



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKSOLOTTA OMURİLİK HASARI SONRASI
REJENERASYONU SAĞLAYAN MOLEKÜLER
MEKANİZMALARIN PROTEOMİKS YÖNTEMLERİ İLE
TANIMLANMASI**

ECE CANA FESÇİOĞLU

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi TURAN DEMİRCAN

İSTANBUL-2018



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKSOLOTTA OMURİLİK HASARI SONRASI
REJENERASYONU SAĞLAYAN MOLEKÜLER
MEKANİZMALARIN PROTEOMİKS YÖNTEMLERİ İLE
TANIMLANMASI**

ECE CANA FESÇİOĞLU

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi TURAN DEMİRCAN

İSTANBUL-2018

TEŞEKKÜR

Danışmanım Dr. Turan Demircan'a yüksek lisans dönemim boyunca beni desteklediği, bana güvendiği, bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman benden esirgemediği için teşekkür ederim.

Tez çalışmama kattıkları yeni öneriler ve yaptıkları önemli eleştiriler için değerli hocalarım Doç. Dr Esra Çağavi, Dr.Öğr.Üyesi Nihal Karakaş'a ve Dr.Öğr.Üyesi Cüneyd Parlayan'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bana bilimsel anlamda katkı yapan çalışma ve dost canlısı bir ortam oluşturarak laboratuvar çalışmalarımı keyifli bir hale dönüştüren arkadaşlarım Sevilay Şahin, Gökçe İlayda Görgülü, Harbiye Hacıbektaşoğlu, Tuğçe Torun'a teşekkür ederim.

Pozitif enerji yayarak beni sürekli motive eden laboratuvar arkadaşım Berna Yıldırım'a teşekkür ederim.

Proteomiks çalışması boyunca benden yardımlarını esirgemeyen ve bilimsel katkılarından dolayı Orhan Çakan'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince de her türlü desteğini, katkısını zaman ve mekan ayırt etmeksizin esirgemeyen bebeklik arkadaşım Psk. Zeynep Haktanır'a teşekkür ederim.

Son olarak bana her zaman inanan, beni her zaman destekleyen ve her zaman arkamda olacaklarını bildiğim annem Ayda Dereli Tarım, babam Yavuz Tarım ve kardeşlerim Beste Vera Dereli, Batukan Tarım'a sonsuz kere teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
TABLolar LİSTESİ.....	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	viii
RESİMLER LİSTESİ.....	x
1.ÖZET.....	1
2.ABSTRACT	2
3.GİRİŞ VE AMAÇ	3
4.GENEL BİLGİLER.....	5
4.1.Rejenerasyon	5
4.2.Aksolot	8
4.2.1.Aksolot yaşam döngüsü ve anatomisi	9
4.2.2.Aksolot metamorfozu.....	10
4.2.3.Aksolot rejenerasyonu	14
4.2.3.1.Aksolot uzuv rejenerasyonu	14
4.2.3.2.Aksolot mekezi sinir sistemi ve periferel sinir sistemi rejenerasyonu.....	16
4.3.Omurilik ve Omurilik Hasarı	17
4.3.1.Omurilik anatomisi.....	17
4.3.2.Omurilik hasarı.....	18
4.3.3.1.Omurilik hasarında ikincil hasarın fizyolojisi.....	19
4.3.3.Urodele amfibilerde omurilik anatomisi, hasarı ve rejenerasyonu	23
4.4.Proteomiks.....	24
5.MATERYAL ve METOD.....	27
5.1.Aksolotların Bakımı ve Metamorfoza İndüklenmesi	27
5.1.1.Aksolotların bakımı.....	27
5.1.2.Aksolotların metamorfoza indüklenmesi	27

5.2.Biyolojik Örneklerin Hazırlanması	28
5.2.1.Neotenik aksolotlar için biyolojik örneklerin hazırlanması	28
5.2.2.Metamorfik aksolotlar için biyolojik örneklerin hazırlanması.....	29
5.3.Kullanılan Malzemeler	30
5.4.Aksolot Omurilik Hasarı Verilmesi ve Doku Örneklerinin Toplanması	31
5.4.1.Omurilik hasar modeli.....	31
5.4.2.Doku örneklerinin toplanması	32
5.4.3.Cerrahi operasyon sonrası refleks testleri	33
5.5.Toplanan Örneklerden RNA ve Protein İzolasyonu	34
5.5.1.Mekanik parçalama/doku lizisi	34
5.5.2.RNA izolasyonu	35
5.5.3. Agaroze Jel Elektrophorezi	35
5.5.4. Protein İzolasyonu.....	36
5.5.5.Qubit 3.0 Fluorometer ile protein konsantrasyonun ölçümü	37
5.6.Protein Kütüphanesinin Oluşturulması ve Protein Dizi Analizi	38
6.BULGULAR	41
6.1.Aksolotların metamorfoza indüklenmesi	41
6.2.Omurilik hasar modeli sonrası refleks testleri	42
6.3.Omurilik hasar modeli sonrası metamorfik aksolotlar	43
6.4.Omurilik hasar modeli sonrası omurilik rejenerasyonu	43
6.5.RNA konsantrasyonları	45
6.6.Agaroz jel elektrophorezi.....	46
6.7.Protein konsantrasyonları	46
6.8.Proteom dizi analizi.....	48
6.8.1.Venn diyagramları.....	48
6.8.2.Gen ontoloji analizi	51
6.8.3.STRING: Protein etkileşim ağı	56
7.TARTIŞMA	59
7.1.Aksolotların metamorfoza indüklenmesi	59

7.2.Omurilik hasar modeli sonrası refleks testleri	59
7.3.RNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi	61
7.4.Protein izolasyonu, protein kütüphanesinin oluşturulması ve protein dizi analizi.....	62
8.SONUÇ	68
9.KAYNAKLAR.....	69
10.ETİK KURUL ONAYI.....	74
11.ÖZGEÇMİŞ	76



TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 5.2.1. Neotenik aksolot için deney ve kontrol grubu dağılımı.....	28
Tablo 5.2.2. Metamorfik aksolotlar için deney ve kontrol grubu dağılımı.....	29
Tablo 5.3.1. Kullanılan kitlerin ve sarf malzemelerin listesi.....	30
Tablo 6.2. Neotenik ve metamorfik aksolot refleks yanıtları.....	42
Tablo 6.5. Neotenik ve metamorfik aksolot RNA konsantrasyonları.....	45
Tablo 6.7. Neotenik ve metamorfik aksolot protein konsantrasyonları.....	47

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1. Doku hasarına veya kaybına yanıt olarak verilen mekanizmalar.....	6
Şekil 4.2. 19 farklı türdeki 30 adet genin analizine dayanılarak oluşturulan 10 farklı semender ailesinin gösterildiği filogenetik ağaç.....	9
Şekil 4.1.1. Yetişkin lökistik aksolotun dış (üst) ve iç (alt) görünümünün karikatürü.....	10
Şekil 4.2.2. Xenopus'ta tiroid metabolizması.....	12
Şekil 4.3.1. Omurilik ve omurganın çapraz kesiti.....	17
Şekil 4.3.2.1. Memelilerde omurilik hasarının şematik gösterimi.....	22
Şekil 4.4. Proteomiks çalışmaları ve biyolojik uygulamaları.....	25
Şekil 5.4.1. Cerrahi operasyonlar.....	32
Şekil 6.6. TRIzol ile izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü.....	46
Şekil 6.8.1.1. TRIzol-FASP 120 dakika üç tekrarlı okuma sonuçları.....	48
Şekil 6.8.1.2 TRIzol-FASP 180 dakika üç tekrarlı okuma sonuçları.....	49
Şekil 6.8.1.3. FASP 180 dakika üç tekrarlı okuma sonuçları.....	50
Şekil 6.8.2.1. TRIzol-FASP 120 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre ayırım grafiği.....	51
Şekil 6.8.2.2. TRIzol-FASP 120 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin biyolojik işlevlerine ayırım grafiği.....	52
Şekil 6.8.2.3. TRIzol-FASP 120 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin hücresel bileşenlerine göre ayırım grafiği.....	52

Şekil 6.8.2.4. TRIzol-FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre ayırım grafiği.....	53
Şekil 6.8.2.5. TRIzol-FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin biyolojik işlevlerine ayırım grafiği.....	53
Şekil 6.8.2.6. TRIzol-FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin hücresel bileşenlerine göre ayırım grafiği.....	54
Şekil 6.8.2.7. FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre ayırım grafiği.....	54
Şekil 6.8.2.8. FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin biyolojik işlevlerine göre ayırım grafiği.....	55
Şekil 6.8.2.9. FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin hücresel bileşenlerine göre ayırım grafiği.....	55
Şekil 6.8.3.1. TRIzol-FASP 120 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin STRING: protein etkileşim analizi.....	56
Şekil 6.8.3.2. TRIzol-FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin STRING: Protein etkileşim analizi.....	57
Şekil 6.8.3.3. FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin STRING: Protein etkileşim analizi.....	58

RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.2.2. Aksolot metamorfozu.....	13
Resim 4.2.3.1. Metamorfozla beraber azalan rejenerasyon yeteneği.....	15
Resim 5.4.1. Aksolotta cerrahi operasyon ve örnek toplama.....	31
Resim 6.1. Aksolot metamorfozu.....	41
Resim 6.2. Aksolotta metamorfoz direnci.....	41
Resim 6.3. Metamorfik aksolotta omurilik hasarı sonrası görülen değişimler.....	43
Resim 6.4.1. Neotenik aksolotta hasar sonrası omurilik rejenerasyonu.....	44
Resim 6.4.2. Metamorfik aksolotta hasar sonrası omurilik rejenerasyonu.....	44

1.ÖZET

AKSOLOTTA OMURİLİK HASARI SONRASI REJENERASYONU SAĞLAYAN MOLEKÜLER MEKANİZMALARIN PROTEOMİKS YÖNTEMLERİ İLE TANIMLANMASI

Aksolot (*Ambystoma mexicanum*), amfibi sınıfı, semender grubuna mensup bir rejenerasyon kapasitesi son derece yüksek olan bir omurgalı canlı türüdür. Yenilenme ve doku tamir mekanizması hala tam olarak anlaşılmamakla birlikte, bir hasar durumunda uzuvlarını (ön ve arka ayaklarını), kuyruğunu, iç organlarını ve merkezi sinir sistemi organları olan beyin ile omuriliği yenileme yeteneğine sahiptir. Aksolotta ampute edilmiş bir organın tekrar oluşumunun başarılı olması rejenerasyona spesifik bir doku olan blastema dokusunun oluşmasıyla ilişkilidir. Aksolotların çok sayıda fonksiyonel ve yapısal protein ile sinyal yolağının memelilerle aynı olması aksolotlarla yapılan deneylerden elde edilecek bilgilerin memelilerde uygulanma potansiyelini artırmaktadır. Bu tez kapsamında omurilik hasarının sürecinde önemli roller oynayan mekanizmaların bulunabilmesi için neotenik ve metamorfik aksolotta omurilik hasarı sonrası farklı zaman aralıklarında (0.saat, 6.saat, 12.saat, 24.saat, 4.gün ve 7.gün) hasar bölgesinden blastema örnekleri alınmış, bu örneklerin proteomiks çalışmaları yapılarak, omurilik rejenerasyonunda rol oynayan proteinlerin tanımlanması amaçlanmıştır. Cerrahi operasyonlar sonrasında hem neotenik hem de metamorfik aksolotların omuriliklerini rejenere edebildiği görülmüştür. Metamorfik aksolotlarda cerrahi operasyon sonrası abdomen bölgesinde sıvı birikimi gözlemlenmesinin, metamorfozu ile beraber değiştiği düşünülen immün sistem ile ilişkili olabileceği öne sürülmüştür. Buna ek olarak yapılan proteom dizi analizlerinde TRIzol protein izolasyonunu takiben izlenen FASP örnek hazırlama protokolü arasındaki uyumsuzluk olduğu görülmüştür. TRIzol protein izolasyonunu takiben FASP protokolüne geçilmesi tanımlanabilecek protein sayısını düşürdüğü, FASP protkolü hem protein izolasyonu ve hem de örnek hazırlığı için tercih edildiğinde ise tanımlanan protein sayısının arttığı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Aksolot, rejenerasyon, omurilik hasarı, proteomiks

2.ABSTRACT

IDENTIFICATION OF MOLECULAR REGULATORS FOR REGENERATION USING PROTEOMICS APPROACHES

Among highly regenerative vertebrates amphibian axolotl (*Ambystoma mexicanum*), even though its regeneration and tissue repair mechanism is still not completely understood. Upon injury axolotls can regenerate its limb, tail, internal organs and central nervous system organs such as brain and spinal cord. Successful regeneration of the amputated organ is associated with the formation of blastema tissue, a tissue specific to regeneration. Since the axolotls share large number of functional and structural proteins and signaling pathways with mammals, it is possible to use the information we learn from studying this organism on mammals. In this thesis, in order to find the mechanisms that play important roles in the process of spinal cord regeneration, blastema tissue samples are collected at different time points (Hour 0, Hour 6, Hour 12, Hour 24, Day 4 and Day 7) from neotenic and metamorphic axolotl following spinal cord injury. Following the sample collection proteomics analysis of the samples were conducted. The aim of the proteomics analysis was to identify proteins that play a role in spinal cord regeneration. It has been shown that both neotenic and metamorphic axolotls were able to regenerate their spinal cord after spinal cord injury. The observation of fluid accumulation in the abdomen region of metamorphic axolotls after surgical operations may be related to the changes in the immune system due to metamorphosis. In addition, it was found that there was a discrepancy between the TRIzol protein isolation protocol and the FASP sample preparation protocol. Following the TRIzol protein isolation, it was observed that the transition to the FASP protocol decreased the number of proteins that could be identified, and the number of proteins defined could be increased when FASP was preferred for both protein isolation and sample preparation.

Keywords: Axolotl, regeneration, spinal cord injury, proteomics

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Omurilik hasarı sonrası, hasarlı bölgede bir dizi moleküler ve hücresel olaylar meydana gelmektedir. Omurilik yaralanması oluştuğunda, lezyon alanındaki birçok glial hücre hemen harekete geçerek farklı hücrelerle birlikte inflamatuvar yanıtları başlatmaktadır. Yaralanmaya ilk yanıtlardan biri, makrofajlar, nötrofiller ve lökositlerin olası enfeksiyonları önlemek için yaralanma bölgesine göç etmesidir. Oluşturulan inflamatuvar reaksiyon aksonal dejenerasyon ve demiyelinleşme süreçlerini hızlandırmaktadır. İnflamasyon reaksiyonundan sonra lezyon etrafında bir ödem oluşmakta ve astrositleri bu bölgeye doğru hareketi sonucunda lezyon bölgesinde glial yara izi oluşumu başlamaktadır. Bu hücreler kronik fazda daha büyük bir inflamatuvar reaksiyon oluşumunu teşvik ederek akson dejenerasyonu ve demiyelinizasyonuna sebep olmaktadır. Bunda salgıladıkları sinyalleşme proteinlerin, aksonal büyüme ve miyelin kılıf oluşumu için inhibitör bir etkiye sahip olması da rol oynamaktadır. Her ne kadar glial yara oluşumu hasarlı omuriliği korumak ve stabilize etmek için oluşturuluyor olsa da; bu yoğun yapısı ve yara bölgesinden yapılan salgılar nedeniyle omurilik fonksiyonel olarak iyileşememekte ve yenilenememektedir.

Aksolot (*Ambystoma mexicanum*), rejenerasyon yeteneği son derece yüksek bir amfibi türüdür. Bu canlı bir hasar durumunda uzuvlarını (ön ve arka ayaklarını), kuyruğunu, iç organlarını ve merkezi sinir sistemi organları olan beyin ile omuriliği yenileme yeteneğine sahiptir. Aksolotta doku onarımı bu sürece spesifik bir doku olan blastema dokusunun oluşmasıyla ilişkilidir. Blastema dokusu farklılaşmış hücrelerin (doku hücresi) farklılaşmamış hücrelere (kök hücre ve progenitor hücrelere) dönüşmesiyle oluşur. Böylelikle ampute edilen organ kök hücrelerin tekrar gerekli doku hücrelerine farklılaşmasıyla tam olarak rejenere edilebilir. Aksolotlardaki çok sayıda fonksiyonel ve yapısal protein ile sinyal yolağı memelilerle aynıdır. Bu durum aksolot rejenerasyon çalışmalarından elde edilecek bilgilerin, bu canlı rejeneratif sürecin anlaşılmasına imkan sağlamasının yanı sıra memelilerde hasar sonrası onarım sürecinde yaşanan problemlerin anlaşılması ve potansiyel rejeneratif terapi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

Bu tezle, omurilik hasarının iyileşmesi sürecinde önemli roller oynayan mekanizmaların bulunabilmesi için neotenik ve metamorfik aksolotta omurilik hasarı sonrası farklı zaman aralıklarında (0.saat, 6.saat, 12.saat, 24.saat, 4.gün ve 7.gün) hasar bölgesinden blastema örnekleri toplanıp, bu örneklerin proteomiks çalışmaları yaparak, omurilik rejenerasyonunda rol oynayan, neotenik ve metamorfik aksolot proteomunda farklılık gösteren proteinleri, bu proteinlerin görevlerini ve birbirleriyle olan ilişkilerini tanımlamayı amaçlamaktayız.



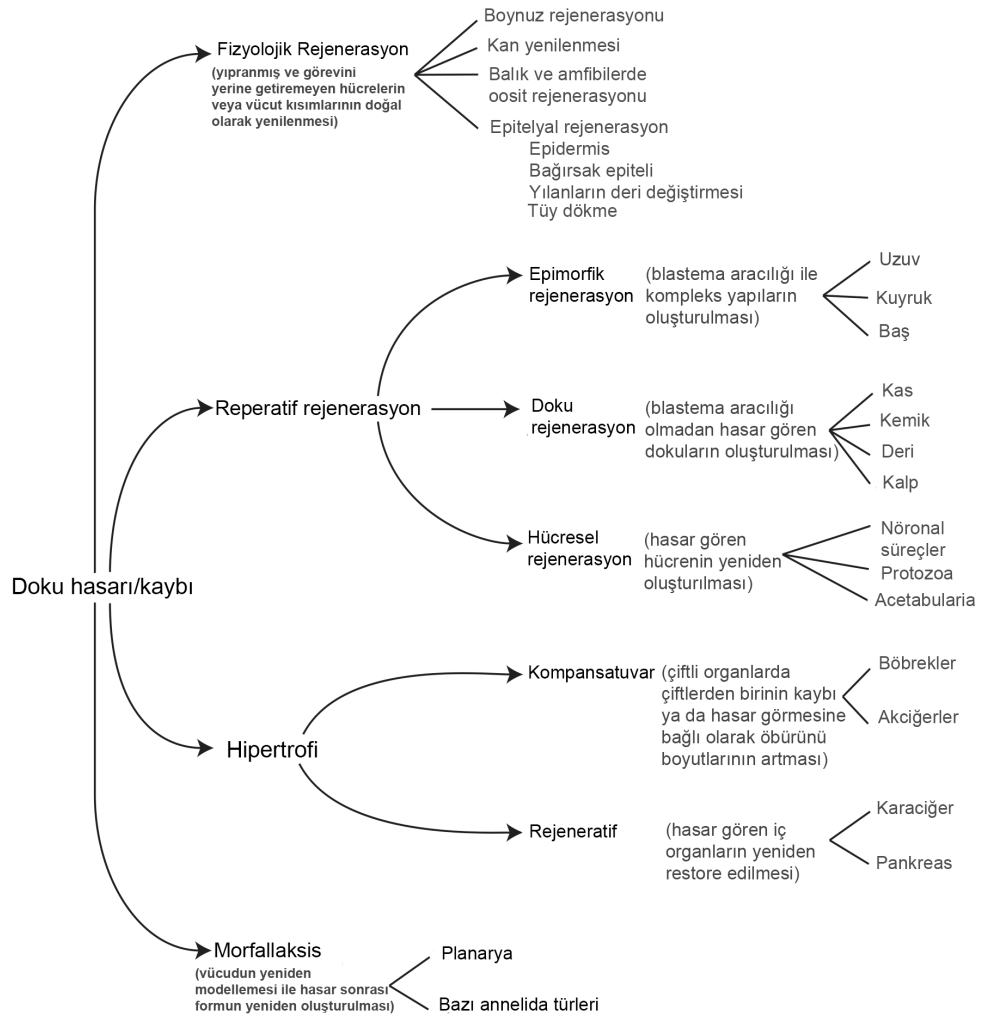
4.GENEL BİLGİLER

4.1.Rejenerasyon

Organizma hasar sonrası zarar gören dokularını yenileyebilmektedir fakat bu onarım yeteneği hem türler arasında hem de hasarın meydana geldiği dokuya bağlı olarak değişiklik göstermektedir (1-3) Rejenerasyon, organizmanın hasar sonrası zarar gören veya organizmanın kaybettiği hücre, doku ve organlarını, hiçbir fonksiyon kaybı olmadan yeniden oluşturabilme veya onarabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır (1). Rejenerasyon yeteneği yüksek canlılarda meydana gelen bir hasar sonrası tetiklenen doku onarım programı canlıya göre değişkenlik göstermektedir. Canlının rejeneratif yeteneğinden bağımsız bir şekilde tüm canlılarda hasara karşı verilen ilk yanıt yara iyileşmesidir. Yara iyileşmesinden sonra oluşan doku rejeneratif kapasiteye sahipse en az üç farklı program beraber ya da birbirinden bağımsız olacak şekilde dereye girmektedir. Bunlar; doku modellemesi, kök hücrelerin aktivasyonu ve proliferasyonu ve geri-farklılaşma veya trans-farklılaşmadır. Hasar sonrası uyarılan hücreler, kaderleri belirlendikten sonra bu yönde farklılaşmaya giderek yeni dokuyu oluşturmaktadır. Oluşan yeni doku hem fonksiyonel açıdan hem de boyutu bakımından dokunun geri kalanıyla uyumlu olmalıdır (3). Blastema, kayıp dokuyu oluşturacak farklılaşmamış hücrelerin oluşturduğu rejenerasyona özgü bir dokuya verilen isimdir. Blastemada bulunan farklılaşmamış hücreler yara bölgesinden köken alırlar. Yara bölgesindeki kök hücreler ve/veya bu bölgedeki somatik hücrelerin geri farklılaşmasıyla elde edilen kök ve öncü hücreler blastema hücre popülasyonunun oluşturmaktadır (4) . Yara yanıtı ve blastema oluşumunu takiben organizmanın, kayıp dokularını doğru hücre tipleri ve paterni ile yeniden oluşturması gerekmektedir. Rejenerasyonun düzgün bir şekilde gerçekleşebilmesi için hücreler doğru hücre tiplerine farklılaşarak kaybedilen gelişmiş yapıları oluşturmaktadır.

Rejenerasyon pek çok canlı türünde görülmesine karşın, organizmanın rejeneratif kapasitesine göre; hücre, doku, iç organlar, yapısal organlar ve tüm vücut rejenerasyonu olmak üzere farklı biyolojik seviyelerde gerçekleşmektedir (1). Rejenerasyonun en basit örneklerinden biri hasar gören sinir sistemindeki aksonal büyümedir. Bağırsak, karaciğer ve adrenal salgı bezleri gibi organlarda hücrelerinin proliferasyonu ile gerçekleşen rejenerasyon ise belirli bir organı oluşturan hücrelerin çoğalmasını gerektirdiği için daha kompleks bir süreçtir. Diğer doku ve organlardaki

rejenerasyon ise proliferasyon ve kök hücrelerin geri farklılaşması ile gerçekleşebilir (5). Organizmaların kullandığı rejenerasyon stratejilerini şu şekilde özetlemek mümkündür: önceden var olan dokunun yeniden düzenlenmesi, yetişkin somatik hücrelerinin kullanımı ve geri farklılaşma ve/veya trans farklılaşma (3). Organizmanın sahip olduğu rejenerasyon kapasitesine bağlı olarak kullandığı rejenerasyon stratejisi de değişkenlik göstermektedir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Doku hasarına veya kaybına yanıt olarak verilen mekanizmalar (6)

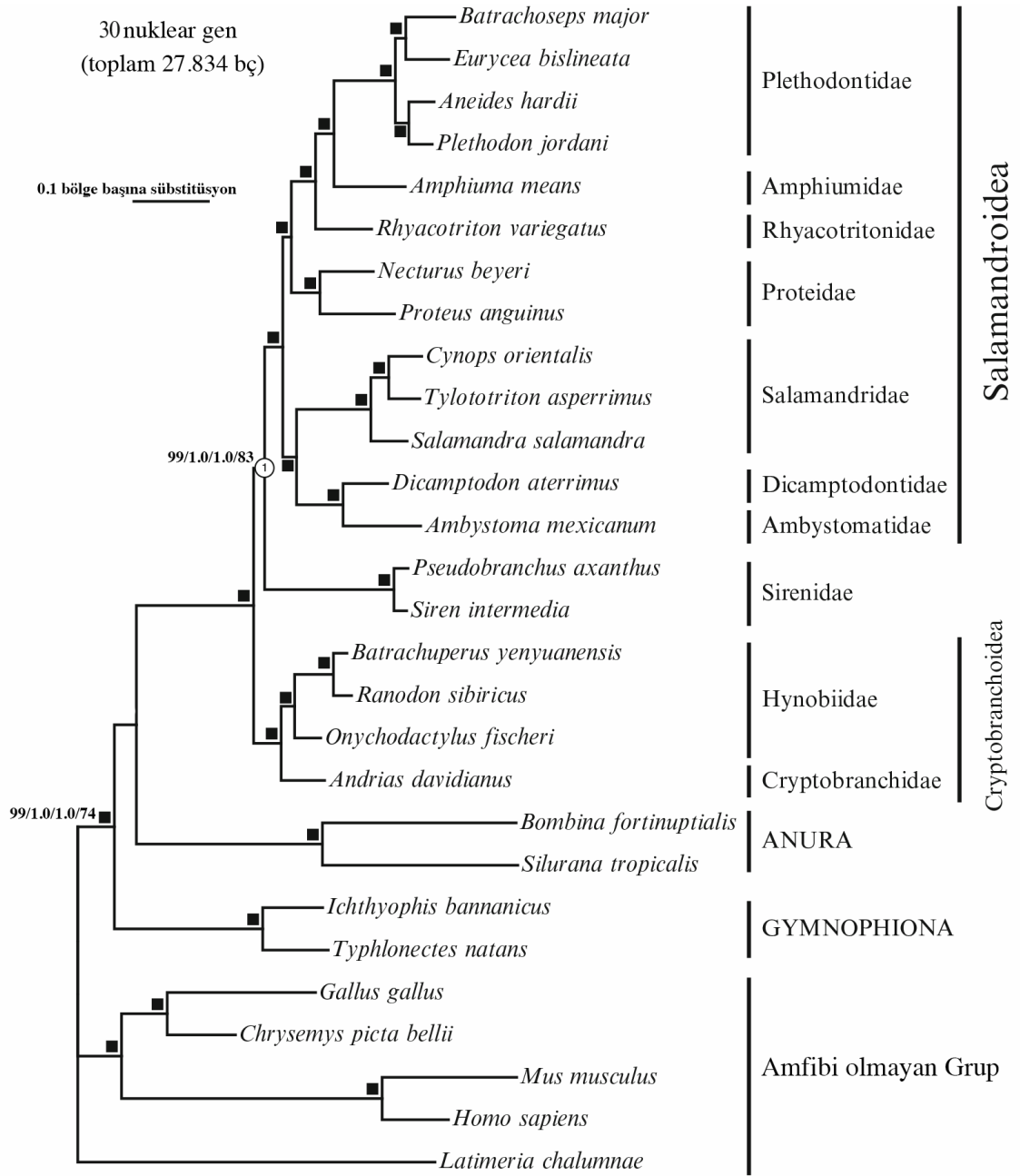
Omurgasız hayvanlarda görülen rejenerasyon yeteneği omurgalı hayvanlara kıyasla daha yüksektir. Planarya ve hidra gibi omurgasız canlılar kopan küçük vücut parçalarından yeni bir organizmayı meydana getirebilme yeteneğine sahipken omurgalılarda rejenerasyon yeteneği sınırlıdır ve rejenerasyon kapasitesi türler arasında değişiklik gösterir (5). Balıklar, zebra balığı başta olmak üzere, iyi bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Balık türlerinde bu kapasite değişkenlik göstermekle birlikte, yüzgeç (7, 8), omurilik ve beyin (3, 9), kalp (10-13) ve lens rejenerasyonu (3) balık türlerinde görülmektedir. İlkel omurgalıların çeşitli organları rejenere etme kapasitesi var iken memeliler sınıfında bu yetenek daha da azalmıştır. Kaybolan vücut parçalarını yenileme yeteneklerindeki sınırlılıklar var olmakla beraber, memelilerde, doku homeostazından ötürü dokuların sürekli yenilenmesi görülmektedir (örn; hematopoez, gametogenez, intestinal sistem epitelyum ve deri yenilenmesi). Homeostaz ilgili dokularda bulunan mutlitpotent kök hücrelerinin aktivitesiyle gerçekleşmektedir. Bu nedenle memeliler üzerinde yapılan rejenerasyon çalışmalarının büyük bir kısmı somatik, fetal ve embriyonik kök hücrelerin doku onarımındaki rollerine odaklanmaktadır. Memelilerin sınırlı rejenerasyon kapasitesi organizmanın farklı organları arasında da değişkenlik göstermektedir. Fare ve insan gibi memeli türlerinde ampüte olan parmak uçlarının rejenere olabildiği (14), memelilerde bağırsak ve karaciğerin kendini yenileme yeteneğinin yüksek olduğu, karaciğerde kısmi hepatoktomi sonrası karaciğerin kalan loblarının büyüme göstererek organdan alınan bölgeyi yeniden oluşturabildiği (15, 16), erişkin memeli beyinde hipokampusun dentate gyrus bölgesinde ve ön beyinin lateral ventriküllerinde olfaktor nöron rejenerasyonun olduğu bilinmektedir (17).

Amfibilerde de rejenerasyon kapasitesi türlere göre değişkenlik göstermektedir. Amfibik canlı türleri arasında kurbağalar (*Xenopus laevis* ve *Xenopus tropicalis*), semender ailesinin üyelerinde olan Newt (*Notophthalmus viridescens*) ve Aksolot (*Ambystoma mexicanum*) yüksek restorasyon kapasitelerinden ötürü rejenerasyon çalışmaları ve rejeneratif tıp araştırmalarında kullanılmak için uygun modellerdir. *Xenopus laevis* 'te larval dönemde görülen retina (18), uzuv (19), kuyruk (20), beyin ve omurilik (19) rejenerasyon yeteneği organizmanın metamorfoza erişkinliğe ulaşmasıyla birlikte kaybolmaktadır (21). Kuyruklu amfibiler omurgalı tetrapodlar arasında en yüksek rejenerasyon kapasitesine sahip omurgalı hayvanlardır (22). Aksolot ve Newt gibi amfibiler vücut kısımlarının (uzuv, çene, kuyruk, deri,

omurilik, kalp vb.) rejenerasyonuna imkan tanıyan eşsiz yetenekleri ve yara izi bırakmadan yaralarını tamamen iyileştirebilme yeteneklerini hayatları boyunca sürdürebilmektedir (23-25). Yetişkin Newtler, hasar gören veya kaybettikleri uzuvlarını, kuyruklarını, beyinlerini, omuriliklerini, kıl hücrelerini, lens, retina, çene ve kalplerini rejenere edebildikleri için omurgalı türler arasında en yüksek rejeneratif kapasiteye sahip canlı türüdür (5). Neotenik semender türü olan aksolotlarda ise, uzuv, kuyruk, kalp, beyin ve omurilik rejenerasyonu görülmektedir.

4.2.Aksolot

Ambystoma mexicanum, Amfibi sınıfı, Urodela takımı, Ambystomatidae ailesin ve *Ambystoma* cinsine mensuptur (Şekil 4.2.). *Ambystoma* cinsi, Kuzey Amerika' dan Güney Meksika ve Güney Alaska'ya kadar yayılan bir bölgeyi habitat edinmiştir ve bu bölgede yaşamakta olan 30 farklı *Ambystoma* türü tanımlanmaktadır. Bunların arasında Merkezi Meksiko dağlarını habitat edinmiş 17 Meksika ambystomatoid semender türü bulunmaktadır ve bu türlerin beşi zorunlu neoteniktir (26). Neoteni; organizmanın erişkin dönemlerinde larval karakteristiklerini korumasıdır, neotenik canlılar normal koşullar altında metamorfoza uğramazlar ve yetişkin larval formda üreyebilmektedirler. Aksolot, Meksiko vadi bölgesinde bulunan Xochimilco Gölü'ne endemik neotenik bir ambystomatoiddir (27). Aksolot adını, daha önce burada yaşadığına inanılan Aztekler'in tanrısı olan Xolotl'dan almaktadır. Günümüzde, habitat kaybı, invaziv canlı türlerinin artışı ve yaşadıkları gölün su kalitesindeki değişimlerden ötürü aksolotlar nesli tükenmekte olan canlılar kategorisine alınmıştır (28).



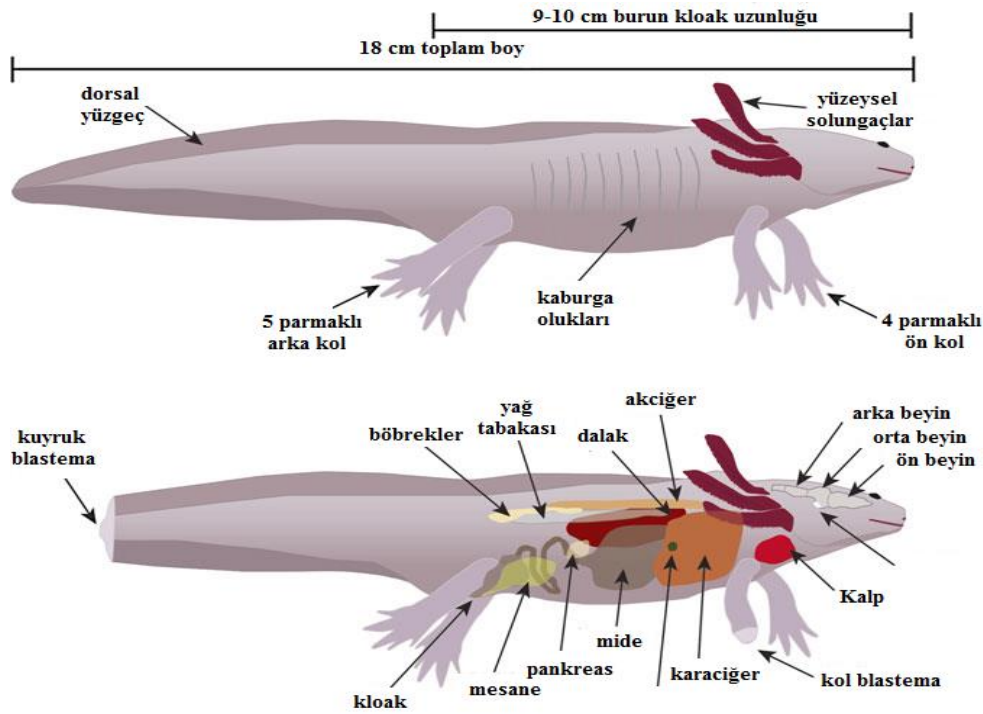
Şekil 4.2. 19 farklı türdeki 30 adet genin analizine dayanılarak oluşturulan 10 farklı semender ailesinin gösterildiği filogenetik ağaç (29).

4.2.1. Aksolot yaşam döngüsü ve anatomisi

Paedomorf canlılar oldukları için doğal şartlar altında metamorfoza uğrayıp karasal hayata geçmeyen aksolotların yaşam döngülerinin tamamı suda

gerçekleşmektedir. Yaşam döngüleri incelendiğinde erkek aksolotlar tarafından suya bırakılan spermlerin dişiler tarafından kloakta toplandığı, iç döllenme sonrası döllenmiş yumurtaların tekrar suya bırakıldığı ve embriyonik gelişimin su içerisinde gerçekleştiği görülmektedir. Suya bırakılan döllenmiş yumurta içinde embriyonik gelişimi 20°C 'lık ortam koşullarında iki haftada tamamlanmaktadır. Aksolotlar yumurtadan çıktıktan sonra morfolojik değişime uğrayıp ön ve arka ayaklarını oluştururlar ve erişkin hale gelirler. Erişkinlerin çiftleşmesi için geçen süre dişilerde yumurtadan çıktıktan sonra 9-12 ay arasında olurken erkeklerde 12-15 ayı bulur (30). 18-24 ay bir aksolot için tamamen erişkin hale geçme, 15-45 cm arasında değişkenlik gösteren bir vücut büyüklüğüne sahip olma ve ideal vücut büyüklüğüne erişme çağıdır. Ortalama yaşam süresi 10-15 yıldır (31).

Aksolot anatomisine bakıldığında, en dikkat çekici özellikleri genellikle kırmızı renkli solungaçlarıdır. Akuatik yetişkinler, larval ambystomatid karakteristiği olan solungaçlarını hayatları boyunca kaybetmemektedirler. Aksolotlar solungaç solunumunun yanı sıra deri ve akciğer solunumu da yapabilmektedirler (32). Canlının omurgası boyunca uzanan dorsal kuyruk yüzgeci vardır. Uzuvarına bakıldığında; ön uzuvlarda 4 adet arka uzuvlarda ise 5 adet parmak olduğu görülmektedir (Şekil 4.2.1.).



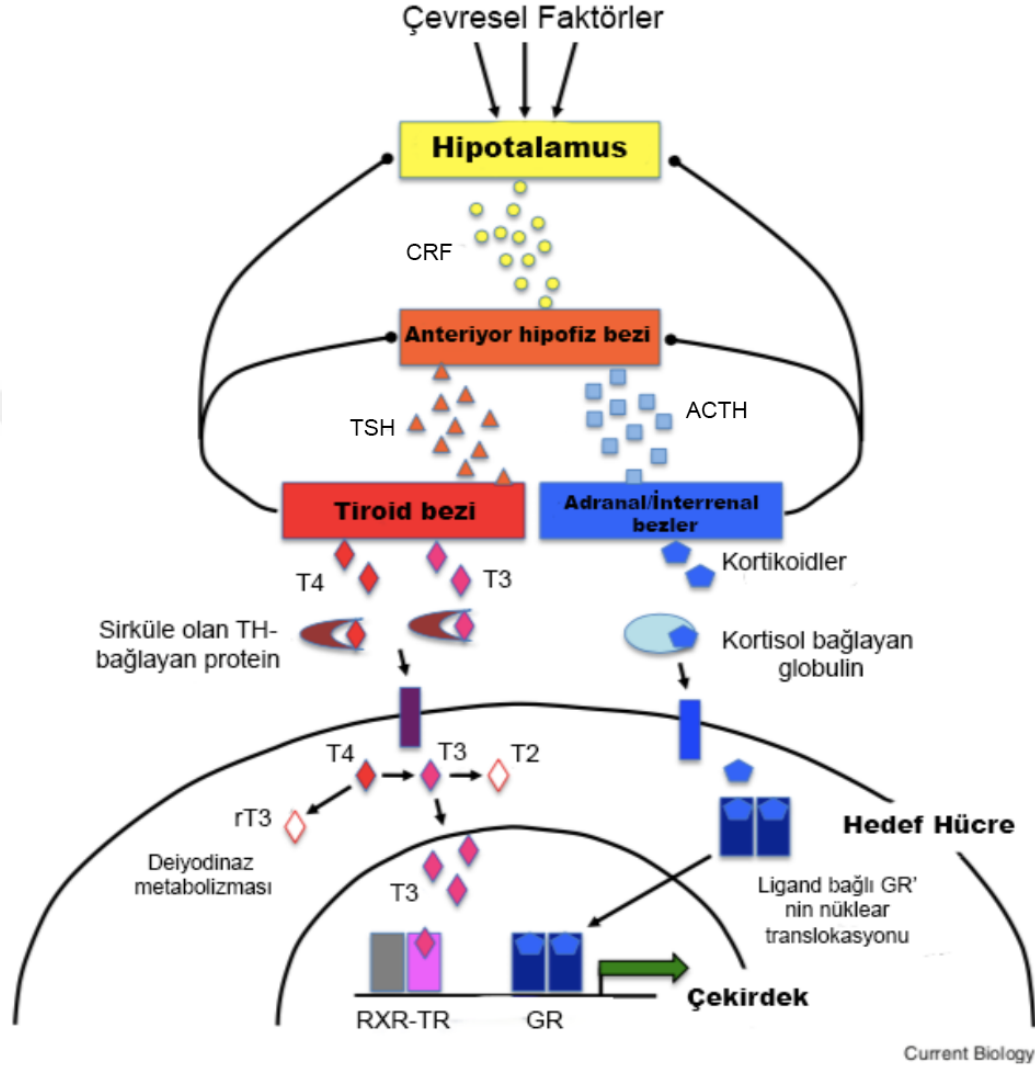
Şekil.4.2.1. Yetişkin lökistik aksolotun dış (üst) ve iç (alt) görünümünün karikatürü (31)

4.2.2.Aksolot metamorfozu

Metamorfoz amfibilerin gelişimsel karakteristiğidir ve amfibilerde metamorfoz, canlının akuatik larval formdan erişkin forma geçerken geçirdiği bir dizi morfolojik, biyokimyasal ve davranışsal değişikliği ifade etmektedir (33-35). Canlıda görülen tüm bu değişiklikler tiroid hormonlarındaki (T_3 — triiodotironin ve T_4 — tiroksin) değişimler ve bu hormonların hedef hücrelerin çekirdeklerinde bulunan reseptörleriyle olan etkileşimlerine bağlı olarak gerçekleşmektedir (35, 36).

Amfibilerde tiroid hormon metabolizması incelendiğinde, şekil 4.2.2.'de de gösterildiği gibi çevresel uyarılarla hipotalamus tarafından kortikotropin serbestleştirici hormon (CRH) salındığı görülmektedir. CRH anterior hipofiz bezinde spesifik reseptörlere bağlanarak hem tiroid uyarıcı hormon (TSH) hem de adrenokortikotrofik hormon (ACTH) üretimini tetiklemektedir (37). Hipofiz bezi tiroid uyarıcı hormon (TSH) salınımıyla tiroid bezini uyararak tiroid bezinden T_3 (az miktarda) ve T_4 üretimini başlatırken ACTH kortikoidlerin üretimini kontrol etmektedir. Steroid yapılı diğer hormonlar gibi bu hormonlarda kanda taşıyıcı proteinler aracılığıyla hedef hücrelerine gitmektedir. Hedef hücreye sadece serbest T_4 ve T_3 girebilmektedir. Hücre içi aktif form T_3 olduğu için T_4 taşıyıcı proteinden ayrılıp hücreye geçtiğinde sitoplazmada yer alan deiyodinaz enzimleri tarafından T_3 'e çevrilir. T_3 reseptörleri hücrenin çekirdeğinde bulunmaktadır ve T_3 'e bağlanmadan DNA'ya bağlanıp transkripsiyonu başlatma özellikleri olmadığı için inaktif durumdadırlar. T_3 ister direk hücreye girsin ister hücre içinde T_4 'ten T_3 'e çevrilmiş olsun, çekirdeğe taşıyıcı proteinler yardımıyla girer ve reseptörün ligand bağlanma bölgesi ('*domain*'i), bağlanır. T_3 tiroid hormon reseptörüne (THR) bağlanınca, reseptörün DNA'ya bağlanma bölgesi, DNA üzerinde bulunan 'tiroid hormon response element'i'nin (TRE) yarısına bağlanarak 9-cis retinoik asit reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturur. Ligandların bağlanmasıyla heterodimeri oluşturan reseptörler artık DNA'ya bağlanıp tiroid hormon response elementine aktive edecek durumdadır. Böylelikle tiroid hormonları, spesifik genlerin transkripsiyonunu başlatmaktadırlar (38). Kortikoidleri glukokortikoid (GR) reseptörünün ligandlarıdır. GR'ler de nüklear reseptörler ailesinin üyeleridir. Sitoplazmada konumlanan GR'ler ligand bağlanması sonucu çekirdeğe girmektedirler. Çekirdekte glukokortikoid

response elementine (GRE) homodimer olarak spesifik genleri aktive etmektedirler. TR-RXR ve GR'ler arasında sinerjistik gen aktivasyonu tanımlanmıştır(39).

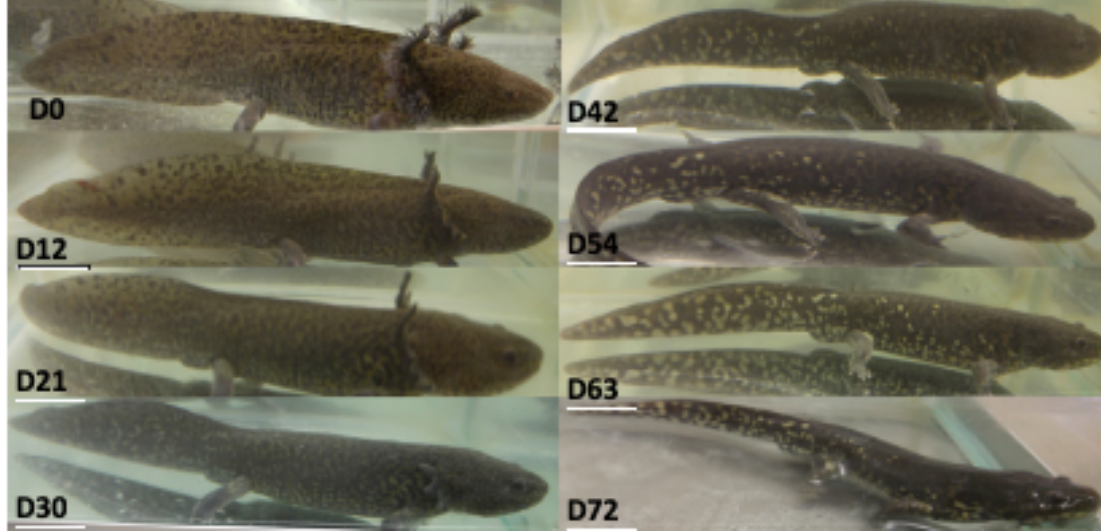


Şekil 4.2.2. Xenopus'ta tiroid metabolizması (37) Stres, su seviyesinin düşmesi ve predator canlıların artması gibi çevresel faktörlerle uyarılan hipotalamustan CRF salınımı anterior hipofiz bezinden TSH salınımını başlatarak tiroid bezini uyarmaktadır. Uyarılan hipofiz bezinden salgılanan T₄ ve T₃ hedef hücreye taşınmakta ve burada T₄'ün aktif form olan T₃'e çevrimi gerçekleşmektedir. T₃ daha sonra hücre çekirdeğine giderek burada reseptörüne bağlanmaktadır. Reseptöre ligand bağlanmasıyla canının metamorfik karakterleri sergilemesine sebep olacak bir dizi genin transkripsiyonu başlamaktadır.

Amfibilerde tiroid hormonunun tetiklediği spesifik gen ekspresyonu organizmanın metamorfozunun altında yatan temel sebeptir (37, 40) Urodeleler arasında paedomorfozun evrimleşmesiyle birlikte bu sınıfa mensup birçok canlı türünde metamorfozun gerçekleşmediği görülmüştür (41). Metamorfoza girmeyen bu paedomorfik organizmalarda larval karakterler erişkinlik döneminde korunmaktadır

(42, 43). Paedomorfik türlerde gerçekleşen biyokimyasal farklılıklar bu canlıların doğal şartlar altında metamorfoza girmesini engellese de *Ambystoma mexicanum* (aksolot) tiroid uyarıcı hormon (TSH), T₃ ve T₄ uygulamasını takiben metamorfoza uğramaktadır (35, 44, 45).

Aksolotlarda metamorfozu indüklemek için araştırmacılar tarafından tercih edilen iki farklı metot vardır. Bunlardan ilki bu hormonların canlıya intraperitonel enjeksiyonla uygulanması iken (45) diğeri hormonların canlının yaşadığı suyun içine verilmesidir (34). Önceki çalışmaların büyük bir kısmı metamorfoz sürecinin kendisine odaklanmışken (45-48), araştırmacıların ilgilenmeye başladığı bir diğer konu metamorfik aksolotlarda rejenerasyon kapasitesini incelemek olmuştur (49, 50).



Resim 4.2.2. Aksolot metamorfozu (51). Neotenik aksolotlara üç günde bir T₄ verilerek metamorfoz indüklenmiştir. 72 günün sonunda canlının solungaçlarının ve kuyruk yüzgecinin kaybolduğu, derisinde pigmentasyon değişimi gözlemlenmiştir (D:Gün).

Resim 4.2.2’de de görüldüğü gibi metamorfoza uğrayan aksolotta, solungaçlar, pigmentasyon ve kuyruk yüzgeci gibi akuatik yaşama özgü karakteristik özellikler, karasal yaşama adaptasyonu kolaylaştıracak şekilde yeniden düzenlenmektedir ve bu süreç yaklaşık iki ayda tamamlanmaktadır. Metamorfozla beraber aksolot solungaçlarını ve dorsal kuyruk yüzgecini kaybetmekte ve deri pigmentasyonuna uğramaktadır. Dışarıdan verilen tiroidin farklı konsantrasyon dozları metamorfozun tamamlanma süresini etkilese de, metamorfoz sürecini ve metamorfoz ile değişen gen ekspresyonunu etkilememektedir (52, 53).

4.2.3.Aksolot Rejenerasyonu

Aksolotlarda rejenerasyon yaşamın her döneminde görülmekte ve bilenebildiği kadarıyla canlının erişkinliğe geçmesiyle rejeneratif potansiyelinde kayıp olmamaktadır. Larval dönemde görülen rejenerasyon ile erişkin dönemde görülen rejenerasyon arasındaki fark erişkin dönemde rejenerasyon süresinin uzamasıdır (49, 54). Günümüzde, aksolot sahip olduğu otantik rejeneratif özelliklerinden ötürü kök hücre ve restoratif tıp çalışmalarında kullanılan model organizmalardan birisi olmuştur (28). Aksolotların çok sayıda fonksiyonel ve yapısal protein ile sinyal yolağının memelilerle aynı olması aksolotlarla yapılan deneylerden elde edilecek bilgilerin memelilerde uygulanma potansiyelini artırmaktadır. Bu canlılar ölümcül olmayacak her tür hasarlanmayı giderebilmekte olup, hasar gören doku veya organı tamamen rejenere edebilme yeteneğine sahiptir. Rejenerasyon; bu canlının iç organlarında, omurilik ve beyin gibi merkezi sinir sistemi elemanlarında, kuyruk, solungaç ve ön/arka uzuvlarında gerçekleşmektedir (5). Hasar sonrası rejenere edilen doku veya organda herhangi bir yara izi oluşmamakta ve yeniden oluşturulan doku veya organ fonksiyonlarını hasar öncesindeki düzeyde yerine getirebilmektedir.

4.2.3.1.Aksolot uzuv rejenerasyonu

Aksolotta yapılan araştırmaların başında uzuv rejenerasyonu çalışmaları gelmektedir. Aksolotlar uzuvlarını, uzvun distal ucunda oluşan yüksek proliferatif aktiviteye sahip hücrelerin oluşturduğu blastema dokusuyla rejenere etmektedir. Ampütasyon sonrası, ampütasyon bölgesinde konumlanan progenitor hücreler veya geri farklılaşıp kök hücre haline dönüşen hücreler çoğalarak, gelişimsel sürece benzer bir mekanizma ile uzvun kaybolan kısmını yeniden oluşturmaktadırlar (55). Uzuv rejenerasyonunu aşağıdaki aşamalarda özetlemek mümkündür (22);

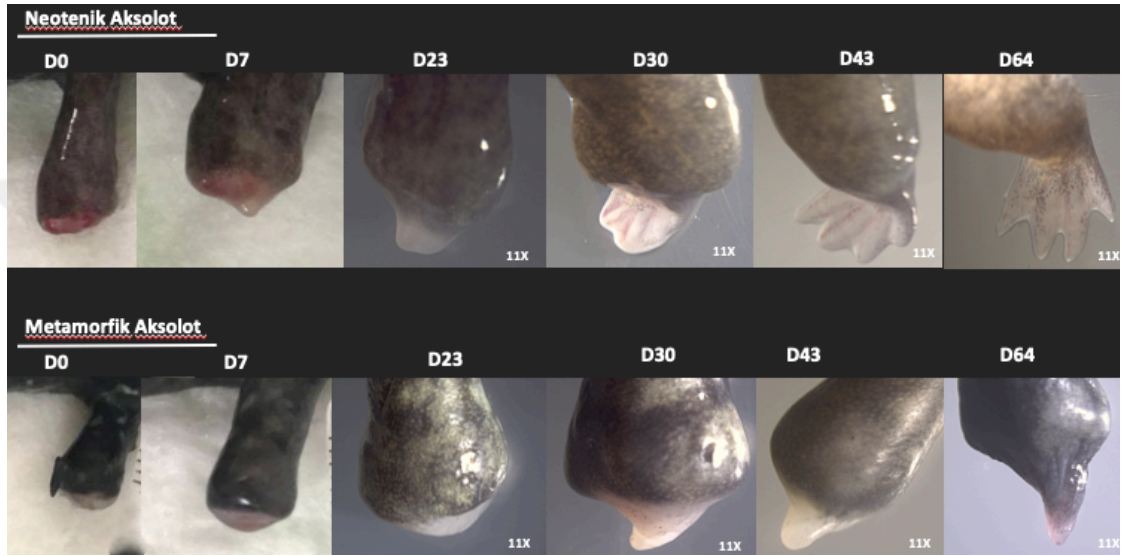
1)Yara İyileşmesi: Ampütasyon bölgesindeki yüzeyin epidermal migrasyonla kapatılması

2)Fagositoz: Hafif inflamatuvar yanıt ve yara epitelinin altındaki matriks bileşenlerinin enzimatik yıkımı

3)Geri Farklılaşma: Yara epitelinin 1-2 mm altında farklılaşmış hücre tiplerinin kaybı ve aynı bölgede geri farklılaşmış (kök hücre benzeri karakter kazanmış) hücrelerin varlığı

4)Blastema Oluşumu: Geri farklılaşmış hücrelerin birikimiyle blastema dokusunun oluşumu

5)Morfogenez ve Büyüme: Blastemanın büyümesi ve blastemayı oluşturan hücrelerin farklılaşarak yeni uzvu oluşturacak şekilde gelişmesi.



Resim 4.2.3.1. Metamorfozla beraber azalan rejenerasyon yeteneği (51). Neotenik ve metamorfik aksolotlar kullanılarak yapılan çalışmada metamorfozla beraber rejenerasyon kapasitesinin azaldığı gösterilmiştir.

Aksolotta uzuv rejenerasyonunun mekanizması pek çok araştırmacının ilgisini çekmekte ve bu rejeneratif sürecin gerçekleşmesinin sağlayan moleküler mekanizmaların anlaşılabilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (56-58). Uzuv rejenerasyonu üzerine yapılan bu çalışmaların bir kısmı metamorfozun rejenerasyon üzerine etkisini aydınlatmayı hedeflenmiştir. Bu çalışmalarda hem metamorfik hem de neotenik aksolotların uzuvları ampüte edilmiş ve uzuv rejenerasyonu takip edilmiştir. Yapılan gözlemler rejenerasyonun ileriki günlerinde neotenik aksolot başarılı bir şekilde ampüte edilen uzuvlarını rejenere edebildiğini gösterirken, metamorfik aksolotlar aynı zaman periyodunda uzuvlarını başarılı bir şekilde rejenere edememiş, amputasyon bölgesinde anormal yapıların olduğu gözlemlenmiştir ve bu gözlemlere bağlı olarak metamorfozla birlikte aksolotta rejenerasyon kapasitesinin azaldığını öne sürmüştür (49, 51).

4.2.3.2.Aksolot merkezi sinir sistemi ve periferel sinir sistemi rejenerasyonu

Aksolotlar evrimsel olarak daha ilkel neotenik canlılar olduklarından ötürü beyinleri son derece basit bir yapıya sahiptir. Aksolot beyni memeli beynine kıyasla kısmen düz ve daha uzunlamasına bir görünümdeyir, beynin telesefalon, mezensefalon ve rombensefalon bölümleri birbirinden rahatlıkla ayrılabilir. Olfaktör bulbus büyüktür fakat optik loblar küçük ve tam ayrılmamıştır, serebellum ise tam gelişmemiştir (59). Aksolot omuriliğı ise memelilerdekine benzer bir yapıya sahiptir. Merkezi kanalda ependimal hücreleri barındıran ve içte gri ve dışta ak maddeden meydana gelen omurilik, üç katlı bağ doku meninjleryle çevrelenmiştir

Karasal hayata geçiş yapan aksolot beynine ait çok veri olmamasına karşın neotenik ve metamorfik aksolottan alınan organlar kullanılarak yapılan karşılaştırmalı histolojik çalışmada, canlının neotenik ve metamorfik formlarının beyinlerinde de ciddi farklılıklar olmadığı gösterilmiştir ve beyin metamorfoz sonrası minör değişim geçiren organlardan biri olarak sınıflandırılmıştır (60). Yine de metamorfik süreçte beyin de yapısal değişimler geçirmektedir. Özellikle optik loblar büyümekte ve canlının yeni binoküler görüşüne uygun hale gelmektedir (61). Bu durum aksolot beynin plastisitesini koruduğunu ve canlının hayatı boyunca ciddi değişimler geçirebileceğini böylelikle nöral plastisiteyi incelemek için aksolotların son derece yararlı model organizmalar olacağını işaret etmektedir.

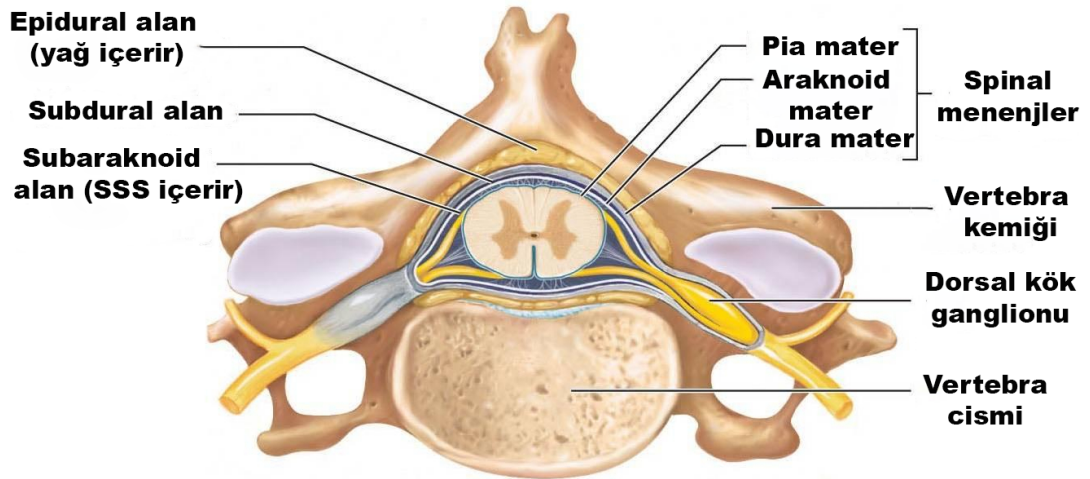
Memelilerin aksine aksolotların merkezi sinir sisteminin rejeneratif potansiyeli yüksektir ve merkezi sinir sisteminde meydana gelen ciddi hasarları onarabilmektedirler. Aksolot beynin meydana gelen büyük çaplı hasarlar sonrası canlının rejenere olabildiğı hatta tam lobektomi sonrasında bile canlının kendini onarabildiğı gösterilmiştir (62, 63). Yetişkin beyinlerinin ventriküler bölgesinin tamamında nöral proliferasyon görülmektedir (64). Aksolotlar omurilik hasarını tamamen iyileştirmekte ve kuyruk ampütasyonu sonrası kuyruklarını spinal kolon dahil rejenere edebilmektedirler. Memelilerde ise bu iki süreçte merkezi sinir sistemi hasarı sonrası aksonal büyümeyi engellediğı bilinen glial yara izi oluşumu görülmektedir.

Aksolot periferel sinir sistemine bakıldığında basit fakat diğel tetrapodlara benzer bir organizasyona sahip olduğu görülmektedir (54). Periferel sinir sistemi, canlıda görülen sinir bağımlı rejenerasyondan ötürü araştırmacıların ilgisini çekmektedir.

4.3.Omurilik ve Omurilik Hasarı

4.3.1.Omurilik anatomisi

Omurilik nöronların oluşturduğu, motor ve duysal bilgilerin beyin ve gövde arasında taşındığı, destek hücreleri ile birlikte boru şeklinde bir kanal gibi uzanan sinir ağına verilen addır. Bilgi aktarılmasının yanı sıra kimi refleksleri oluşturan ve koordine eden merkez görevi görmektedir (65). Memelilerde beyinin medulla oblongata bölgesinden başlayıp ilk lumbar omurlara kadar devam etmektedir. Omurilik, omurlardan oluşan omurga tarafından ve tıpkı beyinde olduğu gibi meninj olarak adlandırılan    membranlı bağı doku elemanı tarafından da korunmaktadır. Dıştan içe doğru bu meninjler, dura mater, araknoid mater ve pia mater olarak adlandırılmaktadır. Araknoid mater ve pia mater arasında omuriliğın korunmasına yardımcı olan i i serebrospinal sıvı ile dolu subaraknoid boşluk ve i i gevs k fibröz ve adipoz bağı doku ile dolu epidural boşluk (dura ve periosteum arasında) bulunmaktadır (66, 67) . şekil 4.3.1.'de memeli omuriliğı şematize edilmiştir.



Copyright   2010 Pearson Education, Inc.

şekil 4.3.1. Omurilik ve omurganın çapraz kesiti. SSS: Serebrospinal Sıvı

Omurilikte gri madde merkezde konumlanmakta ve etrafında ak madde bulunmaktadır. Gri madde internöronlar, efferent nöronların hücre gövdeleri ile dendiritleri ve afferent nöronların fiberlerinden oluşmaktadır. Gri maddeyi çevreleyen ak madde ise, miyelinli akson gruplarından oluşmaktadır. Bu akson gruplarına fiber yolları ya da yolakları da denmektedir ve bunlar omurilik boyunca longitudinal uzanmaktadır. Bu yolakların bir kısmı aşağıya doğru yani beyin ile perifer arasındaki bilgi alışverişini sağlarken, diğerleri yukarıya doğru yani bilgiyi beyne taşımaktadır. Bu yolaklar beyin ile omurilik arasındaki iletişim açısından son derece önemlidir.

4.3.2.Omurilik hasarı

Omurilik hasarı (Spinal cord injury-SCI), motor veya duysal nöronlardaki kayıplar ile karakterize olan ve yaralanma bölgesine bağlı olarak farklı fonksiyonel kayıplar ile sonuçlanan nörolojik hasarlar olarak tanımlanmaktadır (68). Yapılan araştırmalara göre omurilik hasarının dünyadaki yıllık insidansı milyonda 25.5 (69), Türkiye'deki yıllık insidansı ise milyonda 12.7 olarak hesaplanmıştır (70).

Merkezi sinir sistemi (MSS) hasarları insan hayatını olumsuz yönde etkilemektedir, felç ve omurilik hasarları (SCI) en sık görülen merkezi sinir sistemi hasarlarıdır. Memelilerin sahip olduğu sınırlı rejenerasyon kapasitesinden ötürü MSS'nde görülen hasarlar tamamen onarılamamaktadır. Omurilik hasarı sonrası, MSS yenilenme ve onarımının gerçekleşmemesi bireyin yaşam standartlarını düşürmekte ve ciddi bir finansal maliyete sebep olmaktadır. Omurilik hasarını tamamen iyileştirmeyi hedefleyen yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi rejeneratif tıp alanında çalışma yapan araştırmacıların en büyük hedeflerinden biridir.

Omurilik hasarının patojenitesini anlamada ve tedavi yolları geliştirmede ilerlemeler olmasına karşın, hasar sonrasında çoğunlukla ciddi ve kalıcı sakatlık görülmektedir. Omurilik hasarını iki aşamada incelemek mümkündür: a) birinci hasar olarak da tanımlanan akut fazdır ve bu fazda, doku zedelenmesi iskemi, kanama (hemoraj) ve vaskular hasar gerçekleşmektedir. b) İkinci fazsa sekonder hasar olarak adlandırılan doğal immün yanıtın aktivasyonuna bağlı olarak oluşan inflamatuvar yanıt fazıdır. İnflamatuvar yanıtların içinde polazirasyon ilişkili makrofaj aktivasyonu, ikincil hasarın karakteristik özelliğidir. Omurilik hasarının sonucunu esas belirleyen

safha ikincil hasardır. Hasar gören omurilikte epimerkezde makrofaj birikimi ve kanama görülür, buradaki makrofajların fenotipi ve aktivasyon statüsü, omurilik hasarının sonucunu belirler. Makrofaj aktivasyonu ve polarizasyonu mikroçevrede gerçekleşen değişimlere çok duyarlıdır. Makrofajlar mikroçevrenin üzerlerindeki etkilerine göre ya ikincil yanıtlar başlatabilir ya da MSS rejenerasyonu gerçekleştirebilirler.

4.3.2.1.Omurilik hasarında ikincil hasarın fizyolojisi

İmmün yanıtların görev aldığı ikincil hasarda kan-omurilik bariyerinin yıkımı, hücresel düzensizlikler, ekzitotoksisite, oksidatif stres, hemoraj, iskemi ve inflamatuvar değişimler görülmektedir. İnflamatuvar değişimler, hücre nekrozu ve apoptozu, süresi uzayan Wallerian denejrasyonu ve yara izi oluşumuyla omurilik dokularında ikincil hasara sebep olmaktadır (71). İkincil hasarın gelişiminde infiltrate olan makrofajlar, nötrofiller ve MSS mikrogliya hücreleri rol oynamaktadır (71).

Omurilik dokusunda hasara bağlı iskeminin gelişiminde, travma kuvveti, fibrin, platelet thrombine bağlı olarak, intravasküler koagülasyonu kapiller sonrası venüller ve sulkal arterlerin yırtılması, venöz statisi, şişkinlik, proteinöz sıvı sızdırması ve ödem gelişmektedir (72, 73). Omuriliği saran pia maddesi sıkı bir yapı olduğu için ödem artan bir çatlak basınç yaratmaktadır ve bu durum iskeminin gelişmesine sebebiyet vermektedir. Primer lezyondaki iskemi, metabolik asidikliğe sebep olarak pH'ı düşür, bu durumu reaktif hiper anemi ve reperfüzyon takip eder. Hiperanemi ve reperfüzyon toksik ürünlerin (serbest radikallerin) açığa çıkmasına sebep olur, açığa çıkan bu toksik ürünler ise hücresel yapıların zarar görmesine ve hücrelerin oksidatif strese girmesine sebep olmaktadır (74).

Serbest radikaller hücre membranında lipid peroksidasyonuna sebep olarak nöral doku hasarının gelişmesine neden olmaktadır (75). Hasar gören omurilikte serbest radikallerin kaynağı araşidonik asit kaskadıdır. Bu kaskadda serbest radikaller ya biyogenik amin nörotransmitterlerin oto-oksidasyonu ya da monoamin oksidaz-B aktivitesi gibi enzimlerin aktiviteleri sonucu açığa çıkmaktadır. Bu yolağa ek olarak infiltrate olan makrofajlar, nötrofiller ve mikrogliyalarda serbest radikal üretmektedir. Artan serbest radikaller akut omurilik hasarının patofizyolojisinde başka olaylarla da ilişkilendirilmektedir; düşük Ca^{+2} -ATPaz pompası aktivitesine bağlı olarak yüksek

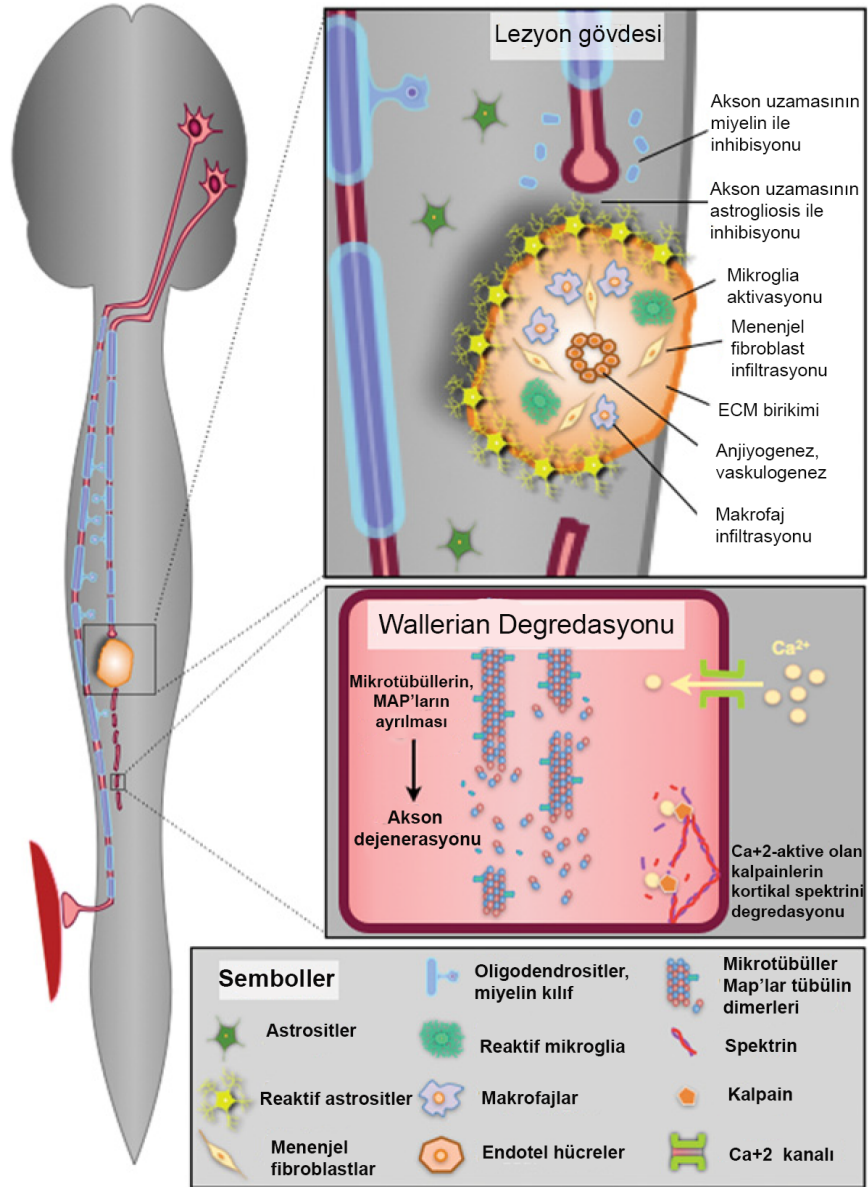
intrase    ler Ca^{+2} , ağrı peroksinitrit (PN), 3-nitrotirozin (3-NT), 4-hidroksinonenal (4-HNE)   retimine bağlı olarak mitokondri fonksiyon bozukluğu ve spinal mikrovasküler endotelinoksidatif hasarından kaynaklanan mikrovasküler perfüzyon düzensizlikleri de serbest radikallerin açığa çıkmasına sebep olmaktadır (76).

Tüm bu mekanizmaların yanı sıra ikincil hasardaki en önemli süreç inflamasyondur. Sekonder hasardaki inflamasyonu birkaç aşamada tanımlamak mümkündür (77); Hasar sonrası 0.-2.günlerde nötrofiller stimüle olur ve lokal mikrogliya hasar bölgesine dolmaya ba  lar, 3.-7.günlerde kan monositleri birikir, 7. gün ve devam eden süreçte ise anti-inflamatuvar makrofajlar oluşan yara izini düzeltmeye çalışır ve aksonal büyüme gerçekleştir. Omurilik hasarı sonrası meydana gelen inflamasyonunun hem iyileşme sürecine faydalı hem de dokuya zarar veren etkileri vardır.

Omurilik hasarı sonrası, hasarlı bölgede bir dizi moleküler ve hücresel olaylar meydana gelmektedir. Omurilik yaralanması oluştuğunda, lezyon alanındaki birçok glial hücre hemen harekete geçerek farklı hücrelerle birlikte inflamatuvar yanıtları başlatır (78). Yaralanmaya ilk yanıtlardan biri, makrofajlar, nötrofiller ve lökositlerin olası enfeksiyonları önlemek için yaralanma bölgesine g    etmesidir (79, 80). Oluşturulan inflamatuvar reaksiyon aksonal dejenerasyon ve demiyelinle  me süreçlerini hızlandırmaktadır (81). Şekil 4.3.2.1.'de de özetlendiği gibi akson dejenerasyona uğrarken, Wallerian dejenerasyonu olarak adlandırılan bir süreçten geçmektedir (82). Burada hasar gören aksonun hem distal hem de proksimal kısımlarında Ca^{+2} akışına ve Ca^{+2} bağımlı proteaz kalpainlerin aktivasyonu bağlı olarak aksonal dejenerasyon ba  lamaktadır (83). Yapılan   alı  malar, sadece kalpainlerin değil, Ca^{+2} bağlı başka yolakların da akson dejenerasyonunda etkili olabileceğini d        mektedir (84-86). Ca^{+2} yolaklarının başlattığı olaylar zincirini takip eden 24-48 saatlik süreç gecikme periyodu adlandırılmakta ve bu süreçte aksonun distal kısmı morfolojik olarak bütünlük sergilemekte ve kısa bir süre için hale elektriksel olarak uyarılabilir bir karakter göstermektedir (87). Aksonun hızlı dejenerasyona uğradığı sonraki süreçte ise hücre iskeleti elementleri, özellikle mikrotübülleri, alt ünitelerine ayrılmakta ve makrofajların açığa çıkan akson debrisini temizlemek üzere bölgeye g    ettiği d        mektedir (88, 89). İnfiamasyon reaksiyonundan sonra lezyon etrafında bir   dem oluşmakta ve astrositlerin bu bölgeye

doğru hareketi sonucunda lezyon bölgesinde glial yara izi oluşumu başlamaktadır (90, 91) Bu hücreler kronik fazda daha büyük bir enflamatuvar reaksiyon oluşumunu teşvik ederek akson dejenerasyonu ve demiyelinizasyonuna sebep olmaktadır. Bunda salgıladıkları sinyalleşme proteinlerin, aksonal büyüme ve miyelin kılıf oluşumu için inhibitör bir etkiye sahip olması da rol oynamaktadır (80, 92). Her ne kadar glial yara oluşumu hasarlı omuriliği korumak ve stabilize etmek için oluşturuluyor olsa da; bu yoğun yapısı ve yara bölgesinden yapılan salgılar nedeniyle omurilik fonksiyonel olarak iyileşememekte ve yenilenememektedir.





Şekil 4.3.2.1. Memelilerde omurilik hasarının şematik gösterimi. Omurilik hasarı sonrasında hücreler hasar bölgesine doğru göç etmeye başlamaktadırlar. Makrofajlar, ölmekte olan hücreleri yutarken, astrositler, fibroblastlar ve endotelial hücreler hasarın meydana getirdiği boşluğu doldurmaktadır. Bu hücrelerden bazıları salgıladıkları proteinlerle akson uzamasını inhibe etmektedir. Hasarın kaudalinde aksonlar hücre gövdesiyle bağlantılarını yitirmiştir ve aksonun ölümü ile sonuçlanan Wallerian degradasyonu sürecine girmektedir (86).

Omurilik hasarlarını tamamen tedavi etmeyi hedefleyen stratejilerinin geliştirebilmesi için, sınırlı yenilenme yeteneğine sahip memeli organizmalar yerine yenilenme yeteneği yüksek canlılarda araştırmalar yapmak büyük öneme sahiptir. Bu canlılarda rejenerasyon ve doku onarımının nasıl gerçekleştiğinin anlaşılması, memelilerde onarım mekanizmalarının anlaşılması ve iyileştirilmesinin önünü açacaktır. Rejenerasyon kapasitesi yüksek omurgasız türlerde onarım

mekanizmalarına dair öğrenebileceğimiz birçok bilgi olmasına karşın, bu canlıların gelişkin bir sinir sisteminin olmaması ve evrimsel olarak memelilere uzak olmaları nedeniyle, memelilerle daha yakın akraba olan rejenerasyon kapasitesi yüksek omurgalı canlılar üzerinde bu çalışmaların yapılması tedavi stratejisinin geliştirilmesi sürecinde daha doğru bir yaklaşım olacaktır.

4.3.3.Urodele amfibilerde omurilik anatomisi, hasarı ve rejenerasyonu

Urodele amfibi omuriliği, omurga boyunca uzanan düzleşmiş silindirik biçimdeki sinir hücrelerinden oluşmaktadır. Her bir omurga ile birlikte, kordun tüm uzunluğu boyunca bilateral bir çift omurga sinirleri gelişir. Her bir omurilik sinirinin dorsal sensör ve ventral motor kökü vardır. Bunlar bir noktada kaynaşarak daha sonra dorsal, ventral ve iletişim kuran sinir dallarına ayrılmaktadır (93). Yetişkinlerin omuriliği merkezi kanalda yer alan ependimal hücreleri, gri ve onu çevreleyen ak maddeyi içermektedir (94). Omuriliğinin yüzeyinde birçok kan damarı sonlanmaktadır.

Semender omurilik rejenerasyonu çalışmalarının büyük bir kısmı günümüzde amputasyonu takiben rejenere olan kuyruk üzerine yapılmaktadır. Daha eski çalışmalarda bu türlerinin farklı omurilik lezyonlarını tamir edecek rejeneratif kapasiteye sahip olduğu gösterilmiştir. 1965’lerde Newt üzerinde yapılan çalışmalar, canlının omurilik hasarı sonrası omuriliğini fonksiyonel olarak rejenere ettiğini göstermiştir. Yapılan çalışmalarda omuriliğin iki ucunun birbirine doğru göç ettiği zamanla lezyon bölgesinde akson büyümesini gerçekleştirdiği ve omuriliği ucunun birleştiği gösterilmiştir (95, 96). Aksolatta aksonların retrograd olarak işaretlenmesiyle yapılan bir başka çalışmada, koordineli yüzme ile supraspinal aksonların yeniden büyümesi arasında korelasyon olduğu gösterilmiştir (97).

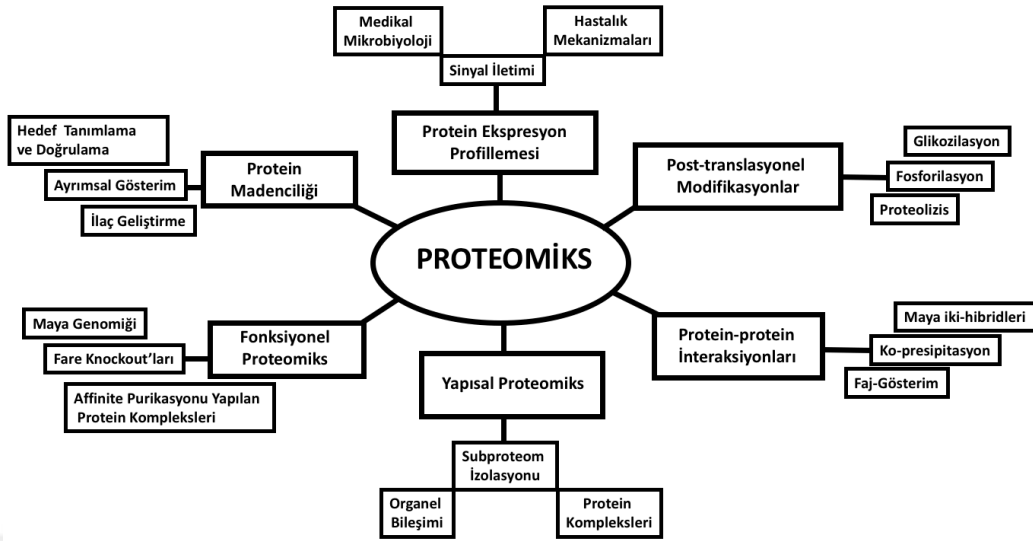
Newt üzerinde yapılan bir başka çalışmada meninjial ve glial hücrelerin hasar sonrası rejenerasyona imkan tanıyan bir çevre oluşturduğunu göstermektedir. Bu çalışmada meninjiyal fibroblastlar ve glial hücrelerin hasar bölgesine göç ederek endotelial hücrelerle birlikte, aksonların üzerinde büyüyebileceği bir substrat görevi gördüğü ve sensör nöranlar rejenere olmamasına rağmen canlının tüm motor kontrolünü geri kazandığı ifade edilmektedir (98). Bu durum newt meninjial ve glial

hücrelerinin nöronal aksonlarla bereber koordineli bir şekilde çalışarak hasar bölgesini doldurduğunu düşündürmektedir. Memeli omurilik hasarında ise meninjal fibroblastlar ve astrositler beraber hareket ederek glial yara izi oluşumuna neden olmakta ve bu yara izi de aksonal büyümenin gerçekleşmesini önlemektedir (99). Eski çalışmaların büyük bir kısmı hasar sonrası gerçekleşen süreçte omuriliğin yapısında meydana gelen gelişmeleri ifade etse de, günümüzde yapılan çalışmalarla bu gözlemlerin doğruluğu kanıtlanmıştır ve bu eski çalışmalar pek çok moleküler çalışmanın temellerini oluşturmaktadır.

Anuran, urodele ve memeli glial hücrelerinin hasarı takiben bölgeye göç ettiği, bölünmeye başladığı ve bu hücrelerde Notch, BMP ve Wnt gibi sinyal yollarının aktive olduğu bilinmekte ve bu da farklı türler arasında hasara yanıt mekanizmaları açısından benzerlikler olduğunu göstermektedir (86, 100). Buna rağmen halen memelilerde fonksiyonel rejenerasyon yerine fonksiyonel olmayan yara iyileşmesi görülmesinin nedeni merak uyandırmaktadır. Newt ve aksolot gibi canlılar üzerinde yapılan çalışmalarla omurilik rejenerasyonu sürecinde hücrelerin kökeni ve potansiyeli hakkında bir miktar veri elde edilmesine karşın, hangi sinyallerin bu hücreleri bölünmeye, göç etmeye, doğru yer ve zamanda doğru hücre tipine farklılaşmaya teşvik ettiğine dair araştırmalar halen sürmektedir.

4.4.Proteomiks

Proteomiks terimi 1995 yılında ilk ortaya atıldığında bir hücre hattı, doku ya da organizmanın tüm protein içeriğinin (proteom) büyük-ölçekli karakterizasyonunu tanımlamak için kullanılıyordu (101). Günümüzde proteomiks ifadesi iki farklı şekilde kullanılmaktadır, ilki, gen ürünlerinin büyük ölçekli analizinin sadece protein bazında biyokimyasal metotlar kullanılarak gerçekleştirilmesini ifade ederken, ikinci kullanımı ise; proteinlerin karakterizasyonunu, lokalizasyonunu ve başta maya iki hibrid sistemleri olmak üzere kullanılan protein interaksyonu çalışmalarını kapsayan fonksiyonel genomiksi ifade etmektedir (102). Tanımı ne olursa olsun proteomiks çalışmalarının hedefi ortaktır; bir örnekteki (hücre, doku vb.) toplam protein içeriğinin kapsamlı analizini yaparak ve proteinlerin birbirleriyle etkileşimleri, modifikasyonları, fonksiyonları ve lokalizasyonlarıyla ilgili bilgi sahibi olmak. Şekil 4.4.'te proteomiksin çalışma ve uygulama alanları gösterilmektedir.



Şekil 4.4. Proteomiks çalışmaları ve biyolojik uygulamaları (101). Proteomiks yapılan çalışmaya göre yapısal proteomiks, fonksiyonel proteomiks, protein ekspresyon profillemesi, post-translasyonel modifikasyon, protein-protein interaksiyonları ve protein madenciliği çalışmaları olarak alt birimlere ayrılmaktadır. Bu alt birimlerin uygulama alanları figürde gösterilmektedir.

Proteom dinamik bir yapıdır, çalışılan örnek ister hücre, ister doku ister organ olsun, iç ve dış kaynaklı sinyallerin, hücre içi protein sentezini etkileyebilmesi, sentezlenen proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları, translokasyonu ve yıkımı da yine bu sinyallere bağlı olarak farklı şekilde etkilenebildiği için proteom analizi aynı zamanda çevre koşullarını da yansıtmaktadır. Bu nedenle proteom çalışmaları, belirli bir zamanda çevre şartlarının protein içeriği üzerindeki etkisine dair bilgiyi de vermektedir. Sadece gen düzeyinde yapılan çalışmalar, protein çalışmalarına kıyasla daha kısıtlı bir bilgi vermektedir. Sadece genomu çalışarak, hücre içi mekanizmaları, hastalık modellerini ve çevrenin hücreye etkisini anlamaya çalışmak yetersiz kalacaktır. Hem genlerin hem de çevrenin yansıması niteliğindeki proteom bu anlamda hücre içi mekanizmaların daha geniş çerçeveden görülmesine yardımcı olacaktır.

Gelişen teknoloji ile birlikte proteomiks alanında da ilerlemeler kaydedilmektedir. Proteom analizlerinde kullanılan cihazlarda yapılan iyileştirmeler, farklı proteom çalışmalarının yapılmasını mümkün kılmıştır. Bu çalışmalardan biri de ister hayvan modeli kullanılarak ister klinik çalışmalardaki örnekler kullanılarak yapılan omurilik hasarını takiben değişen proteomun incelenmesidir (103-106).

Nörotravmanın teşhisinde kolaylık sağlayacak biyobelirteçlerin ve hasar mekanizmasında kritik rol oynayan moleküllerin tanımlanması, hasar sonrası uygulanabilecek yeni terapi stratejilerinin gelişmesinin önünü açacaktır. Rejeneratif canlılarda hasar sonrası onarım mekanizmasını anlamak için yapılan çalışmalardan birinde önceden oluşturulmuş mRNA sekans veri setleri ve yüksek verimli proteomiks beraber kullanılarak aksolot kuyruk proteomu oluşturulmuş ve rejenerasyonun farklı zaman aralıklarında alınan örneklerle karşılaştırmalı proteom analizi yapılmıştır (107). Aksolot ve sıçan kullanılarak gerçekleştirilen başka bir çalışmada, omurilik hasarı sonrası aksolot miR-125b fonksiyonel iyileşme için olmazsa olmaz bir faktör olduğu gösterilmiş, sıçanda miR-125b seviyelerinin arttırılmasının *Sema4D* ve diğer glial skar ilişkili genlerin ekspresyonunu azaltarak fonksiyonel iyileşmenin gerçekleşmesine yardımcı olduğu gösterilmiştir. Özellikle rejenerasyon kapasitesi yüksek canlılarda hasar sonrası iyileşme sürecinde rol oynayan faktörlerin tanımlanması ve bu faktörlerin rejenerasyon kapasitesi sınırlı canlı türlerinde ortologlarının bulunması üzerine yapılan çalışmalar, omurilik hasarının tedavisine yönelik stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

5.MATERYAL VE METOT

5.1.Aksolotların bakımı ve metamorfoza indüklenmesi

Bu çalışmada, Ambystoma Genetic Stock Center (AGSC)'dan getirilen ve İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbî Araştırmalar Merkezi'nde (MEDİTAM) çoğaltılan vahşi tip aksolotlar (*Ambystoma mexicanum*) kullanılmıştır. Çalışma boyunca izlenen deneysel protokol ve deneylerde kullanılacak aksolotların bakım ve manipölasyon koşulları için İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı (Onay No: 38828770-604.01.01-E.2499) alınmıştır. Çalışmaya 48 adet neotenik hayvan ile başlanmış ve bu hayvanların 24 tanesi metamorfoza indüklemiştir.

5.1.1.Aksolotların bakımı

Proje süresince aynı anne-babadan tek yumurtlama döneminden elde edilmiş 200 civarındaki 6 aylık ergen 6-8 cm boylarında vahşi tip aksolot arasından rastgele 48 adet canlı seçilmiştir. Seçilen canlılar 1 yaşındayken deneylere başlanmıştır. Aksolotlar deney süresince, bu canlılar için en uygun ortam koşulu sağlayan Holtfreter solüsyonu içerisinde her bir akvaryumda bir aksolot olacak şekilde 18-20 °C sıcaklık altında tutulmuştur. Beslenmeleri ise her iki günde bir pellet yem (JBL novolotl) verilerek gerçekleştirilmiştir.

5.1.2.Aksolotların metamorfoza indüklenmesi

Neotenik aksolotları metamorfoza indüklemek için Tiroksin (T₄) kullanılmıştır. Önceki çalışmalarda T₄'ün 20° C'de 50 nM konsantrasyonla kullanılması durumunda, yaklaşık 60 gün sonra aksolotların metamorfozu tamamladığı belirtilmiştir (30). Bu çalışma temel alınarak, 100 µM L-tiroksin stok solüsyonu Holtfreter solüsyonuyla seyreltilerek akvaryum başına final T₄ konsantrasyonu 50 nM olacak şekilde aksolotların metamorfoza indüklenmesine başlanılmıştır. Bu işlem, aksolotların metamorfozu tamamlanıncaya kadar üç günde bir suları değiştirilerek tekrarlanmıştır.

Metamorfoza indüklenen aksolotlarda morfolojik değişimler, T₄ uygulamasını takiben 2.haftadan sonra gözlenmeye başlanmaktadır. Bu değişimler; kilo kaybı,

kuyruk ve dorsal sırt yüzgeçlerinin kaybolması, göz protrüzyonu ve solungaçlarının kaybolması olarak sıralanabilir. Metamorfoza uğrayan aksolotların akvaryumlarındaki sıvı hacmi canlının vücudunu nemli tutmaya yetecek kadar, yaklaşık $\frac{3}{4}$ oranında azaltılarak metamorfoza uğrayan aksolotların karasal hayata geçişleri desteklenmiştir. Metamorfoz süreci yaklaşık olarak 6-8 hafta arasında tamamlanmıştır.

5.2.Biyolojik örneklerin hazırlanması

5.2.1.Neotenik aksolotlar için biyolojik örneklerin hazırlanması

24 adet neotenik aksolottan laminektomi (kontrol grubu) ve omurilik hasarı grubu (deney grubu) olmak üzere iki farklı grup oluşturulmuştur. Bu 24 adet aksolottan 18 tanesi omurilik hasarı grubu canlılarını oluştururken 6 tanesi laminektomi grubu canlılarını oluşturmaktadır. Hem laminektomi hem de omurilik hasarı grubu için Tablo 5.2.1’de gösterildiği üzere farklı zaman aralıklarında (toplam 6 zaman aralığı) doku örnekleri toplanmıştır. Omurilik hasarı grubu canlıları için 3 canlıdan toplanan örnekler bir arada parçalanarak bir havuz oluşturulmuş ve proteom çalışması bu üç canlıdan oluşturulan protein havuzu üzerinde yapılmıştır. Laminektomi grubu canlılarında ise her zaman dilimi için bir canlı bulunmaktadır ve tek canlıdan gelen örnek üzerinde proteomiks çalışması yapılmıştır. Doku örneği alınacak zaman aralıkları ve kullanılacak canlı sayıları şu şekildedir:

Tablo 5.2.1. Neotenik aksolot için deney ve kontrol grubu dağılımı

Zaman Aralığı	Omurilik Hasarı Grubu	Laminektomi Grubu
0.saat	3 adet	1 adet
6.saat	3 adet	1 adet
12.saat	3 adet	1 adet
24.saat	3 adet	1 adet
4.gün	3 adet	1 adet
7.gün	3 adet	1 adet

5.2.2. Metamorfik aksolotlar için biyolojik örneklerin hazırlanması

Metamorfik aksolotlar da tıpkı neotenik canlılar da olduğu gibi gruplanmıştır. Tiroksin uygulaması sonrası, metamorfik aksolot karakteristiği sergileyen 24 adet aksolot laminektomi (kontrol grubu) ve omurilik hasarı grubu (deney grubu) olmak üzere iki farklı gruba ayrılmıştır. Bu 24 adet aksolottan 18 tanesi omurilik hasarı grubu canlılarını oluştururken 6 tanesi laminektomi grubu canlılarını oluşturmaktadır. Hem laminektomi hem de omurilik hasarı grubu için 6 farklı zaman aralığında doku örnekleri toplanmıştır. Omurilik hasarı grubu canlıları için 3 canlıdan toplanan örnekler bir arada parçalanarak bir havuz oluşturulmuş ve proteom çalışması bu üç canlıdan oluşturulan protein havuzu üzerinde yapılmıştır. Laminektomi grubu canlılarında ise her zaman dilimi için bir canlı bulunmaktadır ve tek canlıdan gelen örnek üzerinde proteomiks çalışması yapılmıştır. Doku örneği alınacak zaman aralıkları ve kullanılacak canlı sayıları şu şekildedir:

Tablo 5.2.2. Metamorfik aksolotlar için deney ve kontrol grubu dağılımı

Zaman Aralığı	Omurilik Hasarı Grubu	Laminektomi Grubu
0.saat	3 adet	1 adet
6.saat	3 adet	1 adet
12.saat	3 adet	1 adet
24.saat	3 adet	1 adet
4.gün	3 adet	1 adet
7.gün	3 adet	1 adet

5.3.Kullanılan malzemeler

Tablo 5.3. Kullanılan kitlerin ve sarf malzemelerin listesi.

Malzeme Adı	Firma	Katalog Numarası
Tiroksin	Sigma	T1775
Benzokain	Acros Organics	150780025
TRIzol Reagent	Thermo Fisher	15596026
Glikojen	Thermo Fisher	R0551
SYBR Safe	Thermo Fisher	S33102
Quick-Load Purple 2-Log DNA Ladder	NEB	N0550S
6X Purple Gel Loading Dye	NEB	B7025S
FASP TM Protein Digestion Kit	expedeaon	44250

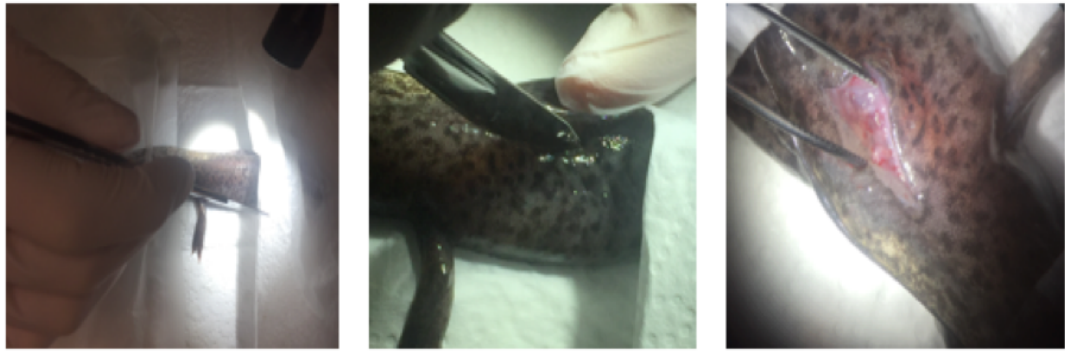
5.4.Aksolot omurilik hasarı verilmesi ve doku örneklerinin toplanması

5.4.1.Omurilik hasarı modeli

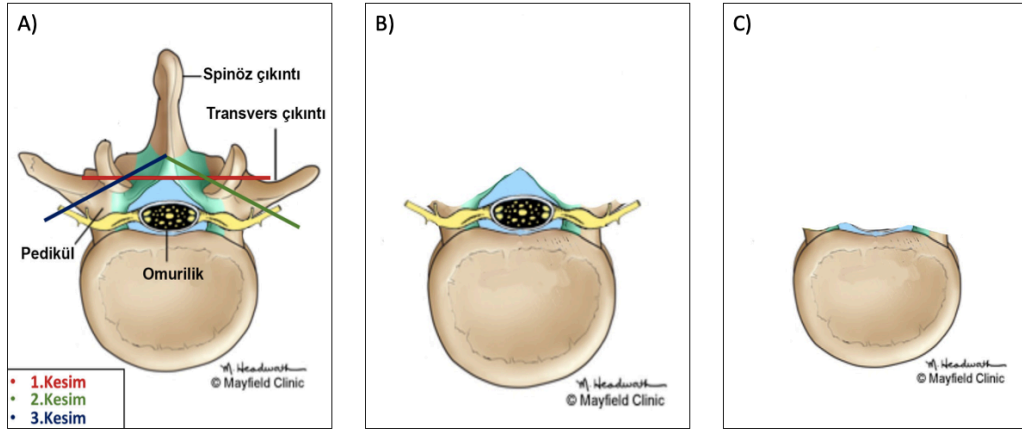
Aksolotların metamorfozu tamamlandıktan sonra omurilik hasarı deneylerine başlanmıştır. Vücut uzunluğu 6-8 cm olan neotenik ve metamorfik aksolotlar, omurilik hasarı verilmeden önce 0.01% Benzokain (Acros Organics, Kat. No: 150780025) ile anesteziye alınmıştır. Pens ile uzuv ve solungaç refleksleri kontrol edilen aksolotların anestezi altında olduklarından emin olunduktan sonra omurilik hasar deneylerine başlanmıştır. Diseksiyon mikroskobu altına alınan aksolotların operasyon süresi boyunca derilerinin kurumaması için hasar verilecek bölge dışında kalan kısımları Holtfreter solüsyonu ile ıslatılmış peçetelerle kapatılmıştır. Cerrahi operasyon

aksolotlar anestezi altında iken arka bacakları üzerinden bir kesi yapılmasıyla başlanmıştır. Bu kesinin yapıldığı yerde deri ve kas dokusu açılarak erişilen omurda laminektomi gerçekleştirilmiştir. Açılan omurun içinden geçen omurilik çıkartılmıştır (108). Bu çalışmada omuriliği çıkartılan canlılar deney grubunu oluştururken sadece laminektomi yapılan canlılar ise kontrol grubunu oluşturacaktır. Her iki grupta, operasyon sonrası açılan deri yaralı bölge üzerine yerleştirilerek operasyon bölgesine sütür atılmıştır. Operasyon sonrası aksolotlar akvaryumlarına geri konulmuştur ve örnek toplama sürelerine kadar 20° C' de normal ortam koşullarında tutulmuştur.

Anestezi altındaki neotenik ve metamorfik aksolotlarda deney grupları için laminektomiye takiben omurilik hasarı oluşturulmuş, kontrol grupları içinse sadece laminektomi yapılmıştır. Neotenik ve metamorfik aksolotlar üzerinde gerçekleştirilen cerrahi operasyonlar Resim 5.4.1'de özetlenmiş, Şekil 5.4.1.'de şematize edilmiştir.



Resim 5.4.1. Aksolotta cerrahi operasyon ve örnek toplama. Temsili olarak neotenik aksolodun kullanıldığı şekildeki işlemlerin aynıları metamorfik aksolotlar için de yapılmıştır. Operasyonları gerçekleştirmek için anesteziye alınan aksolotlar derilerinin operasyon süresi boyunca nemli kalması için Holtfreter solüsyonuyla ıslatılmış peçete ile sadece operasyon bölgesi açıkta kalacak şekilde mikroskop altına yerleştirilir. Bistüri yardımıyla hasar bölgesinde ilk kesi yapılır. Omurgaya ulaşmak için operasyon bölgesinde kaslar da kesilir. Omur görüldüğünde ilk kesim spinöz çıkıntıdan yapılır daha sonra transvers çıkıntılar da kesilerek, tek omur açılır ve omuriliğe ulaşılır. Omurilik hasarı gruplarında açılan omurun içinden geçen omurilik makasla iki uçtan kesilerek çıkarılır. Laminektomi gruplarında ise sadece omur açılır, omurilik dokusuna örnek toplama süresine kadar herhangi bir zarar verilmez.



Şekil 5.4.1. Cerrahi operasyonlar. A) Aksolotta yapılan cerrahi operasyonlar için üç kesim bölgesi belirlenmiş ve bu kesim bölgeleri sırasıyla açılarak omuriliğe erişim sağlanmıştır. B) Laminektomi operasyonu sonrası omurlar açılmış, omurilik dokusuna herhangi bir zarar verilmemiştir. C) Omurilik hasarı operasyonlarında ise için açılan omurun içinden geçen omurilik kesilerek çıkarılmıştır.

5.4.2.Doku örneklerinin toplanması

Diseksiyon mikroskobu altında neotenik ve metamorfik canlılardan hasar sonrası, yenilenmenin 0., 6., 12., 24. saatleri ile 4. ve 7. günleri doku örnekleri yara bölgesinin tekrar açılması ve oluşan blastema dokusu ile birlikte 1mm civarındaki çevre dokuların alınmasıyla toplanmıştır. Toplanan doku örnekleri hemen sıvı nitrojene aktarılarak dondurulmuş ve protein izolasyonuna kadar -80°C ' de saklanmıştır. Örnek toplama işlemi omurilik hasarı gruplarına ek olarak laminektomi gruplarında da aynı zaman aralıkları için gerçekleştirilmiştir.

0.saat grubu: Omurilik hasarı gruplar için aksolotların omurilik hasar bölgesinin anterioründen 0.5mm büyüklüğünde doku alınmıştır. Laminektomi yapılan gruplar için aynı bölgeye denk düşen doku örneği alınmıştır. Hayvanlardan alınan dokular hemen sıvı nitrojende dondurulup -80°C 'de saklanmıştır. Alınan dokular proteomiks çalışmasında kullanılmıştır.

6.saat grubu: Omurilik hasarı gruplar için aksolotların omurilik hasar bölgesinin anterioründen 0.5mm büyüklüğünde doku alınmıştır. Laminektomi yapılan gruplar için aynı bölgeye denk düşen doku örneği alınmıştır. Hayvanlardan alınan dokular hemen sıvı nitrojende dondurulup -80°C 'de saklanmıştır. Alınan dokular proteomiks çalışmasında kullanılmıştır.

12.saat grubu: Omurilik hasarı gruplar için aksolotların omurilik hasar bölgesinin anterioründen 0.5mm büyüklüğünde doku alınmıştır. Laminektomi yapılan gruplar için aynı bölgeye denk düşen doku örneği alınmıştır. Hayvanlardan alınan dokular hemen sıvı nitrojende dondurulup -80°C’de saklanmıştır. Alınan dokular proteomiks çalışmasında kullanılmıştır.

24.saat grubu: Omurilik hasarı gruplar için aksolotların omurilik hasar bölgesinin anterioründen 0.5mm büyüklüğünde doku alınmıştır. Laminektomi yapılan gruplar için aynı bölgeye denk düşen doku örneği alınmıştır. Hayvanlardan alınan dokular hemen sıvı nitrojende dondurulup -80°C’de saklanmıştır. Alınan dokular proteomiks çalışmasında kullanılmıştır.

4.Gün grubu: Omurilik hasarı gruplar için omurilik hasar bölgesinde oluşan blastema ve sadece omurilik rejenerasyon mekanizmasında görevli faktörlerin ortaya çıkarılması için 1mm çevre dokulardan 4.gün doku örneği alınmıştır. Laminektomi yapılan gruplar için aynı bölgeye denk düşen doku örneği alınmıştır. Hayvanlardan alınan dokular hemen sıvı nitrojende dondurulup -80°C’de saklanmıştır. Alınan dokular proteomiks çalışmasında kullanılmıştır.

7.Gün Grubu: Omurilik hasarı gruplar için omurilik hasar bölgesinde oluşan blastema ve sadece omurilik rejenerasyon mekanizmasında görevli faktörlerin ortaya çıkarılması için 1mm çevre dokulardan 7.gün doku örneği alınmıştır. Laminektomi yapılan gruplar için aynı bölgeye denk düşen doku örneği alınmıştır. Hayvanlardan alınan dokular hemen sıvı nitrojende dondurulup -80°C’de saklanmıştır. Alınan dokular proteomiks çalışmasında kullanılmıştır.

5.4.3.Cerrahi operasyon sonrası refleks testleri

Resim 5.4.1’de özetlenen cerrahi operasyon çalışmalarının başarısı canlılar anesteziden çıktığında yapılan refleks testleriyle doğrulanmıştır. Refleks testlerinde canlıların kuyruk ve arka uzuvları pens yardımıyla sıkıştırılarak, verdikleri tepkiler kayıt altına alınmıştır. Omurilik hasarı sonrası canlıların, hasarın yapıldığı bölgeden itibaren felç olması beklenmektedir. Bu durumda omurilik operasyonunun başarılı

olarak tanımlanabilmesi için operasyon sonrası arka uzuv ve kuyruk pens ile sıkıştırıldığında canlının tepki vermemesi beklenmemektedir. Bu testlerde hem omurilik hasarı hem de laminektomi öncesinde ve sonrasında canlıların tepkileri kontrol edilmiş, gözlemler kamera ile kayıt altına alınmıştır.

5.5.Toplanan örneklerden RNA ve protein izolasyonu

Doku örneklerinden protein kütüphanesinin hazırlanması ve protein dizi analizinin yapılması amacıyla protein izolasyonu yapılmıştır. Protein izolasyonu yapılacak örneklerden aynı zamanda RNA izolasyonu da yapılacağı için iki izolasyona beraber olanak tanıyan metodunun oturtulması denemeleri yapılmıştır. Bunun için ilk olarak neotenik ve metamorfik aksolot karaciğer ve omuriliği örneklerinden TRIzol Reagent (Thermo Fisher, Kat. No: 15596026) kullanılarak protein izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları ölçüldükten sonra TRIzol metodunun bu çalışma için uygun olduğuna karar verilmiştir. Bunu takiben laminektomi ve omurilik hasar grubu canlılarından toplanan doku örneklerinden TRIzol Reagent kullanılarak gerçekleştirilen protein izolasyonu üretici firmanın talimatları izlenmiştir. Tüm zaman dilimleri için doku örnekleri toplandıktan sonra protein izolasyonlarına başlanmıştır. -80°C'den çıkartılan doku örnekleri TRIzol içerisine aktarılmadan önce bozulmamaları için hemen sıvı nitrojen alınmıştır.

5.5.1.Mekanik parçalama/doku lizisi

Canlılardan toplanan örneklerden protein izole etmek için, örnekler öncelikle mekanik parçalanmıştır, mekanik parçalama için aşağıda belirtilen basamaklar takip edilmiştir;

- 1- Sıvı nitrojenden çıkarılan örnekler mekanik parçalanama için, deney gruplarında aynı zaman dilimine ait üç canlıdan alınan örnekler 1ml TRIzol Reagent içeren ependorf tüpe aktarılırken laminektomi grupları için toplanan tek canlıdan örnek 1 ml TRIzol içerisine aktarılmıştır.
- 2- Örnekler, çeker ocak altında 2.5 ml şırınga yardımıyla TRIzol içerisinde parçalanmış sonrasında da vorteksenerek iyice homojenize edilmiştir.

3- 5 dakika oda sıcaklığında bekletilen örneklerin üzerine 1 ml TRIzol için 200 µl kloroform eklenmiştir. Kloroform eklendikten sonra 15 saniye vortekslenen örnekler 2-3 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

4- İnkübasyon sonrası 4°C’ de 15000 x g ‘de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ependorf tüpte üç farklı faz oluşumu görülmüştür. Bu fazlardan üstteki berrak faz, dokudaki RNA’ları, ortadaki ara faz DNA’yı içerirken en alttaki organik faz ise protein ve lipidleri içermektedir.

5.5.2.RNA izolasyonu

Faz ayırımı sonrasında üstteki berrak faz alınarak RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir, RNA izolasyonu süresince aşağıdaki protokol izlenmiştir.

1- Yeni bir 1.5 ml’lik ependorf tüpe aktarılan üst faza, başlangıçta lizis için kullanılan 1 ml TRIzol’e 500 µl izopropanol olacak şekilde izopropanol eklenmiştir. Elde edilecek RNA miktarının arttırmak amacıyla 5 µl glikojen (Thermo Fisher, Kat. No.: R0551) eklenerek pipetleme yapılmıştır, 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir.

2- 4°C de 12000 x g’de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılarak, elde edilen pelletin üzerine 1ml Trizol için 1:1 oranında olacak şekilde 1 ml %75 EtOH konulmuştur.

3- Örnekler vortekslenmiş ve sonrasında da 4°C de 7500 x g’de 5 dakika santrifüj yapılmıştır.

4- Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmıştır, elde edilen RNA pelletinden EtOH’ı iyice uzaklaştırmak için tüp havada kurutulmuştur.

5- Pelleti üzerine 20 µl RNaz içermeyen su eklenerek pellet çözölmüştür. RNA konstrasyon ve saflık ölçümü için SpectraMax cihazında 230nm, 260nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçölmüştür. RNA bütönlüğünü göstermek için örnekler agaroz jel elektroforezine tabi tutulmuştur. Agaroz jel elektroforezi ve konsantrasyon ölçümü sonrası RNA örnekleri -80°C’de saklanmıştır.

5.5.3.Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi için 1X TAE Buffer içinde 100 ml %1’lik agaroz jel hazırlanmış içörisine 5 µl SYBR Safe (Thermo Fisher, Kat. No.: S33102) eklenerek

jel dökülmüş ve donması beklenmiştir, donduktan sonra elektroforez tankına aktarılan jelin üzerine maksimum seviyeye kadar 1X TAE Buffer konulmuştur. Marker olarak Quick-Load Purple 2-Log DNA Ladder (NEB, Kat. No.: N0550S) kullanılmıştır ve örnekler 6X Purple Gel Loading Dye (NEB, Kat. No.: B7025S) ile karıştırılarak jele yüklenmiştir. Örnekler, 80V ve 400mA'de 45 dakika boyunca yürütülmüş ve ChemiDoc cihazında Image Lab™ (Bio-Rad) programı kullanılarak görüntülenmiştir.

5.5.4. Protein izolasyonu

Kloroform ayrımı sonrası RNA'yı içeren üst faz uzaklaştırıldıktan sonra tüpte kalan ara faz ve organik (fenol-kloroform) faz DNA ve protein izolasyonu için kullanılır. Bu çalışmada protein izolasyonunu gerçekleştirmek için önce DNA çöktürülerek uzaklaştırılmış daha sonra protein izolasyonuna başlanmıştır. Protein izolasyonu için üretici firmanın önerdiği protokol takip edilmiştir, önerilen protokolün basamakları aşağıda belirtildiği gibidir;

- 1- Ara fazın üzerindeki berrak faz tamamen uzaklaştırılıp, tüpte sadece ara ve organik faz bırakılmıştır.
- 2- En baştan lizis için kullanılan 1 ml TRIzol için 300 µl %100 EtOH tüpe eklendikten sonra tüp birkaç kere ters çevrilerek karıştırılmıştır.
- 3- Oda sıcaklığında 2-3 dakika inkübe edilen örnekler 4°C de 2000 x g'de 5 dakika santrifüj yapılarak DNA pelleti çöktürülmüştür. Fenol-etanol süpernatantı ise 15 ml'lik falkon tüpe aktararak protein izolasyonuna devam edilmiştir.
- 4- Proteinleri çöktürmek için falkon tüp içerisindeki fenol-etanol süpernatantına 1.5 ml izopropanol eklenerek, 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- 5- İnkübasyon sonrası da 4°C de 12000 x g'de 10 dakika santrifüj yapılarak protein pelleti elde edilmiştir.
- 6- Süpernatant tamamen uzaklaştırılmıştır ve pellet üzerine %95 EtOH içerisinde taze hazırlanmış 0.4 M üreden 2 ml eklenmiş ve oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilip, 4°C de 7500 x g'de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonra süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bu işlem iki kere daha 0.4 M üre ile tekrarlandıktan sonra bir kere de %100 EtOH ile tekrarlanarak protein pelletine yıkama yapılmıştır.
- 7- %100 EtOH yıkamasında sonra süpernatant uzaklaştırılınca, protein pelleti EtOH tamamen uzaklaştırmak için 5-10 dakika boyunca havada kurutulmuştur.

8- Etanol uzaklaştırılınca protein pelleti üzerine 200 µl %1 SDS eklenerek, çözündürülmüştür (Pelletin tamamen çözünmesi için %1 SDS eklendikten sonra 50°C 'de 5-7 dakikalık inkübasyonla sağlanmıştır).

9- Pellet tamamen çözündükten sonra 4°C de 1000 x g'de 10 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası supernatant yeni bir 1.5 ml'lik tüpe aktarılmış ve konsantrasyonları ölçüldükten sonra proteom çalışmasına kadar -80°C'ye kaldırılmıştır.

10- Elde edilen proteinlerin konsantrasyonları Qubit 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher, Kat. No.: Q33216) kullanılarak ölçülmüştür.

5.5.5.Qubit 3.0 Fluorometer ile protein konsantrasyonunun ölçümü

Qubit 3.0 Fluorometer ile protein konsantrasyonlarının ölçümü üretici firmanın talimatları takip edilerek, aşağıda belirtilen protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir;

1- 1 µl Qubit Protein Reagent ile 199 µl Qubit Protein Buffer ile vortekslenerek karıştırılır (Total örnek sayısı ve standartlar için kullanılacak hacim kadar solüsyon hazırlanır).

2- Üç standart için ayrı tüplerde, total hacmi 200 µl olacak şekilde 190 µl solüsyon 10 µl standart ile vortekslenerek karıştırılır ve 15 dakika karalık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilir.

3- Örneklerden ise 198 µl solüsyon 2 µl protein ile vortekslenerek karıştırılır ve 15 dakika karalık ortamda oda sıcaklığında inkübe edilir.

4- İnkübasyon sonrası önce standartlar sonra örneklerin cihazda okutularak proteinlerin konsantrasyon ölçümleri yapılır.

Özetle TRIzol kullanılarak başlatılan mekanik parçalama ve RNA izolasyonu için RNA'ları içeren üst fazın alınmasından sonra kalan ara ve organik var protein izolasyonu için kullanılmıştır. Protein izolasyonu için önce ara fazdaki DNA içeriği presipite edilmiş süpernatantta kalan protein içeriği ile izolasyona devam edilmiştir. Protein izolasyonu sonrasında Qubit 3.0 Fluorometer cihazı kullanılarak protein konsantrasyonları ölçülmüştür. Elde edilen konsantrasyon değerleri Tablo 4.'te gösterilmiştir.

5.6. Protein kütüphanesinin oluşturulması ve protein dizi analizi

İzole edilen protein örneklerinden protein kütüphanesinin oluşturulması ve protein dizi analizinin yapılabilmesi için, örnekler FASP (Filter Aided Sample Preparation - Filtre Yardımlı Örnek Hazırlama) yöntemi kullanılarak cihaza yüklemeye hazır hale getirilmiştir. Bu yöntemi gerçekleştirmek için FASP™ Protein Digestion Kit (expedon, Kat.No. 44250) kullanılmıştır ve örnekler aşağıda belirtildiği gibi üretici firmanın önerdiği protokol takip edilerek hazırlanmıştır.

- 1- İzole edilen 200µl'lik protein örneklerinin tamamına 250 µl UPX ve 5µl proteaz inhibitör karışımı eklenerek, pipedaj yapılarak karıştırılır.
- 2- Örnekler 100°C 600 rpm'de 10 dakika çalkalayıcı kullanılarak karıştırılır.
- 3- Çalkalama sonrasında 4°C'de 1 saat boyunca inkübe edilir.
- 4- İnkübasyon sonrasında örnekler 16.000 xg 'de 10 dakikda santrifüjlenir ve süpernatant LoBind tüplere aktarılır.
- 5- Qubit 3.0 Fluorometer ile protein konsantrasyonları tayin edilir.
- 6- Protein konsantrasyon tayini sonrasında tüm örnekler final konsantrasyonu 50µg/30µl olacak şekilde hazırlanır.
- 7- Hazırlanan örnekler kullanılan kitin içindeki filtreli FASP tüplerine aktarılır ve üzerine 200µl üre ilave edilerek 14.000 xg'de 15 dakika santrifüjlenir.
- 8- Santrifüj sonrası filtre üzerine tekrar üzerine 200µl üre ilave edilerek 14.000 xg'de 15 dakika santrifüj işlemi tekrarlanır.
- 9- Toplama tüpündeki süpernatant uzaklaştırılır, filtrenin üzerine 10 µl iyodoasetamid ve 90 µl üre eklenir 1 dakika 250 rpm'de çalkalanarak karıştırılır ve sonrasında 20 dakika boyunca karanlıkta inkübe edilir.
- 10- İnkübasyon sonrası örnek üzerine 100 µl üre eklenerek 15 dakika boyunca santrifüj edilir, bu işlem toplam 3 kere tekrarlanır.
- 11- Santrifüjler sonrasında tüpte toplanan sıvı kısım uzaklaştırılır, filtreye 100µl 50mM amonyum bikarbonat eklenerek 14.000 xg'de 15 dakika santrifüj yapılır, bu işlem toplamda 3 kere tekrarlanır.
- 12- Örnek üzerine 75µl digestion solüsyonu eklenir, tüpün her tarafı hava almayacak bir şekilde parafilm ile sarılarak 37°C 'lik etüvde bir gece inkübasyona kaldırılarak tripsinizasyon gerçekleştirilir.

- 13- Tripsinizasyon sonrasında filtre yeni bir tüpe aktarılır ve üzerine 100µl amonyum bikarbonat eklenerek 14.000 x g 15 dakika iki defa santrifüj edilir.
- 14- Tüpteki sıvı kısım uzaklaştırılmadan filtreye 50 µl sodyum klorür eklenerek 14.00 xg'de 15 dakika santrifüj edilir.
- 15- Santrifüj sonrası filtre atılır, elde edilen peptid örneklerini konsantre hale getirmek için liyofilizasyon yapılır. Örnekler sıvı nitrojen içine daldırılarak hemen dondurulur ve liyofilizatöre konarak, iki gün boyunca liyofilizasyona tabi tutulur.
- 16- Liyofilizasyon sonrası %0.1 formik asit çözeltisinden 20 µl eklenerek konsantrasyonu ölçülen örnekler, final konsantrasyonu 100ng/µl olacak şekilde %0.1 formik asitte hazırlandıktan sonra cihaza yüklenir.

Nano akış sıvı kromatografisinin (UPLC), elektrospray iyonizasyon-kuadrupol uçuş zamanı (ESI-QTOF) kütle spektrometresi ile birleştirilmesi protein ifade farklılıklarının derinlemesine analiz edilebileceği ileri bir proteomik araştırmalar platformu meydana getirmektedir. Teknolojik yenilikler ile birlikte gelişen proteomik metodolojiler, protein ifade farklılıklarının analiz edilmesini mümkün kılmaktadır. Karmaşık protein örneklerinin analiz edilebilmesi için kütle spektrometresi analizi öncesinde çeşitli yöntemler ile ayrıştırılmaları yani analiz edilen karışımın basitleştirilmesi gerekmektedir. Total protein ekstraktları tek bir seferde kütle spektrometresine verilmiş olsaydı, yüksek miktardaki proteinler düşük miktarda bulunan proteinleri maskeleyecek ve tanımlamanın kısıtlı olmasına neden olabilecektir. Bu sorunu çözmek için de 1D ters faz kromatografisi (1D-RP) bütün protein örnekleri için kullanılmıştır. Bu kromatografik yöntemde peptitler, C₁₈ kolon dolgu maddesine karşı göreceli hidrofobik etkileşimlerine dayanarak farklı zamanlarda kolondan çıkmaktadırlar. Bu metotta peptit örnekleri öncelikle tuzak kolon adı verilen 2 cm'lik C₁₈ kolonunda alıkonur ve ardından nano pompa ile oluşturulan asetonitril gradienti ile tuzak kolondan ayrılan peptitler C₁₈ analitik kolonunda hidrofobik etkileşimler ile ayrıştırılarak kolondan çıkmaktadır. Peptit karışımının karmaşıklık derecesi göz önüne alınarak, farklı uzunlukta nano kolonlar kullanılmaktadır. MS analizi kütle spektrometresi ile peptitlerin bütünü hakkında bilgi toplamak için gerçekleştirilirken, MS/MS analizi ise peptitlerin amino asit dizi bilgisi bulunmuştur. Peptitlerin analizi için iki farklı metot kullanılmıştır. Birincisi Waters'ın MS^E sistemi diye adlandırılan ve SYNAPT-HDMS sisteminde önce 5 eV daha sonra

25-40 eV çarpışma enerjisindeki analiz yöntemidir. Bu yöntemde her bir çarpışma enerjisinde 1.5 s kadar veri toplanmakta ve belirli m/z aralığında olan peptitler taranarak, hem peptidin bütünü hakkında hem de amino asit sekansı hakkında daha fazla bilgi alınmaktadır.

Bu tez kapsamında da LC-MS^E teknolojisi kullanılmıştır, bu teknolojiye doku örneklerinden ekstrakte edilen proteinler tripsin ile parçalandıktan sonra bir boyutlu ters faz (RP) kromatografik ayırıştırma yönteminden sonra peptit ağırlığının belirlenmesi için MS denilen analiz gerçekleştirilmiştir ve ardından MS/MS yöntemiyle amino asit sekansı belirlenmek için kullanılmıştır. Waters Synapt G2-Si Q-TOF cihazına yüklenen örnekler, hem 120 hem de 180 dakikalık okumalar 3 kere tekrarlanmıştır ve elde edilen veriler Masslynx, Version 4.1 yazılımı kullanılarak gösterilmiştir. LC-MS metodoloji kullanılarak ayrılan proteinler, protein kütüphanesi oluşturulduktan sonra VENNY 2.1. (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>) çevrimiçi platformu kullanılarak bir örnek başına yapılan üç ayrı okumada ortak tanımlanan protein sayısına bakılmıştır. Bu proteinler üzerinden gen ontoloji analizi PANTHER Version 13.1. sınıflandırma sistemi kullanılarak yapılmıştır.

6.BULGULAR

6.1.Aksolotların metamorfoza indüklenmesi

Neotenik aksolotlar iki aylık süre boyunca sularına T₄ katılarak metamorfoza indüklenmiştir. İki aylık süreç boyunca canlılarda gözlemlenen morfolojik değişiklikler Resim 6.1’de özetlendiği gibidir.



Resim 6.1. Aksolot metamorfozu. İki aylık bir süreç boyunca yaşadığı ortama T₄ ilavesiyle metamorfozu indüklenen aksolotta meydana gelen morfolojik değişimler görüntülenmiştir. İlk iki haftadan sonra görülmeye başlayan morfolojik değişimler; solungaçların ve dorsal kuyruk yüzgecinin kaybolması, canlıda görülen kilo kaybı, göz kapaklarının belirginleşmesi olarak özetlenebilir (109).



Resim 6.2. Aksolotta metamorfoz direnci. Bir adet, iki aylık T₄ uygulamasının sonunda aksolot kuyruk yüzgecini kaybettiği halde solungaçlarını kaybetmemiştir.

6.2.Omurilik hasar modeli sonrası refleks testleri

Cerrahi operasyonlar sonrasında yapılan cerrahi müdahalenin başarısını göstermek için canlıların kuyruk ve arka uzuv refleksleri operasyonu takiben canlılar anesteziiden çıktıktan sonra kontrol edilmiştir. Canlıların verdiği refleks yanıtları Tablo 6.2’de gösterilmektedir.

Tablo 6.2. Neoteonik ve Metamorfik Aksolot Refleks Yanıtları

Operasyon Grubu	Örnek zaman dilimi	Operasyon Öncesi	Operasyon Sonrası
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	0.saat	+	-
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	6.saat	+	-
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	12.saat	+	-
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	24.saat	+	-
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	4.gün	+	-
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	7.gün	+	-
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	0.saat	+	-
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	6.saat	+	+
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	12.saat	+	+
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	24.saat	+	+
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	4.gün	+	+
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	7.gün	+	+
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	0.saat	+	-
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	6.saat	+	-
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	12.saat	+	-
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	24.saat	+	-
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	4.gün	+	-
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	7.gün	+	-
Metamorfik Aksolot Kon Laminektomi Grubu	0.saat	+	-
Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu	6.saat	+	+
Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu	12.saat	+	+
Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu	24.saat	+	+
Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu	4.gün	+	+
Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu	7.gün	+	+

6.3.Omurilik hasar modeli sonrası metamorfik aksolotlar

Omurilik hasarı operasyonlarında sonra metamorfik aksolotların abdomen bölgesinde şişkinlik gözlemlenmiştir.

A)



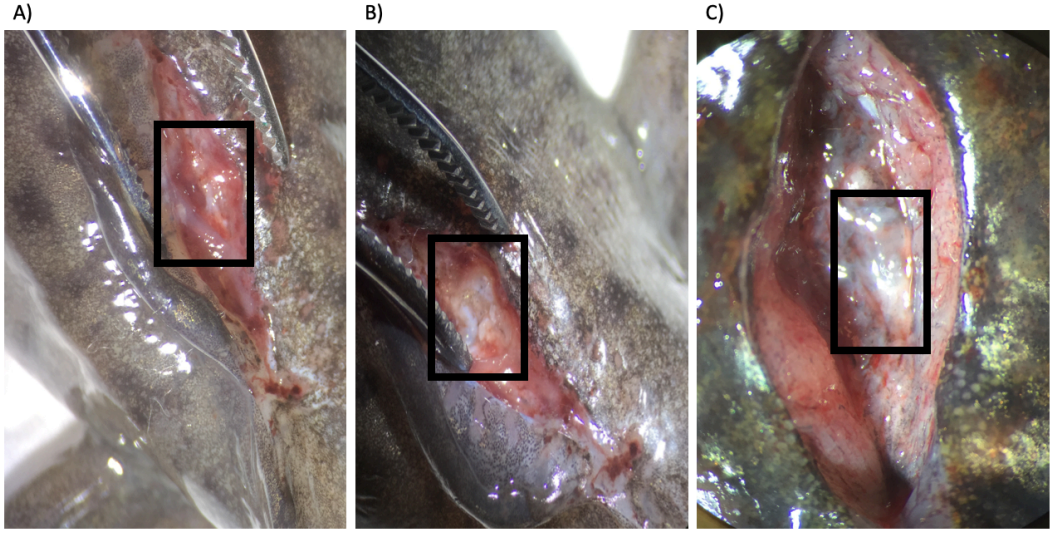
B)



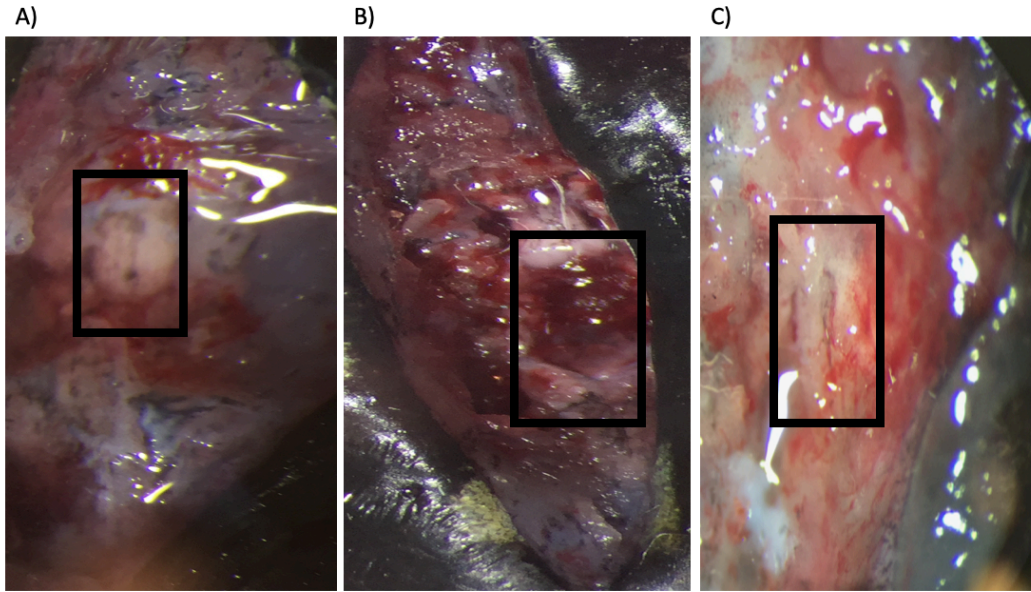
Resim 6.3. Metamorfik aksolotta omurilik hasarı sonrası görülen değişimler. A) Cerrahi operasyonlar öncesi metamorfik aksolot. B) Cerrahi operasyondan 45gün sonra metamorfik aksolot.

6.4.Omurilik hasar modeli sonrası omurilik rejenerasyon

Neotenik ve metamorfik aksolotlar üzerinde yapılan omurilik hasarı sonrası, hem neotenik aksolotlar (Resim 6.4.1.) hem de metamorfik aksolotlar (Resim 6.4.2.) hasar sonrası omuriliği rejenere etmiştir.



Resim 6.4.1. Neotenik aksolotta hasar sonrası omurilik rejenerasyonu. A) Omurilik hasar operasyonu öncesi omurilik. B) Omurilik hasar operasyonu sonrası omuriliği çıkartılmış omurganın görünümü C) Neotenik aksolotta omurilik hasar operasyonundan bir ay sonra rejenere olan omurilik.



Resim 6.4.2. Metamorfik aksolotta hasar sonrası omurilik rejenerasyonu A) Omurilik hasar operasyonu öncesi metamorfik aksolotta omurilik B) Omurilik hasarı sonrası omuriliği çıkartılmış omurganın görünümü. C) Metamorfik aksolotta omurilik hasar operasyonundan bir buçuk ay sonra rejenere olan omurilik.

6.5.RNA konsantrasyonları

24 farklı örnekten TRIzol kullanılarak izole edilen RNA'ların konsantrasyonları Tablo 6.3.'teki gibidir.

Tablo 6.5. Neoteonik ve Metamorfik Aksolot RNA Konsantrasyonları

<i>Operasyon Grubu</i>	<i>Örnek zaman dilimi</i>	<i>A260/A280</i>	<i>Konsantrasyon (ng/μl)</i>
<i>Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	0.saat	1.6	154 ng/μl
<i>Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	6.saat	1.8	159 ng/μl
<i>Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	12.saat	1.5	138 ng/μl
<i>Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	24.saat	1.7	147 ng/μl
<i>Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	4.gün	2.0	133.5 ng/μl
<i>Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	7.gün	1.8	69 ng/μl
<i>Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	0.saat	2.2	141 ng/μl
<i>Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	6.saat	1.3	31 ng/μl
<i>Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	12.saat	1.9	55 ng/μl
<i>Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	24.saat	1.7	94.6 ng/μl
<i>Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	4.gün	2.0	56 ng/μl
<i>Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	7.gün	1.9	95 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	0.saat	2.2	131 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	6.saat	2.3	79 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	12.saat	2.0	123 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	24.saat	2.5	265 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	4.gün	2.4	240 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu</i>	7.gün	2.1	172.5 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	0.saat	1.8	76 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	6.saat	1.3	68.6 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	12.saat	1.9	55 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	24.saat	1.7	125 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	4.gün	1.6	61 ng/μl
<i>Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu</i>	7.gün	1.8	179 ng/μl

6.6.Agaroz jel elektroforezi

İzolen edilen RNA örneklerine ait jel görüntüsü Şekil 6.3.'de gösterilmektedir.



Şekil 6.6. TRIzol ile izole edilen RNA örneklerinin agaroz jel görüntüsü. M: Marker, 1: Neotenik OH 0.saat, 2:Neotenik OH 6.saat, 3:Neotenik OH 24.saat, 4:Neotenik OH 4.gün, 5:Neotenik Lami 0.saat, 6:Metamorfik OH 0.saat, 7:Metamorfik OH 12.saat, 8:Metamorfik OH 24.saat, 9:Metamorfik OH 4.gün, 10:Metamorfik OH 7.gün, 11:Metamorfik Lami 24.saat, 12:Metamorfik Lami 7.gün (OH: Omurilik Hasarı, Lami: Laminektomi) Diğer örneklerin konsantrasyonu düşük olduğu agaroz jelle yüklenmemiş için sadece konsantrasyonları yüksek olan 12 örnek seçilerek agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir.

6.7.Protein konsantrasyonları

Protein izolasyonu sonrasında Qubit 3.0 Fluorometer cihazı kullanılarak ölçülen protein konsantrasyonları Tablo 6.4'te belirtildiği gibidir.

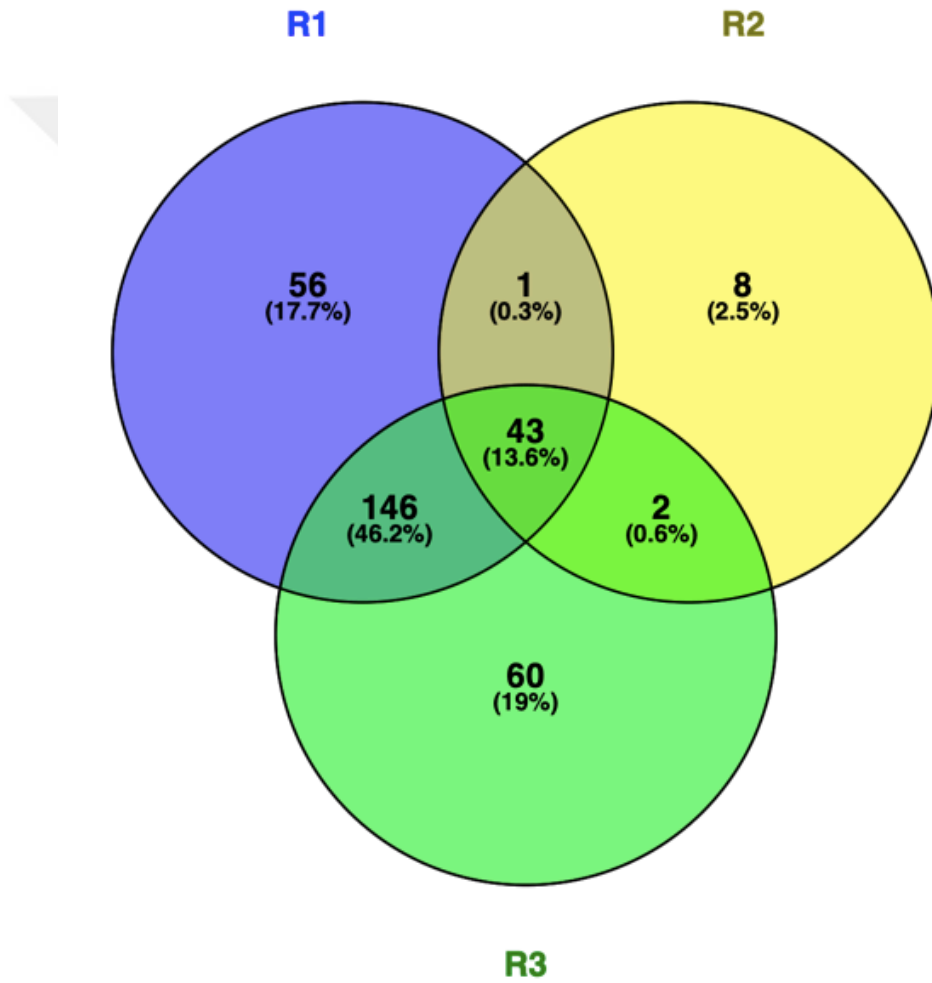
Tablo 6.7. Neoteonik ve Metamorfik Protein Konsantrasyon Sonuçları

Operasyon Grubu	Örnek zaman dilimi	Konsantrasyon (µg/ml)
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	0.saat	291 µg/ml
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	6.saat	268 µg/ml
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	12.saat	346 µg/ml
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	24.saat	269 µg/ml
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	4.gün	206 µg/ml
Neoteonik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	7.gün	186 µg/ml
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	0.saat	134 µg/ml
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	6.saat	184 µg/ml
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	12.saat	260 µg/ml
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	24.saat	230 µg/ml
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	4.gün	165 µg/ml
Neoteonik Aksolot Laminektomi Grubu	7.gün	434 µg/ml
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	0.saat	264 µg/ml
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	6.saat	343 µg/ml
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	12.saat	312 µg/ml
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	24.saat	289 µg/ml
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	4.gün	342 µg/ml
Metamorfik Aksolot Omurilik Hasarı Grubu	7.gün	336 µg/ml
Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu	0.saat	179 µg/ml
Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu	6.saat	297 µg/ml
Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu	12.saat	166 µg/ml
Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu	24.saat	406 µg/ml
Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu	4.gün	259 µg/ml
Metamorfik Aksolot Laminektomi Grubu	7.gün	313 µg/ml

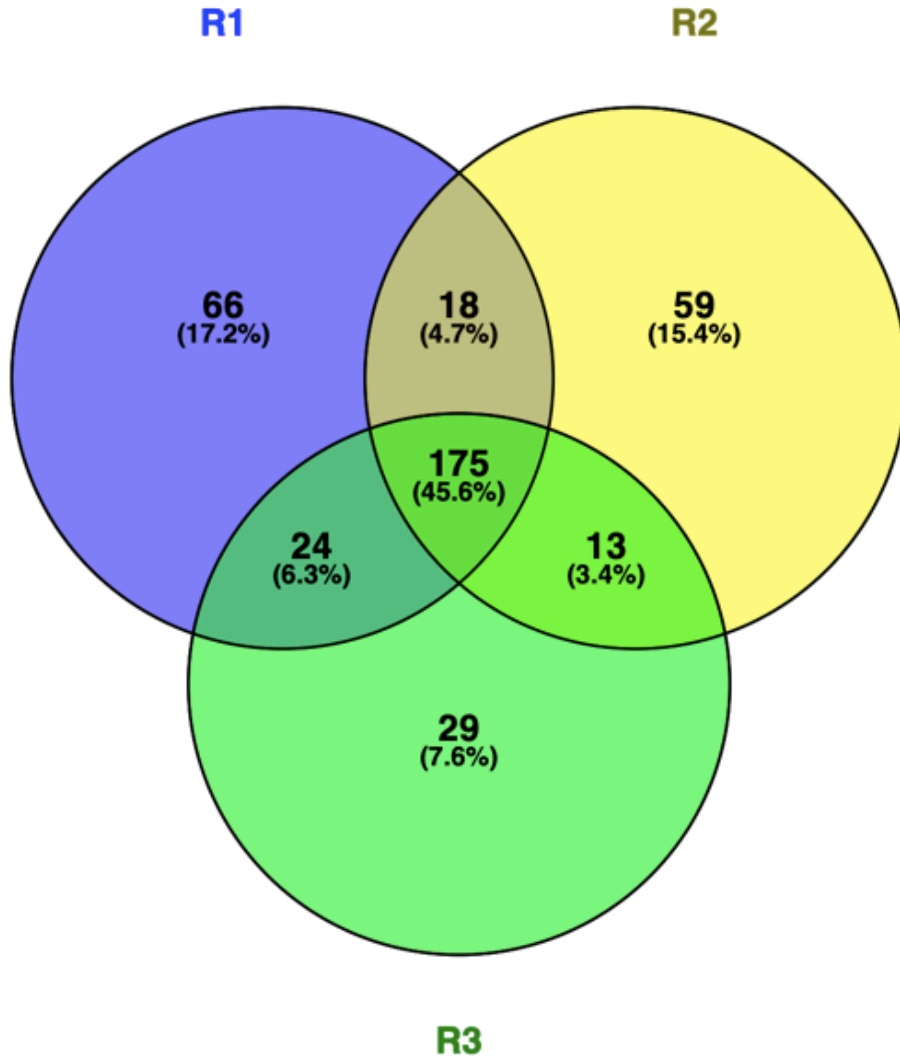
6.8. Proteom dizi analizi

6.8.1.Venn diyagramları

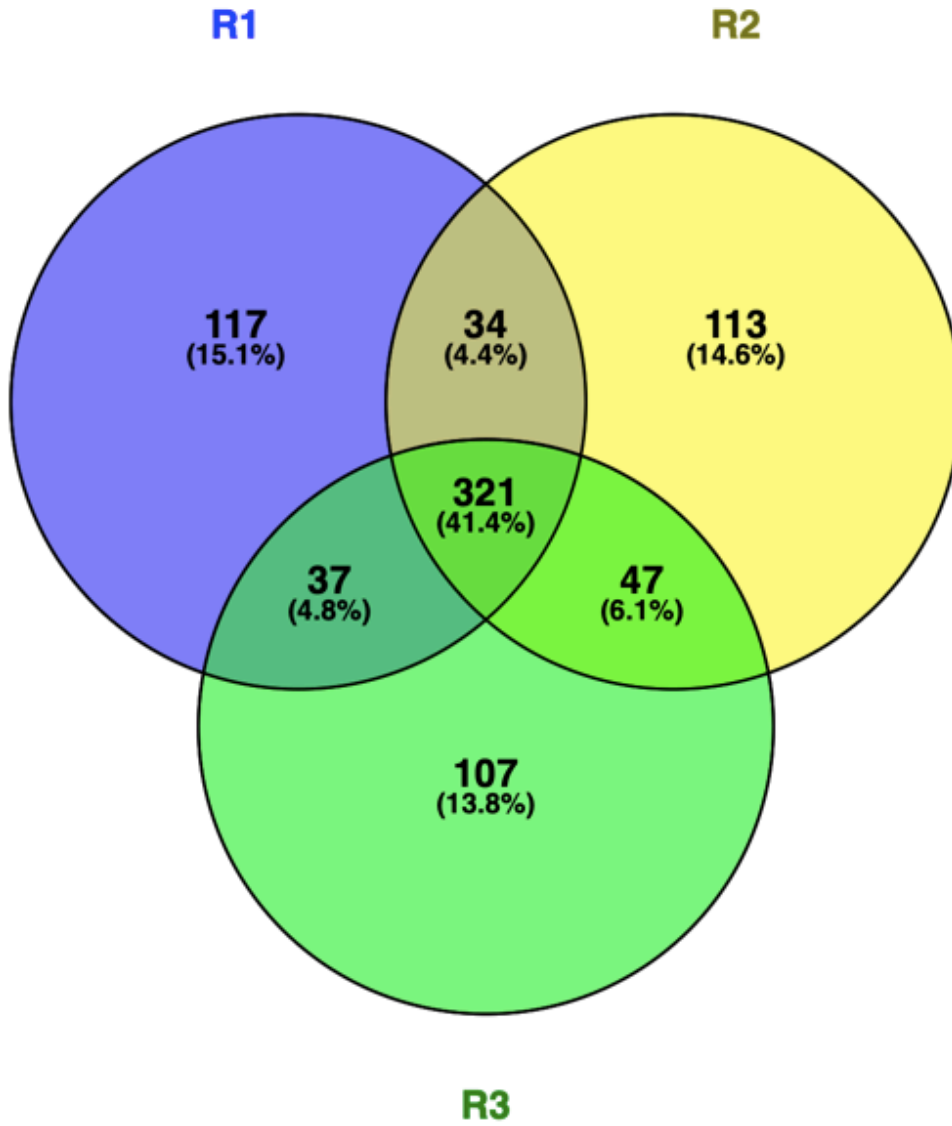
Proteom dizi analizi optimizasyon çalışması için neotenik aksolottan alınan dokudan TRIzol kullanılarak protein izolasyonu ve FASP ile örnek hazırlığı gerçekleştirilen numunelerin üç tekrarlı olacak şekilde 120 dakika (TRIzol-FASP 120 dakika) ve 180 dakika (TRIzol-FASP 180 dakika) okuma programları seçilerek yapılan çalışmada tanımlanan protein miktarları sırasıyla Şekil 6.8.1.1. ve Şekil 6.8.1.2.'de gösterilmektedir. Sadece FASP protokolü kullanılarak hazırlanan örneklerin 180 dakikalık örnek analiz (FASP 180 dakika) sonucu ise Şekil 6.8.1.3.'te gösterilmektedir.



Şekil 6.8.1.1. TRIzol-FASP 120 dakika üç tekrarlı okuma sonuçları. VENNY 2.1. yazılımı kullanılarak Venn diyagramı üzerinde okuma başına tanımlanan ortak protein sayıları gösterilmektedir. Aynı örnekten üzerinde yapılan 120 dakikalık üç okumada tanımlanan ortak protein miktarı 43, toplam protein miktarı ise 316'dır (TRIzol-FASP 120 dakika: TRIzol ile protein izolasyonu ve FASP protokolü ile örnek hazırlığı gerçekleştirilen neotenik aksolot dokusunun 120 dakikalık okuma programında yapılan analizi).



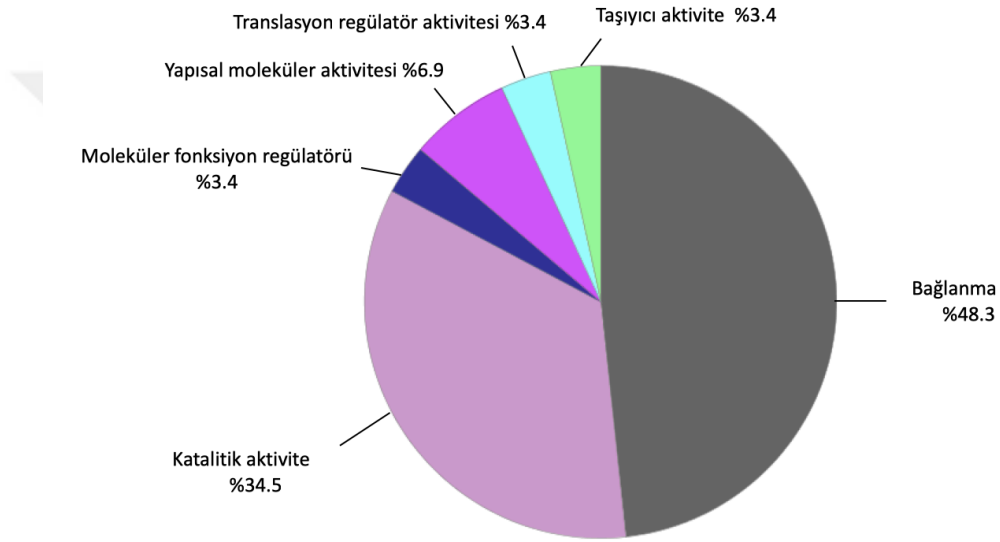
Şekil 6.8.1.2. TRIzol-FASP 180 dakika üç tekrarlı okuma sonuçları. VENNY 2.1. yazılımı kullanılarak Venn diyagramı üzerinde okuma başına tanımlanan ortak protein sayıları gösterilmektedir. Aynı örnekten üzerinde yapılan 180 dakikalık üç okumada tanımlanan ortak protein miktarı 175, toplam protein miktarı ise 384'tür (TRIzol-FASP 180 dakika: TRIzol ile protein izolasyonu ve FASP protokolü ile örnek hazırlığı gerçekleştirilen neotenik aksolot dokusunun 120 dakikalık okuma programında yapılan analizi).



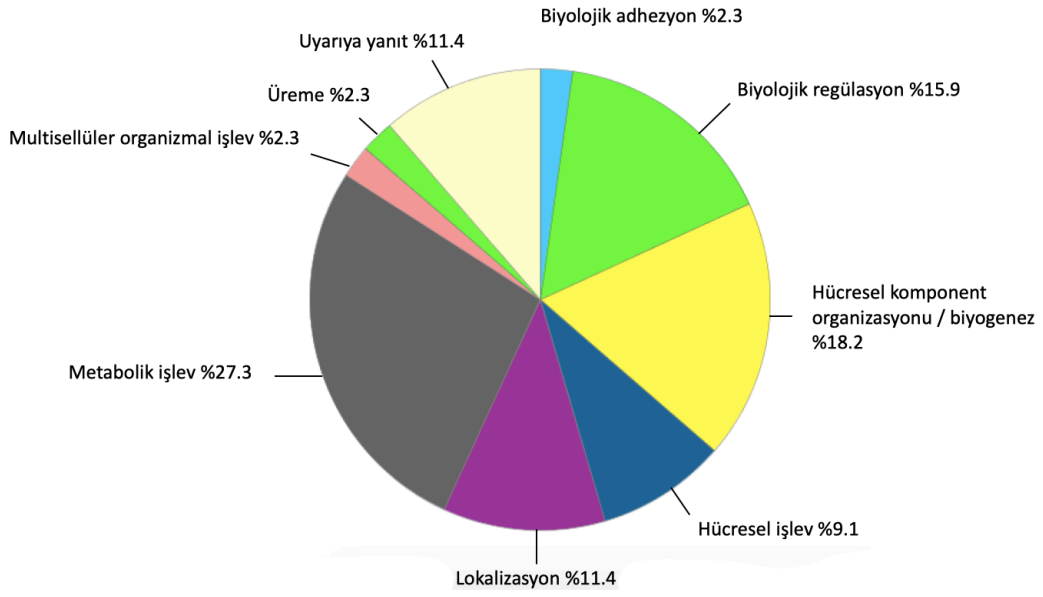
Şekil 6.8.1.3. FASP 180 dakika üç tekrarlı okuma sonuçları. VENNY 2.1. yazılımı kullanılarak Venn diyagramı üzerinde okuma başına tanımlanan ortak protein sayıları gösterilmektedir. Aynı örnekten üzerinde yapılan 180 dakikalık üç okumada tanımlanan ortak protein miktarı 321, toplam protein miktarı ise 776'dır (FASP 180 dakika: FASP protokolü takip edilerek protein izolasyonu ve örnek hazırlığı yapılan neotenik aksolot dokusunun 180 dakikalık okuma programında yapılan analiz sonuçları).

6.8.2.Gen ontoloji analizi

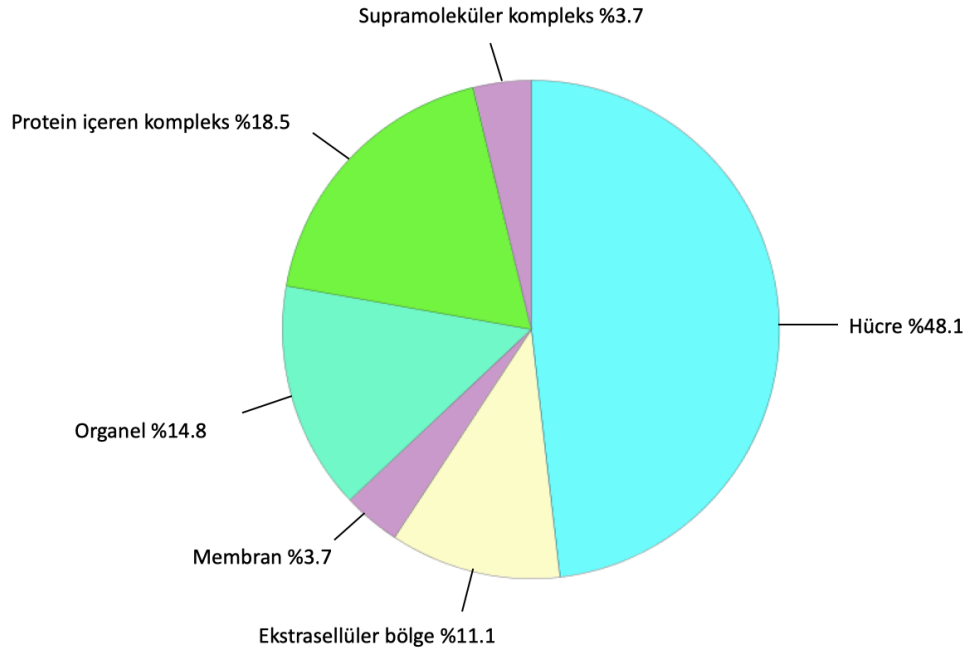
Venn diyagramları oluşturulduktan sonra bir örnek üzerinde yapılan üçlü okumalarda ortak olarak tanımlanan proteinler seçilerek, aksolotta tanımlanan bu proteinlerin tekrarsız fare (*Mus musculus*) ortologları NCBI üzerinden BLASTP kullanılarak bulunması ardından bulunan referansların PANTHER veri tabanına yüklenip sınıflandırma analizi yapılmıştır. Gen ontoloji analizleriyle proteinler, moleküler fonksiyonlarına (Şekil 6.8.2.1, Şekil 6.8.2.4. ve Şekil 6.8.2.7.), biyolojik işlevlerine (Şekil 6.8.2.2., Şekil 6.8.2.5. ve Şekil 6.8.2.8.) ve hücresel bileşenlerine (Şekil 6.8.2.3., Şekil 6.8.2.6. ve Şekil 6.8.2.9.) göre ayrılmıştır.



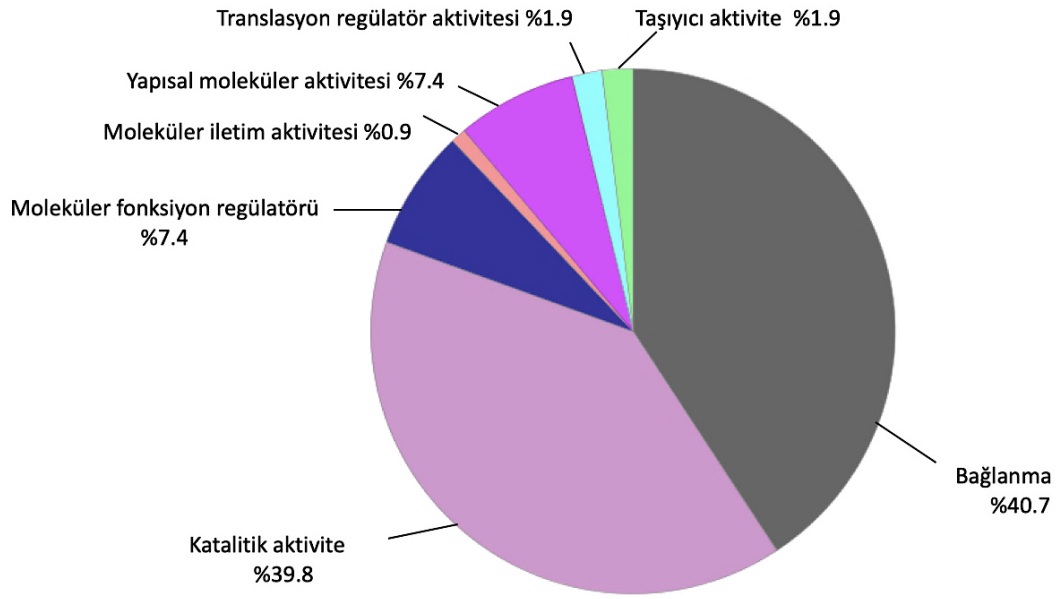
Şekil 6.8.2.1. TRIZOL-FASP 120 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre ayırım grafiği.



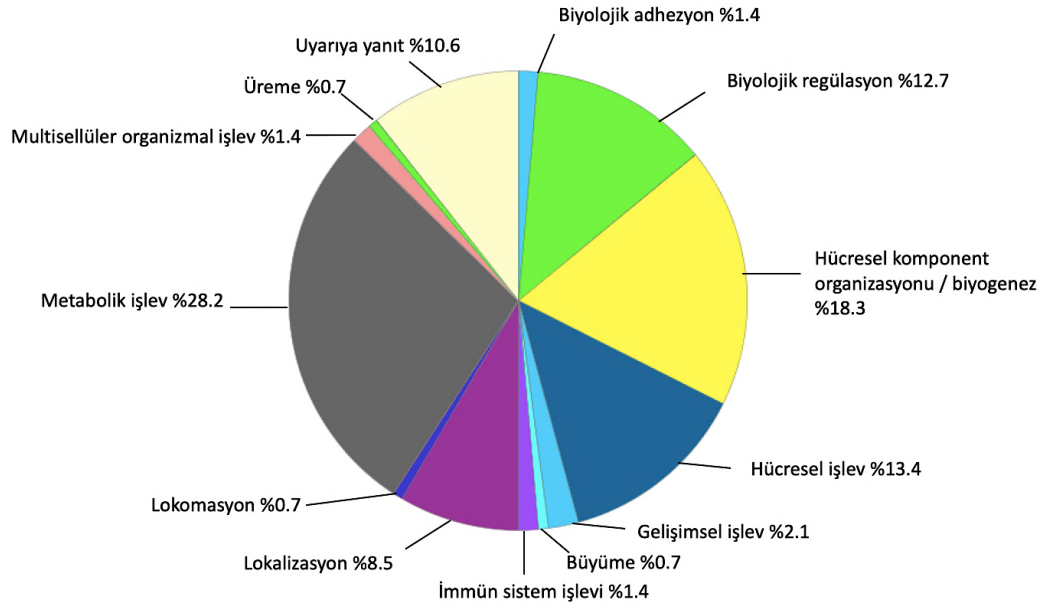
Şekil 6.8.2.2. TRIzol-FASP 120 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin biyolojik işlevlerine ayırım grafiği.



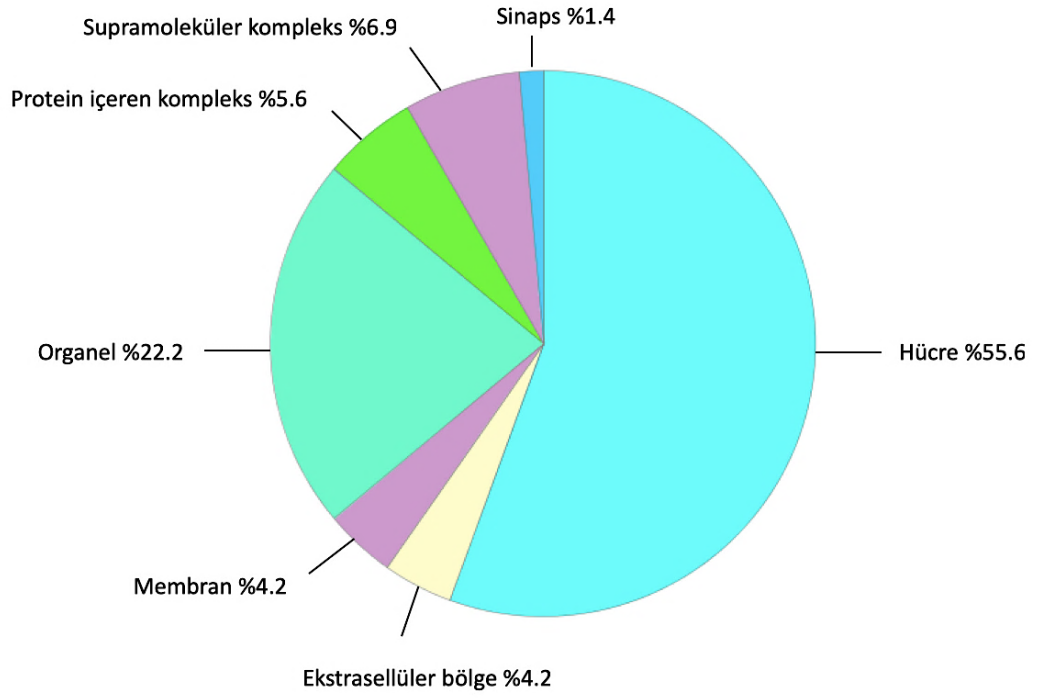
Şekil 6.8.2.3. TRIzol-FASP 120 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin hücresel bileşenlerine göre ayırım grafiği.



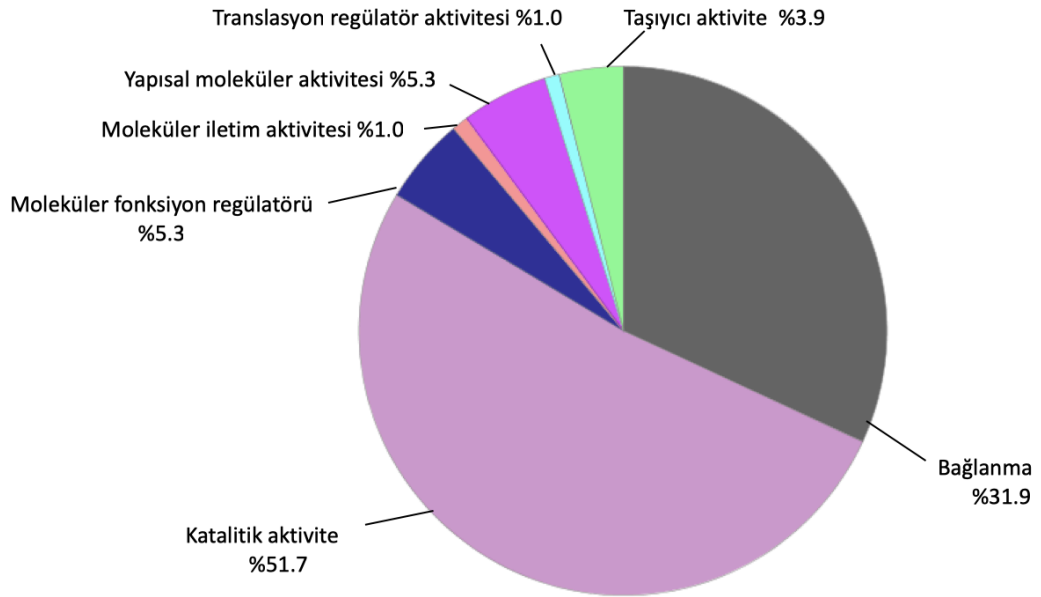
Şekil 6.8.2.4. TRIZOL-FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre ayırım grafiği.



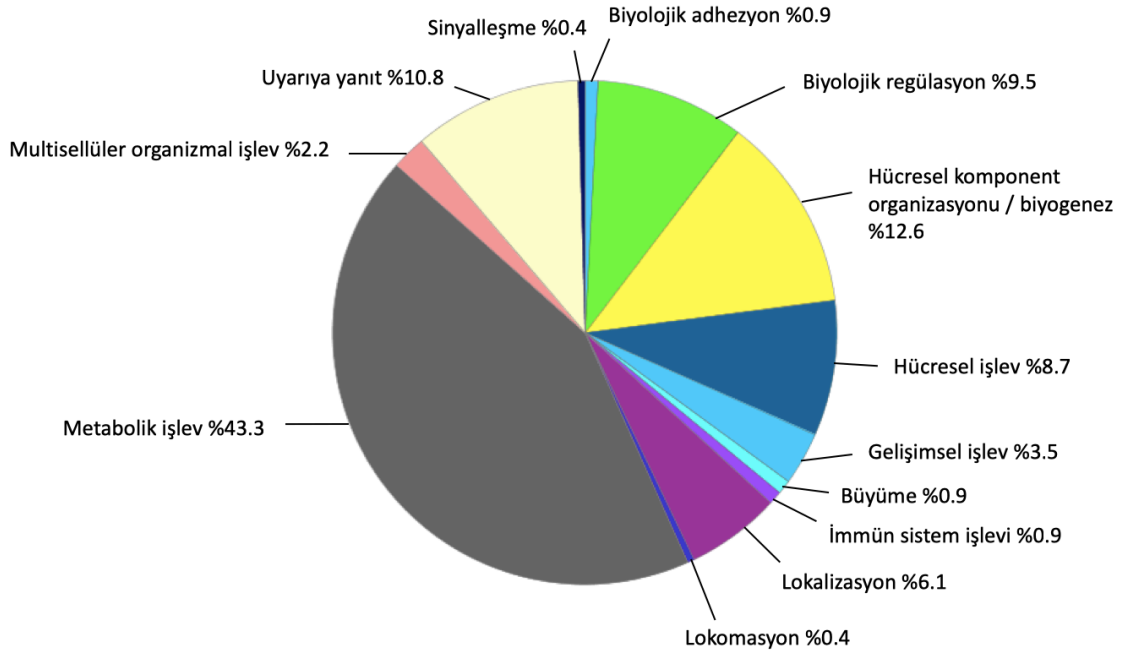
Şekil 6.8.2.5. TRIZOL-FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin biyolojik işlevlerine ayırım grafiği.



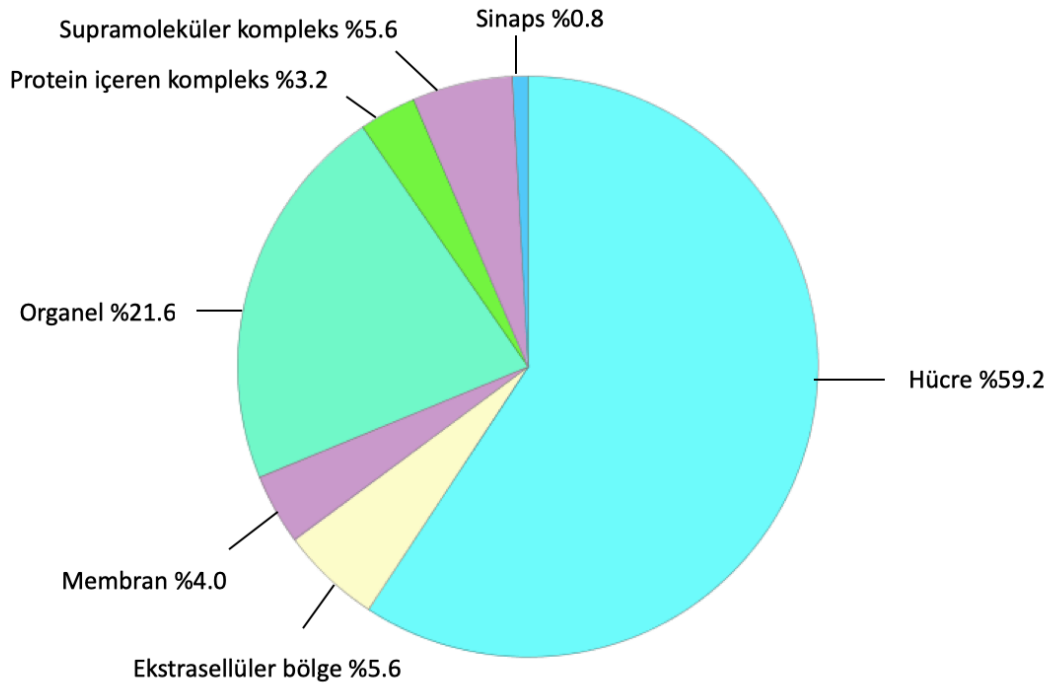
Şekil 6.8.2.6. TRIzol-FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin hücresel bileşenlerine göre ayırım grafiği



Şekil 6.8.2.7. FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre ayırım grafiği.



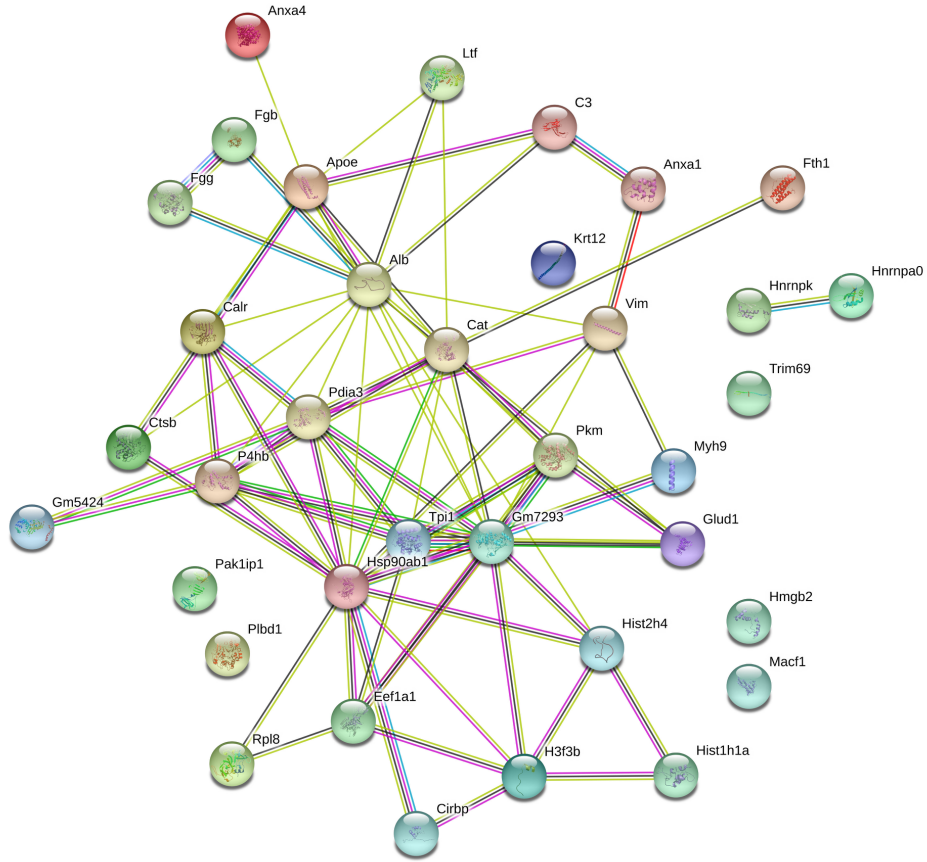
Şekil 6.8.2.8. FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin biyolojik işlevlerine göre ayırım grafiği.



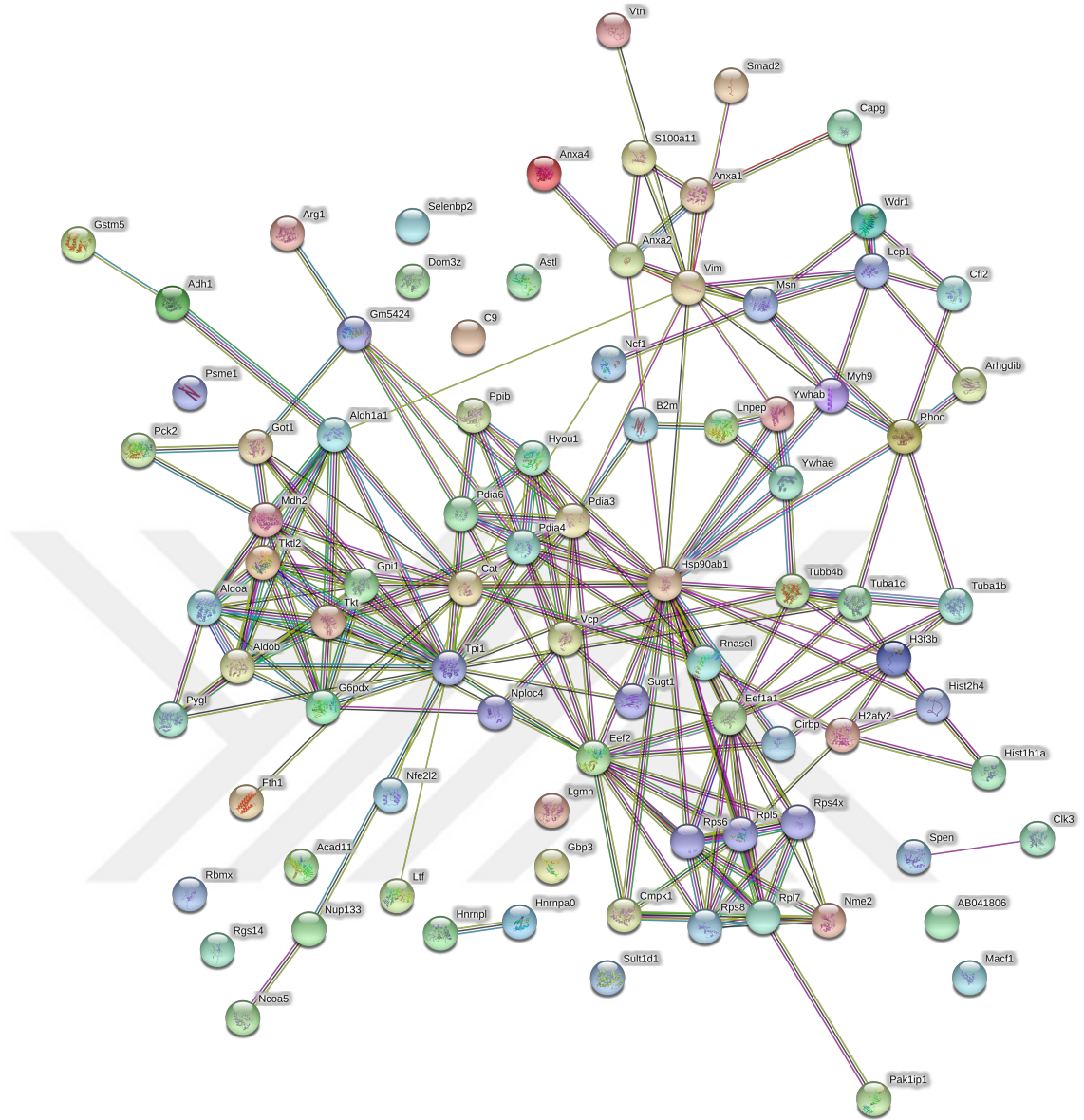
Şekil 6.8.2.9. FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin hücresel bileşenlerine göre ayırım grafiği.

6.8.3.STRING: protein etkileşim ağları

Gen ontoloji analizlerini takiben STRING veri tabanında fonksiyon protein ilişki ağı analizi yapılmıştır (Şekil 6.8.3.1., Şekil 6.8.3.2. ve Şekil 6.8.1.3.). STRING analizleri yapılırken gen ontoloji analizinde olduğu gibi bir örnek üzerinde yapılan üçlü okumalarda ortak olarak tanımlanan proteinler seçilmiştir. Aksolotta tanımlanan bu proteinlerin, NCBI üzerinden BLASTP kullanılarak bulunan tekrarsız fare (*Mus musculus*) ortologları referans alınarak STRING analizi gerçekleştirilmiştir.



Şekil 6.8.3.1. TRizol-FASP 120 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin STRING: protein etkileşim analizi.



Şekil 6.8.3.2. TRizol-FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin STRING: Protein etkileşim analizi.

7.TARTIŞMA

7.1 Aksolotların metamorfoza indüklenmesi

İki aylık bir süreç boyunca yaşadıkları ortama T₄ solüsyonu eklenerek metamorfoza indüklenen aksolotlarda önceki çalışmalarla uyumlu olacak şekilde Resim 6.1’de belirtilen morfolojik değişimler; solungaçların ve dorsal kuyruk yüzgecinin kaybolması, canlıda görülen kilo kaybı, göz kapaklarının belirginleşmesi gözlemlenmiştir. İki aylık sürecin sonunda gözlenen morfolojik değişimler aksolotların metamorfoza indüklendiğini göstermektedir. Çalışma başlangıcında 50nM T₄ solüsyonu canlıların ortamına homojen bir şekilde her yere dağıtılarak eklenirken, deney süresince dört canlının ölümü üzerine kullanılan tiroksin solüsyonun konsantrasyonu 25 nM’a düşürülerek metamorfoz indükleme çalışmasına devam edilmiştir. Başlangıçta kullanılan 50 nM’lık konsantrasyonun bazı hayvanların ölümüne sebep olmasında hayvanların bireysel metabolik farklılıklarının etkili olduğu düşünülmektedir.

Metamorfoza indüklenmesi amacıyla aynı tarihte T₄ solüsyonu verilen aksolotlardan bir tanesinin iki aylık sürecin sonunda T₄ uygulamasına yanıt vermediği, solungaçlarının kaybolmadığı gözlemlenmiştir. Bu durumda bu canlıdaki metabolik farklılıklardan ötürü olduğu düşünülmektedir. Çalışma süresince canlıya T₄ uygulaması devam ettirilmiş ve 4 aylık süreci sonunda canlının solungaçlarının geri çekilmeye başladığı gözlemlenmesine rağmen, solungaçları tamamen kaybolmamıştır (Resim 6.2.).

7.2 Omurilik hasar modeli sonrası refleks testleri

Anestezi altındaki neotenik ve metamorfik aksolotlarda deney grupları için laminektomi ve omurilik hasarı, kontrol grupları içinse sadece laminektomi yapılmıştır. Resim 5.4’te özetlenen cerrahi operasyon çalışmalarının başarısı canlılar anesteziiden çıktığında yapılan refleks testleriyle kontrol edilmiştir. Bu testlerde canlının kuyruk ve arka uzuvları pens ile sıkıştırılarak refleks yanıtları kontrol edilmiştir. Omurilik hasarı ve laminektomi grubu canlıların operasyon sonrası kuyruk ve arka uzuv refleks yanıtları Tablo 6.2’de gösterilmiştir. Operasyonu takiben süreçte

çalışmada kullanılan her aksolot için haftada bir kere refleks yanıt kontrolleri yapılmış ve bu kontroller video kaydına alınmıştır.

Refleks testlerin kontrol amaçlı kullanmak ve hasar öncesi refleks yanıtlarının nasıl olduğu göstermek amacıyla operasyon öncesinde canlıların arka uzuvları ve kuyrukları pens ile sıkıştırıldığında canlının arka uzvunu/kuyruğunu geri çektiği ve neotenik canlılar söz konusu olduğunda yüzerek, metamorfik canlılara bakıldığında ise yürüyerek uzaklaştığı gözlemlenmiştir. Operasyon gününden itibaren çekilen hasar testi videolarında omurilik hasarı verilen canlıların arka uzuvları pens ile sıkıştırılarak refleks yanıtları kontrol edildiğinde canlıların arka uzuv ve kuyruklarını geri çekmediği, tepki vermediği ve yüzerken/yürürken arka uzuvları kullanmadıkları görülmektedir. Regenerasyonun daha ileriki dönemlerinde, neotenik canlılar için hasar sonrası ikinci ayda metamorfik canlılar için hasar sonrası iki buçuk ay sonra, canlıların arka uzuvları pens ile sıkıştırıldığında refleks yanıtı verdiği, yüzerken/yürürken arka uzuvları kullandığı görülmektedir.

Laminektomi yapılan canlıların ise operasyon sonrası bu canlıların refleks testlerine cevap verdiği ve yüzerken/yürürken arka uzuvları kullandığı görülmektedir. Laminektomi yapılan neotenik ve metamorfik canlılar arasında 0.saat laminektomi gruplarında, omurilik dokusu operasyonu takiben hemen alındığı için bu canlılarda operasyon sonrası yapılan refleks testlerinde canlıların herhangi bir refleks yanıtı vermediği gözlemlenmiştir. Diğer laminektomi gruplarında da örnek toplama sonrasında bu canlı gruplarının refleks testlerine cevap vermediği, yüzerken/yürürken arka uzuvları kullanmadığı görülmektedir. Regenerasyonun daha ileriki dönemlerinde ise bu canlıların tıpkı omurilik hasar grubu canlılarında olduğu gibi arka uzuvları pens ile sıkıştırıldığında refleks yanıtı verdiği, yüzerken/yürürken arka uzuvları kullandığı görülmektedir.

Omurilik regenerasyonu sürecini, canlının davranışlarına bakarak anlamak üzere gerçekleştirilen refleks testlerinde, 24 metamorfik canlının 15'inde abdomen bölgesinde bir şişkinlik olduğu gözlemlenmiştir (Resim 6.4). Sadece metamorfik canlılarda gözlemlenen bu durumun, canlılar anestezi altına alınıp incelendiğinde abdomen bölgesinde biriken sıvıdan kaynaklı olduğu anlaşılmıştır. Metamorfizle

beraber değişen immünitinin bu durumun gözlemlenmesiyle bir ilişkisi olup olmadığının anlaşılması ancak ileride yapılacak araştırmalarla mümkün olacaktır.

Neotenik ve metamorfik aksolotlar kullanılarak yapılan uzuv rejenerasyonu çalışmasında, metamorfik aksolotların uzuv rejenerasyonunu başarıyla gerçekleştiremediği, rejenerasyon sonrasında metamorfik canlıların uzuvlarının anormal morfoloji sergilediği gösterilmiştir (Resim 4.2.3.1.). Bu çalışmada elde edilen veriler ışığında, neotenik ve metamorfik aksolot omurilik rejenerasyon yanıtlarında da benzer bir iyileşme profilinin görülmesi beklenmekteydi, neotenik aksolotlarda operasyon sonrası omuriliğin tamamen rejenere olması ve refleks testlerinde canlının arka uzuvlarını hasar öncesinde olduğu kullanması beklenirken, metamorfozla birlikte rejeneratif kapasitenin kısıtlandıği metamorfik canlılarda, operasyon sonrası rejenerasyonun başarılı bir şekilde gerçekleşmemesi ve buna bağlı olarak da refleks testlerinde canlıların arka uzuv ve kuyruklarının pens ile sıkıştırılmasına tepki vermemesi beklenmekteydi. Buna karşın metamorfik canlı gruplarının da, neotenik gruplarda olduğu refleks testlerine yanıt vermesi ve hasardan yaklaşık bir ay sonra operasyon bölgesinde yapılan incelemelerde hem neotenik aksolotlarda (Resim 6.4.1) hem de metamorfik aksolotlarda (Resim 6.4.2.) rejenere omurilik dokusunun gözlemlenmesi beklenmedik bu bulgu olmuştur. Bu durum uzuv rejenerasyonu ve omurilik rejenerasyonu süreçlerinde farklı mekanizmaların rol oynayabileceğini, immünite, hücre tipi ve doku kompleksliğinin rejenerasyon üzerinde farklı etkileri olabileceğinin düşündürmektedir. Buna ek olarak yapılan refleks testlerinde, neotenik canlılarda operasyon sonrası ikinci aydan itibaren arka uzuv ve kuyrukları pensle sıkıştırıldığında canlıların uzuv ve kuyruklarını geri çektiği, yüzerken arka uzuvlarını kullandıği görülmektedir, metamorfik canlıların için bu sürecin ortalama iki buçuk aya çıkması, rejenerasyonun gecikmeli olarak gerçekleştiğini düşündürmektedir. Bu gecikmenin tam olarak neye bağlı olarak gerçekleştiği hakkında bir fikir sahibi olabilmek için transkriptom ve proteom çalışmalarından elde edilecek verilere ihtiyaç duyulmaktadır.

7.3. RNA izolasyonu ve agaroz jel elektroforezi

Omurilik hasarı veya laminektomi yapılan neotenik ve metamorfik aksolotların farklı zaman aralıklarında toplanan doku örneklerinden TRIzol kullanılarak RNA

izolasyonu yapılmıştır. TRIzol yöntemi aynı dokudan DNA, RNA ve proteinin izolasyonunu mümkün kılan bir yöntemdir. Toplanan doku örneklerinden hem RNA hem de protein izolasyonu gerçekleştirilerek, elde edilecek proteom verilerinin yanı sıra istenilmesi durumunda transkriptom analizlerinin de yapılması planlanmıştır. İzole edilen RNA'ların konsantrasyonları Tablo 6.3.'te gösterildiği gibidir. RNA örneklerinin tümünün konsantrasyonları yüksek olmadığı için, konsantrasyonu yüksek olan 12 RNA örneği seçilmiştir, düşük konsantrasyona sahip örneklerden eşit miktarda agaroz jele yüklendiğinde örneğin tamamı veya tamamına yakın bir kısmı kullanılacağı için sadece yüksek konsantrasyona sahip örneklerle agaroz jel elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Seçilen RNA örnekleri ile agaroz jel elektroforezi yapılarak; 28S 18S ve 5S rRNA bant profilleriyle RNA bütünlüğü gösterilmiştir. RNA örnekleri transkriptom analizleri gerçekleştirilene kadar -80°C'de muhafaza edilecektir.

7.4. Protein izolasyonu, protein kütüphanesinin oluşturulması ve protein dizi analizi

Rejenerasyonun farklı zaman aralıklarında toplanan örneklerin protein izolasyonu aynı dokudan hem RNA hem de protein izolasyonunu mümkün kılan TRIzol yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. İzole edilen proteinlerin konsantrasyonları Tablo 6.4.'te gösterildiği gibidir. Protein örneklerinin konsantrasyonlarına bakılarak, örneklerin proteom analizinde kullanılmaya uygun olduğuna karar verilmiştir. Proteom analizinin yapılması için örnekler FASP yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (110). Bu yöntemle göre hazırlanan örnekler liyofilizasyon sonrasında %0.1 formik asit içerisinde çözündürülerek, final konsantrasyonu 200 ng/μl olacak şekilde ayarlanmış ve Waters Synapt G2-Si Q-TOF cihazına yüklenmiştir. LC-MS/MS analizi yapılarak, neotenik ve metamorfik aksolotların omurilik rejenerasyonun farklı zaman aralıklarında toplanan örneklerine ait protein ifadesi analizi yapılması hedeflenmiştir.

Deney örneklerine başlanmadan önce, aynı izolasyon metodu kullanılarak omurilik dokusundan izole edilen protein örnekleri, Waters Synapt G2-Si Q-TOF cihazına yüklenmiş ve üç tekrarlı hem 120 dakika hem de 180 dakikalık okuma programları seçilerek optimizasyon çalışması yapılmıştır. Yapılan optimizasyon çalışmasından elde edilen veriler, VENNY 2.1. kullanılarak Venn diyagramları şekilde

gösterilmiştir. Venn diyagramlarına bakıldığında 120 dakikalık okuma programında tanımlanan 316 proteinden 43'ü her üç okumada da tanımlanabilirken (Şekil 6.8.1.1), 180 dakikalık okuma programında tanımlanan 384 proteinden 175'i her üç okumada da tanımlanabilmiştir (Şekil 6.8.1.2.). Tanımlanan protein miktarı az olmasına karşın 180 dakikalık okumada ortak tanımlanan proteinlerin daha fazla olması, neotenik ve metamorfik aksolottan omurilik rejenerasyonun farklı zamanlarında toplanan 24 adet örneğin analizinin de 180 dakikalık programda yapılmasının daha uygun olacağını önermektedir. Protein izolasyon ve örnek hazırlığı aşamalarında FASP protokolü tercih edildiğinde ise tanımlanan ortak protein miktarı 321, toplam protein miktarı ise 776'ya yükselmiştir (Şekil 6.8.1.3.). Bu durum FASP protokolü tek başına tercih edildiğinde tanımlanabilecek protein miktarının daha yüksek olabileceğini işaret etmektedir.

Üç çalışma içinde ayrı venn diyagramları kullanılarak bulunan ortak proteinlerin PANTHER sınıflandırma sistemi kullanılarak gen ontoloji analizi yapılmıştır. PANTHER veri tabanına yüklenecek olan protein referansları aksolot için tanımlı olmadığından, öncelikle NCBI üzerinden BLASTP kullanılarak elde edilen proteinlerin tekrarsız fare (*Mus musculus*) ortologları bulunmuştur. Bulunan referanslar PANTHER veri tabanına yüklenip sınıflandırma analizi yapılmıştır. Böylelikle, aksolot proteinlerinin fare ortologları kullanılarak PANTHER veri tabanı üzerinden moleküler fonksiyon, biyolojik süreç ve hücresel bileşen analizleri gerçekleştirilmiştir. TRIzol-FASP 120 dakika çalışmasında ortak tanımlanan proteinler üzerinden gerçekleştirilen gen ontoloji analizinde; proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre ayrımları Şekil 6.8.2.1.'de, biyolojik işlevlerine göre ayrımı Şekil 6.8.2.2.'de ve hücresel bileşenlerine göre ayrımı Şekil 6.8.2.3'te yüzdelik dilimleri belirtilerek gösterilmiştir. TRIzol-FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin gen ontoloji analizi sonuçları Şekil 6.8.2.4.'te moleküler fonksiyonlarına, Şekil 6.8.2.5.'te biyolojik işlevlerine ve Şekil 6.8.2.6.'da hücresel bileşenlerine göre yüzdelik dilimleriyle beraber gösterilmiştir. Son olarak, FASP 180 dakika çalışmasında tanımlanan ortak proteinlerin moleküler fonksiyonlarına Şekil 6.8.2.7., biyolojik işlevlerine göre Şekil 6.8.2.8. ve hücresel bileşenlerine göre Şekil 6.8.2.9. ayırım grafikleri yüzdelik dilimleriyle gösterilmiştir.

Ortak tanımlanan proteinlerin fare ortologları kullanılarak, STRING veri tabanı üzerinde protein etkileşim analizi yapılmıştır. STRING: protein etkileşim ağları

yukarıda belirtilen TRIzol-FASP 120 dakika, TRIzol-FASP 180 dakika ve FASP 180 dakika çalışmaları için sırasıyla Şekil 6.8.3.1., Şekil 6.8.3.2. ve Şekil 6.8.3.3.'te gösterilmektedir.

Veri tabanları kullanılarak ön denemelere ait proteinler tanımlanırken çalışmaya ait örnekler cihaza yüklenmek üzere hazırlanmış ve örneklerin analizine başlanmıştır. Kolona örnek yüklemesi öncesinde yapılan Qubit protein konsantrasyon tayini ile enjekte edilen her mikro litreye karşılık ne kadar peptit bulunduğu saptanmış ve böylelikle fazla yüklemeler önlenmiştir. Çalışma örneklerinin liyofilizasyon işleminden sonra zaman kazandıracağı için başlangıçta ilk 14 örneğin yüklenmesi, bu örneklerinin biyoinformatik analizleri yapılırken kalan 10 örneğin cihaz okumalarına başlanmasına karar verilmiş ve kalan 10 örnek liyofilizatörden çıkartıldıktan sonra %0.1'lik formik asitte çözünmeyip -20°C'ye kaldırılarak, cihaza yüklenene kadar burada muhafaza edilmiştir.

Omurilik rejenerasyonunda rol oynayan proteinleri tanımlamak için kullanılacak deney örneklerinin FASP yöntemi aşamalarında birtakım sorunlarla karşılaşmıştır. Bu sorunlardan ilki liyofilizasyon sonrası cihaza yüklemek için %0.1 formik asitte çözündürülen ilk 14 örneğin homojenize edilememesidir. Normal şartlar altında liyofilizatörden çıkartılan örneğe formik asit eklendiğinde örneğin tamamen çözünüp, şeffaf sıvı bir madde halinde cihaza yüklenmesi beklenmektedir. Homojenize edilmesi planlanan örneklerin, tüpte lipid benzeri yuvarlak bir yapı oluşturmuştur. Örneklerden başka bir set olmadığı için, protein izolasyon ve örnek hazırlama aşamasının tekrarlanamayacağı ilk 14 örnek bu şekilde cihaza yüklenmiş ve analiz sonucunda tanımlanan proteinler üzerinden proteomiks çalışmasına devam edilmiştir. Kalan 10 örnek cihaza yüklenirken taze %0.1 formik asitte çözündüğünde benzer bir durumla karşılaşmamıştır. İlk 14 örneğin %0.1 formik asitte beklenildiği çözünmemesinin nedeni tam olarak anlaşılamamasına karşın, kullanılan formik asitten ötürü olabileceği düşünülmektedir. Neotenik ve metamorfik aksolotlardan rejenerasyonun farklı zamanlarında toplanan ve TRIzol yöntemi kullanılarak protein izolasyonu gerçekleştirilen örnekler, FASP yöntemiyle Waters Synapt G2-Si Q-TOF cihazına yüklenmeye hazır hale getirilirken örneklerde oluşan beklemeyen lipid yapısının protein kütüphane oluşturma ve dolayısıyla protein dizi analizin yapılmasını

olumsuz etkilemiştir. İlk 14 örneğin formik asitte tam olarak çözünmemesinin tanımlanan protein sayısını etkilediği düşünülmektedir.

Örnek analizinde karşılaşılan bir diğer sorun ise, analiz esnasında cihazın hata vermesidir. QTOF sistemi yüksek basınç hatası vermiş, normal şartlar altında örnek stabilitesinin bozulmaması için 4°C olması gereken örnek sıcaklığı 8.6°C'ye çıkmıştır, yüksek basınç hatası çözüldükten sonra örnek sıcaklığı artmasına rağmen cihaza yüklenen ve yedeği olmayan örneklerin okumasına devam edilmiştir. 24 örnek için de üç tekrarlı okuma sonuçlarında ortak tanımlanan proteinlerin, proteom dizi analizi optimizasyon çalışmasında olduğu gibi, VENNY 2.1. kullanılarak gösterilmesi ve tanımlanan bu proteinlerin PANTHER sınıflandırma sistemi kullanılarak gen ontoloji analizi yapılması hedeflenmiştir. PANTHER veri tabanına yüklenecek olan protein referansları aksolot için tanımlı olmadığından, aksolot omurilik örnekleri kullanılarak gerçekleştirilen ön çalışmada olduğu gibi, öncelikle elde edilen proteinlerin tekrarsız fare (*Mus musculus*) ortologları NCBI üzerinden BLASTP kullanılarak bulunması ardından bulunan referansların PANTHER veri tabanına yüklenip sınıflandırma analizi yapılması hedeflenmiştir. Bu yöntemle aksolot proteinlerinin fare ortologları kullanılarak PANTHER veri tabanı üzerinden moleküler fonksiyon, biyolojik süreç ve hücresel bileşen analizleri yapılması amaçlanmıştır.

Aksolotta rejeneratif süreçlerin proteomiks yöntemiyle aydınlatılmaya çalışıldığı, aksolot kuyruk proteomu çalışmasında 1001 protein (107) ve rejenere olan uzuvdan farklı zamanlarda alınan blastema dokusunun proteomiks çalışmasında anlamı değişim gösteren 309 protein (111) tanımlanmıştır. Bu çalışmada 24 setlik örnekten proteinin tanımlanamaması nedeni kullanılan TRIzol protein izolasyon metodunun örnek hazırlamak için kullanılan FASP metoduyla uyumsuzluğu ve örneklerin analizi sırasında karşılaşılan teknik sorunlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Sıvı nitrojende dondurulmuş dokudan hem RNA hem de protein izolasyonu yaparken, dokuyu sıvı nitrojen yardımıyla havada ezerek toz haline getirdikten sonra, toz halindeki örneğin yarısının RNA izolasyonu yarısının da protein izolasyonunda kullanılması, karşılaşılan sorunun önüne geçebilirdi ancak, çalışma örnekleriyle aynı boyutlarda alınan başka omurilik örnekleri üzerinde yapılan denemelerde dokunun 1 mm gibi son derece küçük boyutlarında olması, sıvı azot

kullanılarak havanda toz haline getirildiğinde örnek kaybının olması, farklı doku homojenizasyon metodu tercih edilmiştir. Başlangıç dokusundan aynı anda hem DNA, hem RNA, hem de protein izolasyonunu mümkün kıldığı için TRIzol yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. TRIzol izolasyon yöntemiyle yeterli konsantrasyonda protein elde edilmesine rağmen, izolasyonu takiben gerçekleştirilen FASP yönteminde ciddi miktarda protein kaybının olduğu düşünülmektedir. FASP metodu örnek hazırlamada son derece başarılı bir yöntem olmasına karşın TRIzol kullanılarak izole edilen protein örnekleri üzerinde başarılı bir sonuç alınamamıştır. Literatürde farklı doku örneklerinden TRIzol kullanılarak izole edilen proteinlere ait proteom çalışmaları bulunmaktadır (112-114). Bu çalışmaların, bu tez çalışmasından farkı protein izolasyonu sonrasında takip edilen proteomiks basamaklarıdır, TRIzol ile izole edilen proteinlerin proteomiks analizlerinde 2D-jel elektroforez yöntemini takiben LC-MS/MS yapılarak protein tanımlanabilmiştir. Bu tez çalışmasında ise TRIzol ile izole edilen örnekler FASP yöntemiyle hazırlandıktan sonra LC-MS/MS analizi yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda yeterli miktarda protein tanımlanamaması TRIzol yöntemiyle izole edilen protein örneklerinin FASP yönteminde kullanılmaya uygun olmadığına işaret etmektedir.

Yaşanılan teknik sorunlar proteomiks çalışmasından istenilen miktarda protein tanımlanamamasında etkili olmuştur. Cihaza yüklenen örneklerin analiz esnasında sıcaklıklarındaki 4°C'lik artış örnek stabilitesini azaltarak örnek kalitesini düşürmüştü bu nedenle de protein tanımlanmasını olumsuz etkilemiş olabileceğini düşündürmektedir. 24 örneklik set içerisinde yeterli miktarda protein tanımlanmadığı için biyoinformatik analizlere optimizasyon çalışmasında kullanılan örneklerle devam edilmiştir. Yapılan ilk optimizasyon çalışması farklı sürelerde yapılan örnek okumalarının, tanımlanan protein miktarı üzerindeki etkisi anlamaya yöneliktir. Yukarıda da belirtildiği gibi bu optimizasyon çalışmasının sonucunda 180 dakikalık okumalarda tanımlanan protein sayısının arttığı bulunmuştur. Diğer optimizasyon çalışması ise TRIzol ve FASP protokollerinin protein dizi analizi üzerindeki etkisinin anlaşılması için gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada iki farklı izolasyon protokolü uygulanan örnekler kullanılmıştır. Bu örneklerden birinde, TRIzol kullanılarak protein izolasyonu gerçekleştirip izolasyonu takiben FASP protokolü uygulanarak örnekler hazırlığı gerçekleştirilmiştir. Diğer örnek ise sadece FASP protokolü takip edilerek hem protein izolasyonu gerçekleştirilmiş hem de örnek hazırlığı gerçekleştirilmiştir.

Hem izolasyon hem de örnek hazırlığı aşamalarında FASP protokolünün takip edildiği ve 180 dakikalık örnek okuma programının uygulandığı çalışmada tanımlanan ortak protein miktarı 321, toplam protein miktarı ise 776'ya yükselmiştir. Sadece FASP protokolü takip edildiğinde elde edilen total protein sayısı yaklaşık iki kat artması, TRIzol protein izolasyon protokolü ile FASP protokolü arasındaki uyumsuzluğun protein dizi analizinde tanımlanan protein miktarını etkilediği düşüncesini desteklemektedir.



8.SONUÇ

Rejeneratif kapasitelerinin farklı olduğu uzuv rejenerasyonu çalışmalarıyla gösterilen neotenik ve metamorfik aksolotların omurilik rejenerasyonun farklı zamanlarında toplanan örneklerin proteom analizi yapılarak, rejenerasyonun erken zamanlarında bu canlının iki farklı formunda görev alan proteinler, bu proteinlerin rolü, birbiriyle ilişkilerinin proteomiks kullanılarak gösterilmesi hedeflenmiştir. LC-MS/MS analizi sonucunda elde edilen verilerin öncelikle BLASTP aramaları yapılarak fare ortologları bulunmuştur. Bunun temel sebebi proteom analizinde kullanılan veri tabanlarında aksolot için tanımlı protein referanslarının olmamasıdır. BLASTP araması sonucunda elde edilen proteinler PANTHER sınıflandırma sistemi kullanılarak moleküler fonksiyon, biyolojik aktivite ve hücresel bileşenlerine göre ayrılmıştır. STRING: fonksiyonel protein ilişki ağları kullanılarak tanımlanan proteinlerin birbirleriyle etkileşimleri gösterilmiştir.

TRIzol metodu DNA, RNA ve proteinin aynı başlangıç materyalinden izole edilmesini mümkün kılmasına karşın, yapılan çalışmada protein dizi analizi için uygun olmadığı görülmüştür. Bunun temel sebebinin TRIzol protein izolasyonunu takiben izlenen FASP örnek hazırlama protokolü arasındaki uyumsuzluk olabileceği düşünülmektedir. TRIzol protein izolasyonunu takiben FASP protokolüne geçilmesi tanımlanabilecek protein sayısını düşürdüğü, FASP protkolü hem protein izolasyonu ve hem de örnek hazırlığı için tercih edildiğinde ise tanımlanan protein sayısının arttığı görülmüştür. Buna ek olarak örneklerin Waters Synapt G2-Si Q-TOF cihazında yapılan analizlerinde, örnek başına ayrılan okuma süresinin 120 dakikadan 180 dakikaya çıkarılmasıyla tanımlanan protein miktarında artış görülmesi, aksolot omurilik örneklerinin proteom dizi analizinde 180 dakikalık okuma programının tercih edilmesinin tanımlanabilecek protein sayısını yükselteceğine işaret etmektedir.

İnsan akraba olarak bildiğimiz en yakın rejeneratif omurgalı canlı türü olan aksolot üzerinden yapılacak rejeneratif çalışmalar, insanda hasar onarım mekanizması anlaşılması ve potansiyel rejeneratif terapilerin ortaya konabilmesi mümkün olabilir. Aksolotta rejenerasyon çalışmalarına devam edilerek canlının eşsiz rejenerasyon yeteneğinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması son derece önem taşımaktadır

9.KAYNAKLAR

1. Bely AE, Nyberg KG. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends Ecol Evol.* 2010;25(3):161-70.
2. Brookes JP, Kumar A. Comparative aspects of animal regeneration. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2008;24:525-49.
3. Sanchez Alvarado A, Tsonis PA. Bridging the regeneration gap: genetic insights from diverse animal models. *Nat Rev Genet.* 2006;7(11):873-84.
4. Allen JM, Ross KG, Zayas RM. Regeneration in Invertebrates: Model Systems. In: John Wiley & Sons L, editor. eLS2016.
5. Tsonis PA. Regeneration in vertebrates. *Dev Biol.* 2000;221(2):273-84.
6. M. Carlson B. Chapter 1. An Introduction to Regeneration2007.
7. Poss KD, Shen J, Nechiporuk A, McMahon G, Thisse B, Thisse C, et al. Roles for Fgf Signaling during Zebrafish Fin Regeneration. *Developmental Biology.* 2000;222(2):347-58.
8. Thummel R, Bai S, Sarras MP, Song P, McDermott J, Brewer J, et al. Inhibition of zebrafish fin regeneration using in vivo electroporation of morpholinos against fgfr1 and msxb. *Developmental Dynamics.* 2006;235(2):336-46.
9. Beck CW, Christen B, Slack JMW. Molecular Pathways Needed for Regeneration of Spinal Cord and Muscle in a Vertebrate. *Developmental Cell.*5(3):429-39.
10. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science.* 2002;298(5601):2188-90.
11. Poss KD. Getting to the heart of regeneration in zebrafish. *Semin Cell Dev Biol.* 2007;18(1):36-45.
12. Raya A, Consiglio A, Kawakami Y, Rodriguez-Esteban C, Izpisua-Belmonte JC. The zebrafish as a model of heart regeneration. *Cloning Stem Cells.* 2004;6(4):345-51.
13. Zhang R, Han P, Yang H, Ouyang K, Lee D, Lin YF, et al. In vivo cardiac reprogramming contributes to zebrafish heart regeneration. *Nature.* 2013;498(7455):497-501.
14. Han M, Yang X, Farrington JE, Muneoka K. Digit regeneration is regulated by Msx1 and BMP4 in fetal mice. *Development.* 2003;130:5123-32.
15. Susick R, Moss N, Kubota H, Lecluyse E, Hamilton G, Luntz T, et al. Hepatic progenitors and strategies for liver cell therapies. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;944:398-419.
16. Vessey CJ, de la Hall PM. Hepatic stem cells: a review. *Pathology.* 2001;33(2):130-41.
17. Gritti A, Bonfanti L, Doetsch F, Caille I, Alvarez-Buylla A, Lim DA, et al. Multipotent Neural Stem Cells Reside into the Rostral Extension and Olfactory Bulb of Adult Rodents. *The Journal of Neuroscience.* 2002;22(2):437-45.
18. Vergara MN, Del Rio-Tsonis K. Retinal regeneration in the *Xenopus laevis* tadpole: a new model system. *Mol Vis.* 2009;15:1000-13.
19. Lee-Liu D, Mendez-Olivos EE, Munoz R, Larrain J. The African clawed frog *Xenopus laevis*: A model organism to study regeneration of the central nervous system. *Neurosci Lett.* 2017;652:82-93.
20. Tseng A-S, Adams DS, Qiu D, Koustubhan P, Levin M. Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus laevis*. *Developmental biology.* 2007;301(1):62-9.

21. Gibbs KM, Chittur SV, Szaro BG. Metamorphosis and the regenerative capacity of spinal cord axons in *Xenopus laevis*. *Eur J Neurosci*. 2011;33(1):9-25.
22. Carlson BM. Some principles of regeneration in mammalian systems. *The Anatomical Record Part B: The New Anatomist*. 2005;287B(1):4-13.
23. Ziegels J. The Melanocytes of the Axolotl. Their modifications during skin regeneration. *Arch Bio*. 1971;82:407-28.
24. Hui FW, Smith AA. Degeneration of Leydig cells in the skin of the salamander treated with cholinolytic drugs or surgical denervation. *Exp Neurol*. 1976;53:610-9.
25. Wallace H. Vertebrate limb regeneration. Chichester, U.K.: Wiley; 1981.
26. Shaffer HB, Lauder GV. Aquatic prey capture in ambystomatid salamanders: patterns of variation in muscle activity. *J Morphol*. 1985;183(3):273-84.
27. Contreras V, Martinez-Meyer E, Valiente E, Zambrano L. Recent decline and potential distribution in the last remnant area of the microendemic Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Biol Conserv*. 2009;142(12):2881-5.
28. Zambrano L, Reidl PM, McKay J, Griffiths R, Shaffer HB, Flores-Villela O, et al. *Ambystoma mexicanum*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: 2010 Contract No.: e.T1095A3229615.
29. Shen XX, Liang D, Feng YJ, Chen MY, Zhang P. A versatile and highly efficient toolkit including 102 nuclear markers for vertebrate phylogenomics, tested by resolving the higher level relationships of the caudata. *Mol Biol Evol*. 2013;30(10):2235-48.
30. Khattak S, Murawala P, Andreas H, Kappert V, Schuez M, Sandoval-Guzman T, et al. Optimized axolotl (*Ambystoma mexicanum*) husbandry, breeding, metamorphosis, transgenesis and tamoxifen-mediated recombination. *Nat Protoc*. 2014;9(3):529-40.
31. Farkas JE, Monaghan JR. Housing and Maintenance of *Ambystoma mexicanum*, the Mexican Axolotl. In: Kumar A, Simon A, editors. *Salamanders in Regeneration Research*: Humana Press; 2015. p. 27-46.
32. Gorsic M. Axolotl – a supermodel for tissue regeneration. *Slov Vet Res*. 2007;44:5-10.
33. Dodd MHI, Dodd JM. The biology of metamorphosis. In: Loft B, editor. *Physiology of the Amphibia*. 3. 2 ed. New York: Academic Press; 1976. p. 467-599.
34. Page RB, Monaghan JR, Samuels AK, Smith JJ, Beachy CK, Voss SR. Microarray analysis identifies keratin loci as sensitive biomarkers for thyroid hormone disruption in the salamander *Ambystoma mexicanum*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2007;145(1):15-27.
35. Rosenkilde P, Ussing AP. What mechanisms control neoteny and regulate induced metamorphosis in urodeles? *Int J Dev Bio*. 1996;40:665-73.
36. Brown DD. The role of thyroid hormone in zebrafish and axolotl development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(24):13011-6.
37. Laudet V. The origins and evolution of vertebrate metamorphosis. *Curr Biol*. 2011;21(18):R726-37.
38. Hall JE, Guyton AC. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*. 12 ed. Philadelphia, Pa: Saunders/Elsevier; 2011.
39. Denver RJ. Stress hormones mediate environment-genotype interactions during amphibian development. *Gen Comp Endocrinol*. 2009;164(1):20-31.
40. Brown DD, Cai L. Amphibian metamorphosis. *Dev Biol*. 2007;306(1):20-33.
41. Shaffer HB, Voss SR. Phylogenetic and Mechanistic Analysis of A Developmentally Integrated Character Complex: Alternate Life History Modes in Ambystomatid Salamanders. *American Zoologist*. 1996;36(1):24-35.

42. Shaffer HB. Natural history, ecology, and evolution of the Mexican "Axolotls". *Axolotl Newslett.* 1989;18:5-11.
43. Johnson CK, Voss SR. Salamander paedomorphosis: linking thyroid hormone to life history and life cycle evolution. *Curr Top Dev Biol.* 2013;103:229-58.
44. Norris DO, Platt JE. T3- and T4-induced rates of metamorphosis in immature and sexually mature larvae of *Ambystoma tigrinum* (amphibia: Caudata). *Journal of Experimental Zoology.* 1974;189(3):303-10.
45. Prahlad KV, DeLanney LE. A study of induced metamorphosis in the axolotl. *J Exp Zool.* 1965;160(1):137-45.
46. Taurog A, Oliver C, Eskay RL, Porter JC, McKenzie JM. The role of TRH in the neoteny of the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Gen Comp Endocrinol.* 1974;24(3):267-79.
47. Taurog A. Effect of TSH and long-acting thyroid stimulator on thyroid ¹³¹I-metabolism and metamorphosis of the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Gen Comp Endocrinol.* 1974;24(3):257-66.
48. Galton VA. The role of thyroid hormone in amphibian metamorphosis. *Trends Endocrinol Metab.* 1992;3(3):96-100.
49. Monaghan JR, Stier AC, Michonneau F, Smith MD, Pasch B, Maden M, et al. Experimentally induced metamorphosis in axolotls reduces regenerative rate and fidelity. *Regeneration.* 2014;1(1):2-14.
50. Seifert AW, Monaghan JR, Voss SR, Maden M. Skin Regeneration in Adult Axolotls: A Blueprint for Scar-Free Healing in Vertebrates. *PLoS ONE.* 2012;7(4):e32875.
51. Demircan T, Ovezmyradov G, Yildirim B, Keskin I, İlhan AE, Fescioglu EC, et al. Experimentally induced metamorphosis in highly regenerative axolotl (*ambystoma mexicanum*) under constant diet restructures microbiota. *Sci Rep.* 2018;8(1):10974.
52. Page RB, Voss SR, Samuels AK, Smith JJ, Putta S, Beachy CK. Effect of thyroid hormone concentration on the transcriptional response underlying induced metamorphosis in the Mexican axolotl (*Ambystoma*). *BMC Genomics.* 2008;9:78.
53. Page RB, Voss SR. Induction of metamorphosis in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Cold Spring Harb Protoc.* 2009;2009(8):pdb prot5268.
54. Kumar A, Simon A. Salamanders in Regeneration Research Methods and Protocols. Walker JM, editor: Humana Press; 2015.
55. Simon A, Tanaka EM. Limb regeneration. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2013;2(2):291-300.
56. Tanaka EM. Cell differentiation and cell fate during urodele tail and limb regeneration. *Current Opinion in Genetics & Development.* 2003;13(5):497-501.
57. Yakushiji N, Suzuki M, Satoh A, Sagai T, Shiroishi T, Kobayashi H, et al. Correlation between Shh expression and DNA methylation status of the limb-specific Shh enhancer region during limb regeneration in amphibians. *Developmental Biology.* 2007;312(1):171-82.
58. Monaghan JR, Maden M. Cellular plasticity during vertebrate appendage regeneration. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;367:53-74.
59. Francis ETB. *The Anatomy of the Salamander.* Oxford: The Clarendon Press; 1934.
60. Demircan T, İlhan AE, Aytürk N, Yıldırım B, Öztürk G, Keskin İ. A histological atlas of the tissues and organs of neotenic and metamorphosed axolotl. *Acta Histochemica.* 2016;118(7):746-59.

61. Stirling RV, Brandle K. Expansion of the visual projection to the tectum of axolotls during metamorphosis. *Brain Re.* 1982;281:343-5.
62. Kirsche K, Kirsche W. Regenerative processes in the telencephalon of *Ambystoma Mexicanum*. *J Hirnforsch.* 1964;7:421-36.
63. Richter W. Regenerative processes following removal of the caudal sector of the telencephalon including the telencephalo-diencephalic border region in *Ambystoma mexicanum*. *J Hirnforsch.* 1968;10:515-34.
64. Maden M, Manwell LA, Ormerod BK. Proliferation zones in the axolotl brain and regeneration of the telencephalon. *Neural Dev.* 2013;8:1.
65. Kirshblum SC, Burns SP, Biering-Sorensen F, Donovan W, Graves DE, Jha A, et al. International standards for neurological classification of spinal cord injury (Revised 2011). *The Journal of Spinal Cord Medicine.* 2011;34(6):535-46.
66. Van-De-Graaff KM, Strete D, Creek CH. *Human Anatomy*. Boston: McGraw-Hill; 2001.
67. Vander AJ, Luciano DS, Sherman JH. *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function*: McGraw-Hill; 2001.
68. Holanda LJ, Silva PMM, Amorim TC, Lacerda MO, Simão CR, Morya E. Robotic assisted gait as a tool for rehabilitation of individuals with spinal cord injury: a systematic review. *Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation.* 2017;14:126.
69. Rahimi-Movaghar V, Sayyah MK, Akbari H, Khorramirouz R, Rasouli MR, Moradi-Lakeh M, et al. Epidemiology of Traumatic Spinal Cord Injury in Developing Countries: A Systematic Review. *Neuroepidemiology.* 2013;41(2):65-85.
70. Karacan İ, Koyuncu H, Pekel Ö, Sümbüloğlu G, Kirnap M, Dursun H, et al. Traumatic spinal cord injuries in Turkey: A nation-wide epidemiological study. *Spinal Cord.* 2000;38:607-701.
71. Kong X, Gao J. Macrophage polarization: a key event in the secondary phase of acute spinal cord injury. *J Cell Mol Med.* 2017;21(5):941-54.
72. Sekhon LH, Fehlings MG. Epidemiology, demographics, and pathophysiology of acute spinal cord injury. *Spine (Phila Pa 1976).* 2001;26(24 Suppl):S2-12.
73. Fehlings MG, Perrin RG. The role and timing of early decompression for cervical spinal cord injury: update with a review of recent clinical evidence. *Injury.* 2005;36 Suppl 2:B13-26.
74. Ishikawa T, Suzuki H, Ishikawa K, Yasuda S, Matsui T, Yamamoto M, et al. Spinal cord ischemia/injury. *Curr Pharm Des.* 2014;20(36):5738-43.
75. Basu S, Hellberg A, Ulus AT, Westman J, Karacagil S. Biomarkers of free radical injury during spinal cord ischemia. *FEBS Lett.* 2001;508(1):36-8.
76. Xiong Y, Singh IN, Hall ED. Tempol protection of spinal cord mitochondria from peroxynitrite-induced oxidative damage. *Free Radic Res.* 2009;43(6):604-12.
77. Faden AI, Wu J, Stoica BA, Loane DJ. Progressive inflammation-mediated neurodegeneration after traumatic brain or spinal cord injury. *Br J Pharmacol.* 2016;173(4):681-91.
78. Wang H-f, Liu X-k, Li R, Zhang P, Chu Z, Wang C-l, et al. Effect of glial cells on remyelination after spinal cord injury. *Neural Regeneration Research.* 2017;12(10):1724-32.
79. McCreedy DA, Sakiyama-Elbert SE. Combination therapies in the CNS: engineering the environment. *Neurosci Lett.* 2012;519(2):115-21.
80. Fitch MT, Silver J. CNS injury, glial scars, and inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol.* 2008;209(2):294-301.

81. Donnelly DJ, Popovich PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2008;209(2):378-88.
82. Kerschensteiner M, Schwab ME, Lichtman JW, Miggel T. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med*. 2005;11(5):572-7.
83. George E, Glass J, Griffin J. Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *The Journal of Neuroscience*. 1995;15(10):6445-52.
84. Finn JT, Weil M, Archer F, Siman R, Srinivasan A, Raff MC. Evidence That Wallerian Degeneration and Localized Axon Degeneration Induced by Local Neurotrophin Deprivation Do Not Involve Caspases. *The Journal of Neuroscience*. 2000;20(4):1333-41.
85. Zhai Q, Wang J, Kim A, Liu Q, Watts R, Hoopfer E, et al. Involvement of the ubiquitin-proteasome system in the early stages of wallerian degeneration. *Neuron*. 2003;39(2):217-25.
86. Diaz Quiroz Juan F, Echeverri K. Spinal cord regeneration: where fish, frogs and salamanders lead the way, can we follow? *Biochemical Journal*. 2013;451(3):353-64.
87. Tsao JW, Brown MC, Carden MJ, McLean WG, Perry VH. Loss of the compound action potential: an electrophysiological, biochemical and morphological study of early events in axonal degeneration in the C57BL/Ola mouse. *Eur J Neurosci*. 1994;6(4):516-24.
88. Lubinska L. Patterns of Wallerian degeneration of myelinated fibres in short and long peripheral stumps and in isolated segments of rat phrenic nerve. Interpretation of the role of axoplasmic flow of the trophic factor. *Brain Res*. 1982;233(2):227-40.
89. Griffin JW, George R, Lobato C, Tyor WR, Yan LC, Glass JD. Macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. *J Neuroimmunol*. 1992;40(2-3):153-65.
90. Hulsebosch CE. Recent advances in pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Adv Physiol Educ*. 2002;26(1-4):238-55.
91. Carballo-Molina OA, Velasco I. Hydrogels as scaffolds and delivery systems to enhance axonal regeneration after injuries. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2015;9:13.
92. Eftekhari Eftekharpour, Soheila Karimi-Abdolrezaee, Michael G. Fehlings. Current status of experimental cell replacement approaches to spinal cord injury. *Neurosurgical Focus*. 2008;24(3-4):E19.
93. Zug GR, Vitt LJ, Caldwell JP. *Herpetology: An introductory biology of amphibians and reptiles*. 4 ed. San Diego, California: Academic Press; 2013.
94. Chernoff EA, Stocum DL, Nye HL, Cameron JA. Urodele spinal cord regeneration and related processes. *Dev Dyn*. 2003;226(2):295-307.
95. Butler EG, Ward MB. Reconstitution of the spinal cord following ablation in urodele larvae. *Journal of Experimental Zoology*. 1965;160(1):47-65.
96. Butler EG, Ward MB. Reconstitution of the spinal cord after ablation in adult *Triturus*. *Dev Biol*. 1967;15(5):464-86.
97. Clarke JD, Alexander R, Holder N. Regeneration of descending axons in the spinal cord of the axolotl. *Neurosci Lett*. 1988;89(1):1-6.
98. Zukor KA, Kent DT, Odelberg SJ. Meningeal cells and glia establish a permissive environment for axon regeneration after spinal cord injury in newts. *Neural Dev*. 2011;6:1.

99. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(2):146-56.
100. Odelberg SJ. Cellular plasticity in vertebrate regeneration. *Anat Rec B New Anat*. 2005;287(1):25-35.
101. Graves PR, Haystead TA. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2002;66(1):39-63; table of contents.
102. Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. 2000;405(6788):837-46.
103. Ding Q, Wu Z, Guo Y, Zhao C, Jia Y, Kong F, et al. Proteome analysis of up-regulated proteins in the rat spinal cord induced by transection injury. *Proteomics*. 2006;6(2):505-18.
104. Tsai MC, Shen LF, Kuo HS, Cheng H, Chak KF. Involvement of acidic fibroblast growth factor in spinal cord injury repair processes revealed by a proteomics approach. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7(9):1668-87.
105. Yan X, Liu J, Luo Z, Ding Q, Mao X, Yan M, et al. Proteomic profiling of proteins in rat spinal cord induced by contusion injury. *Neurochem Int*. 2010;56(8):971-83.
106. Liu W, Shang FF, Xu Y, Belegu V, Xia L, Zhao W, et al. eIF5A1/RhoGDIalpha pathway: a novel therapeutic target for treatment of spinal cord injury identified by a proteomics approach. *Sci Rep*. 2015;5:16911.
107. Demircan T, Keskin I, Dumlu SN, Aytürk N, Avşaroğlu ME, Akgün E, et al. Detailed tail proteomic analysis of axolotl (*Ambystoma mexicanum*) using an mRNA-seq reference database. *PROTEOMICS*. 2017;17(1-2):1600338-n/a.
108. Diaz Quiroz JF, Tsai E, Coyle M, Sehm T, Echeverri K. Precise control of miR-125b levels is required to create a regeneration-permissive environment after spinal cord injury: a cross-species comparison between salamander and rat. *Disease Models & Mechanisms*. 2014;7(6):601-11.
109. Demircan T, Ovezmyradov G, YILDIRIM B, Keskin I, ilhan AE, Fescioglu EC, et al. Experimentally Induced Metamorphosis in Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) Under Constant Diet Restructures Microbiota Accompanied by Reduced Limb Regenerative Capacity. *bioRxiv*. 2018.
110. Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*. 2009;6(5):359-62.
111. Rao N, Jhamb D, Milner DJ, Li B, Song F, Wang M, et al. Proteomic analysis of blastema formation in regenerating axolotl limbs. *BMC Biol*. 2009;7:83.
112. Pop C, Ameling S, Empen K, Rüdebusch J, Dhople VM, Felix SB, et al. Proteome analysis of heart biopsies using a TRIzol-based protein extraction. *Clinica Chimica Acta*. 2015;438:246-7.
113. Chan K-K, Kwok CS-N, Sze ET-P, Lee FW-F. Evaluation of the Use of TRIzol-Based Protein Extraction Approach for Gel-Based Proteomic Analysis of Dried Seafood Products and Chinese Tonic Foods. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(7):1998.
114. Young C, Truman P. Proteins isolated with TRIzol are compatible with two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analyses. *Anal Biochem*. 2012;421(1):330-2.

10.ETİK KURUL



**T.C.
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**



E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.2499
Konu : Etik Kurulu Kararı

30/09/2015

Sayın Yrd. Doç. Dr. Turan DEMİRCAN

Üniversitemizin Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "Axololt'da Omurilik Hasarı Sonrası Rejenerasyonu Sağlayan Moleküler Mekanizmaların Yeni-nesil RNA Dizileme ve Proteomiks Yöntemleri ile Tanımlanması" isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

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

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanunu'na göre Doç. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 30.09.2015 tarihinde e-imzalanmıştır.
Doğrulama Kodu: <http://ebys.medipol.edu.tr/e-imza/confirmationCodeDocumentView.aspx?Code=2F0D3F7EX7>

Kavacık Mahallesi Ekinçiler Caddesi No: 19 Beykoz / İSTANBUL
Tel: (216) 681 5100 Faks: (212) 531 7555



T.C.

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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
30/09/2015	75		Yrd. Doç. Dr. Turan Demircan

"Axololt'da Omurilik Hasarı Sonrası Rejenerasyonu Sağlayan Moleküler Mekanizmaların Yeni-nesil RNA Dizileme ve Proteomiks Yöntemleri ile Tanımlanması" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 24 ay

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

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ece Cana	Soyadı	Fesçioğlu
Doğum Yeri	KADIKÖY	Doğum Tarihi	01/07/1993
Uyruğu	TC	TC Kimlik No	
E-mail	e.canafescioglu@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans		
Lisans	T.C. İstanbul Kültür Üniversitesi	2015
Lise	Özel Fenerbahçe Spor Kulübü Anadolu Lisesi	2011

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre
Bursiyer	İstanbul Medipol Üniversitesi, TÜBİTAK Proje No: 315S027	1 yıl

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma	Yazma*
İngilizce	Çok iyi	Çok İyi	Çok İyi
Almanca	İyi	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	
-----	--

ALES	70
------	----

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Windows Office	Çok iyi
Illustrator	Çok iyi