



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**AKSOLOTL OMURİLİK DOKUSUNUN
ULTRASTRÜKTÜREL YAPISININ TANIMLANMASI**

NACİYE BİLGİN BADUR

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL-2022

TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri

Enstitüsü/Programın seviyesi : Yüksek Lisans () Doktora (X)

Anabilim Dalı : Sinirbilim

Öğrenci : Naciye BİLGİN BADUR

Tez Başlığı : Aksolotl Omurilik Dokusunun Ultrastrüktürel Yapısının Tanımlanması

Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi/ Kuzey Yerleşkesi

Sınav Tarihi :

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

Danışman

Kurumu

Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

İmza

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

Prof. Dr. Neslin EMEKLİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE ve KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içerisinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Naciye BİLGİN BADUR

TEŞEKKÜR

Her konuda desteğini her zaman hissettiğim ve öğrencisi olmak ile her zaman gurur duyduğum ve duyacağım kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e;

Pek değerli tez izleme komitesi jüri üyeleri; Prof. Dr. Ertuğrul Kılıç, Prof. Dr. Lütfü Hanoğlu hocalarıma;

İhtiyaç duyduğum her konuda; bilgi, beceri ve desteklerini bir an bile esirgemeyen Dr. Öğr. Üye. Neşe Ayşit ve Arife Ahsen Kaplan'a;

Medipol SABİTA laboratuvarı çalışma arkadaşlarım (alfabetik sırayla): Ayşe Server Sezer, Cemil Özgül, Dr. Esra Nur Yiğit, Dr. Fadime Çadircı Tungaç, Gülsena Baydaş, Dr. Mehmet Şerif Aydın, Dr. Nagihan Mantar, Dr. Sadık Bay, Safiye Serdengeçti, Sevgi Nur Bostan, Dr. Şükriye Bilir ve Medipol MEDİTAM üyelerine;

Kardeşlerim ve meslektaşlarım Op. Dr. Selin Bilgin Kadıoğlu ve Dr. Sena Bilgin'e ve ilaç sektöründe senelerdir çalışan kardeşim Mehmetnur Bilgin'e ve eğitim hayatımın her aşamasında desteklerini, dualarını hissettiğim canım annem Sevim Bilgin ve babam Mehmet Bilgin'e;

Çocuklarıma yokluğumu hissettirmeyen Ecz. Selman Akyüz ve Ecz. Gülistan Akyüz'e;

Yaşlarımdan çok daha fazla yük taşıtırıp büyük bir fedakarlığa zorladığım göz bebeklerim Ömer'im ve Erva'ma;

Bana en çok inanan, güvenen ve en büyük motivasyon kaynağım olan kıymetli eşim Dr. Ecz. İsa BADUR'a

teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU	i
ETİK İLKE ve KURALLARA UYGUNLUK BEYANI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
RESİMLER LİSTESİ	xiv
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Aksolotl.....	5
4.2. Spinal Kord Anatomisi, Histolojisi	6
4.3. Sinir sistemi Rejenerasyonu	10
4.4. Elektron Mikroskobu	11
4.5. Eksplant Kültürü	11
5. MATERYAL ve METOT	12
5.1. Ortak Bilgiler	12
5.1.1. Sarf malzemeleri	12
5.1.2. Hayvanların temini	12
5.1.3. Hayvanların sakrifikasyonu – spinal kord dokusunun çıkarılması	13
5.1.4. Benzokain hazırlama.....	13

5.1.5. Diseksiyon besiyeri.....	13
5.1.6. Kültür besiyeri	13
5.1.7. Kültür kabı kaplaması	14
5.1.8. Faktörler.....	14
5.1.9. Matrijel.....	14
5.1.10. Dokuların boyanması.....	15
5.2. Aksolotl Spinal Kord Dokusu Ultrastrüktürel Yapısının Histolojik Yöntemlerle Gösterilmesi	16
5.2.1. Hematoksilen-Eozin boyama metodu.....	16
5.2.2. Elektron mikroskobu görüntülemesi için doku takibinin hazırlanması.....	17
5.3. Eksplant Kültürü Yöntem Geliştirme Deneyleri.....	21
5.3.1. Matrijel ve büyüme faktörleriyle eksplant kültürü yöntemi ..	21
5.3.2. Doku sıvısının absorpsiyonu sonrası eksplant kültürü yöntemi	22
5.3.3. Kültür kabı kapağı modifikasyonu ile eksplant kültürü yapışmasını artırma yöntemi	22
5.3.4. Doku boyutunun küçültülmesi ile eksplant kültürü yöntemi.	22
5.3.5. Kültür besiyeri ozmolaritesinin artırılması ile eksplant kültürü yöntemi.....	25
5.3.6. Şartlandırılmış doku ile eksplant kültürü yöntemi.....	25
5.4. Eksplant Ko-Kültürleri.....	26
5.4.1. Kas-Spinal Kord Eksplant Ko-Kültürü.....	26
5.4.2. Blastema- spinal kord ko-kültürü	27
6. BULGULAR	29
6.1. Hayvanların Sakrifikasyonu- Omurilik Dokusunun Çıkarılması.....	29

6.2. Aksolotl Spinal Kord Dokusu Ultrastrüktürel Yapısının Histolojik Yöntemlerle Gösterilmesi	30
6.2.1. Dokuların hematoxilen- eozin boyaması.....	30
6.2.2. Spinal kord dokusunun elektron mikroskobu görüntülemesi için takibi ve görüntüleri	32
6.2.3. Seri kesitlerin üç boyutlu analizi	40
6.3. Eksplant Kültürü Yöntem Geliştirme Deneyleri.....	49
6.3.1. Matrijel ve büyüme faktörleriyle eksplant kültür yöntemi	49
6.3.2. Doku sıvısının absorpsiyonu sonrası eksplant kültürü yöntemi	53
6.3.3. Kültür kabı kapağı modifikasyonu ile eksplant kültürü yapışmasını arttırma yöntemi	55
6.3.4. Doku boyutunun küçültülmesi ile eksplant kültürü yöntemi.	56
6.3.5. Kültür besiyeri ozmolaritesinin arttırılması ile eksplant kültürü yöntemi	59
6.3.6. Doku şartlandırma hasarı ile eksplant kültürü yöntemi	60
6.4. Ko-kültürler.....	63
6.4.1. Kas-spinal kord eksplant ko- kültürü.....	63
6.4.2. Blastema -spinal kord eksplant ko-kültürü	65
7. TARTIŞMA	70
8. SONUÇ	74
9. KAYNAKLAR.....	75
10. ETİK KURUL ONAYI	80
11. ÖZGEÇMİŞ.....	83

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

3D	: Üç boyutlu
aCSF	: artificial Cerebrospinal Fluid
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
CB	: Cocodylate Buffer
DAPI	: 4', 6-diamidino-2-fenilindol
ddH₂O	: Double Distile Su
DDSA	: Dodecenyl Succinide Anhydride
dH₂O	: Distile Su
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
DPM-30	: 2,4,6-Tris (dimethylaminomethyl) phenol
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik asit
EGF	: Epidermal Growth Factor
FGF	: Fibroblast Growth Factor
İMÜ-HADYEK	: İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu
L-15	: Leibovitz's L-15
MEDİTAM	: İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi
MEM	: Minimum Essential Media
MgCl₂	: Magnezyum klorür
mOsmol	: Miliosmol
NaH₂PO₄	: Monosodyum fostat
NaHCO₃	: Sodyum bikarbonat
NBA	: Neuro Basal -A
NGF	: Nerve Growth Factor

NMDA	: N-metil-D-aspartat
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PDGF	: Platelet Derived Growth Factor
PFA	: Paraformaldehit
PI	: Propidyum İyodür
RA	: Retinoik Asit
TCH	: Tiyokarbohidrizid
TEM	: Transmisison Electron Microscopy
UA	: Uranyl asetat

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 5.1 Eksplant kültür sarf malzemeleri.....	12
Tablo 5.2 Büyüme faktörlerine göre kültür kapları içeriği bileşenleri	21
Tablo 5.3 aCSF bileşenleri	24
Tablo 5.4 Kas-Spinal kord ko-kültür kültür kapları içeriği bileşenleri	27



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4.1 Spinal kordtan çıkan spinal sinirlerin yapısı (22)	7
Şekil 4.2 Spinal kord enine kesiti (13)	7
Şekil 4.3 Spinal kord inen ve çıkan yolakların şematik görünümü (14)	8
Şekil 4.4 Spinal kord duyu iletim ve motor iletim (çıkan ve inen) yolakları (a), spinal kord enine kesiti (b)	8
Şekil 4.5 Akslotl spinal kord enine kesiti (15)	9
Şekil 4.6 Ürodel spinal kord H&E (16)	9
Şekil 5.1 Akslotl spinal kord nöron segmentasyon aşamaları	16
Şekil 5.2 Akslotl spinal kord eksplant kültürü aşamaları	21
Şekil 5.3 Blastema Modeli (32)	28
Şekil 6.1 H&E Boyaması, 4X, 4µm	30
Şekil 6.2 H&E Boyaması, 40X 4µm	31
Şekil 6.3 Toluidine blue boyaması, 20X, sarı ok nöron, kırmızı ok akson, beyaz ok santral kanal, yeşil ok endim hücresi, sarı okla işaretli nöron santral kanal ön kısmını göstermektedir.	33
Şekil 6.4 Spinal kord seri kesiti 180X görünümü, kırmızı ok santral kanal ön kısmını göstermektedir	34
Şekil 6.5 Spinal kord kesiti 150X görünümü, kırmızı ok endim hücresi, sarı ok santralı gösterir.	35
Şekil 6.6 Spinal kord dokusu elektron mikroskobu (Zeiss, GeminiSEM 500), 500X, 3.00 kV, sarı ok nöron, kırmızı ok nöron, yeşil ok akson	36
Şekil 6.7 Spinal kord dokusu (Zeiss, GeminiSEM 500), 2.58 K X, 30.00 kV, kırmızı ok çekirdek membranı, sarı ok hücre membranı	37
Şekil 6.8 Akslotl spinal kord dokusu (Zeiss, GeminiSEM 500), 4.21 K X, 30.00 kV, sarı ok hücre membranı, kırmızı ok çekirdek membranı	38
Şekil 6.9 Akslotl spinal kord dokusu (Zeiss, GeminiSEM 500), 5.18 K X, 30.00 kV, kırmızı ok akson	39
Şekil 6.10 Akslotl spinal kord segmentasyonu için hücre seçiminin yapıldığı ilk kesit	40

Şekil 6.11 Seri kesitlerden 15 kesit aralıklarla alınan kesitlerin üzerinde yeşil renkle işaretli nöron, 127. kesit 15'er ritmik sayma dizininde olmamasına rağmen son kesit olduğu için şekilde gösterilmiştir.	41
Şekil 6.12 Segmente edilen kesitlerin birleştirilmesi.....	42
Şekil 6.13 Segmentasyon sonrası birleştirilen kesitlerin doku içinde farklı açılardan görünümü.....	43
Şekil 6.14 Hücrenin segmente edilen kısmının çap / uzunluk oranı.....	44
Şekil 6.15 Aksolotl spinal kord dokusundan segmentasyon için seçilen hücrenin, serinin ilk kesitindeki görünümü ve işaretlenmesi.....	45
Şekil 6.16 Seri kesitlerden 15 kesit aralıklarla alınan kesitlerin üzerinde yeşil renkle işaretli nöron, 127. kesit 15'er ritmik sayma dizininde olmamasına rağmen son kesit olduğu için şekilde gösterilmiştir.....	45
Şekil 6.17 Segmentasyon yapılan hücrenin sol yan taraftan görünümü.....	46
Şekil 6.18 Hücrenin segmente edilen kısmının çap / uzunluk oranı.....	47
Şekil 6.19 Hücre çekirdeğinin segmentasyonunu. Kırmızı ile çekirdek, yeşil ile sitoplazma gösterilmiştir.	48
Şekil 6.20 FGF eklenmiş kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokudan göçen spinal kord hücresi, akson boyu 474,407 µm olarak ölçüldü (ImageJ), inkübasyonun 3. gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI).....	50
Şekil 6.21 EGF eklenmiş kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 3.gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI).....	51
Şekil 6.22 Faktör eklenmeden hazırlanan kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 3.gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI).....	52
Şekil 6.23 FGF eklenmiş kültür besiyeri (NBA) içerisinde filtre kağıdına fazla sıvının absorbe edildiği eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 7.gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal	

mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)	54
Şekil 6.24 FGF eklenmiş kültür besiyeri (NBA) içerisinde vibratom ile kesit alınan dokunun eksplant kültürü (ImageJ), inkübasyonun 3. gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)	56
Şekil 6.25 FGF eklenmiş ve ozmolaritesi arttırılmış (306 mOzmol) kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 7.gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)	59
Şekil 6.26 Kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 2. ayında eksplant dokudan göç eden hücreler DAPI ve MAP-2 ile boyandı, konfokal mikroskopta görüntü alındı (LSM 800) (mavi DAPI, yeşil MAP-2)	60
Şekil 6.27 Kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 2. ayında eksplant dokudan göç eden hücreler DAPI ve MAP-2 ile boyandı, konfokal mikroskopta görüntü alındı (LSM 800) (mavi DAPI, yeşil MAP-2)	61
Şekil 6.28 NBA kültür besiyeri içinde şartlandırma hasarı ile yapılan spinal kord doku eksplantı, inkübasyonun 2.ayında hücre göçü ve akson uzaması, brightfield mikroskop görünümü	62
Şekil 6.29 FGF eklenmiş NBA besiyeri içerisinde kas- spinal kord eksplant ko-kültüründen spinal kord dokusu (ImageJ), inkübasyonun 3.gününde spinal kord eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)	64
Şekil 6.30 NBA besiyeri içerisinde blastema spinal kord eksplant ko-kültüründen spinal kord dokusu (ImageJ), inkübasyonun 7.gününde spinal kord eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal	

mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI) 66



RESİMLER LİSTESİ

Resim 6.1 Akslotl spinal kord dokusu diseksiyonu	29
Resim 6.2 Spinal kord parafin takibi	31
Resim 6.3 A: Spinal kord doku bloğu B: Spinal kord doku bloğu traşlanmış hali	32
Resim 6.4 Diseksiyon besiyerinde spinal kord dokuları.....	49
Resim 6.5 Filtre kağıdı.....	53
Resim 6.6 Çubuk aksamı kültür kabı kapağı	55
Resim 6.7 Düşük erime noktalı agaroz içinde doku	57
Resim 6.8 Vibratom stage kısmına yapıştırıcı ile yapıştırılan agaroz içinde doku	58
Resim 6.9 Vibratom (Leica, VT 1000S).....	58
Resim 6.10 Ampüte edilen parmak segmenti	65
Resim 6.11 Akslotl ön kolunda, dirsek-parmak arası mesafe ölçümü.....	67
Resim 6.12 Akslotl ön kol bilek düzeyinde ampütasyon.....	67
Resim 6.13 Akslotl blastema oluşumu 8 günlük takip süreci.....	68
Resim 6.14 Blastema dokusunun alınması	69

1. ÖZET

AKSOLOTL OMURİLİK DOKUSUNUN ULTRASTRÜKTÜREL YAPISININ TANIMLANMASI

Spinal kord yaralanması insanlarda tam olarak tedavisi mümkün olmayan bir engellilik durumu oluşturmaktadır. Aksolotl yüksek rejenerasyon kapasitesi nedeniyle rejeneratif tıp araştırmaları için ideal bir laboratuvar canlısıdır. Bu çalışma ile aksolotl spinal kord rejenerasyon sürecini incelemek ve aksolotl spinal kord yapısı hakkında bilgi edinmek amaçlanmıştır. Aksolotl spinal kord dokusu rejenerasyonunda önemli yeri olduğu bilinen ve kök hücre gibi davranan ependimal hücrelerden köken alan nöron elektron mikroskopunda görüntülenmiştir. Nöronun segmentasyonu analiz programları ile yapılarak üç boyutlu görüntüsü elde edilmiştir. Nöronların rejenerasyon sürecini incelemek amacıyla aksolotl spinal kord dokusu eksplant kültürü yapılmıştır. Eksplant kültürü optimizasyonu ile hücre göçü, akson uzatma ve canlılık görölmüştür. Göç eden ve akson uzatan hücreler immunositokimya boyamaları ile gösterilmiştir. Sonuç olarak aksolotlun spinal kord rejenerasyonunu nasıl gerçekleştirdiğini daha iyi anlamak amacıyla benzer çalışmalar metamorfoz geçirmiş aksolotl ile yapıp sonuçlar kıyaslanabilir.

Anahtar Kelimeler: Aksolotl, Elektron Mikroskobu, Eksplant Kültürü, Rejenerasyon, Segmentasyon, Spinal Kord

2. ABSTRACT

DEFINING THE ULTRASTRUCTURE OF AXOLOTL SPINAL CORD TISSUE

Spinal cord injury causes a disability in human beings with no complete cure. Axolotl is an ideal laboratory animal for regenerative medicine research, because of having high regenerative capacity. The goal of this research is investigating about spinal cord regeneration process and axolotl spinal cord structure. The neurons, which play an important role in spinal cord regeneration and are derived from ependymal cells that have the stem cell character, were viewed under electron microscopy. The neuron's three dimensional structure was shown with segmentation method by using analysis softwares. Axolotl spinal cord explant culture is performed. Cell migration, axon prolongation and live cells were observed and showed via immunocytochemical staining. As a result; in order to understand how the spinal cord regeneration is happening in axolotl, similar studies may be performed in metamorphic axolotl and the results may be compared.

Key Words: Axolotl, Electron Microscopy, Explant Culture, Regeneration, Segmentation, Spinal Cord

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Dünyada spinal kord hasarı sıklığı bir milyonda 3.6-195.4 kişi olarak görülmektedir (1). Güncel tedavi seçenekleri arasında; robotik tedaviler, fonksiyonel elektrik stimulasyonu gibi nörorehabilitasyon tedavileri olsa da tam iyileşme sağlanamamaktadır.

Periferik sinirlerde hasar sonrası rejenerasyon oluştuğu gözlenmiş olsa da santral sinir sistemi için fonksiyonel bir rejenerasyon henüz yoktur (2).

Aksolotl sinir sistemi rejenerasyonunu başarılı bir şekilde gerçekleştirmektedir.

Aksolotlun bunu nasıl yaptığını anlayıp memelilere translasyonu sağlanırsa spinal kord hasarının tedavisi için önemli sonuçlar elde edilebilir.

Spinal kordun ultrastrüktürel yapısının incelenmesi amacıyla hematoksilen ve eozin boyaması yapıldı. Dokudaki nöronların daha detaylı incelenmesi amacıyla elektron mikroskopu ile görüntü alıp, analiz programları ile nöron segmentasyonu yapıp üç boyutlu görüntüsü elde edildi.

Aksolotl spinal kord rejenerasyonunu incelemek amacıyla, çalışmamızda aksolotl spinal kord dokusu eksplantı yapıldı. Daha önce farklı semender türlerinde spinal kord doku eksplant kültürleri yapılmıştır (3) . Aksolotlda ilk kez spinal kord dokusu eksplant kültürü bu çalışma ile yapıldı. Eksplantın optimizasyonu için kültür besiyerine farklı büyüme faktörleri eklendi. Literatürde mevcut çalışmalarda kullanılan kültür besiyerlerinin ozmolaritesi memeli canlılara göre optimize edildiği için ve aksolotlda bu durum farklılık gösterebileceği için kültür besiyeri ozmolarite değişiklikleri uygulandı.

Dokunun boyutunun, dokunun kültür kabına yapışmasını kolaylaştırması amacıyla; farklı boyutta doku kesitleri ile eksplant kültürleri yapıldı. Aksolotl spinal kord dokusu şartlandırma yapılarak eksplante edildi. Blastema dokusunun aksolotlda ampute segment rejenerasyonundaki rolü nedeniyle blastema ile spinal kord eksplant

ko-kültürü yapıldı. Kas dokusunun hücre göçüne etki etme olasılığı nedeniyle spinal kord ile kas ko-kültürü yapıldı.

Pirmer hücre kültürü yapılmadan önce hücrelerin yapışmasını engelleyecek bir ortamda belli bir süre tutulduktan sonra hücre kültürlerinin yapılmasına şartlandırma hasarı etkisi denir (4). Bu tekniğin akson büyütmede olumlu etkisi gösterilmiştir. Çalışmamızda aksolotl spinal kord dokusu diseke edildikten sonra diseksiyon besiyerinde tutularak şartlandırma hasarı etkisi elde edilmesi amaçlandı. Şartlandırma hasarı sonrası eksplant kültürü yapılan aksolotl spinal kord dokusunda hücre göçü ve akson uzatma gözlemlendi.

Aksolotl, spinal kord dokusu rejenerasyon hakkında bilgi verme potansiyeli olması açısından önemli, bu amaçla bu konuda daha çok çalışma yapılması yararlı olabilir. Neotenic aksolotl ile metamorfoz geçirmiş aksolotl çalışmaları kıyaslanarak neotenic aksolotla özgü olan rejenerasyonun moleküler mekanizmaları anlaşılabilir. Elde edilen verilerin memeli canlılarla benzerlik ve farklılıkları incelenerek memeli canlılarda spinal kord dokusu rejenerasyonu oluşabilmesi için gerekli şartların sağlanması amaçlanabilir.

4. GENEL BİLGİLER

Sinir sistemi rejenerasyonu memeli canlılarda sınırlı miktarda periferik sinirlerde görülmüş olup, merkezi sinir sisteminde klinik olarak anlamlı rejenerasyon henüz görülmemiştir (2). Hem santral hem de periferik sinir sistemi rejenerasyonunu gerçekleştirebilen semender grubundan olan aksolotl rejenerasyon sürecini incelemek amacıyla tercih edildi. Spinal kordun ultrastrüktürel yapısını göstermek amacıyla elektron mikroskopunda incelendi. Kök hücre özelliği gösteren endodermal hücrelerin dönüşmesi ile oluşan ve rejenerasyonu sağlayan nöron; segmentasyon yöntemi ile analiz edildi. Bu amaçla ImageJ, Adobe Photoshop, SketchUp analiz programları kullanılarak nöronun üç boyutlu yapısı gösterildi (5) (6)(7). Spinal kord rejenerasyon süreci hakkında yol gösterici olması bakımından aksolotl spinal kordunun eksplant kültürü yapıldı. Eksplant kültürünün optimizasyonu çeşitli yöntemler kullanılarak sağlandı.

4.1. Aksolotl

Aksolotl (*Ambystoma mexicanum*), amfibi sınıfından olan semenderler grubuna ait olup, Ambystomatidae familyasındaki kaplan semenderlerindedir. Aksolotlların, ana yaşam alanlarının Meksika bölgesindeki göllerin olduğu ve atalarının orada yaşayan metamorfik kaplan semenderleri olduğu düşünülmektedir (8).

Aksolotlların laboratuvar şartlarında kolayca yetiştirilebilmesi deneysel çalışmalar açısından önemlidir. Aksolotllar neotenik evrede kalıp dışarıdan müdahale edilmedikçe metamorfoza girmezler ve kalıcı olarak suda yaşarlar (9).

Aksolotllardaki bu yenilenme kapasitesini açıklamak için bazı hipotezler ortaya atılmıştır. Bunlar içinden en ikna edici olanı, aksolotlların metamorfozlarını tamamlayamadıkları ve embriyonik ya da larval dönem benzeri karakteristiklere sahip olduğu için yüksek yenilenme kapasitesine sahip olduğudur (10).

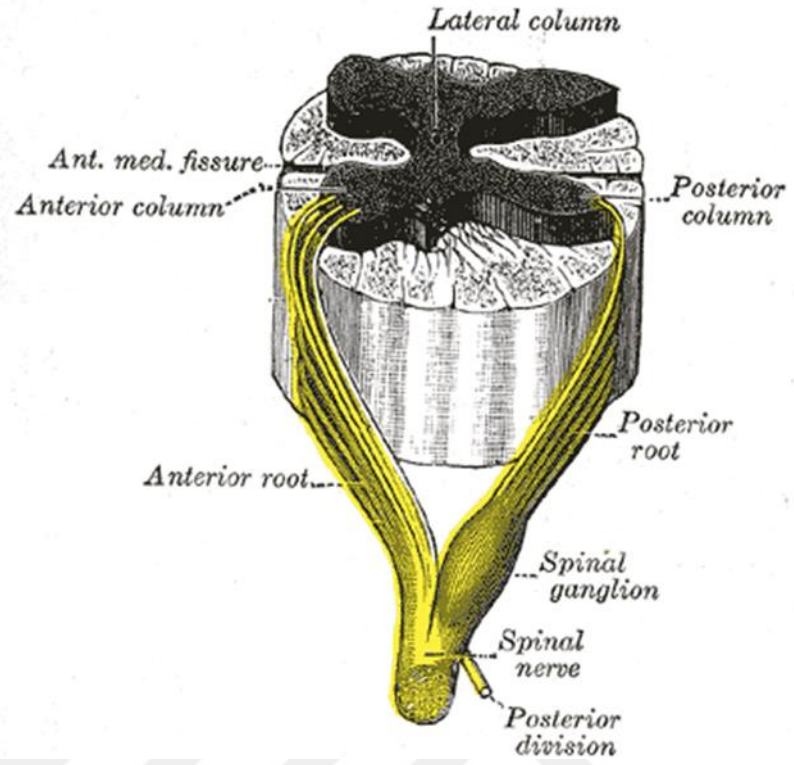
Tamir ve rejenerasyon kapasitesi yüksek olan bir omurgalı canlı türüdür. Yenilenme ve doku tamir mekanizması henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Hasara maruz kaldığında ön ve arka ayaklarını, kuyruğunu, iç organlarını ve santral sinir sistemi kısımları olan beyin ile omuriliği yenileme kapasitesi vardır. Aksolotlda

ampute edilmiş bir organın tekrar oluşumunun başarılı olması rejenerasyona spesifik bir doku olan blastema dokusunun oluşmasıyla ilişkilidir. Aksolotlların, yapısal protein ve sinyal yollarının memeli canlılarla benzer olması aksolotlarla yapılan deneylerden elde edilecek bilgilerin memeli canlılarda uygulanma potansiyelini arttırmaktadır. Aksolotl; tamir ve rejenerasyon yeteneğinin yüksek olması nedeniyle, rejeneratif tıp araştırmalarında tercih edilmektedir (11).

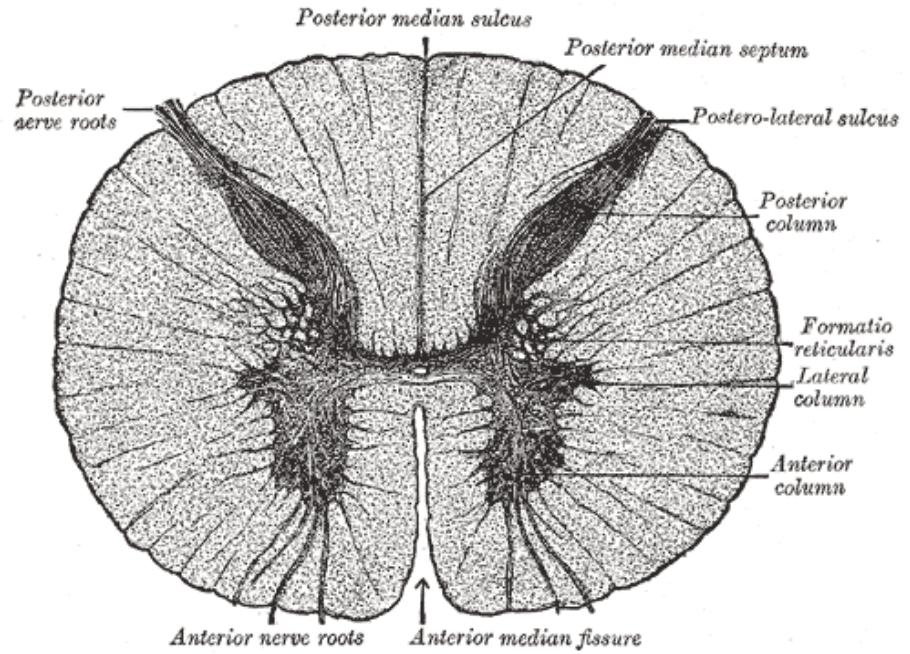
4.2. Spinal Kord Anatomisi, Histolojisi

Spinal kord santral sinir sistemi içerisinde yer alır. Spinal kordta gri cevher ve beyaz cevher organizasyonu; gri cevher iç kısımda, beyaz cevher gri cevheri dışardan saracak şekilde dış kısımda yer alacak şekildedir (Şekil 4.1-2). Transvers kesitlerde gri cevher anterior ve posterior boynuz kısımlarına ayrılmıştır. Posterior boynuz nöronları spinal sinirler aracılığı ile spinal korda giren duyu bilgisini alır. Torasik bölgede lateral boynuzlar vardır. Lateral boynuzda sempatik gangliyon giden pregangliyonik viseral motor nöronlar bulunur. Anterior boynuz çizgili kaslara giden spinal sinirlerin motor nöronlarının gövdelerini barındırır. Beyaz cevher ise anterior, posterior, lateral olmak üzere 3 kısma ayrılır, spesifik fonksiyonları olan aksonal yollardan oluşur. Posterior kolon; somatik mekanoreseptörlerden aldığı duyu bilgisiyi (çıkan yollar) taşır (Şekil 4.3-4).

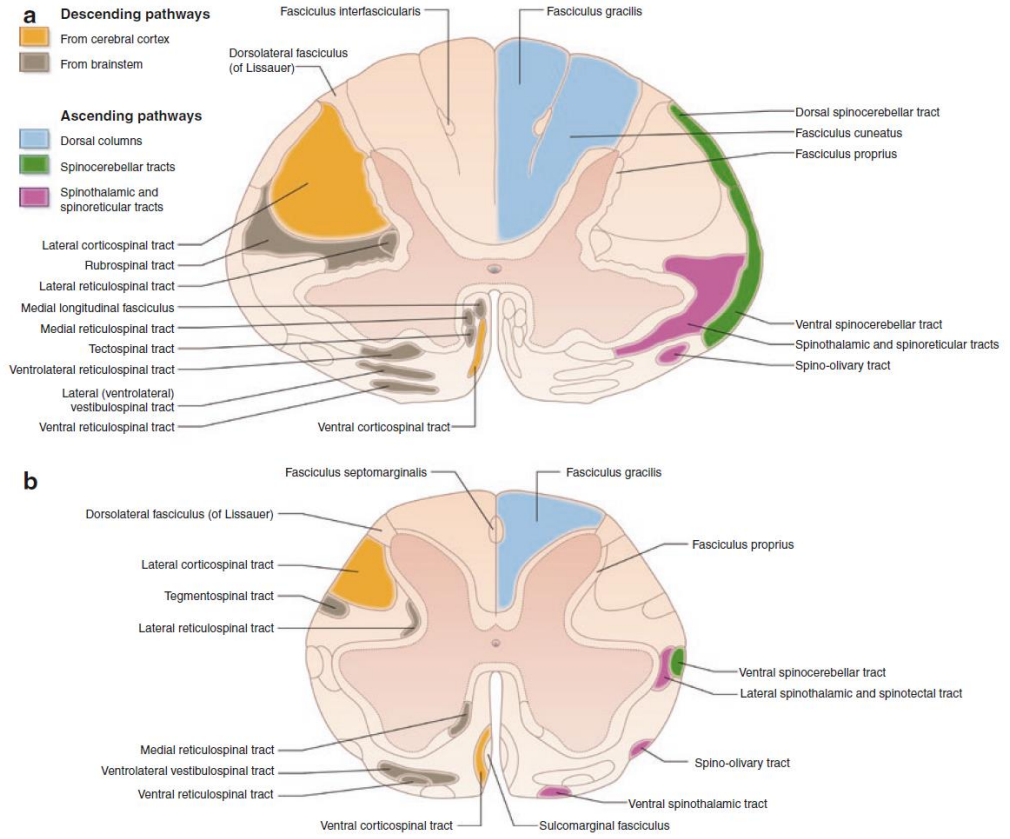
Lateral kolon; serebral korteksten spinal motor nöronlarla bağlantı kuracak aksonları barındırır. Bu yollara kortikospinal yollar denir. Anterior yollar hem inen motor bilgisiyi hem de ağrı, ısı gibi çıkan duyu bilgisiyi içerir. Spinal kordun organizasyonu ile ilgili genel kural olarak posterior duyu bilgisiyi taşıyan nöronlar, lateralde pregangliyonik viseral motor nöronlar, anteriorde somatik motor nöronlar ve aksonlar bulunur (12) .



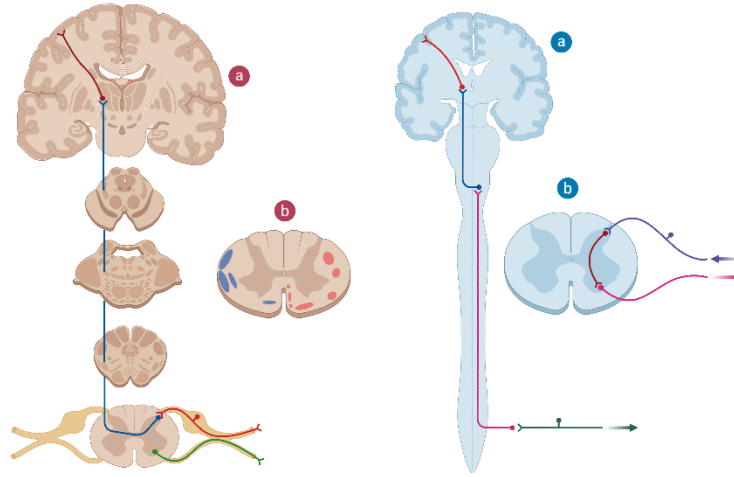
Şekil 4.1 Spinal kordtan çıkan spinal sinirlerin yapısı (22)



Şekil 4.2 Spinal kord enine kesiti (13)

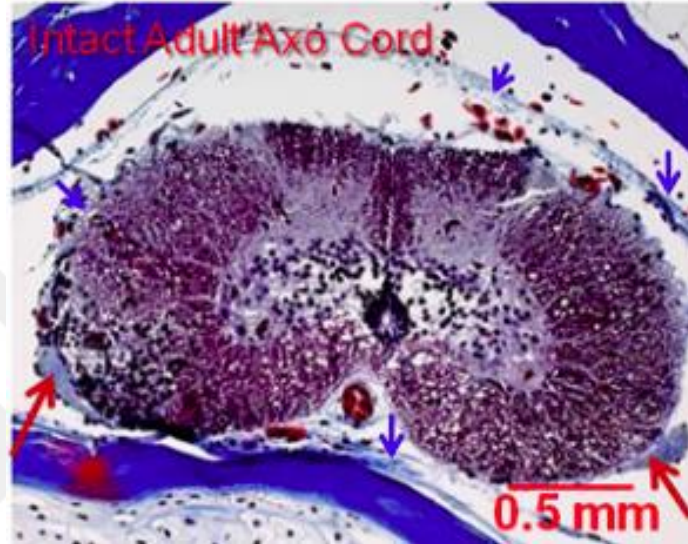


Şekil 4.3 Spinal kord inen ve çıkan yollarının şematik görünümü (14)

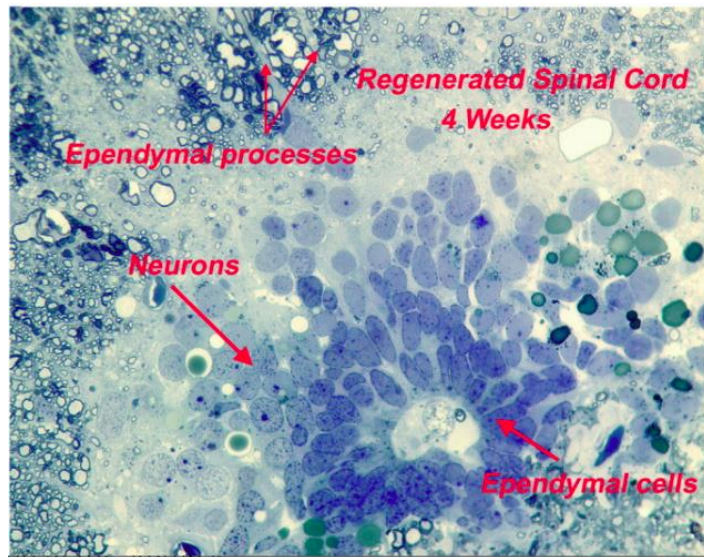


Şekil 4.4 Spinal kord duyu iletim ve motor iletim (çıkan ve inen) yolları (a), spinal kord enine kesiti (b)

Memeli canlılarda spinal kord dokusunda ön ve arka boynuzlar bulunurken, neotenik aksolotl spinal kord dokusunda ön boynuz ve arka boynuz yapıları gözlenmemektedir. Santral kanal etrafından başlayıp perifere doğru uzanan nöronlar görülmektedir (18–20) (21) (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Aksolotl spinal kord enine kesiti (15)



Şekil 4.6 Ürodel spinal kord H&E (16)

Amfibi grubundan olan newt (su keleri) ve semender grubunu tarif eden ürodel spinal kordunda santral kanalı çevreleyen endim hücreleri ile gri cevher ve beyaz cevher bulunmaktadır. Gri cevher ile beyaz cevher arasındaki sınır memelilerdeki kadar belirgin değildir. Amfibilerde endim hücreleri radyal uzantılar ile pia matere kadar uzanır. Spinal kordun üzerinden geçen kan damarlarına kadar uzanan endim hücreleri kan-spinal kord bariyerini oluşturur. Ürodelde 9 farklı nöron tipi tanımlanmış olup bazıları amfibilerde ortak olarak bulunur (16) (Şekil 4.5).

4.3. Sinir sistemi Rejenerasyonu

Aksolotlun spinal kord kesisini tamir yeteneği mevcuttur (17). Aksolotlda kuyruk bölgesinden yapılan spinal kord kesisinde rejenerasyon süreci blastema dokusu ile gerçekleşir (18). Kuyruk amputasyonu sonrası gelişen rejenerasyon ile spinal kord kesisi sonrası direk aksonal büyüme şeklinde olan iki farklı rejenerasyon tipi vardır (19). Doku hasarı sonrası gerçekleşen rejenerasyon sürecinde; çok az miktarda hücre proliferasyonu ve differensiyasyonu gözlenmekle beraber temelde hasarlanan nörondan aksonal büyüme görülür (20). Amfibilerde endimoglyyal hücrelerin nöral kök hücre gibi davrandığı düşünülmektedir, nöral kök hücre belirteci olan Sox2/3 eksprese etmeleri bu hipotezi desteklemektedir (21) (22). Aksolotlda kesi bölgesindeki endimoglyyal hücrelerin epitel hücrelerinden mezenkim hücrelerine doğru bir diferansiyasyon geçirip spinal kordun kesilen kısmına doğru migrasyon yaptığına dair kanıt vardır (23).

Aksolotlda yapılan spinal kord kesisi modeli ile yapılan rejenerasyon araştırmalarında; EGF, PDGF gibi büyüme faktörlerinin rejenerasyon sürecinde önemli olduğu saptanmıştır. Bu faktörler hücrelerin proliferasyonu ve migrasyonu için gerekli olup endim hücrelerinde rejenerasyon sürecini başlatırlar (24).

4.4. Elektron Mikroskobu

Hücrenin dış yüzeyi ile ilgili bilgi edinmek için SEM kullanılır. Elektron mikroskobunun ilk geliştirilmiş hali olup, TEM; SEM'deki fizik kurallarının geliştirilmesiyle ortaya çıkmıştır (24) .

TEM ilk olarak 1940'lı yıllarda kullanılmaya başlandı ve o zamandan beri hücre biyolojisinde önemli bir teknolojiyi oluşturmaktadır. En sık kullanılan TEM, plastiğe gömülü boyanmış ince kesitlere gelen elektron ışımalarının örnekten geçerken dağılıp emilmesi sonucu kontrast ve görüntü oluşturması esasına göre çalışır. Elektron ışımalarının kısa dalgaboyu olması nedeniyle (görünür ışıkta fotonlardan 100000 kat daha kısa) TEM subnanometre düzeyinde çözünürlük sağlar ve bu çözünürlük, ışık mikroskobu ile elde edilebilecek en yüksek çözünürlük olan 20 nm'ye göre çok daha detaylı bilgi verir.

TEM'in; hücre iskeleti, membran sistemleri, organeller, siller, mikrovillus gibi farklılaşmış hücrelerdeki özelleşmiş yapılar ve neredeyse her hücre bileşeninin analizinde değerli olduğu ispatlanmıştır. TEM olmadan hücrelerin kompleks yapılarını ve hücresel yapıları göstermek mümkün değildir (25).

4.5. Eksplant Kültürü

Eksplant çalışma ortamı in vivo ortama en yakın özelliği gösterir. Eksplant kültür ortamı; nörojenez, aksonojenez, travmatik lezyon yanıtı ve hücre ölümü çalışmaları için uygun ortam sağlar (8) (9) (10) (11) (12) (13)(14) (15). Eksplant çalışma ortamı; fare dorsal kök ganglion hücreleri için gerçek hücre etkileşim ortamını taklit edip aksonların oluşturduğu biyokimyasal olaylar hakkında bilgi verir (16). Ancak ex vivo ortamların in vivo ortamların barındırdığı bütün özelliklere sahip olmamaları önemli bir kısıtlayıcı faktördür.

Eksplant ortamı; hücrelerin, dokuların üç boyutlu yapılarını görüntülemek açısından elverişlidir. Eksplant ortamı oluşturmak amacıyla matrijel, kollajen gibi farklı malzemeler kullanılabilir.

5. MATERYAL ve METOT

5.1. Ortak Bilgiler

5.1.1. Sarf malzemeleri

Tablo 5.1 Eksplant kültür sarf malzemeleri

Malzeme	Firma Adı	Katalog numarası
EGF	Sigma	E9644
FGF	Gibco	aa10-155
NGF	Sigma	N0513
RA	StemMACS	130-117-339
Heparin	Stemcell Technologies	07980
NBA	Gibco	A10888-022
B-27	Gibco	17504044
Antibiyotik -antimikotik solüsyonu	Sigma	A5955
Glutamin (Glutamax)	Gibco	35050061
L-15	Multicell	323-050-cl
Benzocaine	Sigma	E1501
Filtre kağıdı	M. Nagel	105.02.125
PFA	Sigma	158127
Poly-D lizin	Merck	P7280
Matrigel	Corning	4041123
PBS	PanBiotech	P04-36500
Cam tabanlı kültür kabı	WPI	FD35
PI	ICN	255535-164
Calcein	Invitrogen	C1430

5.1.2. Hayvanların temini

Tüm deneylerde neotenik aksolotl kullanıldı. Aksolotlların bakımı ve üretimi İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezi (MEDİTAM) tarafından gerçekleştirildi. Deneylerin materyal ve metodları İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İMÜ-HADYEK) tarafından onaylandı.

5.1.3. Hayvanların sakrifikasyonu – spinal kord dokusunun çıkarılması

Ortalama uzunlukları 18-20 cm olan aksotl benzokain içinde 20-30 dk bekletildi. Arka ayakta forseps ile sıkıştırınca oluşan refleks yanıtın kaybolması ile aksotlun sakrifiye edildiğine karar verilip, aksotl diseksiyon yatağına alınarak kafası makasla dekapite edildi. Gözle görülür aktif kanama durduktan sonra (yaklaşık 5 dk) sırt derisi orta hattan arka ayak kısmına kadar kesildi. Orta hattan sağa ve sola doğru kayarak kemik doku etrafındaki kas dokusu makasla kesilerek kemik dokuya ulaşıldı.

İnce makasla laminalar kesilerek spinal kord üzerindeki kemik doku çıkarıldı. Spinal kord dokusu bir ucundan forseps ile tutularak çıkarıldı.

5.1.4. Benzokain hazırlama

1 gr benzokain 1 lt dH₂O'da 40 °C'de bir gece kalacak şekilde manyetik karıştırıcıda tutulup, tamamıyla çözdürüldü.

5.1.5. Diseksiyon besiyeri

%1 Antibiyotik, %1 glutamax, %10 ddH₂O oranları kullanılarak L-15'e eklendi ve diseksiyon besiyeri elde edilmiş oldu. Çıkarılan spinal kord dokusu diseksiyon besiyeri içeren kültür kabına konuldu. -20 ° C'den soğuk tabla alınıp mikroskop tabanına yerleştirildi. Tablanın üzerine içinde spinal kord dokusu olan kültür kabı konuldu. Mikroskop altında; doku, mikroskop obejektifinin mikrometresi kullanılarak doku parçalarının uzunlukları 1 mm uzunlukta olacak şekilde bistüri ile kesildi.

5.1.6. Kültür besiyeri

Doku kültürlerinin besiyerleri NBA ile hazırlandı. NBA'ya; %10 ddH₂O, %1 glutamax, %1 antibiyotik, %2 oranlarında B27 eklenerek kültür besiyerleri elde edildi.

5.1.7. Kültür kabı kaplaması

Cam tabanlı kültür kabı kaplandı. Kaplama için Poly-D lizin kullanıldı. 75 µL poly- D lizin + 675 µL ddH₂O kullanılarak, %10'luk poly D- lizin elde edildi. 145 µL/ kültür kabı eklenerek 1,5 saat kabinde (24 °C) bekletildi. 3 kere ddH₂O ile yıkama yapıldı. Kaplama işlemi bu şekilde tamamlandı.

5.1.8. Faktörler

Doku eksplant kültüründe; akson uzatma ve hücre göçüne katkı sağlaması amacıyla çeşitli büyüme faktörleri kullanıldı.

Blastema oluşumunda DNA replikasyonunu indüklediği saptanan FGF, eksplant kültürlerinde 10 ng/ ml oranında kullanıldı (26).

Aksolotl spinal kord ependim hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonunu sağladığı gösterilen EGF, eksplant kültürlerinde 20 ng/ ml oranında kullanıldı (27).

Ekstremitte rejenerasyonunu sağladığı bilinen RA, eksplant kültürlerinde 0,1 µmolar kullanıldı (3) .

FGF'i stabilize ederek FGF'in etki etmesini kolaylaştırıcı etki gösterdiği için heparin 1 µm/ ml oranında kullanıldı (28).

Sıçan spinal kord rejenerasyonunda NGF salınımı yapan hidrojel kullanımının katkı sağladığını gösteren çalışma nedeniyle eksplant kültürüne 80 ng/ ml oranında NGF ilave edildi (29) .

5.1.9. Matrijel

Doku eksplantının kültür kabına yapışmasını kolaylaştırmak ve üç boyutlu görüntü elde etmek amacıyla matrijel kullanıldı. -20 °C'de sıvı şekilde, 37°C'de jel şeklinde olma özelliğine sahip olan matrijel kabin içerisinde kırık buz içinde tutularak, matrijelin jelleşmesi önlenildi. Matrijel çiçek damlaları halinde pipetle kültür kabına 10 µl /damla olacak şekilde dairesel sırada 5 damla olarak damlatıldı. Pipetle kültür kaplarına uygun şekilde eklendikten sonra tam jelleşme sağlanması için her damlaya bir spinal kord dokusu ekimi yapıлып, 5 dk 37 ° C' lik inkübatörde bekletildi.

İnkübatörden çıkarılıp kabine alınan kültür kaplarına 150 µl kültür besiyeri eklendi. Sonrasında 20 ° C' lik inkübatöre transfer edildi. 24 saat sonra kültür besiyeri 1500 µl'ye tamamlandı.

Deneylerde genel olarak 3 günde bir kültür besiyeri değiştirildi. Kültür kabı tabanına yapışan dokular, yapışmayı sağladığı sürece deneyler devam ettirildi. Dokunun kültür kabı tabanından ayrıldığı deneylerde, deneyler sonlandırıldı. Dokunun kültür kabı tabanına yapışmasını optimize etmek için her deney protokolü 3 kez aynı yöntemle tekrar edildi.

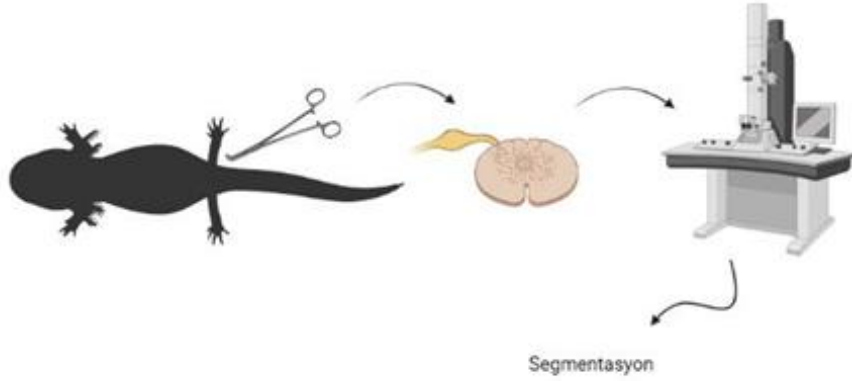
5.1.10. Dokuların boyanması

Eksplant kültür dokuları PI, calcein boyaması yapılarak hücre göçü, canlılık açısından incelendi. İşlem sırası aşağıdaki gibi uygulandı;

1. Kültür kabındaki NBA çekilip atıldı.
2. 3 kere PBS ile yıkama yapıldı.
3. 5 µl/ ml oranında PI eklendi.
4. 1 µl/ ml oranında calcein eklendi.
5. 15 dk içinde görüntüleme yapıldı.

Görüntülemeler konfokal mikroskopta yapıldı (Zeiss, LSM 800). ImageJ programı ile analiz edildi (5).

5.2. Akslotl Spinal Kord Dokusu Ultrastrüktürel Yapısının Histolojik Yöntemlerle Gösterilmesi



Şekil 5.1 Akslotl spinal kord nöron segmentasyon aşamaları

Akslotl spinal kord dokusu seri kesit halinde elektron mikroskobunda incelendi. Bu amaçla spinal kord dokusundaki hedef bölgeyi görüntülemek için hematoksilin ve eozin boyaması yapıldı. Hedef bölge olarak santral kanal ön kısmı belirlendi. Belirlenen hedef bölgeyi elektron mikroskobunda görüntülemek amacıyla akslotl spinal kord dokusu blok haline getirildi. Bloklardan seri kesit alınıp elektron mikroskobunda görüntüldü. Belirlenen nöronun segmentasyonu için analiz programları kullanılarak üç boyutlu elde edildi.

5.2.1. Hematoksilin-Eozin boyama metodu

Akslotl spinal kord dokusunun genel histolojik yapısını görüntülemek ve elektron mikroskobunda görüntüleme yapılacak alana karar vermek amacıyla hematoksilin- eozin boyaması için doku takibi yapıldı.

Yukarıda anlatıldığı gibi diseke edilen spinal kord dokusu arka ayak hizasından 1 cm önde olacak seviyeden alındı.

1. %4 PFA'da doku fiksasyonu yapıldı.
2. PFA'dan alındıktan sonra yıkama yapıldı.

3. Dokular %10 EDTA'da +4 °C 'de bir gece boyunca bekletildi. EDTA'dan sonra %4 PFA'da bir gün boyunca dokunun fikse olması için tekrar bekletildi.
4. 30 dakika akar suda yıkama yapıldı. İkişer saat sırasıyla %70- %80- %96 alkolde bekletildi. Birer saat %100- %100 alkolde bekletildi. 25 dk ksilende bekletildi.
5. 30 dk sıvı parafinde bekletildi. Sıvı parafin bir gece boyunca inkübatörde 60 °C'de bekletildi.
6. Doku gömülüp mikrotomda 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler 39 °C suda toplandı. Kesitler pozitif şarjlı lama alındı.
7. Lamlar inkübatörde 60 °C'de, parafinin tamamen erimesi için 2 saat bekletildi.
8. Pozitif şarjlı lam üzerindeki kesitler 30 dk ksilende bekletildi. Sırasıyla %100- %96- %70 alkolde 15'er dk bekletildi. dH₂O'da 5 dk boyunca yıkandı.
9. Hematoksilen -eozin boyaması uygulandı. Ksilende bekletildi.
10. Biomount lameli ile kapatıldı.
11. Mikroskop ile brightfield görüntüleme yapıldı

5.2.2. Elektron mikroskobu görüntülemesi için doku takibinin hazırlanması

- Hayvanların sakrifikasyonu ve spinal kord dokusunun çıkarılması yukarıda anlatıldığı gibi yapıldı.
- Elektron mikroskobunda görüntüleme yapabilmek amacıyla aşağıda anlatıldığı şekilde doku takibi yapıldı (30).
- Dokular 3 gün boyunca fiksasyon solüsyonunda (%2 PFA+ 0.15 M cocodylate buffer [CB] içinde %2,5 GA + 2 mM CaCl₂) + 4 ° C'de bekletildi.

Doku takibinin 1. gününde;

3-4 kez 0.15 M CB ile her yıkama 5 dk olacak şekilde yıkama yapıldı.

Osmiyum-1 solüsyonu hazırlama:

3,3 ml %4 OsO₄, 2 ml ferrosiyanür, 1,3 ml dH₂O (1,65 ml 4% OsO₄, 1 ml ferrosiyanür, 0,65 ml dH₂O) oranları kullanıldı. Solüsyon çeker ocak içinde hazırlandı.

TCH solüsyonu hazırlama:

%0,5 TCH solüsyonu elde etmek için 3 ml dH₂O ile 15 mg TCH karıştırılıp verteks ile çözünmesi sağlandı. Tamamen erimesi için inkübatörde 60 °C'de eriyene kadar bekletildi. Sonra filtreden geçirildi.

Osmiyum-2 solüsyonu hazırlama:

- 1,5 ml dH₂O ile 1,5 ml % 4 osmiyum kullanılarak 3 ml %2 OsO₄ elde edildi.
- Dokular 30 dk osmiyum-1 solüsyonunda bekletildi.
- 3-4 kez dH₂O ile yıkama yapıldı. İlk yıkama sonrası dokuların bulunduğu tüpler değiştirildi.
- Dokular TCH'de 30 dk bekletildi.
- 3-4 dH₂O ile yıkama yapıldı. İlk yıkama sonrası dokuların bulunduğu tüpler değiştirildi.
- Dokular Osmiyum-2 solüsyonunda 30 dk bekletildi.
- 3-4 kez dH₂O ile yıkama yapıldı.

Uranil Asetat (UA) hazırlama:

- 60 mg UA, 3 ml dH₂O ile %2 oranında UA hazırlandı.
- Dokular UA içinde bir gece boyunca +4 °C'de bekletildi.

Doku takibinin 2. gününde;

- UA içindeki dokular 4-5 kez dH₂O ile yıkandı. Tüpler yenilendi.
- Dokular lead aspartate (kurşun aspartat) içinde 60 °C'de inkübatörde 1 saat bekletildi.
- Dokular dH₂O ile 7-8 yıkandı. Tüpler yenilendi.

Aseton ile dehidratasyon;

Dokular sırasıyla %50 asetonda 15 dk, %70 asetonda 15 dk, %90 asetonda 15 dk, %100 asetonda 10 dk, %100 asetonda 10 dk, ikinci %100 asetonda 10 dk bekletildi.

Epoxy- Embedding Kit (45359) hazırlama:

1. Mixture A hazırlama: Epoxy embedding medium 2,5 ml ile 4 ml DDSA karıştırıldı.
2. Mixture B hazırlama: Epoxy embedding medium 4 ml ile 3,5 ml NMA karıştırıldı.
3. Mixture C hazırlama: Mixture A ve Mixture B karıştırıldı. 250 µl DPM-30 eklendi.
4. Dokular 1:1 oranında karıştırılan %100 aseton ile Mixture C'de 2 saat bekletildi.
5. Daha sonra 1:2 oranında karıştırılan %100 aseton ile Mixture C'de 2 saat bekletildi.
6. En son olarak saf Mixture C'de 2 saat bekletildi.

Mixture C kapsüle döküldü, dokular düzgünce duracak şekilde kapsüle konuldu. Dokuların bilgisinin yazılı olduğu kağıtlar da kapsüle eklendi. Dokuların polimerize olması için inkübatörde 60 °C'de bir gece bekletildi.

Dokuların gömülü olduğu solüsyonun” polimerize olup yeterli katılık seviyesine ulaşması sağlandı.

1. Kapsülden çıkarılan dokunun etrafındaki rezin doku traş cihazı (Leica, EM TRIM2) ile traşlandı.
2. Daha sonra ultramikratoma (Leica, EM UC7) alınan dokunun etrafındaki rezin daha hassas bir yöntem olması nedeniyle jilette traşlandı.
3. Son olarak dokunun etrafındaki rezini tamamen temizlemek amacıyla cam bıçak (Leica, EM KMR3) ile traşlama yapıldı. Rezinden tamamen temizlenen dokudan ultramikratomda (Leica, EM UC7) cam bıçak (Leica, EM KMR3) ile 500 nm kalınlığında kesitler alındı.

4. Kesitler dH₂O ile ıslatılmış lama konuldu. Lamalar manyetik ısıtıcı (Thermo Scientific) ile 70 °C’de kurutuldu.
5. Sonra toluidin blue ile boyanıp tekrar kurutuldu. dH₂O ile toluidine blue boyası yıkanıp tekrar kurutuldu.
6. Işık mikroskobu ile görüntüleme yapıldı.

Toluidine blue ile boyanan kesitlerin görüntülemeleri ile dokusunun anterior-posterior kısmına karar verilip, elektron mikroskobu ile görüntüleme yapılacak bölgeye karar verildi. Elmas bıçakta seri kesit almadan önce doku tekrar cam bıçak ile traşlandı.

Image J analiz programı ile spinal kord santral kanal ön kısmındaki nöron çapı hesaplandı. Nöron çapı 15 µm olarak ölçüldü. Çap boyutunun iki katı olacak uzunlukta seri kesit alındı. Her bir kesitin kalınlığı 100 nm idi ($15 \times 2 = 30 \mu\text{m}$, $30 \mu\text{m} = 30000 \text{ nm}$, $30000 \text{ nm} / 100 \text{ nm} = 300$ kesit). Bu şekilde kesit sayısına karar verildi.

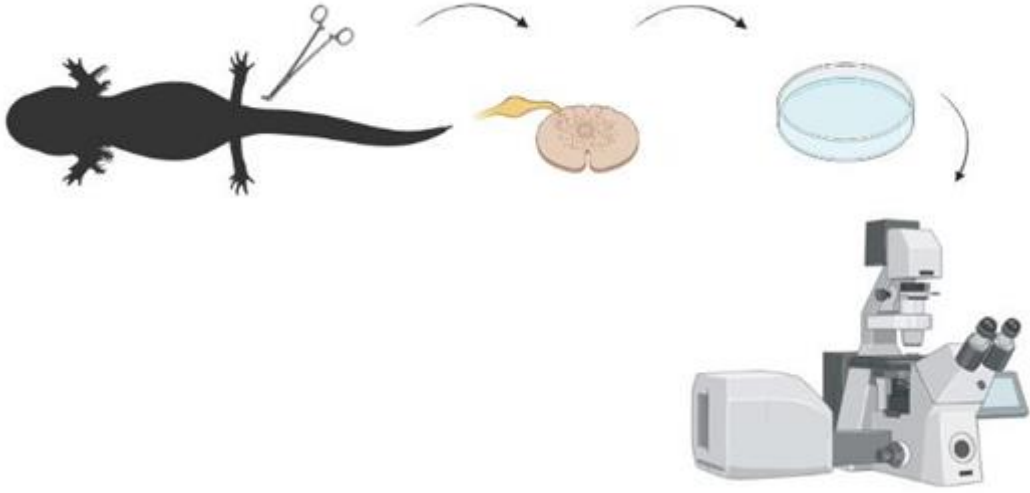
Elmas bıçak (Diatome, MT13302) ile ultramikratomda 300 adet seri kesit alındı. Seri kesitler her lamelde 15- 20 seri kesit olacak şekilde lameller üzerine sırasıyla toplandı. Lameller elmas bıçak küvetine sığacak şekilde cam çizme kalemi ile çizip kesildi. Lamellerin üzerine kesitler alınmadan önce mavi ateş ile lameller yakıldı. Kesitler toplandıktan sonra lamellerin kaplanması kaplama cihazı (Leica, EM ACE200) ile “gold platinum” modunda 10 sn “diffuse” ayarında yapıldı. Kaplama yapılarak elektron mikroskobunda görüntüleme sırasında “charging” olmasını engellendi.

Kaplanmış lameller elektron mikroskobunda (Zeiss, Gemini SEM 500) sırasıyla görüntülendi. Seri kesitlerin standart olması amacıyla görüntüleme 500X, 3 kv’de, BSD detektörü ile yapıldı.

Görüntüleme ile santral kanalın önündeki nöronlar incelendi.

Elektron mikroskobu görüntüleri ImageJ, Adobe Photoshop, SketchUp programları ile analiz edilip segmentasyon yapıldı (23) (24) (25).

5.3. Eksplant Kültürü Yöntem Geliştirme Deneyleri



Şekil 5.2 Aksolotl spinal kord eksplant kültürü aşamaları

5.3.1. Matrijel ve büyüme faktörleriyle eksplant kültürü yöntemi

Yukarıdaki bölümlerde anlatılan şekilde diseke edilen spinal kord dokusu, 5 adet cam tabanlı kültür kabına eksplant kültürü olarak ekildi. Kültür kabının kaplaması, diseksiyon besiyeri, kültür besiyeri, matrijel ve faktörler uygulanması ve deney takipleri yukarıdaki bölümlerde anlatıldığı gibi yapıldı.

Tablo 5.2 Büyüme faktörlerine göre kültür kapları içeriği bileşenleri

Kültür Kabı No	Faktör
1	Kontrol (faktör eklenmedi)
2	FGF + Heparin
3	EGF
4	EGF + FGF
5	EGF + FGF + RA
6	NGF

5.3.2. Doku sıvısının absorpsiyonu sonrası eksplant kültürü yöntemi

Matrijel ve büyüme faktörlerinin kullanıldığı deneydeki işlemler tekrar edildi. Spinal kord dokusu matrijele ekilmeden önce UV'de 30 dk tutulan filtre kağıdının üzerine konularak dokunun etrafındaki sıvının absorbe edilmesi sağlandı. Bu işlemle matrijele ekilen dokunun yüzmesinin engellenmesi amaçlandı.

Daha önceki deneylerde; büyüme faktörlerinden FGF, EGF eklenen kültür kaplarında canlılığın daha uzun sürmesi nedeniyle bundan sonraki deneylerde bu faktörler kullanıldı.

5.3.3. Kültür kabı kapağı modifikasyonu ile eksplant kültürü yapışmasını artırma yöntemi

Filtre kağıdına ilaveten dokunun yapışmasını kolaylaştırmak amacıyla, kültür kabının kapağının tam ortasına gelecek şekilde 1 cm uzunluğunda ortası delik çubuk aksam yapıştırıldı. Matrijele ekilen, kültür besiyeri ve faktörleri ilave edilen kültür kaplarının üst kısmına 1 x 1 cm boyutlarında filtre kâğıdı yerleştirildi. Kültür kabı kapağı kapatılınca çubuk aksam ve filtre kâğıdı ile dokuların kültür kabı tabanına güçlü bir şekilde yapışması amaçlandı.

5.3.4. Doku boyutunun küçültülmesi ile eksplant kültürü yöntemi

Matrijel, EGF ve FGF büyüme faktörleri kullanılarak yapılan bu deneyde, spinal kord dokusunu küçültme işlemi için vibratom (Leica, VT1000 S) cihazı kullanıldı.

Spinal kord dokusu; oda sıcaklığı koşullarında, agar yatağına damlalıklarla damlatılan %2,5 oranındaki düşük erime noktalı agaroz, 1 cm uzunlukta olacak şekilde gömüldü. 1 dk boyunca -20 °C'de bekletildikten sonra donmuş hale gelen agaroz, agar yatağından çıkarılıp dokunun kenarlarındaki agaroz tıraşlandı.

Tıraşlanan agaroz içindeki doku, vibratomun stage kısmına yapıştırıcı ile yapıştırıldıktan sonra, vibratomun stage kısmı vida ile sabitlendi. Hazne kısmı aCSF ile dolduruldu. Haznenin dış kısmına kırık buz eklendi. 50 µm kalınlığında kesitler

alındı. Alınan doku kesitlerinin etrafındaki agaroz forseps yardımıyla uzaklaştırıldı. Spinal kord dokusu; eksplant kültürü olarak matrijel ve FGF ile EGF ayrı kültür kaplarına eklenerek takip edildi.

Düşük Erime Noktalı Agaroz Yüzdesi Optimizasyon Deneyleri

Düşük erime noktalı agaroz %4 oranında hazırlandı. Beherin içine 4 gr agaroz ve 100 mL ddH₂O eklendi. Mikrodalgada 1 dk boyunca ısıtıldı. Tamamen çözülme gözlenene kadar işlem tekrarlandı.

%4 oranındaki düşük erime noktalı agaroz ile hazırlanan doku örnekleri vibratomda kesilirken kesitlerde bütünlük kaybı yaşandığı için agarozun oranında azalma yapılması planlandı.

%2 oranında hazırlandı (2 gr/ 100 ml ddH₂O). Agarozda yeterince donma ve katılaşma gözlenmedi.

%2,5 oranında agaroz hazırlandı (2,5 gr/ 100ml ddH₂O). Agarozda yeterli katılaşma gözlendi. Kesitleri aldıktan sonra kesitlerin bütünlüğünü koruduğu gözlendi. İdeal agaroz oranı %2,5 olarak belirlendi.

aCSF (Cutting Solution) Hazırlanması

Tablo 5.3 aCSF bileşenleri

Madde	mM	Molekül ağırlığı	gr
KCl	1,47	74,56	0,11 gr/ L
NaH ₂ PO ₄	1,23	138,01	0,17 gr/ L
NaHCO ₃	27	84,01	2,275 gr/L
L-ascorbic acid	0,45	176,12	0,012 gr/ 150 mL
Glucose	10	180,16	0,270 gr /150 mL
Sucrose	213	342,20	10,935 gr/ 150 mL
MgCl ₂	10	95,21	1,5 mL (1 M) / 150 mL
CaCl ₂	0,5	110,98	75 mL (1M) / 150 mL

Önceden hazırlandı (1L), +4 °C’de saklandı.

Bu kısımdan 150 mL alınıp, yukarıdaki kimyasal maddeler uygun oranda eklenerek hazırlandı.

Vibratom haznesine 150 mL aCSF konuldu. aCSF’in osmolaritesi 300-310 mOsmol/ L olarak ayarlandı.

Ozmolarite Ölçümü-Ozmometre Cihazı

1. Cihaz arka kısımdaki açma-kapama düğmesine basılarak açıldı.
2. Hazırlanan aCSF çözeltisinden 210 mL alınarak osmolarite cihazının numune kabına (kuyucuk) konuldu.
3. Cihazın start düğmesine basıldı.
4. Ozmometre cihazının hazır olduğu ekranda görülünce tekrar start düğmesine basıldı.
5. Cihazın 3000’e kadar sayması beklendi.

6. 290-310 mOsmol arası deęerler normal kabul edildi.
7. 290'dan küçük çıkan ozmolarite değerleri olması durumunda 50 mL ddH₂O'da 0,5 gr glukoz çözüp, çözdürülen glukozu ekleyerek ölçüm tekrarlandı
8. 310'dan büyük çıkan ozmolarite değerleri olması durumunda ddH₂O eklenerek ölçümler tekrarlandı

5.3.5. Kültür besiyeri ozmolaritesinin arttırılması ile eksplant kültürü yöntemi

Matrijel ve EGF ile FGF büyüme faktörleri kullanılarak spinal kord eksplant kültürü yapıldı.

Kültür besiyeri olarak NBA'ya %1 antibiyotik, %1 glutamax, %2 B27, %5 mannitol eklenerek ozmolaritesi arttırılmış besiyeri kullanıldı (306 mOsm). Ozmolarite arttırılarak, spinal kord dokusunun kültür kabına yapışmasına ve hücre göçüne olumlu katkı sağlanması amaçlandı.

5.3.6. Şartlandırılmış doku ile eksplant kültürü yöntemi

Spinal kord dokusu çıkarıldıktan sonra 3 gün boyunca L-15 besiyerinin içinde +4 °C'de bekletildi. Bu şekilde şartlandırma hasarı modeli oluşturuldu (4) . Üçüncü günün sonunda spinal kord dokusu matrijelin içine ekildikten sonra NBA ile kültür besiyeri tamamlandı. Kültür besiyeri değişimi yapılmadan 2 ay boyunca izlendi. Brighfield mikroskopta hücre göçü ve akson uzatma gözlemlendi. Microtubule associated protein-2 (MAP-2) antikor ve DAPI boyaması yapıldı. Protokolü şu şekildedir (31):

1. Kültür kabındaki kültür besiyeri çekilip atıldı.
2. PBS ile 2 kere yıkama yapıldı.
3. 500 µl PFA eklendi, 15 dk beklendi.
4. 2 kere PBS ile yıkama yapıldı.
5. 500 µl blocking solüsyonu eklendi, 45 dk beklendi.
6. 2 kere PBS ile yıkama yapıldı.

7. Primer antikor olarak 1/500 oranında dilüe edilen 100 µl microtubule associated protein-2 antikorunu (Monoclonal mouse, LOT No: 073M4774, Sigma) eklendi, kültür kabının etrafı ıslak peçete ile sarılıp bir gece bekletildi.
8. 3 kere PBS ile yıkama yapıldı.
9. Sekonder antikor olarak 488 Alexa fluor (goat to mouse IgG, Invitrogen) kullanıldı. 100 µl eklendi. 2 saat beklendi.
10. 3 kere PBS ile yıkama yapıldı.
11. 1 ml DAPI eklendi. 10 dk sonra 2 kere PBS ile yıkama yapıldı.
12. Görüntüleme yapılana kadar +4 °C’de karanlık ortamda muhafaza edildi.
13. Görüntüleme konfokal mikroskobu (Zeiss, LSM 800) ile yapıldı.

5.4. Eksplant Ko-Kültürleri

5.4.1. Kas-Spinal Kord Eksplant Ko-Kültürü

Eksplant kültüründe nöronların akson uzatmasını uyarmak amacıyla kas dokusu ile ko-kültür yapıldı. Aksolotlun arka ayak beşinci parmak ampütasyonu yapılarak kas dokusu elde edildi. Ampute edilen kısmın üzerindeki cilt dokusu mikroskop altında eksize edildikten sonra 1 mm çapında kas dokusu yukarıda anlatıldığı şekilde kaplaması yapılan kültür kabına ekildi. Kas dokusuna ortalama 10 mm uzaklıkta olacak şekilde 3 tane 1 mm uzunluğunda spinal kord dokusu kültür kabına konuldu. Matrijel yukarıda anlatılan şekilde uygulandı. Bu amaçla 6 kültür kabında deney yapıldı. Kültür kaplarının içerikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 5.4 Kas-Spinal kord ko-kültür kültür kapları içeriği bileşenleri

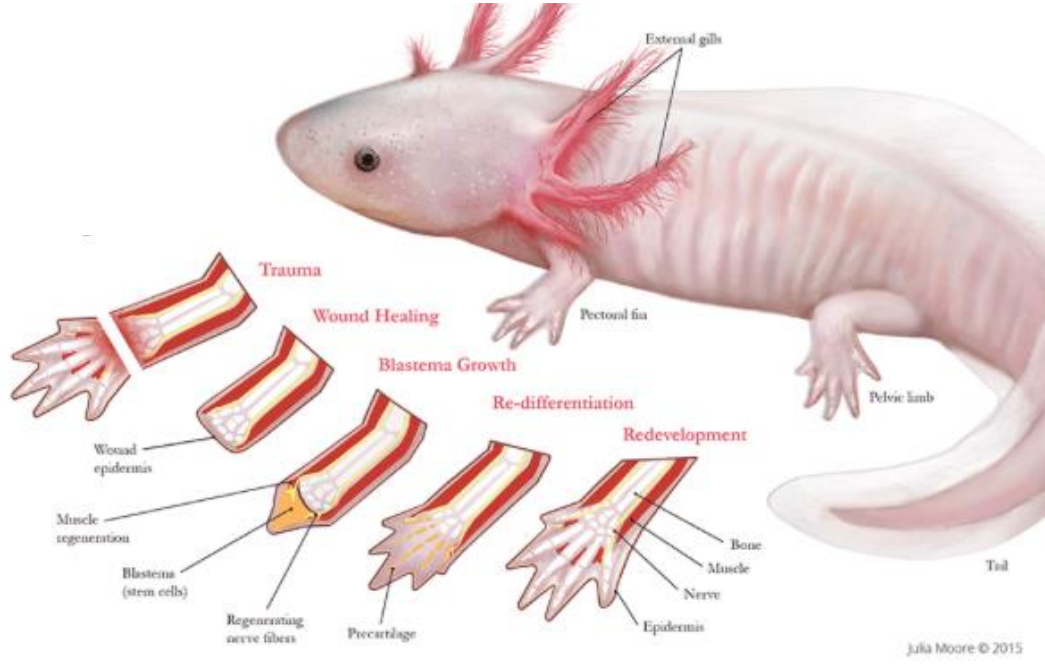
Kültür Kabı No	Doku, Faktör, Kültür Besiyeri
1	Kas dokusu, spinal kord dokusu, EGF, kültür besiyeri (NBA)
2	Kas dokusu, spinal kord dokusu, FGF, kültür besiyeri (NBA)
3	Spinal kord dokusu, EGF, kültür besiyeri (NBA)
4	Spinal kord dokusu, FGF, Kültür besiyeri (NBA)
5	Kas dokusu, FGF, kültür besiyeri (MEM)
6	Kas dokusu, EGF, kültür besiyeri (MEM)

Deneylerin takibi dokular kültür kabı tabanından ayrılıp yüzmeye başlayınca kadar yapıldı. 3 kez tekrar edildi.

5.4.2. Blastema- spinal kord ko-kültürü

Yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan benzokain 1/ 5 oranında ddH₂O ile dilüe edildi. Elde edilen benzokain ile yaklaşık 20 dk içinde anesteziye alınan aksolotlun ön kol dirsek ekleminden parmak ucuna kadar ölçülüp 1/2 oranını koruyacak şekilde el bileğine yakın seviyeden ampute edildi. İşlem sonrası 2 saat içinde aksolotl anesteziyenin etkisinden çıktı. Amputasyon sonrası aksolotl 8 gün boyunca takip edildi. 8. Günde benzokain ile sakrifiye edilen aksolotlun ampute segment ucunda oluşan blastema dokusu 1 cm olacak şekilde bistüri ile kesildi. Blastemanın en uç kısmından 1 mm uzunlukta doku alınıp, sakrifiye edilen başka bir aksolotldan diseke edilen spinal kord dokusu diğer deneylerdeki ile aynı şekilde kültür kabına eksplant kültürü olarak ekildi. Blastema oluşturulan aksolotlun spinal kord dokusu, blastema oluşum sürecinde farklı özellik kazanmış olabileceği için tercih edilmedi. Ortada blastema dokusu ve etrafında

10 mm uzaklıkta olacak şekilde 3 adet spinal kord dokusu matrijel içinde kültür edildi. Yukarıda anlatılan şekilde hazırlanan NBA 150 µl miktarında eklendi. 24 saat sonra kültür besiyeri 1500 µl'ye tamamlandı. Diğer deneylerden farklı olarak büyüme faktörleri verilmedi. Deney takibi dokular kültür kabı tabanından ayrılıp yüzüncüye kadar yapıldı. Deneyler 3 kez tekrar edildi.



Şekil 5.3 Blastema Modeli (32)

6. BULGULAR

6.1. Hayvanların Sakrifikasyonu- Omurilik Dokusunun Çıkarılması

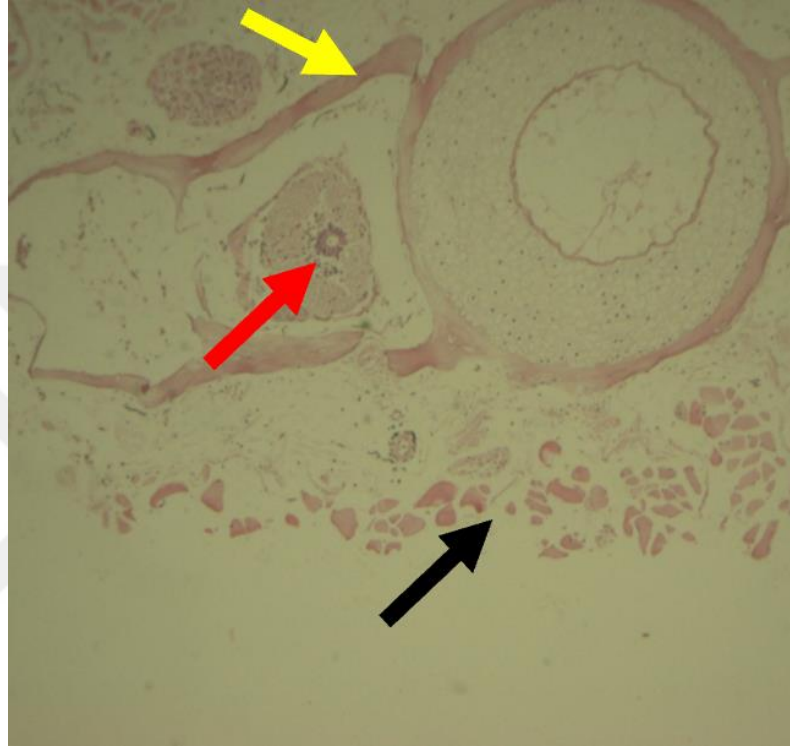
Aksolotllar benzokain anestezisinde sakrifiye edildi. Benzokaine alındıktan 20 dk sonra forseps ile parmak kısıtırma refleksinin kaybolduğu gözlenince, diseksiyon yatağına alınıp dekapite edildi. Spinal kord dokusu Resim 6.1'deki gibi diseke edilip çıkarıldı.



Resim 6.1 Aksolotl spinal kord dokusu diseksiyonu

6.2. Aksolotl Spinal Kord Dokusu Ultrastrüktürel Yapısının Histolojik Yöntemlerle Gösterilmesi

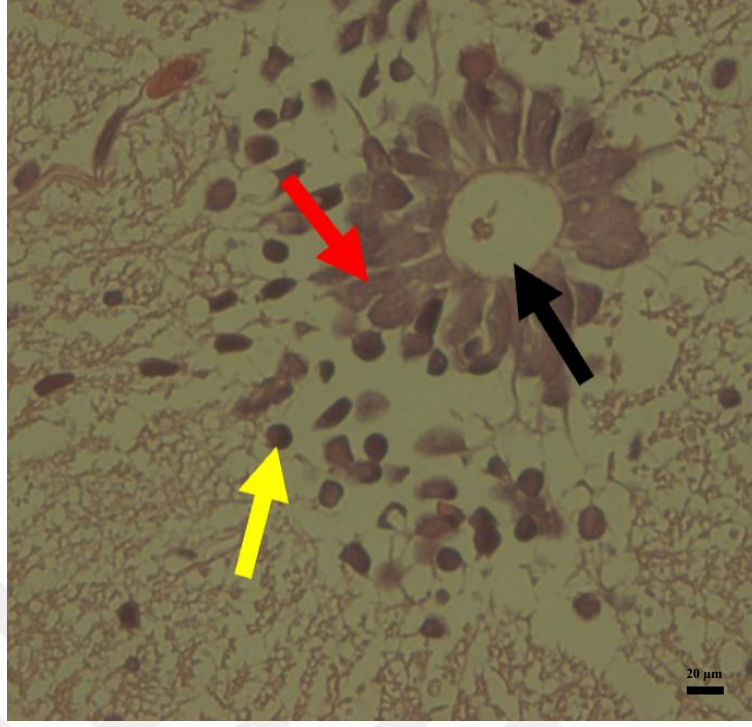
6.2.1. Dokuların hematoksilen- eozin boyaması



Şekil 6.1 H&E Boyaması, 4X, 4µm

Sarı ok vertebra laminası, siyah ok paraspinal kas dokusu, kırmızı ok spinal kord

Hematoksilen eozin boyaması sonrası 4X ve 40X büyütmede aksolotl omurgası ve spinal kord dokusu görülmektedir. Yukarıdaki şekilde görülen sarı ok vertebra laminasını, kırmızı ok spinal kordu ve siyah ok paravertebral kasları göstermektedir.



Şekil 6.2 H&E Boyaması, 40X 4µm
Sarı ok nöron, siyah ok santral kanal, kırmızı ok ependim hücresi

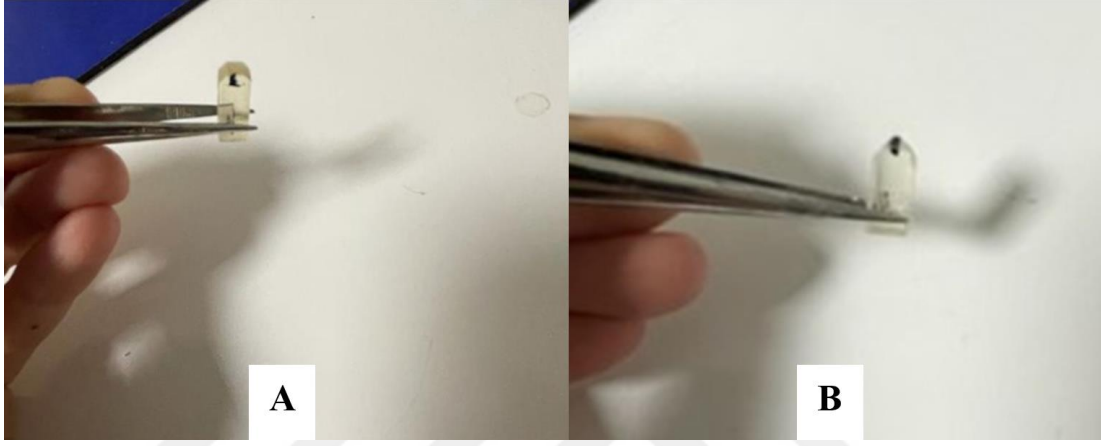
Yukarıdaki şekilde 40X büyütmede sarı ok nöronları, siyah ok santral kanalı ve kırmızı ok ependim hücresini göstermektedir.



Resim 6.2 Spinal kord parafin takibi
Sarı ok spinal kord

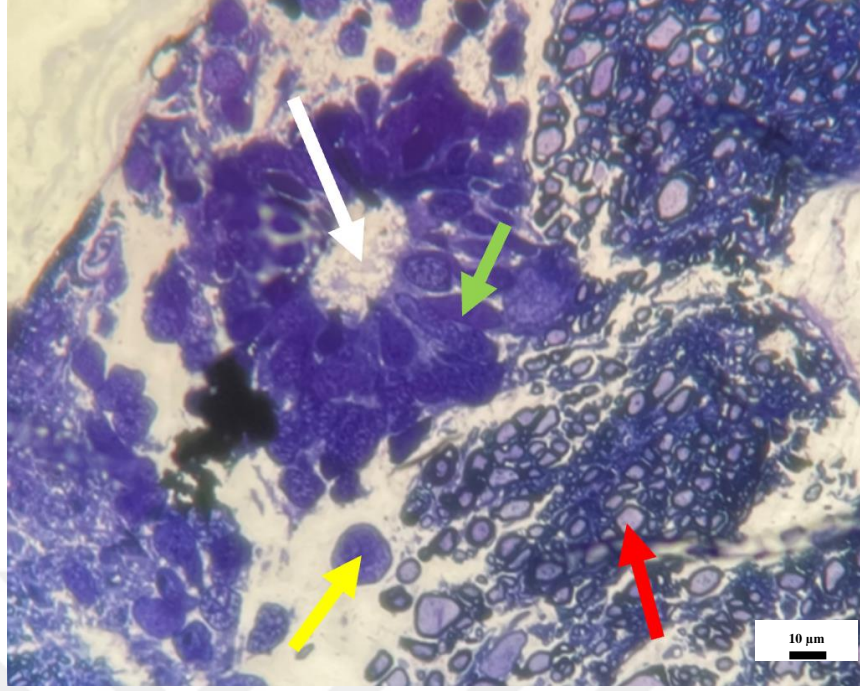
Yukarıdaki resimde hematoxilen eozin boyaması için parafin takibi yapılan ve arka ayak seviyesinden alınan kuyruk dokusunun parafin içinde fiksasyon edilmiş hali görülmektedir.

6.2.2. Spinal kord dokusunun elektron mikroskobu görüntülemesi için takibi ve görüntüleri



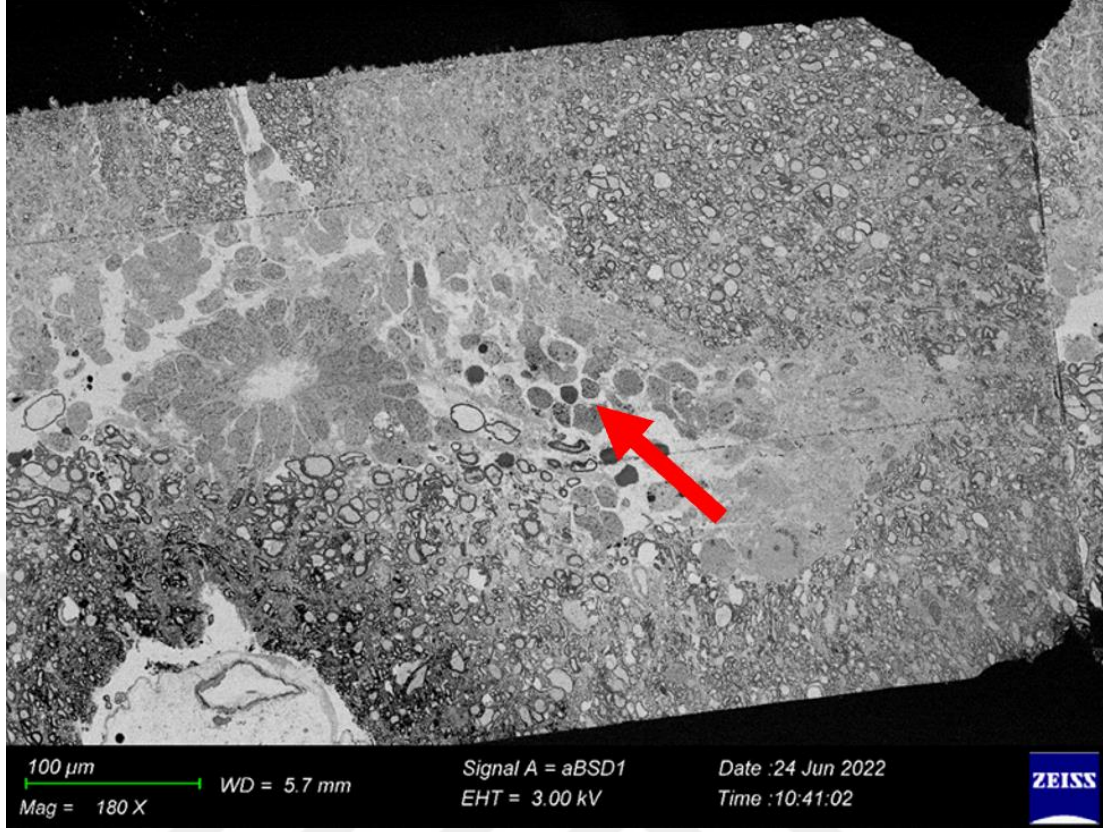
Resim 6.3 A: Spinal kord doku bloğu B: Spinal kord doku bloğu traşlanmış hali

Yukarıdaki resimde elektron mikroskobu için yapılan doku takibi sonrası spinal kordun blok halindeki görünümü ve traşlanarak elmas bıçak ile kesit almaya uygun hale getirilmiş şekli görülmektedir.



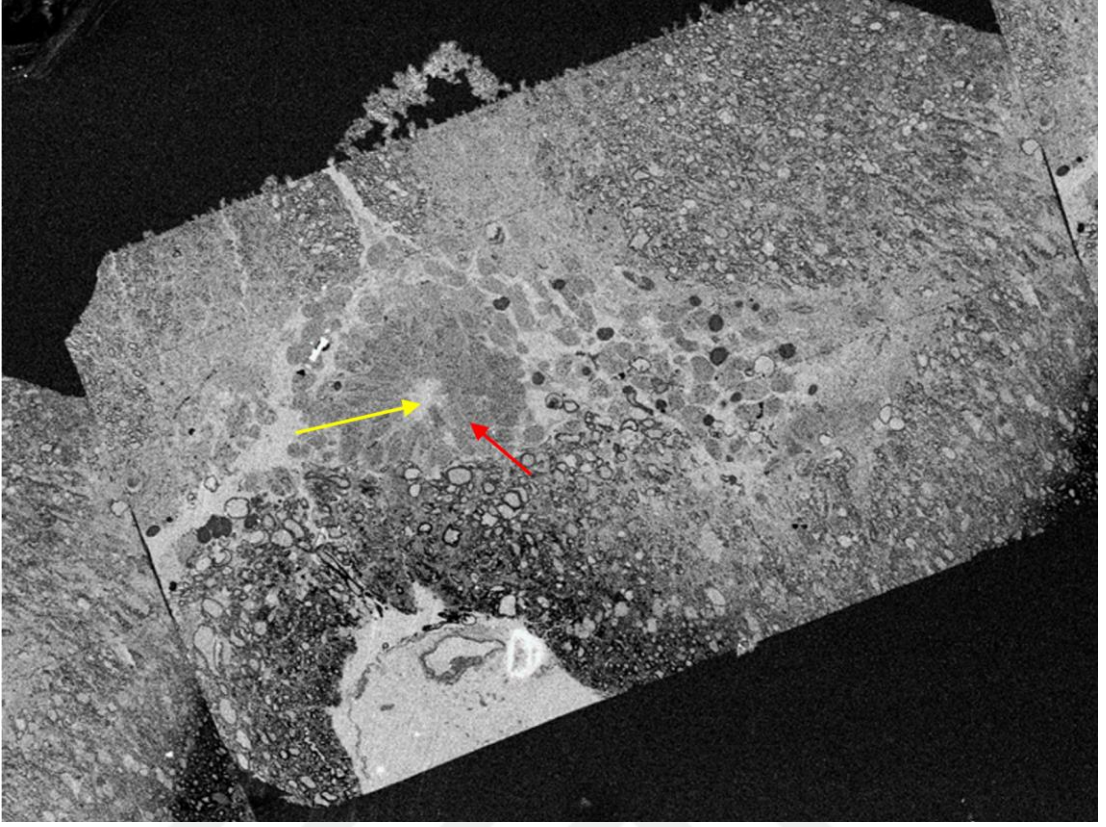
Şekil 6.3 Toluidine blue boyaması, 20X, sarı ok nöron, kırmızı ok akson, beyaz ok santral kanal, yeşil ok ependim hücresi, sarı okla işaretli nöron santral kanal ön kısmını göstermektedir.

Yukarıdaki şekilde cam bıçak ile alınan kesit örneğinin toluidine blue boyamasında santral kanal ve onu çevreleyen ependim hücreleri ile santral kanal komşuluğundaki nöronlar ve daha dışarıda yerleşmiş olan aksonlar görülmektedir. Toluidine blue boyaması seri kesitlerde görüntülenmesi amaçlanan bölgeye karar verildi. Kesit kalınlığı 500 nm'dir. Toluidine boyaması protokolü materyal ve metot bölümünde anlatıldığı gibi yapıldı.



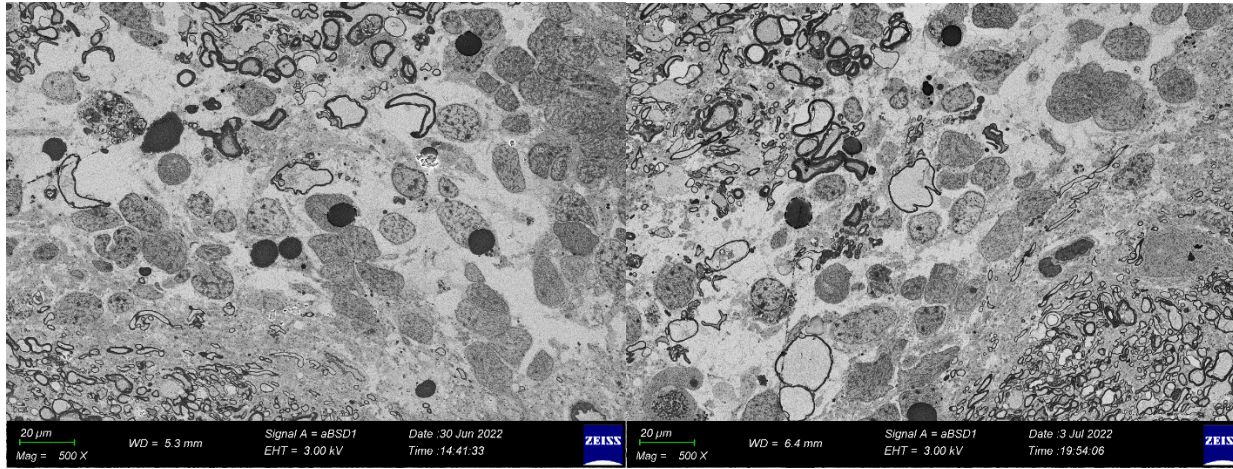
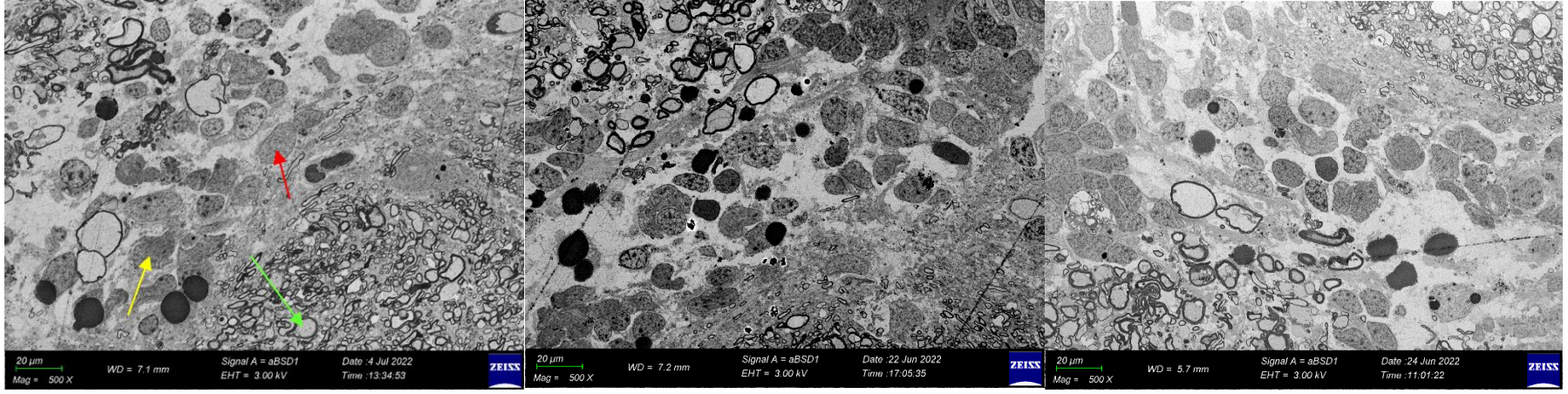
Şekil 6.4 Spinal kord seri kesiti 180X görünümü, kırmızı ok santral kanal ön kısmını göstermektedir

Elektron mikroskobu görüntüsünde spinal kord dokusunun ön ve arka kısmını ayırtetmek amacıyla doku bloğu traşlanınca ön kısım sol taraf yatay traşlanarak blok işaretlenmiş oldu. Yukarıdaki şekilde sağ üst köşede bloğun yatay traşlanmış hali görülmektedir. Kırmızı okla gösterilen kısım segmentasyon yapılacak alan için hedef bölge olarak seçildi. O bölgeden alınan seri kesitlerden 127 adet seçildi. Birinci kesit üzerinde seçilen nöronun 127 seri kesit boyunca segmentasyon yöntemiyle analizi yapılarak incelendi.



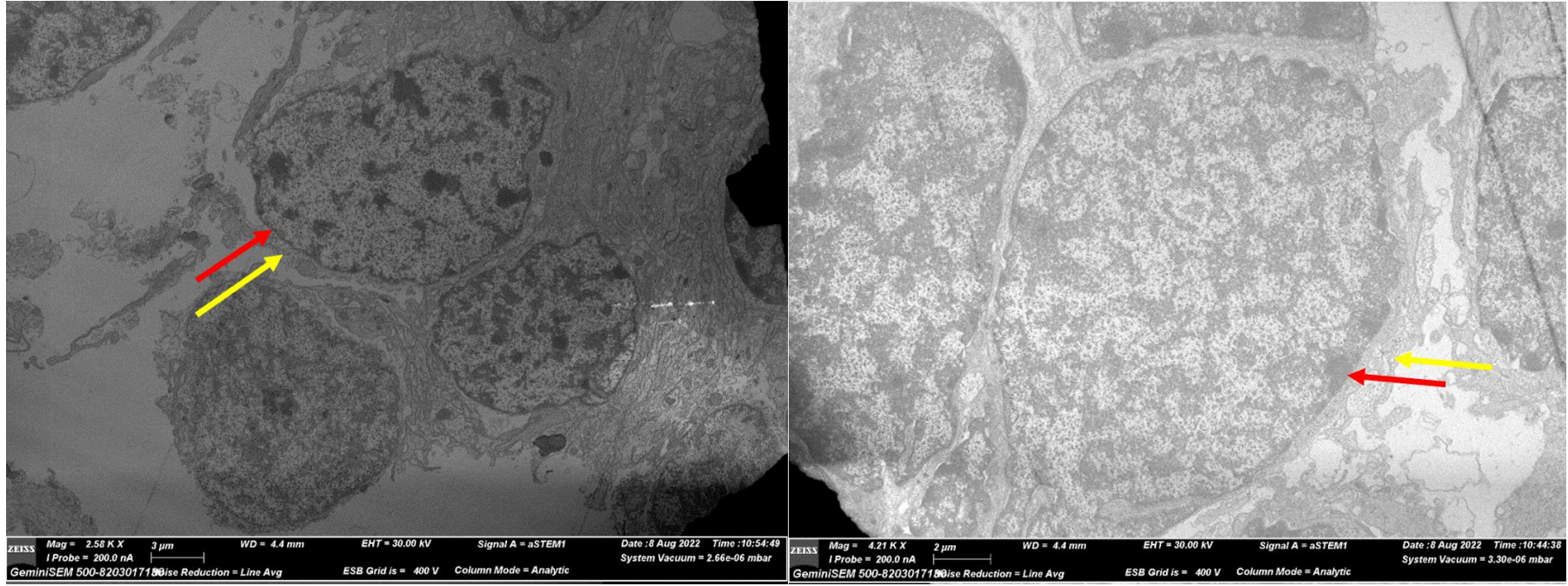
Şekil 6.5 Spinal kord kesiti 150X görünümü, kırmızı ok ependim hücresi, sarı ok santral gösterir.

Elektron mikroskobu görüntüleri toluidine blue görüntüleriyle uyumlu olup santral kanlı ependim hücreleri ve ependim hücrelerinden perifere uzanan nöronlar görülmektedir. Düzenli ön ve arka boynuz yapıları görülmedi.



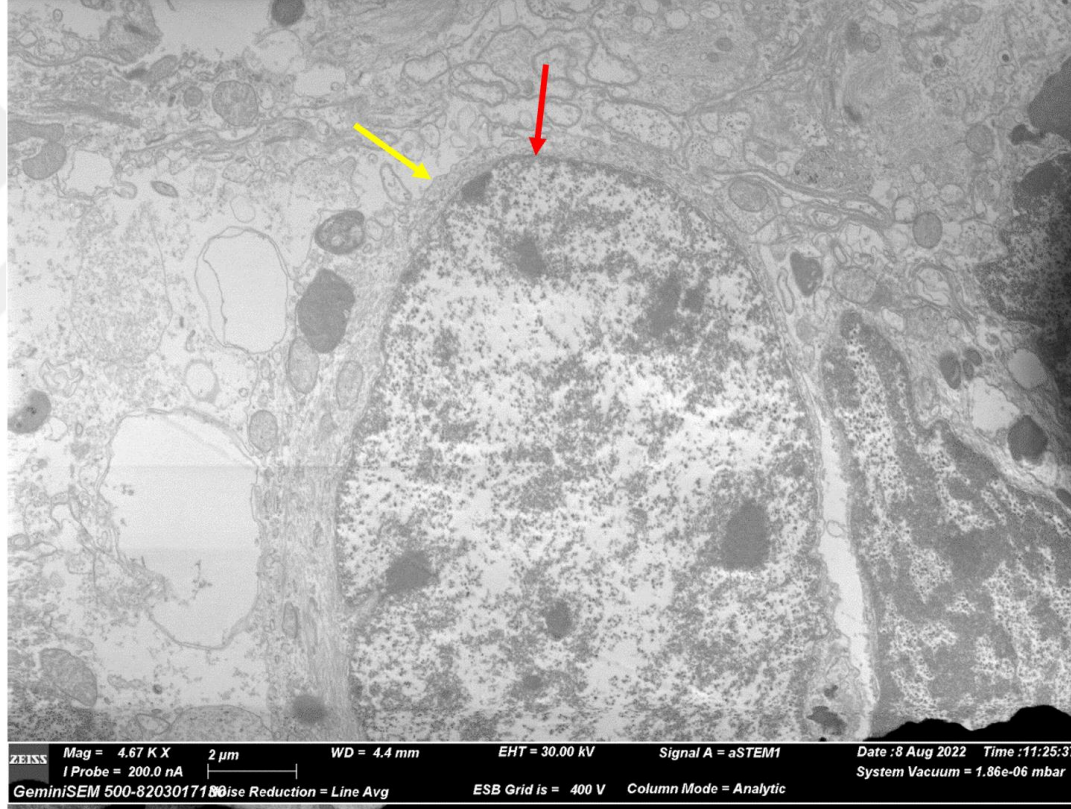
Şekil 6.6 Spinal kord dokusu elektron mikroskobu (Zeiss, GeminiSEM 500), 500X, 3.00 kV, sarı ok nöron, kırmızı ok nöron, yeşil ok akson

Elektron mikroskobu görüntü büyüklüğü 500X yapılarak santal kanalın ön kısmı görüntülendi. Segmentasyon analizi yapılacak nöronlar ve aksonlarla olan komşulukları gösterildi.



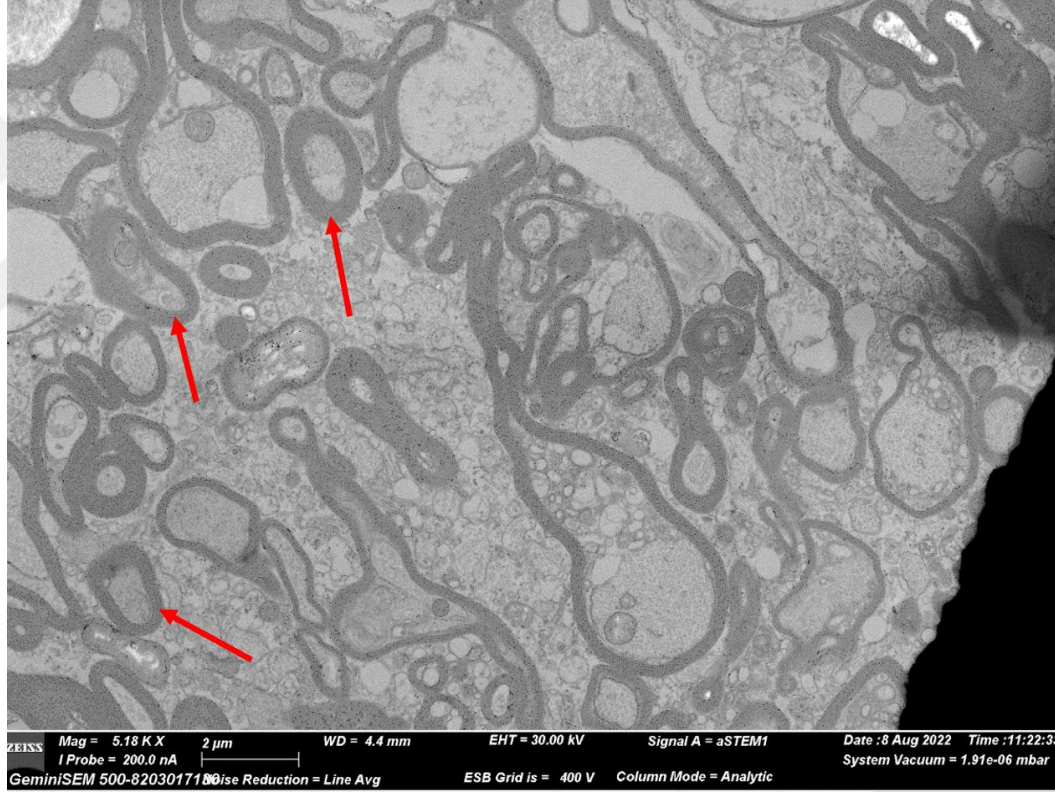
Şekil 6.7 Spinal kord dokusu (Zeiss, GeminiSEM 500), 2.58 K X, 30.00 kV, kırmızı ok çekirdek membranı, sarı ok hücre membranı

Elektron mikroskobu görüntü büyüklüğü artırılarak nöronların çekirdek sitoplazma kısımları gösterildi. Yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi çekirdek zarı ile sitoplazma zarının birbirine çok yakın seyrettiği gösterildi.



Şekil 6.8 Akslotl spinal kord dokusu (Zeiss, GeminiSEM 500), 4.21 K X, 30.00 kV, sarı ok hücre membranı, kırmızı ok çekirdek membranı

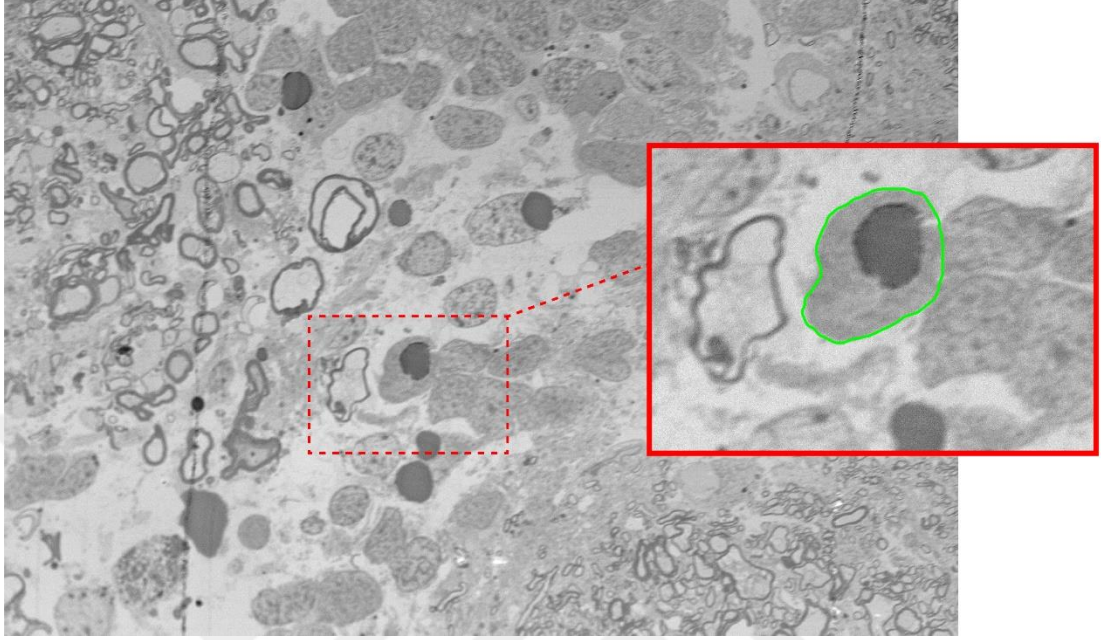
Yukarıdaki şekillerde görüldüğü gibi akslotl spinal kord dokusunun çekirdek membranı ile sitoplazma membranı görülmektedir. Arada kalan kısım sitoplazmayı oluşturmaktadır.



Şekil 6.9 Akslotl spinal kord dokusu (Zeiss, GeminiSEM 500), 5.18 K X, 30.00 kV, kırmızı ok akson

Yukarıdaki şekilde aksonlar kırmızı oklarla gösterilmiştir. Santral kanalın etrafındaki nöronların periferine doğru gidildikçe aksonlar görülmeye başlandı.

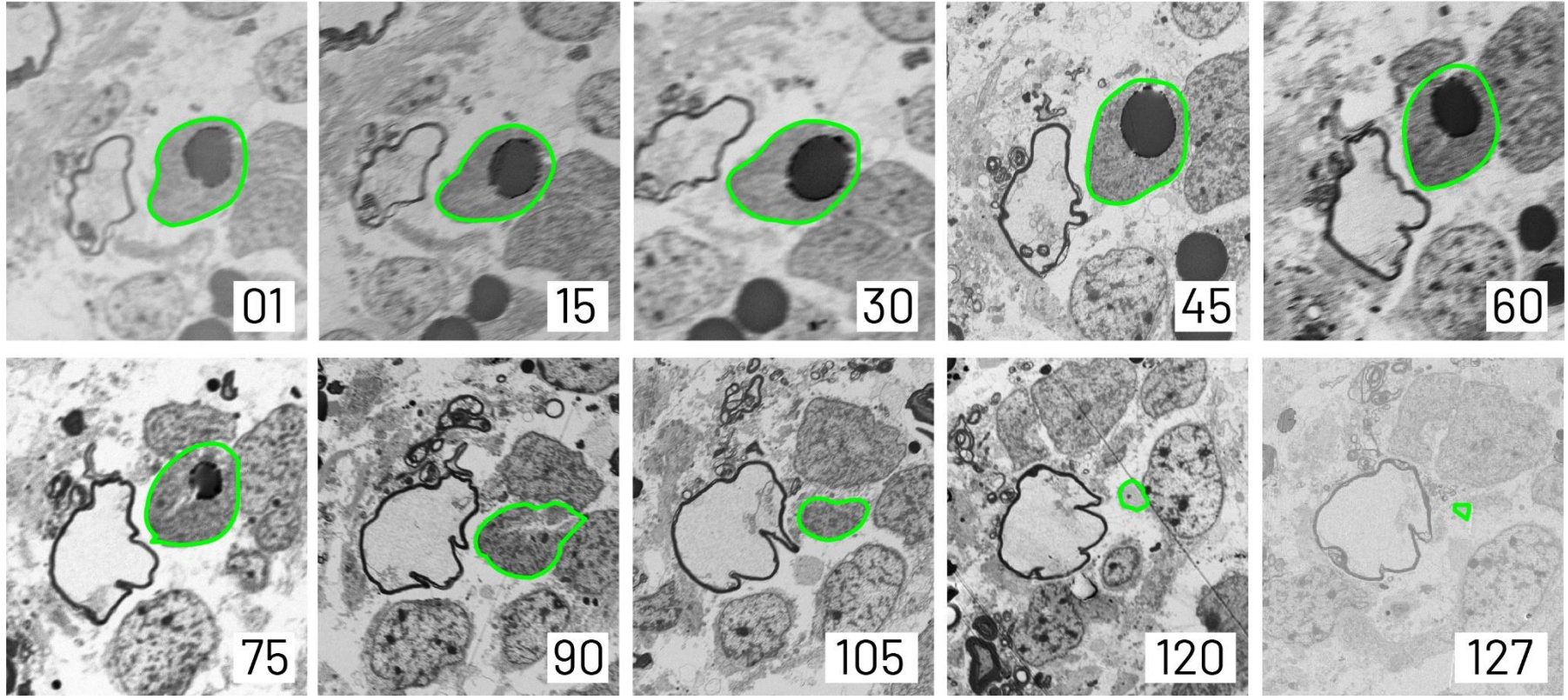
6.2.3. Seri kesitlerin üç boyutlu analizi



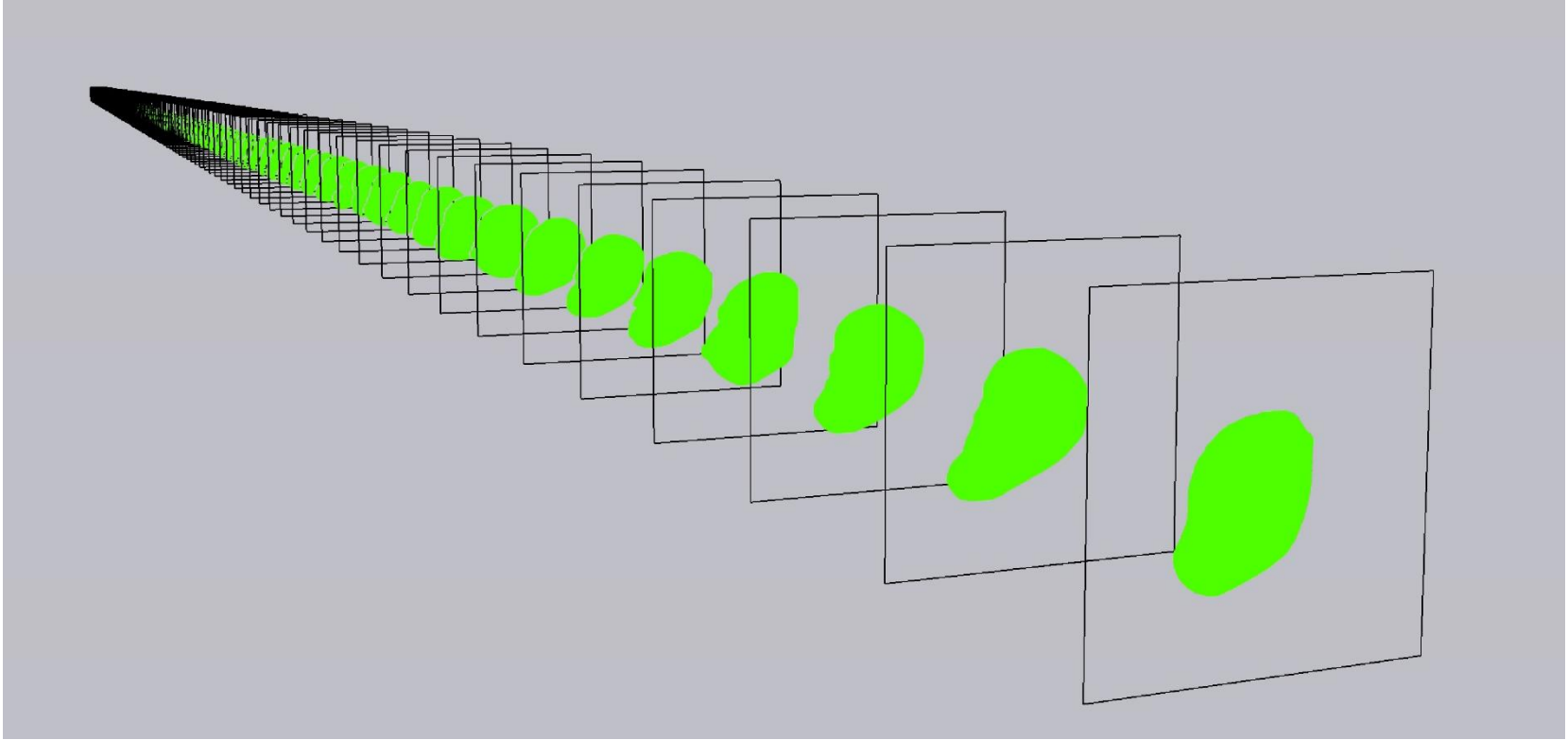
Şekil 6.10 Akslotl spinal kord segmentasyonu için hücre seçiminin yapıldığı ilk kesit

Santral kanalın ön kısmından nöron seçildi. 127 adet kesit ImageJ ile üst üste getirilerek “alignment” yapıldı. Data dosyasının boyutlarını küçültmek amacıyla seçilen nöronun çevresi “crop” fonksiyonu ile kesildi.

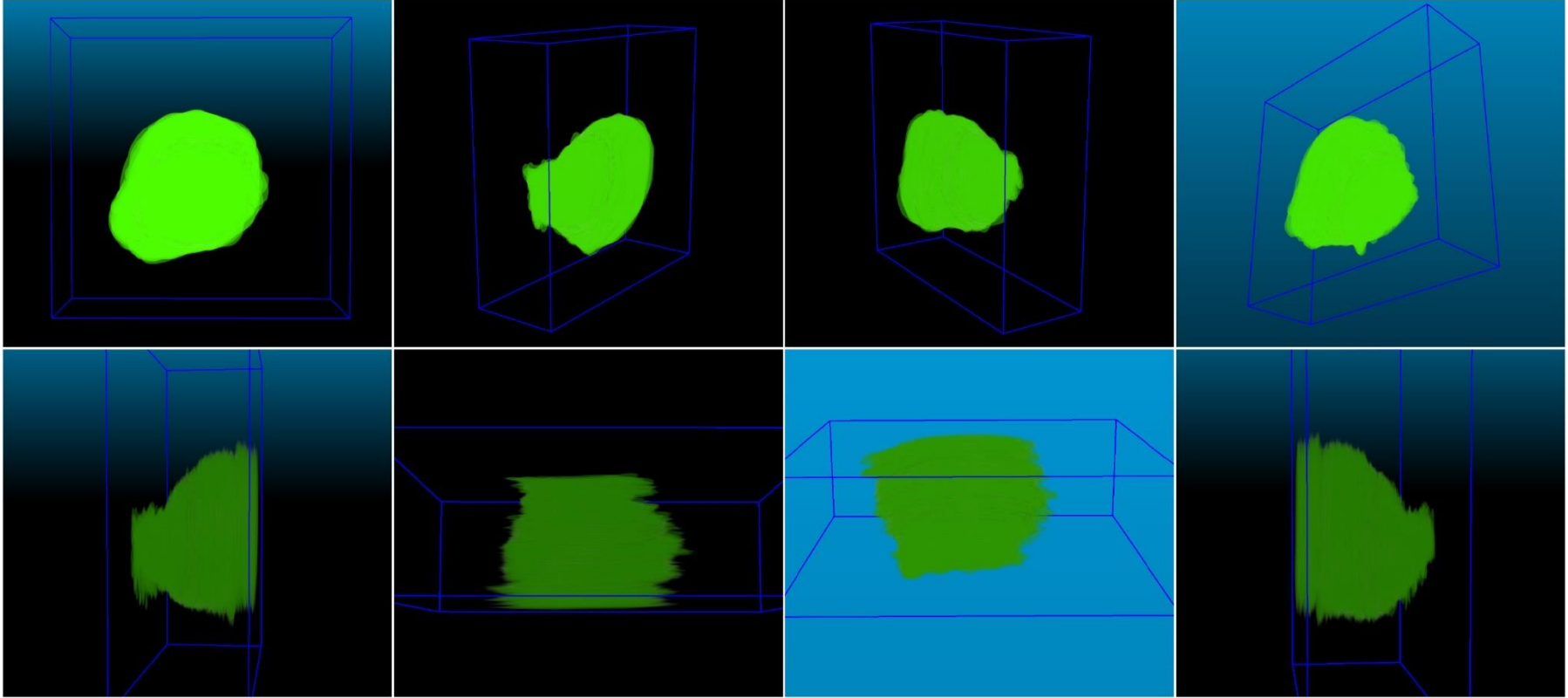
Yukarıdaki şekilde etrafı yeşil olarak sınırları belirlenen hücre segmentasyon için seçildi. Aşağıdaki şekillerde görüldüğü üzere, Adobe Photoshop program ile bu hücrenin içi boyandı ve bu işlem 127 kesit için tekrarlandı. Boyama işlemi “manuel” olarak her kesitte uygulandı. Aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi 127 tane kesit sırasıyla SketchUp program ile arka arkaya dizilip birleştirildi. Hücrenin üç boyutlu görüntüsü elde edildi.



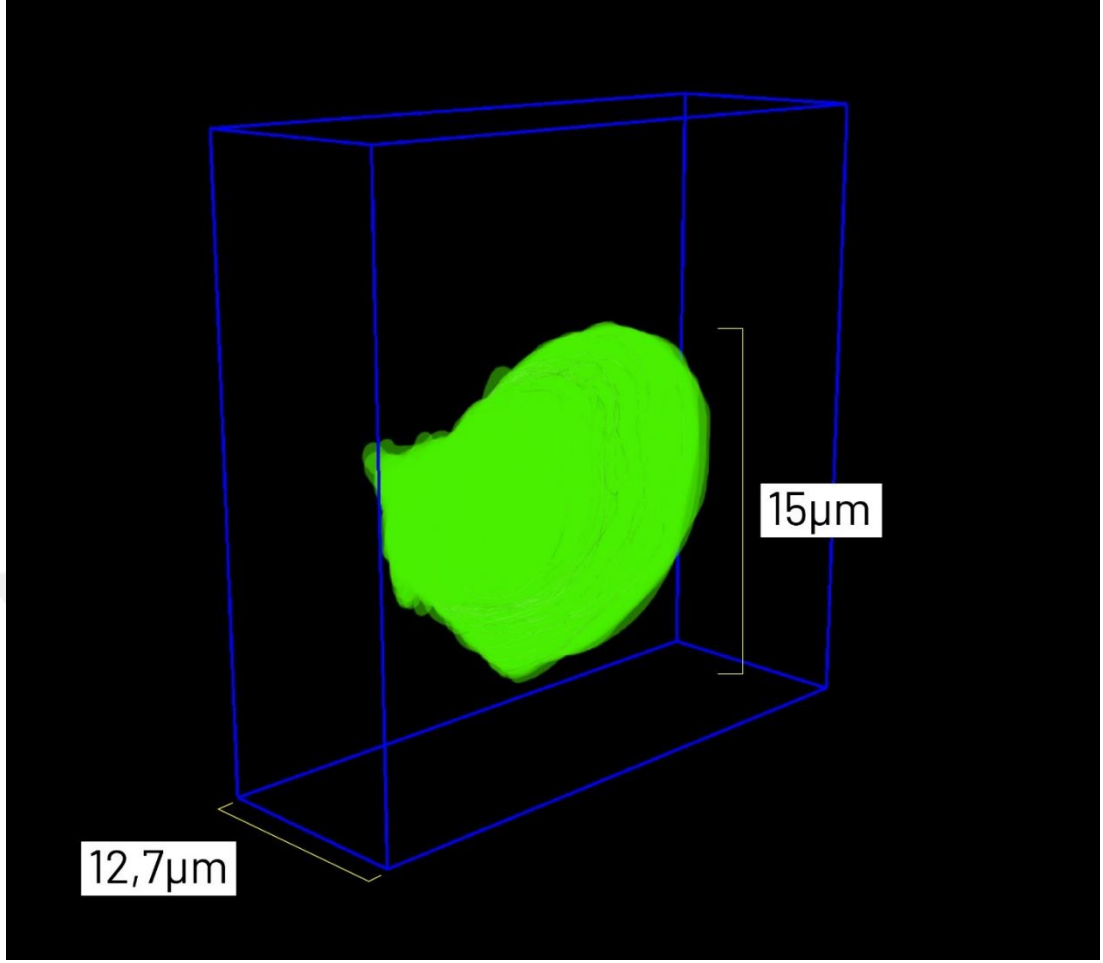
Şekil 6.11 Seri kesitlerden 15 kesit aralıklarla alınan kesitlerin üzerinde yeşil renkle işaretli nöron, 127. kesit 15'er ritmik sayma dizininde olmamasına rağmen son kesit olduğu için şekilde gösterilmiştir.



Şekil 6.12 Segmente edilen kesitlerin birleştirilmesi



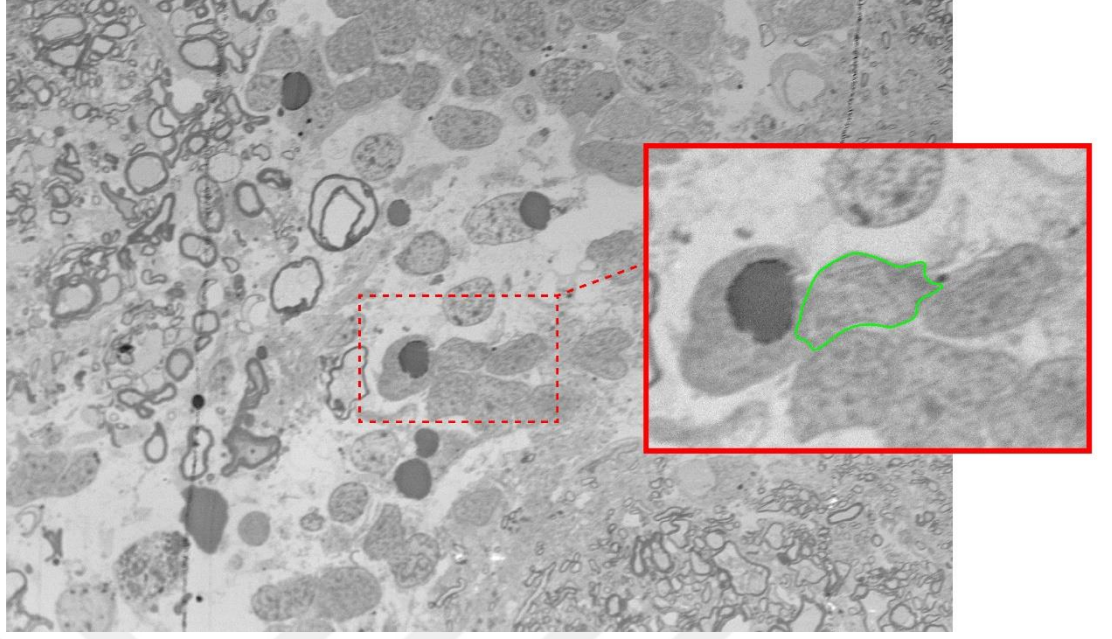
Şekil 6.13 Segmentasyon sonrası birleştirilen kesitlerin doku içinde farklı açılardan görünümü



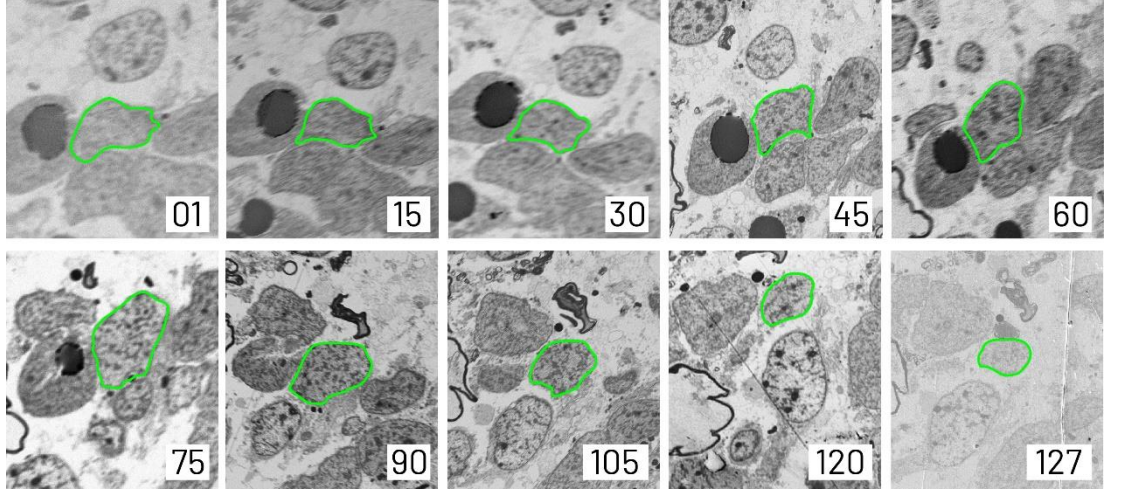
Şekil 6.14 Hücrenin segmente edilen kısmının çap / uzunluk oranı

Hücrenin çapı 3 farklı çap ölçümünün ortalaması alınarak ImageJ ile $15\ \mu\text{m}$ hesaplandı. Segmente edilen kesit sayısı 127 olup her kesit $100\ \text{nm}$ kalınlığında olduğundan segmentasyona dahil edilen hücre uzunluğu $12.7\ \mu\text{m}$ 'dir ($127 \times 100\text{nm} = 12700\text{nm} = 12.7\ \mu\text{m}$).

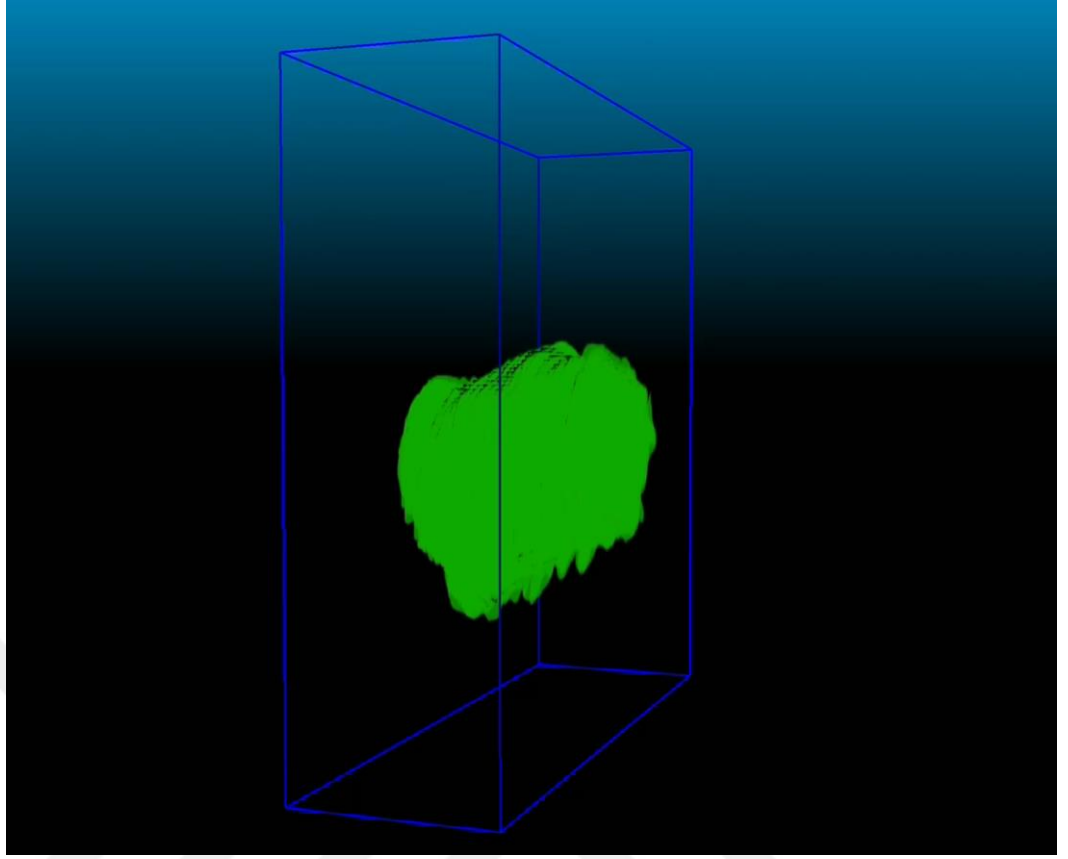
Çekirdeği ve sitoplazmasını ayrı renklerde göstererek segmentasyonu yapılan hücre aşağıdaki şekillerde gösterildiği gibi seçilip segmente edildi.



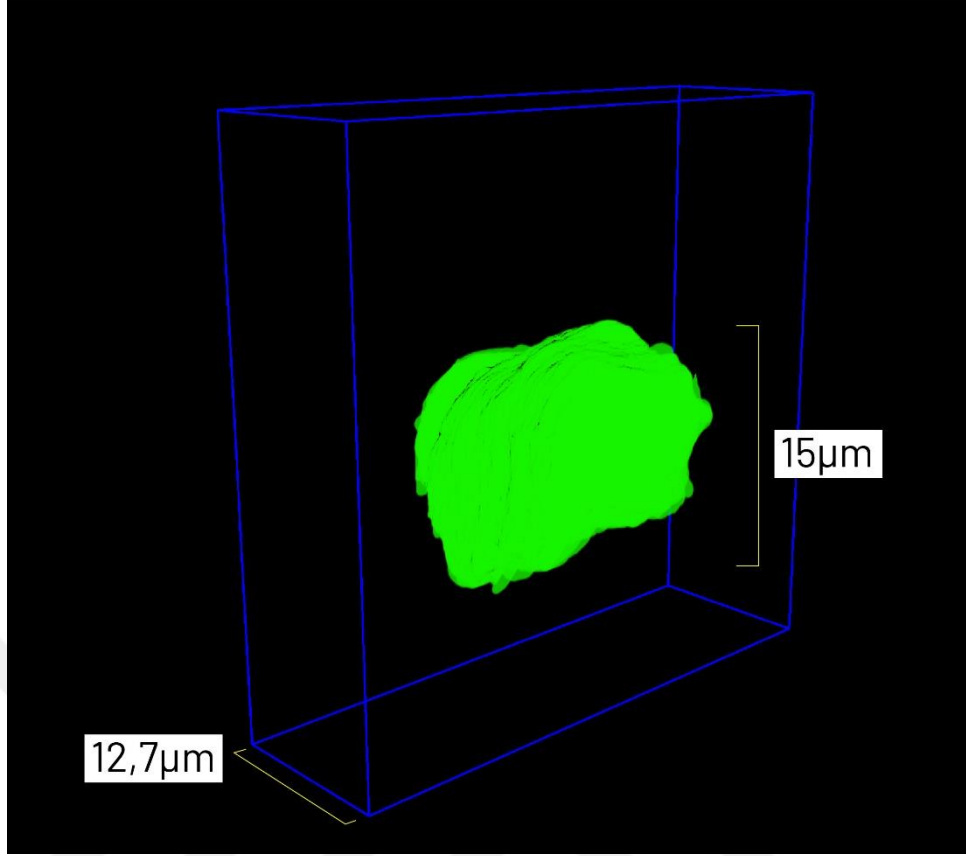
Şekil 6.15 Akslotl spinal kord dokusundan egmentasyon için seçilen hücrenin, serinin ilk kesitindeki görünümü ve işaretlenmesi



Şekil 6.16 Seri kesitlerden 15 kesit aralıklarla alınan kesitlerin üzerinde yeşil renkle işaretli nöron, 127. kesit 15'er ritmik sayma dizininde olmamasına rağmen son kesit olduğu için şekilde gösterilmiştir

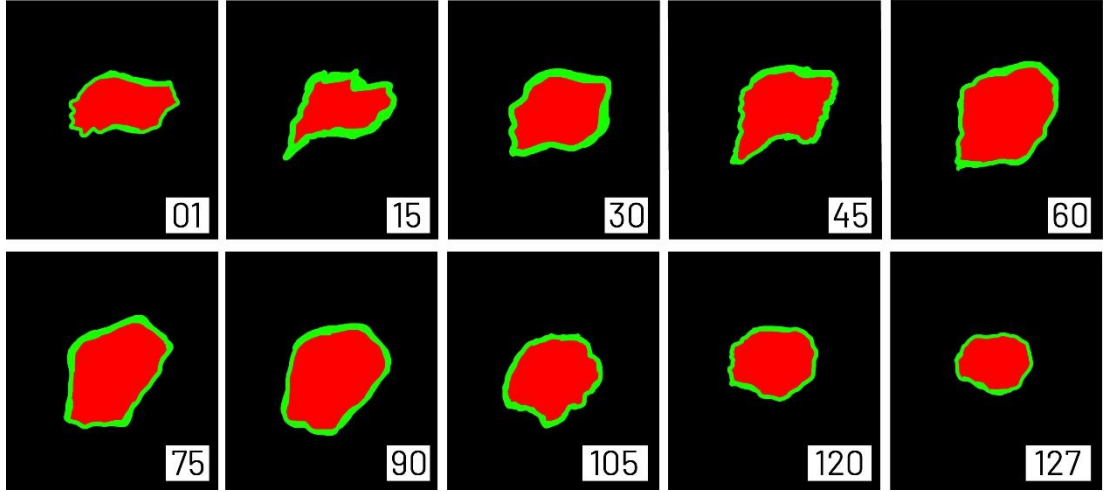


Şekil 6.17 Segmentasyon yapılan hücrenin sol yan taraftan görünümü



Şekil 6.18 Hücrenin segmente edilen kısmının çap / uzunluk oranı

Hücrenin çapı 3 farklı çap ölçümünün ortalaması alınarak ImageJ ile $15 \mu\text{m}$ hesaplandı. Segmente edilen kesit sayısı 127 olup her kesit 100 nm kalınlığında olduğundan segmentasyona dahil edilen hücre uzunluğu $12.7 \mu\text{m}$ 'dir ($127 \times 100 \text{ nm} = 12700 \text{ nm} = 12.7 \mu\text{m}$).



Şekil 6.19 Hücre çekirdeğinin segmentasyonu. Kırmızı ile çekirdek, yeşil ile sitoplazma gösterilmiştir.

Yukarıdaki elektron mikroskobu görüntülerinde de görüldüğü gibi, segmentasyon sonucunda da çekirdek boyutlarının sitoplazmanın büyük bir kısmını kapladığı gösterilmiştir.

Şekil 6.18’de segmente edilen nöronun 127 kesit boyunca çekirdek zarı işaretlenip boyanarak segmente edildi. Aynı nöron ikinci kez çekirdek ile segmente edilerek sitoplazma ve çekirdek oranları gösterildi.

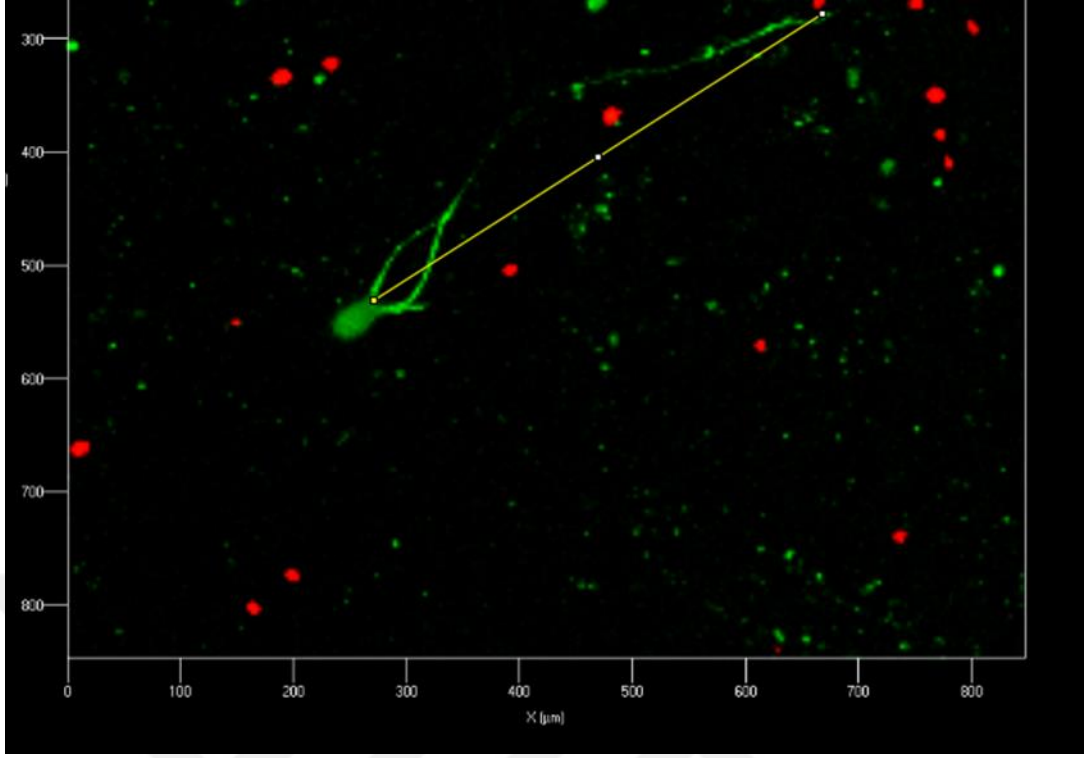
6.3. Eksplant Kùltürü Yöntem Geliştirme Deneyleri

6.3.1. Matrijel ve büyüme faktörleriyle eksplant kùltür yöntemi

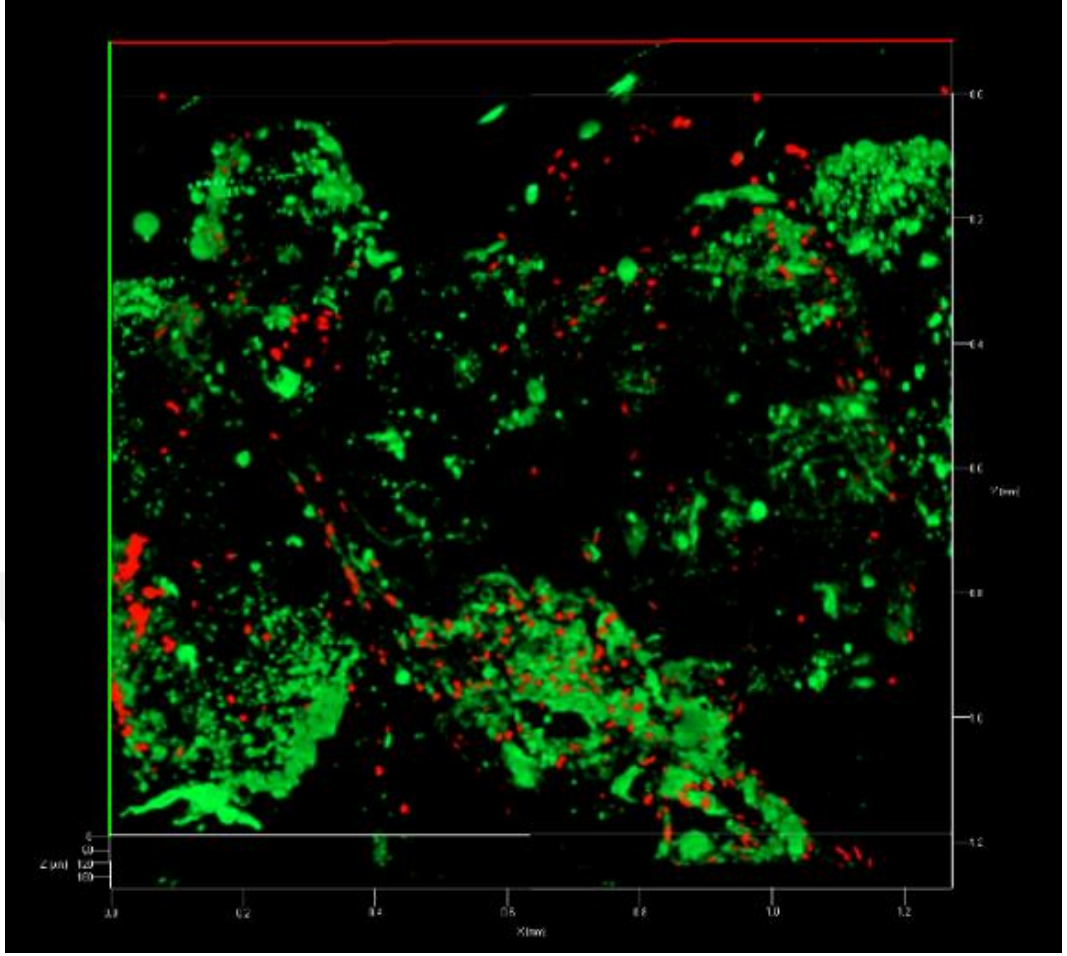


Resim 6.4 Diseksiyon besiyerinde spinal kord dokuları

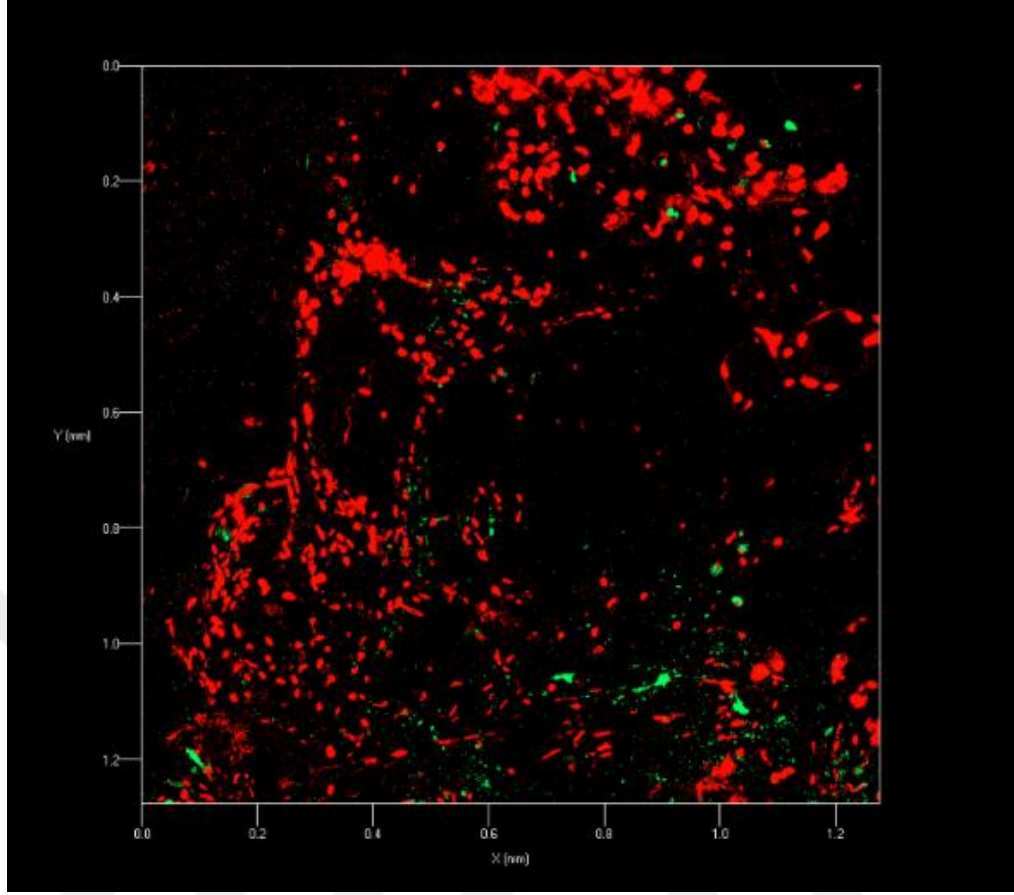
Spinal kord dokuları materyal ve metot bölümünde anlatıldığı gibi L-15 ile hazırlanan diseksiyon besiyerine alındı. Kùltür ekimi öncesi diseksiyon besiyerinde uygun boyutlara getirmek amacıyla kesildi.



Şekil 6.20 FGF eklenmiş kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokudan göçen spinal kord hücresi, akson boyu 474,407 µm olarak ölçüldü (ImageJ), inkübasyonun 3. gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)



Şekil 6.21 EGF eklenmiş kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 3.gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)



Şekil 6.22 Faktör eklenmeden hazırlanan kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 3.gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)

Materyal ve metot bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanan kültür kaplarında eksplant kültürü yapıldı. Yukarıdaki şekillerde görüldüğü gibi; FGF eklenilen kültür kaplarından alınan görüntüde akson uzatan nöron gösterildi. Ancak hedeflenen miktarda hücre göçü, akson uzatma gösterilemedi. EGF eklenmiş kültür kabından alınan görüntüde canlılık diğer kültür kaplarına göre daha yüksekti. Tekrarlanan deneylerde beklenen canlılık gösterilemedi.

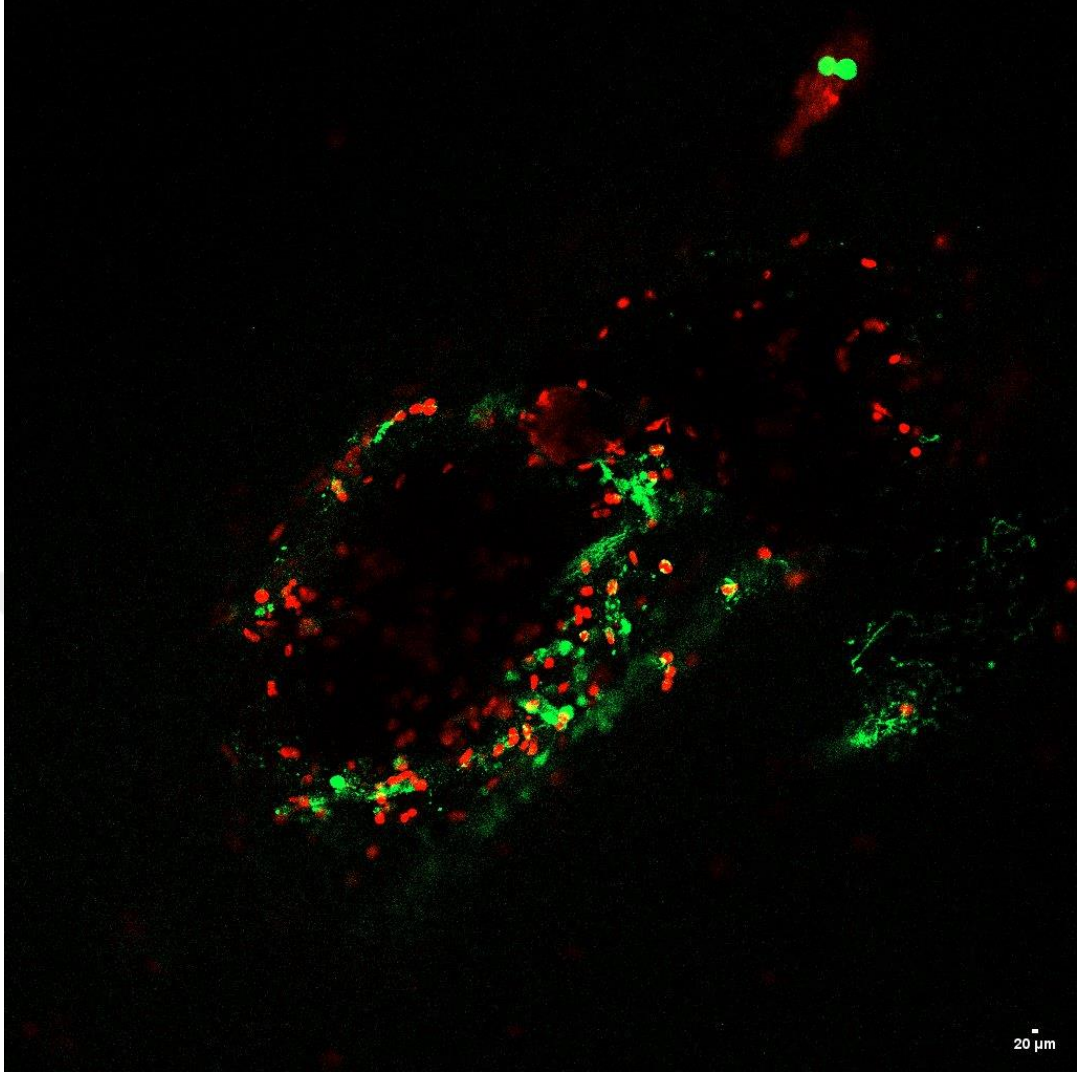
Yukarıdaki şekilde görüldüğü gibi kültür besiyerine faktör ilave edilmeden yapılan eksplant kültüründen alınan görüntüde ölüm oranının diğer kültür kaplarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Boyamaların protokolleri materyal ve metot bölümünde anlatıldığı şekilde yapıldı.

6.3.2. Doku sıvısının absorpsiyonu sonrası eksplant kültürü yöntemi



Resim 6.5 Filtre kağıdı

Yukarıdaki resimde görülen filtre kağıtları kullanıldı. FGF’li kültür kaplarının brightfield görüntüsünde hücre göçü diğer kültür kaplarına oranla daha yüksek olduğu için PI, Calcein boyaması yapıp konfokal mikroskopta görüntülendi. Aşağıdaki şekilde görüldüğü üzere hem hücre ölümü ve hem de kısmi canlılık görüldü.

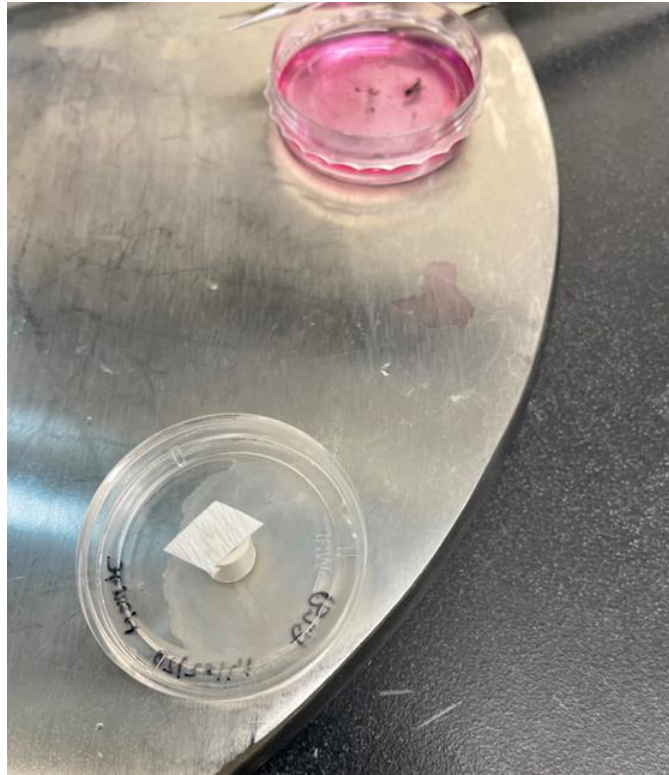


Şekil 6.23 FGF eklenmiş kültür besiyeri (NBA) içerisinde filtre kağıdına fazla sıvının absorbe edildiği eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 7.gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)

6.3.3. Kültür kabı kapağı modifikasyonu ile eksplant kültürü yapışmasını arttırma yöntemi



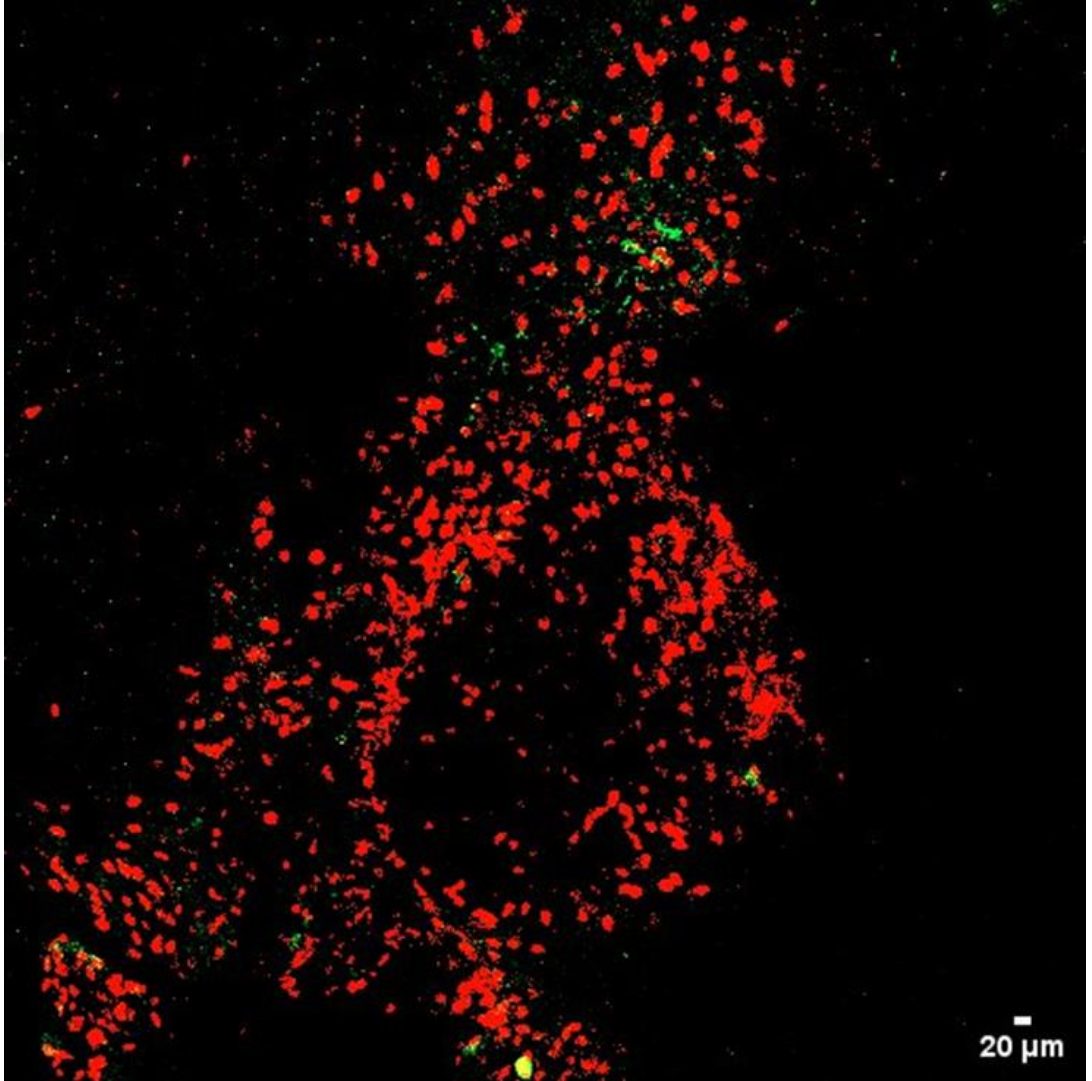
Resim 6.6 ubuk aksamalı kültür kabı kapağı



Resim 6.6 Filtre kağının yerleştirilmesi

Dokunun yapışması amacıyla kullanılan çubuk aksamı kültür kabı kapağı ve filtre kağıdı yukarıdaki resimdeki gibidir. Kültür kabı kapağının çubuk kısmına filtre kağıdı konuldu. Filtre kağıdı çubuğun ucundan düşmeyecek şekilde kapak çevrilip kültür kabı kapatıldı. Tekrarlayan denemelerde doku yapışması sağlanamadı ve bu nedenle mikroskop görüntüsü alınmadı.

6.3.4. Doku boyutunun küçültülmesi ile eksplant kültürü yöntemi



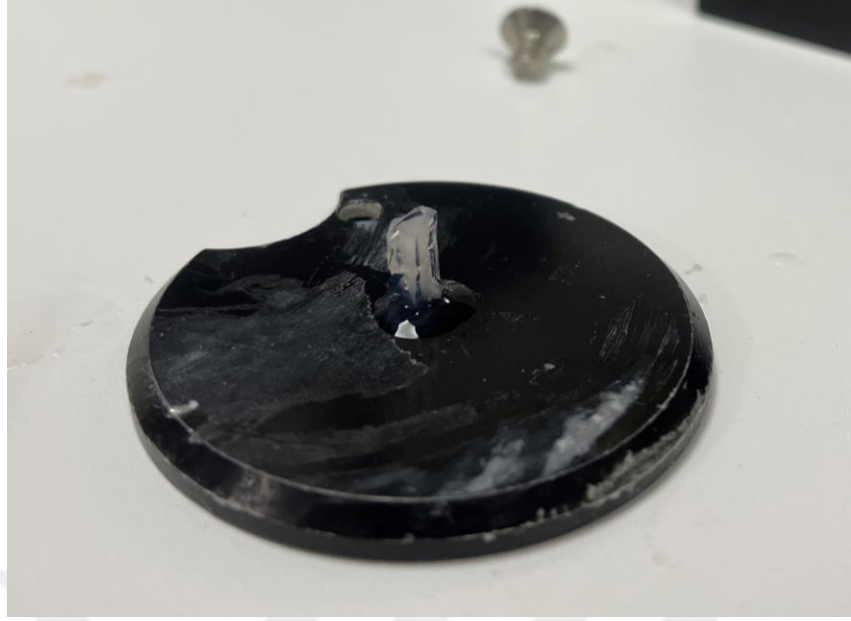
Şekil 6.24 FGF eklenmiş kültür besiyeri (NBA) içerisinde vibratom ile kesit alınan dokunun eksplant kültürü (ImageJ), inkübasyonun 3. gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskofta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)

Aşağıdaki resimde görüldüğü şekilde agar yatağına doku alınıp düşük erime noktalı agaroz materyal ve metot bölümünde anlatıldığı şekilde gömüldü.



Resim 6.7 Düşük erime noktalı agaroz içinde doku

Agarozdaki doku, vibratom stage kısmına yapıştırıcı ile yapıştırıldı. Vibratom (Leica, VT1000 s) ile 50 μm kalınlığında kesit alındı.



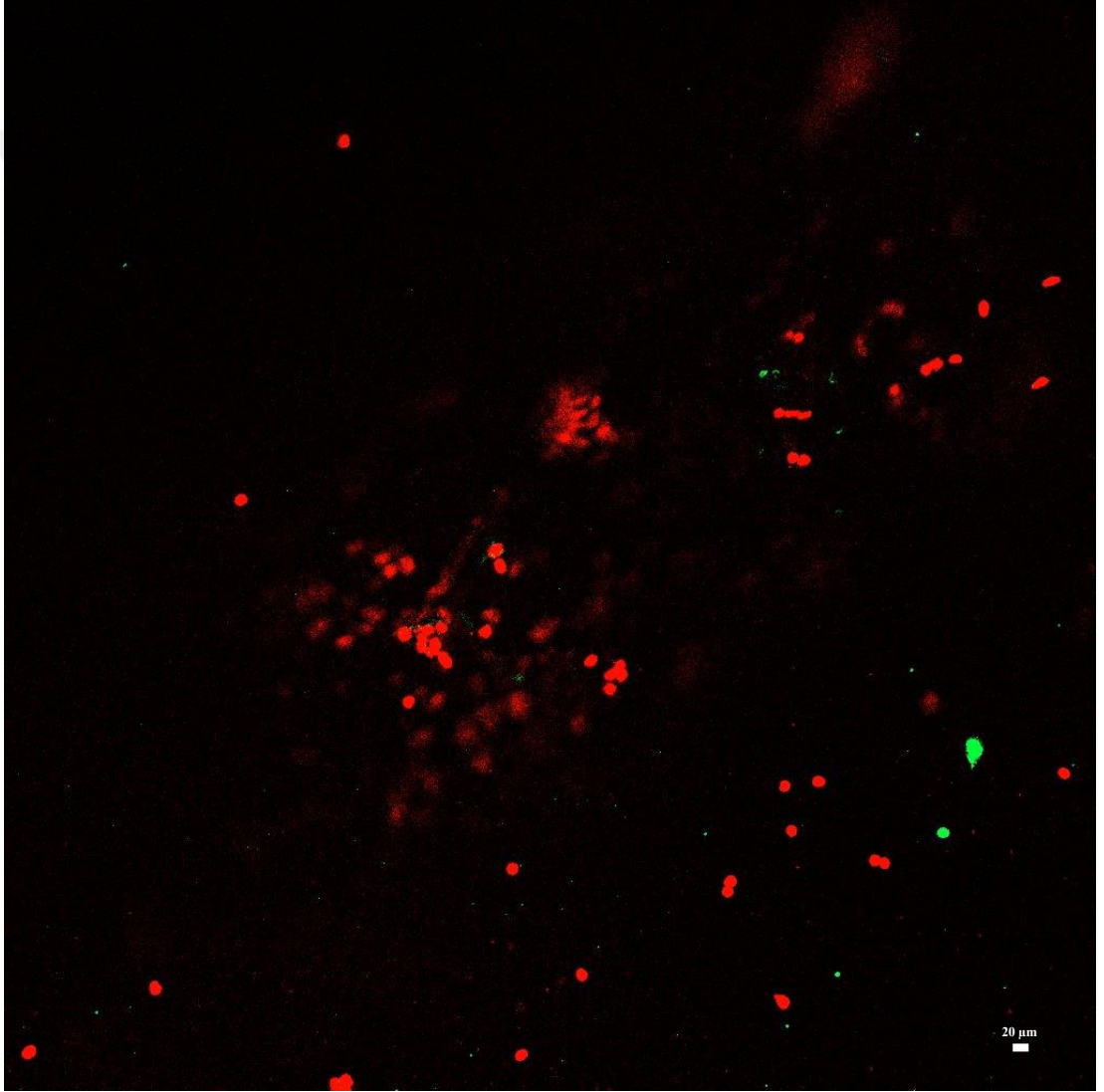
Resim 6.8 Vibratom stage kısmına yapıştırıcı ile yapıştırılan agaroz içinde doku



Resim 6.9 Vibratom (Leica, VT 1000S)

6.3.5. Kültür besiyeri ozmolaritesinin arttırılması ile eksplant kültürü yöntemi

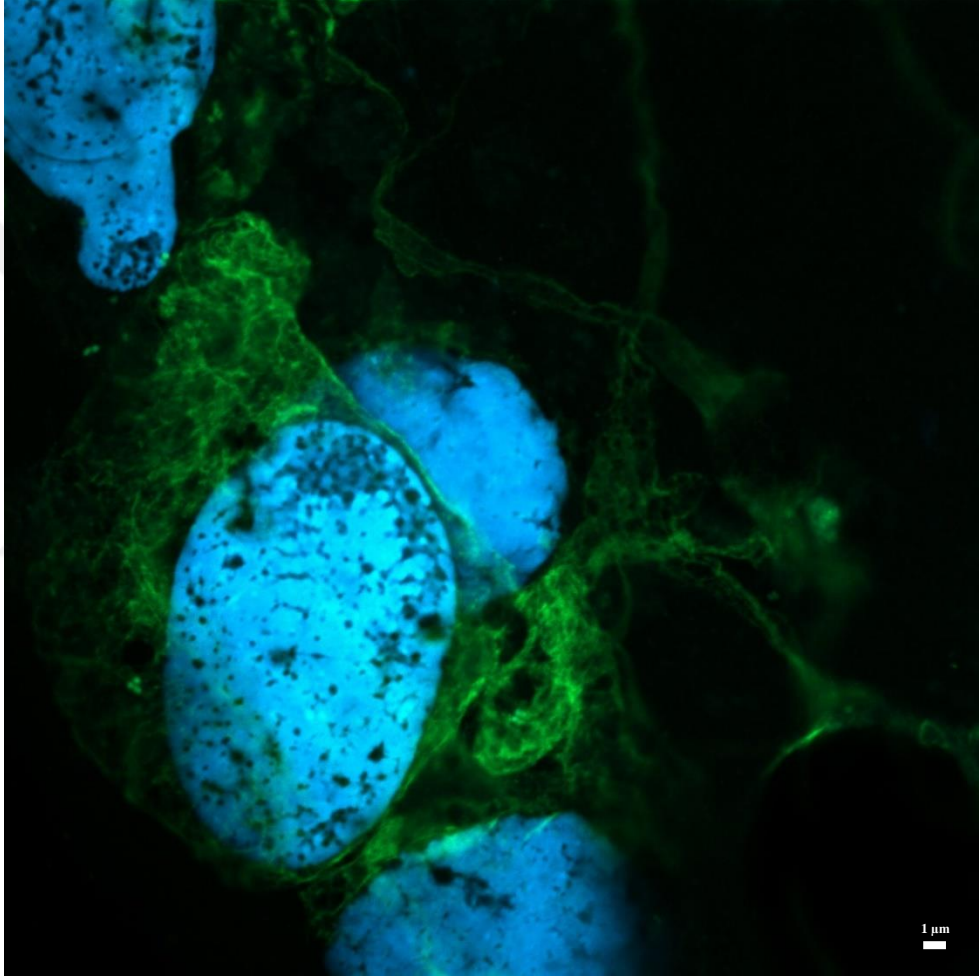
NBA'nın ozmolaritesi materyal ve metot bölümünde "Ozmolarite lm-Ozmometre Cihazı" kısmında anlatıldığı gibi hesaplanıp 306 mOzmol değerindeki besiyeri ile deneyler yapıldı. Hücrelerde lm gözlendi. Tekrarlanan deneylerde de benzer sonuçlar elde edildi.



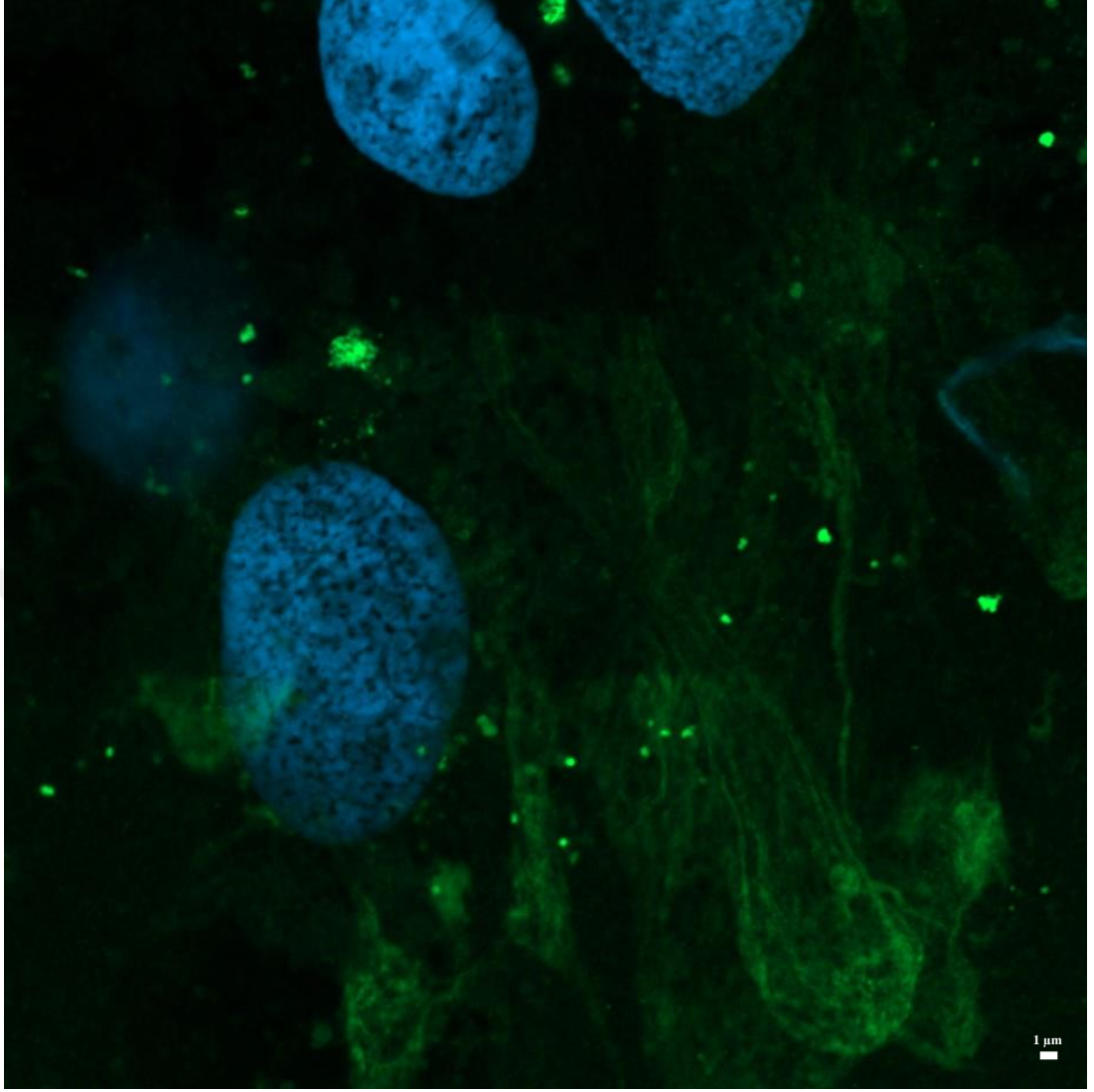
Şekil 6.25 FGF eklenmiş ve ozmolaritesi arttırılmış (306 mOzmol) kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 7.gününde eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik Şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)

6.3.6. Doku şartlandırma hasarı ile eksplant kültürü yöntemi

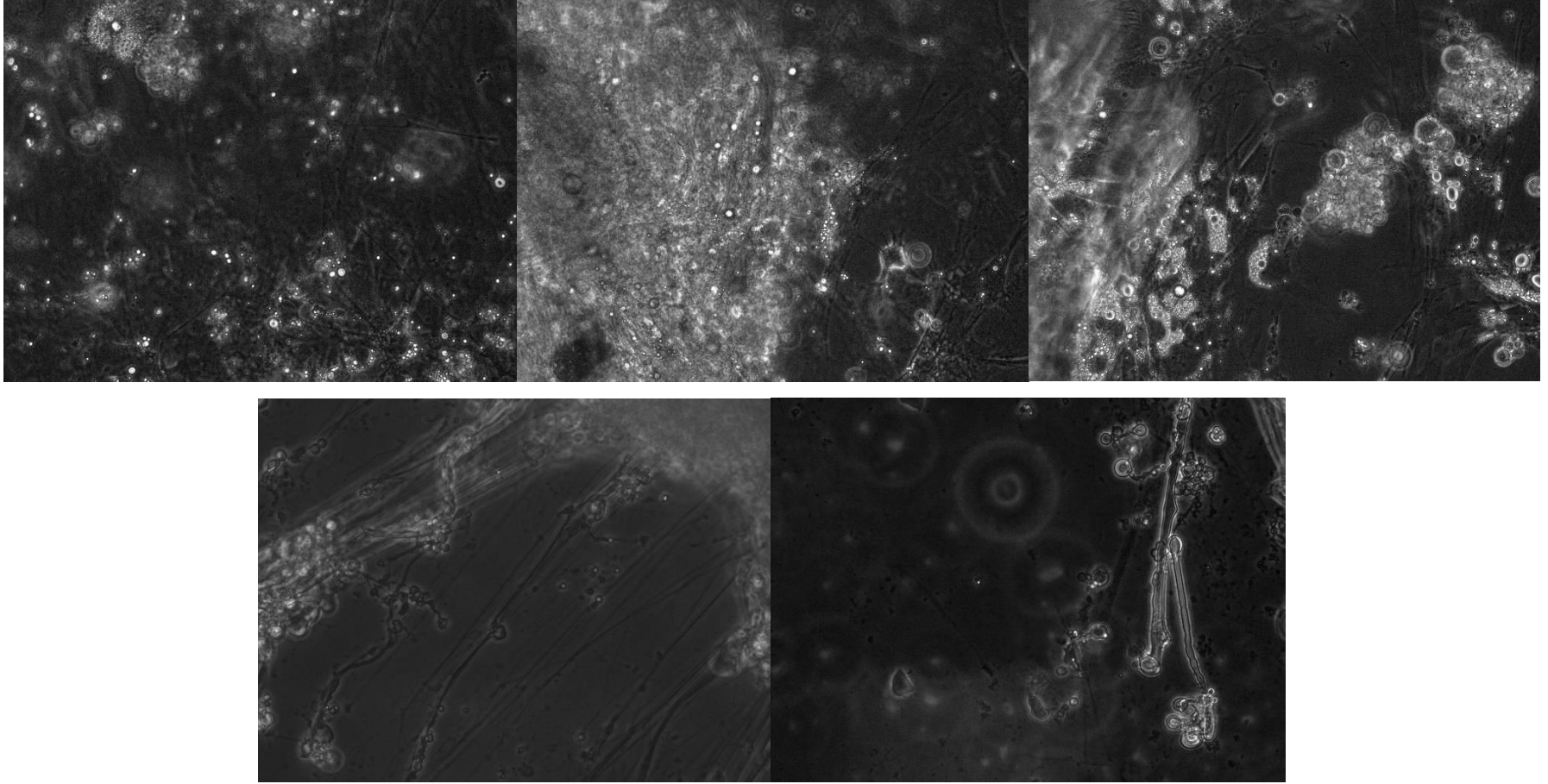
Spinal kord dokusu materyal ve metot bölümünde anlatıldığı gibi şartlandırma hasarı sonrası, matrijel ve NBA ile 2 ay süre ile kültür besiyeri değiştirilmeden izlendi. Resimde görüldüğü gibi akson uzatma gözlemlendi. Hücre çekirdek yapıları resimdeki gibi görüldü.



Şekil 6.26 Kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 2. ayında eksplant dokudan göç eden hücreler DAPI ve MAP-2 ile boyandı, konfokal mikroskopta görüntü alındı (LSM 800) (mavi DAPI, yeşil MAP-2)



Şekil 6.27 Kültür besiyeri (NBA) içerisinde eksplant dokusu (ImageJ), inkübasyonun 2. ayında eksplant dokudan göç eden hücreler DAPI ve MAP-2 ile boyandı, konfokal mikroskopta görüntü alındı (LSM 800) (mavi DAPI, yeşil MAP-2)



Şekil 6.28 NBA kültür besiyeri içinde şartlandırma hasarı ile yapılan spinal kord doku eksplantı, inkubasyonun 2. ayında hücre göçü ve akson uzaması, brightfield mikroskop görünümü

6.4. Ko-kültürler

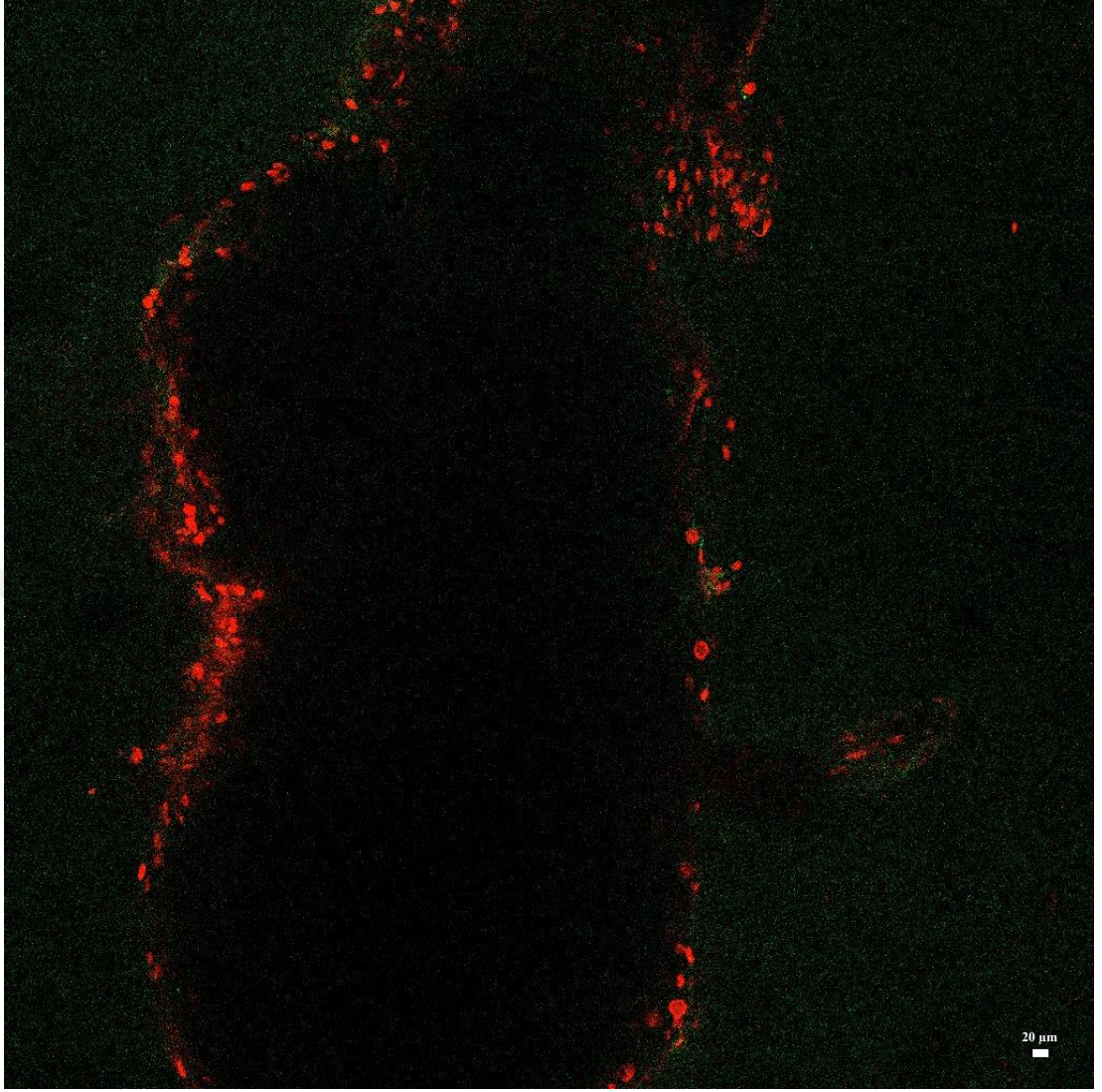
6.4.1. Kas-spinal kord eksplant ko- kültürü

Spinal kord ve kas ko-kültürleri materyal ve metot bölümünde anlatılan şekilde hazırlanan kültür kaplarına eksplant olarak ekildi. Aşağıdaki resimde ampüte arka ayak parmak segmenti görülmektedir. Arka ayak segmentinden kas dokusu elde edildi.

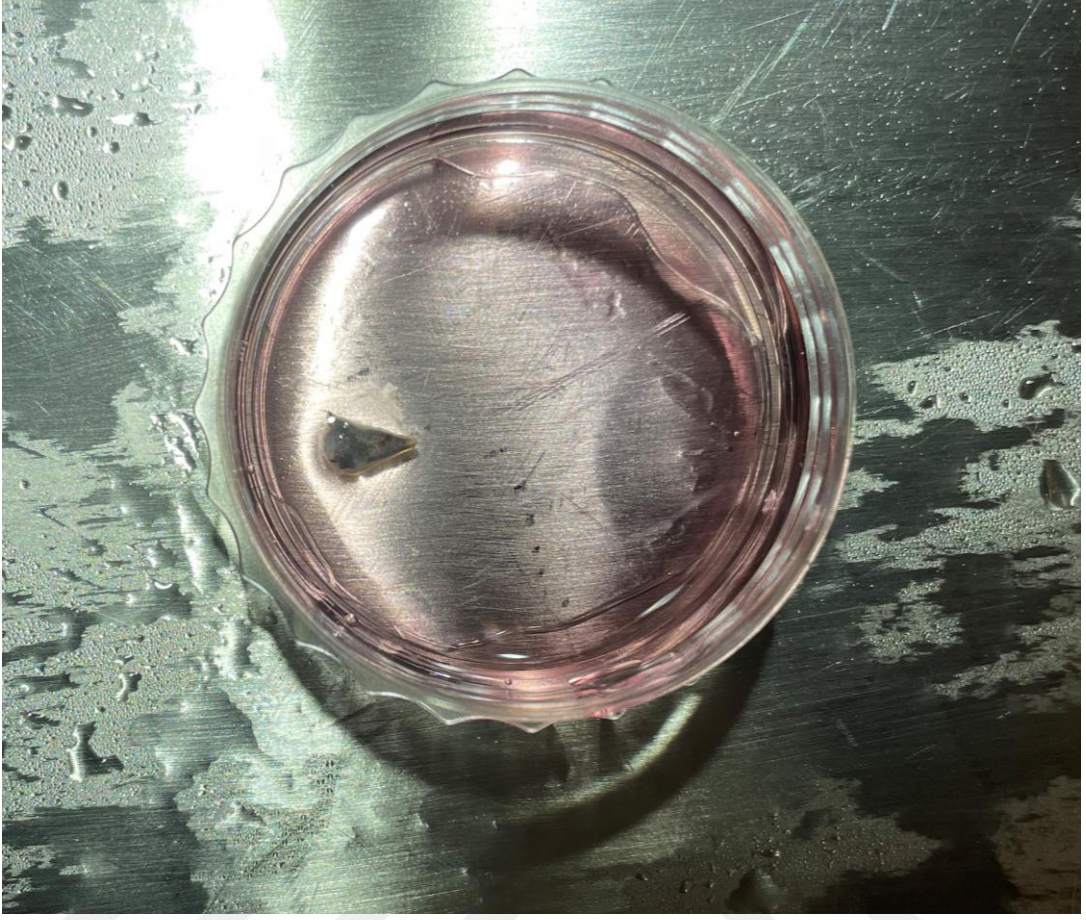
Sadece kas kültürü ile hazırlanan kültür kaplarında MEM kültür besiyeri olarak kullanıldı. Kas ve spinal kord ko-kültürü hazırlanan kültür kaplarında NBA kültür besiyeri kullanıldı. Böylece NBA besiyerinin MEM besiyerine göre kas dokusuna farklı etkisi olup olmayacağını görülmeye çalışıldı. Kas dokularında kültür kapları arasında fark görülmedi.

Sadece spinal kord eksplant kültürü ile hazırlanan kültür kaplarının, kas- spinal kord ko-kültürlerine kontrol grubu olması amaçlandı.

Aşağıdaki şekilde canlılık göstermeyen hücrelerin daha çok olduğu görülmektedir.



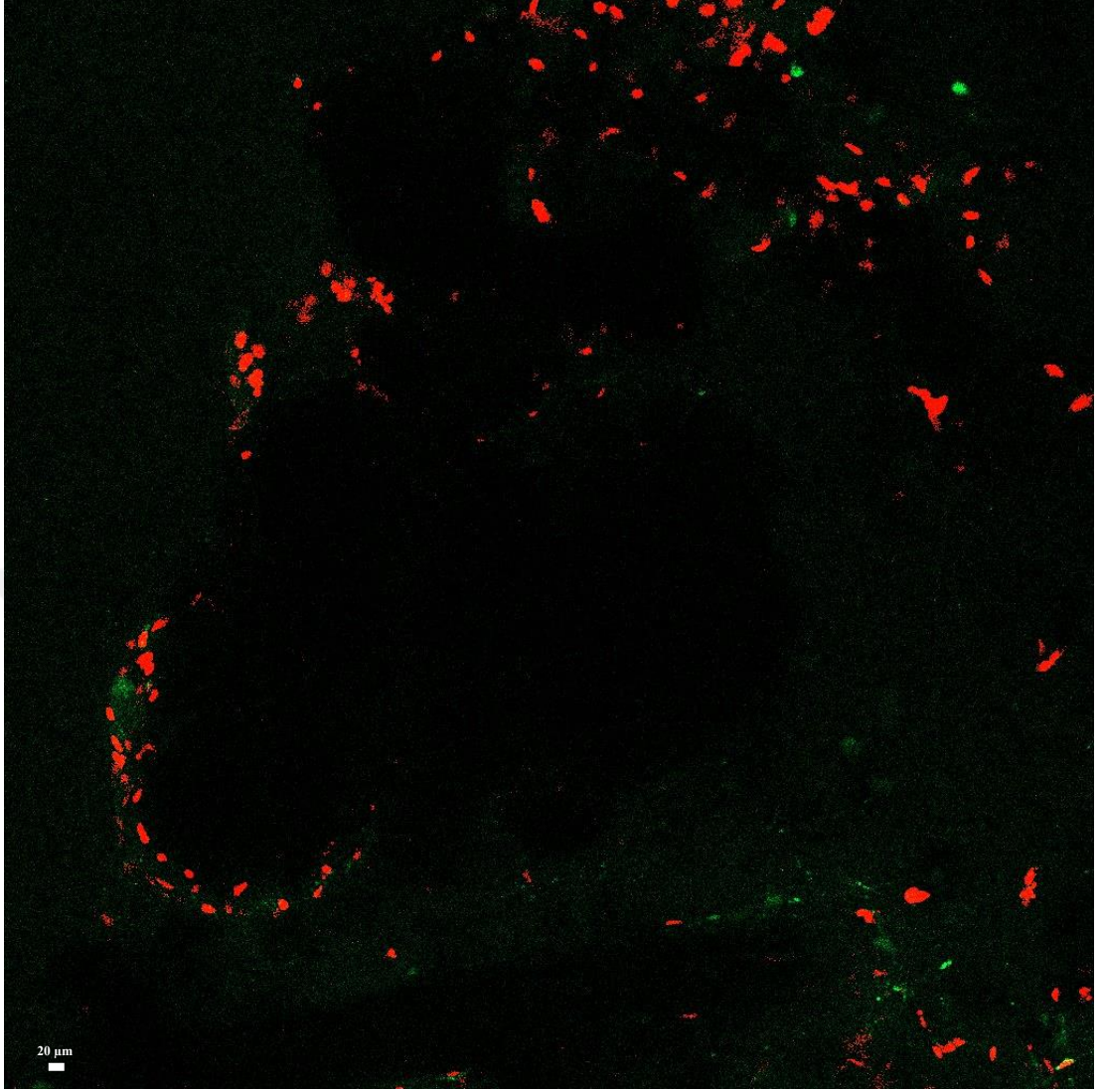
Şekil 6.29 FGF eklenmiş NBA besiyeri içerisinde kas- spinal kord eksplant ko-kültüründen spinal kord dokusu (ImageJ), inkübasyonun 3.gününde spinal kord eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)



Resim 6.10 Ampüte edilen parmak segmenti

6.4.2. Blastema -spinal kord eksplant ko-kültürü

Materyal ve metot bölümünde anlatıldığı şekilde blastema dokusu oluşturuldu. Sekiz gün boyunca ön bilek seviyesinde hasar yapılarak oluşturulan blastema dokusu takip edildi. Aşağıdaki blastema dokusunun alınması resminde görüldüğü şekilde blastema dokusu alındı.



Şekil 6.30 NBA besiyeri içerisinde blastema spinal kord eksplant ko-kültüründen spinal kord dokusu (ImageJ), inkübasyonun 7.gününde spinal kord eksplant dokudan göç eden hücreler calcein ve PI ile boyandı, konfokal mikroskopta fizyolojik şartlar sağlanarak görüntü alındı (LSM 880) (yeşil calcein, kırmızı PI)



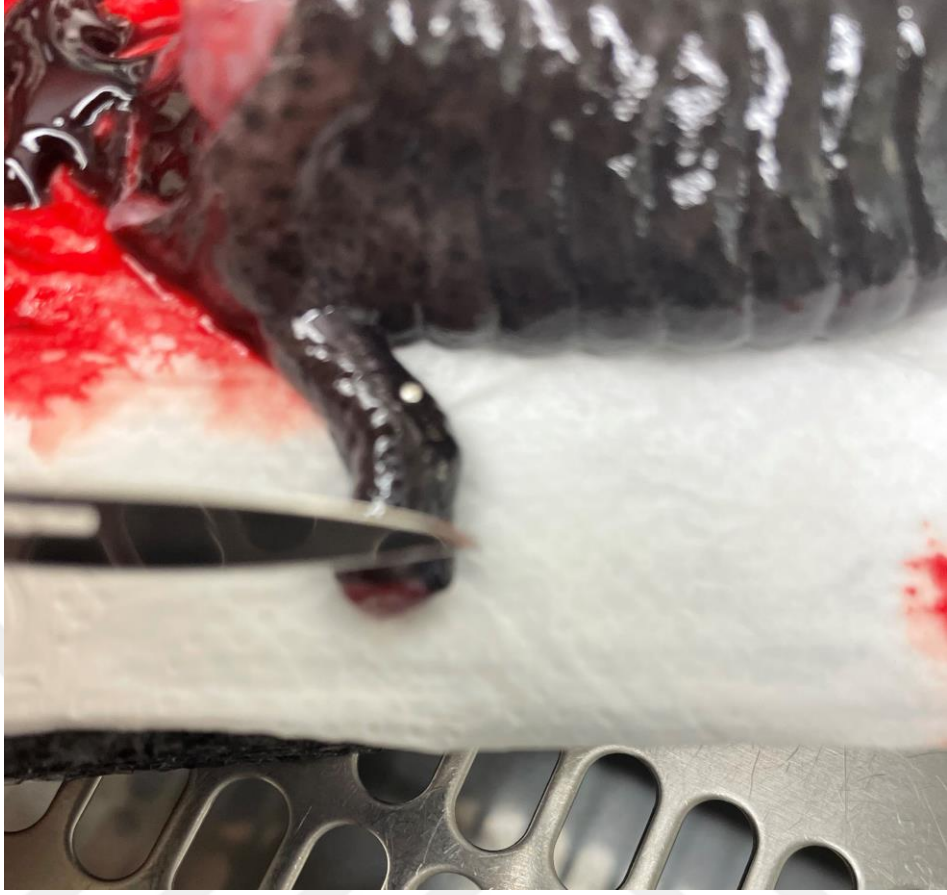
Resim 6.11 Aksolotl ön kolunda, dirsek-parmak arası mesafe ölçümü



Resim 6.12 Aksolotl ön kol bilek düzeyinde ampütasyon



Resim 6.13 Aksolotl blastema oluşumu 8 günlük takip süreci



Resim 6.14 Blastema dokusunun alınması

7. TARTIŞMA

Bu çalışmada aksolotl spinal kord dokusunun enine kesitinde memelilerdeki yapıdan farklı olarak ön boynuz ve arka boynuz yapısının olmadığı gösterildi. Spinal kord dokusunun enine kesitindeki anatomiyi Enos ve ark 2019'daki çalışmalarında göstermiştir (15). Bizim çalışmamızda da hematoksil-eozin takiplerinde spinal kord dokusunda benzer yapı şekli gösterildi. Düzenli bir ön boynuz ve arka boynuz yapısının olmaması aksolotlun rejenerasyon yeteneğinde önemli olabilir. Amfibi grubundan olan ürodel türünün spinal kord rejenerasyonunun incelendiği bir çalışmada ependim hücrelerinin nörona dönüşüp rejenerasyon sağladığı gösterilmiştir. Çalışmamızdaki toluidin blue boyası ile alınan histolojik kesitler, bu çalışmadaki kesitlerin histolojik yapısı ile benzerlik göstermektedir (16).

Neoteknik aksolotl spinal kord dokusunda ön boynuz ve arka boynuz yapısının olmamasının rejenerasyondaki önemini anlamak amacıyla metamorfoza uğramış aksolotl ile neoteknik aksolotl spinal kord transvers kesitleri karşılaştırılabilir.

Santral kanalın etrafında ependimal hücrelerden sonra dağılmış şekilde nöronlar gözlemlendi. Bu nöronların birbirleriyle ilişkisi rejenerasyon için önemli olabilir. Bu nöronların kök hücre özelliğinde olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (16).

Segmentasyon çalışmaları doku ve hücreler hakkında daha detaylı bilgi vermesi ve ortak terminolojinin oluşturulması için önemlidir. Hücre veya organel işaretlemesinin "manuel" olarak yapılmasının zaman alıcı ve iş yükü fazla olması nedeniyle son zamanlarda "machine learning tool" yapay zeka teknikleri ile segmentasyonu ve işaretlemeyi kolaylaştıracak analiz programları geliştirilmiştir. Ancak bu programlar için görüntü kalitesi ve tıpkılık çok önemli olduğu için her zaman istenilen sonuç alınmayabilir. Bu durumlarda "manuel" işaretleme metodları hala önemini korumaktadır.

Bu çalışmada seri kesit görüntülerindeki bazı farklılık oranları nedeniyle "manuel" segmentasyon yöntemleri tercih edilmiştir. Manuel segmentasyonun avantajları hücredeki değişimi her kesitte gözle kontrol ederek ilerleme fırsatı vermesidir.

Dezavantajları ise hücrenin hacmi, boyutları hakkında ileri düzeyde istatistik bilgi verememesidir. Bu ölçümler önceden bilinen değerlerin analiz programlarına tanıtılıp en-boy oranlarının oluşturulması ile elde edildi.

Segmentasyon klinik olarak önemli bir yere sahiptir. Dokular ve organların fizyolojik sınırlarda olup olmadığına segmentasyon analizleri sonucu normal dokular ve hücrelerden elde edilen verilere göre karar verilir. Hakkında yeterince bilgi olmayan canlılar ve dokular için standart verilerin elde edilmesi için de önemlidir. Sağlıklı insanların radyolojik görüntülemeleri sonrasında yapılan segmentasyon analizi ile spinal kordun seviyeleri ve seviyeler arasındaki boyut değişikliği ortaya konmuştur (33).

Eksplant kültürleri hücredeki canlılık faaliyetlerinin in vivo ortamlara göre daha detaylı ve gerçeğe yakın bir şekilde gösterilmesine olanak tanır (34).

Dmetrichuk ve ark. 2005'te yaptıkları çalışmada amfibi grubundan newt (su keleri) spinal kord dokusu eksplantında aksonal uzama gösterilmiştir. Ancak benzer şekilde amfibilerde spinal kord dokusu eksplant kültürünün hücre göçü ve aksonal uzama oluşturduğu güncel çalışma sayısının çok sınırlı olması, aksolotlda spinal kord doku eksplant kültürünün beklenen şekilde olması için optimizasyon çalışmalarına gerek olduğunu göstermektedir.

Retinoik asidin spinal kord dokusu hücre kültüründe rejenerasyon için gerekli olduğunu ve retinoik asit inhibisyonunun rejenerasyon sürecini durdurduğunu gösteren çalışma olmasına rağmen çalışmamızda yapılan deneylerde retinoik asidin eksplant kültürüne eklenmesinin beklenen etkiyi oluşturmadığı görüldü (3,35). Farklı miktarlarda retinoik asit kullanılarak deneylerin tekrarlanması sonuç verici olabilir.

Giampaoli ve ark. blastema oluşumunda FGF'in DNA replikasyonunu indüklediğini göstermişler (26). Çalışmamızda, spinal kord dokusunda da benzer etkinin oluşmasını amaçlayarak FGF kullandık. Rejenerasyona ek katkı gözlenmedi. Heparinin intrinsik salgılanan FGF'i stabilize ederek FGF'in etkisini arttırdığını gösteren çalışmalar nedeniyle çalışmamızda heparin kullanıldı (28). Anlamlı sonuç elde edilemedi.

NGF salınımı yapan hidrojelin sıçan spinal kord rejenerasyonuna katkı sağladığını gösteren çalışma nedeniyle, çalışmamızda eksplant kültürüne NGF ilave edildi (29). Rejenerasyona yönelik ek katkı gözlenmedi.

Ko-kültür çalışmalarında blastemanın intrinsik retinoik asit etkisinin rejenerasyona katkı sağladığı gösterilmiştir (35). Bu çalışmada blastema ko-kültür ile böyle bir etki gözlenemedi. Salınan retinoik asit miktarının yetersiz olması, kullanılan spinal kord dokusunun büyüklüğü ile ilişkili olabilir. Büyük dokuya retinoik asidin diffüze olması daha zorlaşır. Blastema ve spinal kord dokusunun birbirine olan mesafesi optimize edilerek deney tekrarlanması hedeflenen sonucu gösterebilir.

Kas- spinal kord ko-kültürü ile kas dokusunun spinal kordtan hücre göçü için yön belirleyici olması planlandı. Ancak beklenen etki görülmedi. Sıçan spinal kord dokusunun insan kas dokusu ile ko-kültür yapıldığı bir çalışmada innervasyonun tamamlanması için spinal kord dokusu dorsal kök gangliyon ile eksplante edilmiş (36). Spinal kord dokusunun kültür kabına yapışması optimize edilerek ve dorsal kök gangliyon ile eksplante edilerek deneyin tekrar edilmesi sonuç verebilir.

Aksotl ile ilgili güncel bir derlemede aksotlların matriks metalloproteinaz enzimlerinin rejenerasyon sırasında arttığı ifade edilmiştir. Doku eksplant kültürlerinin kültür kabı tabanına yapışma sorunun nedenlerinden biri litik özellikte olan bu enzimin doku yapışmasını engellemesi olabilir (37).

Şartlandırma hasarının yapıldığı aksotl spinal kord eksplant kültüründe hücre göçü ve akson uzatma görüldü. Şartlandırılmış spinal kord dokusunun stres altındayken rejenerasyon için gereken faktörleri intrinsik olarak sağladığı ve böylece dışardan desteğe ihtiyaç kalmadan rejenerasyon sürecini başlatabildiği görüldü (4). Besiyerinin sürekli değiştirilmemesi dokunun salgıladığı faktörlerin kültür kabında kalmasını sağlar. Böylece spinal kord dokusunun salgıladığı intrinsik faktörler sayesinde eksplant kültüründe hücre göçü, akson uzatma eylemlerini yapabildiği düşünülmektedir. Bu çalışma ile uzun süreli besiyeri ve doku boyutu optimizasyonlarından sonra basit koşullarda, yani büyüme faktörlerine ihtiyaç duyulmadan spinal kord dokusunun eksplant kültürü anlamlı sonuç verdiği görüldü.

Başka amfibi türlerinde spinal kord eksplantı yapılmış olsa da aksolotl spinal kord dokusu eksplantı ilk kez bu çalışmada denendi.



8. SONUÇ

İlk kez bu çalışma ile neotenik aksolotl spinal kord dokusu elektron mikroskobu görüntülemesi yapıldı. Nöron hücresi segmente edildi. Metamorfoz geçirmiş aksolotl spinal kord dokusu ile neotenik aksolotl spinal kord dokusunun histolojik yapısını kıyaslayan çalışmalar nöronların yapısı hakkında bilgi verebilir.

Daha iyi tekniklerle yapılan segmentasyon nöron hakkında daha fazla bilgi verecektir. Spinal kord dokusundaki hücreler immunositokimyasal veya immunohistokimyasal yöntemlerle işaretlenerek hücre tipleri belirlenip tek tek segmente edilirse spinal kordtaki hücreler hakkında daha detaylı bilgi edinilmiş olur.

Aksolotlun yüksek rejenerasyon kapasitesinin anlaşılmasına katkı sağlamak amacıyla yapılan bu çalışmada ilk defa aksolotl spinal kord eksplant kültürü çalışıldı. Daha önceki çalışmalarda amfibi türünden canlılarda spinal kord eksplant kültürü yapılmış olsa da aksolotl spinal kord eksplantı ilk kez yapılmış oldu.

Şartlandırma hasarı yapılan spinal kord dokusunda canlılık, hücre göçü, rejenerasyon olduğu görüldü. Aksolotlların canlılık için daha az gereksinimlerinin olması, yüksek rejenerasyon yetenekleriyle ilişkili olabilir. Şartlandırma hasarı yapılan spinal kord dokuları ile kas ko-kültürü yapılarak kas dokusu innervasyon açısından incelenebilir.

9. KAYNAKLAR

1. Behzad Jazayeri S, Beygi S, Shokraneh F, Merete Hagen E, Rahimi-Movaghar V. Incidence of traumatic spinal cord injury worldwide: a systematic review. *European Spine Journal* [Internet]. 2014;24(2015):905–18. Available from: <https://www.iscos.org.uk>
2. Höke | December ; J. nrneuro Advancing in peripheral nerve regeneration. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2013;9:668–76. Available from: www.nature.com/
3. Hunter K, Maden M, Summerbell D, Eriksson ¶ U, Holder N. Retinoic acid stimulates neurite outgrowth in the amphibian spinal cord (retinol/cellular retinol-and retinoic acid-binding proteins/glia). Vol. 88, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991.
4. Kaval Oğuz E, Gürkan Öztürk . An In Vitro Model for Conditioning Lesion Effect. 2019;39:61–71. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10571-018-0633-2>
5. ImageJ [Internet]. [cited 2022 Jun 20]. Available from: <https://imagej.nih.gov/ij/>
6. Resmi Adobe Photoshop | Fotoğraf ve tasarım yazılımı [Internet]. [cited 2022 Jul 28]. Available from: <https://www.adobe.com/tr/products/photoshop.html>
7. 3D Design Software | 3D Modeling on the Web | SketchUp [Internet]. [cited 2022 Jul 28]. Available from: <https://www.sketchup.com/>
8. Voss SR, Epperlein HH, Tanaka EM. *Ambystoma mexicanum*, the Axolotl: A Versatile Amphibian Model for Regeneration, Development, and Evolution Studies. *Cold Spring Harbor Protocols* [Internet]. 2009 Aug 1 [cited 2022 Jun 28];2009(8):pdb.emo128. Available from: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2009/8/pdb.emo128.full>

9. SchreckenberG GM, Jacobson AG. Normal Stages of Development of the Axolotl, *Ambystoma mexicanum*. Vol. 42, DEVELOPMENTAL BIOLOGY. 1975.
10. Galliot B, Ghila L, Library WO. Cell Plasticity in Homeostasis and Regeneration INTRODUCTION TO ADULT DEVELOPMENTAL BIOLOGY. *Molecular Reproduction & Development*. 2010;77:837–55.
11. Aksolotta omurilik hasarı sonrası rejenerasyonu sağlayan moleküler mekanizmaların proteomiks yöntemleri ile tanımlanması [Internet]. [cited 2022 Jun 9]. Available from: <https://acikerisim.medipol.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12511/8324>
12. Dale Purves et al. (eds.) - Neuroscience-Sinauer Associates (2018).
13. Gray’s Anatomy for Students E-Book - Richard Drake, A. Wayne Vogl, Adam W. M. Mitchell - Google Kitaplar [Internet]. [cited 2022 Jul 20]. Available from: https://books.google.com.tr/books?hl=tr&lr=&id=_ozrqnzzhFwC&oi=fnd&pg=PP1&dq=grays+anatomy&ots=DT9UEccLFw&sig=OYsExHdTSjHERalXJwUWXVRfNpE&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
14. Ko HY. Management and Rehabilitation of Spinal Cord Injuries. *Management and Rehabilitation of Spinal Cord Injuries*. 2022;
15. 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. *Frontiers in Immunology*. 2019 Nov 1;10.
16. Chernoff EAG, Stocum DL, Nye HLD, Cameron JA. Urodele Spinal Cord Regeneration and Related Processes. *Developmental Dynamics* [Internet]. 2003;226:295–307. Available from: <http://www>.
17. Thygesen MM, Lauridsen H, Pedersen M, Orłowski D, Mikkelsen TW, Rasmussen MM. A clinically relevant blunt spinal cord injury model in the regeneration competent axolotl (*Ambystoma mexicanum*) tail. *Experimental*

- and Therapeutic Medicine [Internet]. 2019 Mar 1 [cited 2022 Jun 12];17(3):2322–8. Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2019.7193/abstract>
18. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. Available from: www.proteomics-journal.com
 19. Freitas PD, Yandulskaya AS, Monaghan JR. Spinal Cord Regeneration in Amphibians: A Historical Perspective. 2019;
 20. 3. Kirsche, W. (1956) Experimentelle Untersuchungen... - Google Scholar with H-Index Calculator [Internet]. [cited 2022 Jun 9]. Available from: https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0%2C5&q=3.%09Kirsche%2C+W.%281956%29+Experimentelle+Untersuchungen+%C3%BCber+die+Regeneration+des+durchtrennten+R%C3%BCckenmarkes+von+Amblystoma+mexicanum.+Z+Mikrosk+Anat+Forsch%2C+62%2C+521%E2%80%93586.&btnG=
 21. Joven A, Simon A. Homeostatic and regenerative neurogenesis in salamanders. *Progress in Neurobiology*. 2018 Nov 1;170:81–98.
 22. Gaete M, Muñoz R, Sánchez N, Tampe R, Moreno M, Contreras EG, et al. Spinal cord regeneration in *Xenopus* tadpoles proceeds through activation of Sox2-positive cells [Internet]. 2012. Available from: <http://www.neuraldevelopment.com/content/7/1/13>
 23. O’hara CM, Egar MW, Chernoff EAG. Reorganization of the Ependyma During Axolotl Spinal Cord Regeneration: Changes in Intermediate Filament and Fibronectin Expression. 1992.
 24. Henini M. Scanning electron microscopy: An introduction. III-Vs Review. 2000;13(4):40–4.
 25. Winey M, Meehl JB, O’Toole ET, Giddings TH. Conventional transmission electron microscopy. Vol. 25, *Molecular Biology of the Cell*. 2014. p. 319–23.

26. Giampaoli S, Bucci S, Ragghianti M, Mancino G, Zhang F, Ferretti P. Expression of FGF2 in the limb blastema of two Salamandridae correlates with their regenerative capability. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2003 Nov 7;270(1530):2197–205.
27. Chernoff EAG, Munck CM, Mendelsohn LG, Egars MW. PRIMARY CULTURE OF AXOLOTL SPINAL CORD EPENDYMAL CELLS. Vol. 22. 1990.
28. Tonge DA, Leclere PG. DIRECTED AXONAL GROWTH TOWARDS AXOLOTL LIMB BLASTEMAS IN VITRO [Internet]. Available from: www.elsevier.com/locate/neuroscience
29. Alizadeh A, Moradi L, Katebi M, Ai J, Azami M, Moradveisi B, et al. Delivery of injectable thermo-sensitive hydrogel releasing nerve growth factor for spinal cord regeneration in rat animal model. *Journal of Tissue Viability*. 2020 Nov 1;29(4):359–66.
30. Hua Y, Laserstein P, Helmstaedter M. Large-volume en-bloc staining for electron microscopy-based connectomics. *Nature Communications*. 2015 Aug 3;6.
31. Demir O, Aysit N, Onder Z, Turkel N, Ozturk G, Sharrocks AD, et al. ETS-domain transcription factor Elk-1 mediates neuronal survival: SMN as a potential target. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2011 Jun;1812(6):652–62.
32. Fullscreen Page | mooreillustrations [Internet]. [cited 2022 Jul 21]. Available from: <https://www.mooreillustrations.com/fullscreen-page/comp-j1odd0b2/eb669568-6772-4166-8966-22a6acfb2179/1/%3Fi%3D1>
33. Sköld MK, Wyart C, Fehlings MG, Frostell A, Hakim R, Thelin EP, et al. a review of the segmental Diameter of the healthy human spinal cord. *Neurol* [Internet]. 2016;7:238. Available from: www.frontiersin.org

34. Fornaro M, Sharthiya H, Tiwari V. Adult Mouse DRG Explant and Dissociated Cell Models to Investigate Neuroplasticity and Responses to Environmental Insults Including Viral Infection. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* [Internet]. 2018 Mar 9 [cited 2022 Jun 9];2018(133):e56757. Available from: <https://www.jove.com/v/56757/adult-mouse-drg-explant-dissociated-cell-models-to-investigate>
35. Dmetrichuk JM, Spencer GE, Carlone RL. Retinoic acid-dependent attraction of adult spinal cord axons towards regenerating newt limb blastemas in vitro. *Developmental Biology*. 2005 May 1;281(1):112–20.
36. Arnold AS, Christe M, Handschin C. A functional motor unit in the culture dish: Co-culture of spinal cord explants and muscle cells. *Journal of Visualized Experiments*. 2012 Apr 12;(62).
37. Bölük A, Yavuz M, Demircan T. Axolotl: A Resourceful Vertebrate Model for Regeneration and Beyond. *Developmental Dynamics* [Internet]. 2022 Jul 30 [cited 2022 Aug 8]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.520>

10.ETİK KURUL ONAYI



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

E-İmzalıdır

Sayı : 38828770-604.01.01-41707
Konu : Etik Kurulu Kararı

20/08/2019

Sayın Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 17/07/2019 tarihli 34 karar no ile onay verilen “Aksolot Spinal Kord Dokusunun Oluşturulan Eksplant Modelinde Rejenerasyon ve İnnervasyon Açısından İncelenmesi” isimli çalışmanızın başlığını “Aksolotl Omurilik Rejenerasyonunun Eksplant Kültür Modelinde İncelenmesi” olarak değiştirilmesi isteğiniz uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.

Bilgilerinize rica ederim.

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

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakınızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden D1858491X2 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

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

Sayı : E-38828770-772.02-2817
Konu: Etik Kurulu Kararı

12/05/2022

Sayın Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 20.08.2019 tarihli 38828770-604.01.01- E.34944 sayı no ile onay verilen "Aksolotl Omurilik Rejenerasyonunun Eksplant Kültür Modelinde İncelenmesi" isimli çalışmanız için aşağıda verilen değişiklikler uygun bulunmuş olup kayıt altına alınmıştır.


Bilgilerinize rica ederim.

- Yukarıda ismi belirtilen araştırma açık adı yerine "Aksolotl Omurilik Dokusunun Ultrastrüktürel Yapısının Tanımlanması" olarak değiştirilmesi isteği.

Prof. Dr. Ertuğrul KILIÇ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(İMÜ-HADYEK) Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrakımızı <https://turkiye.gov.tr/istanbul-medipol-universitesi-ebys> linkinden 99DF4A7CX8 kodu ile doğrulayabilirsiniz.

Medipol Üniversitesi Kavacık Yerleşkesi (Ana Yerleşke Rektörlük)
Kavacık Mah. Ekinciler Cad. No: 19, Kavacık Kavşağı, 34810 Beykoz, İstanbul
T: 444 85 44 F: 0212 531 75 55
E-Posta: bilgi@medipol.edu.tr İnternet Adresi: www.medipol.edu.tr
Kep Adresi: medipoluniversitesi@hs03.kep.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin: Bilge KAYA
Tel: 





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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
17/07/2019	34		Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

“Aksolot Spinal Kord Dokusunun Oluşturulan Eksplant Modelinde Rejenerasyon ve İnnervasyon Açısından İncelenmesi” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “**Oybirliği**” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: Eylül 2019, 2 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mehmet OZANSOY	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	