0,141174332	-1,60637	-0,22924	-38,83
-0,937916175	1,602824651	-0,199099118	1,067137	-0,87319	-96,8
-0,412662235	3,673046378	-0,051691337	6,792032	-0,33288	-21,791
-0,048612625	0,382078095	-0,093296699	1,796583	-0,13496	-77,76
0,619410084	0,412909796	-0,024372073	2,117288	2,189825	-6,87
-0,958110185	0,549868961	-0,054527865	2,832664	-46,3185	-18,6
5,514349388	-0,21792237	-0,048126443	-0,83365	15,49533	-21,68
19,0445587	0,68668798	-0,180233366	2,676958	38,05827	-155,7
-0,690253828	0,484429486	-0,024662369	0,356054	-0,61476	-18,17
-0,544115173	2,216604844	-0,081218112	6,218838	-2,33374	-50,94
1,004767599	1,913331501	-0,159555712	0,487861	0,169562	-45,25
-0,547260735	-0,70228951	-0,090443808	-7,03643	-1,4222	-50,54
-0,762887972	0,764931184	-0,112529366	0,022583	-0,03977	-28,74
-0,720886645	-0,66514155	-0,078548953	-0,09441	-0,10411	-34,45
10,59600667	0,853773945	-0,154811481	0,355731	0,357483	-138,29
2,189942692	0,620382729	-0,099085565	0,91686	2,770553	-15,17
-0,699967926	-0,04383081	-0,134195013	-1,75814	-18,6421	-102,89

9,937224342	-0,62998739	-0,088617091	-2,30769	2,9463	-38,98
-0,71273498	-0,66018116	-0,095279211	-1,6294	-3,562	-47,45
-0,707429285	-0,48032289	-0,088179513	-1,90509	-0,72792	-41,38
-0,836623885	-0,82462785	-0,107654569	-0,89132	-1,41057	-38,62
-0,308222123	-0,31412241	-0,105102818	-2,6352	-1,28458	-38,64
-0,811935642	-0,6373642	-0,083780509	-2,69721	-6,09707	-82,28
0,282863652	0,535132117	-0,053324168	0,133672	0,045156	-21,72

Lateral kuvvetlerde aksotomi öncesi-sonrası, kortikal kuvvetlerde aksotomi öncesi-sonrası ve alan ölçümünde aksotomi öncesi-sonrası ikili t testleri (paired t test) yapıldı. Aksotomi sonrası lateral kuvvetlerde ve alanda azalma, kortikal kuvvetlerde artma görüldü. (Tablo 6.4.1.3). Alan ölçümü hariç ($p < 0.01$) kuvvet ölçümlerinde anlamlı fark görülmedi ($n=48$).

Tablo 6.4.1.3. Ölçülen kuvvetler ve alanların ortalamaları ve t-test sonucu anlamlılık değerleri.

	Ortalama	n	Anlamlılık
Aksotomi öncesi lateral kuvvet	3,5528	48	0,559
Aksotomi sonrası lateral kuvvet	2,7326	48	
Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	3,8051	48	0,246
Aksotomi sonrası kortikal kuvvet	4,2401	48	
Aksotomi öncesi alan	490,0844	48	0
Aksotomi sonrası alan	445,6848	48	

Hücrelerde ölçülen ve hesaplanan bütün parametrelerle IBM SPSS'de korelasyon analizi yapıldı. Korelasyon analizi sonuçlarına göre aksotomi öncesi-sonrası lateral kuvvetler anlamlı olarak korele olmadığı görüldü. Aksotomi öncesi-

sonrası kortikal kuvvetler ve alan anlamlı olarak korele çıktı (Tablo 6.4.1.4) (n=48) (p<0.01). Korelasyon analizine tabi tutulan diğer parametrelerden de korele çıkan değişkenler oldu (Tablo 6.4.1.5).

Tablo 6.4.1.4. Ölçülen kuvvetler ve alanların korelasyon katsayıları ve korelasyon testi sonucu anlamlılık değerleri (p<0.01).

	n	Korelasyon	Anlamlılık
Aksotomi öncesi & sonrası lateral kuvvet	48	0,089	0,55
Aksotomi öncesi & sonrası kortikal kuvvet	48	0,918	0
Aksotomi öncesi & sonrası alan	48	0,987	0

Tablo 6.4.1.5. Ölçülen ve hesaplanan değerlerin korelasyon testi sonucu anlamlılık değerleri (p<0.01** ve p<0.05*).

		Aksotomi öncesi lateral kuvvet	Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Aksotomi öncesi alan	Aksotomi sonrası lateral kuvvet
Aksotomi öncesi lateral kuvvet	Pearson Korelasyonu	1	,506**	0,044	0,089
	Anlamlılık		0	0,767	0,55
	N	48	48	48	48
Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	,506**	1	0,199	0,22
	Anlamlılık	0		0,175	0,132
	N	48	48	48	48
Aksotomi öncesi alan	Pearson Korelasyonu	0,044	0,199	1	0,284
	Anlamlılık	0,767	0,175		0,05

	N	48	48	48	48
Aksotomi sonrası lateral kuvvet	Pearson Korelasyonu	0,089	0,22	0,284	1
	Anlamlılık	0,55	0,132	0,05	
	N	48	48	48	48
Aksotomi sonrası kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	,525**	,918**	0,243	0,262
	Anlamlılık	0	0	0,097	0,073
	N	48	48	48	48
Aksotomi sonrası alan	Pearson Korelasyonu	0,041	0,17	,987**	0,242
	Anlamlılık	0,78	0,247	0	0,097
	N	48	48	48	48
Lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,161	-0,076	0,198	,669**
	Anlamlılık	0,275	0,61	0,178	0
	N	48	48	48	48
Kortikal kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,036	-0,171	0,062	-0,019
	Anlamlılık	0,808	0,245	0,674	0,897
	N	48	48	48	48
Alan değişimi	Pearson Korelasyonu	0,03	-0,144	-0,118	-0,168
	Anlamlılık	0,838	0,329	0,426	0,254
	N	48	48	48	48
Mutlak kortikal kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	0,086	-0,128	0,124	0,12
	Anlamlılık	0,561	0,386	0,399	0,417
	N	48	48	48	48

Mutlak lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	-,757**	-0,268	0,151	,584**
	Anlamlılık	0	0,065	0,307	0
	N	48	48	48	48
Mutlak alan değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,037	-0,253	-,614**	-,366*
	Anlamlılık	0,801	0,083	0	0,011
	N	48	48	48	48

		Aksotomi sonrası kortikal kuvvet	Aksotomi sonrası alan	Lateral kuvvet değişimi	Kortikal kuvvet değişimi
Aksotomi öncesi lateral kuvvet	Pearson Korelasyonu	,525**	0,041	-0,161	-0,036
	Anlamlılık	0	0,78	0,275	0,808
	N	48	48	48	48
Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	,918**	0,17	-0,076	-0,171
	Anlamlılık	0	0,247	0,61	0,245
	N	48	48	48	48
Aksotomi öncesi alan	Pearson Korelasyonu	0,243	,987**	0,198	0,062
	Anlamlılık	0,097	0	0,178	0,674
	N	48	48	48	48
Aksotomi sonrası	Pearson Korelasyonu	0,262	0,242	,669**	-0,019

lateral kuvvet	Anlamlılık	0,073	0,097	0	0,897
	N	48	48	48	48
Aksotomi sonrası kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	1	0,207	-0,094	0,146
	Anlamlılık		0,157	0,526	0,323
	N	48	48	48	48
Aksotomi sonrası alan	Pearson Korelasyonu	0,207	1	0,156	0,046
	Anlamlılık	0,157		0,291	0,754
	N	48	48	48	48
Lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,094	0,156	1	-0,076
	Anlamlılık	0,526	0,291		0,606
	N	48	48	48	48
Kortikal kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	0,146	0,046	-0,076	1
	Anlamlılık	0,323	0,754	0,606	
	N	48	48	48	48
Alan değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,15	0,028	-0,129	-0,069
	Anlamlılık	0,308	0,85	0,382	0,639
	N	48	48	48	48
Mutlak kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	0,276	0,106	-0,051	,780**
	Anlamlılık	0,058	0,473	0,73	0

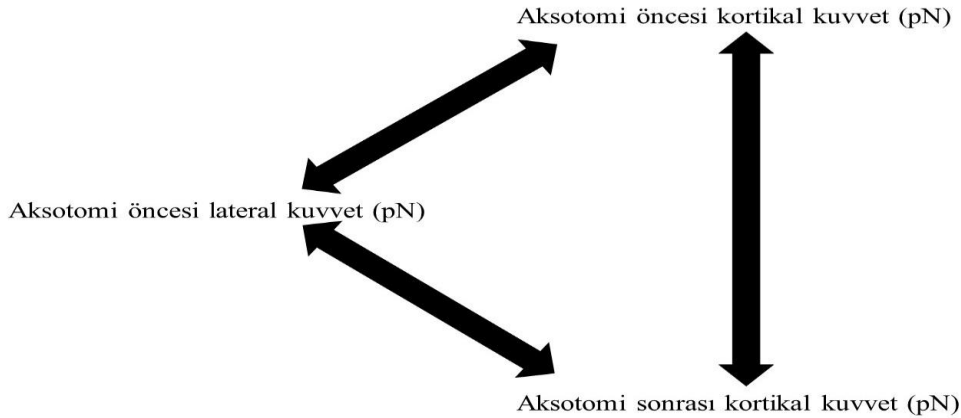
değişimi	N	48	48	48	48
Mutlak lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,256	0,125	,570**	0,017
	Anlamlılık	0,079	0,397	0	0,91
	N	48	48	48	48
Mutlak alan değişimi	Pearson Korelasyonu	-,309*	-,481**	-,319*	-0,114
	Anlamlılık	0,033	0,001	0,027	0,442
	N	48	48	48	48

		Alan değişimi	Mutlak kortikal kuvvet değişimi	Mutlak lateral kuvvet değişimi	Mutlak alan değişimi
Aksotomi öncesi lateral kuvvet	Pearson Korelasyonu	0,03	0,086	-,757**	-0,037
	Anlamlılık	0,838	0,561	0	0,801
	N	48	48	48	48
Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	-0,144	-0,128	-0,268	-0,253
	Anlamlılık	0,329	0,386	0,065	0,083
	N	48	48	48	48
Aksotomi öncesi alan	Pearson Korelasyonu	-0,118	0,124	0,151	-,614**
	Anlamlılık	0,426	0,399	0,307	0

	N	48	48	48	48
Aksotomi sonrası lateral kuvvet	Pearson Korelasyonu	-0,168	0,12	,584**	-,366*
	Anlamlılık	0,254	0,417	0	0,011
	N	48	48	48	48
Aksotomi sonrası kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	-0,15	0,276	-0,256	-,309*
	Anlamlılık	0,308	0,058	0,079	0,033
	N	48	48	48	48
Aksotomi sonrası alan	Pearson Korelasyonu	0,028	0,106	0,125	-,481**
	Anlamlılık	0,85	0,473	0,397	0,001
	N	48	48	48	48
Lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,129	-0,051	,570**	-,319*
	Anlamlılık	0,382	0,73	0	0,027
	N	48	48	48	48
Kortikal kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,069	,780**	0,017	-0,114
	Anlamlılık	0,639	0	0,91	0,442
	N	48	48	48	48
Alan değişimi	Pearson Korelasyonu	1	-0,027	-0,135	,792**
	Anlamlılık		0,854	0,361	0
	N	48	48	48	48

Mutlak kortikal kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,027	1	0,008	-0,16
	Anlamlılık	0,854		0,954	0,277
	N	48	48	48	48
Mutlak lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,135	0,008	1	-0,209
	Anlamlılık	0,361	0,954		0,153
	N	48	48	48	48
Mutlak alan değişimi	Pearson Korelasyonu	,792**	-0,16	-0,209	1
	Anlamlılık	0	0,277	0,153	
	N	48	48	48	48

Korelasyon testi sonuçlarına göre, aksotomi öncesi lateral kuvvet ile aksotomi öncesi kortikal kuvvet ve aksotomi sonrası lateral kuvvet pozitif korele (Şekil 6.4.1.3); aksotomi sonrası kortikal ve lateral kuvvet mutlak alan değişimi ile negatif korele ve lateral kuvvet değişimi ile mutlak alan değişimi negatif korele çıkmıştır. Yani aksotomi sonrası kortikal ve lateral kuvvetlerin artması hücre alanının azalması ile ilişkilidir.



Şekil 6.4.1.3. Ölçülen kuvvetlerin korelasyonu ($p < 0.01$).

6.4.2. BDM grubu

Deney düzeneğimizde ölçülen kuvvetlerde miyozinin rolünü anlamak için hücrelerdeki miyozinler inhibe edilerek ölçüm yapıldı (Tablo 6.4.2.1). Miyozin inhibisyonu için genel miyozin inhibitörü olan BDM (2.3 butanedione monoxime) kullanıldı. BDM, kuvvet ortalamalarını düşürdü ve istatistiksel anlamlılığını değiştirdi (Tablo 6.4.2.2).

Tablo 6.4.2.1. BDM eklenen hücrelerde aksotomi öncesi ve sonrasında lateral kuvvet, kortikal kuvvet ve alan ölçüm sonuçları.

Aksotomi öncesi lateral kuvvet	Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Aksotomi öncesi alan	Aksotomi sonrası lateral kuvvet	Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Aksotomi sonrası alan
4,94	11,24	735,98	5,40	11,38	584,05
6,91	13,08	422,77	13,57	10,98	398,25
3,70	4,26	289,67	1,85	5,42	325,92
3,11	3,20	172,16	2,08	3,89	168,60
0,67	3,43	655,47	0,93	1,98	585,22
0,48	0,54	408,42	0,31	0,47	373,40
0,92	0,85	628,97	0,18	1,31	595,12
1,80	2,80	776,61	0,74	3,80	759,20
0,52	0,45	176,71	3,26	0,63	178,07
0,12	0,34	787,01	1,18	0,63	726,98
0,85	4,14	478,23	0,28	2,44	441,15
0,52	0,09	236,68	0,32	0,46	245,76
1,46	0,80	551,33	2,51	1,41	533,37
6,64	1,10	392,41	3,17	1,80	372,99
1,42	0,33	548,97	0,94	1,28	544,39
1,68	2,39	327,69	0,48	4,88	391,13
1,24	0,39	492,39	1,09	2,28	413,62
0,94	1,25	491,36	1,17	1,75	434,15
0,71	0,84	230,62	0,39	2,24	191,74

0,72	1,05	577,83	0,80	2,67	517,01
0,68	2,41	333,06	0,08	0,67	326,67

Tablo 6.4.2.2. BDM eklenen hücrelerden ölçülen kuvvetler ve alanların ortalamaları ve t-test sonucu anlamlılık değerleri.

	Ortalama	n	Anlamlılık
Aksotomi öncesi lateral kuvvet	1,9066	21	0,939
Aksotomi sonrası lateral kuvvet	1,9395	21	
Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	2,6192	21	0,200
Aksotomi sonrası kortikal kuvvet	2,9705	21	
Aksotomi öncesi alan	462,5876	21	0,007
Aksotomi sonrası alan	433,6567	21	

6.4.3. Blebbistatin ölçüm grubu

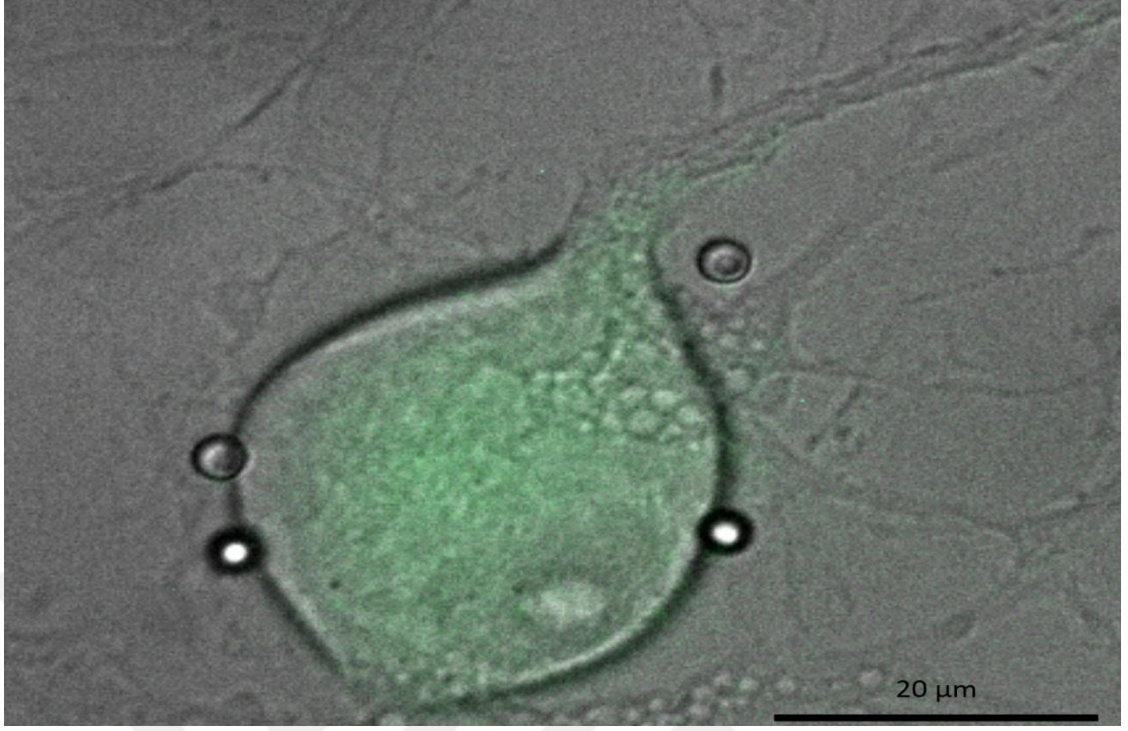
Blebbistatin miyozin II inhibitörüdür. AKG nöronlarında miyozin inhibisyonu için kullanıldı. Blebbistatin eklendikten sonra konulan boncuklar hareket ettiremedi. Dolayısıyla lateral ve kortikal kuvvet ölçüm yapılamadı.

6.4.4 Kalsiyumsuz ölçüm grubu

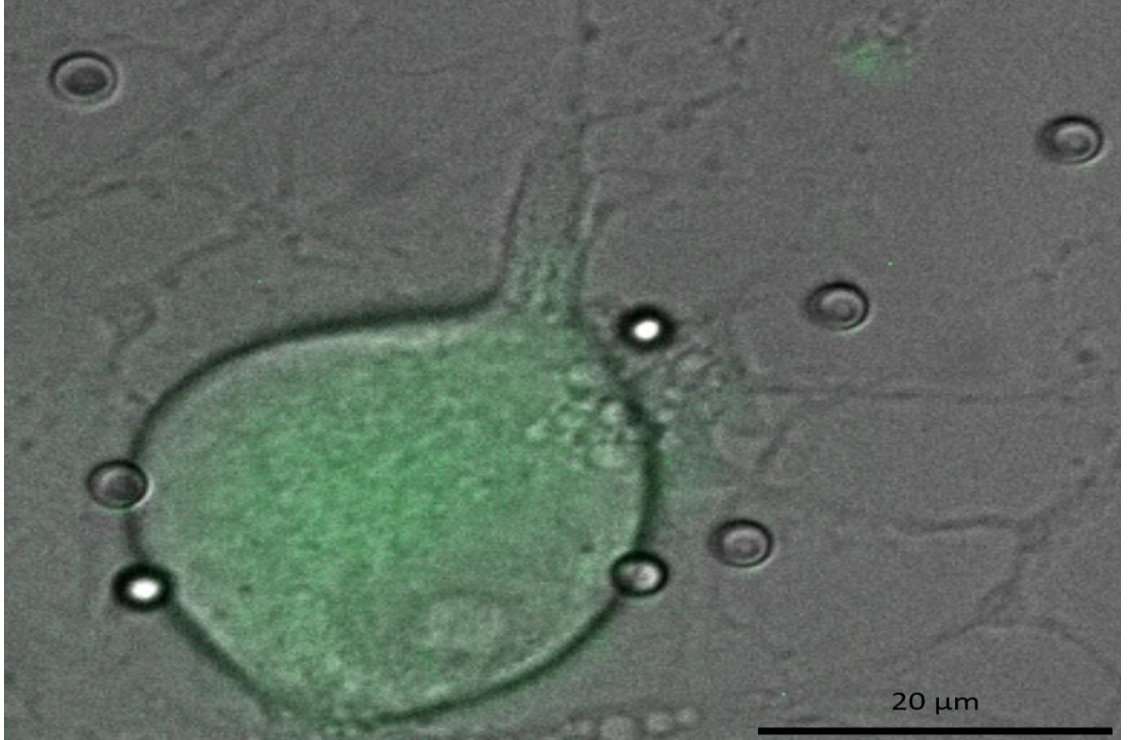
Kalsiyumun ölçülen kuvvetlere etkisine bakmak için farklı deney gruplarında kalsiyumsuz besiyeri ve EDTA kullanıldı. Her iki deney grubunda da boncuklar hareket ettiremedi ve kuvvet ölçümü yapılamadı.

6.4.5. Kaspaz-3/7 grubu

Hücrelerde aksotomi sonrası meydana gelen kuvvet ve alanlardaki değişimin mekanizmasını anlamak için Kaspaz-3/7 canlı boyası kullanıldı (Resim 6.4.5.1 ve Resim 6.4.5.2). Kaspaz-3/7 eklendikten sonra aksotomi öncesi-sonrası lateral kuvvet, kortikal kuvvet ve parlaklık ölçümleri yapıldı (Tablo 6.4.5.1) (n=21)(Not: Bu deney grubundan elde edilen kuvvet verileri kuvvet ölçüm grubunda da kullanılmıştır).



Resim 6.4.5.1. Aksotomi öncesi Kaspaz-3/7 eklenmiş AKG hücresi (Ölçek çubuğu=20μm).



Resim 6.4.5.2. Aksotomi sonrası AKG hücresinde Kaspaz-3/7 dağılımı (Ölçek çubuğu=20μm).

Tablo 6.4.5.1. Aksotomi öncesi-sonrası ölçülen kortikal kuvvet, lateral kuvvet, alan, Kaspaz-3/7 parlaklığı ve bunlara bağlı hesaplamalar.

Aksotomi öncesi lateral kuvvet	Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Aksotomi öncesi alan	Aksotomi öncesi parlaklık	Aksotomi sonrası lateral kuvvet	Aksotomi sonrası kortikal kuvvet
2,776167843	4,702135178	833,47	6371,959	2,641211037	6,498718032
3,535339198	5,127725376	281,88	6205,868	5,725163947	7,245013415
48,34357075	5,1515257	341,11	6319,353	2,025103249	7,984189785
2,810001616	3,8254319	450,48	5459,081	18,30533231	2,991784716
1,998380318	3,898362208	863,88	6345,077	40,05665159	6,575320679
0,89062461	0,734996743	736,75	5690,883	0,275867563	1,091050838
4,28904736	2,805569206	627,2	3900,332	1,955311613	9,024407498
0,168756961	0,254980005	283,6	6159,104	0,338318487	0,742841282
2,598759623	10,01927787	558,8	6033,477	1,176560522	2,982844139
0,052131249	0,029523271	255,4	841,093	0,012360946	0,052106542
0,144419932	0,141936475	438,58	1004,706	0,040309532	0,047528628
0,03373748	0,416656921	893,28	6358,586	0,391220039	0,772387745
1,265125721	1,477894256	153,1	3906,276	4,035678548	2,394754327
26,63272947	40,11188817	766,72	6240,939	7,990673067	38,35375144
0,296491218	3,663078728	439,87	5926,101	3,242790962	1,355385331
4,997652051	2,468106994	498,01	5533,71	1,435650617	0,838709257
1,028965908	3,966267111	469,27	6121,276	0,301045292	2,06117824

1,686029124	1,080873789	358,74	6407,588	0,275456888	0,189555159
4,167720214	8,389093322	367,64	5050,69	2,883136641	5,753891084
7,509298346	4,231818479	982,09	5460,533	1,412231375	1,534608869
0,159639699	0,249792018	407,32	5895,901	0,204795967	0,383463749

Aksotomi sonrası alan	Aksotomi sonrası parlaklık	Kortikal kuvvet değişimi	Lateral kuvvet değişimi	Parlaklık değişimi	Alan değişimi
755,71	6410,450	0,382078	-0,04861	0,006040685	-0,0933
275,01	5706,660	0,41291	0,61941	-0,080441286	-0,02437
322,51	5522,101	0,549869	-0,95811	-0,126160384	-0,05453
428,8	5837,969	-0,21792	5,514349	0,069405089	-0,04813
708,18	6286,065	0,686688	19,04456	-0,009300439	-0,18023
718,58	5915,468	0,484429	-0,69025	0,039463999	-0,02466
576,26	4160,011	2,216605	-0,54412	0,066578691	-0,08122
238,35	6406,356	1,913332	1,004768	0,040144151	-0,15956
508,26	6292,045	-0,70229	-0,54726	0,042855554	-0,09044
226,66	900,634	0,764931	-0,76289	0,070790032	-0,11253
404,13	970,631	-0,66514	-0,72089	-0,033915394	-0,07855
754,99	1046,684	0,853774	10,59601	-0,835390447	-0,15481
137,93	5228,231	0,620383	2,189943	0,338418227	-0,09909
663,83	6009,699	-0,04383	-0,69997	-0,037052117	-0,1342
400,89	6290,426	-0,62999	9,937224	0,061478027	-0,08862
450,56	6327,25	-0,66018	-0,71273	0,143401082	-0,09528
427,89	6170,285	-0,48032	-0,70743	0,008006337	-0,08818

320,12	4951,577	-0,82463	-0,83662	-0,227232306	-0,10765
329	6355,801	-0,31412	-0,30822	0,258402515	-0,1051
899,81	5644,178	-0,63736	-0,81194	0,033631332	-0,08378
385,6	6401,59	0,535132	0,282864	0,085769588	-0,05332

Mutlak kortikal kuvvet değişimi	Mutlak lateral kuvvet değişimi	Mutlak alan değişimi
1,796583	-0,13496	-77,76
2,117288	2,189825	-6,87
2,832664	-46,3185	-18,6
-0,83365	15,49533	-21,68
2,676958	38,05827	-155,7
0,356054	-0,61476	-18,17
6,218838	-2,33374	-50,94
0,487861	0,169562	-45,25
-7,03643	-1,4222	-50,54
0,022583	-0,03977	-28,74
-0,09441	-0,10411	-34,45
0,355731	0,357483	-138,29
0,91686	2,770553	-15,17
-1,75814	-18,6421	-102,89
-2,30769	2,9463	-38,98
-1,6294	-3,562	-47,45
-1,90509	-0,72792	-41,38
-0,89132	-1,41057	-38,62
-2,6352	-1,28458	-38,64
-2,69721	-6,09707	-82,28
0,133672	0,045156	-21,72

Aksotomi öncesi ve sonrası lateral kuvvetlerin, kortikal kuvvetlerin ve Kaspaz-3/7 parlaklıklarının ortalamaları alındı, ikili t-test yapıldı ve korelasyon analizine bakıldı. İkili t-testinde bu üç değer de anlamlı değişmedi. Korelasyon testinde ise aksotomi öncesi-sonrası kortikal kuvvet ve aksotomi öncesi-sonrası parlaklık kendi içlerinde anlamlı korele çıktı (Tablo 6.4.5.2). Ölçülen ve hesaplanan diğer tüm parametreler ile korelasyon analizi yapıldı (Tablo 6.4.5.3).

Tablo 6.4.5.2. Aksotomi öncesi-sonrası ölçülen kortikal kuvvet, lateral kuvvet, Kaspaz-3/7 parlaklığı ortalamaları ve t-test ve korelasyon anlamlılığı değerleri ($p<0.01$).

	Ortalama	n	Anlamlılık	Korelasyon anlamlılığı
Aksotomi öncesi lateral kuvvet	5,494504	21	0,76	0,996
Aksotomi sonrası lateral kuvvet	4,510708	21		
Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	4,892711	21	0,754	0
Aksotomi sonrası kortikal kuvvet	4,708261	21		
Aksotomi öncesi parlaklık	5296,78729	21	0,7	0
Aksotomi sonrası parlaklık	5182,57671	21		

Tablo 6.4.5.3. Aksotomi öncesi-sonrası ölçülen ve hesaplanan tüm parametrelerin korelasyon analiz sonuçları ($p<0.01^{**}$ ve $p<0.05^{*}$).

		Aksotomi öncesi lateral kuvvet	Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Aksotomi öncesi alan	Aksotomi öncesi Kaspaz-3/7
Aksotomi öncesi lateral	Pearson Korelasyonu	1	,481*	0,01	0,222
	Anlamlılık		0,027	0,964	0,334

kuvvet	N	21	21	21	21
Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	,481*	1	0,253	0,237
	Anlamlılık	0,027		0,269	0,301
	N	21	21	21	21
Aksotomi öncesi alan	Pearson Korelasyonu	0,01	0,253	1	0,323
	Anlamlılık	0,964	0,269		0,153
	N	21	21	21	21
Aksotomi öncesi Kaspaz-3/7	Pearson Korelasyonu	0,222	0,237	0,323	1
	Anlamlılık	0,334	0,301	0,153	
	N	21	21	21	21
Aksotomi sonrası lateral kuvvet	Pearson Korelasyonu	-0,001	0,133	0,276	0,197
	Anlamlılık	0,996	0,566	0,226	0,392
	N	21	21	21	21
Aksotomi sonrası kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	,547*	,950**	0,258	0,206
	Anlamlılık	0,01	0	0,26	0,37
	N	21	21	21	21
Aksotomi sonrası alan	Pearson Korelasyonu	0,014	0,233	,993**	0,315
	Anlamlılık	0,951	0,31	0	0,164
	N	21	21	21	21
Aksotomi sonrası Kaspaz-3/7	Pearson Korelasyonu	0,146	0,253	0,026	,709**
	Anlamlılık	0,527	0,269	0,912	0
	N	21	21	21	21
Kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	0,017	-0,172	-0,033	-0,068

değişimi	Anlamlılık	0,943	0,457	0,886	0,77
	N	21	21	21	21
Lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,208	-0,124	0,318	0,238
	Anlamlılık	0,365	0,592	0,16	0,298
	N	21	21	21	21
Kaspaz-3/7 değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,082	0,043	-0,397	-0,268
	Anlamlılık	0,724	0,855	0,074	0,241
	N	21	21	21	21
Alan değişimi	Pearson Korelasyonu	0,116	-0,177	-0,249	-0,061
	Anlamlılık	0,616	0,442	0,277	0,793
	N	21	21	21	21
Mutlak kortikal değişimi	Pearson Korelasyonu	0,154	-0,256	-0,01	-0,119
	Anlamlılık	0,504	0,263	0,964	0,609
	N	21	21	21	21
Mutlak lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	-,780**	-0,292	0,165	-0,049
	Anlamlılık	0	0,199	0,476	0,832
	N	21	21	21	21
Mutlak alan değişimi	Pearson Korelasyonu	0,012	-0,291	-,777**	-0,284
	Anlamlılık	0,959	0,201	0	0,213
	N	21	21	21	21

		Aksotomi sonrası lateral kuvvet	Aksotomi sonrası kortikal kuvvet	Aksotomi sonrası alan	Aksotomi sonrası Kaspaz-3/7
Aksotomi	Pearson	-0,001	,547*	0,014	0,146

öncesi lateral kuvvet	Korelasyonu				
	Anlamlılık	0,996	0,01	0,951	0,527
	N	21	21	21	21
Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	0,133	,950**	0,233	0,253
	Anlamlılık	0,566	0	0,31	0,269
	N	21	21	21	21
Aksotomi öncesi alan	Pearson Korelasyonu	0,276	0,258	,993**	0,026
	Anlamlılık	0,226	0,26	0	0,912
	N	21	21	21	21
Aksotomi öncesi Kaspaz-3/7	Pearson Korelasyonu	0,197	0,206	0,315	,709**
	Anlamlılık	0,392	0,37	0,164	0
	N	21	21	21	21
Aksotomi sonrası lateral kuvvet	Pearson Korelasyonu	1	0,206	0,219	0,23
	Anlamlılık		0,369	0,341	0,315
	N	21	21	21	21
Aksotomi sonrası kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	0,206	1	0,235	0,197
	Anlamlılık	0,369		0,306	0,391
	N	21	21	21	21
Aksotomi sonrası alan	Pearson Korelasyonu	0,219	0,235	1	0,049
	Anlamlılık	0,341	0,306		0,833
	N	21	21	21	21
Aksotomi	Pearson	0,23	0,197	0,049	1

sonrası Kaspaz-3/7	Korelasyonu				
	Anlamlılık	0,315	0,391	0,833	
	N	21	21	21	21
Kortikal kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	0,069	0,064	-0,056	-0,148
	Anlamlılık	0,768	0,782	0,811	0,522
	N	21	21	21	21
Lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	,757**	-0,077	0,244	-0,018
	Anlamlılık	0	0,74	0,286	0,938
	N	21	21	21	21
Kaspaz-3/7 değişimi	Pearson Korelasyonu	0,066	0,008	-0,359	,483*
	Anlamlılık	0,778	0,973	0,11	0,026
	N	21	21	21	21
Alan değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,342	-0,171	-0,14	0,155
	Anlamlılık	0,13	0,459	0,545	0,502
	N	21	21	21	21
Mutlak kortikal değişimi	Pearson Korelasyonu	0,214	0,059	-0,018	-0,198
	Anlamlılık	0,352	0,798	0,937	0,391
	N	21	21	21	21
Mutlak lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	,627**	-0,297	0,126	0,03
	Anlamlılık	0,002	0,191	0,587	0,896
	N	21	21	21	21
Mutlak alan	Pearson	-,503*	-0,312	-,696**	0,103

değişimi	Korelasyonu				
	Anlamlılık	0,02	0,169	0	0,657
	N	21	21	21	21

		Kortikal kuvvet değişimi	Lateral kuvvet değişimi	Kaspaz-3/7 değişimi	Alan değişimi
Aksotomi öncesi lateral kuvvet	Pearson Korelasyonu	0,017	-0,208	-0,082	0,116
	Anlamlılık	0,943	0,365	0,724	0,616
	N	21	21	21	21
Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	-0,172	-0,124	0,043	-0,177
	Anlamlılık	0,457	0,592	0,855	0,442
	N	21	21	21	21
Aksotomi öncesi alan	Pearson Korelasyonu	-0,033	0,318	-0,397	-0,249
	Anlamlılık	0,886	0,16	0,074	0,277
	N	21	21	21	21
Aksotomi öncesi Kaspaz-3/7	Pearson Korelasyonu	-0,068	0,238	-0,268	-0,061
	Anlamlılık	0,77	0,298	0,241	0,793
	N	21	21	21	21
Aksotomi sonrası lateral kuvvet	Pearson Korelasyonu	0,069	,757**	0,066	-0,342
	Anlamlılık	0,768	0	0,778	0,13
	N	21	21	21	21
Aksotomi sonrası	Pearson Korelasyonu	0,064	-0,077	0,008	-0,171

kortikal kuvvet	Anlamlılık	0,782	0,74	0,973	0,459
	N	21	21	21	21
Aksotomi sonrası alan	Pearson Korelasyonu	-0,056	0,244	-0,359	-0,14
	Anlamlılık	0,811	0,286	0,11	0,545
	N	21	21	21	21
Aksotomi sonrası Kaspaz-3/7	Pearson Korelasyonu	-0,148	-0,018	,483*	0,155
	Anlamlılık	0,522	0,938	0,026	0,502
	N	21	21	21	21
Kortikal kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	1	0,119	-0,085	-0,205
	Anlamlılık		0,607	0,714	0,374
	N	21	21	21	21
Lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	0,119	1	-0,306	-,496*
	Anlamlılık	0,607		0,178	0,022
	N	21	21	21	21
Kaspaz-3/7 değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,085	-0,306	1	0,26
	Anlamlılık	0,714	0,178		0,255
	N	21	21	21	21
Alan değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,205	-,496*	0,26	1
	Anlamlılık	0,374	0,022	0,255	
	N	21	21	21	21
Mutlak kortikal	Pearson Korelasyonu	,746**	0,158	-0,112	0,038

değişimi	Anlamlılık	0	0,495	0,63	0,871
	N	21	21	21	21
Mutlak lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	0,03	,636**	0,105	-0,304
	Anlamlılık	0,897	0,002	0,651	0,18
	N	21	21	21	21
Mutlak alan değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,093	-,622**	,494*	,753**
	Anlamlılık	0,689	0,003	0,023	0
	N	21	21	21	21

		Mutlak kortikal değişimi	Mutlak lateral kuvvet değişimi	Mutlak alan değişimi
Aksotomi öncesi lateral kuvvet	Pearson Korelasyonu	0,154	-,780**	0,012
	Anlamlılık	0,504	0	0,959
	N	21	21	21
Aksotomi öncesi kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	-0,256	-0,292	-0,291
	Anlamlılık	0,263	0,199	0,201
	N	21	21	21
Aksotomi öncesi alan	Pearson Korelasyonu	-0,01	0,165	-,777**
	Anlamlılık	0,964	0,476	0
	N	21	21	21
Aksotomi öncesi Kaspaz-3/7	Pearson Korelasyonu	-0,119	-0,049	-0,284

	Anlamlılık	0,609	0,832	0,213
	N	21	21	21
Aksotomi sonrası lateral kuvvet	Pearson Korelasyonu	0,214	,627**	-,503*
	Anlamlılık	0,352	0,002	0,02
	N	21	21	21
Aksotomi sonrası kortikal kuvvet	Pearson Korelasyonu	0,059	-0,297	-0,312
	Anlamlılık	0,798	0,191	0,169
	N	21	21	21
Aksotomi sonrası alan	Pearson Korelasyonu	-0,018	0,126	-,696**
	Anlamlılık	0,937	0,587	0
	N	21	21	21
Aksotomi sonrası Kaspaz-3/7	Pearson Korelasyonu	-0,198	0,03	0,103
	Anlamlılık	0,391	0,896	0,657
	N	21	21	21
Kortikal kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	,746**	0,03	-0,093
	Anlamlılık	0	0,897	0,689
	N	21	21	21
Lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	0,158	,636**	-,622**
	Anlamlılık	0,495	0,002	0,003
	N	21	21	21
Kaspaz-3/7 değişimi	Pearson Korelasyonu	-0,112	0,105	,494*

	Anlamlılık	0,63	0,651	0,023
	N	21	21	21
Alan değişimi	Pearson Korelasyonu	0,038	-0,304	,753**
	Anlamlılık	0,871	0,18	0
	N	21	21	21
Mutlak kortikal değişimi	Pearson Korelasyonu	mcordeg	mplatdeg	malandeg
	Anlamlılık	0,154	-,780**	0,012
	N	0,504	0	0,959
Mutlak lateral kuvvet değişimi	Pearson Korelasyonu	21	21	21
	Anlamlılık	-0,256	-0,292	-0,291
	N	0,263	0,199	0,201
Mutlak alan değişimi	Pearson Korelasyonu	21	21	21
	Anlamlılık	-0,01	0,165	-,777**
	N	0,964	0,476	0

Korelasyon analizinde, kuvvet ölçümü grubunda görülen, aksotomi öncesi lateral kuvvet-aksotomi öncesi kortikal kuvvet-aksotomi sonrası kortikal kuvvet birbirleri ile korele çıktı. Ayrıca önemli bir sonuç olarak, mutlak alan değişimi ile Kaspaz-3/7 değişimi korele çıktı.

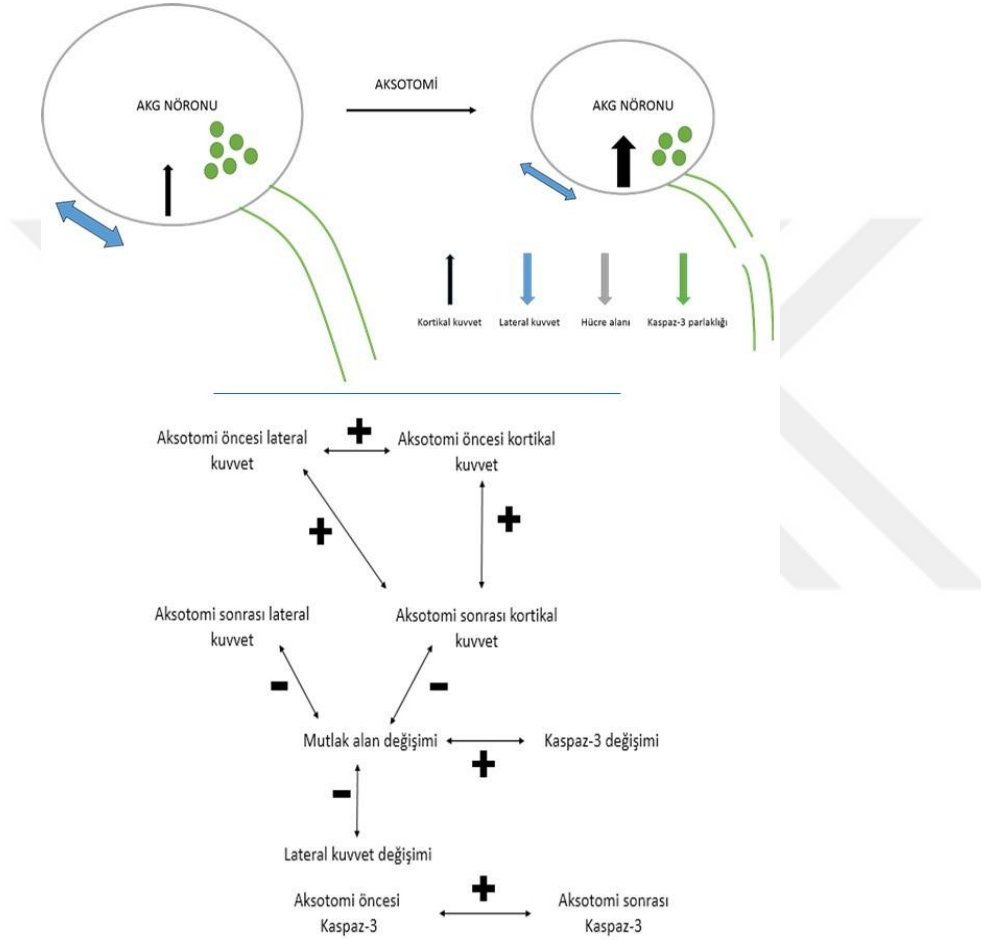
6.4.6. Kontrol (Sham) grubu

Kontrol grubunda Kaspaz-3/7 grubundan farklı olarak kuvvet ölçümü yapılmadı. Bunun nedeni ise parlaklık ölçümünün normalizasyona ihtiyaç duyup duymadığının belirlenmesidir. Sadece kuvvet ölçümü yapılmayıp diğer tüm işlemler yapıldıktan sonra aksotomi öncesi ve sonrası parlaklık ölçümleri yapıldı (Tablo 6.4.6) (n=37). Parlaklık değişimi için normalizasyona ihtiyaç duyulmadı.

Tablo 6.4.6. Kontrol(sham) grubunda aksotomi öncesi-sonrası parlaklık değerleri ve parlaklık değişimi

Aksotomi öncesi parlaklık	Aksotomi sonrası parlaklık	Parlaklık değişimi
5028,138	5152,361	0,024705567
6245,537	5853,104	-0,062834149
4660,831	4684,772	0,005136638
4301,248	3488,827	-0,188880297
6244,629	6102,211	-0,022806479
3390,785	3411,017	0,00596676
5829,913	5037,01	-0,136005975
6008,319	5989,137	-0,003192573
6310,856	6214,475	-0,015272255
2640,076	2617,73	-0,00846415
3313,747	2644,847	-0,201856086
6228,176	5992,214	-0,037886213
3989,955	2466,475	-0,381828868
4013,93	2474,501	-0,383521636
3891,746	2436,975	-0,373809339
3806,61	2354,813	-0,381388427
3469,246	4712,597	0,358392285
3797,878	3669,382	-0,03383363
5424,755	5453,363	0,005273602
3608,081	3598,03	-0,002785691
5119,071	4978,632	-0,02743447
2296,337	2329,638	0,014501791
2404,158	2404,734	0,000239585
4492,367	4171,445	-0,071437173
4249,947	3940,855	-0,072728436
5301,865	5276,537	-0,004777187
5980,123	5873,305	-0,017862174
5828,469	5638,006	-0,03267805
6022,264	5764,434	-0,042812803
6190,754	6208,735	0,002904493
6100,189	6042,064	-0,009528393
6100,746	5898,969	-0,033074152
6027,482	6222,116	0,032291096
6229,57	5378,719	-0,136582621
5441,288	5799,662	0,06586198
3718,684	3922,653	0,05484978

Çalışmamızda özet olarak aksotomiden sonra hücre boyutunda anlamlı azalma tespit edildi ($p<0,05$). Aksotomiden sonra lateral gerginlik azalırken; kortikal gerginlik arttı fakat bu değişiklikler anlamlı değildi. Aksotomi sonucu hücre boyutunda meydana gelen değişim, lateral ve kortikal kuvvetlerle pozitif korele çıkmıştır ($p<0,05$). Kaspaz-3 aktivitesi, hücre boyutundaki azalma ile pozitif korele çıkmıştır fakat kortikal ve lateral kuvvetlerle ilişkili değildir ($p<0,05$) (Şekil 6.5).



Şekil 6.5. Çalışmanın özeti (+: pozitif korelesyonu ve -: negatif korelesyonu göstermektedir).

7.TARTIŞMA

Hücre mekaniği çalışmalarında kuvvet uygulama ve algılama teknikleri öne çıkmaktadır. Kuvvet ölçümü yapılabilen tekniklerden yaygın olanları atomik kuvvet mikroskopisi(atomic force microscopy) ve optik cımbızlar (optical tweezers) sistemleridir. İki sistemin de birbirlerine göre üstünlükleri mevcuttur. Atomik kuvvet mikroskopunda kuvvet uygulama, kuvvet algılama ve uzaysal algılama aralıkları geniş olmasına karşın; optik cımbızlar sistemi lazer ışınının direk hücre ile temas etmemesi bakımından üstündür. Bu da hücrelerin daha az stres altında kalmalarına neden olur (87). Çalışmamızda arka kök gangliyonlarında kuvvet ölçümü yapılabilmesi için optik cımbızlar sistemi kullanılmıştır. Çalışmamızda optik cımbızlar sistemi ile hücre gövdesinden kuvvet ölçümü ilk defa yapılmıştır (130).

Hücrelerde bulunan kuvvetler ve bu kuvvetlerin tanımları tam olarak belirlenememiştir. Membran gerginliği ve kortikal gerginlik şematik olarak belirtilse de nasıl ayrı ayrı ölçülecekleri belirtilmemiştir (111). AKG nöronlarında AFM kullanılarak periferik sinir hasarı sonrası mekanik farklılıklar tespit edilmiştir (121). Çalışmamızda lateral ve kortikal kuvvetler, periferik sinir hasarı öncesi ve sonrası, x ve y ekseninde olmak üzere, ayrı ayrı ölçülmüştür. Aksotomiden önceki lateral kuvvet, aksotomiden önceki lateral kuvvet ve aksotomiden sonraki kortikal kuvvet birbirleri ile korele çıkmıştır. Aksotomi sonrasında lateral kuvvetlerin ortalamaları azalırken; kortikal kuvvetlerin ortalamaları artmıştır. Hücrelerde meydana gelen alan değişimi ile aksotomi sonrası kortikal kuvvet ve aksotomi sonrası lateral kuvvet de korele çıkmıştır. Kuvvetlerin birbirleri ile korelasyonu ortak olarak ölçülen membran ve membrana yakın hücre iskeleti bağlantıları ile açıklanabilir. Lateral kuvvetlerin aksotomi öncesi ve sonrasında korele olmaması ölçüm zamanı ile ilgili olabilir. Kortikal kuvvet daha çok hücre iskeleti elemanlarından kaynaklanmaktadır. Lateral kuvvet ise daha çok membrandaki proteinler ve lipidlerden kaynaklanmaktadır. Aksotomi ile hücre iskeleti yıkımı meydana gelmektedir. Sonuçlarımıza göre aksotomiden sonra hücre iskeleti elemanlarında birbirlerine yakınlaşma meydana geldiğini düşünmekteyiz. Yani alan azalması ile hücre iskeleti daha sıkı bir hal almaktadır. Bu durumun aksine membran daha gevşek bir yapının meydana geldiğini

düşünmekteyiz. Bu yapının gevşekliği membrandaki lokalizasyonlara göre değişebilir.

Aktin ve miyozin, nöron hücre iskeletindeki önemli yapılardandır ve hücrelerin mekanik özelliklerini etkilemektedir (131). BDM, miyozin inhibitörü olarak kullanılmaktadır (132). AKG nöronlarında da BDM kullanılmıştır (133). Çalışmamızda miyozin inhibitörü olarak kullandığımız BDM grubunda, hücreler aksotomiden sonra anlamlı olarak küçüldüler. Fakat alan küçülmesi ile kuvvetler arasında bir korelasyon görülmedi. Yani hücrelerdeki kuvvetler miyozinden bağımsızdır.

Kaspaz-3, periferik sinir hasarı yaralanmalarındaki aksonal dejenerasyondaki aktin ve tübülün kesiminde önemli bir göstergedir (86). Değişen kuvvetlerin moleküler altyapısını anlamak için aksotomi öncesi ve sonrası canlı Kaspaz-3 değişimi bakıldı. Kaspaz-3 parlaklığı aksotomiden sonra azaldı. Kaspaz-3 parlaklığı istatistiksel olarak anlamlı değişmedi fakat aksotomi öncesi ve sonrası Kaspaz-3 parlaklığı korele çıktı. Önceki bulgularımızda korele çıkan mutlak alan değişimi, Kaspaz-3 değişimi ile de korele çıkmıştır. Azalan Kaspaz-3 seviyesi ile kortikal gerginliğin artması arasında ilişki olduğunu düşünmekteyiz. Aktin ve tübülünün kesimi kortikal kuvvetleri artırmış olabilir.

Hücrelerde meydana gelen mekanik iletimde görevli sinyal tabakası, kuvvet iletim tabakası ve aktin düzenleyici tabakada görevli proteinler vardır (105). AKG hücrelerinde aksotomi hasarında bu tabakalarda nasıl değişiklik gösterdiği bilinmemektedir. Sonuçlarımızda çıkan kuvvet değişiklikleri ile bu tabakalardaki proteinlerin ilişkili olduğunu düşünmekteyiz. İmmünohistokimya tekniği ile aksotomi öncesi ve sonrası bu tabakalardaki proteinlerin değişimleri floresan olarak bakılabilir. Proteinlerin lokalizasyonu dondurarak kırma (freeze-fracture) (134) ve/veya korelatif mikroskopi (correlative microscopy) (135) yöntemleri de kullanılabilir.

8. SONUÇ

Çalışmamızda arka kök gangliyon nöronlarında hücre mekaniği çalışması; aksotomi öncesi ve sonrası lateral ve kortikal kuvvet ölçümü, kuvvet ölçümlerinin BDM ile doğrulanması ve aksotomi öncesi ve sonrası kuvvet ölçümüne ek Kaspaz-3/7 parlaklık ölçümü olarak yapılmıştır. Aksotomi öncesi lateral kuvvet, aksotomi öncesi kortikal kuvvet ve aksotomi sonrası kortikal kuvvet birbirleri ile anlamlı olarak korele çıkmıştır. Ayrıca hücrelerde mutlak alan değişikliği ile aksotomi sonrası lateral kuvvet, aksotomi sonrası kortikal kuvvet ve Kaspaz-3/7 parlaklık değişimi istatistiksel olarak korele çıkmıştır.



9.KAYNAKLAR

1. Kandel E, Schwartz J. Principles of Neural Science, Fifth Edition: McGraw-Hill Education; 2013.
2. Brodal P. The Central Nervous System: Oxford University Press; 2010.
3. Bradbury EJ, McMahon SB, Ramer MS. Keeping in touch: sensory neurone regeneration in the CNS. Trends in pharmacological sciences. 2000;21(10):389-94.
4. Quasthoff S, Hartung HP. Chemotherapy-induced peripheral neuropathy. Journal of neurology. 2002;249(1):9-17.
5. Windebank AJ, Grisold W. Chemotherapy-induced neuropathy. Journal of the Peripheral Nervous System. 2008;13(1):27-46.
6. Melli G, Höke A. Dorsal Root Ganglia Sensory Neuronal Cultures: a tool for drug discovery for peripheral neuropathies. Expert opinion on drug discovery. 2009;4(10):1035-45.
7. Fu SY, Gordon T. The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. Molecular neurobiology. 1997;14(1-2):67-116.
8. Richardson PM, Miao T, Wu D, Zhang Y, Yeh J, Bo X. Responses of the nerve cell body to axotomy. Neurosurgery. 2009;65(4):A74-A9.
9. Vestergaard S, Tandrup T, Jakobsen J. Effect of permanent axotomy on number and volume of dorsal root ganglion cell bodies. Journal of Comparative Neurology. 1997;388(2):307-12.
10. George EB, Glass JD, Griffin JW. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. The Journal of neuroscience. 1995;15(10):6445-52.
11. Vanderluit JL, McPhail LT, Fernandes KJ, McBride CB, Huguenot C, Roy S, et al. Caspase-3 is activated following axotomy of neonatal facial motoneurons and caspase-3 gene deletion delays axotomy-induced cell death in rodents. European Journal of Neuroscience. 2000;12(10):3469-80.
12. Bao G, Suresh S. Cell and molecular mechanics of biological materials. Nature materials. 2003;2(11):715-25.
13. Janmey PA, McCulloch CA. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. Annu Rev Biomed Eng. 2007;9:1-34.
14. Lo C-M, Wang H-B, Dembo M, Wang Y-l. Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. Biophysical journal. 2000;79(1):144-52.

15. Georges PC, Miller WJ, Meaney DF, Sawyer ES, Janmey PA. Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophysical journal*. 2006;90(8):3012-8.
16. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677-89.
17. Hahn C, Schwartz MA. The role of cellular adaptation to mechanical forces in atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008;28(12):2101-7.
18. Paszek MJ, Zahir N, Johnson KR, Lakins JN, Rozenberg GI, Gefen A, et al. Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer cell*. 2005;8(3):241-54.
19. Apodaca G. Modulation of membrane traffic by mechanical stimuli. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2002;282(2):F179-F90.
20. Houk AR, Jilkine A, Mejean CO, Boltyanskiy R, Dufresne ER, Angenent SB, et al. Membrane tension maintains cell polarity by confining signals to the leading edge during neutrophil migration. *Cell*. 2012;148(1):175-88.
21. Sheetz MP. Cell control by membrane–cytoskeleton adhesion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2001;2(5):392-6.
22. Hoffman BD, Crocker JC. Cell mechanics: dissecting the physical responses of cells to force. *Annual review of biomedical engineering*. 2009;11:259-88.
23. Sun M, Graham JS, Hegedüs B, Marga F, Zhang Y, Forgacs G, et al. Multiple membrane tethers probed by atomic force microscopy. *Biophysical journal*. 2005;89(6):4320-9.
24. Dai J, Sheetz MP. Cell membrane mechanics. *Methods in cell biology*. 1997;55:157-71.
25. Khakshour S, Beischlag TV, Sparrey C, Park EJ. Probing Mechanical Properties of Jurkat Cells under the Effect of ART Using Oscillating Optical Tweezers. *PloS one*. 2015;10(4):e0126548.
26. Khokhlova MD, Lyubin EV, Zhdanov AG, Rykova SY, Sokolova IA, Fedyanin AA. Normal and system lupus erythematosus red blood cell interactions studied by double trap optical tweezers: direct measurements of aggregation forces. *Journal of biomedical optics*. 2012;17(2):0250011-6.
27. Schwingel M, Bastmeyer M. Force mapping during the formation and maturation of cell adhesion sites with multiple optical tweezers. *PloS one*. 2013;8(1):e54850.
28. y Cajal SR. Estructura de los centros nerviosos de las aves 1888.

29. Sherrington C. Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. *The Journal of physiology*. 1906;34(1-2):1.
30. Golgi C. Sulla struttura della sostanza grigia del cervello. *Gazzetta Medica Italiana Lombardia*. 1873;33:244-6.
31. Porter KR, Claude A, Fullam EF. A study of tissue culture cells by electron microscopy methods and preliminary observations. *The Journal of experimental medicine*. 1945;81(3):233-46.
32. De Robertis ED, Bennett HS. Some features of the submicroscopic morphology of synapses in frog and earthworm. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1955;1(1):47-58.
33. Palay SL. Synapses in the central nervous system. *The Journal of biophysical and biochemical cytology*. 1956;2(4):193-202.
34. Magner LN. *A history of the life sciences, revised and expanded*: CRC Press; 2002.
35. Waldeyer W. Ueber einige neuere Forschungen im Gebiete der Anatomie des Centralnervensystems¹). *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 1891;17(44):1213-8.
36. Ahrens MB, Orger MB, Robson DN, Li JM, Keller PJ. Whole-brain functional imaging at cellular resolution using light-sheet microscopy. *Nature methods*. 2013;10(5):413-20.
37. Kenet T, Bibitchkov D, Tsodyks M, Grinvald A, Arieli A. Spontaneously emerging cortical representations of visual attributes. *Nature*. 2003;425(6961):954-6.
38. Miller J-eK, Ayzenshtat I, Carrillo-Reid L, Yuste R. Visual stimuli recruit intrinsically generated cortical ensembles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(38):E4053-E61.
39. Steriade M, Gloor P, Llinas RR, Da Silva FL, Mesulam M-M. Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. *Electroencephalography and clinical neurophysiology*. 1990;76(6):481-508.
40. Fox MD, Raichle ME. Spontaneous fluctuations in brain activity observed with functional magnetic resonance imaging. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007;8(9):700-11.
41. Berger H. Über das elektrenkephalogramm des menschen. *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience*. 1929;87(1):527-70.
42. Pravdich-Neminsky V. Ein versuch der registrierung der elektrischen gehirnerscheinungen. *Zbl Physiol*. 1913;27:951-60.

43. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *The Journal of physiology*. 1952;117(4):500.
44. Shepherd GM. *The synaptic organization of the brain*: Oxford University Press; 2003.
45. Houser C, Vaughn J, Hendry S, Jones E, Peters A. GABA neurons in the cerebral cortex. *Cerebral cortex*. 1984;2:63-89.
46. Salzberg B, Grinvald A, Cohen L, Davila H, Ross W. Optical recording of neuronal activity in an invertebrate central nervous system: simultaneous monitoring of several neurons. *Journal of Neurophysiology*. 1977;40(6):1281-91.
47. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *Journal of Biological Chemistry*. 1985;260(6):3440-50.
48. Kralj JM, Hochbaum DR, Douglass AD, Cohen AE. Electrical spiking in *Escherichia coli* probed with a fluorescent voltage-indicating protein. *Science*. 2011;333(6040):345-8.
49. Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, et al. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. 1997;388(6645):882-7.
50. Connor JA. Digital imaging of free calcium changes and of spatial gradients in growing processes in single, mammalian central nervous system cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986;83(16):6179-83.
51. Denk W, Strickler JH, Webb WW. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*. 1990;248(4951):73-6.
52. Svoboda K, Denk W, Kleinfeld D, Tank DW. In vivo dendritic calcium dynamics in neocortical pyramidal neurons. *Nature*. 1997;385(6612):161-5.
53. Quirin S, Jackson J, Peterka DS, Yuste R. Simultaneous imaging of neural activity in three dimensions. *Frontiers in neural circuits*. 2014;8:29.
54. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nature neuroscience*. 2005;8(9):1263-8.
55. Franze K, Janmey PA, Guck J. Mechanics in neuronal development and repair. *Annual review of biomedical engineering*. 2013;15:227-51.
56. Sapunar D, Kostic S, Banozic A, Puljak L. Dorsal root ganglion—a potential new therapeutic target for neuropathic pain. *J Pain Res*. 2012;5:31-8.

57. Sapunar D, Ljubkovic M, Lirk P, McCallum JB, Hogan QH. Distinct membrane effects of spinal nerve ligation on injured and adjacent dorsal root ganglion neurons in rats. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2005;103(2):360-76.
58. Xie W-R, Deng H, Li H, Bowen T, Strong J, Zhang J-M. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. *Neuroscience*. 2006;142(3):809-22.
59. Abram SE, Yi J, Fuchs A, Hogan QH. Permeability of injured and intact peripheral nerves and dorsal root ganglia. *The Journal of the American Society of Anesthesiologists*. 2006;105(1):146-53.
60. Jimenez-Andrade JM, Herrera MB, Ghilardi JR, Vardanyan M, Melemedjian OK, Mantyh PW. Vascularization of the dorsal root ganglia and peripheral nerve of the mouse: implications for chemical-induced peripheral sensory neuropathies. *Molecular pain*. 2008;4(1):1.
61. Caspary T, Anderson KV. Patterning cell types in the dorsal spinal cord: what the mouse mutants say. *Nature Reviews Neuroscience*. 2003;4(4):289-97.
62. Marmigère F, Ernfors P. Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage. *Nature Reviews Neuroscience*. 2007;8(2):114-27.
63. Coffman JA. Runx transcription factors and the developmental balance between cell proliferation and differentiation. *Cell biology international*. 2003;27(4):315-24.
64. Chen AI, de Nooij JC, Jessell TM. Graded activity of transcription factor Runx3 specifies the laminar termination pattern of sensory axons in the developing spinal cord. *Neuron*. 2006;49(3):395-408.
65. Levanon D, Bettoun D, Harris-Cerruti C, Woolf E, Negreanu V, Eilam R, et al. The Runx3 transcription factor regulates development and survival of TrkC dorsal root ganglia neurons. *The EMBO journal*. 2002;21(13):3454-63.
66. Levanon D, Brenner O, Negreanu V, Bettoun D, Woolf E, Eilam R, et al. Spatial and temporal expression pattern of Runx3 (Aml2) and Runx1 (Aml1) indicates non-redundant functions during mouse embryogenesis. *Mechanisms of development*. 2001;109(2):413-7.
67. Marmigère F, Montelius A, Wegner M, Groner Y, Reichardt LF, Ernfors P. The Runx1/AML1 transcription factor selectively regulates development and survival of TrkA nociceptive sensory neurons. *Nature neuroscience*. 2006;9(2):180-7.
68. Theriault FM, Roy P, Stifani S. AML1/Runx1 is important for the development of hindbrain cholinergic branchiovisceral motor neurons and selected

cranial sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(28):10343-8.

69. Masuda T, Tsuji H, Taniguchi M, Yagi T, Tessier-Lavigne M, Fujisawa H, et al. Differential non-target-derived repulsive signals play a critical role in shaping initial axonal growth of dorsal root ganglion neurons. *Developmental biology*. 2003;254(2):289-302.

70. Yaron A, Huang P-H, Cheng H-J, Tessier-Lavigne M. Differential requirement for Plexin-A3 and-A4 in mediating responses of sensory and sympathetic neurons to distinct class 3 Semaphorins. *Neuron*. 2005;45(4):513-23.

71. Mesnard NA, Alexander TD, Sanders VM, Jones KJ. Use of laser microdissection in the investigation of facial motoneuron and neuropil molecular phenotypes after peripheral axotomy. *Experimental neurology*. 2010;225(1):94-103.

72. Hanani M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain research reviews*. 2005;48(3):457-76.

73. Peirs C, Williams S-PG, Zhao X, Walsh CE, Gedeon JY, Cagle NE, et al. Dorsal horn circuits for persistent mechanical pain. *Neuron*. 2015;87(4):797-812.

74. Costigan M, Befort K, Karchewski L, Griffin RS, D'Urso D, Allchorne A, et al. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. *BMC neuroscience*. 2002;3(1):1.

75. Stam FJ, MacGillavry HD, Armstrong NJ, De Gunst M, Zhang Y, Van Kesteren RE, et al. Identification of candidate transcriptional modulators involved in successful regeneration after nerve injury. *European Journal of Neuroscience*. 2007;25(12):3629-37.

76. Cragg B. What is the signal for chromatolysis? *Brain research*. 1970;23(1):1-21.

77. Dent EW, Gertler FB. Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron*. 2003;40(2):209-27.

78. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, et al. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*. 1995;376(6535):37-43.

79. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences*. 1997;22(8):299-306.

80. Jänicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(16):9357-60.

81. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science*. 1998;281(5381):1312-6.
82. Zheng TS, Schlosser SF, Dao T, Hingorani R, Crispe IN, Boyer JL, et al. Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(23):13618-23.
83. Deshmukh M, Johnson EM. Programmed cell death in neurons: focus on the pathway of nerve growth factor deprivation-induced death of sympathetic neurons. *Molecular Pharmacology*. 1997;51(6):897-906.
84. Simon DJ, Weimer RM, McLaughlin T, Kallop D, Stanger K, Yang J, et al. A caspase cascade regulating developmental axon degeneration. *The Journal of neuroscience*. 2012;32(49):17540-53.
85. Momeni HR, Mehranjani MS, Shariatzadeh MA, Haddadi M. Caspase-mediated apoptosis in sensory neurons of cultured dorsal root Ganglia in adult mouse. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2013;15(3):212.
86. Sokolowski JD, Gamage KK, Heffron DS, LeBlanc AC, Deppmann CD, Mandell JW. Caspase-mediated cleavage of actin and tubulin is a common feature and sensitive marker of axonal degeneration in neural development and injury. *Acta neuropathologica communications*. 2014;2(1):1.
87. Rodriguez ML, McGarry PJ, Sniadecki NJ. Review on cell mechanics: experimental and modeling approaches. *Applied Mechanics Reviews*. 2013;65(6):060801.
88. Di Carlo D, Wu LY, Lee LP. Dynamic single cell culture array. *Lab on a Chip*. 2006;6(11):1445-9.
89. Affonce DA, Lutchen KR. New perspectives on the mechanical basis for airway hyperreactivity and airway hypersensitivity in asthma. *Journal of applied physiology*. 2006;101(6):1710-9.
90. Klein-Nulend J, Bacabac R, Veldhuijzen J, Van Loon J. Microgravity and bone cell mechanosensitivity. *Advances in Space Research*. 2003;32(8):1551-9.
91. Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, GARCIA-CARDEÑA G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2000;902(1):230-40.
92. Judex S, Gross TS, Bray RC, Zernicke RF. Adaptation of bone to physiological stimuli. *Journal of biomechanics*. 1997;30(5):421-9.
93. Tan J, Kalapesi F, Coroneo M. Mechanosensitivity and the eye: cells coping with the pressure. *British journal of ophthalmology*. 2006;90(3):383-8.

94. Heydemann A, McNally EM. Consequences of disrupting the dystrophin-sarcoglycan complex in cardiac and skeletal myopathy. *Trends in cardiovascular medicine*. 2007;17(2):55-9.
95. Thompson DW. *On growth and form*. On growth and form. 1942.
96. Heath J, Dunn G. Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study. *J Cell Sci*. 1978;29(1):197-212.
97. Hynes RO. The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*. 2004;23(6):333.
98. Choquet D, Felsenfeld DP, Sheetz MP. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin-cytoskeleton linkages. *Cell*. 1997;88(1):39-48.
99. Rief M, Gautel M, Oesterhelt F, Fernandez JM, Gaub HE. Reversible unfolding of individual titin immunoglobulin domains by AFM. *Science*. 1997;276(5315):1109-12.
100. Giannone G, Jiang G, Sutton DH, Critchley DR, Sheetz MP. Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation. *The Journal of cell biology*. 2003;163(2):409-19.
101. Sawada Y, Tamada M, Dubin-Thaler BJ, Cherniavskaya O, Sakai R, Tanaka S, et al. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*. 2006;127(5):1015-26.
102. von Wichert G, Jiang G, Kostic A, De Vos K, Sap J, Sheetz MP. RPTP- α acts as a transducer of mechanical force on $\alpha v/\beta 3$ -integrin-cytoskeleton linkages. *The Journal of cell biology*. 2003;161(1):143-53.
103. Margadant F, Chew LL, Hu X, Yu H, Bate N, Zhang X, et al. Mechanotransduction in vivo by repeated talin stretch-relaxation events depends upon vinculin. *PLoS Biol*. 2011;9(12):e1001223.
104. Iskratsch T, Wolfenson H, Sheetz MP. Appreciating force and shape [mdash] the rise of mechanotransduction in cell biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014;15(12):825-33.
105. Han MK, de Rooij J. Converging and Unique Mechanisms of Mechanotransduction at Adhesion Sites. *Trends in cell biology*. 2016.
106. Akin O, Mullins RD. Capping protein increases the rate of actin-based motility by promoting filament nucleation by the Arp2/3 complex. *Cell*. 2008;133(5):841-51.
107. Mullins RD, Heuser JA, Pollard TD. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching

networks of filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(11):6181-6.

108. Bieling P, Weichsel J, McGorty R, Jreij P, Huang B, Fletcher DA, et al. Force feedback controls motor activity and mechanical properties of self-assembling branched actin networks. *Cell*. 2016;164(1):115-27.

109. Singer S, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Membranes and Viruses in Immunopathology*; Day, SB, Good, RA, Eds. 1972:7-47.

110. Diz-Muñoz A, Fletcher DA, Weiner OD. Use the force: membrane tension as an organizer of cell shape and motility. *Trends in cell biology*. 2013;23(2):47-53.

111. Gauthier NC, Masters TA, Sheetz MP. Mechanical feedback between membrane tension and dynamics. *Trends in cell biology*. 2012;22(10):527-35.

112. Gervásio OL, Phillips WD, Cole L, Allen DG. Caveolae respond to cell stretch and contribute to stretch-induced signaling. *Journal of cell science*. 2011;124(21):3581-90.

113. Sinha B, Köster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, et al. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*. 2011;144(3):402-13.

114. Wetzel C, Hu J, Riethmacher D, Benckendorff A, Harder L, Eilers A, et al. A stomatin-domain protein essential for touch sensation in the mouse. *Nature*. 2007;445(7124):206-9.

115. Poole K, Herget R, Lapatsina L, Ngo H-D, Lewin GR. Tuning Piezo ion channels to detect molecular-scale movements relevant for fine touch. *Nature communications*. 2014;5.

116. Qi Y, Andolfi L, Frattini F, Mayer F, Lazzarino M, Hu J. Membrane stiffening by STOML3 facilitates mechanosensation in sensory neurons. *Nature communications*. 2015;6.

117. Horie H, Ikuta S, Takenaka T. Membrane elasticity of mouse dorsal root ganglion neurons decreases with aging. *FEBS letters*. 1990;269(1):23-5.

118. Hochmuth RM. Micropipette aspiration of living cells. *Journal of biomechanics*. 2000;33(1):15-22.

119. Mustata M, Ritchie K, McNally HA. Neuronal elasticity as measured by atomic force microscopy. *Journal of neuroscience methods*. 2010;186(1):35-41.

120. Spedden E, White JD, Naumova EN, Kaplan DL, Staii C. Elasticity maps of living neurons measured by combined fluorescence and atomic force microscopy. *Biophysical journal*. 2012;103(5):868-77.

121. Martin, M., Benzina, O., Szabo, V., Véggh, A. G., Lucas, O., Cloitre, T., ... & Gergely, C. Morphology and nanomechanics of sensory neurons growth cones following peripheral nerve injury. *Plos one*. 2013; 8(2), e56286
122. Ashkin A. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical review letters*. 1970;24(4):156.
123. Ashkin A. Applications of laser radiation pressure. *Science*. 1980;210(4474):1081-8.
124. Lim C, Zhou E, Li A, Vedula S, Fu H. Experimental techniques for single cell and single molecule biomechanics. *Materials Science and Engineering: C*. 2006;26(8):1278-88.
125. Tan Y, Kong C-w, Chen S, Cheng SH, Li RA, Sun D. Probing the mechanobiological properties of human embryonic stem cells in cardiac differentiation by optical tweezers. *Journal of biomechanics*. 2012;45(1):123-8.
126. Zhang H, Liu K-K. Optical tweezers for single cells. *Journal of The Royal Society Interface*. 2008;5(24):671-90.
127. Neuman KC, Block SM. Optical trapping. *Review of scientific instruments*. 2004;75(9):2787-809.
128. Sleep J, Wilson D, Parker K, Winlove C, Simmons R, Gratzer W, editors. Elastic properties of the red blood cell membrane measured using optical tweezers: relation to haemolytic disorders. *Biophysical journal*; 1999: 20814-3998.
129. Svoboda K, Block SM. Biological applications of optical forces. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*. 1994;23(1):247-85.
130. Athamneh AI, Suter DM. Quantifying mechanical force in axonal growth and guidance. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2015;9.
131. Cooper GM. *Actin, myosin, and cell movement*. 2000.
132. Ostap EM. 2, 3-Butanedione monoxime (BDM) as a myosin inhibitor. *Journal of Muscle Research & Cell Motility*. 2002;23(4):305-8.
133. Huang G, McARDLE JJ. Novel suppression of an L-type calcium channel in neurones of murine dorsal root ganglia by 2, 3-butanedione monoxime. *The Journal of physiology*. 1992;447:257.
134. Severs NJ, Robenek H. Freeze-fracture cytochemistry in cell biology. *Methods in cell biology*. 2008;88:181-204.
135. de Boer P, Hoogenboom JP, Giepmans BN. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up! *Nature methods*. 2015;12(6):503-13.

10. ETİK KURUL ONAYI



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

Edinilmiştir

Sayı : 38828770-604.01.01-E.23167
Konu : Etik Kurulu Kararı

09/11/2016

Sayın Prof. Dr. Gürkan Öztürk

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Aksonomi Hasarının Arka Kök Gangliyon Nöronlarının Membran Gerginliğine Etkisinin Araştırılması" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur. Bilgilerinize rica ederim.

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

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 3070 sayılı Elektronik Kanununa göre Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 09/11/2016 tarihinde oluşturulmuştur.
Tutarlılığı <https://sbs.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 7ED59665N0 kodu ile doğrulanabilmektedir.

İstanbul Medipol Üniversitesi
Kırsak Mah. Ekinciler Cad No:19 Kocaeli Kampüsü 34810
Beşiktaş/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin: bilgi@medipol.edu.tr

ETİK KURUL ONAYI (DEVAM)



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
08/09/2016	75		Prof. Dr. Görkan Öztürk

"Aksotomi Hasarının Arka Kök Gangliyon Nöronlarının Membran Gerginliğine Etkisinin Araştırılması" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 ay

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. 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. Talat KELEŞTEMUR	
Üye	Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Fahriye ŞENBAHÇE	

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Sadık	Soyadı	Bay
------------	-------	---------------	-----

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	Gebze Teknik Üniversitesi/Fen Fakültesi/Moleküler Biyoloji Ve Genetik	2015
Lise	Ordu Anadolu Öğretmen Lisesi	2010

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Moleküler Biyolog	Medipol Üniversitesi - REMER	01.11.16 -

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	İyi	Orta	İyi
Almanca	Başlangıç	Başlangıç	Başlangıç
Rusça	Başlangıç	Başlangıç	Başlangıç
Arapça	Başlangıç	Başlangıç	Başlangıç

	Sayısal	Eşit ağırlık	Sözel
ALES Puanı	77,74297	72,62292	57,94883

YDS Puanı	62.5
------------------	------

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi

Sertifikalar

İstanbul Medipol Üniversitesi	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	2015
-------------------------------	---------------------------------------	------