



T.C
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**AKSOLOTL VE FARE ARKA KÖK GANGLİONLARININ REJENERASYON
KAPASİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

AYŞE SERVER SEZER

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL - 2020

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, yaptığım hataları bir baba şefkatiyle karşılayan ve büyük bir sabırla bana yardımcı olmaya çalışan saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e,

Her ihtiyacım olduğunda yardımlarını benden esirgemeyen Dr. Mehmet Şerif AYDIN ve Olgu Enis TOK'a

Desteklerini her zaman gördüğüm ekip arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Neşe AYŞİT, Sadık BAY, Gülsena BAYDAŞ, Esra Nur YİĞİT, Sevginur BOSTAN, Şeyma KABLAN'a

Çalışma ortamımızı güzelleştiren laboratuvar arkadaşlarım Zeynep ALADAĞ, Tuba OĞUZ, Fatmagül İlayda AYDINLI, Burcu KURT VATANDAŞLAR ve Emre VATANDAŞLAR'a

En yoğun zamanlarında bile bana yardımcı olan başta Hilmi Kaan ALKAN, Mehtap ŞİMŞEK, Büşra BATĞI olmak üzere tüm REMER ailesine,

Her zaman ve her koşulda yanımda olup desteğini ve sevgisini benden esirgemeyen canım arkadaşım Safiye SERDENGECİ'ye,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi bu çalışma süresince de sevgi ve desteklerini hiç eksik etmeyerek her zaman yanımda olan sevgili annem Ulviye SEZER'e, canım babam Emin SEZER'e, kardeşim Fatma Elif SEZER'e, teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
RESİMLER LİSTESİ.....	viii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Periferik Sinir Sistemi.....	5
4.1.1. Arka Kök Ganglionu.....	7
4.2. Periferik Sinir Travması.....	8
4.3. Periferik Sinir Rejenerasyonu	10
4.3.1. Aksonal Rejenerasyon	11
4.4. Semenderlerde Rejenerasyon.....	12
4.4.1. Rejenerasyonda Model Organizma Aksolotl.....	15
4.4.1.1. Aksolotlda Periferik Sinir Rejenerasyonu	16
5. MATERYAL VE METOT	18
5.1. Malzeme Listesi	18
5.2. Hayvan hatları.....	18
5.3. AKG Nöron Kültürü.....	19
5.3.1. Kültür Kaplarının Hazırlanması	19
5.3.2. Diseksiyon ve Kültür Vasatlarının Hazırlanması	21
5.3.3. AKG Diseksiyonu	21
5.3.4. Hücre Eldesi.....	23

5.3.4.1. Kollajenaz İnkübasyonu.....	23
5.3.4.2. Kollajenaz Enziminin Uzaklaştırılması.....	23
5.3.4.3. Tripsin İnkübasyonu.....	23
5.3.4.4. Tritürasyon ve DNase inkübasyonu	24
5.3.4.5. Enzimin Aktivitelerinin Durdurulması Uzaklaştırılması.....	24
5.3.4.6. Hücrelerin Ayrıştırılması	24
5.3.4.7. Percoll'ün Uzaklaştırılması	25
5.3.4.8. Hücre Ekimi.....	25
5.4. Mikroskopik Görüntüleme.....	25
5.5. Akson Uzama ve Hücre Hareket Dinamiklerinin Analizi.....	26
6. BULGULAR.....	30
6.1. Aksototl Kültür Kabı Kaplama Protokollerinin Etkinlikleri.....	30
6.2. Akson Uzama Miktarının Mikroskopik Takibi	32
6.3. Akson Geri Çekme Miktarının Mikroskopik Takibi.....	35
6.4. Büyüme Konisinin Hareketinin Mikroskopik Takibi.....	36
6.5. Hücre Gövdesinin Hareketinin Mikroskopik Takibi.....	37
6.6. Akson Dallanma Sayısının Mikroskopik Takibi	38
7. TARTIŞMA	40
8. SONUÇ.....	44
9. KAYNAKLAR.....	45
10. ETİK KURUL ONAYI.....	52
11. ÖZGEÇMİŞ.....	55

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 5.1.1: Malzeme listesi.....	18
--	----



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1.1: Duyu nöronlarının periferik uzantılarının gösterilmesi (1).....	5
Şekil 4.1.2: Periferik sinir organizasyonun gösterilmesi (2).....	6
Şekil 4.1.1.1: a. Mallory-Azan yöntemi ile boyanmış bir arka kök gangliyonu gösteren fotomikrograf. psödo-unipolar nöron gövdesi (ok), sinir lifleri (NF). b. Ganglionun yüksek büyütmede görüntüsü. Satellite hücresi (ok) (3).....	8
Şekil 4.2.1: Wallerian dejenerasyonu (4).....	10
Şekil 4.4.1: Rejenerasyon çalışmalarında kullanılan semender türleri (5)	13
Şekil 4.4.2: Semenderlerde beyin rejenerasyonu (5).....	15

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 5.3.3.1:** Yetişkin fare arka kök ganglion diseksiyonu aşamaları.....22
- Resim 5.3.3.2:** Aksolotl arka kök ganglion diseksiyonu aşamaları.....22
- Resim 5.4.1:** Yetişkin fare AKG nöronlarının aydınlık alan mikroskopi görüntüsü.26
- Resim 5.5.2:** A. Trackmate eklentisi kullanılarak hücre gövde hareketi ve büyüme konisi hareketi ölçüldü. Mavi yol hücre gövdesinin izlediği yolu gösteriyor. Kırmızı yol büyüme konisinin izlediği yolu gösteriyor. B. “ROI manager” kullanılarak hücre gövde merkezi belirlendi.....27
- Resim 5.5.3:** Aksolotl AKG nöronlarının büyüme konisinin aydınlık alan mikroskopi görüntüsü.....28
- Resim 5.5.4:** İki farklı aksolotl AKG nöronlarının uzayan aksonlarının birbiri ile temasının aydınlık alan mikroskopi görüntüsü.....29
- Resim 6.1.1:** Poly-D-Lizin ve laminin ile kaplanan kültür kaplarında inkübe edilen aksolotl AKG nöronlarının temsili aydınlık alan mikroskopi görüntüsü.....31
- Resim 6.2.1:** Yetişkin fare AKG nöronlarında akson uzamaları **A.** 24. saatte yetişkin fare hücrelerinde akson uzaması (137,706 μm). **B.** 36. saatte yetişkin fare hücrelerinde akson uzaması (547,645 μm). **C.** 48. saatte yetişkin fare hücrelerinde akson uzaması (838,63 μm).....32
- Resim 6.2.2:** Embriyonik fare AKG nöronlarında akson uzamaları **A.** 24. saatte embriyonik fare hücrelerinde akson uzaması (98,375 μm). **B.** 36. saatte embriyonik fare hücrelerinde akson uzaması (126,643 μm). **C.** 48. saatte embriyonik fare hücrelerinde akson uzaması (180,322 μm).32
- Resim 6.2.3:** Aksolotl AKG nöronlarında akson uzamaları **A.** 24. saatte aksolotl hücrelerinde akson uzaması (391,426 μm). **B.** 36. saatte aksolotl hücrelerinde akson

uzaması (763,544 μm). C. 48. saatte aksolotl hücrelerinde akson uzaması (1048,195 μm)	33
Resim 6.2.4: Yetişkin fare, aksolotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saatlik takiplerinden elde edilen görüntülerle akson uzama miktarlarının karşılaştırılması (** $p<0,001$, **** $p<0,0001$).....	34
Resim 6.3.1: Yetişkin fare, aksolotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saatlik takiplerinden elde edilen görüntülerle akson geri çekme miktarlarının karşılaştırılması (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).....	35
Resim 6.4.1: Yetişkin fare, aksolotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saatlik takiplerinden elde edilen görüntülerle büyüme konisinin hareketlerinin karşılaştırılması (** $p<0,01$).....	36
Resim 6.5.1: Yetişkin fare, aksolotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saatlik takiplerinden elde edilen görüntülerle hücre gövdesinin kat ettiği mesafelerin karşılaştırılması (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).....	37
Resim 6.6.1: Yetişkin fare, aksolotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saatlik takiplerinden elde edilen görüntülerle akson dallanma sayılarının karşılaştırılması.....	38
Resim 6.6.2: Yetişkin fare, aksolotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saat boyunca yeni oluşan ve geri çekilen akson dallanma sayıları (* $p<0,05$).....	39

1. ÖZET

AKSOLOTL VE FARE ARKA KÖK GANGLIONLARININ REJENERASYON KAPASİTELERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Aksolotl semender aile üyesi, rejenerasyon araştırmaları için çok değerli bir model hayvandır. Kopan ekstremitelelerini tekrar büyütebilen aksolotl hem periferik hem de merkezi sinir sistemini başarıyla ve eksiksiz bir şekilde yeniler. Aksolotlda periferik sinirlerin rejenerasyonu da memelilere göre çok daha başarılıdır ve hatta ekstremitte rejenerasyonu bunun gerçekleşmesine bağlıdır. Bu hayvanlarda sinir rejenerasyonunu daha başarılı kılan, sistemik faktörler olabileceği gibi nöronların intrinsik kapasiteleri de memelilerden farklı olabilir. Diğer taraftan aksolotlun biyolojik olarak embriyonik dönem özellikleri koruyarak yetişkinliğe ulaşması sinir rejenerasyon başarısının altındaki sebep olabilir. Bu gerçeklerden yola çıkarak, bu tez çalışmasında aksolotl duyu nöronu akson rejenerasyon kapasitesinin yetişkin ve embriyonik fare ile karşılaştırılması yapılmıştır. Fare nöron kültürleri için yayınlanmış standart bir protokol izlenmiş, aksolotl arka kök ganglion (AKG) nöron protokolü ise bu tez çalışması kapsamında geliştirilmiştir. Aksolotl ve yetişkin ve embriyonik fare AKG nöronları kültürün 24-48. saatleri arasında gövde ve akson büyüme konisi hareketleri, akson uzama ve geri çekme miktarları ve dallanma sayılarını analiz etmek amacıyla görüntülenmiştir. Görüntüler zaman aralıklı aydınlık alan mikroskopisi ile 10 dakika aralıklarla kaydedilmiştir. Sonuç olarak aksolotl AKG nöronlarının bireysel nöron rejenerasyon kapasitesinin yetişkin fare ve embriyonik farenin nöronlarına kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Embriyonik fare AKG nöronlarının rejenerasyon kapasitesinin ise, yetişkin fare AKG nöronlarına kıyasla aksolotl AKG nöronlarının kapasitesine daha yakın olduğu bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Arka kök ganglion nöronu, aksolotl, fare, periferik sinir rejenerasyonu, rejenerasyon.

2. ABSTRACT

COMPARISON OF REGENERATION CAPACITIES OF AXOLOTL AND MOUSE DORSAL ROOT GANGLIONS

The axolotl salamander family member is an invaluable model animal for regeneration research. The axolotl, which can regrow the severed extremities, successfully and completely regenerates both the peripheral and central nervous systems. Regeneration of peripheral nerves in the axolotl is also much more successful than in mammals, and even limb regeneration depends on this. While there may be systemic factors that make nerve regeneration more successful in these animals, the intrinsic capacities of neurons may also be different from mammals. On the other hand, retention of the embryonic characteristics in axolotl may underlie the nerve regeneration success. Based on these facts, in this thesis, the axon regeneration capacity of the axolotl sensory neuron was compared with the adult and embryonic mice. A published standard protocol was followed for mouse neuron cultures while the axolotl dorsal root ganglion (DRG) neuron protocol was developed within the scope of this thesis study. Axolotl, adult and embryonic mouse cultures were continuously imaged between 24-48th hours to quantify and analyse cell soma and axon movements, axon elongation and retraction distances and branching numbers. Images were recorded at 10-minute intervals with time-lapse brightfield microscopy. As a result, it was observed that the individual neuron regeneration capacity of axolotl DRG neurons was higher compared to the neurons of adult and embryonic mouse. The regeneration capacity of embryonic mouse DRG neurons was found to be closer to the capacity of axolotl DRG neurons compared to adult mouse DRG neurons.

Key Words: Dorsal root ganglion neurons, axolotl, mouse, peripheral nerve regeneration, regeneration.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Yetişkin memeli merkezi sinir sistemi (MSS) aksonlarının çoğu yaralanma sonrasında yeniden büyümeyen, memeli periferik sinir sistemi (PSS) ve çoğu omurgasız ve memeli olmayan omurgalıların aksonları yenilenebilir (6). MSS hasarından sonra akson rejenerasyonunun başarısız olması sıklıkla kalıcı sakatlıklara neden olur. Bu nedenle, bir nöronun kopmuş aksonu yeniden üretme kabiliyeti, fonksiyonun geri kazanılması için hayati önem taşır. Schwann hücreleri aksonlarla sıkı temas halindedir ve aksonal fonksiyonu destekler. Schwann hücrelerinin bölünmesi, kopmuş veya ezilmiş periferik sinirin rejenerasyonundaki ilk adımdır (7).

Semenderler tüm yaşamları boyunca hasarlı veya kayıp vücut parçalarını yenilemekte mükemmeldir. Aksolotl, tetrapodlar arasında, dokuları, organları ve tüm vücut parçalarını yeniden büyütmek için etkileyici bir yetenekle en geniş rejeneratif kapasiteye sahiptir (8,9). Aksolotlın ampute edilmiş ekstremitelerini tamamen yeniden üretebilme kabiliyeti, onu memelilerden ve neredeyse ürodellerin dışındaki tüm omurgalılarından ayırır, ancak filogeni boyunca bazı rejeneratif mekanizmalar korunur. Aksolotl ekstremita rejenerasyonu, memelilerin parmak ucu rejenerasyonu ile bazı temel benzerlikleri paylaşır ancak memeli ekstremita rejenerasyonu bu kapsamda çok sınırlıdır. Sonuç olarak aksolotlın yüksek seviyedeki rejenerasyon kapasitesine sahip olması aksolotlın memelilerde rejeneratif tıbbın araştırılması ve ilerletilmesi için cazip bir model olmasını sağlar (9).

Merkezi sinir sisteminde sınırlı rejeneratif potansiyele sahip olan memelilerin aksine, aksolotlın merkezi sinir sisteminde gerçekleşen ağır yaralanmalardan tamamen kurtulabileceği gösterilmiştir. Aksolotl beyнинin büyük bölümleri yaralanmadan sonra tamamen yenilenebildiği ve çalışmalar tam lobektomiden bile iyileşebileceklerini bulmuştur (10,11).

Aksolotlların omurga hasarı sonucunda kuyruklarını ve omuriliklerini tamamen rejenerate edebildikleri gösterilmiştir. Bu rejenerasyon olayları, memelilerdeki merkezi sinir sistemi yaralanmasından sonra aksonal büyümeyi engellediği düşünülen glial skar oluşumu olmadan meydana geldiği bulunmuştur (12,13).

Aksolotl periferik nöronlarının akson rejenerasyon yetenekleri memelilere göre daha yüksektir. Bu hayvanlarda sinir rejenerasyonunu daha başarılı kılan, sistemik faktörler olabileceği gibi nöronların intrinsik kapasiteleri de memelilerden farklı olabilir. Aksolotl nöronları tiroid hormon sinyallemedeki mutasyonlar nedeniyle metamorfozunu tamamlayamadığı ve bazı embriyonik özelliklerini koruduğu gözlenmiştir (14). Bu doğrultuda embriyonik fare, yetişkin fare ve aksolotl arka kök ganglion nöronlarının bireysel rejenerasyon kapasiteleri *in-vitro* ortamda mukayese edildi. Amaca yönelik olarak aksolotl arka kök ganglion nöron kültürü protokolü geliştirildi. Geliştirilen bu protokol ile periferik sinir yaralanmalarına yönelik araştırmalara katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

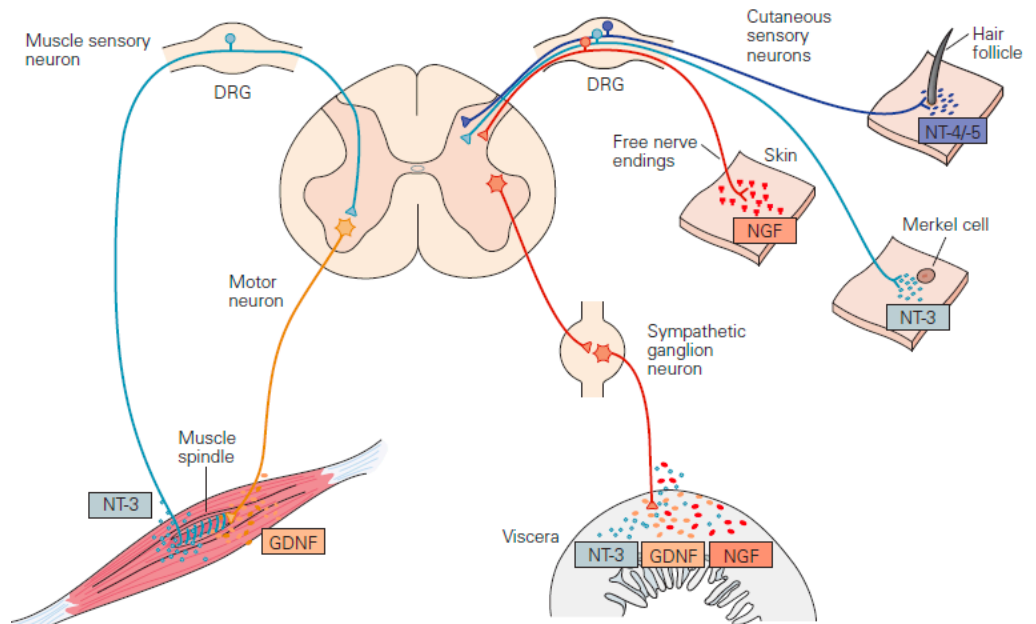


4. GENEL BİLGİLER

4.1. Periferik Sinir Sistemi

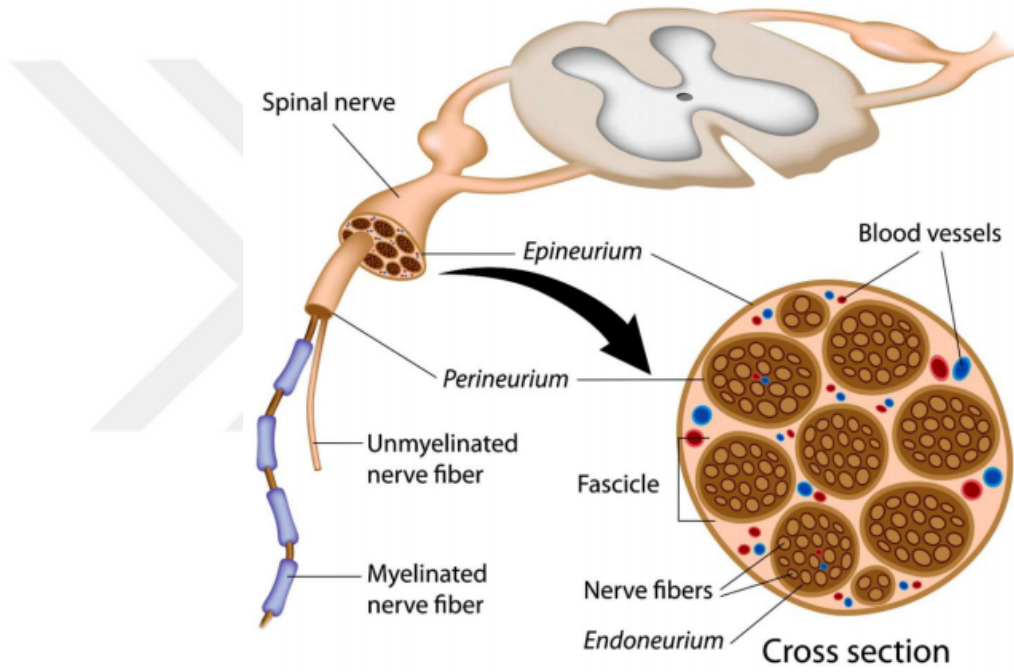
Periferik sinir sistemi (PSS), özel sinir uçlarına sahip periferik sinirlerden ve merkezi sinir sisteminin dışında bulunan sinir hücresi gövdelerini içeren ganglionlardan oluşur. Ganglionlar vücudun organları ve dokuları ile beyin ve omurilik arasında duyuusal ve motor (efektör) bilgi taşıyan, bağ dokusu ile bir arada tutulan birçok nöronal hücre gövdelerinden ve bunlara giden ve bunlardan çıkan sinir liflerinden oluşur (3).

Periferik sinirlerin hücre gövdeleri, merkezi sinir sistemi içinde veya merkezi sinir sistemi (MSS) dışında periferik ganglionlarda bulunabilir. Duyu nöron hücre gövdeleri ganglionlarda bulunur, ancak MSS'ne yakındır. PSS'nin motor nöron hücre gövdeleri MSS'de bulunur. İskelet kasını somatik efferent lifler ile innerve eden motor nöronların hücre gövdeleri, beyin, beyin sapı ve omurilikte bulunur. MSS'den ayrılan aksonlar periferik sinir lifleri ile innerve ettikleri iskelet kaslarına gider. Tek bir nöron MSS'den efektör organa impulsları iletir. Duyusal sistemde (hem somatik afferent hem de viseral afferent bileşenler), tek bir nöron reseptörü, duyuusal bir ganglion yoluyla omuriliğe veya beyin sapına bağlanır (1) (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1: Duyu nöronlarının periferik uzantılarının gösterilmesi (1).

Periferik sinirin büyük kısmı sinir liflerinden ve bunları destekleyen Schwann hücrelerinden oluşur. Her bir sinir lifi, lif boyunca uzunlamasına seyreden kollajen fibrillerinden oluşan çok ince gevşek bağ dokusu olan endonöryum ile çevrilidir. Birçok sinir lifi bir araya gelerek sinir fasikülünü oluşturur. Her bir sinir fasikülü ise metabolik olarak aktif difüzyon bariyeri görevi gören kan-sinir bariyerinin oluşumuna katkıda bulunan özelleşmiş bir bağ dokusu olan perinöryum ile çevrilidir. Sinir fasiküllerinden oluşan periferik sinir ise düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşan bir kılıf olan epinöryum ile çevrilir (3) (şekil 4.1.2).



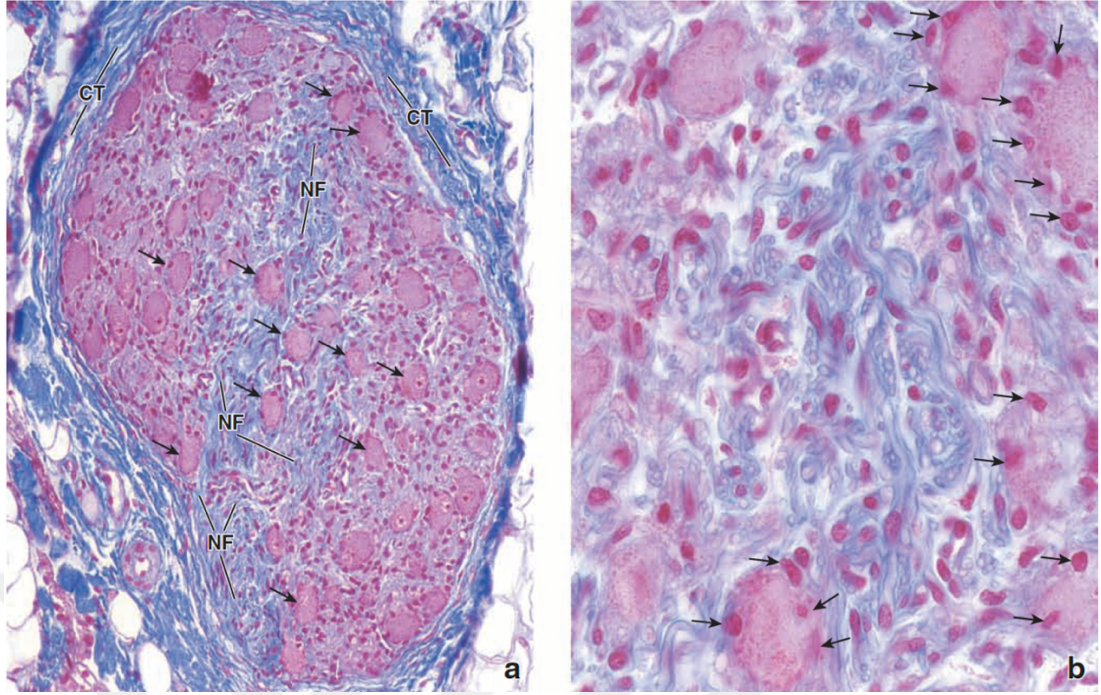
Şekil 4.1.2: Periferik sinir organizasyonun gösterilmesi (2).

Periferik sinirde hücre dışı matriks Schwann hücrelerinin bazal laminasında ve endonöryumda bulunur ve esas olarak tip IV kollajen, laminin, fibronektin ve entaktinlerden oluşur (2). Laminin, sinir yaralanmasından sonra bazal lamina iskelelerine rejeneratif destekleme kabiliyeti kazandıran yapıştırıcı bileşendir ve *in-vitro* nörogenezi desteklediği gösterilmiştir (15). Fibronektin ise hem tip IV kollajen ve laminin ile sürdürdüğü önemli ilişki hem de sinir lifi oluşumundaki katkısından dolayı sinir rejenerasyonunda önemli bir bileşendir (16). Laminin ve tip IV kolajen ile kovalent olmayan bağ kuran entaktin yetişkin Schwann hücreleri için öncül göç

faktörü olarak rol almaktadır (17). Olgun doku yapısıyla ilişkili olmayan fibrin hücre dışı matriks bileşenlerinin onarım stratejisinde önemli rol oynayarak hasar sonrası geçici bir ağ oluşturup yeni salgılanan hücre dışı matriksin olgun bileşenleri ile yer değiştirir. Başarılı bir aksonal rejenerasyonun gerçekleşmesi için fibrin ağının oluşması gerektiği gösterilmiştir (16).

4.1.1. Arka Kök Ganglionu

Arka kök ganglionu, termoreseptörler, nosiseptörler, propriyoseptörler ve kemoreseptörler gibi reseptörlerden duyuusal bilginin dönüştürülmesinden, modüle edilmesinden ve omuriliğe iletilmesinden sorumlu birincil duyu nöronlarının hücre gövdelerini içerir. Hücre gövdeleri, somalar arasındaki etkileşimi engelleyen satellite hücre katmanlarıyla ayrılır (18) (Şekil 4.1.1.1). AKG nöronları, bir aksonun iki ayrı dala ayrılıp distal ve proksimal uç ile sonlanmasından dolayı psödo-unipolar nöronlar olarak kabul edilir. Çevreden gelen uyarıların ürettiği aksiyon potansiyellerinin her zaman AKG'den geçmesi gerekmez; AKG'yi atlayabilir ve proksimal uç ve omuriliğe kadar devam edebilirler. AKG'nin bu benzersiz özelliği yetişkin psödo-unipolar nörona farklılaşmadan önce bipolar nöron olarak embriyolojik başlangıcının olması ile mümkün olduğu düşünülmektedir (19). Hücre gövdelerinin büyüklüğüne ve işlevlerine göre sınıflandırılmış çeşitli AKG nöronları vardır. A Tipi AKG nöronları büyüktür; dokunma, titreşim ve propriyosepsiyondan sorumludur. B tipi nöronların büyüklüğü küçüktür ve nosisepsiyondan sorumludur (20).



Şekil 4.1.1.1: a. Mallory-Azan yöntemi ile boyanmış bir arka kök ganglionu gösteren fotomikrograf. psödo-unipolar nöron gövdesi (ok), sinir lifleri (NF). b. Ganglionun yüksek büyütmede görüntüsü. Satellite hücresi (ok) (3).

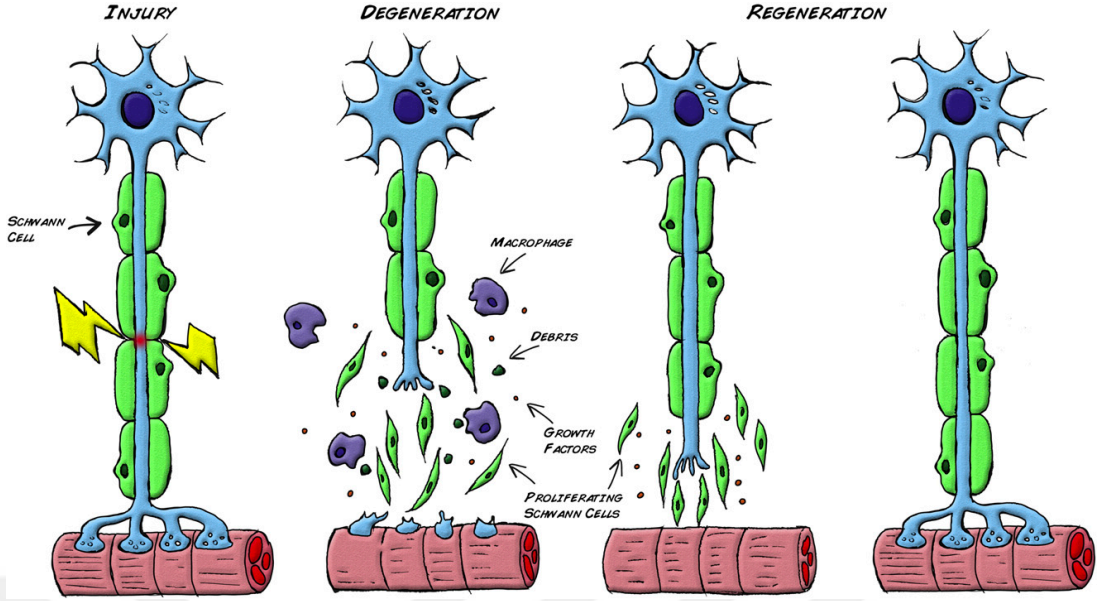
4.2. Periferik Sinir Travması

Periferik sinir travmaları, dünya çapında bir milyondan fazla insanı etkileyen önemli bir klinik ve halk sağlığı sorunudur. Her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 20 milyon ve Avrupa'da yaklaşık 300.000'den fazla kişi periferik sinir travmasından etkilenmektedir (21,22). Ağır yaralanmaların hastaların yaşam kalitesi üzerinde yıkıcı etkileri vardır. Periferik sinir travmaları hasarlanan sinir lifleri tarafından innerve edilen alanlarda akut veya ilerleyici motor, duyuşal ve otonomik işlevlerin kaybına neden olmaktadır. Periferik aksonlar, koşullar ve ortam izin verdiğinde yenilenebilir de işlevsel iyileşme garanti değildir. Lezyonun ciddiyetine bağlı olarak değişen derecelerde defektler görülebilir ve bu genellikle hastayı sakat bırakabilir (23).

Periferik sinir travması, Wallerian dejenerasyonu ile karakterizedir ve fizyolojik fonksiyonun geri kazanımı büyük önem taşıyan Schwann hücrelerinin ve

makrofajların fonksiyonelliğine bağlıdır. Wallerian dejenerasyonu, herhangi bir periferik sinirin tüm koruyucu tabakaları kesildiğinde ve aksonlar nöronal hücre gövdelerinden ayrıldığında meydana gelir. Yıkılan miyelin atıkların fagositozu ile aksonal segmentin hasar bölgesinden distal uca doğru parçalanmasını ifade eder. Aynı zamanda proksimal aksonal segment ise bir Ranvier düğümüne ulaşana kadar geriye doğru dejenere olur (24,25).

Hasar sonrası her filizin distal kısmında aktin filamentleri bakımından zengin filopodiadan oluşan bir büyüme konisi gelişir. Filopodinin uçları büyüme konisinin ilerlemesi için bir yön belirler. Tercihen Schwann hücresinin dış tabakasında bulunan fibronektin ve laminin gibi hücre dışı matrisin proteinleri ile etkileşime girerler. Yeniden farklılaşan Schwann hücreleri ve makrofajlar, daha sonra aksonların yenilenmesi için destek sağlayan Büngner bantlarını oluşturmak için endonöral tüpler içinde sıraya girerler. Bu filiz, bant boyunca günde yaklaşık 3 mm oranında büyüyebilir. Birçok yeni filiz hücresele bantlarla temas etmemesine ve dejenere olmasına rağmen, yüksek sayıları duyu ve motor bağlantılarını yeniden kurma olasılığını artırır. Hasar bölgesini geçtikten sonra, filizler distal güdükte hayatta kalan hücresele bantlara girer. Bu bantlar daha sonra nöritleri hedeflerine yönlendirir ve aynı zamanda sürekli büyüme için uygun bir mikro çevre sağlar. Yeniden farklılaşan Schwann hücreleri, miyeline özgü proteinlerin ekspresyonunu baskılayarak nörotrofik faktör ve GAP-43 üretimini artırır. Denerve olan Schwann hücreleri miyelin debrisini bir dereceye kadar fagosite edebilir. Miyelin ve aksonal atığın tamamının fagositozu için bölgede makrofajların toplanması gereklidir (26,27) (Şekil 4.2.1).



Şekil 4.2.1: Wallerian dejenerasyonu (4).

4.3. Periferik Sinir Rejenerasyonu

Yetişkin memeli merkezi sinir sistemi (MSS) aksonlarının çoğu yaralanma sonrasında yeniden büyümezken, memeli periferik sinir sistemi (PSS) ve çoğu omurgasız ve memeli olmayan omurgalıların aksonları yenilenebilir. MSS hasarından sonra akson rejenerasyonunun başarısız olması sıklıkla kalıcı sakatlıklara neden olur. Bu nedenle, bir nöronun kopmuş aksonu yeniden üretme kabiliyeti, fonksiyonun geri kazanılması için hayati önem taşır (6).

Çok sayıda çalışma Schwann hücrelerinin periferik sinir hasarından sonra aksonal rejenerasyonda önemli bir rol oynadığını belgelemiştir. PSS'de yeni oluşan bir yarada Schwann hücreleri bölünür ve yeni sinir filizinin doğrudan büyümesini sağlayan hücresel bantlar geliştirir (4).

Schwann hücreleri aksonlarla sıkı temas halindedir ve aksonal fonksiyonu destekler. Aksonlarla yapılan etkileşim modeline göre, Schwann hücreleri miyelinan ve miyelinan olmayan tiplere ayrılır. Miyelinli sinir lifi, tek bir akson ve koruma

Schwann hücrelerinden oluşurken, miyelinleme yapmayan lif, tek bir Schwann hücresi tarafından sarılmış birden fazla aksone sahiptir (7).

Schwann hücrelerinin bölünmesi, kopmuş veya ezilmiş periferik sinirin rejenerasyonundaki ilk adımdır. Başlangıçta bu hücreler kendilerini endonöral tüp adı verilen bir dizi silindir şeklinde düzenlerler. Çoğalan Schwann hücreleri, Büngner bantları adı verilen uzunlamasına sütunlara benzeyen hücresel bantlar halinde kendilerini organize ederler. Hücresel bantlar, yenilenen aksonların yeni sinir uzantılarının (nöritler veya filizler) büyümesine rehberlik eder. Bantlar yerleştikten sonra, proksimal güdükten çok sayıda filiz büyümeye başlar (7).

4.3.1. Aksonal Rejenerasyon

Aksonal rejenerasyonun gerçekleşmesi için, nöronun hasar sonrasında hayatta kalması ve rejenerasyon için gerekli metabolik duruma geçebilmesi gerekir. Bu nöronun tipine, canlının yaşına, hasarın niteliğine, derecesine ve hücre gövdesinden uzaklığına bağlıdır. Hasarın distalinde kalan sinir parçasının rejenerasyona uygun bir ortam sağlaması gerekir ve başarılı bir akson rejenerasyonu için de uygun hedefin tekrar inerve edilebilmesi gerekir.

Yaralı nöron içinde aksonal rejenerasyonu tetikleyen iç faktörler vardır (28,29). *In-vitro* ortamda AKG nörit büyümesi miyelinle ilişkili glikoprotein (MAG) veya miyelin tarafından inhibe edilir. Bununla birlikte, periferik dal kültürden önce lezyona uğradığında, AKG nöronları MAG veya miyelin üzerinde nöritler geliştirebilir (30,31). Hem *in-vitro* hem de *in-vivo* deneyler, AKG periferik aksonlarının lezyonunun, miyelin ile ilişkili inhibitör moleküllerin inhibitör etkilerinin üstesinden gelmek için yeterli bir iç büyüme kapasitesini aktive ettiğini göstermektedir. Periferik akson lezyonlarının intrinsik büyüme kapasitesini nasıl etkinleştirdiği merak edilmektedir. Hücre içi siklik adenozin monofosfatın (cAMP), periferik sinir lezyonundan sonra arttığı bulunmuştur. AKG'ye periferik sinir lezyonu olmadan önce enjeksiyonu yapılan bir cAMP analogu olan dibutiril-cAMP (db-cAMP) nöronal iç büyüme kapasitesini başlatmak ve AKG nöronlarının merkezi dalını yarananma

sonrası rejenerasyona teşvik etmek için yeterli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca MAG üzerinde AKG nöronlarının nörit büyümesini de desteklemektedir (30).

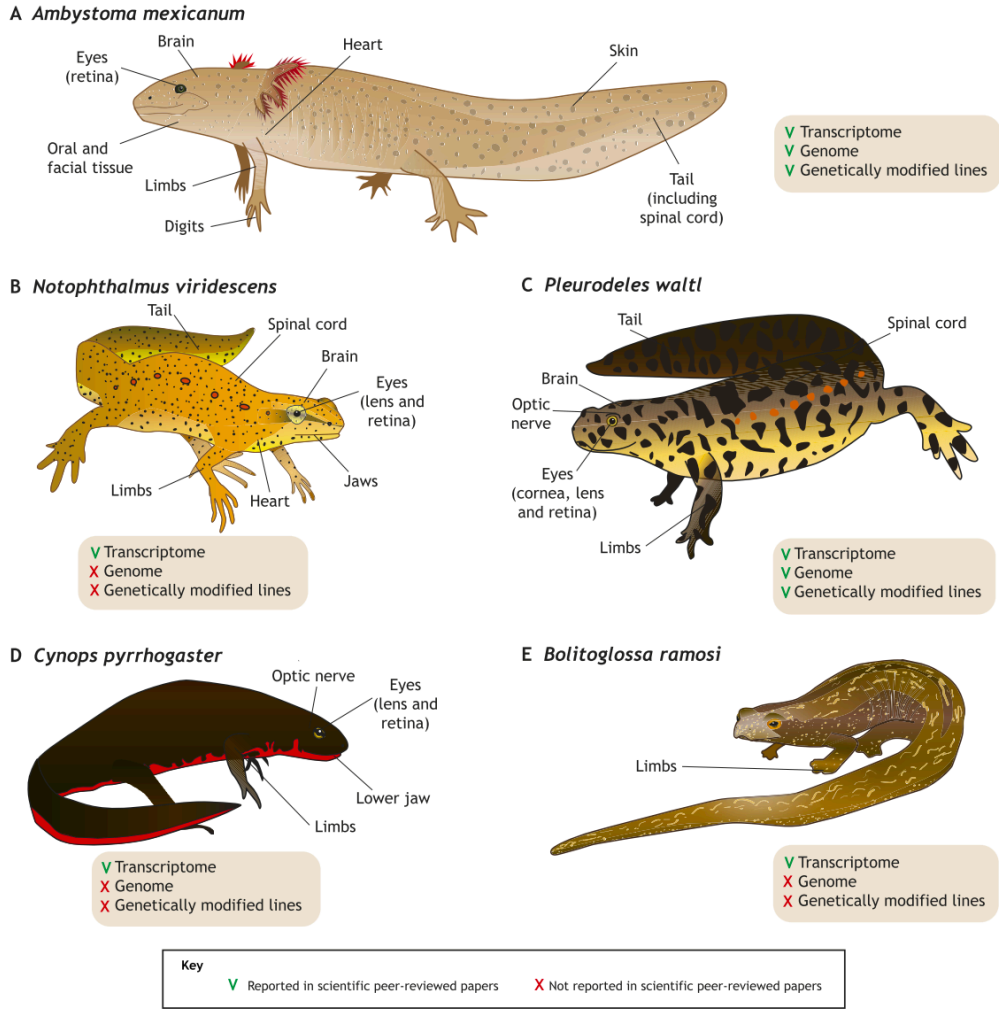
Bununla birlikte, aksonal rejenerasyon çevresel faktörler tarafından düzenlenebilir. Örneğin, sinir hasarından hemen sonra, çeşitli nörotrofik faktörler (örn., BDNF, FGF, TGF- β , GDNF) üretilir ve yaralanan aksonlar etrafındaki Schwann hücreleri ve makrofajlarından salgılanır, aksonal zardaki ilgili reseptörlere bağlanır ve lezyon sinyalleri üretilir. Genel olarak lezyon sinyalleri geriye doğru hücre gövdesine taşınır ve gen ekspresyonunu indükler (32,33).

İnhibitör moleküller, rejenerasyonun meydana geldiği memeli PSS'nde daha az bulunur (34). Akson rejenerasyonunun çevresel inhibisyonu ile ilişkili nöronal reseptörleri, koreseptörleri ve aşağı akış efektörlerini saptamıştır (35). Salgılanan inhibitör moleküller akson yeniden büyümesini kısıtlasa da, son bulgular skarı oluşturan astrositlerin farelerde omurilik yaralanması sonrası farklı MSS aksonal yollarının kendiliğinden yeniden büyümesini desteklediğini göstermektedir (36).

4.4. Semenderlerde Rejenerasyon

Tüm amfibiler rejeneratif kapasiteler sergilerken, bunlardan bazılarının rejenerasyon kapasitesi diğerlerinden daha fazladır. Semenderler tüm yaşamları boyunca hasarlı veya kayıp vücut parçalarını yenilemekte mükemmeldir.

Tüm semenderler karmaşık yapıları yeniden oluşturma potansiyelini gösterir: tüm ekstremiteler, kuyruk, oküler dokular, merkezi sinir sistemlerinin ve kalbin önemli kısımları yeniden büyüyebilir (37,38). Aksolotlların yanı sıra diğer amfibiler de rejenerasyon yetenekleri bakımından incelenmiştir. *Xenopus laevis*'in yavruları kuyruklarını ve omurgalarını yeniden üretebilirken, bazı yeni türler (*Pleurodeles waltl*, *Notophthalmus viridescences* ve *Cynops pyrrhogaster* en yaygın olarak incelenen türlerdir) ekstremiteleri ve organları yeniden üretebilir. (39) (Şekil 4.4.1).



Şekil 4.4.1: Rejenerasyon çalışmalarında kullanılan semender türleri (5).

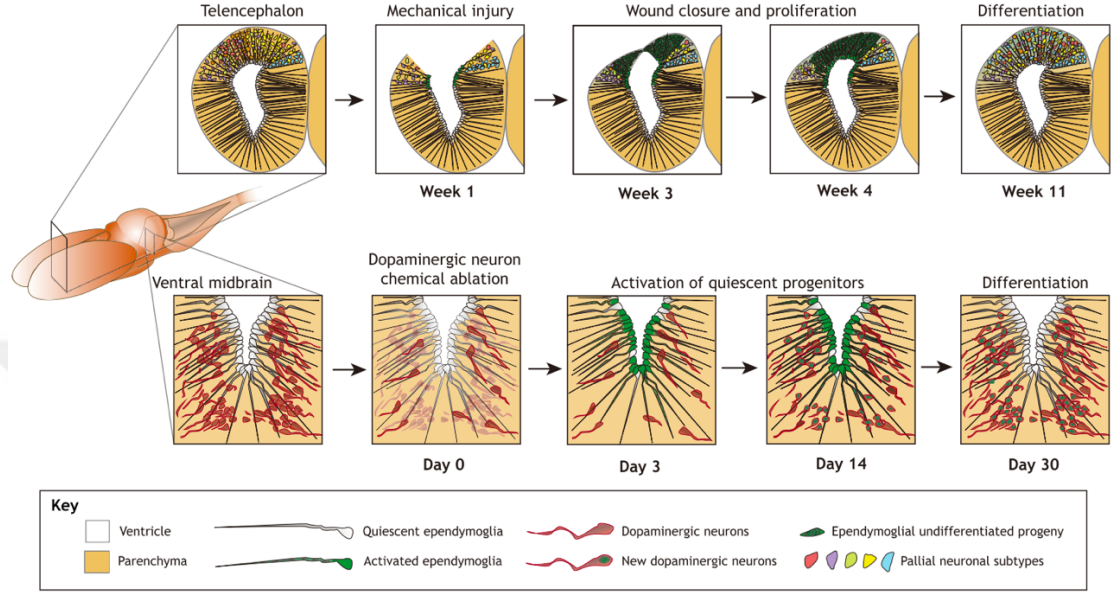
Yetişkin semenderler, hem yapı hem de işlev açısından retina, beyin bölgeleri ve omurilik dahil olmak üzere çeşitli hasarlı sinir dokularını yeniden oluşturabilir (37,40). Merkezi sinir sistemi (MSS) hasarı genellikle hem nöronal hem de nöronal olmayan hücre tiplerini etkiler ve hasarın derecesine bağlı olarak davranışsal anormalliklere yol açabilir. İşlevi geri kazanmak için hem eksik hücrelerin hem de hasarlı bağlantıların yeniden oluşturulması gerekir. Semenderler bu süreçlerde oldukça iyi performans gösterir ve bunu aşağıda açıklandığı gibi çeşitli işlemleri kullanarak yaparlar.

Semenderler de yaralanma sonrasında omuriliklerini yeniden oluşturabilirler (37,41,42). Bu nedenle ve memelilerin aksine, semenderlerde omurilik travması

sadece geçici bir hareket kaybına yol açar (43–45). Semenderlerde omurilik transeksiyonundan sonra, yaralanmanın her iki tarafında yara iyileşmesi süreci, omuriliğin onarılmasına ve ardından yeni nöronların ve aksonların üretilmesine yol açar. Hasar görmüş aksonlar daha sonra merkezi kanalı hizalayan ependimoglia hücrelerin (memelilerde radyal glial hücrelerin muadilleri olan) uzantıları tarafından oluşturulan kanallar aracılığıyla yeniden büyür ve hasarlı aksonların yeniden işlevsel bir şekilde oluşmasını sağlar (37). Semenderlerde kuyruk amputasyonu da yeni bir omuriliğin oluşumuyla sonuçlanır ve bu deneysel paradigma, omurilik rejenerasyonu sırasında ortaya çıkan anahtar süreçlerin ve moleküllerin keşfinde etkili olmuştur (41,42).

Semender beyni evrimsel olarak memeli beyninden daha basit kalmış olsa da, çoklu nöronal alt popülasyonları ile beynin genel sito-mimarisi, semenderler dahil tüm omurgalılar arasında paylaşılır (37). İki tip yaralanma modeli hem doku rejenerasyonu hem de davranışsal iyileşme açısından semender beyninde önemli restoratif süreçler göstermiştir. Örneğin, telensefalon veya dorsal orta beynin parçaları çıkarılıp, bunun ardından yara kapanması, proliferasyon, nöronal çeşitliliğin yeniden ortaya çıkması ve yeni nöronlar arası bağlantıların oluşumu izlendi (Şekil 4.4.2). Semenderler memelilerden çok daha iyi olsa da, aksonal izlemeyi içeren dikkatli analizler, bu yenilenme sürecinin her zaman orijinal yapının tamamen aynı olmadığını ortaya koymuştur (12,46–50). Buna karşılık, diğer yaralanma modelleri, spesifik nöronal alt tiplerini ortadan kaldıran intrakraniyal toksin enjeksiyonundan sonra bireysel nöronal alt popülasyonların nasıl rejenere edildiğini ele almıştır. Bu çalışmalarda ependimoglia hücrelerin yeni nöronlar için ana kaynak olduğunu ortaya koymuştur. Bu deneyler ayrıca bölgeye özgü bir şekilde ependimoglia proliferasyonu ve nörogenezde nörotransmitter sinyali için önemli bir rol ortaya koymuştur (37,51–53). Ayrıca, ilişkisel öğrenme, karar verme ve korku davranışı tahlillerine dayanarak, bu çalışmalar semenderlerle memeliler arasında klişeleşmiş davranışların ontogenetik kodlamasının korunduğunu göstermiştir (37). Bu nedenle, semenderlerdeki beyin rejenerasyon çalışma sonuçlarının memeli karşılıklarını aramak yeni potansiyel tedavi girişimlerinin bulunması açısından son derece önemlidir. Bu ilkenin bir kanıtı olarak,

semenderlerdeki çalışmalara dayanarak, fare orta beyindeki dopamin aracı nörogenezi arttırmak mümkün olmuştur (54).



Şekil 4.4.2: Semenderlerde beyin rejenerasyonu (5).

4.4.1. Rejenerasyonda Model Organizma Aksolotl

Yetişkinlik boyunca dokuları ve yapıları rejenerere edebilen büyük bir sucul semender olan aksolotl (*Ambystoma mexicanum*), karmaşık doku rejenerasyonunun incelenmesi için paha biçilmez bir modeldir. Aksolotl, tetrapodlar arasında, dokuları, organları ve tüm vücut parçalarını yeniden büyütmek için etkileyici bir yetenekle en geniş rejeneratif kapasiteye sahiptir (8,9). Ampütasyonlu ekstremiteleri mükemmel bir şekilde yenileyebilen aksolotllar, bu olağanüstü rejeneratif yeteneği gösteren memelilerle en yakından ilişkili olan tetrapodlardır ve bu nedenle bu hayvanların çalışılması rejeneratif tıbbın ilerleyebilmesi için kilit canlıdır. Aksolotl, aynı zamanda bir laboratuvar ortamında yetiştirilmesi ve bakımı nispeten kolay olduğundan rejeneratif araştırma için tercih edilen semender haline gelmiştir (55).

Aksolotlın ampute edilmiş ekstremitelerini tamamen yeniden üretebilme kabiliyeti, onu memelilerden ve neredeyse ürodellerin dışındaki tüm omurgalılarından

ayırır. Memeli ekstremite rejenerasyonu bu kapsamda çok sınırlıdır. Akslotl ekstremite rejenerasyonu, memelilerin parmak ucu rejenerasyonu ile bazı temel benzerlikleri paylaşır ve sonuç olarak memelilerde rejeneratif tıbbın ilerletilmesi için cazip bir model sunar. Merkezi sinir sisteminde sadece sınırlı rejeneratif potansiyele sahip olan memelilerin aksine, akslotl merkezi sinir sisteminde de gerçekleşen büyük yaralanmalardan tamamen kurtulabilir. Akslotl beyninin büyük bölümleri yaralanmadan sonra tamamen yenilenebilir ve çalışmalar tam lobektomiden bile iyileşebileceklerini bulmuştur (10,11). Yetişkin beyinlerin ventriküler bölgesi boyunca nöronal proliferasyon gözlenmiştir (48). Akslotllar ayrıca omurga hasarı sonucunda kuyruklarını ve omuriliklerini rejenerate edebilir. Bu rejenerasyon olayları semenderlerde, memelilerdeki merkezi sinir sistemi yaralanmasından sonra aksonal büyümeyi engellediği düşünülen glial skar oluşumu olmadan meydana gelir (12,13). Tam olarak bu hayvanların merkezi sinir sisteminin neden glial skarlaşma olmadan iyileşebileceği araştırılmaktadır.

4.4.1.1. Akslotlda Periferik Sinir Rejenerasyonu

Akslotllın periferik sinir sistemi basittir, ancak diğer tetrapodlara benzer bir şekilde düzenlenmiştir. Akslotl periferik sinir sistemi, sinire bağımlı rejenerasyon kapasitesi nedeniyle araştırmacıları özellikle ilgilendirmektedir (55).

Sinir rejenerasyon çalışmalarının uzun geçmişine rağmen, bu sürecin altında yatan mekanizmaların çoğu, büyük ölçüde birçok modern tekniğin semenderlerde kullanılmak üzere optimize edilmemiş olmasından dolayı tam olarak anlaşılabilmiştir (56). Bununla birlikte, daha yeni yaklaşımlar, sinirlerin blastemal proliferasyon için önemli olan bir veya daha fazla büyüme faktörünü sağladıkları fikrini güçlü bir şekilde desteklemiştir (55). İlgili faktörler arasında sinir büyüme faktörü ve kemik morfogenetik proteinli (BMP) fibroblast büyüme faktörleri bulunur. Bu çalışmaların çoğu, kültürlenmiş blastemal hücreler üzerinde gerçekleştirilmiştir ve bu bulgular ile birlikte, proliferatif sinyalleri sinirden rejeneratif blastemaya iletmek için birlikte çalışan bir dizi faktör olduğunu göstermektedir (57).

Akson rejenerasyonuna, nörona dışarıdan gelen sinyaller kadar kendi sahip olduğu intrinsik mekanizmalar da destek sağlar (58,59). Hasar sonrası rejeneratif moda geçiş, aksonal taşıma, hasar sinyal mekanizmaları ve anti apoptotik mekanizmaların etkinliği nöronların intrinsik özellikleri olarak sınıflandırılabilir. Bir nöronun hasar sonrası vereceği cevap ve bu mekanizmaların aktivasyonu sahip olduğu intrinsik yeteneklere bağlıdır (60,61).

Periferik nöronlarla yapılan sınırlı sayıda *in-vitro* çalışmalarda AKG'lerin eksplant kültürleri yapılmıştır ve bunlar çoğunlukla blastema ile kültüre edilmişlerdir (62). Ancak aksotl AKG nöronlarının bireysel intrinsik rejenerasyon kapasitelerini eksplant kültürü ile anlamak mümkün değildir. Bunun için en uygun yöntem ayrılmış AKG nöronlarının kültüre edilmesidir ancak literatürde bununla ilgili bir protokol ya da yayın bulunmamaktadır.

Amaca yönelik olarak aksotl arka kök ganglion nöron kültürü protokolü geliştirildi. Bu doğrultuda embriyonik fare, yetişkin fare ve aksotl arka kök ganglion nöronlarının bireysel rejenerasyon kapasiteleri *in-vitro* ortamda mukayese edildi. Geliştirilen bu protokol ile periferik sinir yaralanmalarına yönelik araştırmalara katkı sağlaması amaçlanmaktadır.

5. MATERYAL VE METOT

5.1. Malzeme Listesi

Tablo 5.1.1: Malzeme listesi

Malzeme	Firma–Katalog No
RPMI-1640	Sigma-R0883
Neurobasal A	Gibco-A10888-022
L-15	Multicell-323-050-cl
B27	Gibco-17504044
GlutaMAX	Gibco-35050061
Antibiyotik	Sigma-A5955
Kollajenaz	Sigma-C7657
Hanks Balanced Salt Solution	Sigma-H9269
Tripsin EDTA	Sigma-59418C
DNAz	Sigma-D4513
FBS	Sigma-F4135
Tripsin İnhibitör	Sigma-T6522
Poly-L-Lysine	Sigma-P6282
Laminin	Sigma-L2020
Percoll	Sigma-P4937

5.2. Hayvan hatları

Canlı görüntüleme deneylerinde 6-8 haftalık Balb-c farelerden, embriyolardan (E13-E14) ve 1 yaşında, 10-15 cm uzunluğunda vahşi tip aksolotllardan izole edilen AKG nöron hücreleri kullanıldı. Bu deneyler için 8 adet yetişkin ve embriyonik fare kullanıldı. Aksolotl AKG nöron kültür protokolünü oturtmak amacı ve canlı

görüntüleme deneylerinde toplam 60 aksolotl kullanıldı. Kullanılan hayvanlar İstanbul Medipol Üniversitesi Tıp Araştırmaları Merkezi'nden (MEDİTAM) temin edildi. Etik kurul onayı, İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alındı.

5.3. AKG Nöron Kültürü

Bu deneylerde fare nöron kültürleri için yayınlanmış standart protokoller uygulanırken (63), aksolotl duyu nöron kültür protokolü ise tez kapsamında geliştirildi.

5.3.1. Kültür Kaplarının Hazırlanması

Yetişkin ve embriyonik fare: Kültür yapılmadan bir önceki gün hücrelerin ekim yapılacağı 35 mm'lik cam tabanlı kültür kapları nöronların yaşayabilmeleri için uygun şekilde hazırlandı. Yetişkin ve embriyonik fare AKG nöron kültürü için 750 µl %10 Poly-L-Lizin (75 µl Poly-L-Lizin + 675 µl steril ddH₂O) 35 mm'lik cam tabanlı kültür kaplarının ortalarına yayılarak kaplandı. Kültür kapları 2 saat oda sıcaklığında kabin içerisinde bekletildi. Ardından 3 kere 1 ml distile su ile yıkandı. Kültür kaplarının ortalarına 500 µl %1 laminin (5 µl laminin + 495 µl steril ddH₂O) eklendi. Kültür kapları lamininde gece boyu 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Hücre ekimleri yapılmadan önce 3 defa steril ddH₂O ile yıkandı, yıkamadan sonra kurumaya bırakıldı.

Aksolotl: Hücrelerin ekim yapılacağı 35 mm'lik cam tabanlı ve plastik tabanlı kültür kaplarında nöronların yaşayabilmeleri için farklı kombinasyonlar denendi.

Birinci yöntem

Yetişkin ve embriyonik fare AKG nöron kültürlerinde olduğu gibi 750 µl %10 Poly-L-Lizin (75 µl Poly-L-Lizin + 675 µl steril ddH₂O) ve 500 µl %1 laminin (5 µl laminin + 495 µl steril ddH₂O) ile hem cam tabanlı hem de plastik tabanlı kültür kapları kaplandı. Kültür kapları lamininde gece boyu 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Hücre ekimleri yapılmadan önce 3 defa steril ddH₂O ile yıkandı, yıkamadan sonra kurumaya bırakıldı.

İkinci yöntem

Hem cam tabanlı hem de plastik tabanlı kültür kapları sadece 750 µl %10 Poly-L-Lizin (75 µl Poly-L-Lizin + 675 µl steril ddH₂O) ile kaplandı. Hücre ekimi yapılmadan önce 3 kere 1 ml distile su ile yıkandı. Laminin %1 oranında hücre ekimi esnasında eklendi.

Üçüncü yöntem

750 µl %10 Poly-L-Lizin (75 µl Poly-L-Lizin + 675 µl steril ddH₂O) ve 500 µl %1 fibronektin (5 µl fibronektin + 495 µl steril ddH₂O) ile kaplanan kültür kapları gece boyu 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Hücre ekimleri yapılmadan önce 3 defa steril ddH₂O ile yıkandı, yıkamadan sonra kurumaya bırakıldı.

Dördüncü yöntem

500 µl %0,2 jelatin (1 µl jelatin + 499 µl steril ddH₂O) ile kaplanan kültür kapları 20 dakika 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Hücre ekimleri yapılmadan önce 3 defa steril ddH₂O ile yıkandı, yıkamadan sonra kurumaya bırakıldı.

Beşinci yöntem

750 µl %10 Poly-L-Ornitin (75 µl Poly-L-Ornitin + 675 µl steril ddH₂O) ve 500 µl %1 fibronektin (5 µl fibronektin + 495 µl steril ddH₂O) ile kaplanan kültür kapları gece boyu 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Hücre ekimleri yapılmadan önce 3 defa steril ddH₂O ile yıkandı, yıkamadan sonra kurumaya bırakıldı.

Altıncı yöntem

750 µl %10 Poly-D-Lizin (75 µl Poly-D-Lizin + 675 µl steril ddH₂O) ve 500 µl %1 laminin (5 µl laminin + 495 µl steril ddH₂O) ile hem cam tabanlı hem de plastik tabanlı kültür kapları kaplandı. Kültür kapları lamininde gece boyu 37 °C'de inkübatörde bekletildi. Hücre ekimleri yapılmadan önce 3 defa steril ddH₂O ile yıkandı, yıkamadan sonra kurumaya bırakıldı.

5.3.2. Diseksiyon ve Kùltür Vasatlarının Hazırlanması

Yetişkin ve embriyonik fare: Yetişkin ve embriyonik fare doku diseksiyonlarında kullanılmak üzere içeriklerinde %1 antibiyotik ve %1 glutaMAX olacak şekilde 15 ml RPMI 1640 hazırlandı. Diseksiyon yapılana kadar +4 °C'de soğumaya bırakıldı. Aynı anda kùltür vasatı da taze olarak hazırlandı. Yetişkin ve embriyonik fare nöron kùltürlerinde kullanılmak üzere içeriklerinde %1 antibiyotik, %1 glutaMAX ve %2 B27 olacak şekilde 15 ml Neurobasal A hazırlandı. Hazırlanan vasat kullanılana kadar %5 CO₂, 37 °C'de inkübatörde tutuldu.

Aksolotl: Aksolotl doku diseksiyonunda kullanılmak üzere içeriğinde %1 antibiyotik ve %1 glutaMAX olacak şekilde 15 ml L-15 hazırlandı. Diseksiyon yapılana kadar +4 °C'de soğumaya bırakıldı. Kùltür vasatı da taze hazırlandı. %1 antibiyotik, %1 glutaMAX ve %2 B27 olacak şekilde 15 ml Neurobasal A hazırlandı. Hazırlanan vasat kullanılana kadar %5 CO₂, 37 °C'de inkübatörde tutuldu.

Aksolotl nöron kùltüründe kullanılmak üzere hazırlanan vasatlar %10 oranında sulandırılarak hazırlandı.

5.3.3. AKG Diseksiyonu

Yetişkin fare: Balb-c yetişkin fareler CO₂ solutularak sakrifiye edildi. Kostaları AKG'lere zarar vermeden dikkatli bir şekilde çıkartıldı. Çıkartılan kostalar soğuk tabla üzerinde, içerisinde diseksiyon vasatı bulunan silikon tabanlı kùltür kapları içerisine alındı. Steril koşullarda, Carl Zeiss 0.5X stereo mikroskop altında 25-30 adet AKG periferik ve santral uzantıları kesilerek hızlı bir şekilde çıkartıldı.



Resim 5.3.3.1: Yetişkin fare arka kök ganglion diseksiyonu aşamaları

Embriyonik fare: Gebe Balb-c fareler CO₂ solutularak sakrifiye edildi. 13-14 günlük embriyolar çıkarılıp soğuk tabla üzerinde, içerisinde diseksiyon vasatı bulunan silikon tabanlı kültür kapları içerisine alındı. Steril koşullarda Carl Zeiss 0.5X stereo mikroskop altında embriyoların AKG'ları, omurilikleri nazikçe temizlendikten sonra zarar vermeden çıkartıldı.

Aksolotl: Yetişkin aksolotl %1 benzokain içerisinde canlılık belirtisi göstermeyene kadar 20 dakika bekletilerek sakrifiye edildi. Omurgası AKG'larına zarar vermeyecek şekilde dikkatlice açıldı. Çıkartılan kostalar soğuk tabla üzerinde, içerisinde diseksiyon vasatı bulunan silikon tabanlı kültür kapları içerisine alındı. Steril koşullarda, Carl Zeiss 0.5X stereo mikroskop altında 25-30 adet AKG periferik ve santral uzantıları kesilerek hızlı bir şekilde çıkartıldı.



Resim 5.3.3.2: Aksolotl arka kök ganglion diseksiyonu aşamaları

5.3.4. Hücre Eldesi

5.3.4.1. Kollajenaz İnkübasyonu

Yetişkin ve embriyonik fare: Diseksiyondan elde edilen AKG'ler 1 ml %1'lik tip 1 kollajenaz enzimi bulunan kültür vasatı içerisine eklenir. [990 µl kültür vasatı+10 µl kollajenaz enzimi (Sigma)]. 40 dakika ependorfun kapağı açık şekilde 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilir.

Aksolotl: Diseksiyondan elde edilen AKG'ler 1 ml %1'lik tip 1 kollajenaz enzimi bulunan kültür vasatı içerisine eklenir. [990 µl kültür vasatı+10 µl kollajenaz enzimi (Sigma)]. 45 dakika ependorfun kapağı açık şekilde 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilir.

5.3.4.2. Kollajenaz Enziminin Uzaklaştırılması

Yetişkin fare, embriyonik fare ve aksolotl ganglionlarının kollajenaz inkübasyon süreleri sonunda AKG'lerin olduğu kollajenaz enziminin bulunduğu kültür vasatı tamamen çekildi. 3 kez 1 ml HBSS ile ganglionlar kollajenaz enziminden uzaklaştırıldı. Yıkamanın bitiminde HBSS ganglionlardan tamamen uzaklaştırıldı.

5.3.4.3. Tripsin İnkübasyonu

Yetişkin ve embriyonik fare: 10X Tripsin EDTA'dan 1X olacak şekilde 500 µl hazırlandı. (450 µl kültür vasatı + 50 µl tripsin 10X). Yıkanan ganglionların üzerine eklendi. 15 dakika ependorfun kapağı açık şekilde 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilir.

Aksolotl: 10X Tripsin EDTA'dan 1X olacak şekilde 500 µl hazırlandı. (450 µl kültür vasatı + 50 µl tripsin 10X). Yıkanan ganglionların üzerine eklendi. 30 dakika ependorfun kapağı açık şekilde 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilir.

5.3.4.4. Tritürasyon ve DNase inkübasyonu

Yetişkin fare, embriyonik fare ve aksolotl ganglionlarının tripsin inkübasyon sürelerinin sonunda tüplere %1 oranında DNase eklendi. Tripsin de ortamdan uzaklaştırılmadan ganglionların mekanik ayrıştırması yapıldı. Sırası ile 1000 µl pipet ucu, 200 µl pipet ucu ve son olarak da 2 kez insülin iğnesinden geçirilerek doku homojenize olana dek tritüre edildi. Tritürasyon aşaması bitince DNase inkübasyonu için hücreler 45 dakika ependorfun kapağı açık şekilde 37 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilir.

5.3.4.5. Enzimin Aktivitelerinin Durdurulması Uzaklaştırılması

Yetişkin fare, embriyonik fare ve aksolotl hücrelerinin DNase inkübasyon süreleri sonunda 1000 RPM'de 5 dakika santrifüj edilip DNase ve Tripsin EDTA ortamdan uzaklaştırıldı. Tüm enzim aktivitelerini durdurmak için 360 µl kültür vasatı içerisine 40 µl FBS ve 30 µl tripsin inhibitörü eklendi. Bir sonraki basamak için hücre süspansiyonu hazırlanmış oldu.

5.3.4.6. Hücrelerin Ayrıştırılması

Hücrelerin büyüklükleri ve ağırlıklarına göre ayrışması için yetişkin ve embriyonik fare için 3 tabakalı, aksolotl için 2 tabakalı percoll gradyanı hazırlandı.

Yetişkin ve embriyonik fare: Tüpün en altında %60'lık, ortada %35'lik ve en üstte %10'luk her biri 500 µl olmak üzere Percoll tabakaları hazırlandı ve bir önceki basamakta hazırlanan hücre süspansiyonu en üst tabakanın üzerine dikkatlice eklenip 1700 RPM de 20 dakika santrifuj edildi. %60'lık ve %35'lik katmanların arasından 750 µl Percoll – hücre solüsyonu karışımı çekildi.

Aksolotl: Sırasıyla %80 ve %5 oranında olmak üzere 2 tane 500 µl Percoll tabakası hazırlandı. Tüpün en altına %80'lik en üstüne de %5'lik tabakalar birbirine karışmayacak şekilde dikkatlice kondu. Hazırlanan hücre süspansiyonu en üst tabakanın üzerine dikkatlice eklenip 1700 RPM de 20 dakika santrifuj edildi. %80'lik ve %5'lik katmanların arasından 750 µl Percoll – hücre solüsyonu karışımı çekildi.

5.3.4.7. Percoll'ün Uzaklaştırılması

Yetişkin ve embriyonik fare: Bir önceki basamakta elde edilen 750 µl hücre solüsyonunun üzerine 3 ml kültür vasatı eklendi. Hücre süspansiyonu 1000 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

Aksolotl: Percoll katmanları arasından alınan 750 µl Percoll- hücre solüsyonu karışımı üzerine 2 kere 3 ml kültür vasatı eklenerek 1000 RPM'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.

5.3.4.8. Hücre Ekimi

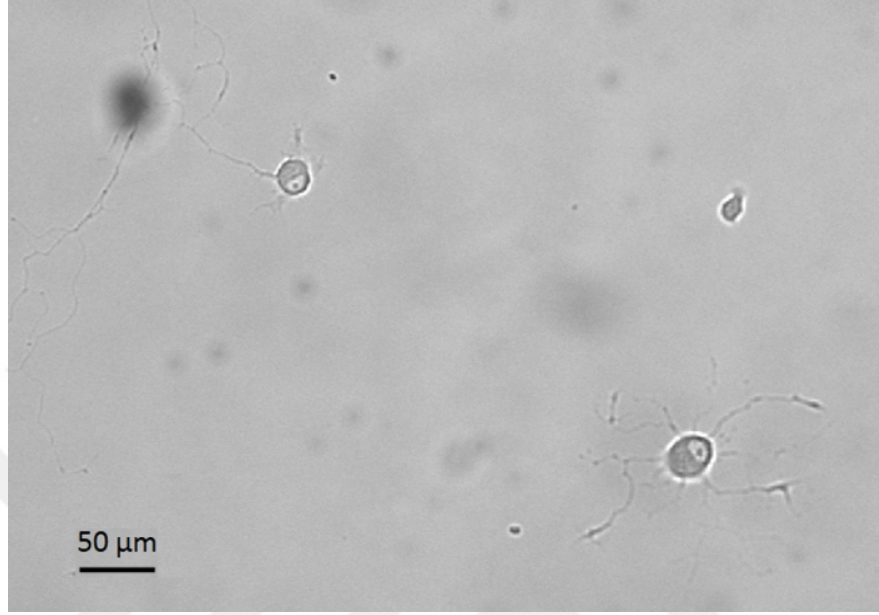
Yetişkin ve embriyonik fare: Elde edilen hücre pelletinin üzerine her bir kültür kabına 500 µl ekim yapılacak şekilde kültür vasatı eklendi. Ekilen hücreler 2 saat boyunca 37 °C, %5 CO₂'li etüvde tutunmaları için inkübe edildi. 2 saatin sonunda kültür kaplarındaki kültür vasatı 1500 µl'ye tamamlandı.

Aksolotl: Percoll uzaklaştırıldıktan sonra ekim için hazır hale gelen hücreler, kültür kabı başına 100 µl ekim yapılacak şekilde kültür vasatı ile dilüe edildi. Hücreler kültür kabına çiçek şeklinde ekildi. Ekim yapıldıktan sonra aksolotl nöronları 20 °C, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmeye devam edildi. Aksolotl nöronlarının kültür kabına tutunmaları memeli nöronlarına göre daha hassas olduğu için vasat tamamlama işlemi ekim yapıldıktan 24 saat sonra kademeli olarak yapıldı. 100 µl ekilen hücreler ilk olarak 500 µl'ye, inkübasyonun 48. saatinde ise kültür vasatı 1500 µl'ye tamamlandı.

5.4. Mikroskopik Görüntüleme

Ekim yapılan yetişkin ve embriyonik fare hücreleri ilk 24. saatlerini tamamladıklarında, aksolotl hücreleri ise 48. saatinde mikroskopik görüntülemeye alındılar. Görüntülemeler zaman aralıklı aydınlık alan (Bright Field) mikroskopisi ile yapıldı. 24 saat boyunca 10 dakika aralıklarla SD konfokal mikroskop (Zeiss Cell Observer Spinning Disc Time-Lapse Microscope) ile çekimleri yapıldı. Aksolotl AKG nöron hücreleri için uygun yaşam koşulları olan 20 °C, %5 CO₂ oranı sağlanarak zaman aralıklı görüntülemeleri yapıldı. Memeli AKG nöron hücrelerinin uygun yaşam

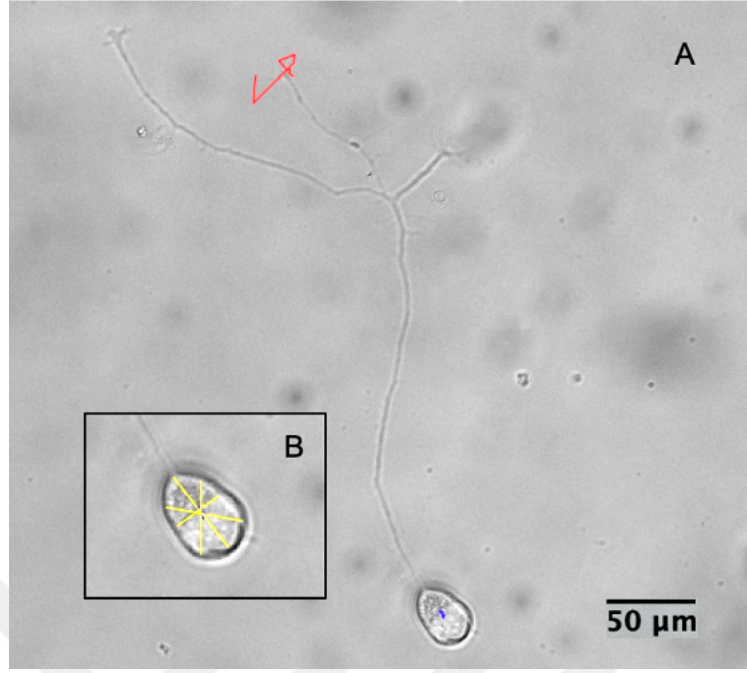
koşulları olan 37 °C, %5 CO₂ oranı ayarlanarak zaman aralıklı çekimleri yapıldı. Takibi yapılan hücreler görüntünün merkezine alınıp 3x3 mikroskobik alan boyutunda, 145 görüntü kaydedildi.



Resim 5.4.1: Yetişkin fare AKG nöronlarının aydınlık alan mikroskopi görüntüsü.

5.5. Akson Uzama ve Hücre Hareket Dinamiklerinin Analizi

Aksonlardaki hücre gövde hareketi ve büyüme konisi hareketi miktarı Fiji (ImageJ) programının Trackmate eklentisi kullanılarak belirlendi (64). Hücre gövde hareketi, hücrenin merkezi belirlenerek takip edildi. Hücrelerin merkezi “ROI manager” aracı yardımıyla belirlendi (Resim 5.5.2).



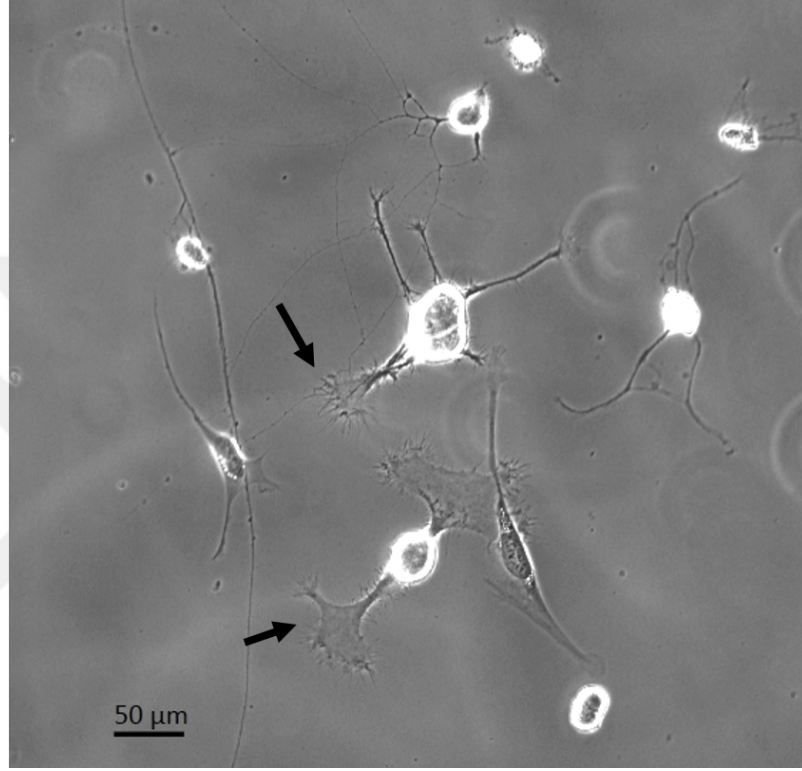
Resim 5.5.2: A. Trackmate eklentisi kullanılarak hücre gövde hareketi ve büyüme konisi hareketi ölçüldü. Mavi yol hücre gövdesinin izlediği yolu gösteriyor. Kırmızı yol büyüme konisinin izlediği yolu gösteriyor. B. “ROI manager” kullanılarak hücre gövde merkezi belirlendi.

TrackMate eklentisi, tek nokta izlemek için kullanılan bir eklentidir. Amacı zaman aralıklı görüntülemelerde bir noktayı farklı zamanlarda işaretlemeyi sağlayarak X-Y koordinatında hareketini hesaplamaktır.

Trackmate eklentisi ile aksolotl, yetişkin ve embriyonik AKG nöronlarının hücre gövde hareketi ve büyüme konisinin hareketleri ölçüldü. Akson uzunluğunun yanı sıra büyüme konilerinin hareketinin ölçülmesindeki amaç bazı nöronlar aksonlarını uzatmasa bile büyüme konilerinde hareket gözlenmiştir. Bu hareketliliğin rejenerasyon kapasitesinde farklılık yaratacağı düşünüldüğü için büyüme konilerinin hareketleri incelendi.

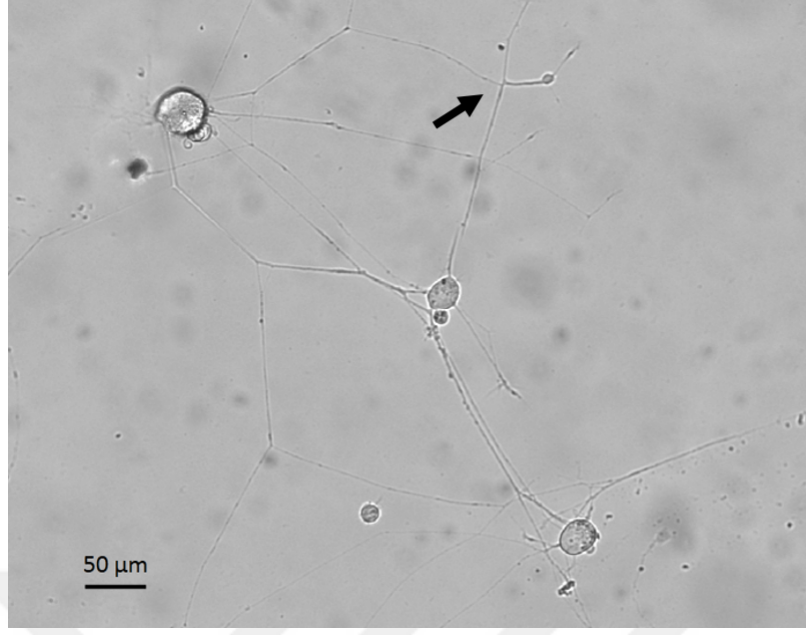
Görüntülemeye alınan 10 adet aksolotl AKG nöron kültürlerinin her birinden 8 nöron 24 saat boyunca takip edildi. Bu nöronların 20 tanesinin akson uzama miktarı, büyüme konisi hareketi ve dallanma sayısı analiz edildi. 6 adet yetişkin ve embriyonik

fare AKG nöron kültürlerinin her birinden 8 nöron 24 saat boyunca takip edildi. Hem yetişkin fare hem de embriyonik fare AKG nöronlarının 20 tanesinin akson uzama miktarı, büyüme konisi hareketi ve dallanma sayısı analiz edildi. Aksolotl AKG nöronlarının aksonlarının ve büyüme konisinin hareketlerini ölçerken büyüme konisinin en uzun ucundan ölçümler yapıldı (Resim 5.5.3).



Resim 5.5.3: Aksolotl AKG nöronlarının büyüme konisinin aydınlık alan mikroskobik görüntüsü.

24 saatlik görüntüleme boyunca büyüme konileri 3x3 mikroskobik alan boyutundaki görüntünün dışında kalan ve aksonları diğer nöronlarla birbirleri ile temas eden nöronların ölçümü yapılmadı (Resim 5.5.4). Analize 24 saat boyunca görüntülenen nöron gövdeleri, büyüme konileri dahil edildi.



Resim 5.5.4: İki farklı aksotl AKG nöronlarının uzayan aksonlarının birbiri ile temasının aydınlık alan mikroskopi görüntüsü.

AKG nöronlarının; akson uzama miktarı, uzatma ve geri çekme (sayısı, varlığı/yokluğu) ve dallanma sayıları ölçüldü. (63).

Fiji'den alınan ham veriler MS Excel üzerinde işlenerek tüm istatistiksel testler (t Test, one-way ANOVA) ve GraphPad Prism ile yapıp grafikler de yine GraphPad Prism kullanılarak oluşturuldu.

6. BULGULAR

6.1. Aksolotl Kùltür Kabı Kaplama Protokollerinin Etkinlikleri

Yetişkin fare ve embriyonik fare AKG nöron kùltürlerinde kullanılan Poly-L-Lizin ve laminin kombinasyonu aksolotl AKG nöronlarının yüzeye tutunup akson uzatmaları için uygun ortam oluşturmadı.

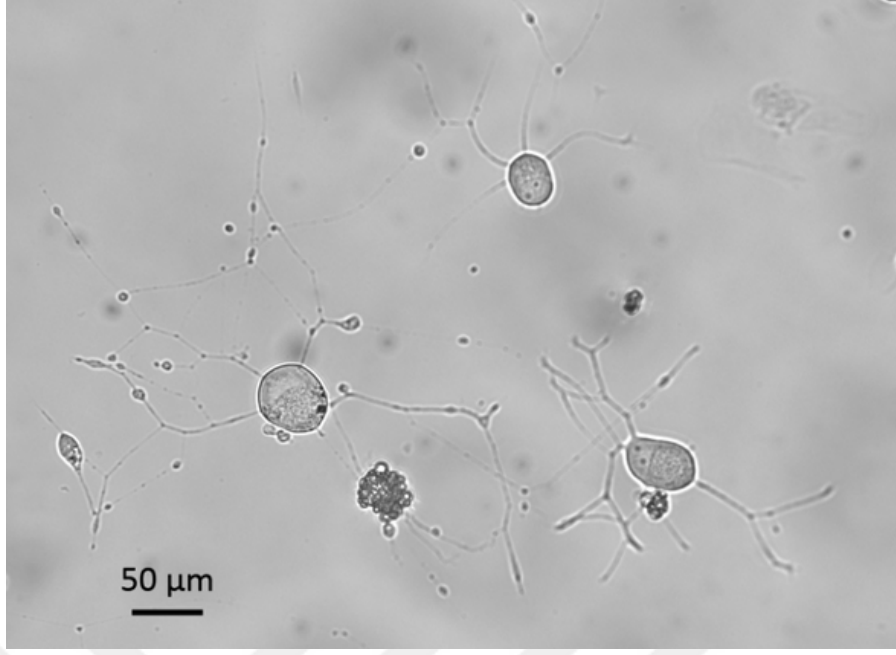
Yüzey kaplamasının sadece Poly-L-Lizin olduğu ve lamininin kùltür kaplarına ekim sırasında hücrelerle karıştırılıp daha sonra kùltür kabına ekilen hücrelerde ilk 24 saatlik periyotta ölümler gerçekleşti. Yüzeye tutunan nöron gözlenmedi.

Poly-L-Lizin ve fibronektin kullanılan kùltür kaplarında hücrelerde yüzeye tutunma gözlenirse de akson uzatan hücre gözlenmedi.

Aksolotl AKG nöron hücreleri için jelatinle kaplanan kùltür kaplarına ekilen hücrelerin ilk 24 saatlik periyotta ölümleri gerçekleşti.

Poly-L-Ornitin ve fibronektin ile kaplanan kùltür kaplarında yüzeye tutunan aksolotl AKG nöron hücrelerinin sayısında artış gözlenirse de akson uzatma gerçekleşmedi.

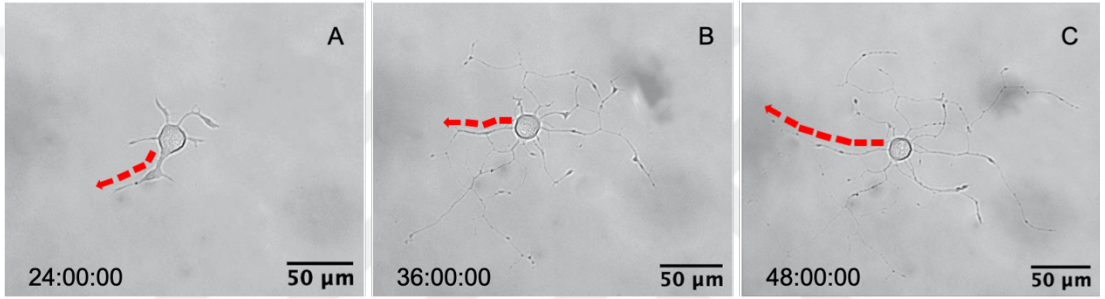
Farklı yüzey kaplaması kombinasyonlarının denemesi sonucunda aksolotl AKG nöron hücrelerinin 750 µl %10 Poly-D-Lizin ve 500 µl %1 laminin ile kaplanan kùltür kaplarında yüzeye tutunduğu ve akson uzattığı gözlendi (Resim 6.1.1).



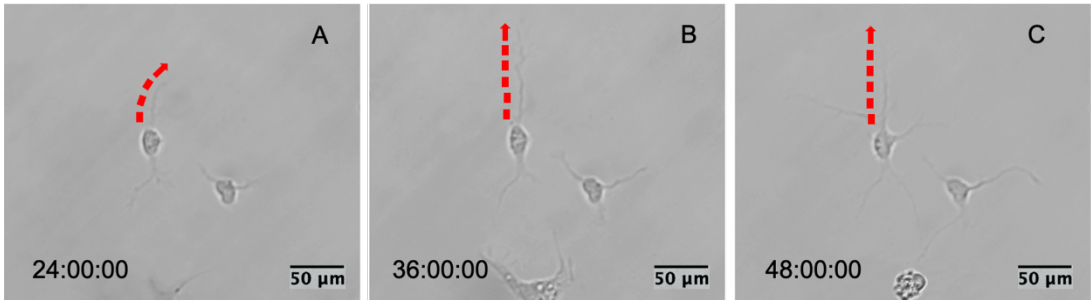
Resim 6.1.1: Poly-D-Lizin ve laminin ile kaplanan kültür kaplarında inkübe edilen aksolotl AKG nöronlarının temsili aydınlık alan mikroskopi görüntüsü.

6.2. Akson Uzama Miktarının Mikroskopik Takibi

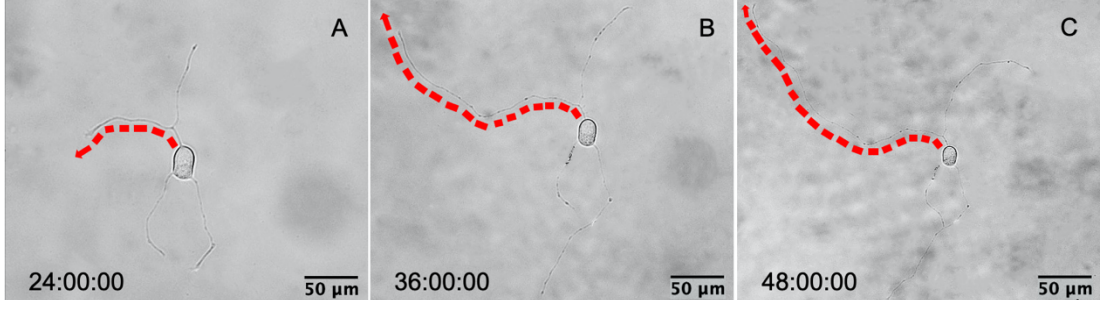
Yetişkin fare, embriyonik fare ve aksolotl AKG nöronları kültüre edildi. Akson dinamiklerinin ölçümü, hücre gövdesi hareketi analizleri için gerekli olan görüntüler için zaman aralıklı aydınlık alan mikroskobisi kullanıldı. Aksolotl AKG nöronları yetişkin ve embriyonik fare AKG nöronları 24. saatlerinden 48. saatlerine kadar görüntülendi. Akson uzama miktarları karşılaştırıldı (Resim 6.2.1, Resim 6.2.2, Resim 6.2.3, Tablo 6.2.1).



Resim 6.2.1: Yetişkin fare AKG nöronlarında akson uzamaları **A.** 24. saatte yetişkin fare hücrelerinde akson uzaması (137,706 µm). **B.** 36. saatte yetişkin fare hücrelerinde akson uzaması (547,645 µm). **C.** 48. saatte yetişkin fare hücrelerinde akson uzaması (838,63 µm).



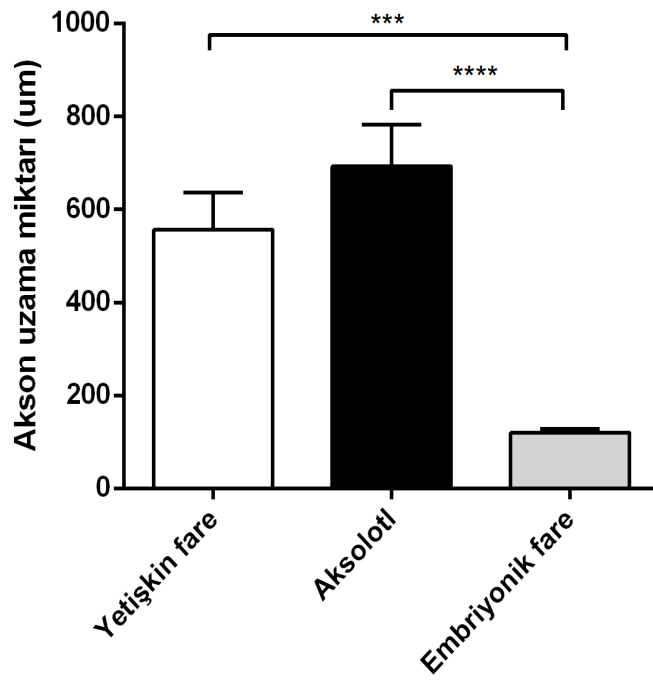
Resim 6.2.2: Embriyonik fare AKG nöronlarında akson uzamaları **A.** 24. saatte embriyonik fare hücrelerinde akson uzaması (98,375 µm). **B.** 36. saatte embriyonik fare hücrelerinde akson uzaması (126,643 µm). **C.** 48. saatte embriyonik fare hücrelerinde akson uzaması (180,322 µm).



Resim 6.2.3: Aksolotl AKG nöronlarında akson uzamaları **A.** 24. saatte aksolotl hücrelerinde akson uzaması (391,426 µm). **B.** 36. saatte aksolotl hücrelerinde akson uzaması (763,544 µm). **C.** 48. saatte aksolotl hücrelerinde akson uzaması (1048,195 µm).

AKG nöronlarının akson uzatmalarının belirlenmesi için 24 saat boyunca aksonları takip edilerek uzunlukları ölçüldü.

24 saat boyunca yetişkin fare nöronlarının $556.5 \pm 79.48 \mu\text{m}$ (n=20), aksolotl nöronlarının $692.5 \pm 90.13 \mu\text{m}$ (n=20), embriyonik fare nöronlarının ise $120.1 \pm 8.080 \mu\text{m}$ (n=20) akson uzattığı tespit edildi. Embriyonik AKG nöronlarının yetişkin fare ($p=0.0004$) ve aksolotla ($p<0.0001$) kıyasla anlamlı olarak daha az akson uzattıkları tespit edildi. Aksolotl nöronlarının akson uzatma miktarının yetişkin fareye kıyasla daha fazla olmasına rağmen bu farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (Resim 6.2.4).

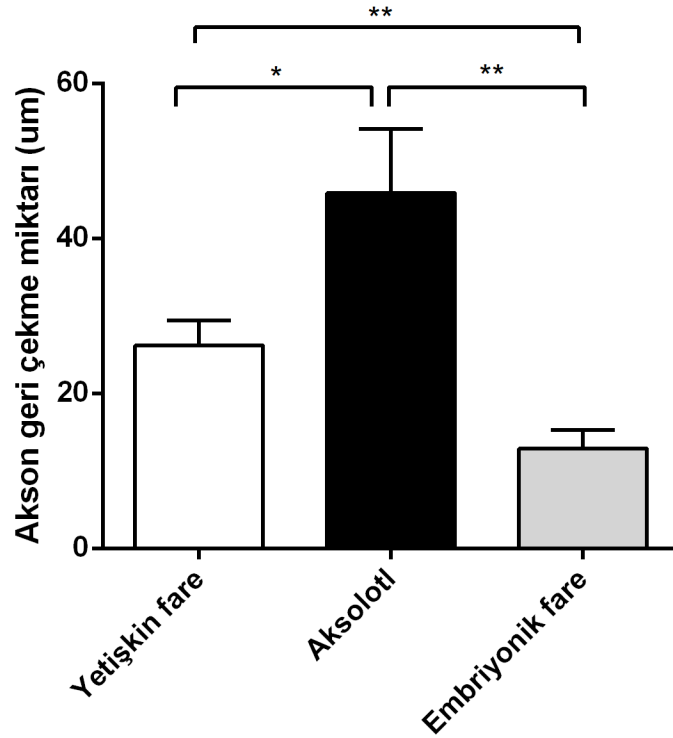


Resim 6.2.4: Yetişkin fare, aksolotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saatlik takiplerinden elde edilen görüntülerle akson uzama miktarlarının karşılaştırılması (***) $p<0,001$, **** $p<0,0001$).

6.3. Akson Geri Çekme Miktarının Mikroskopik Takibi

Akson boyunun dinamik olarak değışkenlik göstermesinin rejenerasyon ile ilişkilendirilebileceği göz önünde bulundurularak aksonların geri çekilme miktarları analiz edildi.

24 saat boyunca yetişkin fare nöronlarının aksonlarının geri çekilme miktarı $26.23 \pm 3.157 \mu\text{m}$ (n=20) iken aksotl nöronlarında bu değeri $45.90 \pm 8.195 \mu\text{m}$ (n=20), embriyonik fare nöronlarında ise $12.86 \pm 2.458 \mu\text{m}$ (n=20) olarak ölçüldü. Aksotl nöronlarının akson geri çekme miktarının yetişkin ($p=0.0333$) ve embriyonik ($p=0.0030$) fareye kıyasla anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edildi. Ayrıca yetişkin fare nöronlarının da embriyonik fareye kıyasla akson geri çekme miktarının daha fazla olduğu belirlendi ($p=0.0066$) (Resim 6.3.1).

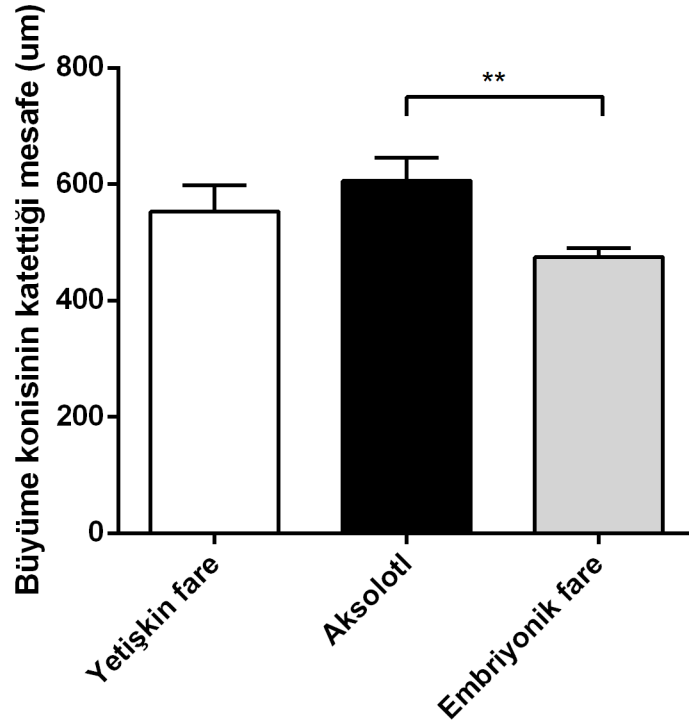


Resim 6.3.1: Yetişkin fare, aksotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saatlik takiplerinden elde edilen görüntülerle akson geri çekme miktarlarının karşılaştırılması (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

6.4. Büyüme Konisinin Hareketinin Mikroskopik Takibi

Kültüre edilen AKG nöronlarının büyüme konilerinin 24 saat boyunca aldıkları mesafe tespit edildi.

Yetişkin farede büyüme konilerinin aldıkları mesafe $552.9 \pm 45.83 \mu\text{m}$ (n=20), aksolotlda $606.0 \pm 39.90 \mu\text{m}$ (n=20), embriyonik fare kültürlerinde ise $474.7 \pm 15.29 \mu\text{m}$ (n=20) olarak ölçüldü. Aksolotl nöronlarının büyüme konilerinin aldıkları mesafenin embriyonik fareye kıyasla anlamlı olarak arttığı belirlendi ($p=0.0094$) (Resim 6.4.1).

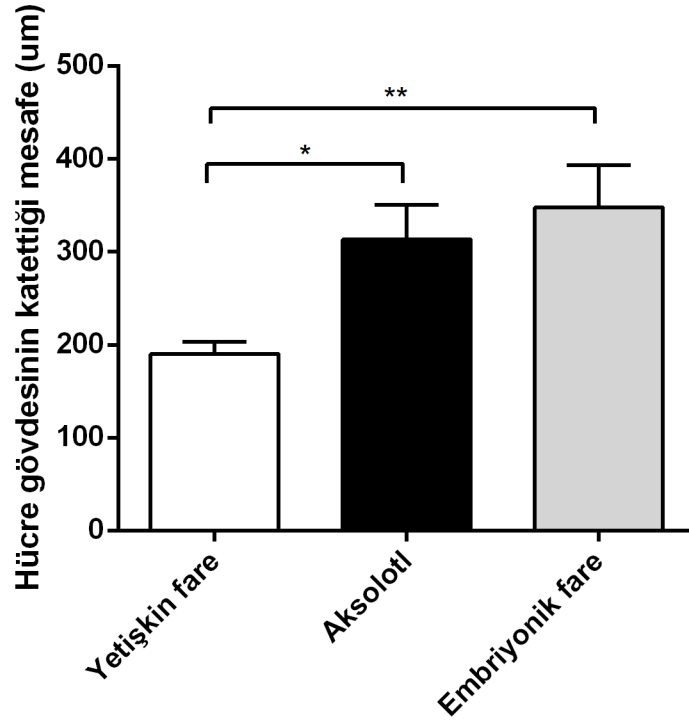


Resim 6.4.1: Yetişkin fare, aksolotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saatlik takiplerinden elde edilen görüntülerle büyüme konisinin hareketlerinin karşılaştırılması (** $p<0,01$).

6.5. Hücre Gövdesinin Hareketinin Mikroskopik Takibi

AKG nöron gövdelerinin 24 saat boyunca hareketleri gözlemlendi ve aldıkları mesafe tespit edildi.

24 saat boyunca yetişkin fare nöronlarının $190.3 \pm 13.08 \mu\text{m}$ (n=20), aksolotl nöronlarının $313.1 \pm 37.53 \mu\text{m}$ (n=20), embriyonik fare nöronlarının ise $348.1 \pm 45.51 \mu\text{m}$ (n=20) mesafe kat ettiği tespit edildi. Aksolotl ve embriyonik AKG nöron gövdelerinin aldıkları mesafenin yetişkin fareye kıyasla anlamlı olarak artış gösterdiği belirlendi (sırasıyla $p= 0.0102$, $p=0.0037$) (Resim 6.5.1).

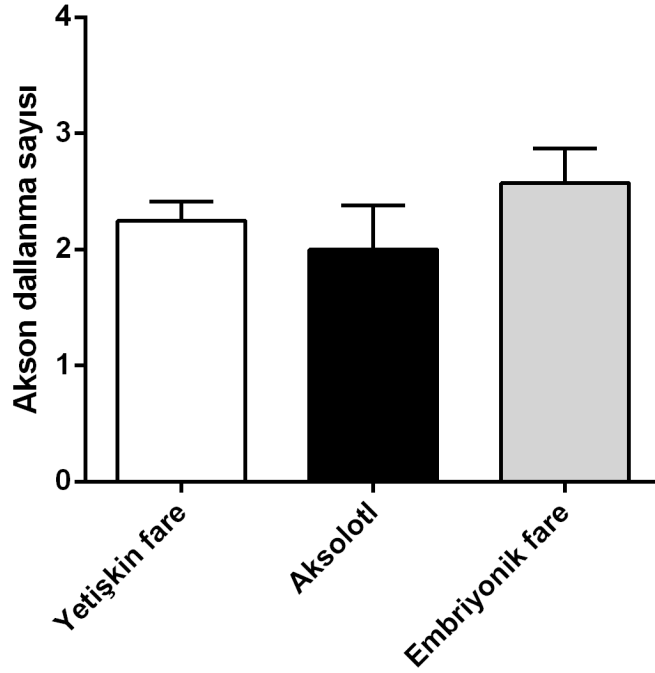


Resim 6.5.1: Yetişkin fare, aksolotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saatlik takiplerinden elde edilen görüntülerle hücre gövdesinin kat ettiği mesafelerin karşılaştırılması (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).

6.6. Akson Dallanma Sayısının Mikroskopik Takibi

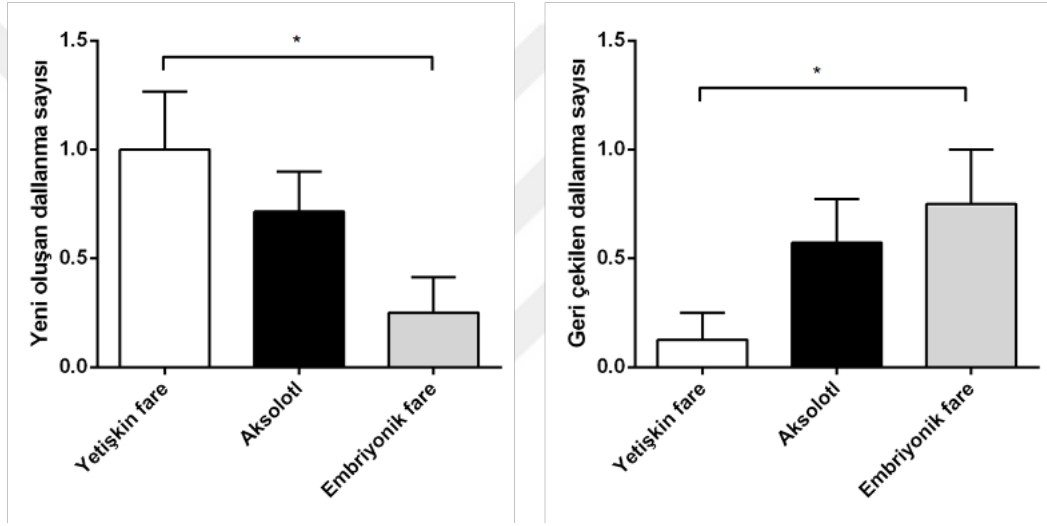
24 saat boyunca ana aksondan yeni oluşan ve geri çekilen dallanma sayıları her bir gruptaki nöronlar için analiz edildi.

24 saat boyunca kültüre edilen hücrelerin görüntülemenin ilk anındaki ana aksondan çıkan dallanma miktarları tespit edildi. İlk andaki dallanma miktarları yetişkin fare nöronlarında 2.250 ± 0.1637 (n=20), aksolotl nöronlarında 2.000 ± 0.3780 (n=20), embriyonik fare nöronlarında ise 2.571 ± 0.2974 (n=20) olarak belirlendi. Gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi (Resim 6.6.1).



Resim 6.6.1: Yetişkin fare, aksolotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saatlik takiplerinden elde edilen görüntülerle akson dallanma sayılarının karşılaştırılması.

Yeni oluşan dallanma sayısı yetişkin fare nöronlarında 1.000 ± 0.2673 (n=20), aksolotl nöronlarında 0.7143 ± 0.1844 (n=20), embriyonik fare nöronlarında 0.2500 ± 0.1637 (n=20) olarak bulundu. Geri çekilen dallanma sayıları yetişkin fare nöronlarında 0.1250 ± 0.1250 (n=20), aksolotl nöronlarında 0.5714 ± 0.2020 (n=20), embriyonik fare nöronlarında 0.7500 ± 0.2500 (n=20) olarak bulundu. En fazla yeni dallanma sayısı ve en az geri çekilme miktarı yetişkin fare nöronlarında gözlemlendi. Bu artış ($p=0.0313$) ve azalmaların ($p= 0.0421$) embriyonik fare nöronlarına kıyasla anlamlı olduğu gözlemlendi (Resim 6.6.2).



Resim 6.6.2: Yetişkin fare, aksolotl ve embriyonik fare AKG nöronlarının 24 saat boyunca yeni oluşan ve geri çekilen akson dallanma sayıları (* $p<0,05$).

7. TARTIŞMA

Çalışmamızda yetişkin ve embriyonik fareden izole edilen olgun AKG nöronlarının *in-vitro* ortamda yaşamasını sağlayan kültür protokolü takip edilmiştir (63). Çalışmalarımızda kullandığımız bu protokolden elde ettiğimiz veriler stabil olduğundan dolayı memeli AKG kültür protokolünde herhangi bir modifikasyon yapmaya ihtiyaç duyulmamıştır.

Yenilenen aksonların hücre dışı matriks ile etkileşimleri, rejeneratif süreçte anahtar rol oynar. Rogers ve ark. izole edilmiş duyu nöronların, Poly-L-Lizin kaplı yüzeylere kıyasla laminin ve fibronektin kaplı substratlar üzerinde daha uzun nörit uzaması olduğunu göstermişlerdir (65). Laminin, Schwann hücreleri için fibronektin kaplı substratlar yerine laminin kaplı substrat üzerinde daha iyi bir morfoloji geliştirdiğinden dolayı tercih edilen bir substrattır (66). Başka bir çalışmada AKG eksplantlarının, laminin jelleri üzerinde fibronektin ve kollajen tip I'e kıyasla daha iyi büyüdüğü gösterilmiştir (67). Öte yandan, farklı duyu nöron popülasyonlarının farklı substrat tercihleri olabileceği düşünülmektedir. Embriyonik duyu nöronları, fibronektin ve laminin üzerinde benzer şekilde büyürken, kutanöz duyu nöronlarının laminini tercih ettiği bilinmektedir (68). Embriyonik dönemde beyinde nöral krestlerin migrasyonunda da hücre dışı ortam proteinlerinin rolü önemlidir. Lamininin, embriyonik dönemdeki aksonal uzamayı destekleyici iyi bir substrat olarak bilinmektedir (69). Nöronların yüzeye tutunma oranlarını arttırmak, hücrelerin ve proteinlerin katı yüzeylere bağlanmasını kolaylaştırmak için Poly-D-Lizin tercih edilmektedir (70). Bu bilgilerden yola çıkarak geliştirdiğimiz aksolotl AKG nöron kültürü protokolünde kaplama metodu olarak Poly-D-Lizin ve laminin tercih edilmiştir. Dolayısıyla kullandığımız bu kombinasyonun nöronların yüzeye tutunma eğilimini artırarak hem hücre canlılığının korunmasında hem de nörit uzamasında etkili olmasının literatürle tutarlı olduğu gözlemlenmiştir.

Kültür protokolünün optimizasyonunda karşılaştığımız bir farklılık da aksolotl AKG nöron kültürü memeli AKG nöron kültürü ile aynı yoğunluktaki kültür vasatında inkübe edildiğinde nöronların önce su kaybedip daha sonra normal boyutlarına geri döndüğü ama bu osmolarite değişiminden dolayı nöronların yüzeye tutunamadığı

ancak hayatta kaldıkları gözlemi olmuştur. Buna dayanarak aksolotl kültür vasatı %10 oranında ddH₂O ile dilüe edilip aksolotl nöronlarının stabil şekilde kültüre edilmesi sağlanmıştır. Bu durum aksolotlın mutlak sucul bir semender olmasına bağlı olabileceğini düşündürmüştür (14). Aksolotl türü ile ilgili belirli bir bilgi olmasa da literatürde tatlı suda yaşayan omurgalı bazı tetrapod ve balık türlerinin nispeten daha düşük plazma osmolaritesine sahip olduğu bilinmektedir (71).

Xenopus laevis ile yapılan *in-vitro* çalışmalarda sıcaklık koşullarının 20°C’de tutulduğu bilinmektedir (72). Aksolotl AKG nöronları memeli nöronlarına kıyasla daha soğuk ortamda 20°C’de inkübe edilmiştir. Düşük sıcaklığın aksolotlın rejenerasyon kapasitesinin yüksekliğinde önemli rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (73). Laboratuvarımızda yapılan daha önceki çalışmalarda aksolotl nöronları memeli koşulları olan 37°C’de inkübe edilmiş ve sadece %10 oranında bir yaşam olduğu gözlenmiştir. Çalışmamızda geliştirilen aksolotl AKG nöron protokolü, aksolotl nöronlarının yaşam oranlarının ve rejenerasyon kapasitesinin en yüksek olduğu optimum sıcaklıkta 20°C’de stabilize edilmiştir. Memeli AKG nöronlarının yaşayabildiği optimize edildiği sıcaklık 37°C olarak bilinmektedir (63). Laboratuvarımızda yapılan daha önceki çalışmalarda memeli nöronlarının 20°C’de gelişemediği ve düzgün aktivite gösteremediği gözlenmiştir.

Deneysel çalışmalar, yetişkin hayvanlarda genç hayvanlara kıyasla sinir rejenerasyonunun daha yavaş ve akson dinamiklerinin daha az olduğunu göstermiştir. (74,75). Yetişkin sıçanlarda nöron büyüme faktörü (NGF) reseptörlerinin azalması aksonal rejenerasyonun azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (76). Yetişkin hayvanlarda aksonal rejenerasyon hızı yavaşlar ve rejenere aksonların yoğunluğu azalır. Yaşlanma aynı zamanda, büyüme konisi hareketi ve akson dallanmasında azalmaya neden olur (77). Aksolotl nöronlarının tiroid hormon sinyallemedeki mutasyonlar nedeniyle metamorfozunu tamamlayamadığı ve bazı embriyonik özelliklerini koruduğu gözlenmiştir. Bu nedenle de aksolotl nöronlarının embriyonik fareye yakın davranış sergiledikleri düşünülür (14). Literatürdeki çalışmalar farklı dönemlerde olan nöronların farklı davranışlar gösterdiğini ortaya koymuştur (77). Bu bulgularla tutarlılık gösteren çalışmamızda embriyonik fare ve yetişkin fare AKG

nöronlarının arasındaki hem morfolojik hem de dinamik farklılıklar rejenerasyonun düzenlenmesinin yaşa bağlı bir değişkenlik gösterdiğini düşündürmektedir. Çalışmamızın sonuçlarına genel bir bakış atıldığında embriyonik fare ve aksolotl AKG nöronları kültüre edilip rejenerasyon kapasitelerinin karşılaştırılması sonucu birbirlerine yakın davranışlarda bulunduğu gözlenmiştir. Bu iki grubun da yetişkin fare AKG nöronlarına kıyasla daha yüksek bir rejenerasyon kapasitesi gösterdiği aşıkardır.

Periferik nöron hasarı sonrasında hücre iskeletinin yeniden yapılanması akson rejenerasyonu için en etkili faktör olduğu bilinmektedir. Hücre iskeletini oluşturan mikrotübüllerin polimerizasyonun inhibisyonunun, akson rejenerasyonunu sınırladığı bilinmektedir (78,79). Hem gelişen nöronların (80,81) hem de hasar sonrası rejenerasyon olan periferik nöronların (82) büyüme konisi içindeki hücre iskeleti dinamikleri gelişen aksonların uzamasını ve yönlendirilmesini sağlar. Sinir rejenerasyonu sırasında yaşa bağlı değişikliklerle ilgili çoğu çalışma, nöronların verdiği yanıt, aksonları ve onların uçlarıyla ilgilidir. Hasar sonrası yetişkin hayvanların büyüme konisinde mikrotübül ve filament dağılımında azalma ile akson uzamasında azalma olduğu bilinmektedir (83). Başka bir periferik sinir rejenerasyonu ile ilgili çalışmada genç ve yetişkin sıçanlar karşılaştırıldığında yetişkinlerde daha düşük yoğunlukta nörofilament varlığı ile akson dallanma sayısında azalma olduğu gösterilmiştir (75). Literatürde aksolotl AKG nöronlarıyla ilgili hem hücre iskeleti hem de buna bağlı akson dinamiği hakkında çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda ise hem yeni oluşan dallanma sayısı hem de akson uzama miktarı yetişkin AKG nöronlarında embriyonik AKG nöronlarına göre daha yüksektir. Bu bulgular literatürde bulunan memeli nöron davranışları ile çelişkili olmasına rağmen aksolotl AKG nöronlarının embriyonik AKG nöronlarından daha yüksek rejeneratif kapasiteye sahip olduğunu gösterdik. Aynı şekilde hücre gövde hareketine baktığımızda aksolotl AKG nöronlarının kat ettiği mesafenin embriyonik fare AKG nöronlarına yakın olduğu ve yetişkin fare AKG nöronlarına göre oldukça aktif hareket halinde olduklarını gözlemledik. Bu sonuçlardan yola çıkarak aksolotl AKG nöronlarının hücre iskelet dinamiğinin bu hızlı yapısal değişikliklere uyum sağlamak için memeli hücrelerine kıyasla daha efektif intrinsik mekanizmaları olduğu öne sürülebilir. Bu

bilgiyi desteklemek için aksotl ve embriyonik nöronlarda hücre iskeleti ve akson rejenerasyonu arasındaki ilişkiyi açıklayacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Yaralanma sonrası aksonların rejenerasyonu sırasında büyüme konilerinin oluşması embriyonik gelişim sırasındaki nöronların davranışına benzemektedir. Büyüme konileri, embriyonik nöronlarda nöronal hücre gövdelerinin veya dallanma uçlarının yakınında oluşurken, hasarlı aksonların dejenere uçlarında oluşur (84). Biz de çalışmamızda akson rejenerasyonun ilk adımlarından biri olarak kabul edilen ve rejenerasyon için önemli bir parametre olan büyüme konisinin kat ettiği mesafeye baktığımızda aksotl AKG nöronlarının embriyonik fare AKG nöronlarından daha hareketli olduğunu gözlemledik. Ek olarak, yetişkinde önemli ölçüde artan vücut boyutu nedeniyle, rejenerasyon olan aksonların genellikle gelişen nöronların aksonlarından çok daha uzun mesafeler kat ettiği gözlenmiştir (84). Benzer olarak çalışmamızda yetişkin fare AKG nöronlarının, embriyonik fare AKG nöronlarından daha fazla büyüme konisi hareketliliğine sahip olmasına rağmen aksotl AKG nöronlarına oldukça yakın mesafe kat ettiğini gözlemledik.

Aksonal rejenerasyon ile ilgili literatürde nöronal hücrelerin rejenerasyon kapasitelerinin göstergesi olan belli parametreler görülmektedir. Memelilerde AKG nöronlarının primer kültürü ile yapılmış birçok çalışma mevcuttur ve bu çalışmalarda periferik sinir rejenerasyonun intrinsik kapasitesine, akson hasarı sonrası rejenerasyonda aktive olan rejenerasyon-asosiyel genlere (RAGler), nöron gliya sinyallemlerine dair birçok moleküler mekanizma ortaya konulmuştur (59,61,84,85). Ancak aksotl gibi sistemik olarak rejenerasyon kapasitesi yüksek olduğu belirlenen bir hayvan modelinde geliştirilmiş primer nöron kültürü çalışması mevcut değildir. Bizim çalışmamız literatürde var olmayan bir tekniği geliştirme ve optimize etme amaçlı olduğu için gözlemlenen daha üstün rejeneratif kapasitenin moleküler mekanizmalarına dair bir açıklama sunmaması limitasyonlarından biridir. Bu süreçlerin araştırılması ve aksotl nöronlarını daha üstün kılan mekanizmaların aydınlatılmasını amaçlayan ileriki çalışmalar için bir temel yöntem oluşturacaktır.

8. SONUÇ

Memelilerde travma sonrası periferik sinir rejenerasyonun görece sınırlılığı klinik bağlamda önemli bir konudur. Ancak bazı omurgalı canlıların yüksek sinir rejenerasyonu gösterirken memelilerde bunu sınırlayan faktörler ve hücrel mekanizmalar konusunda hala açık noktalar olduğu düşünülmektedir. Sinir rejenerasyonun daha başarılı olduğu aksotl nöronlarının intrinsik kapasitelerinin memeli nöronlarından farklı olduğu düşünülmektedir. Bu bilgiler ışığında literatürdeki bu boşluğu doldurabilmek için stabil ve tekrarlanabilir bir aksotl AKG nöron protokolü geliştirildi. Bu yöntemleri kullanarak yapılan çalışmaların sonuçlarına göre aksotlda akson rejenerasyon kapasitesi karşılaştırıldığında yetişkin ve embriyonik farenin akson rejenerasyon kapasitesinden daha yüksek olduğu gözlemlendi.

9. KAYNAKLAR

1. Kandel E. Principles of Neural Science. 5th ed. Vol. 10, Acta Endocrinologica. McGraw-Hill, New York; 2014.
2. Bryan DJ, Litchfield CR, Manchio J V, Logvinenko T, Holway AH, Austin J, et al. Spatiotemporal expression profiling of proteins in rat sciatic nerve regeneration using reverse phase protein arrays. *Proteome Sci.* 10(1):9, 2012.
3. Ross MH. Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 7th ed. 2016.
4. Faroni A, Mobasseri SA, Kingham PJ, Reid AJ. Peripheral nerve regeneration : Experimental strategies and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 82–83:160–7, 2015.
5. Joven A, Elewa A, Simon A. Model systems for regeneration: salamanders. *Development.* 146(14): 0–2, 2019.
6. Curcio M, Bradke F. Axon Regeneration in the central nervous system: facing the challenges from the inside. *Annu Rev Cell Dev Bi.* 34:1–27, 2018.
7. Namgung U. The role of schwann cell-axon interaction in peripheral nerve. *Cells Tissues Organs.* 200(1):6–12, 2014.
8. Yun MH. Changes in regenerative capacity through lifespan. *Int J Mol Sci.* 16:25392–432, 2015.
9. Tanaka EM. Regeneration : If They Can Do It , Why Can ' t We ? *Cell.* 113(5):559–62, 2003.
10. Kirsche K, Kirsche W. Regenerative processes in the telencephalon of *Ambystoma Mexicanum*. *J Hirnforsch.* 7:421–36, 1964.
11. Richter W. Regenerative processes following removal of the caudal sector of the telencephalon including the telencephalo-diencephalic border region in *Ambystoma mexicanum*. *J Hirnforsch.* 10(6):515–34, 1968.
12. Okamoto M, Ohsawa H, Hayashi T, Owaribe K TP. Regeneration of retinotectal projections after optic tectum removal in adult newts. *Mol Vis.* 13:2112–8, 2007.
13. Parish CL, Beljajeva A, Arenas E, Simon A. Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced

- regeneration model. *Development*. 134(15):2881–7, 2007.
14. De Groef B, Grommen SVH, Darras VM. Forever young: endocrinology of paedomorphosis in the Mexican axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Gen Comp Endocrinol*. 266:194–201, 2018.
 15. Wang G. Behavior of axons, schwann cells and perineurial cells in nerve regeneration within transplanted nerve grafts: effects of anti-laminin and anti-fibronectin antisera. *Brain Res*. 583(1–2):216–26, 1992.
 16. Brown RA, Phillips JB. Cell responses to biomimetic protein scaffolds used in tissue repair and engineering. *Int Rev Cytol*. 262(7):75–150, 2007.
 17. Lee HK, Seo IA, Park HK, Park YM, Ahn KJ, Yoo YH, et al. Nidogen is a prosurvival and promigratory factor for adult schwann cells. *J Neurochem*. 102:686–98, 2007.
 18. Pope JE, Deer TR, Kramer J, Virginia W, Words K, Cord S, et al. A Systematic review : current and future directions of dorsal root ganglion therapeutics to treat chronic pain. *Pain Med*. 14:1477–96, 2013.
 19. Liem L, Dongen E Van, Huygen FJ. The dorsal root ganglion as a therapeutic target for chronic pain. *Reg Anesth Pain Med*. 41(4):1–9, 2016.
 20. Kishi M, Tanabe J, Schmelzer JD, Low PA. Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*. 51:819–24, 2002.
 21. Taylor CA, Rice JB. The incidence of peripheral nerve injury in extremity trauma. *Am J Phys Med Rehabil*. 87(5):381–5, 2008.
 22. Ciardelli G, Chiono V. Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromol Biosci*. 6:13–26, 2006.
 23. Allodi I, Udina E, Navarro X. Specificity of peripheral nerve regeneration: interactions at the axon level. *Prog Neurobiol*. 98(1):16–37, 2012.
 24. Bruck W. The role of macrophages in wallerian degeneration. *Brain Pathol*. 7:741–52, 1997.
 25. Rotshenker S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation*. 8:1–14, 2011.
 26. Zochodne DW. The challenges and beauty of peripheral nerve regrowth. *J Peripher Nerv Syst*. 18:1–18, 2012.

27. Cattin A, Burden JJ, Emmenis L Van, Enver T, Ruhrberg C, Lloyd AC, et al. Macrophage-induced blood vessels guide schwann cell-mediated regeneration of peripheral nerves. *Cell*. 162(5):1127–39, 2015.
28. Ide C. Peripheral nerve regeneration. *J Neurosci Res*. 1996;25:101–21.
29. Chen Z, Yu W, Strickland S. Peripheral regeneration. *Annu Rev Neurosci*. 30:209–33, 2007.
30. Neumann S, Bradke F, Tessier-lavigne M, Basbaum AI. Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron*. 34:885–93, 2002.
31. Qiu J, Cai D, Dai H, Mcatee M, Hoffman PN, Bregman BS, et al. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron*. 34:895–903, 2002.
32. Zweifel LS, Kuruvilla R, Ginty DD. Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat Rev Neurosci*. 6:615–25, 2005.
33. Rishal I, Fainzilber M. Axon–soma communication in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. 15(1):32–42, 2013.
34. Lutz AB, Barres BA. Contrasting the glial response to axon injury in the central and peripheral nervous systems. *Dev Cell*. 28(1):7–17, 2014.
35. Schwab ME, Strittmatter SM. Nogo limits neural plasticity and recovery from injury. *Curr Opin Neurobiol*. 27:53–60, 2014.
36. Anderson MA, Burda JE, Ren Y, Ao Y, Shea TMO, Kawaguchi R, et al. Astrocyte scar formation aids central nervous system axon regeneration. *Nature*. 532(7598):195–200, 2016.
37. Joven A, Simon A. Homeostatic and regenerative neurogenesis in salamanders. *Prog Neurobiol*. 170:81–98, 2018.
38. Tanaka EM. The molecular and cellular choreography of appendage regeneration. *Cell*. 165(7):1598–608, 2016.
39. Zhang P, Wake DB. Molecular phylogenetics and evolution higher-level salamander relationships and divergence dates inferred from complete mitochondrial genomes. *Mol Phylogenet Evol*. 53(2):492–508, 2009.
40. Tanaka EM. A comparative perspective on brain regeneration in amphibians and teleost fish. *Dev Neurobiol*. 79(5):424–36, 2018.
41. Felipe J, Quiroz D, Echeverri K. Spinal cord regeneration: where fish, frogs and

- salamanders lead the way, can we follow? *Biochem J.* 364:353–64, 2013.
42. Tazaki A, Tanaka EM, Fei J. Salamander spinal cord regeneration: the ultimate positive control in vertebrate spinal cord regeneration. *Dev Biol.* 16, 2017.
 43. Butler E, Ward M. Reconstitution Ablation of the Spinal Cord in Adult Triturus. *Dev Biol.* 15:464–86, 1967.
 44. Landry M, Cedex B, Saint-sae C. Recovery of bimodal locomotion in the spinal-transected salamander, *Pleurodeles waltlii*. *Eur J Neurosci.* 20:1995–2007, 2007.
 45. Davis M, Ayers JL, Koran L, Anderson MC, Simpson SB. Time course of salamander spinal cord regeneration and recovery of swimming: HRP retrograde pathway tracing and kinematic analysis. *Exp Neurol.* 213:198–213, 1990.
 46. Amamoto R, Gisselle V, Huerta L, Takahashi E, Dai G. Adult axolotls can regenerate original neuronal diversity in response to brain injury. *Elife.* 5:1–22, 2016.
 47. Fujisawa H. Retinotopic analysis of fiber pathways in the regenerating retinotectal system of the adult newt *cynops pyrrhogaster*. *Brain Res.* 206(1):27–37, 1981.
 48. Maden M, Manwell LA, Ormerod BK. Proliferation zones in the axolotl brain and regeneration of the telencephalon. *Neural Dev.* 8:1–15, 2013.
 49. Urata Y, Yamashita W, Inoue T, Agata K. Spatio-temporal neural stem cell behavior leads to both perfect and imperfect structural brain regeneration in adult newts. *Biol Open.* 7(6):1–14, 2018.
 50. Minelli G, Franceschini V, Del Grande P, Ciani F. Newly-formed neurons in the regenerating optic tectum of *triturus cristatus carnifex*. *Basic Appl Histochem.* 31:43–52, 1987.
 51. Berg DA, Kirkham M, Beljajeva A, Knapp D, Habermann B, Ryge J, et al. Efficient regeneration by activation of neurogenesis in homeostatically quiescent regions of the adult vertebrate brain. *Stem Cells Dev.* 180:4127–34, 2011.
 52. Berg DA, Kirkham M, Wang H, Frise J. Dopamine controls neurogenesis in the adult salamander midbrain in homeostasis and during regeneration of dopamine

- neurons. *Cell*. 8:426–33, 2011.
53. Kirkham M, Hameed LS, Berg DA, Wang H, Simon A. Progenitor cell dynamics in the newt telencephalon during homeostasis and neuronal regeneration. *Stem Cell Reports*. 2(4):507–19, 2014.
 54. Hedlund E, Belnoue L, Theofilopoulos S, Salto C, Bye C. Dopamine receptor antagonists enhance proliferation and neurogenesis of midbrain *Lmx1a*-expressing progenitors. *Sci Rep*. 6:1–11, 2016.
 55. Farkas JE. Exploring the neural control of axolotl limb regeneration. Northeastern University; 2017.
 56. Satoh A, Makanae A, Nishimoto Y, Mitogawa K. FGF and BMP derived from dorsal root ganglia regulate blastema induction in limb regeneration in *Ambystoma mexicanum*. *Dev Biol*. 417(1):114–25, 2016.
 57. Makanae A, Hirata A, Honjo Y, Mitogawa K, Satoh A. Nerve independent limb induction in axolotls. *Dev Biol*. 381(1):213–26, 2013.
 58. Abe N, Cavalli V. Nerve injury signaling. *Curr Opin Neurol*. 18:276–283, 2008.
 59. Chandran V, Coppola G, Nawabi H, Tuszyński M, Woolf CJ, Geschwind DH, et al. A systems-level analysis of the peripheral nerve intrinsic axonal growth program. *Neuron*. 89:956–70, 2016.
 60. Afshari FT, Kappagantula S, Fawcett JW. Extrinsic and intrinsic factors controlling axonal regeneration after spinal cord injury. *Expert Rev Mol Med*. 11:1–19, 2009.
 61. Fawcett JW, Verhaagen J. Intrinsic determinants of axon regeneration. *Dev Neurobiol*. 78(10):890–7, 2018.
 62. Athipozhy A, Lehrberg J, Monaghan JR, Gardiner DM, Voss SR. Characterization of transcriptional responses of dorsal root ganglia cultured in the presence and absence of blastema cells from regenerating salamander limbs. *Regeneration*. 1(2):1–10, 2014.
 63. Cengiz N, Erdog E, Oguz EK. Consequences of neurite transection in vitro. *J Neurotrauma*. 29:2465–74, 2012.
 64. Tinevez J, Perry N, Schindelin J, Hoopes GM, Reynolds GD, Laplantine E, et al. TrackMate: an open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*. 115:80–90, 2016.

65. Rogers SL, Letourneau PC, Palm SL, McCarthy J, Furcht LT. Neurite extension by peripheral and central nervous system neurons in response to substratum-bound fibronectin and laminin. *Dev Biol.* 98(1):212–20, 1983.
66. Palm SI, Furcht L. Production of laminin and fibronectin by schwannoma cells: cell-protein interactions in vitro and protein localization in peripheral nerve in vivo. *J. Cell Biol.* 96(5):1218–26, 1983.
67. Deister C, Aljabari S, Schmidt CE. Effects of collagen 1, fibronectin, laminin and hyaluronic acid concentration in multi-component gels on neurite extension. *Biomater Sci.* (2015):37–41, 2012.
68. Guan W, Puthenveedu MA, Condic ML. Sensory neuron subtypes have unique substratum preference and receptor expression before target innervation. *J Neurosci.* 23(5):1781–91, 2003.
69. Olsson L, Svensson K, Perris R. Effects of extracellular matrix molecules on subepidermal neural crest cell migration in wild type and white mutant (dd) axolotl embryos. *Pigment Cell Res.* 9(1):18–27, 1996.
70. Kamande J, Nagendran T, Harris J, Taylor AM. Multi-compartment microfluidic device geometry and covalently bound poly-D-lysine influence neuronal maturation. *Front Bioeng Biotechnol.* 7:1–9, 2019.
71. Takei Y. Comparative physiology of body fluid regulation in vertebrates with special reference to thirst regulation. *Jpn J Physiol.* 50(2):171–86, 2000.
72. Eimanifar A, Aufderheide J, Schneider SZ, Krueger H, Gallagher S. Development of an in vitro diagnostic method to determine the genotypic sex of *Xenopus laevis*. *Peer J.* 1–16, 2019.
73. Enos N, Takenaka H, Scott S, Salfity HVN, Kirk M, Egar MW, et al. Meningeal foam cells and ependymal cells in axolotl spinal cord regeneration. *Front Immunol.* 10:1–29, 2019.
74. Tanaka K, Webster H. Myelinated fiber regeneration after crush injury is retarded in sciatic nerves of aging mice. *J Comp Neurol.* 308(2):180–7, 1991.
75. Vaughan DW. Effects of advancing age on peripheral nerve regeneration. *J Comp Neurol.* 323(2):219–37, 1992.
76. Parhad IM, Scott JN, Cellars LA, Bains JS, Krekoski CA, Clark AW. Axonal atrophy in aging is associated with a decline in neurofilament gene expression.

- J Neurosci Res. 41(3):355–66, 1995.
77. Verdú E, Ceballos D, Vilches JJ, Navarro X. Influence of aging on peripheral nerve function and regeneration. *J Peripher Nerv Syst.* 5(4):191–208, 2000.
 78. Biswas S, Kalil K. The microtubule-associated protein tau mediates the organization of microtubules and their dynamic exploration of actin-rich lamellipodia and filopodia of cortical growth cones. *JNeuroSci.* 38(2):291–307, 2018.
 79. Schaefer AW, Kabir N, Forscher P. Filopodia and actin arcs guide the assembly and transport of two populations of microtubules with unique dynamic parameters in neuronal growth cones. *J Cell Biol.* 158(1):139–52, 2002.
 80. Forscher P, Smith SJ. Actions of cytochalasins on the organization of actin filaments and microtubules in a neuronal growth cone. *J Mol Cell Biol.* 107(4):1505–16, 1988.
 81. Forscher P, Kaczmarek LK, Buchanan J, Smith SJ. Cyclic AMP induces changes in distribution and transport of organelles within growth cones of *Aplysia* bag cell neurons. *JNeuroSci.* 7(11):3600–11, 1987.
 82. Kerschensteiner M, Schwab ME, Lichtman JW, Misgeld T. In vivo imaging of axonal degeneration and regeneration in the injured spinal cord. *Nat Med.* 11(5):572–7, 2005.
 83. Pestronk A, Drachman DB, Griffin JW. Effects of aging on nerve sprouting and regeneration. *Exp Neurol.* 70(1):65–82, 1980.
 84. He Z, Jin Y. Intrinsic control of axon regeneration. *Neuron.* 90(3):437–51, 2016.
 85. Mahar M, Cavalli V. Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. *Nat Rev Neurosci.* 19(6):323–37, 2018.

10. ETİK KURUL ONAYI



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

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.14290
Konu : Etik Kurulu Kararı

24/05/2018

Sayın Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna yapmış olduğunuz “Aksolotl ve Yenidoğan Fare Arka Kök Ganglionlarının Rejenerasyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması” isimli başvurunuz incelenmiş olup, etik kurulu kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

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

EK:
-Karar Formu (1 sayfa)

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 24.05.2018 tarihinde e-imzalanmıştır. Evrağımızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden F81E5D0EX7 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi
Kavacık Mah. Ekinciler Cad.No:19 Kavacık Kavşağı 34810
Beykoz/İSTANBUL

Tel: 444 85 44
İnternet: www.medipol.edu.tr
Ayrıntılı Bilgi İçin : [bilgi@medipol.edu.tr](mailto: bilgi@medipol.edu.tr)



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
23/05/2018	30		Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

“Aksolotl ve Yenidoğan Fare Arka Kök Ganglionlarının Rejenerasyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 1 yıl

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



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

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-E.41157
Konu : Etik Kurulu Kararı

19/08/2019

Sayın Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 23/05/2018 tarihli 30 karar no ile onay verilen "Aksolotl ve Yenidoğan Fare Arka Kök Ganglionlarının Rejenerasyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması" isimli çalışmanızın başlığını "Aksolotl ve Fare Arka Kök Ganglionlarının Rejenerasyon Kapasitelerinin Karşılaştırılması" olarak değiştirilmesi ve "toplam fare sayısının (embriyonik fare sayısı 30, yetişkin fare sayısı 20) 50" olması isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

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

Bu belge 5070 sayılı e-İmza Kanununa göre Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK tarafından 19/08/2019 tarihinde e-imzalanmıştır. Eyağınızı <https://ebys.medipol.edu.tr/e-imza> linkinden 37966E1AX2 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

İstanbul Medipol Üniversitesi

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

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

11. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ayşe Server	Soyadı	SEZER
Doğum Yeri	İstanbul	Doğum Tarihi	05.04.1995
Uyruğu	T.C.	TC Kimlik No	
E-mail	ayseserversezer@gmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık	-	-
Yüksek Lisans	-	-
Lisans	T.C. İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi	2017
Lise	Sakarya Anadolu Lisesi	2013

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
-	-	-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	İyi	İyi	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu □								
KPDS	YDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

□□Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

□□KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; YDS: Yabancı Dil Bilgisi Seviye Tespit Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test; TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	74,29622	73,06080	69,82514
YÖKDİL Puanı	61,250		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Programları	Çok iyi
Fiji İmage J	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

YAYINLAR

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (*Proceedings*) basılan bildiriler

Sefer, Ö., Yörük, E., Develi, ES, Zümrüt, IM, **Sezer, AS**, Konukcu, Z, “Effects of Kaempferol on Growth and Toxin Production in *Fusarium culmorum*”, 2nd Balkan Agriculture Congress 2017, 16-18 May, Tekirdag, S:51.

Yörük, E., Sefer, Ö., **Sezer, AS**, Konukcu, Z, Develi, ES, “Investigation of Eugenol Effects at Growth and Transcriptomic Levels in *Fusarium culmorum*”, 2nd Balkan Agriculture Congress 2017, 16-18 May, Tekirdag, S:29.

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

Sefer, Ö., Yörük, E., Develi, ES, **Sezer, AS**, Konukcu, Z, 2017. 2,4-Dimetilpirol“ün Başak Yanıklığı Hastalığı Etmeni *Fusarium culmorum*“un Üzerine Etkilerinin İncelenmesi, International Journal of Secondary Metabolites, International Journal of Secondary Metabolite, 4(2): 103-113.

Yörük, E., Sefer, Ö, **Sezer, AS**, Konukcu, Z, Develi, ES, 2018. Investigation of Eugenol Effects at Growth and Transcriptomic Levels in *Fusarium culmorum*, Iğdır University Journal of the Institute of Science and Technology, 8(2): 215-221.

Sefer, Ö., Yörük, E., Develi, ES, Zümrüt, IM, **Sezer, AS**, Konukcu, Z. 2017. Kaempferol“ün Başak Yanıklığı Etmeni *Fusarium culmorum*“un Üremesi ve Toksin Üretimi Üzerine Olan Etkileri, Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 12(1): 24-33.

Projeler

Bitki Türevli Bileşiklerin *Fusarium culmorum* Üzerindeki Etkilerinin Fenotipik ve Genetik Düzeyde İncelenmesi TÜBİTAK Projesi, 2209-A, **Proje Yöneticisi**, 2016.