

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ERİŞKİN FARE MEDİAL VESTİBÜLER ÇEKİRDEK
HÜCRELERİNİN İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜNÜN
HAZIRLANMASI**

Serap ALTUNTAŞ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

1. Yrd. Doç. Dr. Aydın Him
2. Doç.Dr. Gürkan Öztürk

VAN – 2008

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERİŞKİN FARE MEDİAL VESTİBÜLER ÇEKİRDEK HÜCRELERİNİN
İZOLASYONU VE KÜLTÜRÜNÜN HAZIRLANMASI

Serap ALTUNTAŞ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doç.Dr. Gürkan ÖZTÜRK
Jüri Başkan

Doç.Dr. Ender ERDOĞAN
Üye

Yrd.Doç.Dr. Aydın HİM
Üye

TEZ KABUL TARİHİ
15/12/2008

İÇİNDEKİLER

Kapak	I
Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Teşekkür	V
Kısaltmalar	VI
Şekiller Listesi	VII
Tablolar Listesi	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hücre Kültürü.....	3
2.1.1. Hücre kültürü çeşitleri.....	4
2.1.2. Hücre kültürü yapımının temel aşamaları	5
2.2. Büyüme Faktörleri	8
2.3. İmmunohistokimya.....	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	15
3.1. Deney Hayvanları	15
3.2. Hücre Kültürü Hazırlanması	15
3.3. Hücrelerin Ekilmesi.....	16
3.4. Kültür Vasatı.....	16
3.5. İmmunohistokimya ve Canlılık Testleri.....	16
3.6. Nöron Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler.....	18
4. BULGULAR	19
4.1 Kültürde Nöronların Morfolojik ve Fenotipik Özellikleri.....	19
4.2 Serumun Kültürlerde Hücre Sağkalım Oranlarına Etkisi.....	23
4.3 Büyüme Faktörlerinin Kültürlerde Hücre Sağkalım Oranlarına Etkisi.....	24
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	26
5.1. Erişkin Vestibüler Nron Kültürlerinde Sağkalım ve Nörit Rejenerasyonu.....	26
5.2. Serum, NGF ve IGF-1 Kültürdeki Vestibüler Çekirdek Nöronlarını Destekledi.....	28
ÖZET	31

SUMMARY	32
KAYNAKLAR	33
ÖZGEÇMİŞ	38
EKLER	39

TEŞEKKÜR

Deneysel bir çalışma olan araŐtırmamın planlanması ve yürütölmesinin her aŐamasında yardımcı olan tez danıŐmanım, Y.Y.Ü. Tıp Faköltesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri ve danıŐmanlarım Yrd. Doç. Dr. Aydın HİM ve Doç. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e, immunohistokimya yöntemlerinin uygulamalarındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Ender Erdoğan'a, yönetimine ve laboratuvara ait teknik konularda yardım ve desteklerini gördüğüm Neuroscience Araştırma Birimi ve Fizyoloji Anabilim Dalı öğrenci ve öğretim üyelerine teşekkürü bir borç bilirim.

KISALTMALAR

- aFGF : Asidik fibroblast büyüme faktörü
bFGF : Bazik fibroblast büyüme faktörü
BDNF : Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
BSA : Bovine (sığır) serum albumini
CNTF : Silier nörotrofik faktör
EGF : Epidermal büyüme faktörü
FCS : Fötal dana serumu
GDNF : Glial hücre kökenli sinir büyüme faktörü
GFAP : Glial fibriler asidik protein
IGF-1 : İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
IGF-2 : İnsülin benzeri büyüme faktörü-2
LIF : Lösemi inhibe edici faktör
NGF : Sinir büyüme faktörü
NT-3 : Nörotrofin-3
NT-4/5 : Nörotrofin-4/5
PBS : Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
PDGF : Platelet kaynaklı büyüme faktörü
TGF β : Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
Trk : Tirozin kinaz

ŞEKİLLER

Şekil 1. İmmunoflöresan işaretlemenin tek aşamalı (A) ve iki aşamalı (B) uygulanişı.....	14
Şekil 2. Vestibüler nöron kültüründe propidium iyodür ile ölü-canlılık testi.....	20
Şekil 3. İzole hücre kültüründe bir vestibüler nöronun dört günlük gelişimi.	21
Şekil 4. Büyüme faktörü reseptörlerinden trkA (A), trk B (B) ve trk C (C) immunohistokimyası.....	22
Şekil 5. Serumlu ve serumsuz vestibüler hücre kültürlerinde canlılık oranları.	23

TABLÖLAR

Tablo 1. Yapılarındaki nükleotid ve amino asit benzerliklerine göre sınıflandırılmış büyüme faktörleri.....	9
Tablo 2. İmmünohistokimyasal işaretlemede kullanılan primer antikorlar.....	17
Tablo 3. İmmünohistokimyasal işaretlemede kullanılan sekonder antikorlar.....	18
Tablo 4. Serumsuz vestibüler hücre kültürlerinde canlılık oranları ve kültürlere sinir büyüme faktörlerinin katılmasının canlılık oranlarına etkileri.....	25

1. GİRİŞ

Hücre kültürü çalışmaları nöronların ayrı ayrı incelenmesine olanak tanınmaları, in vivo ortamdaki bilinmeyen faktörlerin olmaması, istenilen farmakolojik ajanların doğrudan uygulanabilmesi ve hücre dışı ortamın daha kolay kontrol edilebilmesi ve bunlara bağlı olarak deneylerin tekrar edilebilirliğinin daha güvenilir olması gibi avantajları sunmaktadır. Yukarıda bahsedilen pek çok üstünlüklerinden dolayı, çeşitli beyin bölgelerinden izole edilen nöronların özelliklerinin incelenmesi için, hücre kültürlerinin kullanımı son yıllarda giderek artmaktadır. Primer nöronal hücre kültürleri daha çok embriyonik veya erken postnatal dönemde alınan dokulardan yapılmaktadır. İzole hücre kültürü yapımında embriyonik dokuların tercih edilmesinin nedenleri arasında; bu dönemde glia hücrelerinin az olması, daha saf nöron kültürü elde edilebilmesi, hücreler arası bağlantıların ve sinapsların az olması, yaşam için daha az faktörlere ihtiyaç duymaları sayılabilir (Mattson ve ark., 1988; Goslin ve Banker, 1989; Brewer ve ark., 1993). Erişkin sinir sisteminde ise nöronlar arasındaki sıkı bağların bulunması, izolasyon sırasında akson ve dendritlerinin parçalanmasıyla mekanik ve metabolik hasarın fazla olması, trofik faktörlere daha fazla ihtiyaç duymaları gibi nedenlerden dolayı erişkin nöronların izole edilip kültürlerinin yapılması genellikle daha zordur. Ancak primer nöron kültürü için embriyonik dokuların kullanılması kolay ve çok yaygın olmakla birlikte, bu sistemler hücrelerin gelişim aşamalarında olmaları nedeniyle amaçlanan çalışmalar için sıklıkla uygun olmamaktadır. Embriyonik nöronlar çoğu kez fizyolojik, farmakolojik, rejeneratif ve patolojik karakterler bakımından erişkin nöronlardan farklılıklar göstermektedir. Bazı durumlarda embriyonik ve erişkin nöronlar arasındaki bu farklar kalsiyum dinamikleri (Brewer ve ark., 2006), glutamat nörotransmitterine karşı olan duyarlılıkları (Brewer, 1998) ve mitokondri fonksiyonlarında (Parihar ve Brewer, 2007) olduğu gibi çok önemli derecede olabilmektedir. Erişkin hayvanlardan nöron kültürleri hazırlamak zor olmakla beraber; Parkinson hastalığı, Alzheimer Hastalığı, inme gibi merkezi sinir sistemi ile ilgili bir çok önemli hastalığın erişkinlerde görülmesi nedeniyle erişkin nöron kültürleri kullanılarak yapılan çalışmalar daha fazla tercih edilirler. Erişkin hayvanlardan izole nöron kültürü yapımının yaklaşık 20 yıllık bir geçmişi olmakla birlikte ilk denemeler çok başarılı değildi. Huettner ve Baughman (1986) ile Kaneda ve ark.'nın (1988)

yaptıkları ilk çalışmalarda embriyonik nöronlar iki hafta kadar yaşarken, erişkin merkezi sinir sistemi nöronları kültürlerde sadece saatler içerisinde ölmekteydiler. Son zamanlarda erişkin hayvanlarda hipokampus (Brewer, 1997), serebral korteks (Eide ve McMurray, 2005; Alexanian ve Nornes, 2001), sempatik gangliyonlar (Orike ve ark., 2001) gibi sinir sisteminin farklı bölgelerinden izole edilen nöron kültürleri başarı ile yapılmaktadır.

Vestibüler nöronların özellikleri izole hücre kültürlerinde çalışılmamıştır. Vestibüler sistem fizyolojisi ve patolojisi ile ilgili çalışmalar daha çok beyin kesitlerinde (Sekirnjak ve du Lac, 2002; Him ve Dutia, 2001; Dutia ve Johnston, 1998; Serafin ve ark., 1991a,b) ve izole tüm beyin preparatlarında (Babalian ve ark., 1997) araştırılmıştır. Vestibüler sistem ile ilgili bozukluklar; özellikle ilerleyen yaşlarda çok sıklıkla karşılaşılan denge problemleri, düşmeler, vertigo, Meniere hastalığı ve baş dönmeleri gibi toplumun önemli bir kısmını ilgilendiren rahatsızlıkların altında yatan nedenleridir. Vestibüler sistem temel olarak başın hareketlerini ve pozisyonunu algılar ve bu bilgileri kullanarak göz hareketlerinin düzenlenmesi, postürün sağlanması ve vücudun pozisyonunun algılanmasına aracılık eder. Vestibüler sinyaller labirent içerisinde bulunan yarım daire kanalları ve otolit organlarda yerleşik reseptörlerden alınır ve temel olarak süperior, inferior, lateral ve medial vestibüler çekirdeklere ulaştırılırlar. Vestibüler sistemle ilgili hücre kültürü çalışmaları oldukça sınırlıdır. Vestibüler gangliyon nöronlarının elektrofizyolojik özellikleri izole hücre kültürlerinde çalışılmıştır (Chabbert ve ark., 1997; Lefebvre ve ark., 1991; Rabejac ve ark., 1997). Genlain ve ark. (2003) ise medial vestibüler çekirdek nöronlarının elektrofizyolojik özelliklerini mikroeksplant kültürlerinde çalışmışlardır. Vestibüler çekirdek nöronlarının izole hücre kültürleri ise henüz yapılmamıştır. Bu çalışmada vestibüler sistemin bir parçası olan vestibüler çekirdek nöronlarının izole hücre kültürlerin hazırlanması ve bu kültürlerde nöronların morfolojik ve elektrofizyolojik özelliklerinin incelenmesi ile, vestibüler sistem fizyolojisi ve patolojisi ile ilgili olarak yapılacak in vitro araştırmalara bir altyapı oluşturması planlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hücre Kültürü

Günümüzde yapılan araştırma çalışmalarının önemli bir bölümü hücre kültürlerinde gerçekleştirilmektedir. Çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkileri yanısıra, bir hücre ya da dokuda üretilen belirli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla belirli bir hücre serisinden çoğaltılan hücrelerde kullanılarak canlı ortamında (in vivo) yapılması olanaksız veya zor olan çalışmaları gerçekleştirmek mümkündür. Hücre veya doku kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yıla yakın bir süreyi kapsamaktadır. İlk olarak 1907'de Harrison kurbağa embriyo dokularını 1913'te Carrel tavuk embriyo dokularını kültür ortamında uzun süre saklayabilmişlerdir (Alberts, 1994). Sanford ve ark. (1948) ise, hücrelerin dokulardan ayrılarak bağımsız olarak kültürde yaşatılabileceklerini gösterdiler. Bu yıllardan sonra hücre kültürü çalışmaları antibiyotiklerin ve tripsinin kullanılmaya başlanmasıyla hızlandı ve giderek yaygınlaştı.

Doku veya hücre kültürü genel bir tanımlama ile hayvan veya bitkilerden hücrelerin, dokuların veya organların çıkartılıp yaşamaları ve çoğalmaları için suni bir ortama konulmasıdır. Bu suni ortam kabaca uygun bir cam veya plastik kültür kabı ile hücrelerin yaşamı için gerekli besinleri içeren bir sıvıdan oluşur. Tüm bir organın veya organın bir parçasının kültürünün yapılmasına organ kültürleri adı verilirken, hücrelerin organ veya dokulardan ayrıştırılarak ekilmesiyle yapılan kültürlere de hücre kültürleri adı verilir.

Hücre kültürü, hücre biyolojisi ve moleküler biyolojinin kullandığı başlıca metodlardan biridir ve oldukça geniş alanlarda kullanılmaktadır. Temel hücre fizyolojisi, hastalık ve hücreler arasındaki ilişkiler, ilaçların hücreler üzerindeki etkileri ve yaşlanma gibi model sistemlerde kullanıldıkları gibi; toksisite testlerinde, kanser araştırmalarında, aşıların geliştirilmesi ve üretiminde, biyolojik temelli ilaçların elde edilmesinde (insülin ve hormonların üretilmesi) kullanılmaktadır.

2.1.1. Hücre kültürü çeşitleri

Hücre kültürleri temel olarak iki gruba ayrılabilir; primer hücre kültürleri ve sürekli hücre serileri. Primer kültürler, hücreler veya dokuların mekanik ve/veya enzimatik yollarla organ ve dokulardan ayrılarak kültür ortamına konulmasıyla yapılır. Böylece, elde edilen hücreler asıl kökenlerinin özelliklerini yansıtmayı sürdürürler. Örneğin, fibroblastlar kollajen salgılamaya, embriyonik kas hücrelerinden türetilen hücreler kültür ortamında kas lifleri oluşturarak kendiliğinden kasılmaya, sinir hücreleri aksonlarını uzatarak diğer sinir hücreleriyle sinapslar yapmaya, epitel hücreleri de sağlam bir epitelin özelliklerini taşıyan tabakalar oluşturmaya devam ederler. Primer kültürler eksplant kültürleri ve izole hücre kültürleri olarak iki gruba ayrılabilir. Eksplant kültürlerinde bir parça doku alınıp kültüre konur ve sonrasında bu dokulardan hücreler çıkarak çoğalmaya başlar. İzole hücre kültürlerinde ise hücreler kültüre konulmadan önce bulunduğu yapılardan mekanik ve/veya enzimatik yollarla ayrıştırılır ve bu izole hücreler şekilde kültüre ekilir. Primer hücre kültürlerinde çoğalan hücreler buradan alınıp başka kültürlere ekilebilir ve çoğaltılabilir. Bu şekilde elde edilen kültürler 'sekonder hücre kültürleri' denir ve bir seri kültür işlemlerinden sonra 'sürekli hücre serileri' elde edilir. Sürekli hücre serileri genellikle anormal kanser hücreleri (örn. HeLa) ya da transformasyona uğratılmış hücre serileri olup köken aldıkları hücrelerle pek çok açıdan farklılıklar gösterirler. Bu kültürler hücre siklusunun kontrolü gibi çalışmalardan büyük miktarlarda aşuların ve rekombinat DNA'ların üretilmesine kadar farklı alanlarda kullanılmaktadırlar. Bu kültürlerin önemli bir avantajı dimetilsülfoksit veya gliserol gibi uygun kriyoprotektif ajanlarla dondurulabilir ve uzun süre saklanabilir olmalarıdır. Buna karşılık primer kültürlerin önemli bir üstünlüğü in vivo ortamdan daha kısa süre önce uzaklaştırılmış olmaları nedeniyle hücrelerin doğal yapı ve fonksiyonlarını daha iyi koruyabilmeleridir. Ancak bu kültürlerin hazırlanmasındaki en büyük dezavantaj hücrelerin ayrıştırılmaları sırasında hasara uğramaları ve kültürdeki ortamın in vivo ortamdan farklı olmasıdır (Alberts, 1994).

Günümüzde kültürlerin büyük kısmı dokudan ayrıştırılmış hücre süspansiyonları şeklinde yapılmaktadır. Kan hücreleri ve transformasyona uğramış hücreler (tümör hücreleri gibi) çoğalabilmek için bir yüzeye ihtiyaç duymazlar ve süspansiyon şeklinde

kültürleri yapılır. Ancak çoğu doku hücreleri süspansiyon ortamında yaşamaya uyumlu olmayıp bölünmek ve çoğalmak için katı bir yüzeye gereksinim duyarlar. Hücre kültürleri için bu gereksinim plastik veya cam doku kültür kaplarının yüzeyi ile karşılanır. Kandan türemiş hücre serileri (lösemi ve lenfoma hücre serileri gibi) süspansiyon besiyerlerinde üremeye eğilimliken; akciğer, böbrek, beyin gibi katı dokulardan elde edilmiş hücreler bir yüzeye tutunarak tabaka şeklinde üreme eğilimindedirler. Hücrelerin türlerine göre gereksinimleri farklılıklar göstermekle birlikte çoğu hücre, kültür kapları kollajen ya da laminin gibi özel ekstrasellüler matriks yapılarıyla kaplanmazsa tutunamaz, çoğalamaz ve farklılaşamazlar.

2.1.2. Hücre kültürü yapımının temel aşamaları

Hücre kültürü çalışmaları için gerekli temel araç-gereçler şunlardır: laminar akımlı kabin, karbon dioksit (CO₂) ayarlı etüv, faz kontrast mikroskop, hücrelerin tutunma ve hareketlerine olanak sağlayacak toksik olmayan, biyolojik olarak inert ve optik olarak saydam, tek kullanımlık steril plastik veya cam kaplardır. Laminar akımlı kabinler partikül filtresine sahiptirler. Bu kabinler dikey ya da yatay olabilirler, dikey olanlarında süzülen hava kabinin üstünden çıkarken yatay olanlarında kullanıcı bölgesinden yatay olarak dışarı üflenmektedir. Kabinlerin kullanım öncesi UV (ultraviyole, morötesi) ışıkla sterilizasyonu sağlanmalıdır. Kullanılan kültür vasatının pH'sının nötral tutulabilmesi için hücreler yaklaşık olarak % 5 CO₂'li ortamda tutulurlar. Hücreleri gözlemek için de invert faz kontrast mikroskoplar kullanılır.

Hücre kültürü yönteminin temel aşamaları şunlardır; 1. Dokunun vücut dışına çıkartılması, 2. Dokunun parçalanarak hücrelerin elde edilmesi, 3. Hücrelerin kültür kaplarına ekilmesi, 4. Uygun besi ortamında ve çevre şartlarında inkübasyonu (Marther, 1998).

Tek bir hücre tipi hakkında mümkün olan en iyi bilgiyi edinmek için o hücrenin dokudaki diğer hücre tiplerinden ayrılarak izole edilmesi gerekir. Farklı hücre türleri doku süspansiyonundan değişik yöntemlerle ayrılarak (izole edilerek) tipleri belirlenebilir. Değişik hücre türlerinden oluşan bir dokudan tek bir tip hücreyi ayırmak

için yapılması gereken ilk işlem, tüm hücreleri bir arada tutan hücre dışı maddeyi ayırmaktır. Bunun için doku örneği, proteinleri parçalayan tripsin ve kollajenaz gibi proteolitik enzimler ve hücre yapışmasında rol oynayan kalsiyum iyonunu (Ca^{+2}) bağlayan EDTA gibi ajanlarla muamele edilir. Farklı hücre türlerini ayırmak için değişik yöntemler uygulanabilir. Hücrelerin fiziksel özelliklerine göre; örneğin büyük olanlar küçük olanlardan, ağır olanlar hafif olanlardan santrifüj edilerek ayrılabilir. En gelişmiş hücre ayırıştırma yöntemlerinden birinde belirli hücreleri işaretlemek için antikor bağlanmış bir florasan boya kullanılır. Böylece işaretlenmiş hücreler işaretlenmemiş olanlardan florasanla aktive olan bir elektronik hücre ayırıcı kullanılarak ayrılabilir. Böyle bir makine saniyede binlerce hücre ayırabilir ve işaretlenmemiş 1000 tane hücrenin içinden florasanla işaretlenmiş bir hücreyi ayırabilecek kadar seçicidirler.

Laser ışını kullanarak da mikroskop altında belli bir hücre topluluğu mikrodiseksiyon yöntemiyle elde edilebilir. Bu yöntem özellikle bir tümör dokusunun çeşitli yerlerinden alınan hücrelerin özelliklerinin belirlenmesinde kullanılabilir.

Yapılan kültürün amacına bağlı olarak hücreleri ekmek için farklı tipte ve büyüklükte kültür kapları kullanılabilir. Kültür yapımının amacı çok sayıda hücre elde etmek ise, 150 mm çaplı kaplar veya şişeler kullanılabilir. Hücrelerin çoğalması arzu edilmeyip kültürde gelişimleri takip edilecekse 35 veya 60 mm'lik kültür kapları kullanılabilir. İmmunohistokimya, fotoğraflama veya elektron mikroskopi amacıyla kullanılacaklarsa cam tabanlı kaplar veya lameller kullanılabilir. Kullanılacak kültür kapları hücrelerin yapışmalarını kolaylaştırmak için genellikle protein yapısında bazı maddelerle kaplanır. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanları fibronektin, laminin ve kollajendir. Bazı kültürlerde bu iş için kültür kapları bir tabaka halinde hücre ile kaplanır, sonra bunun üzerine esas kültürü yapılacak olan hücreler ekilir (örneğin glia hücre tabakası üzerine nöronların ekilmesi) (Alberts, 1994).

Ekilen hücrelerin kültür ortamında yaşamlarını devam ettirmelerinde en önemli ve en karmaşık faktörlerden biri kültür vasatıdır. Kültür vasatındaki besin maddelerinin yanında sıcaklık, nem, pH, osmolarite, oksijen ve karbondioksit konsantrasyonları, büyüme faktörleri gibi koşullar da önemlidir. Sıcaklık genellikle hücrenin alındığı

ortamdaki sıcaklığa yakın bir değerdir. Soğukkanlı hayvanlardan alınan hücreler 18-25 °C’de inkübe edilirken memeli hayvanlardan alınan hücreler genellikle 36-37 °C’de inkübe edilirler. Kültürdeki besin maddelerini temel olarak; aminoasitler, vitaminler, mineraller ve karbonhidratlar oluşturur. Bunlar hücrelerin büyüme ve fonksiyonları için gerekli protein ve diğer yapısal elemanların yapımında ve metabolizmanın devam ettirilebilmesi için gerekli enerjinin sağlanmasında kullanılırlar. Büyüme faktörleri ve hormonlar hücrelerin büyüme hızlarını ve işlevsel özelliklerini belirlerler ve genellikle kültür vasatına farklı hayvanlardan veya insanlardan elde edilmiş olan %5-20’lik serum olarak katılırlar. Hücre kültürlerinde kullanılan serumun içerisindeki faktörlerin tip ve miktarlarının kullanılan serumlar arasında farklılıklar göstermesi nedeniyle, sıklıkla serum yerine tanımlanmış büyüme faktörleri kullanılmaktadır. Kültür vasatları hazır sıvılar şeklinde satın alınabileceği gibi kuru toz maddeler halinde alınıp laboratuvarlarda hazırlanabilir. Hazır vasatların ömrü genellikle kısa olmaktadır. Bu yüzden genellikle vasat içerikleri ayrı ayrı hazır satın alınıp, kullanılacakları zaman kültür vasatı laboratuvarında hazırlanabilir. Kültür vasatlarının kültürdeki hücreleri pH değişikliklerine karşı koruyan tampon özellikleri de vardır. Hücre içi ve dışı pH, hücrelerde iyon dengesinin sağlanmasının yanında hücre enzimlerinin optimal fonksiyon yapmaları ve hormon ve büyüme faktörlerinin reseptörlerine bağlanmasını için de önemlidir. pH’da oluşacak kısa süreli değişiklikler bile hücrelerin apoptoz ile ölümlerine yol açabilir. Ortam pH’sını hücre tipine göre 7.0-7.4 arasında tutmak için genellikle korbondioksit-bikarbonat tabanlı tamponlar veya HEPES gibi organik tamponlar kullanılır. Korbondioksit-bikarbonat tabanlı tamponların kullanıldığı durumlarda vasat içerisinde çözünen korbondioksiti ayarlamak için korbondioksit kontrollü etüvlere ihtiyaç vardır. Bu etüvlerde genellikle %5 CO₂ - %95 hava gaz karışımı hava kullanılarak istenilen pH ve oksijen basıncı elde edilebilmektedir. Kültür vasatının osmolaritesinin de pek çok maddenin hücre içi ve dışında hareketini etkilediği için kontrol edilmesi gerekmektedir. Osmolarite genellikle vasata ilave edilen tuz ve glukoz ile ayarlanır. Çoğu ticari kültür vasatı yaklaşık 300 mOsm olacak şekilde ayarlanmıştır. Kültür vasatının osmolaritesi osmometre adı verilen aletlerle ölçülmektedir. Kültür vasatının buharlaşmasıyla azalması sonucu osmolarite artarak hücrelerin hasarlanmasına neden olabilir. Buharlaşmanın engellenebilmesi için

genellikle ortam neminin de ayarlanabildiği inkübatörler kullanılmaktadır (Alberts, 1994).

Kültürlerde ekim yapılmadan önce genellikle hücre sayısı, yoğunluğu, ölü-canlı oranları belirlenir. Toplam ve canlı hücre sayısını belirlemek için hemositometre kullanılmaktadır. Bu işlemde örnek alınıp sulandırıldıktan sonra hemositometre lamında hücreler sayılarak milimetreküpteki hücre sayısı hesaplanır. Canlı hücreleri belirleme yöntemleri bazı boya ile ölü hücrelerin boyanırken canlı hücrelerin boyanmaması temeline dayanır. Böylece ölü ve canlı hücrelerin oranı bulunur. Tripan mavisi canlı hücreleri belirlemek için yararlanılan bu boyalardan biridir. Membran bütünlüğü korunmuş canlı hücreler boyayı almazlar. Ölü-canlı hücrelerin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri de ölü hücre membranlarından geçerek çekirdeği boyayan ve florasan bir madde olan propidium iyodürdür (Marther, 1998).

2.2. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri hücrelerin bölünmesini, farklılaşmasını ve pek çok metabolik işlevlerini etkileyen polipeptid yapıda ve suda eriyebilir maddelerdir. Büyüme faktörleri çeşitli doku ve hücrelerden salınırlar ve sistemik dolaşımda bulunurlar. Etkileri sistemik olmakla birlikte salındıkları bölgelerde otokrin ve parakrin olarak da etki gösterebilirler (Tauber ve Tauber, 1987). Büyüme faktörleri yapılarındaki nükleotid ve amino asit benzerliklerine göre üst ailelere ayrılmışlardır (Mercola ve Stiles, 1988). Bu üst aileler ve bu ailelere ait büyüme faktörleri Tablo 1’de verilmiştir.

Büyüme faktörlerinin bir kısmı sinir hücrelerinin gelişimi, farklılaşması, akson ve dendritlerinin belirmesi, hedef innervasyonu, işlevsel sinaps oluşumu ve nöronların hayatta kalması ve ölümünde belirleyici roller oynamaktadırlar. ‘Nörotrofik faktörler’ veya ‘sinir büyüme faktörleri’ adı verilen bu faktörlerin başlıcaları: nörotrofinler ailesine ait; sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), nörotrofin-3 (NT-3) ve nörotrofin-4/5 (NT-4/5) olup diğer ailelere ait Glial hücre kökenli sinir büyüme faktörü (GDNF), Silier nörotrofik faktör (CNTF), asidik fibroblast

büyüme faktörü (aFGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), Lösemi inhibe edici faktör (LIF) ve İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) gibi bazı büyüme faktörlerinin de sinir sisteminin gelişmesi ve fonksiyonunda önemli etkileri vardır. Nörotrofinler, diğer büyüme faktörlerine göre daha yaygın olarak merkezi ve periferik sinir sisteminin bütün sinir hücre tiplerinde bulunmaktadır (Gun-Moore ve Tavare, 1998).

Tablo 1. Yapılarındaki nükleotid ve amino asit benzerliklerine göre sınıflandırılmış büyüme faktörleri.

<p>Nörotrofinler Sinir büyüme faktörü (NGF) Beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) Nörotrofin-3 Nörotrofin-4/5</p>
<p>Glia hücrelerinden kaynaklanan nörotrofik faktörler Glial hücre kökenli sinir büyüme faktörü (GDNF) Nörturin Persefin Artemin</p>
<p>Sitokinler Silier nörotrofik faktör (CNTF) Lösemi inhibe edici faktör (LIF) İnterlökinler</p>
<p>Epidermal büyüme faktörleri Epidermal büyüme faktörü (EGF) Dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGFβ) Nöregulinler</p>
<p>Mezodermal kökenli büyüme faktörleri Asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF) Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)</p>
<p>İnsülin benzeri büyüme faktörleri İnsülin İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) İnsülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2)</p>

Nörotrofik faktörler, nöronlarda, kas, bağ doku, deri ve bez hücrelerinde sentezlenirler. Nöronlarda sentez sonrası bu faktörler gövde, dentrit, akson ve akson terminali gibi pek çok yerden salgınabilir. Bu yüzden tek bir nöron pek çok nörona, glia hücrelerine, kas ve bez gibi hedef dokulara nörotrofik faktörleri verebilir (Lessmann ve ark., 2003).

Nörotrofik faktörlerin önemli bir kısmını oluşturan nörotrofinler iki tip membran reseptörüne bağlanarak etkilerini gösterirler. Birinci tip reseptörler nörotrofinlere yüksek affiniteyle bağlanan ve üç alt tipi olan tirozin kinaz (trk) reseptörleridir. NGF trkA'ya, BDNF ve NT-4/5 trkB'ye, NT-3 ise trkC'ye bağlanır. NT-3 düşük affinite ile trkA ve trkC'ye de bağlanabilir. Nörotrofik faktörler ile trk reseptörleri arasında az da olsa çapraz etkileşim vardır. Nörotrofinlerin bağlandığı diğer tip reseptör bütün nörotrofinlere daha düşük affiniteyle bağlanan p75'dir. Trk reseptörleri akson büyümesi, nöronların sağkalımları ve hücre çoğalması gibi trofik etkilerde doğrudan rol alırken, p75 reseptörleri trk reseptörleri üzerinde düzenleyici rolleri vardır (Kaplan ve Miller, 2000).

NGF, embriyolojik gelişme sırasında sempatik nöronların ve duyu nöronlarının hayatta kalmasında çok önemli rollerinin yanısıra, yaralanmalardan sonra rejenerasyon sürecinde aksonların doğru hedeflerini bulmasında da önemli görevler üstlenirler. BDNF daha çok merkezi sinir siteminde yaygın olup; motor, duyu ve sempatik sinir gelişiminde önemlidir. Sinir hücrelerini koruyucu etkisi iyi bilinmektedir ve bu özelliğiyle Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda tedavi edici potansiyeli bulunmaktadır. NT-3 VE NT-4/5 çeşitli nöron tiplerinden rejenerasyonu teşvik ederler (Lessmann ve ark, 2003).

Epidermal büyüme faktörleri epitelyal ve fibroblastik hücrelerde çoğalmaya yol açan mitojenik etkiye sahiptirler. Merkezi sinir sistemi nöronlarında büyüme, farklılaşma ve nöron hasarlarından sonra sağkalım üzerine etkileri vardır. TGF ile birlikte sinir sistemi tümörlerinin gelişimi dejeneratif hastalıklarda rolleri bildirilmiştir (Plata-Salamán, 1991). Kültürlerde serebral kortikal ve serebellar nöronların sağkalım

oranlarını artırdığı ve nörit uzatmalarını teşvik ettikleri gösterilmiştir (Yamada ve ark., 1996).

Mezoderm kökenli büyüme faktörlerinden PDGF'nin fibroblastlar, glial hücreler, arteriyel duvar düz kas ve endotel hücreleri üzerinde mitojenik etkileri vardır. Daha çok otokrin bir etkiyle inflamatuvar reaksiyonlarda ve yara iyileşmesinde rol oynarlar. Merkezi ve periferik sinir sisteminin çoğu glia ve sinir hücrelerinde PDGF ve reseptörleri ifade edilir. Sinaptik iletideki modülatör etkilerinin yanında özellikle glial hücrelerin proliferasyonu, göçü ve farklılaşmasında önemli rolleri vardır (Valenzuela ve ark., 1997).

FGF vücutta oldukça yaygındır, tanımlanmış 23 alt tipi beyinde ve diğer bütün orgalarda bulunur. Başlıca mitojenik, kemotaktik, angiogenezisi ve farklılaşmayı artırıcı etkileri vardır. bFGF'in serebral iskemiden sonra nöron sağkalımını, akson rejenerasyonunu ve damarlaşmayı artırıcı etkileri vardır (Kawamata ve ark., 1997).

GDNF özellikle ortabeyin nöronlarının gelişimi için önemli olup, motor, duyuşal ve sempatik nöronların yaşamları için de önemlidir. Yokluğunda enterik nöronların ve böbreklerin gelişiminde de bozukluklar olmaktadır (Moore ve ark., 1996).

İGF'lerin insülin ile yakın yapısal benzerlikleri vardır. Hücre proliferasyonunu uyarırlar. IGF'lerin düşük konsantrasyonları in-vitro duyuşal, sempatik ve motor nöronların sağkalımlarını destekler (Recio-Pintove ark., 1986).

Sitokinlerden interlökinler daha çok lökositlerin üretim ve başkalaşımını uyarırlar. LIF embriyoda nöron gelişiminde rol oynar. Sinir yaralanmalarında retrograde olarak taşınarak bazı nöropeptidlerin salgılanmasını uyarır. Bazı nöronların hayatta kalmasını ve rejenerasyonunu destekler. CNTF silier gangliondan izole edilmiştir. LIF'e benzer etkileri vardır (Zigmond ve ark., 1996).

Gelişen aksonlar hedefe ulaşırken uzun mesafeler kat ederler. Uzaktaki hedeflerine ulaşırken hem ara hem de hedef alanlarında sağlanan büyüme ipuçlarına yanıt verirler. Distal aksonlarda başlatılan nörotrofin sinyalleme, distal akson uzamasını desteklemek için hem gerekli hem de yeterlidir. Gelişen aksonlarda başlatılan nörotrofin

sinyal olayları, hücre ölümünü engellemek için nöronal hücre gövdelerini retrograd olarak sinyal gönderir. Bu sinyal olayları hücrenin yaşamını sürdürmesinde, akson büyümesinde, sinaptogenezde, metabolizmada, nörotransmitter ve nöropeptit fenotiplerinde bulunan transkripsiyonel olaylarını etkiler. Hemen hemen bütün nöronlar için presinaptik eşlerle fonksiyonel bağlantıların sağlanması amacıyla dentritlerin oluşması gerekir. Çoğu durumda dentritler, aksonlar hedef alanlarına innervasyona uğramadan önce uzarlar. Ancak bazı çalışmalar faktörlerin PSS içindeki dentritlerin büyüme ve muhafaza edilmesini kontrol ettiğini göstermiştir. Retrograd nörotrofin sinyali nörotransmitter ve nöropeptidlerin gen ifadesini de düzenlerler. Böylece nöronlar kendilerine mahsus fenotipik özellikleri kazanırlar. Bu, embriyonik hayatta olduğu kadar yetişkin canlılarda da geçerlidir. (Zweifel ve ark., 2005).

2.3. İmmunohistokimya

İmmunohistokimya, işaretlenmiş antikolar kullanılarak hücre ve dokuda antijenlerin bulunduğu yerlerin gösterilmesini sağlayan bir yöntemdir. İlk kez 1941 de A.H.Cons'ca uygulandı. Bir antikoru flüoresan veya başka bir boya ile boyayarak doku kesitlerinde antijenin varolduğu yerler dolayısı ile antijenik fenotip belirlenebilmektedir. Bu yöntem antijene karşı spesifik olarak antikor oluşması ve antijen ile antikorun birleşmesine dayanır. Bu özel bağlantıdan dokuda yer alan antijenlerin, bunlara özel antikolar üretilmesi ile immunohistokimyasal yöntemler geliştirilmiştir.

Organizmaya yabancı olan ve kendisine karşı bir bağışık cevap oluşturan maddeye antijen veya immunojen denir. Bir antijen doku üzerindeki protein, karbonhidrat veya lipid molekülü olabilir. Bir veya daha fazla antikor bağlayıcı bölge içerir.

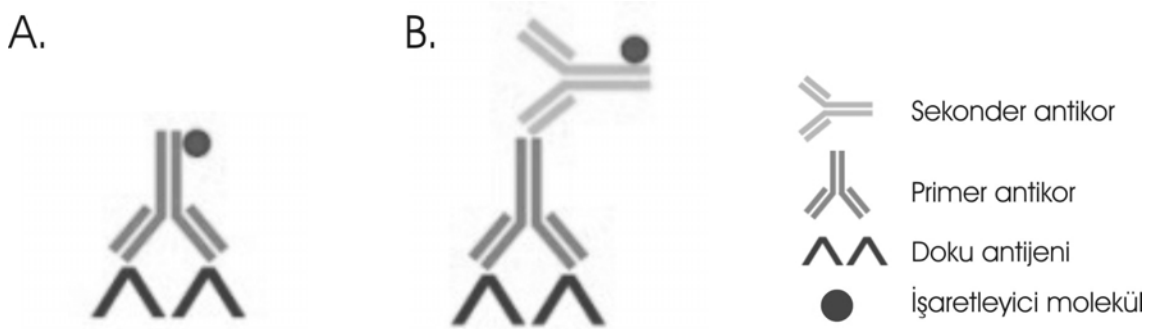
Antikor immunoglobulin olarak bilinen serum proteindir. Humoral immun sistemde B lenfositlerinin farklılaşması ile oluşan plazma hücrelerinden salgılanan immunoglobulinler IgG, IgA, IgM, IgE ve IgD olmak üzere 5 tiptir. En sık kullanılan tip IgG'dir. Bu farklılık ağır zincirlerinin değişikliğinden kaynaklanır.

Antikolar poliklonal ve monoklonal olmak üzere iki tiptir. Poliklonal antikolar bir hayvanın ilgili protein molekülü ile immunize edilmesi sonucu oluşan antikordardır. Antijenik uyarımla beraber farklılaşan plazma hücre klonlarının oluşturduğu farklı özellikteki antikoların tümüdür. Monoklonal antikolarda ise geliştirilen hibridoma tekniği ile saf antikor üretilmesi amaçlanmış ve sağlanmıştır.

1941 ve 1950 yıllarında Albert H. Coons ve arkadaşları tarafından ilk kez bir antikoru flüoresan bir boya ile işaretleyerek doku kesitlerine uygulanması ile başlayan immunohistokimyasal boyama tekniği, bu ilk boyanmalardan sonra çok sayıda antikor üretimi sonucunda teknik ileri derecede genişlemiş ve gelişmiştir. Sadece farklı antikor üretmenin yanı sıra, farklı işaretçilerde kullanılarak immunohistokimyanın, hem ışık, hem flüoresan hem de elektron mikroskop ile değerlendirilmesi sağlanmıştır. Rutin

olarak parafine gömülü kesitler üzerinde çalışılan immunohistokimya, aynı zamanda dondurup-kırma (frozen) kesitlerde kullanılabilirdiği gibi, sadece tespit edilmiş kültür hücrelerinde de çalışılabilmektedir. (Gartner ve Hiatt, 1997).

İmmunoflöresan işaretleme gerek ışık gerekse elektron mikroskopide doğrudan (tek aşamalı) veya dolaylı (iki aşamalı) olmak üzere iki şekilde uygulanmaktadır.



Şekil 1. İmmunoflöresan işaretlemenin tek aşamalı (A) ve iki aşamalı (B) uygulanışı. Key'den değiştirilerek alınmıştır (2006).

Tek aşamalı yöntemde; antikor, flöresan boya veya enzim ve altın tanecikleri gibi diğer işaretleyiciler ile işaretlenmiş olarak bulunur ve doğrudan kesitler üzerine uygulanır (Şekil 1A). İki aşamalı yöntemde öncelikle antijene özel birincil antikor kesit üzerine uygulanır. Böylece 1. aşamada, işaretlenmiş primer antikor antijene bağlanır. Daha sonra oluşan antijen-antikor kompleksinin görünür hale gelebilmesi için işaretlenmiş ikinci antikor uygulanır. İşaretleyici olarak biotin, hidrojen peroksidaz, alkalen fosfataz, glukoz oksidaz ve flöresan işaretleyiciler kullanılabilir (Şekil 1B) (Key, 2006).

Hücre kültür ortamında üretilen hücrelerde hem immunoperoksidaz hem de immunofloresan yöntemi kullanılarak immunoreaktivite saptanabilir. Ayrıca hem tek aşamalı hem de iki aşamalı yöntem kullanılabilir, ancak en sık kullanılan yöntem iki aşamalı yöntemdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Genç erişkin (6-8 haftalık) Balb/C fareler Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edildi. Hayvanlar standart fare kafeslerinde oda ısısında sürekli yem ve su ile barındırıldı. Tıp Fakültesi Etik Kurulu izni alındı. Hayvanların en az acı çekmesi için gerekli bütün önlemler alındı.

3.2. Hücre Kültürü Hazırlanması

Kültür hazırlanmasında temel olarak Brewer'in (1997) metodu bazı değişiklikler yapılarak kullanıldı. Deney hayvanları intraperitoneal olarak enjekte edilen ketamin (100 mg/kg, Ketalar, Pfizer) ile anestezisi edildi. Fareleri ağrı testi uygulanarak anestezinin tam gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi. Ağrıya cevap oluşmadığında diseksiyon işlemini başlandı. Fare önce diseksiyon tahtasına sabitlendi. Diseksiyon mikroskobunun ışık kaynağı altında orbital yaklaşımla kafatası açıldı ve beyinleri B27, NeurobasalA, antibiyotik ve glutamin içeren 2 ml soğuk kültür vasatı içersine alındı (kültür vasatının detaylı bileşimi aşağıda verilmiştir). Beyin soğutmali tabla üzerine alındıktan sonra operasyon mikroskopu altında medial vestibüler çekirdekler iki taraflı olarak diseksiyonla çıkartıldı. Çıkartılan vestibüler çekirdekler bir ependorf tüp içersinde hazırlanmış olan papain enzim solüsyonuna (6 U/ml, NBA içinde hazırlanmış) kondu. Bu enzim solüsyonu içinde 4 °C'de 30 dak inkübe edildi. İnkübasyonun ardından hücreler mekanik tritürasyonla ayrıştırıldı. Mekanik tritürasyon için sırasıyla mavi ve sarı mikropipet uçları ve insülin enjektörü kullanıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu DNase (100 mikrogram/ml) içeren vasat içersinde 15 dakika süreyle 50 Hz vibrasyonlu ajitatörde tutuldu. Nöronları glia hücrelerinden ve artıklardan ayırmak için hücre süspansiyonuna perkol gradyanı uygulandı. Perkol gradyanı herbirinden 1 ml olmak üzere NeurobasalA içersinde %60, 30, 20 ve 10'luk perkolden hazırlandı. Hücre süspansiyonu bu perkol gradyanının üzerine ilave edildi ve 4 °C'de, 5000 devir/dakika'da 25 dakika süreyle santrifüj edildi. %30'luk bant seviyesinden 1 ml hücre süspansiyonu alındı ve 5 ml kültür vasatı ile sulandırıldı. Hücre süspansiyonu

4°C’de, 2000 devir/dakika’da 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak 200 mikrolitre hücre süspansiyonu elde edildi.

3.3. Hücrelerin Ekilmesi

Hücreler daha önceden %10’luk poli-L-lizin (Sigma, P4707) ile kaplanmış olan dört kuyulu petrilere ekildi. Her bir kuyuya 50 mikrolitre hücre süspansiyonu konuldu ve kültür vasatı ile 400 mikrolitreye tamamlandı. Poli-L-lizin 2 saat süreyle oda ısısında petrilere bekletilerek kaplandı. Distile su ile yıkandıktan sonra 1 saat kurumaya bırakıldı. Bu kaplama işlemleri ekimden hemen önce uygulandı. Ekimden sonra petrilere 1 saat süreyle etüvde %5 CO₂ ve 37 °C’de inkübe edildi. Bu süre sonunda yapışmayan hücreler ve istenmeyen kalıntıların uzaklaştırılması için kültür vasatı değiştirildi. Elektrofizyoloji yapılacak deneyler için ise 35 mm’lik plastik petrilere ekim yapıldı. Bu petrilere de önceden poli-L-lizin ile kaplandı ve ekimden sonra kültür vasatı 1500 mikrolitreye tamamlandı.

3.4. Kültür Vasatı

Kültür vasatı NeurobasalA içerisinde şu bileşenler ile hazırlandı: 2 mM GlutaMaxI (Gibco), 100 ünite/ml penisilin, 100 mikrogram/ml streptomisin ve %2 B27 (NBA-B27) (Gibco). Hücre sağkalım oranlarına etkilerini araştırmak için bazı deneylerde kültür vasatına aşağıdaki madde ve faktörler (hepsi Sigma’dan) ilave edildi: fetal dana serumu (FCS) (%10 ve %20), sinir büyüme faktörü (NGF) (50 ng/ml), beyin-kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF) (50 ng/ml), nörotrofin-3 (NT3) (50 ng/ml), lösemi inhibe edici faktör (LIF) (10 ng/ml), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) (5 ng/ml), epidermal büyüme faktörü (EGF) (20 ng/ml), insulin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) (50 ng/ml).

3.5. İmmünohistokimya ve Canlılık Testleri

İmmünohistokimya deneyleri için hücreler önceden poli-L-lizin ile kaplanmış 15 mm çaplı yuvarlak lamellere ekildi. Kültürün ikinci gününde hücreler poliklonal glial

fibriler asidik protein (GFAP), monoklonal fosforillenmiş nöroflament NF200 (NE14), nörotrofin reseptörlerinden poliklonal trkA (NGF-R için), monoklonal trkB (BDNF-R ve NT4/5 için) ve poliklonal trkC (NT3 için) primer antikorları kullanılarak immünohistokimyasal işleme tabi tutuldu (Tablo 2). Özet olarak, hücreler PBS içerisinde taze olarak hazırlanmış ve soğutulmuş (4°C) %4'lük paraformaldehit ile 30 dakika tespit edildi. Kültürler PBS ile yıkandı ve 30 dakika blok solüsyonunda (PBS içerisinde: BSA %3, Triton X %0.3, Na-azide %0.01) bekletildi. Bir gece 4°C'de 1:100 oranında sulandırılmış primer antikorlar ile inkübe edildi ve 3 kez 5 ml PBS ile yıkandı. Florasan florokrom konjüge edilmiş sekonder antikorlar (Tablo 3) 3-4 saat uygulandı ve kültürler yine 3 kez 5 ml PBS ile yıkandı. Özel bir solüsyon ile (Slow Fade Light Antifade Kit, Mol. Probes, S-7461) kapatma işleminin ardından hücreler konfokal mikroskop (Zeiss LSM 510 Meta) ile görüntülendi.

Tablo 2. İmmünohistokimyasal işaretlemede kullanılan primer antikorlar.

Antikor adı	Özellik	Elde Yeri	Hangi türe karşı	Mono /poli klonal	Katalog No	Üretici Firma /yer
GFAP	Glial Fibriler Asidik Protein	Fare	İnsan	M	GF-2	Dako
Ne14	Fosforile Nöroflament High (200 kD)	Fare	Domuz	M	Ne5389	Sigma
Trk A	NGF Reseptör	Tavşan	Rekombinant	P	06-574	Ubstate
Trk B	BDNF Reseptör, NT 4-5	Fare	Sıçan	M	610102	Becton-Dickinson
Trk C	NT 3	Keçi	Fare	P	07-226	Ubstate

Tablo 3. İmmünohistokimyasal işaretlemede kullanılan sekonder antikorlar.

Antikor adı	Elde Yeri	Hangi türe karşı	Uyarılma (nm)	Katalog No	Üretici Firma /yer
Alexa fluor 488	Keçi	Fare IgG	488	A11001	Invitrogen
Alexa fluor 488	Keçi	Tavşan IgG	568	A11008	Invitrogen
Alexa Fluor 568	Keçi	Fare IgG	568	A11004	Invitrogen
Alexa Fluor 568	Keçi	Tavşan IgG	568	A11011	Invitrogen
Alexa Fluor 633	Tavşan	Keçi IgG	633	A21086	Invitrogen

Kültürlerde canlılık testi için 10 mikromolar florasın propidyum iyodür boyası kullanıldı. Hücrelerin ekilmesinden hemen sonra, 24, 48 ve 72 saat sonra florasın mikroskopta ölü ve canlı hücreler sayılarak hücre sağ kalım oranları hesaplandı.

3.6. Nöron Morfolojisinin Değerlendirilmesi ve İstatistik Analizler

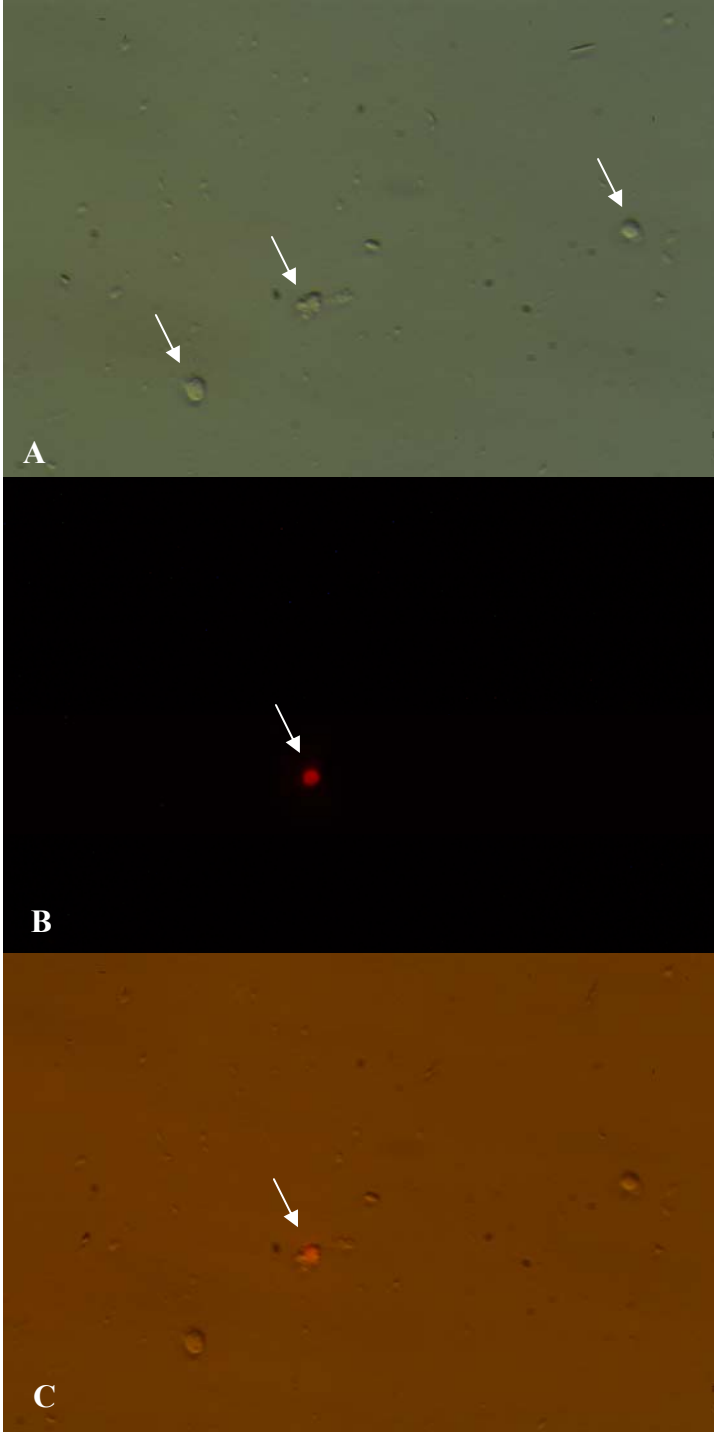
Kültürü yapılan hücrelerin ve uzantılarının boyutları ve morfolojileri alınan dijital görüntüler üzerinde Axiovision 3.0 yazılımı ile gerçekleştirildi. Hücre sağ kalım oranlarının karşılaştırılması ve serumun nörit uzatmaya olan etkilerinin istatistiksel analizleri SigmaStat (Systat Software Inc, USA) istatistik programı kullanılarak Ki-kare testi ile yapıldı. Veriler ortalama \pm SD (Standart sapma) olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1 Kùltürde Nöronların Morfolojik ve Fenotipik Özellikleri

Enzimatik ve mekanik izolasyonla 1 mg vestibüler çekirdek dokusundan yaklaşık 680 sinir hücresi elde edildi. Elde edilen hücre süspansiyonu yoğunluğu 9190 hücre/ml idi. Buna göre petrilere ekilen hücrelerin ekim yoğunluğu 11.6 hücre/mm² idi. Ekim yoğunluğunun düşük olması nedeniyle nöronlar genelde birbirlerinden ayrı ayrı bulunmaktaydı ve glia hücreleriyle temas halinde değillerdi. Ekimin hemen sonrasında canlılık testleri yapıldı. Ölü hücrelerin çekirdekleri boyayı alarak florasan mikroskopta kırmızı olarak göründü (Şekil 2). Ekim sonrasında canlı olan hücrelerin oranı %93 idi. Bu oran bir saat sonra yapılan yıkama işleminden sonra da aynıydı. Ekilen hücrelerin %81'i petri tabanına yapışırken %19'u kültür vasatının değıştirilmesi sırasında kayboldu.

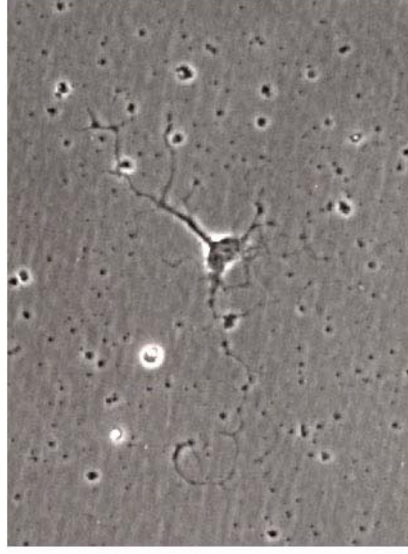
Hücreler ekildiklerinde kùltürlerde küresel şekildehydiler ve uzantıları yoktu. Ekimden kısa bir süre sonra (3-5 saat) nöritler uzamaya başladı. Kùltürün 48. saatinde hücre gövdeleri büyüklükleri ve nöritlerin uzunlukları Axiovision3 yazılımı ile ölçüldü. Hücreler multipolar özellikte olup, somadan çıkan primer nörit sayısı bir nöron için ortalama 6.8 ± 2.3 (n=53) idi. Yuvarlak veya üçgen şeklinde olan multipolar nöronların en küçükleri 12.5 en büyükleri ise 22.5 mikrometre çapındaydı (ortalama nöron çapı 16.6 ± 1.9 mikrometre). Hücrelerden çıkan 107 mikrometre kadar uzunlukta nöritler vardı (ortalama nörit uzunluğu 37.4 ± 11.9 mikrometre) (Şekil 3). Nörit uzama hızı saatte 0.8 mikrometre idi. Kùltür periyodu süresince glia hücreleri çok azdı. Kùltürdeki hücreler sinir büyüme faktörü reseptörlerinden trkB için negatif iken pek çoğu trkA ve trkC için pozitif (Şekil 4).



Şekil 2. Vestibüler nöron kültüründe propidium iyodür ile ölü-canlılık testi. Propidium iyodür 10 mikromolar konsantrasyonda kültüre konur ve ölü nöronların çekirdeğine bağlanır. Işık mikroskopunda (A) görülen üç nörondan ölü olan bir tanesi florasan mikroskopta kırmızı ışığa vermekte (B, ok). C’de ise iki görüntü üstüste verilmiştir.



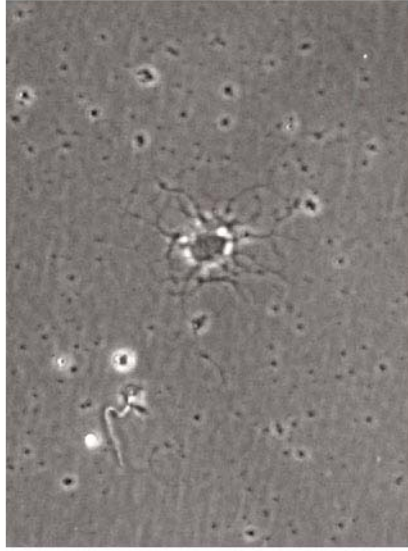
1 G



2 G



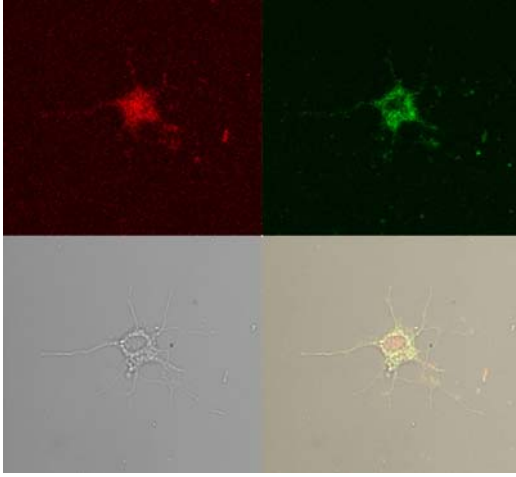
3 G



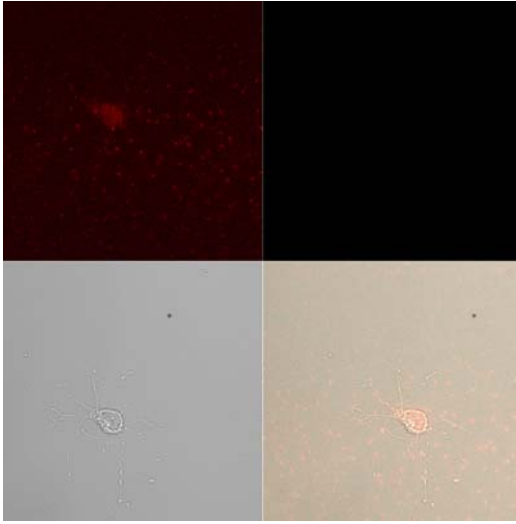
4 G

Şekil 3. İzole hücre kültüründe bir vestibüler nöronun dört günlük gelişimi.

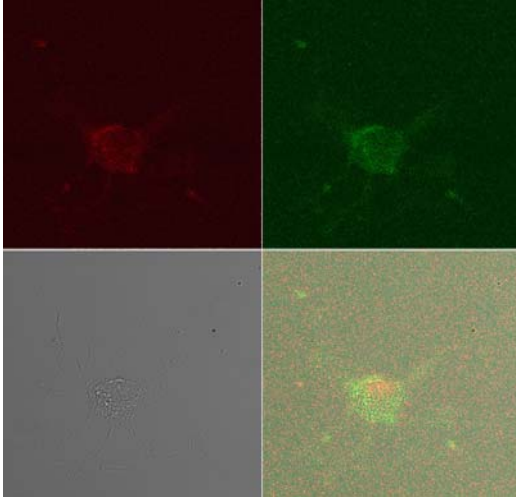
A.



B.



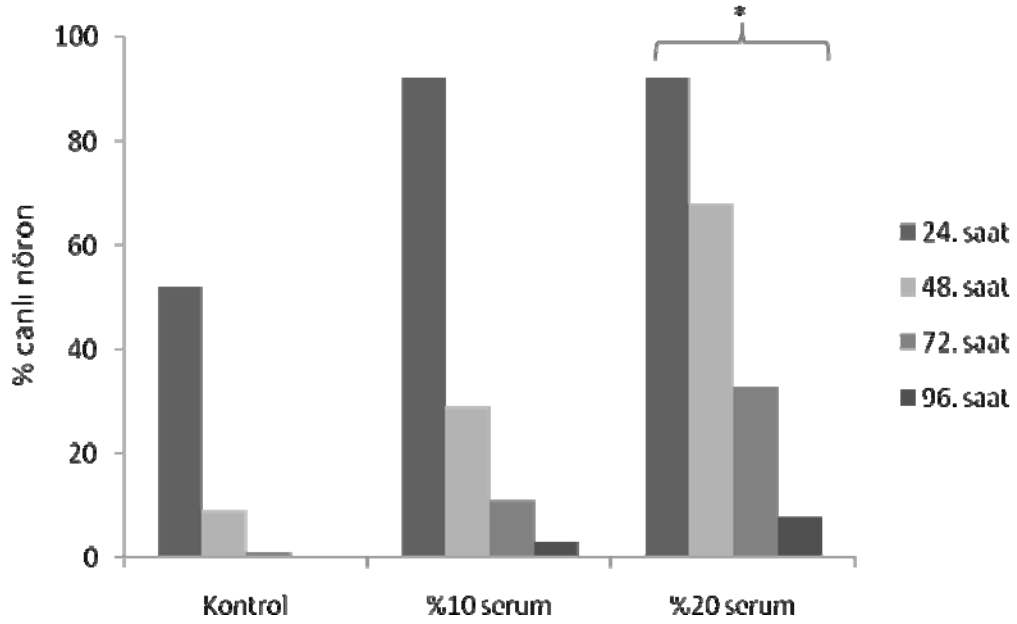
C.



Şekil 4. Büyüme faktörü reseptörlerinden trkA (A), trk B(B) ve trk C(C) immunohistokimyası. Medula vestibüler nöronların büyük kısmı trk A ve trk C için pozitif iken (A ve C) trk B pozitif nöron bulunmadı (B). Kırmızı renk nöron markırı olarak kullanılan NF200'ün varlığını gösteriyor. A ve C'de yeşil renk sırasıyla trkA ve trk C varlığını gösteriyor.

4.2. Serumun Kültürlerde Hücre Sağkalım Oranlarına Etkisi

Serumsuz kültür vasatında inkübe edilen kültürlerde nöronların sağkalım oranları 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sırasıyla %52, %9, %1 ve %0 idi. Kültür vasatına %10 serum ilave edilmesi nöronların sağkalım oranlarını serumsuz kültürlerle göre artırdı, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi; 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sağkalım oranları sırasıyla %92, %29, %11 ve %3 ($p=0.076$, Ki-kare testi) bulundu. Kültür vasatına %20 serum ilave edilmesi ise nöronların sağkalım oranlarını anlamlı şekilde artırarak hücre sağkalım oranları 24, 48, 72 ve 96. saatlerde sırasıyla %92, %68, %33 ve %8 bulundu ($p<0.01$, Ki-kare testi) (Şekil 5).



Şekil 5. Serumlu ve serumsuz vestibüler hücre kültürlerinde canlılık oranları. Kültür vasatına %20'lik FCS ilave edilmesi nöronların sağkalım oranlarını serumsuz kültürlerle göre anlamlı oranda artırmıştır ($*p<0.01$, Ki-kare testi). Kültür vasatına %10'lik FCS ilave edilmesi nöronların sağkalım oranlarını artırırsa da bu istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildi ($p=0.067$, Ki-kare testi).

Kültür vasatına serum ilave edilmesi nöronların sağkalım oranlarını artırmanın yanında nörit uzatan nöron sayısını da anlamlı oranda artırdı; serumsuz kültürlerde

nöronların %2'si nörit uzatırken; vasata %20 serum ilave edilen kültürlerde nöronların %8'i nörit uzattı ($p<0.05$, Ki-kare testi).

4.3. Büyüme Faktörlerinin Kültürlerde Hücre Sağkalım Oranlarına Etkisi

Büyüme faktörlerinden NGF ve IGF-1 nöronların sağkalım oranlarını hiçbir faktör katılmamış olan kontrol kültürlerine göre anlamlı oranlarda artırdı. NGF katılmış kültürlerde nöronların sağkalım oranları kültürün 24, 48, 72 ve 96. saatlerinde sırasıyla %68, %34, %13 ve %3 olarak bulundu ($p<0.01$, Ki-kare testi). IGF-1 katılmış kültürlerde ise sağkalım oranları kültürün 24, 48 ve 72. saatlerinde sırasıyla %66, %29 ve %5 olarak bulundu ($p<0.05$, Ki-kare testi). Büyüme faktörlerinden LIF, BDNF, NT3, FGF ve EGF kültürlerde nöronların sağkalım oranlarını anlamlı bir şekilde etkilemedi. BDNF katılmış kültürlerde kültürün 24, 48 ve 72. saatlerinde nöronların sağkalım oranları sırasıyla %64, %13 ve %3; NT3 katılmış kültürlerde kültürün 24, 48 ve 72. saatlerinde nöronların sağkalım oranları sırasıyla %45, %11 ve %1; LIF katılmış kültürlerde kültürün 24, 48 ve 72. saatlerinde nöronların sağkalım oranları sırasıyla %42, %11 ve %2; FGF %60, %16 ve %3; EGF katılmış kültürlerde kültürün 24, 48 ve 72. saatlerinde nöronların sağkalım oranları sırasıyla %60, %13 ve %2 olarak bulundu. ($p>0.05$, Ki-kare testi) (Tablo 4).

Tablo 4. Serumsuz vestibüler hücre kültürlerinde canlılık oranları ve kültürlere sinir büyüme faktörlerinin katılmasının canlılık oranlarına etkileri.

	% canlı hücre oranı							
	Serumsuz kültür vasatı	NGF katılmış kültür vasatı	BDNF katılmış kültür vasatı	IGF-1 katılmış kültür vasatı	LIF katılmış kültür vasatı	NT3 katılmış kültür vasatı	EGF katılmış kültür vasatı	FGF katılmış kültür vasatı
24. saat	52	68	64	66	42	45	60	60
48. saat	9	34	13	29	11	11	13	16
72. saat	1	13	3	5	2	1	2	3
96. saat	0	3	0	0	0	0	0	0
Ki-kare testi		p<0.01	p=0.705	P<0.05	p=0.554	p=0.780	p=0.818	p=0.472

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Erişkin Vestibüler Nöron Kültürlerinde Sağkalım ve Nörit Rejenerasyonu

Nöronlar izolasyon sırasında bütün uzantılarını kaybetmelerine rağmen, kültüre konulduktan 3-4 saat gibi kısa bir süre sonra uzantıları rejenere olmaya başladı. Ekim sırasında yuvarlak ve uzantıları olmayan hücreler kültürün ikinci gününde yuvarlak, oval veya üçgen şeklinde, 12-22 mikrometre çapında ve multipolar özellikteydi. Medial vestibüler çekirdek hücrelerinin izole kültürlerdeki bu morfolojik özellikleri daha önce beyin kesitlerinde bildirilen özelliklerine benzerlikler gösterdi (Johnston ve ark., 1996, Holstein ve ark., 1999). Nöritler 0.8 mm/saat hızda rejenere oldular ve bazıları 107 mikrometre kadar uzama gösterdiler. Vestibüler nöronların primer nörit sayısı bir nöron için ortalama 6.8 ± 2.3 iken ortalama nörit uzunluğu ise 37.4 ± 11.9 mikrometreydi. Rejenere olan nöritlerin uzunlukları diğer merkezi sinir sistemi izole kültürlerinde elde edilen değerlere yakın bulundu; Brewer'in (1997) hipokampal nöron kültürlerinde kültürün 4. gününde nöronlardan ortalama 3.8 primer nörit çıkarken nöritlerin uzunlukları 74 mikrometre kadardı.

Merkezi sinir sistemine ait nöronların kültürlerde bu kadar hızlı rejenere olması kültür ortamının nöronların yaşam ve fonksiyonları için uygun olduğunun bir göstergesidir. Kullanılan kültür vasatı nöronların sadece yaşamlarının devam ettirilmesini sağlamamış bunun yanında bütün uzantılarını kaybederek mekanik ve metabolik hasara uğrayan erişkin vestibüler nöronların diğer bazı merkezi sinir sistemi nöronlarında olduğu gibi (hipokampal, serebral korteks nöronları) uygun ortam olduğunda rejenere olabildiklerini göstermiştir.

Bu çalışmada vestibüler nöronların glia hücrelerinden ayrılıp daha saf olarak kültüre ekilmesi için perkol gradyanı kullanıldı. Kültürlerde glia hücreleri oranının %10'u geçmemesi yapılan uygulamanın başarılı olduğunu göstermektedir. Perkol gradyanı ile nöronların sağkalımları ve nörit rejenerasyonuna olumsuz etkileri olan doku kalıntıları da büyük ölçüde uzaklaştırılarak daha temiz kültürler elde edildi. Kültürlerde glia varlığı nöronların fonksiyonlarını etkileyebileceği ve araştırılacak

kimyasal ajanların nöronların yanında glia hücrelerini de etkileyebileceği için, özellikle glia hücrelerinin fonksiyonları çalışılmıyacaksa kültürlerde glia varlığı istenilmez. Nöron kültürü yapımında önceleri nöronlar bir glia tabakası üzerine ekilirken (Huettner ve Baughman, 1986) bugün artık perkol gradyanı uygun kültür vasatlarının kullanılmasıyla glia tabakasına gerek olmadığı gibi glia hücrelerinin varlığı minimuma indirilebilmektedir. Bazı çalışmalarda glia hücreleri oranı %5'e kadar düşürülebilmektedir (Juurlink ve ark., 1990). Bizim yaptığımız kültürlerde de glia oranının az olması ve daha az yoğunlukta ekim yapılması nedeniyle nöronlar genellikle birbirilerinden ayrı bulunmaktaydılar ve glia hücreleriyle temas halinde değillerdi.

Vestibüler çekirdeklerin küçük olması nedeniyle her bir fareden elde edilen doku miktarı (4.5 ± 0.2 mg) ve dolayısıyla sinir hücresi sayısı da azdı. Bu nedenle ekim yoğunluğu da (11.6 hücre/ mm^2) oldukça düşük oldu. Merkezi sinir sisteminin diğer bölgelerinden yapılan izole hücre kültürlerinde daha fazla doku kullanılabilirdi için genelde daha yoğun ekimler yapılabilmektedir. Hipokampal nöronlar kültürlerine 150 hücre/ mm^2 yoğunlukta ekim yapıldığında Brewer (1997) hücreleri üç haftadan fazla yaşatabilmiştir. Benzer şekilde, kortikospinal traktus nöronları 350 hücre/ mm^2 yoğunlukta ekildiklerinde bir haftadan daha uzun süreyle kültür ortamında canlılıklarını devam ettirebilmişlerdir (Alexanian, 2001). Ekim yoğunlukları nöronların kültürlerde sağkalım oranları üzerinde etkili olabilir. Bizim yaptığımız kültürlerde kültürün 96. saatinde sağkalım oranları %8 iken daha yoğun ekim yapılan koklear çekirdek kültürlerinde (307 hücre/ mm^2 , Fitzakerley ve ark., 1997) 7. günde bu orana yakın bir sağkalım elde edilmiştir. Fitzakerley ve ark. (1997) optimal belirledikleri yoğunluğun üzerinde ve altında yapılan ekimlerde sağkalım oranlarının azaldığını gösterdiler. Eğer fare vestibüler hücre kültürleri de birkaç hayvandan alınıp farklı yoğunluklarda ekimler denenebilirse sağkalım sürelerini uzatmak mümkün olabilir. Nöronların sağkalım oranları ve sürelerini etkileyen önemli faktörlerden biri de kültür vasatına katılan serum ve büyüme faktörleridir. Kültüre katılan %20'lik fetal dana serumu vestibüler nöronların sağkalım oranlarını ve sürelerini anlamlı derecede artırmıştır.

5.2. Serum, NGF ve IGF-1 Kùltürdeki Vestibùler Çekirdek Nùronlarını Destekledi

Kùltür vasatına serum ilavesi nùronların sağkalım oranlarını artırmıştır. Yüzde 20'lik FCS ilave edilmesi %10'lik FCS' ye oranla nùronların sağkalım oranlarını artırmada daha etkiliydi. Serumun kùltür ortamında sinir hücrelerine olan trofik etkileri bilinmektedir. Bu etkiler serumun içersinde bulunabilen pek çok çeşitli büyüme faktöründen kaynaklanıyor olabilir. Ancak serumun içeriği ve trofik etkinin tam olarak bunlardan hangisinin etkisiyle ortaya çıktığını belirlemek güçtür. Hücre kùltürü çalışmalarında ortamın kontrol edilebilmesi ve deneylerin aynı şartlarda tekrar edilebilirliği en büyük avantajdır ve bu nedenle serum gibi içersinde bilinmeyen bazı faktörlerin bulunduğu vasatlar pek tercih edilmezler. Daha çok serumun yerine geçebilecek ve nùron sağkalımı için gerekli temel maddelerin olduğu ve içeriği tam olarak bilinen vasatlar (NeurobasalA gibi) ve bunlara ilave edilen yeterli trofik etkiyi sağlayabilecek büyüme faktörleri kullanılır (Bjare, 1992). Biz de burada burada trofik etkileri olduğu bilinen başlıca büyüme faktörlerinin vestibùler nùron kùltürlerinde sağkalım oranlarına etkilerinin olup olmadıklarını araştırdık.

NGF ve IGF-1 merkezi ve periferik sinir sistemi hücre kùltürlerinde sıkça kullanılan büyüme faktörlerindedir ancak farklı nùron tiplerinin farklı faktörlerden yaşamsal destek alabildiği de bilinmektedir (Ang ve ark., 1993; Thoenen ve ark., 1993; Zhang ve ark., 1993; Yin ve ark., 1994; Luo ve ark., 1997; Silva ve ark., 2000; Kimpinski ve Mearow, 2001; Salie ve Steeves, 2005). Biz bu çalışmamızda pek çok farklı faktörün bu açıdan etkinliğini test ettik. Vestibùler çekirdekten fenotipik olarak çok sayıda trkA immünoreaktif hücrenin izole edilmesi bu reseptörün ligandı olan NGF'nin hücrelerin yaşama oranını artırması ile uyumluydu. Daha önce vestibùler çekirdeklerde trkA ve IGF2R (IGF reseptörü) pozitif hücrelerin varlığı başkaları tarafından gösterilmiş olup, bizim bulgularımız bunlarla tutarlıdır (Sobreviela ve ark., 1994; Nagano ve ark., 1995).

NGF ve IGF-1'in dışında test edilen sinir büyüme faktörleri ise vestibùler çekirdek hücrelerinin kùltürlerdeki sağkalım oranlarına olumlu etkiler göstermediler.

Bunlardan BDNF'in etkili olmaması bu nöronlarda kültürlerde BDNF'in reseptörü olan trkB'nin gösterilememesi ile uyumluydu. Ancak vestibüler nöron kültürlerinde varlığını gösterdiğimiz trkC reseptörleri aracılığıyla etki eden NT-3 faktörü de nöron sağkalımı üzerine etkisizdi. Etili olarak bulunmayan diğer faktörlerden LIF, EGF ve FGF'in reseptörlerinin vestibüler çekirdek nöronlarında varlığı konusunda ise yeterli bilgiler bulunmamaktadır.

Bazı büyüme faktörlerinin kültürlerde nöron sağkalımı ve nörit uzatmaya etilerinin gösterilememesi bu faktörlerin tek başlarına kullanılmasına bağlı olabilmektedir. Bazı sinir büyüme faktörleri birlikte uygulandıklarında tek başlarına uygulandıklarında ortaya çıkmayan etkileri görülebilmektedir. Örneğin motor nöronlarda BDNF, FGF ve CNTF tek başlarına yeterli trofik etki sağlamayıp, ancak birlikte uygulandıklarında nöronlara yeterli desteği sağladıkları gösterilmiştir (Nishi, 1994). İleriki çalışmalarda vestibüler nöronlar üzerine de yukarıda denenen sinir büyüme faktörleri kombine edilerek de sağkalım oranlarına ve nörit uzamaya olan etkilerinin araştırılması faydalı olacaktır.

Sonuç olarak, bu çalışma ile erişkin medial vestibüler çekirdek nöronlarının izole kültürleri ilk defa yapıldı. Dört güne kadar kültürlerde canlı tutulan vestibüler nöronların bazı fenotipik özellikleri tanımlandı ve bu izole kültürlerin fizyolojik, toksikolojik, farmakolojik ve patofizyolojik çalışmalarda kullanılabilmesi sağlanmış oldu. Örneğin bu kültür sistemini kullanarak nöron uzantılarına laser ile hasar yapılarak nörit dejenerasyonunu zaman-aralıklı mikroskopi kullanarak direk olarak gözlemlenebilir, nörit dejenerasyonu mekanizması incelenebilir, dejenerasyon hızı ve miktarını azaltabilecek, rejenerasyonu destekleyebilecek kimyasal ajanlar test edilebilir.

İzole vestibüler kültürlerdeki nöronların kullandıkları nörotransmitterler, membran reseptörleri ve yanıtları gibi diğer fizyolojik özellikleri de immunohistokimyasal ve elektrofizyolojik yöntemlerle tanımlanabilir. In vivo nöronlara daha yakın özelliklere sahip olabilmeleri için vestibüler nöron kültürü protokolünde bazı değişiklikler öngörülebilir; örneğin izolasyon sırasındaki enzimatik uygulama süresi kısaltılarak iyon kanalı proteinlerinin parçalanması azaltılabilir, serum ile birlikte

büyüme faktörleri kombine edilerek nöron sağkalım süreleri uzatılarak nöronlara kaybetikleri membran proteinlerinin yerine konması için zaman kazandırılabilir.

Burada tarif edilen izole nöron kültürlerinde vestibüler sistem ile ilgili patofizyolojik çalışmalar ve hücre seviyesinde nöronal dejenerasyon ve rejenerasyonun mekanizmaları ile ilgili çalışmalar yapılması mümkün olabilecektir.

ÖZET

Altuntaş S, Gündüz Ç, Erişkin fare medial vestibüler çekirdek hücrelerinin izolasyonu ve kültürünün hazırlanması. Y.Y.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Van, 2008. Merkezi sinir sistemi nöronlarının özelliklerinin incelenmesi için izole hücre kültürlerinin kullanımı sundukları avantajlardan dolayı son yıllarda giderek artmaktadır. Bu proje ile vestibüler sistem patolojilerinin ileri yaşlarda daha çok görülmelerinden dolayı özellikle erişkin farelerden medial vestibüler çekirdek nöronlarının izole hücre kültürlerinin hazırlanması ve bu kültürlerde vestibüler nöronların morfolojik özelliklerinin tanımlanması amaçlandı. Vestibüler çekirdek nöronlarının izole hücre kültürleri daha önce yapılmamış olup bu proje kapsamında ilk olarak gerçekleştirildi. Vestibüler nöronlar kültürde rejenerasyon göstererek nöritler uzattılar ve in vivo özelliklerine benzer morfolojilerini kazanıp fetal dana serumu ilave edilmiş kültürlerde dört güne kadar canlılıklarını sürdürdüler. Geliştirilen bu metod sayesinde vestibüler sistem ile ilgili fizyolojik, toksikolojik, farmakolojik ve patofizyolojik çalışmalar yapılabilir, nöron ölümleri ve akson dejenerasyonu mekanizmaları incelenebilir, dejenerasyon hızı ve miktarını azaltabilecek, rejenerasyonu destekleyebilecek kimyasal ajanlar test edilebilir.

Anahtar sözcükler: Vestibüler çekirdek, izole hücre kültürü, büyüme faktörleri.

SUMMARY

Altuntaş S, Isolation and culture of adult mouse medial vestibular nucleus neurons. University of Yuzuncu Yil University, Institute of Health Sciences, Master Thesis in Department of Physiology, Van, 2008. There has been an increase in the use of isolated cell cultures to study the properties of central nervous system neurons due to their advantages. The aim of this project is to prepare vestibular nucleus isolated cell cultures from adult mice especially because vestibular pathologies are more common in the older ages and to describe the morphological properties of vestibular neurons in culture. Isolated cell cultures of vestibular nucleus neurons has not been performed before and first described in this study. The vestibular neurons showed regeneration and grew neurites in cultures gaining some adult-like morphological properties and stay alive up to four days in fetal calf serum supplemented medium. Using this method of adult neuronal cultures physiological, toxicological, pharmacological and pathophysiological studies of vestibular system can be performed, mechanisms of neuronal death and axon degeneration can be studied, and chemical substances that could reduce the amount and rate of degeneration and promote regeneration can be tested.

Key words: Vestibular nucleus, isolated cell culture, growth factors.

KAYNAKLAR

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robersts K, Walter P (1994) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York.
- Alexanian AR, Nornes HO (2001) Proliferation and regeneration of retrogradely labeled adult rat corticospinal neurons in culture. *Exp Neurol* 170:277-282.
- Ang LC, Bhaumick B, Juurlink BH (1993) Neurite promoting activity of insulin, insulin-like growth factor I and nerve growth factor on spinal motoneurons is astrocyte dependent. *Brain research* 74:83-88
- Babalian A, Vibert N, Assie G, Serafin M, Muhlethaler M, Vidal PP (1997) Central vestibular networks in the guinea-pig: functional characterization in the isolated whole brain in vitro. *Neuroscience* 81:405-426
- Bjare U (1992) Serum-free cell culture. *Pharmacology & Therapeutics* 53:355-374
- Brewer GJ (1997) Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience methods* 71:143-155
- Brewer GJ (1998) Age-related toxicity to lactate, glutamate, and beta-amyloid in cultured adult neurons. *Neurobiology of aging* 19:561-568
- Brewer GJ, Reichensperger JD, Brinton RD (2006) Prevention of age-related dysregulation of calcium dynamics by estrogen in neurons. *Neurobiology of aging* 27:306-317
- Brewer GJ, Torricelli JR, Evege EK, Price PJ (1993) Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *Journal of neuroscience research* 35:567-576
- Chabbert C, Chambard JM, Valmier J, Sans A, Desmadryl G (1997) Voltage-activated sodium currents in acutely isolated mouse vestibular ganglion neurones. *Neuroreport* 8:1253-1256
- Dutia MB, Johnston AR (1998) Development of action potentials and apamin-sensitive after-potentials in mouse vestibular nucleus neurones. *Exp Brain Res* 118:148-154
- Eide L, McMurray CT (2005) Culture of adult mouse neurons. *Biotechniques* 38:99-104
- Fitzakerley JL, Schaefer KL, Kitko RA, Manis PB (1997) Properties of cochlear nucleus neurons in primary culture. *Hearing research* 114:148-168
- Gartner LP, Hiatt JL (1997) *Color Textbook of Histology*. WB Saunders Co, Pennsylvania

- Genlain M, Nonclercq D, Laurent G, Toubreau G, Godaux E, Ris L (2003) Properties of neurons from the rat medial vestibular nucleus in microexplant culture. *Neurosci Lett* 338:45-48.
- Goslin K, Banker G (1989) Experimental observations on the development of polarity by hippocampal neurons in culture. *J Cell Biol* 108:1507-1516
- Gunn-Moore FJ, Tavaré JM (1998) Progress toward understanding the molecular mechanisms of neurotrophic factor signalling. *Cellular signalling* 10:151-157
- Him A, Dutia MB (2001) Intrinsic excitability changes in vestibular nucleus neurons after unilateral deafferentation. *Brain Res* 908:58-66.
- Holstein GR, Martinelli GP, Cohen B (1999) The ultrastructure of GABA-immunoreactive vestibular commissural neurons related to velocity storage in the monkey. *Neuroscience* 93:171-181
- Huettner J, Baughman R (1986) Primary culture of identified neurons from the visual cortex of postnatal rats. *J Neurosci* 6:3044-3060
- Johnston AR, Dutia MB (1996) Postnatal development of spontaneous tonic activity in mouse medial vestibular nucleus neurones. *Neurosci Lett* 219:17-20
- Kaneda M, Nakamura H, Akaike N (1988) Mechanical and enzymatic isolation of mammalian CNS neurons. *Neurosci Res* 5:299-315
- Kaplan DR, Miller FD (2000) Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Current opinion in neurobiology* 10:381-391
- Kawamata T, Speliotis EK, Finklestein SP (1997) The role of polypeptide growth factors in recovery from stroke. *Advances in neurology* 73:377-382
- Key M (2006) *Immunohistochemical Staining Methods*. Dako, California
- Kimpinski K, Mearow K (2001) Neurite growth promotion by nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 in cultured adult sensory neurons: role of phosphoinositide 3-kinase and mitogen activated protein kinase. *Journal of neuroscience research* 63:486-499
- Lefebvre PP, Van de Water TR, Represa J, Liu W, Bernd P, Modlin S, Moonen G, Mayer MB (1991) Temporal pattern of nerve growth factor (NGF) binding in vivo and the in vitro effects of NGF on cultures of developing auditory and vestibular neurons. *Acta oto-laryngologica* 111:304-311
- Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M (2003) Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Progress in neurobiology* 69:341-374

- Luo J, West JR, Pantazis NJ (1997) Nerve growth factor and basic fibroblast growth factor protect rat cerebellar granule cells in culture against ethanol-induced cell death. *Alcoholism, clinical and experimental research* 21:1108-1120
- Marther JP, Roberts PE (1998) *Introduction to cell and tissue culture*. Plenum Press, New York
- Mattson MP, Dou P, Kater SB (1988) Outgrowth-regulating actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci* 8:2087-2100
- Mercola M, Stiles CD (1988) Growth factor superfamilies and mammalian embryogenesis. *Development (Cambridge, England)* 102:451-460
- Moore MW, Klein RD, Farinas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K, Rosenthal A (1996) Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature* 382:76-79
- Nagano T, Sato M, Mori Y, Du Y, Takagi H, Tohyama M (1995) Regional distribution of messenger RNA encoding the insulin-like growth factor type 2 receptor in the rat lower brainstem. *Brain Res Mol Brain Res* 32:14-24
- Nishi R (1994) Neurotrophic factors: two are better than one. *Science (New York, NY)* 265:1052-1053
- Oriake N, Thrasivoulou C, Cowen T (2001) Serum-free culture of dissociated, purified adult and aged sympathetic neurons and quantitative assays of growth and survival. *Journal of neuroscience methods* 106:153-160
- Parihar MS, Brewer GJ (2007) Simultaneous age-related depolarization of mitochondrial membrane potential and increased mitochondrial reactive oxygen species production correlate with age-related glutamate excitotoxicity in rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research* 85:1018-1032
- Plata-Salaman CR (1991) Epidermal growth factor and the nervous system. *Peptides* 12:653-663
- Rabejac D, Devau G, Raymond J (1997) AMPA receptors in cultured vestibular ganglion neurons: detection and activation. *The European journal of neuroscience* 9:221-228
- Recio-Pinto E, Rechler MM, Ishii DN (1986) Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci* 6:1211-1219
- Salie R, Steeves JD (2005) IGF-1 and BDNF promote chick bulbospinal neurite outgrowth in vitro. *Int J Dev Neurosci* 23:587-598

- Sanford K, Earle W, Likely G (1948) The growth in vitro of single isolated tissue cells. *J Natl Cancer Inst* 9:229-246
- Sekirnjak C, du Lac S (2002) Intrinsic firing dynamics of vestibular nucleus neurons. *J Neurosci* 22:2083-2095
- Serafin M, de Waele C, Khateb A, Vidal PP, Muhlethaler M (1991) Medial vestibular nucleus in the guinea-pig. I. Intrinsic membrane properties in brainstem slices. *Exp Brain Res* 84:417-425
- Serafin M, de Waele C, Khateb A, Vidal PP, Muhlethaler M (1991) Medial vestibular nucleus in the guinea-pig. II. Ionic basis of the intrinsic membrane properties in brainstem slices. *Exp Brain Res* 84:426-433
- Silva A, Montague JR, Lopez TF, Mudd LM (2000) Growth factor effects on survival and development of calbindin immunopositive cultured septal neurons. *Brain research bulletin* 51:35-42
- Sobreviela T, Clary DO, Reichardt LF, Brandabur MM, Kordower JH, Mufson EJ (1994) TrkA-immunoreactive profiles in the central nervous system: colocalization with neurons containing p75 nerve growth factor receptor, choline acetyltransferase, and serotonin. *The Journal of comparative neurology* 350:587-611
- Tauber JP, Tauber MT (1987) Growth factors: general review. *International journal of radiation applications and instrumentation* 14:407-419
- Thoenen H, Hughes RA, Sendtner M (1993) Towards a comprehensive understanding of the trophic support of motoneurons. *Comptes rendus de l'Academie des sciences* 316:1158-1163
- Valenzuela CF, Kazlauskas A, Weiner JL (1997) Roles of platelet-derived growth factor in the developing and mature nervous systems. *Brain Res Brain Res Rev* 24:77-89
- Yamada M, Ikeuchi T, Hatanaka H (1997) The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. *Progress in neurobiology* 51:19-37
- Yin QW, Johnson J, Prevet D, Oppenheim RW (1994) Cell death of spinal motoneurons in the chick embryo following deafferentation: rescue effects of tissue extracts, soluble proteins, and neurotrophic agents. *J Neurosci* 14:7629-7640
- Zhang Y, Tatsuno T, Carney JM, Mattson MP (1993) Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:378-388

Zigmond RE, Hyatt-Sachs H, Mohny RP, Schreiber RC, Shadiack AM, Sun Y, Vaccariello SA (1996) Changes in neuropeptide phenotype after axotomy of adult peripheral neurons and the role of leukemia inhibitory factor. *Perspectives on developmental neurobiology* 4:75-90

Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD (2005) Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nature reviews* 6:615-625

ÖZGEÇMİŞ

Serap ALTUNTAŞ, 1982 yılında Isparta'nın Eğirdir İlçesi'nde doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Isparta'da tamamladı. 2004 yılında Niğde Üniversitesi Aksaray Sağlık Yüksek Okulu Sağlık Memurluğu Bölümü'nden mezun oldu. Bir süre Isparta'da özel bir hastanede çalıştı. 2005 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Bölümü'nde yüksek lisans eğitimine başladı. 2007 yılında Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde hemşire olarak göreve başladı. Evlidir ve halen aynı yerde göreve devam etmektedir.

EKLER



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU


ETİK KURUL KARARI

Toplantı Tarihi : 22.05.2006
Toplantı Yeri : Tıp Fakültesi Dekanlığı Toplantı Odası
Toplantı Sayısı : 2006/05
Karar Sayısı : 2006/05-04


Etik Kurulumuz; mevcut üyelerinin katılımı ile 22.05.2006 tarihinde yaptığı toplantıda, Dr.Aydın HİM'in Etik Kurul Başkanlığına verdiği "Erişkin fare medial vestibüler çekirdek hücrelerinin izolasyonu ve kültürünün hazırlanması" isimli projeye ait dosya ve eklerini incelemiş olup, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususları yerine getirmek, çalışma bitiminde çalışma ile ilgili raporun tanzim edilerek Etik Kurul Başkanlığımıza sunulması koşuluyla ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere, bu çalışmanın yapılmasında herhangi bir sakınca bulunmadığına, katılan tüm üyelerin oy birliği ile karar vermiştir.



Prof.Dr.Mustafa BERKTAŞ
Başkan

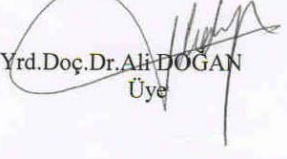

Doç.Dr.Mustafa KÖSEM
Üye


Doç.Dr.Hayrettin AKDENİZ
Üye


Doç.Dr.Ercan KIRIMI
Üye


Doç.Dr.Gürkan ÖZTÜRK
Üye


Yrd.Doç.Dr.Hanefi ÖZBEK
Üye


Yrd.Doç.Dr.Ali DOĞAN
Üye


Yrd.Doç.Dr.Lütfullah BEŞİROĞLU
Üye


Baş.Hem.Remziye Sen TANRITANIR
Üye