

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEKANİK HASARIN AKSONAL TAŞIMAYA ETKİSİ
VE AKSONAL HASAR SİNYAL MEKANİZMALARI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Elçin YENİDÜNYA
DANIŞMAN: Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

VAN 2011

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**MEKANİK HASARIN AKSONAL TAŞIMAYA ETKİSİ
VE AKSONAL HASAR SİNYAL MEKANİZMALARI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Elçin YENİDÜNYA

VAN 2011

KABUL VE ONAY SAYFASI

Biyoloji Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK danışmanlığında, Elçin YENİDÜNYA tarafından sunulan “**Mekanik Hasarın Aksonal Taşımaya Etkisi ve Aksonal Hasar Sinyal Mekanizmaları**” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 07./10./2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İmza:

Üye: Prof. Dr. Güler ÜNAL

İmza:

Üye: Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Aydın HİM

İmza:

Üye: Yrd. Doç. Dr. Burak KAPTANER

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 30./11./2011 tarih ve 2011/33-XIII sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Dr. Turgut AYGÜN
Enstitü Müdürü

ÖZET

MEKANİK HASARIN AKSONAL TAŞIMAYA ETKİSİ VE AKSONAL HASAR SİNYAL MEKANİZMALARI

Yenidünya, Elçin

Doktora Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

Ekim 2011, 125 sayfa

Nöronların bütünlüklerini koruyabilmeleri ve normal işlevlerini yerine getirebilmeleri için gövdeden akson ve dendritlere doğru (anterograd) ve ters yönde (retrograd) sürekli bir madde taşınması gerçekleşmektedir. Nörodejeneratif hastalıklarda ve travmalar sonucunda aksonal taşıma bozulur ve bunun sonucunda aksonlar üzerinde taşınan parçaların sayısı ve taşınma hızları değişir. Akson hasarı sonucu negatif ve pozitif hasar sinyal mekanizmaları oluşmakta ve hücre gövdesine bu sinyaller taşınarak nukleus haberdar edilmektedir.

Bu çalışmada, bir nöron kültürü modelinde laser ışınıyla yapılan bir akson kesisi ardından, aksonal taşımanın nasıl etkilendiği ve hasarla ilgili sinyal mekanizmalarının niteliği araştırıldı. Bunun için yetişkin fare arka kök gangliyonları ayrıştırılarak primer duyu nöron kültürü yapıldı ve *in vitro* ortamda bu hücrelerin aksonlarında taşınan parçaların sayısı ve hızları belirlendi. Aksonlar, laser ışığı ile hassas bir şekilde gövdeden yaklaşık 200 µm uzaklıktan kesildi ve 12 dakika süresince, gövdeden 50 µm uzaklıktaki bir noktada gerçekleşen aksonal taşıma analizleri yapıldı. Aksotomi sonrası dallanan ve dallanmayan aksonlarla ve komşu aksonlarda taşınan parçaların sayıları ve hızları tespit edildi. Diğer taraftan, aksonal taşımada rol oynayan dynein ve kinesin motor proteinleri, aksonal taşıma belirteci APP, aksonal protein tau ve hasar sinyal kompleksi oluşturan α ve β importinin ~~ölçümü~~ ve sonrası miktarları immünohistokimyasal olarak işaretlendi. Akson hasarı ile DR6 ve kaspaz 6 arasında bir ilişki olup olmadığı analiz edildi. Aksotomi ile nöronlarda meydana gelen hasar sinyali olarak işlev görebilecek depolarizasyon özel bir boya ile görüntülendi. Akson hasarıyla

uyarılan yeni protein sentezinin aksonal taşımaya etkisi, transkripsiyon ve translasyon seviyelerinde inhibe edilerek araştırıldı.

Çalışmanın sonucunda, *in vitro* ortamda uzayan aksonlara uygulanan aksotomiden sonra, hasar öncesine göre, retrograd olarak taşınan parçaların sayısının ve hızlarının azaldığı, diğer taraftan anterograd olarak taşınan parçaların sayısının değişmediği ancak; hızlarının azaldığı belirlenirken, komşu dal ve aksonlarda buna paralel değişikliklere rastlanmadı. Hasar sinyalinin iletilmesinde aksotomiye bağlı depolarizasyon dalgasının rol oynayabileceği ve transkripsiyon seviyesinde bir düzenlemenin olabileceği tesbit edilirken; importinler, APP, tau, DR6 ve kaspaz 6 gibi bazı faktörlerle ilgili literatürde rapor edilmemiş yeni bulgulara ulaşıldı. Sonuç olarak; bu çalışma, yetişkin nöronunda mekanik hasarın aksonal taşımayı nasıl etkilediği ve hasarla ilgili sinyal mekanizmasında nelerin rol oynayabileceğine ilişkin yeni ve önemli veriler elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Arka kök gangliyonu, Aksonal taşıma, Hasar Sinyalleri, APP, Dynein, Kinesin, α importin, β importin

ABSTRACT

THE EFFECT OF MECHANICAL INJURY ON AXONAL TRANSPORT AND AXONAL INJURY SIGNALLING MECHANISMS

Yenidünya, Elçin

PhD thesis, Biology Department

Supervisor: Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

October 2011, 125 pages

A continuous material transport from the soma to the axon or dendrite (anterograde) or in the opposite direction (retrograde) should occur in neurons to preserve their integrity and keep them functioning. Axonal transport is disturbed in neurodegenerative diseases and following traumas that lead to change in the number and speed of materials transported. Axonal injury also creates positive or negative signals that are transmitted to the cell body and inform the nucleus about the injury.

In this study, how the axonal transport is affected by an axotomy with a laser beam in a neuronal culture model and the characteristics of signal mechanisms regarding injury were investigated. For this, primary sensory neuronal cultures were setup by dissociation of adult mouse dorsal root ganglia and the number and speed of particles transported in their outgrown axons in vitro were determined. With a laser beam, axons were cut at about 200 μm from the soma and transport occurring at 50 μm during 12 minutes was analysed. The number and speed of particles in branching or solitary axons or neighbouring ones were determined. Besides, pre and post axotomy levels of motor proteins dynein and kinesin, axonal injury marker APP, axonal protein tau and injury complex forming α and β importins were immunohistochemically analysed. A potential relationship between axonal injury and DR6 and caspase 6 was investigated. Depolarization induced by axotomy, which may act as an injury signal were visualized with a special dye. The role of new protein synthesis in disturbed axonal transport after axonal injury was analyzed by inhibition of transcription and translation.

The results showed that the number and speed of retrogradely transported particles were decreased after axotomy while not the number but the speed of anterograde particles was reduced. These changes were not observed in neighbouring branches or axons. It was found that a wave of depolarization due to axotomy may act as an injury signal and a regulation at transcription level may occur. Novel findings were obtained regarding importins, APP, tau, DR6 and caspase 6. In conclusion, this study has provided new and important data about how mechanical injury affects axonal transport in adult neurons and what may play significant role in injury signalling mechanisms.

Key words: Dorsal Root Ganglion, Axonal Transport, Injury Signals, APP, Dynein, Kinesin, importin α , importin β

ÖN SÖZ

Sinir sistemi, canlının iç ve dış ortamında sürekli olarak meydana gelen değişiklikleri izleyerek bunlara cevap vermesini sağlayan, organ ve organ sistemlerinin kusursuz bir şekilde çalışmasını kontrol eden sistemdir. Periferik (çevresel) ve merkezi olmak üzere iki kısma ayrılan sinir sistemi, milyarlarca sinir hücresinden oluşur. Sinir hücresi genel olarak soma veya hücre gövdesi, dendritler ve akson olmak üzere üç bölümden oluşur. Sinir hücrelerinde gövdeden akson ve dendritlere doğru (anterograd) ve ters yönde (retrograd) sürekli bir madde taşınması gerçekleşir. Sinir hücrelerinin işlevlerini yerine getirebilmeleri gerekli maddelerin her iki yönde taşınabilmesine bağlıdır. Aksonlarda meydana gelen bu taşıma aksonal taşıma olarak adlandırılmakta olup günümüzde aksonal taşımanın temel mekanizmasıyla ilgili hala bilinmeyenlerin olduğunu ve mekanizma içinde sürekli olarak yeni bir takım oyuncuların tespit edildiğini görmekteyiz. Aksonal taşımanın bu denli irdelenen bir konu olmasının altında yatan temel sebeplerden biri bu mekanizmanın pek çok patofizyolojik mekanizmada rol oynama olasılığıdır. Diyabetik nöropati, amiyotrofik lateral skleroz, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı gibi birçok bozuklukta aksonal taşıma kusurlarının var olduğu tespit edilmiştir. Aksonal taşıma ile ilgili in vivo ve in vitro çalışmalar bulunmaktadır. Hasar oluşturulması ve hasar sonrası aksonal taşımada var olan değişiklikleri inceleyen in vitro çalışmaların çoğunda sinir hücresi ve aksonlarının büyük olması sebebiyle bazı yumuşakça türleri kullanılmıştır. Yapılan gerek in vitro gerekse in vivo çalışmalarda hasar sonrası oluşan sinyaller ve bu sinyallerin çekirdeğe taşınma mekanizmaları incelenmiştir. Bu çalışmada ise kültürü yapılmış fare arka kök gangliyonu primer duyu nöronu kültüründe, sağlıklı bir şekilde akson uzatmış nöronlara hassas bir şekilde aksotomi uygulandı. Aksotomi öncesi ve aksotomi sonrası aksonlarda taşınan parça sayıları, hızları ve bunlara etki eden çeşitli morfolojik özellikler ile hasar sinyalleri incelendi. Bu çalışmanın çok sayıda nörodejeneratif hastalığın ve sinir sistemi travmalarının yol açtığı hasarların daha iyi anlaşılması ve böylece yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacağı kanısındayız. Tez çalışmamda; her konuda güvenini, desteğini ve bilgisini esirgemeyen, değerli hocam Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e, beni bu alanda çalışmaya teşvik eden ve yardımlarını esirgemeyen sevgili hocam Prof. Dr. Güler ÜNAL'a, laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarını

esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Nurettin CENGİZ’e, Doç. Dr. Aydın HİM’e, değerli arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Burak KAPTANER’e laboratuvar çalışma arkadaşlarım Elif Kaval OĖUZ’a ve Neře AYŐİT’e, her zaman destek, güven ve sabırlarını hiçbir zaman eksik etmeyen aileme, teőekkürlerimi sunarım.

Elçin YENİDÜNYA

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xviii
KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
2.1. Nöron (Sinir hücresi)	3
2.2. Arka Kök Gangliyonu (AKG) ve primer duyu nöronları	4
2.3. Aksonal Taşıma	5
2.3.1. Aksonal taşımada görevli olan motor proteinler	8
2.3.1.1. Kinesin	8
2.3.1.2. Dynein	9
2.3.1.3. Miyosin	10
2.4. Aksonal Taşıma Çeşitleri	11
2.5. Akson hasarı ve hasar sonrası sinyal mekanizmaları	11
2.5.1. Akson hasarı	11
2.5.1.1. Waller dejenerasyonu	12
2.5.1.2. Aksonal dejenerasyon	12
2.5.1.3. Segmental demiyelinizasyon	13
2.5.2. Akson hasarı ve aksonal taşıma	13
2.5.3. Akson hasarından sonra oluşan sinyal mekanizmaları	14
2.5.3.1. Depolarizasyon dalgası	14
Depolarizasyon dalgasıyla birlikte iyon	
2.5.3.1.1. dengesi değişimi ve hücre iskeletine	14
dolayısıyla aksonal taşımaya etkisi	
2.5.3.2. Negatif hasar sinyal mekanizmaları	16
2.5.3.3. Pozitif hasar sinyal mekanizmaları	17
2.5.3.3.1. Pozitif hasar sinyali içinde yer alan	18
importinler	
2.5.4. Akson hasar sinyallerinin etki mekanizmaları	21
2.5.5. Aksonal taşıma ve Amiloid Precursor Protein (APP)	22
2.5.6. Aksonal taşıma ve tau proteini	24
2.6. Nörodejeneratif hastalıklar ve aksonal taşıma	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Deney Hayvanı	29
3.1.2. Sarf malzemeleri	29
3.2. Yöntem	29
3.2.1. Çalışmada kullanılan vasatlar	29
3.2.1.1. Diseksiyon vasatı	29
3.2.1.2. Kültür vasatı	29

3.2.2.	Fareden arka kök gangliyonlarının çıkarılması	29
3.2.3.	Hücre kültürü	31
3.2.4.	Aksotomi (akson kesisi) öncesi ve sonrası aksonal taşıma görüntülemesi	33
3.2.5.	Akson sonrası transkripsiyon ve translasyon seviyesindeki inhibisyonların aksonal taşıma üzerine etkilerinin görüntülenmesi	33
3.2.5.1.	Transkripsiyon inhibisyonu ve aksonal taşıma üzerine etkilerinin görüntülenmesi	33
3.2.5.2.	Translayon inhibisyonu ve aksonal taşıma üzerine etkilerinin görüntülenmesi	34
3.2.6.	Aksotomi yapılırken kullanılan laserin aksonal taşıma üzerine etkilerinin görüntülenmesi (kontrol)	35
3.2.7.	Aksotomiden sonra oluşan depolarizasyon dalgasının belirlenmesi	35
3.2.8.	İmmunohistokimya deneyleri	36
3.2.8.1.	Tespit işlemi	37
3.2.8.2.	Primer antikor uygulaması	37
3.2.8.3.	Sekonder antikor uygulaması	38
3.2.9.	APP-DR-6-Kaspaz-6 immünoreaktivitesi	38
3.2.10.	Mikroskopik görüntüleme ve görüntü analizleri	40
3.2.10.1.	Zaman aralıklı mikroskopi (Time Lapse) ile görüntüleme	40
3.2.10.2.	Laser taramalı konfokal mikroskopta immunohistokimyasal preparatların görüntülenmesi	41
3.2.10.3.	PALM Mikrolaser sistemi	42
3.2.10.4.	Görüntü analizleri	43
3.2.10.5.	Floresan görüntü analizleri	44
3.2.11.	İstatistiksel analizler	44
4.	BULGULAR	45
4.1.	Morfolojik özelliklere ait bulgular	45
4.2.	Aksonal taşıma	48
4.2.1.	Kontrol şartlarında dalsız aksonlarda taşıma	49
4.2.2.	Kontrol şartlarında dallı aksonlarda taşıma	53
4.3.	Aksotominin aksonal taşımaya etkisi	59
4.3.1.	Dalsız aksonlarda taşıma	59
4.3.2.	Dallı aksonlarda taşıma	69
4.3.3.	Komşu aksonlarda taşıma	77
4.4.	Aksotomi öncesi ve sonrası transkripsiyon ve translasyon seviyesindeki inhibisyonların aksonal taşıma üzerine etkileri	82
4.4.1.	DRB ile transkripsiyon inhibisyonunun aksonal taşıma üzerine etkileri	82
4.4.2.	Anisomisin ile translasyon inhibisyonunun aksonal taşıma üzerine etkileri	84
4.5.	Aksotomiye bağlı depolarizasyon özellikleri	85
4.6.	Aksotomi hasarı sinyalinde importinlerin rolü	87

4.7. Aksonal taşımayla ilişkili proteinlerde aksotomiye bağlı meydana gelen değişiklikler	90
4.8. APP-DR-6-Kaspaz-6 immünoaktivitesi	96
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	100
5.1. Çalışmada kullanılan yöntemin kritiği	100
5.2. Kontrol şartlarında aksonal taşıma ile ilgili tanımlayıcı veriler	102
5.3. Akson hasarı sonrası aksonal taşıma ile ilgili bulgular	104
5.4. Sonuç ve Yorum	111
KAYNAKLAR	113
ÖZGEÇMİŞ	125

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Bir nöronun yapısı (Anonim, 2011).	3
Şekil 2.2. Arka kök gangliyonu anatomisi (Weitz, 1998).	4
Şekil 2.3. Mikrotübül yapısı (Anonim, 2011).	6
Şekil 2.4. Aksonal taşıma (Pasinelli ve Brown, 2006).	7
Şekil 2.5. Kinesinin yapısı (Anonim, 2011).	9
Şekil 2.6. Dyneinin yapısı (Hirokawa, 1998).	10
Şekil 2.7. Nuklear taşıma döngüsü (Yudin ve Fainzilber, 2009).	19
Şekil 2.8. Retrograd hasar sinyal kompleksi (Hanz ve Fainzilber, 2007).	20
Şekil 2.9. Aksonal varikoziteler, sferoidler ve son bulb (Coleman, 2005).	24
Şekil 2.10. Tau fosforilasyonu ve mikrotübül depolimerizasyonu (Mandelkow ve Mandelkow, 1998).	25
Şekil 2.11. Çeşitli seviyelerde retrograd aksonal taşıma değişiklikleri (Perlson ve ark., 2010).	26
Şekil 3.1. Arka kök gangliyon hücre kültürü basamakları.	32
Şekil 3.2. a. Aksonu dallanmayan nöronlar, b. Komşu dallı aksone sahip olan nöronlar, c. Komşu aksonu olan nöronlar	34
Şekil 3.3. APP ölüm reseptör mekanizması (Nikolaev ve ark. 2009).	39
Şekil 3.4. Zaman aralıklı mikroskopi sistemi	41
Şekil 3.5. Laser taramalı konfokal mikroskopi sistemi.	42
Şekil 3.6. PALM Mikrolaser Sistemi	43
Şekil 4.1. Kültür ortamında akson uzatmış nöronlar	45
Şekil 4.2. Gövde alanı (μm^2) / akson sayısı korelasyon grafiği ($r=-0,13$; $p<0,05$).	46
Şekil 4.3. Gövde alanı (μm^2) / akson çapı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,15$; $p<0,05$).	46
Şekil 4.4. Gövde alanı (μm^2) / akson dal sayısı korelasyon grafiği ($r=0,60$; $p<0,05$)	47
Şekil 4.5. Aksotomi sonrası meydana gelen geri çekilme miktarı (μm) / çekirdeğin akson hilusuna uzaklığı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=-0,16$; $p<0,05$).	47
Şekil 4.6. Gövdeden çıkan toplam akson sayısı / aksotomi sonrası meydana gelen geri çekilme miktarı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,11$; $p<0,05$).	48
Şekil 4.7. Aksotomi sonrası meydana gelen geri çekilme miktarı (μm) / aksotomi mesafesi (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=-0,15$; $p<0,05$).	48
Şekil 4.8. Kontrol grubunda laser atışı öncesi ve sonrasında, anterograd ve retrograd olarak taşınan parça sayısı / dk.	49
Şekil 4.9. Retrograd olarak taşınan parçanın üç saniye süresince arka arkaya karelerde görüntüsü.	49
Şekil 4.10. Dalsız aksonlarda, kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / çekirdek	51

	uzaklığı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,18$; $p<0,01$).	
Şekil 4.11.	Dalsız aksonlarda, kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson çapı korelasyon grafiği ($r=0,18$; $p<0,01$).	51
Şekil 4.12.	Dalsız aksonlarda, kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / gövde alanı (μm^2) korelasyon grafiği ($r=0,20$; $p<0,01$).	52
Şekil 4.13.	Dalsız aksonlarda, kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson çapı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,19$; $p<0,01$).	52
Şekil 4.14.	Dalsız aksonlarda, kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / gövde alanı (μm^2) korelasyon grafiği ($r=0,22$; $p<0,01$).	53
Şekil 4.15.	Dalsız aksonlarda, kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / çekirdek uzaklığı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,19$; $p<0,01$).	53
Şekil 4.16.	Dallı aksonlarda, kontrol şartlarında anterograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson sayısı korelasyon grafiği ($r=0,77$; $p<0,01$).	55
Şekil 4.17.	Dallı aksonlarda, kontrol şartlarında anterograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / gövde alanı (μm^2) korelasyon grafiği ($r=0,88$; $p<0,01$).	55
Şekil 4.18.	Dallı aksonlarda, kontrol şartlarında anterograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson çapı (μm) korelasyon grafiği ($r=-0,68$; $p<0,05$).	56
Şekil 4.19.	Dallı aksonlarda, kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson çapı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,21$; $p<0,05$).	56
Şekil 4.20.	Dallı aksonlarda, kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / çekirdek uzaklığı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,40$; $p<0,01$).	57
Şekil 4.21.	Dallı aksonlarda, kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson sayısı korelasyon grafiği ($r=-0,35$; $p<0,01$).	57
Şekil 4.22.	Dallı aksonlarda, kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson çapı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,22$; $p<0,05$).	58
Şekil 4.23.	Dallı aksonlarda, kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / çekirdek uzaklığı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,41$; $p<0,05$).	58
Şekil 4.24.	Dalsız aksonlarda aksotomi öncesi ve sonrası anterograd aksonal taşıma değerleri (*: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. $p<0,05$).	60
Şekil 4.25.	Dalsız aksonlarda aksotomi öncesi ve sonrası retrograd aksonal taşıma değerleri (*: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. $p<0,01$).	60

Şekil 4.26.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası anterograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,46$; $p<0,01$).	61
Şekil 4.27.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası anterograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) ve geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,46$; $p<0,01$).	61
Şekil 4.28.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) ve gövde alanı (μm^2) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,34$; $p<0,01$).	63
Şekil 4.29.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / çekirdeğin hilusa olan uzaklığı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,29$; $p<0,01$).	63
Şekil 4.30.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson çapı arasındaki (μm) korelasyon grafiği ($r=0,28$; $p<0,01$).	64
Şekil 4.31.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) ve geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,21$; $p<0,01$).	64
Şekil 4.32.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / aksotomi mesafesi (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=-0,20$; $p<0,05$).	65
Şekil 4.33.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / çekirdeğin hilusa uzaklığı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,29$; $p<0,01$).	65
Şekil 4.34.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / gövde alanı (μm^2) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,33$; $p<0,01$).	66
Şekil 4.35.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson çapı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,27$; $p<0,01$).	66
Şekil 4.36.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,29$; $p<0,01$).	67
Şekil 4.37.	Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) ve aksotomi mesafesi (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=-0,21$; $p<0,01$).	67
Şekil 4.38.	Dalsız aksonlarda anterograd olarak taşınan parçaların d-hız değişim oranı / geri çekilme miktarı (μm) ile korelasyonunu gösteren grafik ($r=0,42$; $p<0,05$).	69
Şekil 4.39.	Dalsız aksonlarda retrograd olarak taşınan parçaların d-hız değişim oranı / geri çekilme miktarı (μm) ile korelasyonunu gösteren grafik ($r=0,41$; $p<0,05$).	69
Şekil 4.40.	Dallı aksonlarda aksotomi öncesi ve sonrası anterograd aksonal taşıma değerleri.	70

Şekil 4.41.	Dallı aksonlarda aksotomi öncesi ve sonrası retrograd aksonal taşıma değerleri.	70
Şekil 4.42.	Dallı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson çapı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,27$; $p<0,05$).	72
Şekil 4.43.	Dallı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,24$; $p<0,01$).	72
Şekil 4.44.	Dallı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson sayısı arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=-0,29$; $p<0,01$).	73
Şekil 4.45.	Dallı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson sayısı arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=-0,39$; $p<0,01$).	73
Şekil 4.46.	Dallı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson çapı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,32$; $p<0,01$).	74
Şekil 4.47.	Dallı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,27$; $p<0,05$).	74
Şekil 4.48.	Dallı aksonlarda anterograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız değişim oranı / akson dal sayısı arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,32$; $p<0,05$).	75
Şekil 4.49.	Dallı aksonlarda anterograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız değişim oranı / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,48$; $p<0,05$).	76
Şekil 4.50.	Dallı aksonlarda retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız değişim oranı / akson dal sayısı arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,30$; $p<0,05$).	76
Şekil 4.51.	Dallı aksonlarda retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız değişim oranı / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,49$; $p<0,05$).	77
Şekil 4.52.	Komşu aksonlarda anterograd taşımada aksotomi öncesi ve sonrası değişim grafiği.	78
Şekil 4.53.	Komşu aksonlarda retrograd taşımada aksotomi öncesi ve sonrası değişim grafiği.	78
Şekil 4.54.	Gövdeden komşu aksonuna aksotomi yapılmış olan aksonun aksotomi sonrasında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,19$; $p<0,05$).	79
Şekil 4.55.	Gövdeden komşu aksonuna aksotomi yapılmış olan aksonun aksotomi sonrasında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / aksotomi mesafesi (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,20$; $p<0,05$).	80
Şekil 4.56.	Gövdeden komşu aksonuna aksotomi yapılmış olan aksonun aksotomi sonrasında retrograd olarak taşınan	80

	parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / gövde alanı arasındaki (μm^2) korelasyon grafiği ($r=0,22$; $p<0,05$).	
Şekil 4.57.	Gövdeden komşu aksonuna aksotomi yapılmış olan aksonun aksotomi sonrasında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız değişim oranı / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,41$; $p<0,05$).	81
Şekil 4.58.	Anterograd olarak taşınan parçaların aksotomi öncesi DRB varlığı ile yokluğu arasındaki farkı gösteren grafik.	82
Şekil 4.59.	Anterograd olarak taşınan parçaların DRB varlığında aksotomi öncesi ve sonrasındaki durumu gösteren grafik (*: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *: $p<0,01$).	83
Şekil 4.60.	Retrograd olarak taşınan parçaların DRB varlığında aksotomi öncesi ve sonrasındaki durumu gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *: $p<0,01$, #: $p<0,01$).	83
Şekil 4.61.	Anterograd olarak taşınan parçaların Anisomisin varlığında aksotomi öncesi ile kontrol durumunu gösteren grafik (*: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. $p<0,01$).	84
Şekil 4.62.	Anterograd olarak taşınan parçaların, Anisomisin varlığında aksotomi öncesi ve sonrası durumları	84
Şekil 4.63.	Retrograd olarak taşınan parçaların, Anisomisin varlığında aksotomi öncesi ve sonrası durumları (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *: $p<0,05$, #: $p<0,01$).	85
Şekil 4.64.	Çekirdek ve gövde de aksotomi sonrası kontrol grubuna göre DIBAC miktarındaki artışı gösteren grafik (*; #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *: $p<0,01$; #: $p<0,01$).	86
Şekil 4.65.	a. Aksotomi öncesi DIBAC ile boyanmış nöron, b. Aksotomi sonrası DIBAC ile boyanmış nöronda özellikle hücre gövdesi etrafında boyanma artışı (mavi ok), c. Aksotomi öncesi DIBAC ile boyanmış nöron, d. Aksotomi sonrası DIBAC ile boyanmış nöronda tüm hücrede boyanma artışı (sarı ile gösterilen çizgi aksotominin yapıldığı yer).	87
Şekil 4.66.	Çekirdek, gövde ve distal aksonda importinin, aksotomi sonrası kontrol grubuna göre miktarındaki azalmayı gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *: $p<0,05$; #: $p<0,01$).	88
Şekil 4.67.	Gövdede α/β importinin, aksotomi sonrası kontrol grubuna göre miktarındaki azalmayı gösteren grafik (*: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. $p<0,05$).	88
Şekil 4.68.	a. α importin görüntüsü, b. β importin görüntüsü, c. α ve β	89

	importinin birlikte bulundukları durumun görüntüsü, d. α ve β importinin kolokalizasyon görüntüsü	
Şekil 4.69.	a. Gövde ve çekirdekte α importin görüntüsü, b. Gövde ve çekirdekte β importin görüntüsü, c. Gövde ve çekirdekte α ve β importinin birlikte bulundukları durumun görüntüsü, d. Gövde ve çekirdekte α ve β importinin kolokalizasyon görüntüsü.	90
Şekil 4.70.	Çekirdek ve proksimal aksonda kinesinin, aksotomi sonrası kontrol grubuna göre miktarındaki artışı gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *:p<0,05; #:p<0,05).	91
Şekil 4.71.	a. APP görüntüsü, b. Kinesin görüntüsü, c. APP ve kinesinin birlikte bulundukları durumun görüntüsü, d. APP ve kinesinin kolokalizasyon görüntüsü.	92
Şekil 4.72.	Proksimal ve distal aksonda dyneinin, aksotomi sonrası kontrol grubuna göre miktarındaki artışı gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *:p<0,05; #:p<0,05).	93
Şekil 4.73.	a. APP görüntüsü, b. Dynein görüntüsü, c. APP ve dyneinin birlikte bulundukları durumun görüntüsü, d. APP ve dyneinin kolokalizasyon görüntüsü.	94
Şekil 4.74.	Çekirdek ve gövde de tau ve APP'nin birlikte bulunma durumunun aksotomi sonrası kontrol grubuna göre miktarındaki azalışı gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *:p<0,01; #:p<0,05).	95
Şekil 4.75.	a. APP görüntüsü, b. Tau görüntüsü, c. APP ve taunun birlikte bulundukları durumun görüntüsü, d. APP ve taunun kolokalizasyon görüntüsü.	96
Şekil 4.76.	N-APP inhibisyonu yapıldığı durumda, kontrol ve kontrol aksotomisi gruplarında proksimal ve distal akson parçalarında, N-APP miktarlarını gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *:p<0,01; #:p<0,01).	97
Şekil 4.77.	N-APP inhibisyonu yapıldığı durumda, kontrol ve kontrol aksotomisi gruplarında proksimal aksonda, DR 6 miktarlarını gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *:p<0,01; #:p<0,05).	98
Şekil 4.78.	N-APP'nin inhibe edildiği durumda, a. N- APP görüntüsü, b. Kaspaz 6 görüntüsü, c. DR 6 görüntüsü, d. N-APP ve DR6'nın birlikte bulundukları durumun görüntüsü, e. N-APP ve DR6'nın kolokalizasyon görüntüsü.	98
Şekil 4.79.	Kontrol aksotomisinde, a. N-APP görüntüsü, b. Kaspaz 6 görüntüsü, c. DR 6 görüntüsü, d. N-APP ve DR6'nın birlikte bulundukları durumun görüntüsü, e. N-APP ve DR6'nın kolokalizasyon görüntüsü.	99

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Retrograd hasar sinyalleriyle ilgili aktivasyonlar (Hanz ve Fainzilber, 2006).	22
Çizelge 2.2. Nörodejeneratif hastalıkların aksonal taşıma bozukluklarıyla bağlantısı (Perlson ve ark., 2010).	27
Çizelge 3.1. Sarf malzeme listesi.	30
Çizelge 3.2. İmmünohistokimya kombinasyonları.	38
Çizelge 3.3. Üçlü immünohistokimya boyama kombinasyonu.	40
Çizelge 4.1. Dalsız aksonlarda aksonal taşıma değerleri	50
Çizelge 4.2. Proksimalinde dallanması olmayan aksonlarda taşıma hızları ile ilgili anlamlı korelasyonlar (+:artış; -:azalış).	50
Çizelge 4.3. Kontrol şartlarında dallı aksonlarda aksonal taşıma değerleri	54
Çizelge 4.4. Kontrol şartlarında, dallanma distalinde aksonal taşıma hızları ile ilgili anlamlı korelasyonlar (+:artış, -:azalış).	54
Çizelge 4.5. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası aksonal taşıma değerleri.	59
Çizelge 4.6. Aksotomi sonrası dalsız aksonlarda aksonal taşıma hızları ile ilgili anlamlı korelasyonlar (+:artış; -:azalış).	62
Çizelge 4.7. Dallı aksonlarda aksotomi sonrası aksonal taşıma değerleri.	70
Çizelge 4.8. Aksotomi sonrası dallı aksonlarda aksonal taşıma hızları ile ilgili anlamlı korelasyonlar (+:artış, -:azalış).	71
Çizelge 4.9. Komşu aksonlarda aksotomi öncesi ve sonrası elde edilen veriler.	77
Çizelge 4.10. Komşu aksonuna aksotomi yapılmış aksonlarda aksonal taşıma hızları ile ilgili anlamlı korelasyonlar (+:artış, -:azalış).	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μl	Mikrolitre
μJ	Mikrojoule
μm	Mikrometre (Mikron)
Ca^{++}	Kalsiyum
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad Derece
cm	Santimetre
dk	Dakika
G	Gravite
Hz	Hertz
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogram
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
ng	Nanogram
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
sn	saniye

Kısaltmalar

AKG	Arka kök gangliyonu
ALS	Amiyotrofik Lateral Skleroz
a.ö.	Aksotomi öncesi
APP	Amiloid Prekürsor Protein
Arp-1	Aktinle ilişkili protein 1 (Arp-1)
a.s.	Aksotomi sonrası
ATP	Adenozin Tri Fosfat
ATPaz	Adenozin Tri Fosfataz
BACE	Beta sekretaz
CAS	Hücrel apoptozise duyarlı genlerin ürünü olan protein
CGRP	Kalsitonin geni ile ilişkili peptid
CREB	cAMP'ye bağlanan ve NGF'e cevap veren protein
d-hız	Duraksamalı hız

DIBAC
DR6
DRB
GEFs
GTP
GTPaz
JAK
JNK
KLCs
mRNA
NF
NGF
NLS
Ort.
SCa
SCb
SDOD
s-hız
STAT3

Syd
Trk

1,3- dibutylbarbituric acid
Ölüm reseptörü 6
Dihidrobenzimidazole 1- β -D ribofuranosid
Guanin nükleotid değişim faktörü
Guanozin trifosfat
Guanozin trifosfataz
Janus Kinaz
c-Jun NH2 terminal Kinaz
Kinesin hafif zincir
Mesajcı Ribo Nükleik Asit
Nörofilament
Sinir büyüme faktörü
Nuklear lokalizasyon sinyali
Ortalama
Yavaş bileşen A
Yavaş bileşen B
Süperoksiddismutaz
Sürekli hız
Sinyal Çevireci ve Transkripsiyon
Aktivatörü 3
Sunday driver
Tirozin kinaz

1.GİRİŞ

Çeşitli duyu organlarından sayısız bilgiyi alan ve bu bilgilere vücudun uygun cevabı vermesi için işleyen sinir sistemi, üstlendiği bu koordinasyon görevinin yanı sıra canlının iç ve dış çevresinde meydana gelen değişikliklere karşı vücudun dengesini sağlamaktadır (Guyton ve Hall, 2001). Sinir sistemi anatomik olarak merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sistemlerinden oluşmaktadır. Merkezi sinir sistemi: beyin, omurilik ve gözün sinir ile ilgili kısımlarından oluşurken; periferik sinir sistemi: periferik ganglionlar, sinirler, gangliyonları merkezi sinir sistemine bağlayan sinir uçları, reseptörler ve vücudun efektör yapılarından oluşur. Sinir sisteminin işlevsel birimleri, nöron veya sinir hücresi olarak adlandırılan uyarılabilme yeteneğine sahip son derece özelleşmiş hücrelerdir. Bu hücrelerde genel olarak soma veya hücre gövdesi, dendritler ve akson olmak üzere üç bölümden oluşur (Kierszenbaum, 2006).

Sinir hücrelerinde gövdeden akson ve dendritlere doğru (anterograd) ve ters yönde (retrograd) sürekli bir madde taşınması gerçekleşir. Sinir hücrelerinin işlevlerini yerine getirebilmeleri gerekli maddelerin her iki yönde taşınabilmesine bağlıdır. Bu taşınan maddeler arasında membranlı organeller, tübülünler, aktinler, metabolik enzimler ve nörotransmitterler bulunmaktadır. Nöritler (akson ve dendritler) üzerinde bu maddelerin taşınmasında motor protein olarak adlandırılan çeşitli proteinler görev alır. Nöronlarda mikrotübüller, organeller ve diğer hücre içi materyallerin gidecekleri yerlere taşınmasında bir ray gibi görev üstlenmiştir. Mikrotübül üzerinde motor görevi yapan proteinler üç büyük sınıfa ayrılmıştır. Bunlar miyozinler, dyneinler ve kinesinlerdir (Hirokawa, 1998). Kinesinler, anterograd olarak kargo taşıyan iki ağır ve iki hafif zincirden oluşan 360 kDa molekül ağırlığında bir heterotetramerdir (Bloom ve ark., 1988). Dyneinler ise retrograd olarak kargo taşıyan iki ağır, üç orta, dört hafif zincirden oluşan çok alt birimli kompleks bir proteindir (Paschacl ve ark., 1987; Lye ve ark., 1987; Shroer ve ark., 1989). Günümüzde aksonal taşımanın temel mekanizmasıyla ilgili hala bilinmeyenlerin olduğunu ve mekanizma içinde sürekli olarak yeni bir takım oyuncuların tespit edildiğini görmekteyiz (Hirokawa, 1998). Aksonal taşımanın bu denli irdelenen bir konu olmasının altında yatan temel sebeplerden biri bu mekanizmanın pek çok patofizyolojik mekanizmada rol oynama olasılığıdır (Almenar-Quearalt ve Goldstein, 2001). Bu konuda yapılan çalışmaların daha ilk yıllarından itibaren çeşitli

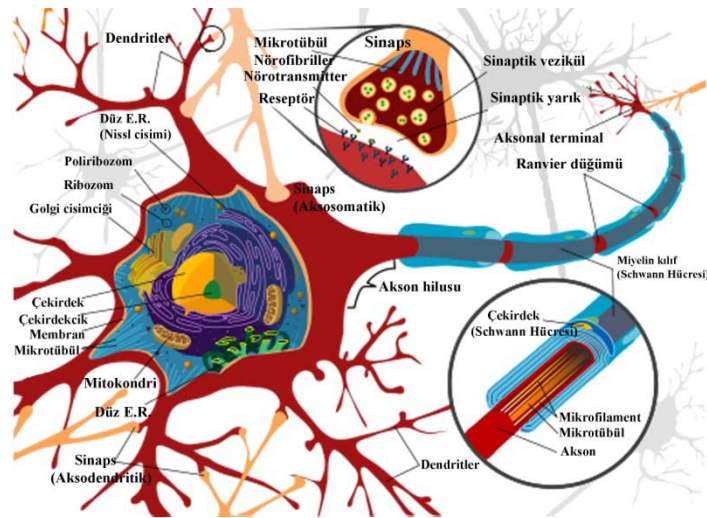
nörodejeneratif hastalıklarda aksonal taşımanın bozulmuş olabileceği düşünülmüştür (Schwab, 1977; Brimijoin, 1982). Diyabetik nöropatiden, Amiyotrofik Lateral Skleroz, Alzheimer hastalığından Huntington hastalığına kadar pek çok bozuklukta aksonal taşıma kusurlarının var olduğu tespit edilmiştir (Chevalier-Larsen ve Hozbaur, 2006; Coleman, 2005).

Bu çalışmanın amacı, fare primer duyu nöron kültüründe akut hasar sonrası aksonal taşımanın hangi mekanizmalarla ve ne şekilde etkilendiğinin açıklığa kavuşturulmasıdır. Bu çalışmanın çok sayıda nörodejeneratif hastalığın ve sinir sistemi travmalarının yol açtığı hasarların daha iyi anlaşılması ve böylece yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunacağı kanısındayız.

2. KAYNAK BİLDİRİLİŞLERİ

2.1. Nöron (Sinir Hücresi)

Bütün nöronlar, onları diğer doku hücrelerinden farklı kılacak genel özelliklere sahiptirler. Nöronlar tipik olarak yüksek derecede polarize durumdadırlar. Elektriksel sinyalleri işleyebilmek için hücre fonksiyonları kısımlara ayrılmıştır. Hücre gövdesi olarak adlandırılan perikaryon, genellikle toplam hücre hacminin onda birinden daha az kısmını oluşturur. Ayrıca gövde, nukleus ve diğer hücre organellerini içerir. Nöronun diğer kısımlarını oluşturan dendritler ve akson, hücre gövdesinden çıkan uzantılardır. Dendritler çok sayıda ince dallara ayrılan diğer nöronlardan sinaptik bilgileri almak için özelleşmiş yapılardır (Şekil 2.1). Akson ise elektriksel uyarıları yayan, genellikle uzak mesafelere ulaşan diğer bir sinir hücresi ya da hedef organla nöronu sonlandıran tek özelleşmiş uzantıdır. Nöronların hücre membranındaki iyon kanalları ve pompaları yardımıyla hücrenin içi ve dışı arasındaki anlık iyon değişimleri sonucu elektriksel potansiyelin hızlı bir şekilde değişmesi mümkündür. Nöronlarda polarite ve uyarılabilme özellikleri uzun mesafeler boyunca sinyallerin alınması, iletilmesi ve işlenmesini sağlayacak şekilde gelişmiştir. Hücre gövdesinden çıkan uzantı sayısına göre nöronlar multipolar, bipolar, psödounipolar ve unipolar olmak üzere dört gruba ayrılırlar. İşlevlerine göre ise duyu, motor ve internöronlar olmak üzere üç gruba ayrılırlar (Kandel ve ark., 2000).

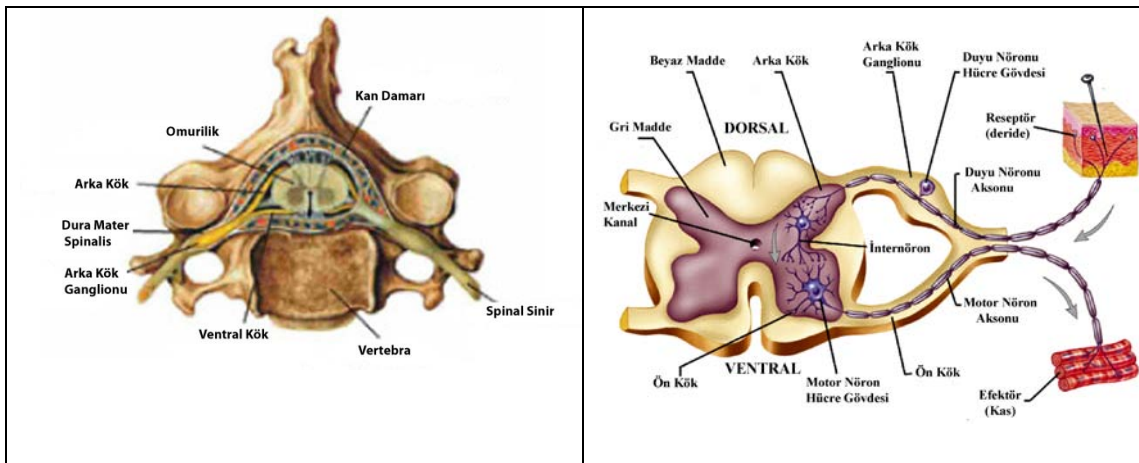


Şekil 2.1. Bir nöronun yapısı (Anonim, 2011).

2.2 Arka Kök Gangliyonu (AKG) ve primer duyu nöronları

Omurilik dorsal ve ventral boynuzlarından, arka (dorsal) ve ön (ventral) kökler den oluşur. Bu kökler, omurilikten ve omuriliğe doğru uzanan sinir lifleri taşırlar. Arka kökler omuriliğe duyu (afferent) lifleri, ventral kökler omurilikten motor (efferent) lifleri taşırlar. Yan taraflarda ise her bir intervertebral deliğe yakın bir şekilde yerleşmiş bir dorsal kök içinde çok sayıda dorsal kökçük, ventral kök içinde ise çok sayıda ventral kökçük birleşmiş durumda bulunmaktadır. Bu kökler sonra intervertebral foramen içinde vertebral kanallarda uzanarak ayrılırlar. Burada arka ve ön kökler duyu ve motor fibrillerin her ikisini taşıyan spinal siniri oluşturmak üzere birleşirler. Omuriliğe lateralden, ön kökle ortadan birleşen bir arka kök, intervertebral foramina içinde kıvrılır ve bu arka kök gangliyonudur (Şekil 2.2).

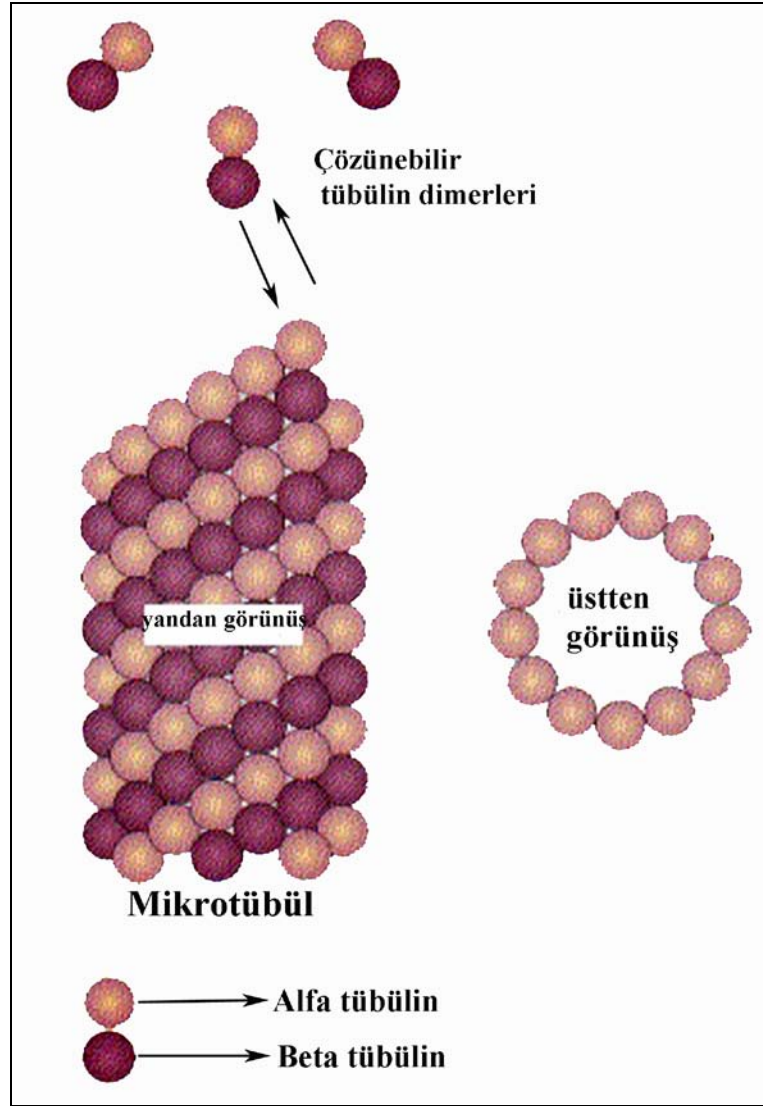
Gangliyon nöron hücre gövdelerinin bir arada bulunduğu yapılara verilen addır. AKG periferal duyu liflerinin gövdelerini içerir. Periferal duyu nöronları nadir ve benzersiz bir yapıya sahiptirler. Periferal duyu nöronları psödounipolar yapıdadır. Psödounipolar nöron tek aksona sahiptir. Ancak gövdeden çıkan tek akson T şeklinde ikiye ayrılır. Aksonun bir kolu ya özelleşmiş bir yapıda, ya da serbest sinir ucu formunda bir reseptör yapısı oluşturur (Meissner kapsülü ya da Paccini kapsülü gibi). Bu reseptörler deri, deri altı dokular, derin dokular ya da iç organlara yerleşmiştir. Aksonun diğer ucu ise merkezi sinir sistemi ile ilişkilidir. Bu nöronlar genellikle duyu sonlanmalarından aldıkları mesajları merkezi sinir sistemine iletirler (Şekil 2.2). Dolayısıyla bu nöronlara duyu nöronları adı da verilmektedir.



Hücre gövdesi metabolik fonksiyonları yerine getirir ve 10-50 µm büyüklüğündedir. Hücre içinde endoplazmik retikulum ve üzerinde Nissl cisimcikleri bulunmaktadır. Çekirdek içinde belirgin bir çekirdekcik vardır. Arka kök ganliyonları yan yana 10-20 µm büyüklüğünde, en fazla 50 µm büyüklüğünde hücre gövdelerinin bir araya gelmesinden oluşur. AKG nöronları küçük satellit hücreleri tarafından çevrelenir (Öztürk, 1999).

2.3. Aksonal Taşıma

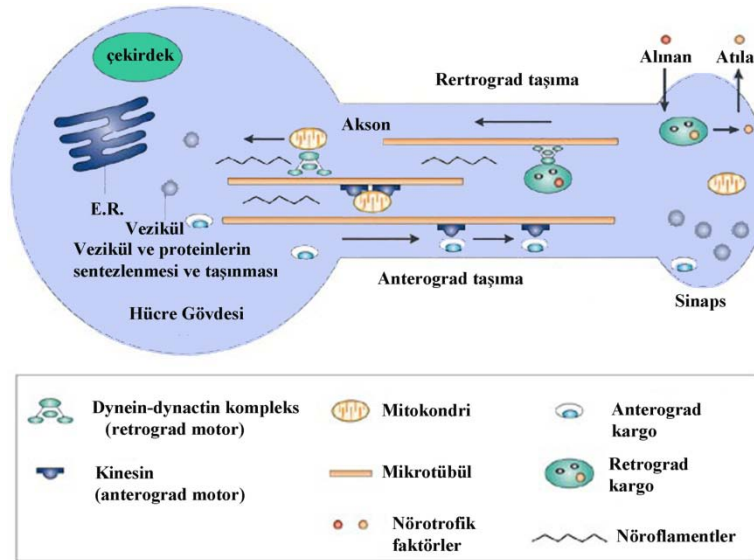
Nöronlar hücre dışıyla içi arasında aksonlarla ve dendritlerle bilgi alışverişini sağlamak için polarize durumdadırlar. Bu polarize yapı, fonksiyonlarını yerine getirebilmeleri için gereklidir. Polaritenin oluşumundan, bir çok protein ve hücrenin sitoiskelet elemanlarının nitelikleri ve dağılımları sorumludur (Setou ve ark., 2003). Nöronların hücre iskeleti yapısını oluşturan önemli elemanlarından biri olan nörofilamentler aksonlara mekanik destek ve kararlılık sağlar. Nörofilamentlerin moleküler ağırlıklarına göre NF 68 (hafif zincir), NF 160 (orta zincir) ve NF 200 (ağır zincir)'den oluşan bir heteropolimer oldukları bilinmektedir (Hoffman ve ark., 1984; Schlaepfer, 1987). Hücre iskeleti yapısını oluşturan diğer önemli elemanlarından biri mikrotübüllerdir (Stephen ve Edds 1976; Schap ve ark., 1977). Aksonal taşıma gerçekleşirken mikrotübüller bir ray gibi iş görürler. Mikrotübüller, tübülün heterodimerlerinden oluşan tüp benzeri yapılardır. On üç adet paralel bir şekilde dizilmiş protofilament mikrotübül duvarını oluşturur (Şekil 2.3). Aksonlarda mikrotübüller daha hızlı büyüyen artı uç ve daha yavaş büyüyen eksi uç olmak üzere polarize durumda uzanır (Hirokawa, 1998).



Şekil 2.3. Mikrotübül yapısı (Anonim, 2011).

Aksonal taşımayla ilgili çalışmaların tarihi 1960'lara kadar uzanır (Grafstein ve Murray, 1969). Hücresel komponentler hücre fonksiyonunun devamlılığının sağlanması için doğru zamanda doğru yerlere teslim edilmelidir. Bunun için iki yönlü madde taşınması gerekmektedir (Şekil 2.4). Akson ve sinaptik terminalin gereksinim duyduğu proteinler hücre gövdesinde sentezlendikten sonra buraya taşınmak zorundadır. Çok sayıda protein membranlı organeller içerisinde ya da protein kompleksler halinde taşınır (Almenar-Queralt ve Goldstein, 2001) (Şekil 2.4). Mata ve ark., (1985) işaretlenmiş intraaksonal proteinleri sinire enjekte ettikten sonra enjekte edilen bölgenin proksimal ve distal kısımlarına bu proteinlerin anterograd ve retrograd olarak taşınma sonucu ilerlediklerini tespit etmişlerdir. *In vitro* ortamda aksonal taşıma

üzerine etki edebilecek çeşitli maddeler çalışılmıştır. Histaminin kültürü yapılan fare AKG nöronlarında anterograd ve retrograd yönde taşınan madde sayısını azalttığı bulunmuştur (Amano ve ark., 2001). Primer duyu nöronlarında ekstraselüler ATP'nin aksonal taşımayı nasıl etkilediği araştırılmış ve her iki yönde 14 dakika içinde önemli derecede arttığı tespit edilmiştir (Sakama ve ark., 2003). Yapılan farklı bir çalışmada aksonal taşımanın devamı için protein kinaz C aktivitesinin gerekli olduğu, protein kinaz C inhibitörü kullanıldığında anterograd ve retrograd taşınmanın azaldığı tespit edilmiştir (Hiruma ve ark., 1999). Kültürü yapılmış fare primer duyu nöronlarında aksonal taşıma üzerine, P maddesinin ve kalsitonin-gen ilişkili peptidin etkisi araştırılmıştır. Sonuçta P maddesinin anterograd ve retrograd yönde taşımayı azalttığı, α -CGRP'nin ise arttırdığı bulunmuştur (Hiruma ve ark., 2000).



Şekil 2.4. Aksonal taşıma (Pasinelli ve Brown, 2006).

Uzunca bir süre bütün proteinlerin hücre gövdesinde sentezlenip anterograd aksonal taşıma ile nöronların uzak bölgelerine iletildiği bilinmesine rağmen bir takım proteinler özel durumlarda aksonda lokal olarak sentezlenmektedir (Dalhstrom, 2010). Goldfish (altın balık), Mauthner aksonlarında ve mürekkep balığının dev aksonlarında ribozomlar ve RNA'nın gözlenmesiyle burada lokal bir sentezin olduğu yönünde ilk gözlemler elde edilmiştir (Edström ve Sjöstrand 1969; Giuditta, 1980). Mürekkep balığının aksonlarında nörofilament β aktin, β tübilin, kinesin, anolaz, ısı şok proteinlerini kodlayan RNA'lar bulunmaktadır (Kaplan ve ark., 1992; Chun ve ark.,

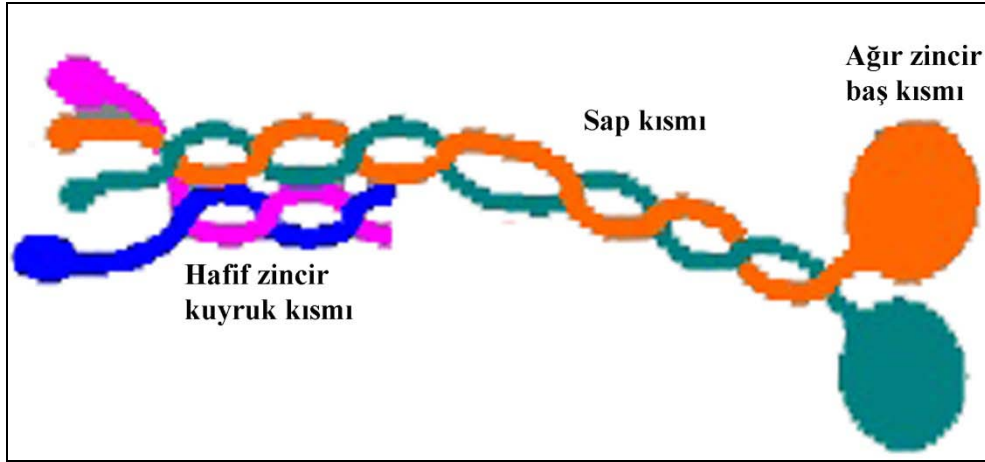
1996). Yine mürekkep balığı dev aksonlarında çalışan farklı bir araştırmacı grubu YOYO-1 ile işaretlediği endojen ribozom plaklarının postsinaptik aksonal bölgede diğer kısımlara oranla daha fazla bulunduğunu ve bu plakların genellikle mitokondrilere yakın bulunduklarını tespit etmişlerdir (Bleher ve Martin, 2001). Aksonal RNA'lar arasında translasyon faktörleri, ribozomal proteinleri kodlayan mRNA'larda bulunmaktadır (Willis ve Twiss, 2006). Böylece aksonlar ihtiyaçları olan proteinleri sentezleyebilirler. Memelilerde aksonal mRNA'ların büyük kısmı anterograd olarak perikaryondan yaklaşık 100 mm/gün hızında taşınır (Wills 2006, Zhang 2000). Gelişmiş memeli nöronlarında aksonlardaki proteinin küçük bir oranı lokal olarak sentezlenmektedir. Travma gibi bazı özel durumlarda aksondaki protein sentez oranı değişebilir (Dalhstrom, 2010). Yetişkin memeli nöronları, cAMP'ye bağlanan ve NGF'e cevap veren proteini (CREB) kodlayan mRNA içerirler. Aksondaki CREB transkripsiyon faktörünün lokal translasyonu, NGF'e cevap veren protein olduğu için nukleusa sinyal taşır (Cox ve ark., 2008; Lin ve Holt, 2008).

2.3.1. Aksonal taşımada görevli olan motor proteinler

2.3.1.1. Kinesin

Yapılan çeşitli mikroskopik ve biyokimyasal araştırmalar mikrotübüller boyunca membranlı organellerin, ATP aktivasyonu ile kinesin motor proteini ile taşındığını göstermiştir (Grafstein, 1980, Hirokawa, 1982). Kinesin molekülü iki adet 120 kD'luk kinesin ağır zinciri (KHCs) ile iki adet 64 kD'luk kinesin hafif zincirinden (KLCs) oluşur. Kinesin iki küresel baş (10 nm), bir sap ve bir fan benzeri yapıyla sonlanan 80 nm uzunluğunda bir moleküldür (Şekil 2.5). Küresel baş kısımlarıyla mikrotübüllere bağlanan kinesin ağır zincirleri bir taraftan da ATPaz'a bağlanır, hafif zincirler ise fan benzeri son kısmı oluşturur (Sheetz ve ark., 1998). Bu son kısımla membranlı organellere bağlanır. Motor proteinin (KLC yani kinesin ince zincirler) bulunma pozisyonuna göre üç tip kinesin protein ailesi vardır. Bunlar; sonunda -NH₂ grubu taşıyan motor tip (N tip), sonunda -COOH grubu taşıyan motor tip (C tip) ve orta motor tip (M tip)'dir. Kinesinler nöronda hücre gövdesinden aksona doğru

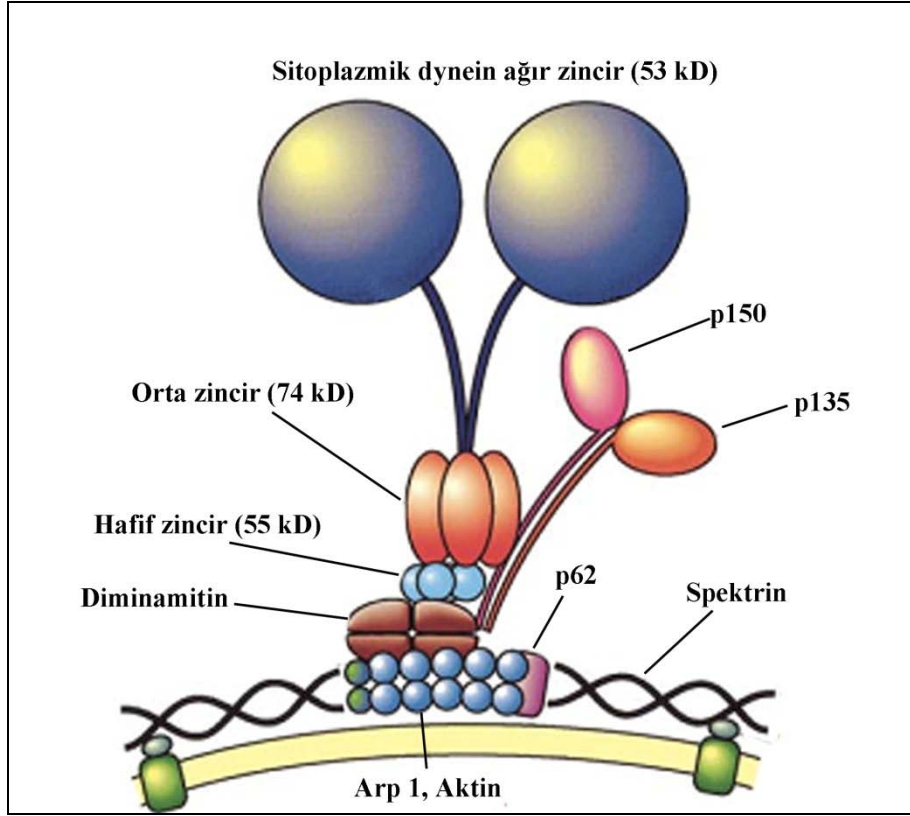
(anterograd yönde) membranlı organelleri taşır (Hirokawa, 1998; Almenar-Queralt ve Goldstein, 2001).



Şekil 2.5. Kinesinin yapısı (Anonim, 2011).

2.3.1.2. Dynein

Sinir hücresinin aksonun terminalinden hücre gövdesine yani mikrotübüllerin eksi ucuna doğru hareket eden bir diğer protein olan dynein, protein ailesinin üyesi olan sitoplazmik dyneindir. Sitoplazmik dynein 530 kDa ağırlığında iki ağır zincir, 74 kDa ağırlığında üç orta zincir ve 55 kDa ağırlığında dört hafif zincirden oluşan toplam 1,2 MD ağırlığında çok alt birimli bir kompleksdir (Şekil 2.6). Sitoplazmik dynein ile aksonemal dyneinin primer yapıları karşılaştırıldığında merkezi -COOH terminal bölgesinin, mikrotübüller ile bağlantı oluşturan ve motor hareketi sağlayan globüler şekilde olduğu, -NH₂ teminal bölgesinin ise, kargo bağlayan bir bölgesi olduğu düşünülmektedir (Hirokawa, 1998). Dynein ağır zinciri ATPaz'a bağlanarak ATP'yi hidrolizler (Sheetz ve ark., 1998). Sitoplazmik dynein dynaktin adı verilen ve 10 alt birimden oluşan protein kompleks ile birleşir. Bu alt üniteler p150, p135, p62, dynamitin (p50), aktinle ilişkili protein 1 (Arp-1), aktin, aktin yakalayan protein β alt ünitesi, p27 ve p24'dür. p150 ve p135, Arp1-aktin kısa filamentinden yan kol şeklinde oluşur ve bu iki globüler baş ile mikrotübüle bağlanırlar. Yetmiş dört kDa ağırlığındaki orta zincir p150-Arp-1 aktin kısa filament vasıtasıyla kargoya bağlanır.



Şekil 2.6. Dyneinin yapısı (Hirokawa, 1998).

İmmünohistokimyasal analizler, antikor enjeksiyonu, *in vitro* hareket izlemeleri ve hücre içi fraksinasyon, sitoplazmik dyneinin aksonlarda membranlı organellerin retrograd taşınması için bir motor rolü olduğunu göstermiştir. Lizozomlar, Golgi kompleksinin sentrozomal yerleşimi ve membranlı organeller retrograd olarak taşınır (Paschal ve ark., 1987; Hirokawa 1990).

2.3.1.3. Miyosin

Sinir terminal bölgesinde mikrotübül ucuna yakın ve aksolemmmanın altında yerleşmiş olan aktin ağı vardır. F-aktin filamentleri, büyüme konisi ve sinir terminali gibi kısa mesafelerde kullanılır. Aktin ile birleşebilen miyosin motor protein vardır. Nöronlarda miyosin-II, nöronal migrasyon ve büyüme konisinin hareketini sağlar. Miyosin V ise, organel taşınmasından sorumludur (Hirokawa, 1998; Brown ve Bridgman, 2004; Brown ve ark., 2004).

2.4. Aksonal Taşıma Çeşitleri

Aksonlarda anterograd ve retrograd taşıma olmak üzere iki yönlü hareket söz konusudur. Hareket hızlarının farklı olması farklı aksonal taşıma çeşitlerinin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Aksonal taşımanın 4 ayrı alt birimi vardır:

I. Yavaş bileşen A (SCa): Günde 0,2-1 mm hızla gerçekleşir, nörofilament ve mikrotübül gibi akson iskelet elemanlarını taşır.

II. Yavaş bileşen B (SCb): Günde 2-8 mm hızla gerçekleşir, 100'den fazla polipeptid, bazı mikrotübüller ve aktin bununla taşınır. Bazıları aktine bağlanan metabolik enzimlerdir.

III. Orta bileşen: Günde 50-100 mm hızla gerçekleşir, mitokondrileri taşır.

IV. Hızlı bileşen: Günde 200–400 mm hızla zarla ilişkili kompleks bir protein grubunu (enzimler vs), çeşitli organelleri, nöropeptidleri ve diğer nörotransmitterleri taşır (Schawartz, 1979; Goldberg ve ark.,1980; Vance ve ark., 2000; Almenar-Queralt ve Goldstein, 2001).

Hızı belirleyen faktörler taşınan materyalin yapısı, büyüklüğü ve başka yapılarla ilişkileridir. Tüm taşıma çeşitlerinde aynı motor proteinlerin kullanıldığı sanılmakta olup, buna göre yavaş taşımalarda taşıma hareketsiz dönemlerle ayrılmış sıçramalar tarzında olmaktadır. Aksonal taşıma sırasında pek çok molekül öncül formundan işlevsel formuna dönüştürülür.

2.5. Akson hasarı ve hasar sonrası sinyal mekanizmaları

2.5.1. Akson hasarı

Periferik sinir sistemi hasarları, önemli derecede fonksiyon kaybına ve devam eden günlük olayların aksamasına neden olur. Rejenerasyon ve reinnervasyon gerçekleşse de bazen kalıcı olarak hasar görmüş duyu ve motor nöronlar, nöropatik ağrı gibi ikincil problemler yüzünden önemli fonksiyon kayıplarına yol açabilirler (Jaquet ve ark., 2001; Rosberg ve ark., 2005). Sinir hasarlarından sonra meydana gelen iyileşme ya da adaptasyon üç yoldan biriyle olur:

1-Hedef dokular hasarlı aksonların rejenerasyonu ile tekrar innerve olması.

2-Yakınlarda bulunan hasarsız aksonların kolleteral dalları ile tekrar innerve olması.

3-Kaybolmuş fonksiyonlar ile ilgili sinir sistemi devrelerinin tekrar şekillenmesi (Fu ve Gordon, 1997).

Periferik sinir hasarları sonrasında kesilmiş aksonların rejenere olması ve fonksiyonel bağlantılarını tekrar kurabilmesi canlının yaşı, etkilenen sinir lifi, lezyon yeri, lezyon tipi ve aksonun kat etmesi gereken mesafeye bağlı olarak değişiklik gösterir. (Navarro ve ark., 2007). Genel olarak insanlarda 2 cm'den daha dar boşluk oluşturan sinir yaralanmaları iyileşebilmekte, fakat 4 cm'den daha fazla aralık oluştuğunda tamirin neredeyse imkansız olduğu kabul edilmektedir (Reyes ve ark., 2005). Periferik ve merkezi sinir sistemi sinir hasarının sonuçları birbiri ile yakın ilişkilidir; Şöyle ki periferik bir sinir hasarı genellikle merkezi sinir sisteminde önemli ve uzun süreli değişikliklere ve yeni düzenlemelere neden olur (Kaas, 1991; Wall ve ark., 2002; Kaas ve Collins, 2003). Siyatik sinir hasarından sonra AKG'larda küçük nöronların büyük nöronlara göre % 10-30 arasında daha fazla etkilendiği rapor edilmiştir (Arvidsson ve ark., 1986; Ygge, 1989; Vesterdaard ve ark., 1997; Groves ve ark., 1999; Tandrup ve ark., 2000). Periferik sinir sisteminde başlıca üç dejenerasyon söz konusudur. Bunlar; Waller dejenerasyonu, aksonal dejenerasyon ve segmental demiyelinizasyondur.

2.5.1.1. Waller dejenerasyonu

Periferik sinir liflerinin kopmasıyla sonuçlanan hasarlardan sonra lezyonun distalinde akson ve miyelin kılıfları Waller dejenerasyonu adlı bir süreç içerisinde parçalanır (Fu ve Gordon, 1997). Dejenerasyon retrograd olarak aksonun proksimal sinir güdüğünün kısa bir segmentinde de meydana gelir (Beuche ve Friede, 1986). Dejenerasyonun artıkları Schwann hücrelerinin ve makrofajların işbirliği ile temizlenir (Perry ve Brown, 1992; Stoll ve Müller, 1999).

2.5.1.2. Aksonal dejenerasyon

Aksonal dejenerasyon, sinir travması, toksik sebepler, nörodejeneratif hastalıklar ve normal nöron gelişimi gibi farklı sebeplerle ortaya çıkabilir (Hilliard, 2009). Bu dejenerasyon ya doğrudan periferik sinir hücre gövdesini ya da aksonun

bütününü etkiler (Coleman, 2005; Conforti ve ark., 2007). Periferik sinir hücresi hasar nedeniyle canlılığını yitirmişse geri dönüş mümkün değildir. Hasara sebep olan engeller aksonun bütünlüğü bozulmadan ortadan kalkarsa, akson haftalar ya da aylar sonra fonksiyonuna yeniden kavuşabilir (Navarro ve ark., 2007). Ancak aksonun bütünlüğü bozulmuşsa Waller dejenerasyonu devreye girer (Lunn ve ark., 1989).

2.5.1.3. Segmental demiyelinizasyon

Miyelinli sinir liflerinde, periferik sinir aksonunda bir hasar olmaksızın etrafındaki Schwann hücrelerinde veya miyelin kılıfta meydana gelen hasardır (Atalay ve Üstün, 2004). Miyelin yenilenebilen bir kılıftır. Demiyelinizasyon etkeni ortadan kalktığında, demiyelinizasyonu takiben 15 gün ile 6 ay arasında remiyelinizasyon tamamlanabilir. Bununla birlikte remiyelinize olan segmentlerde miyelin, öncekine göre daha ince ve internodal aralıklar daha kısadır.

2.5.2. Akson hasarı ve aksonal taşıma

Akson hasarı sonrası aksonal taşıma ile ilgili gözlemler yapmak için akson hasarı oluşturmada çeşitli yöntemler kullanılmıştır. Bazı araştırmacılar gangliyonların ve aksonların büyüklüğü sebebiyle omurgasız türleri tercih etmişlerdir. Bu çalışmalara gösterilebilecek en iyi örneklerden biri mürekkep balıklarının dev aksonları üzerinde yapılan çalışmadır (Gallant ve ark., 2003). Bazı çalışmalarda ise, *Aplysia californica*'nın ağza yakın yanak (bukkal) gangliyonları çıkarılıp kültürü yapıldıktan sonra akson kesimi için mikropipetlerle bası uygulanmıştır (Spira ve ark., 2003; Erez ve ark. 2007). Başka bir çalışmada, *Limnea* merkezi gangliyonlarından ışınlanan sinir bölgesine sinir basısı uygulanmıştır (Perlson ve ark., 2003).

Memelilerde yapılan çalışmalara bakılacak olursa; genellikle sıçanların tercih edildiği göze çarpmaktadır. Anestezi uygulandıktan sonra eğer arka kök gangliyonu ve bu gangliyonların aksonları çalışılıyorsa genellikle siyatik sinir kesisi ve belli bir süre sonra bu sinirden alınan kesitlerle ya da siyatik sinirin bağlı olduğu L4 ve L5'lerin çıkarılmasıyla kültür ortamında aksonal taşıma ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmektedir (Kitao ve ark., 1997; Twiss ve ark., 2001; Zeng ve ark., 2001; Hanz ve ark., 2003; Perlson ve ark., 2005). Zheng ve ark., (2001) arka kök

gangliyonlarını çıkarıp hücre kültürü yaptıktan sonra aksonları kesmek için kapillar mikroelektrodlar kullanmışlardır.

Merkezi sinir sistemine ait nöronlar üzerinde yapılan aksonal taşıma ile ilgili çeşitli çalışmalarda yine sıçanlar tercih edilmiştir. Bu çalışmalarda çeşitli hasar modelleri kullanılmıştır. Boyundan kesi yapmak, optik sinir hasarı oluşturmak için gözün arkasına kaygan bir tabaka yerleştirerek hasar oluşturmak, örnek verilebilecek çalışmalar arasında yer almaktadır (Stone ve ark., 2004; Serbest ve ark., 2007).

2.5.3. Akson hasarından sonra oluşan sinyal mekanizmaları

2.5.3.1. Depolarizasyon dalgası

Nöron akson kısmından kesildiğinde, yani aksotomi gerçekleştiğinde, aksondan hücre gövdesine zamanında, tam ve doğru bir şekilde bilgi ulaştırılmalıdır. Bunun için üç farklı sinyal mekanizması vardır: Birincisi; hasarla indüklenen aksiyon potansiyeli boşalmasıdır (Berdan ve ark., 1993). Berdan ve ark. (1993) bir yumuşakça olan *Helisoma trivolis*'in bukkal gangliyonları içindeki B5 nöronlarının özafegal sinirlerine bası ya da kesi yaparak oluşturdukları aksotomi sonrası hızlı bir depolarizasyon dalgasının oluştuğunu, ayrıca buna aksiyon potansiyeli oluşumlarının eşlik ettiğini tespit etmişlerdir. Aksotomiye cevap oluşumunda membran depolarizasyon büyüklüğünün, soma ve hasar bölgesi arasındaki mesafe arttıkça katlanarak azaldığını göstermişlerdir. Farklı bir çalışmada, akson hasarına elektrofizyolojik cevap patch-clamp ile kayıt edilmiştir. Hasar, iyon dengesini bozarak dışarıdan kalsiyum iyon girişi ve sodyum yüklenmesiyle aksiyon potansiyeline neden olmuştur. Elektrofizyolojik cevap, gövdenin hasardan hızlı bir şekilde haberdar olmasını sağladığı bildirilmiştir (Mandolesi ve ark., 2004).

2.5.3.1.1. Depolarizasyon dalgasıyla birlikte iyon dengesi değişimi ve hücre iskeletine dolayısıyla aksonal taşımaya etkisi

Farelere yapılan optik sinir hasarı ardından sitoiskelet proteinlerinin zamana bağlı olarak nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Nörofilament proteinlerinden NF68 hasardan yarım saat sonra, 24. saate kadar azalma gösterdiği belirlenmiştir. NF200 ve

α t b lin proteinleri hasardan daha geç etkil nerek 72. saatten sonra akut bir şekilde azalma gösterirken, mikrotübüle bağlı protein Ta  t b linin etkil nmediği gösterilmiştir. Diğer taraftan Ca^{++} iyonu girişiyle kalpein aktivasyonu gerçekleşmiş ve kalpeine spesifik olarak aksol mma iskeleti olan spektrin proteinini par alamı tır. Spektrin parçalanma ürünleri, immünohistokimyasal olarak, hasardan 0,5., 24. ve 72. saatlerden sonra tespit edilmiştir (Serbest ve ark., 2007).

Hasar sonrası hücre içinde Ca^{++} artı ının etkilerini araştıran farklı bir çalışmada, *Aplyisa* nöron kültürü yapılmış ve kalpein aktivasyonunun etkileri incelenmiştir. Aksonun kesim yerine göre gövdeye yakın olan kısım proksimal bölge (1 μ m-300 μ m arası) ve kesim yerinden yaklaşık olarak 50-150 μ m uzaklıktaki kısım (gövdeye 500 μ m uzaklıkta) ise distal bölge olarak adlandırılmıştır. Aksotomi yapıldıktan sonra dakikalar, hatta saniyeler içinde Ca^{++} seviyesinin artışına bağlı olarak membran kapanır. Ca^{++} artı ı, kalpein aktivasyonunu sağlayarak daha sonra kalpein substratı olan spektrin yıkımı ve nörofilament yıkımı ba lar. Kalpein aktivasyonu anterograd taşımayı etkilemez, anterograd olarak taşınan veziküller membranla birleşir. Aslında kalpeinin etkisi normal şartlarda sınırlı olup, parçalamadan ziyade düzenleyicidir. Hasarla oluşan kalpein aktivasyonu büyüme konisi oluşumunda ve hücre iskeletinin tekrar organizasyonunda ilk adımdır. Kalpeptinle kalpein inhibisyonu yapıldığında, hücre iskeleti oluşumu ve büyüme konisi oluşumunun engellendiği gözlenmiştir (Spira ve ark., 2003). Ratlara yapılan omurilik hasarı ile Ca^{++} ilişkili kalpein aktivasyonuna bakıldığında; hasardan sonra 15 dakika kadar kısa bir sürede spektrin yıkım ürünlerinin çok yükseldiği, fosforile edilmemiş NF200' n hasardan 4 saat sonra azaldığı, fosforile NF200 ve aktin seviyesinde ise fazla bir değişikliğin olmadığı gözlenmiştir (Schumacher ve ark., 1999).

Saatman ve ark. (2003) travmatik akson hasar modeli olarak sıçan optik sinirine basıyla hasar olu turmu , bu hasardan retrograd taşımanın, nörofilament proteinlerini ve spektrinini nasıl etkilendiğini 14 gün boyunca belli aralıklarla takip etmişlerdir. Retrograd olarak taşınan florogold i aretleyicisi kullanılan çalışmada hasardan bir gün sonra retinal gangliyon hücrelerinin sayısının önemli derecede azalmasına bağlı olarak, hasardan 24 saat sonra retrograd ta ımanında bozulduğu gösterilmiştir. Spektrin yıkım ürünleri ise, kalpein aktivasyonu sonucu, hasardan 20 dakika ile 1-2 saat sonrasına kadar görülmüştür. Kalpeinin ikinci aktivasyonu ise; hasardan dört gün sonra

görülmüştür. Hasardan bir gün sonra fosforile olmamış nörofilamentler belirlenirken, 14 gün sonra ise aksonal dejenerasyonla nörofilament kaybı tam olarak belirlenmiştir (Saatman ve ark., 2003). Yine benzer bir çalışmada, aksonal hasarla bağlantının kesildiği bölgelerde Ca^{++} orjinli hücre iskeletinin proteolitik yıkılma ürünleri gözlenmiştir (Buki ve ark., 1999; Saatman ve ark., 2003). Mürekkep balığı üzerinde yapılan çalışmada aksotomiden iki gün sonra tübülünün, tübülünü taşıyan motor proteinlerin inaktivasyonuna bağlı olarak inhibe olduğu belirtilmiştir (Gallant, 2003).

2.5.3.2. Negatif hasar sinyal mekanizmaları

İkinci hasar sinyal mekanizması ise, normalde hedeften salınan ve retrograd olarak taşınan nörotrofik faktörlerin kesilmesidir. Negatif hasar sinyal mekanizması olarak adlandırılan bu sinyal, normalde hücre gövdesinde var olan proteinlerin kesintiye uğraması sonucu ortaya çıkan ve iletilen sinyallerdir. (Ben-Yaakov ve Fainzilber, 2009; Hanz ve Fainzilber, 2006). Hedeften salınan nörotrofinler, sinir terminali üzerindeki Tirozin kinaz (Trk) reseptörüne bağlanarak uzak mesafede bulunan hücre gövdesine retrograd taşınım ile, hayatiyeti ve gen ekspresyonunu düzenlemektedir. Retrograd sinyalin mekanizması tam açıklanamasa da; nörotrofin-Trk kompleksi, PI-3 ve Erk-5 içeren hayatiyet sinyallerini taşır (Ginty ve Segal 2002). Bazı araştırmacılara göre, bu retrograd sinyalin kesilmesi de aksotomi sonrası aksonal taşıma ile iletilen bir sinyal olarak kabul edilmektedir (Ambron ve ark., 1996). Ambron ve ark. (1996) akson hasarından sonra aksonda intrinsik sinyal moleküllerinin hasarla aktive olduğunu göstermişlerdir.

Bir nöron hedefle bağlantılı olduğunda hedeften salınan sinyaller uygun sinaptik gelişim için intrinsik büyüme aktivitesini baskılamaktadır. Fakat nöron hasara uğradığında baskılanan bu intrinsik büyüme aktivitesi rejenerasyona izin vermek için aktive olmaktadır. Bu sinyal mekanizması negatif hasar sinyal mekanizması olarak bilinmekte olup henüz hakkında çok az bilgi mevcuttur (Wu ve ark., 1993; Bronfman ve ark., 2007; Abe ve Cavalli, 2008).

2.5.3.3. Pozitif hasar sinyal mekanizmaları

Üçüncü sinyal mekanizması pozitif hasar sinyalleri olup, makromolekül sinyallerin retrograd olarak taşınmasıdır. Makromolekül sinyaller de iki farklı şekilde oluşur ve taşınırlar. Bu oluşum ve taşınım ya akson hasar bölgesinde aksotomiden sonra aksoplazmik proteinlerin translasyon sonrası fosforilasyonu, düzenli ve süreksiz proteolizisi gibi modifikasyonlara uğrayarak ya da lokal protein sentezi sonucu retrograd olarak taşınma ile pozitif hasar sinyallerini oluşturarak meydana gelir (Ambron ve ark., 1996; Zhang ve Ambron 2000; Perlson ve ark., 2004; Ben-Yaakov ve Fainzilber, 2009; Hanz ve Fainzilber, 2006).

Perlson ve ark. (2004) yapmış oldukları çalışmada *Lymnaea* merkez gangliyonlarına ait sinirlerin aksotomisinden 24 saat sonra, 2 cm uzaklıktaki akson bölgesindeki aksoplazmik proteinleri izole edip, bu proteinleri iki yönlü jel elektroforeziyle belirlediler. Belirlenen 400 protein noktasından 172 tanesinin kontrol aksoplazmasına göre farklı olduğu bildirilmiştir. Bu farklı protein noktalarının aynı gen sekans ailesine ait oldukları belirlenirken; izoelektrik noktalarındaki farklılıkların translasyon sonrası modifikasyonlar sonucu ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Mitojen aktive eden protein kinazların (MAPK) üyeleri, sitokinler ve onların transkripsiyon faktörleri, nukleusa giriş çıkışı düzenleyen ve lokal olarak translasyona uğrayan importinleri içeren farklı proteinler, pozitif hasar sinyalleri olarak tanımlanmıştır. Aksonal hasarın, Erk, c-Jun N- terminal kinaz (JNK) ve protein kinaz G'yi içeren çeşitli MAPK'ların retrograd taşınımı ve lokal aktivasyonunu uyardığı bilinmektedir. (Abe ve Cavalli, 2008).

Zhang ve Ambron (2000), yaptıkları çalışmada *Aplysia* nöronlarında pedal(ayak) sinirlerini hasara uğratılmalarının ardından hasar ile hücre gövdesi arasında ligasyon yapıp bu arada kalan aksoplazmayı enjektörle çıkarmışlardır. Araştırmacılar, çıkarılan aksoplazma içinde hayatta kalma ve rejenerasyonu arttıran pozitif hasar sinyal mekanizmasına ait nuklear lokalizasyon sinyali (NLS) içeren nuklear importinleri bulunduran bu aksoplazma kültür yapılmış hücrelere enjekte edildiğinde hayatta kalma süresini ve büyümeyi önemli derecede arttırdığını bulmuşlardır (Zhang ve Ambron, 2000).

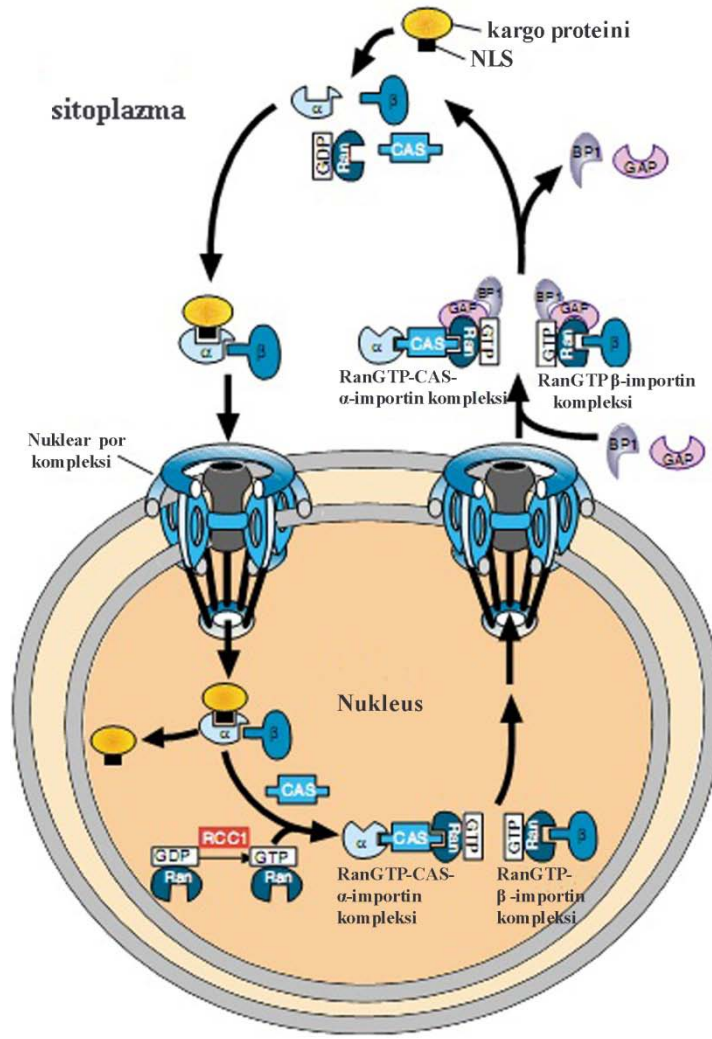
Sıçanlarda hipoglossial motor nöronlarda yapılan sinir hasarı sonrası aksonal taşınımın kolşisin ile bloklanmasıyla, nörotrofin reseptörü p75'in ve asetilkolin

transferazın transkripsiyonunun düzenlenmesine incelenmiştir. Hasar bölgesinden salınan ve aksonlarda retrograd olarak taşınan pozitif sinyal mekanizmalarının p75 ve asetil kolin transferazın ifade edilmelerini uyardığı bulunmuştur (Bussmann ve Sofroniew, 1999).

2.5.3.3.1. Pozitif hasar sinyali içerisinde yer alan importinler

Sinir hücresinde sinyalin nukleusa iletilebilmesi için taşıyıcı reseptörlerin varlığına ve enerjiye gereksinim vardır. Bir taşıyıcı reseptör özellikle kargonun orjinlendiği kısmı tanımalı ve nuklear por kompleksinin zıt tarafına doğru onu taşımalıdır. Bu en iyi şekilde Ran GTPaz'lar tarafından düzenlenen importin ve exportin ailesinin aracılığı ile yapılan taşıma tarafından anlaşılabilir. Importin ailesi içinde yer alan α importin ve β importin heterodimer oluşturarak Ran yokluğunda yani sitoplazmada substrata bağlanırlar ve nukleusa geçtikten sonra Ran-GTP'ye bağlandıklarında serbest kalırlar. Substrattan ayrılan importin kompleksi, α ve β importin alt ünitelerine ayrılıp sitoplazmaya geri dönerler. Eksportinler ise, importinlerin aksine yalnızca Ran-GTP varlığında kargolarına bağlanabilirler.

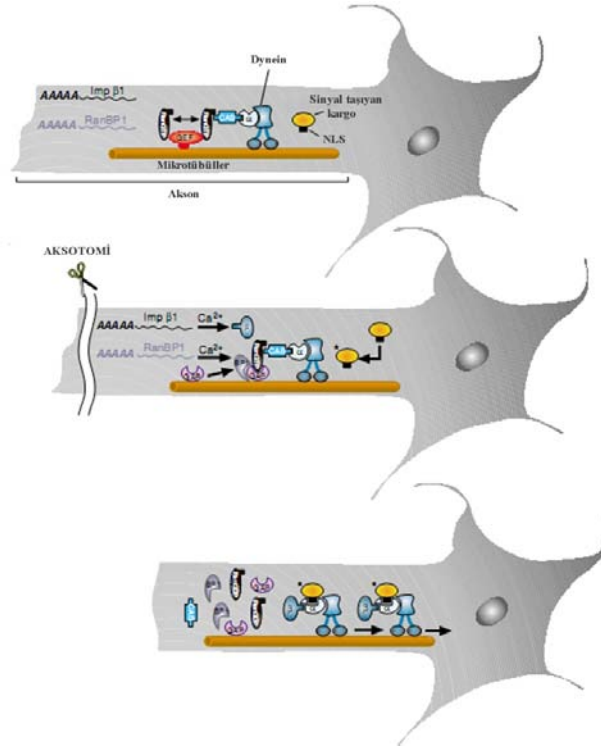
Böylece yalnız substratları ile nukleusta birleşebilirler. Kargonun fark edilmesini sağlayan sinyallerin çok azı tanımlanabilmiştir. Bunlardan en iyi bilineni lizince zengin olan klasik nuklear lokalizasyon sinyali(NLS) dir. NLS'yi importin α/β kompleksi tanımaktadır (Weis 2003). Ran fonksiyonu; guanin nükleotid değişim faktörü (GEFs), GTPaz aktive edici protein, ve çeşitli Ran'a bağlanan proteinlere bağlıdır. RCC1, nukleusta olan Ran-GTP'yi sağlamlaştıran bir Ran-GEF'dir. Ran-GTP direkt olarak β importin, dolaylı olarak da CAS (hücrel apoptozise duyarlı genlerin ürünü olan protein ya da eksportin-2) ile α importine bağlanır. Ran -GDP ise sitoplazmada bulunur, importine bağlanmaz ve Ran-GTP ile ilişkili olarak dışarı atılır. Sitoplazmada Ran PB1 importinden Ran-GTP'yi ayırır. Böylece Ran reseptörlerinin asimetrik dağılımı nuklear taşımayı sağlamış olur (Şekil 2.7) (Yudin ve Fainzilber, 2009).



Şekil 2.7. Nuklear taşıma döngüsü (Yudin ve Fainzilber, 2009).

İmportinler hücre gövdesinden oldukça uzak olan dendrit ve aksonlarda bulunmaktadır. İmportinlerden α importin, hem kontrol hem de hasara uğramış siyatik sinirde bulunur ve dynein motor proteine bağlanırlar. Fakat β importin normal şartlarda siyatik sinir aksoplazmasında bulunmamakla birlikte, β importinin mRNA'sı bulunmaktadır. Hasar sonrası bu mRNA'lar lokal olarak hızla translasyona uğrayarak β importini oluşturmaktadırlar. Bu sentez sonrasında α/β importin heterodimeri retrograd motor proteine ve NLS bağlı sinyal proteinine bağlanarak nukleusa taşınır (Hanz ve Fainzilber, 2004). Hanz ve ark. (2003) α importinin hasar öncesi ve sonrası arasında önemli bir değişiklik göstermediğini ancak β importinin lokal translasyonunun hasar sonrasında zamanla arttığını, Western blot analizleriyle, göstermişlerdir. Bununla birlikte aksonlarda β importinin mRNA'ları in situ hibridizasyonla tespit edildiğini ve

hasarlı aksoplazmada artan β importinin, NLS bağılı sinyali taşıyan kargonun artmasına izin verdiğini ifade etmişlerdir. Aksonlarda lezyon sonrası gerçekleşen lokal protein sentezi ya da proteinlerin geçirdikleri modifikasyonlar sonucu oluşan sinyal proteinlerine NLS, dynein, α/β importin heterodimerinin eklenmesiyle, retrograd hasar sinyali oluşmaktadır. β importin hasardan sonra ortalama 30 dk- 1 saat'lık süre içinde, importin dynein kompleksi ise hasardan sonra ortalama 2 saatlik sürede oluşur. NLS inhibisyonunun ise rejenerasyonu engellediği gösterilmiştir. Aksotomi yapılmış yetişkin AKG nöronlarında, rejenerasyona cevabın transkripsiyonel seviyede düzenlenmesi sinyal moleküllerinin importinlerle retrograd olarak taşınma ile gerçekleştirilmektedir (Hanz ve ark., 2003) (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Retrograd hasar sinyal kompleksi (Hanz ve Fainzilber, 2007).

Hücre gövdesi ile akson terminalindeki proteinler, sürekli yer değişimi içindedir. Sinir hücresindeki bu kompleks işlemi araştırmak için *Aplysia* nöronları kullanılmıştır. *In vitro* *Aplysia* nöronlarına insan serum albumin rhodamin (rHSA) ile nuklear lokalizasyon sinyali bağlanmış (SV-40) rHSA enjekte edilmiş ve bunların dağılımlarına bakıldığında: sinyal taşıyan proteinin gövdeye doğru ilerlediği ve sinyal

taşımayan proteinin enjekte edilen bölgelerde biriktiği gözlenmiştir (Schmied ve ark., 1993).

2.5.4. Akson hasar sinyallerinin etki mekanizmaları

Akson hasar bölgesinde oluşan sinyaller, hasarlı aksonun tekrar büyümesini sağlamak için transkripsiyonel ve translasyonel seviyelerde aktivasyonları etkinleştirir (Ben-Yaakov ve Fainzilber, 2009). Hücre gövdesinde hasara karşı çeşitli kinazlar aktive olur. Bunlardan bazıları Mitojen Aktive edici Protein Kinazlar (MAPK)'dan Erk1, Erk2 ve Jnk, Janus Kinaz (JAK)'dır (Rajan ve ark., 1995; Yao ve ark., 1997; Kenny ve Kocsis, 1998; Obata ve ark., 2004). Aksotomiyle aktive olan kinazlar tarafından transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ya da ekspresyonlarının artmasıyla düzenlenir. Örneğin lezyonla uyarılan Jnk, JunD ve Fos, ATF2, ATF3 gibi transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu ve arttırılması, ayrıca nukleus içindeki DNA'ya bağlanan ATF3'ün translokasyonu uyarılır (Kenny ve Kocsis, 1998; Lindwall ve Kanje, 2005).

Akson hasarı sonrasında, rejenerasyon modülatörü olarak tanımlanan PTEN/mTOR yolu aktifleşir. Bu yol rejenerasyonda translasyonel aktivitenin düzenlenmesini sağlar. Bununla ilgili çalışmaların birinde, normalde olgun retinal ganliyon hücrelerin rejenerasyon kapasiteleri sınırlı iken PTEN inhibe edildiğinde bu nöronların rejenerasyonu gerçekleşmektedir (Park ve ark., 2008, Ben-Yaakov ve Fainzilber, 2009).

Akson hasarı sonrasında Erk1/2, p38, Jnk içeren kinazların lezyonla fosforile olması ve bunların retrograd motor proteinlerle bağlantı kurarak taşınmasını içeren mekanizmalar bulunmaktadır (Çizelge 2.1) (Zrouri ve ark., 2004; Lindwall ve Kanje, 2005). Vimentin sinir sisteminde glial hücreler tarafında sentezlenmekte olup, hasarla birlikte nöronlarda da sentezlenir, lezyondan 30 dakika ile 8 saat sonra nöronlarda vimentin ve periferin sentezinin arttığı bildirilmiştir. Aynı sürede MAP Kinaz aktivasyonu ile Erk1 ve Erk2'nin fosforile edildiği de belirtilmiştir. Hasar sonrasında vimentin, dynein ve β importinin kompleks yaptığı daha sonra bu komplekse fosforile Erk1'in katıldığı gösterilmiştir. Bu kompleks sinyalin, retrograd olarak hücre gövdesine taşındığı, bu taşınan sinyal ile de transkripsiyon faktörü Elk-1'in uyarıldığı bildirilmiştir (Perlson ve ark., 2005). Hasarı izleyen süreçte STAT3, P311, sox11'i

içeren transkripsiyon faktörlerinin aktive edildiği diğer çalışmalar tarafından da gösterilmiştir (Nadeau ve ark., 2005). Hasarla birlikte, c-Jun NH2 terminal Kinaz (JNK) aktive olur ve Sunday Driver (syd) protein ile birleşir. Bu kompleks, dynaktin ile birleşerek retrograd yönde taşınır (Cavalli, 2005). Hasar sonrasında JNK'nın aktivasyonu ile cJun, ATF2, Elk1 fosforillenmesi gerçekleşir. Bunlar da DNA promotor bölgelerine bağlanan transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerler (Kenny ve Kocsis, 1998).

Çizelge 2.1. Retrograd hasar sinyalleriyle ilgili aktivasyonlar (Hanz ve Fainzilber, 2006).

Molekül	Nöron tipi	Lezyon bölgesindeki Aktivasyon	Hasardan sonra retrograd aksonal taşıma	Hücre gövdesindeki hedef cevap
Erk1/2	AKG	Fosforilasyon	Vimentin, importin dynein	β ve Elk fosforilasyonu
Jnk	AKG	Fosforilasyon	JIP ve dynaktin	c-Jun fosforilasyonu ATF uyarılması
ATF2	AKG	Fosforilasyon	Henüz gösterilmedi	Henüz gösterilmedi
STAT3	AKG ve motor	Fosforilasyon	Henüz gösterilmedi	Henüz gösterilmedi

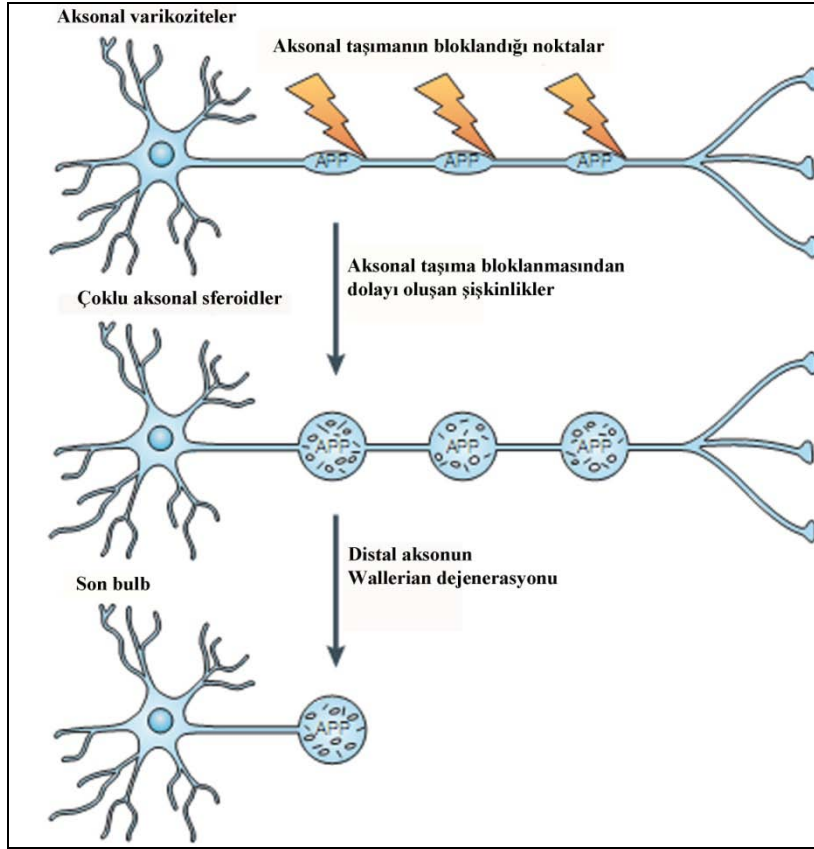
2.5.5. Aksonal taşıma ve Amiloid Prekürsör Protein (APP)

Amiloid prekürsör protein (APP), normal şartlarda hızlı bir şekilde anterograd olarak taşınır. Presinaptik ve postsinaptik terminallerde, gövde, akson ve dendritlerde bulunur (Sheetz ve ark., 1998). Ancak aksonal taşıma bozuklukları ile ilgili birçok çalışmada APP bu özelliği nedeniyle bir markır olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalara örnek olarak: Stone ve ark. (2004) travmatik akson hasarının aksonal taşıma ve aksolemma geçirgenliği üzerine etkilerini araştırmışlardır. Hasardan sonra aksolemmal bütünlüğünü takip edebilmek için 3,10, 40 kD ağırlığında floresan dekstranlar kullanılmış, aksonal taşıma işaretleyicisi olarak da anterograd olarak taşınan APP'den yararlanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda hasardan sonra 5 dakika ile 3 saatlik zaman zarfı içinde aksolemma bozukluğunu gösteren işaretleyiciler tespit edilmiştir. Aksonal taşıma bozukluğunu gösteren APP ise hasardan 30 dakika ile 6 saatlik süre

sonrasında tespit edilmiştir. Her iki işaretleyicinin birlikte bulunma durumları ancak 6 saat sonra gözlenmiştir. Çalışmada hasar sonrası aksolemmal geçirgenlik ile aksonal taşıma bozukluklarının birbirinden bağımsız olarak geliştiği gösterilmiştir (Stone ve ark., 2004).

Nöronal bağlantıların düzenlenmesinde ya da hücre ölümü meydana gelişinde APP ve ölüm domaini DR6, kaspaz bağımlı olarak aktive olur. Nikolaev ve ark. (2009)'nın yaptıkları çalışmada nörotrofik faktör eksikliğinin APP'nin yüzeye yayılımını tetiklediğini ve betasekretazı (BACE) uyararak APP'yi parçalayıp N-APP oluşturduğunu bildirmişlerdir. DR6'nın hem hücre gövdesinde hem de aksonda gözlendiğini bildirmişlerdir. N-APP'nin, DR6'ya bağlanarak onu aktifleştirdiğini ve kaspaz aktivasyonu başlattığını bildirmişlerdir. Sonrasında hem aksonda hem de hücre gövdesinde dejenerasyon başladığını ifade etmişlerdir (Nikolaev ve ark., 2009).

Waller dejenerasyonunun 2-3 hafta ertelenebildiği yavaş Waller dejenerasyonlu mutant farelerde hem fiziksel hasara sebep olan hem de aksonal taşımayı engelleyen ve hücre ölümünü tetikleyen moleküller araştırılmıştır. Geriye doğru ölüm hipotezi aksonun distal sonunda başlar ve retrograd olarak ilerler. Ancak hasarla indüklenen Waller dejenerasyonun anterograd olarak yayıldığına dair şüpheler vardır. Hücre gövdesinden aksonal taşımanın kesilmesi Waller dejenerasyonu için alternatif bir tetikleyicidir. Aksonal taşıma bozuklukları çok sayıda merkezi sinir sistemi nörodejeneratif hastalıklarında belirlenmiştir. Normalde hızlı bir şekilde taşınan APP'ler aksonal sferoid ve varikozitelere birikir ve aksonal taşımanın bloklanmasında immünohistokimyasal markır olarak kullanılırlar. Alzhemier hastalığı gibi hastalıklarda hasarlanan aksonal taşımada yalnızca APP birikmez ayrıca APP biriken bölgelerde amiloid plak oluşumları gözlenir. Aksonal taşımanın bozulduğu ve tıkanıklık sonucu oluşan şişkinlikler taşımanın zayıf olduğu Ranvier düğümlerinde meydana gelir (Şekil 2.9.) (Coleman, 2005).

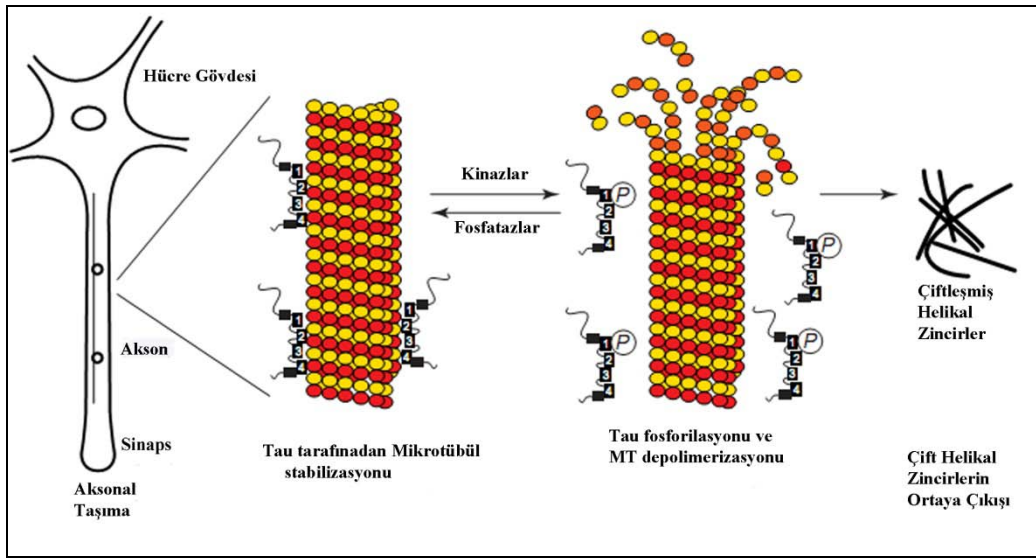


Şekil 2.9. Aksonal varikoziteler, sferoidler ve son bulb (Coleman, 2005).

2.5.6. Aksonal taşıma ve tau proteini

Çeşitli rejenerasyon çalışmalarında aksonal belirteç olarak tau proteini, dendritik belirteç olarak da MAP-2 proteini kullanılmıştır (Bradke ve Dotti, 2000; Zheng ve ark., 2001; Mandolesi ve ark., 2004). Tau, mikrotübül oluşumunda tübinle polimerize olan mikrotübül ile bağlantı kurarak, mikrotübülü stabilize eden, ısıya dayanıklı ve immünohistokimyasal çalışmalarda aksonlarda lokalize olduğu gösterilen bir proteindir. Tau, asidik N-terminal bölgesi, proline zengin orta domain, üç ya da dört tekrarlı temel domain ve C-terminal kısımdan oluşmaktadır. Bu bölgelerin birinden MAP kinaz gibi çok sayıda kinazın aktivitesiyle, fosforillenebilir. Tau çubuk benzeri bir molekül olup kol benzeri yapılar ve kısa aralıklarla, mikrotübüle bağlanır. Alzheimer hastalığında taunun hiperfosforilasyonu çiftleşmiş helikal zincirleri oluşturmaktadır (Şekil 2.10) (Hirokawa ve ark., 1988; Mandelkow ve Mandelkow, 1998). Tau'nun çok sayıda bölgeden fosforillenmesi ile hiperfosforilasyonu yeni doğanların dokularında, mitotik hücrelerde, nöronların farklılaşmasında ve nöronların

apoptozis ile ölüm süreçleri gibi farklı aşamalarda görülür. Tau'nun anormal derecede fosforillenmesiyle tau mikrotübülden ayrılır ve çift helikal zincirler oluşur. Bu durumda mikrotübüller devamlılıklarını ve kararlılıklarını kaybederler, intraselüler trafik bozulur, nöronlarda dejenerasyon başlar. Alzheimer hastalığında bozuk aksonal taşımaya yol açan tau patolojisiyle sinaps kaybı arasında da bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Mandelkow ve Mandelkow, 1998).



Şekil 2.10. Tau fosforilasyonu ve mikrotübül depolimerizasyonu (Mandelkow ve Mandelkow, 1998).

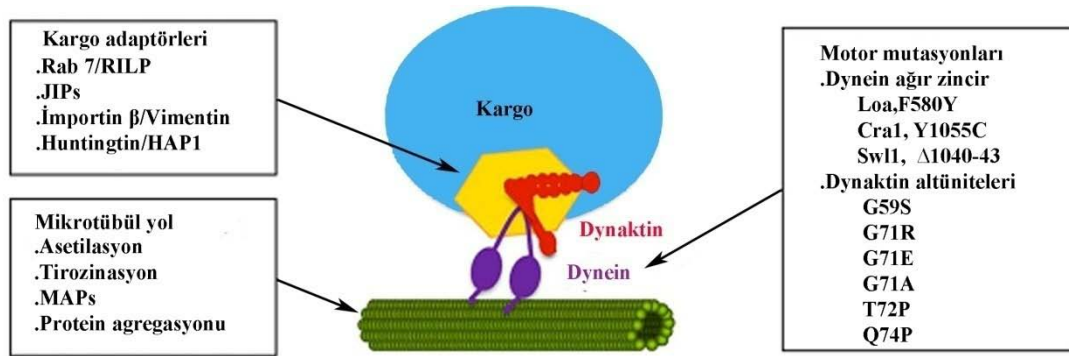
Tau'nun hiperfosforilasyonu tarafından başlayan Tau agregasyonu nörodejeneratif taupatide tanımlanmış ve tau fonksiyon kaybına bağlı nöronal dejenerasyon tetiklenmiştir. Tau'ya bağlı gelişen nörodejenerasyon ve çözülmeyen agregat oluşumları aksonal taşımının azalmasını arttırmıştır (Falzone ve ark., 2010). Yapılan farklı bir çalışmada aksonal taşımada gerekli olan APP'nin belirlenmediği durumda taunun fazla ekspresyonunun, APP yokluğunu kompanse ettiği bulunmuştur (Smith ve ark., 2010).

2.6. Nörodejeneratif hastalıklar ve aksonal taşıma

İlk yıllardan itibaren çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda aksonal taşımının bozulmuş olabileceği düşünülmüştür (Schwab, 1977; Brimijoin, 1982). Diyabetik nöropatiden, Amiyotrofik Lateral Skleroza (ALS), Alzheimer hastalığından Huntington

hastalığına kadar pek çok bozuklukta aksonal taşıma kusurları gösterilmiştir (Chevalier-Larsen ve Hozbaur, 2006; Coleman, 2005). Nörodejeneratif hastalıklarda nöron kaybı altında yatan hücresel ve moleküler mekanizmalar tam olarak açıklanamamıştır. Nörodejeneratif hastalıkların gelişmesinin sebeplerinden birisinin de aksonal taşımada meydana gelen bozukluklar olduğu belirlenmiştir (Almenar-Queralt ve Goldstein, 2001).

Aksonal taşımada görevli olan motor proteinlerdeki mutasyonlar aksonal taşıma bozukluklarına sebep olmaktadır. Anterograd taşımada görevli motor protein kinesinde meydana gelen mutasyon, kinesinin fonksiyonunun bozulmasına, dolayısıyla nörodejenerasyonun uyarılmasına sebep olur. Retrograd taşımada görevli motor proteindeki nokta mutasyonlar ya da delesyonlar dynein fonksiyon bozukluklarına sebep olur (Cheavlier-Larsen ve Holzbaaur, 2006) (Şekil 2.11). ALS, Hungtington gibi hastalıklarda aksonal taşımada yavaşlama görülmüştür (Perlson ve ark., 2010).



Şekil 2.11. Çeşitli seviyelerde retrograd aksonal taşıma değişiklikleri (Perlson ve ark., 2010).

Protein agregatların oluştuğu karakterize edilmiş ALS, Hungtington ve Alzhemier hastalıklarında bu agregatların motor proteinin ayrılmasına sebep oldukları belirlenmiştir. Süperoksiddismutaz (SDOD1) mutant agregatları ve Huntingtin proteinlerinin hem dynein hem de kinesin motor proteinleri yakaladıklarına dair kanıtlar bulunmaktadır (Çizelge 2.1) (Trushina ve ark., 2004; Ligon ve ark., 2005).

Aksonal taşımayı düzenleyen mikrotübüllerdeki tübülün ünitelerin tirozinasyonu, asetilasyonu gibi modifikasyonlarda aksonal taşımayı etkiler (Dompiere ve ark., 2007; Konishi ve Seteou, 2009).

Kargonun motor proteine bağlanmasını sağlayan adaptör proteinlerde meydana gelecek bozukluklar nörodejeneratif hastalıklarda belirlenmiştir (Çizelge 2.1). Örneğin

Charcot Marie Tooth hastalığında endozomların motor proteine bağlanmasında görevli olan adaptör proteindeki mutasyon, ALS hastalığında GTP düzenleyen adaptör proteindeki mutasyon, aksonal nöropati sebebidir (Hadano ve ark., 2001; McCray ve ark., 2010).

Mitokondrilerin ihtiyacı olan yerlere iletilememesi sonucu oluşan enerji ihtiyacı ve mitokondrial transportta meydana gelen problemlerde çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda gözlenmiştir (Çizelge 2.2) (Pilling ve ark., 2006).

Özellikle nöronlar gibi postmitotik hücrelerde toksik madde birikimini önlemek ve yaşlanmış organel ve protein agregatlarını parçalamak için makrofaji önemlidir. Nöronlarda otofogozom oluşumu, Ag5 ya da At7 genleri ile kontrol edilir. ALS, Huntington, Parkinson gibi hastalıklarda otofagozomların taşınımına bağlı olarak birikim gerçekleşir (Ravikumar ve ark., 2004; 2005). Ayrıca hücrenin hayatta kalmasını sağlayacak yada apoptozise gitmesine neden olacak sinyal iletimin dengesindeki değişiklik patojenitelerdeki hayati noktadır (Perlson ve ark., 2010).

Çizelge 2.2. Nörodejeneratif hastalıkların aksonal taşıma bozukluklarıyla bağlantısı (Perlson ve ark., 2010).

HASTALIK	KLİNİK ÖZELLİKLER	GENETİK	KAPSA- DIĞI PROTEİN	A.T. BOZULU- YOR MU?	KANITLAR
Amiyotrofik Lateral Skleroz	Motor Nöron Dejenerasyonu	Çoklu Faktörler	SOD	Evet	Mutant SOD1 ekspresyonu hastalığın erken safhalarında aksonal taşımayı engeller. Endosom morfolojisi ve hareket bozukluğu
			Aslin	Tanımlanmadı	
Huntington Hastalığı	Chorea, psikiyatrik ve bilişsel fonksiyon bozukluğu	Otozomal dominant	Huntingtin	Evet	Patojenik Htt ekspresyonu aksonal taşıma bozukluklarına sebep olur.
Alzheimer Hastalığı	Hafıza kaybı bunama	Çoklu Faktörler	Tau, Amiloid β	Evet	
Parkinson Hastalığı	Dinlenme halinde titreme, rijidite, brakikinezi ve yürüyüş bozukluğu	Çoklu Faktörler	α - sinüklein	Evet	α -sinüklein mutantları kültürü yapılmış nöronlarda taşımayı azaltır

Çizelge 2.2. Nörodejeneratif hastalıkların aksonal taşıma bozukluklarıyla bağlantısı (Perlson ve ark., 2010) (Devam).

HASTALIK	KLİNİK ÖZELLİKLER	GENETİK	KAPSA- DIĞI PROTEİN	A.T. BOZULU- YOR MU?	KANITLAR
Charcot- Marrie- Tooth, Tip- 2A	Duyu ve motor aksonal nöropatide uzunluğa bağlı	Otozomal Dominant	Kinesin (KIF1B)	Belirsiz	KIF1B mutantlarından alınan siyatik sinir ekstraktlarında sinaptik veziküller azalmış

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Deney Hayvanı

Çalışmada canlı materyal olarak 6-12 haftalık Balb-C ırkı, dişi fareler kullanıldı.

3.1.2. Sarf malzemeleri

Çalışmada kullanılan sarf malzemeler ile ilgili ayrıntılar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada kullanılan vasatlar

3.2.1.1. Diseksiyon Vasatı

Diseksiyon vasatı, RPMI 1640, içerisine %1 oranında glutamin ve aynı oranda antibiyotik-antimikotik solüsyonunun aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlandı. Diseksiyon süresince vasat soğuk olarak kullanıldı.

3.2.1.2. Kültür vasatı

Neurobasal A (NBA), içerisine %1 glutamin, %1 antibiyotik-antimikotik ve %2 oranlarında B27 supplementinin aseptik koşullarda eklenmesiyle hazırlandı. Kültür süresince vasat 37°C sıcaklıkta kullanıldı.

3.2.2. Fareden arka kök gangliyonlarının çıkarılması

Farelerin anestezisi, intra peritoneal ketamin (40 mg/kg) enjeksiyonu ile yapıldı. Ardından fareler servikal transeksiyon ile öldürüldü. Çalışmanın amacına uygun olarak arka kök gangliyonları, stereo mikroskop kullanılarak, aseptik koşullarda çıkarıldı. Gangliyonlar, hücre kültürü yapılıncaya kadar soğuk RPMI 1640 vasatında bekletildi.

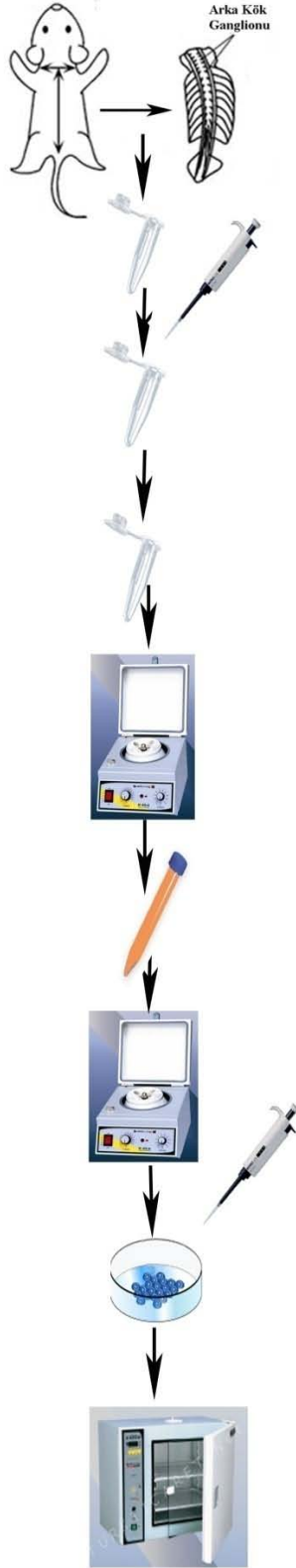
Çizelge 3.1. Sarf malzeme listesi.

Sarf Malzemesi	Firma	Katalog Numarası
Neuro Basal A (NBA)	Invitrogen	10888
RPMI 1640	Sigma	R0883
Hanks'in Dengeli Tuz Solüsyonu (HBSS)	Sigma	H9269
Kollajenaz	Sigma	C7657
Tripsin	Sigma	T4424
Deoksiribonükleaz I (DNAz)	Sigma	D4513
Fetal dana serumu (FCS)	Sigma	F9665
Tripsin İnhibitörü	Sigma	T6522
Percoll	Sigma	P4937
Poly-l-lizin	Sigma	P6282
Laminin	Sigma	L2020
B27 suplementi	Invitrogen	17504-044
Antibiyotik-antimikotik solüsyonu	Sigma	A5955
Glutamin (Glutamax)	Invitrogen	35050-038
Cam tabanlı Petri kabı	WPI	FD35
Fosfat Tamponu (PB)	Sigma	P3288
Fosfat Tuz Tamponu (PBS)	Sigma	P4417
Formaldehit	TAAB lab.	F003
Tau	Santa Cruze	D0190
Karyoferin β_1	Santa Cruze	C2904
Alzheimer Precursor Protein A4	Millipore	LV16344989
DR6 (E-17)	Santa Cruze	J260
DRB (5,6-Dihidrobenezimidazole 1- β -D ribofuranosid)	Sigma	035K4029
Anizomisin	Sigma	055K4102
Caspaz-6 (Tavşan poliklonal)	Abcam	465983
Anti-importin α	Sigma	09K4807
Dynein (Fare monoklonal)	Sigma	118K4764
B-APP	Abcam	726258
Kinesin	Abcam	760322
DIBAC (1,3-dibutylbarbituricacid)	Invitrogen	569376
Alexa 633 eşek ani-keçi IgG	Invitrogen	A21082
Alexa 568 keçi anti-tavşan IgG	Molecular Probes	A11011
Alexa 488 keçi anti-fare IgG	Molecular Probes	A11001
Alexa 568 keçi anti-fare IgG	Molecular Probes	A11004
Alexa 488 tavuk anti-keçi IgG	Molecular Probes	A21467
Alexa 555 eşek anti-fare IgG	Molecular Probes	A31570
Alexa 488 eşek anti-tavşan IgG	Invitrogen	A21206
Sığır serum albumini (BSA)	Sigma	A9418
Triton X	Merck	K26456203 924
Sodyum Azid	Sigma	S8032
Tween 20	Merck	S95415 814
Anti-Alzheimer Precursor Protein A4, APP'nin 66-81. amino asit (N-terminus)	Millipore	MAB348

3.2.3. Hücre kültürü

Hücre kültürü başlıca dört ana basamakta gerçekleştirildi. Bunlar:

1. Enzimatik ayrıştırma: Enzimatik parçalamaya kolajenaz ile başlandı (992,5µl NBA + 7,5 µl kolajenaz). Gangliyonlar, 40 dakika etüvde inkübe edildi, HBSS ile 3 kez yıkandıktan sonra, bir diğer enzim olan tripsin (400µl NBA + 200 µl Tripsin- 15 dk) ile enzimatik ayrıştırmaya devam edildi.
2. Mekanik ayrıştırma: Ganglionların tiriturasyonu yapıldı ve kültüre %1 oranında DNaz (6µl) eklenerek 30 dk. boyunca 50 Hz frekansta ajite edilerek etüvde inkübe edildi.
3. Percoll gradienti ile ayrıştırma: İnkübasyondan sonra 120 g'de 3 dk. santrifüjleme sonucu ayrılan hücreler çöktürölüp, süpernatant atıldı ve ardından pellet NBA (360 µl), FCS (40 µl) ve tripsin inhibitörü (30 µl) ile çözüldü. Plastik tüp içinde dipten yukarıya doğru %60, %35 ve %10'luk yoğunluklarda hazırlanan percoll gradienti üzerine hücre süspansiyonu kondu. 20 dakika 4000 rpm'de, 4°C'de santrifüj ile nöronlar diğer hücrelerden ve doku kalıntılarından ayrıldı. Nöronları içeren percoll gradient tabakası bir başka tüpe aktararak, 120 g'de 3 dk. santrifüjle hücreler dibe toplandı. Süpernatantın büyük bir bölümü atıldı ve geriye kalan supernatant içinde hücre pelleti çözüldü. Son olarak 600 µl süspansiyon elde edildi.
4. Ekim: Elde edilen nöronlar, bir gün öncesinde oda sıcaklığında 2 saat %10 poly-l lizin ve ardından 37°C'de 1 gece süresince % 0,001'lik laminin ile kaplanan ve ekim öncesinde steril distile su ile yıkanıp kurutulan 35 mm'lik Petri kaplarına ekildi. Hücreler öncelikle NBA içinde 600 µl süspansiyon olarak ekildi. Hücrelerin tabana yapışması için, 1 saat etüvde inkübasyondan sonra vasat 1,5 ml'ye tamamlandı. Kùltürler %5 CO₂ ayarlı 37°C'lik etüvde inkübasyona alındı. Hücre kültürü aşamaları Şekil 3.1'de özetlenmiştir.



Arka kök gangliyonları fareden çıkarıldı.

Çıkarılan gangliyonlar enzimatik olarak önce kollajenaz ile sonra tripsin ile parçalandı.

Gangliyonların mekanik ayrıştırılması tiritürasyon yöntemiyle gerçekleştirildi.

Hücre süspansiyonu DNAaz ile ajitatörde inkübe edildi.

Hücreler santrifüj yöntemi ile çöktürüldü.

Pellet, NBA, FCS ve tripsin inhibitörü ile çözüldü.

Sırasıyla %60, %35 ve %10 konsantrasyonlarında olan percoll gradient yöntemiyle nöronlar diğer hücrelerden ve doku artıklarından ayrıldı.

%35'lik Percoll tabakasından alınan hücreler yıkandıktan sonra tabanı laminin kaplı petriye ekildi.

Arka kök gangliyon nöronları etüvde inkübe edildi(%5 CO₂ ve 37°C).

Şekil. 3.1. Arka kök gangliyon hücre kültürü basamakları.

3.2.4. Aksotomi (akson kesisi) öncesi ve sonrası aksonal taşıma görüntülemesi

Aksotomi ve görüntüleme için, laser mikrodiseksiyon mikroskobu (Zeiss Axiovert 200) ve özel yazılımı (PALM Microbeam) kullanıldı. Aksotomi ve görüntüleme, laser mikrodiseksiyon mikroskobunun tablası üzerine monte edilmiş olan ve 37°C/%5 CO₂'ye sahip petri sabitleme kutusu içerisinde gerçekleştirildi. Hücre kültüründe ekim yapıldıktan 48 saat sonra akson uzatmış nöronlardan aksotomi öncesi 40x'lik kuru objektifle belirlenen nöronlara pozisyon numaraları verilip kayıt edildi. Daha sonra 100x'lik immersiyon yağlı objektif ile aksotomi öncesi 12 dakika süresince belirlenen nöronun aksonu, hücre gövdesinden yaklaşık olarak 50 µm uzaklıktaki bir noktadan, mikroskoba bağlı CCD kamerayla alınan görüntüleri kaydedildi. Daha sonra laser mikrodiseksiyon mikroskobuyla, nöron gövdesinden yaklaşık 200 µm uzaklıktaki aksone aksotomi yapıldı. Yine aksotomi sırasında ve sonrasında aynı nörondan ve aynı noktadan 12 dakika boyunca mikroskoba bağlı CCD kamerayla görüntüler kaydedildi. Nöronlar; dallanmayan aksone sahip olanlar, dallanan aksone sahip olan nöronlar ve komşu dallı aksone sahip olan nöronlar olarak seçildi (Şekil 3.2). Bu deney grubu aynı zamanda inhibitör (translasyon ve transkripsiyon) kullanılan aksonal taşıma görüntü ve değerlendirilmelerinin yapıldığı diğer deney gruplarının kontrol aksotomisi olarak belirlendi.

3.2.5. Akson sonrası transkripsiyon ve translasyon seviyesindeki inhibisyonların aksonal taşıma üzerine etkilerinin görüntülenmesi

3.2.5.1. Transkripsiyon inhibisyonu ve aksonal taşıma üzerine etkilerinin görüntülenmesi

Aksotomiden 2 saat önce transkripsiyon inhibitörü olarak kullanılan 5,6-Dihidrobenzimidazole 1-β-D ribofuranosid (DRB), 48 saat önce kültürü yapılmış Petrilere, konsantrasyonu 3 mM olacak şekilde konuldu. Aksotomi ve görüntüleme sistemi için, sıcaklığı 37°C ve CO₂'i %5'e ayarlanmış Petri sabitleme kutusu monte edilmiş laser mikrodiseksiyon mikroskobu (Zeiss Axiovert 200) ve özel yazılımı (PALM Microbeam) kullanıldı. Hücre kültüründe ekim yapıldıktan 48 saat sonra akson uzatmış nöronlardan aksotomi öncesi 40x'lik kuru objektifle belirlenen nöronlara

pozisyon numaraları verilerek kayıt edildi. Daha sonra 100x'lik immersiyon yağlı objektife geçilerek, aksotomi öncesi 12 dakika süresince belirlenen nöronun aksonu, hücre gövdesinden yaklaşık olarak 50 μm uzaklıktaki bir noktadan mikroskoba bağlı olan CCD kamerayla, görüntüleri kaydedildi. Daha sonara laser mikrodiseksiyon mikroskobuyla, nöron gövdesinden yaklaşık 200 μm uzaklıktaki aksone aksotomi yapıldı. Yine aksotomi sırasında ve sonrasında aynı nöronun ve aynı noktadan 12 dakika boyunca mikroskoba bağlı CCD kamerayla alınan görüntüler kayıt edildi. Daha öncede olduğu gibi nöronlar üç kategoriye ayrılarak belirlendi. Bunlar; dallanmayan aksone sahip olanlar, dallanan aksone sahip nöronlar ve komşu aksone sahip nöronlardır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. **a.** Aksonu dallanmayan nöronlar, **b.** Komşu dallı aksone sahip olan nöronlar, **c.** Komşu aksone sahip olan nöronlar

3.2.5.2. Translasyon inhibisyonu ve aksonal taşıma üzerine etkilerinin görüntülenmesi

Aksotomiden 2 saat önce translasyon inhibitörü olarak Anisomisin, 48 saat önce kültürü yapılmış Petrilere konsantrasyonu 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ olacak şekilde konuldu. Aksotomi ve görüntüleme sistemi için, sıcaklığı 37°C ve CO₂'i %5'e ayarlanmış Petri sabitleme kutusu monte edilmiş laser mikrodiseksiyon mikroskobu (Zeiss Axiovert 200) ve özel yazılımı (PALM Microbeam) kullanıldı. Hücre kültüründe ekim yapıldıktan 48 saat sonra akson uzatmış nöronlardan aksotomi öncesi 40x'lik kuru objektifle belirlenen nöronlara pozisyon numaraları verilerek kaydedildi. Daha sonra 100x'lik immersiyon yağlı objektife geçilerek, aksotomi öncesi 12 dakika süresince belirlenen nöronun aksonu, hücre gövdesinden yaklaşık olarak 50 μm uzaklıktaki bir noktadan mikroskoba bağlı olan CCD kamerayla, görüntüleri kaydedildi. Daha sonra laser mikrodiseksiyon mikroskobuyla, nöron gövdesinden yaklaşık 200 μm uzaklıktaki aksone aksotomi

yapıldı. Yine aksotomi sırasında ve sonrasında aynı nörondan ve aynı noktadan 12 dakika boyunca mikroskoba bağlı CCD kamerayla alınan görüntüler kayıt edildi. Nöronlar üç kategoriye ayrılarak belirlendi. Bunlar; dallanmayan aksona sahip olanlar, dallanan aksona sahip nöronlar ve komşu dallı aksona sahip nöronlardır.

3.2.6. Aksotomi yapılırken kullanılan laserin aksonal taşıma üzerine etkilerinin görüntülenmesi (kontrol)

Nöronun olmadığı boş alana laser atışı ve görüntüleme sistemi için, sıcaklığı 37°C ve CO₂'i %5'e ayarlanmış Petri sabitleme kutusu monte edilmiş laser mikrodiseksiyon mikroskobu (Zeiss Axiovert 200) ve özel yazılımı (PALM Microbeam) kullanıldı. Hücre kültüründe ekim yapıldıktan 48 saat sonra akson uzatmış nöronlardan boş laser atışı öncesi 40x'lik kuru objektifle belirlenen nöronlara pozisyon numaraları verilip kayıt edildi. Daha sonra 100x'lik immersiyon yağlı objektifte nöron ve uzantılarının olmadığı boş alana laser atışı öncesi 12 dakika süresince belirlenen nöronun aksonu, hücre gövdesinden yaklaşık olarak 50 µm uzaklıktaki bir noktadan, mikroskoba bağlı olan CCD kamerayla görüntüleri kayıt edildi. Daha sonra laser mikrodiseksiyon mikroskobuyla, nöron gövdesinden yaklaşık 200 µm uzaklıktaki aksona 25 µm uzaklıktan nöron ve uzantılarının olmadığı boş alana laser atışı yapıldı. Yine boş laser atışı ve sonrasında aynı nörondan ve aynı noktadan 12 şer dakika boyunca mikroskoba bağlı CCD kamerayla görüntüler kayıt edildi. Nöronlar üç kategoriye ayrılarak belirlendi. Bunlar; dallanmayan aksona sahip olanlar, dallanan aksona sahip nöronlar ve komşu dallı aksona sahip nöronlardır.

3.2.7. Aksotomiden sonra oluşan depolarizasyon dalgasının belirlenmesi

Nöronlar aksotomiye uğradıklarında depolarizasyon dalgası aksonlardan hücre gövdesine iletilmektedir (Berdan ve ark., 1993). Bu ileti aynı zamanda akson hasar sinyali mekanizmaları arasında yer almaktadır. Çalışmamızda aksotomiyle oluşan depolarizasyon dalgasını göstermek için, daha önceki çalışmalarda da kullanılmış olan voltaj değişikliğini gösteren ve canlı hücrede daha çok hücre gövdesi çevresinde floresan olarak boyanma sonucu gözlenebilen DIBAC (1,3- dibutylbarbituric acid)

kullanıldı (Kiedrowski, 1999). DIBAC boyası sitosolik proteinlere bağlandığında floresan yoğunluğu artmaktadır. Buna bağlı olarak hücre depolarize olduğunda boyanın hücre içine girişi artmakta ve hücre içindeki lipid ve proteinlere bağlanarak floresan şiddeti atmaktadır. Hücre hiperpolarize olduğunda ise DIBAC hücreden dışarı çıkmakta ve protein ile lipidlere bağlı DIBAC konsantrasyonu azalacağı için floresan şiddeti de azalmaktadır (Kiedrowski, 1999; FLIPR, 1999). Hücre kültüründe ekim yapıldıktan 48 saat sonra Petri kutusuna (Cell Observer-Zeiss) 100 nM konsantrasyonunda DIBAC koyulup mikroskop sistemine yerleştirildi ve merkez olarak işaretlenen noktanın 23,52 mm²'lik alanına düşen bölgedeki nöronların görüntüleri 20x'lik objektifle alındı. Bu sistemde görüntüler alındıktan sonra daha sonraki uygulamalarda merkezi bölgeyi bulabilmek için Petri kutusunun kapağına merkezi gösterecek bir nokta konuldu. Görüntü fotoğrafı tablet bilgisayara alındı ve bu görüntü fotoğrafı konfokal laser taramalı mikroskopta nöronları bulabilmek için ters çevrildi. Bu işlemler sırasında, Petrilere floresan ışıkla görüntülenen ve depolarizasyon dalgasında floresan ışık altında şiddet değişikliği görüntülenebilen DIBAC'dan 100 nM konsantrasyonda bırakıldı. Petri kutusunun tabanına yüzeyini kapatacak şekilde steril cam lamel kapatıldı. Konfokal laser taramalı mikroskop ile (Zeiss LSM 510 META) belirlenen nöronun argon (488 nm) laser taramasıyla 40x'lik immersiyon yağlı objektifte aksotomi öncesi alınan görüntüsü kayıt edildi. Seçilen nöron tablet bilgisayarda işaretlendi. Daha sonra Petri kutusu laser mikrodiseksiyon mikroskobuna götürülüp, seçilen nöron bulundu ve 63x kuru faz kontrast objektif ile aksotomi yapıldıktan sonra hızlı bir şekilde laser taramalı mikroskopta aksotomi öncesi alınan görüntüyle aynı ayarlar olacak şekilde aynı nöronun aksotomi sonrası görüntüleri 10 dakika boyunca kayıt edildi. Daha sonra görüntüler Image J (National Institutes of Health (NIH) programı ile analiz edildi.

3.2.8. İmmünohistokimya deneyleri

İmmünohistokimya boyama kombinasyonları aksonal taşımayla ilişkili olduğu bilinen proteinlerin tespit edilmesine yönelik olarak seçildi. Aksonal taşımada görevli olan motor proteinler dynein ve kinesin, aksonal taşıma işaretçisi olarak bilinen ve anterograd olarak taşınan APP, aksonal protein olan tau immünohistokimya boyamalarla gösterildi. Daha önce yapılan araştırmalarda α importinin sentezlenmesi olarak aksonda bulunduğu iken, β importinin ise aksoplazmadaki mRNA'nın hasarla

translasyona uğrayıp α importinle birleştiği ve daha sonra bu heterodimer ve NLS bağlı kargonun dyneine bağlanarak, çekirdeğe sinyal taşıdığı bilinmektedir (Hanz ve ark., 2003; Hanz ve Fainzilber, 2004). Bu çalışmada aksotomi yapılan nöronlar ile aksotomi yapılmamış kontrol nöronlarında, α importin, β importin ve her ikisinin birlikte bulunma durumlarını immünohistokimyasal olarak belirlendi. İmmünohistokimya boyamalarına başlarken ilk olarak hücre kültürüne ekim yapıldıktan 48 saat sonra akson uzatmış sağlıklı nöronların bulunduğu Petri ler zaman aralıklı mikroskopi sistemine yerleştirilip merkez nokta seçilerek, yaklaşık olarak 23,52 mm²'lik alanda bulunan nöronlar görüntüledi. Bu sistemde görüntüler alındıktan sonra daha sonraki uygulamalarda merkezi bölgeyi bulabilmek için Petri kutusunun kapağına merkezi gösterecek bir nokta konuldu. Görüntü fotoğrafı tablet bilgisayara aktarıldı. Daha sonra Petri ler laser taramalı mikrodiseksiyon mikroskobuna yerleştirilip, sağlıklı nöronların 150-200 μ m uzaklıktaki aksonlarına aksotomi yapıldı. Seçilen nöronlar, immünohistokimyasal işlemler tamamlandıktan sonra konfokal mikroskopta görüntülenirken yerlerinin bulunabilmesi için tablet bilgisayarda işaretlendi. Petri ler aksotomiden 3 saat sonra tespit edildiler.

3.2.8.1. Tespit işlemi

İmmünohistokimyasal boyama öncesinde ilk olarak Petriden kültür vasatı uzaklaştırıldı ve Petri oda sıcaklığında fosfat tamponlu tuz (PBS) ile 2 defa yıkandı. Ardından hücreler yine oda sıcaklığında % 4'lük taze formaldehit ile 15 dakika boyunca tespit edildi. PBS ile 2 defa yıkamanın ardından, Petri kabına blok solusyonu (%3 BSA, %0,1 Triton X, %0,1 sodyum azid, %1 tavuk+keçi serumu ayrıca sadece keçi serumlu olarak hazırlandı) eklenerek 30 dakika buzdolabında bekletildi. Daha sonra, Petri ler, oda sıcaklığında sıcaklığındaki PBS ile iiki kez yıkandı.

3.2.8.2. Primer antikor uygulaması

Çalışmada α importin, β importin, kinesin, dynein, tau ve APP antikorları olmak üzere altı farklı primer antikor kullanıldı. Sulandırma oranı (%3 BSA, %0,1 sodyum azid, %0,1 Tween 20) ile 1/100 olacak şekilde hazırlandı. Primer antikorlar, α importin ve β importin birinci grubu, kinesin ve APP ikinci grubu, dynein ve APP üçüncü grubu,

tau ve APP dördüncü grubu oluşturacak şekilde paylaştırıldı. Petri yüzeylerinin ortasına her bir primer antikordan 150µl ve 100 µl PBS konularak, Petriler bir gece buzdolabında nemli atmosferde bekletildi. Primer antikor uygulamasının ardından Petriler, 5 kez PBS ile yıkandı.

3.2.8.3. Sekonder antikor uygulaması

Sekonder antikor olarak, Alexa 488 tavuk anti-keçi ve Alexa 568 keçi anti-fare IgG'si olmak üzere iki farklı sekonder antikor aynı anda importin, β importin primer antikorlarının eklenmiş olduğu Petriler için kullanıldı. Alexa 488 keçi anti-fare ve Alexa 568 keçi anti-tavşan IgG'si olmak üzere iki farklı sekonder antikor aynı anda; kinesin ve APP, dynein ve APP, tau ve APP primer antikorlarının konulduğu Petriler için kullanıldı. Sekonder antikorlar kullanılmadan önce 1/100 oranında sulandırma solusyonuyla sulandırıldı ve preparatların üzerine her birinden 50 µl kondu. Buzdolabında, nemli bir kutuda 3 saat inkübasyondan sonra preparatlar 5 kez PBS ile yıkandı ve görüntülenmek üzere lamel ile kapatıldı (Çizelge 3.2).

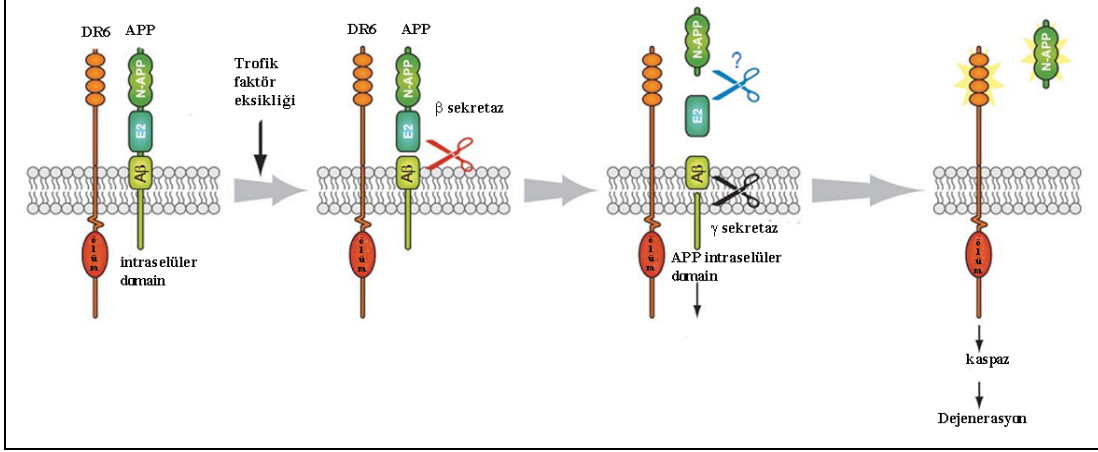
Çizelge 3.2. İmmünohistokimya kombinasyonları

Primer antikor sulandırma sıvısı	Primer Antikor	Blok solusyonu	Sekonder antikor
Serumsuz sulandırma sıvısı	Anti-importin α	Tavuk+Keçi serumlu	Alexa 568 keçi anti-fare IgG
Serumsuz sulandırma sıvısı	Karyoferin β_1 (importin β)	Tavuk+Keçi serumlu	Alexa 488 tavuk anti-keçi IgG
Serumsuz sulandırma sıvısı	B-APP	Keçi serumlu	Alexa 568 keçi anti-tavşan IgG
Serumsuz sulandırma sıvısı	Dynein	Keçi serumlu	Alexa 488 keçi anti-fare IgG
Serumsuz sulandırma sıvısı	Kinesin	Keçi serumlu	Alexa 488 keçi anti-fare IgG
Serumsuz sulandırma sıvısı	Tau	Keçi serumlu	Alexa 488 keçi anti-fare IgG

3.2.9. APP-DR-6-Kaspaz-6 immünoreaktivitesi

Nörotrofik faktör eksikliğinin APP'nin yüzeye yayılımını tetiklediği ve betasekretazı (BACE) uyararak APP'yi parçalayıp N-APP oluşturduğu gösterilmiştir.

(Nikolaev ve ark., 2009). DR6 ‘nın hem hücre gövdesinde hem de aksonda bulunduğu, N-APP’nin, DR6’ya bağlanarak onu aktifleştirmesi sonucunda, kaspaz 6’yı uyardığı ve hem aksonda hem de hücre gövdesinde dejenerasyona sebep olduğu bildirilmiştir (Nikolaev ve ark., 2009). Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada geliştirilen metot ile bu mekanizma test edildi. Bu mekanizmaya ait Şekil 3.3.’de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. APP ölüm reseptör mekanizması (Nikolaev ve ark. 2009).

Kültür yapıldıktan 48 saat sonra, toplam üç Petriden bir Petriye, aksotomiden 1 saat önce (20 ug/ml) N-APP inhibitörü kondu ve diğer iki Petriye aksotomiden önce herhangi bir şey konulmadı. N-APP inhibitörünün bulunduğu Petri ve içinde N-APP inhibitörünün olmadığı Petri (kontrol aksotomisi) olmak üzere toplam iki Petrinin zaman aralıklı mikroskopi sistemine yerleştirilip merkez nokta seçilerek yaklaşık olarak 23,52 mm²'lik alanda bulunan nöronlar, görüntülendi. Bu sistemde görüntüler alındıktan sonra, daha sonraki uygulamalarda merkezi bölgeyi bulabilmek için Petri kutularının kapağına merkezi gösterecek bir nokta konuldu. Fotoğraflanan görüntü tablet bilgisayara alındı. Daha sonra Petriler laser taramalı mikrodiseksiyon mikroskobuna yerleştirilip, sağlıklı nöronların 150–200 µm uzaklıktaki aksonlarına, aksotomi yapıldı. Seçilen nöronlar, immünohistokimyasal işlemler bittikten sonra konfokal mikroskopta görüntülenirken, yerlerinin bulunabilmesi için tablet bilgisayarda işaretlendi. Aksotomi yapılan iki Petri (N-APP inhibitörlü ve kontrol aksotomisi) ve kontrol olarak kullanılan ve herhangi bir işlemin yapılmadığı Petriler olmak üzere toplam üç Petri aksotomiden 3 saat sonra tespit edildi. Primer antikor olarak N-APP, aktif kaspaz-6 ve DR6 kullanıldı. Sekonder antikor olarak ise Alexa 488 eşek anti-

tavşan, 633 eşek anti-keçi, 555 eşek anti-fare Ig G'si kullanıldı (Çizelge 3.3). Primer ve sekonder uygulamasının ardından laser taramalı konfokal mikroskopta Petriler görüntülendi.

Çizelge 3.3. Üçlü immünohistokimya boyama kombinasyonu

Primer antikor sulandırma sıvısı	Primer Antikor	Blok solusyonu	Sekonder antikor
Serumsuz sulandırma sıvısı	Kaspaz-6	Eşek serumlu	Alexa 488 eşek anti tavşan IgG
Serumsuz sulandırma sıvısı	DR6	Eşek serumlu	Alexa 633 eşek anti-keçi IgG
Serumsuz sulandırma sıvısı	N-APP	Eşek serumlu	Alexa 555 eşek anti-fare IgG

3.2.10. Mikroskobik görüntüleme ve görüntü analizleri

3.2.10.1. Zaman aralıklı mikroskopi (Time Lapse) ile görüntüleme

Zaman aralıklı mikroskopi (Time Lapse) görüntüleme sistemi motorize bir invert mikroskop (Axiovert 200M) ve tüm fonksiyonları kontrol edilip programlanabildiği bilgisayar ve yazılımından oluşmaktadır. Bu sistem, mikroskop üzerinde bulunan dijital kamera ile alınan görüntülerin bilgisayar ortamına aktarılabilmesine olanak vermektedir. Tablo üzerinde bulunan ve preparatın içine yerleştirildiği inkübasyon kutusu destek üniteler sayesinde hücreler için uygun atmosfer şartlarını (37°C, %5 CO₂, nem) sağlamaktadır. Sistemde kullanılan bilgisayar programı (Axiovision 3.1) mikroskobun tüm fonksiyonlarının bilgisayar ortamında düzenlenebilmesine olanak sağlandı. Bu programla preparatların X, Y, Z koordinatları ile birlikte çeşitli pozisyonlar kaydedilebildi ve görüntü alma aralığı, süresi ile görüntü özellikleri (renk ayarı, parlaklık, çözünürlük gibi) ayarlandı (Şekil 3.4). Görüntü alınırken ve iki görüntü alımı arasında objektifler, filtreler ve ışık ayarı gibi çalışmanın özelliğine göre daha önce kaydedilen bu özellikler otomatik olarak değiştirilebilmekte ayrıca görüntülenen pozisyonlar zvi formatında depolanıp, daha sonra bu görüntüler birleştirilerek film haline getirilebilmektedir (Öztürk ve Erdoğan, 2004).



Şekil 3.4. Zaman aralıklı mikroskopi sistemi.

3.2.10.2. Laser taramalı konfokal mikroskopta immunohistokimyasal preparatların görüntülenmesi

İmmunohistokimyasal olarak boyaması yapılan preparatlar konfokal laser taramalı mikroskop ile görüntülendi (Zeiss LSM 510 META). Görüntülemeler için argon (488 nm) ve helyum-neon (543 nm) laserleri kullanıldı. Çoğu preparatların görüntülenmesinde 40x büyütme sulu ve immersiyon yağlı objektifler kullanıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Laser taramalı konfokal mikroskopi sistemi.

3.2.10.3. PALM Mikrolaser sistemi

Mikroskopta bulunan laser ünitesi 337 nm dalga boyunda, her biri 3 ns süren ve yaklaşık olarak 300 μ J enerji salan darbeler üretmektedir. Laser aksotomileri sırasında 63x kuru faz kontrast objektifi, 100x immersiyon yağlı objektif (Achromplan N.A. 0.75, Zeiss Almanya), laser ışınlarını, mikroskobu ve mikroskoba bağlı olan CCD kamerayı kontrol eden bilgisayar sistemi kullanıldı (Şekil 3.6).

Mikroskop tablası aksotomi öncesi ve sonrası 12 dakika süreyle her saniyeden fotoğraf çekecek şekilde uzun süre fizyolojik şartları sağlamak için, sıcaklığı 37°C ve CO₂'i %5'e ayarlı Petri sabitleme kutusuna sahiptir. Görüntüleme ve aksotomi, laser mikrodiseksiyon mikroskobu (Zeiss Axiovert 200) kullanılarak 100x immersiyon yağlı objektifle yapıldı. Aksotomisi yapılacak olan nöronlar belirlenerek pozisyonlar kaydedildi. Aksotomi için seçilen nöronların ve aksonlarının sağlıklı olmasına dikkat edildi. Akson uzunlukları en az 200 μ m olan nöronlar seçildi. Mümkün olan en düşük enerji düzeyinde (% 70) akson kesimi yapıldı.



Şekil 3.6. PALM Mikrolaser Sistemi.

3.2.10.4. Görüntü analizleri

Aksotominin gerçekleştirildiği grup, kontrol grubu, transkripsiyon ve translasyonun inhibe edildiği toplam dört deney grubunun her biri için seçilen 30 nöronun (dalsız-10+dallı- 10+komşu dallı-10=30 nöron) kesim öncesi 12 dk. ve kesim sonrası 12 dk. olmak üzere toplam 24 dakikalık süreyle alınan (her saniyede bir görüntü) kayıt dosyası önce Cleaner programı ile sıkıştırıldı. Sonra yine aynı program ile Quik time formatına çevrildi. Daha sonra bu dosyalar Image J programı ile birlikte her saniye bir kare olacak şekilde açıldı. Işık mikroskobunun çözünürlük sınırları içinde gözlenebilen, taşınan parçacıkların sayıları, çeşitleri (anterograd, retrograd) ve hızları tespit edildi. Hızlar ortalama hız olarak hesaplandı ($\mu\text{m/sn}$). Ortalama hızlar ayrıca sürekli taşınan parçacıkların ortalama hızı (s-hız) ve duraksamalı taşınan parçaların ortalama hızı (d-hız) olarak iki gruba ayrıldı. Ayrıca aksotomi sonrası ortalama hızlar, aksotomi öncesi ortalama hızlara bölünerek, s-hız değişim oranı ve d-hız değişim oranı elde edildi. Elde edilen morfolojik özelliklere, hızlara ve taşınan parça sayılarına ait tüm verilere istatistik analiz uygulanarak korelasyonlar elde edildi. Laserin etkisinin araştırıldığı deney grubu kontrol olarak belirlendi. Herhangi bir uygulama yapılmadan aksotominin gerçekleştirildiği ve taşınan parçaların incelendiği grup kontrol aksotomisi olarak belirlendi.

3.2.10.5. Floresan görüntü analizleri

Laser taramalı konfokal mikroskop ile alınan floresan görüntülerin floresan parlaklık ve lokalizasyon analizleri de Image J programı ile yapıldı. Image J programı ile elde edilen boyanma şiddetine ait verilere istatistiksel analiz uygulandı.

3.2.11. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler SPSS 13.0 yazılımı ve Microsoft Excel ile gerçekleştirildi. Gruplar arası karşılaştırmalar için parametrik ve parametrik olmayan testler (Student t-testi ve çeşitli gruplar arasındaki ilişkileri irdelemek için Pearson korelasyon analizleri) uygulandı.

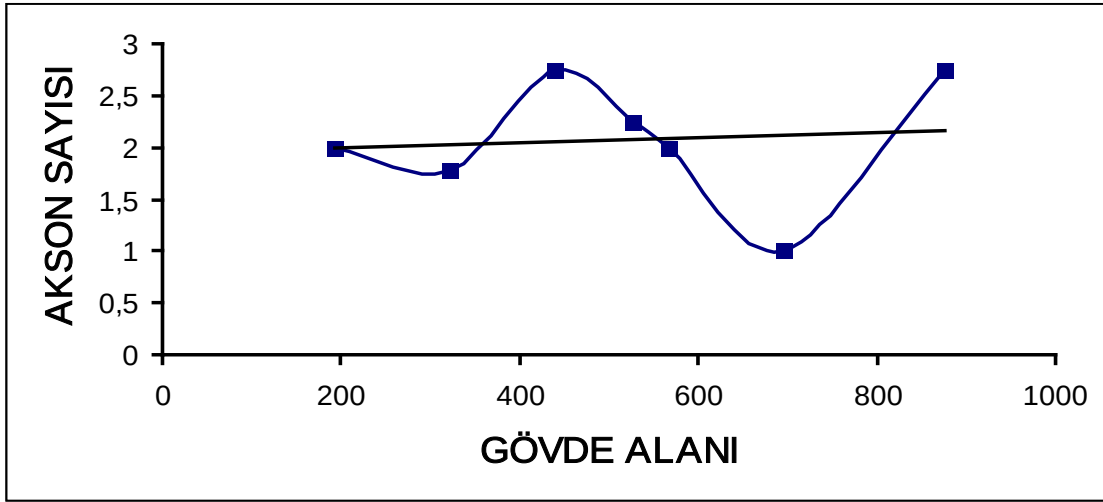
4. BULGULAR

4.1. Morfolojik özelliklere ait bulgular

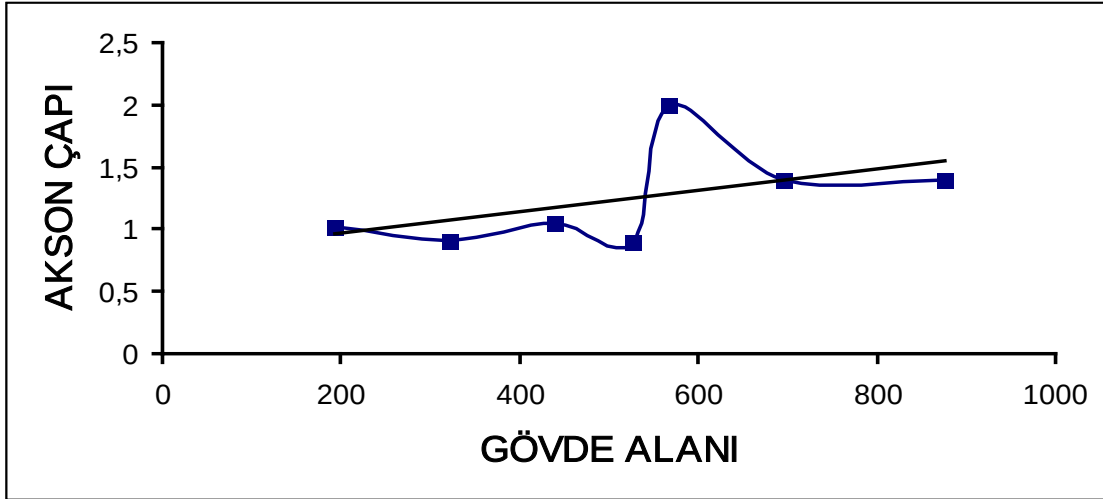
Kültüre ekilen nöronların birkaç saat içinde akson uzatmaya başladığı gözlemlendi. Ekimi izleyen 48 saat içinde ise nöronların çoğunun akson uzatmış halde olduğu belirlendi. (Şekil 4.1). Sonrasında kontrol şartları ve aksotomi sonrası nöronlar arasındaki morfolojik özelliklerin korelasyon analizi yapıldı. Gövde alanı küçük olan nöronun akson sayısının fazla olduğu bulundu ($r=-0,13$; $p<0,05$) (Şekil 4.2). Diğer taraftan aksonun ince ($r=-0,15$; $p<0,05$) ve dal sayısının az olduğu tespit edildi. ($r=0,6$; $p<0,05$). Gövde alanı büyük olan nöronlarda ise akson sayısının az olduğu gözlemlendi ($r=-0,13$; $p<0,05$). Ayrıca aksonun kalın ($r=0,15$; $p<0,05$) ve dal sayısının fazla olduğu bulundu ($r=0,60$; $p<0,05$) (Şekil 4.3, 4.4). Aksotomi yapıldıktan sonra birbiriyle ilişkili olan özelliklere bakıldığında, çekirdek akson hilusuna ne kadar yakınsa, aksotomi sonrası aksonun geri çekilme miktarının o kadar fazla olduğu tespit edildi ($r=-0,16$; $p<0,05$) (Şekil 4.5) ayrıca, çekirdeğin akson hilusuna uzaklığının, akson dal sayısı ve akson kalınlığı ile ilişkili olmadığı bulundu. Geri çekilme miktarıyla, gövdeden çıkan akson sayısının doğru orantılı ($r=0,11$; $p<0,05$) (Şekil 4.6) ve kesim mesafesi ile ters orantılı bir şekilde korele olduğu bulundu ($r=-0,15$; $p<0,05$) (Şekil 4.7).



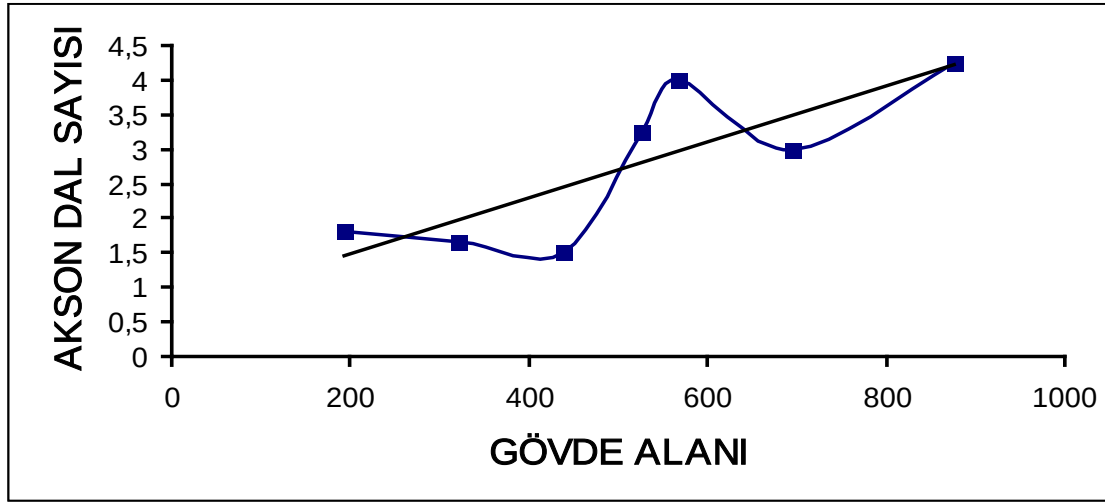
Şekil 4.1. Kültür ortamında akson uzatmış nöronlar



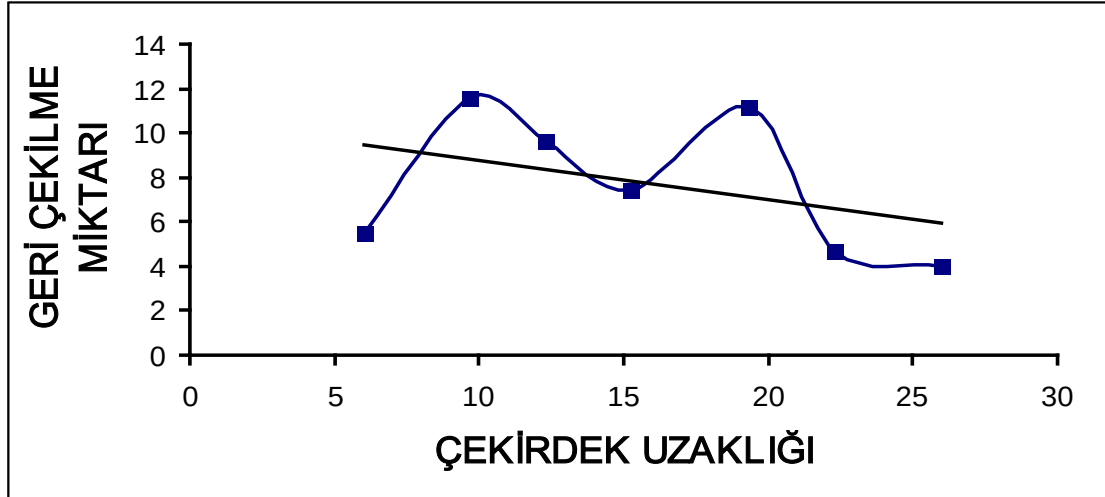
Şekil 4.2. Gövde alanı (μm^2) / akson sayısı korelasyon grafiği ($r=-0,13$; $p<0,05$).



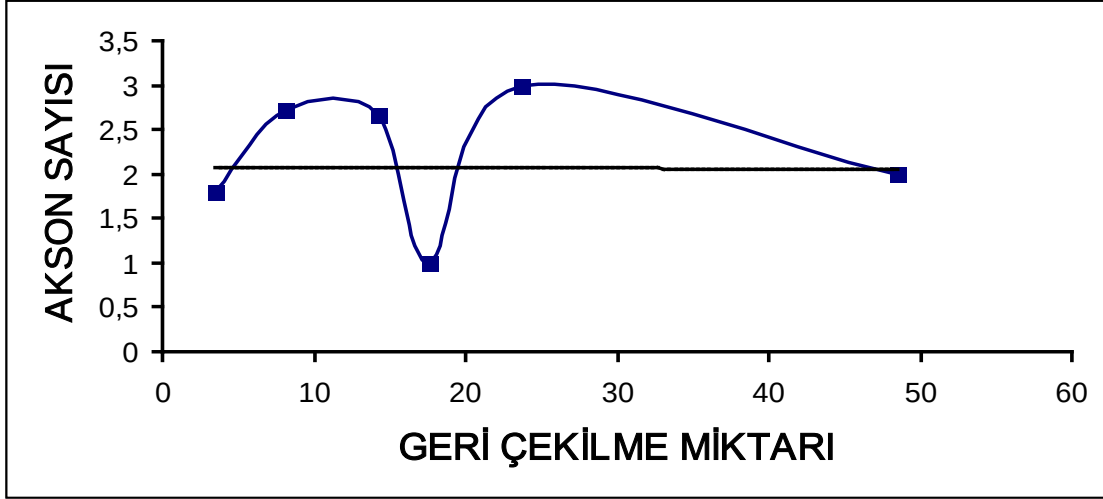
Şekil 4.3. Gövde alanı (μm^2) / akson çapı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,15$; $p<0,05$).



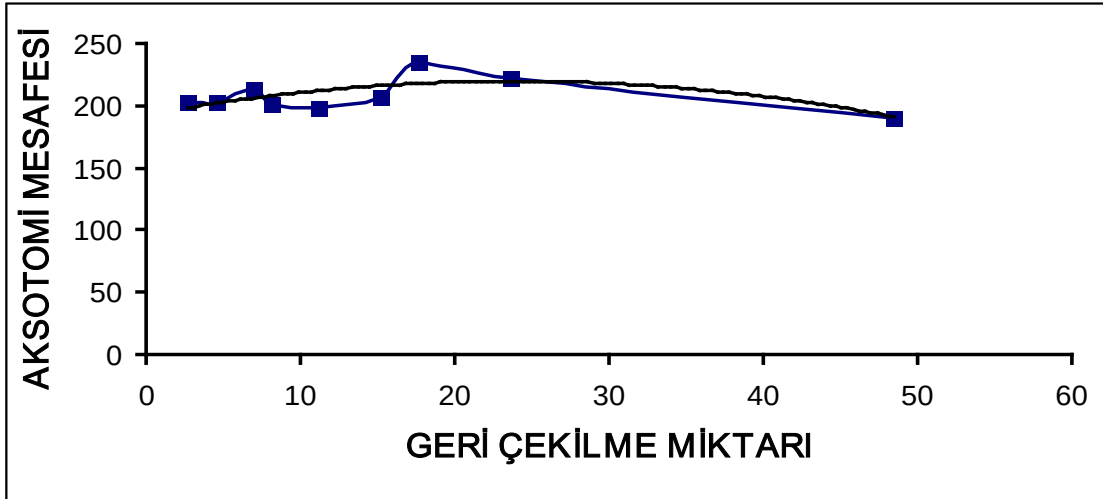
Şekil 4.4. Gövde alanı (μm^2) / akson dal sayısı korelasyon grafiği ($r=0,60$; $p<0,05$).



Şekil 4.5. Aksotomi sonrası meydana gelen geri çekilme miktarı (μm) / çekirdeğin akson hilusuna uzaklığı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=-0,16$; $p<0,05$).



Şekil 4.6. Gövdeden çıkan toplam akson sayısı / aksotomi sonrası meydana gelen geri çekilme miktarı (µm) korelasyon grafiği ($r=0,11$; $p<0,05$).



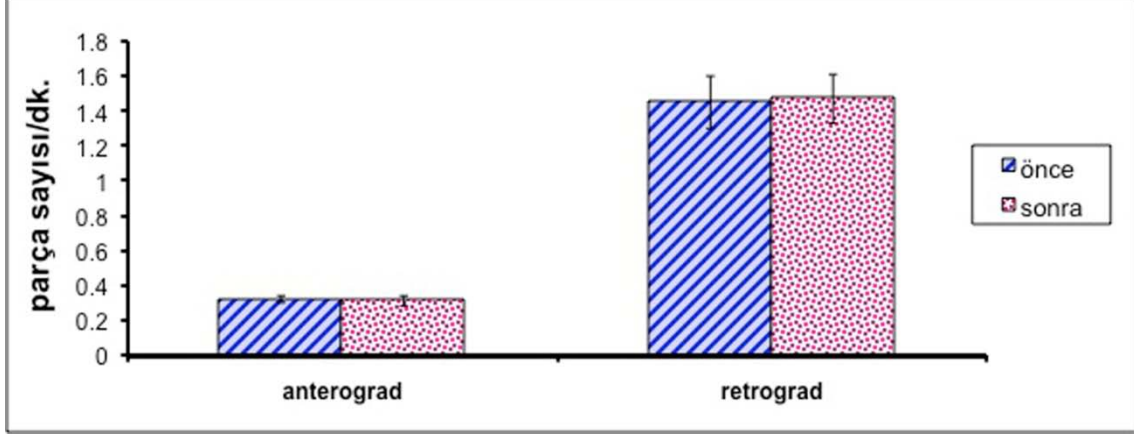
Şekil 4.7. Aksotomi sonrası meydana gelen geri çekilme miktarı (µm) / aksotomi mesafesi (µm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=-0,15$; $p<0,05$).

Geri çekilme miktarının, gövde alanı büyüklüğünden ($r=-0,007$) ve akson dal sayısından ($r=0,06$) etkilenmediği tespit edildi. Akson kalınlığının ise, akson sayısından ($r=0,06$), gövde alanı büyüklüğünden ($r=0,08$), çekirdeğin akson hilusuna uzaklığından ($r=-0,02$) ve kesim yerine uzaklığından ($r=-0,01$) etkilenmediği bulundu.

4.2. Aksonal taşıma

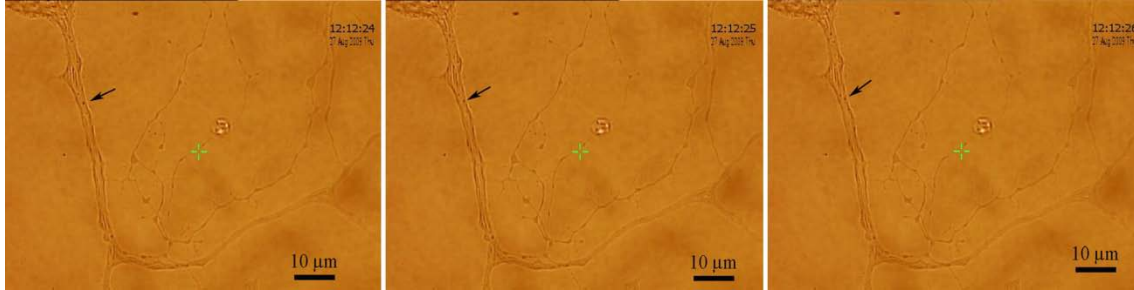
Laser ışınının odaklandığı nokta dışında olası etkisinin test edilmesi amacıyla yapılan deneylerde, aksonların yakınına yapılan atışların aksonlardaki taşımaya bir etki

yapmadığı görüldü (Şekil 4.8). Bu durum ile ilgili veriler istatistiksel analizlerle ortaya kondu.



Şekil 4.8. Kontrol grubunda laser atışı öncesi ve sonrasında, anterograd ve retrograd olarak taşınan parça sayısı / dk.

Aksonal taşımanın gözlenmesiyle ilgili olarak retrograd olarak taşınan bir parçanın hareketi arka arkaya üç saniyelik fotoğraf kareleri Şekil 4.9.'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Retrograd olarak taşınan parçanın üç saniye süresince arka arkaya karelerde görüntüsü.

4.2.1. Kontrol şartlarında dalsız aksonlarda taşıma

Kontrol şartlarında anterograd ve retrograd olarak taşınan parçaların sayıları, ortalama s-hız ve d-hızları, nöron tiplerine göre Çizelge 4.1'de verilmiştir. Buna göre birim zamanda gerçekleşen retrograd taşımanın, anterograd taşımadan anlamlı olarak daha fazla olduğu gözlemlendi.

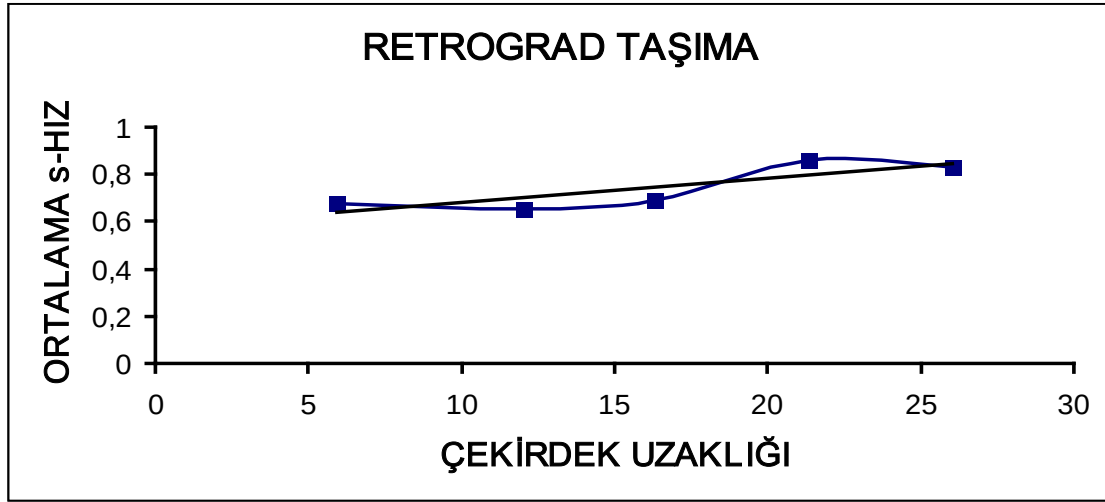
Çizelge 4.1. Kontrol şartlarında dalsız aksonlarda aksonal taşıma değerleri

	ANTEROGRAD Ort $\pm$ SH	N	RETROGRAD Ort. $\pm$ SH	N
Sayı (parça/dk.)	0,1 $\pm$ 0,01	28	1,27 $\pm$ 0,125	28
Ort. s-Hız (μ m/sn)	0,79 $\pm$ 0,09	37	0,71 $\pm$ 0,017	423
Ort. d-Hız (μ m/sn)	0,74 $\pm$ 0,09	37	0,61 $\pm$ 0,018	423

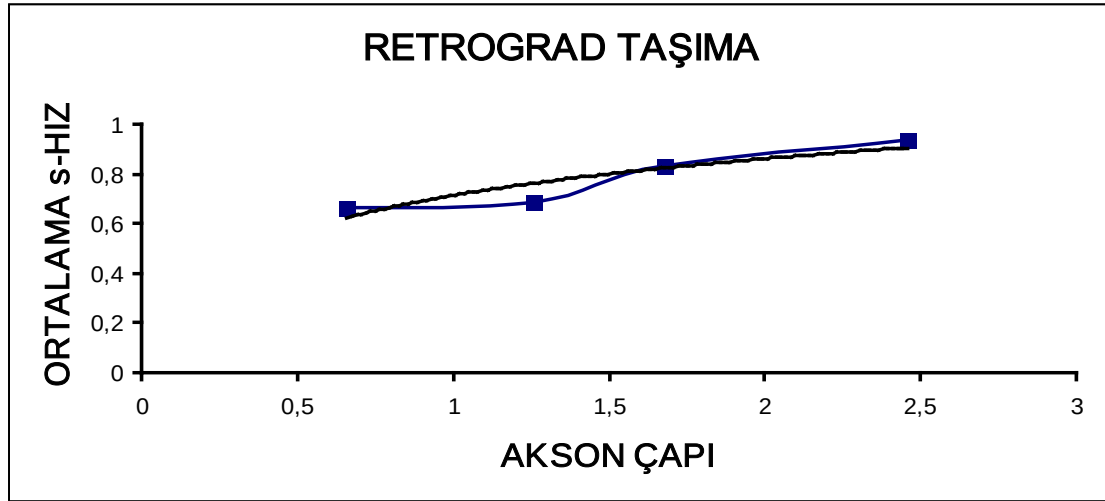
Ortalama hız ve morfolojik özellikler arasındaki korelasyon analizleri, kontrol şartlarında dalsız aksonlarda retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hızlarının, çekirdeğin hilusa uzaklığı ($r=0,18$; $p<0,01$), akson çapı arttıkça ($r=0,18$; $p<0,01$) ve gövde alanı arttıkça arttığı ($r=0,20$; $p<0,01$) tespit edildi. Bu korelasyon sonuçlarına ilişkin grafikler sırasıyla Şekil 4.10, 4.11, ve 4.12’de verilmiştir. Retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hızlarının akson çapının ($r=0,19$; $p<0,01$) (Şekil 4.13), gövde alanının ($r=0,22$; $p<0,01$) (Şekil 4.14), çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığının arttıkça arttığı ($r=0,19$; $p<0,01$) tespit edildi (Şekil 4.15). Dalsız aksonlarda anlamlı olan korelasyonlar Çizelge 4.2.’de özetlenmiştir. Kontrol şartlarında anterograd taşınan parçaların ortalama s-hız ile gövde alanı ($r=0,10$), akson kalınlığı ($r=0,01$) ve çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı ($r=0,08$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı tespit edildi. Anterograd taşınan parçaların ortalama d-hız ile gövde alanı ($r=0,15$), akson kalınlığı ($r=0,02$) ve çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı ($r=0,09$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı bulundu.

Çizelge 4.2. Proksimalinde dallanması olmayan aksonlarda taşıma hızları ile ilgili anlamlı korelasyonlar (+:artış, -:azalış).

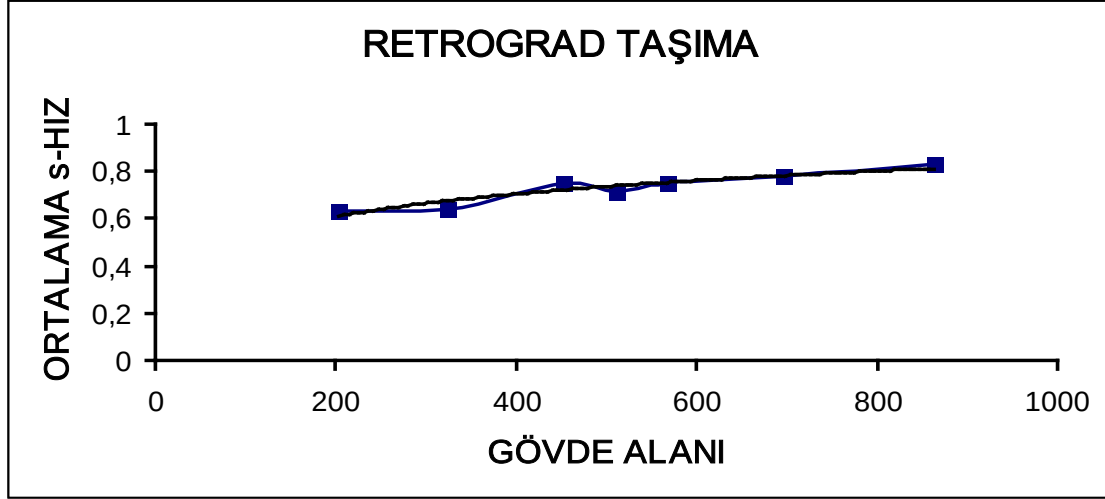
	Anterograd	Retrograd
Ort. s-hız	Yok	+ Gövde alanı + Akson çapı + Çekirdek-hiluks mesafesi
Ort. d-hız	Yok	+ Gövde alanı + Akson çapı + Çekirdek-hiluks mesafesi



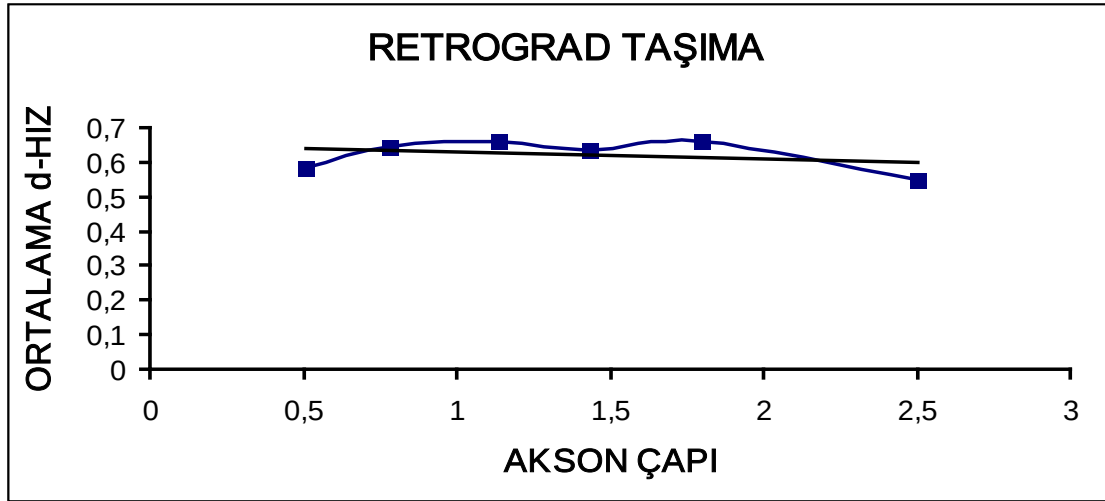
Şekil 4.10. Dalsız aksonlarda kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız (µm/sn.) / çekirdek uzaklığı (µm) korelasyon grafiği ($r=0,18$; $p<0,01$).



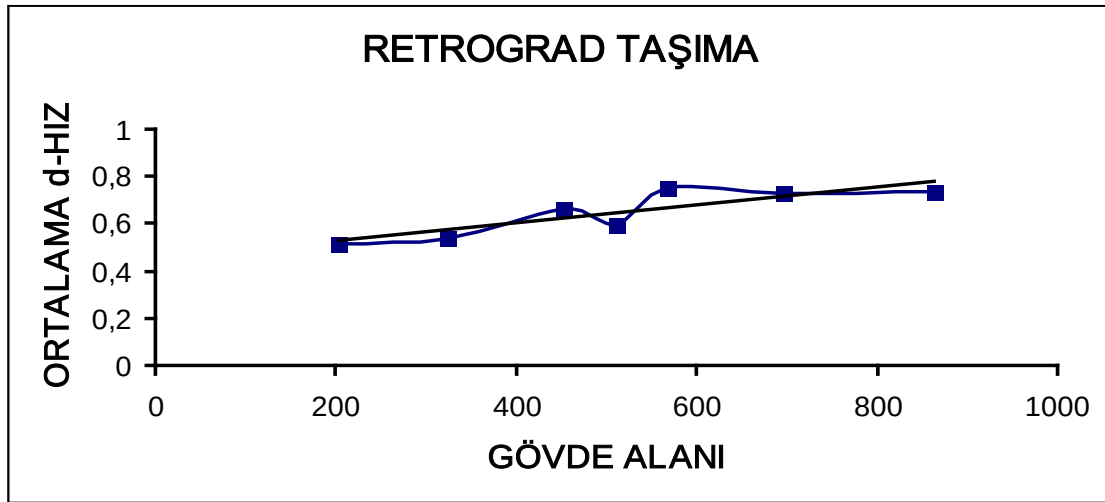
Şekil 4.11. Dalsız aksonlarda kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız (µm/sn.) / akson çapı korelasyon grafiği ($r=0,18$; $p<0,01$).



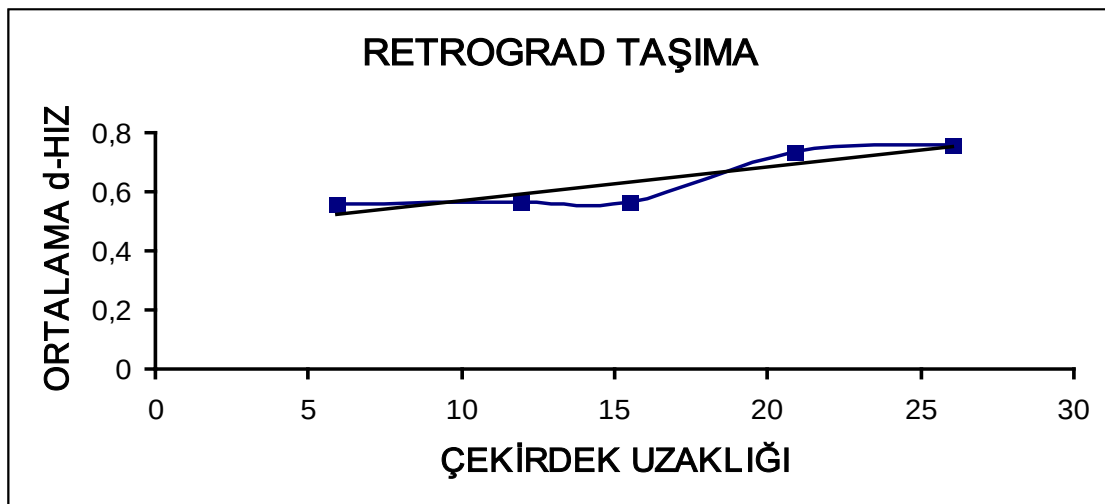
Şekil 4.12. Dalsız aksonlarda kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / gövde alanı (μm^2) korelasyon grafiği ($r=0,20$; $p<0,01$).



Şekil 4.13. Dalsız aksonlarda kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson çapı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,19$; $p<0,01$).



Şekil 4.14. Dalsız aksonlarda kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / gövde alanı (μm^2) korelasyon grafiği ($r=0,22$; $p<0,01$).



Şekil 4.15. Dalsız aksonlarda kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / çekirdek uzaklığı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,19$; $p<0,01$).

4.2.2. Kontrol şartlarında dallı aksonlarda taşıma

Kontrol şartlarında, komşu dalda anterograd ve retrograd olarak taşınan parçaların sayıları, ortalama s-hız ve d-hızlarına ait sonuçlar Çizelge 4.3’de gösterilmiştir. Burada da dalsız aksonlarda olduğu gibi, retrograd olarak taşınan parça sayısının anterogradlardan daha fazla olduğu gözlemlendi.

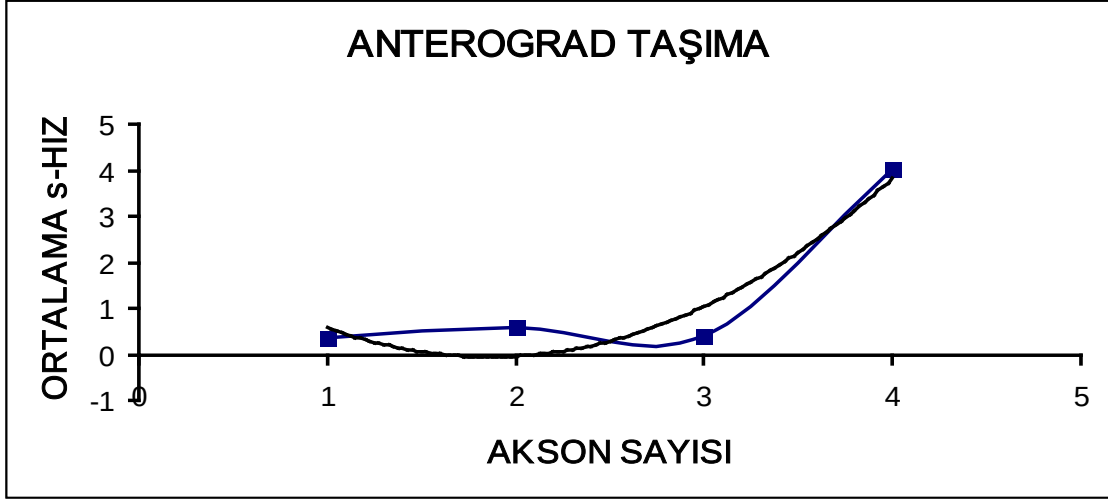
Çizelge 4.3. Kontrol şartlarında dallı aksonlarda aksonal taşıma değerleri.

	ANTEROGRAD Ort $\pm$ SH	N	RETROGRAD Ort. $\pm$ SH	N
Sayı (parça/dk.)	0,075 $\pm$ 0,01	10	0,75 $\pm$ 0,1	10
Ort. s-Hız (μ m/sn)	0,85 $\pm$ 0,4	9	0,63 $\pm$ 0,02	88
Ort. d-Hız (μ m/sn)	0,39 $\pm$ 0,07	9	0,52 $\pm$ 0,03	88

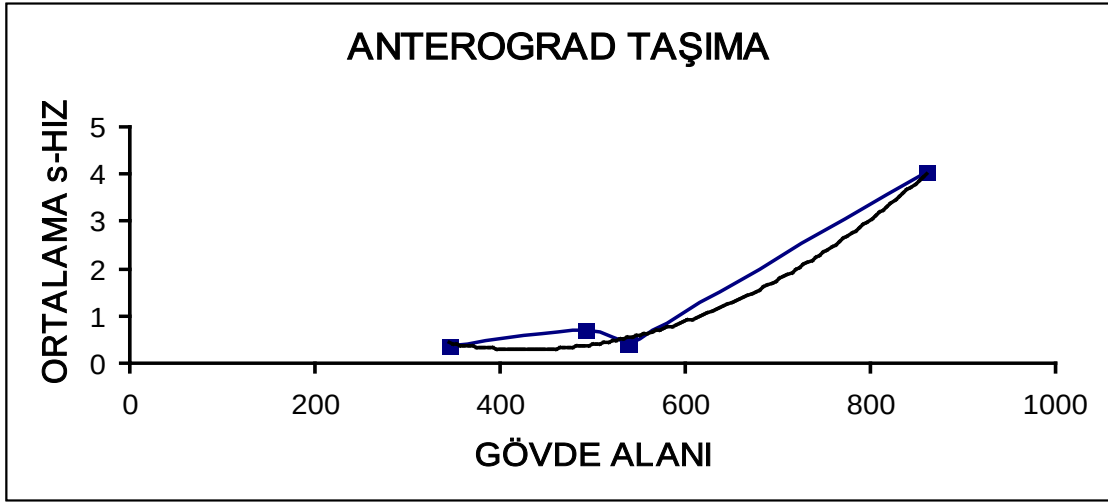
Korelasyon analizlerine göre; komşu dalın, kontrol şartlarında anterograd olarak taşınan parçalara ait ortalama s-hızlarının, nörondan çıkan toplam akson sayısı ($r=0,77$; $p<0,05$) (Şekil 4.16) ve nöron gövde alanı arttıkça ($r=0,88$; $p<0,01$) arttığı tespit edildi (Şekil 4.17). Komşu dalın kontrol şartlarında anterograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hızları akson çapı arttıkça ($r=-0,68$; $p<0,05$) azaldığı bulundu (Şekil 4.18). Korelasyon analizi sonuçları elde edilen veriler, komşu dalın kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hızlarının, akson çapı arttıkça ($r=0,21$; $p<0,05$) (Şekil 4.19) ve çekirdeğin hilusa uzaklığı arttıkça ($r=0,40$; $p<0,01$) arttığını gösterdi (Şekil 4.20). Aynı şartlarda retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hızlarının nörondan çıkan toplam akson sayısı arttıkça ($r=-0,35$; $p<0,01$) azaldığı (Şekil 4.21), buna rağmen ortalama d-hızın akson çapı arttıkça ($r=0,22$; $p<0,05$) arttığı bulundu (Şekil 4.22). Ayrıca retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hızlarının çekirdeğin hilusa olan uzaklığı arttıkça da ($r=0,41$; $p<0,05$) arttığı bulundu (Şekil 4.23). Dallanan aksonların anlamlı çıkan korelasyonları Çizelge 4.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Kontrol şartlarında, dallanma distalinde aksonal taşıma hızları ile ilgili anlamlı korelasyonlar (+:artış, -:azalış).

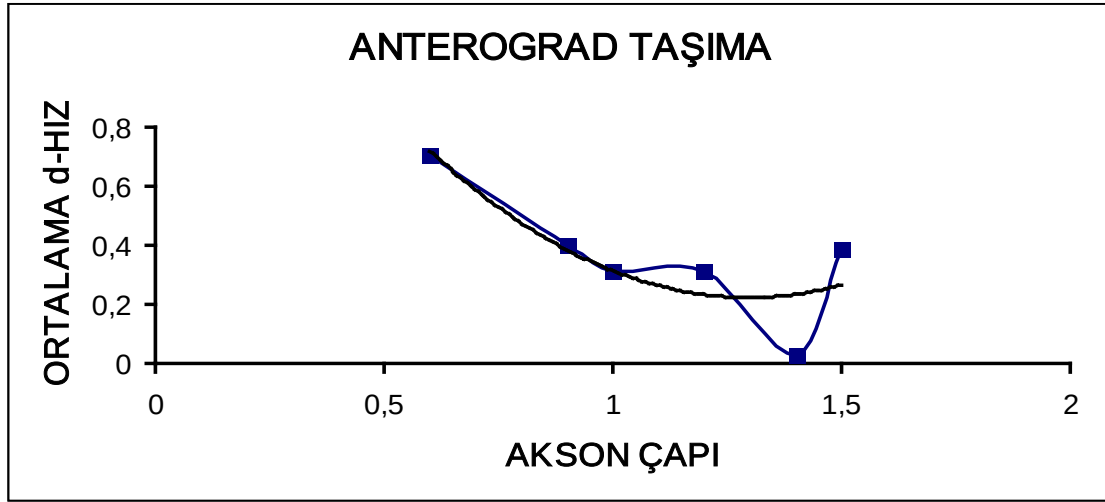
	Anterograd	Retrograd
Ort. s-hız	+ Toplam akson sayısı + Gövde alanı	+ Akson çapı + Çekirdek-hiluks mesafesi
Ort. d-hız	- Akson çapı	- Akson sayısı + Akson çapı + Çekirdek-hiluks mesafesi



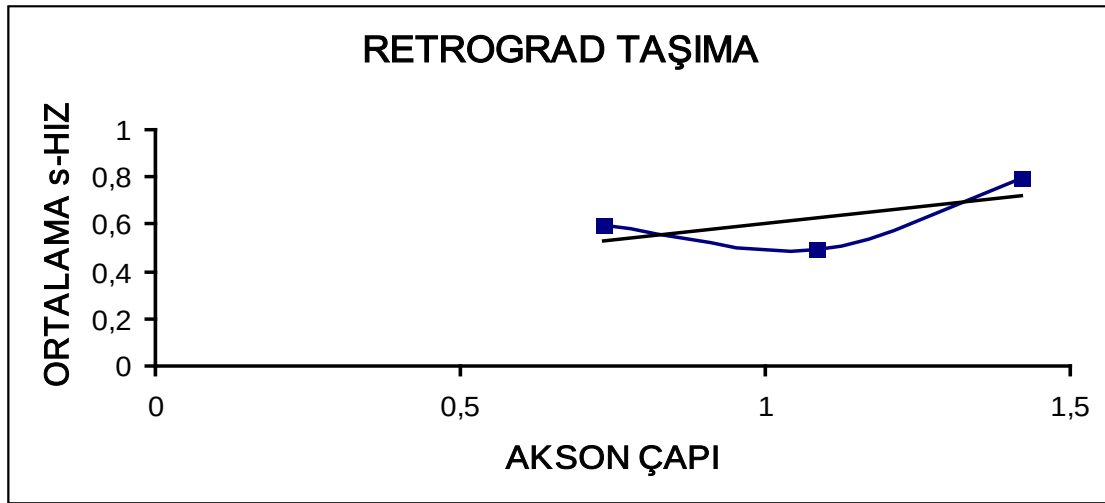
Şekil 4.16. Dallı aksonlarda kontrol şartlarında anterograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson sayısı korelasyon grafiği ($r=0,77$; $p<0,01$).



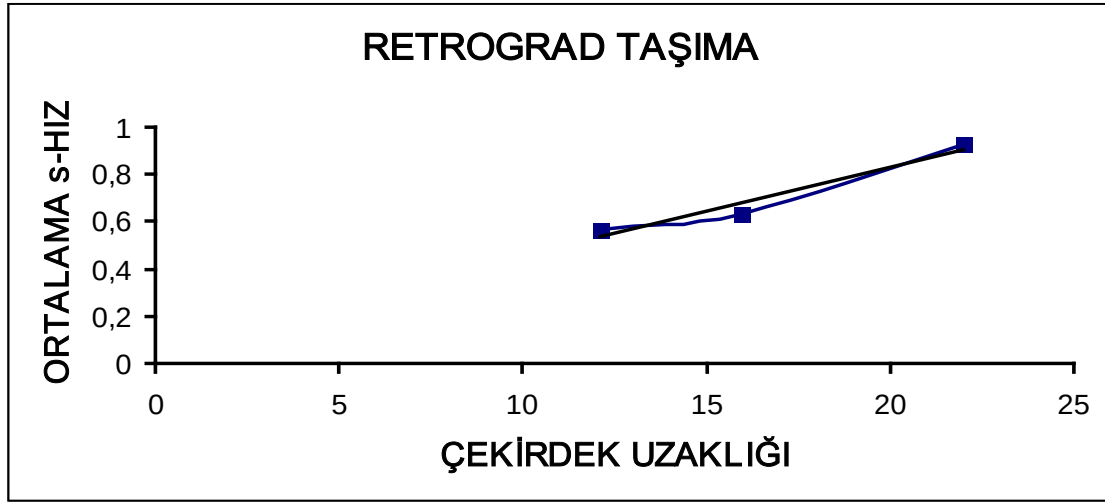
Şekil 4.17. Dallı aksonlarda kontrol şartlarında anterograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / gövde alanı (μm^2) korelasyon grafiği ($r=0,88$; $p<0,01$).



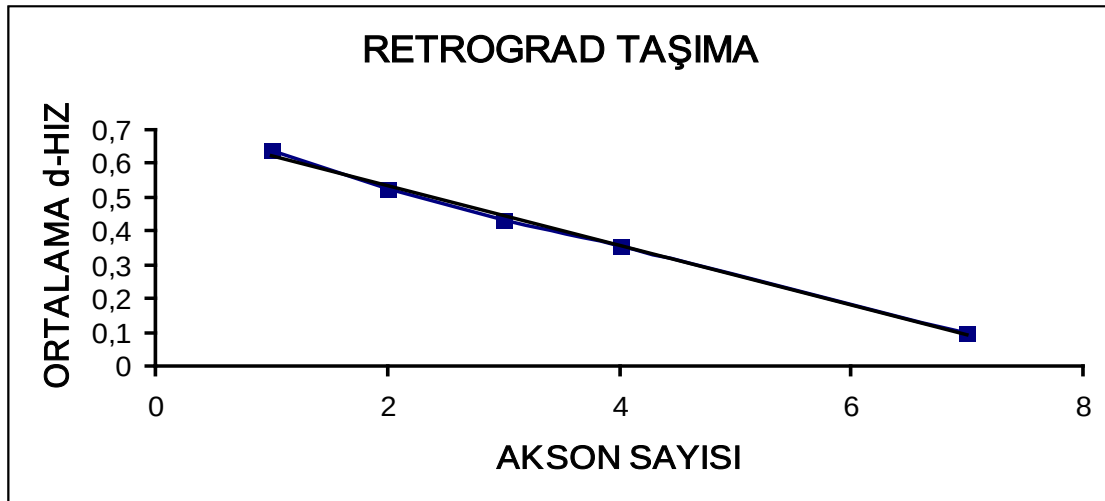
Şekil 4.18. Dallı aksonlarda kontrol şartlarında anterograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson çapı (μm) korelasyon grafiği ($r=-0,68$; $p<0,05$).



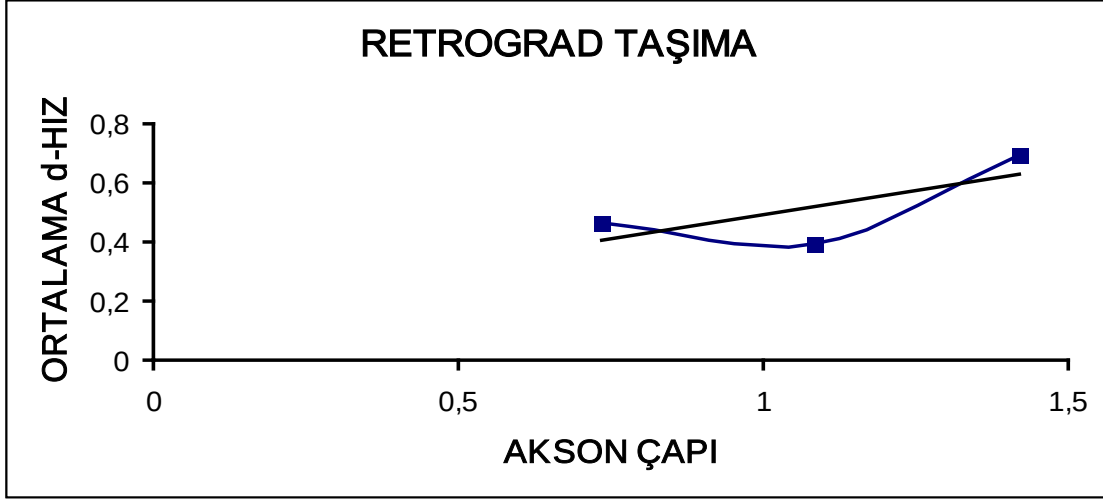
Şekil 4.19. Dallı aksonlarda kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson çapı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,21$; $p<0,05$).



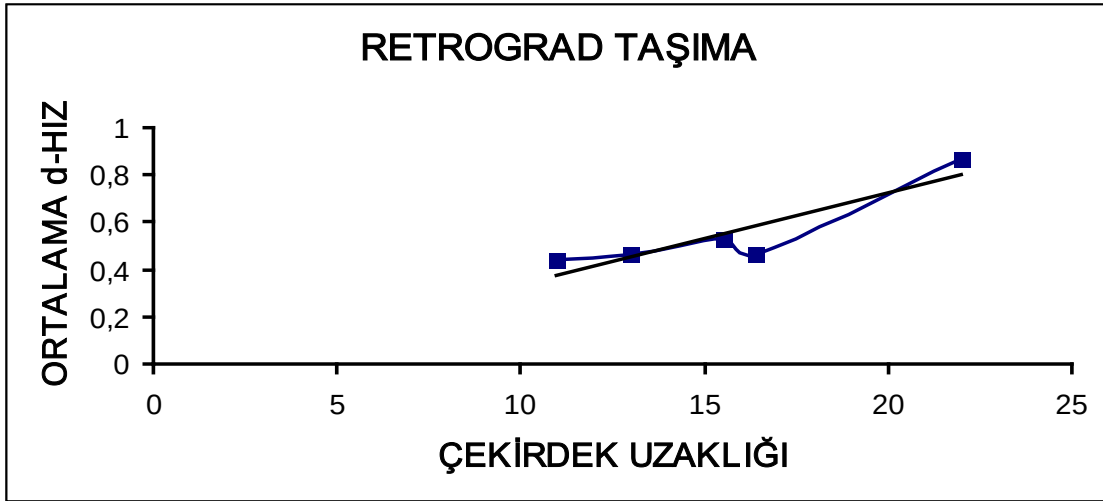
Şekil 4.20. Dallı aksonlarda kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / çekirdek uzaklığı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,40$; $p<0,01$).



Şekil 4.21. Dallı aksonlarda kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson sayısı korelasyon grafiği ($r=-0,35$; $p<0,01$).



Şekil 4.22. Dallı aksonlarda kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / akson çapı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,22$; $p<0,05$).



Şekil 4.23. Dallı aksonlarda kontrol şartlarında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn.}$) / çekirdek uzaklığı (μm) korelasyon grafiği ($r=0,41$; $p<0,05$).

Komşu dalın kontrol şartlarında anterograd olarak taşınan parçalara ait ortalama s-hız ile akson dal sayısı ($r=-0,44$), akson kalınlığı ($r=0,04$) ve çekirdeğin akson hilusuna uzaklığı ($r=0,19$) arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişki bulunamadı. Ortalama d-hız ile toplam akson sayısı ($r=0,008$), gövde alanı ($r=-0,07$), çekirdeğin akson hilusuna uzaklığı ($r=0,56$) arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı tespit edildi. Retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s hızı ile toplam akson sayısı ($r=-0,20$), akson dal sayısı ($r=-0,07$) ve gövde alanı ($r=0,14$) arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı

bulundu. Ayrıca ortalama d hız ile akson dal sayısı ($r=-0,03$) ve gövde alanı ($r=0,13$) arasında da anlamlı bir ilişkiye rastlanmadı.

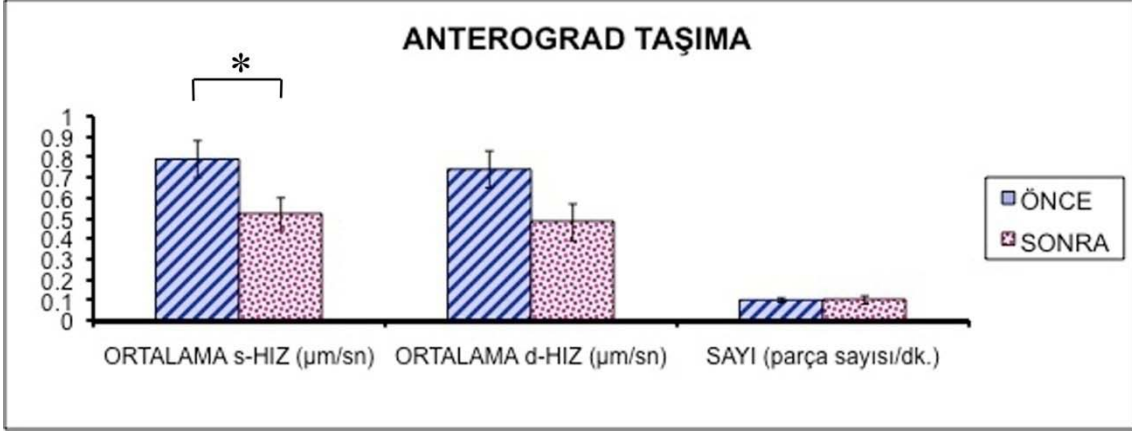
4.3. Aksotominin aksonal taşımaya etkisi

4.3.1. Dalsız aksonlarda taşıma

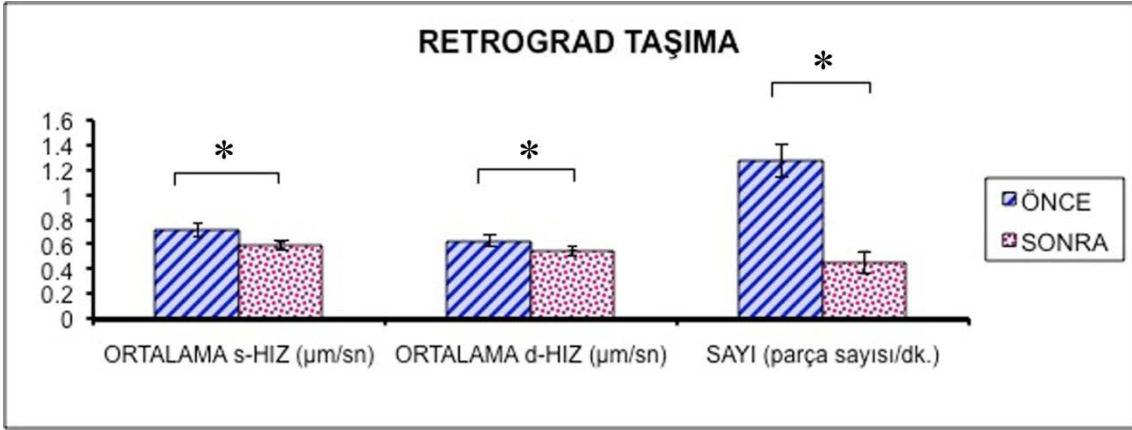
Aksonu dallanmayan nöronların aksotomi sonrasında öncesine göre, anterograd olarak taşınan parçaların sayıları anlamlı derecede değişmezken, ortalama s-hızlarının anlamlı derecede azaldığı ($p<0,05$) ve ortalama d-hızlarında herhangi bir değişimin meydana gelmediği bulundu. (Çizelge 4.5; Şekil 4.24). Aynı tip nöronlarda kesim öncesine göre, kesim sonrasında retrograd taşınan parçaların sayılarının, ortalama s-hız ve d-hızlarının anlamlı derecede azaldığı ($p<0,01$) belirlendi. (Çizelge 4.5; Şekil 4.25). Aksotomi sonrası ortalama hızların, aksotomi öncesi ortalama hızlara oranlanması ile her durum için hız değişim oranları elde edildi ve bunlar karşılaştırıldı (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası aksonal taşıma değerleri.

	ANTEROGAD Ort $\pm$ SH	N	RETROGRAD Ort. $\pm$ SH	n
Sayı (parça/dk.)	0,1 $\pm$ 0,02	28	0,45 $\pm$ 0,09	28
Ort. s-Hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$)	0,52 $\pm$ 0,08	33	0,59 $\pm$ 0,02	148
Ort. d-Hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$)	0,48 $\pm$ 0,09	33	0, 53 $\pm$ 0,02	148
s-Hız değişim oranı	1,42 $\pm$ 0,41	12	0,80 $\pm$ 0,057	25
d-Hız değişim oranı	1,58 $\pm$ 0,63	12	0,84 $\pm$ 0,065	25

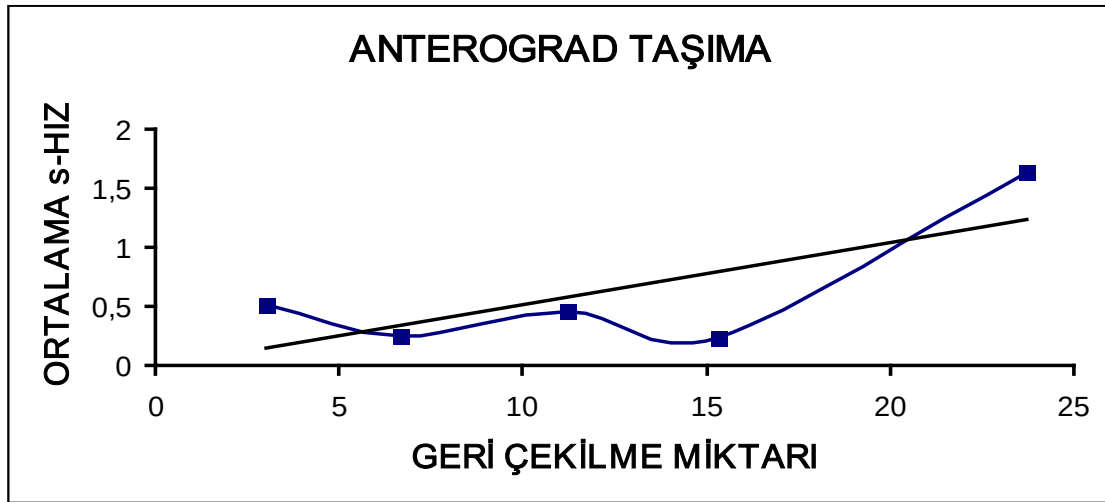


Şekil 4.24. Dalsız aksonlarda aksotomi öncesi ve sonrası anterograd aksonal taşıma değerleri (*: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. $p<0,05$).

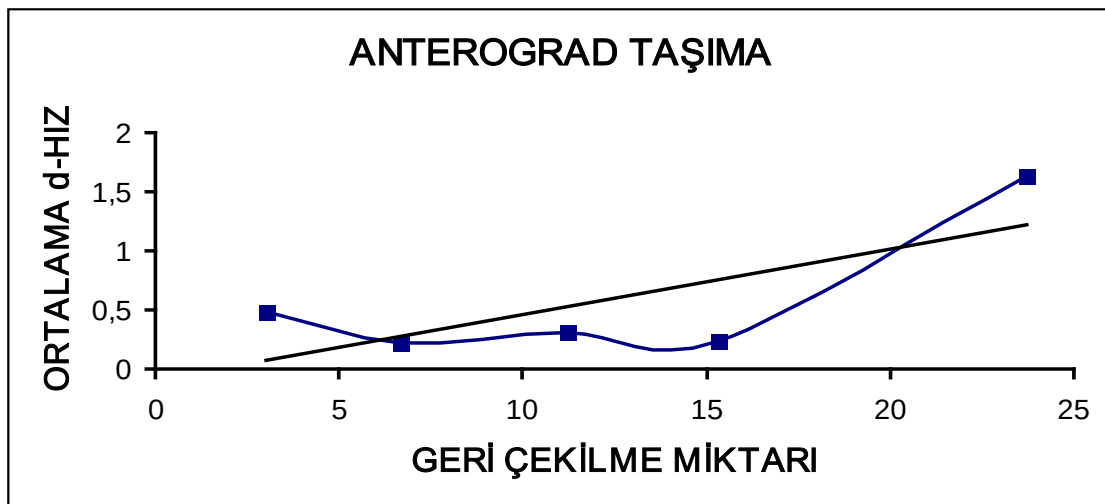


Şekil 4.25. Dalsız aksonlarda aksotomi öncesi ve sonrası retrograd aksonal taşıma değerleri (*: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. $p<0,01$).

Taşınan parçaların ortalama hızı ve nöron morfolojisiyle ilişkileri ortaya koyan korelasyon analiz sonuçları anterograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ve d-hızlarının, aksotomi sonrasında geri çekilme miktarı arttıkça ($r=0,46$; $p<0,01$), arttığı tespit edildi. Bu korelasyona ilişkin grafik Şekil 4.26 ve 4.27’de gösterildi. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası ortaya çıkan anlamlı korelasyonlar Çizelge 4.6.’da gösterildi.



Şekil 4.26. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası anterograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,46$; $p<0,01$).



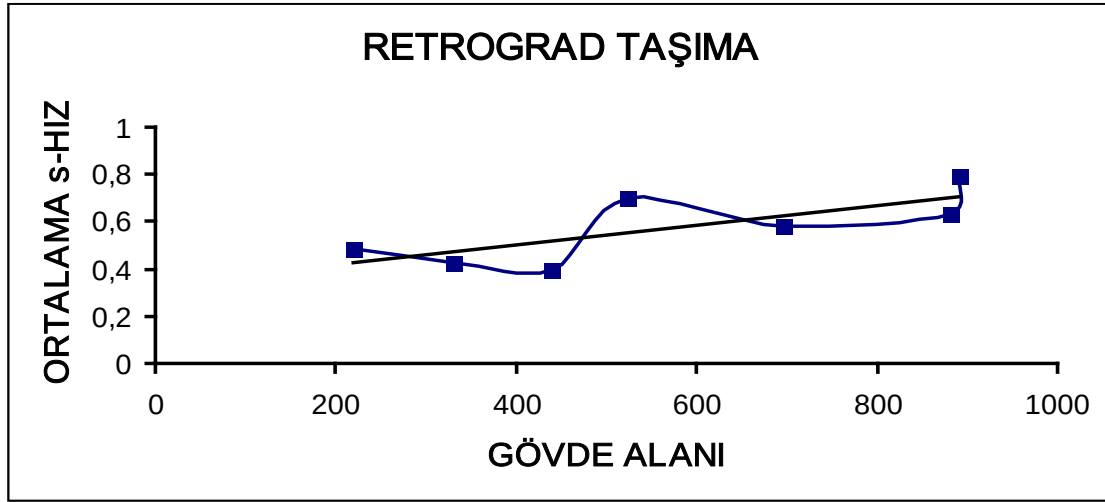
Şekil 4.27. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası anterograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) ve geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,46$; $p<0,01$).

Aksotomi sonrasında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hızlarının aksotomi öncesinde olduğu gibi gövde alanı arttıkça ($r=0,34$; $p<0,01$) arttığı tespit edildi (Şekil 4.28). Bunlarla birlikte, aksotomi öncesi ve sonrasında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hızlarının çekirdeğin hilusa uzaklığı arttıkça ($r=0,29$; $p<0,01$) (Şekil 4.29) ve akson çapı arttıkça ($r=0,28$; $p<0,01$) arttığı belirlendi (Şekil 4.30). Retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hızları, aksotomi sonrasında geri çekilme miktarı arttıkça ($r=0,21$; $p<0,01$) arttığı tespit edildi (Şekil 4.31). Diğer taraftan

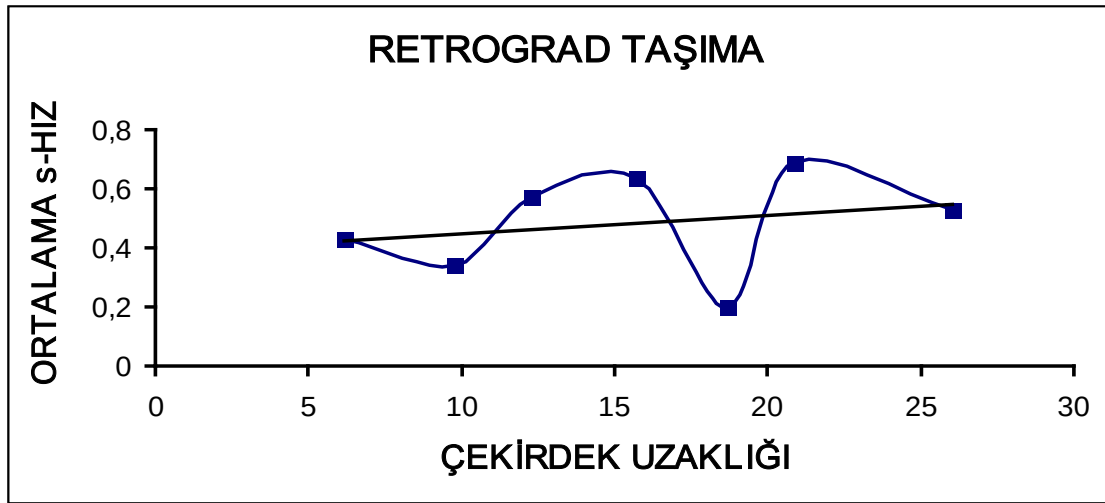
aksotomi mesafesi arttıkça ($r=-0,20$; $p<0,05$) retrograd taşınan parçaların ortalama s-hızlarının azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.32). Aksotomi sonrasında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hızlarının, çekirdeğin hilusa uzaklığı arttıkça ($r=0,29$; $p<0,01$) arttığı tespit edildi (Şekil 4.33). Ayrıca aksotomi öncesindeki duruma benzer olarak, aksotomi sonrasında da retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hızlarının, gövde alanı arttıkça ($r=0,33$; $p<0,01$) arttığı (Şekil 4.34) ve akson çapı arttıkça ($r=0,27$; $p<0,01$) arttığı bulundu (Şekil 4.35). Retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hızlarının ise, aksotomi sonrasında geri çekilme miktarı arttıkça ($r=0,29$; $p<0,01$) arttığı (Şekil 4.36), bununla birlikte aksotomi mesafesi arttıkça ($r=-0,21$; $p<0,01$) azaldığı belirlendi (Şekil 4.37). Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası ortaya çıkan anlamlı korelasyonlar Çizelge 4.6.' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. Aksotomi sonrası dalsız aksonlarda aksonal taşıma hızları ile ilgili anlamlı korelasyonlar (+:artış; -:azalış).

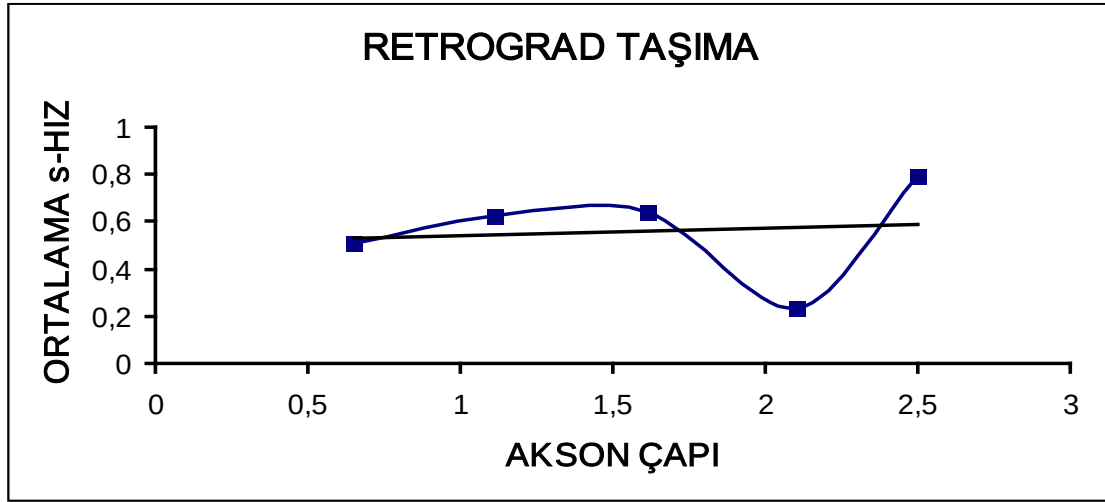
	Anterograd	Retrograd
Ort. s-hız	+ Geri çekilme miktarı	+ Akson çapı + Çekirdek-hiluks mesafesi + Gövde alanı - Aksotomi mesafesi
Ort. d-hız	+ Geri çekilme miktarı	+ Gövde alanı + Akson çapı + Çekirdek-hiluks mesafesi + Geri çekilme miktarı + Aksotomi mesafesi



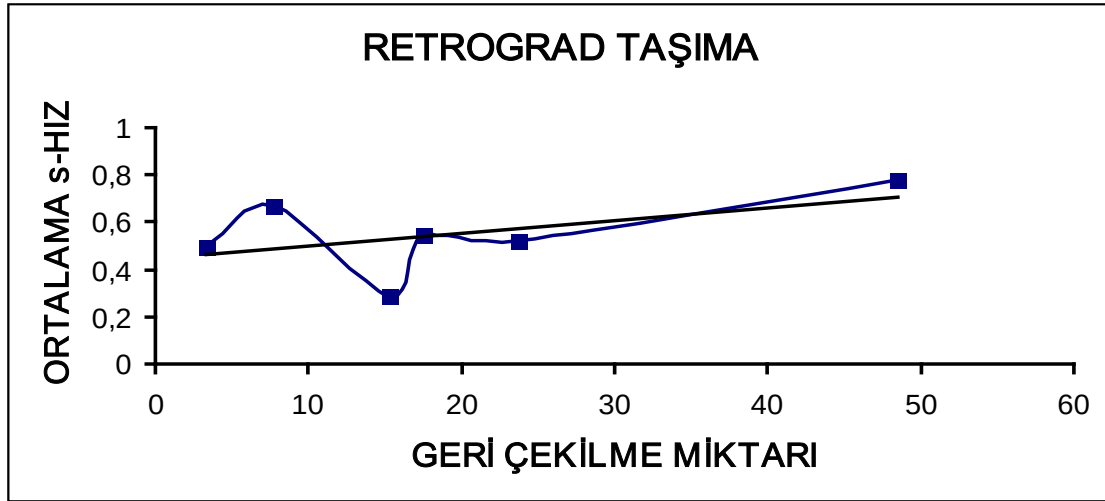
Şekil 4.28. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız (µm/sn) ve gövde alanı (µm²) arasındaki korelasyon grafiği (r=0,34; p<0,01).



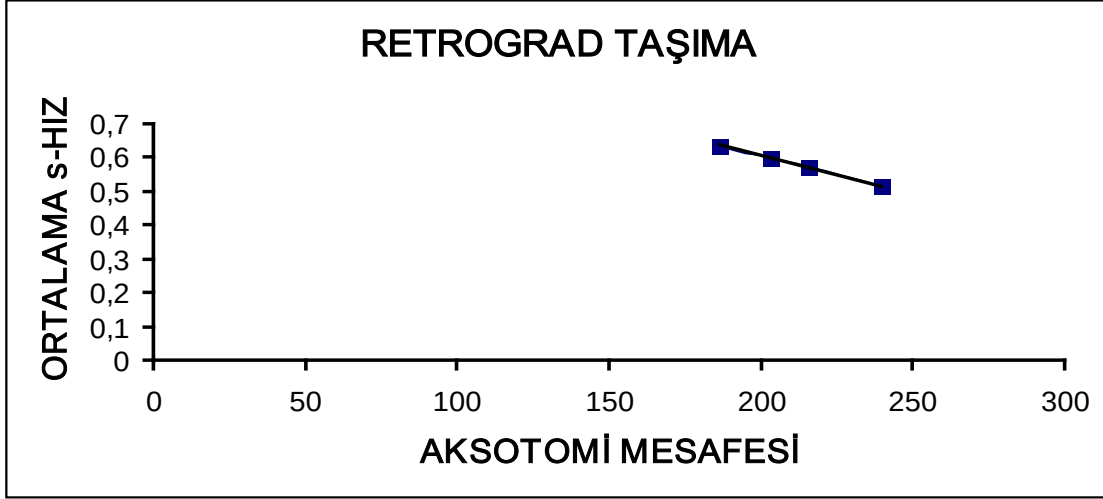
Şekil 4.29. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız (µm/sn) / çekirdeğin hilusa olan uzaklığı (µm) arasındaki korelasyon grafiği (r=0,29; p<0,01).



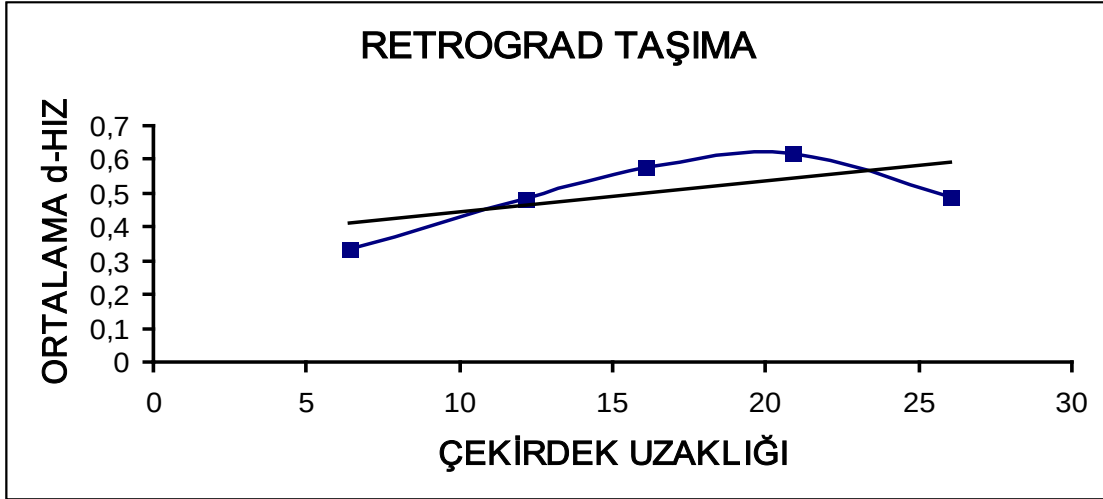
Şekil 4.30. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson çapı arasındaki (μm) korelasyon grafiği ($r=0,28$; $p<0,01$).



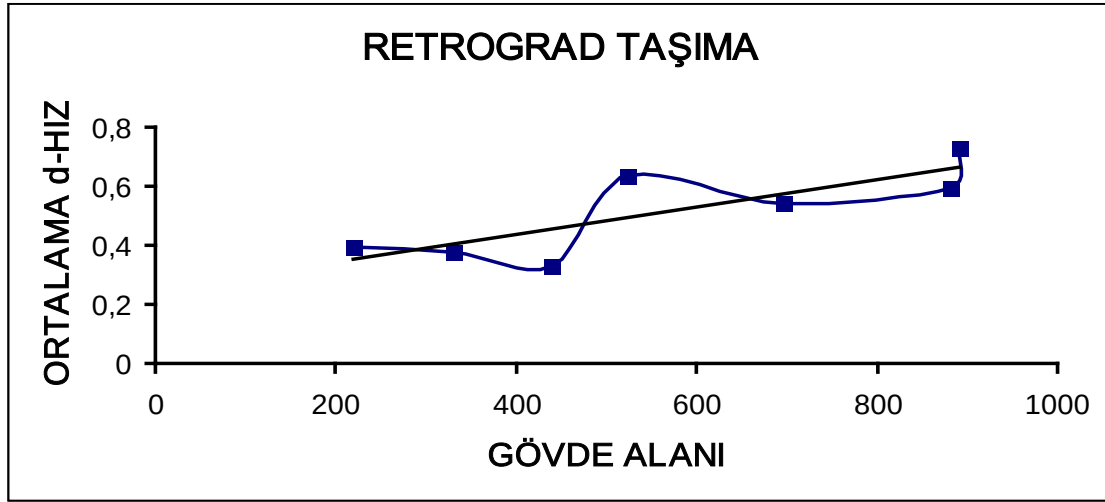
Şekil 4.31. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) ve geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,21$; $p<0,01$).



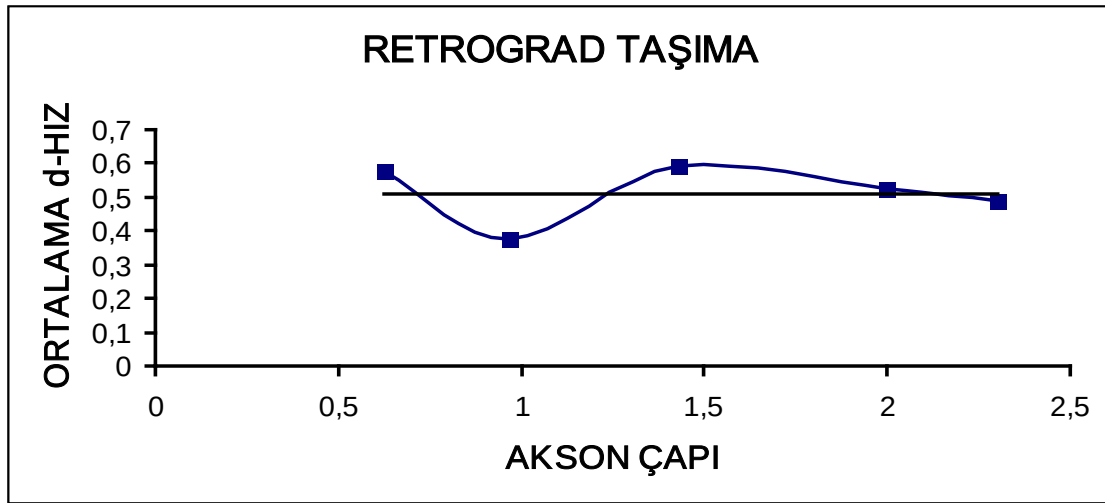
Şekil 4.32. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / aksotomi mesafesi (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=-0,20$; $p<0,05$).



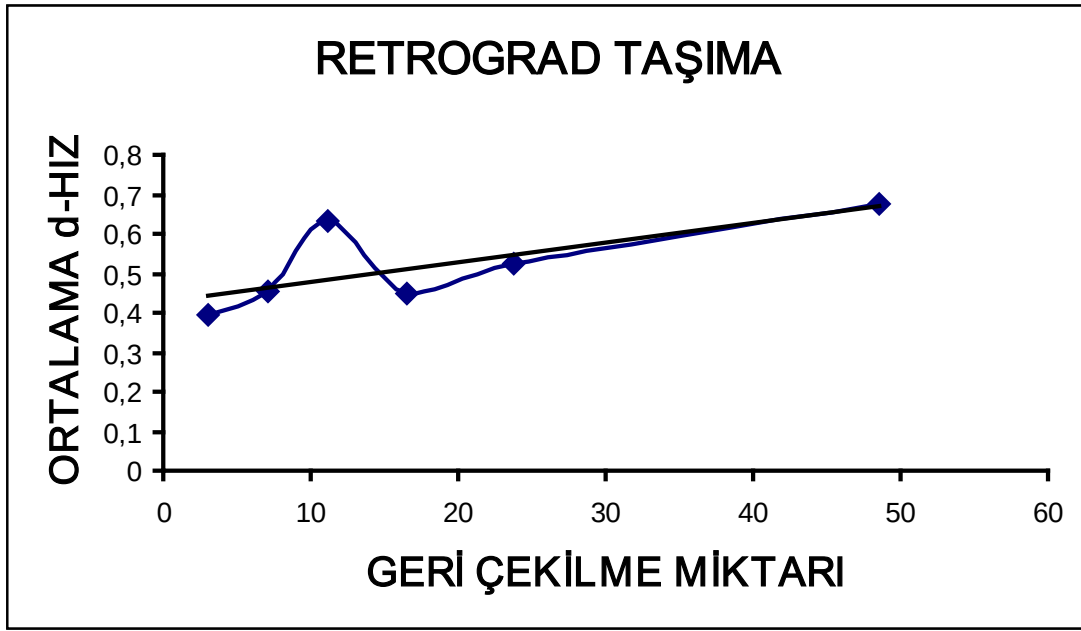
Şekil 4.33. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / çekirdeğin hilusa uzaklığı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,29$; $p<0,01$).



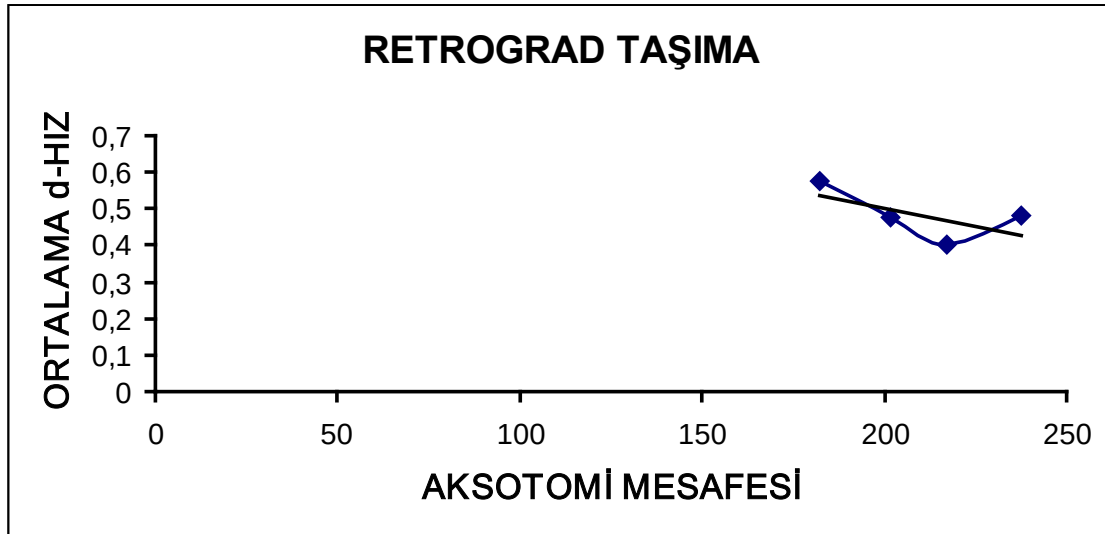
Şekil 4.34. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / gövde alanı (μm^2) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,33$; $p<0,01$).



Şekil 4.35. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson çapı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,27$; $p<0,01$).



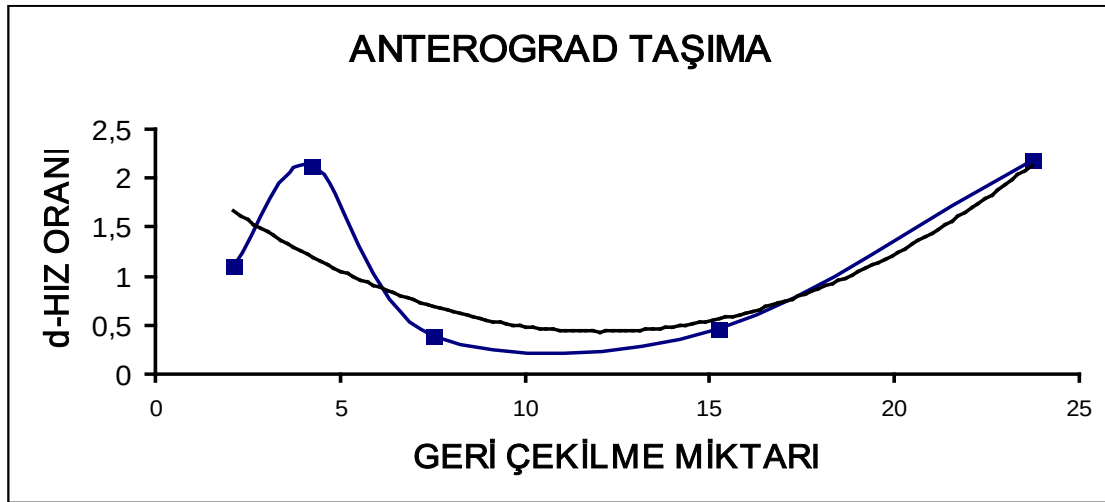
Şekil 4.36. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,29$; $p<0,01$).



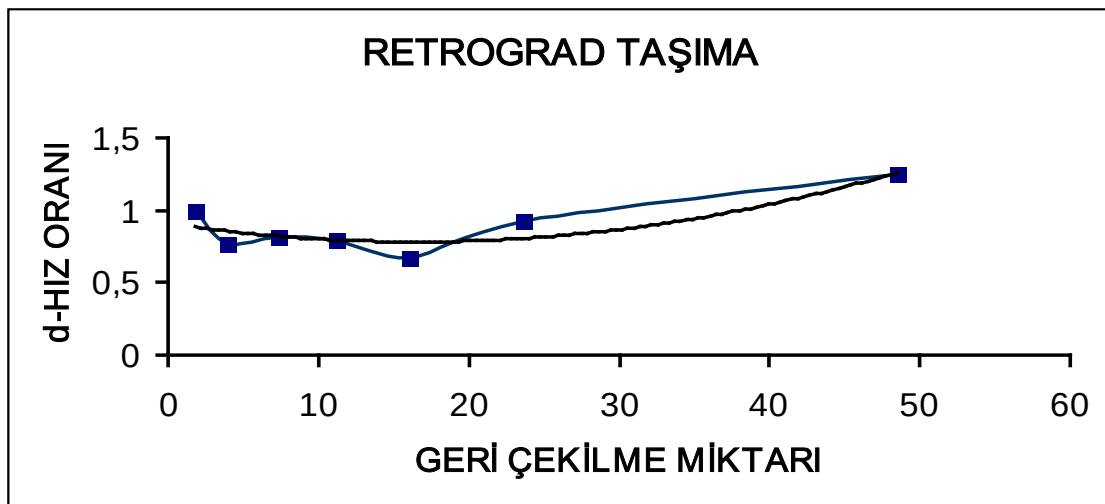
Şekil 4.37. Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) ve aksotomi mesafesi (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=-0,21$; $p<0,01$).

Dalsız aksonlarda aksotomi sonrası anterograd olarak taşınan parçaların ortalama s hızları ile gövde alanı ($r=0,24$), akson kalınlığı ($r=0,02$), çekirdek uzaklığı ($r=-0,16$) ve aksotomi mesafesi ($r=0,25$) arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir ilişkiye rastlanmadı.

Anterograd ve retrograd olarak taşınan parçaların aksotomi sonrası sahip oldukları ortalama hızın, aksotomi öncesi sahip oldukları ortalama hıza bölünmesi sonucu elde edilen hız değişim oranlarıyla morfolojik özellikler arasında korelasyon analizi yapıldı. Korelasyon analizi sonuçlarına göre, aksonu dallanmayan nöronlarda anterograd olarak sürekli taşınan parçaların s-hız değişim oranı ile gövde alanı ($r=-0,07$), geri çekilme miktarı ($r=0,04$), akson kalınlığı ($r=-0,22$), çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı ($r=-0,12$) ve aksotomi mesafesi arasında ($r=0,02$) anlamlı bir ilişkinin bulunmadığı tespit edildi. Bununla birlikte anterograd olarak d-hız değişim oranının, geri çekilme miktarının artışı ile arttığı ($r=0,42$; $p<0,05$) bulundu (Şekil 4.38). Bu da bize geri çekilme miktarındaki artışın, duraksamalı taşımada parçacığın bekleme sürelerini azalttığını böylece aksonal taşıma hızının aksotomi sonrası korunduğunu göstermektedir. Anterograd olarak duraksamalı taşınan parçaların d hız değişim oranı ile gövde alanı ($r=0,003$), akson kalınlığı ($r=0,012$), çekirdeğin akson hilusuna uzaklığı ($r=-0,07$) ve aksotomi mesafesi ($r=-0,11$) arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Aynı tip nöronlarda, retrograd olarak sürekli taşınan parçaların s-hız değişim oranları ile gövde alanı ($r=-0,07$), akson kalınlığı ($r=-0,22$), çekirdeğin akson hilusuna uzaklığı ($r=-0,13$), geri çekilme miktarı ($r=0,03$) ve aksotomi mesafesi ($r=-0,01$) arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı tespit edildi. Fakat anterograd taşımada olduğu gibi retrograd olarak taşınan parçaların, d-hız değişim oranları geri çekilme miktarındaki artışla daha fazla korunduğu belirlendi ($r=0,41$; $p<0,05$) (Şekil 4.39). Duraksamalı olarak retrograd hareket eden parçaların d-hız değişim oranı ile gövde alanı ($r=0,003$), akson kalınlığı ($r=0,01$), çekirdeğin akson hilusuna uzaklığı ($r=-0,07$) ve aksotomi mesafesi ($r=-0,11$) arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.



Şekil 4.38. Dalsız aksonlarda anterograd olarak taşınan parçaların d-hız değişim oranı / geri çekilme miktarı (μm) ile korelasyonunu gösteren grafik ($r=0,42$; $p<0,05$).



Şekil 4.39. Dalsız aksonlarda retrograd olarak taşınan parçaların d-hız değişim oranı / geri çekilme miktarı (μm) ile korelasyonunu gösteren grafik ($r=0,41$; $p<0,05$).

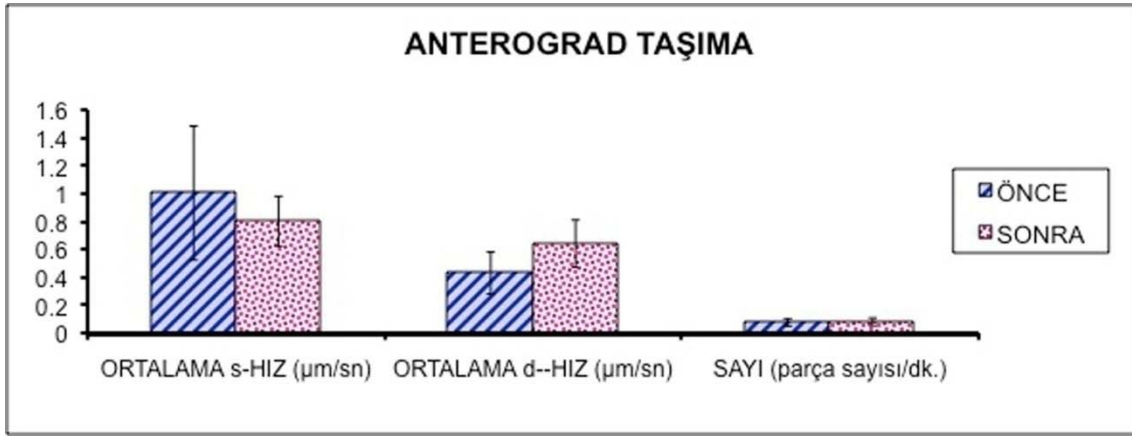
4.3.2. Dallı aksonlarda taşıma

Aksonu dallı olan nöronlarda, aksotomi sonrasında, aksotomi öncesine göre taşınan parçaların sayıları anlamlı derecede değişmezken, bu tip nöronlarda anterograd ve retrograd olarak taşınan parçaların, ortalama s-hız ve d-hızların komşu dallarının aksotomisinden etkilenmediği saptandı (Çizelge 4.7), (Şekil 4.40 ve 4.41). Ayrıca

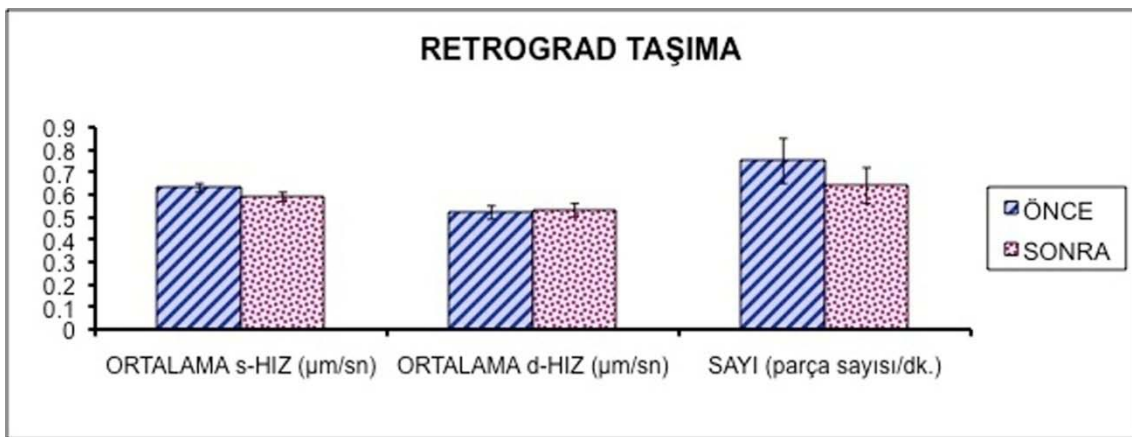
aksotomi sonrası ortalama hızların, aksotomi öncesi ortalama hızlara bölünmesiyle her durum için hız değişim oranları elde edildi (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. Dallı aksonlarda aksotomi sonrası aksonal taşıma değerleri

	ANTEROGRAĐ	N	RETROGRAĐ	N
	Ort $\pm$ SH		Ort. $\pm$ SH	
Sayı (parça/dk.)	0,083 $\pm$ 0,02	10	0,64 $\pm$ 0,08	10
Ort. s-Hız (μ m/sn)	0,49 $\pm$ 0,04	10	0,59 $\pm$ 0,02	75
Ort. d-Hız (μ m/sn)	0,45 $\pm$ 0,05	10	0,53 $\pm$ 0,03	75
s-Hız değişim oranı	1,22 $\pm$ 0,16	4	0,85 $\pm$ 0,06	10
d-Hız değişim oranı	5,63 $\pm$ 4,48	4	1,17 $\pm$ 0,29	10



Şekil 4.40. Dallı aksonlarda aksotomi öncesi ve sonrası anterograd aksonal taşıma değerleri.



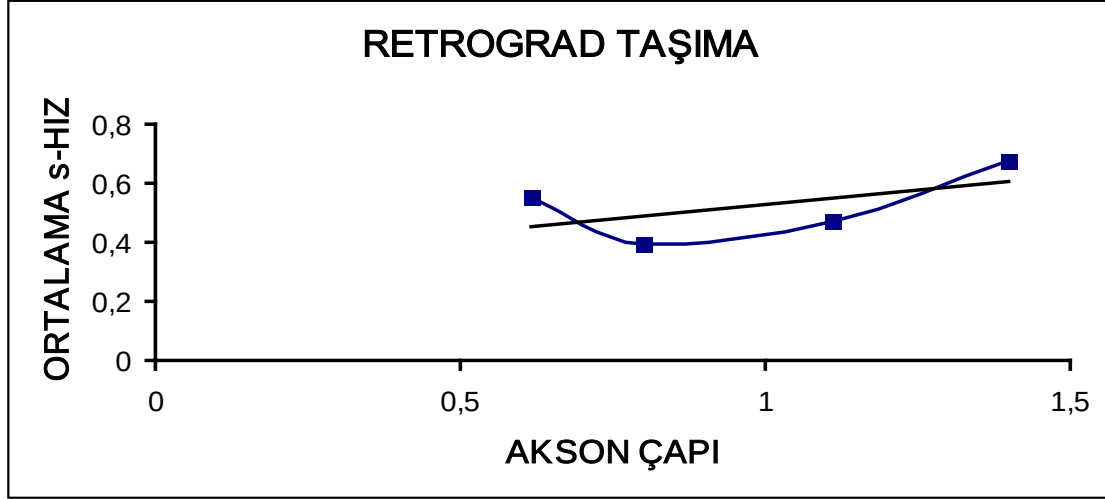
Şekil 4.41. Dallı aksonlarda aksotomi öncesi ve sonrası retrograd aksonal taşıma değerleri.

Korelasyon analizi sonuçları, komşu dalı aksotomi yapılan nöronlarda aksotomi sonrasında, öncesinde olduğu gibi, retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hızları, akson çapı arttıkça ($r=0,27$; $p<0,05$) (Şekil 4.42) ve çekirdeğin hilusa uzaklığı arttıkça ($r=0,24$; $p<0,01$) arttığı belirlendi (Şekil 4.43). Ayrıca aksotomi sonrasında, öncesinden farklı olarak, retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hızları gövdeden çıkan toplam akson sayısı arttıkça ($r=-0,29$; $p<0,01$) azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.44). Komşu dalı aksotomi yapılan nöronlarda, aksotomi öncesindeki benzer şekilde, aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hızlarının, nörondan çıkan toplam akson sayısı arttıkça azaldığı ($r=-0,39$; $p<0,01$) (Şekil 4.45) ve akson çapı arttıkça arttığı bulundu ($r=0,32$; $p<0,01$) (Şekil 4.46). Ayrıca ortalama d-hızın çekirdeğin hilusa olan uzaklığı arttıkça ($r=0,27$; $p<0,05$) arttığı gözlemlendi (Şekil 4.47). Komşu dalı aksotomi yapılan aksonlarda taşınan parçalarla ilişkili olan morfolojik özellikler Çizelge 4.8’de verilmiştir.

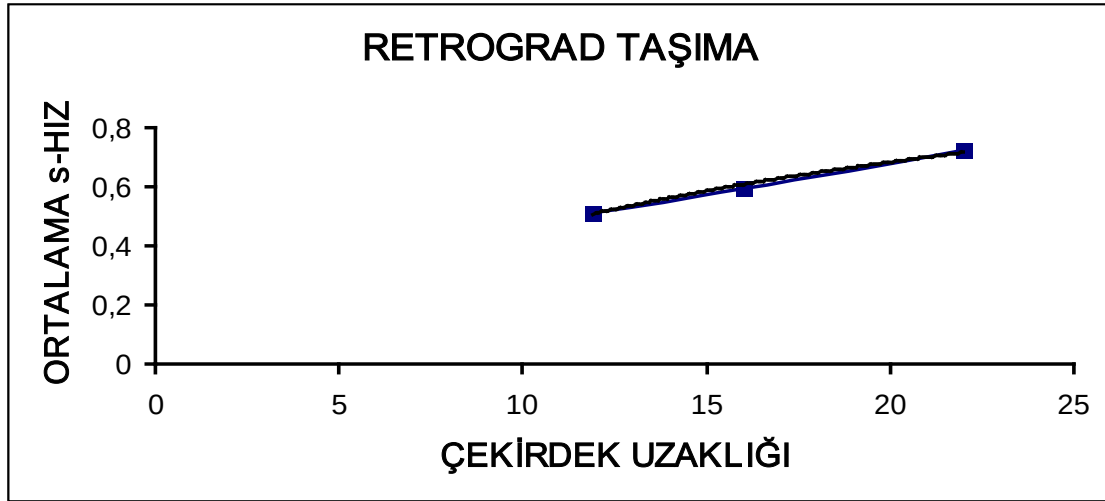
Taşınan parçaların ortalama hız ve nöron morfolojileriyle aralarındaki ilişkileri ortaya koyan korelasyon analizlerine göre; komşu dalı aksotomi yapılan nöronlarda aksotomi sonrası anterograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hızı ile toplam akson sayısı ($r=0,38$), aksondaki dal sayısı ($r=-0,17$), gövde alanı ($r=-0,12$), geri çekilme miktarı ($r=0,51$), akson kalınlığı ($r=-0,20$), çekirdeğin akson hilusuna uzaklığı ($r=-0,50$), ve aksotomi mesafesi ($r=-0,32$) arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı. Ortalama d-hız ile toplam akson sayısı ($r=-0,21$), aksondaki dal sayısı ($r=-0,06$), gövde alanı ($r=0,002$), aksonun geri çekilme miktarı ($r=0,57$), akson kalınlığı ($r=0,11$), çekirdeğin akson hilusuna uzaklığı ($r=-0,32$) ve aksotomi mesafesi ($r=-0,18$) arasında da anlamlı bir ilişki tespit edilmedi.

Çizelge 4.8. Aksotomi sonrası dallı aksonlarda aksonal taşıma hızları ile ilgili anlamlı korelasyonlar (+:artış, -:azalış).

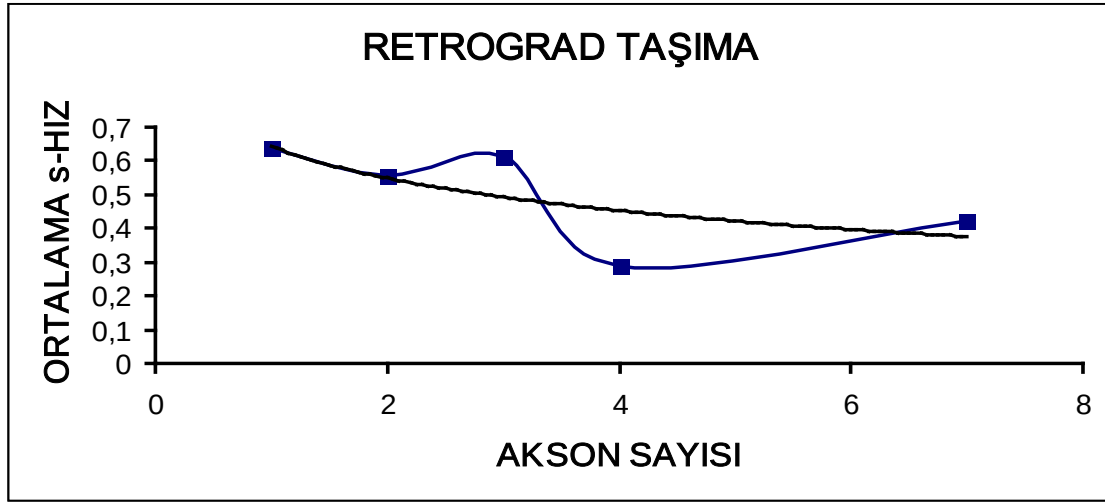
	Anterograd	Retrograd
Ort. s-hız	Yok	+ Akson çapı + Çekirdek-hiluks mesafesi + Toplam akson sayısı
Ort. d-hız	Yok	+ Toplam akson sayısı + Akson çapı + Çekirdek-hiluks mesafesi



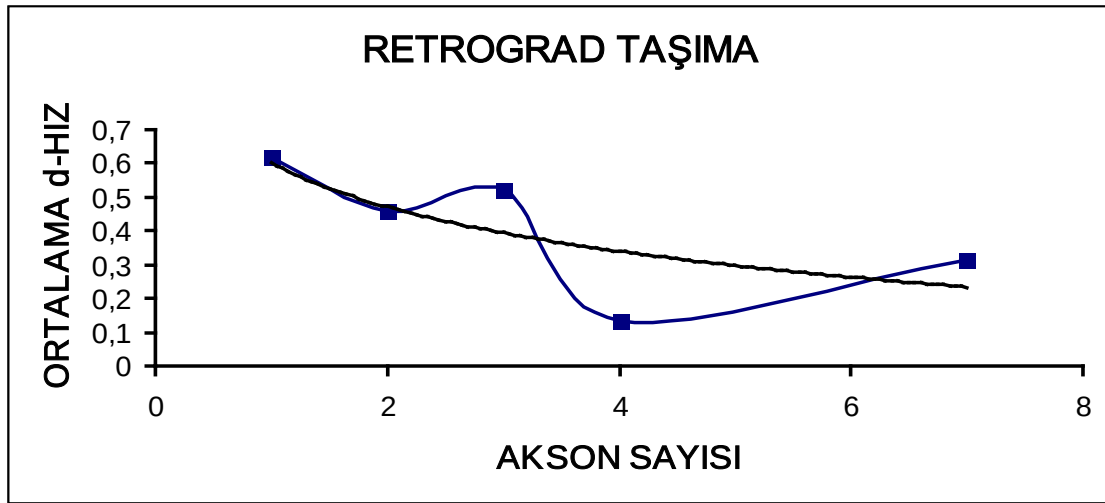
Şekil 4.42. Dalılı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson çapı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,27$; $p<0,05$).



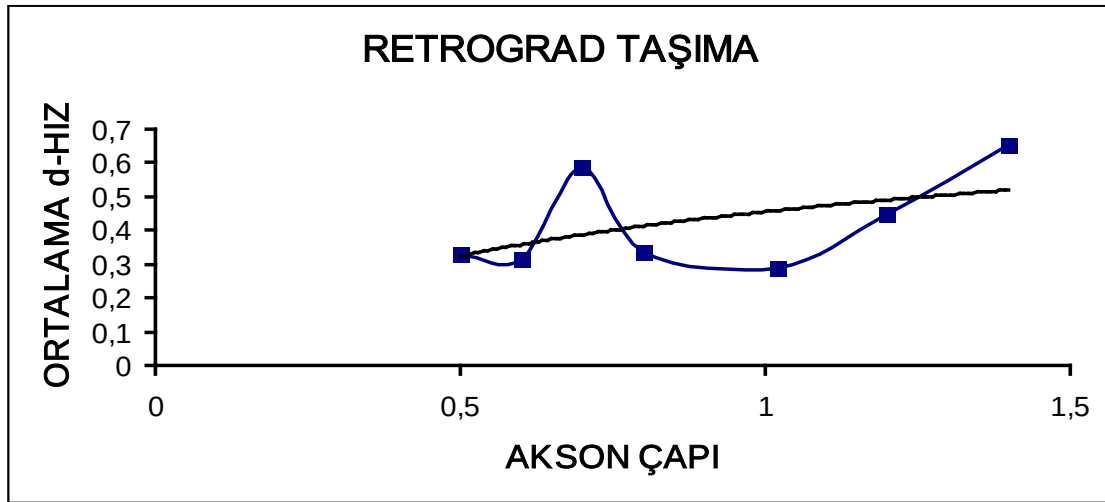
Şekil 4.43. Dalılı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,24$; $p<0,01$).



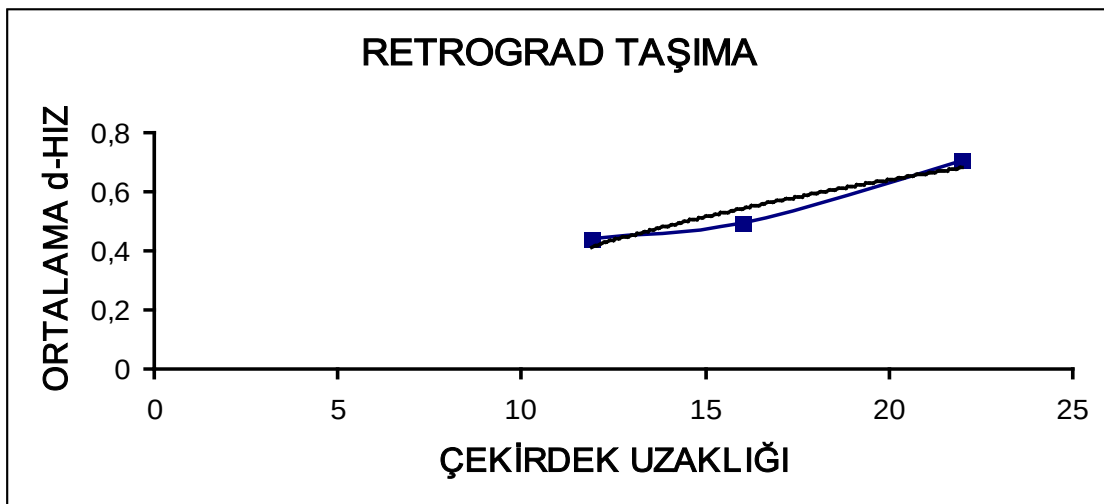
Şekil 4.44. Dalılı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson sayısı arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=-0,29$; $p<0,01$).



Şekil 4.45. Dalılı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson sayısı arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=-0,39$; $p<0,01$).



Şekil 4.46. Dalılı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / akson çapı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,32$; $p<0,01$).

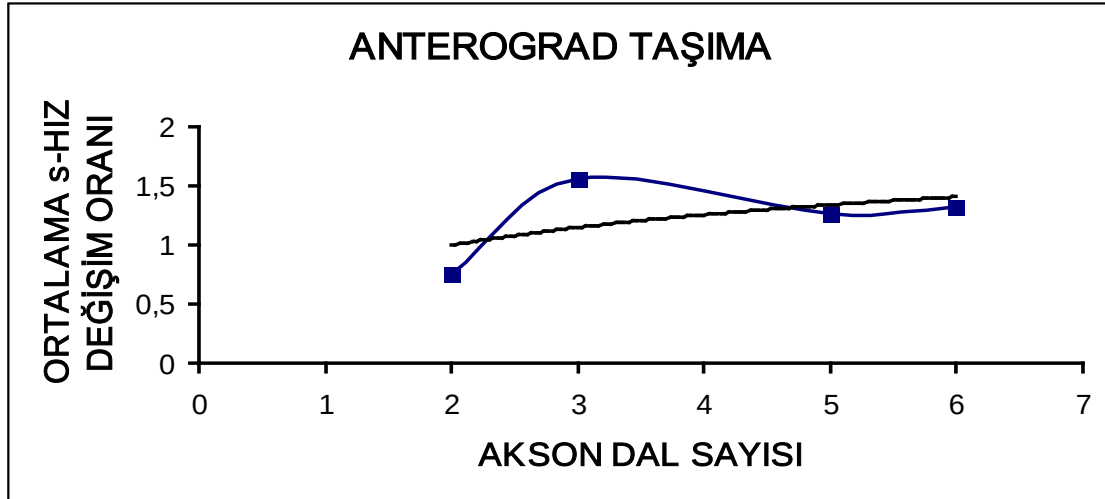


Şekil 4.47. Dalılı aksonlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,27$; $p<0,05$).

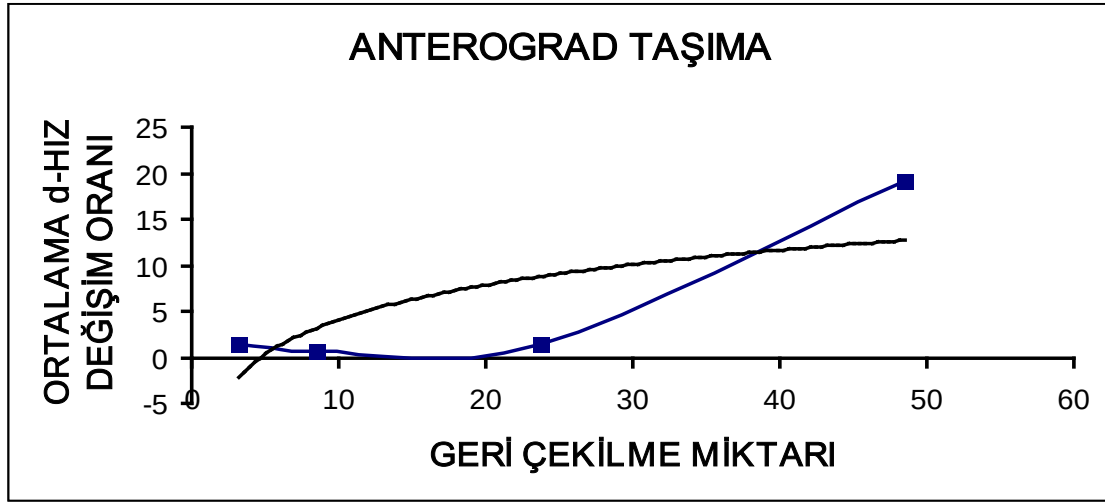
Aksotomi yapılan aksone komşu dalı olan nöronlarda anterograd olarak sürekli taşınan parçaların s-hız değişim oranının, akson proksimalindeki dal sayısı arttıkça arttığı ($r=0,32$; $p<0,05$) ve aksotomi sonrası hızın o kadar korunduğu belirlendi (Şekil 4.48). Anterograd olarak taşınan parçaların s-hız değişim oranı ile akson dal sayısı ($r=0,3$), gövde alanı ($r=0,13$), geri çekilme miktarı ($r=0,26$), akson kalınlığı ($r=-0,10$), çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı ($r=-0,21$) ve aksotomi mesafesi ($r=0,10$) arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı. Aynı tip nöronlarda anterograd olarak taşınan d-

hız değişim oranının, geri çekilme miktarıyla ($r=0,48$; $p<0,05$) arttığı ve aksonal taşınmanın paralel olarak o kadar korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.49). Anterograd olarak taşınan parçaların d hız değişim oranı ile akson dal sayısı ($r=0,02$), gövde büyüklüğü ($r=0,06$), akson kalınlığı ($r=0,2$), çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı ($r=-0,07$) ve aksotomi mesafesi ($r=0,14$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı tespit edildi.

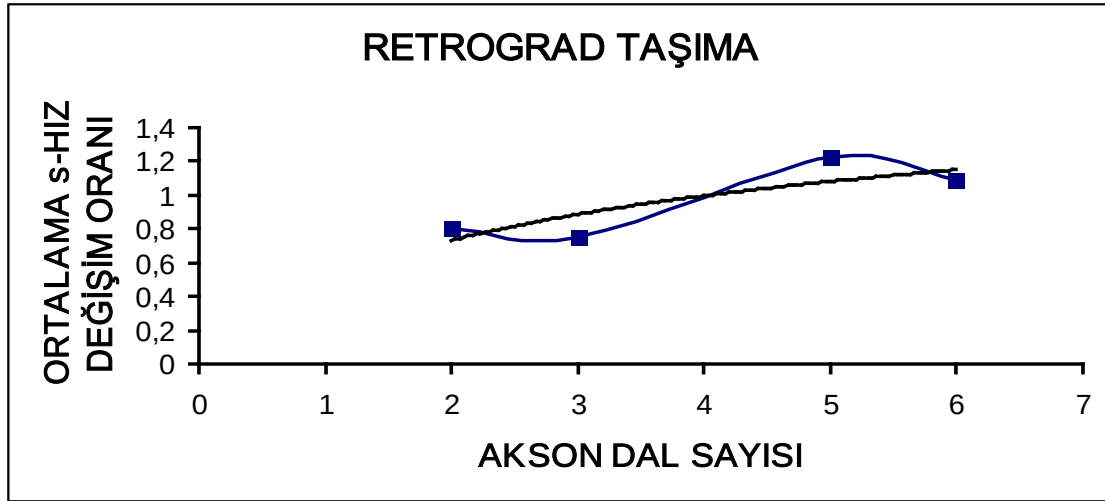
Aksotomi yapılan aksone komşu dalı olan nöronlarda retrograd olarak taşınan parçaların s-hız değişim oranıyla akson proksimalindeki dal sayısı arasında pozitif bir korelasyon olduğu bulundu ($r=0,30$; $p<0,05$) (Şekil 4.50). Retrograd olarak taşınan parçaların s-hız değişim oranıyla, gövde alanı ($r=0,15$), geri çekilme miktarı ($r=0,27$), akson kalınlığı ($r=-0,16$), çekirdeğin akson hiluksuna olan uzaklığı ($r=-0,18$) ve aksotomi mesafesi ($r=0,07$) arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı bulundu. Aynı tip nöronlarda retrograd olarak taşınan parçaların d-hız değişim oranının, geri çekilme miktarıyla arttığı ($r=0,49$; $p<0,05$) tespit edildi (Şekil 4.51). Retrograd olarak taşınan parçaların d-hız değişim oranıyla, gövde alanı ($r=0,07$), akson kalınlığı ($r=0,16$), çekirdeğin akson hiluksuna olan uzaklığı ($r=-0,06$), aksotomi mesafesi ($r=-0,14$) ve akson dal sayısı ($r=0,03$) arasında anlamlı bir ilişkinin olmadığı bulundu.



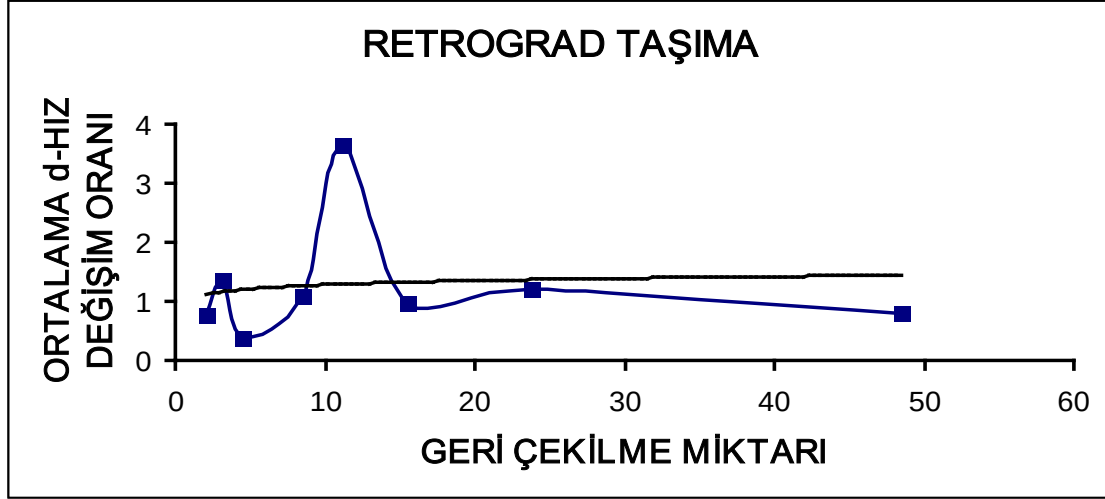
Şekil 4.48. Dallı aksonlarda anterograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız değişim oranı / akson dal sayısı arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,32$; $p<0,05$).



Şekil 4.49. Dallı aksonlarda anterograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız değişim oranı / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,48$; $p<0,05$).



Şekil 4.50. Dallı aksonlarda retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız değişim oranı / akson dal sayısı arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,30$; $p<0,05$).



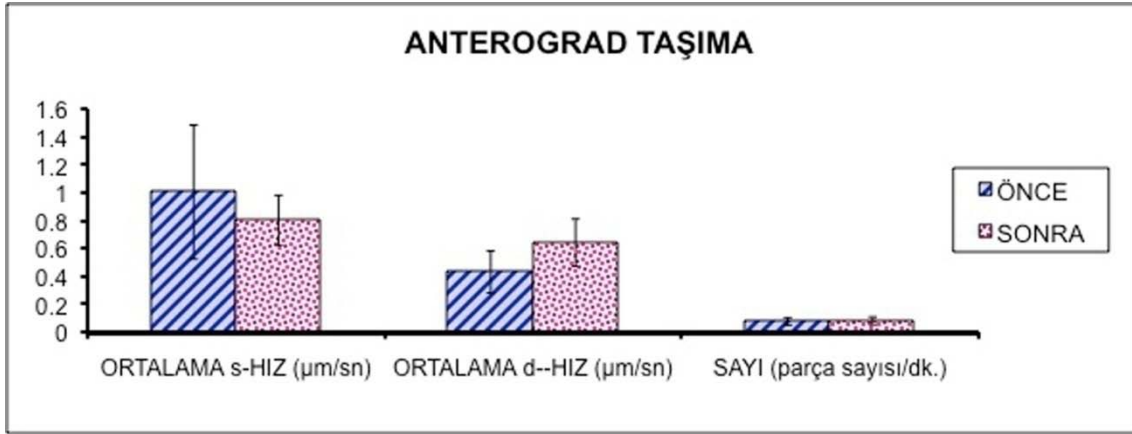
Şekil 4.51. Dallı aksonlarda retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız değişim oranı / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyonu gösteren grafik ($r=0,49$; $p<0,05$).

4.3.3. Komşu aksonlarda taşıma

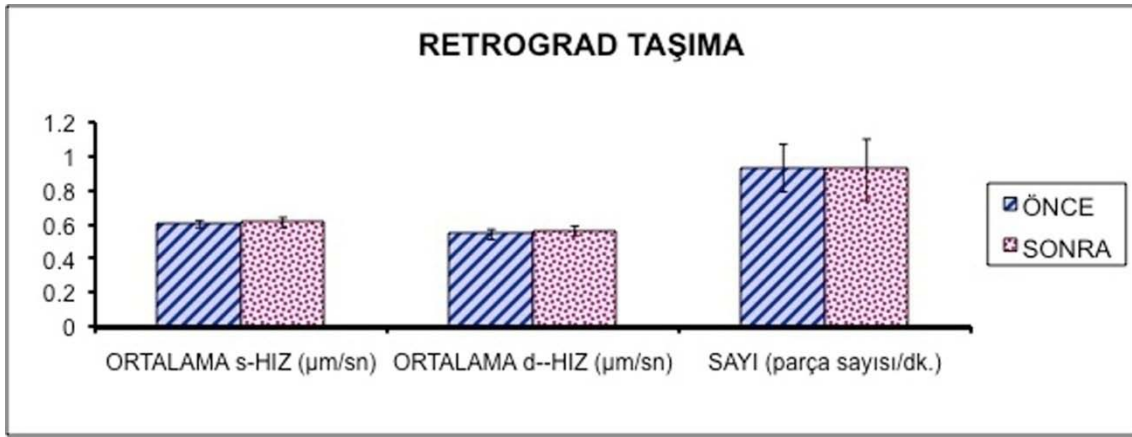
Gövdeden birden fazla aksonun çıktığı nöronlarda komşu bir akson aksotomisinin, aksotomi yapılmamış aksonda anterograd ve retrograd olarak taşınan parçaların sayılarını ve ortalama hızlarını etkilemediği gözlemlendi (Çizelge 4.9), (Şekil 4.52 ve 4.53). Diğer taraftan aksotomi sonrası ortalama taşınma hızları, aksotomi öncesi ortalama hızlarına bölünerek her durum için hız değişim oranları elde edildi (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9. Komşu aksonlarda aksotomi öncesi ve sonrası elde edilen veriler.

	ANTEROGRAĐ				RETROGRAĐ			
	Ort $\pm$ SH				Ort. $\pm$ SH			
	a.ö.	n	a.s.	n	a.ö.	n	a.s.	n
Sayı (parça/dk.)	0,075 $\pm 0,02$	10	0,08 $\pm 0,02$	10	0,93 $\pm 0,14$	10	0,92 $\pm 0,18$	10
Ort. s-Hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$)	1,00 $\pm 0,48$	9	0,8 $\pm 0,18$	10	0,60 $\pm 0,02$	110	0,61 $\pm 0,03$	108
Ort. d-Hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$)	0,4 $\pm 0,15$	9	0,6 $\pm 0,17$	10	0,54 $\pm 0,03$	110	0,56 $\pm 0,03$	108
s-Hız değişim oranı	0,72 $\pm 0,28$			3	0,98 $\pm 0,13$			10
d-Hız değişim oranı	1,16 $\pm 0,49$			3	1,05 $\pm 0,21$			10



Şekil 4.52. Komşu aksonlarda anterograd taşımada aksotomi öncesi ve sonrası değişim grafiği.



Şekil 4.53. Komşu aksonlarda retrograd taşımada aksotomi öncesi ve sonrası değişim grafiği.

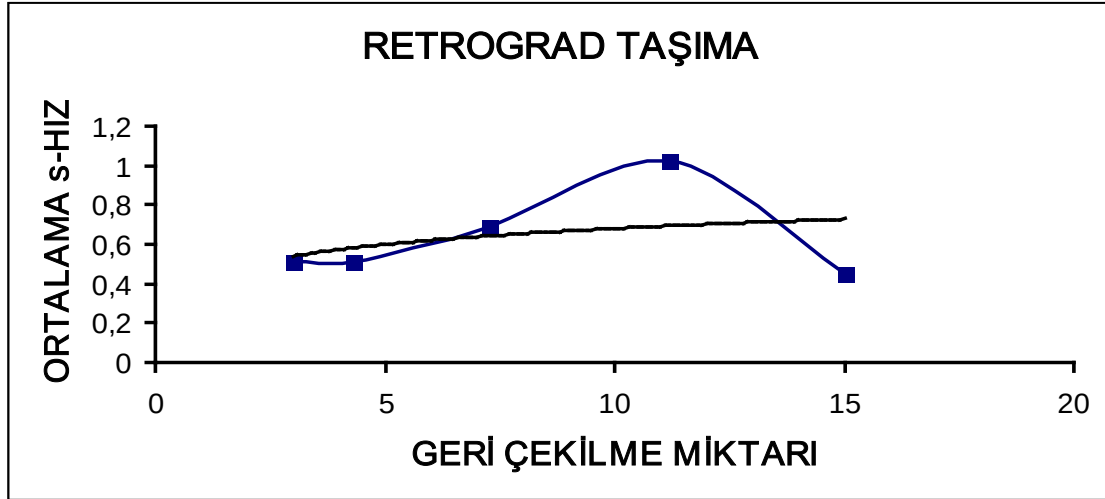
Taşınan parçaların ortalama hız ve nöron morfolojileriyle aralarındaki ilişkileri ortaya koyan korelasyon analizlerine göre gövdeden komşu aksone aksotomi yapılmış olan aksonun, aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçacıkların ortalama s-hızları, geri çekilme miktarı ($r=0,19$; $p<0,05$) (Şekil 4.54) ve aksotomi mesafesi arttıkça ($r=0,20$; $p<0,05$) arttığı belirlendi (Şekil 4.55). Aksotomi öncesi ve sonrası retrograd taşınan parçacıkların ortalama d-hızları ise, gövde alanı arttıkça arttığı tespit edildi ($r=0,22$; $p<0,05$) (Şekil 4.56). Komşu aksonuna aksotomi yapılmış aksonun aksotomi sonrası taşınan parçalarının hızlarıyla, morfolojik özellikler arasında anlamlı çıkan korelasyonlar Çizelge 4.10 gösterilmiştir.

Gövdeden komşu aksone aksotomi yapılmış olan aksonun, aksotomi sonrasında anterograd taşınan parçacıkların ortalama s hızı ile toplam akson sayısı ($r=0,37$), akson

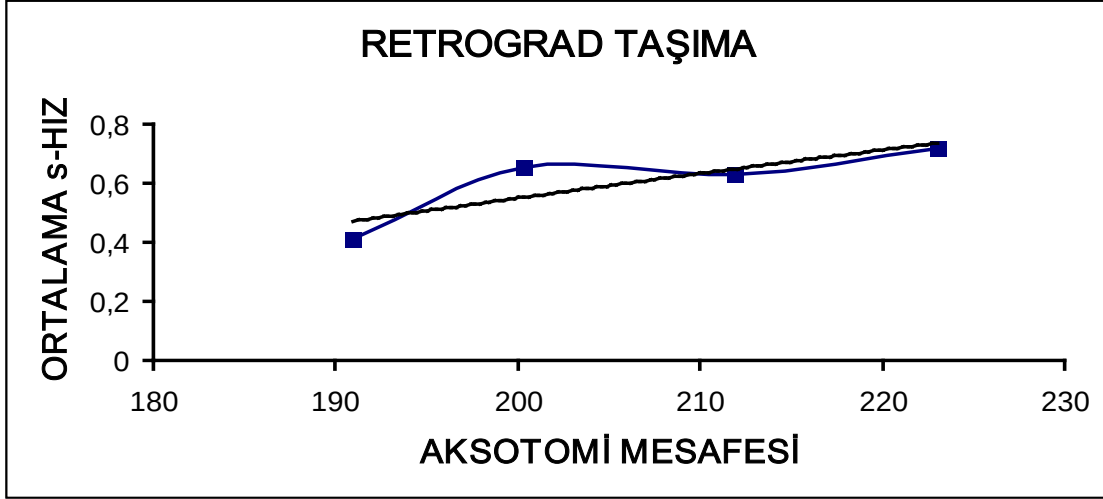
dal sayısı ($r=0,14$), gövde alanı ($r=0,11$), geri çekilme miktarı ($r=0,06$), akson kalınlığı ($r=0,36$), çekirdeğin akson hilusuna uzaklığı ($r=0,04$) ve aksotomi mesafesi ($r=-0,34$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişkinin olmadığı gözlemlendi. Ortalama d-hızı ile toplam akson sayısı ($r=-0,03$), akson dal sayısı ($r=0,30$), gövde alanı ($r=0,33$), geri çekilme miktarı ($r=-0,31$), akson kalınlığı ($r=0,36$), çekirdeğin akson hilusuna uzaklığı ($r=0,35$) ve aksotomi mesafesi ($r=-0,13$) arasında da anlamlı bir ilişkinin olmadığı tespit edildi.

Çizelge 4.10. Komşu aksonuna aksotomi yapılmış aksonlarda aksonal taşıma hızları ile ilgili anlamlı korelasyonlar (+:artış, -:azalış).

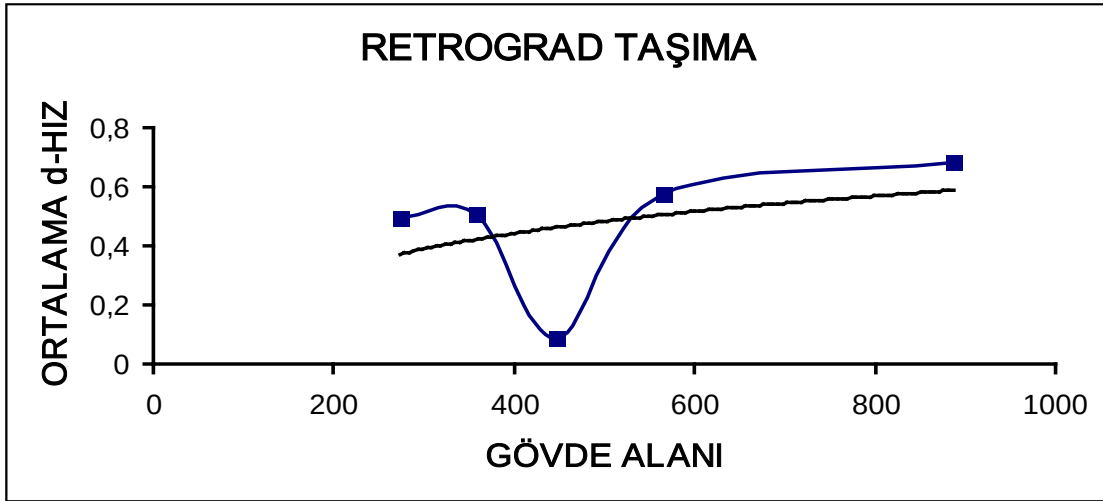
	Anterograd	Retrograd
Ort. s-hız	Yok	+ Geri çekilme miktarı + Aksotomi mesafesi
Ort. d-hız	Yok	+ Gövde alanı



Şekil 4.54. Gövdeden komşu aksonuna aksotomi yapılmış olan aksonun aksotomi sonrasında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m/sn}$) / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,19$; $p<0,05$).



Şekil 4.55. Gövdeden komşu aksonuna aksotomi yapılmış olan aksonun aksotomi sonrasında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / aksotomi mesafesi (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,20$; $p<0,05$).

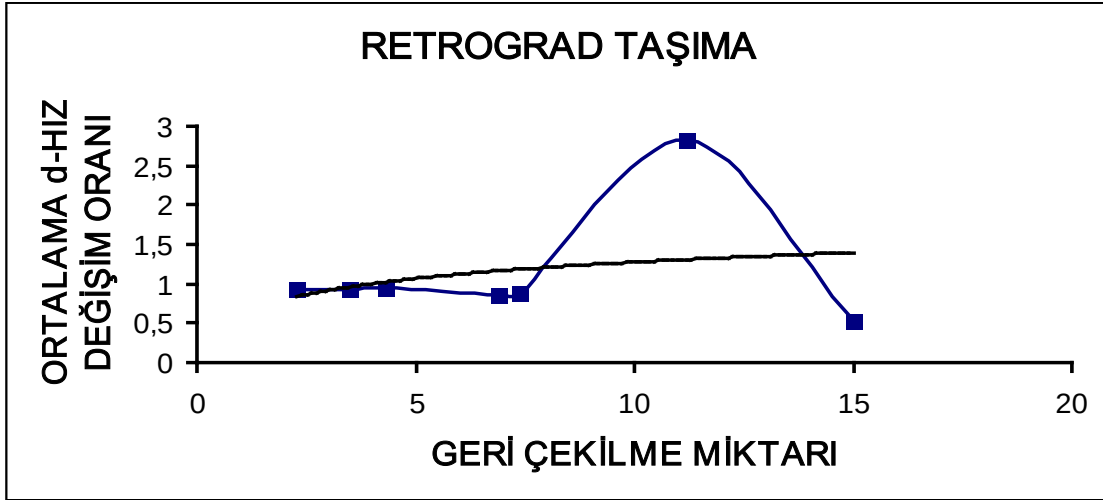


Şekil 4.56. Gövdeden komşu aksonuna aksotomi yapılmış olan aksonun aksotomi sonrasında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız ($\mu\text{m}/\text{sn}$) / gövde alanı arasındaki (μm^2) korelasyon grafiği ($r=0,22$; $p<0,05$).

Gövdeden komşu olan aksone yapılan aksotomi ve bu aksone komşu diğer bir aksondan elde edilen korelasyon analizi sonuçlarına göre, retrograd olarak taşınan parçaların ortalama s-hız ile toplam akson sayısı ($r=0,11$), akson dal sayısı ($r=0,003$), gövde alanı ($r=0,12$), akson kalınlığı ($r=0,02$) ve çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı ($r=0,05$) arasında anlamlı ilişkinin olmadığı tespit edildi. Ortalama d-hız ile toplam akson sayısı ($r=0,007$), akson dal sayısı ($r=0,08$), geri çekilme miktarı ($r=0,11$),

akson kalınlığı ($r=0,074$), çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı ($r=0,15$) ve aksotomi mesafesi ($r=0,17$) arasında anlamlı ilişkinin olmadığı bulundu.

Gövdeden komşu olan aksona yapılan aksotomi ve bu aksona komşu diğer bir aksondan elde edilen korelasyon analizi sonuçları, retrograd olarak taşınan parçaların s-hız değişim oranının, akson dal sayısı ($r=0,03$), gövde alanı ($r=-0,07$), geri çekilme miktarı ($r=0,03$), akson kalınlığı ($r=-0,22$), çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı ($r=-0,16$) ve aksotomi mesafesi ($r=0,01$) ile ilişkili olmadığını gösterdi. Aynı tip nöronda retrograd olarak taşınan parçaların d-hız değişim oranının geri çekilme miktarı arttıkça arttığı bulundu ($r=0,41$; $p<0,05$) (Şekil 4.57). Retrograd olarak taşınan parçaların d-hız değişim oranının, akson dal sayısı ($r=0,09$), gövde alanı ($r=0,05$), akson kalınlığı ($r=0,04$), çekirdeğin akson hilusuna olan uzaklığı ($r=-0,09$) ve aksotomi mesafesi ($r=-0,13$) ile ilişkili olmadığı bulundu. Bu tip nöronda anterograd olarak taşınan parçaların veri sayısı istatistiksel değerlendirme için yetersiz olduğu için hız değişim oranlarının korelasyon analizi yapılamadı.

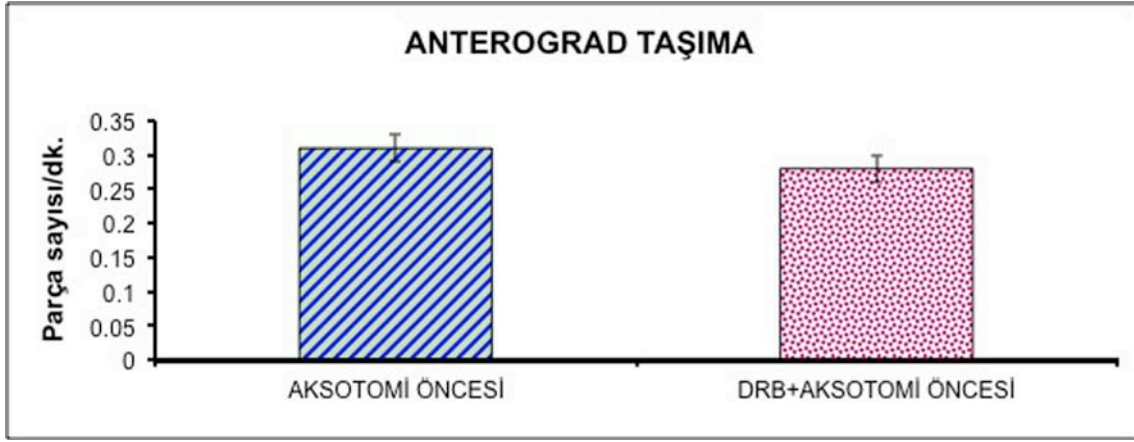


Şekil 4.57. Gövdeden komşu aksonuna aksotomi yapılmış olan aksonun aksotomi sonrasında retrograd olarak taşınan parçaların ortalama d-hız değişim oranı / geri çekilme miktarı (μm) arasındaki korelasyon grafiği ($r=0,41$; $p<0,05$).

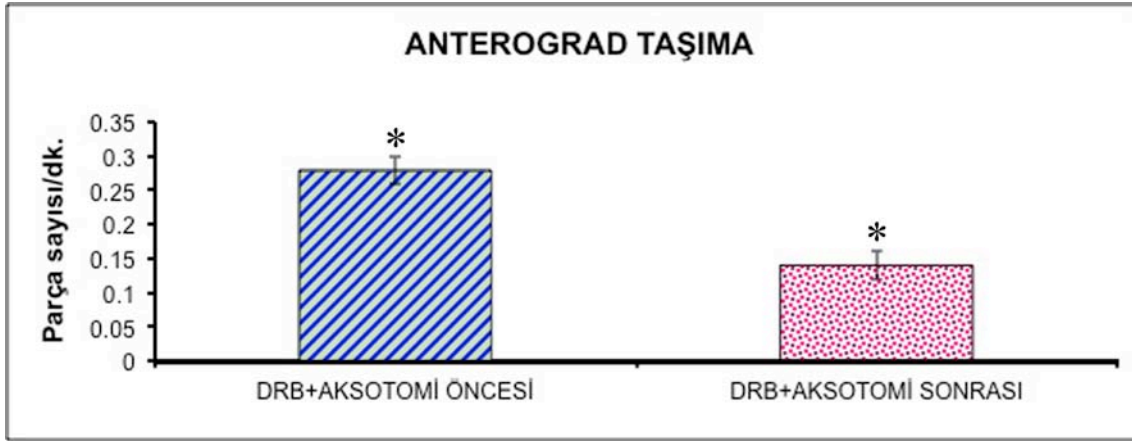
4.4. Aksotomi öncesi ve sonrası transkripsiyon ve translasyon seviyesindeki inhibisyonların aksonal taşıma üzerine etkileri

4.4.1. DRB ile transkripsiyon inhibisyonunun aksonal taşıma üzerine etkileri

Transkripsiyon, aksotomiden önce DRB (5,6-Dihidrobenzimidazole 1- β -D ribofuranosid) ile inhibe edildi. İnhibisyon sonucu anterograd taşımanın etkilenip etkilenmediği, verilere istatistiksel analiz uygulanması sonucunda tespit edildi. Buna göre, inhibisyon uygulanmış anterograd taşınan parçaların, aksotomi öncesi verileriyle kontrol grubunda anterograd taşınan parçaların verileri arasında önemli bir farklılık gözlenmedi (Şekil 4.58). İnhibisyon uygulamasında aksotomi sonrası anterograd olarak taşınan parçalar, aksotomi öncesine göre anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p < 0,01$) (Şekil 4.59). Elde edilen sonuçlara göre anterograd taşımanın aksotomiyle anlamlı derecede etkilenmediği, bununla birlikte transkripsiyon inhibe edildiğinde anterograd taşıma için bu durumun değiştiği gözlemlendi.

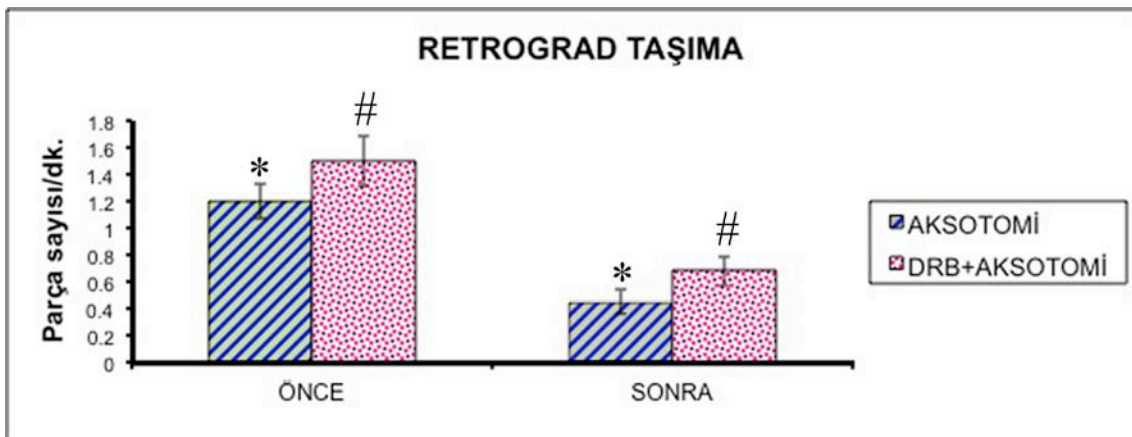


Şekil 4.58. Anterograd olarak taşınan parçaların aksotomi öncesi DRB varlığı ile yokluğu arasındaki farkı gösteren grafik.



Şekil 4.59. Anterograd olarak taşınan parçaların DRB varlığında aksotomi öncesi ve sonrasındaki durumu gösteren grafik (*: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir.*:p<0,01).

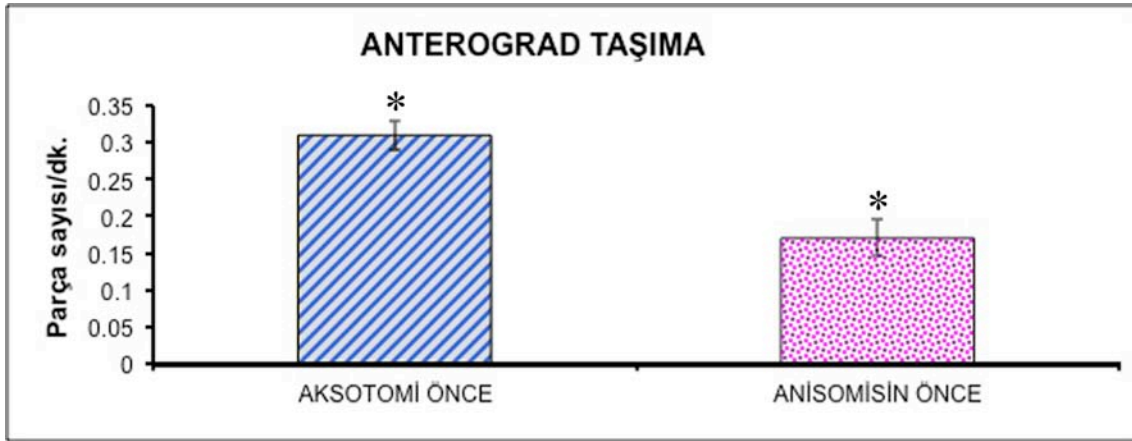
İnhibisyon sonucu retrograd taşıma istatistiksel olarak analiz edildi. Buna göre, inhibisyon uygulanmış dönemde nöronlarının aksonlarında retrograd olarak taşınan parçalar, aksotomi öncesi ve kontrol grubunun aksotomi öncesi verileri arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.60). İnhibisyon uygulanmış nöronların aksonlarında retrograd olarak taşınan parçaların aksotomi sonrası sayılarıyla, aksotomi grubundaki aksotomi sonrası taşınan parça sayıları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmedi (Şekil 4.60). İnhibisyon uygulanan nöronlarda aksotomi sonrası retrograd olarak taşınan parçaların, aksotomi öncesine göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (p<0,01) (Şekil 4.60.).



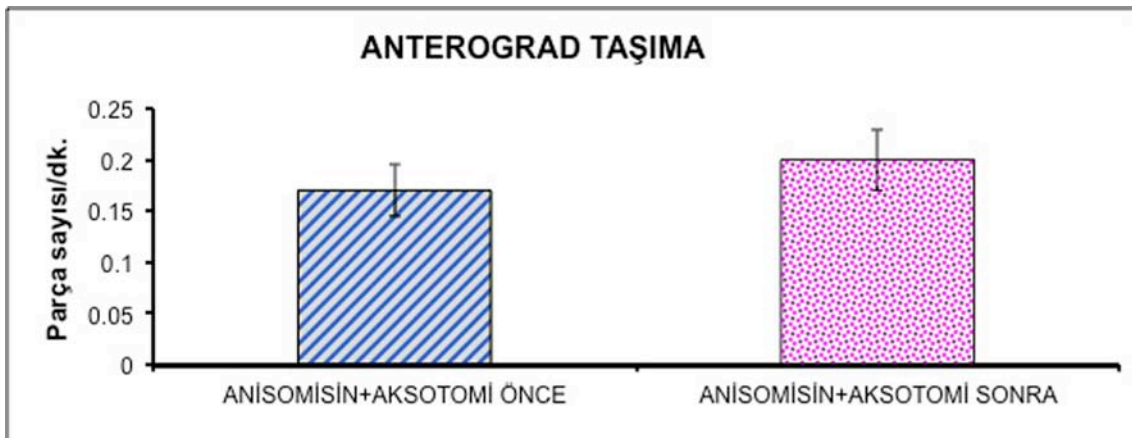
Şekil 4.60. Retrograd olarak taşınan parçaların DRB varlığında aksotomi öncesi ve sonrasındaki durumu gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *:p<0,01, #: p<0,01).

4.4.2. Anisomisin ile translasyon inhibisyonunun aksonal taşıma üzerine etkileri

Aksotomiden önce translasyon Anisomisin ile inhibe edildi. İnhibisyon sonucunda anterograd taşımanın etkilenip etkilenmediği tespit edildi. Buna göre, inhibisyon uygulanan nöronların aksonlarında anterograd taşınan parçaların aksotomi öncesi verileriyle kontrol grubu anterograd taşınan parçaların verileri arasında anlamlı derecede farklılık gözlemlendi ($p < 0,01$). (Şekil 4.61) İnhibisyon uygulamasının aksotomi öncesi ve sonrası anterograd olarak parça taşınması üzerine anlamlı bir değişim meydana getirmediği belirlendi (Şekil 4.62).

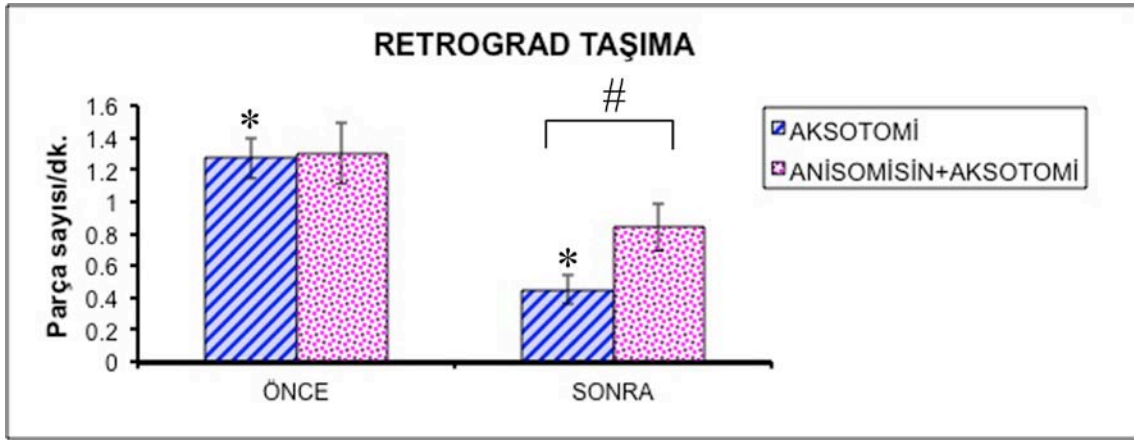


Şekil 4.61. Anterograd olarak taşınan parçaların Anisomisin varlığında aksotomi öncesi ile kontrol durumunu gösteren grafik (*: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. $p < 0,01$).



Şekil 4.62. Anterograd olarak taşınan parçaların, Anisomisin varlığında aksotomi öncesi ve sonrası durumları

İnhibisyon sonrası istatistiksel analizlerin sonuçlarına göre, inhibisyon uygulanmış nöronların aksonlarında retrograd olarak taşınan parçaların, aksotomi öncesi ve kontrol aksotomisi öncesi verileri arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.63). İnhibisyon uygulanan nöronların aksonlarında retrograd olarak taşınan parçaların aksotomi sonrası sayılarıyla, kontrol grubunun aksotomi sonrası taşınan parça sayısı arasında anlamlı ölçüde farklılık gözlemlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.63). İnhibisyon uygulamasının ardından aksotomi öncesi ile sonrası arasında önemli bir fark bulunmadı (Şekil 4.63) .

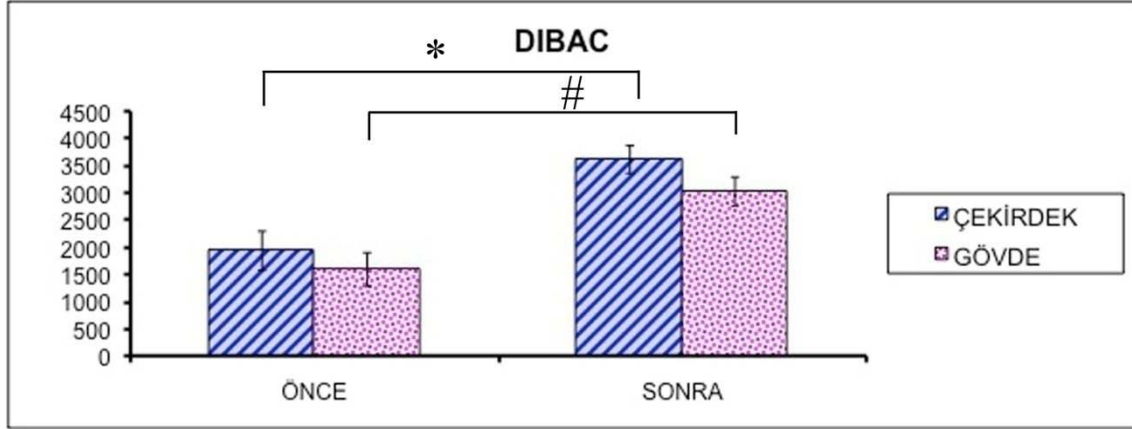


Şekil 4.63. Retrograd olarak taşınan parçaların, Anisomisin varlığında aksotomi öncesi ve sonrası durumları (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *: $p<0,05$, #: $p<0,01$).

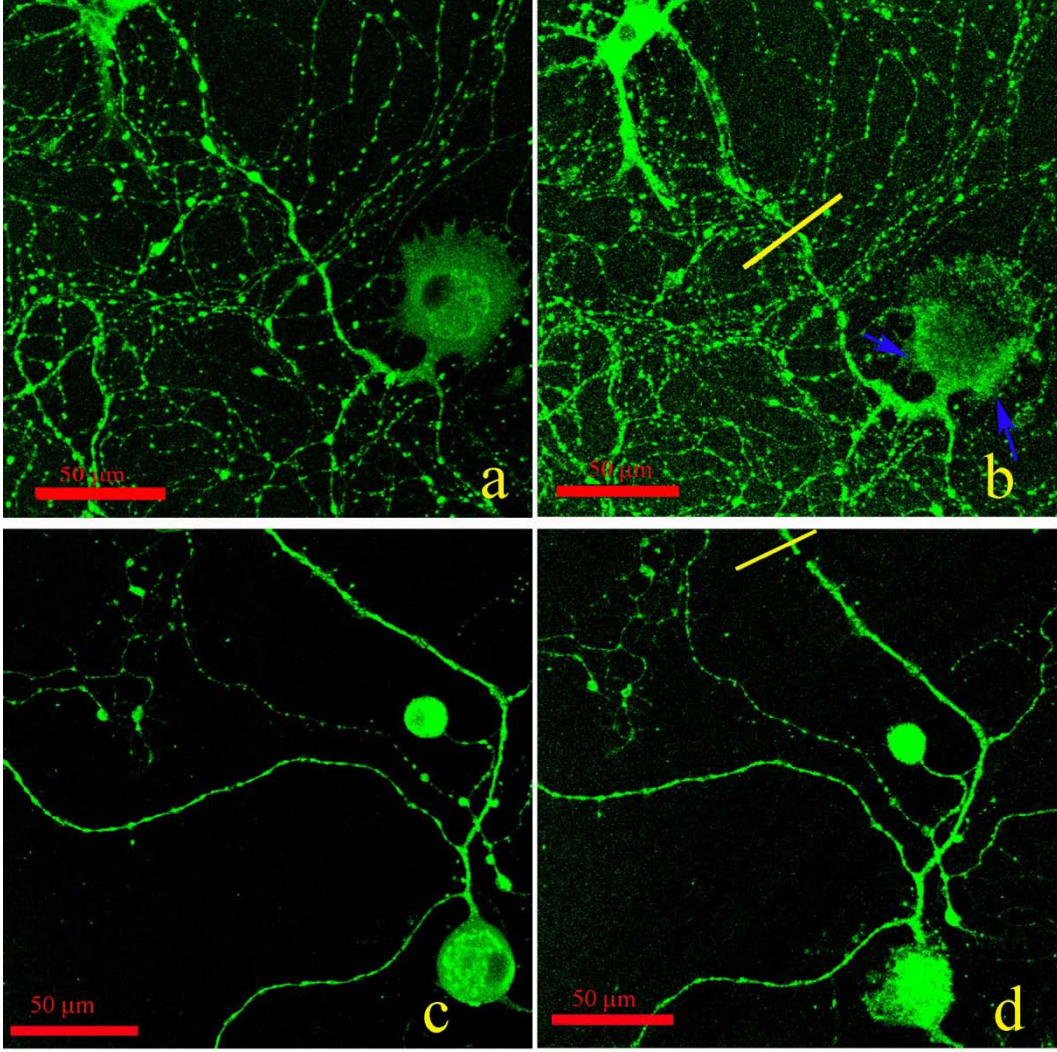
4.5. Aksotomiye bağlı depolarizasyon özellikleri

Aksotomi yapılmadan önce DIBAC'ın bulunduğu durumda nöronların floresan görüntüleri alındı. Aksotomi yapıldıktan sonra depolarizasyon gerçekleştiği zaman bu boyanın girişi artmakta ve dolayısıyla yansıttığı ışık miktarı da o ölçüde artmaktadır. Buna bağlı olarak aksotomi yapıldıktan sonra ilk hasar sinyali olan depolarizasyon dalgası, DIBAC ile canlı boyamanın ardından tespit edildi. Aksotomi sonrası, aksotomi öncesine göre boyanma şiddetindeki artış istatistiksel olarak analiz edildi. Bu analiz sonucuna göre, çekirdek ($r=0,30$; $p<0,01$) ve gövdedeki ($r=0,019$; $p<0,01$) boyama miktarının anlamlı derecede arttığı tespit edildi (Şekil 4.64). Ancak proksimal ve distal akson kısımlarındaki artış, anlamlı bulunmadı. Bunun sebebinin aksotomi sonrası görüntüleme sürecine kadar aksonlardaki depolarizasyon dalgasının yerini

repolarizasyona bırakması olarak yorumlanabilir. Görüntülemeye ait fotoğraflar Şekil 4.65’de verildi.



Şekil 4.64. Çekirdek ve gövde de aksotomi sonrası kontrol grubuna göre DIBAC miktarındaki artışı gösteren grafik (*; #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *:p<0,01; #: p<0,01).

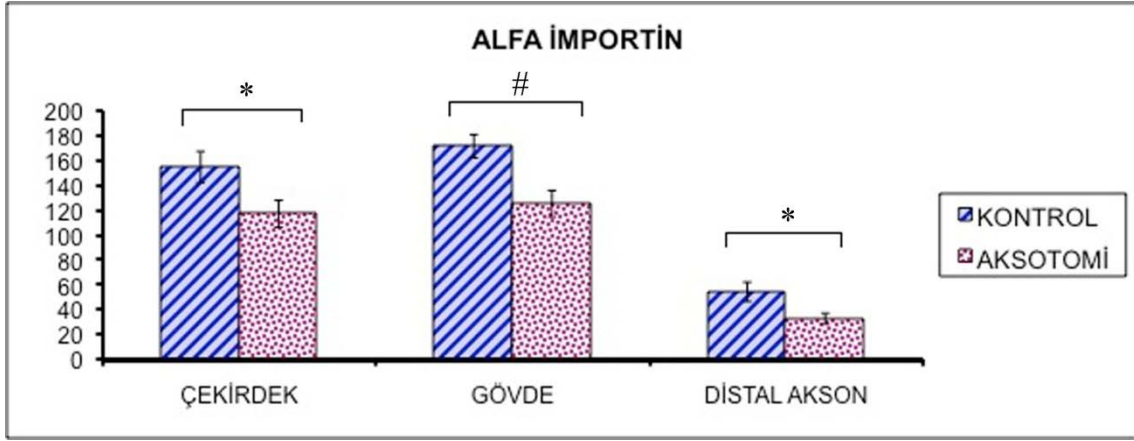


Şekil 4.65. a. Aksotomi öncesi DIBAC ile boyanmış nöron, **b.** Aksotomi sonrası DIBAC ile boyanmış nöronda özellikle hücre gövdesi etrafında boyanma artışı (mavi ok), **c.** Aksotomi öncesi DIBAC ile boyanmış nöron, **d.** Aksotomi sonrası DIBAC ile boyanmış nöronda tüm hücrede boyanma artışı (sarı ile gösterilen çizgi aksotominin yapıldığı yer).

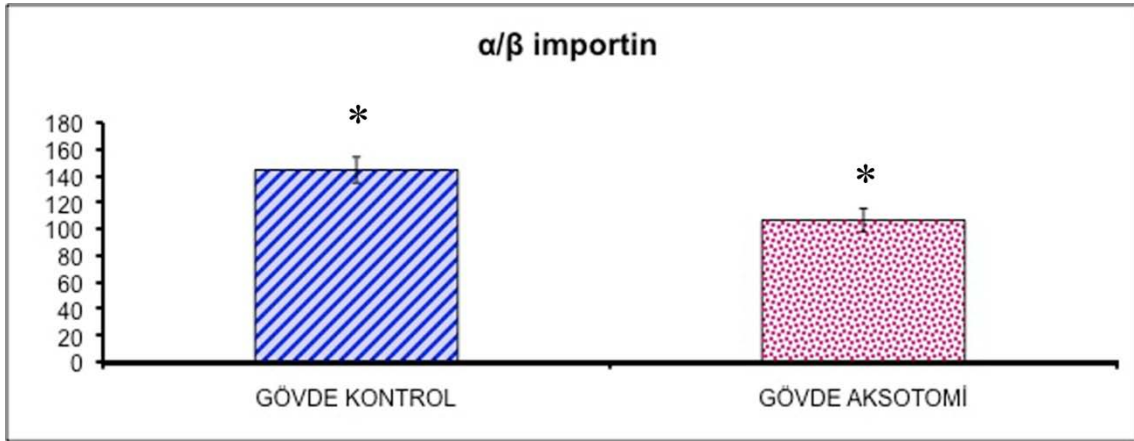
4.6. Aksotomi hasarı sinyalinde importinlerin rolü

Floresan görüntüleme verilerinin istatistiksel analizlerin sonuçlarına göre, çekirdekte kontrol grubuna göre aksotomi sonrası, α importinin anlamlı derecede azalırken ($p < 0,05$) (Şekil 4.66), β importin ve α/β importin kompleksinin değişmediği gözlemlendi. Gövdede ise kontrole göre aksotomi sonrası, α importin ($p < 0,01$) (Şekil 4.66) ve α/β importin kompleksinin ($p < 0,05$) anlamlı derecede azaldığı (p değerleri sırasıyla $< 0,01$ ve $< 0,05$) (Şekil 4.67), β importin seviyesinde anlamlı bir değişimin meydana gelmediği tespit edildi. Proksimal aksonda ise anlamlı bir değişim meydana gelmezken,

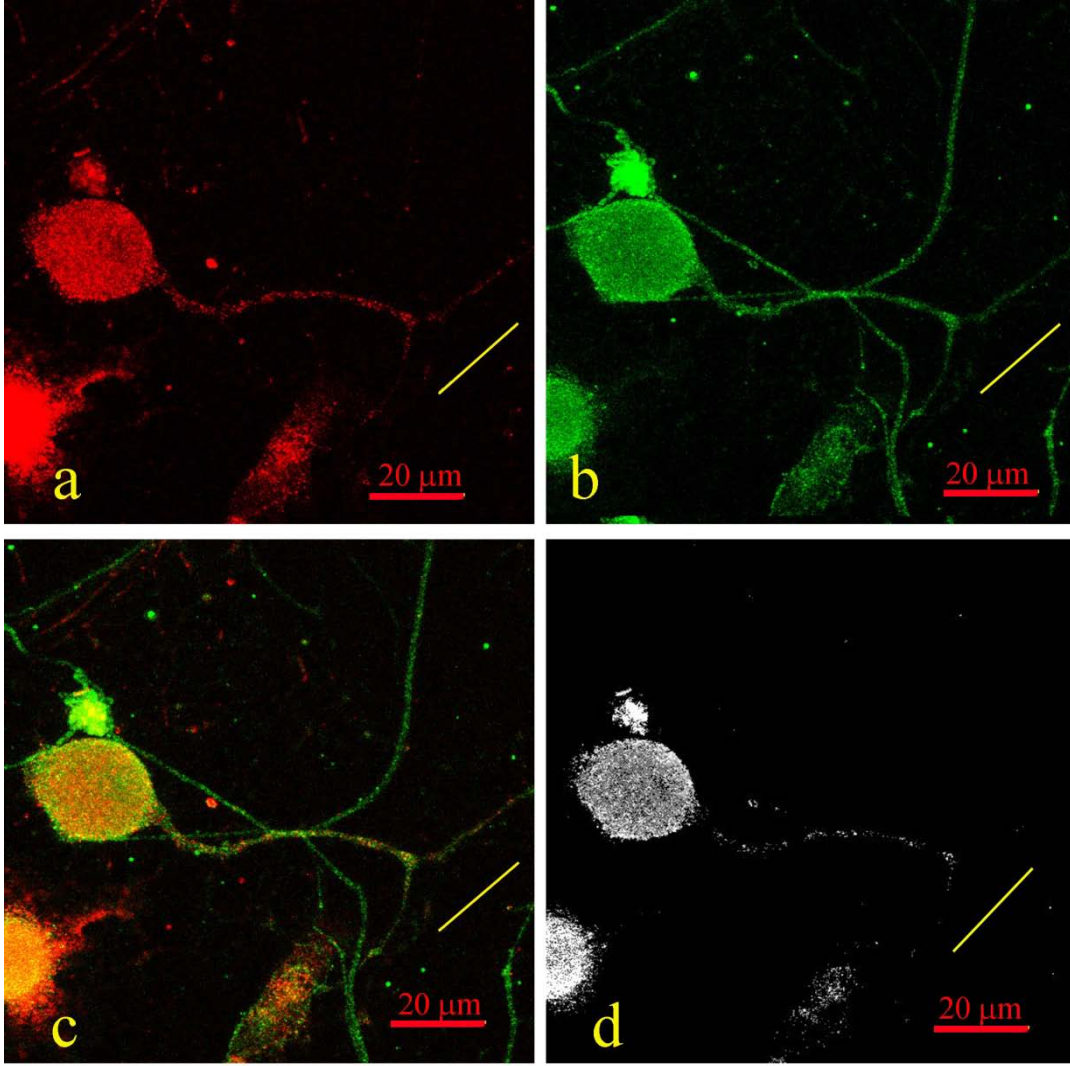
distal aksonda kontrol grubuna göre aksotomi sonrası, α importinin ($p<0,05$) anlamlı derecede azaldığı tespit edildi (Şekil 4.66). Distal aksonda ise, β importin ve α/β importin kompleksi seviyesinde anlamlı bir değişimin meydana gelmediği gözlemlendi. Aksotomi yapılmış aksona komşu daldan veya aksondan alınan verilerde de bu değişkenlerin anlamlı derecede değişmediği belirlendi. Görüntülemeye ait fotoğraflar Şekil 4.68 ve 4.69’de verildi.



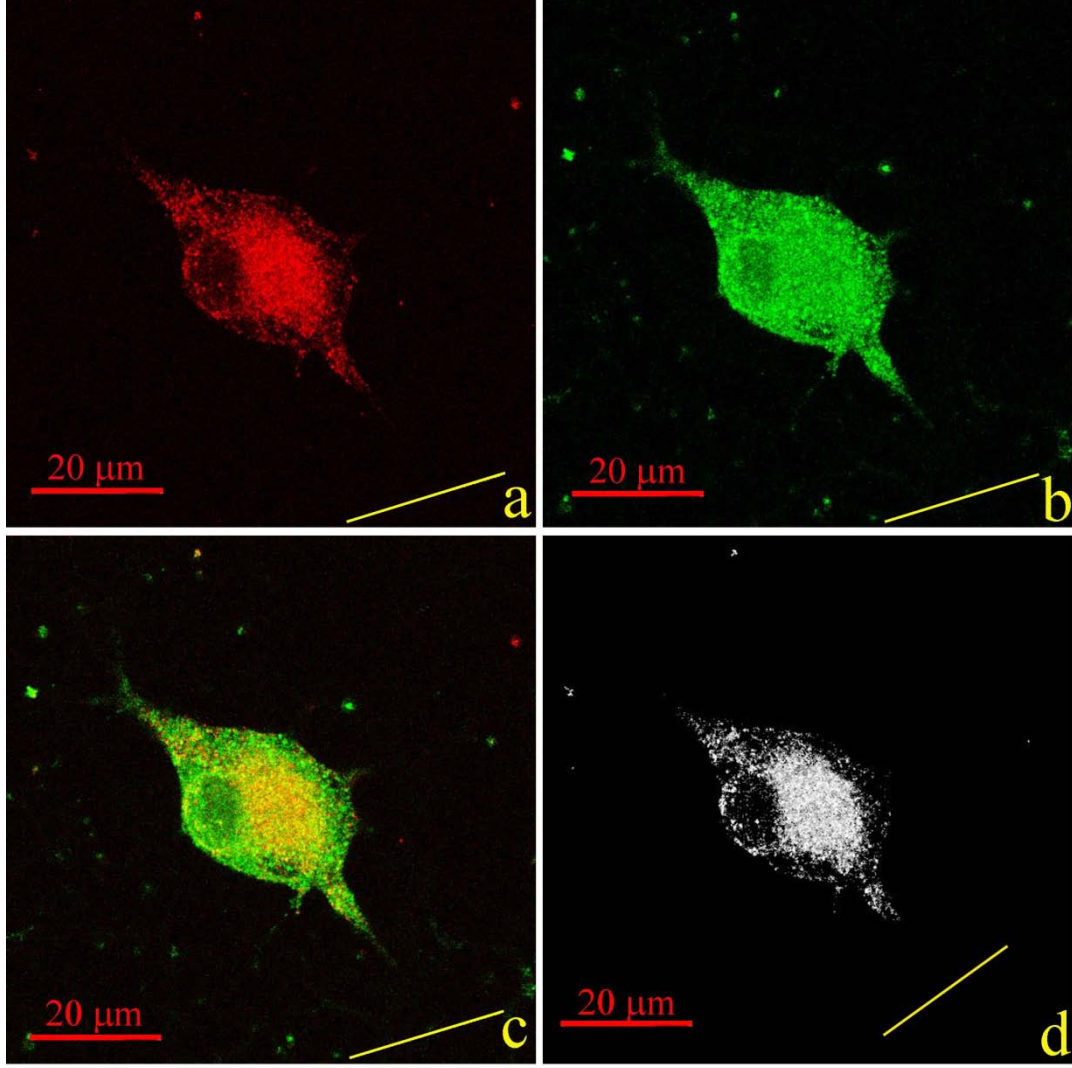
Şekil 4.66. Çekirdek, gövde ve distal aksonda α importinin, aksotomi sonrası kontrol grubuna göre miktarındaki azalmayı gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *: $p<0,05$; #: $p<0,01$).



Şekil 4.67. Gövdede α/β importinin, aksotomi sonrası kontrol grubuna göre miktarındaki azalmayı gösteren grafik (*: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. $p<0,05$).



Şekil 4.68. a. α importin görüntüsü, b. β importin görüntüsü, c. α ve β importinin birlikte bulundukları durumun görüntüsü, d. α ve β importinin kolokalizasyon görüntüsü.

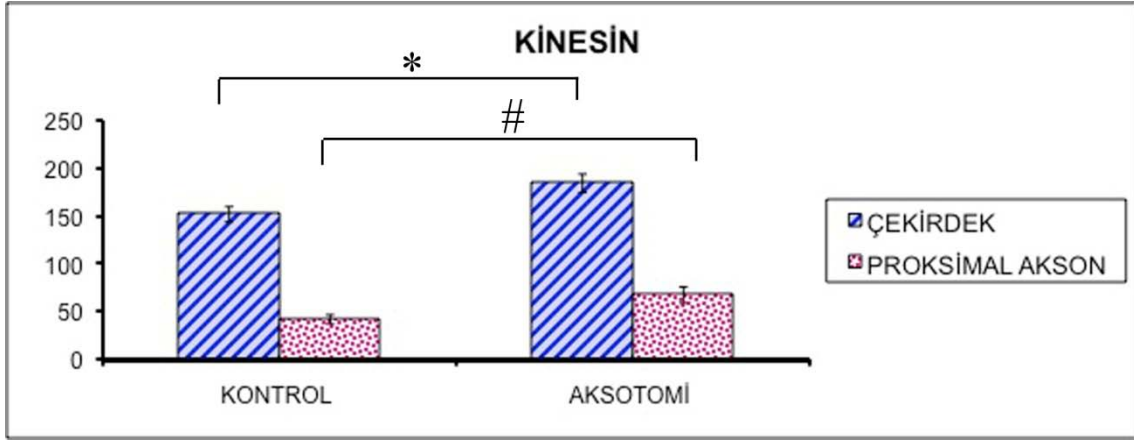


Şekil 4.69. a. Gövde ve çekirdekte α importin görüntüsü, b. Gövde ve çekirdekte β importin görüntüsü, c. Gövde ve çekirdekte α ve β importinin birlikte bulundukları durumun görüntüsü, d. Gövde ve çekirdekte α ve β importinin kolokalizasyon görüntüsü.

4.7. Aksonal taşımayla ilişkili proteinlerde aksotomiye bağlı meydana gelen değişiklikler

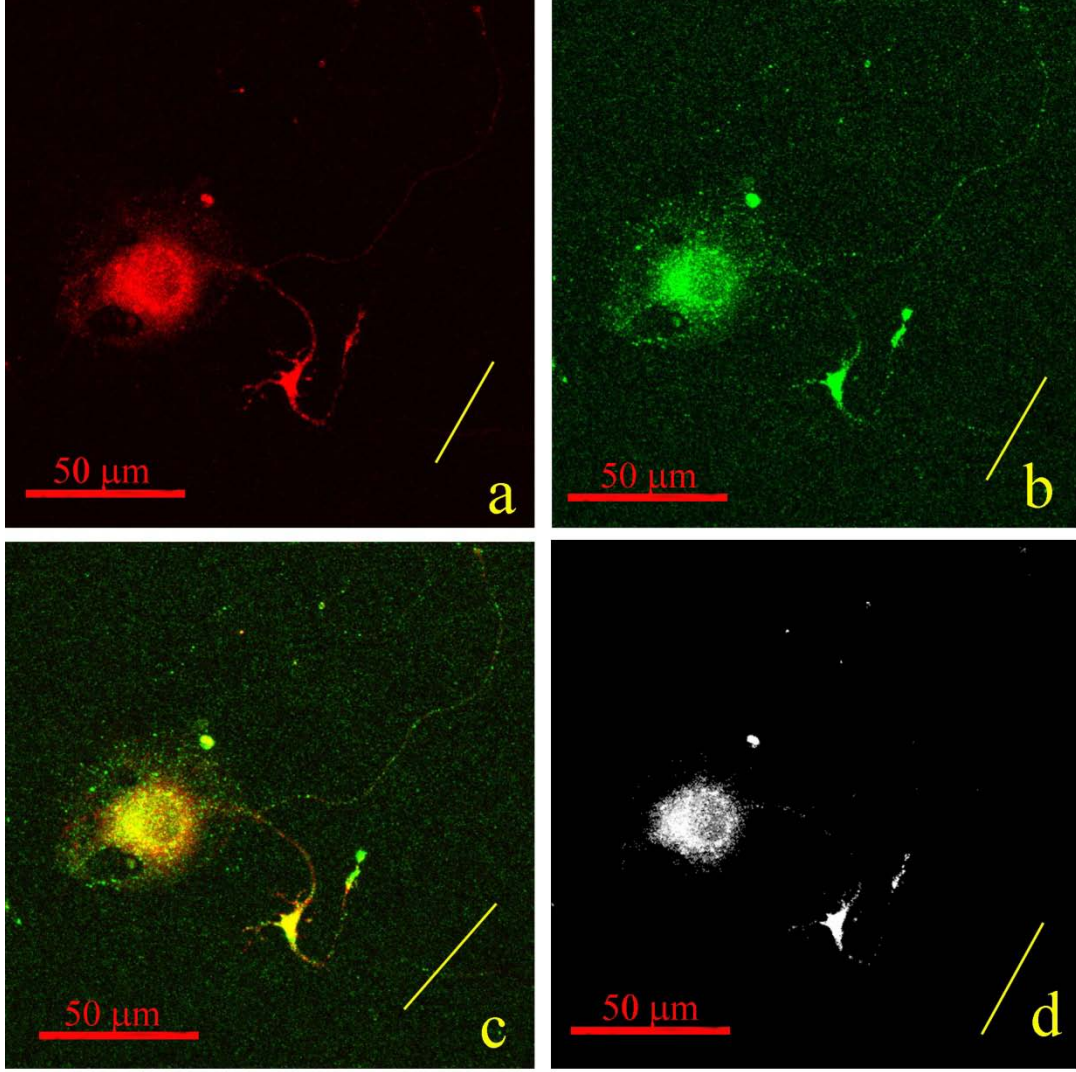
Anterograd taşımada görevli olan kinesin motor proteininin ve yine anterograd olarak taşınan APP'nin ayrı ayrı ve birlikte bulunma durumları değerlendirmek için görüntülerden elde edilen floresan boyanma şiddetlerinin istatistiksel analizlerine göre, aksotomi yapılan nöronların çekirdeklerinde kinesin miktarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı bulundu ($p < 0,05$) (Şekil 4.70). APP ve kinesin-APP kolokalizasyonu miktarlarının kontrol grubu nöronlarına göre anlamlı derecede

değişmediği belirlendi. Gövdede bu değişkenlerin hiçbirinde anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edildi. Aksotomi yapılan nöronun proksimal aksonunda, kinesin miktarının kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı bulundu ($p<0,05$) (Şekil 4.70). Öte yandan APP ve kinesin-APP kolokalizasyonunda anlamlı bir değişikliğin olmadığı, distal aksonda ise bu değişkenler bakımından anlamlı derecede fark gözlenmediği tespit edildi.



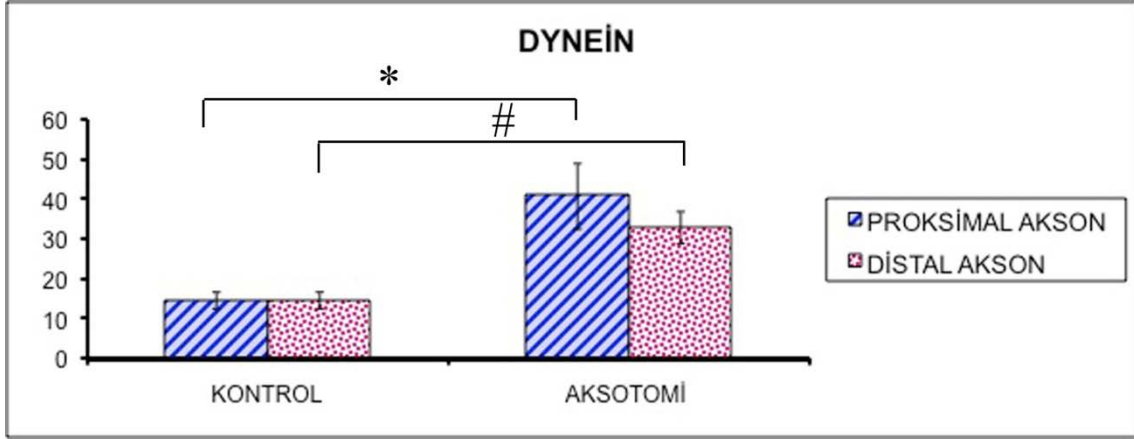
Şekil 4.70. Çekirdek ve proksimal aksonda kinesinin, aksotomi sonrası kontrol grubuna göre miktarındaki artışı gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *: $p<0,05$; #: $p<0,05$).

Aksotomi yapılmış aksone komşu daldan alınan verilerde de, bu değişkenlerin anlamlı derecede değişmediği tespit edildi. Çekirdek ve proksimal aksonda kinesin miktarının, aksotomi ile taşıma yavaşladığı için arttığı gözlemlendi. Görüntülemeye ait fotoğraflar Şekil 4.71’de verilmiştir.



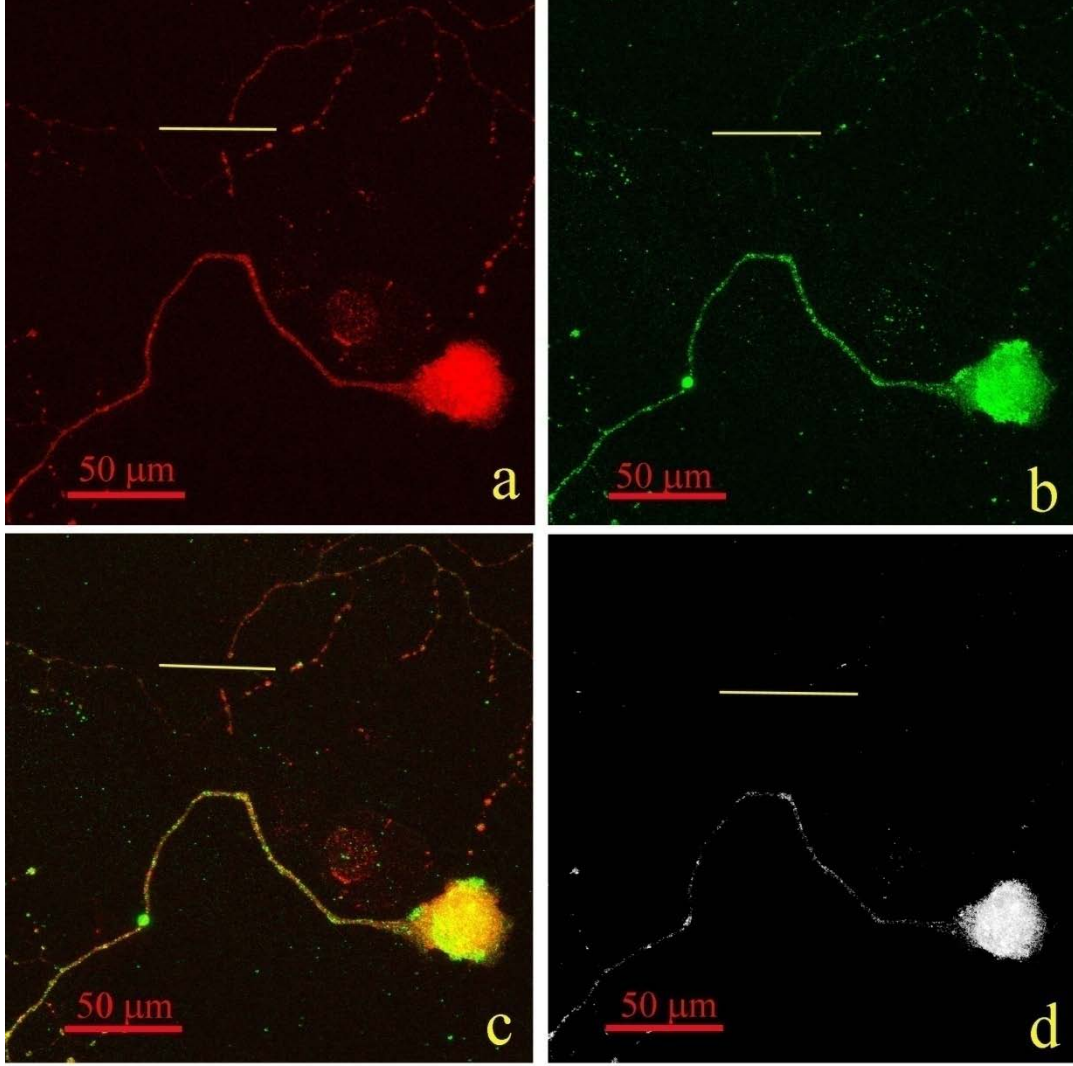
Şekil 4.71. a. APP görüntüsü, b. Kinesin görüntüsü, c. APP ve kinesinin birlikte bulundukları durumun görüntüsü, d. APP ve kinesinin kolokalizasyon görüntüsü.

Retrograd taşımada görevli olan motor protein dynein ile aksonal taşıma belirteci APP'nin, ayrı ayrı ve birlikte bulunma durumlarını değerlendirmek için, görüntülerden elde edilen floresan boyanma şiddetlerinin istatistiksel değerlendirmesine göre, çekirdekte bu değişkenler bakımından anlamlı bir fark gözlenmedi. Gövdede de aynı durum geçerli olup anlamlı bir değişiklik gözlenmedi fakat aksotomi yapılmış nöronun proksimal ve distal aksonunda, dynein miktarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı ($p < 0,05$) (Şekil 4.72), diğer parametrelerde ise anlamlı derecede değişikliğin meydana gelmediği tespit edilmedi.



Şekil 4.72. Proksimal ve distal aksonda dyneinin, aksotomi sonrası kontrol grubuna göre miktarındaki artışı gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *:p<0,05; #:p<0,05).

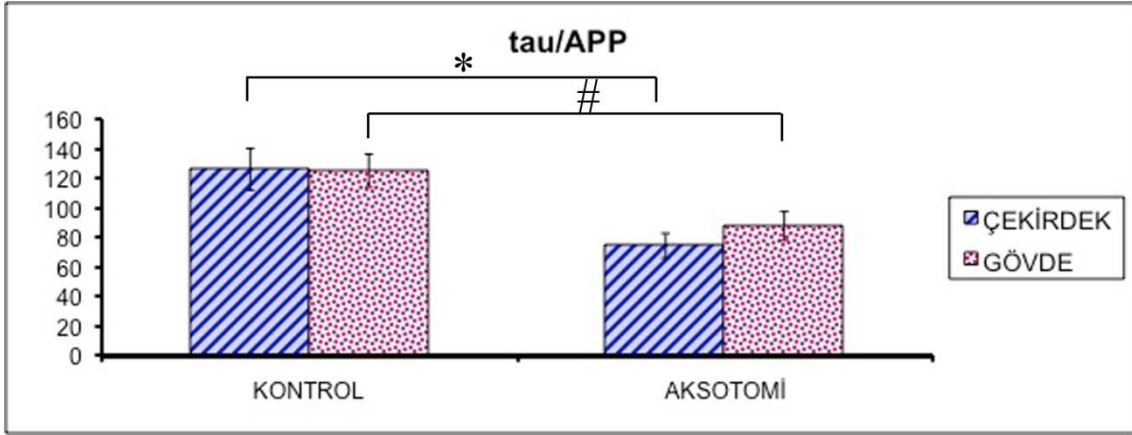
Aksotomi yapılmış aksona komşu daldan alınan verilerde de bu değişkenlerin anlamlı derecede değişmediği gözlemlendi. Görüntülemeye ait fotoğraflar Şekil 4.73’de verilmiştir.



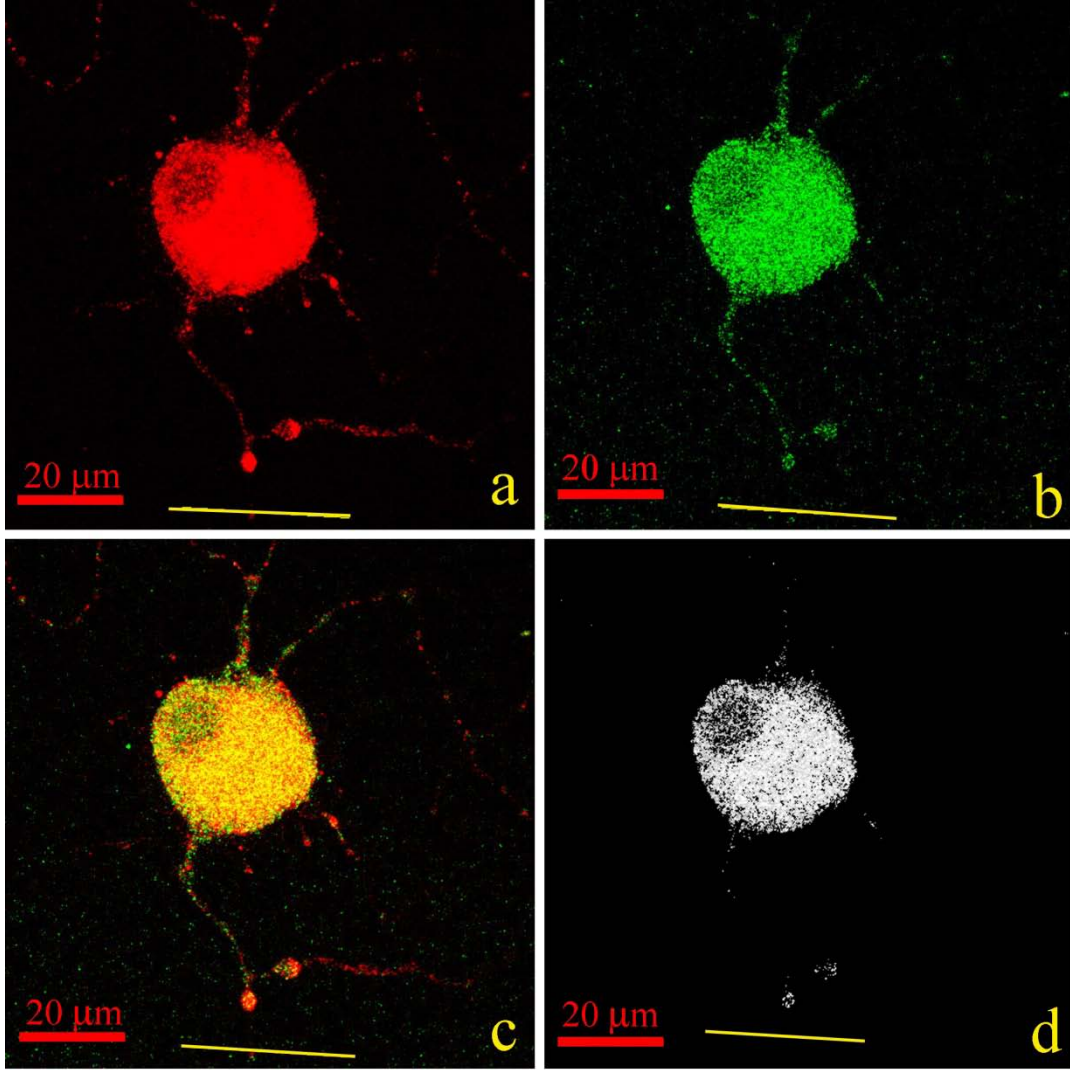
Şekil 4.73. **a.** APP görüntüsü, **b.** Dynein görüntüsü, **c.** APP ve dyneinin birlikte bulundukları durumun görüntüsü, **d.** APP ve dyneinin kolokalizasyon görüntüsü.

Aksonal markır olarak kullanılan ve aksonal taşıma bozulduğunda mikrotübül den ayrılarak stabilizasyonun bozulmasına sebep olan tau proteini ile aksonal taşıma işaretleyicisi olarak kullanılan APP'nin ayrı ayrı ve birlikte bulunma durumlarını değerlendirmek için görüntülerden elde edilen floresan boyanma şiddetlerinin istatistiksel değerlendirmesine göre; çekirdekte, APP ve tau'nun ayrı ayrı bulunma durumlarının kontrole göre anlamlı derecede değişmediği belirlendi ancak aksotomi yapılmış nöronun çekirdeğinde, APP ve tau'nun birlikte bulunma durumlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi ($p < 0,01$) (Şekil 4.74). Aynı durum gövde de mevcut olup APP ve tau'nun birlikte bulunma durumlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p < 0,05$) (Şekil 4.74). Proksimal ve distal

akson kısımlarında, bu özellikler bakımından kontrol grubu nöron aksonları ve kesilmemiş aksonlar arasında anlamlı derecede bir fark bulunmadı. Görüntülemeye ait fotoğraflar Şekil 4.75’de verilmiştir.



Şekil 4.74. Çekirdek ve gövde de tau ve APP’nin birlikte bulunma durumunun aksotomi sonrası kontrol grubuna göre miktarındaki azalışı gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *:p<0,01; #:p<0,05).

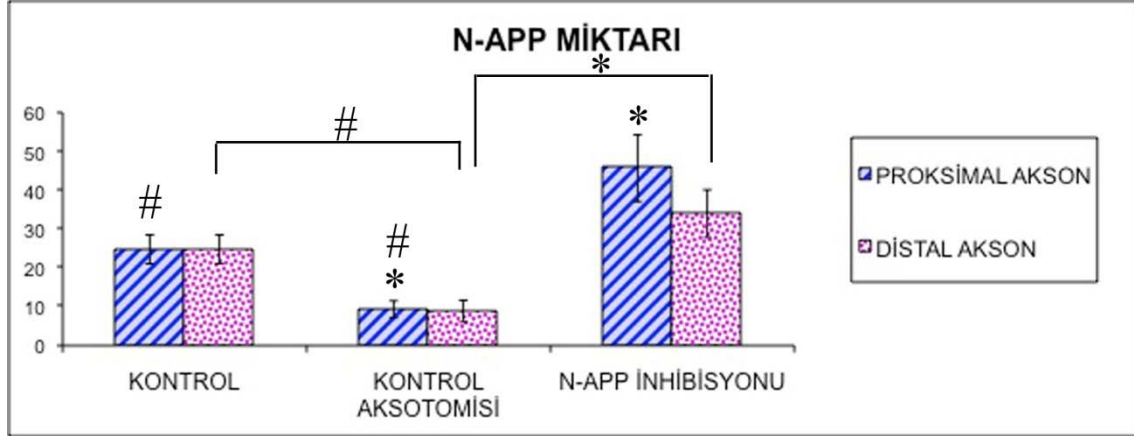


Şekil 4.75. a. APP görüntüsü, **b.** Tau görüntüsü, **c.** APP ve taunun birlikte bulundukları durumun görüntüsü, **d.** APP ve taunun kolokalizasyon görüntüsü.

4.8. APP-DR-6-Kaspaz-6 immünoreaktivitesi

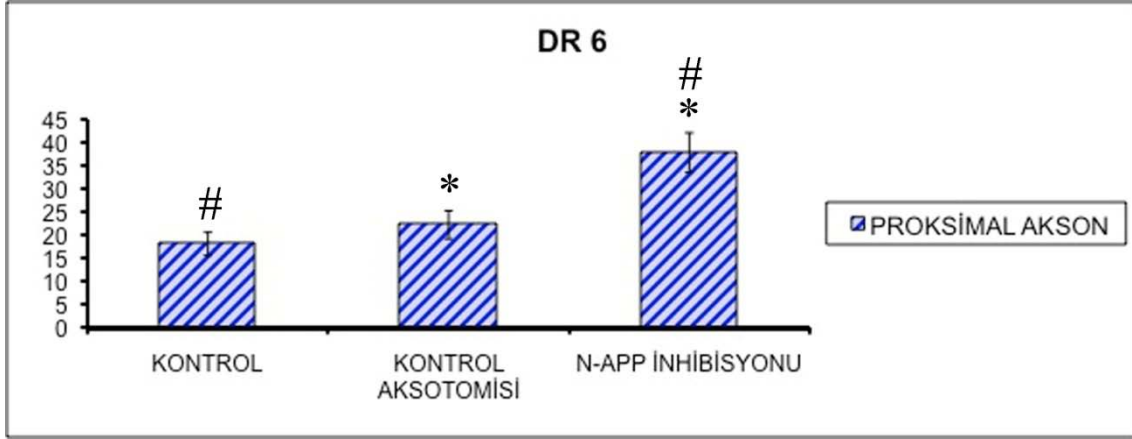
N-APP inhibisyonunun yapıldığı grupta, proksimal akson parçasının N-APP miktarının, kontrol aksotomisi grubunun proksimal akson parçasının N-APP miktarına göre anlamlı derece fazla olduğu belirlendi ($p < 0,01$) (Şekil 4.76). Kontrol aksotomisi grubunun proksimal aksonundaki N-APP miktarının, kontrol grubu proksimal aksonu N-APP miktarından anlamlı derecede az olduğu tespit edildi ($p < 0,01$) (Şekil 4.76). N-APP'nin inhibe edildiği durumda distal aksondaki N-APP miktarının, kontrol grubu aksotomisinin distal aksonundaki N-APP miktarından anlamlı derecede fazla olduğu bulundu ($p < 0,01$). Kontrol aksotomisi distal aksonundaki N-APP miktarının, kontrol

grubu distal aksonundaki N-APP miktarından anlamlı derecede az olduğu bulundu ($p<0,01$) (Şekil 4.76).

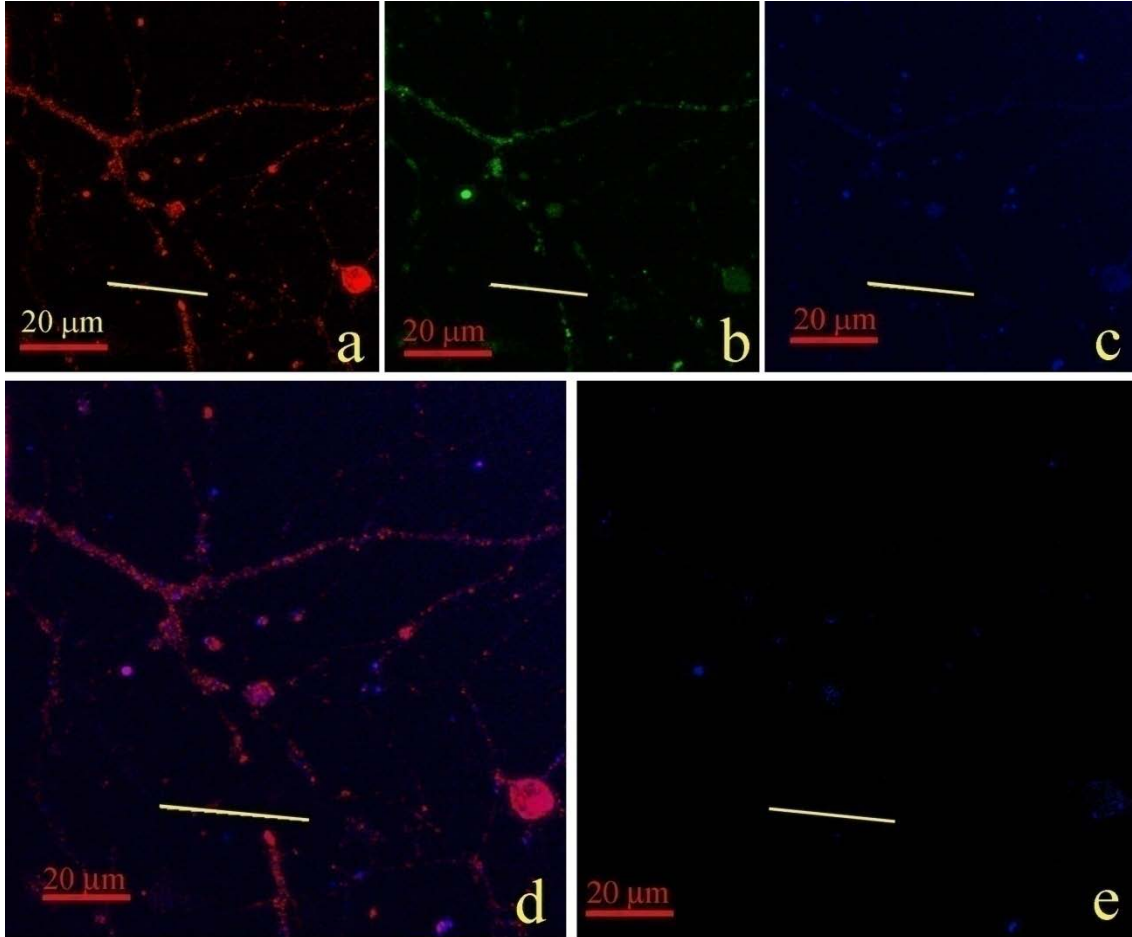


Şekil 4.76. N-APP inhibisyonu yapıldığı durumda, kontrol ve kontrol aksotomisi gruplarında proksimal ve distal akson parçalarında, N-APP miktarlarını gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *: $p<0,01$; #: $p<0,01$).

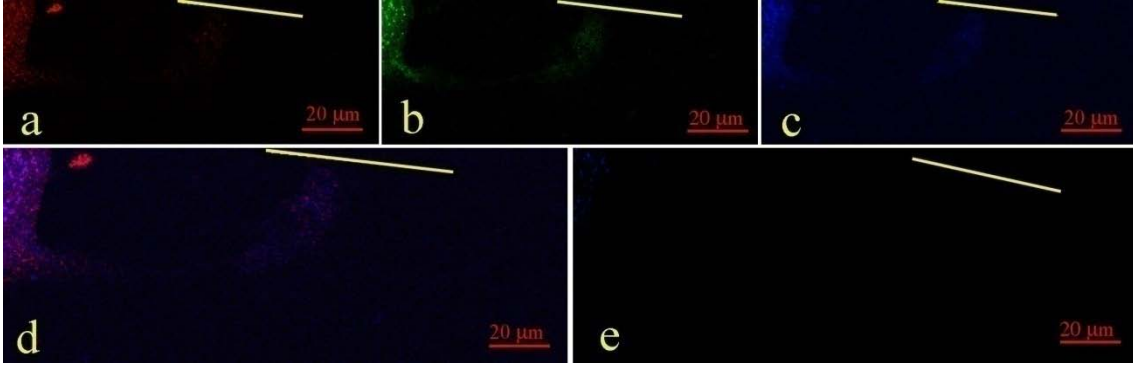
Proksimal ve distal aksonlarda tüm şartlarda, kaspaz 6 miktarında anlamlı bir değişikliğin olmadığı belirlendi. Kontrol aksotomisi ve kontrol grupları arasında DR 6 miktarında anlamlı derecede bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi, fakat N-APP'nin inhibe edildiği durumda aksotomi yapılan nöronun proksimal aksonunda DR 6 miktarının, kontrol aksotomisinin proksimal aksonundaki DR 6 miktarına göre anlamlı derecede fazla olduğu belirlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.77). N-APP'nin inhibe edildiği durumda proksimal aksondaki DR 6 miktarının, kontrol aksonundaki DR 6 miktarına göre de anlamlı derecede fazla olduğu bulundu ($p<0,01$) (Şekil 4.77). Distal aksonda tüm şartlar için, DR 6 miktarında anlamlı bir değişikliğin olmadığı gözlemlendi. Görüntülemelere ait fotoğraflar Şekil 4.78 ve 4.79'de verildi.



Şekil 4.77. N-APP inhibisyonu yapıldığı durumda, kontrol ve kontrol aksotomisi gruplarında proksimal aksonda, DR 6 miktarlarını gösteren grafik (*, #: Birbirleriyle istatistiksel açıdan anlamlı derecede farklı olan sütunları göstermektedir. *:p<0,01; #:p<0,05).



Şekil 4.78. N-APP'nin inhibe edildiği durumda, **a.** N- APP görüntüsü, **b.** Kaspaz 6 görüntüsü, **c.** DR 6 görüntüsü, **d.** N-APP ve DR6'nın birlikte bulundukları durumun görüntüsü, **e.** N-APP ve DR6'nın kolokalizasyon görüntüsü.



Şekil 4.79. Kontrol aksotomisinde, **a.** N-APP görüntüsü, **b.** Kaspaz 6 görüntüsü, **c.** DR 6 görüntüsü, **d.** N-APP ve DR6'nın birlikte bulundukları durumun görüntüsü, **e.** N-APP ve DR6'nın kolokalizasyon görüntüsü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Çalışmada kullanılan yöntemin kritiği

Bu çalışmada çok hassas, tekrarlanabilir ve kontrol edilebilir bir aksotomi yöntemi kullanılarak akson hasarı sonrası aksonal taşımanın nasıl etkilendiği araştırıldı. Bu konu üzerinde çalışan diğer araştırmacılar çalışmalarında, mikropipet ya da kapillar mikroelektrodlar kullanarak aksonal hasar oluşturmuşlardır (Zheng ve ark., 2001; Spira ve ark., 2003). Söz konusu çalışmalar ile karşılaştırıldığında bu çalışmada kullanılan yöntemin daha hassas ve tekrar edilebilir olduğu söylenebilir. Bu konuyla ilgili, *in vivo* çalışmalarda ise arka kök gangliyonu ve bu gangliyonların aksonları, siyatik sinir kesisi ve belli bir süre sonra bu sinirden alınan kesitlerde ya da siyatik sinirin bağlı olduğu AKG'lerden yapılan kültürlerde, aksonal taşımanın nasıl gerçekleştiği araştırılmıştır (Goshima ve ark., 1997; Hanz ve ark., 2003, Brown ve ark., 2003). Hücre kültüründe aksonal taşımayı tam olarak kantifiye etmek mevcut teknik imkanlar ile mümkün değildir. Bu ve bu gibi çalışmalarda kullanılan yöntemin, ortamın sıcaklığının, kültürün yapıldığı hayvanın yaşının, kültürün süresinin sonuçları etkileyebileceği söylenebilir. Bu ve diğer çalışmalarda amaç aksonal taşımaya ilişkin mutlak rakamlar elde etmek değil, çeşitli manipülasyonların aksonal taşımayı nasıl etkilediğini incelemektir.

NGF eksikliğinin ve (Nikolaev ve ark., 2010), antineoplastik ajanların aksonal taşımaya etkisi çalışılmıştır (Goshima ve ark., 2010). Bu çalışmada da aynı nöronda kontrol şartlarıyla aksotomi sonrası taşıma özelliklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, hem antero ve hem de retrograd taşıma ile ilgili analizler yapıldı ve bir yandan da dallanma özelliklerinin aksotomi ile değişen taşımada ne roller oynadığı araştırılmaya çalışıldı. Görüntüleme ışık mikroskopu çözünürlüğü ile sınırlı kaldığı için ancak nispeten daha büyük partiküller ayırt edilebildi ancak tüm ortam şartları (sıcaklık, pH) tavizsiz bir şekilde sabit tutulduğundan aksotomi sonrası meydana gelen değişiklikler kesin doğrulukla tespit edildi. Yaptığımız ön çalışmalarda birkaç derecelik sıcaklık farkının bile taşımayı çok etkilediği gözlemlendi. Bu konuda Grafstein ve ark., (1971) yaptıkları çalışmada sıcaklığın azaltıldığı durumda aksonal taşımanın yavaşladığını tespit ettiler. Ancak konuyla ilgili literatürdeki diğer çalışmaların çoğunda

sıcaklıkla ilgili bilgiye rastlanmamaktadır; bu da söz konusu araştırma sonuçlarına ihtiyatla yaklaşmayı gerektirmektedir.

Kantifikasyonun bazı araştırmacıların (Goshima ve ark., 2010) yaptığı gibi floresan işaretçiler kullanılarak yapılması da mümkündür. Nitekim Goshima ve ark., (2010) CM-DiI ile boyanmış vezikülleri, laser taramalı konfokal mikroskop ile görüntülemişler ve hücre gövdesinden 15 μm uzaklıktaki akson boyunca 1 μm 'lik aralıklarla sanal dikey çizgiler oluşturmuşlar, her 1 μm 'lik aralıktan 2 dk. süresince geçen parça sayısını ve hızını hesaplamışlardır. Çalışma dizaynımıza uygun olarak konfokal mikroskopta 12 dk. boyunca sürekli görüntüleme yapılması fototoksisiteyi ve tekniğe bağlı artefakti beraberinde getirebilirdi. Çalışmamızda ışık mikroskopi gözlemlerinde fototoksisitenin en önemli kaynaklarından biri olan floresan moleküllerin kullanılmaması, görüntülemeye çok düşük bir ışık şiddetinin kullanılması bizim yöntemimizi daha güvenilir kılmıştır. Bu çalışma, yetişkin nöronların kullanılması, kültüre herhangi bir büyüme faktörünün ya da serumun eklenmemesi, akson taşınması ile hücrenin morfolojik özellikleri arasındaki ilişkilerin araştırılması, taşınmanın kantifikasyonunda partiküllerin hareket halinde ve durağan olduğu sürelerin göz önüne alınması gibi teknik üstünlükleri ile öne çıkmaktadır.

Travma sonrası aksonal taşımada meydana gelen değişikliklerle ilgili çalışmalar insanlardan başlayarak primatlar, kemirgenler gibi farklı gruptaki canlılar üzerinde yapılmıştır. Travmatik beyin hasarlarında, travmatik akson hasarı olarak bilinen olay sonucunda aksonların bağlantıları kesilir ve dejenerasyona uğrarlar (Adams ve ark., 1982). Ratlarda oluşturulan travmatik beyin hasarının aksonal taşımayı bozduğu floresan işaretli dekstranlar kullanılarak gösterilmiştir (Stone ve ark., 2004). Fare optik sinirine bası yapılarak meydana getirilen hasardan 4, 24 ve 72 saat sonra oluşan aksonal şişkinlikte nörofilament proteinlerinin yanı sıra diğer hücre iskelet proteinlerinin de azaldığı bildirilmiştir (Serbest ve ark., 2007). Hücre kültürü ve akson hasarı ile ilgili çalışmalarda diğer araştırmacıların çoğu dev aksonları olan *Aplysia*, *Lymnea* gibi omurgasızları tercih etmişlerdir (Gallant ve ark. 2003; Spira ve ark., 2003; Perlson ve ark., 2003; Erez ve ark. 2007). Memelilere göre çok farklı boyut ve yapıya sahip bu modellerden elde edilen sonuçların doğrudan memeli hücreleri için de geçerli varsayılması yanıltıcı olabilir. Bu çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar, yetişkin primer duyu nöronu kültürlerinin kullanılması, aksotomi yönteminin güvenilir,

tekrarlanabilir ve hassas olarak uygulanabilir bir yöntem olması sebebiyle çok daha güvenilir olma potansiyeline sahiptir. Diğer taraftan çalışmamızda kullandığımız görüntüleme yöntemi, objektifin çözünürlüğü ile sınırlı kalmıştır. Bundan dolayı sonuçlar tüm taşınan materyale ait değil, gözlenebilir daha büyük partiküllere aittir.

5.2. Kontrol şartlarında aksonal taşımayla ilgili tanımlayıcı veriler

Çalışma kapsamında tanımlayıcı morfolojik özelliklerle ilgili yapılan analizlerin doğrudan aksonal taşımayla ilgisi olmasa da, bu analizler AKG nöronlarının kültürde gösterdikleri fenotipik özellikler hakkında bir takım yeni sonuçlar ortaya koymuştur. Örneğin, gövdesi küçük nöronların daha fazla sayıda aksona sahip olması, buna karşılık bu aksonların büyük nöronların aksonlarına nispeten daha az dallanma yapması yeni bir bulgudur. AKG nöronlarının boyutları, işlevsel gruplandırmalarında kriter olarak kullanılmaktadır. Buna göre küçük nöronlar daha çok ağrı, büyükler ise titreşim ve hassas dokunma gibi duyuları taşımada görev alırlar (Öztürk, 1999). Bu çalışmada gövde büyüklüğü ve dallanma arasında ortaya konulan ilişkinin canlı hayvandaki karşılığının araştırılması yeni bir takım nöroanatomik özellikleri ortaya çıkarabilecektir.

Aksotomi sonrası meydana gelen geri çekilmenin, çekirdeğin akson hilusuna, dolayısıyla kesim noktasına ne kadar yakınsa o kadar fazla olması oldukça ilginç bir sonuçtur. Hücre boyutunun geri çekilme miktarıyla bir korelasyonunun bulunmaması bu ilişkinin fenotipik özelliklerle ilişkili olmaktan çok, hasar noktasıyla çekirdek arasında aksotomi ile tetiklenen bir haberleşme sürecinin varlığını düşündürmektedir.

Her ne kadar bu çalışmanın amacı aksonal taşıma ile ilgili mutlak rakamlar elde etmek olmasa da, hesaplanan birim zamanda taşınan parçacık sayılarının literatürden farklılık gösterdiğine dikkat çekmek gerekir. Bu, aksonal taşıma çalışmalarında kullanılan dokunun kaynağı, kültür tekniği ve görüntüleme yöntemlerinin bu çalışmaların sonucunu ne denli etkileyebileceğini gösteriyor. Nitekim aynı araştırma grubu farklı görüntüleme yöntemleri kullandıklarında, aynı tip hücrelerden farklı kantifikasyonlar yapmıştır. Goshima ve ark., 1997’de yaptıkları çalışmada fare AKG hücre kültüründe DIC mikroskop ile aksonal taşımanın 2 dk. boyunca görüntülenmesi sonucunda anterograd ve retrograd yönde taşınan parça sayısının 40-50 parça/dk. olduğu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar aksonal taşımayı konfokal mikroskop ile görüntüleyebilmek için embriyonik tavuk AKG hücre kültüründe işaretleyici olarak

CM-DiI kullanmışlar ve hücre gövdesinden 15 μm uzaktan geçen parça sayısını 12-13 parça/dk. olarak hesaplamışlardır (Goshima, ve ark., 2010).

Bu çalışmada, birim zamanda retrograd olarak taşınan görülebilen parçacık sayısı anterograd olarak taşınanların sayısından daha fazla olduğu bulundu. Ancak farklı yönlerde taşınan partiküllerin boyutları arasında genel bir fark olabileceğinden, bunun da görülebilirliklerini etkileyeceğinden bu bulguyu mutlak doğru olarak kabul etmemek yerinde olacaktır.

Çalışmamızda, taşındığı tespit edilen parçaların çoğunun diğer araştırmacıların sonuçlarına paralel olarak sıçramalı tarzda hareket ettikleri gözlemlendi (Trivedi ve ark., 2007; Goshima, ve ark. 2010). Bu çalışmada parçaların hızlarının belirlenebilmesi için duraksamalı ortalama hız (d-hız) ve sürekli ortalama hız (s-hız) olmak üzere iki kategori tercih edildi. Taşınan partikül sayılarındaki önemli farkların aksine, literatürdeki farklı çalışmalarda taşıma hızlarının birbirine yakın değerler olarak rapor edildiği ve bu hızların daha çok d-hız olarak hesaplandığı görülmektedir. Bir karşılaştırma yapıldığında bizim hesapladığımız anterograd taşınan parçaların d-hızı Goshima, ve ark., (2010)'larının hesapladıkları değerlere göre daha yavaş olduğu ve retrograd olarak taşınan parçaların d-hızının ise yakın olduğu bulundu. Hesaplanan iki hız tipi karşılaştırıldığında retrograd taşımada hareket sırasındaki duraksamaların, anterograd taşımaya göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bu oldukça yeni bir bulgudur ve önemli ve güncel bir araştırma alanı olan motor protein mekanizmaları ile ilgili yeni ipuçları vermektedir.

Her iki yöne taşınmanın büyük nöronlarda daha hızlı gerçekleştiği bulgusu, bu nöronların daha kalın aksonları için daha yoğun bir materyal trafiğine ihtiyaç duyacağı gerçeği ile açıklanabilir. Öte yandan akson çapının artışıyla taşıma hızları arasındaki ilişkinin daha farklı olduğu gözlemlendi. Buna göre kalın aksonlarda retrograd taşınmanın daha hızlı olduğu, ancak anterograd taşınmanın akson çapından etkilenmediği bulundu. Retrograd taşımada izlenen partiküller genel olarak çok daha büyüktü; buna bağlı olarak taşıma sırasında karşılaştıkları direncin anterograd taşınan parçalara göre daha fazla olması beklenebilir. Akson çapı arttıkça bu direnç azalacak, bundan da en çok retrograd taşınan büyük partiküllerin fayda görerek daha hızlı taşınacakları düşünülebilir. Çekirdek hilustan ne kadar uzaksa retrograd taşınmanın o denli hızlı olması bulgusu, gövde büyüklüğü ile ilişkili dolaylı bir mekanizmayla açıklanabilir. Buna göre aslında

çekirdeğin hilustan uzak olması, nöron gövdesinin daha büyük olmasından olup, retrograd taşımayla ilişkili bulunan korelasyon aslında hücre gövde büyüklüğü ile ilişkili korelasyonu yansıtmaktadır.

Dallanma distalinde yapılan ölçümlerin, yukarıda yorumlanan proksimalinde dallanma bulunmayan aksonlara ait olan ölçümlerden oldukça farklı sonuçlar ortaya koyduğu gözlemlendi. Burada dikkati çeken ilk özellik, dallanmaların taşınan partiküllerin duraksama sürelerini önemli derecede etkilediği ve bunun, her iki yöne olan taşıma için de geçerli olduğuydu. Bununla birlikte etkilenmenin niteliğinin taşınma yönüne göre farklılık göstermesiydi. Bu bağlamda ilginç bir bulgu ise, akson çapının artmasıyla anterograd taşınan parçacıkların duraksama sürelerinin uzamasıdır (azalmış d-hız). Elimizdeki ve literatürdeki mevcut verilere dayanarak bu gözlemi yorumlamak mümkün gözükmemektedir. Açıklanması güç diğer bir bulgu ise anterograd s-hızın, büyük ve fazla sayıda aksonu olan nöronlarda daha yüksek olmasıdır. Bir aksonun dalında parçacıkların retrograd taşıma sırasındaki duraksamanın, akson sayısı fazla olan nöronlarda daha fazla olduğu gözlemlendi. Oldukça karmaşık gibi gözükse de bu ilişki retrograd taşınan parçaların hücre gövdesine ulaştıktan sonra işleminden geçtiğine dair ipuçları verebilir. Buna göre hücre gövdesine aksondan ne kadar çok parçacık taşınırsa, merkezde bu parçacıkların o kadar yoğun işlendiği söylenebilir. Ana akson şaftındaki trafik bu yoğunluktan çok fazla etkilenmezken, yan dallardan katılan parçacıklar duraksatılarak ana şafttaki trafiğe geçişleri daha kontrollü olarak gerçekleşiyor olabilir.

5.3. Akson hasarı sonrası aksonal taşıma ile ilgili bulgular

Aksotomiye içeren *in vitro* deney modellerinde daha çok hasar sinyal mekanizmalarının aksonda taşınımı ya da hücre iskelet elemanlarının yıkımına bağlı olarak, aksonal taşımanın nasıl etkilendiği ele alınmıştır (Spira ve ark., 2003; Hanz ve ark., 2003). Aksotomi sonrası taşınan parça sayısındaki değişiklikler ve taşınan parçaların hızları ile ilgili çalışmalar oldukça az sayıdadır. Bunlardan birinde, *in vivo* ortamda, aksonal taşıma ile ilgili yapılan bir çalışmada, travmatik akson hasar modeli olarak rat optik sinire baskıyla hasar oluşturulmuş, bu hasar sonucunda retrograd taşımanın, nörofilament proteinlerinin ve spektrinin nasıl etkilendiği 14 gün boyunca belli aralıklarla takip edilmiştir. Çalışmada retrograd olarak taşınan florogold işaretleyicisi kullanılmış ve hasardan 1 gün sonra retinal gangliyon hücre sayısının

önemli derecede azalmasına bağlı olarak retrograd taşımanın bozulduğu gösterilmiş ve 14 gün sonra ise aksonal dejenerasyonla nörofilament kaybı tam olarak belirlenmiştir (Saatman ve ark., 2003).

Çalışmamızda, dalsız aksonlarda aksotomi sonrasında, öncesine göre anterograd taşınan parçaların sayısında bir değişim meydana gelmezken, ortalama s-hızlarının anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (Bkz. Şekil 4.24). Aynı şartlarda retrograd taşınan parçaların hem sayıları hem de ortalama d- ve s-hızlarının anlamlı derecede azaldığı belirlendi (Bkz. Şekil 4.25). Aksotomi sonrası anterograd ve retrograd yönde taşınan parçaların yavaşlamalarına dair bu bulguları, kinesin ve dyneinin proksimal aksonda immünohistokimyasal olarak, kontrole göre anlamlı derecede daha yüksek miktarda tespit edilmesi desteklemiştir. Bu bulgular akson hasarının farklı yöndeki taşımaları farklı şekilde etkilediğini ilk kez ortaya koymaktadır. Başka yeni bulgu ise aksotomi sonrası her iki yönde taşımanın yavaşladığı ancak anterograd taşımada bu yavaşlamanın azalan duraklama süresi ile kompanse edilerek birim zamanda taşınan parçacık sayısının sabit tutulması olduğudur. Anterograd taşımanın bu şekilde korunmaya çalışılması, tamir ve muhtemel bir rejenerasyon için materyal teminine yönelik olabilir.

İstatistiksel analizlerin ortaya koyduğu diğer anlamlı sonuçları doğru bir şekilde yorumlayabilmek için bu spesifik durumları ortaya çıkaran daha ayrıntılı deneylerin yapılması gerekmektedir. Çalışılan durumların çeşitliliği ve veri elde etme sürecinin oldukça zaman alması, bazı ikincil verilerin daha ileri çalışmalara yol göstermeden öteye geçememesinin temel sebebi olmuştur. Örneğin aksotominin gövdeden ne kadar uzakta yapıldığı farklı yöndeki taşımaları ve d-hız ve s-hızı farklı farklı etkilemiştir. Aksotomi sonrası gözükten retraksiyon sırasında retrograd taşımanın daha hızlı çalıştığı, bunun da duraksama sürelerinin azalmasıyla sağlandığı, bir başka önemli ve ilginç bulgu olmuştur. Bu, retraksiyonun aktif bir işlem olduğunu, hızlanan retrograd taşımanın muhtemelen hücrel materyallerin korunmasına yönelik olduğunu düşündürmektedir.

Bu çalışmada, hasar gören bir aksonda meydana gelen değişikliklerin nöronun diğer aksonlarında, yani hücrenin tümünde aksonal taşımayı etkileyip etkilemediği de araştırıldı. Bu amaçla yapılan analizler aynı zamanda aksotomi ile tetiklenen hasar mesaj sisteminin lokal mi yoksa bütüncül mü olduğu hakkında fikir verecekti. Bununla ilgili söylenebilecek en net sonuç gerek kesilen aksonun proksimalindeki dallarda,

gerekse gövdeden çıkan diğer aksonlarda taşımanın ne hız ne de partikül sayısı olarak etkilenmediği gözlemdir. Bu, nöronun her uzantısını etkileyen ya da kesilen komşu aksondan sıçrayarak sağlam dallarda taşımayı bozan bir mesajın varlığı ihtimalini oldukça azaltmaktadır. Öte yandan aksotomi ile birlikte nöronun genelinde, kesilmeyen akson ve dallarda daha önce mevcut olmayan bazı korelasyonların ortaya çıktığı gözlemlendi. Bunlar, genellikle aksotomiye komşu olan dalda taşıma hızları ve nöronun genel morfolojisiyle ilişkili olup doğru şekilde yorumlanmaları daha ileri araştırmaları gerektirmektedir.

Bu çalışmada kinesin ve dyneinin yanı sıra aksonal taşıma belirteci olan APP'de immünohistokimyasal olarak belirlendi. Aksotomi yapılmış nöronda kontrol grubuna göre APP miktarının değişmediği gözlemlendi. Aksonal taşıma ile ilişkili olarak APP'nin anterograd olarak taşındığı ve aksonal taşıma bozukluklarında, aksonal taşıma belirteci olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Sheetz ve ark., 1998; Stone ve ark. 2004). Normalde hızlı bir şekilde taşınan APP'ler aksonal sferoid ve varikozitelere birikir, bu da aksonal taşımanın bloklanmasına yönelik immünohistokimyasal bir markır olarak kullanılmasına olanak sağlar. Alzhemier hastalığı gibi hastalıklarda hasarlanan aksonal taşımada yalnızca APP birikmez, ayrıca APP biriken bölgelerde amiloid plak oluşumları gözlenir (Coleman, 2005). Fosforile olmuş APP ve c-Jun NH₂ terminal kinaz ilişkili protein 1 (JIP-1)'in birlikte aynı vezikül içerisinde kinesin tarafından taşındığı tespit edilmiştir (Muresan ve Muresan 2005). Bu çalışmada, APP miktarının ve APP ile kinesinin birlikte bulunma durumlarının aksotomi sonrasında, öncesine göre değişmemesi, *in vitro* çalışmada APP'nin aksonal taşıma markırı olarak tercih edilmesinin tekrar gözden geçirilmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda, aksotomi yapılan nöronun çekirdeğinde ve gövdesinde APP ve tau'nun birlikte bulunma durumu, kontrol grubuna göre anlamlı derecede az bulundu, ancak tau'unun tek başına bulunma durumu kontrol grubuna göre değişiklik göstermedi. Farklı bir çalışmada, fosforile tau ve APP plaklarının bir arada bulunduğu tespit edilmiştir (Perez ve ark. 2008). Diğer bir çalışmada ise, Oblinger ve ark., (1991), aksotomi yapılan AKG nöronlarında tau mRNA'sı ve ekspresyonunda azalma olduğunu bildirmişlerdir. Alzheimer hastalığında önemli olan tau patojenitesi ile APP birikiminin birlikte ele alındığı bir çalışmada, tau'nun fazla ekspresyonunun aksonlarda APP taşınmasını engelleyerek patojeniteye sebep olduğuna dair bulgular elde edilmiştir

(Stamer ve ark., 2002). Çalışmamızda tau ve APP'nin birlikte azalması aksotomi sonrası tau ve APP'nin hem taşınmasındaki hem de miktarındaki azalmalara atfedilebilir.

Çalışmamızda transkripsiyon ve translasyonun inhibe edildiği durumda, aksotomi sonrası taşınan parçaların etkilenip etkilenmediği araştırılırken çok önemli bulgular elde edildi. Normal şartlarda anterograd olarak taşınan parça sayısı aksotomi sonrasında değişmezken; DRB ile transkripsiyonun inhibe edildiği durumda, anterograd olarak taşınan parça sayısının, aksotomi sonrasında öncesine göre anlamlı derecede azalması, hasarla birlikte anterograd taşınmanın sürdürülebilmesi için gen ekspresyonu seviyesinde bir kontrol mekanizmasının gerekli olduğunu, düşündürmektedir. Normal şartlarda retrograd olarak taşınan parça sayısının aksotomi sonrası öncesine göre azaldığı ve bu durumun transkripsiyonun inhibe edildiği durumda da değişmemesi, retrograd taşımada anterograd taşımadaki gibi bir durumun olmadığını düşündürmektedir.

Translasyon anisomisin ile inhibe edildiğinde, kontrol şartlarındaki anterograd taşıma sonuçları ile aynı sonuçların elde edilmesi transkripsiyonun inhibe edildiği durumda yaptığımız yorumu doğrular nitelikte olup, translasyon seviyesindeki inhibisyonun anterograd taşınmanın etkilenmediği şeklinde yeni bir bulguya erişilmiş oldu. Aksotomi retrograd taşınan parçaların sayısını azaltırken, translasyon inhibisyonunun bu azalmayı engellediği gözlemlendi. Bu durum, retrograd taşımayı yavaşlatan sinyal mekanizmasında protein translasyonunun rol oynadığını düşündürmektedir. Uzunca bir süre bütün proteinlerin hücre gövdesinde sentezlenerek anterograd aksonal taşıma ile nöronların uzak bölgelerine iletiliğinin bilinmesiyle birlikte, daha sonraki zamanlarda bir takım proteinlerin özel durumlarda aksonda lokal olarak sentezlendiği tespit edilmiştir (Dalhstrom, 2010). Bu konuyla ilgili çalışmalar 1960'lara kadar dayanmaktadır (Edström ve Sjöstrand 1969). Aksonal RNA'lar arasında translasyon faktörleri, ribozomal proteinleri kodlayan mRNA'lar da bulunmaktadır (Willis ve ark., 2006). Travma gibi durumlarda aksondaki lokal protein sentez oranı değişebilir (Dalhstrom, 2010). Akson hasar bölgesinde aksotomiden sonra, aksoplazmik proteinler translasyon sonrası modifikasyonlara uğrayarak (fosforilasyon, düzenli ve kesikli proteolizis) ve ayrıca lokal protein senteziyle retrograd olarak taşınım pozitif hasar sinyal mekanizmasını oluştururlar (Ambron ve ark., 1996; Zhang ve

Ambros 2000; Perlson ve ark., 2003; Yaakov ve Fainzilber 2004; Hanz ve Fainzilber, 2006). Sinyalin nukleusa iletilebilmesi için taşıyıcı reseptörlerin varlığı ve enerjiye gereksinim vardır. İmportin ailesi içinde yer alan α importin ve β importin heterodimer oluşturarak çekirdeğe sinyal taşırlar (Weis, 2003). Farklı bir çalışmada α importinin miktarında hasar öncesi ve sonrası arasında önemli bir değişiklik olmazken, β importinin lokal translasyonunun hasar sonrasında zamanla arttığı gösterilmiştir (Hanz ve ark., 2003). Çalışmamızda da translasyon inhibe edildiğinde aksotominin sebep olduğu lokal protein sentezi ve β importin sentezi yapılamadığı için hasar sinyal kompleksinin oluşmadığı ve çekirdeğe bu sinyalin iletilemediği, hasar sinyalinin çekirdeğe iletilememesinden dolayı retrograd taşınan parça sayısında bir değişimin meydana gelmediği sonucuna varılabilir.

Çalışmamızda kullandığımız model de aksotomi öncesi ve aksotomi sonrası α ve β importinin ayrı ayrı ve birlikte bulunma durumlarını değerlendirmek için yapılan immünohistokimyasal boyama sonuçlarının oldukça şaşırtıcı olduğu görüldü. Aksotomi yapılan nöronların çekirdeğinde ve sitoplazmasında kontrol grubuna göre importin anlamlı derecede azalırken, β importin ve α/β importin kompleksinin anlamlı derecede değişmediği gözlemlendi. Kesilen aksonun proksimal bölgesinde herhangi bir değişim meydana gelmezken, çekirdek ve sitoplazmadakine benzer şekilde distal bölgede de α importinin anlamlı derecede azaldığı, β importin ve α/β importin kompleksi seviyesinde herhangi bir anlamlı değişimin meydana gelmediği tespit edildi. Oysaki daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda β importin ve α/β importin seviyesinde aksotomi sonrası anlamlı bir artışın olduğu gözlenmiştir (Hanz ve ark., 2003; Hanz ve Fainzilber, 2004). İmportinlerden α importin in, hem sağlam hem de hasara uğramış siyatik sinirde bulunduğu ve dynein motor proteinine bağlandığı bilinmektedir. Bununla birlikte β importin normal şartlarda siyatik sinir aksoplazmasında bulunmazken, importinin mRNA'sı bulunmaktadır. Hasar sonrası bu mRNA'lar lokal olarak hızla translasyona uğrar ve β importini oluştururlar. Bu sentez sonrasında α/β importin heterodimeri retrograd motor proteine ve NLS bağlı sinyal proteinine bağlanarak nukleusa taşınır (Hanz ve Fainzilber, 2004). α importin seviyesinde hasar öncesi ve sonrasında önemli bir değişiklik meydana gelmediği ancak β importinin lokal translasyonunun hasar sonrasında zamanla arttığı bildirilmiştir (Hanz ve ark., 2003). Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz sonuçların, var olan sonuçlardan bu kadar farklı çıkmasını tam olarak

yorumlayamıyoruz. Ancak yaptığımız çalışmada immünohistokimya uygulaması için tespit işlemini, β importinin hasardan sonra ortalama 30 dk- 1 saat'lik süre içinde, importin dynein kompleksinin hasardan sonra ortalama 2 saatlik sürede olduğu bilgisi göz önüne alınarak, aksotomiden 3 saat sonra gerçekleştirdik. Nitekim, Ohara ve ark., (2011) yaptıkları çalışmada, hipokampal nöronlara aksotomi yapılması ardından, importin seviyesinin aksotomiden 1 saat sonra proksimal akson ve hücre gövdesinde arttığını belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada, hem β importin hem de α/β importin kompleksini belirleyebilmek için, tespit süresini daha uzun uygulamamız ve kullanılan yöntem farklılığı bu moleküllerin artışını yakalayamama sebebi olabilir.

Aksotomi sonrası oluşan hasar sinyallerinden biri de depolarizasyon dalgasının oluşmasıdır. Berdan ve ark. (1993), bir yumuşakça olan *Helisoma trivolis*'in bukkal gangliyonlarında yer alan B5 nöronlarının özafagal sinirlerine akson hasarı oluşturduklarında, hasar sonrası hızlı bir depolarizasyon dalgasının meydana geldiğini ve buna aksiyon potansiyelinin eşlik ettiğini tespit etmişlerdir. Akson hasarına elektrofizyolojik cevabın patch-clamp (yama kısıpacı) ile kayıt edildiği delinme sonucu oluşturulan hasarın aksiyon potansiyeli oluşturduğu ve elektrofizyolojik cevabın gövdenin hasardan hızlı bir şekilde haberdar olmasını da sağladığı belirlenmiştir (Mandolesi ve ark., 2004). Hasar sonrasında depolarizasyon dalgasını gösteren farklı bir çalışmada DIBAC depolarizasyon dalgası ile birlikte daha çok hücre gövdesi çevresinde, floresan boyanma şiddetinin arttığı bulunmuştur (Kiedrowski, 1999). Hücre depolarize olduğunda DIBAC'ın hücre içine girişi artarak ve hücre içindeki lipid ve proteinlere bağlanması sonucunda floresan şiddeti atmaktadır. Hücre hiperpolarize olduğunda ise DIBAC hücreden dışarı çıkmakta ve protein ile lipidlere bağlı DIBAC konsantrasyonu azaldığında floresan şiddeti de azalmaktadır (Kiedrowski, 1999; FLIPR, 1999). Benzer olarak bu çalışmada aksotomi sonrası, aksotomi öncesine göre DIBAC ile boyanma şiddetinin gövde ve çekirdekte anlamlı derecede arttığı belirlendi. Bununla birlikte proksimal ve distal aksonda DIBAC'ın floresan şiddetinde anlamlı derecede bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.67). Çalışmamızda aksotomi öncesi nöron görüntüsü laser taramalı konfokal mikroskopta alındıktan sonra aksotomi yapılması için laser mikrodiseksiyon mikroskobuna götürülüp aksotomi işlemi gerçekleştirildi. Aksotomi yapıldıktan sonra tekrar görüntü alınabilmesi için laser taramalı konfokal mikroskoba geçilerek nöronun görüntülenmesi sağlandı. Aksotomi ile DIBAC'ın içeriye giriş oranı

artsa da laser taramalı konfokal mikroskopta görüntüleme gerçekleşene kadar geçen süre içinde proksimal ve distal aksonun repolarize olma ihtimalinden dolayı, DIBAC'ın hücre içi konsantrasyonunun eski seviyesine geri dönmesine bağlı olarak boyanma şiddeti değişmemiş görünebilir. Literatürdeki bilgilere de paralel olarak bu grupta yaptığımız deneyler, aksonal hasarla ortaya çıkan depolarizasyonun hücre gövdesine kadar iletilmediğini ve bu özelliği ile bir sinyal mekanizması olarak işlev görebileceğini ortaya koymaktadır.

Nöronal bağlantıların düzenlenmesinde ve hücre ölümü meydana gelişinde APP ve ölüm reseptörü DR6, kaspaza bağımlı olarak aktive olmaktadır (Nikolaev ve ark., 2009). Nörotrofik faktör eksikliğine bağlı olarak betasekretazın (BACE) uyarılması sonucunda APP'nin parçalanıp N-APP oluşturduğu gözlenmiştir. DR6 ise, hem hücre gövdesinde hem de aksonda bulunur. N-APP'nin, DR6'ya bağlanarak onu aktifleştirmesi sonucunda, hücre gövdesinde kaspaz 3, aksonda ise kaspaz 6 uyarılır ve hem aksonda hem de hücre gövdesinde dejenerasyon başlar. N-APP'nin, kaspaz 6'nın ve BACE'nin inhibe edilmesi, dejenerasyonu engellemektedir (Nikolaev ve ark., 2009). Bu çalışmada Nikolaev ve ark., (2009)'nın deneylerinde kullandıkları bütün immünohistokimyasal ajanlar birebir temin edilerek deney modelimizde uygulandı. Farklı olarak çalışmamızda embriyonik hücre kültürü yerine yetişkin primer duyu nöron kültürü kullanıldı ve hücreler için trofik faktör eksikliği yerine aksotomi uygulanıp mekanizmanın işleyişi incelendi. Çalışmamızda, N-APP inhibisyonunun gerçekleştirildiği grupta aksotomi yapılmış nöronların proksimal akson parçalarında N-APP miktarı, kontrol aksotomisi proksimal akson N-APP miktarına göre anlamlı derecede fazla bulundu ($P<0,01$). Bu sonuç, sentezi yapılan ancak inhibisyon etkisiyle ortamda fonksiyonel olmayan N-APP'lerin birikmesi sonucunda oluşmuş olabilir. N-APP miktarının, kontrole ait aksotomisi yapılan proksimal parçada, kontrol grubu N-APP miktarına göre anlamlı derecede az bulunması ise, kontrol aksotomisinde N-APP'lerin ölüm reseptörü DR6'ya bağlanması sebebiyle ortaya çıkmış olabilir ($P<0,01$). İmmünohistokimyasal olarak Kaspaz 6 ve DR6 boyanmasında anlamlı değişikliğin olmadığı belirlendi. N-APP inhibisyonunun gerçekleştirildiği grupta aksotomi yapılmış nöronların distal akson parçalarında da proksimal akson parçalarında olduğu gibi N-APP miktarı, kontrol aksotomisine göre anlamlı derecede fazla olduğu bulundu ($P<0,01$). N-APP inhibisyonunun gerçekleştirildiği durumdaki aksotomi yapılmış

proksimal akson parçasında DR6 miktarının, kontrol aksotomisi ve kontrole göre anlamlı derecede fazla olduğu tespit edildi. N-APP inhibisyonu gerçekleştirildiğinde, DR6 miktarının kontrole göre fazla belirlenmesi DR6' ya bağlanma yüzeylerinin boş kalmasından kaynaklanabilir. Benzer olarak farklı bir çalışmada ise aksotomi uygulaması ve toksik madde uygulamalarında N-APP/DR6/Kaspaz6 yolunun aktive olmadığı bildirilmiştir (Vohra, ve ark. 2010). Yukarıda özetlenen verilere dayanarak biz de aksotomi ile hasar durumunda kaspaz 6 yolunun aktive olmadığını söyleyebiliriz.

5.4. Sonuç ve Yorum

Sonuçlar şu şekilde özetlenebilir;

1. Aksonlarda taşınan parçaların hızı, nöronun sahip olduğu morfolojik özelliklerle ilişkilidir.
2. Aksotomi ile hasarlanan aksonda anterograd olarak taşınan parça sayısı aksotomi öncesine göre değişmemekte ancak ortalama hızı azalmaktadır. Retrograd olarak taşınan parçaların ise aksotomi sonrası hem sayısı hem de ortalama hızı azalmaktadır.
3. Retrograd taşıma aksotomiden, anterograd taşımadan daha fazla etkilenmektedir.
4. Aksotominin yapıldığı aksona komşu olan dal da ve aksonda, taşınan parçaların sayı ve hızlarında anlamlı bir değişim meydana gelmemektedir.
5. Anterograd olarak taşınan parça sayısı, transkripsiyon inhibe edildiğinde aksotomi sonrasında, aksotomi öncesine göre anlamlı derecede azalmaktadır. Bu da anterograd taşımanın aksotomi sonrası gen ifadesine bağlı bir mekanizmayla düzenlediğini düşündürmektedir.
6. Retrograd olarak taşınan parça sayısı, translasyon inhibe edildiğinde aksotomi sonrasında, öncesine göre değişmemektedir. Bunun sebebi lokal protein sentezinin engellenerek gövdeye mesaj iletmesinin kesintiye uğraması olabilir.
7. Aksotomi sonrası hücre gövdesinde kuvvetli depolarizasyon olduğu ve bunun bir hasar sinyal mekanizması olarak işlev görebileceği tespit edildi.
8. Aksotomi sonrası β importin ve α/β importin kompleksinin artmasını beklerken, aksotomi sonrası çekirdekte ve distal aksonda α importinin azaldığı, gövdede ise α importin ve α/β importin kompleksinin azaldığı tespit edildi.

9. Aksonal taşıma işaretleyicisi olan APP'nin akson hasarı sonrası kontrole göre miktarının değişmediği gözlemlendi.
10. Nörotrofik madde eksikliğinde aktive olan N-APP/DR6/Kaspaz6 yolu, mekanik hasarla oluşturulan aksotomi sonrasında aktive olmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Abe N., Cavalli V., 2008. Nerve injury signaling. *Current Opinion in Neurobiology*, **18**:276–283.
- Adams J.H., Graham D.I., Murray L.S., Scott G., 1982. Diffuse axonal injury due to nonmissile head injury in humans: an analysis of 45 cases. *Ann. Neurol.* **12**(6):557-63.
- Almenar-Queralt A., Goldstein L. S.B., 2001. Linkers, packages and pathways: new concepts in axonal transport. *Current Opinion in Neurobiology*, **11**:550–557.
- Amano R., Hiruma H., Nishida S., Kawakami T. Shimizu K., 2001. Inhibitory effect of histamine on axonal transport in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience Research*, **41**:201–206.
- Ambron R.T., Zhang X., Gunstream J.D., Povelones M., Walters E.T., 1996. Intrinsic injury signals enhance growth, survival, and excitability of *Aplysia* neurons. *The Journal of Neuroscience*, **16**(23):7469–7477.
- Anonim, 2011. The cytoskeleton. <http://users.rcn.com/~jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/C/Cytoskeleton.html>. Eriřim tarihi:6.10.2011.
- Anonim, 2011. Microtubule motors. <http://rpi.edu/dept/bcbp/molbiochem/MBWeb/mb2/part1/kinesin.htm>. Eriřim tarihi: 6.11.2011.
- Arvidsson J., Ygge J., Grant G., 1986. Cell loss in lumbar dorsal root ganglia and transganglionic degeneration after sciatic nerve resection in the rat. *Brain Res.*, **373**:15–21.
- Atalay Öz F., Üstün H., 2004. Neuronal degeneration, regeneration in peripheral nervous system and new treatment modalities in neurodegenerative diseases. *Fiziksel Tıp*, **7**(3): 157-162.
- Ben- Yaakov K., Fainzilber M., 2009. Retrograde injury signaling in lesioned axons. *Results Probl. Cell Differ.*, **48**:327-38.
- Berdan R.C., Easaw J.C., Wang R., 1993. Alterations in membrane potential after axotomy at different distances from the soma of an identified neuron and the effect of depolarization on neurite outgrowth and calcium channel expression. *J. Neurophysiol.*, **69**:151–164.

- Beuche W., Friede R.L., 1986. Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration of peripheral nerves depends on silica-sensitive bg/bg negative and Fc-positive monocytes. ***Brain Res.***, **378**:97-106.
- Bleher R., Martin R. 2001. Riosomes in the squid giant axon. ***Neuroscience***, **107**(3):527-534.
- Bloom G.S., Wagner M. C., Pfister K. K., Brady S. T., 1988. Native structure and physical properties of bovine brain kinesin and identification of the ATP-binding subunit polypeptide. ***Biochemistry***, **27**: 3409–3416.
- Bradke F., Dotti C.G., 2000. Differentiated neurons retain the capacity to generate axons from dendrites. ***Current Biology***, **10**:1467–1470.
- Brimijoin WS., 1982. Abnormalities of axonal transport: are they a cause of peripheral nerve disease? ***Mayo Clin. Proc.***, **57**(11):707-14.
- Bronfman F.C., Escudero C.A., Weis J., Kruttgen A., 2007. Endosomal transport of neurotrophins: Roles in signaling and neurodegenerative diseases. ***Dev. Neurobiol.***, **67**(9):1183-203.
- Brown A., 2003. Axonal transport of membranous and nonmembranous cargoes: a unified perspective. ***The Journal of Cell Biology***, **160**(6): 817-821.
- Brown J.R., Stafford P., Langford GM., 2004. Short-range axonal/dendritic transport by myosin-V: A model for vesicle delivery to the synapse. ***J. Neurobiol.***, **58**(2):175-88.
- Brown M.E., Bridgman PC., 2004. Myosin function in nervous and sensory systems. ***J. Neurobiol.***, **58**(1): 118-30.
- Buki A., Siman R., Trojanowski J.Q., Povlishock J.T., 1999. The role of calpain-mediated spectrin proteolysis in traumatically induced axonal injury. ***J. Neuropathol. Exp. Neurol.***, **58**(4):365-75.
- Bussmann K.A.V., Sofroniew M.V., 1999. Re-Expression of P75^{NTR} by adult motor neurons after axotomy is triggered by retrograde transport of a positive Signal from axons regrowing through damaged or denervated peripheral nerve tissue. ***Neuroscience***,. **91**(1): 273–281.
- Cavalli V., Kujala P., Klumperman J., Goldstein L. S.B., 2005. Sunday driver links axonal transport to damage signaling. ***The Journal of Cell Biology***, **168**(5):775–787.

- Chevalier-Larsen E., Holzbaur EL., 2006. Axonal transport and neurodegenerative disease. ***Biochim. Biophys. Acta***. 1762(11-12):1094-108.
- Chun J., Gioio A.E., Crispino M., Giuditta A., Kaplan B.B., 1996. Differential compartmentalization of mRNAs in squid giant axon ***Journal of Neurochemistry***, **67**(5):1806–1812.
- Coleman M., 2005. Axon degeneration mechanisms: Commonality amid diversity. ***Nature***, 6:889-898.
- Conforti L., Adalbert R., Coleman M. P., 2007. Neuronal death: where does the end begin? ***Trends Neurosci.***, **30**:159–166.
- Cox L.J., Hengst U., Gurskaya N.G., Jaffrey S.R., 2008. Intra-axonal translation and retrograde trafficking of CREB promotes neuronal survival. ***Nature Cell Biology***, **10**:149-159.
- Dahlstrom B.A., 2010. Fast intra-axonal transport: Beginning, development and post-genome advances. ***Progress in Neurobiology***, **90**:119–145
- Dompierre J.P., Godin J.D., Charrin B.C., Cordelie `res F.P., King S.J., Humbert S., Saudou F., 2007. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. ***The Journal of Neuroscience***, **27**(13):3571–3583.
- Edström A., Sjöstrand J., 1969. Protein synthesis in the isolated Mauthner nerve fibre of goldfish. ***J. Neurochem.***, **16**(1):67-81.
- Falzone T.L., Gunawardena S., McCleary D., Reis G.F., Goldstein L.S.B, 2010. Kinesin-1 transport reductions enhance human tau hyperphosphorylation, aggregation and neurodegeneration in animal models of tauopathies. ***Human Molecular Genetics***, **19**(22):4399-408.
- Flipr Application Note. 1999. Measuring Membrane Potential Using DIBAC With the FLIPR® I and FLIPR384 Fluoremetric Imaging Plate Reader Systems.
- Fu Y.S., Gordon T., 1997. The cellular and molecular basis of periferal nerve regeneration. ***Molecular Neurobiology***. **14**(1): 67-116.
- Gallant P. E., 2003. Axotomy inhibits the slow axonal transport of tubulin in the squid giant axon. ***Biol. Bull.***, **205**: 187–188.
- Ginty D.D., Segal R.A., 2002. Retrograde neurotrophin signaling: Trk-ing along the axon. ***Current Opinion in Neurobiology***, **12**:268–274.

- Giuditta A., 1980. Origin of axoplasmic protein in the squid giant axon. *Riv. Biol.*, **73**(1):35-49.
- Goldberg D. J., Lubit B.W, Schwartz J.H., 1980. Analysis of the mechanism of fast axonal transport by intracellular injection of potentially inhibitory macromolecules: evidence for a possible role of actin filaments. *PNAS*, **77** (12):7448-7452.
- Goshima Y., Kawakami T., Hori H., Sugiyama Y., Takasawa S., Hashimoto Y., Kagoshima-Maezono M., Takenaka T., Misu Y., Strittmatter SM., 1997. A novel action of collapsin: collapsin-1 increases antero- and retrograde axoplasmic transport independently of growth cone collapse. *J. Neurobiol.* **33**(3):316-28.
- Goshima Y., Usui H., Shiozawa T., Hida T., Kuraoka S., Takeshita S., Yamashita N., Ichikawa Y., Kamiya Y., Gotoh T., Gotoh T., 2010. Computational analysis of the effects of antineoplastic agents on axonal transport. *J. Pharmacol Sci.*, **114**(2):168-79.
- Grafstein B., Forman D.S., 1980. Intracellular transport in neurons. *Physiol. Rev.*, **60**(4):1167-283.
- Grafstein B., Forman D. S., McEwen B.S., 1972. Effects of temperature on axonal transport and turnover of protein in goldfish optic system. *Experimental Neurology* **34**:1:158-170.
- Grafstein B., Murray M., 1969. Transport of protein in goldfish optic nerve during regeneration. *Exp. Neurol.*, **25**(4):494-508.
- Groves M.J., An S.F., Giornetto B., Scaravilli F., 1999. Inhibition of sensory neuron apoptosis and prevention of loss by NT-3 administration following axotomy. *Exp. Neurol.*, **155**: 284–294.
- Guyton, A. C., Hall, J. E., 2001. *Tıbbi Fizyoloji*, 1. baskı. Yüce Yayınları A. Ş. & Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. İstanbul. 1024.
- Hadano S., Hand C.K., Osuga H., Yanagisawa Y., Otomo A., Devon R.S., Miyamoto N., Showguchi-Miyata J., Okada Y., Singaraja R., Figlewicz D.A., Kwiatkowski T., Hosler B.A., Sagie T., Skaug J., Nasir J., Brown R.H.Jr., Scherer S.W., Rouleau G.A., Hayden M.R., Ikeda J.E., 2001. A gene encoding a putative

- GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat. Genet.*, **29**(2):166-73.
- Hanz S., Fainzilber M., 2004. Integration of retrograde axonal and nuclear transport mechanisms in neurons: implications for therapeutics. *Neuroscientist*, **10**:404-408.
- Hanz S., Fainzilber M., 2006. Retrograde signaling in injured nerve—the axon reaction revisited. *Journal of Neurochemistry*, **99**: 13–19.
- Hanz S., Perlson E., Willis D., Zheng J., Massarwa R., Huerta J. J., Koltzenburg M., Kohler M., Minnen J., Twiss J. L., Fainzilber M., 2003. Axoplasmic importins enable retrograde injury signaling in lesioned nerve. *Neuron*, **40**:1095–1104.
- Hilliard A.M., 2009. Axonal degeneration and regeneration: a mechanistic tug of war. *Journal of Neurochemistry*, **108**:23-32.
- Hirokawa N., 1982. Cross-linker system between neurofilaments, microtubules, and membranous organelles in frog axons revealed by the quick-freeze, deep-etching method. *J. Cell Biol.*, **94**(1):129-42.
- Hirokawa N., 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, **279**:519-526.
- Hirokawa N., Sato-Yoshitake R., Yoshida T., Kawashima T., 1990. Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo. *J. Cell Biol.* **111**(3):1027-37.
- Hiruma H., Maruyama H., Katakura T., Simada Z. B., Nishida S., Nishida S., Hoka S., Takenaka T., Kawakami T., 1999. Axonal transport is inhibited by a protein kinase C inhibitor in cultured isolated mouse dorsal root ganglion cells. *Brain Research*, **826**:135–138.
- Hiruma H., Saito A., Ichikawa T., Kiriya Y., Hoka S., Kusakabe T., Kobayashi H., Kawakami T., 2000. Effects of substance P and calcitonin gene-related peptide on axonal transport in isolated and cultured adult mouse dorsal root ganglion neurons. *Brain Research*, **883**:184–191.
- Hoffman P.N., Griffin J.W., Price D.L., 1984. Control of axonal caliber by neurofilament transport. *J. Cell Biol.*, **99**(2):705-14.

- Jaquet J.B., Luijsterburg A.J., Kalmijn S., Kuypers P.D., Hofman A., Hovius S.E., 2001. Median, ulnar and combined median–ulnar nerve injuries: functional outcome and return to productivity. *J. Trauma*, **51**: 687–692.
- Kaas J.H., 1991. Plasticity of sensory and motor maps in adult mammals. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**: 137–167.
- Kaas J.H., Collins C.E., 2003. Anatomic and functional reorganization of somatosensory cortex in mature primates after peripheral nerve and spinal cord injury. *Adv. Neurol.*, **93**: 87–95.
- Kandel E., Schwartz J. H., Jessell T. M., 2000. *Principles of Neural Science*. 4 edition. McGraw-Hill, Health Professions Division. 1414.
- Kaplan B.B., Gioio A.E., Capano C.P., Crispino M., Giuditta A., 1992. β -Actin and β -Tubulin are components of a heterogeneous mRNA population present in the squid giant axon *Molecular and Cellular Neuroscience*, **3**(2):133-144.
- Keierszenbaum, A. L., 2006. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, Palme Yayıncılık. Ankara. 18.
- Kenney A.M., Kocsis J.D., 1998. Peripheral axotomy induces long-term c-Jun amino-terminal kinase-1 activation and activator protein-1 binding activity by c-Jun and junD in adult rat dorsal root ganglia in vivo. *The Journal of Neuroscience*, **18**(4):1318–1328.
- Kiedrowski L., 1999. Elevated extracellular K^+ concentrations inhibit N-methyl-D-aspartate-induced Ca_2^{+} influx and excitotoxicity. *Molecular Pharmacology*, **56**(4):737-743.
- Kitao A., Hirata H., Morita A., Yoshida T., Uchida A. 1997. Transient damage to the axonal transport system without Walleria degeneration by acute nerve compression. *Experimental Neurology*, **147**: 248–255.
- Konishi Y., Setou M., 2009. Tubulin tyrosination navigates the kinesin-1 motor domain to axons. *Nat. Neurosci.*, **12**(5):559-67.
- Ligon L.A, LaMonte B.H., Wallace K.E., Weber N., Kalb R.G., Holzbaur E.L., 2005. Mutant superoxide dismutase disrupts cytoplasmic dynein in motor neurons. *Neuroreport.*, **16**(6):533-6.
- Lin A.C., Holt C.E., 2008. Function and regulation of local axonal translation. *Current Opinion in Neurobiology* **18**(1):60-68.

- Lindwall C, Kanje M. 2005. The Janus role of c-Jun: cell death versus survival and regeneration of neonatal sympathetic and sensory neurons. *Exp. Neurol.*, **196**(1):184-94.
- Lunn E.R., Perry V.H., Brown M.C., Rosen H., Gordon S., 1989. Absence of Wallerian degeneration does not hinder regeneration in peripheral nerve. *Eur. J. Neurosci.*, **1**:27–33.
- Lye J., Porter M. E., Scholey J. M., McIntosh J. R., 1987. Identification of a microtubule-based cytoplasmic motor in the nematode *C. elegans*. *Cell*, **51**: 309-18.
- Mandelkow E., Mandelkow E., 1998. Tau in Alzheimer's disease. *Cell Biology*, **8**:425-427.
- Mandolesi G., Madeddu F., Bozzi Y., Maffei L., Ratto G. M., Acute physiological response of mammalian central neurons to axotomy: ionic regulation and electrical activity. *The FASEB J.*, **18**(15):1934-6.
- Mata M., Staple J., Fink D.J., 1985. Ultrastructural localization of slow retrograde axonal transport: an autoradiographic study. *The Journal of Neuroscience*, **5**(11): 2900-2908.
- McCray B.A., Skordalakes E., Taylor J.P., 2010. Disease mutations in Rab7 result in unregulated nucleotide exchange and inappropriate activation. *Human Molecular Genetics*, **19**(6):1033–1047.
- Muresan Z., Muresan V., 2005. Coordinated transport of phosphorylated amyloid-beta precursor protein and c-Jun NH2-terminal kinase-interacting protein-1. *J. Cell Biol.*, **171**(4):615-25.
- Nadeau S., Hein P., Fernandes K.J., Peterson A.C., Miller F.D., 2005. A transcriptional role for C/EBP beta in the neuronal response to axonal injury. *Mol. Cell Neurosci.*, **29**:525–535.
- Navarro X., Vivo M., Valero-Cabre A., 2007. Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration. *Progress Neurobiology*. (4): 163-201.
- Nikolaev A., McLaughlin T., D. M. O'Leary D., Tessier-Lavigne M., 2009. APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature*, **457**:981-990.

- Obata K., Yamanaka H., Dai Y., Mizushima T., Fukuoka T., Tokunaga A., Nogu-chi K., 2004. Differential activation of MAPK in injured and uninjured DRG neurons following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. ***Eur. J Neurosci.***, **20**:2881–2895.
- Öztürk G., 1999. ***Axonal regeneration and expression of neuropeptides and neurofilaments in primary sensory neurons in vitro.***(doktora tezi). University of London, Physiology Department Biomedical Sciences Division King's College London, London.
- Paschal B. M., Shpetner H. S., Vallee R. B., 1987. MAP 1C is a microtubule-activated ATPase which translocates microtubules in vitro and has dynein-like properties. ***J. Cell Biol.***, **105**: 1273-82.
- Park K. K., Liu K., Hu Y., Smith P. D., Wang C., Cai B., Xu B., Connolly L., Kramvis I., Sahin M., He Z., 2008. Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. ***Science***, **322**:963-966.
- Pasinelli P., Brown R. H., 2006. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. ***Nature Reviews Neuroscience***, **7**:710-723.
- Perlson E., Hanz S., Ben-Yaakov K., Segal-Ruder Y, Seger R., Fainzilber M., 2005. Vimentin-dependent spatial translocation of an activated MAP kinase in injured nerve. ***Neuron***. **45**: 715–726.
- Perlson E., Hanz S., Medzihradsky K.F., Burlingame A.L., Fainzilber M., 2004. From snails to sciatic nerve: retrograde injury signaling from axon to soma in lesioned neurons. ***J. Neurobiol.***, **58**(2):287-94.
- Perlson E., Maday S., Fu M., Moughamian A.J., Holzbaur E.L.F., 2010. Retrograde axonal transport: pathways to cell death? ***Trends in Neurosciences*** **33**: 335–344.
- Perry V. H., Brown M.C., 1992. Macrophages and nerve regeneration. ***Curr. Opin. Neurobiol.***, **2**: 679–682.
- Pilling A.D., Horiuchi D., Lively C.M., Saxton W.M., 2006. Kinesin-1 and dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in drosophila motor axon. ***Molecular Biology of the Cell***, **17**: 2057–2068.
- Rajan P., Stewart C.L., Fink J.S. 1995. LIF-mediated activation of STAT proteins after neuronal injury in vivo. ***Neuroreport***, **6**(16):2240-4.

- Ravikumar B., Acevedo-Arozena A., Imarisio S., Berger Z., Vacher C., O'Kane C.J., Brown S.D., Rubinsztein D.C., 2005. Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins. *Nat. Genet.*, 37(7):771-6.
- Ravikumar B., Vacher C., Berger Z., Davies J.E., Luo S., Oroz L.G., Scaravilli F., Easton D.F., Duden R., O'Kane C.J., Rubinsztein D.C., 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.*, 36(6):585-95.
- Reyes O., Sosa I., Kuffler D.P., 2005. Promoting neurological recovery following a traumatic peripheral nerve injury. *P. R. Health Sci. J.*, 24: 215–223.
- Rosberg H.E., Carlsson K.S., Dahlin L.B., 2005. Prospective study of patients with injuries to the hand and forearm: costs, function, and general health. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 39: 360–369.
- Saatman K.E., Abai B., Grosvenor A., Vorwerk C.K., Smith D.H., Meaney D.F., 2003. Traumatic axonal injury results in biphasic calpain activation and retrograde transport impairment in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 23(1):34-42.
- Sakama R., Hiruma H., Kawakami T., 2003. Effects of extracellular ATP on axonal transport in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience*, 121:531–535.
- Schlaepfer WW., 1987. Neurofilaments: structure, metabolism and implications in disease. *J. Neuropathol Exp Neurol.*, 46(2): 117-29.
- Schmied R., Huang C.C., Zhang X.P., Ambron D.A., Ambron R. T. 1993. Endogenous axoplasmic proteins and proteins containing nuclear localization signal sequences use the retrograde axonal transport/nuclear import pathway in Aplysia neurons. *J. Neurosci.*, 13:4064–4071.
- Schumacher P. A., Eubanks J. H., Fehlings M.G., 1999. Increased Calpain I-mediated proteolysis, and preferential loss of dephosphorylated Nf200 following traumatic spinal cord injury. *Neuroscience*, 91:733–744.
- Schwab M., Thoenen H., 1977. Retrograde axonal and transsynaptic transport of macromolecules: physiological and pathophysiological importance. *Agents Actions.*, 7(3):361-8.
- Schwartz J.H., 1979. Axonal transport: Components, mechanisms, and specificity. *Annual Review of Neuroscience*, 2: 467-504.

- Serbest G., Burkhardt M.F. , Siman R., Raghupathi R., Satman K.E., 2007. Temporal profiles of cytoskeletal protein loss following traumatic axonal injury in mice. *Neurochem. Res.*, **32**:2006–2014.
- Setou M., Hayasaka T., Yao I., 2003. Axonal transport versus dendritic transport. *J. Neurobiol.*, **58**(2):201-6.
- Sheetz M.P., Pfister K.K., Bulinski J.C., Cotman C.W., 1998. Mechanisms of trafficking in axons and dendrites: Implications for development and neurodegeneration. *Progress in Neurobiology*, **55**:577- 594.
- Shroer T. A., Steuer E. R., Sheetz M. P., 1987. Cytoplasmic dynein is a minus end-directed motor for membranous organelles. *Cell* **56** (6): 937-46.
- Smith K.D.B., Peethumnongsin E., Lin H., Zheng H., Pautler R.G., 2010. Increased human wildtype Tau attenuates axonal transport deficits caused by loss of APP in mouse models. *Magn. Reson. Insights.*, **4**:11-18.
- Spira M.E., Oren R., Dormann A., Gitler D., 2003. Critical calpain-dependent ultrastructural alterations underlie the transformation of an axonal segment into a growth cone after axotomy of cultured *Aplysia* neurons. *The Journal Of Comparative Neurology*, **457**:293–312.
- Stephens R.E., Edds K.T., 1976. Microtubules: structure, chemistry, and function. *Physiol. Rev.*, **56**(4):709-77.
- Stoll G., Muller H.W., 1999. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration. *Basic Insights Brain Pathol.*, **9**: 313-325.
- Stone J.R., Okonkwo D.O., Dialo A.O., Rubin D.G., Mutlu L.K., Povlishock J.T., Helma G.A., 2004. Impaired axonal transport and altered axolemmal permeability occur in distinct populations of damaged axons following traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, **190**:59– 69.
- Tandrup T., Woolf C.J., Coggeshall R.E., 2000. Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transection of the rat sciatic nerve. *J. Comp. Neurol.*, **422**:172–180.
- Trivedi N., Jung P., Brown A., 2007. Neurofilaments switch between distinct mobile and stationary states during their transport along axons. *Journal of Neuroscience* **27**: 507-516.

- Trushina E., Dyer R.B, Badger II J.D., Ure D., Eide L., Tran D.D., Vrieze B.T., Legendre-Guillemain V., McPherson P.S., Mandavilli B.S., Van Houten B., Zeitlin S., McNiven M., Aebersold R., Hayden M., Parisi J.E., Seeberg E., Dragatsis I., Doyle K., Bender A., Chacko C., McMurray C.T., 2004. Mutant Huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons .in vivo and in vitro. ***Molecular And Cellular Biology***, **24**: 8195–8209.
- Vance J.E., Campenot R.B., Vance D.E., 2000. The synthesis and transport of lipids for axonal growth and nerve regeneration. ***Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids***, **1486**(1):84-96.
- Vestergaard S., Tandrup T., Jakobsen J., 1997. Effect of permanent axotomy on number and volume of dorsal root ganglion cell bodies. ***J. Comp. Neurol.***, **388**: 307–312.
- Wall J.T., Xu J., Wang X., 2002. Human brain plasticity: an emerging view of the multiple substrates and mechanisms that cause cortical changes and related sensory dysfunctions after injuries of sensory inputs from the body. ***Brain Res. Rev.***, **39**:181–215.
- Weis K., 2003. Regulating Access to the Genome: Nucleocytoplasmic transport throughout the Cell Cycle. ***Cell***, **112**:441–451.
- Weitz B., 1998. ***Atlas der Anatomie. Organsysteme und Strukturen*** . Augsburg, Almany.
- Willis D. E., Twiss J.L., 2006. The evolving roles of axonally synthesized proteins in regeneration. ***Current Opinion in Neurobiology***, **16**:111–118.
- Wikipedia, 2011. Neuron. <http://en.wikipedia.org/wiki/Neuron>. Eriřim tarihi:6.11.2011.
- Wu W., Mathew T.C., Miller F.D., 1993. Evidence that the loss of homeostatic signals induces regeneration-associated alterations in neuronal gene expression. ***Dev. Biol.***, **158**(2):456-66.
- Yao Z., Diener K., Wang X.S., Zukowski M., Matsumoto G., Zhou G., Moi R., Sasaki T., Nishina H., Huii C.C., Tan T., Woodgett J. P., Penninger J.M., 1997. Activation of stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal protein kinases (SAPKs/JNKs) by a novel mitogen-activated protein kinase (MKK7). ***The Journal Of Biological Chemistry***, **272**: 32378–32383.

- Ygge J., 1989. Neuronal loss in lumbar dorsal root ganglia after proximal compared to distal sciatic nerve resection: a quantitative study in the rat. ***Brain Res.***, **478**:193–195.
- Yudin D., Fainzilber M., 2009. Ran on tracks—cytoplasmic roles for a nuclear regulator ***Journal of Cell Science***, **122**:587-593.
- Zhang X., Ambron R.T., 2000. Positive injury signals induce growth and prolong survival in *Aplysia* Neurons. ***J. Neurobiol.***, **45**(2):84-94.
- Zheng J., Kelly T. K., Chang B., Ryazantsev S., Rajasekaran A. K., Martin K. C., Twiss J. L., 2001. A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. ***The Journal of Neuroscience***, **21**(23):9291–9303.
- Zrouri H., Le Goascogne C., Li W.W., Pierre M., Courtin F., 2004. The role of MAP kinases in rapid gene induction after lesioning of the rat sciatic nerve. ***Eur. J. Neurosci.***, **20**(7):1811-8.

ÖZ GEÇMİŞ

Elçin YENİDÜNYA, 1980 yılında Ankara’da doğdu. İlköğrenimini Niğde-Van’da lise öğrenimini de Van’da tamamladı. 1998 yılında girdiği Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2002 yılında mezun oldu. Aynı yıl Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitime ve Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. 2005 yılında yüksek lisans eğitimini tamamladıktan sonra, 2006 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalında doktora eğitime başladı. Halen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü’nde Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.