



TC.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TRANSNÖRONAL DEJENERASYONUN HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE CANLI GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

ESRA NUR YİĞİT

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL - 2017



TC.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TRANSNÖRONAL DEJENERASYONUN HÜCRE
KÜLTÜRÜNDE CANLI GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMİ İLE
ARAŞTIRILMASI**

ESRA NUR YİĞİT

SİNİRBİLİM ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. GÜRKAN ÖZTÜRK

İSTANBUL - 2017

TEŞEKKÜR

Öncelikle çalışmamın her aşamasında, maddi manevi hiçbir desteğini benden esirgemeyen ve yüksek lisans eğitimim boyunca öğrendiğim çoğu şeyi ona borçlu olduğum değerli danışmanım Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e,

Tez savunma jürimde bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Işıl KURNAZ ve Doç. Dr. Zübeyir BAYRAKTAROĞLU'na,

Hayat tecrübelerini ve bilimsel bilgilerini bana sıkılmadan aktaran abilerim Dr. Mehmet Şerif AYDIN, Dr. Taha KELEŞTEMUR ve Emre VATANDAŞLAR'a,

Sınırsız desteklerini gördüğüm grup arkadaşlarım Dr. Neşe AYŞİT, Tuba AKGÜL ÇAĞLAR, Sadık BAY, Gülsena BAYDAŞ ve bilime her gün yeni bir bakış açısıyla bakmamı sağlayan Fazlı Kemal BAYAT'a,

Her zaman yanımda olan Burcu KURT VATANDAŞLAR, çalışma ortamımızı güzelleştiren laboratuvar arkadaşlarım Fatmagül İlayda AYDINLI, Bircan KOLBAŞI, Mahmut Erhan AVŞAROĞLU, Tuba OĞUZ ve Eşref ÇELİK'e,

En yoğun zamanlarında bile bana yardımcı olan başta Hilmi Kaan ALKAN, Mehtap Şimşek, Pelin DİLSİZ ve Özlem MUTLU olmak üzere tüm REMER ailesine,

Hayatım boyunca her türlü desteğini gördüğüm anneme, babama, kardeşim Berra'ya ve zor çalışma şartlarımda bana her zaman destek olmuş olan sevgili eşim Burak'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
BEYAN	i
TEŞEKKÜR	iii
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ	viii
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Arka Kök Gangliyon Yapısı.....	5
4.1.1. AKG Nöronu	7
4.1.2.Satellit Glia Hücreleri	8
4.2. Sinir Hasarı	9
4.2.1.Aksonal Hasar	10
4.2.2.Transnöronal Dejenerasyon ve İkincil Ölüm	11
4.3. Pürin Reseptörleri.....	13
4.4. Konneksin Kanalları (Oluklu Bağlantılar)	14
4.5. Panneksin Kanalları	15
4.6. P2X7 – Panx1 – NMDAR İlişkisi.....	16
5. MATERYAL VE METOD	18
5.1. Malzeme Listesi	18
5.2. Fare Hatları.....	19
5.2.1.DNA izolasyonu ve genotipleme	19
5.3. AKG Kültürü.....	22

5.3.1.Kültür öncesi hazırlıklar.....	22
5.3.2.Sakrifiye ve AKG eldesi	22
5.3.3.Hücre eldesi.....	22
5.4. ATP ye Bağlı Boya Alım Deneyleri	23
5.4.1.Farklı konsantrasyonlardaki ATP nin zamana bağlı etkisi	23
5.4.2.ATP nin nöron ve glialarda aktive ettiği kanalların bulunması	23
5.5. Hücre Kültüründe İkincil Ölüm Deneyleri	24
5.5.1.Nörit hasarının (aksotomi) uygulanması.....	24
5.5.2.Aksotomi sonrası ikincil ölüm oranlarının belirlenmesi.....	24
5.5.3.Hücre zarı protein miktarlarının karşılaştırılması	25
5.5.3.1.Immunositokimyasal boyama protokolü.....	25
5.5.4.Aksotomi sonrası ikincil hasara bağlı boya alım analizleri	26
5.5.5.Aksotomi çevresindeki nöronların kalsiyum değişiminin belirlenmesi.....	26
5.5.6.Kalsiyum – ikincil ölüm korelasyonunun incelenmesi	27
5.6. Görüntülerin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme	27
6. BULGULAR.....	28
6.1. Genotipleme Sonuçları.....	28
6.3. ATP nin Hücre Zarı Geçirgenliği Üzerindeki Etkisi.....	29
6.4. ATP Uygulamasının Hücrelerde Aktive Ettiği Kanalların Tespiti	34
6.5. Aksotomi Modelinin Oluşturulması.....	35
6.6. Aksotomi Yapılan Hücrelerin Çevresindeki Hücrelerin Protein Miktarlarındaki Değişim	36
6.7. Aksotomi Sonrası İkincil Ölümün Gösterilmesi	39
6.8. Aksotomi Sonrası Çevredeki Hücrelerin Hücre Zarı Geçirgenliğinin İncelenmesi	40
6.9. Aksotomi Çevresindeki Nöronların Kalsiyum Değişimi	43

7. TARTIŞMA.....	49
8. SONUÇ	54
9. KAYNAKLAR	55
10. EKLER	65
11. ETİK KURUL ONAYI.....	66
12. ÖZGEÇMİŞ	67



TABLO LİSTESİ

Tablo 5.1.1: Malzeme Listesi.....	18
Tablo 5.2.1.1: Jackson Kirli DNA izolasyonu Protokolü	20
Tablo 5.2.1.2: GCaMP ifadesinin kontrolü için kullanılan primer listesi.....	20
Tablo 5.2.1.3: Cre ifadesinin kontrolü için kullanılan primer listesi	20
Tablo 5.2.1.4: Cre için kullanılan PZR reaksiyon bileşenleri.....	21
Tablo 5.2.1.5: GCaMP için kullanılan PZR reaksiyon bileşenleri.....	21
Tablo 5.2.1.6: Ortak PZR reaksiyonu protokolü.....	21
Tablo 5.3.1.1: Diseksiyon ve yaşam vasatları bileşenleri	22



ŞEKİL ve RESİM LİSTESİ

Resim 4.1.1: İnsanda C1 ve C2 AKG nin anatomik lokalizasyonunun gösterilmesi .	5
Şekil 4.1.1: AKG nin psödounipolar yapısının şematize edilmiş gösterimi	6
Şekil 4.1.2: Duyu nöronlarının periferik uzantılarının gösterilmesi	7
Resim 4.1.2.1: Fare AKG sinin düşük büyütme elektron mikroskopi görüntüsü.....	8
Resim 6.1.1: Cre (sol) ve GCaMP (sağ) ifadesi için yapılan PZR sonucu agaroz jel görüntüsü.....	28
Resim 6.2.1: AKG kültürünün 48. saatinde nöron ve gliaların temsili görüntüsü.....	28
Resim 6.2.2: AKG nöronlarında spontan kalsiyum aktivitesinin temsili görüntüsü..	29
Şekil 6.3.1: ATP uygulaması sonrası nöronlardaki boya alım miktarlarının gösterilmesi.....	30
Şekil 6.3.2: ATP uygulaması sonrası glialardaki boya alım miktarlarının gösterilmesi.	30
Resim 6.3.1: 100 µM ATP uygulaması sonucu zamana bağlı boya alım analizleri..	32
Resim 6.3.2: 1 mM ATP uygulaması sonucu zamana bağlı boya alım analizleri.. ...	33
Şekil 6.4.1: ATP uygulamasının nöronlarda hangi kanalların aktivasyonu ile boya alımını artırdığının gösterilmesi.....	34
Şekil 6.4.2: ATP uygulamasının glialarda hangi kanalların aktivasyonu ile boya alımını artırdığının gösterilmesi.....	35
Resim 6.5.1: Femtosaniye lazer aksotomisinin temsili görüntüsü.....	36
Resim 6.6.1: Nöron ve glialardaki panneksin1 ve P2X7 reaktivitesinin kontrol preparatındaki temsili görüntüsü.....	37
Şekil 6.6.1: Aksotomi yapılan hücrelere komşu a) nöronların ve b) gliaların hücre zarındaki panneksin1 miktarının zamana bağlı değişiminin floresan parlaklık değeri ile gösterilmesi.	38
Şekil 6.6.2: Gliaların hücre zarındaki P2X7 miktarının zamana bağlı değişiminin floresan parlaklık değeri ile gösterilmesi	39
Şekil 6.7.1: Aksotomi yapılan hücrenin çevresindeki nöronların ölüm oranının gösterilmesi.	40
Şekil 6.8.1: Hasar bölgesine olan mesafeye göre nöronların boya alım miktarlarının karşılaştırılması	41

Şekil 6.8.2: Hasar bölgesine olan mesafeye göre gliaların boya alım miktarlarının karşılaştırılması	41
Resim 6.8.1: Aksotomi sonrası çevrede bulunan hücrelerin boya alım miktarları... ..	42
Şekil 6.9.1: Aksotomi sırasında çevredeki ışımaya yapan nöronların tüm nöronlara olan oranı.....	43
Şekil 6.10.1: Aksotomi sonrası çevrede kalsiyum artışı görülen nöronlardaki ölüm oranının kalsiyum artışı görülmeyen nöronlar ile karşılaştırılması.....	44
Şekil 6.10.2: Aksotomi sonrası çevredeki tüm nöronların ölüm oranlarının karşılaştırılması.	45
Şekil 6.10.3: Aksotomi yapılan nöronun çevresinde ışımaya görülen nöronlardaki ölüm oranları ve NMDA reseptörleri ile konneksin kanallarının bloklanması sonrası değişiminin gösterilmesi.	46
Resim 6.10.1: Aksotomi sırasında alınan GCaMP görüntülerinin termal haritası.....	47
Resim 6.10.2: Hasar sonrası kalsiyum artışı görülen hücrelerdeki ölümün gösterilmesi.....	48

1. ÖZET

TRANSNÖRONAL DEJENERASYONUN HÜCRE KÜLTÜRÜNDE CANLI GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI

Sinir sisteminde kısıtlı bir alanda meydana gelen bir hasar öncelikle hasar bölgesindeki hücreleri etkiler ve sonrasında çevre bölgelerde ikincil hasar diye de adlandırılan patolojik bir sürecin başlamasına sebep olur. İkincil hasar, çevredeki hücrelerin ölüm ve dejenerasyonuna sebep olduğunda transnöronal dejenerasyon olarak da adlandırılır. Çalışmamızda bu süreçte rol oynadığı düşünülen P2X7 reseptörü ve hasar sonrası yayılan kalsiyum sinyali, femtosaniye kızılötesi lazer kullanılarak oluşturduğumuz in-vitro hasar modeli ile araştırılmıştır. Hücre kültürü ortamında sınırlı sayıda sinir hücresinde aksotomi hasarı oluşturulduktan 24 saat sonra yapılan canlılık testlerinde ölüm oranının kontrol grubuna kıyasla arttığı ve yalnızca glia hücrelerinde bulunan P2X7 reseptörü bloklandığında ölüm oranının anlamlı bir şekilde kontrol seviyelerine düştüğü gözlenmiştir. Boya alım analizlerinde de hasarın hemen sonrasında çevredeki glia hücrelerinde boya alımının arttığı ve bu artışın hasar bölgesine olan mesafe ile negatif korelasyon gösterdiği gözlenmiştir. P2X7 reseptörü bloklandığında kontrol seviyelerine düşmesi glia hücrelerindeki P2X7 reseptörünün aktivasyonunun hücre zarında büyük bir por açılmasını sağladığını düşündürmüştür. Panneksin1 ve P2X7 boyamaları da aksotomi sonrası komşu hücrelerde bu proteinlerin hücre zarındaki miktarının da zamana bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Kalsiyumun hasar sinyalinin yayılmasındaki etkisinin araştırıldığı deneylerde ise hasarlanan nöronun etrafındaki hücrelerin %4,5 inde kalsiyum artışı olduğu, bu oranın NMDA reseptörü ve oluklu bağlantılar bloklandığında değişmediği fakat NMDA reseptörlerinin bloklanması aksotomi sonrası kalsiyum cevabı görülen hücrelerdeki ölüm oranının azalttığı görülmüştür. Tüm bu bulgular transnöronal dejenerasyon sinyalinin yayılmasında gliaların etkin bir rol oynayabileceğini ve P2X7, panneksin1 ve NMDA reseptörlerinin bu süreçte yer aldıklarını ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: İkincil hasar, NMDAR, transnöronal dejenerasyon, panneksin1, P2X7

2. ABSTRACT

INVESTIGATING TRANSNEURONAL DEGENERATION IN CELL CULTURE WITH LIVE IMAGING

An injury occurred in limited region of nervous system primarily affects cells at injury region later induces a pathological process in neighboring cells called secondary injury. If secondary injury causes death and degeneration of neighboring cells it's also called transneuronal degeneration. In our study, P2X7 receptor and spreading calcium signal are considered as possible actors in this process and researched using a precise femtosecond infrared laser induced in-vitro injury model. In cell cultures, after limited number of neurons were axotomized, viability tests after 24-hour indicated that total death ratio were increased compared to control and blocking of P2X7 receptors which present only in glial cells, significantly decreased cell death. In dye uptake assays, shortly after axotomies, glial cells showed increased dye uptake level and this increase was negatively correlated with distance to injury region. Blocking of glial P2X7 receptors decreased dye uptake of glial cells to control levels and this make us thought that P2X7 receptors may open a large pore on the cell membrane. Immunocytochemistry indicated that the amount of P2X7 and Pannexin1 channels in cell membranes of neighboring cells were also changed time dependently after injury. Experiments testing the effect of the spreading calcium signal in response to injury indicated that 4.5% of neighboring neurons were showed calcium increase as a response to axotomy. Inhibition of NMDA receptors and gap junctions didn't alter this ratio but inhibition of NMDA receptors decreased death ratio of the neighboring neurons which showed increased levels of calcium in response to axotomy. All of these findings indicated that glial cells may have an active role in spreading of transneuronal degeneration signal and P2X7, Pannexin1 and NMDA receptors are involved in the process.

Anahtar kelimeler: Secondary injury, NMDAR, transneuronal degeneration, Pannexin1, P2X7

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Travmatik akson hasarı, sinir hücrelerinde travmaya bağlı olarak gelişen aksonal dejenerasyon ile sonuçlanan hasara verilen isimdir (1). Hasar sonrası hasarlanan hücrede meydana gelen değişiklikler haricinde çevre doku ve hücrelerde de hasara bir cevap meydana ve ikincil hasar olarak adlandırılır (2). Lokal bir hasar bölgesinden çevredeki sağlam nöronlara ölüm sinyalinin yayılma süreci ise Transnöronal dejenerasyon olarak adlandırılır. Nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesinin da transnöronal dejenerasyon yoluyla olduğu düşünülmektedir (3, 4). Nörodejeneratif süreçler haricinde lokal bir hasarın da transnöronal dejenerasyon yoluyla çevredeki sağlam hücrelere zarar verdiği bilinmektedir (5).

Hasarlanan hücrelerden ATP açığa çıkması da ATP nin, lokal bir hasarın çevreye yayılmasına katkıda bulunup bulunmadığına dair çalışmaların yapılmasını sağlamıştır (6). Ayrıca bu durum Pürinerjik sinyal yollarının da hasar sinyali sonucu aktive olup hasarın yayılmasına katkı sağlayabileceklerini düşündürmüştür.

P2X reseptörlerinin yüksek ATP konsantrasyonunda açtığı büyük porun panneksin1 olduğu varsayılarak bununla ilgili birçok çalışma yapılmıştır. panneksin1 ifade etmeyen hücrelerde de P2X reseptörlerinden bazılarındaki bir yapısal değişiklik ile büyük por yapısının oluşması bu mekanizmanın panneksin1 den bağımsız bir mekanizma olduğunu savunmuştur (7) Aynı şekilde panneksin1 bloklayıcı kimyasalların P2X7 nin aktivasyonu sonrası büyük molekülleri geçirmesini inhibe edememiş olması da bunu destekler niteliktedir (8)

P2X reseptörleri ile panneksin1 kanallarının fiziksel olarak bir bağının olsun ya da olmasın fizyolojik süreçlerde panneksin1 kanallarının açılıp kapanmasının P2X ve NMDA kanalları tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (9).

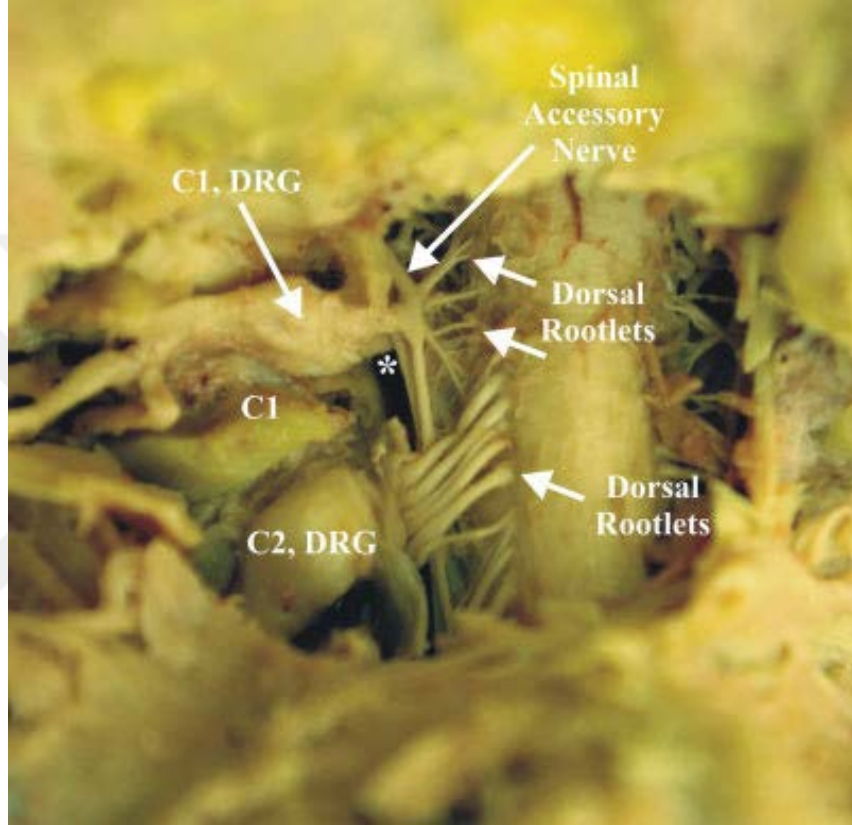
Travmatik hasarlar dışında, nörodejeneratif hastalıklara bağlı meydana gelen sinir hasarlarında nörodejenerasyon başlangıcı her nörodejeneratif hastalık için farklılık göstermekle birlikte moleküler düzeylere inildiğinde glutamat eksitotoksitesisi, inflamasyon, mitokondrinin ve hücre içi taşıma elemanlarının fonksiyon kaybı, protein katlanma bozuklukları gibi süreçlerde ortak mekanizmaların ve protein sinyal yollarının yer aldığı görülmektedir (10-12).

Tüm bu veriler göz önünde bulundurulduğunda travmatik hasar sonucu etrafa yayılan ikincil hasar sinyalinin ilerlemesinde görev alan birden fazla mekanizmadan hasarın yayılmasında en etkin rol oynadığı düşünülen iki ana hedef belirlenmiştir. Bunlardan birincisi ATP ye bağlı aktifleşen pürinerjik sinyal mekanizması, ikincisi ise kalsiyum üzerinden ilerleyen sinyaldir. Bu iki sürecin hasar çevresindeki nöronların ölümüne olan etkisi incelenecektir. Ayrıca ikincil hasarın ilk hasardan ne kadar süre sonra başladığı ve zamana bağlı olarak hem glia hem de nöron hücrelerinde kanal dinamiklerini nasıl etkilediği ve hücre zarındaki protein miktarları üzerinde ne gibi değişikliklere sebep olduğu femtosaniye kızılötesi lazer kullanılarak arka kök gangliyon nöron kültürlerinde sınırlı bir alanda travmatik hasar oluşturularak incelenecektir.

4. GENEL BİLGİLER

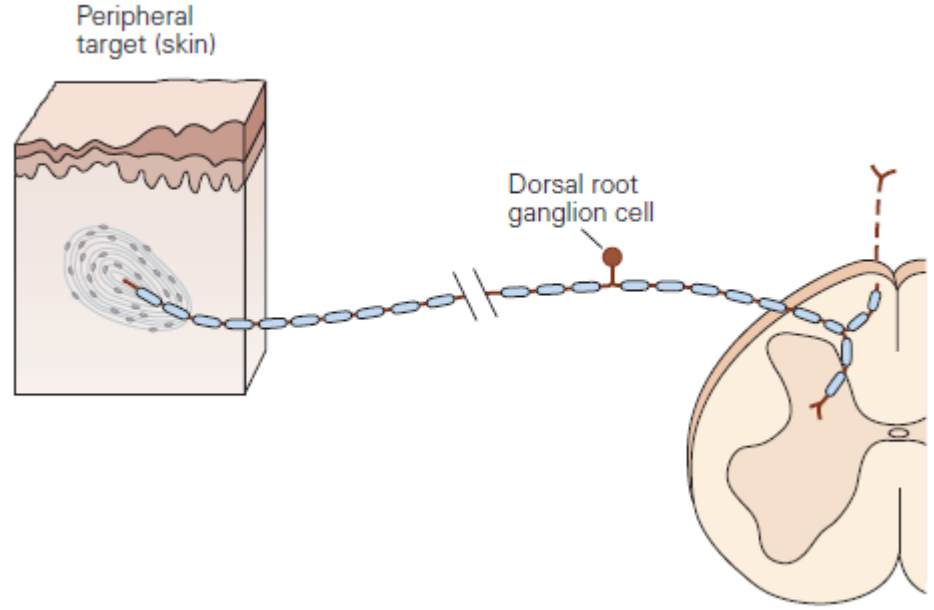
4.1. Arka Kök Gangliyon Yapısı

Gangliyon, periferik sinir sistemindeki, anatomik olarak izole halde bulunan sinir hücreleri topluluklarına verilen isimdir. Somatik sinir sisteminin elemanlarından olan duyu nöronlarının gövdeleri arka kök gangliyon (AKG) içerisinde yer almaktadır.



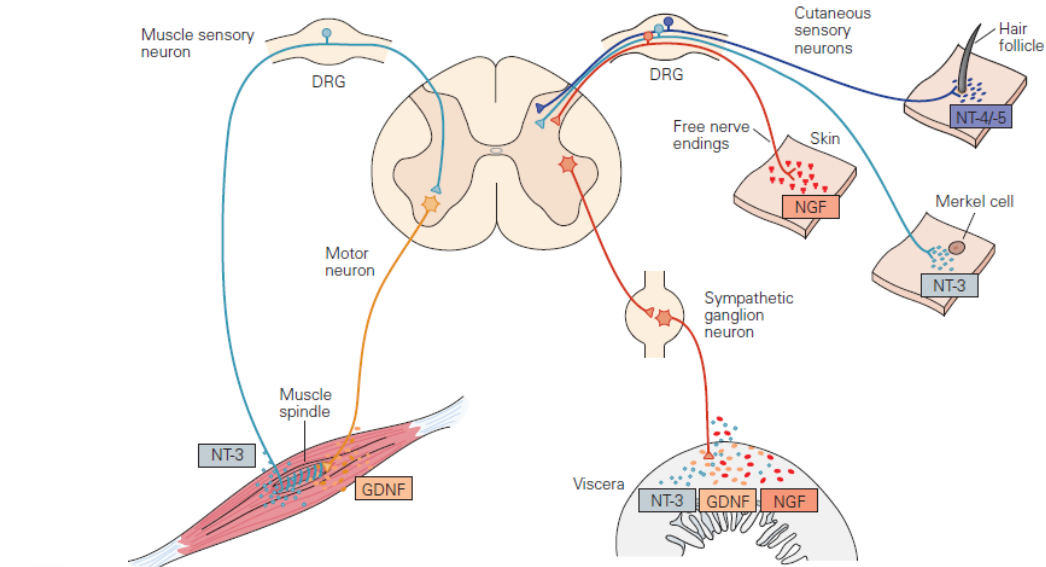
Resim 4.1.1: İnsanda C1 ve C2 AKG nin anatomik lokalizasyonunun gösterilmesi (13).

AKG, tek bir aksonu olan psödüünipolar nöron gövdelerinden oluşur ve AKG nöronlarının aksonları gövdeden çıktıktan sonra iki ayrı dala ayrılır, bir dal arka boynuzdan santrala giriş yaparken diğeri de periferdeki özelleşmiş duyu reseptörlerinden veya direkt olarak açık akson uçlarından aldığı duyuların omuriliğe iletimini sağlar (14).



Şekil 4.1.1: AKG nin psödounipolar yapısının şematize edilmiş gösterimi (14).

Genetik arka plana göre değişim göstermekle birlikte, farelerde 8 servikal, 13 torasik, 5-6 lumbar, 4 sakral olmak üzere 30-31 çift AKG bulunmaktadır (15, 16). Her bir AKG içerisinde farklı tipte duyu nöronları heterojen olarak dağılmıştır. AKG içerisindeki farklı duyu nöronu tiplerinin belirlenmesinde kabul edilen ilk sınıflandırma yöntemi morfolojik sınıflandırmadır. Hücre boyutu ve boyanma yoğunlukları göz önünde bulundurularak sırasıyla büyük ve küçük, açık ve koyu olmak üzere ikiye ayrılmışlardır (17, 18). Fakat daha sonraki çalışmalarda morfolojik sınıflandırmaya ek olarak duyu nöronlarının stimulus iletim hızlarına (A ve C lifleri) ve hücrelerin fonksiyonlarına göre de sınıflandırmalar yapılmıştır (14). AKG nöronlarının hayatta kalım mekanizmaları periferdeki akson uçlarının bulunduğu yerden salgılanan nörotrofik faktörlere bağlıdır ve bu faktörler AKG nöronunun aksonunun bulunduğu yere dolayısıyla fonksiyonuna göre de çeşitlilik göstermektedir (19).



Şekil 4.1.2: Duyu nöronlarının periferik uzantılarının gösterilmesi (14).

Farklı nörotrofinler farklı AKG nöron alt tiplerinin canlılığına katkıda bulunur. Deriyi innerve eden ağrı nöronları NGF, Propriosensitif nöronlar ve Merkel hücrelerini innerve eden mekanosensitif nöronlar Nörotrofin -3 (NT-3), tüy foliküllerini innerve eden AKG nöronları ise NT-4 ve NT-5 e bağlıdır (Şekil 4.1.3) (14).

4.1.1. AKG Nöronu

AKG nöronları periferik sinir sistemindeki nörodejenerasyon, ağrı çalışmalarında ve duyu nöronlarının fonksiyonlarının araştırıldığı çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (20). Bu çalışmalara ek olarak akson rejenerasyonu, dejenerasyonu, hücre canlılığı, nöron ağrı modellemesi, miyelinizasyon gibi temel çalışmalarda da model olarak kullanılabilir (16).

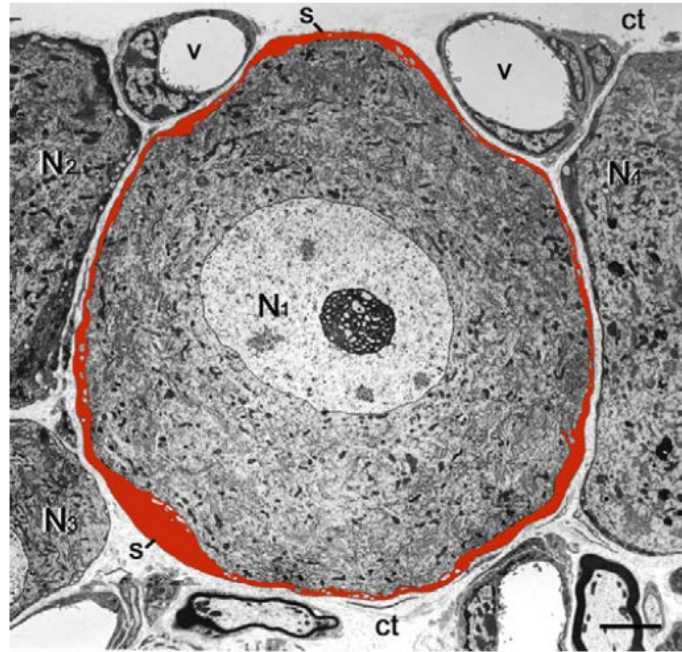
Glutamat, AKG nöronlarında en çok bulunan eksitör nörotransmitterdir (21). AKG hücrelerinde temel olarak 3 farklı glutamat üretme mekanizması vardır (22):

- Glutamini glutamata çeviren glutaminaz enzimi
- Glukozun glutamata çevrildiği trikarboksilik asit döngüsü
- N-asetil-aspartil-glutamat ın glutamat ve N-asetil-aspartata çevrilmesi

Glutamat üretildikten sonra veziküler glutamat taşıyıcıları (VGLUT) ile paketlenip taşınır. VGLUT1, VGLUT2 ve VGLUT2 olmak üzere toplamda 3 VGLUT alt tipi bulunmaktadır (23). VGLUT2 nin AKG nöronlarında en yaygın olarak ifade edilen alt tip olduğu çoğunlukla fareler ile yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (24-26).

4.1.2. Satellit Glia Hücreleri

AKG, histolojik olarak incelendiğinde, gangliyon içerisindeki nöron gövdelerinin satellit glia hücreleri ile birbirlerinden ayrılmış olduğu görülmektedir. Nöronlar ile çevrelerindeki satellit hücrelerinin arasında yaklaşık olarak 20 nm lik bir mesafe vardır bu da nöronların dış ortamla olan etkileşiminin çok az olduğunu ve bu sayede satellit hücrelerinin nöronlara mekanik destek verdiği düşünülmektedir (27).



Resim 2.1.2.1: Fare AKG sinin düşük büyütme elektron mikroskopi görüntüsü. AKG nöronunu saran satellit hücresi kırmızı ile gösterilmiştir. (N₁ – N₄ : AKG nöronları, v: kan damarları, ct: bağ doku) (28)

Satellit hücrelerinin nöronlara hem mekanik hem de besleyici destek sağladığı uzun zamandan beri bilinmektedir. (29) Fakat merkezi sinir sistemindeki destek hücrelerine kıyasla fonksiyonları ve farmakolojik özellikleri hakkında bilinenler çok daha azdır. (30) Destek görevlerine ek olarak merkezi sinir sistemindeki glia

hücrelerine benzer bir şekilde satellit hücrelerinin de nörotransmisyonunda rol oynayabildikleri gösterilmiştir (29). Yeni görüntüleme tekniklerinin kullanılması farklı nöron alt tiplerinin ve satellite glia hücrelerinin fonksiyonlarının detaylı incelemelerini mümkün kılmıştır (31).

4.2. Sinir Hasarı

Sinir dokuda meydana gelen hasar sinir hasarı olarak adlandırılır. Travmatik sinir hasarı ilk kez sınıflandırıldığında morfolojik sonuçlar ve hasarın derecesi göz önüne alınmıştır (32, 33):

- Nöropraksi: En kolay iyileşen sinir yaralanması biçimidir. Aksonda herhangi bir hasara rastlanmazken miyelin hasarından dolayı impuls iletiminde aksamalar olmaktadır. Sunderland sınıflandırmasına göre 1. derece hasar sınıfına girer.
- Aksonotmezis: Sinir hücresi etrafındaki bağ doku intakt olmasına rağmen aksonda hasar görülmesi sonucu oluşur. Rejenerasyon süreci nöropraksiye göre çok daha uzun bir zaman gerektirir. Sunderland sınıflandırmasına göre 2., 3. ve 4. dereceye ayrılır. 3. derecede endonöral tüplerde hasarlanma varken 4. Derecede buna ek olarak perinörium hasarına da rastlanır.
- Nörotmezis: Hem sinir hücresinde hem de bağ dokuda hasar bulunmaktadır. Tam iyileşme genellikle mümkün olmamaktadır. Sunderland sınıflandırmasına göre 5. derece hasar olarak kabul edilir.

Travmatik hasarlar dışında, nörodejeneratif hastalıklara bağlı meydana gelen sinir hasarlarında nörodejenerasyon başlangıcı her nörodejeneratif hastalık için farklılık göstermekle birlikte farklı klinik sonuçlar ortaya çıkmasına rağmen moleküler düzeylere inildiğinde glutamat eksitotoksitesisi, inflamasyon, mitokondrinin ve hücre içi taşıma elemanlarının fonksiyon kaybı, protein katlanma bozuklukları gibi süreçlerde ortak mekanizmaların ve protein sinyal yollarının yer aldığı görülmektedir (10-12) Bunlara ek olarak, iskemik hasarların da Alzheimer ile ortak bir şekilde Protein kinaz C (PKC) aktivitesini benzer şekilde etkiledikleri gösterilmiştir (34).

4.2.1. Aksonal Hasar

Travmatik akson hasarı, sinir hücrelerinde travmaya bağlı olarak gelişen aksonal dejenerasyon ile sonuçlanan hasara verilen isimdir (1). Travmatik akson hasarlarının çalışılması için hem in-vivo hem de in-vitro olarak bir çok farklı hasar modeli geliştirilmiştir (35). In-vivo modeller fizyolojik süreçlere daha yakın olması sebebiyle tercih edilirken in-vitro modeller de deney koşullarının çok daha kontrollü olması, tek hücre ile izole bir şekilde çalışılabilmesi nedeniyle tercih edilmektedir (36, 37).

Aksonal hasar sonrası hücrede birçok akut ve uzun süreli değişiklikler meydana gelir. Hasar bölgesinin distal kısmı Wallerian dejenerasyonu olarak bilinen bir dejenerasyon sürecine girer (38-40).

Wallerian dejenerasyonunda, aksonal hasar ile birlikte dış ortamdan içeriye bir kalsiyum akışı olur ve hem dıştan gelen kalsiyumun hem de iç depolardaki kalsiyumun da salınması ile Kalpainler aktive olur böylece hücre iskeletinin bozulma süreci başlatılmış olur. Bir süre zarar görmemiş halde kalan distal uç normal şartlar altında hücre gövdesinden temin edilmekte olan faktörlerin bitmesi, mitokondri zar potansiyelinin kaybedilip ROS açığa çıkması ile de granüler olarak parçalanma sürecine girer (41).

Proksimal kısımda da akson hasarına bağlı olarak hücrenin kaderini etkileyecek birtakım değişiklikler meydana gelir. Distal kısımda olduğu gibi burada da hücre içi iyon değişimi en önemli faktörlerden biridir. İçeriye giren kalsiyum depolarizasyona neden olur (42). Hasar meydana geldikten sonra hasar sinyalleri hasar bölgesinden gövdeye retrograd olarak taşınır ve hücrenin rejenerasyona veya dejenerasyona gideceği bu şekilde belirlenir (43).

Hasar sonrası hücrede aktive olan sinyal yolları ile ilgili yoğun çalışmalar yapılmıştır. Periferik hasarlarda rejenerasyon kapasitesi santral hasara kıyasla çok daha yüksektir (44). Bir çalışmada AKG nöronunda hasarlanmamış durumda Histone deasetilaz-5 (HDAC5) in çekirdek içerisinde bulunup rejenerasyonu sağlayacak genlerin ifadesini baskılar konumdayken hasar durumunda hücre gövdesine kadar gelen kalsiyum sinyali PKC nin çekirdek içerisine girip HDAC5 in sitoplazmaya çıkmasını ve rejenerasyon ile ilişkili olan genlerin ifadesinin arttığı gösterilmiştir (42).

Başka bir çalışmada periferik akson hasarı ile JNK yolağının retrograd olarak aktivasyonu sonrası Hsp27 gibi rejenerasyonda görevli proteinlerin ifadesinin arttığı gözlenmiştir (45). JNK'nin aktivasyonu sonrasında da c-jun ve GAP-43 gibi rejenerasyon genlerinin ifadesinin de periferik hasar sonucu arttığı ve bu proteinlerin ifadesi inhibe edildiğinde rejeneratif kapasitenin azalmış olduğu gözlenmiştir (46, 47).

Hasarlanan hücre içinde meydana gelen değişimlere ek olarak glia hücreleri de rejenerasyon sürecine katkıda bulunmaktadır. Schwann hücreleri hasar sonrası açığa çıkan miyelin ve akson kalıntılarını fagosite ettikleri gibi nörotrofik faktörlerin de salarak hücre canlılığı ve rejenerasyonuna katkıda bulunurlar (48, 49).

Santral hasarlarda ise rejeneratif kapasite daha düşüktür, rejenerasyonu sağlayan genler periferik sistemdeki kadar ifade edilemez ve glia hücreleri de hasardan etkilenip ölüme gidebilir. Santral hasarı sonrası rejenerasyonu artırmak için bağışıklık belirli antikolar ile immun hücrelerin hasar bölgesine daha çok gelmeleri sağlanarak miyelin ve akson kalıntılarının daha etkili bir şekilde temizlenmesi ile rejenerasyona katkıda bulunulması üzerine çalışılmaktadır (50).

4.2.2. Transnöronal Dejenerasyon ve İkincil Ölüm

Hasar sonrası hasarlanan hücrede meydana gelen değişiklikler haricinde çevre doku ve hücrelerde de hasara bir cevap meydana gelir. Bu, sonradan görülen dejeneratif etkiye ikincil hasar adı verilir (2). Çevre hücre veya dokularda görülen işlev kaybı fizyolojik şartlar altında birincil hasardan sonra birkaç saat içinde olabileceği gibi haftalar sonra da görülebilir (51).

Temel olarak travmatik hasar sonrası iki çeşit hücre ölümünden bahsedebiliriz. Bunlardan bir tanesi nekrotik ölüm diğeri ise apoptotik ölümdür. Morfolojik olarak bakıldığında nekrozda hücrenin şişmesi ve organel içeriğinin dış ortama salınıp inflamatuvar bir süreç başlatırken apoptozda hücrenin büzülüp DNA bozulmasının gerçekleştiği ve genellikle inflamasyon sinyali başlatmadığı programlı ve zamana yayılmış bir ölüm söz konusudur (52, 53). Inflamasyona bağlı meydana gelen ikincil ölümlerin çoğunun ise apoptotik ölümler olduğu gösterilmiştir (54).

Hem travmatik beyin hasarında hem de omurilik hasarında ilk anda görülen mekanik etkiyle sınırlı bir bölgede hücre ölümü meydana gelir. Hasarı takiben meydana gelen kanama ve iskemi ilk anda bir grup hücrenin daha ölümüne sebep olurken inme durumunda damarda meydana gelen travma sonrasında meydana gelen ölüm travmadan birkaç saat sonra gerçekleşir ve ikincil hasar olarak değerlendirilir (55).

İskemi sonrası birincil bölge çevresindeki hücelere kan akışı dolayısıyla oksijen ve besin tedariği sağlanamadığı için hipoksik ölüm gerçekleşir, hasar olmasına rağmen hücre ölümünün henüz gerçekleşmediği bir bölge oluşur ve bu bölge penumbra alanı olarak adlandırılır (56). Penumbra alanının ve buradaki hücrelerin canlılığının korunabilmesinin hasar sonrası iyileşme sürecinde çok önemli rol oynadığı düşünülmektedir (57).

Lokal bir hasar bölgesinden çevredeki sağlam nöronlara ölüm sinyalinin yayılma süreci ise Transnöronal dejenerasyon olarak adlandırılır. Nörodejeneratif hastalıkların ilerlemesinin de transnöronal dejenerasyon yoluyla olduğu düşünülmektedir (3, 4). Nörodejeneratif süreçler haricinde lokal bir hasarın da transnöronal dejenerasyon yoluyla çevredeki sağlam hücelere zarar verdiği bilinmektedir (5). Transnöronal dejenerasyonun belirgin bir şekilde tanımlanabileceği bölgelerden bir tanesi de retinadır. Bu bölgede oluşan travmatik hasarlar veya glokom gibi rahatsızlıklara bağlı meydana gelen ve yayılarak genişleyen hücre ölüm sinyali buna örnek olarak verilebilir (58).

Hem nörodejeneratif süreçlerde hem de travmaya bağlı sinir hasarlarında başlangıçta küçük bir bölgede veya sınırlı sayıda sinir hücresinde etkili olan fakat zamanla çevredeki sağlıklı hücelere yayılan ölüm sinyallerinin mekanizması ve nörodejeneratif süreçler ile travmatik hasarlar arasındaki ortak mekanizmalar hala araştırılmaktadır.

4.3. Pürin Reseptörleri

Pürinlerin varlığına ilk olarak kardiyovasküler sistemde rastlanmıştır ve sonraki çalışmalarla da damarlar üzerinde çeşitli modülasyon etkilerine sahip oldukları gösterilmiştir (59, 60). Pürinler cAMP, ATP ve NADH gibi önemli bileşenlerin içerisinde bulunmaktadır.

Pürinerjik reseptörlerin toplamda 19 alt tipi bulunmaktadır (61). Bunlardan 4 tanesi P1, 8 tanesi P2Y, 7 tanesi de P2X reseptörleridir. P1 reseptörleri G protein bağlı reseptörlerdir ve adenosin duyarlıdır, bu yüzden aynı zamanda adenosin reseptörleri olarak da adlandırılırlar (59). P2 reseptörleri ise P2X ve P2Y olmak üzere ikiye ayrılır. P2X reseptörleri ligand kapılı kanallar iken P2Y reseptörleri G protein bağlı reseptörlerdir. P2X reseptörlerinin tümünün (P2X1-7) ligandı ATP iken P2Y reseptörlerinden P2Y2, P2Y4, P2Y11, P2Y13 ATP; P2Y1, P2Y12 ve P2Y13 ADP; P2Y2, P2Y4 ve P2Y6 UTP; P2Y4, P2Y6 ve P2Y14 de UDP ye karşı duyarlıdır (62).

ATP nin hücrelerin enerji metabolizmasında hayati önem taşımakla birlikte hem pürinerjik sinyal mekanizmasına dahil olmasıyla hem de sinir sisteminde nörotransmitter görevi görmesiyle önemli roller oynadığı bilinmektedir (63). ATP nin astrosit kalsiyum sinyallerinin modülasyonunda rol oynadığı (64, 65) ve hasar gören hücrelerdeki ATP salınımı (66) da ATP nin sinir sisteminde yalnızca bir nörotransmitter değil aynı zamanda hasar sinyal mekanizmasında da görevli olduğunu düşündürmüştür. Hasarlanan hücrelerden ATP açığa çıkması da ATP nin, lokal bir hasarın çevreye yayılmasına katkıda bulunup bulunmadığına dair çalışmaların yapılmasını sağlamıştır (6). Bu çalışmaların birinde omurilik hasarı sonrasında hasar bölgesinin merkezinde düşük ATP miktarı gözlenirken hasar çevresinde yüksek miktarda ATP salınımı gözlenmiştir (6, 67).

P2X reseptörlerinin tümü aktive olmaları sonucunda hücre içine iyon akışını sağlar, P2X7 reseptörü ise düşük ATP konsantrasyonlarında diğer P2X reseptörleri gibi iyon kanal görevi görürken yüksek ATP konsantrasyonların iyon akışına ek olarak hücre zarında apoptoz sürecinde de yer aldığı bilinen büyük porların açılmasına sebep olur (68).

Çevresel sinir sisteminde de ATP ve pürin reseptörleri nöropatik ağrı modelleri üzerinden çalışılmaktadır (69, 70). AKG deki P2X reseptörlerinin ifadesini mRNA düzeyinde inceleyen bir çalışmada P2X7 ifadesinin AKG nöronlarında olmadığı fakat satellite glia hücrelerinde olduğu gösterilmiştir (71).

4.4. Konneksin Kanalları (Oluklu Bağlantılar)

Oluklu bağlantılar hücreler arası haberleşmede elektrolit, metabolit ve ikincil haberci moleküllerinin geçişini sağlayan kanallara verilen isimdir (72). Oluklu bağlantılar omurgalılarda konneksin kanalları tarafından meydana gelmiştir (73). Konneksin kanalları seçici olmayan kanallardır ve hem iyonların hem de büyük moleküllerin, metabolitlerin geçişine izin verir (74). 21 adet alt üyeden oluşan konneksin kanalları birbirine benzer yapıdadır. Tüm üyelerde hücre içi amino ve karboksil ucu, 4 adet transmembran, 2 adet hücre dışı, 1 adet de hücre içi kıvrım bölgesi bulunmaktadır (75). Hücre içerisinde konneksinler altılı yapılar halinde bir araya getirilir ve hücre zarına bu şekilde taşınırlar (76). Hücre zarında bir arada bulunan konneksin kanallarının bitişik hücre ile karşı karşıya gelmesi sonucunda da bir oluklu bağlantı oluşmuş olur (77). Oluklu bağlantı oluşturmamış olanlar ise zarda kanal işlevi görür ve Konnekson olarak adlandırılırlar (78).

Oluklu bağlantıların açılıp kapanması hücre içi pH ve voltaj değişiklikleri, çeşitli kimyasallar ve translasyon sonrası modifikasyonlar ile düzenlenir (73). Voltaj değişimine bağlı olarak açılıp kapanma mekanizması iki farklı şekilde gerçekleşebilir. Oluklu bağlantı içerisindeki tek bir konneksin alt biriminin bir substrata karşı kapanması hızlı kapanma olarak tanımlanırken kanalın tümünün senkronize bir şekilde kapanması da yavaş kapanma olarak gösterilmiştir (79, 80).

Merkezi sinir sisteminde astrositler hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde sıklıkla çalışılmaktadır. Astrositlerin çevredeki hücreleri ve ortamı sürekli kontrol edebilmesi için oluklu bağlantılar bulundurmaları önemli özelliklerinden bir tanesi olarak kabul edilmektedir (81).

Fonksiyonel olarak astrositler ile benzer özellikler taşıdığı düşünülen satellit hücrelerinde yapılan Lusifer sarısı boyamaları da satellit hücrelerinin yoğunlukla çevreledikleri nöron ile, daha az miktarda da diğer satellit glia hücreleriyle aralarında oluklu bağlantılar olduğu gösterilmiştir (30).

Yine astrositlerdeki mekanizmaya benzer bir şekilde satellit glia hücreleri ile nöronlar arasında bulunan oluklu bağlantıların nöronun uyarılması sonucu ortamda artan ve fazla bulunduğu takdirde nöronda eksitotoksisteye yol açabilecek potasyum ve glutamati tamponladığı da düşünülmektedir (82).

4.5. Panneksin Kanalları

Omurgasızlarda bulunan İnneksin kanallarının homoloğu olan panneksin kanalları yapısal olarak konneksin kanallarına çok benzemektedir ve panneksin1, panneksin2 ve Panneksin3 olmak üzere toplamda 3 adet alt tipi bulunmaktadır (83). Homologları olan inneksinler ve yapısal benzerlikleri olan konneksinler hücreler arası oluklu bağlantı görevi görmelerine rağmen panneksinler yalnızca hücre zarı kanalı olarak davranmaktadırlar. Ayrıca, konneksin ve panneksinlerin benzer kimyasallar ile inhibe olması iki protein ailesinin de benzer açılıp kapanma mekanizmalarına sahip olduklarını düşündürmüştür (84). Fakat panneksin kanalları konneksin kanallarından farklı olarak hücreler arası bağlantılar oluşturmaz ve hücre içi potasyum, voltaj, pH değişiklikleri ve mekanik etki ile açılana kadar kapalı konumdadır (85, 86). Ayrıca panneksin ve konneksin kanallarının bir başka farklılığı da voltaj duyarlılıklarıdır, konneksin kanalları voltaj değişikliklerine karşı hassasken panneksinlerin voltaj duyarlılıklarının çok daha az olduğu bilinmektedir (87). Konneksinler kalsiyum konsantrasyonunun 1mM olduğu durumlarda kapalıyken kalsiyum tutucu bir ajanın varlığında açık konuma geçerler. Panneksinler ise 10mM a kadar yükselen kalsiyum konsantrasyonlarına herhangi bir tepki vermemiştir (86, 88). Bununla beraber P2Y1 reseptör aktivasyonu sonucunda kalsiyum değişimi ile açıldığı gözlenmiştir (89). Bu da panneksin dinamiğinde kalsiyumun tek başına etkili olmadığı göstermektedir.

Panneksin alt tiplerinden panneksin1 tüm dokularda yaygın olarak ifade edilirken Panx2 merkezi sinir sisteminde ve panneksin3 de kemik ve deride ifade

edilmektedir (87). Panneksinlerin hem fizyolojik hem de patolojik süreçlerde rol oynadığı bilinmektedir. Tat hücrelerinde voltaj değişikliği ile panneksin kanallarının açılıp hücreden ATP çıkışını sağladıkları gösterilmiştir (86). Yine eritrositler ile yapılan başka bir çalışma da hücrelerden ATP çıkışının panneksin kanalları üzerinden olduğunu göstermiştir (90). Bu bulgular nöronlarda görülen ATP çıkışının da benzer bir mekanizmayla olabileceğini düşündürmüştür.

İskemik durumda merkezi sinir sistemi nöronlarındaki panneksin kanallarının dinamiklerinin incelendiği bir çalışmada oksijen ve glikoz yoksunluğunun panneksin kanallarını aktive ettiği gösterilmiştir (91).

Trigeminal gangliyonda hem nöronlarda hem de satellit glia hücrelerinde panneksin1 ifadesi olduğu mRNA ve protein düzeyinde gösterilmiştir (92). Başka bir çalışmada da yine trigeminal gangliyonda inflamasyonun panneksin1 ifadesini artırdığı ve panneksin1 geninin silindiği durumlarda da aşırı duyarlılık durumunun ortadan kalktığı gösterilmiştir (93). AKG ile yapılan bir çalışmada da nöron ve satellitlerde hem panneksin1 hem de panneksin2 ifadesi görülmüştür ve boya alımının panneksin1 ve P2X7 tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (94) .

4.6. P2X7 – Panx1 – NMDAR İlişkisi

Hücre içi iyon konsantrasyonu değişimi, voltaj değişimi, mekanik stres gibi etkiler dışında panneksin1 kanallarının açılıp kapanması P2X ve NMDA kanalları tarafından kontrol edilir (9). P2Y reseptörlerinin de kalsiyum modülasyonu üzerinden panneksin1 kanallarını aktive ettiği gösterilmiştir (89). Bazı hücre tiplerinde P2X reseptörleri ile panneksin1 kanallarının bir arada bulunduğu da gösterilmiştir (95). Bu da P2X reseptörlerinin panneksin1 aktivasyonunu direk olarak sağlayabildiğini veya ortak bir aktivasyon mekanizmalarının olduğu iddiasını güçlendirmiştir. Aktive olan panneksin1 kanalı hücre içinden dışına ATP akışını sağlar. Hücre dışında artan ATP konsantrasyonu ise negatif geri besleme yaparak panneksin1 i inhibe eder ve normal haline döndürür (96).

P2X reseptörlerinin yüksek ATP konsantrasyonunda açtığı büyük porun panneksin1 olduğu varsayılmış ve bununla ilgili birçok çalışma yapılmıştır. panneksin1 ifade etmeyen hücrelerde de P2X reseptörlerinden bazılarında karboksil ucundaki bir yapısal değişiklik ile büyük por yapısının oluşması bu mekanizmanın panneksin1 den bağımsız bir mekanizma olduğunu savunmuştur (7). Aynı şekilde panneksin1 bloklayıcı kimyasalların P2X7 nin aktivasyonu sonrası büyük molekülleri geçirmesini inhibe edememiş olması da bunu destekler niteliktedir (8).

NMDA kanallarına bağlı panneksin1 aktivasyonu ise genellikle travmatik beyin hasarı gibi patolojik süreçlerde çalışılmıştır (97). (98)'de iskemi sonucu astrositlerden glutamat ve ATP salınımı olduğu ve bunun sonucunda da panneksin1 in aktive olduğu gösterilmiştir. Yine başka bir çalışmada NMDAR ın panneksin1 ve Src kinazlar ile bir araya gelip bir yapı oluşturduğu ve bu yapının bozulmasının iskemik hasar sonrası koruyucu olduğu gözlenmiştir (99).

5. MATERYAL VE METOD

5.1. Malzeme Listesi

Tablo 5.1.1: Malzeme Listesi

Malzeme	Firma – Katalog No
RPMI 1640	Sigma-R0883
Neurobasal - A	Gibco-A10888-022
Antibiyotik – Antimikotik	Sigma-A5955
GlutaMAX	Gibco-35050061
B27	Gibco-17504044
Kolajenaz	Sigma-C7657
Tripsin-EDTA	Sigma-59418C
DNaz	Sigma-D4513
Hanks Balanced Salt Solution	Sigma-H9269
Poly L Lysine	Sigma-P6282
Laminin	Sigma-L2020
Percoll	Sigma-P4937
FBS	Sigma-F4135
Tripsin inhibitörü	Sigma-T6522
PBS	Sigma-P4417
Tween-20	Sigma-P9416
Triton-X	Sigma-T8787
Goat Serum	Sigma-G9023
BSA	Sigma-A9418
Sodyum Azit	Sigma-S8032
P2X7 sıçan antikoru	Novus-NBP1-40894
Panneksin-1 tavşan antikoru	ThermoFisher-487900
BBG	Sigma-B0770
ATP	Sigma-A2383
Carbenoxolone	Sigma-C4790
Probenecid	Sigma-P36400

Trizma base	Sigma-T1503
HCl	Sigma-H1758
NaOH	Sigma-221465
EDTA	Sigma-E9884
PFA	Sigma-15127
488 goat anti rabbit	Abcam-ab150077
568 goat anti rat	Abcam-ab175476
AP5	Sigma-A5282
DAPI	Sigma – D9542
YO – PRO 1	ThermoFisher – Y3603

5.2. Fare Hatları

Boya alım deneylerinde 6-8 haftalık erkek Balb/c farelerden izole edilen AKG hücreleri kullanılmıştır. Kalsiyum deneyleri için ise Vglut-ires-cre ve Ai96(RCL-GCaMP6s) fare hatları çaprazlanarak glutamaterjik nöronlarında GCaMP6s ifade eden ikili transgenik hatlar üretildi. GCaMP proteini GFP ve Kalmodulin proteinlerinin birleşiminden oluşmuştur. Normal kalsiyum konsantrasyonunda GFP sinyali baskılanıp hafif bir floresan sinyali verirken kalsiyum bağlanması sonucunda Kalmodulin yapısal değişikliğe uğrar ve bu da GFP sinyalinin baskılanmasını kaldırıp ışımının gerçekleşmesini sağlar.

5.2.1. DNA izolasyonu ve genotipleme

Genotipleme için öncelikle 1 aylık olan yavru fareler annelerinin kafeslerinden alınıp dişi erkek ayrımları yapıldı ve kısa süreli Isoflurane anestezisi altındayken kulaklarından doku örneği alındı. Dokular PZR tüplerindeki 75 µl 25 mM NaOH / 0.2 mM EDTA'dan oluşan lizis solüsyonu içerisine alındı. DNA elde etmek için dokular Thermocycler cihazına yerleştirildi ve Jackson'ın önerdiği hızlı (kirli) DNA izolasyon protokolü kullanıldı.

Tablo 5.2.1.1: Jackson Kirli DNA izolasyonu Protokolü

Sıcaklık (C)	Süre (dk)
98	60
15	∞

Thermocycler cihazından alınan tüplere 75 µl 40mM Tris /HCl (pH:5.5) eklenip lizis solüsyonunun nötralizasyonu sağlandı. Örnekler 4000g de 5 dakika santrifüjlendi, süpernatant kısmından 100 µl alındı ve önceden otoklavlanmış olan tüplere aktarılıp PZR yapılarına kadar +4 °C de saklandı. PZR reaksiyonunda Jackson'ın önermiş olduğu primerler kullanıldı.

Tablo 5.2.1.2: GCaMP ifadesinin kontrolü için kullanılan primer listesi

Primer Kodu	Primer dizisi
19908 (mutant ileri primer)	ACG AGT CGG ATC TCC CTT TG
oIMR9021 (geri primer)	CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC

Tablo 5.2.1.3: Cre ifadesinin kontrolü için kullanılan primer listesi

Primer kodu	Primer dizisi
13126 (ileri primer)	CGG TAC CAC CAA ATC TTA CGG
11642 (mutant geri primer)	ATC GAC CGG TAA TGC AGG CAA

Her örnek için iki ayrı PZR karışımı (Cre ve GcaMP) hazırlandı. Sadece cre veya sadece GCaMP reaksiyonlarında pozitif bant görülen fareler üretim için ayrılırken her iki reaksiyonda da pozitif bantın görüldüğü ikili transgenik fareler kalsiyum deneyleri için saklandı.

Tablo 2.2.1.4: Cre için kullanılan PZR reaksiyon bileşenleri

PCR Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µl)
Quickload Master Mix (2x)	5
13126	0.5
11642	0.5
ddH ₂ O	3
DNA	1

Tablo 5.2.1.5: GCaMP için kullanılan PZR reaksiyon bileşenleri

PCR Reaksiyon Bileşenleri	Miktar (µl)
Quickload Master Mix (2x)	6
19908	0.5
oIMR9021	0.5
oIMR9020	0.3
ddH ₂ O	3.7
DNA	1

Tablo 5.2.1.6: Ortak PZR reaksiyonu protokolü

Sıcaklık	Süre
95 C	1:00
95 C	0:25
60 C	0:20
68 C	0:35
2. adıma dön (35x)	
72 C	3:00

5.3. AKG Kültürü

5.3.1. Kültür öncesi hazırlıklar

Kültür yapılmadan bir gün önce 35 mm lik cam tabanlı petrilerin tabanları PALM microdiseksiyon cihazının UV lazeri ile işaretlendi. İşaretlenen petriler 100 µl %1 poly L lisin eklenip 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda 2 kere steril ddH₂O ile yıkanan petrilere 150 µl %1 Laminin eklendi ve gece boyunca 37 °C de bekletildi. Ekim aşamasına gelindiğinde 2 kere steril ddH₂O ile yıkayıp ekim işlemi için hazır hale getirildi. Kültür aşamalarında kullanılacak olan vasatlar taze olarak hazırlandı.

Tablo 5.3.1.1: Diseksiyon ve yaşam vasatları bileşenleri

Diseksiyon vasatı		Yaşam vasatı	
RPMI 1640	%1 Antibiyotik	Neurobasal A	%1 Antibiyotik
	%1 GlutaMAX		%1 GlutaMAX
			%2 B27

5.3.2. AKG diseksiyonu

Transgenik ve/veya Balb/c fareler CO₂ solutma yöntemi ile sakrifiye edildi. Kültürde eritrosit olmasını engellemek için Fare 70% EtOH ile yıkandıktan sonra aort atardamarı kesilip fazla kanın akması sağlandı. Kostalar dikkatli bir şekilde AKG larına zarar vermeden disekte edilip steril ddH₂O ile bir kez yıkandıktan sonra soğuk tabla üzerindeki diseksiyon vasatı içerisine alındı. 35 adet (+5, -5) AKG u, Carl Zeiss 0.5x stereo mikroskop altında kostalardan, periferik ve santral uzantıları kesilerek ayrıldı.

5.3.3. Hücre eldesi

AKG ları %1 Tip I kolajenaz içeren yaşam vasatı içerisinde 37 °C de, %5 CO₂ de 40 dakika boyunca inkübe edildi. Süre sonunda dikkatli bir şekilde 1 ml HBSS ile 3 kez yıkayıp kolajenaz uzaklaştırıldı ve 10x Tripsin EDTA 1x olacak şekilde 500 ul yaşam vasatına alınıp 15 dakika 37 °C de, %5 CO₂ de inkübe edildi. İnkübatörden

alınan tüp içerisine %1 DNAz I eklendi ve sırasıyla 1000 µl pipet ucu, 200 µl pipet ucu ve son olarak da 2 kez insülin iğnesi olmak üzere doku homojenize olana kadar (10 -15 dakika) aşamalı tritürasyondan geçirildi. Bu şekilde tekrar 37 °C 5% CO₂ ye alınan hücreler 30 dakika – 1 saat arasında inkübe edildi. İnkübasyon süresi dolduğunda 1000 rpm de 3 dakika santrifüj ile Tripsin EDTA ve DNAz uzaklaştırılıp hücreler %9 FBS, %6 Tripsin inhibitörü içeren yaşam vasatında süspanse edildi. Sırasıyla 60%, 35% ve 10% olmak üzere Percoll tabakaları hazırlandı ve hücreler en üst tabakanın üzerine dikkatlice eklenip 1700 rpm de 20 dakika santrifüje alındı. 60% ve 35% katmanları arasından 750 µl Percoll – yaşam vasatı karışımı çekilip 3 ml yaşam vasatı eklenerek yıkandıktan sonra hücreler sayıldı ve her petride 1500 – 2000 arasında nöron olacak şekilde 200 µl olarak petrilerin tabanlarının çizilmiş olduğu kısımlara ekildi. Hücreler yapıştıktan sonra vasatları 1 ml e tamamlandı.

5.4. ATP ye Bağlı Boya Alım Deneyleri

5.4.1. Farklı konsantrasyonlardaki ATP nin zamana bağlı etkisi

AKG kültürleri görüntülenmeden önce 30 dakika boyunca 10 µM YO-PRO-1 ile inkübe edildi. Petri merkezinden 20x objektif ile 3 boyutlu ve 5x5 kare olacak şekilde 488nm lazer ile konfokal görüntüleri alındı. Kültürler düşük (100 µM) ve yüksek konsantrasyonlu (1 mM) ATP uygulamasından sonra farklı zaman aralıklarında tekrar görüntülendi. Nöron ve glia hücrelerinin hücre zarı dinamikleri zamana bağlı boya alım analizleri yapılarak incelendi ve hücre zarı geçirgenliğinin kontrol gruplarına kıyasla en fazla olduğu zaman kritik nokta olarak belirlendi.

5.4.2. ATP nin nöron ve glialarda aktive ettiği kanalların bulunması

Hücreler ATP inkübasyonu öncesinde P2X7, konneksin ve panneksin1 kanalları hedef alınarak sırasıyla 1 µM BBG, 50 µM CBX, 5 µM CBX ve 1 µM Probenecid ile blokladı ve ATP eklendikten sonra kontrol gruplarına kıyasla boya alımının maksimum olduğu belirlenen kritik zamanda tekrar görüntülendi. Boya alım

analizlerinin sonuçlarına göre nöron ve glia hücrelerinde ATP uygulaması sonucu aktifleşen kanallar belirlendi.

5.5. Hücre Kültüründe İkincil Ölüm Deneyleri

5.5.1. Nörit hasarının (aksotomi) uygulanması

Zaman aralıklı canlı görüntülemenin yapılmayacağı deneylerde aksotomi uygulaması için morötesi lazer (Carl Zeiss PALM MicroBeam) kullanıldı. Aksotomi uygulaması inkübatör hazneli mikroskop tablası kullanılarak, fizyolojik şartlara (37 °C ve 5% CO₂) uygun şekilde yapıldı. Canlı görüntüleme yapılacak olan deneylerde ise Carl Zeiss LSM 780 Konfokal mikroskobuna fiziksel olarak eklenmiş olan Chameleon Kızılötesi Femtosaniye lazeri aksotomi için kullanıldı.

Femtosaniye lazeri, seçilen hücelere stabil ve tekrarlanabilir aksotomi uygulanabilmesi için optimize edildi. (Objektif: 20x, dalga boyu:793nm, iterasyon: 30, tarama hızı: çekim ile senkronize, lazer gücü: %60) Bu hasar modeli canlı kalsiyum görüntüleme ve boya alım deneylerinde kullanıldı. Mikroskop yazılımında zaman dizisi aralığı 0 ms olarak belirlendi ve YO-PRO-1 ile GCaMP görüntülemelerinde konfokal mikroskobun 488nm, PI görüntülemek için ise 561nm lazeri kullanıldı. Hasar verilecek olan nöronlar belirlendi ve nöritleri işaretlenerek canlı görüntüleme yapılırken eş zamanlı olarak hasar verildi. Tüm deneylerde aksotomi çevresindeki nöron ve glia hücreleri seçilerek analiz edildi.

5.5.2. Aksotomi sonrası ikincil ölüm oranlarının belirlenmesi

Kültürlerin 48. saatinde ölü hücrelerin çekirdeklerini boyayan Propidium İyodür (PI), besi yeri içerisindeki oranı %5 olacak şekilde petrilere eklendi ve 20x objektif ile merkezden 10x10 karelik aydınlık alan ve floresan görüntüleri alındı. Görüntü alındıktan sonra her petrinin merkezinden 10 adet canlı nöron seçildi ve yaklaşık bir gövde boyu mesafeden akson hasarı verildi. Hasardan 24 saat sonra aynı ayarlar ile aynı bölgeden tekrar 10x10 kare alındı ve gruplar arasındaki ölüm oranları karşılaştırıldı. Ölüm belirteci olarak PI kullanılmakla birlikte ertesi gün aynı bölgeden

alınan görüntülerde bulunamayan hücreler de ölü olarak kabul edildi. Aynı deneyler hasar öncesi ve sonrası 1 er saat olmak üzere P2X7 ve panneksin1 kanallarının kimyasal inhibitörleri (sırasıyla 1 μ M BBG, 1 μ M Probenecid) kullanılarak tekrarlandı. Kontrol olarak aynı miktarda kimyasalların çözülmüş olduğu steril ddH₂O kullanıldı.

5.5.3. Hücre zarı protein miktarlarının karşılaştırılması

10 adet hücrenin hasarlandığı petripler hasardan 1, 6, 12 ve 24 saat sonra 4% PFA ile fikse edilip anti-Panx1 ve anti-P2X7 antikoları ile işaretlenip 5.5.3.1’de ayrıntılı olarak anlatılan immunositokimya protokolü uygulanarak boyandı. Hasarlanan her hücrenin çevresindeki nöron ve glia hücreleri 40x yağlı objektif kullanılarak 3 boyutlu olarak 488nm ve 561nm lazer ile görüntülendi.

5.5.3.1. Immunositokimyasal boyama protokolü

Hücrelerin içerisinde bulunduğu yaşam vasatı çekilerek petripler 2 kere 1 ml 1x PBS ile yıkandı ve 750 μ l %4 lük PFA eklenerek oda sıcaklığında 15 dakika fikse edildi. Süre sonunda PFA çekilerek atıldı ve 1ml 1x PBS ile 2 kere yıkandı. Bloklama için 3:100 BSA, 1:100 keçi serumu, 3:1000 Sodyum Azit içeren PBS eklenip oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi. Bloklama sonrasında aynı solüsyon içerisinde çözülmüş birincil antikolar (tavşan anti-Panx1: 1:100, sıçan anti-P2X7: 1:500) her petriye eklendi ve +4 °C de çalkalama kabı üzerinde gece boyu inkübe edildi. Ertesi gün 3 kere 5er dakika çalkalama kabı üzerinde PBS ile yıkanan petrilere yine aynı solüsyon içerisinde çözülmüş ikincil antikolar (keçi anti-tavşan Alexa Fluor 488 nm, keçi anti-sıçan Alexa Fluor 568 nm) eklendi ve oda sıcaklığında 3 saat çalkalama kabı ile inkübe edildi. Süre bitiminde 5 dakika boyunca 1x PBS ile 4 kere yıkanan petripler 500 μ l, 1 μ g/ml DAPI eklenip 3 dakika oda sıcaklığında bekletildi, 3 dakika sonunda DAPI petriden çekildi ve 1 kere 5 dakika 1x PBS ile yıkandı. Görüntülenene kadar 3:1000 Sodyum Azit içeren PBS içerisine alınıp +4 °C ‘de bekletildi.

5.5.4. Aksotomi sonrası ikincil hasara bağı boya alım analizleri

Tüm canlı görüntüleme deneyleri konfokal mikroskop ile, 37 °C ve 5% CO₂ altında, kültürlerin 48. saatinde gerçekleştirildi. Aksotomi sonrası çevredeki hücrelerin zar dinamiklerinin incelenmesi için boya alım deneyleri yapıldı. Bu deneylerde, hücre zarındaki seçici olmayan büyük porların açılıp kapanmasının göstergesi olarak YO-PRO-1 iyodür (491/509) kullanıldı. Hücrelere son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde YO-PRO-1 eklendi ve hücreler 30 dakika sonunda 3 boyutlu ve 5x5 kare olarak 488nm lazer, 20x objektif ile görüntülendi. İlk görüntüler sonrasında hasar grubunda petri merkezinde seçilen 10 adet hücreye kızılötesi lazer ile bir hücre gövdesi boyu mesafeden aksotomi yapıldı, kontrol gruplarında ise yine seçilen hücrelerin kenarlarına aynı ayarlarda ve sayıda atışlar yapıldı. Bir petrideki tüm kesimler gerçekleştirildikten sonra (~15 dakika) tekrar aynı ayarlarda konfokal görüntüleri alındı. Hücre dinamiklerindeki değişimin P2X7 reseptörünün hücre zarında açtığı büyük pordan kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi için kültürler boya eklenmeden 1 saat önce %5 CO₂, 37 °C'de 1µM BBG ile inkübe edildi. Hem glialar hem de nöronlarda hasar bölgesine olan mesafe de göz önünde bulundurularak boya alım analizleri gerçekleştirildi.

5.5.5. Aksotomi çevresindeki nöronların kalsiyum değişiminin belirlenmesi

Kalsiyum görüntüleme deneylerinde Vglut2-GCaMP ikili transgenik fare hattından alınan AKG kültürleri kullanıldı. Her petride birbirinden uzak noktalar seçilerek her bir çerçevede tek bir nörona aksotomi uygulandı ve bu esnada 488 nm lazer kullanılarak zaman aralıklı canlı görüntüleme yapıldı. Hasar verilecek olan her hücre ve çevresindeki hücreler hasar öncesi kontrol atışı yapılarak aynı ayarlarda görüntülendi. Böylece her hücre için spontan kalsiyum aktivitesinin kontrolü sağlanmış oldu. Aksotomi yapılan nörona komşu olan nöronlardaki kalsiyum değişimleri analiz edildi.

5.5.6. Kalsiyum – ikincil ölüm korelasyonunun incelenmesi

Aksotomi yapılan nöronun etrafındaki komşu nöronlarda görülen kalsiyum değişiminin hücre ölümüne katkısının araştırılması için kalsiyum görüntülemesi yapılacak olan hücrelere görüntümeden 5 dakika önce PI eklendi ve hasar verildikten 24 saat sonra aynı hücreler tekrar bulunarak 561nm lazer ile konfokal görüntüleri alındı ve aksotomi çevresindeki nöronların ölüm oranı analiz edildi. Aynı deneyler, hasar öncesinde NMDA reseptörleri ve konneksin kanalları bloklanarak (sırasıyla 100µM AP5, 5uM CBX) tekrar gerçekleştirildi ve kalsiyuma bağlı ölüm oranları kontrol grubuyla kıyaslandı.

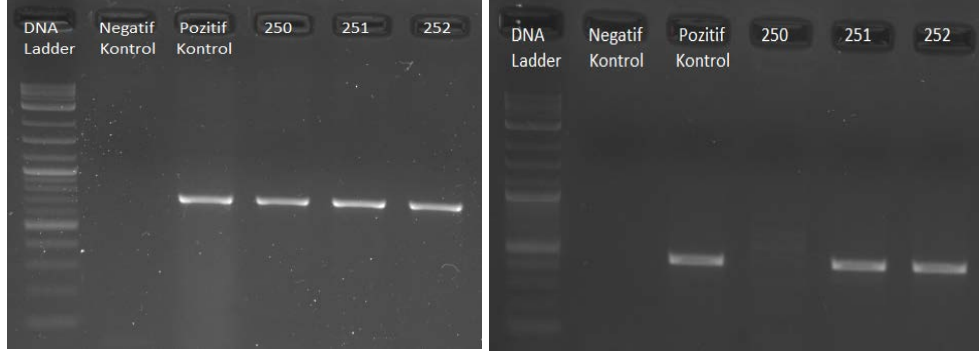
5.6. Görüntülerin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme

Alınan tüm görüntüler Fiji (Fiji is Just ImageJ) programı ile analiz edildi. Ölümcül hücre sayımı yapılırken hasar öncesi ve sonrası aynı bölgeden alınan görüntülerde, aynı hücrelerin bulunması “ROI manager” aracı yardımıyla gerçekleştirildi. 3 boyutlu görüntülerin analizleri ise maksimum intensite projeksiyonu yapılmış görüntüler üzerinde, yine “ROI manager” aracı ile hücre çevrelerinin seçilmesi ile yapıldı

Fijiden alınan ham veriler MS Excel üzerinde işlenerek (zaman, merkeze yakınlık vb. Parametrelerin tayini) tüm istatistiksel testler (t Test, one-way ANOVA, chi kare) SPSS ve GraphPad Prism ile yapılarak grafikler de yine GraphPad Prism kullanılarak oluşturuldu.

6. BULGULAR

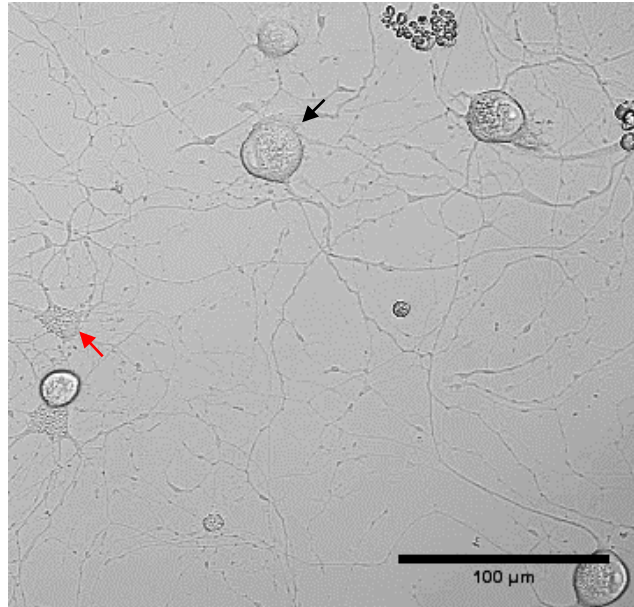
6.1. Genotipleme Sonuçları



Resim 6.1.1: Cre (sol) ve GCaMP (sağ) ifadesi için yapılan PZR sonucu agaroz jel görüntüsü. 250 numaralı farede yalnız Cre ifadesi vardır ve üretim için ayrılmıştır. 251 ve 252 numaralı fareler ise ikili transgenik olduğu için kalsiyum görüntüleme deneylerinde kullanılmak üzere ayrılmıştır.

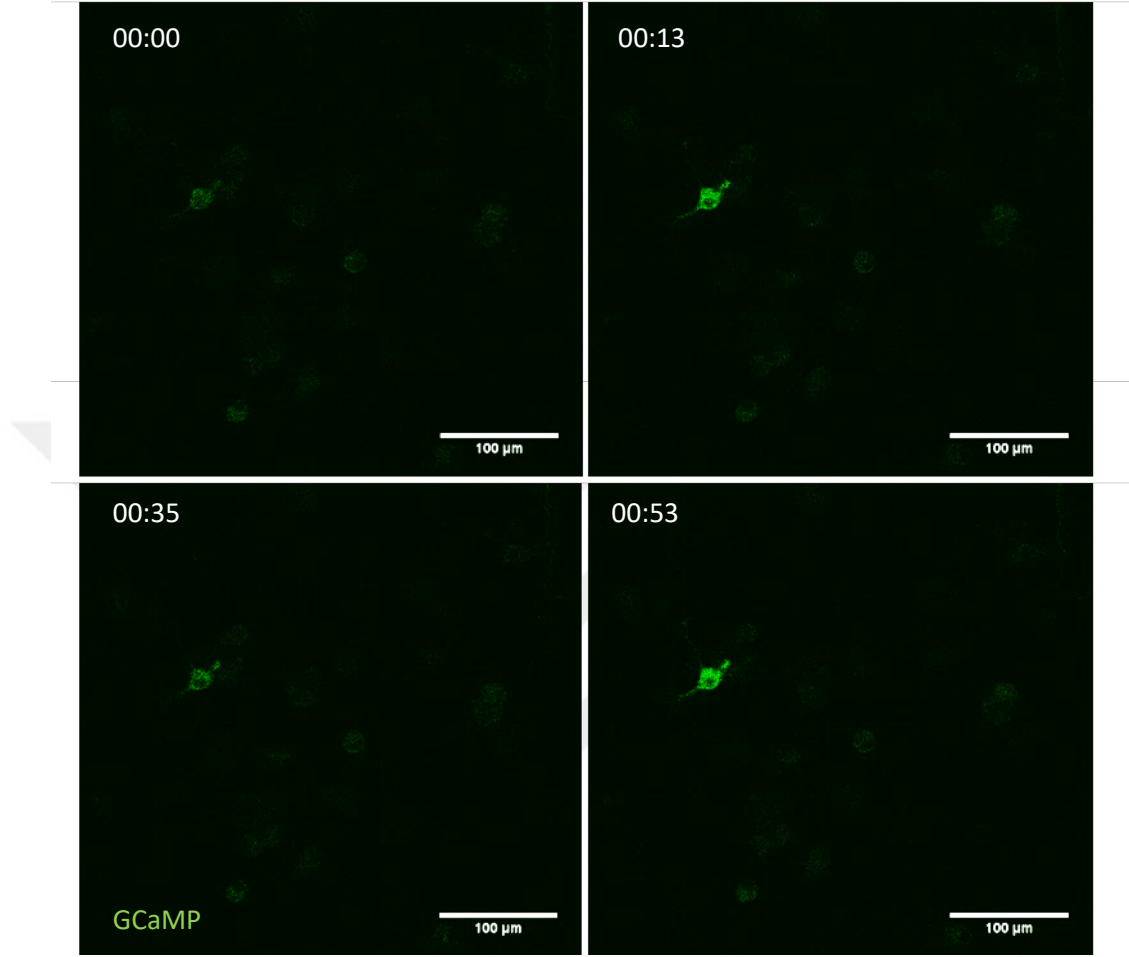
6.2. AKG Kültürü

AKG Nöronları ekimden ~2 saat sonra nörit uzatmaya başladı ve kültürün 48. saatinde aksotomi için yeterli boya ulaştı ve satellit hücreleri de 48. saatte nöronların çevresinden uzaklaşmaya başladı.



Resim 3.2.1: AKG kültürünün 48. saatinde nöron ve gliaların temsili görüntüsü (siyah ok nöronu, kırmızı ok gliayı göstermektedir.).

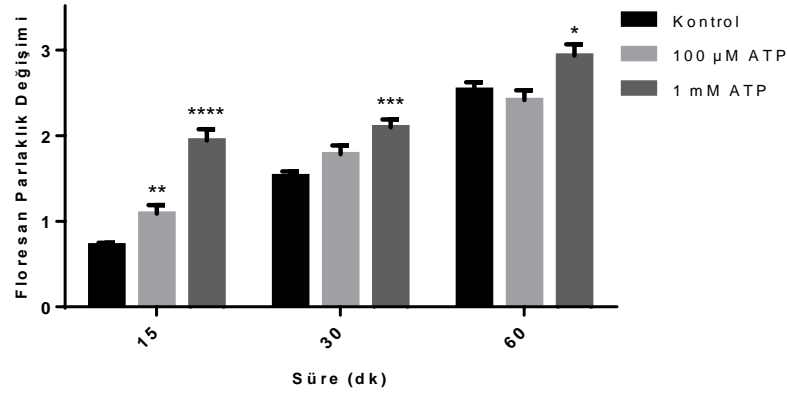
Hücre kültürünün ilk günlerinde AKG nöronlarında nadir olarak spontan kalsiyum aktivitesi gözlemlendi (Şekil 6.2.2).



Resim 6.2.2: AKG nöronlarında spontan kalsiyum aktivitesinin temsili görüntüsü.

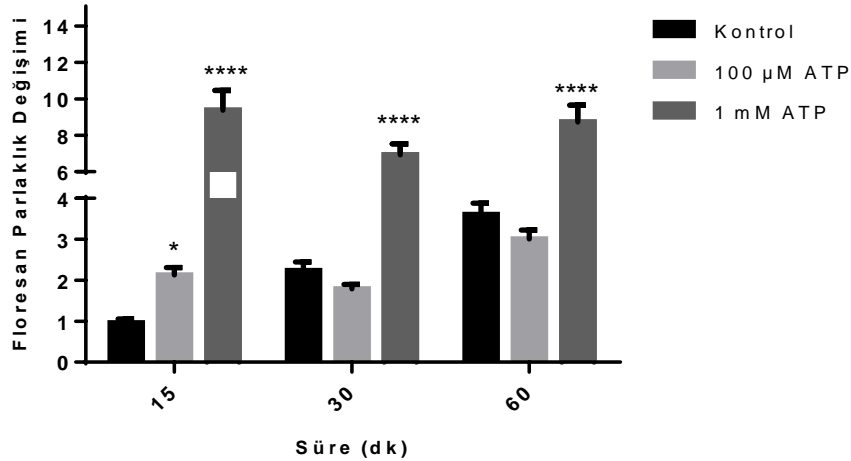
6.3. ATP nin Hücre Zarı Geçirgenliği Üzerindeki Etkisi

Nöron ve gliaların hücre zarında ATP ye bağlı olarak büyük bir por açılıp açılmadığının tespiti için ortama verilen yüksek ve düşük konsantrasyonlu ATP nin boya alımını nasıl etkilediği incelendi.



Şekil 6.3.1: ATP uygulaması sonrası nöronlardaki boya alım miktarlarının gösterilmesi. Anlamlılık değerleri kontrol grubuna kıyasla verilmiştir (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

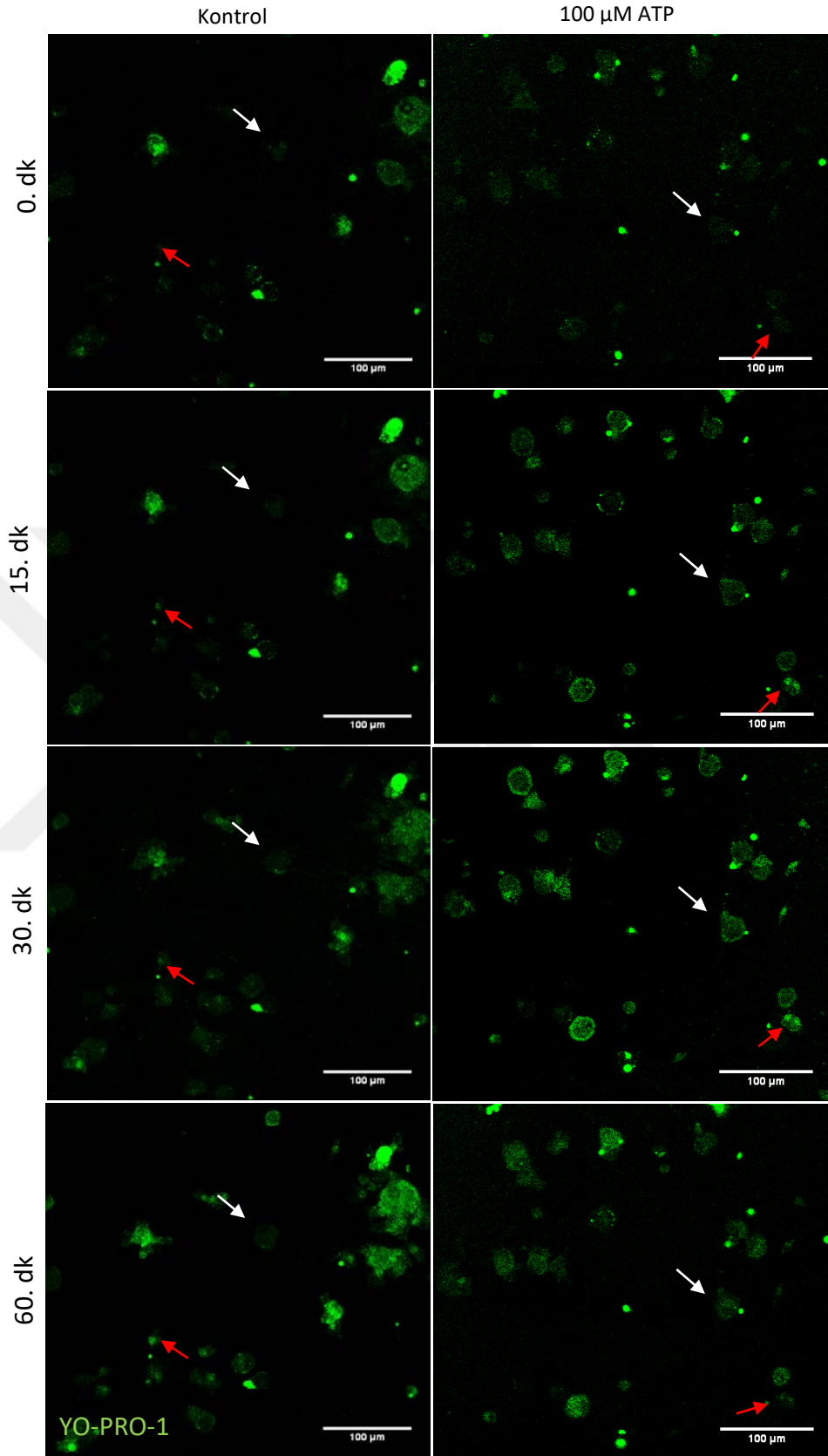
Boya alım analizi protokolüne uygun bir şekilde hazırlanan hücreler, ATP uygulaması öncesinde ve uygulamadan 15, 30 ve 60 dakika sonra 5x5 kare ve 3 boyutlu olarak konfokal mikroskop ile görüntülendi. Boya alım miktarları, hücre içerisinde ölçülen floresan parlaklık değişiminin başlangıçta ölçülen değere olan oranı ile değerlendirilmiştir. ATP nin etkisini spontan boya alımıyla kıyaslayabilmek için kontrol olarak kültürler ATP yerine steril ddH₂O eklenmiştir.



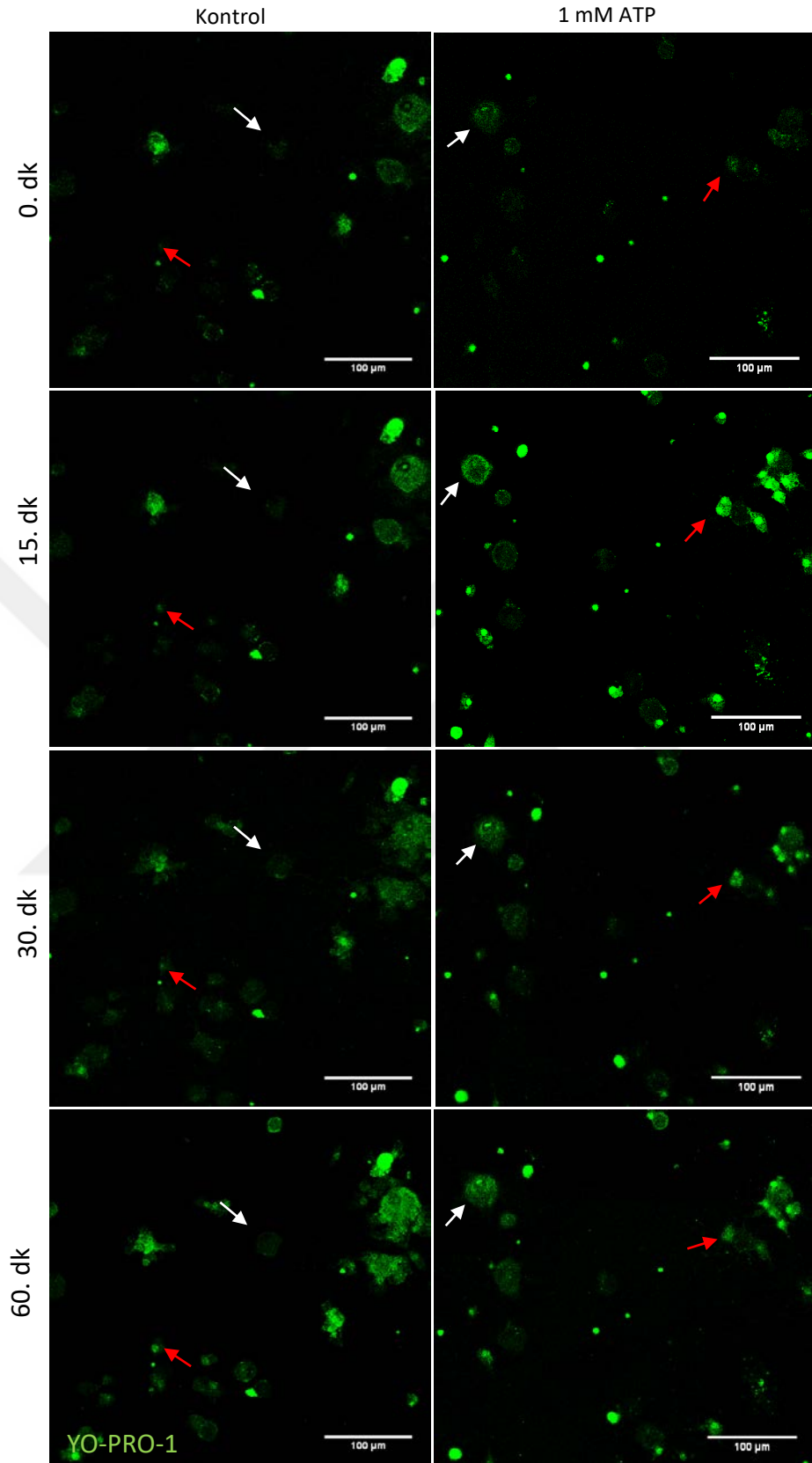
Şekil 6.3.2: ATP uygulaması sonrası glialardaki boya alım miktarlarının gösterilmesi. Anlamlılık değerleri kontrol grubuna kıyasla verilmiştir (*: $p < 0.05$, ****: $p < 0.0001$).

Ortamdaki ATP hem nöron hem de glia hücrelerindeki boya alım miktarlarını kontrol grubuna kıyasla arttırmıştır. Bu artışın 1mM ATP uygulamasında glialarda nöronlara kıyasla 3,6 kat fazlayken 100µM ATP uygulandığında 1,5 kat fazla olduğu gözlenmiştir.

1mM ATP uygulandığında hem glia hem de nöronlarda daha uzun süreli boya alımı gözlenmiştir. 100µM ATP uygulaması ise her iki hücre tipi için de sadece ilk 15 dakikada anlamlı bir artan boya alımına neden olurken zamanla kontrol seviyelerine gerilemiştir. Bu yüzden düşük ATP değişimlerinin de gözlenebilmesi için bundan sonraki deneylerde ilk 15 dakika kritik nokta olarak belirlenmiş ve hem hasar hem de ATP deneyleri bu süre zarfında gerçekleştirilmiştir.



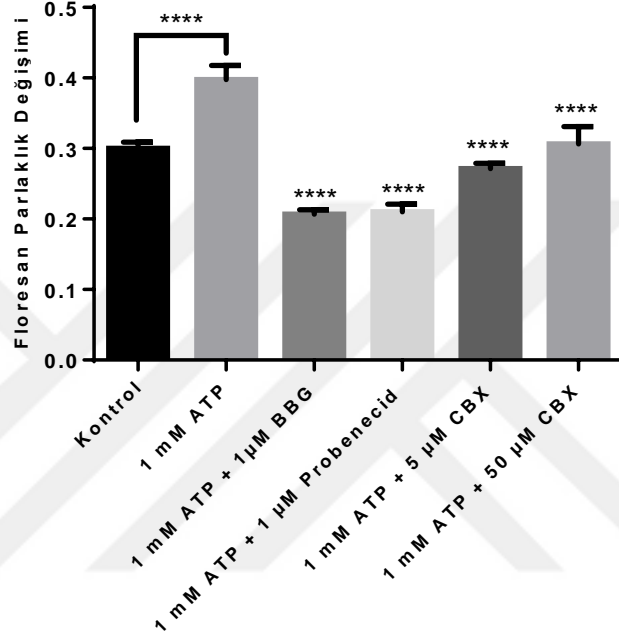
Resim 6.3.1: 100 μM ATP uygulaması sonucu zamana bağlı boya alım analizleri. Nöronlar beyaz ok, glialar kırmızı ok ile gösterilmiştir.



Resim 6.3.2: 1 mM ATP uygulaması sonucu zamana bağlı boya alım analizleri. Nöronlar beyaz ok, glialar kırmızı ok ile gösterilmiştir.

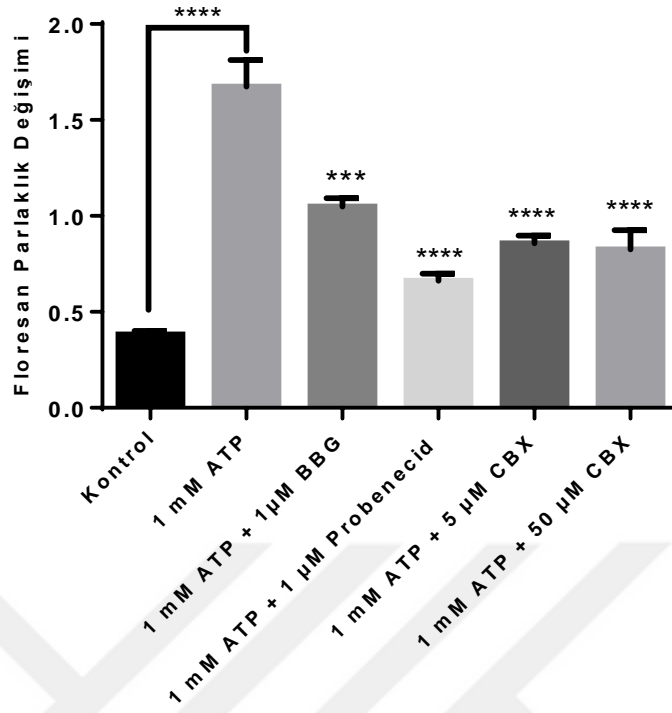
6.4. ATP Uygulamasının Hücrelerde Aktive Ettiği Kanalların Tespiti

Belirlenen kritik nokta (15.dk) süresince uygulanan ATP nin hücrelerde hangi kanallar yoluyla büyük bir por açtığı ve/veya açılan porun tespiti için deneyler P2X7 reseptörleri, panneksin1 kanalları ve konneksin kanallarının inhibitörleri varlığında tekrarlanmıştır.



Şekil 6.4.1: ATP uygulamasının nöronlarda hangi kanalların aktivasyonu ile boya alımını artırdığının gösterilmesi. Anlamlılık değerleri ATP grubuna kıyasla verilmiştir (****: $p < 0.0001$).

P2X7 reseptörünün ve panneksin1 kanalının ayrı ayrı bloklanması nöronlardaki boya alımını kontrol seviyelerinin altına düşürmüştür. Konneksin kanallarını bloklamak için 50 µM CBX kullanılırken, panneksin1 kanalını bloklamak için 5 µM Carbenoxolone (CBX) kullanılmasından yola çıkarak 50 µM CBX in aynı zamanda panneksin1 kanallarını da blokladığı düşünülmüş ve bu yüzden iki farklı konsantrasyon uygulaması birbiriyle kıyaslanarak konneksin kanallarının etkisi incelenmiştir. İki grup arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

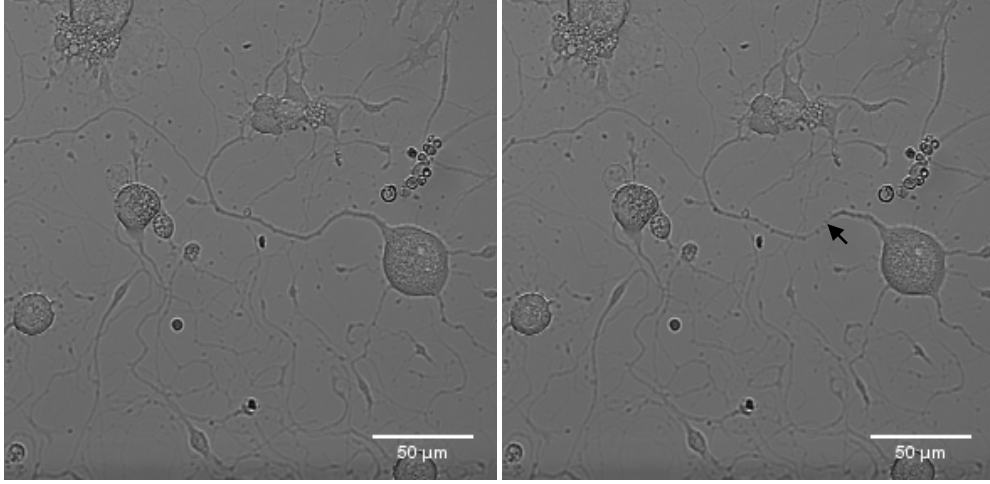


Şekil 6.4.2: ATP uygulamasının glialarda hangi kanalların aktivasyonu ile boya alımını artırdığının gösterilmesi. Anlamlılık değerleri ATP grubuna kıyasla verilmiştir (***: $p < 0.001$, ****: $p < 0.0001$).

Gliyalardaki ATP uygulamasına bağlı boya alımının da P2X7 reseptörleri ve panneksin1 kanalının bloklanması ile anlamlı bir şekilde azaldığı gösterilmiştir. panneksin1 kanallarının bloklanması P2X7 reseptörünün bloklanmasına kıyasla boya alımını daha fazla düşürmüştür ($p < 0.001$). Konneksin kanallarının ise sürece bir etkisi gözlenmemiştir.

6.5. Aksotomi Modelinin Oluşturulması

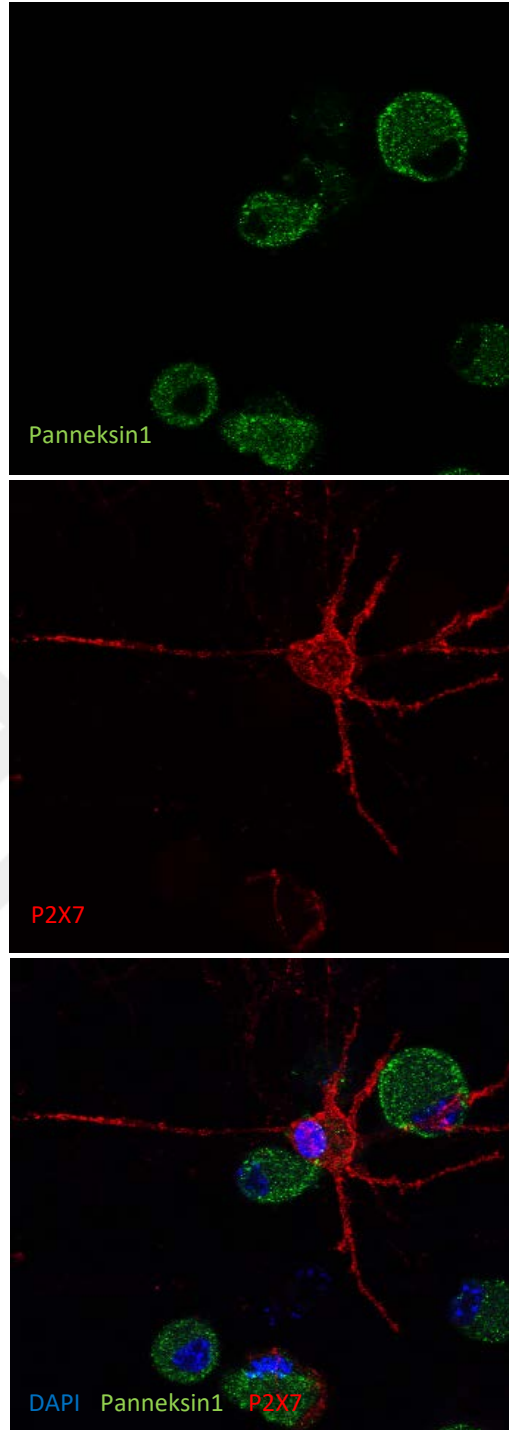
İkincil ölümün tespiti için oluşturulan in-vitro aksotomi modelinde hücrelerde canlı görüntüleme yapılmıyacaksa PALM MicroBeam, canlı görüntüleme yapılacaksa Konfokal mikroskobu ile Femtosaniye lazeri kullanıldı (Şekil 6.5.1).



Resim 6.5.1: Femtosaniye lazer aksotomisinin temsili görüntüsü (Sol: aksotomiden önce, sağ: aksotomiden sonra, aksotomi yapılan bölge siyah ok ile gösterilmiştir).

6.6. Aksotomi Yapılan Hücrelerin Çevresindeki Hücrelerin Protein Miktarlarındaki Değişim

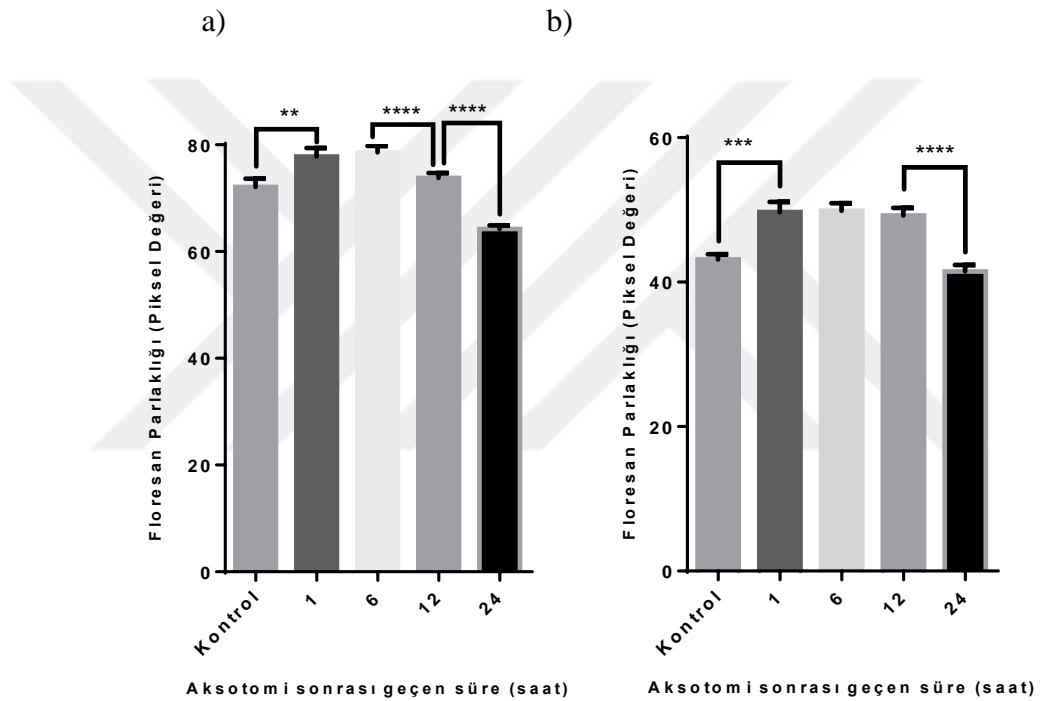
Hasar sonrası hem glia hem de nöronlarda hücre zarındaki protein miktarları zamana bağlı olarak immunositokimyasal boyamalar ile incelenmiştir. Petri merkezinde 10 adet nöronun hasarlandığı gruplar hasardan 1 saat, 6 saat, 12 saat ve 24 saat sonra fiksenip P2X7 reseptörü ve panneksin1 kanalına karşı antikorlar ile boyanmıştır. Hasar verilen nöronların çevresindeki hücrelerin 3 boyutlu görüntüleri alınarak P2X7 ve panneksin1 miktarları analiz edilip gruplar kendi aralarında kıyaslanmıştır. Yapılan immunositokimya boyamaları sonucunda nöronlarda P2X7 ifadesine rastlanmamıştır (Resim 6.6.1).



Resim 6.6.1: Nöron ve glialardaki panneksin1 ve P2X7 reaktivitesinin kontrol preparatındaki temsili görüntüsü.

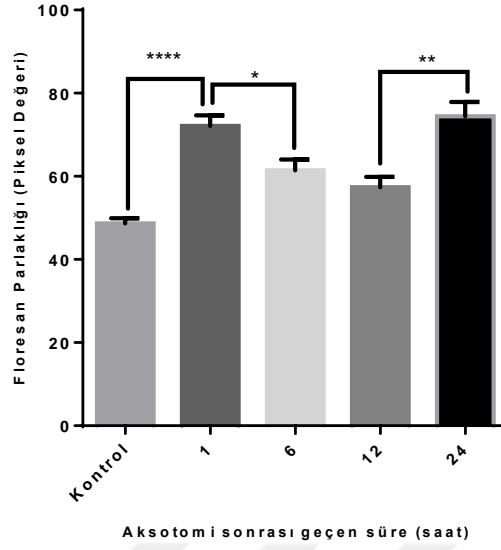
Hem nöron hem de glia hücrelerinde panneksin1 miktarlarının benzer şekilde değiştiği gözlemlenmiştir (Şekil 6.6.2a). Nöronlarda hasar sonrası ilk saatte (n=163) artış gösterip 6. saate (n=220) kadar sabit kalmış ve 12. Saatte (n=352) gerileyip 24. Saatte (n=222) ise kontrol seviyelerinin (n=158) de altına düşmüştür (p<0.0001).

Glia hücrelerinde de panneksin1 miktarında 1. saatten (n=174) itibaren artış gözlenirken, 6. saatte (n=135) ve 12. saate kadar (n=143) herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Hasarın 24. saatinde (n=125) ise panneksin1 seviyeleri kontrol seviyelerine (n=355) kadar gerilemiştir (Şekil 6.6.2b).



Şekil 6.6.1: Aksotomi yapılan hücelere komşu a) nöronların ve b) gliaların hücre zarındaki panneksin1 miktarının zamana bağlı değişiminin floresan parlaklık değeri ile gösterilmesi (**: p<0.01, ****: p<0.0001).

Glia hücrelerinin hücre zarındaki P2X7 değişimi ise daha kompleks bir trend göstermektedir (Şekil 6.6.2). Hasar sonrası ilk saatte (n=170) P2X7 reseptörünün hücre zarındaki miktarı da panneksin1 e benzer şekilde kontrol grubuna (n=355) kıyasla bir artış göstermiştir. Fakat 6. saatte (n=136) azalıp 12. saate (n=143) kadar sabit kalıp 24. saatte (n=125) ise tekrar artış göstermiş ve kontrol seviyelerinin de üzerine çıkmıştır (p<0.0001).

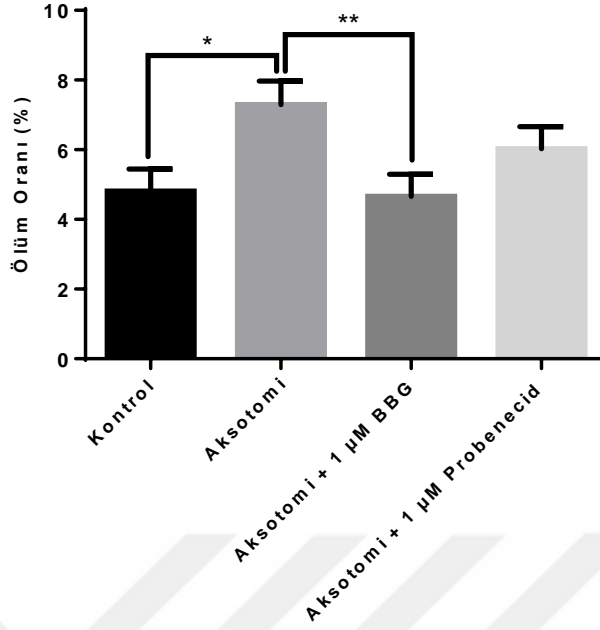


Şekil 6.6.2: Gliaların hücre zarındaki P2X7 miktarının zamana bağlı değişiminin floresan parlaklık değeri ile gösterilmesi (*: $p < 0.05$, ****: $p < 0.0001$)

6.7. Aksotomi Sonrası İkincil Ölümün Gösterilmesi

AKG kültürleri 48. saatinde PI ile boyanıp 10x10 kare olacak şekilde görüntüledi. Hasar gruplarında her petride merkezden seçilen 10 adet nöron hasarlandı. Hasar grubunun kontrolü olarak ise farklı petrielerde merkezden seçilen 10 adet nöronun kenarına kontrol atışları yapıldı. 24 saat sonra tekrar aynı bölgelerden 10x10 kare görüntüledi ve hasarlanan nöronların çevresindeki nöronların ölüm oranları kıyaslandı. Hasar grubunda kontrol grubuna kıyasla artan ölüm oranına rastlandı. ($p < 0.05$)

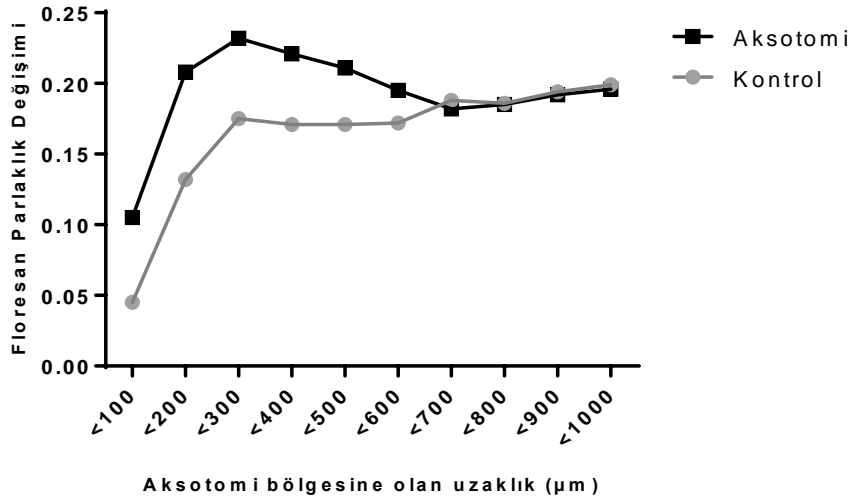
Kontrol grubunda ($n=1143$) petri genelindeki ölüm oranı %4,8 iken hasar grubunda ($n=1467$) ölüm oranının anlamlı olarak artıp %7,3 e kadar çıktığı bulunmuştur. Glia hücrelerinde bulunan P2X7 reseptörünün bloklanması ($n=1094$) ölüm oranını kontrol seviyelerine kadar, %4,7 e düşürmüştür. P2X7 reseptörünün hücre zarında açtığı büyük porun panneksin1 kanalı olduğu hipotezini göz önünde bulundurarak panneksin1 kanallarının bloklandığı ($n=1426$) grupta ise ölüm oranının hasar grubuna kıyasla azalıp %6 ya indiğini fakat bu düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir.



Şekil 6.7.1: Aksotomi yapılan hücrenin çevresindeki nöronların ölüm oranının gösterilmesi (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

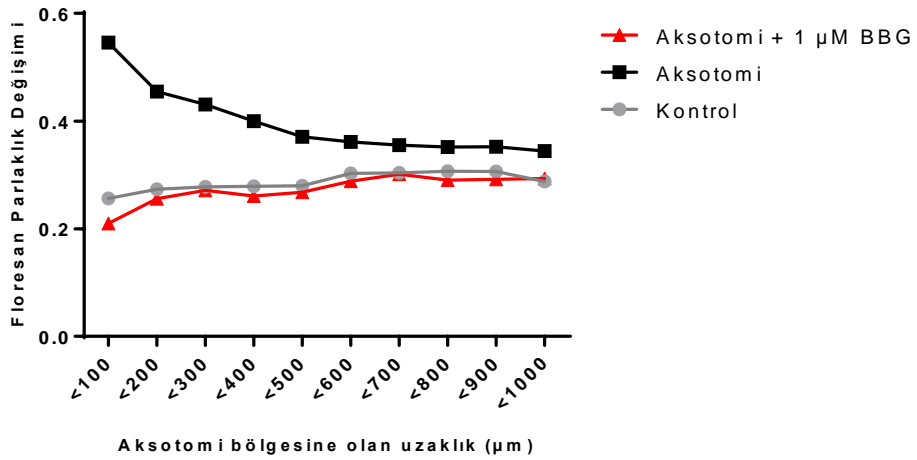
6.8. Aksotomi Sonrası Çevredeki Hücrelerin Hücre Zarı Geçirgenliğinin İncelenmesi

Petri merkezinde belirlenen 10 adet nöronun hasarlanması sonucu 5x5 karelik bir alandan hasar öncesi ve sonrası YO-PRO-1 görüntüleri alınarak hücre zarı dinamikleri incelenmiştir. Nöron hücrelerinin genel boya alımları incelendiğinde kontrol grubu ($n=597$) ile hasar grubu ($n=700$) arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenememiştir. Hasar merkezine yaklaştıkça ($< 600 \mu\text{m}$) boya alımlarının kontrol grubuna kıyasla arttığı gözlenmiştir fakat bu artışın hasar merkezine olan mesafe ile arasında herhangi bir korelasyona rastlanmamıştır.

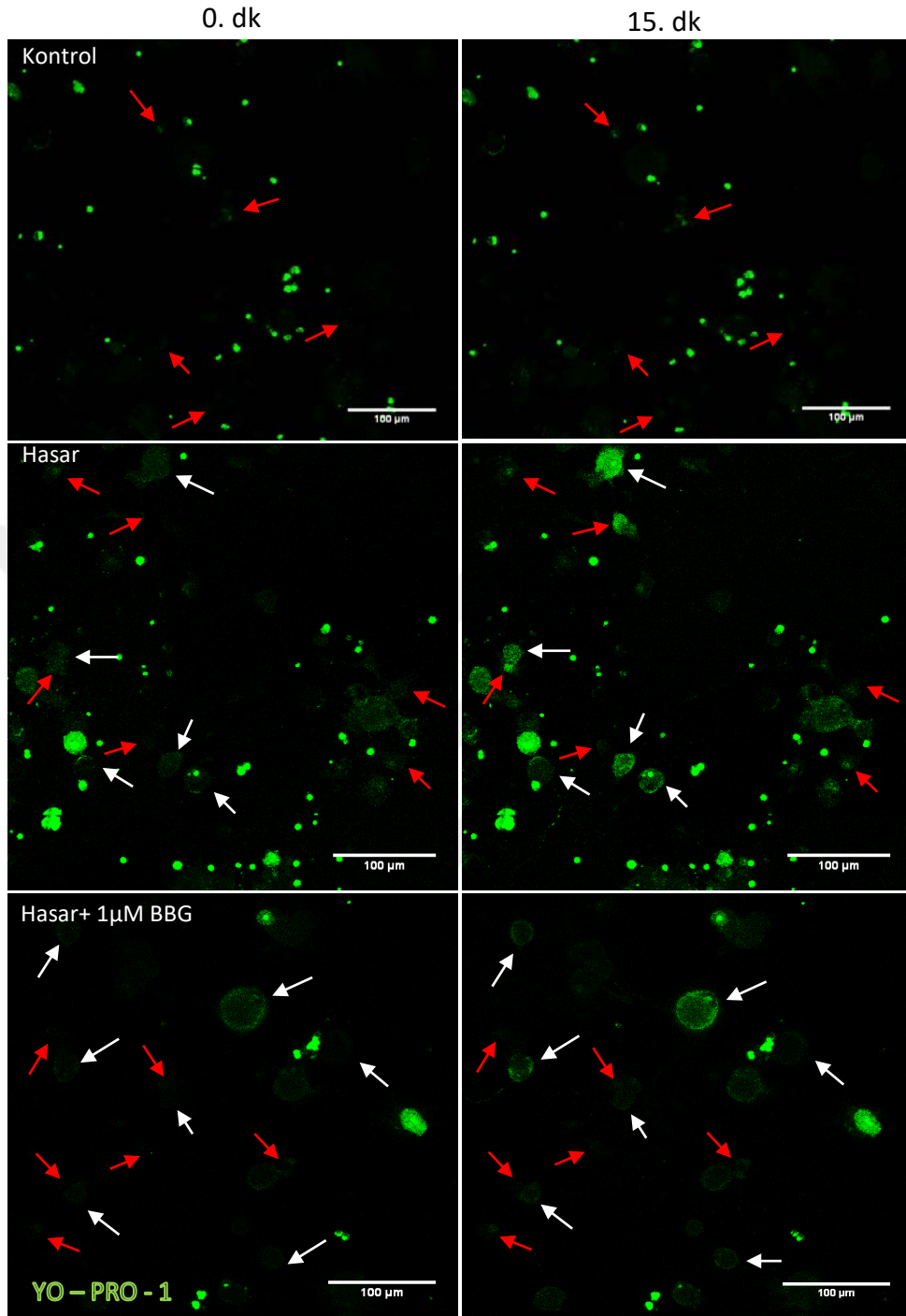


Şekil 6.8.1: Hasar bölgesine olan mesafeye göre nöronların boya alım miktarlarının karşılaştırılması

Glia hücrelerindeki genel boya alımı hasar grubunda (n=724) kontrol grubuna (n=599) kıyasla anlamlı olarak artış göstermiştir ($p < 0.0001$). Ayrıca hasar merkezine yaklaştıkça boya alımının arttığı gözlenmiştir. Hasar merkezine olan mesafe ile boya alımı arasında negatif korelasyon belirlenmiştir ($p < 0.01$). Aynı deneyler P2X7 reseptörleri bloklandıktan sonra (n=601) yapıldığında ise hasar verilen gruptaki glia hücrelerinin kontrol grubundakine benzer şekilde davrandığı gözlemlenmiştir. Altta tablodaki kontrol grubu etiketi yanlış.



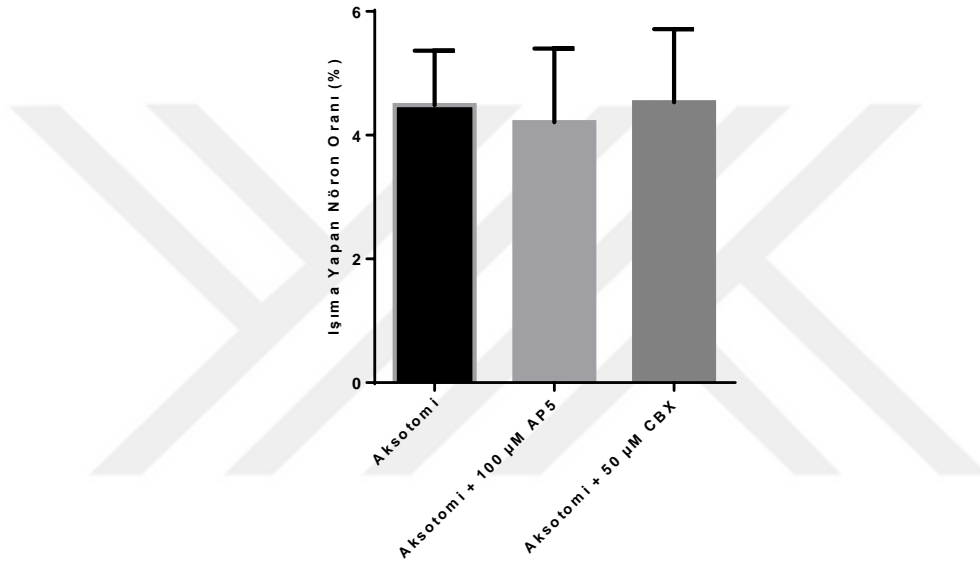
Şekil 6.8.2: Hasar bölgesine olan mesafeye göre gliaların boya alım miktarlarının karşılaştırılması



Resim 6.8.1: Aksotomi sonrası çevrede bulunan hücrelerin boya alım miktarları. Beyaz oklar aksotomi yapılan nöronları, kırmızı oklar ise glia hücrelerini göstermektedir.

6.9. Aksotomi Çevresindeki Nöronların Kalsiyum Değişimi

Aksotomi anında hem hasarlanan hem de çevre hücrelerdeki kalsiyumun eş zamanlı olarak gözlenmesi için aksotomi esnasında konfokal mikroskop ile zaman aralıklı görüntüler alındı. Kalsiyum indikatörü olarak glutamaterjik nöronlarında GCaMP ifade eden AKG kültürleri kullanıldı. Her hücrenin farklı kalsiyum aktivitesi olacağı göz önünde bulundurularak her hücreye aksotomi öncesi kontrol atışı yapılarak zaman aralıklı görüntüleri alındı.

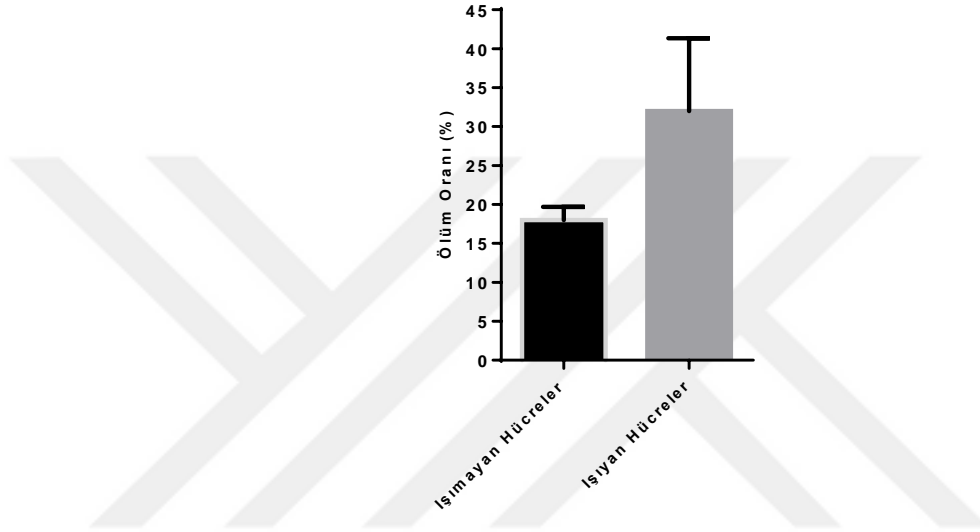


Şekil 6.9.1: Aksotomi sırasında çevredeki ışımaya yapan nöronların tüm nöronlara olan oranı. Yalnızca aksotomi yapılan grup, NMDA reseptörleri ve konneksin kanallarının bloklandığı grup ile karşılaştırılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda aksotomi yapılan nöronların tümünde kalsiyum artışı görülürken (dış ortamdaki kalsiyumun hasar bölgesinden hücre içerisine girişi) hasar çevresindeki tüm nöronların (n=557) %4,5 inde kalsiyum artışına rastlanmıştır. Bu oran NMDA reseptörleri (n=285) ve konneksin kanallarının (n=309) bloklandığı gruplarda da sırasıyla %4,2 ve %4,5 olarak gözlenmiş ve gruplar arasında istatistiksel bir farka rastlanmamıştır (Şekil 6.9.1).

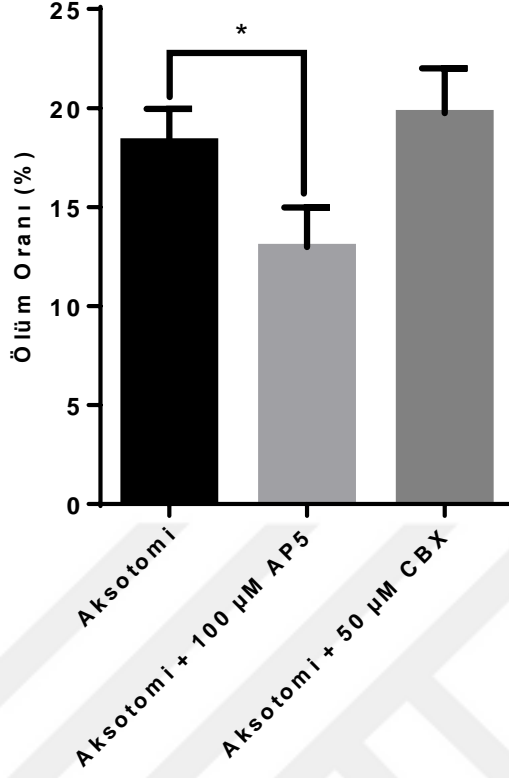
6.10. Kalsiyum Artışının Hücre Ölümüyle İlişkisi

Kalsiyumun aksotomi çevresindeki nöronların ölümü üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığının araştırılması için görüntüleme yapılacak olan hücrelere PI eklenmiş ve aksotomi yapılan hücreler ile çevrelerindeki hücreler 24 saat sonra tekrar görüntülenmiştir. Aksotomi yapılan hücrenin etrafındaki hücrelerden ışılanların ölüm oranları ile ışımayan hücrelerin ölüm oranları karşılaştırıldı.



Şekil 6.10.1: Aksotomi sonrası çevrede kalsiyum artışı görülen nöronlardaki ölüm oranının kalsiyum artışı görülmeyen nöronlar ile karşılaştırılması.

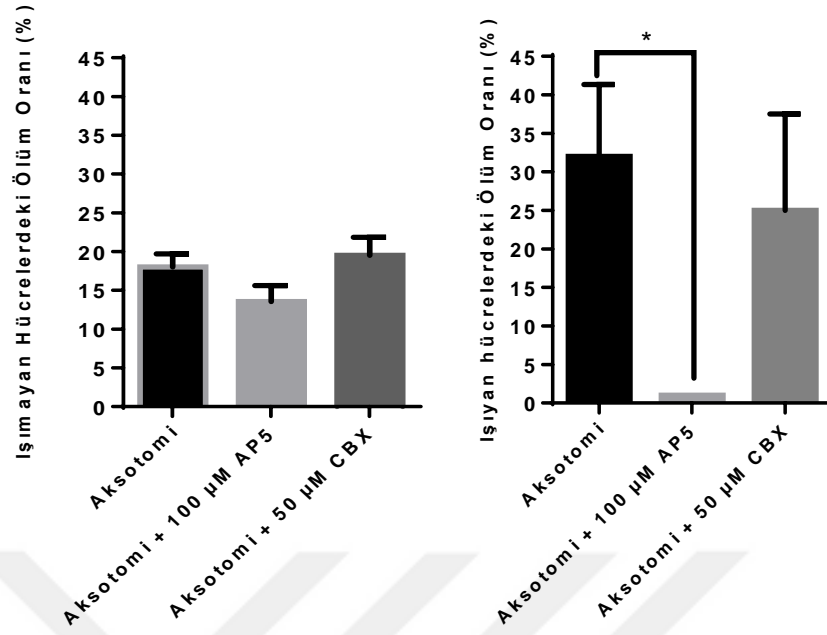
Aksotomi grubunda (n=557) ışılan hücrelerdeki ölüm oranı (%32) ışımayan hücrelerdeki ölüm oranına (%18) kıyasla artış göstermiştir fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Kalsiyuma bağlı artan ölüm oranında rol oynayabileceği düşünülen NMDA reseptörleri ve konneksin kanalları bloklanıp aynı deneyler tekrarlanmıştır.



Şekil 6.10.2: Aksotomi sonrası çevredeki tüm nöronların ölüm oranlarının karşılaştırılması (*: $p < 0.05$).

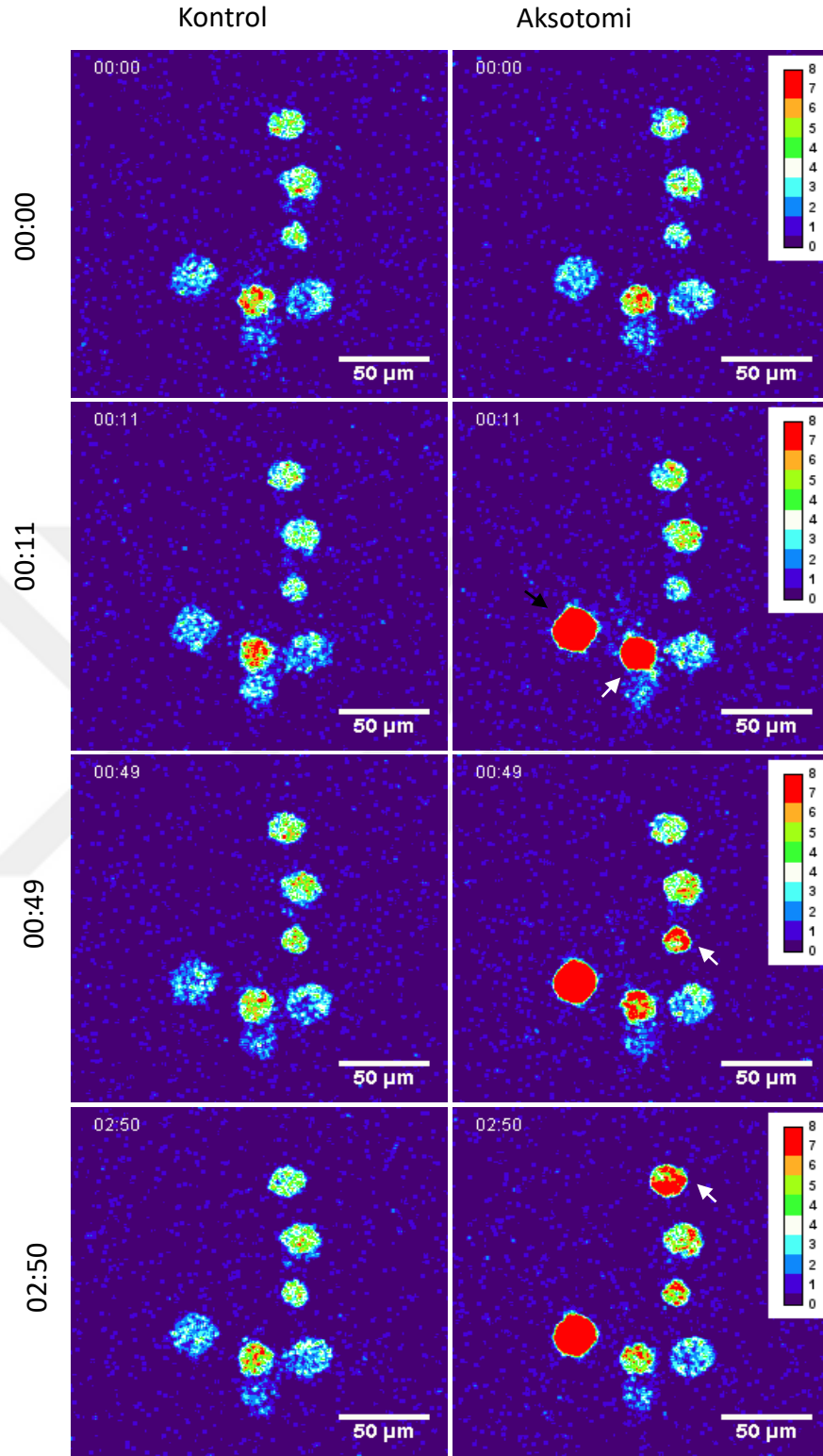
Aksotomi uygulamasından 24 saat sonra kısa mesafedeki tüm nöronların ölüm oranları NMDA reseptörü ve konneksin kanallarının bloklanması sonucu incelenmiştir (Şekil 6.10.2). NMDA reseptörlerinin bloklanması ($n=285$) ölüm oranını anlamlı bir şekilde azaltırken konneksin kanallarının ($n=309$) bu süreçte bir etkisi gözlenmemiştir.

NMDA reseptörünün ve konneksin kanallarının aksotomi esnasında kalsiyum artışı görülen komşu nöronların ölümü üzerindeki etkisinin incelenmesi için kalsiyum cevabı görülen ve görülmeyen nöronlar her grup içerisinde ayrı ayrı incelenmiştir (Şekil 6.10.3).

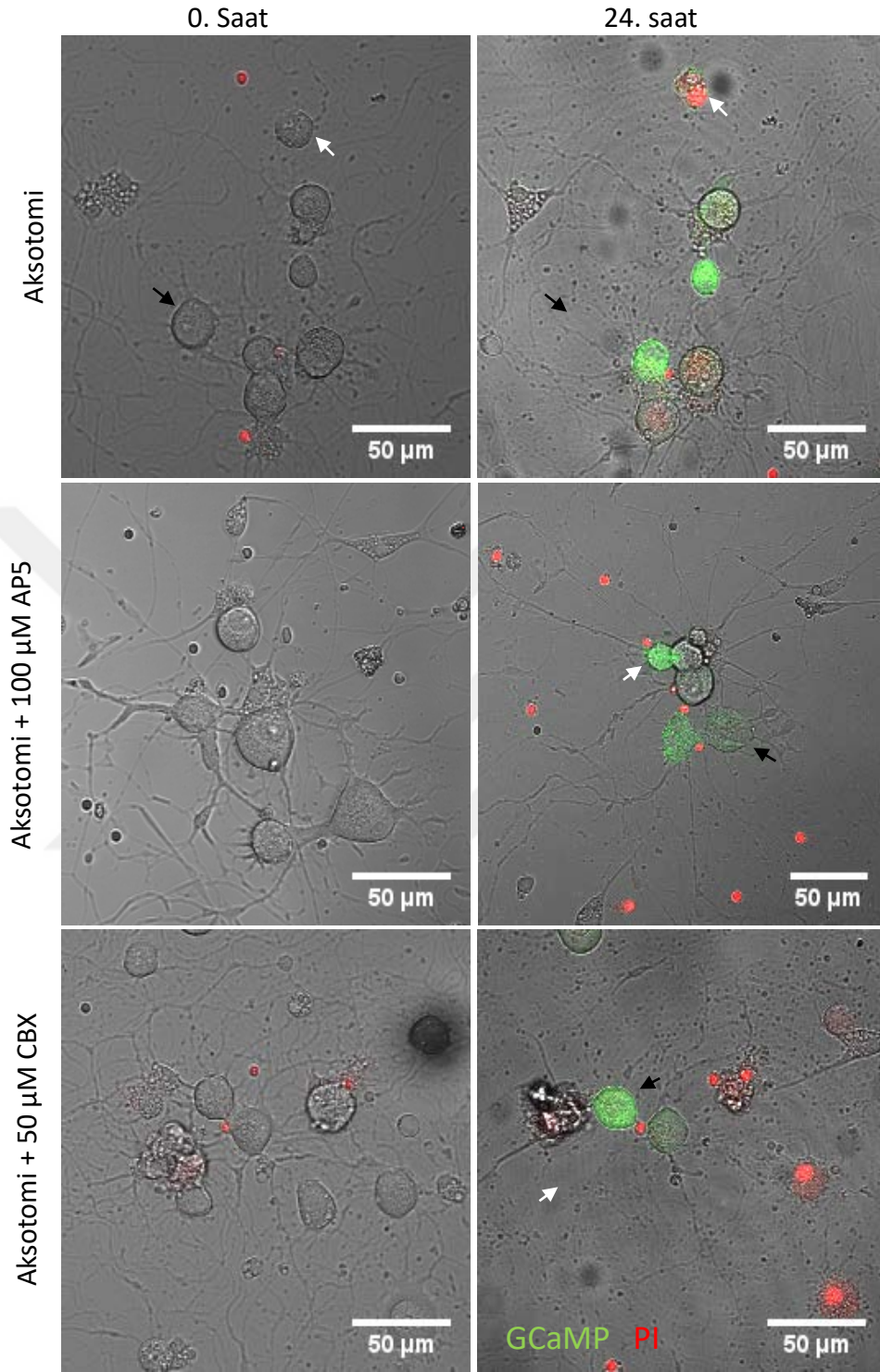


Şekil 6.10.3: Aksotomi yapılan nöronun çevresinde ışıma görülen nöronlardaki ölüm oranları ve NMDA reseptörleri ile konneksin kanallarının bloklanması sonrası değişiminin gösterilmesi (*: $p < 0.05$).

Bu deneyler sonucunda yine konneksin kanallarının bu süreçte bir etkisine rastlanmamıştır. NMDA reseptörleri bloklanan gruplarda ise ışıma görülen ve görülmeyen hücre gruplarında ölüm oranının sırasıyla %1 ve %13,6 ya kadar düştüğü gözlenmiştir. Yapılan istatistiksel analizler sonucu komşu nöronlarda aksotomiye kalsiyum cevabı vermeyen hücrelerin ölüm oranları üzerinde NMDA ve konneksin kanallarının anlamlı bir etkisinin olmamasına rağmen kalsiyum cevabı görülen hücrelerde NMDA kanallarının bloklanmasının kontrol grubuna kıyasla ölüm oranını anlamlı bir şekilde azalttığı görülmüştür ($p < 0.05$).



Resim 6.10.1: Aksotomi sırasında alınan GCaMP görüntülerinin termal haritası. Sol taraf kontrol atışı, sağ taraf aksotomi atışını göstermektedir. Siyah ok hasarlanan, Beyaz ok ise kontrol grubuna kıyasla kalsiyum artışı görülen nöronları işaret eder.



Resim 6.10.2: Hasar sonrası kalsiyum artışı görülen hücrelerdeki ölümün gösterilmesi. Siyah ok hasar verilen hücreyi, beyaz ok hasara kalsiyum cevabı veren komşu hücreyi göstermektedir (Aksotomi grubu, Şekil 25 te termal harita ile gösterilen hücrelerin aksotomiden 24 saat sonraki görüntüsüdür.)

7. TARTIŞMA

AKG nöron kültürü özellikle rejenerasyon, ağrı, miyelinizasyon gibi süreçlerin incelenmesi için sıklıkla kullanan hücre kültürü modellerinden biridir (100-104) Çalışmamızda da hem stabil ve tekrarlanabilir olması hem de yetişkin hayvandan rahatlıkla izole edilebilen olgun hücreler ile çalışmamıza olanak sağlayan bir kültür protokolü kullanılmıştır (105).

Sinir sisteminde meydana gelen bir hasar çevredeki hasarlanmayan hücreleri de zaman içerisinde etkileyip ikincil hasar sonucu bir dejenerasyon sürecini başlatmaktadır. Hasar sonrası hasarlanan çevre doku ve hücrelerde meydana gelen hasar ikincil hasar olarak adlandırılır (2). Travmatik akson hasarlarının çalışılması için hem in-vivo hem de in-vitro olarak bir çok farklı hasar modeli geliştirilmiştir (35). Transnöronal dejenerasyonun in-vivo modellerinin dezavantajlarından biri izole bir sistemde çalışmamak ile birlikte ikincil ölüm sürecinin günler sonra ortaya çıkmasıdır (106). Bu sürenin uzunluğu çok fazla faktörün ve farklı hücre tiplerinin sürece dahil olmasıyla birlikte sürecin daha kompleks hale gelmesine neden olur. Oluşturmuş olduğumuz model, hücre kültürü ortamında femtosaniye kızılötesi lazer kullanılarak tek bir hücrenin kontrollü bir aksotomi yapılarak hasarlanmasına ve bu sistemin konfokal mikroskobu ile birleştirilmiş olması da aksotomi esnasında fizyolojik koşullara uygun bir şekilde canlı görüntüleme yapılmasına olanak sağlamıştır.

Sinir hasarı sonrası hasarlanan hücreden dış ortama ATP salınımı olduğu bilinmektedir (107). Hasar olmaksızın da ATP nin glia hücrelerindeki pürinerjik reseptörlerin aktivasyonunu sağlayıp çoğalmalarını indüklediği (7) , veya kalsiyum modülasyonunu sağlayıp hücreler arası iletişime de katkıda bulunduğu gösterilmiştir (64, 65). Çalışmamızda öncelikle dış ortamdaki ATP miktarının AKG nöron ve glia hücrelerine olan etkisinin incelenmesi için hücreler düşük ve yüksek konsantrasyonlu ATP ile muamele edilip zamana bağlı olarak görüntülendi. ATP etkisinin incelenmesi amacıyla hücre zar dinamikleri ve hücre zarında bulunan porların açılıp kapanmasının incelenmesi için kullanılan yöntemlerden bir tanesi olan (108, 109) boya alım analiz yöntemi kullanıldı. Özellikle apoptoz sonucu hücre zarında meydana gelen veya pürinerjik sinyal aktivasyonu sonrası hücre zarında açılan porların dinamiklerinin incelenmesi için YO-PRO-1 ve TO-PRO-3 gibi floresan

boyalar kullanımıyla hücre zarındaki açılan porlardan hücre içine boya alımı bu süreçlerin dinamik olarak izlenebilmesini mümkün kılmıştır (110-112). Yapmış olduğumuz boya alım analizleri 100 μ M ATP uygulaması sonrası AKG nöron ve glialarının akut olarak (~15 dk) etkilendiğini ve zamanla bu etkinin normal seviyelere düştüğünü göstermiştir. 1 mM ATP uygulaması ise hem nöron hem de glialar üzerinde daha uzun süreli bir etkiye sebep olmuşsa da 100 μ M ATP uygulamasının sonucuna benzer bir şekilde kontrol grubuna kıyasla en yüksek fark akut olarak gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak ATP nin akut süreçte etkin olduğu görüldü ve ilk 15 dakika yapılacak deneyler için kritik nokta olarak belirlendi. Ayrıca 100 μ M ATP uygulaması sonucu glia hücrelerindeki boya alımı nöronlardakinin yaklaşık iki katıyken 1 mM ATP uygulamasında bu oran dört katına çıkmıştır.

AKG deki satellit hücrelerinde P2X7 ifadesi olduğu fakat AKG nöronlarında olmadığı literatürde gösterilmiştir (71). Bu bilgidenden de yola çıkarak glia hücrelerindeki boya alımının nöronlara kıyasla daha yüksek olması bu süreçte P2X7 reseptörünün rolünün olabileceğini ve P2X7 ile direk veya dolaylı yollardan kompleks benzeri bir yapı oluşturduğu düşünülen panneksin1 (99, 113, 114) kanalının da sürece dahil olabileceğini düşündürmüştür.

Nöronlarda görülen boya alımının P2X7 reseptörünün bloklanması ile azalması ise gliaların sürece dahil olduğunu düşündürmüştür. Primer mikroglia kültürlerinde BzATP ile P2X7 nin aktive edilmesi sonrası yapılan ELİSA analizleri, kültür ortamına IL1 β ve IL18 salınımının olduğunu, fakat aynı süreç P2X7 KO mikroglialarda tekrarlandığında IL1 β ve IL18 varlığına rastlanmadığını göstermiştir (115). Benzer şekilde, satellit glia hücrelerindeki P2X7'nin ATP ye bağlı aktivasyonunun inflamatuvar sitokinlerin salınımına neden olduğu ve ortama salınan sitokinlerin AKG nöronlarında bulunan P2X3 reseptörlerini aktive edip nöropatik ağrı sürecini tetiklediği gösterilmiştir (116). Bu veriler göz önünde bulundurulduğunda, aksotominin hemen sonrasında görülen glia aktivasyonunun inflamuar süreçleri başlatıp nöronlarda bulunan pürin reseptörlerinin aktivasyonu ile ikincil ölüm sinyalini kuvvetlendirdiği değerlendirilmiştir.

Fizyolojik şartlarda AKG nöronları ve satellit hücreleri arasında konneksin proteinlerinden oluşan oluklu bağlantıların olduğu bilinmektedir (117). Tüm bu bilgiler göz önünde bulundurularak boya alımlarının hangi kanallardan kaynaklı olduğunun belirlenmesi için aynı deneyler P2X7, panneksin1 ve konneksin kanalları bloklanarak tekrarlandı. Hem nöron hem de glialarda panneksin1 kanalının ATP ye bağlı boya alımında rol oynadığı gözlemlendi. Konneksin ve panneksin kanallarının yapılarının birbirlerine benzemesi sebebiyle ortak kimyasallar tarafından inhibe edildikleri bilinmektedir (84). Konneksinlerin bloklanması için 50 μ M CBX gerekiyken, panneksin1 in bloklanması için 5 μ M CBX in yeterli olduğu gösterilmiştir (118). İki arasındaki ayrımın yapılabilmesi için her iki konsantrasyon da kullanıldı ve 50 μ M CBX in konneksinleri bloklarken panneksin1 i de bloklamış olacağı varsayılarak sonuçlar incelendi. 5 μ M CBX ve 50 μ M CBX uygulamasının ATP ye bağlı boya alımını benzer şekilde azalttıklarından yola çıkılarak konneksin kanallarının ATP ye bağlı boya alımı üzerinde bir etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

Beklendiği gibi glialardaki ATP ye bağlı boya alımında P2X7 reseptörünün rolünün olduğu gözlemlendi. Fakat beklenmedik bir şekilde P2X7 bloklanmasının aynı gruptaki nöronların boya alım miktarlarını da azalttığı gözlemlendi. P2X7 ve panneksin1 ifadesinin protein düzeyinde kontrolü için immunositokimyasal boyamalar yapıldı. Boyamalar sonucunda glialarda panneksin1 ve P2X7 nin hücre zarında lokalize olduğu görülürken nöronların hücre zarında yalnızca panneksin1 e rastlandı. Nöronlarda P2X7 ifadesi olmamasına rağmen P2X7 nin bu süreçte rol oynaması, glia hücrelerindeki aktifleşen P2X7 reseptörlerinden ortama daha çok ATP salınması sonucu nöronlarda bulunan diğer pürin reseptörlerinin açılmış olabileceğini düşündürdü.

Hücre kültüründe, limitli sayıda nörona verilen hasarın çevredeki hücreleri nasıl etkilediğinin araştırılması için merkezinde 10 adet nörona aksotomi yapılan kültürler belirli zaman aralıklarında fikslendi ve komşu hücrelerdeki P2X7 ile panneksin1 in hücre zarındaki protein miktarları zamana bağlı olarak analiz edildi. Hem nöron hem de glialardaki panneksin1 miktarının aksotomiden sonraki ilk saatte arttığı fakat 24 saat sonuna doğru tekrar düştüğü gözlemlenmiştir. Glialardaki P2X7 nin ise aksotomiden 1 saat sonra arttığı gözlenirken ilk 6 saatte 24 saat sonunda tekrar

kontrol grubunun üzerine çıkmış olduğu gözlemlendi. İlk 6 saatte görülen azalmanın nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte 24 sonunda görülen panneksin1 miktarındaki azalmanın P2X7 miktarındaki artış ile gösterdiği negatif korelasyon, (96) de belirtilen, ortamdaki fazla ATP nin panneksin1 in inhibisyonuna neden olduğu verisiyle anlam kazanmaktadır. Kültür ortamında limitli sayıda nöronda yapılan aksotomi hasarının çevredeki nöronların canlılığı üzerindeki etkisinin incelenmesi için aksotomiden 24 saat sonra yapılan canlılık testleri az sayıda nöronun hasarlanmasının çevredeki nöronların ölümüne sebep olduğunu göstermiştir. Aynı deneyler kimyasal bloklayıcıların varlığında tekrarlandığında, P2X7 nin bloklanması ölüm oranlarını kontrol seviyelerine kadar düşürmüştür. panneksin1 in bloklanması ise ölüm oranlarında bir düşüşe sebep olsa da bu düşüş hasar esnasında bloklayıcı kullanılmayan gruba kıyasla anlamlı çıkmamıştır.

P2X7 nin bloklanmasının ölüm oranlarını düşürmesi ikincil ölüm sinyalinin yayılmasında glia hücrelerin rolünün olabileceğini düşündürmüştür. Hasarın hemen sonrasında yapılan boya alım analizleri sonucunda nöronların boya alım seviyelerinde bir artışa rastlanamazken gliaların boya alımlarının kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu gözlemlendi. Aksotomi merkezine olan mesafeye göre yapılan analizler de glialardaki boya alım seviyesinin hasar merkezine yaklaştıkça arttığını göstermiştir. P2X7 nin bloklayıcısının varlığında aynı deneyler tekrarlandığında ise gliaların kontrol grubundaki gibi davrandığı gözlemlenmiştir. Böylece kültür ortamında gerçekleştirilen aksotomi hasarından hemen sonra (~15 dk) glialara P2X7 nin de süreçte yer aldığı bir hasar sinyalinin gittiğini ve hasar bölgesine olan mesafenin de bu sinyalin yayılmasında önemli bir faktör olduğu tespit edilmiş oldu. Travmatik hasar söz konusu olduğunda etkin olduğu düşünülen en önemli faktörlerden bir diğeri kalsiyum eksitotoksitesidir (119, 120). Kalsiyumun ikincil ölüm hasarında herhangi bir etkisinin olup olmadığının belirlenmesi için yapılan deneylerde aksotomi yapılan nörona komşu nöronların sadece % 4,5 inde aksotomi esnasında kalsiyum artışına rastlandı. NMDA reseptörlerinin ve konneksin lerin bloklanması da bu oranı değiştirmedir. Yakın mesafe ölüm oranlarına bakıldığında, aksotomi esnasında kalsiyum artışı görülen komşu nöronlarda kalsiyum cevabı görülmeyen nöronlara kıyasla daha fazla ölüm oranı görüldü fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. NMDA reseptörleri ve konneksin lerin bloklayıcılarının varlığında deneyler

tekrarlanıp 24 saat sonraki ölüm oranlarına bakıldığında konneksin kanallarının herhangi bir etkisine rastlanmazken NMDA reseptörlerinin bloklanması aksotomi yapılan nöronun yakın çevresindeki nöronların ölüm oranını anlamlı olarak düşürmüştür. Kalsiyum cevabı görülen ve kalsiyum cevabı görülmeyen nöronlar ayrı ayrı incelendiğinde ise kalsiyum cevabı görülen nöronlardaki ölüm oranının NMDA reseptörlerinin bloklanması sonucu azaldığı fakat kalsiyum cevabı görülmeyen nöronlardaki düşüşün anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu da NMDA reseptörlerinin ikincil ölüm sinyalinin yayılmasında rol oynadığının özellikle de aksotomi sonrası komşu hücrelerde görülen kalsiyum artışının ölümcül etkilerini azalttığı gösterilmiştir.

Anoksik hücre depolarizasyonu sonrasında aktifleşen NMDA reseptörlerinin Src kinaz ve Panneksin1 in yer aldığı bir sinyal yolağını başlatıp hücre ölümüne neden olduğu hipokampal kesit kültürlerinde gösterilmiştir (91, 121-124). Yine benzer şekilde epileptik süreçlerde Panneksin1 in modülasyon görevi yapıp uyarılabilirliği artırdığı gösterilmiştir (91, 121, 124). Çalışmamızda NMDA reseptörlerinin kanal fonksiyonunun aksotomi esnasındaki kalsiyum cevabı üzerinde bir etkisinin olmadığı görülmüştür. NMDA bloklanmasının aksotomi sırasında çevre hücrelerde herhangi bir etkisi olmamasına rağmen kalsiyum artışı görülen hücrelerdeki ölüm oranını düşürmesi ise NMDA reseptörlerinin ikincil ölüm sinyalini başlatmasındaki önemini ortaya koymuştur. Kronik ağrı modellerinde hücrelerden salınan ATP, glutamat ve sitokinlerin, NMDA ve pürin reseptörlerini aktifleştirmesi ile nöron ve glialarda inflamatuvar süreci başlatıp kronik ağrı durumunu meydana getirdiği gösterilmiştir (123, 125, 126). Çalışmamızda da bu verilerle uyumlu bir şekilde glial pürinerjik sinyalinin önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir.

Tüm bu bulgular bir araya geldiğinde transnöronal dejenerasyonun kronik ağrı ve epileptik nöbet gibi durumlardakine benzer şekilde gerçekleşmiş olabileceği düşünülmüştür. Aksotomi çevresindeki sağlam nöronların depolarizasyonunun kalsiyum eksitotoksitesinden daha kompleks, NMDA reseptörlerinin yer aldığı bir ikincil ölüm sürecini başlattığı, glialardaki pürinerjik yolağın aktifleşmesinin ise hasarın ilk anından itibaren inflamatuvar cevap oluşturduğu ve nöron ile glia hücrelerinde gerçekleşen bu iki ayrı sürecin ortak bileşeni olan panneksin1 in devreye girmesiyle ikincil ölüm sürecinin kuvvetlendiği değerlendirilmiştir.

8. SONUÇ

Hücre kültüründe oluşturmuş olduğumuz aksotomi modeli her hücrenin birebir kantifikasyonunun yapılmasına olanak sağlamış, bu sayede nöron ve glia hücrelerinin ayrı ayrı incelenmesini, hasar bölgesine olan mesafeye bağlı analizlerin yapılabilmesini, hücrelerdeki protein değişikliklerinin hücre içi lokalizasyonlarına göre değerlendirilebilmesini ve en önemlisi de hasar esnasında canlı görüntüleme yapılabilmesini mümkün kılmıştır.

Bu yöntemleri kullanarak yaptığımız deneylerin sonuçlarını özetleyecek olursak, hasarlanan bir hücre komşu hücrelerinin bir kısmında kalsiyum cevabı oluşturur ve bu cevap komşu hücrenin NMDA reseptörleri üzerinden ölüme gitmesine sebep olabilir. Yine hasarlanan hücre çevresindeki hücrelerin (özellikle gliaların) pürinerjik sinyal yolağının P2X7 üzerinden aktivasyonu çevredeki nöronlarda ikincil ölümün gerçekleşmesine neden olan mekanizmalardan bir tanesidir.

9. KAYNAKLAR

1. Geddes, JF, Whitwell, HL, and Graham, DI. Traumatic axonal injury: practical issues for diagnosis in medicolegal cases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26, 105-116. (2000).
2. Hill, CS, Coleman, MP, and Menon, DK. Traumatic Axonal Injury: Mechanisms and Translational Opportunities. *Trends Neurosci* 39, 311-324. (2016).
3. Su, JH, Deng, G, and Cotman, CW. Transneuronal degeneration in the spread of Alzheimer's disease pathology: immunohistochemical evidence for the transmission of tau hyperphosphorylation. *Neurobiol Dis* 4, 365-375. (1997).
4. Stefanis, L, and Burke, RE. Transneuronal degeneration in substantia nigra pars reticulata following striatal excitotoxic injury in adult rat: time-course, distribution, and morphology of cell death. *Neuroscience* 74, 997-1008. (1996).
5. Suzuki, H, Oyanagi, K, Takahashi, H, and Ikuta, F. Evidence for transneuronal degeneration in the spinal cord in man: a quantitative investigation of neurons in the intermediate zone after long-term amputation of the unilateral upper arm. *Acta Neuropathol* 89, 464-470. (1995).
6. Wang, X, Arcuino, G, Takano, T, Lin, J, Peng, WG, Wan, P, et al. P2X7 receptor inhibition improves recovery after spinal cord injury. *Nat Med* 10, 821-827. (2004).
7. Rigato, C, Swinnen, N, Buckinx, R, Couillin, I, Mangin, JM, Rigo, JM, et al. Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a Pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion. *J Neurosci* 32, 11559-11573. (2012).
8. Alberto, AV, Faria, RX, Couto, CG, Ferreira, LG, Souza, CA, Teixeira, PC, et al. Is pannexin the pore associated with the P2X7 receptor? *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 386, 775-787. (2013).
9. Bravo, D, Maturana, CJ, Pelissier, T, Hernandez, A, and Constandil, L. Interactions of pannexin 1 with NMDA and P2X7 receptors in central nervous system pathologies: Possible role on chronic pain. *Pharmacol Res* 101, 86-93. (2015).

10. Fan, J, Dawson, TM, and Dawson, VL. Cell Death Mechanisms of Neurodegeneration. *Adv Neurobiol* 15, 403-425. (2017).
11. Durrenberger, PF, Fernando, FS, Kashefi, SN, Bonnert, TP, Seilhean, D, Nait-Oumesmar, B, et al. Common mechanisms in neurodegeneration and neuroinflammation: a BrainNet Europe gene expression microarray study. *J Neural Transm (Vienna)* 122, 1055-1068. (2015).
12. Avila, J. Common mechanisms in neurodegeneration. *Nat Med* 16, 1372. (2010).
13. Tubbs, RS, Loukas, M, Slappey, JB, Shoja, MM, Oakes, WJ, and Salter, EG. Clinical anatomy of the C1 dorsal root, ganglion, and ramus: a review and anatomical study. *Clin Anat* 20, 624-627. (2007).
14. Kandel, ER. *Principles of neural science*, McGraw-Hill, New York. (2013).
15. Decosterd, I, and Woolf, CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 87, 149-158. (2000).
16. Malin, SA, Davis, BM, and Molliver, DC. Production of dissociated sensory neuron cultures and considerations for their use in studying neuronal function and plasticity. *Nat Protoc* 2, 152-160. (2007).
17. Willis, WD. *Sensory mechanisms of the spinal cord*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. (2004).
18. Sommer, EW, Kazimierczak, J, and Droz, B. Neuronal subpopulations in the dorsal root ganglion of the mouse as characterized by combination of ultrastructural and cytochemical features. *Brain Res* 346, 310-326. (1985).
19. Huang, EJ, and Reichardt, LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 24, 677-736. (2001).
20. Sleigh, JN, Weir, GA, and Schiavo, G. A simple, step-by-step dissection protocol for the rapid isolation of mouse dorsal root ganglia. *BMC Res Notes* 9, 82. (2016).
21. Malet, M, and Brumovsky, PR. VGLUTs and Glutamate Synthesis-Focus on DRG Neurons and Pain. *Biomolecules* 5, 3416-3437. (2015).
22. Miller, KE, Hoffman, EM, Sutharshan, M, and Schechter, R. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. *Pharmacol Ther* 130, 283-309. (2011).

23. Liguz-Leczna, M, and Skangiel-Kramska, J. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 67, 207-218. (2007).
24. Brumovsky, PR, Seal, RP, Lundgren, KH, Seroogy, KB, Watanabe, M, and Gebhart, GF. Expression of vesicular glutamate transporters in sensory and autonomic neurons innervating the mouse bladder. *J Urol* 189, 2342-2349. (2013).
25. Brumovsky, PR, Robinson, DR, La, JH, Seroogy, KB, Lundgren, KH, Albers, KM, et al. Expression of vesicular glutamate transporters type 1 and 2 in sensory and autonomic neurons innervating the mouse colorectum. *J Comp Neurol* 519, 3346-3366. (2011).
26. Brumovsky, P, Watanabe, M, and Hokfelt, T. Expression of the vesicular glutamate transporters-1 and -2 in adult mouse dorsal root ganglia and spinal cord and their regulation by nerve injury. *Neuroscience* 147, 469-490. (2007).
27. Pannese, E. *The satellite cells of the sensory ganglia*, Springer-Verlag, Berlin ; New York. (1981).
28. Hanani, M. Intercellular communication in sensory ganglia by purinergic receptors and gap junctions: implications for chronic pain. *Brain Res* 1487, 183-191. (2012).
29. Magni, G, and Ceruti, S. The purinergic system and glial cells: emerging costars in nociception. *Biomed Res Int* 2014, 495789. (2014).
30. Hanani, M. Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 457-476. (2005).
31. Emery, EC, Luiz, AP, Sikandar, S, Magnusdottir, R, Dong, X, and Wood, JN. In vivo characterization of distinct modality-specific subsets of somatosensory neurons using GCaMP. *Sci Adv* 2, e1600990. (2016).
32. Seddon, HJ. A Classification of Nerve Injuries. *Br Med J* 2, 237-239. (1942).
33. Sunderland, S. A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain* 74, 491-516. (1951).
34. Lucke-Wold, BP, Turner, RC, Logsdon, AF, Simpkins, JW, Alkon, DL, Smith, KE, et al. Common mechanisms of Alzheimer's disease and ischemic stroke:

- the role of protein kinase C in the progression of age-related neurodegeneration. *J Alzheimers Dis* 43, 711-724. (2015).
35. Wang, HC, and Ma, YB. Experimental models of traumatic axonal injury. *J Clin Neurosci* 17, 157-162. (2010).
 36. Morrison, B, 3rd, Saatman, KE, Meaney, DF, and McIntosh, TK. In vitro central nervous system models of mechanically induced trauma: a review. *J Neurotrauma* 15, 911-928. (1998).
 37. Ross, DT, Meaney, DF, Sabol, MK, Smith, DH, and Gennarelli, TA. Distribution of forebrain diffuse axonal injury following inertial closed head injury in miniature swine. *Exp Neurol* 126, 291-299. (1994).
 38. Dzialo, J, Tokarz-Deptula, B, and Deptula, W. Excitotoxicity and Wallerian degeneration as a processes related to cell death in nervous system. *Arch Ital Biol* 151, 67-75. (2013).
 39. Rotshenker, S. Wallerian degeneration: the innate-immune response to traumatic nerve injury. *J Neuroinflammation* 8, 109. (2011).
 40. Koepfen, AH. Wallerian degeneration: history and clinical significance. *J Neurol Sci* 220, 115-117. (2004).
 41. Freeman, MR. Signaling mechanisms regulating Wallerian degeneration. *Curr Opin Neurobiol* 27, 224-231. (2014).
 42. Cho, Y, Sloutsky, R, Naegle, KM, and Cavalli, V. Injury-induced HDAC5 nuclear export is essential for axon regeneration. *Cell* 155, 894-908. (2013).
 43. Abe, N, and Cavalli, V. Nerve injury signalling. *Curr Opin Neurobiol* 18, 276-283. (2008).
 44. Ousman, SS, Frederick, A, and Lim, EF. Chaperone Proteins in the Central Nervous System and Peripheral Nervous System after Nerve Injury. *Front Neurosci* 11, 79. (2017).
 45. Lindwall, C, and Kanje, M. Retrograde axonal transport of JNK signaling molecules influence injury induced nuclear changes in p-c-Jun and ATF3 in adult rat sensory neurons. *Mol Cell Neurosci* 29, 269-282. (2005).
 46. Zochodne, DW. *Neurobiology of peripheral nerve regeneration*, Cambridge University Press, Cambridge ; New York. (2008).

47. Hall, S. The response to injury in the peripheral nervous system. *J Bone Joint Surg Br* 87, 1309-1319. (2005).
48. Gaudet, AD, Popovich, PG, and Ramer, MS. Wallerian degeneration: gaining perspective on inflammatory events after peripheral nerve injury. *J Neuroinflammation* 8, 110. (2011).
49. Madduri, S, and Gander, B. Schwann cell delivery of neurotrophic factors for peripheral nerve regeneration. *J Peripher Nerv Syst* 15, 93-103. (2010).
50. David, S, and Ousman, SS. Recruiting the immune response to promote axon regeneration in the injured spinal cord. *Neuroscientist* 8, 33-41. (2002).
51. Borgens, RB, and Liu-Snyder, P. Understanding secondary injury. *Q Rev Biol* 87, 89-127. (2012).
52. Cohen, JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 14, 126-130. (1993).
53. Savill, J, and Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407, 784-788. (2000).
54. Messer, JS. The cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. *Cell Mol Life Sci* 74, 1281-1296. (2017).
55. Plum, F. What causes infarction in ischemic brain?: The Robert Wartenberg Lecture. *Neurology* 33, 222-233. (1983).
56. Lo, EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 14, 497-500. (2008).
57. Fisher, M. The ischemic penumbra: a new opportunity for neuroprotection. *Cerebrovasc Dis* 21 Suppl 2, 64-70. (2006).
58. Lei, Y, Garrahan, N, Hermann, B, Becker, DL, Hernandez, MR, Boulton, ME, et al. Quantification of retinal transneuronal degeneration in human glaucoma: a novel multiphoton-DAPI approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49, 1940-1945. (2008).
59. Siegel, GJ. *Basic neurochemistry : molecular, cellular, and medical aspects*, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. (1999).
60. Drury, AN, and Szent-Gyorgyi, A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68, 213-237. (1929).

61. Ralevic, V, and Burnstock, G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev* 50, 413-492. (1998).
62. Junger, WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 11, 201-212. (2011).
63. Burnstock, G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27, 166-176. (2006).
64. Arcuino, G, Lin, JH, Takano, T, Liu, C, Jiang, L, Gao, Q, et al. Intercellular calcium signaling mediated by point-source burst release of ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9840-9845. (2002).
65. Guthrie, PB, Knappenberger, J, Segal, M, Bennett, MV, Charles, AC, and Kater, SB. ATP released from astrocytes mediates glial calcium waves. *J Neurosci* 19, 520-528. (1999).
66. Cook, SP, and McCleskey, EW. Cell damage excites nociceptors through release of cytosolic ATP. *Pain* 95, 41-47. (2002).
67. Vladimir Parpura, AS, Alexei Verkhratsky. *Glutamate and ATP at the interface of metabolism and signaling in the brain*, Springer, New York. (2014).
68. Jarvis, MF, and Khakh, BS. ATP-gated P2X cation-channels. *Neuropharmacology* 56, 208-215. (2009).
69. Masuda, T, Ozono, Y, Mikuriya, S, Kohro, Y, Tozaki-Saitoh, H, Iwatsuki, K, et al. Dorsal horn neurons release extracellular ATP in a VNUT-dependent manner that underlies neuropathic pain. *Nat Commun* 7, 12529. (2016).
70. Costa, FA, and Moreira Neto, FL. [Satellite glial cells in sensory ganglia: its role in pain]. *Rev Bras Anesthesiol* 65, 73-81. (2015).
71. Kobayashi, K, Fukuoka, T, Yamanaka, H, Dai, Y, Obata, K, Tokunaga, A, et al. Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat. *J Comp Neurol* 481, 377-390. (2005).
72. Dermietzel, R, and Spray, DC. Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends Neurosci* 16, 186-192. (1993).
73. Beyer, EC, and Berthoud, VM. Gap junction structure: unraveled, but not fully revealed. *F1000Res* 6, 568. (2017).

74. Esseltine, JL, and Laird, DW. Next-Generation Connexin and Pannexin Cell Biology. *Trends Cell Biol* 26, 944-955. (2016).
75. Harris, AL. Emerging issues of connexin channels: biophysics fills the gap. *Q Rev Biophys* 34, 325-472. (2001).
76. Laird, DW. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 394, 527-543. (2006).
77. Revel, JP, and Karnovsky, MJ. Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver. *J Cell Biol* 33, C7-C12. (1967).
78. Evans, WH, De Vuyst, E, and Leybaert, L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. *Biochem J* 397, 1-14. (2006).
79. Kwon, T, Roux, B, Jo, S, Klauda, JB, Harris, AL, and Bargiello, TA. Molecular dynamics simulations of the Cx26 hemichannel: insights into voltage-dependent loop-gating. *Biophys J* 102, 1341-1351. (2012).
80. Oh, S, Abrams, CK, Verselis, VK, and Bargiello, TA. Stoichiometry of transjunctional voltage-gating polarity reversal by a negative charge substitution in the amino terminus of a connexin32 chimera. *J Gen Physiol* 116, 13-31. (2000).
81. Hanani, M. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function. *Brain Res Rev* 64, 304-327. (2010).
82. Ohara, PT, Vit, JP, Bhargava, A, Romero, M, Sundberg, C, Charles, AC, et al. Gliopathic pain: when satellite glial cells go bad. *Neuroscientist* 15, 450-463. (2009).
83. Penuela, S, Gehi, R, and Laird, DW. The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochim Biophys Acta* 1828, 15-22. (2013).
84. Lohman, AW, and Isakson, BE. Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS Lett* 588, 1379-1388. (2014).
85. Sandilos, JK, and Bayliss, DA. Physiological mechanisms for the modulation of pannexin 1 channel activity. *J Physiol* 590, 6257-6266. (2012).
86. Bao, L, Locovei, S, and Dahl, G. Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS Lett* 572, 65-68. (2004).

87. Bruzzone, R, Hormuzdi, SG, Barbe, MT, Herb, A, and Monyer, H. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13644-13649. (2003).
88. Ma, W, Hui, H, Pelegrin, P, and Surprenant, A. Pharmacological characterization of pannexin-1 currents expressed in mammalian cells. *J Pharmacol Exp Ther* 328, 409-418. (2009).
89. Locovei, S, Wang, J, and Dahl, G. Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS Lett* 580, 239-244. (2006).
90. Locovei, S, Bao, L, and Dahl, G. Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7655-7659. (2006).
91. Thompson, RJ, Zhou, N, and MacVicar, BA. Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science* 312, 924-927. (2006).
92. Hanstein, R, Negoro, H, Patel, NK, Charollais, A, Meda, P, Spray, DC, et al. Promises and pitfalls of a Pannexin1 transgenic mouse line. *Front Pharmacol* 4, 61. (2013).
93. Hanstein, R, Hanani, M, Scemes, E, and Spray, DC. Glial pannexin1 contributes to tactile hypersensitivity in a mouse model of orofacial pain. *Sci Rep* 6, 38266. (2016).
94. Huang, LY, Gu, Y, and Chen, Y. Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia* 61, 1571-1581. (2013).
95. Hung, SC, Choi, CH, Said-Sadier, N, Johnson, L, Atanasova, KR, Sellami, H, et al. P2X4 assembles with P2X7 and pannexin-1 in gingival epithelial cells and modulates ATP-induced reactive oxygen species production and inflammasome activation. *PLoS One* 8, e70210. (2013).
96. Qiu, F, and Dahl, G. A permeant regulating its permeation pore: inhibition of pannexin 1 channels by ATP. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C250-255. (2009).
97. Prochnow, N. Relevance of gap junctions and large pore channels in traumatic brain injury. *Front Physiol* 5, 31. (2014).
98. Orellana, JA, Froger, N, Ezan, P, Jiang, JX, Bennett, MV, Naus, CC, et al. ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate

- neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels. *J Neurochem* 118, 826-840. (2011).
99. Weilinger, NL, Lohman, AW, Rakai, BD, Ma, EM, Bialecki, J, Maslieieva, V, et al. Metabotropic NMDA receptor signaling couples Src family kinases to pannexin-1 during excitotoxicity. *Nat Neurosci* 19, 432-442. (2016).
 100. Na'ara, S, Gil, Z, and Amit, M. In Vitro Modeling of Cancerous Neural Invasion: The Dorsal Root Ganglion Model. *J Vis Exp*, e52990. (2016).
 101. Passmore, GM. Dorsal root ganglion neurones in culture: a model system for identifying novel analgesic targets? *J Pharmacol Toxicol Methods* 51, 201-208. (2005).
 102. Haller, I, Lirk, P, Keller, C, Wang, GK, Gerner, P, and Klimaschewski, L. Differential neurotoxicity of tricyclic antidepressants and novel derivatives in vitro in a dorsal root ganglion cell culture model. *Eur J Anaesthesiol* 24, 702-708. (2007).
 103. Liu, N, Varma, S, Shooter, EM, and Tolwani, RJ. Enhancement of Schwann cell myelin formation by K252a in the Trembler-J mouse dorsal root ganglion explant culture. *J Neurosci Res* 79, 310-317. (2005).
 104. Noda, K, Ueda, Y, Suzuki, K, and Yoda, K. Excitatory effects of algescic compounds on neuronal processes in murine dorsal root ganglion cell culture. *Brain Res* 751, 348-351. (1997).
 105. Cengiz, N, Ozturk, G, Erdogan, E, Him, A, and Oguz, EK. Consequences of neurite transection in vitro. *J Neurotrauma* 29, 2465-2474. (2012).
 106. Dihne, M, Grommes, C, Lutzenburg, M, Witte, OW, and Block, F. Different mechanisms of secondary neuronal damage in thalamic nuclei after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 33, 3006-3011. (2002).
 107. Franke, H, and Illes, P. Pathological potential of astroglial purinergic receptors. *Adv Neurobiol* 11, 213-256. (2014).
 108. Munns, CH, Chung, MK, Sanchez, YE, Amzel, LM, and Caterina, MJ. Role of the outer pore domain in transient receptor potential vanilloid 1 dynamic permeability to large cations. *J Biol Chem* 290, 5707-5724. (2015).

109. Dacheux, D, Goure, J, Chabert, J, Usson, Y, and Attree, I. Pore-forming activity of type III system-secreted proteins leads to oncosis of *Pseudomonas aeruginosa*-infected macrophages. *Mol Microbiol* 40, 76-85. (2001).
110. Sorge, RE, Trang, T, Dorfman, R, Smith, SB, Beggs, S, Ritchie, J, et al. Genetically determined P2X7 receptor pore formation regulates variability in chronic pain sensitivity. *Nat Med* 18, 595-599. (2012).
111. Sugiyama, T, Kawamura, H, Yamanishi, S, Kobayashi, M, Katsumura, K, and Puro, DG. Regulation of P2X7-induced pore formation and cell death in pericyte-containing retinal microvessels. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C568-576. (2005).
112. Michel, AD, Kaur, R, Chessell, IP, and Humphrey, PP. Antagonist effects on human P2X(7) receptor-mediated cellular accumulation of YO-PRO-1. *Br J Pharmacol* 130, 513-520. (2000).
113. Boyce, AKJ, and Swayne, LA. P2X7 receptor cross-talk regulates ATP-induced pannexin 1 internalization. *Biochem J* 474, 2133-2144. (2017).
114. Mahi, N, Kumar, A, Jaggi, AS, Singh, N, and Dhawan, R. Possible role of pannexin 1/P2x7 purinoceptor in neuroprotective mechanism of ischemic postconditioning in mice. *J Surg Res* 196, 190-199. (2015).
115. He, Y, Taylor, N, Fourgeaud, L, and Bhattacharya, A. The role of microglial P2X7: modulation of cell death and cytokine release. *J Neuroinflammation* 14, 135. (2017).
116. Burnstock, G, Krugel, U, Abbracchio, MP, and Illes, P. Purinergic signalling: from normal behaviour to pathological brain function. *Prog Neurobiol* 95, 229-274. (2011).
117. Wu, A, Green, CR, Rupenthal, ID, and Moalem-Taylor, G. Role of gap junctions in chronic pain. *J Neurosci Res* 90, 337-345. (2012).
118. Bruzzone, R, Barbe, MT, Jakob, NJ, and Monyer, H. Pharmacological properties of homomeric and heteromeric pannexin hemichannels expressed in *Xenopus oocytes*. *J Neurochem* 92, 1033-1043. (2005).
119. Szydłowska, K, and Tymianski, M. Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell Calcium* 47, 122-129. (2010).

120. Arundine, M, and Tymianski, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34, 325-337. (2003).
121. Thompson, RJ. Pannexin channels and ischaemia. *J Physiol* 593, 3463-3470. (2015).
122. Weilinger, NL, Tang, PL, and Thompson, RJ. Anoxia-induced NMDA receptor activation opens pannexin channels via Src family kinases. *J Neurosci* 32, 12579-12588. (2012).
123. Ando, RD, and Sperlagh, B. The role of glutamate release mediated by extrasynaptic P2X7 receptors in animal models of neuropathic pain. *Brain Res Bull* 93, 80-85. (2013).
124. Zoidl, G, Petrasch-Parwez, E, Ray, A, Meier, C, Bunse, S, Habbes, HW, et al. Localization of the pannexin1 protein at postsynaptic sites in the cerebral cortex and hippocampus. *Neuroscience* 146, 9-16. (2007).
125. von Hehn, CA, Baron, R, and Woolf, CJ. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. *Neuron* 73, 638-652. (2012).
126. Baron, R. Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2, 95-106. (2006).

10.ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
08/11/2016	76		Prof. Dr. Gürkan Öztürk

"Transnöronal Dejenerasyonun Hücre Kültüründe Canlı Görüntüleme Yöntemi ile Araştırılması" başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna "oybirliği" ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 12 ay

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

11.ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Esra Nur	Soyadı	Yiğit
Doğum Yeri	Erzurum	Uyruğu	TC

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	İstanbul Medipol Üniversitesi	
Lisans	Fatih Üniversitesi	2014

İş Deneyimi

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
1. Stajyer		İstanbul Üniversitesi - DETAE	2013 - Yaz
2. Stajyer		Edinburgh Üniversitesi	2012 - Yaz

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Çok iyi	Orta	Çok iyi

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES-2016	83,22086	85,04470	74,80140
ALES-2014	90,41416	89,64299	73,03535
YÖKDİL-2017	97,500		
YDS-2014	78,75000		

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Ms Office	Çok iyi
Phyton	zayıf
Adobe Photoshop	orta
Fiji İmageJ	iyi
IBM SPSS	orta
Matlab	zayıf
Eclipse	orta

Sertifikalar

Sertifika	Kurum	Yıl
Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	İstanbul Medipol Üniversitesi	2014