



**T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**IN VITRO TRANSNÖRONAL DEJENERASYON MEKANİZMASINDA GEN İFADE
DEĞİŞİKLİKLERİ**

ŞERİFE SEFİL

SİNİR BİLİM ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Gürkan Öztürk

İstanbul- 2015

TEZ ONAYI FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi
Programın Seviyesi : Yüksek Lisans (X) Doktora ()
Anabilim Dalı : Sinirbilim
Tez Sahibi : Şerife SEFİL
Tez Başlığı : *In Vitro* Transnöronal Dejenerasyon Mekanizmasında Gen İfade Değişiklikleri
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi
Sınav Tarihi : 10.07.2015

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans / ~~Doktora Tezi Olarak~~ kabul edilmiştir.

Danışman

Kurumu

İmza

Prof.Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Sınav Jüri Üyeleri

Prof.Dr. Duran ÜSTEK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof.Dr. Ertuğrul KILIÇ

İstanbul Medipol Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 23./07./2015 tarih ve 2015./27 - 03 sayılı kararı ile 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 çalışmasıyla 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.


İMZA
Şerife SEFİL

TEŞEKKÜR

Dünyanın en sabırlı insanları olarak düşündüğüm ve beni hayatım boyunca hiç bir zaman yalnız bırakmayan sevgili annem Zennure Sefil ve sevgili babam Nail Sefil,

Başaracağıma her zaman inanan ve sahip olduğu ilmi birikimi benimle paylaşan kıymetli hocam Prof.Dr. Gürkan Öztürk,

Tebessüm etmenin kıymetini bana tekrar hatırlatan, umutsuzluğa hiç bir zaman kapılmama konusunda kendime örnek edindiğim sevgili hocam Prof.Dr. Duran Üstek,

Tezimin hazırlık aşamasında bana yönlendirmeleri ile rehberlik eden kıymetli hocam Yard. Doç. Dr Mehmet Ozansoy,

Ve tezimin yazım aşamasında sınırsız desteği ve pozitif enerjisi ile hep yanımda olan kıymetli hocam Yard. Doç. Dr. Aylin Yaba Uçar,

Hilmi Kaan Alkan, Ekrem Musa Özdemir ve Öğr.Gör. Taha Keleştemur, Pelin Dilsiz, Fulya Köksalar, Özlem Mutlu, Merve Öncül ve Özge Başer başta olmak üzere REMER bünyesindeki tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimle...

Şerife Sefil

İstanbul, 2015

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SSS	: Santral sinir sistemi
PSN	: Periferel sinir sistemi
DRG	: Dorsal Root Ganglion (Arka kök Gangliyon)
ND	: Nöronal Dejenasyon
AD	: Alzeimer Hastalığı
PD	: Parkinson Hastalığı
TND	: Transnöronal Dejenerasyon
HD	: Hungtington Hastalığı
ALS	: Amiyotrofik Lateral Sikleroz Hastalığı
Bax	: BCL2-Associated X Protein
Bcl2	: B-Cell CLL/Lymphoma 2
P53	: Tumor Protein 53
Caspase 3	: Apoptosis-Related Cysteine Peptidase
Fas	: Fas Cell Surface Death Receptor
FasL	: Fas Ligand
ATG5	: Otofaji Spesifik Gen 5
ATG7	: Otofaji Spesifik Gen 7
RIPK1	: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1
RIPK3	: Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3
mTOR	: The Mammalian Target of Rapamycin
P2RX7	: Pürin reseptör 7
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
tRNA	: Taşıyıcı Ribonükleik Asit
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu
PFA	: Paraformaldehit
DAPI	: 4,6-diamino-2-phenylindole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Hemotoksilen ve Eozin ile boyanan DRG kesitleri	6
Şekil 2: Arka kök gangliyonunun anatomik yapısı	7
Şekil 3: Nörodejeneratif mekanizmalar.....	9
Şekil 4: Aksotomi ve dejenerasyon mekanizmaları	12
Şekil 5:Aksonal dejenerasyon sonrası meydana gelen olaylar	13
Şekil 6: Retrograde ve Anterograde transnöronal dejenerasyon mekanizmaları	16
Şekil 7: Hücrelerin laser ile toplanması	20
Şekil 8: SYBR Green tekniği ile qRT-PCR	23
Şekil 9: A-B: qRT- PCR tekniğinde kullanılan erime eğrisi analizi	24
Şekil 10: DRG primer nöron kültür hücreleri ekimi	29
Şekil 11:Hasarlanan nöronda aksonal rejenerasyon.....	30
Şekil 12: Laser ile nöron hücrelerinin aksotomi yapılması.....	31
Şekil 13: LCM yöntemi ile hücrelerin toplanması	32
Şekil 14: mTOR ve β -III Tubulin ile boyanan DRG nöron hücreleri (40X).....	38
Şekil 15: mTOR ve β -III Tubulin ile boyanan DRG nöron hücreleri (20X).....	39
Şekil 16: P2RX7 ve β -III Tubulin ile boyanan DRG nöron hücreleri (20X).....	40
Şekil 17: P2RX7 ve β -III Tubulin ile boyanan DRG nöron hücreleri (40X).....	41

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1: Çalışmada kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri.	25
Çizelge 2: Kimyasallar çizelgesi	51

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: P2RX7 geninin tüm gruplar için gen ifade analiz grafiği	37
Grafik 2: mTOR geninin tüm gruplar için gen ifade analiz grafiği	37

TEZ ONAYI FORMU	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
GRAFİKLER DİZİNİ.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÖZET.....	1
<i>In Vitro</i> Transnöronal Dejenerasyon Mekanizmasında Gen İfade Değişiklikleri.....	1
ABSTRACT.....	2
<i>In Vitro</i> Analysis of Gene Expression for Transneuronal Degeneration Mechanisms.....	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	4
2.GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. PERİFERİK SİNİR HİSTOLOJİSİ	6
2.2. NÖRODEJENERASYON MEKANİZMALARI	8
2.3. AKSONAL DEJENERASYON MEKANİZMASI.....	11
2.4. WALLER DEJENERASYON MEKANİZMASI.....	14
2.5. TRANSNÖRONAL DEJENERASYON MEKANİZMASI.....	15
3.GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. PRİMER NÖRON KÜLTÜRÜ:.....	18
3.1.1. DENEY HAYVANLARI:	18
3.1.2. GENEL TEKNİKLER:	18
3.2. LASER İLE HASARLAMA (AKSOTOMİ):	19
3.3. HÜCRELERİ LASER İLE TOPLAMA (CATAPULTING):.....	20
3.4. RNA İZOLASYONU:	21
3.5. cDNA SENTEZLENMESİ:	21
3.6. qRT PCR ANALİZLERİ.....	22
3.7. İMMÜNOSİTOKİMYA:	26
3.8. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ:	27

4.BULGULAR	28
4.1. PRİMER DRG NÖRON KÜLTÜRÜ:.....	28
4.2. HÜCRELERİN LASER İLE HASARLANMASI (AKSOTOMİ):.....	30
4.3. HÜCRELERİN LASER İLE TOPLANMASI (CATAPULTİNG):	31
4.4. qRT- PCR ANALİZ SONUÇLARI:	32
4.4.1. P2RX7 ve mTOR genleri için örneklerin Cq değerleri:	33
4.4.2. Referans genine (GAPDH) göre örneklerin normalizasyonu (ΔCq):	34
4.4.3. Normalize edilen ΔCq değerlerinden genlerin DNA Miktarları ($2^{-\Delta Cq}$) :	35
4.4.4. P2RX7 ve m TOR genlerinin istatistik analizleri:	36
4.5. P2RX7 reseptör mTOR proteinin immünohistokimyası:	38
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	42
6. KAYNAKLAR:	46
7. EKLER:.....	51
8. ETİK KURUL ONAY:	55
9. ÖZGEÇMİŞ	56

ÖZET

***In Vitro* Transnöronal Dejenerasyon Mekanizmasında Gen İfade Değişiklikleri**

Sinir sisteminin travmatik ve dejeneratif hasarları başlangıçta sınırlı sayıda hücreyi etkilese de daha sonra hasarın yakın ve uzak bölgelere “Transnöronal Dejenerasyon (TND)” adı verilen bir mekanizmayla yayıldığı bilinmektedir. Bu tez çalışması ile *in vivo* modellerle araştırılması kısıtlamalara maruz kalan bu konunun etkin bir *in vitro* model ile araştırılarak TND ‘nun altında yatan moleküler mekanizmaların irdelenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda fare arka kök gangliyon (DRG)’larından yapılan primer nöron kültüründe sadece 10 nöron laserle aksotomi yapılmış ve her hasarlanan nöron kendisi ile komşu olan (herhangi bir müdahaleye maruz kalmayan) nöronun ölümüne sebep olmuştur. Bu nöronlar arasında oluşan transnöronal dejenerasyon mekanizmasının gen ifade değişiklikleri iki aşamalı kantitatif PCR uygulamaları ile analiz edilmiştir. Transnöronal dejenerasyonun gerçekleşmesi için kültürde uzayan aksonlar arasında fiziksel bir irtibatın olması gerektiği için hasarlanacak nöronlar dikkatle seçilmiştir. Hücre kaybına neden olan ölüm yolağı tam olarak bilinmediğinden hücre ölümü ile ilişkili 11 farklı gen (Bax, Bcl2, p53, Caspase 3, Fas, FasL, Atg5, Atg7, mTOR, Rıpk1, Rıpk3) ve hücre apoptozunda etkili olduğu daha önceden rapor edilen P2RX7 geni ile beraber referans gen olarak GAPDH seçilmiş ve toplamda bu 13 genin qRT-PCR ve immunositokimya teknikleri kullanılarak hem kantitatif hem de kaltitatif analizleri yapılmıştır.

Bu tez çalışması ile TND mekanizmasında hasarlanan nöronlardan ortama yayılan pürin reseptörlerinin (P2RX7) miktarca arttığı gözlenmiştir. Bir başka sonuç ise mTOR geninin ifade analizlerinde gözlenen değişikliktir. mTOR gen ifadesi yapılan tüm deneylerde artış göstermiş ve istatistiksel analizlerde kontrol grubu ile aksotomi yapılan nörona komşu olan nöron arasında anlamlı sonuç vermiştir. Çalışmada araştırılan ve hücre ölüm çeşitleri ile ilişkili olduğu bilinen diğer genlerin ifade analizleri yapılan bazı deneylerde yüksek sonuç versede yapılan tekrarlı deneylerde istikrarlı bir artış gözlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: DRG, Hücre Ölümü, Laser Aksotomi, Pürin Reseptör, mTOR. Transnöronal dejenerasyon,

ABSTRACT

***In Vitro* Analysis of Gene Expression for Transneuronal Degeneration Mechanisms**

It is known that although degenerative and traumatic injuries of nervous system initially affect only a few cells, the damage may spread to close and remote locations and that a process called Transneuronal Degeneration (TND) may be in action in such situations. In this study, the molecular mechanism underlying TND had been proposed to investigate *in vitro* on account of this phenomenon was restricted to explore by *in vivo* models.

In vivo models to study TND mechanism have limitations; in this study, which was designed to investigate this phenomenon *in vitro*. It was demonstrated that injury to only ten cells of cultured mouse dorsal root ganglion neurons (DRG) with a laser beam led to death of its neighboring neuron (Transneuronal Degeneration). According to this injured neuron and its neighboring neuron, two steps q RT-PCR technique was employed to observe any gene expression analyses.

While it was known that physical contact of growing axons in culture was essential for the Transneuronal degeneration to occur, the neurons which will be axotomized are selected very carefully. In account of unknown for certain cell death pathway, 11 different genes (Bax, Bcl2, p53, Caspase 3, Fas, FasL, Atg5, Atg7, mTOR, Ripk1, Ripk3) that known to be involved in kinds of cell death, P2RX7 gene that had been reported to be related with apoptotic pathway and one Housekeeping gene (GAPDH) were used to obtain quantitative and qualitative analyses of the gene expression levels by performing qRT-PCR and Immunocytochemistry (ICC) techniques.

In this study has demonstrated that purin receptors released after cell injury increase tendency of neurons to die in transneuronal mechanism. The other interesting conclusion was observed in assessment the amount of gene expression for mTOR. Statistical analyses of mTOR gene expression were showed that there is a significant correlation between neighboring neuron compared to control group. The expression of other genes that were used in this study increase provided in some experiment but it was not consistently observed.

Key words: Cell Death, DRG, Laser Axotomy, Purin Receptors, mTOR. Transneuronal Degeneration

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Geçtiğimiz yüzyılda görülmeye başlayan ve içinde bulunduğumuz zaman diliminde kendini iyiden iyiye hissettiren bir vaka ile karşı karşıyayız. Sanayileşmiş ülkelerde 65 yaş ve üzeri yaşlı nüfusunda görülen artış ile nörodejeneratif hastalıkların görülme sıklığı da artmıştır. Tahmin edilebilirki gelecek zamanlar için birçok dünya ülkesinde şimdiden sinyallerini aldığımız nüfus artışındaki azalma ve bunun bir sonucu olan yaşlı nüfus oranındaki artış nörodejeneratif hastalıklarla toplumlar olarak daha çok karşılaşacağımız ve hem ekonomik hemde fiziksel olarak doğacak ihtiyaçlarla yüzleşmemiz anlamına gelecektir. Nörodejeneratif hastalıklarla ilgili olarak günümüze kadar yapılan çalışmaların birtakım ilaç ve tedavi yöntemleri ortaya koymasına rağmen halen dejeneratif sürecin ilerlemesini durdurabilecek çözümler elde edilememiştir.

Bu doğrultuda, yapılan araştırmalarla etkili, önleyici ya da koruyucu tedavilerin geliştirilememesinin nedenleri arasında en önemlisi nöronların nörodejeneratif hastalıklarda hangi mekanizmalarla öldüğüne dair bilginizin sınırlı olmasından kaynaklanmaktadır. Bu tabloya rağmen, sinir bilim alanında yapılan ve her biri devrim niteliğinde ki bir çok çalışma ile nörodejeneratif hastalıkların sırlarının kilidi tek tek açılacak ve etkili tedavi stratejileri kullanılabilir hale gelecektir

Transnöronal dejenerasyon mekanizması (TND) sinir sistemi hastalıklarında etkin olduğu bilinen bir nörodejeneratif süreçtir.

Bu tez çalışmasında; oluşturulan *in vitro* model ile yapılan moleküler ve hücrel analizler sonucunda TND mekanizmasının anlaşılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda bu ve benzeri mekanizmaların aydınlatılması ile sinir sistemi hastalıklarının teşhis ve tedavisinde yeni yaklaşımlar kazanılarak daha etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunmak hedeflenmektedir.

Bir nöron dejeneratif veya travmatik bir sebeple hasar gördüğünde sadece kendisi değil, yakın ve uzağındaki başka nöronlarında ölüme gittiği gözlenmiştir. İlk defa 1960 yılında Matthews Cowan ve arkadaşları tarafından ortaya konulan (Matthews, Cowan et al. 1960) **Transnöronal dejenerasyon** (TND) mekanizması **seconder-ikincil hasar** olarak da adlandırılmaktadır (Adamchik et al. 2000). TND süreci sinir sisteminde meydana gelen hasarın etkisini artırıp yaygınlaştırarak ortaya çıkan hastalık ya da sakatlık durumunun çok

daha fazla ağırlaşmasına neden olmaktadır. Bu olayın hem santral sinir sisteminin hem de periferik sinir sisteminin çok değişik bölgelerinde olabildiği bilinmektedir.

Günümüzde halen bilinmeyen pek çok yönü olan TND mekanizmasının detaylı olarak araştırılmasının önündeki en önemli engellerden biri *in vivo* deney modellerinin getirdiği kısıtlamalardır. Örneğin *in vivo* modellerde TND'nin ortaya çıkması 4-14 gün arasında değişmektedir (Norgborg ve Johansson, 1996; DeGiorgio et al. 1998; Dihne et al. 2002).

Bu sebeple TND mekanizmasının *in vitro* bir modelle araştırılması tercih edilmiş ve bunun için çeşitli deney modelleri kullanılmıştır. Yapılan bir çalışmada, kültürü yapılan nöron ve glial hücreler plastik bir çubukla hasara uğratılmış ve kültürün diğer tarafındaki hücrelerin bu işlemde nasıl etkilendiği değerlendirilmiştir (Tecoma et al. 1989; Mitchell et al.1995). Ancak bu çalışmalarda hasarlanacak nöron sayısının, hasarın etkileyeceği hücre bölgesinin ve dahası hangi tip hücrelerin hasarlanacağına kontrol edilmesi güç değişkenler olduğu gözlemlenmiştir.

Yapılan çalışmalar göstermiştir ki; TND mekanizmasının araştırılması için oluşturulacak model kolay uygulanabilen, hassas, tekrarlanabilir, ölçeklendirilebilir ve ölçülebilir bir *in vitro* modele ihtiyaç duymaktadır.

Bu tez çalışmasında şimdiye kadar TND çalışmalarında *in vitro* model olarak kullanılan deney modelleri arasında yukarıda bahsettiğimiz kriterlere gösterdiği uygunluk açısından örnek teşkil edebilecek olduğu düşünülen bir model kullanılmıştır (Öztürk G. ve ark.,2011).

Oluşturulan deney modelinde DRG izole edilip kültüre edilmiş ve primer hücre kültürü yapılan bu nöron hücrelerinin aksonları laser ile (337 nm-UV) kesilerek hasara uğratılmıştır. TND mekanizmasının gerçekleşmesi için gereken süre beklendikten sonra hasar verilen hücre ve onların komşuluğundaki nöron hücreleri kültür ortamından ayrı ayrı toplanarak kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak gen ifade analizleri yapılarak nöronların arasındaki TND mekanizması hücrelerin gen düzeyinde ki değişiklikler açısından araştırılmıştır.

Çalışmada hücre ölüm çeşidi olarak bilinen apoptoz, nekroz, otofaji ve nekroptoz olaylarında temel olarak rol aldığı bilinen Bax, Bcl2, p53, Caspase 3, Fas, FasL, Atg5, Atg7, mTOR, Rıpk1, Rıpk3 genleri ve referans gen olarak GAPDH seçilerek bu genlerin ifade analizleri qRT-PCR yöntemiyle belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar ile belirlenen genlerin TND mekanizmasındaki muhtemel rolleri anlaşılmalı ve açıklanmaya çalışılmıştır. Ayrıca sinir sistemi hasarlarında nöron kaybının olduğu durumlarda miktarında aktif olarak artış olduğu

önceki çalışmalarda rapor edilen Pürin reseptöründe (P2RX7) (Rathbon MP et al. 1999) bu genler arasına dahil edilerek TND mekanizmasında gen ifade değişikliğine sahip olup olmadığı araştırılmıştır.

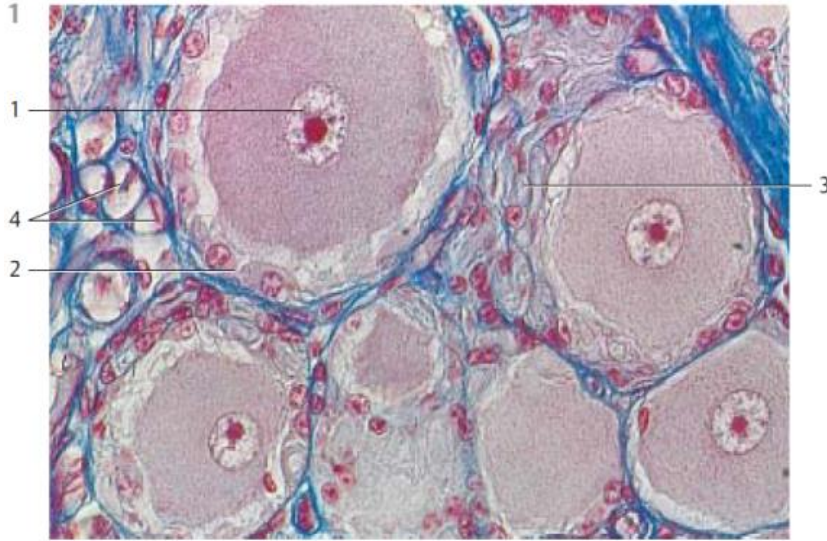
Gen ifade analizleri iki aşamalı qRT-PCR uygulaması ile analiz edilmiş ve analiz sonrasında gen ifade değişikliği olduğu görülen genlerin uygun primer ve sekonder antikorları kullanılarak immünohistokimyasal boyamaları yapılmış ve kantitatif artış olduğu tespit edilen genlerin kalitatif analizleri de bu şekilde gösterilmiştir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1. PERİFERİK SİNİR HİSTOLOJİSİ

Periferik sinirler bağ doku matrisi içerisinde yerleşen, schwann hücreleri tarafından desteklenerek kılıflanmış aksonları içermektedir. Yoğun bağ dokunun dış kılıfı olan epinöryum, tüm sinirin yapısal bütünlüğünü korumaktadır. Perinöryum ise fasikülleri ayırarak endonöronal alanın regülasyonunu sağlayan fizyolojik bir bariyer oluşturur. Endonöryum aksonları içermektedir ve schwann hücrelerini çevreleyerek her fasikülün intertisyumunu oluşturmaktadır. Periferik sinir köklerinin fasikülleri epinöryum veya perinöryum içermedikleri için daha az belirgindirler. Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyanan kesitler incelendiğinde, epinöryumun yoğun kollajen, fibroblast ve kan damarlarından oluştuğu görülmektedir.

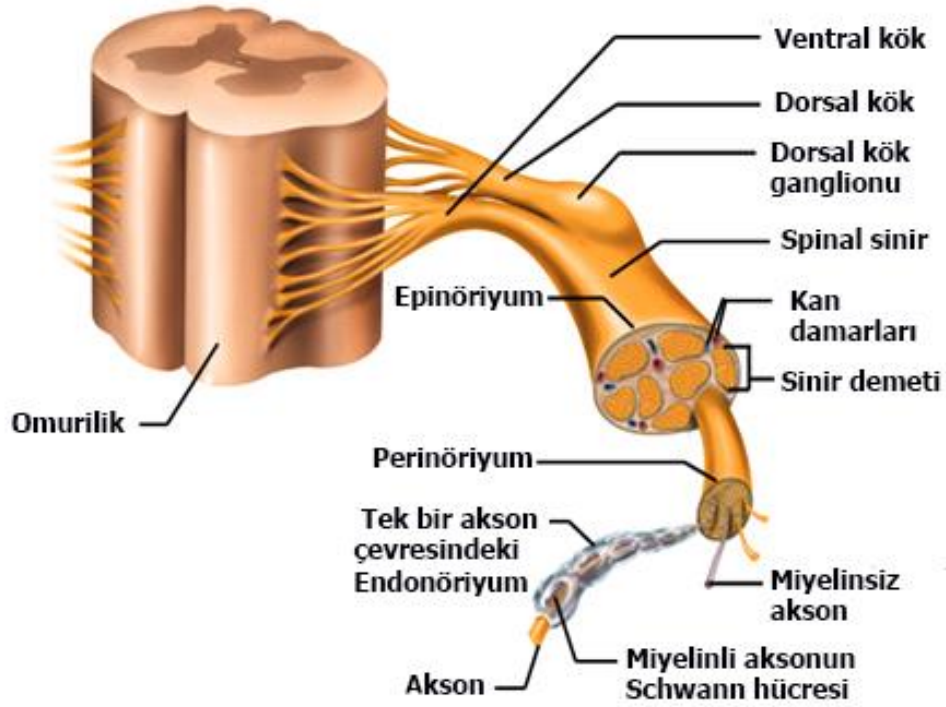
(Şekil 1).



Şekil 1: Hemotoksilen ve Eozin ile boyanan DRG kesitleri.1.Hücre çekirdeği 2.Satellit hücreleri 3.Sinir lifleri ve 4.Kapiller alanlarını göstermektedir (Abraham L. Kierszenbaum *Histology and Cell Biology Text Book* , Elsevier ,2011)

Ayrıca adipositler, mast hücreleri, histiyositler ve lenfatik damarlar da dikkati çekmektedir. Perinöryum, fasikülleri çevreleyen iğ şekilli perinöral hücrelerin oluşturduğu konsantrik yapıdaki tabakalardan meydana gelmektedir. Perinöryumdaki hücre sayısı fasikülün büyüklüğüne bağlıdır. Fasiküller içindeki endonöronal alan, aksonlar, schwann hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve kapillerden oluşmaktadır. Aksonlar etrafındaki myelin, çoklu dairesel şeffaf yapılar şeklinde izlenirken, myelinli aksonlar ise myelin tabakası

içinde eozinofilik yapılar olarak görülmektedir. Bazen, schwann hücresinin çekirdeği myelin tabakasının periferinde izlenmektedir (Şekil 2). Myelin'in %75 (kolesterol, sphingomyelin, galaktolipid), %25'i proteinden oluşur. Myelinli schwann hücrelerinde bulunan miyelin-ilişkili glikoproteinde (myelin-assosiyé glycoprotein (MAG)) miyelinizasyonda önemli rol oynar. Myelinli lifler iletiyi daha hızlı iletir. Çoğu sinir hücresindeki peripherel sinir lifleri hem myelinli, hem de myelinsizdir (Douglas C. Antony et al. 1996, L. Carlos Junqueira et al. 1998).



Şekil 2: Arka kök gangliyonunun anatomik yapısı. Omiriliğin dorsal yüzeyine çıkan sinir lifleri ile ventralden çıkan sinir liflerinin buluştuğu kavşak noktasında bulunan ve yumru şeklinde olan Arka Kök Ganglion-DRG anatomik yapısı (Abraham L. Kierszenbaum, *Histology and Cell Biology Text Book*, Elsevier, 2011)

Periferik Sinir Sistemi (PSS)'ndeki ganglionlar dorsal kök ganglionları (DRG) ve otonomik ganglionlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Dorsal kök (spinal) ganglionlar, dural kesenin torbalaşması şeklinde spinal kolon boyunca yer alırlar. Postmortem muayenede sert nodüller olarak palpe edilen DRG'ler histolojik olarak 100 mikrometre büyüklüğe kadar ulaşan büyük nöronları içerirler. Her bir nöronun gövdesinden tek bir akson çıkarak dallanır, bir uzantıyı santrale diğerini perifere gönderir. Ganglion hücreleri satellit hücreleri olarak

adlandırılan, sitoplazmaları ganglion hücreleri etrafında halo oluşturan destek hücreleri tarafından çevrenmektedir. Akson demetleri, özellikle ganglion hücresinin gövdesi ve satellit hücrelerinin kollajenöz stromasından kaynaklanmaktadır. Otonomik ganglion hücreleri ise ganglion boyunca yer alan aksonlarla birlikte bulunurlar ve buradaki nöronların daha küçük, çekirdekleri sitoplazma içinde eksentrik olarak yer alan ve DRG'ler gibi satellit hücrelerle çevrenmiş nöronlardır (Atalay Ö.F., Üstün H., (2004), Douglas C. Antony et al. 1996).

2.2. NÖRODEJENERASYON MEKANİZMALARI

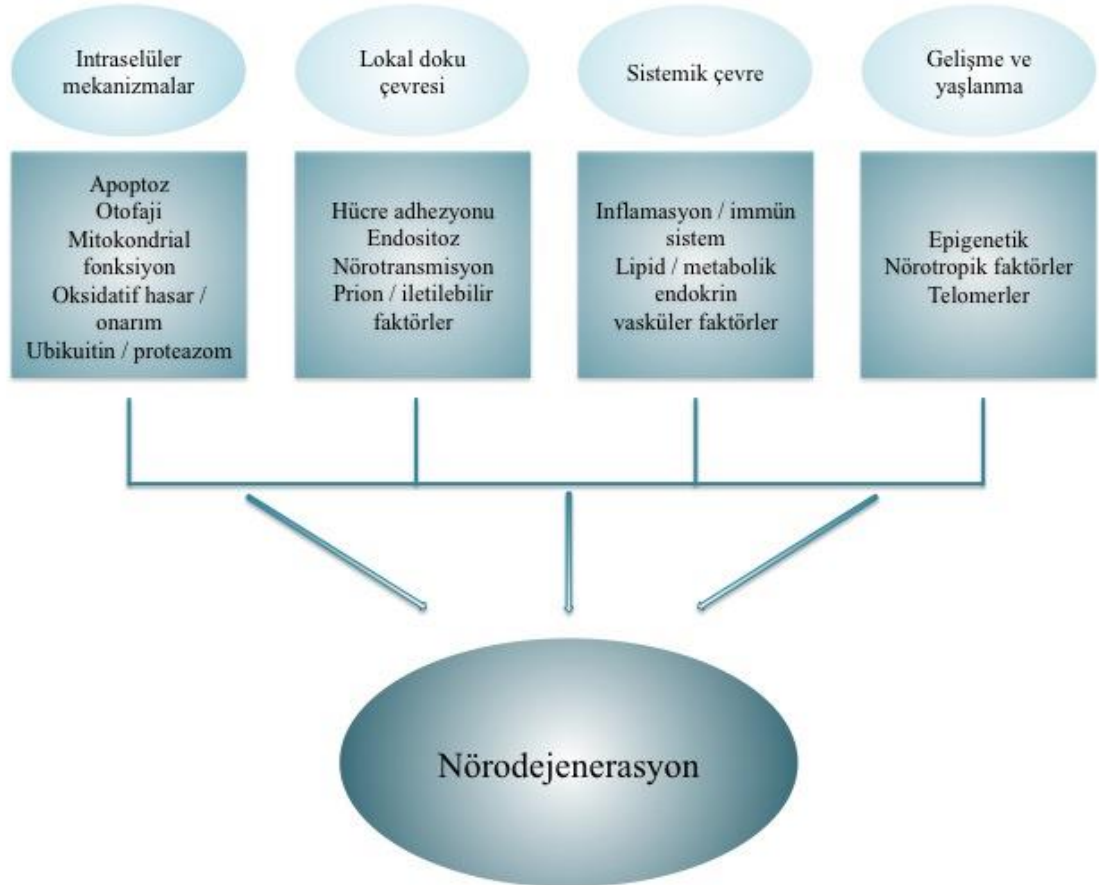
Fonksiyonel veya yapısal kayıplara maruz kalarak nöron hücrelerinin ölmesi ile sonuçlanan süreç '*Nörodejenerasyon*' olarak adlandırılmaktadır. Günümüz dünyasında milyonlarca insanda görülen sinir sistemi hastalıklarının bir çoğunun tanımlanmasında kullanılan bu ifade birincil olarak nöronları etkilese de, uygulamada anatomik sistemlerdeki yapısal veya fonksiyonel kayıp kaynaklı bozukluklardaki hücre ölümlerini de içermektedir. Heterojen klinik nörolojik bozukluklarda görülen patolojik vakaların tanımlanmasında da bu ifade kullanılmaktadır. Neoplazma, ödem, kanama ve primer olmayan sinir sistemi travması gibi nöronal hastalıklar, nörodejeneratif olarak kabul edilmez. Farklı yüzlerce nörodejeneratif bozukluk arasında, en fazla rastlanılanlar: Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Huntington hastalığı (HD) ve Amiyotrofik lateral sikleroz (ALS) hastalıklarıdır. Nörodejeneratif bozuklukların görülme sıklığındaki en önemli risk faktörü özellikle AD ve PD için ilerleyen yaş olarak rapor edilmiştir (Tanner CM et al. 1996).

Klinik olarak birbirine benzer ve farklı pekçok patolojik özellik göstermelerinden dolayı nörodejeneratif hastalıkları pratik bir sınıflandırmada toplamak oldukça güçtür. Bu nedenle farklı lezyonların etkiledikleri bölgelerde farklı klinik tablolara yol açtığı belirtilmiştir (Burn DJ et al. 2001).

Merkezi sinir sisteminin nörodejeneratif bozuklukları olarak ele alındığında serebral kortekste, bazal gangliada, beyin sapında ve omirilikte izlenen nörodejeneratif hastalıklar şeklinde gruplandırma yapmak mümkündür. Ayrıca her bir grup kendi içinde, belirli bir hastalığın daha belirgin olarak öne çıkan kimlik özelliklerine göre sınıflandırılabilir. Örneğin, ağırlıklı olarak serebral korteksi etkileyen hastalıklar grubu demans (örneğin AD) ve

demansın olmadığı koşullar olarak ayrılabilir. Dikkat çekici olan ise AD gibi serebral korteks patolojisi hastalıklarında (Sulkava R. et al.1983) demans çok sık görülmesine rağmen AD dışında en az 50 farklı hastalıkta da görülmektedir (Tomlinson BE. et al. 1977).

Nörodejenerasyon mekanizmasının şimdiye kadar yapılan araştırmalarda pek çok tetikleyicisi olduğu gözlenmiştir. Bu tetikleyiciler arasında hücre içi mekanizmalar (apoptoz, otofaj, oksidatif stress, mitokondriyal fonksiyonlar ve proteinlerin yıkımı gibi), lokal doku çevresi ile olan etkileşimler (endositoz ve nörotansmitter geçişi gibi), immün sistem ve metabolik veziküller, çevre ve yaşlanmaya bağlı olarak değişim gösteren epigenetik faktörler gibi bazı genel başlıklar altında toplanabilir (Şekil 3) (Vijay K. et al.2013).



Şekil 3: Nörodejeneratif sürecin başlaması ve ilerlemesi üzerinde etkisi olduğu düşünülen mekanizmalar (Vijay K. Review Article *J Neurodegener* 2013; 2(3):145-175).

Nörodejeneratif hastalıkların birkaç istisnası dışında neden kaynaklandıkları henüz bilinmemektedir.Sadece hastalıkların teşhisinin yapılabildiği bazı belirteçler mevcuttur. Bunun yanısıra bu hastalıklardaki genetik ve çevresel faktörlerin göreceli rolleri halen araştırılmaktadır.Bazı nörodejeneratif bozukluklar aileden gelen genetik bir temele dayanmaktadır.Örneğin HD ve dentatorubral pallidoluysian atrofi otozomal dominant olarak izlenirken nadirende resesif olarak çalışılmaktadır.Daha az sıklıkla ise otozomal resesif olarak çalışır.Örneğin, ailesel spastik paraparezi, bir X-bağlantılı özellikteki spinal ve bulber musküler atrofi ya da mitokondriyal Leber optike nöropati anneden çocuğana kalıtsal özellik gösterebilir. Bu "saf" genetik nörodejeneratif hastalıklara karşın diğerleri esasen sporadik özellikler göstermektedir ve çok azı kalıtsaldır.Bu durum PD ve AD için de geçerlidir ve hatta ALS için tüm vakaların yaklaşık % 10'u tamamıyla aileseldir (Tanner CM et al.1999).

Nörodejenerasyon mekanizmalarının ilgili moleküler üslerini aydınlatmak için bu sebepten sporadik varyantların çalışılması gerekmektedir.Gerçekten sporadik olan hastaların büyük çoğunluğunda genetiğin nörodejeneratif süreçte katkısının daha az olduğu belirtilmiştir (Tanner CM et al. 1999).

Bunun yerine toksik çevresel faktörler nörodejenrasyon mekanizmasını başlatan birincil şüpheliler olabilirler.Bu görüşü destekleyen bir çalışmada bazı coğrafi veya temporal koşulların nörodejeneratif süreçleri kümeler halinde ortaya çıkardığı gözlenmiştir.Örneğin, yaygın olarak bir gıda veya ilaç olarak alınan yerli bir bitkinin tüketildiği Guam Chamorros halkında PD-ALS kompleksinin görülme sıklığı fazladır (Kurtland LT et al. 1988).PD gibi hastalıkların çevresel faktörlerden etkilendiğini gösteren başka çalışmalar da vardır (Tanner CM et al. 1989). Sporadik nörodejenerasyonun çevre ve genetik arasında önemli patolojik çeşitlilikler gösterdiği de gözlenmiştir (Prezant TR. et al.1993).Nörodejenerasyon mekanizmasında ayrıca hücre içi bazı yapıların aktif rol aldığı da bilinmektedir Lewy cisimcikleri olarak bilinen bazı hücre içi inklüzyonların yokluğunda da bu durum tespit edilmiştir (Forno LS. et al. 1996).

Nörodejenerasyon mekanizmasında hücre ölümlerinin morfolojik çeşitliliği genellikle ihmal edilse de çoğunlukla hücre ölüm çeşitlerinden ilk olarak apoptoz ve nekroz akla gelmektedir (Clarke P. et al. 1990, Yaginuma, H. et al. 1996,Clarke P. et al. 1999). Yapılan çalışmalar ile nöronal dejenerasyon mekanizmasında en az dört ölüm türü tanımlanmıştır: apoptotik, nekrotik, otofajik ve sitoplazmik (Clarke P. et al. 1990). Klinik açıdan hücre ölümlerinin bu şekilde farklılık göstermesi oldukça önemlidir (Uchiyama Y. et al. 2001, Sperandio, S. et al.

2000). Yapılan son çalışmalarda otofajinin de nörodejeneratif mekanizmalarda aktif bir şekilde rol aldığı gösterilmiştir (Son, Shim et al. 2012).

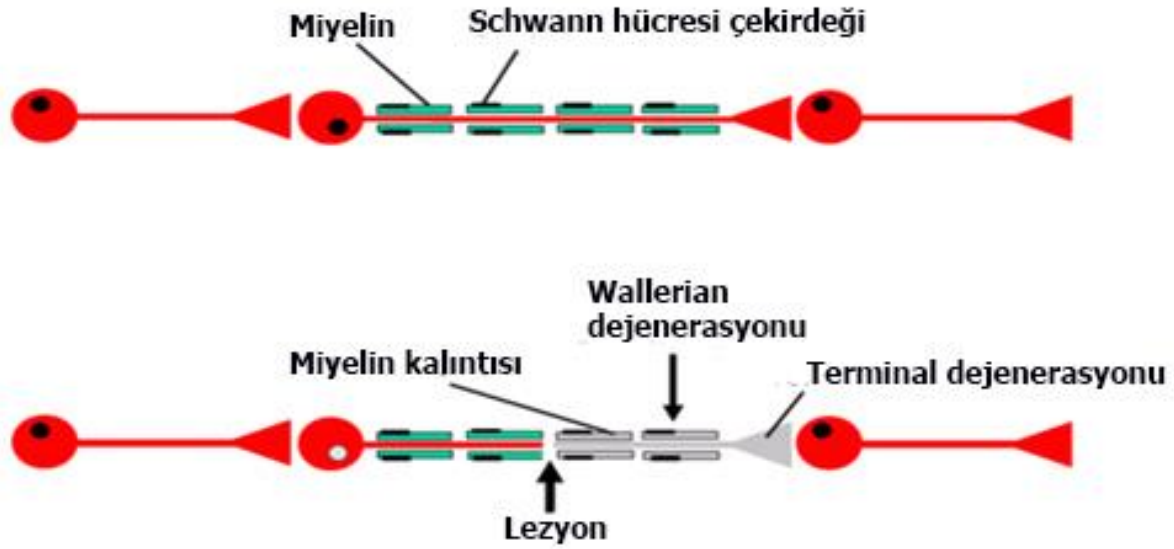
Bu tez çalışmasında bahsi geçen tüm hücre ölümü çeşitleri ile birlikte son zamanlarda yapılan çalışmalar ile gündeme gelen ve programlanmış hücre ölümüne bir alternatif olarak gösterilen 'nekroptoz' adı verilen ölüm çeşidinin de TND mekanizmasında rol alıp almadığı araştırılmıştır (Dana E. et al. 2010, Lorenzo G. et al. 2008).

2.3. AKSONAL DEJENERASYON MEKANİZMASI

Akson dejenerasyonu felç, glaukoma ve motor nöropatilerinde görüldüğü gibi nörodejeneratif şartların en karakteristik olaylarından biridir. Aksonun herhangi

bir sebeple hasar görmesine '**Aksotomi (Axotomy)**' adı verilmektedir. *In vitro* çalışmalarda oluşturulan modeller için aksotomi genellikle hücre aksonunda yapılan bir kesi ile gerçekleştirilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız *in vitro* modelde aksotomiye laser kesimi ile gerçekleştirdik.

Aksonun nöronal hücre gövdesine en uzak kısmının (distalakson) zedelenmesi sonucu buradaki sitoplazmik parçalanma **aksonal dejenerasyon** olarak adlandırılmaktadır. PSS aksonal dejenerasyonda lezyonun oluşması yaklaşık 24 saat sürerken MSS'de bu süreç daha da uzundur (Vargas M.E. et al.2007). Dejenerasyon, akson içindeki tek bir noktada başlayarak daha distal segmentleri içermek üzere ilerlemektedir. Zedelenmeden sonra birkaç gün içinde distal aksonun tüm kısımlarında parçalanma (fragmentasyon) başlamaktadır. Nörofilamanlar ve mikrotübüller sitoplazmada artık görülmez ve yerini amorf granüler sitoplazmik materyale bırakırlar. Aynı zamanda aksolemma da devamlılığını koruyamaz ve aksondaki aksiyon potansiyeli üretimi kesilir. Myelin kılıf dağılır ve hasarın distalindeki alanlarda akson küçük oval segmentlere parçalanır. Fragmanlar, belirgin miyelin debris ve aksonal kalıntıları içerdikleri için 'myelin ovoidler' olarak adlandırılırlar (Şekil 4).



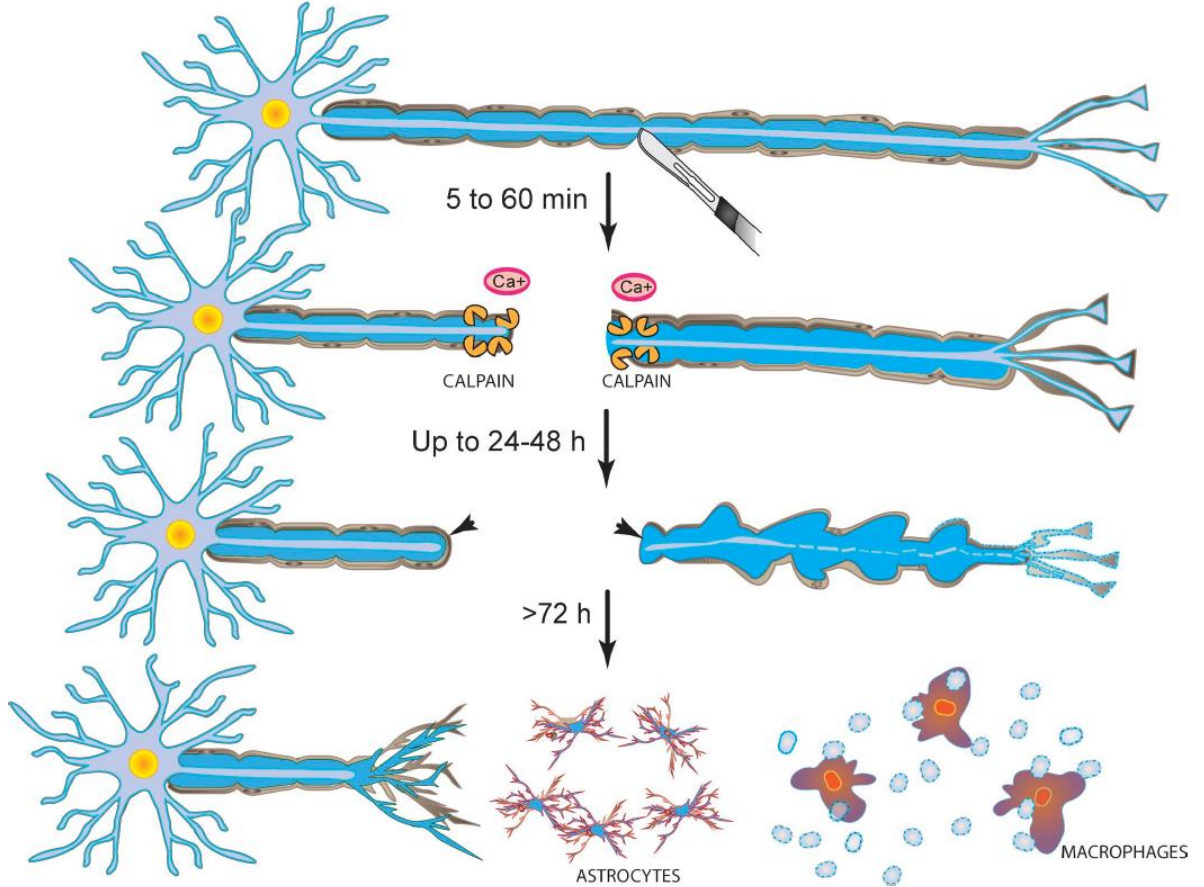
Şekil 4: Aksotomi ve dejenerasyon mekanizmaları

Eğer hasar nöron hücre gövdesinin hemen proksimalinde meydana gelmişse hücre gövdesi dejenere olmaktadır. Hücre gövdesi, santral eozinofilik bir alan şeklinde genişlemekte ve Nissl cisimcikleri hücrenin periferine doğru yer değiştirmektedir. Bu olay '**kromatolizis**' veya '**aksonal reaksiyon**' olarak adlandırılmaktadır. Schwann hücreleri aksonal dejenerasyon ve rejenerasyon olayına aktif olarak katılır.

Akson parçalanmasının başlangıcından kısa bir süre sonra Schwann hücreleri çoğalarak aksonal kalıntıları kuşatmaktadır (Waller A. et al. 1850, Coleman MP. et al. 1998). Makrofajlar aksonal dejenerasyon alanına gelip lifin dış yüzeyine katılırlar (Şekil 5). Birkaç hafta sonra debrisin ortadan kaldırılmasıyla makrofajlar vasküler alanlara göç ederler (Douglas C. Antony et al. 1996, Fansa et al. 2003). Eğer aksonal rejenerasyon tamamlanmamışsa önceden aksonun yer aldığı alan kollajen ile doldurulmaktadır.

Yapılan çalışmalarla aksonal transportun hızının aksonal dejenerasyon ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (Douglas C. Antony et al. 1996). Aslında aksonal transportun ilk göstergesi, kesiden sonra **anterograd akson dejenerasyonudur**. Hızlı aksonal transportta en hızlı hareket, membranla ilişkili veziküller içindeki materyallerle ilgilidir. Bu materyaller anterograd yönde 'kinezin' olarak bilinen mikrotübül-ilişkili ATPaz ile ileri doğru hareket etmektedirler. Kinezin hem aksonal veziküllere hem de mikrotübüllere bağlanarak mikrotübül boyunca vezikül hareketini oluşturmaktadır.

Hızlı aksonal transportun aksonal dejenerasyonla ilişkisini gösteren kanıt, daha kısa olan aksonlarda bu materyalin (veziküllerin) daha hızlı boşalması ve tükenmesiyle dejenerasyonun uzun aksonlara göre daha hızlı olmasıdır. Ek olarak, hızlı taşınan veziküller aksonal kesinin proksimal kısmında birikmektedir. Sonuç olarak, aksonal dejenerasyonun kesiden sonraki 1-4 gün içinde başladığını ve bu zaman çerçevesinde moleküler hareketin ana dalgasının, hızlı aksonal transport olduğunu söylemek mümkündür.



Şekil 5: Aksonal Dejenerasyon sonrası meydana gelen olaylar (Jack T. et al. *The Journal of Cell Biology*, 2012)

Periferel nöropatili hastalardan yapılan biyopsilerde aksonal dejenerasyon sık olarak karşılaşılan bir bulgudur. H&E ile boyanmış, longitudinal kesilerde, lineer miyeloid ovoid sıralar şeklinde görülmektedir. Bunlar lineer zincir şeklinde düzenlenmiş, boşluklar ve eozinofilik materyal şeklinde izlenmektedir. Komşu schwann hücrenin çekirdeği görülebilmekte ve bazen vakuol debrisini çevreleyen schwann hücre sitoplazmaları da izlenebilmektedir. Aksonal dejenerasyonun erken evrelerinde miyelin ovoidler tüm lif boyunca devam etmektedir, ancak zamanla ovoidler daha uzak alanlara dağılırlar. Hasardan itibaren total aksonal fragmentasyonun gerçekleşmesi genellikle 2 haftadan daha az zaman

almaktadır (Douglas C.Antony et al. 1996, Fansa et al. 2003). Böylelikle aksonopati bol dejenere liflerle karakterize iken kronik aksonopati lif kaybı ile karakterizedir. Bu nedenle kronik aksonopatide bir alana düşen akson sayısı azalmakta ve endonöryum kaybolan aksonların yerine geçen kollajenle birlikte artmaktadır.

PSS, eğer zedelenmeye yol açan ajan elimine edilirse geniş rejenerasyon kapasitesine sahiptir ve aksonal filizlenme ve yeniden büyüme iki aşamada gerçekleşmektedir (Şekil 5). İlki ve en hızlı olanı denörvasyon alanının bitişiğindeki aksonların filizlenmesidir. Bu olay, terminal akson filizinin atrofik kas lifini tekrar uyarması şeklinde, iskelet kasında da bildirilmiştir. İkinci tip filizlenme hasarlanan aksonun distal kısmında gerçekleşmekte ve aksonal büyüme konularının oluşmasıyla sonuçlanmaktadır (Şekil 18) (Öztürk G.ve ark.2011).

Büyüyen konun yayılımında ve aksonal büyümenin yeterliliğinde birçok faktör rol oynamaktadır. Büyüyen konlar özelleşmiş, aktinden zengin sitoskeleton içerirler ve artmış büyüme-ilişkili protein (growth-associated protein (GAP-43)) içeren özel vezikül ve membranlara sahiptirler. Diğer büyüme faktörlerinden olan sinir büyüme faktörünün (Nerve Growth Faktörler (NGF) aksonal rejenerasyonu kolaylaştırdığı belirtilmiştir (Onteniente B. ve ark. 2003, Leininger GM ve ark. 2004). Denerve olan schwan hücreleri artmış sayıda NGF reseptörü eksprese ederler. NGF, aksonal rejenerasyon sürecinde hem aksonal büyüme konuları hem de schwan hücreleri ile etkileşerek büyüme konularının uygun son-organa rehberlik etmesine schwan hücreleri yardım etmektedirler (Douglas C.Antony ve ark. 1996). Elektron mikroskobu ile incelendiğinde schwan hücrelerince oluşturulan, Büngnerbandı ile çevrili oldukları görülmektedir.

2.4. WALLER DEJENERASYON MEKANİZMASI

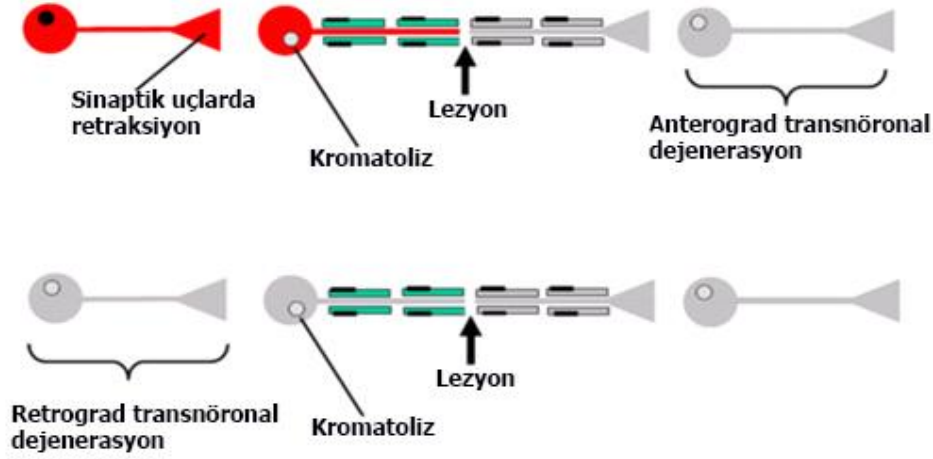
Anterograt veya ortograt dejenerasyon olarak da adlandırılan ‘**Waller Dejenerasyonu**’ bir sinir hücre gövdesinin, dışında bulunan aksondaki sinir lifinin kesilmesi veya ezilmesi sonucu gelişen ve hasarın dejenerasyonunu ifade eden süreç olarak tanımlanmaktadır. Bu süreçlerden biri de ‘Waller benzeri dejenerasyon’ olarak bilinir ve özellikle aksopilazmik taşıma bozulduğunda nörodejenerasyonu meydana getirmektedir. Nörodejeneratif süreçlerin özellikle aksonal transport hasarlarında meydana geldiği rapor edilmiştir (Coleman MP et al. 2010). Yaralanma sonrasında akson iskeletinin etkileşimi dağılmakta aksonal membran parçalanmakta ve miyelin kılıfın degradasyonu sonucu ortama gelen makrofajlar ile ortadan

kaldırılmaktadır (Waller A. et al.1850, Coleman MP. et al.1998). Primer hücre kültürü çalışmalarında bu dejenerasyon çeşidinde protein NMNAT2'nin anahtar bir rolü olduğu gösterilmiştir (Gilley J. et al. 2010). Kesi yaralanmalarından sonra aksonal dejenerasyon ve rejenerasyon arasında bir denge görülmektedir. Ancak transeksiyon zedelenmelerinde sinirin devamlılığı bozulduğu için rejenerasyon distal segmentlerdeki büyüme konularının yanlış yerleşimi sonucu bozulmaktadır. Bu yanlış yerleşim aksonal rejenerasyonun yeterliliğini azaltmakta ve nöromaların oluşmasına yol açmaktadır (Douglas C.Antony et al.1996).

2.5. TRANSNÖRONAL DEJENERASYON MEKANİZMASI

İlk defa 1960 yılında Matthews Cowan ve arkadaşları tarafından ortaya atılan Transnöronal Dejenerasyon mekanizması en yalın ifadesi ile komşu nöronlarından aldıkları bazı uyarıcılar aracılığı ile nöronların fonksiyon kaybına uğraması ya da ölmesi olarak tanımlanmaktadır. Bu olaya aynı zamanda *secondar-ikincil hasar* adı da verilmektedir (Adamchik ve ark., 2000). TND mekanizması hasarın orjinal bölgesine göre çeşitlilik göstermektedir. TND mekanizmasının beyin lezyonları, nöronlar arasındaki etkileşim hasarları gibi başlıca sayabileceğimiz nedenleri bulunmaktadır.Farklı nedensellikleri olsa da TND mekanizmalarının hücresel, aksonal ya da dendritik olarak aynı etkilere sahip oldukları belirlenmiştir.TND mekanizmasının Huntington ve Alzheimer başta olmak üzere birçok hastalıkla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Transnöronal Dejenerasyon mekanizması genel olarak iki başlık altında incelenebilir (Şekil 6). *Anterograd ve Retrograd Transnöronal Dejenerasyon Mekanizması* olarak adlandırılan bu mekanizmalar hasarlanma şeklinin farklılığı ile ayırteilmektedir.

Aksotomi ve Dejenerasyon



Şekil 6: Retrograd ve Anterograd transnörönel dejenerasyon mekanizmaları:

Aksonda meydana gelen lezyonun bölgesine bağlı olarak presinaptik ve post sinaptik hücrelerde farklı şekilde görülen transnörönel mekanizmalarıdır.

Anterograd TND mekanizması inputların kaybı sonucu meydana gelen dejenerasyondur (Pinching A. ve ark.1971). Aralarında sinaptik bağlantı olan iki nöron hücresinden presinaptik nörondaki bir hasardan dolayı post sinaptik hücreye inputun iletilmemesi sonucu meydana gelen bir mekanizmadır. Bu sebeple bu tip TND mekanizmasına **ileri ölüm** (dying forward) veya sinapslar arasında geçen dejenerasyon **trans-sinaptik dejenerasyon** (trans-synaptic degeneration) da denilmektedir (Eisen A. et al. 2001). Retrograd TND mekanizması ise yine aralarında sinaptik bağlantı bulunan iki nörondan post-sinaptik nörondaki bir hasarlanma ile onun trofik olarak presinaptik nöronu destekleyememesi sonucu oluşan bir dejenerasyon mekanizmasıdır. Bu tip TND mekanizmasına **geri ölüm** (dying backward) adı da verilmektedir. TND mekanizmasının bu çeşidi ALS hastalığında açıkça gözlenmiştir. ALS hastalığında Betz hücrelerinin kaybı ile üst motor nöronlarda hasara neden olduğu gösterilmiştir (Eisen A. et al. 2001).

TND mekanizmasının olduğu hücrelerde en karakteristik olarak görülen özellikler hücrelerin sitoplazma ve çekirdeklerinde büzülme ile kendilerini küçültme eğilimi göstermeleridir (Pinching A. et al.1971). Bu büzülme ile konsantrasyonu artan sitoplazma ve çekirdekte bir elektron yoğunluğu izlenmekte ve çekirdekte kromatinlerin birikerek çekirdeğin dejenere

olmaya başladığı gözlenmektedir. Bu durum adeta elektronca yoğun olan bu tabakanın çekirdeğin yerine geçmesidir (Heimer, L. et al.1978). Ayrıca hücrede ribozom sayısında artış, ilk olarak mitokondri olmak üzere golgi cisimciği ve endoplazmik retikulum gibi bazı organlarda da şişmeler görüldüğü tespit edilmiştir (Pinching A.et al. 1971). TND mekanizmalarında aksonlar gibi dendritlerde de hasarlanmalar belirlenmiş ancak dendritlerin etkilenmesinin temel olarak TND şiddetine bağlı olduğu belirtilmiştir (Pinching A et al. 1971).

Anterograd ve retrograd transnöronal dejenerasyon genellikle insanlarda limbik, görsel veya dentate-rubro-olivary yollarındaki lezyonların çevresinde görülmektedir(Terao, S. et al. 1997). Beyin lezyonları anterograd transnöronal dejenerasyon ve onun sonucunda sistem dejenerasyonu gibi patolojik değişikliklere neden olmaktadır (Yamada, K. et al. 1997). Bazı çalışmalar lezyonların doğrudan TND'ye neden olduğunu göstermesine rağmen somatik motor nöronlardaki lezyonlarda bu durum gözlenmemiştir (Terao, S. et al. 1997).

TND mekanizmasının somatik motor sistemi nasıl etkilediğine dair henüz elimizde fazla bilgi yoktur. Alt motor nöronlarındaki bir TND sonrasında üst motor nöronlarında herhangi bir TND kaydedilmemiştir (Terao, S. et al.1997). TND mekanizması için bir başka çalışmaya göre; serebral lif yolları boyunca herhangi bir darbe ile impuls iletiminde kesintilere neden olan bir nörolojik bozukluk olarak tanımlanan '*ayrılma sendromunda*' (disconnection syndrome),beynin beyaz cevherindeki lezyonlarında ikincil nöronal kayıplara ve transnöronal dejenerasyonuna neden olduğu gözlenmiştir. Ayrıca forniks ve kontralateral serebellum gibi temporal lop lezyonları da TND'ye neden olmaktadır (Devinsky, O.ve ark. 2005). Son yapılan çalışmalarda memelilerde yaşlanma ile ilişkili olarak *de novo* mitokondriyal DNA mutasyonlarının da TND'ye neden olduğu gösterilmiştir (Dufour, E., et al.2008). Şimdiye kadar TND ile ilişkisi olduğu tespit edilen hastalıklardan başlıcaları olarak Huntington hastalığı ve multi sistem atrofileri (Stefanis, L ve ark. 1996), Alzheimer hastalığı (Su, J.H. et al. 1997), Cockayne syndrome (Dickson, Dennis W. et al. 2009) ve ALS hastalığı (Eisen A. et al. 2001) sayılabilir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. PRİMER NÖRON KÜLTÜRÜ:

3.1.1. DENEY HAYVANLARI:

Bu tez çalışmasında Balb-C ırkı 6-12 haftalık dişi fareler kullanılmıştır. Fareler İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Etik Kurulunun 38328770-34 sayılı izni ile MEDİTAM (Medipol Üniversitesi Tıbbi Deney Araştırmaları Merkezinden) temin edilmiştir. DRG nöron kültürü için önce hayvanlara Rompun (Xylazin 100mg/kg, Bayer) ve Ketamol (Ketamin 10mg/kg, RP) anestezisi uygulanmıştır. Daha sonra servikal transeksiyon ile ex. edilen fareler her birinden diseksiyon mikroskobu altında ve aseptik koşullarda yaklaşık 12-13 çift DRG çıkarılmış ve bunlar kültür işlemlerine alınmıştır.

3.1.2. GENEL TEKNİKLER:

3.1.2.1 DRG kültür işlemi:

Deney grupları; kontrol grubu, deney grubu (aksotomi yapılan) olmak üzere 2 petri şeklinde hazırlanmış ve tüm deneyler istatistik analizlerinin yapılması için 5 kez tekrar edilmiştir. Steril çalışılması gerektiği için çalışma Laminar Flow kabinde gerçekleştirilmiştir. 37 mm çapında ki cam tabanlı petri (WPI World Precision Instruments, Fluora Dish, 26092014) kültür işleminden bir gün önce Poly-L-Lysin (Sigma P6282): 1/10 oranında steril distile su ile sulandırılarak petrinin cam taban yüzeyi .kaplanmıştır. 2 saat oda sıcaklığında bekletildikten sonra steril distile su ile yıkanarak Laminin (Sigma L2020) : 1 mg/ml, 1/100 oranında distile steril su ile sulandırılarak petri yüzeyi tekrar kaplanmış ve 1 gece boyunca bekletilmek üzere 37 °C de % 5 CO₂'li etüve konulmuştur.

Ertesi gün 10ml RPMI 1640 (Sigma R0883) medyumuna %1 Antibiyotik (Sigma A5955) ve Glutamax (Invitrogen 35050-061) eklenerek diseksiyon mediumu ve 15 ml Neurobasal A (Invitrogen 10888-022) mediumuna ise %1 Glutamax ve Antibiyotik ile %2 B27 (Invitrogen 17504-044) eklenerek kültür medyumunu hazırlanmıştır. RPMI medyumunu diseksiyonda kullanılacağı için oda sıcaklığında bekletilmiş ve kültür medyumunu olarak kullanılan NBA ise 37 °C de % 5 CO₂'li etüve kaldırılmıştır. Anestezi altında servikal diseksiyon ile ex. edilen fareden izole edilen DRG' lar RPMI medyumun içerisine alınarak 990 µl NBA+ 5 µl Kolejenaz (Sigma C7657) ile hazırlanan karışım içerisinde 37 °C de % 5 CO₂ olan etüvede 40

dakika bekletilmiştir . Daha sonra DRG'lar HBBS (H9269) ile üç kere yıkanarak ve 400 µl NBA+ 200 µl Tripsin (Sigma T4424) eklenerek 37 °C de % 5 CO₂'li etüvde 15 dakika bekletilmiştir. Sırasıyla ucu kesik mavi, sağlam mavi ve sarı pipet uçları ile tiritürasyon işleminden geçirilerek son olarak da inisülin enjektöründen geçirilerek içerisine 10 µl DNase (Sigma D45513) eklenip tekrar 37 °C de % 5 CO₂ olan etüvde 30 dakika bekletilmiştir. Hücre süspansiyonu 800 rpm de 3 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı atılarak pellet kısmı içerisine 300 µl NBA + 40 µl Fetal Calf Serum (Sigma F9665) + 30 µl Tripsin inhibitörü (Sigma T6522) eklenerek pellet kısmında ki hücreler için hücre solüsyonunun homojenizasyonu sağlanarak sırası ile %60, %35 ve % 10 luk olarak önceden hazırlanan Percoll (Sigma P4937) üzerine bu hücre süspansiyonu eklenerek ve 1700 rpm 20 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant kısım atılarak ve pellet kısmı 600 µl NBA ile karıştırılarak bir gün öncesinden lamininle kaplanan cam petri steril distile su yıkanıp kurutulduktan sonra petri başına yakalışık 15000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. Petri 2 saat etüvde bekletildikten sonra medyum 1500 µl olacak şekilde tamamlanarak petri tekrar 37 °C de % 5 CO₂'li olan etüve konulmuş ve farklı saat aralıklarında görüntüleri alınmıştır (Şekil 10-11).

Çalışmamızın kontrol aşamalarından biri olarak hazırlanıp etüve konulan DRG primer kültürü nöronlara spesifik olduğu bilinen Creysl Violet boyası ile (Sigma C5042, 1.5 mg/ 300 ml) boyanarak ışık mikroskobunda görüntülenmiştir (Şekil 10). Creysl Violet ile boyama protokolü çalışmamızda kullandığımız DRG primer nöron kültüründeki nöron ve glia hücrelerini doğrulamak için kullanılmıştır. Boyanan nöron ve glia hücreleri bu tez çalışmasında doğru hücreler ile çalışıldığını göstermiştir.

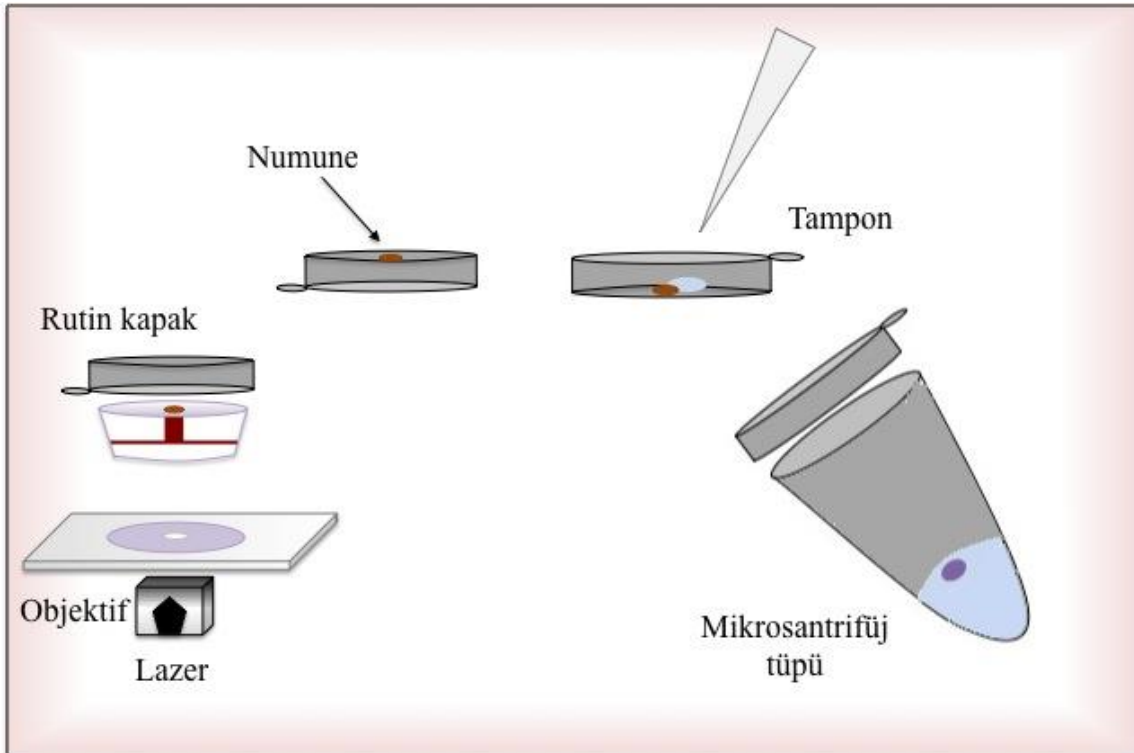
3.2. LASER İLE HASARLAMA (AKSOTOMİ):

DRG primer nöron kültürü ekim yapıldıktan 48 saat sonra nöronların gelişimleri ve uzattıkları akson miktarı gibi özellikleri dikkate alınarak Zeiss Palm Microdissection&Tweezer mikroskobu ile aksotomi işlemine tabi tutulmuştur. Bunun için öncelikle petri yüzeyleri taranarak nöronların büyüklükleri, glia hücrelerinden uzaklıkları ve iki nöronun birbirine sinaptik bağlantı oluşturmuş olması gibi durumları gözönünde bulundurularak TND mekanizmasının gerçekleşebileceği nöron çiftleri seçilmiştir. Uygun olduğu düşünülen 10 çift nöron petrinin farklı bölgelerinden seçilerek ve birbirine komşu olan DRG nöron hücrelerinden bir tanesinin aksonu laser ile (337 nm-UV) kesilerek hasara uğratılmıştır (Şekil 12). Bu işlem petride seçilen 10 nöron için tekrar edilerek TND mekanizmasının

gerçekleşmesi için gereken süre olan 24 saat boyunca bekletilmek üzere petriler tekrar 37 °C de % 5 CO₂'li etüve konulmuştur.

3.3. HÜCRELERİ LASER İLE TOPLAMA (CATAPULTING):

Aksotomiye tabi tutulan ve etüvde bekletilen petriler 24 saat sonra LCM (Laser capture microdissection) adı verilen bir yöntemle petriden önce aksotomi olan hücreler toplanarak 0.6 ml'lik deney tüplerine alınmıştır. 'Catapulting' olarak da adlandırılan bu işlemin nasıl yapıldığı aşağıda ki şekilde şematize edilmiştir (Şekil 7). Kullanılan deney tüpü, kapağında ince teflondan yapılmış bir madde ile dolu olan özel bir tüptür ve izole edilecek nöronun etrafı bilgisayara aktarılmış görüntü üzerinde, Palm mikroskobunun özel programında işaretlenerek çizilir. Sistem öncelikle hücre gövdesinin etrafını bu işarete göre keser. Ardından bu kestiği alanın hemen altına kuvvetli bir foton darbesi göndererek üzerinde ki hücre gövdesi parçasını yukarıya doğru fırlatılarak üstte bulunan içi ince teflon ile dolu olan deney tüpü kapakçığı içinde toplar. Kapağın içindeki madde kapağa fırlatılan hücrelerin tekrar petri içine düşmemesi için kapağa tutunmalarını sağlamaktadır.



Şekil 7: Hücrelerin LCM yöntemi ile toplanması

Aynı şekilde aksotomi olan hücrelerin komşuları olan nöronlarda bu şekilde ikinci bir deney tüpü içerisine alınmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılan petridende 10 nöron (aksotomiye maruz bırakılmamış) ve deney gruplarındaki hücreler bu şekilde LCM ile toplanarak ayrı ayrı deney tüplerine alınmıştır (Şekil 13).

3.4. RNA İZOLASYONU:

Tüplere alınan hücreler yine önceden steril edilmiş ve RNase zap ile muamele görmüş başka bir laminar flow kabin içine alınmıştır. Bu aşamada Quick Pick SML mRNA Kit (Bio-Nobile) izolasyon kiti kullanılarak hücrelerden RNA izolasyonu yapılmıştır. RNA izolasyonu protokolü olarak sırasıyla şu aşamalar uygulanmıştır:

- 100 µl Liziz Buffer
- 15 µl manyetik boncuklar (magnetic beads)
- 5 dakika oda sıcaklığında bekletilerek
- 100 µl Wash Buffer I (Yıkama Tamponu I)
- 100 µl Wash Buffer II (Yıkama Tamponu II)
- 30 µl Elution Tamponu konularak
- 70 °C sıcaklıkta 5 dakika bekletilmiştir

-Manyetik boncuklar uzaklaştırılarak bir sonraki aşama olan cDNA sentezine geçilmiştir, örnekler hemen kullanılmayacaksa saklamak için -80 °C'ye kaldırılmıştır.

3.5. cDNA SENTEZLENMESİ:

Örneklerin RNA izolasyonundan sonra Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche) kullanılarak ve BioRAD Termocycle PCR cihazında uygun sıcaklık inkübasyonları gerçekleştirilerek cDNA sentezi yapılmıştır. cDNA sentezi protokolü olarak sırasıyla şu aşamalar uygulanmıştır:

- 11 µl RNA örneği
- 1 µl Oligo (dT)₁₈
- 0,4 µl PCR Su

65 °C sıcaklıkta 10 dakika bekletildikten sonra ;

-4 µl Reaksiyon Buffer (5X)

-0,5 µl RNase inhibitörü

-2 µl dNTPs

-1 µl DTT

-1,1 µl Reverse Transkriptase örnek üzerine eklenerek;

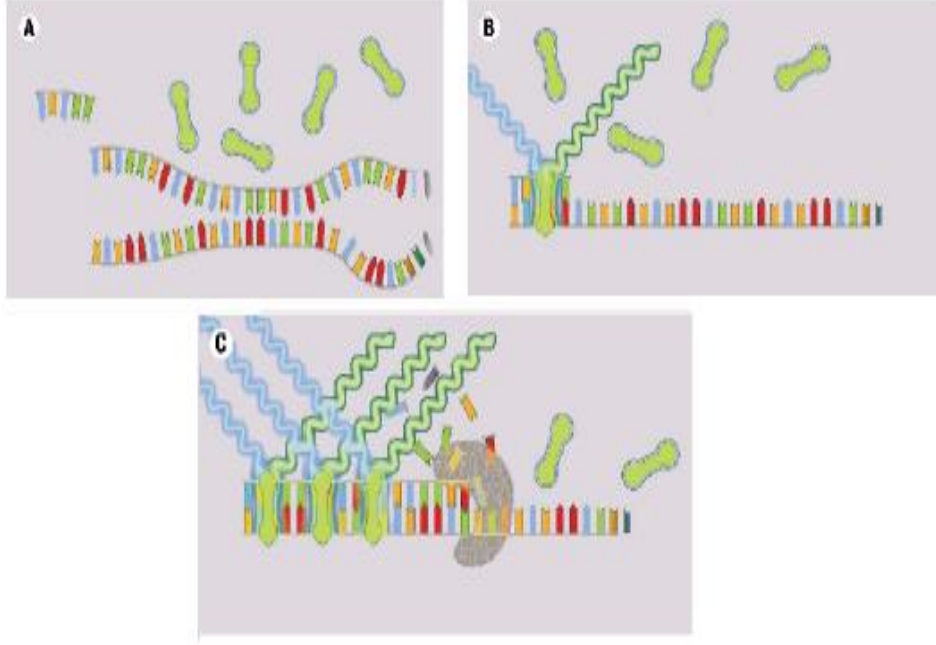
55 °C sıcaklıkta 30 dakika

85 °C sıcaklıkta 5 dakika olacak şekilde PCR cihazında sentezlenme işleminin olması için uygun protokol girilerek cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Örnekler qRT- PCR analizleri için kullanılmıştır/kullanılmayacaksa -80 °C'ye konulmuştur.Bu işlem ile her örnek için toplamda 20 µl hacimde cDNA sentezlenmiştir.

3.6. qRT PCR ANALİZLERİ

qRT-PCR, nükleik asit amplifikasyonunun eş zamanlı olarak gözlenmesini sağlayan bir PCR teknolojisidir.DNA sarmalına bağlanarak floresan ışımaya yapan özel boyalarla (çalışmamızda SYBR Green kullanılmıştır) veya yıkıma bağlı sinyal oluşturan prob diziler aracılığı ile amplifikasyon miktarının tespit edilmesini sağlamaktadır. Her PCR döngüsü sonunda tüp içinde oluşan çift zincirli ürün miktarının ölçülebilmesini ve kantitatif analizlerinin yapılmasını sağlar (Bustin S.A. et al. 2005, Nolan et al. 2006).

SYBR Geen, gen ekspresyon kantitasyonunda sıklıkla kullanılan, çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresan özellik kazanan bir boyadır. Bu boyanın çift zincirli PCR ürününe bağlanması ürün miktarı ile orantılı olarak floresan açığa çıkmasını sağlamaktadır (Şekil 8A-B-C). SYBR Green tekniği ile gen ekspresyonu kantitasyonu için uygun primer seçimi tekniğin en önemli aşamalarından biridir. Bu tekniğin başarıyla uygulanabilmesi için PCR primerlerinin sadece özgül cDNA ya bağlanması, primer-dimer veya özgül olmayan amplifikasyon ürünü oluşturmaması gerekmektedir.

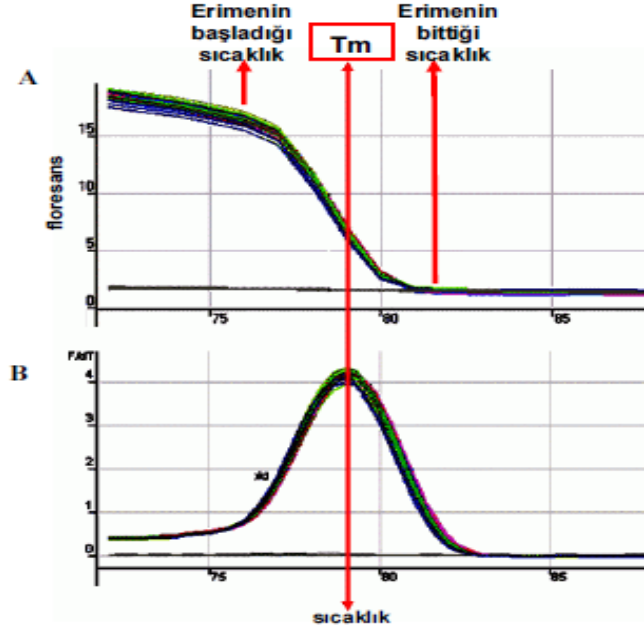


Şekil 8: SYBR Green tekniği ile qRT-PCR uygulaması.

A. Başlangıç aşaması: Reaksiyonun başlangıcında ortamda SYBR Green , primerler ve tek zincirli DNA bulunduğu için floresans sinyal yoktur. **B.** Primerin hedef moleküle bağlanması: Primerin bağlanması ile amplifikasyon sonucu SYBR Green oluşan çift zincirli DNA'ya bağlanır ve az miktarda floresans sinyal açığa çıkar. **C.** Primer uzaması: Amplifikasyon oranına bağlı olarak çift zincirli DNA'nın yapısına daha fazla boya katılarak floresans sinyal artar.

Real Time cihazlarında primer dimer oluşumu ve özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin tespiti için 'melting curve' (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır (Şekil 9A-B). Her çift zincirli DNA kendine özgül bir 'melting temperature' T_m (Çift zincirli DNA 'nın %50'sinin tek zincirli hale geçmesi için gerekli olan sıcaklık) değerine sahiptir. Amplifikasyondan sonra sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek belirli aralıklar ile floresans miktarı tespit edilmektedir. (Şekil 9A-B)

Eşik döngü değeri (C_q) Real Time PCR uygulamalarında önemli bir parametredir. C_q değeri , amplifikasyon sırasında tespit edilen floresans ışınının eşik değerinin aşıldığı döngü sayısıdır. Başka bir ifade ile ürünlerdeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir.



Şekil 9A-B: qRT- PCR tekniğinde kullanılan erime eğrisi analizi

qRT-PCR analizlerinde standart olarak kullanılan kontrol örneklere ihtiyaç vardır fakat bizim çalışmamız alanında bir ilk olduğu için daha önceden 10 hücre ile yapılan bir qRT-PCR analizi olmadığı için standart örnek kullanamamış onun yerine örneklerin 3 kez tekrarları yapılmıştır.

TND mekanizmasının gerçekleştiği hücreler arasında gen ekspresiyon analizlerine olanak sağlamak için kullandığımız *in vitro* model ile elde ettiğimiz hücrelerin cDNA örnekleri BioRAD CFX Connect Real Time System cihazında qRT- PCR tekniği ve Fast Start Essential DNA Green Master Kit (Roche) kullanılarak çoğaltılıp incelenmiştir. Bu tez çalışması kapsamında GAPDH *housekeeping* gen olarak seçilirken bunun dışında hücre ölüm çeşitleri olarak bildiğimiz apoptoz, nekroz, otofaj ve nekroptosis ile ilişkili olduğu bilinen 12 farklı gen seçilmiş (Bax, Bcl2, p53, Caspase3, Fas, FasL, Atg5, Atg7, mTOR, P2RX7, R1pk1, R1pk3) ve tüm bu genlerin primerleri özgül olmayan bağlanma ve dimer oluşumunu engellemek için dikkatle dizilmiştir (Çizelge 1).

GEN	No	Oligonükleotid dizisi		T _m	BÇ
GAPDH	NM_017008*	F	5'- TGGCCTTCCGTGTTCTAC-3'	58.8	178
		R	5'- GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA-3'	57.3	
P53	NM_001127233.1*	F	5'- GTCACAGCACATGACGGAGG-3'	61.4	129
		R	5'- TCTTCCAGATGCTCGGGATAC-3'	59.8	
P2RX7	NM_001038839.1*	F	5'- GACAAACAAAGTCACCCGGAT-3'	57.9	101
		R	5'-CGCTCACCAAAGCAAAGCTAAT3'	58.4	
mTOR	-	F	5'- GCTGGTACAAGGCTTGGCAT-3'	59.4	197
		R	5'- CTCACTGTTGCTGCCCTCTG-3'	61.4	
Bax	6680770a1**	F	5'- TGAAGACAGGGGCCTTTTTG-3'	57.3	140
		R	5'- AATTCGCCGGAGACACTCG-3'	58.8	
Bcl2	NM_009741.3*	F	5'- GTCGCTACCGTCGTGACTTC-3'	61.4	120
		R	5'- CAGACATGCACCTACCCAGC-3'	61.4	
Caspase3	24416451a1**	F	5'-TGGTGATGAAGGGGTCATTTAT-3'	58.9	105
		R	5'- TTCGGCTTTCCAGTCAGACTC-3'	59.8	
Fas	NM_001146708.1*	F	5'- GACATGCTGTGGATCTGGGC-3'	61.4	173
		R	5'- TGACAGCAAAATGGGCCTCC-3'	59.4	
FasL	NM_001205243.1*	F	5'- TCCGTGAGTTCACCAACCAAA-3'	57.9	120
		R	5'- GGGGGTTCCTGTAAATGGG-3'	61.8	
Atg5	16716341a1**	F	5'- TGTGCTTCGAGATGTGTGGTT-3'	57.9	120
		R	5'-GTCAAATAGCTGACTCTTGCAA-3'	58.9	
Atg7	-	F	5'- CCTGTCAGCCTGGCATTGA-3'	59.4	169
		R	5'- TCTCAGCAGCTTGGGTCTCT-3'	59.4	
RIPK1	-	F	5'- CGAGACTGAAGGACACAGCAC3'	61.8	169
		R	5'- ACACAAGGACACCTTCCCGA-3'	59.4	
RIPK3	NM_001164107.1*	F	5'- TGGCTGGCACTCCTCAGATT-3'	59.4	182
		R	5'- GTTGAAGACGAGAGCCGGTG-3'	61.4	

Çizelge 1: Çalışmada kullanılan primerlerin oligonükleotid dizileri, T_m dereceleri ve aplikon uzunlukları. *: NCBI ID numaraları **: Harward Üniversitesi Primer Data Bankasında alınan primelerin ID numaralarını göstermektedir. – işareti : (ID) numarası olmayan bizim dizayn ettiğimiz oligonükleotid dizilerini göstermektedir.

qRT-PCR protokolü şu şekilde uygulanmıştır:

Master Mix , 2X	: 10 µl
Forward Primer	: 1 µl (20pmol/µl)
Reverse Primer	: 1 µl (20pmol/µl)
PCR Su	: 5 µl
cDNA	: 3 µl

Toplamda 20 µl olarak hazırlanan örneklerin qRT-PCR reaksiyonu protokolü şu şekildedir:

95 °C' de 2 dk	
95 °C 'de 10 sn	} x 69 döngü
59 °C 'de 30 sn	
72 °C 'de 20 sn	
65 °C 'de 5 sn	
95 °C 'de 5 sn	

3.7. İMMÜNOSİTOKİMYA:

Araştırılan genlerin gen ekspresyon analizlerinden sonra yapılan diğer bir çalışma ise uygun primer ve sekonder antikorlar kullanılarak immünositokimya analizleri olmuştur. Bunun için gen ekspresyon sonuçlarına göre dikkatimizi çeken P2RX7 ve mTOR genleri seçilmiştir. Bu çalışma için tekrar hazırlanan hücre kültürleri 37 °C de % 5 CO₂'li etüvde bekletildikten sonra petri tabanı taranmış ve TND için uygun olduğu düşünülen 10 tane hücre aksotomi yapılarak tekrar 37 °C de % 5 CO₂'li etüvde TND süresinin gerçekleşmesi için 24 saat bekletilmiştir. 24 saat sonrasında kültürlerdeki medium uzaklaştırılıp oda sıcaklığında fosfat tuz tamponu (PBS) ile 2 defa yıkanmıştır. Ardından hücreler yine oda sıcaklığında %4 lük hazırlanmış paraformaldehit (PFA) ile 15 dakika muameleye tabi tutulup hücreler tespit edilmiştir. PBS ile 2 defa yıkama yapıldıktan sonra petri kabına blok slüsyonu (%3 BSA, %0,1 Triton X, %0,1 sodyum azid, %1 kullanılacak sekonder antikorun elde edildiği hayvanın serumu) eklenerek +4 °C ' de 45 dakika bekletilmiştir. PBS ile 2 defa yıkama yapıldıktan sonra primer antikorlar mTOR (Cell Signaling 2983, 1:400), P2RX7 (Abcam ab109246, 1:300) ve β-III Tübilin

(EMD Millipore Mab1637, 1:100) eklenerek petrilere +4 °C ' de tüm gece bekletilmiştir. Ertesi gün tekrar PBS ile 2 defa yıkama yapıldıktan sonra petrilere sekonder antikorlar Alexa Flour 488 Goat anti Rabbit (Invitrogen a11008, 1:100) ve Alexa 568 Goat anti Mouse (Abcam, 1:100) eklenerek 3 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından çekirdek boyaması için özel kullanılan DAPI (Sigma D9542-5MG, 1µg/ml) 500µl olarak petrilere eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Petrilere 2 defa PBS ile yıkama yapıldıktan sonra Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskopunda görüntüler alınmıştır.

3.8. VERİLERİN İSTATİSTİKSEL ANALİZİ:

Bu çalışma süresince yapılan tüm deneyler, ölçümler, incelemeler ve değerlendirmelerde, ırk, cinsiyet ve ağırlık olarak aynı hayvanlar kullanılmış ve bu hayvanlardan elde edilen DRG ile her deney için ikişer petri primer nöron hücre kültürleri yapılmıştır. Bu kültürlerden biri kontrol grubu diğeri deney grubu olarak kullanılmış ve deney grubunda aksotomi yapılan nöronlar ile komşuları olan nöronlar Zeiss Palm Microdissection & Tweezer mikroskopunun yazılımı ile koordinatları belirlenerek fotoğrafları çekilmiştir. Böylece aksotomi sonrası hem şeklen hemde lokalizasyon olarak yer değiştirmesi muhtemel olan nöronların doğru bir şekilde tanınması ve toplanması sağlanmıştır. Toplanan hücrelerin önceden belirlediğimiz genlere uygun şekilde dizilimi yapılan primerler ile qRT-PCR analizleri yapılmış ve Bio Rad CFX Manager software programı ile C_q değerleri kantite edilmiştir. İki farklı örnek arasında PCR tekniği ile miktar karşılaştırması yaparken, deneysel ve örneklerin doğasından gelen farklılıklar olabildiği için RT-PCR uygulamalarında ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenmesi için, farklı fizyolojik veya patolojik şartlarda ekspresyonu değişmeyen bir başka gen ürünü mRNA ile normalize edilmektedir. Bu çalışmada referans geni olarak en yaygın şekilde kullanılan GAPDH geni kullanılarak normalizasyon işlemi yapılmıştır. (ΔC_q) Daha sonra ise birbirinden bağımsız olan kontrol ve deney grupları için elde ettiğimiz sayısal DNA miktar değerleri ($2^{-\Delta C_q}$) aynı gen için tüm gruplara göre tekrar normalize edilmiştir. Normalizasyon sonrasında bulguların istatistik analizleri IBM SPSS Statistics 20 Student's *t* test kullanılarak yapılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

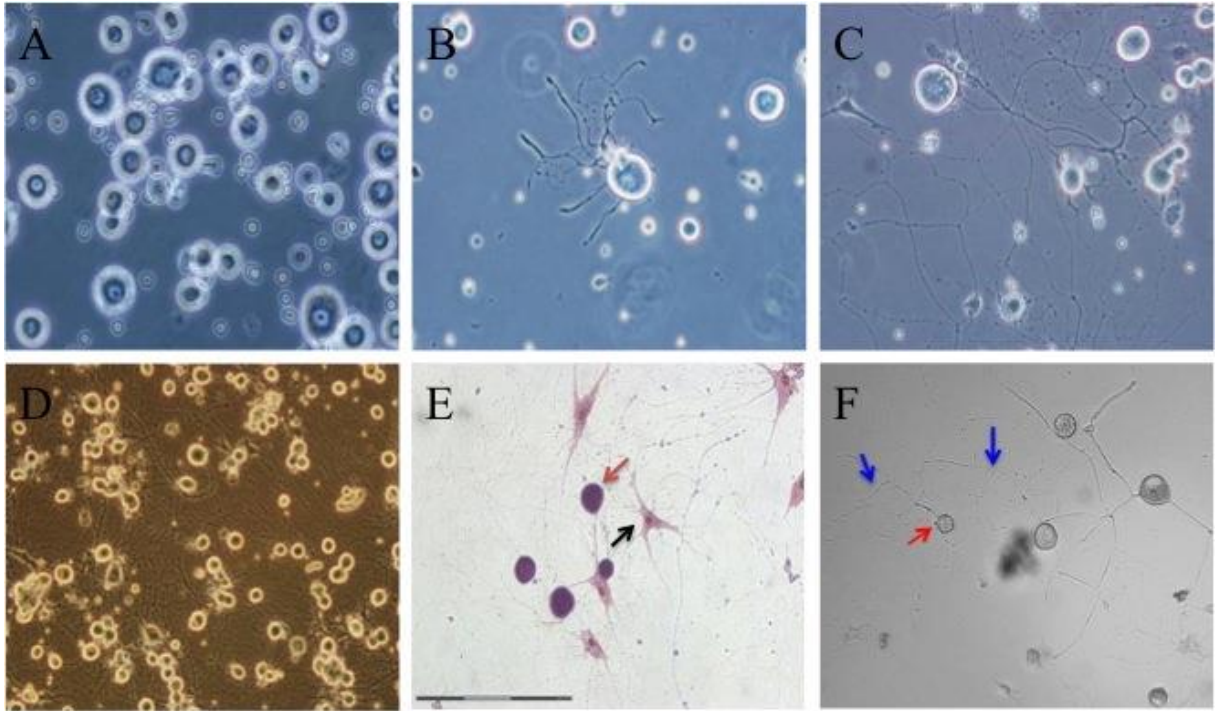
4.1. PRİMER DRG NÖRON KÜLTÜRÜ:

Arka kök ganglionlarından yapılan primer nöron kültürü hücre sayısı her petride eşit olacak şekilde bir gün öncesinden Poly-L-Lyzin ve Laminin ile kaplanarak hazırlanan cam tabanlı petrilere ekilmiştir. Hücreler ekimden hemen sonra birbirinden sadece görece şekil ve büyüklük olarak ayırdedilebilmektedir (Şekil 10-A). Uygun şartlarda (37 °C de % 5 CO₂'li etüv ortamı) bekletildikçe nöron ve glia hücreleri petri taban yüzeyine tutunarak hem hayatta kalmalarını hemde aksonal gelişimlerini sağlamış hücre şekilleri ile birbirinden bariz bir şekilde ayrılacak bir forma sahip olmuşlardır. Ekimden hemen sonra 37 °C de % 5 CO₂'li etüve konulan nöron hücrelerinin 2 saat sonrasında akson uzatmaya başladıkları gözlemlenmiştir. Nöronların buldukları ortamda ihtiyaç duydukları gereksinimleri karşılayabildikleri 2 saat sonra akson uzatmaya başlamış olmaları bize göstermektedir (Şekil 10-B). Nöron hücreleri ekimden 24 saat sonra gelişimlerini ve aksonal uzantılarını ilerleterek kendi aralarında network oluşturmaya başlamışlardır. (Şekil 10-C) Ekimden 48 saat sonra nöron hücreleri gelişimlerini maksimum düzeyde tamamlamışlardır (Şekil 10-D). Ekimden 48 saat sonra nöron ve glialarla çalışıldığını göstermek için çalışmanın bir kontrolü olarak yapılan nöron ve glia hücrelerine spesifik olduğu bilinen Creysl Violet boyası ile primer hücre kültürü petrilere boyanmış ve ışık mikroskopunda görüntüleri alınmıştır. Creysl Violet ile boyanan hücreler nöron ve glia hücreleri ile çalışıldığını kanıtlamaktadır (Şekil 10-E).

Ayrıca TND mekanizmasının moleküler düzeyde nasıl işlediğini anlamak amacı ile yapılan bu tez çalışmasında DRG primer hücre kültürü ile yapılan bazı deneylerde başka gözlemlerde olmuştur. Bunlardan ilki DRG nöron hücrelerinin hiç bir müdahale olmadan doğal olarak ölüme nasıl gittiğini açıklayan ve mevcut literature uygunluk gösteren hücre ölüm sürecidir. DRG primer nöron kültür hücrelerinin ekimden 52 saat sonra ortama herhangi bir taze medium veya NGF- Nöron büyüme faktörü gibi maddelerin eklenmemesi durumunda kültür ortamında bazı nöronların hücre gövdelerinde büzülüp küçülme ve aksonal fragmentasyon olarak kendini karakterize eden dejenerasyon sürecinin başladığı gözlemlenmiştir (Şekil 10-F)

Bir başka ilginç gözlem ise hazırlanan bir deney düzeneğinde lazer aksotomi sonrasında TND mekanizması için gereken süre beklenirken bazı aksotomi olan nöronların akson kesim bölgelerinde öncelikle büyüme konu (Growth cone) gözlenmiş arkasında da tekrar bir aksonal

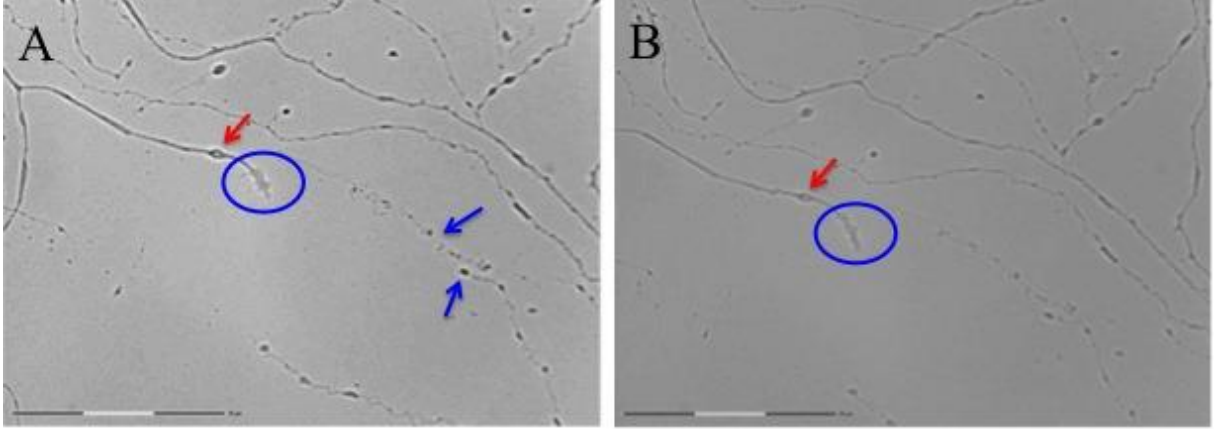
uzama ile kendini gösteren ‘Aksonal Rejenerasyon’ süreci başlamıştır. Aksonun kopan kısmında ise dejenerasyon gözlenmiştir. Aksotomiden yaklaşık 3 saat sonra hasarlanan nöronda aksonal rejenerasyon süreci içerisinde yeniden aksonal uzama devam ettiği şeklindedir. Bu gözlenen sonuçlar aksotomi yapılan aksonal bölgenin uzaklığının hücre gövdesine uzaklığı ile doğrudan bir ilişkisi olduğuna dair söylemleri doğrular niteliktedir. Hasar hücre gövdesinden ne kadar uzakta olursa nöron hücresinin kendini rejenerere etme olasılığı o kadar yüksek gözükmektedir (Şekil 11A-B)



Şekil 10: DRG primer nöron kültür hücrelerinin ekimden sonra farklı zaman aralıklarındaki görüntüleri.

A. Arka kök ganglionlarından yapılan primer nöron kültüründe nöron ve glia hücrelerinin eşit miktarda petriye ekimden hemen sonraki ilk görüntüleridir (20X objektif). **B.** Ekimden hemen sonra 37 °C de % 5 CO₂'li etüve konulan nöron hücrelerinin 2 saat sonrasında aksonal uzamaya başladıklarının görüntüsüdür (40X objektif). **C.** Ekimden 24 saat sonra aksonal uzantılarını ve gelişimlerini ilerleterek kendi aralarında network oluşturan nöron hücrelerini göstermektedir (40X objektif). **D.** Ekimden 48 saat sonra nöron gelişimlerini maksimum düzeyde tamamlamış olan nöronların olduğu kültür ortamını göstermektedir (20X objektif). **E.** Ekimden 48 saat sonra çalışmanın bir kontrolü olarak yapılan nöron ve glia hücrelerine

spesifik olduğu bilinen Creysl Violet boyası ile boyanmış nöron ve glia hücreleri görülmektedir (20X objektif).F.Ekimden 52 saat sonra başlayan aksonal fragmentasyon.

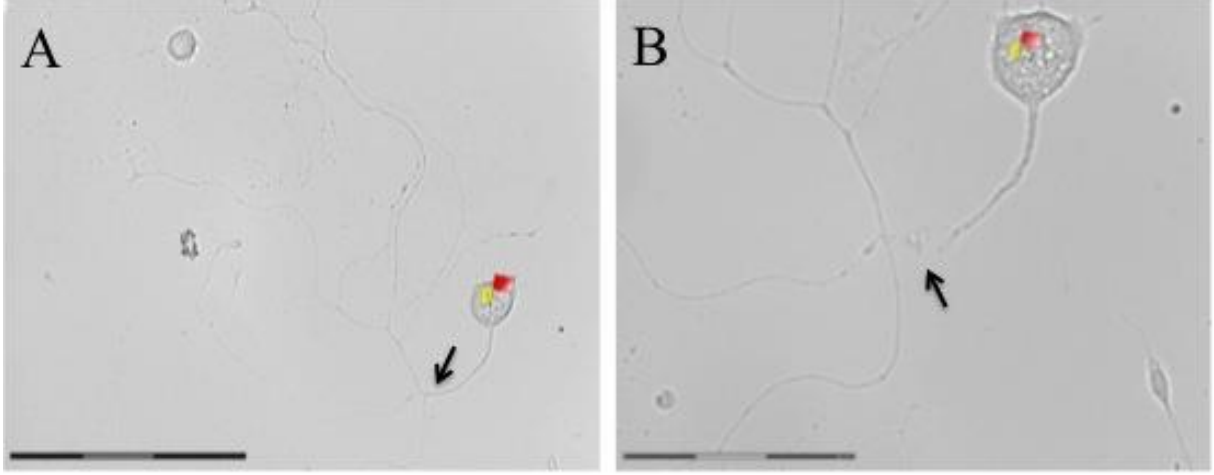


Şekil 11: Aksotomi sonrası meydana gelen aksonal rejenerasyon.

A. Lazer aksotomi sonrasında TND mekanizması için gereken süre beklenirken aksotomi yapılan bazı nöronların akson kesim bölgelerinde aksonal uzama ile kendini gösteren ‘Aksonal Rejenerasyon’süreci başlamıştır. Aksonun kopan kısmında ise dejenerasyon gözlenmiştir.(40X objektif). **B.** Aksotomiden yaklaşık 3 saat sonra hasarlanan nöronda aksonal rejenerasyon süreci içerisinde yeniden aksonal uzama devam etmektedir.

4.2. HÜCRELERİN LASER İLE HASARLANMASI (AKSOTOMİ):

TND mekanizmasının araştırılması için aksotomi yapılacak hücre bazı önemli kriterler göz önünde tutularak ve ekimi yapılan primer DRG nöron hücrelerinin 48 saat sonrasında tüm petri yüzeyi taranarak seçilir. Seçilecek bu iki nöron hücresinin TND mekanizmasının gerçekleşmesi için birbirine komşu olması, aralarında sinaptik bağlantıların bulunması ve yakınlarında glia hücrelerinin bulunmaması gibi bazı kriterleri sağlamış olması gerekmektedir.(Şekil 12-A). Aksotomi işlemi yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra petride farklı objektif büyüklükleri kullanılarak (10X, 20X ve 40X gibi) çekilen fotoğraflar hücrelerin doğru tespitinde kolaylık sağlamaktadır. Taranan petri taban yüzeyinde seçilen iki nörondan biri lazer ile kesilerek aksotomi yapılmıştır. Bu kesimden önce ve sonra hücrelerin bulunduğu alan Palm mikroskopunun kendi yazılımında bulunan bir uygulama ile tek tek farklı objektiflerde görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 12-B).

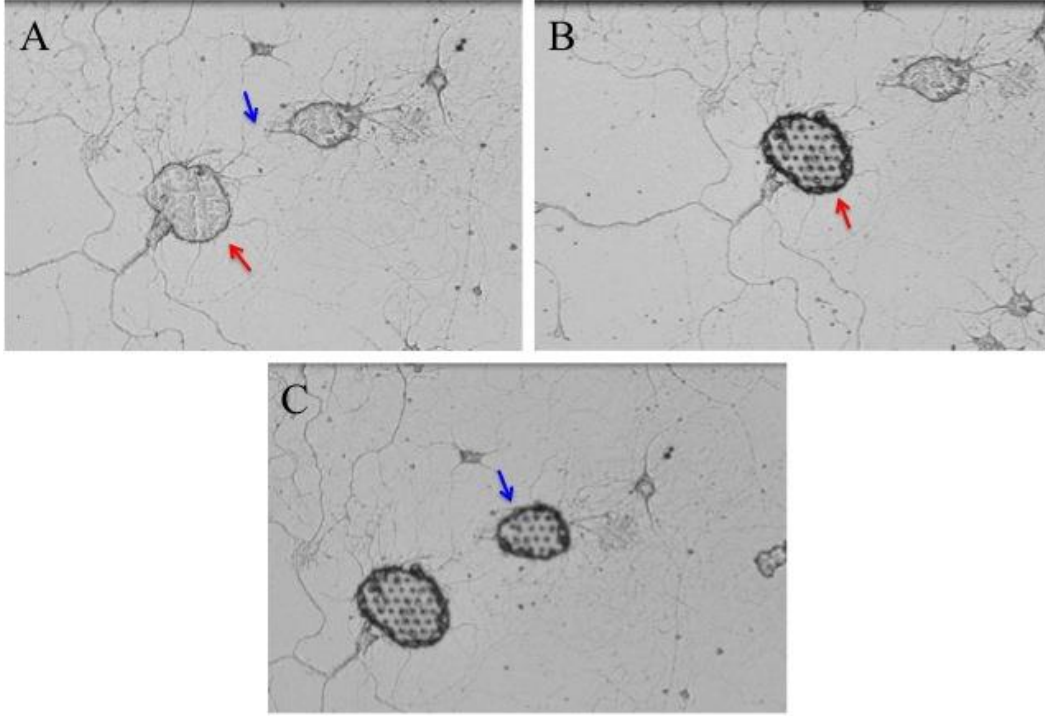


Şekil 12: Laser ile nöron hücrelerinde aksotomi yapılması

A. Ekimden 48 saat sonrasında tüm petri yüzeyi taranarak TND mekanizması için birbirine komşu olan ve sinaptik bağlantıları bulunan iki nörondan aksotomiye maruz kalacak nöronun seçilmesini göstermektedir (20X objektif). **B.** Aksotomi yapılan nöronun aksonal kesim anını göstermektedir (40X objektif).

4.3. HÜCRELERİN LASER İLE TOPLANMASI (CATAPULTİNG):

İki nöron arasında TND mekanizmasının gerçekleşmesi için aksotomiden 24 saat sonra hasara uğrayan nöron ve komşusu olan nöron Palm mikroskobunun LCM uygulaması kullanılarak petriden izole edilmesi öncesinde her iki hücrenin kültür petrisinde doğru bulunması gerekmektedir. Bunun için aksotomi işlemi yapılmadan önce ve yapıldıktan sonra petride farklı objektif büyüklükleri kullanılarak çekilen fotoğraflar kullanılarak hücrelerin tespiti sağlanmaktadır. (Şekil 13-A). Laserle toplama işlemi öncesinde hücrelerin izolasyonu ve izole edilecek nöronun etrafı bilgisayara aktarılmış görüntü üzerinde, Palm mikroskobunun özel programında işaretlenerek çizilmektedir. Öncelikle laser bu işaretlenen hücre gövdesini keser ve daha sonra bu kestiği alanın hemen altına kuvvetli bir foton darbesi göndererek hücre gövdesi parçasını yukarıya doğru fırlatılır ve üstte bulunan içi ince teflon ile dolu olan deney tüpü kapağının içinde toplamaktadır (Şekil 13-B). Aksotomi sonrası yerleri doğru bir şekilde tespit edilen nöron hücrelerinden aksotomi işlemine maruz kalan ve ona komşu olan nöron hücreleri ayrı ayrı deney tüplerine alınmaktadır (Şekil 13-C). Tüm bu işlemler aynı şekilde hiçbir müdahaleye maruz kalmayan kontrol petrisinden seçilen 10 hücre içinde yapılmıştır.



Şekil 13: LCM yöntemi ile hücrelerin toplanması

A. Aksotomiden 24 saat sonra hasara uğrayan nöron (mavi ok kesim bölgesi) ve komşusu olan nöron (kırmızı ok ile gösterilen)(20X objektif). **B.** Laser katapult işlemi ile hücrelerin izolasyonu (20X objektif). **C.** Aksotomi sonrası yerleri doğru bir şekilde tespit edilen nöron hücrelerinden aksotomi işlemine maruz kalan ve ona komşu olan hücreler ayrı ayrı deney tüplerine alınmıştır (20X objektif).

4.4. qRT- PCR ANALİZ SONUÇLARI:

Arka kök gangliyon primer hücre kültüründeki nöronlar aksotomi ile hasara uğratılıp, katapult işlemi ile petriyelerden toplandıktan sonra kontrol grubu ve deney grubundaki hücrelerden ayrı ayrı mRNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Hücrelerin cDNA örnekleri BioRAD CFX Connect Real Time System cihazında qRT- PCR tekniği ve Fast Start Essential DNA Green Master Kit (Roche) kullanılarak çoğaltılıp incelenmiştir. Referans geni GAPDH olmak üzere Bax, Bcl2, p53, Caspase3, Fas, FasL, Atg5, Atg7, mTOR, P2RX7, Rıpk1, Rıpk3 genleri için gen ifade analizleri yapılmıştır. Deneyler öncelikle 3 kez tekrar edilmiş ve genlerin Cq değerlerindeki değişikliklere dikkat edilerek deneylerin devamı tayin edilmiştir. Bu Cq değerlerine göre hücre ölüm mekanizmalarında ilişkili olduğu bilinen ve bu tez çalışmasında kullanılan başlıca genlerin 3 tekrarlı şekilde yapılan gen ifade analizlerinde elde edilen

ortalama C_q değerleri aşağıdaki gibidir. Elde edilen ifade analizleri bazı deneylerde artış yönünde değişiklik gösterebilir bu artış istikrarlı bir şekilde gözlenmediği için deneylerin devamı istikrarlı artışın gözlendiği P2RX7 ve mTOR genleri için 10 tekrarlı olacak şekilde yapılmış normalizasyon işlemleri ve istatistik analizleri bu genler için hesaplanmıştır.

	Ortalama C _q Değerleri		
	Kontrol	Aksotomi	Komşu
GAPDH	34,57	34,88	34,53
Bcl2	35,12	34,93	35,35
Bax	40,89	38,12	39,94
p53	30,98	31,86	30,91
Caspase3	45,05	38,4	39,61
Fas	22,01	21,75	21,69
FasL	44,49	45,79	47,4
RIPK1	37,68	36,52	41,37
RIPK3	38,39	46,71	41,77
Atg5	34,89	34,72	36,02
Atg7	36,92	36,48	36,31

4.4.1. P2RX7 ve mTOR genleri için örneklerin C_q değerleri:

qRT-PCR analizlerinde Bio Rad CFX Manager software programı ile C_q değerleri kantite edilmiştir. Elde edilen C_q değerlerinden gen ekspresyon seviyelerinde artış olduğu tespit edilen P2RX7 ve mTOR genleri için deneylerin n=10 tekari ile elde edilen C_q değerleri şu şekildedir:

P2RX7 geni için örneklerin C_q değerleri

	Kontrol	Aksotomi	Komşu		Kontrol	Aksotomi	Komşu
GAPDH	37,09	42,03	37,21	GAPDH	36,79	38,35	38,98
P2RX7-1	38,21	41,14	39,07	P2RX7-6	37,37	38,78	43,96
P2RX7-2	39,65	44,57	38,45	P2RX7-7	39,43	40,31	40,59
P2RX7-3	41,4	38,82	47,03	P2RX7-8	39,62	42,32	40,41
P2RX7-4	40,22	41,91	45,64	P2RX7-9	37,3	43,48	43,65
P2RX7-5	44,65	39,31	39,11	P2RX7-10	38,4	38,66	42,02

mTOR geni için örneklerin Cq değerleri

	Kontrol	Aksotomi	Komşu		Kontrol	Aksotomi	Komşu
GAPDH	42,33	36,97	38,15	GAPDH	38,05	37,61	35,89
mTOR-1	36,41	32,13	32,21	mTOR-6	34,65	33,05	33,6
mTOR-2	37,03	32,5	32,7	mTOR-7	33,65	33,21	33,47
mTOR-3	36,05	32,49	32,14	mTOR-8	35,04	33,54	34,24
mTOR-4	36,93	33,03	33,04	mTOR-9	34,38	34,09	34,15
mTOR-5	36,4	32,86	32,74	mTOR-10	35,4	34,35	33,62

4.4.2. Referans genine (GAPDH) göre örneklerin normalizasyonu (ΔCq):

Genlerin referans genine göre normalizasyon işlemi; $(\Delta Cq) = (Cq)_{GEN} - (Cq)_{REFERANS}$ formülüne göre yapılan bir matematiksel işlemidir. Bu işlem ile her bir genin referans gene göre eşik döngü değerinde ne kadar farklılık gösterdiği tespit edilmektedir.

P2RX7 geni için örneklerin normalizasyonu:

	Kontrol	Aksotomi	Komşu		Kontrol	Aksotomi	Komşu
	ΔCq	ΔCq	ΔCq		ΔCq	ΔCq	ΔCq
P2RX7-1	1,12	-0,89	1,86	P2RX7-6	0,58	0,43	4,98
P2RX7-2	2,56	2,54	1,24	P2RX7-7	2,64	1,96	1,61
P2RX7-3	4,31	-3,21	9,82	P2RX7-8	2,83	3,97	1,43
P2RX7-4	3,13	-0,12	8,43	P2RX7-9	0,51	5,13	4,67
P2RX7-5	7,56	-2,72	1,9	P2RX7-10	1,61	0,31	3,04

mTOR geni için örneklerin normalizasyonu:

	Kontrol	Aksotomi	Komşu		Kontrol	Aksotomi	Komşu
	ΔCq	ΔCq	ΔCq		ΔCq	ΔCq	ΔCq
mTOR-1	-5,92	-4,84	-5,94	mTOR-6	-3,4	-4,56	-2,29
mTOR-2	-5,3	-4,47	-5,45	mTOR-7	-4,4	-4,4	-2,42
mTOR-3	-6,28	-4,48	-6,01	mTOR-8	-3,01	-4,07	-1,65
mTOR-4	-5,4	-3,94	-5,11	mTOR-9	-3,67	-3,52	-1,74
mTOR-5	-5,93	-4,11	-5,41	mTOR-10	-2,65	-3,26	-2,27

4.4.3. Normalized edilen ΔCq değerlerinden genlerin DNA Miktarları ($2^{-\Delta Cq}$) :

Normalizasyon işleminden sonra elde edilen ΔCq değerlerinden ($2^{-\Delta Cq}$) formülü ile genlerin DNA miktarında ki artış ya da azalış tespit edilmektedir. Çalışmanın devamında yapılacak olan istatistiksel analizler bu artma ya da azalmanın anlamlı olup olmadığını anlamaya yardımcı olacak olan parametrelerdir.

P2RX7 geni için örneklerin DNA Miktarı ($2^{-\Delta Cq}$):

	Normalized edilen (ΔCq)			$2^{-\Delta Cq}$		
	Kontrol	Aksotomi	Komşu	Kontrol	Aksotomi	Komşu
P2RX7-1	1,12	-0,89	1,86	0,460094	1,8531761	0,275476
P2RX7-2	2,56	2,54	1,24	0,169576	0,1719427	0,423373
P2RX7-3	4,31	-3,21	9,82	0,050415	9,2535055	0,001106
P2RX7-4	3,13	-0,12	8,43	0,114229	1,0867349	0,002899
P2RX7-5	7,56	-2,72	1,9	0,005299	6,5887281	0,267943
P2RX7-6	0,58	0,43	4,98	0,668964	0,7422618	0,031686
P2RX7-7	2,64	1,96	1,61	0,160428	0,2570285	0,327598
P2RX7-8	2,83	3,97	1,43	0,140632	0,0638133	0,371131
P2RX7-9	0,51	5,13	4,67	0,702222	0,0285572	0,039282
P2RX7-10	1,61	0,31	3,04	0,327598	0,8066418	0,121582
SD	1,99	2,56	2,91	0,24	3,02	0,16

mTOR geni için örneklerin DNA Miktarı ($2^{-\Delta Cq}$):

	Normalized edilen (ΔCq)			$2^{-\Delta Cq}$		
	Kontrol	Aksotomi	Komşu	Kontrol	Aksotomi	Komşu
mTOR-1	-5,92	-4,84	-5,94	60,55	28,64	61,39
mTOR-2	-5,3	-4,47	-5,45	39,40	22,16	43,71
mTOR-3	-6,28	-4,48	-6,01	77,71	22,32	64,45
mTOR-4	-5,4	-3,94	-5,11	42,22	15,35	34,54
mTOR-5	-5,93	-4,11	-5,41	60,97	17,27	42,52
mTOR-6	-3,4	-4,56	-2,29	10,56	23,59	4,89
mTOR-7	-4,4	-4,4	-2,42	21,11	21,11	5,35
mTOR-8	-3,01	-4,07	-1,65	8,06	16,80	3,14
mTOR-9	-3,67	-3,52	-1,74	12,73	11,47	3,34
mTOR-10	-2,65	-3,26	-2,27	6,28	9,58	4,82
SD	1,27	0,46	1,79	24,60	5,53	23,96

4.4.4. P2RX7 ve m TOR genlerinin istatistik analizleri:

P2RX7 ve mTOR geni için elde edilen DNA miktarları ile her bir örnek için standart sapma hesaplanarak istatistik analizleri IBM SPSS Statistics 20 programında Student's *t* test kullanılarak yapılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

P2RX7 geni için örneklerin karşılatırmalı testleri

	Karşılaştırma Farkları					t	df	Anlam aralığı
	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması	95% Farkların Güven Aralığı				
				Düşük	Yüksek			
Kontrol & Aksotomi	-1,805	3,317	1,049	-4,178	0,568	-1,721	9	,119
Kontrol & Komşu	0,094	0,344	0,109	-0,152	0,340	,862	9	,411
Aksotomi & Komşu	1,899	3,237	1,024	-0,416	4,215	1,855	9	,097

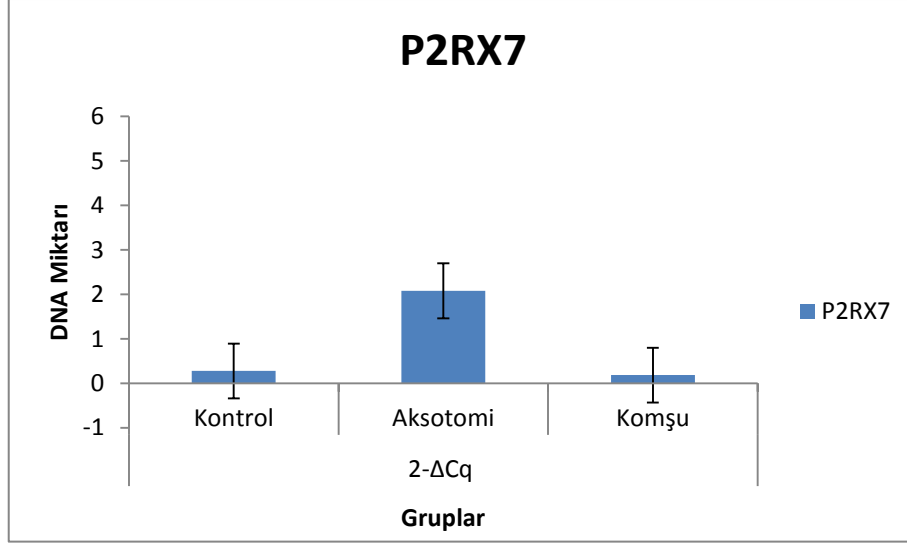
TND mekanizmasının gen ekspresyon analizinde P2RX7 geni için miktarca artış olmasına rağmen gruplar arasında yapılan Student's *t* test istatistik analizde anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

$p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

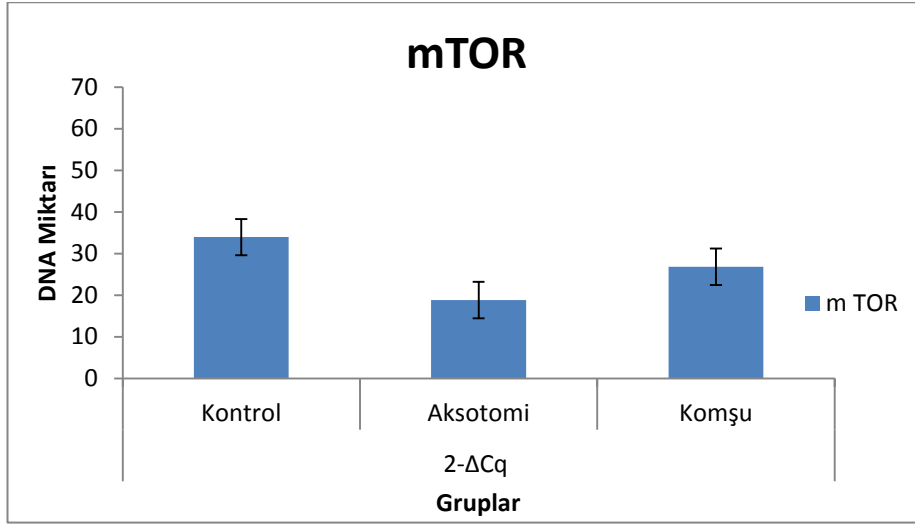
mTOR geni için örneklerin karşılatırmalı testleri

	Karşılaştırma Farkları					t	df	Anlam aralığı
	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata Ortalaması	95% Farkların Güven Aralığı				
				Düşük	Yüksek			
Kontrol & Aksotomi	15,129	23,536	7,443	-1,707	31,966	2,033	9	,073
Kontrol & Komşu	7,143	7,300	2,308	1,921	12,364	3,094	9	,013
Aksotomi & Komşu	-7,987	22,492	7,113	-24,077	8,103	-1,123	9	,291

TND mekanizmasının gen ekspresyon analizinde mTOR geni için gruplar arasında yapılan Student's *t* test istatistik analizinde kontrol grubu ile komşu nöronlar arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



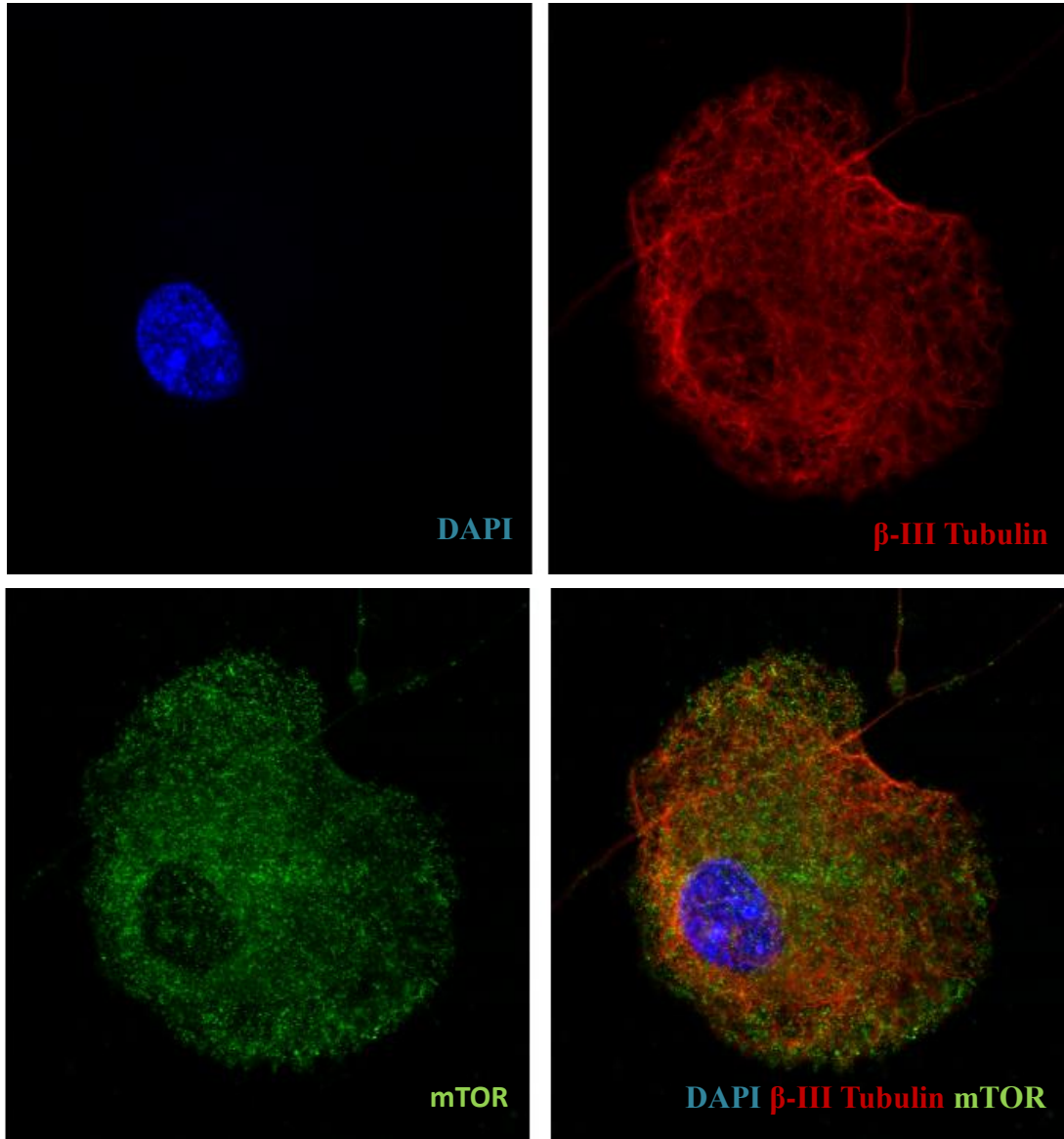
Grafik 1: P2RX7 geni için gruplar arasında DNA miktarlarına göre yapılan istatistik analizlerine standart hatanın da dahil edildiği grafik. Grafikte de görüldüğü gibi TND mekanizması için P2RX7 geni için aksotomi yapılan nöronlarda kontrol ve komşu nöronlarına nazaran miktarca bir artış rahatlıkla gözlenmektedir.



Grafik 2: mTOR geni için gruplar arasında DNA miktarlarının karşılaştırılması. Çubuklar standart hatayı göstermektedir. Grafikte de görüldüğü gibi TND mekanizması için mTOR geninin komşu nörondaki ifade artışı aksotomi yapılan gruba göre miktarca fazladır.

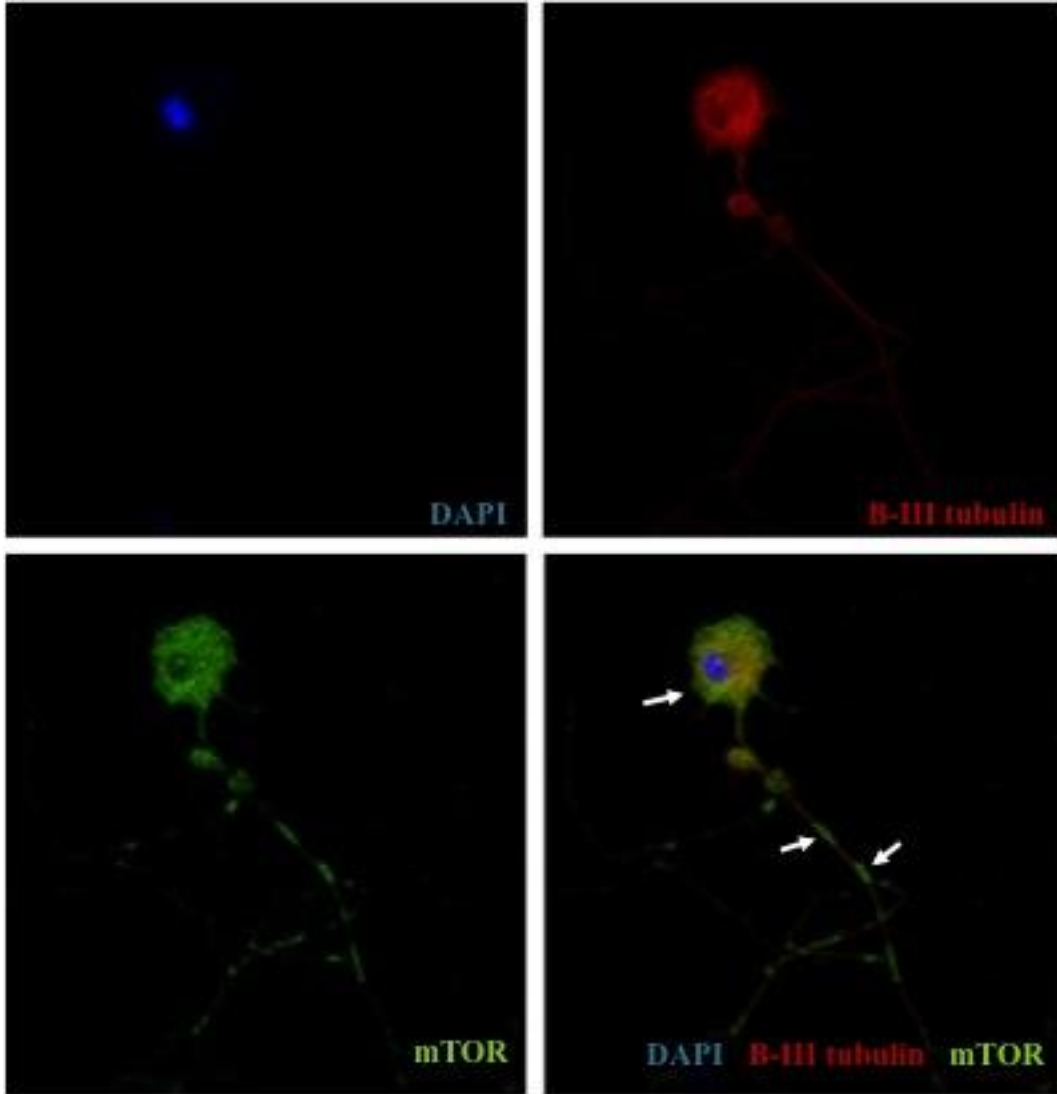
4.5. P2RX7 VE mTOR PROTEİNLERİNİN İMMÜNOSİTOKİMYASI:

Kültürü yapıp 48 saat sonra aksotomi yapıldıktan sonra 37 °C de % 5 CO₂'li etüvde 24 saat bekletilen hücreler bu sürenin sonunda %4 lük PFA ile tespit edilerek ayrı ayrı petriler için P2RX7- β -III Tubulin ve mTOR- β -III Tubulin kombinasyonları şeklinde hazırlanan primer antikoları ve bunlara uygun olarak seçilen sekonder antikoları (Alexa 488 Goat anti Rabbit ve Alexa 568 Goat anti Mouse) ve DAPI çekirdek boyası ile boyanarak Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskobunda farklı objektifler kullanılarak (20X,40X) görüntüleri alınmıştır (Şekil 14-15-16-17).



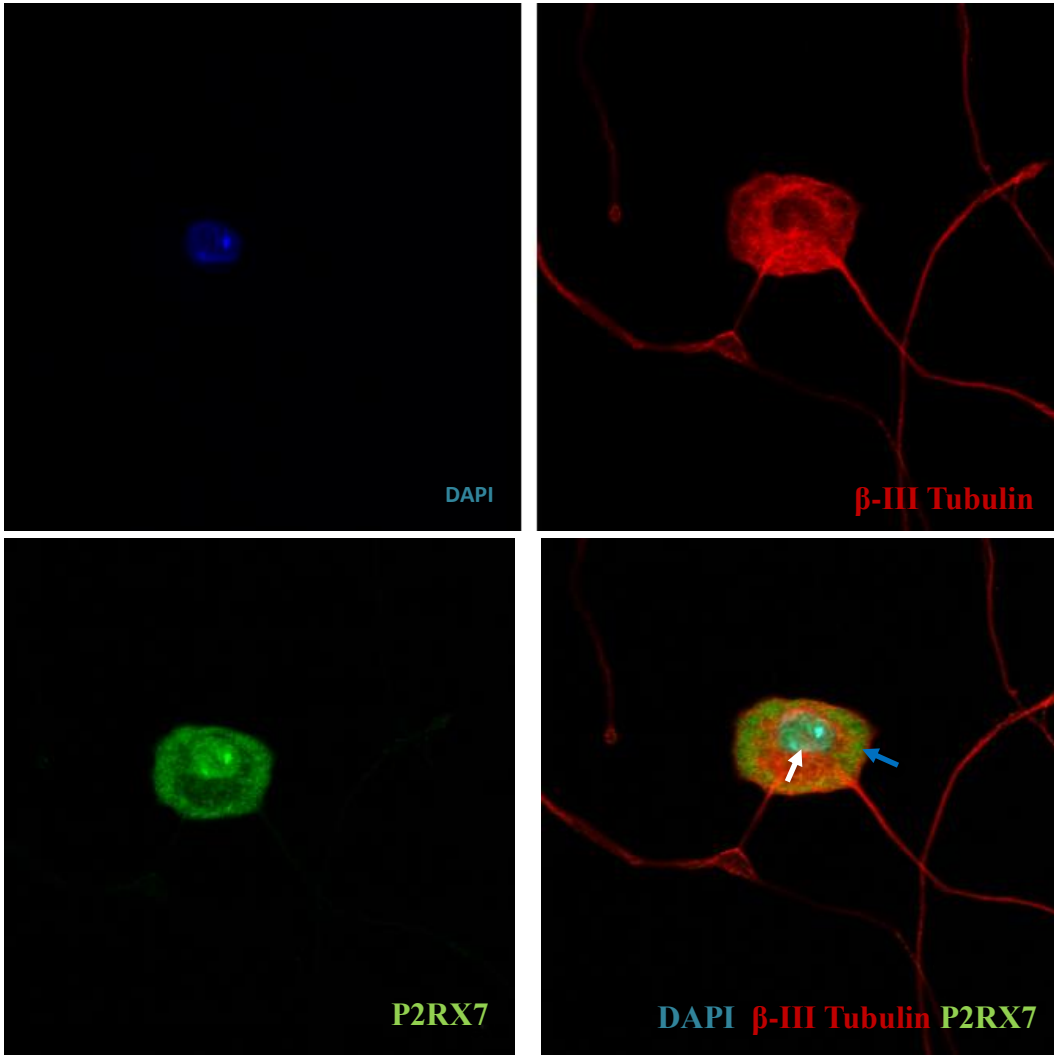
Şekil 14: mTOR proteininin primer DRG nöron hücrelerindeki lokalizasyonu (40X)

Primer hücre kültürü yapılan DRG nöron hücelerinin primer mTOR (yeşil) ve β -III Tubulin (kırmızı) antikoları ve bunlara uygun şekilde seçilen sekonder antikolar (Alexa 488 Goat anti Rabbit, Alexa 568 Goat anti Mouse) ve çekirdek boyası olan DAPI (mavi) ile boyanmış ve 40X objektifle Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskopunda görüntüleri alınmıştır. mTOR proteininin sitoplazma içerisinde hücre gövdesinin her tarafında dağınık bir şekilde ve aksonlar boyunca kümeler halinde bulunduğu tespit edilmiştir.(Şekil 14-15)



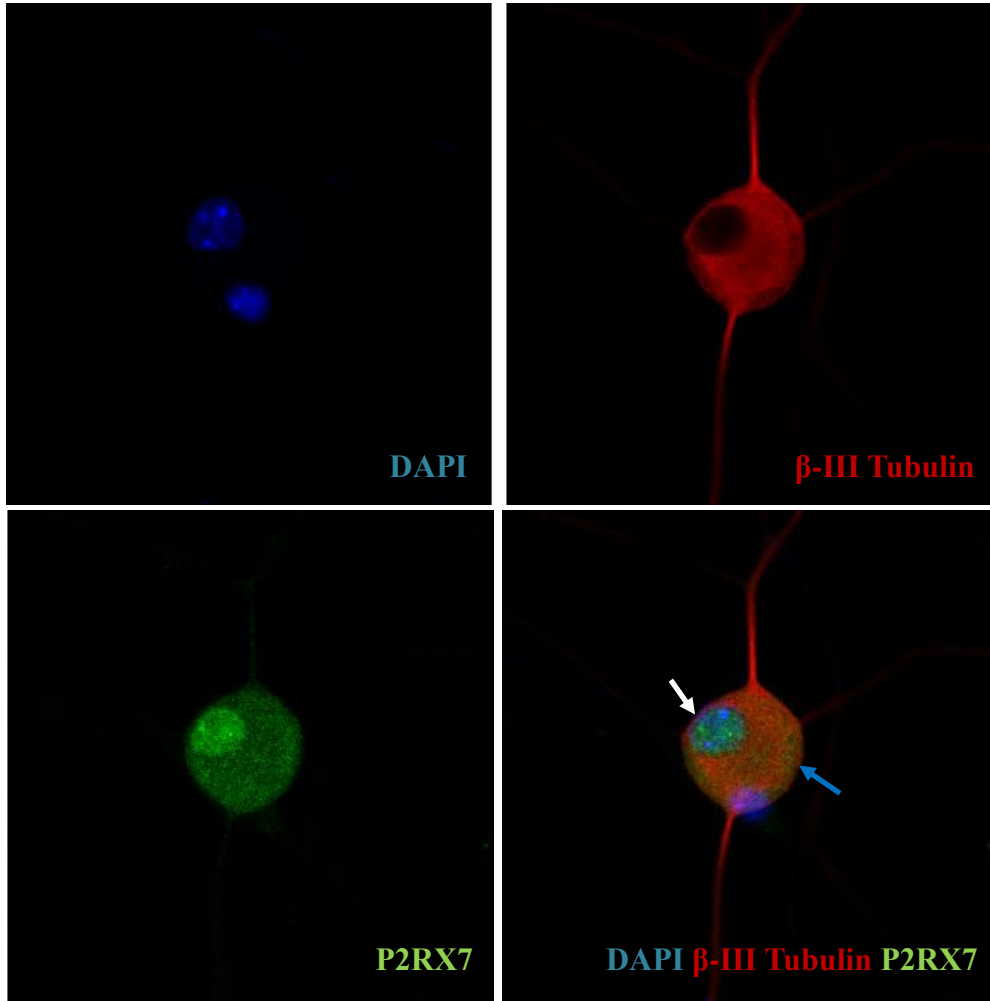
Şekil 15: mTOR proteininin primer DRG nöron hücrelerindeki lokalizasyonu (20X)

Primer hücre kültürü yapılan DRG nöron hücelerinin primer P2RX7 (yeşil) ve β -III Tubulin (kırmızı) antikoları ve bunlara uygun şekilde seçilen sekonder antikolar (Alexa 488 Goat anti Rabbit, Alexa 568 Goat anti Mouse) ve çekirdek boyası olan DAPI (mavi) ile boyanmış ve 20X objektifle Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskopunda görüntüleri alınmıştır. P2RX7 pürin reseptörleri çekirdek içerisinde yoğun bir şekilde ve aynı zamanda hücre gövdesinin periferal çevresinde -membran bölgesinde yoğun olarak lokalize olduğu gözlenirken aksonal uzantılarda P2RX7 pürin reseptörleri gözlenmemiştir (EK 2-3).



Şekil 16: P2RX7 reseptörlerinin primer DRG nöron hücrelerindeki lokalizasyonu (20X)

Primer P2RX7 (yeşil) ve β -III Tubulin (kırmızı) antikorları ve çekirdek boyası olan DAPI (mavi) ile boyanmış ve 40X objektifle Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskopunda görüntüleri alınan P2RX7 pürin reseptörleri çekirdek içerisinde yoğun lokalize olmuş şekilde ve aynı zamanda hücre gövdesinin periferal çeperinde- membran bölgesinde yoğun halde gözlemlenmiştir.



Şekil 17: P2RX7 reseptörlerinin primer DRG nöron hücrelerindeki lokalizasyonu (40X)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Transnörönel dejenerasyon mekanizması yaşanan dünya nüfusu ile bağlantılı olarak geçmişe nazaran günümüzde daha çok artan sayılarla kendini gösteren, nöronal dejenerasyon temelli birçok hastalık için tedavi yöntemleri geliştirme çalışmalarında çok önemli bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır. Açıklanamayan birçok yönü olan TND mekanizmasının sağlıklı bir şekilde çalışılmamasının önünde ki en büyük engellerden biri olarak *in vivo* deney modellerinin getirdiği kısıtlamalar söylenebilir. Çünkü bir *in vivo* deney modelinde TND mekanizmasının ortaya çıkması yaklaşık 4-14 gün arasında değişmektedir (Norgborg ve Johansson, 1996; De Giorgio et al. 1998; Dihne et al. 2002). Bu tez çalışmasında kullanılan *in vitro* deney modeli ile TND mekanizmasının çalışılması için ihtiyaç duyulan deney model sorununa yeni bir yaklaşımla çözüm getirilmiştir. Bu çalışma kullanılan *in vitro* deney modelinin gerekli alt yapının varlığında kolaylıkla uygulanabilen, hassas, tekrarlanabilen, ölçeklendirilebilen ve ölçülebilir bir *in vitro* deney modeli olarak TND mekanizması çalışmaları için ideal bir model olduğu ve etkin bir araştırma yöntemi olarak kullanılabileceğini göstermiştir. Bir nöronal hasar modeli olarak lazer ışınının kullanılması, uygun yoğunlukta ekilmiş nöronlardan istenilen sayıda ve nitelikte bir kaçının hasarlanabilmesi ve geri kalan nöronların hayatta kalması ile kesin, sayıma dayalı analizlerin yapılabilmesini mümkün kılınmakla beraber, görüntü analizlerinde görülmek istenilen diğer değişkenlerin, örneğin hasarlanan nöron hücrelerine komşu olan ya da olmayan tüm nöronlar arasında hasardan önce ve sonra görülen formasyon bozukluklarının görsel takibinin çok kolay ve net bir şekilde yapılabilmesi gibi avantajları bu deney modelinin avantajlarından sadece bir kaçıdır.

Her ne kadar istatistiksel olarak analiz edilmemiş olsada bu çalışmada yapılan önemli bir gözlem TND mekanizmasının gerçekleşmesi için nöronlar arasında sinaptik bağlantılar bulunması gerektiğidir. Etrafındaki nöronlarla herhangi bir sinaptik bağlantısı olmayan nöronların laser aksotomi yapıldığı preparatlarda TND'nun gözlenmemesi bu gözlem için çok güçlü bir kanıttır. Bir diğer önemli gözlem ise TND mekanizmasının gerçekleşmesi için aksonal hasarın hücre gövdesine belli bir yakınlıkta olması gerektiği yönündedir. Aksonal hasarın hücre gövdesine uzak bir alanda yapılması TND mekanizmasının gözlenmemesine aksine nöronda bir aksonal rejenerasyonun gerçekleşmesine sebep olmuştur (Şekil 11).

Bunların yanında diğerk bir gözlem ise aksotomi yapılan nöron hücresi ile komşusu olan hücre arasında aksotomi sonrası meydana gelen hücre ölüm sürecine dairdir. Yapılan gözlemlerde aksotomi olan hücre ile komşusu olan hücre arasında hücre ölüm çeşidi olarak farklılıklar saptanmıştır. Bu ölüm süreci komşu hücrede aksotomi olan hücreden daha önce gerçekleşmektedir.

Gözlemlenen bu gibi durumların net bir şekilde tespit edilmesinin imkanını sağlayan bu *in vitro* deney modeli ile yapılan gen ifade analizleri uzun uğraşlar sonucu yapılmıştır. Bu tez çalışmasının danışman hocalığını yapan Prof. Dr. Gürkan Öztürk'ün yayın aşamasında olan TND ile ilgili bitmiş bir projesinde de çalıştığı gösterilen bu deney modeli ile gen ifade düzeyinde yapılan çalışmalar bu deney modelinin özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

Bu çalışmaya birebir örnek olacak başka bir çalışmanın daha önce hiç yapılmamış olması literatür çalışmalarında benzer bir modele dahi rastlanmamasından dolayı bu çalışmada yapılan ve sadece 10 hücreden RNA izolasyon işlemini kapsayan metodta çalışan ve güvenilir bir protokol oluşturulmasının çok fazla zaman almasına sebep olmuştur. Model ve protokoller için harcanan bu zaman dilimi İMÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü yüksek lisans yönetmenliği gereği araştırmacıya verilen tezi tamamlama süresinin dolmasına sebep olmuştur. Bu zaman sorunu protokollerin optimizasyonu sonrasında yapılan gen ifade analizlerinde tekrarlanması gereken birçok deneyin tekrarına olanak vermediği için anlamlı sonuç vermesi beklenen deneylerin henüz yapılamamış olması sonucunu doğurmuştur.

Buna rağmen elde edilen veriler TND mekanizmasının anlaşılmasına dair çok önemli ip uçları vermiştir. İstatistiksel olarak anlamlı sonuçlar alınmasada gen ifade analizleri yapılan 13 genden 2 tanesi (P2RX7 ve mTOR) için yapılan deneylerde çok dikkat çekici gen ifade değişiklikleri saptanmıştır. Gen ifade analizlerinde P2RX7 ve mTOR için elde edilen sonuçlar hasarlanan nöronun komşuluğundaki nöronun gen ifade düzeyinde bu olaydan etkilendiğini teyit etmiştir.

Bu bulgular ve yapılan tekrarlı deneylerde elde edilen sonuçlar TND mekanizmasına dair iki hipotez geliştirilmesini sağlamıştır. Bunlardan ilki; hasar bölgesinden etrafa yayılan ve TND mekanizmasını tetikleyici özelliği olan bir sinyalin, hücre zarının parçalanması ile ortama yayılan ve sitoplazmaya ait bir içerik olduğu şeklindedir. Daha önce apoptotik süreçlerle ilişkili olduğu rapor edilen (Zhang et al. 2007) P2RX7 reseptörlerinin her ne kadar bu

çalışmada gen ifade analizlerindeki artışı TND'de sorumluluğu olabileceği ihtimalini desteklemiş olsada yaptığımız istatistik analizlerinde P2RX7 gen ifadesindeki artış anlamlı bir sonuç vermemiştir. Bu durum P2RX7 reseptörlerinin tek başına olmasada başka bir mekanizmayla etkileşim halinde olduğunu düşündürmektedir. P2RX7 geninin yapılan tekrar deneylerinde diğer genlerle karşılaştırıldığında gen ifadesindeki miktar artışının çok net bir şekilde görülmesi P2RX7 'nin olayın bir noktasında TND mekanizmasına dahil olduğunu göstermektedir. Bu mekanizmaların elbetteki henüz bilinmeyen farklı yolları olmakla beraber bu çalışmada P2RX7 reseptörlerinin gen ifadelerinin aksotomi yapılan hücrede görece net bir şekilde artması (P2RX7 geninin çekirdekte ve hücre gövdesinin periferinde kümелendiğininide hatırlayarak) P2RX7 geninin daha önceden rapor edildiği gibi (Svichar et al. 1997) nöron hücrelerinde Ca^{+2} artışına sebep olması ve aksotomi olan hücredeki bu Ca^{+2} artışının sinaptik bağlantılı olduğu komşu nöron için bir aşırı uyaran etkisi yaparak stres koşullarının sağlayıcısı olduğu, bu stres koşullarının ise komşu hücrede hücre ölüm yolları için aktivatör bir etkiye neden olarak kendini gösteriyor olması muhtemeldir. Bu anlamda P2RX7 reseptörlerinin miktarca artması TND sürecinin altında yatan önemli bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir. P2RX7 gen ifade analizlerinde görülen artışın istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç vermemesi deney düzeneği ve kullanılan protokollerde yapılacak bazı değişiklikler ile deneylerin tekrar edilmesi gerektiğini göstermektedir.

Ayrıca yapılan tekrarlı deneylerde mTOR geninin gen ifadesindeki artışın istikrarlı bir şekilde devam etmesi, yapılan istatistik analizlerinde komşu nöron ve kontrol grubu arasında fark gözlemlenmiş olması nöronlar arasında sinyal iletimi üzerinde daha etraflıca durulması gerektiği fikrini vermektedir. TND mekanizmasına dair geliştirilen ikinci hipotez nöronların aksonları arasında bulunan sinaptik etkileşim aracılığıyla gerçekleşen bir sinyal iletiminin olduğu yönündedir. Aksotomi olan nöron ile komşusu olan nöron arasındaki bir sinaptik ileti elektriksel veya kimyasal bir ileti olarak kendini gösterecektir. Fakat bu çalışmada yapılan aksonal hasarın hücre gövdesinden uzağa gidildikçe TND mekanizmasının gerçekleşme olasılığının düştüğüne dair yapılan gözlemler bu sinaptik iletimin elektriksel değil kimyasal bir ileti olduğunu göstermektedir. Nitekim söz konusu ileti şayet elektrisel bir ileti olsaydı hasar merkezinden uzaklaştıkça iletimin zayıflaması pek mümkün olmayacaktır. Fakat kimyasal bir sinyal molekülünün bir akson ağı içinde ileti etkisinin zayıflayarak ilerlemesi pekala mümkündür.

Kimyasal olarak sinaptik ileti söz konusu olduğunda TND'de aktif rol aldığı gösterilen nörotansmitter genellikle glutamat olmuştur (Tecoma et al.1989, Ross & Ebner 1990, Arundine et al. 2003, Franke et al. 2006). Bu tez çalışmasında glutamat ve reseptörleri NMDA çalışmaya dahil edilmemiştir fakat yapılan immunositokimya boyamalarında (Şekil 14-15) çok net görüldüğü üzere mTOR proteini nöron hücrelerinde aksonlar boyunca kümeler halinde ve hücre gövdesinde sitoplazma içinde dağınık bir lokalizasyona sahiptir. Hasarın aksonlar üzerinde verilmesi akla ilk olarak bu hasar bölgesinde bulunan mTOR protein kümeleri üzerinden bir sinyal mekanizmasının harekete geçirildiğini getirmektedir. mTOR, hücre büyümesi ve çoğalmasında görev alan, aynı zamanda hücrenin enerji durumunu kontrol eden hücre içi homeostatisi için bir sensör olarak çalışan, bir serin/trionin kinazdır. Hücrede enerji metabolizmasında rol alarak hücre içi enerji dengesinin korunmasından sorumludur. Hücrenin olumlu ya da olumsuz anlamda hücre içi veya hücre dışı değişikliğe maruz kalması durumunda mTOR proteini miktarca artış göstermektedir (Sabatini et al. 1999).

Daha öncedende rapor edildiği gibi sinaptik fonksiyonlarının önemli bir düzenleyicisi olduğu tespit edilen (Jacinto et al. 2004) mTOR proteininin nöron hücreindeki bir hasar sinyal mekanizması ile miktarca anlamlı derecede artması ortamdaki nörotrofik faktörlerin salınmasına sebep olmaktadır (Lenz & Avruch 2005, Nie et al. 2010). Bu durum hücre içinde azalan nörotrofik faktörlerin doğal sonucu olarak mitokondri üzerinden reaktif oksijen türlerini (ROS) aktive ederek hücrenin ölümüne neden olabileceğini düşündürmektedir.

Bu tez çalışmasında orjinal bir deney modeli kullanılarak *in vitro* olarak 10 tane gibi çok az sayıda hücreden TND mekanizmasında gen ifade analizleri yapılarak P2RX7 ve mTOR gibi genlerde ifade artışı olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan örnek sayısı artırılarak özellikle mTOR sinyal mekanizmalarının ve P2RX7 reseptörlerinin hücre hayatı ile ilgili rollerinin daha derinlemesine çalışılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

Atalay Ö.F., Üstin H., Fiziksel Tıp 2004; 7(3): 157-162 Periferik Sinir Sisteminde Nöronal Dejenerasyon, Rejenerasyon ve Nörodejeneratif Hastalıklarda Yeni Tedavi Modaliteleri.

Bustin, S.A and Mueller, R. 2005. Review : Real Time reverse transcription PCR (qRT-PCR) a perspective use in clinical diagnosis .Clinical Science 109, 365-379

Burn, D.J., and Jaros, E. 2001. Multiple system atrophy: cellular and molecular pathology. Mol. Pathol. 54:419–426.

Castagné, V., Gautschi, M., Lefèvre, K., Posada, A., and Clarke, P.G.H. 1999. Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. Prog. Neurobiol. 59:397–423.

Clarke, P.G.H. 1990. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. Anat. Embryol. 181:195–213.

Clarke, P.G.H. 1999. Apoptosis versus necrosis. In Cell death and diseases of the nervous system. V.E. Koliatsos and R.R. Ratan, editors. Humana Press. Totowa, New Jersey, USA. 328.

Christofferson, D. E. and J. Yuan (2010). "Necroptosis as an alternative form of programmed cell death." *Curr Opin Cell Biol* 22(2): 263-268.

Coleman, M. P.; Conforti, L.; Buckmaster, E. A.; Tarlton, A.; Ewing, R. M.; Brown, M. C.; Lyon, M. F.; Perry, V. H. (1998). "An 85-kb tandem triplication in the slow Wallerian degeneration (Wlds) mouse". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (17): 9985–9990.

Coleman, Michael P.; Freeman, Marc R. (1 June 2010). "Wallerian Degeneration, Wld, and Nmnat". *Annual Review of Neuroscience* 33 (1): 245–267.

Devinsky, O. (2005). "The myth of silent cortex and the morbidity of epileptogenic tissue: Implications for temporal lobectomy.". *Epilepsy and Behavior* (7): 383–398

- Dickson, Dennis W., Rapin, Isabelle, Weidenheim, and Karen M. (2009). "Neuropathology of Cockayne syndrome: Evidence for impaired development, premature aging, and neurodegeneration.". *Mechanisms of Aging and Development* 130 (9): 619–636
- Dufour, E., Terzioglu, M., Sterky, F.H., Sorensen, L., Galter, D., Olson, L., Wilbertz, J., and Larsson, N.G. (2008). "Age-associated mosaic respiratory chain deficiency causes trans-neuronal degeneration.". *Hum. Mol. Genet.* 17: 1418–1426.
- Eisen, Andrew, and Weber, Markus. (2001). "The Motor Cortex and Amyotrophic Lateral Sclerosis". *Muscle & Nerve* 24 (4): 564–573
- Fansa H, Keilhoff G. Factors influencing nerve regeneration. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2003 Mar;35(2):72-82.
- Forno, L.S. 1996. Neuropathology of Parkinson's disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55:259–272.
- Gilley, Jonathan; Coleman, Michael P. (25 January 2010). "Endogenous Nmnat2 Is an Essential Survival Factor for Maintenance of Healthy Axons". *PLoS Biology* .
- Heimer, L., and Kalil, R. (1978). "Rapid transneuronal degeneration and death of cortical neurons following removal of the olfactory bulb in adult rats.". *J. Comp. Neurol.* 178 (3): 559–609
- Jacinto,E., Loewith,R., Schmidt, A., Lin, S., Rüegg,M.A., Hall, A., and Hall, M.N.(2004). Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nat. Cell Biol.*6, 1122-1128
- Kostic, V., Jackson-Lewis, V., De Bilbao, F., Dubois-Dauphin, M., and Przedborski, S. 1997. Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Science.* 277:559–562.
- Kurtland, L.T. 1988. Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental neurotoxin. *Trends Neurosci.* 11:51–54.
- L. Carlos Junqueira, José Carneiro, Robert O. Kelley. *Basic Histology.* 8th Edition. Lange Medical Book, 1998.

Leininger GM, Vincent AM, Feldman EL. The role of growth factors in diabetic peripheral neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2004 Mar;9(1):26-53. Tanner, C.M. 1992. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol. Clin.* 10:317–329.

Lenz, G., and Avruch, J. (2005). Glutamatergic regulation of the p70S6 kinase in primary mouse neurons. *J.Biol.Chem.*280, 38121- 38124

Lorenzo Galluzzi and Guido Kroemer,*Necroptosis: A Specialized Pathway of Programmed Necrosis DOI 10.1016/j.cell.2008.12.004 N

Matthews, M. R., W. M. Cowan and T. P. Powell (1960). "Transneuronal cell degeneration in the lateral geniculate nucleus of the macaque monkey." *J Anat* 94(Pt 2): 145-169.

Nie, D., Di Nardo , A., Han., J.M., Baharanyi, H., Kramvis, I., Huynyh, T., Dabora, S., Codeluppi, S., Pandolfi, P.P., Pasquale, E.B., and Sahin,M.(2010), Tsc2-Rheb signaling regulates EphA-mediated axon guidance. *Nat. Neuroscience.* 13, 163-172.

Nolan, T., Hands, R.E., Bustin S.E. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR, *Nature Protocols*, 1(3): 1559-1582

Onteniente B, Rasika S, Benchoua A. Moleküler pathways in cerebral ischemia: cues to novel therapeutic strategies. *Mol Neurobiol* 2003 Feb;27(1):33-72.

Sulkava, R., Haltia, M., Paetau, A., Wikstrom, J., and Palo, J. 1983. Accuracy of clinical diagnosis in primary degenerative dementia: correlation with neuropathological findings. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 46:9–13.

Tomlinson, B.E. 1977. The pathology of dementia. *Contemp. Neurol. Ser.* 15:113–153.

Tanner, C.M., et al. 1999. Parkinson disease in twins: an etiologic study. *JAMA.* 281:341–346.

Prezant, T.R., et al. 1993. Mitochondrial ribosomal RNA mutation associated with both antibiotic-induced and non-syndromic deafness. *Nat. Genet.* 4:289–294.

Pinching, A.J., and Powell, T.P. (1971). "Ultrastructural features of transneuronal degeneration in the olfactory system." *J. Cell. Sci.*(1): 253–287

Rathbone MP¹, Middlemiss PJ, Gysbers JW, Andrew C, Herman MA, Reed JK, Ciccarelli R, Di Iorio P, Caciagli F. Trophic effects of purines in neurons and glial cells. *Prog Neurobiol.* 1999 Dec;59(6):663-90.

Sabatini, D.M., Barrow, R.K., Blackshaw, S., Burnett, P.E., Lai, M.M., Field, M.E., Bahr, B.A., Kirch, J., Betz, H., and Snyder, S.H (1999). Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science* 284, 1161-1164

Sabatini, D.M., Barrow, R.K., Blackshaw, S., Burnett, P.E., Lai, M.M., Field, M.E., Bahr, J., Kirsch, J., Betz, H., and Snyder, S.H. (1999). Interaction of RAFT1 with gephyrin required for rapamycin-sensitive signaling. *Science* 284, 1161-1164.

Son, J. H., J. H. Shim, K. H. Kim, J. Y. Ha and J. Y. Han (2012). "Neuronal autophagy and neurodegenerative diseases." *Exp Mol Med* 44(2): 89-98.

Sperandio, S., de Belle, I., and Bredesen, D.E. 2000. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:14376–14381.

Stefanis, L and Burke, R.E. (1996). "Transneuronal degeneration in substantia nigra pars reticulata following striatal excitotoxic injury in adult rat: time-course, distribution, and morphology of cell death." *Neuroscience* 74 (4): 997–1008.

Su, J.H., Deng, G., and Cotman, C.W. (1997). "Transneuronal degeneration in the spread of Alzheimer's disease pathology: immunohistochemical evidence for the transmission of tau hyperphosphorylation." *Neurobiol* 4 (5): 365–375.

Svichar, N., Shmigol, A., Verkhratsky, A., Kostyuk, P., ATP induces Ca⁺² release from IP3-sensitive Ca⁺² stores exclusively in large DRG neurons, *Neuroreport*, 8, 1555-1559,(1997)

Terao, S., Li, M., Hashizume, Y., Osano, Y., Mitsuma, T., and Sobue, G. (1997). "Upper motor neuron lesions in stroke patients do not induce anterograde transneuronal degeneration in spinal anterior horn cells." *Stroke* 28: 2553–2556

Uchiyama, Y. 2001. Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch. Histol. Cytol.* 64:233–246.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., and Currie, A.R. 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68:251–306.

Waller, A. (1 January 1850). "Experiments on the Section of the Glossopharyngeal and Hypoglossal Nerves of the Frog, and Observations of the Alterations Produced Thereby in the Structure of Their Primitive Fibres". *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 140 (0): 423–429.

Vargas, Mauricio E.; Barres, Ben A. (1 July 2007). "Why Is Wallerian Degeneration in the CNS So Slow?". *Annual Review of Neuroscience* 30 (1): 153–179. doi:10.1146/annurev.neuro.30.051606.094354. PMID 17506644

Yaginuma, H., et al. 1996. A novel type of programmed neuronal death in the cervical spinal cord of the chick embryo. *J. Neurosci.* 16:3685–3703.

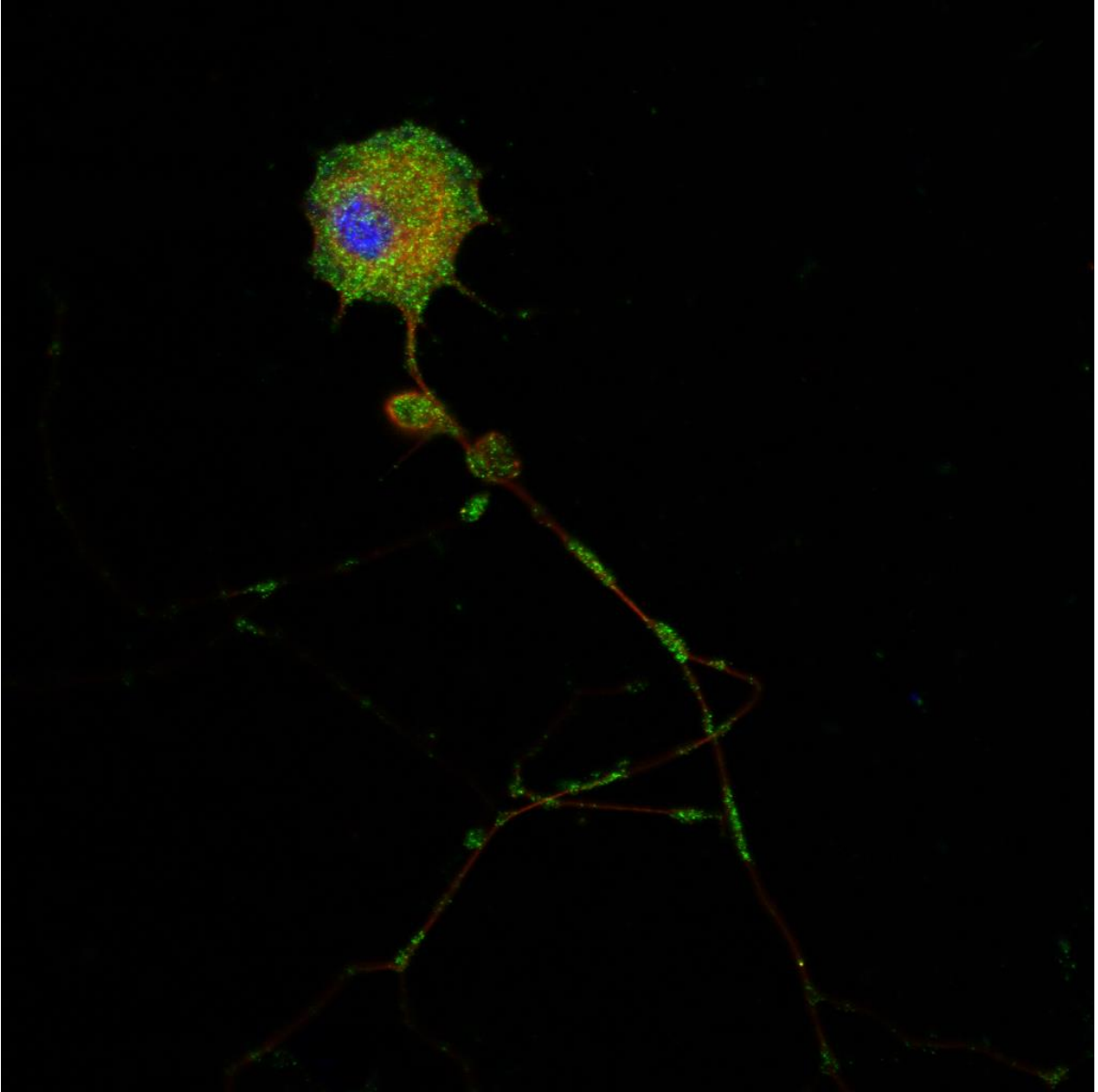
Yamada, K., Goto, S., Yoshikawa, M., Okamura, A., and Ushio, Y. (1997). "Continuous intraventricular drug infusion for the in vivo study of transneuronal degeneration in the striatonigral system of the rat.". *Brain Research Protocols* (1): 371–377.

7. EKLER :

EK 1: Kimyasallar Çizelgesi

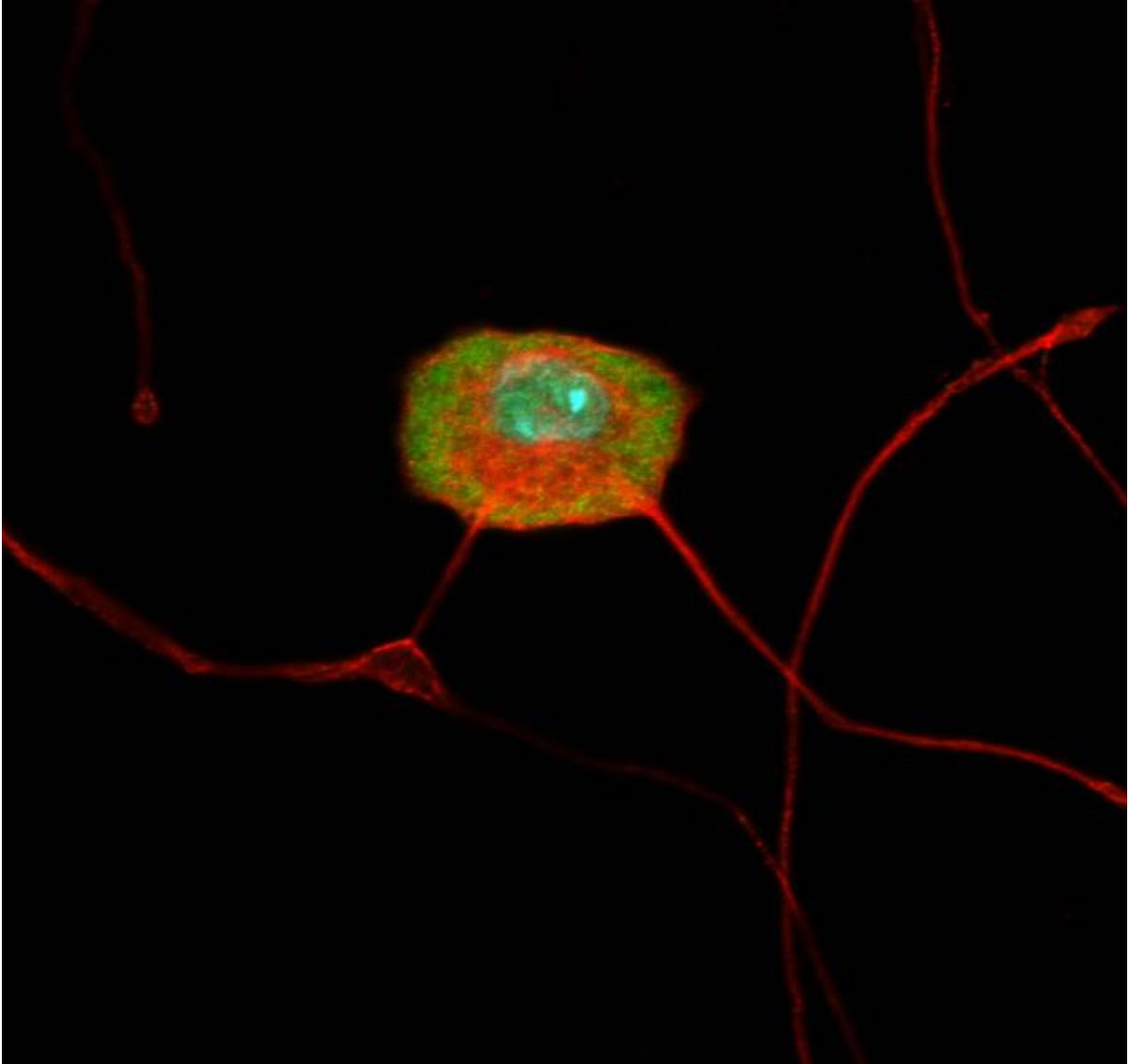
Kimyasal	Firma	Kod Numarası
RPMI 1640	Sigma	R0883
NBA: Neurobasal A	Invitrogen	10888-022
B27	Invitrogen	17504-044
Kolejenaz	Sigma	C7657
Tripsin	Sigma	T4424
DNase	Sigma	D45513
HBBS	Sigma	H9269
Antibiyotik	Sigma	A5955
Glutamax	Invitrogen	35050-061
Tripsin inhibitörü	Sigma	T6522
Fetal Calf Serum	Sigma	F9665
Percoll	Sigma	P4937
Poly-L-Lysin	Sigma	P6282
Laminin	Sigma	L2020

EK 2:



Primer hücre kültürü yapılan DRG nöron hücrelerinin primer mTOR (yeşil) ve β -III Tubulin (kırmızı) antikorları ve bunlara uygun şekilde seçilen sekonder antikorlar (Alexa 488 Goat anti Rabbit, Alexa 568 Goat anti Mouse) ve çekirdek boyası olan DAPI (mavi) ile boyanmış ve 20X objektifle Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskopunda alınan görüntülerinin zoom edilmiş hali ile mTOR proteininin sitoplazma içerisinde hücre gövdesinin her tarafında dağınık bir şekilde ve aksonlar boyunca kümelenmiş şekilde localize olduğu gözlemlenmiştir.

EK 3 :



Primer hücre kültürü yapılan DRG nöron hücelerinin primer P2RX7 (yeşil) ve β -III Tubulin (kırmızı) antikorları ve bunlara uygun şekilde seçilen sekonder antikorlar (Alexa 488 Goat anti Rabbit, Alexa 568 Goat anti Mouse) ve çekirdek boyası olan DAPI (mavi) ile boyanmış ve 20X objektifle Zeiss LSM 780 Konfokal Mikroskopunda zoom yapılarak alınan görüntülerinde P2RX7 pürin reseptörleri çekirdek içerisinde yoğun bir şekilde ve aynı zamanda hücre gövdesinin periferal çeperinde -membran bölgesinde yoğun olarak lokalize olduğu gözlenirken aksonal uzantılarda P2RX7 pürin reseptörleri gözlemlenmemiştir.

8. ETİK KURUL ONAYI

**T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)**

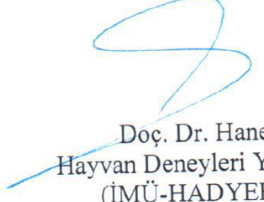
Sayı : 38328770 -34
Konu: Etik Kurulu Kararı

15/05/2014

Sayın Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “İn Vitro Transnöranal Dejenerasyon Mekanizmasındaki Gen İfade Değişiklikleri” 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)


Tel: (0216)681 53 00
Faks:(0212)531 75 55
E-mail: ilknurfil@medipol.edu.tr

Adres:Kavacık Mah.Ekinciler Cad.No:19,34810
Kavacık/BEYKOZ



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)
ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
15/05/2014	20		Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

<p>“İn Vitro Transnöranal Dejenerasyon Mekanizmasındaki Gen İfade Değişiklikleri” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.</p>
<p>Etik Onay Geçerlilik Süresi: 1 yıl</p>

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Dr. Ertuğrul KILIÇ	
Üye	Doç. Dr. Mustafa ÖZTÜRK	
Üye	Yrd. Doç. Dr. H. Emir YÜZBAŞIOĞLU	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Sine Özmen TOĞAY	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Mehmet Yalçın GÜNAL	
Üye	Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Özge Şeyda DURGUT	
Üye	Ekrem Musa ÖZDEMİR	

9.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Şerife	Soyadı	Sefil
Doğum Yeri	Sivas	Doğum Tarihi	14.10.1977
Uyruğu	T.C	T.C Kimlik No	13973330784
E-mail	ssefil@medipol.edu.tr	Tel	05383251725

Eğitim düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	-	-
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	2015
Lisans	Viyana Üniversitesi	2011
Lise	Sivas Lisesi	1994

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
1.Öğretim Girevlisi	İstanbul Medipol Üni.	4 ay
2.Biolog	İstanbul Medipol Üni.	2,5 yıl
3.Biolog	T.C Sağlık Bakanlığı	6 ay

Yabancı Diller	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
Almanca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi
İngilizce	İyi	İyi	İyi

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
Ales	73.97	75.00	65.81

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Word	Çok iyi
Excell	Çok iyi
SPSS	İyi