



T.C.  
İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

**NEOTENİK VE METAMORFİK AXOLOTL (*AMBYSTOMA  
MEXİCANUM*) BEYNİNİN STEREOLOJİK VE  
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER KULLANILARAK  
ARAŞTIRILMASI**

ARİFE AHSEN KAPLAN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
DOÇ. DR. İLKNUR KESKİN

İSTANBUL – 2023

## TEZ ONAY FORMU

Kurum : İstanbul Medipol Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora ( X)  
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji  
Öğrenci : Arife Ahsen KAPLAN  
Tez Başlığı : Neotenik ve Metamorfik Axolotl (*Ambystoma Mexicanum*)  
Beyninin Stereolojik ve İmmünohistokimyasal Yöntemler Kullanılarak Araştırılması  
Sınav Yeri : İstanbul Medipol Üniversitesi Güney Yerleşkesi  
Sınav Tarihi : 14.06.2023

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

### Danışman

Doç. Dr. İlknur KESKİN

### Kurumu

İstanbul Medipol Üniversitesi

### İmza

### Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

İstanbul Medipol Üniversitesi

Doç. Dr. Seda KARABULUT

İstanbul Medipol Üniversitesi

Prof. Dr. Abit AKTAŞ

İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa

Doç. Dr. Turan DEMİRCAN

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi

Yukarıdaki jüri kararıyla kabul edilen bu Doktora Tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ...../....., ..... sayılı kararı ile şekil yönünden Tez Yazım Klavuzuna uygun olduğu onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neslin EMEKLİ

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## **ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

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

ARİFE AHSEN KAPLAN

## TEŞEKKÜR

Sayın Anabilim Dalı başkanımız, kıymetli danışman Hocam Doç. Dr. İlknur Keskin'e bu tezin hazırlanmasında gösterdiği tüm emekleri için sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım. Danışmanlığında yürüttüğüm doktora tezimin tasarlanması, deneylerin yapılması ve sonuçların değerlendirmesi süreçlerinde engin bilgisi ve tecrübesiyle kendisi bana yol göstermiş, potansiyelime ulaşmam için cesaretlendirmiş ve her aşamada sonsuz sabır ve özveri göstererek destek olmuştur. Kendisiyle beraber çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım.

Sayın hocam Prof. Dr. Gürkan Öztürk'e tez izleme komitemde yer aldığı, SABİTA bünyesinde axolotl çalışmama imkan sağladığı ve tezin hazırlanmasında değerli görüşleriyle katkıda bulunduğu için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Anabilim dalımız değerli hocalarından Sayın hocam Doç. Dr. Seda Karabulut'a tüm doktora sürecinde paylaştığı bilgi birikimi ve gösterdiği destekler için teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam boyunca desteklerini her zaman yanımda hissettiğim ekip arkadaşlarım: Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bircan Kolbaşı Erkan, Öğr. Gör. Arzu Güneş, Dr. Duygu Gürsoy ve Arş. Gör. Mervenur Kalender'e teşekkür ederim.

Sayın Hocam Dr. Mehmet Şerif Aydın'a, SABİTA bünyesindeki cihazların kullanımı konusunda bilgi birikimini paylaşarak yardım ettiği için ve Sayın Dr. Öğr. Üye. Neşe Aysit'e, Arş. Gör. Olgu Enis Tok'a, Dr. Sadık Bay'a ve değerli SABİTA ekibine çalışmama gösterdikleri değerli katkıları için teşekkürlerimi sunarım.

MEDİTAM imkanlarını sunarak hayvan deneylerime yardımcı olan Sayın Ekrem Musa Özdemir'e ve tüm MEDİTAM ekibine teşekkür ederim.

Sayın Dr. Gamze Altun'a, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile KİTAM çalışanlarına tezimin stereoloji ve elektron mikroskopi analizlerini yürütürken gösterdikleri yardımlar için teşekkür ederim.

Akademik hayatımın başladığı ilk günden beri desteklerini sunan kıymetli dostum Aslı Yazıcı Soyiç'e teşekkür ederim.

Desteklerini ve sevgilerini yaşam boyu hissettiğim sevgili ailem; babam Prof. Dr. Süleyman Kaplan, annem Nurdan Kaplan ve kız kardeşlerim Elif ve Neyran'a teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAY FORMU .....	i
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANI .....	ii
TEŞEKKÜR .....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	vi
TABLolar LİSTESİ .....	viii
RESİMLER LİSTESİ .....	ix
<b>1. ÖZET</b> .....	1
<b>2. ABSTRACT</b> .....	2
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	3
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	5
4.1. Omurgalılarda Beyin Gelişimi ve Rejenerasyon .....	5
4.2. Semender Beyni .....	8
4.2.1. Ependimoglia hücreler .....	9
4.3. Beyin Hasarı ve Rejenerasyon .....	11
4.4. Metamorfoz .....	13
4.5. İmmünohistokimyasal Analizler .....	14
4.5.1. Glial fibriler asit protein (GFAP) .....	14
4.5.2. Miyelin temel protein (MTP) .....	14
4.5.3. Ki-67 .....	15
4.5.4. Nöronal çekirdek antijeni (NeuN) ve çiftkörtin (DCX) .....	15
4.6. Axolotl Beyin Histolojisi .....	16
<b>5. MATERYAL VE METOT</b> .....	18
5.1. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları .....	18
5.2. Metamorfoz İndükleme .....	18
5.3. Doku Takibi .....	19
5.3.1. Parafin doku takibi .....	19
5.3.2. Elektron mikroskop doku takibi .....	19
5.3.2.1. <i>Klasik elektron mikroskop doku takibi</i> .....	19
5.3.2.2. <i>Enblock staining elektron mikroskop doku takibi</i> .....	21
5.3.2.3. <i>Taramalı elektron mikroskop analizi için dokuların hazırlanması</i> .....	22

5.4.	Kesit Alma ve Krezil Viyole Boyama .....	22
5.5.	Stereolojik Analizler .....	22
5.6.	Alsiyan Mavisi Boyama.....	26
5.7.	Periyodik Asit-Shiff (PAS) Boyama.....	26
5.8.	İmmünohistokimyasal Analizler: .....	26
5.9.	İstatistiksel Analiz.....	28
<b>6.</b>	<b>BULGULAR</b> .....	<b>29</b>
6.1	Histopatolojik Bulgular .....	29
6.2	Stereolojik Sonuçlar .....	31
6.3	İmmünohistokimyasal Bulgular .....	33
6.3.1	Anti Ki-67 immünohistokimya sonuçları .....	33
6.3.1	Anti - miyelin temel protein (MTP) immünohistokimya sonuçları .....	42
6.3.1.1	<i>Telensefalon</i> .....	42
6.3.1.2	<i>Diensefalon</i> .....	48
6.3.2	Anti-NeuN immünohistokimya sonuçları .....	49
6.3.3	Anti-GFAP (Glial Fibriller Asidik Protein) immünohistokimya sonuçları .....	55
1.	Toluidin Mavisi Boyama Sonuçları .....	49
6.5	Elektron Mikroskop Sonuçları .....	64
6.5.1	Geçirimli elektron mikroskop sonuçları .....	64
6.5.2	Taramalı elektron mikroskop sonuçları .....	79
6.5.2.1	<i>Telensefalon</i> .....	79
6.5.2.2	<i>Diensefalon</i> .....	80
<b>7.</b>	<b>TARTIŞMA</b> .....	<b>85</b>
<b>8.</b>	<b>SONUÇ</b> .....	<b>92</b>
<b>9.</b>	<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>93</b>
<b>10.</b>	<b>ETİK KURUL ONAYI</b> .....	<b>102</b>
<b>11.</b>	<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	<b>103</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

<b>AP</b>	: Ara Progenitör hücreler
<b>aAP</b>	: apikal Ara Progenitör hücreler
<b>aRGH</b>	: apikal Radyal Glial Hücreler
<b>AT</b>	: Ara Tabaka
<b>Ax</b>	: Akson
<b>bAP</b>	: bazal Ara Progenitör hücreler
<b>Cp</b>	: Koroid pleksus
<b>DCX</b>	: Çift Kortin
<b>DK</b>	: Değişim Katsayısı
<b>Dp</b>	: Dorsal pallium
<b>DSVT</b>	: Dış Subventriküler Tabaka
<b>ERG</b>	: Ependimo-radyal glia
<b>GFAP</b>	: Glial Fibriller Asidik Protein
<b>HK</b>	: Hata Katsayısı
<b>İSVT</b>	: İç Subventriküler Tabaka
<b>KP</b>	: Kortikal Plaka
<b>Lp</b>	: Lateral pallium
<b>MTP</b>	: Miyelin Temel Proteini
<b>Met</b>	: Metamorfik
<b>Mp</b>	: Medial pallium
<b>MSS</b>	: Merkezi Sinir Sistemi
<b>NE</b>	: Nöroepitelyal
<b>Neo</b>	: Neotenik
<b>NeuN</b>	: Nöronal çekirdek antijeni
<b>NKH</b>	: Nöronal Kök Hücre
<b>NPC</b>	: Nöral Progenitör Hücreler
<b>NPH</b>	: Nöron Prokürsör Hücreler
<b>Olf B</b>	: Olfaktör Bulbus Bölgesi
<b>Olf N</b>	: Olfaktör Sinir
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponu (Phosphate Buffered Saline)
<b>PFA</b>	: Paraformaldehit

<b>RGH</b>	: Radyal Glial Hücreler
<b>Sox-2</b>	: SRY (Sex Determining Region Y)-box 2
<b>T4</b>	: Tetraiodothironin
<b>TH</b>	: Tirozin Hidroksilaz
<b>V</b>	: Kan damarı
<b>VB</b>	: Ventriküler Tabaka
<b>Vp</b>	: Ventral pallium
<b>Vt</b>	: Ventrikül



## TABLolar LİSTESİ

<b>Tablo 6.1</b> Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesinin fiziksel disektör hücre sayım sonuçları (HK: hata katsayısı, SRÖ: sistematik rasgele örnekleme).....	31
<b>Tablo 6.2</b> Metamorfik axolotl beyninin telensefalon bölgesinin fiziksel disektör hücre sayım sonuçları (HK: hata katsayısı, SRÖ: sistematik rasgele örnekleme).....	31
<b>Tablo 6.3</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyninin telensefalon bölgesinin fiziksel disektör hücre sayım sonuçları (DK: değişim katsayısı, SS: standart sapma, SEM: ortalama standart hata) .....	32
<b>Tablo 6.4</b> Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesine ait Ki-67 immünohistokimya Cavalieri yöntemi hacim sonuçları. ....	40
<b>Tablo 6.5</b> Metamorfik axolotl beyninin telensefalon bölgesine ait Ki-67 immünohistokimya Cavalieri yöntemi hacim sonuçları. ....	40
<b>Tablo 6.6</b> Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesine ait Cavalieri yöntemi NeuN immünohistokimya hacim sonuçları.....	53
<b>Tablo 6.7</b> Metamorfik axolotl beyninin telensefalon bölgesine ait Cavalieri yöntemi NeuN immünohistokimya hacim sonuçları.....	53

## RESİMLER LİSTESİ

<b>Resim 4.1</b> İnsanda gelişen serebral korteksin histolojik görüntüsü.....	5
<b>Resim 4.2</b> Fare ve insanda gelişen serebral kortekste bulunan progenitörler hücrelerin dizilimlerinin şematize edilmesi. ....	7
<b>Resim 4.3</b> Axolotl beyin bölgelerinin adlandırılmasının ve ependimoglia hücrelerin yerleşimin şematize edilmesi .....	9
<b>Resim 4.4</b> Neotenik axolotl beynine ait telensefalon bölgesinin farklı seviyelerden alınan kesitlerin Cresyl violet ile boyanmış histolojik kesitlerinin görüntüleri. ....	17
<b>Resim 5.1</b> Fiziksel parçalama yönteminde kullanılan, disektör kesit çifti .....	24
<b>Resim 5.2</b> Olympus CellSens programı kullanılarak ardışık iki kesitte aynı iki alanın görüntülediği disektör çiftleri.....	25
<b>Resim 5.3</b> Disektör hücrelerinin (taneciklerinin) sayılması. ....	25
<b>Resim 5.4</b> ImageJ programı kullanılarak immünohistokimyasal analizler gerçekleştirilmesi. ....	28
<b>Resim 6.1</b> Neo ve Met axolotlların beyinlerinin telensefalon bölgelerinin krezil violet boyama görüntüleri. ....	30
<b>Resim 6.2</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgesinin hücre sayım sonuçlarının normalite grafiği. ....	32
<b>Resim 6.3</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerinin fiziksel disektör hücre sayım sonuçları. ....	33
<b>Resim 6.4</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması.....	34
<b>Resim 6.5</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması.....	35
<b>Resim 6.6</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması.....	36
<b>Resim 6.7</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması.....	37
<b>Resim 6.8</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması.....	38
<b>Resim 6.9</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması.....	39

<b>Resim 6.10</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya hacim sonuçları normalite grafiği.....	41
<b>Resim 6.11</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 ifade eden toplam hücre hacmi sonuçları. ....	41
<b>Resim 6.12</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait MTP immünohistokimya boyaması. ....	43
<b>Resim 6.13</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait MTP immünohistokimya boyaması. ....	44
<b>Resim 6.14</b> Neotenik axolotl beyninin telensefalonun MTP immünohistokimya boyaması.. ....	45
<b>Resim 6.15</b> Metamorfik axolotl beyninin telensefalonun MTP immünohistokimya boyaması. ....	46
<b>Resim 6.16</b> Metamorfik axolotl beyninin telensefalonun MTP immünohistokimyas boyaması. ....	47
<b>Resim 6.17</b> Sıçan beyninin MTP immünohistokimya boyaması. ....	47
<b>Resim 6.18</b> Neotenik ve metamorfik axolot beyinlerinin diensefalon bölgelerinin MTP immünohistokimya boyaması. ....	48
<b>Resim 6.19</b> Neotenik axolot beyninin anterior bölgesinin NeuN immünohistokimya boyaması. ....	50
<b>Resim 6.20</b> Neotenik axolot beyninin telensefalon bölgesinin NeuN immünohistokimya boyaması. ....	51
<b>Resim 6.21</b> Metamorfik axolot beyninin telensefalon bölgesinin NeuN immünohistokimya boyaması. ....	52
<b>Resim 6.22</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait NeuN immünohistokimya hacim sonuçları normalite grafiği.....	54
<b>Resim 6.23</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait NeuN ifade eden toplam hücre hacmi sonuçları. ....	54
<b>Resim 6.24</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait GFAP immünohistokimya boyaması. ....	55
<b>Resim 6.25</b> Neotenik axolotl beyninin telensefalonuna ait GFAP immünohistokimya boyaması. ....	56

<b>Resim 6.26</b> Metamorfik axolotl beyninin telensefalonuna ait GFAP immünohistokimya boyaması. ....	57
<b>Resim 6.27</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyninin telensefalonunda bulunan kan damarları (V), eritrositler ve diğer kan elamanları.....	59
<b>Resim 6.28</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerinde ventrikül etrafında dizilmiş ependimoglia hücreler ve nöronlar .....	60
<b>Resim 6.29</b> Neotenik axolotl beyninin şematize görüntüsü ve farklı seviyelerdeki miyelinli sinir lifleri. ....	61
<b>Resim 6.30</b> Metamorfik axolotl beyninin şematize görüntüsü ve farklı seviyelerdeki miyelinli sinir lifleri. ....	62
<b>Resim 6.31</b> Neotenik axolotl beyninin şematize görüntüsü ve telensefalon ve diensefalon bölgelerinden alınan kesitlerin genel görüntüsü .....	63
<b>Resim 6.32</b> Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesinde ventrikül etrafında tek sıra halinde sıralanan ependimoglia hücrelerinin apikal kısmındaki salgı ürünü .....	64
<b>Resim 6.33</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri. ....	66
<b>Resim 6.34</b> Neotenik ve metamorfik axolotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri. ....	67
<b>Resim 6.35</b> Neotenik ve metamorfik axolotlın beyin dokusudan çekilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri.....	68
<b>Resim 6.36</b> Neotenik ve metamorfik axolotlın beyin dokusudan çekilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri.....	69
<b>Resim 6.37</b> Neotonik axolotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskopik görüntüleri.....	70
<b>Resim 6.38</b> Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesinden geçirimli elektron mikroskop ile çekilen kan hücrelerine ait görüntüleri.....	71
<b>Resim 6.39</b> Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskopik görüntüleri.....	72
<b>Resim 6.40</b> Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskopik görüntüleri.....	73
<b>Resim 6.41</b> Metamorfik axolotl beyin dokusunun telensefalon bölgesinin gri maddesinden çekilmiş geçirimli elektron mikroskopik görüntüleri.....	74

<b>Resim 6.42</b> (a-b) Neotenik axolotl omurilik dokusundan çekilmiş geçirimli elektron mikroskopik görüntüler.....	74
<b>Resim 6.43</b> (a-b) Metamorfik axolotl omurilik dokusundan çekilmiş geçirimli elektron mikroskopik görüntüler.....	75
<b>Resim 6.44</b> Neotenik ve metamorfik axolotl geçirimli elektron mikroskop ile çekilmiş görüntüler.....	76
<b>Resim 6.45</b> (a-f) Neotenik axolotl beyin dokusunun diensefalon bölgesinden çekilmiş geçirimli elektron mikroskopik görüntüler. ....	77
<b>Resim 6.46</b> Neotenik axolotl beyinin telensefalon bölgesinde ventrikül etrafında sıralanan ependimoglia hücrelerin apikal kısmında bulunan salgı ürününün (halka içerisinde) (a,c) ışık ve (b,d) geçirimli elektron mikroskopik görüntüler.....	78
<b>Resim 6.47</b> (a-b) Neotenik axolotl beyninin telensefalonundan çekilen taramalı elektron mikroskop görüntüleri.....	79
<b>Resim 6.48</b> Neotenik axolotl beyninin diensefalonun taramalı elektron mikroskop görüntüleri.....	80
<b>Resim 6.49</b> Neotenik axolotl beyninin diensefalon bölgesinden çekilen taramalı elektron mikroskop görüntüleri.....	81
<b>Resim 6.50</b> Neotenik axolotl beyninin diensefalon duvarının ventrikül tarafından başlayıp (sağ taraf), beyin çevresini örten zarlara (sol taraf) kadar uzanan duvarın taramalı elektron mikroskop görüntüsü. ....	83
<b>Resim 6.51</b> (a-d) Neotenik axolotl beyninin diensefalon bölgesinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri.....	83
<b>Resim 6.52</b> (a-f) Neotenik axolotl beyninin diensefalon bölgesinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri.....	82
<b>Resim 6.53</b> (a-f) Neotenik axolotl beyninin diensefalon taramalı elektron mikroskop görüntüleri.....	84

## 1. ÖZET

### NEOTENİK VE METAMORFİK AXOLOTL (*AMBYSTOMA MEXİCANUM*) BEYNİNİN STEREOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLER KULLANILARAK ARAŞTIRILMASI

Tüm tetrapodların organ veya uzuv gibi karmaşık yapılarını, yeniden oluşturma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Beynin ventriküler bölgesinde bulunan endimoglia hücrelerinin, homeostasis ve hasar durumunda proliferatif özellik gösterdikleri ve kök hücre görevlerinin olduğu bilinmektedir. Metamorfoz sonrasında merkezi sinir sisteminde nöron ve glia düzeyinde ortaya çıkabilecek değişikliklerin incelenmesi ve altında yatan mekanizmaların açıklanması çalışmamızın ana amacını oluşturmaktaydı. Metamorfozla birlikte axolotlın beyin dokusunda gerçekleşen morfolojik değişimler, yeni oluşan nöronlar ve beyin bölgelerinde meydana gelen hücre organizasyonları stereolojik ve immünohistokimyasal yöntemler, ışık ve elektron mikroskopik yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmamızda, yaşamsal süreçlerinde metamorfoz geçirmeyen axolotllar metamorfoza indüklendi. Metamorfoz sonrasında metamorfik axolotlların beyinlerinin telensefalon bölgesinde meydana gelen yapısal değişiklikler, neotenik axolotlların telensefalonu ile karşılaştırıldı. Metamorfoz sonrasında telensefalon bölgesinde toplam nöron sayısında neoteniklere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark gözlenmedi. Metamorfoz sonrasında nöronların çekirdek yapılarında ve miyelin kılıf organizasyonunda yapısal değişikliklerin olduğu ışık ve elektron mikroskopu düzeyinde gösterildi. Lateral ventrikülün duvarında bulunan bir grup endimoglia hücrelerinin apikal yüzeylerinde goblet hücrelerine benzer mukopolisakkarit içerikli salgı keselerinin olduğu tespit edildi. Metamorfiklerin proliferasyon indeksi ve NeuN ifade eden hücre sayısının neoteniklerden istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlendi. Çalışmamızda metamorfoz sonucunda yeni oluşan ve olgunlaşan nöron sayısında önemli derecede artış olmasına karşın, hücre sayısı bakımından neotenikler ile anlamlı bir fark göstermedikleri gözlemlendi. Metamorfik hayvanlarda anti-Ki67 pozitif hücre sayısı artarken, toplam hücre sayısının neoteniklere göre değişmemesi, bu hayvanlarda yüksek düzeyde olan hücre ölümünden kaynaklanmış olabileceğini düşündürmektedir. Metamorfoz, memelilerde perinatal dönemdeki nöronal hücre ölümüne benzer bir süreci telensefalonda başlatmış olabilir. Bu tez İstanbul Medipol Üniversitesi BAP (2022-08) tarafından desteklenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Axolotl, Endimoglia, Metamorfoz, Stereoloji, Telensefalon

## **2. ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF NEOTENIC AND METAMORPHIC AXOLOTL (AMBYSTOMA MEXICANUM) BRAIN USING STEREOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS**

It is known that all tetrapods have the ability to reconstruct their complex structures, such as organs or limbs. It is known that ependymoglia cells in the ventricular region of the brain show proliferative properties in homeostasis and damage and have stem cell functions. The main purpose of our study was to examine the changes that may occur at the level of neurons and glia in the central nervous system after metamorphosis and to explain the underlying mechanisms. Morphological changes in the brain tissue of the axolotl with metamorphosis, newly formed neurons and cellular organizations in the brain regions were investigated using stereological and immunohistochemical methods, light and electron microscopic methods. In our study, axolotls that did not undergo metamorphosis in their vital processes were induced to metamorphosis. Structural changes in the telencephalon region of the brains of metamorphic axolotls after metamorphosis were compared with the telencephalon of neotenic axolotls. After metamorphosis, no statistically significant difference was observed in the total number of neurons in the telencephalon region compared to neotenic. After metamorphosis, structural changes in the nuclei and myelin sheath organization of neurons were demonstrated at the light and electron microscopy level. It was determined that there are mucopolysaccharide-containing secretion sacs similar to goblet cells on the apical surfaces of a group of ependymoglia cells located in the wall of the lateral ventricle. It was observed that the proliferation index of metamorphics and the number of cells expressing NeuN were statistically significantly higher than neotenic. In our study, it was observed that although there was a significant increase in the number of newly formed and maturing neurons as a result of metamorphosis, they did not show a significant difference with neotenic in terms of cell number. While the number of anti-Ki67 positive cells increased in metamorphic animals, the total number of cells did not change compared to neotenic, suggesting that the high level of cell death in these animals may have resulted. Metamorphosis may have initiated a process similar to neuronal cell death in the perinatal period in mammals in the telencephalon. This thesis was supported by Istanbul Medipol University BAP (2022-08).

**Keywords:** Axolotl, Ependymoglia, Metamorphosis, Stereology, Telencephalon

### 3. GİRİŞ VE AMAÇ

Axolotl (*Ambystoma mexicanum*) uzuvları, kalbi, beyni ve akciğerleri gibi iç organları dahil olmak üzere birçok vücut parçasını yenileyebilen rejenerasyon kabiliyeti yüksek sucul semenderdir (1). Birçok dokusunun yenilenmesine izin veren axolotl, rejenerasyon mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla model organizma olarak yoğun ilgi görmektedir. Bu ve benzer canlılar, rejenerasyon yetenekleri ve benzersiz özellikleri nedeniyle, bilim insanlarının doğayı anlamalarına ve insan sağlığı için yeni tedavi/koruyucu stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olmaktadır.

Axolotlın merkezi sinir sistemi (MSS), vücudun hareketlerini kontrol etmekten ve duyu bilgileri işlemekten sorumlu olan beyin ve omurilikten oluşur. Sinir sistemi araştırmaları için dikkat çeken büyüleyici yönlerinden biri rejenerasyon kabiliyetidir. Çalışmalarda bu hayvanların MSS'nin yaralanmalarından sonra nöronları yeniden üretme yeteneğinin olduğu gösterilmiştir. İnsanlardan ve diğer birçok memeli türden farklı olarak, axolotl tüm yaşamı boyunca beyindeki ve omuriliklerindeki nöronları yenileme yeteneğine sahiptir (2).

Axolotlın beyni telensefalon, diensefalon, mezensefalon, ve rhombensefalon olmak üzere farklı bölgelerden oluşmaktadır (3). Semenderlerdeki en büyük beyin bölgesi telensefalon olup pallium, subpallium ve lateral ventrikül bölgelerine ayrılmaktadır. Çalışmalarda pallium bölgesinde hasar sonrasında rejenerasyonun yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu bölge sahip olduğu nöron popülasyonlarını tekrar oluşturabilir, hasarlı sinir liflerini onarabilir, retina, beyin ve omurilikte doku yapısını tekrar kazanabileceği bildirilmiştir (2,4). Yeniden onarım ve büyüme yeteneği, birçok memeli türünde gözlenen fibrotik yara izi ve iyileşme sürecinden hem mekanizma hem de sonuç açısından çok farklılık göstermektedir. Axolotldaki bu rejeneratif potansiyeli harekete geçiren faktörlerin anlaşılması, memelilerde rejenerasyonu etkileyen mekanizmaların anlaşılmasına ışık tutabileceği bildirilmiştir (5).

Semenderlerin çoğu yaşam döngülerinde, metamorfoz geçirirler ve büyüme ile tamamen gelişmiş yetişkin haline gelirler. Axolotlda ise bu durum farklıdır, yaşamları boyunca larva özelliklerini korurlar ve sınırsız büyüme sergileyen neotenik organizmalardır (1,6,7).

Sunulan araştırmanın amacı; yetişkin ve metamorfoza indüklenmiş axolotlın beyninin telensefalon bölgesinde meydana gelen yapısal değişikliklerin stereolojik,

immünohistokimyasal ve elektron mikroskopik yöntemler kullanarak araştırılmasıdır. Moleküler belirteçler kullanılarak, axolotl beyninin telensefalon bölgesinde lateral ventrikülün etrafındaki hücre tabakasında olgunlaşan nöron dağılımları da incelenmiştir. Neotenik ve metamorfik axolotl beyin dokularının morfolojilerinin önemli derecede farklılıklar gösterdiği, bunun ise hayvanın yeni hayat biçimine adaptasyonunda zorunlu olduğu düşünülmektedir.



## 4. GENEL BİLGİLER

### 4.1. Omurgalılarda Beyin Gelişimi ve Rejenerasyon

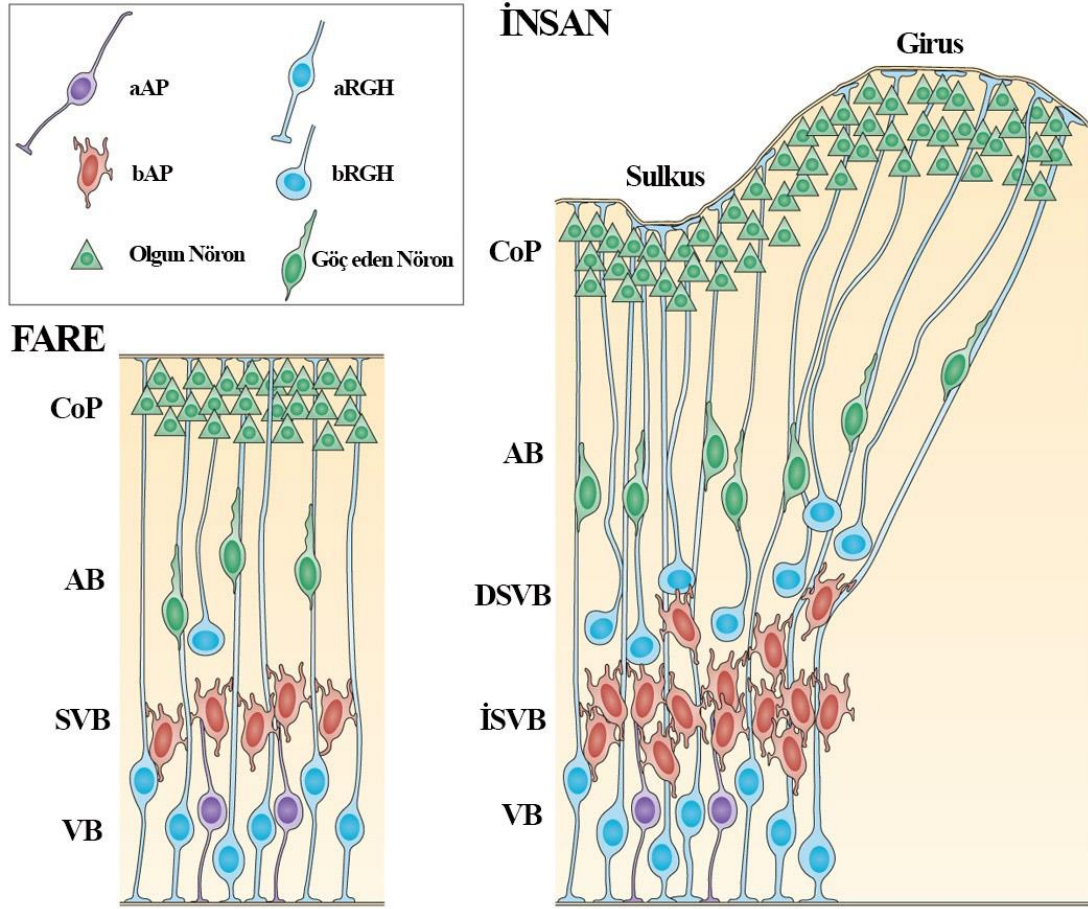
Beyin gelişimi, omurgalılar arasında evrimsel olarak korunmuş bir düzen içinde olmasına karşın, farklı türler arasında önemli derecede bir beyin anatomisi çeşitliliği söz konusudur. Gelişim, yeni nöronların üretimi, hücrelerin çoğalması ve durmasıyla bağlantılı süreçlerle gerçekleşir (8). Omurgalılarda MSS gelişimi sırasında, psödostratifiye epitel hücreleri ventriküler yüzeyde hücre bölünmesi geçirmektedir. Burada oluşan yeni hücrelerden bazıları ventriküllerden pial yüzeye doğru uzanan radyal glial hücreler (RGH) hattı boyunca perifere doğru göç ederek marjinal tabakaya farklılaşır, diğer hücreler ise ventrikül yüzeyinde çoğalmaya devam ederek ventriküler tabakayı (VB) oluşturur (9,10). Ventriküler tabakadan marjinal tabakaya doğru göç eden nöroblastlar kortikal plakayı oluşturur. Subventriküler tabaka ile kortikal tabaka arasındaki ara tabaka hücresel uzantılar ve göç eden hücrelerden oluşmaktadır (Şekil 4.1). Prenatal gelişim sürecinde, ventriküler ve subventriküler tabakadan göç eden hücreler kortikal tabakanın genişlemesini böylelikle serebral korteksin altı katmanlı yapısının oluşmasını sağlar (11)



**Resim 4.1** İnsanda gelişen serebral korteksin histolojik görüntüsü. Ventrikül bölgesinden pia mater tabakasına kadar sırayla ventriküler tabaka, subventriküler tabaka, ara tabaka, kortikal plaka ve marjinal tabaka sırayla gösterilmektedir (Hill 2022'den uyarlanmıştır.).

Memelilerde yeni nöronları üreten hücreler, morfolojik açıdan ve gen ekspresyon modeli açısından nöroglia karakterlidir (12,13). Memelilerde serebral korteks, erken embriyonik dönemde nöral tüpün en rostral bölgesinde olan nöroepitelyal (NE) hücrelerle belirlenir. NE hücreleri, hem nöronlara hem de glia hücrelerine farklılaşan kök hücre karakterindeki hücrelerdir. RGH, NE hücrelerinden köken alan, ventriküler tabakada (VT) bulunan, kortekste ventriküler ve pial yüzeyler arasında bipolar radyal lifleri oluşturan progenitörlerdir (Şekil 2.1, 2.2). RGH, glial özellikleri olan astrositlere, oligodentrositlere ve nöronlara farklılaşan hücreler olup (14), göç eden nöronlar için iskelet görevi görürler. Glial fibriller asidik protein (GFAP) ve astrosite spesifik glutamat taşıyıcı (GLAST; SLC1A3) madde gibi glial belirteçleri ifade ederler. RGH'in nöronları, astrositleri ve oligodendrositleri üretebildiği bilinmektedir (15,16). Korteks, proliferatif RGH'den farklılaşmış yavru hücrelerden oluşmaktadır. Karakteristik altı katmanlı kortikal yapı RGH uzantıları boyunca radyal olarak göç eden nöronlar tarafından oluşturulmaktadır (10).

Ventriküler bölge, memelilerde iki katman halindedir. Bunlar tek sıra halinde dizilmiş endimial hücrelerin oluşturduğu lümenle temasta olan bir katman ve subventriküler bölge olarak tanımlanan diğer bir tabakadır. Nöronal farklılaşma özelliğine sahip hücreler sadece telensefalonun subventriküler bölgesinde bulunan nöral progenitör hücreler (NPC)'dir (9). Progenitörler buldukları bölgeye göre adlandırılırlar. Ventrikülün apikal yüzeyinde bulunan glial hücreler apikal radyal glial hücreler (aRGH) ve apikal ara progenitör hücreler (aAP)'dir. Bazal ara progenitörler (bAP) çoğunlukla fare korteksinde subventriküler tabaka (SVB)'da, insan korteksinde ise iç SVB (İSVB) 'de bulunurlar. Bazal RGH (bRGH), fare korteksindeki SVB'de ve insan korteksindeki dış SVB (DSVB) 'de tanımlanır. Göç eden nöronlar çoğunlukla ara tabakada (AT) görülürken, olgun nöronlar kortikal plakada (KP) içten dışa altı katmanlı bir yapı oluşturur. İnsan korteksindeki kortikal yüzey genişlemesi, sulkus ve gyirus adı verilen katlanmış yapılarla sağlanır. İSVB ve DSVB, bir iç fiber tabakası ile histolojik olarak birbirinden ayrılır (10) (Şekil 4.2).



**Resim 4.2** Fare ve insanda gelişen serebral kortekste bulunan progenitörler hücrelerin dizilimlerinin şematize edilmesi. aRGH ve aAP ventriküler tabakada (VB) bulunmaktadır. Farede bAP subventriküler bölgede (SVB) bulunurken; insanda İSVB de bulunmaktadır. bRGH ise SVB ve DSVB de bulunmaktadır. Göç eden nöronlar AT'da bulunurlar ve olgun nöronlar kortikal plakta (KP) bulunur (Sun ve Hevner 2014' ten uyarlanmıştır).

NPH nöroblastlar halinde olfaktör bulbusa göç ederek burada GABAerjik granüler nöronlara ve dopaminerjik periglomerüler nöronlarına farklılaşırlar. Hipokampal subgranüler bölgede bulunan nöron prokürsor hücreler (NPH) ise, glutamaterjik granül nöronlarına ve az sayıda da hiler astrosit hücrelerine farklılaşırlar. İn vitro çalışmalarda, bu hücrelerden nöron üretimi yapılabilirken, in vivo'da bu hücrelerin sadece hipokampüste ve olfaktör bulbusta yeni nöronlar oluşturdukları bilinmektedir. Yetişkin nörogenezi için bu hedef bölgelerin dışında, NPH'in entegrasyonu esasen yoktur veya minimal düzeydedir. Çoğu beyin bölgesi (serebral korteks dahil), yaralanmaya bağlı nöronal hücre ölümünden sonra hayatta kalma için sınırlı derecede bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir (8). Bu nedenle, çoğu beyin bölgesinde düşük NPH entegrasyon potansiyeli, yaralanma veya nörodejenerasyondan

sonra beyin onarımı için önemli bir engel oluşturmaktadır. Hücre replasmanı için terapötik stratejiler geliştirme adına, bu tür beyin bölgelerinde nörogenez ve nöron entegrasyonuna izin verebilecek mekanizmaların daha iyi anlaşılmasına ihtiyaç vardır (4,17). Yetişkin memeli beyinde yeni nöronların üretimi, hipokampusun dentat girusu ile ön beyindeki lateral ventriküllerin subventriküler bölgesiyle sınırlıdır (18–20). Nörogenez, sessiz bölgelerde uyarılabilir, fakat üretilen yeni nöronların sayısı oldukça düşüktür ve sonuç olarak memelilerin işlevsel iyileşmesi sınırlı olmaktadır (19,20). Memeli olmayan omurgalılardan balık ve semender türlerinin yetişkin beyni ise, nörogenez aracılığıyla olası hasarları onarabilmektedir (21,22).

Bazı çalışmalarda glial hücrelerin memeli olmayan omurgalılarda da nöral kök hücre görevleri olduğu gösterilmiş olmasına karşın, beyindeki nöronların glial kökeni doğrudan gösterilememiştir (21). Bir araştırmada, memeli olmayan yetişkin beyindeki kök hücrelerin gliyal özelliklerden ziyade NE özelliklere sahip oldukları gözlenmiştir (23).

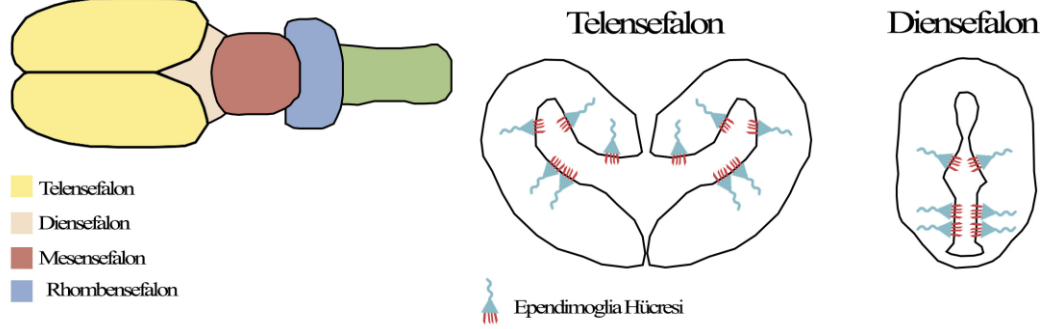
#### **4.2. Semender Beyni**

Amfibiler sınıfı 3 takımdan oluşmaktadır. Bunlar *Gymnophiona*, *Anura* ve *Caudata*. Semenderler, *Caudata* ya da *Urodela* olarak adlandırılan takımındadırlar. Urodellerin beyini, periventriküler gri maddeden oluşan kompakt bir lamina ve az sayıda göç etmiş hücre veya çekirdek kümesi ile karakterize yapıdadır. Kuyruksuz kurbağalarınkiyle (*Anuran*) karşılaştırıldığında genellikle ilkel olarak kabul edilmektedirler (24). Bu tür bir ilkelik, embriyonik gelişim sırasında azaltılmış bir hücresel göç ile ilişkilendirilir ve yetişkin beyinde larval özelliklerin ikincil bir basitleştirilmesine veya tutulmasına yol açtığı bilinmekte, bu sürece de paedomorfoz denilmektedir (25,26).

İki ventrikül etrafında düzenlenen axolotl palium'un nöroanatomi, memeli telensefalonunununkine benzerlikler göstermektedir. Axolotl paliumu, memeli serebral korteksinde bulunan bazı nöron alt tiplerinin temel özelliklerine sahiptir (2).

Semender beyini incelendiğinde, ventriküler bölgede ependimoglia olarak adlandırılan hücrelerin varlığı gözlenir. Ependimoglia hücrelerinin homeostasisin bozulması ve hasar durumunda proliferatif özelliklerinin olduğu bilinmektedir (2,27). Semender beyninin oluşumunda rol alan proliferasyon modelleri, glial çeşitlilik ve

nörogenez hakkında çok az şey bilinmektedir. Progenitör hücre olan bu hücrelerin gelişim sırasında farklı semender türlerinde görev aldıkları bilinmektedir. Ayrıca, doğada kendi yaşam döngülerinde metamorfoz geçiren semenderlerin beyin gelişimi çalışmalarında ependimoglia hücrelerinin farklılaşarak, yeni nöronların oluşmasında görev aldıkları bilinmektedir (27).



**Resim 4.3** Axolotl beyin bölgelerinin adlandırılmasının ve ependimoglia hücrelerin yerleşiminin şematize edilmesi (Lust ve Tanaka'dan uyarlanmıştır).

#### 4.2.1. Ependimoglia hücreler

Semender beyninin ayırt edici bir özelliği, ventriküler sistemin iç yüzeyini kaplayan radyal glia benzeri ependimoglia hücrelerinin kalıcı varlığıdır. Memelilerdeki radyal gliya hücrelerine benzer şekilde, semender ependimoglia hücreleri de nörojenik potansiyele sahiptir ve yetişkin beyninde yaralanma kaynaklı nörogenezde önemli rolleri vardır (28). Yetişkin notophthalmus'ta daha önce iki tip ependimoglia popülasyonu tanımlanmıştır, bunlardan biri kök hücre özelliğine sahip *tip 1* hücreleri diğeri ise transit çoğaltıcı progenitörlerin özelliklerine sahip *tip 2* hücreleridir (29).

Radyal glia, sırasıyla ependimal veya periependimal radyal gliayı oluşturan, ependimal veya periependimal katmanda yer alan gövdeleri armut veya iğ şeklinde olan hücreleri içerir. Bunlar, sırasıyla membrana glia limitans eksterna ve perivasküler glial tabakayı oluşturan uç ayaklar olarak sonlandıkları meningeal yüzeye ve vasküler duvara radyal olarak yönlendirilmiş uzun sitoplazmik uzantılarla karakterize hücrelerdir (30,31). Radyal glia hücreleri sadece filogenetik olarak en ilkel glia formunu temsil etmekle kalmaz, aynı zamanda omurgalıların ontogenisi sırasında ilk ortaya çıkan hücrelerdir. Ontogenetik olarak olgunlaşmamış bir glia tipini temsil

etmektedirler (31). Memelilerde radyal glia hücreleri gelişim ilerledikçe giderek azalır ve astrosit hücrelerinin farklı formlarına dönüşürler. Bu nedenle yetişkin memelilerde neredeyse yoktur (32,33). RGH, memelilerde yenidoğan döneminde silli endodermal hücrelere, parankimal glial hücrelere ve yetişkin NKH'e dönüşürler (33). Diğer omurgalılarda RGH'nın varlığı yetişkinlerde de korunur (31).

Glia fibriller asidik protein (GFAP) ara filament sınıfına aittir ve astroglial soyun olgun hücrelerinin hücre iskeletinde bulunur. Astroglial soya ait hücreler için GFAP güvenilir bir moleküler belirteç olarak kullanılmaktadır (34). Tüm astrosit tiplerinde, Bergmann glia, periependimal radyal glia, endodermal radyal glia ve tanisitlerde GFAP ekspres edilir (31,35).

Ependimoglia hücreler, astrosit belirteçleri olan GFAP, glutamin sentaz ve akuaporin 4'ü ifade eder, bu nedenle kan-beyin bariyerinde görev aldığı ya da glutamat ve iyon hemostazı gibi astrositlere ait görevleri de yerine getirdiği düşünülmektedir (36). Ependimoglia hücrelerin astrosit belirteçlerini ekspres etmelerinin yanında morfolojileri de memelilerdeki merkezi sinir sistemi progenitor hücrelere benzemektedir. Bu hücrelerden, gelişim sırasında nöronlar, astrositler ve oligodendrositler dahil diğer hücreler gelişmektedir (37,38).

Newt beyni, GFAP ekspres eden parankimal astrositlerden yoksundur (28,29). Ependimoglia hücreleri, glutamatın metabolik regülasyonu ile nöronları eksitotoksisiteden korumada görev alır, bu regülasyonu memelilerde astrositler gerçekleştirir (29). Bir çalışmada, GFAP ve GLAST işaretleyicileri, newt beynindeki tüm ependimoglia hücreler için ortak iken, GS seçici olarak yalnızca tip 1 hücrelerinde gösterilebilmiştir (29).

Semenderler ayrıca nöronların hücre tipine özgü değiştirilmesini de sağlayabilir. Spesifik toksin 6-hidroksidopaminin ile dopaminerjik nöronların ablasyonundan sonra yeni nöronların oluşturulduğu gösterilmiştir (39).

Yetersiz bir rejeneratif cevap veya yaygın bir rejenerasyon süreci, eksik veya fazla sayıda hücre ile sonuçlanabilir. Bu nedenle, yeni hücrelerin oluşumunun başlatılması ve uygun şekilde sonlandırılması iki kritik adım olarak kabul edilmektedir. Durağan dokularda, hücre kaybından sonra yer değiştirme süresini kontrol eden mekanizmalar hakkında çok az şey bilinmektedir. Yerel kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin hücre kaybını ve derecesini nasıl algıladıkları

bilinmemektedir, bu mekanizmanın anlaşılması rejenerasyon çalışmaları için önemlidir (40).

### 4.3. Beyin Hasarı ve Rejenerasyon

Tüm tetrapodların organ veya uzuv gibi karmaşık yapıları yeniden oluşturma yeteneğine sahip olduğu bilinmektedir. Ancak memeliler de dahil olmak üzere bu türlerin çoğu, yetişkin organizmalara dönüştükçe bu kapasitelerini önemli derecede kaybetmektedirler. Bunun yanı sıra, ürodel amfibileri (semenderler ve newtler), yetişkinlikleri boyunca yenilenme yeteneğine sahipken, axolotl (*Ambystoma mexicanum*) daha önce vurgulandığı gibi uzuvları, kalbi, beyni ve akciğerleri gibi iç organları da dahil olmak üzere birçok vücut parçalarını da yenileyebilen bir sucül semenderdir (41). Yüksek düzeyde rejeneratif yeteneklerinin olması nedeniyle, bu canlılar, laboratuvar çalışmalarında yeni hayvan modelleri olarak tercih edilmektedirler. Ayrıca teleosit balıklar ve semenderler, rejenerasyon yeteneklerini erişkin yaşamlarında da devam ettirirler. Sürüngenler, kurbağalar, semenderler ve teleosit balıklar gibi daha düşük düzeydeki omurgalılarda ventriküler bölgede bulunan NPH'in yetişkinlikleri boyunca da çoğaldıkları bilinmektedir (4). Nöronal hücre ölümü gerçekleştiğinde, rejenerasyon gerçekleşebilmektedir (27). Bu mekanizmanın nasıl çalıştığının açıklanması rejenerasyon kapasitesi sınırlı olan memeliler için önemlidir. NPH in dağılımını, farklılaşmasını ve göçünü inceleyen karşılaştırmalı çalışmalar, yetişkin memeli MSS'de nöronal rejenerasyonu uyarmak için kullanılacak mekanizmaların anlaşılmasına önemli katkı sağlayabilir. Bununla ilgili olarak, altta yatan mekanizmaların tanımlanması ile nöronal hasara neden olan nöropatolojik hastalıkların tedavisine yönelik önemli katkı sağlayacaktır.

MSS rejenerasyonu çoğunlukla kuyruk ampütasyonu veya bir parça beyin dokusunun çıkarılmasıyla incelenmiştir (21). Hasarlanan beyin dokusunun yenilenmesi, nöronlara farklılaşan ependimoglia hücrelerinin proliferasyonu yoluyla gerçekleşmekte ve bu süreç *nörogenez* olarak adlandırılmaktadır. Nörogenez, gelişmekte olan beyinde ve bazı yetişkin beyin nişlerinde bulunan hücrelerden yeni nöronların oluşturulmasıdır (42,43). Memelilerde, SVB hücreleri yaşam boyunca nörogenez geçirir, ancak beyin hasarından sonra lezyon bölgesinde yeni nöron üretme yeteneği sınırlı kalır (44,45). Uzun süreli vücut büyümesi sergileyen axolotllar gibi

suda yaşayan hayvanlarda, birçok beyin bölgesinde post-embriyonik nörogenez gözlenir. Semenderlerde ve memelilerde görülen nörogenez arasındaki moleküler ilişki kapsamlı araştırılmamıştır (46). Memeli beyninin fonksiyonu, belirli işlevlerin yürütülmesi için gerekli olan farklı ağlara entegre edilmiş olağanüstü çeşitlilikteki nöronal alt tiplerin işlem gücüne dayanmaktadır. Bu nedenle MSS'deki rejeneratif tıbbın bir temel amacı, yalnızca nöronların orijinal heterojenliğini değil, aynı zamanda endojen doku içindeki spesifik bağlantı modellerini de yeniden oluşturmaktır (2).

Kırmızı benekli semenderde yapılan bir çalışmada, orta beyinde bulunan dopaminerjik (DA) nöronların ablasyon sonrasında orta beyin bölgesinde bulunan ependimoglia hücrelerinin hücre döngüsüne yeniden girmesine yol açtığı gösterilmiştir (21). Dopaminerjik hücre rejenerasyonu, hücresel proliferasyona bağlıdır ve normalde durağan olan orta beyindeki ventriküler ependimoglia kök hücrelerinin hücre döngüsüne yeniden girişine bağlıdır (28). Hücre tipine özgü işaretleme yöntemi kullanılarak, yeni hücrelerin çoğunun ventriküler tabakadan çıktığını ve ablasyondan sonra ölen tirozin hidroksilaz (TH) eksprese eden nöronlara değişmek için nörogenez geçirdikleri gösterilmiştir. Buna karşılık, intraventriküler bölgeye herhangi bir madde verilmeden yapılan enjeksiyonun bir mitotik yanıtı indüklediği, ancak bu hücrelerin çoğunun bölgesel ventriküler nişlerinde kaldığı gösterilmiştir (21). Ablasyondan sonra, semenderlerde rejenerasyon gerçekleşir, histolojik restorasyon tamamlanır ve motor davranışta tamamen iyileşme gerçekleşir (28,47). Semenderlerin bu özellikleri, Parkinson hastalığının anlaşılması ve alternatif tedavi yöntemlerinin çalışılması için önemli bir hayvan modelidir (28). Evrimsel olarak korunmuş TH ve Nurr1 belirteçlerini ifade eden dopaminerjik nöronlar, rejenerasyon sırasında yavaş yavaş yeniden oluşurlar ve ablasyondan sonraki dört hafta içinde normal sayılarına ulaşabilmektedirler (47). Ablasyon yapılmayan kontrol hayvanlarının orta beyinlerinde yeni dopaminerjik nöronların varlığı tespit edilememiştir (21). Ablasyon sonrası tam iyileşme gerçekleştikten sonra yeni nöron oluşumunun devam etmediği gözlenmiştir (28,47). Newtler, yetişkin omurgalılar arasında en kapsamlı rejeneratif kapasiteye sahip olan güçlü bir hayvan modelidir (28).

Axolotl pallium bölgesine uygulanan hasar sonrasında oluşan yeni nöronların olgun elektrofizyolojik özellikler kazandıkları ve yerel afferent girdilere yanıt verebildikleri gösterilmiştir. Ancak, beklenmedik bir şekilde uzun mesafe

bağlantılarını ve orijinal doku mimarisini yeniden inşa etmekte başarısız oldukları belirtilmiştir. Yetişkin axolotlların orijinal uzun mesafe bağlantısını ve doku organizasyonunu tamamen yeniden inşa etme kapasitesinde sınırlamalara sahip oldukları gözlenmiştir (2). Ayrıca metamorfoz sonrasında rejenerasyon kapasitesinin kaybolmaması, bu türde rejenerasyonun kısmen yetişkinlikte paedomorfik bir durumun sürdürülmesiyle bağlantılı olduğu teorisine de meydan okumaktadır (48). Bu sonuçlarla, yetişkin axolotl beyninin, yeni nöronların oluşumuna talimat vermenin ötesinde, beynin geniş bir bölgesi çıkarıldığında bile elektrofizyolojik olarak işlevsel olan çeşitli nöronları yeniden üretme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (2).

Birçok farklı semender türü bulunmakta ve bu hayvanların rejenerasyon mekanizmaları birbirinden önemli derecede farklılık gösterebilmektedir. Örneğin Red-spotted Newt (*Notophthalmus viridescens*) ve axolotl (*Ambystoma mexicanum*) kas rejenerasyon mekanizmaları birbirinden çok farklıdır. Bu yüzden farklı semender türlerinin rejenerasyon mekanizmalarının açıklanması gerekmektedir. Bu da rejenerasyon yeteneği yüksek düzeyde olan hayvan türlerinin, ileri düzey teknikler kullanılarak araştırılmasını zorunlu kılmaktadır (49).

#### **4.4. Metamorfoz**

Diğer semender türleriyle karşılaştırıldığında metamorfoz geçiremeyen bir canlı olan axolotl larva evresinin morfolojik özelliklerini yetişkinliğe kadar korumaktadır (48). Metamorfoz yoluyla büyük oranda morfolojik değişikliklere uğrayan amfibiler, gelişimsel zorlukların üstesinden gelmek için iki fazlı yaşam evresi sergilerler. Amfibiler metamorfoz sürecinde, larvadan yetişkin formuna geçişle ilişkili bir dizi davranışsal, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve genetik değişiklik geçirirler (50). Tiroit hormonları, metamorfozun başlaması ve tamamlanmasında önemli bir etkidir. Tiroit hormonunun doğal birikimi (anuranlarda olduğu gibi) veya yaşam alanlarına eklenmesi (axolotlda olduğu gibi), karasal yaşam koşullarına uyum sağlamak için organların kritik bir şekilde yeniden düzenlenmesine yol açar. Bu adaptif süreçte, bazı mevcut organların ve ekstremitelerin kaybı veya rekonstrüksiyonu veya yenilerinin oluşumu gerçekleşebilmektedir (51). Axolotlın metamorfoz geçirmesi için L-tiroksin ile indüklenmesi gereklidir. Bunun için yetiştirme sularına T4 (tetraiodothironin) eklenerek metamorfozu tamamlamaları sağlanmaktadır. T4 hormonunun

uygulamasından sonraki süreçte gözlenen kilo kaybı, yüzgeçlerin kaybolması ve solungaç boyutunda azalma gibi morfolojik değişikliklerle birlikte axolotllar karasal hayat koşullarına uyum sağlamaktadırlar (51,52).

## **4.5. İmmünohistokimyasal Analizler**

### **4.5.1. Glial Fibriler Asit Protein (GFAP)**

Ependimoglia hücrelerinin işaretlenmesinde GFAP kullanılmaktadır. GFAP erişkin insan ve sıçan beyinlerindeki astrositlerin işaretleyicisi olarak kullanılırken, axolotl ve diğer telositlerde memeli benzeri astrositler bulunmadığı için GFAP işaretleme yöntemi ile progenitör hücre görevi gören ependimoglia hücrelerinin beyindeki yerleşim yerlerinin tespiti yapılabilmektedir (21,30,38,53,54). Ayrıca axolotl beyinde astrosit hücreleri yerine radialglia hücreleri görev almaktadır (30). Sıçanlarda da benzer bir süreç söz konusudur, doğumla birlikte lateral ventrikülün duvarında bulunan subventriküler zondaki hücreler farklılaşarak astrositleri oluştururlar, yani prenatal dönemde sıçan beyinde astrosit bulunmamaktadır (55). Kemirgenlerde doğumdan sonraki üç haftalık süreçte, radyal glia hücrelerinin ya da subventriküler bölgedeki progenitör hücrelerin farklılaşmasıyla ve olgunlaşmamış astrositlerin bölünmesiyle yeni astrositler oluşmaktadır (55–57).

### **4.5.2. Miyelin temel protein (MTP)**

Merkezi sinir sisteminde miyelinin ana bileşenlerinden biri de miyelin temel proteindir, “miyelinin yetkili molekülü” olarak adlandırılır (58–60). Sadece miyelinleştirici gliada (MSS'deki oligodendrositler ve PSS'deki Schwann hücreleri) eksprese edilir ve bu hücreler tarafından üretilen plazma zarının ve miyelin zarının sitoplazmik yüzeyinde bulunurlar (60). Fonksiyonel MTP'den yoksunluk, merkezi sinir sisteminde şiddetli hipomiyelinizasyon, titreme semptomları ve erken ölüm ile karakterize edilir (58). Miyelin oluşumundan sorumlu proteolipid proteini (PLP) ve 2',3'-siklik nükleotid 3'-fosfodiesteraz (CNP) gibi diğer miyelin proteinlerinin eksikliğinin, MSS'de miyelinizasyonu etkilemekten ziyade ikincil nöronal etkilere neden olduğu savunulmaktadır (58).

Bir çalışmada, biyokimyasal analiz sonucunda, neotenik ve metamorfik formların her ikisinde de axolotl beyin dokusunda bulunan miyelin bileşenlerinin aynı

olduğu gözlenmiştir (59). Miyelin bakımından zengin bölgeler memelilerde tanımlanmıştır, ancak memeli olmayan omurgalılarda ve amfibilerde bu bölgeler açık bir şekilde tanımlanamamıştır. Ivan ve ark. yaptığı çalışmada, myeline özel bir boya olan Black Gold II reagent ile koronal ve sagittal juvenil axolotl beyni kesitlerini işaretlemiş ve beynin anterior telensefalon bölgesinde işaretli miyelin alanları tespit edememişlerdir (3). Posterior kısmında miyelin ağları tespit edilirken anterior kısmında tespit edilememesini ise tutarsızlık olarak değerlendirmişlerdir. Gelişmekte olan memelide, miyelinizasyon süreci omurilikte başlar ve doğumdan sonra kademeli olarak MSS'nin arka kısmını kaplar. Axolotl beyninin juvenil evresi tamamen miyelinli olmasa bile, yetişkin beyninin ön beyin kısmında miyelin içermesi mümkündür (3). Bu konuya bir diğer yaklaşım ise axolotlın neoteni ve/veya diğer tanımlanamayan fizyolojik olayların bir sonucu olarak beynin ön kısmındaki aksonları miyelinleme kapasitesini kaybetmiş olabileceğidir. Bir diğer hipotez ise, Black Gold II boyası telensefalondaki miyelinleri işaretlemek için uygun bir işaretleyici olmayabilir (3). Bu son hipotezin doğrulanması için, axolotl gelişiminin diğer aşamaları ve/veya miyelini saptamaya yönelik metodolojiler kullanılabilir.

#### **4.5.3. Ki-67**

Gelişim sırasında gerçekleşen hücre çoğalma düzeyinin belirlenmesi için çoğu zaman Ki-67 işaretlenmesiyle immünohistokimyasal analizler yapılmaktadır (61,62). Bir nükleer protein olan Ki-67 hücre döngüsünde G0 fazı hariç, tüm aşamalarda yer alır, bu sebeple Ki-67 ile pozitif boyanan hücrelerin sayılarının hesaplanması, hücre proliferasyon aktivitesinin doğrudan bir ölçüsü olabilmektedir. Ki-67 işaretleyicileri ile hücrelerin proliferasyon indeksi belirlenmektedir (61,62).

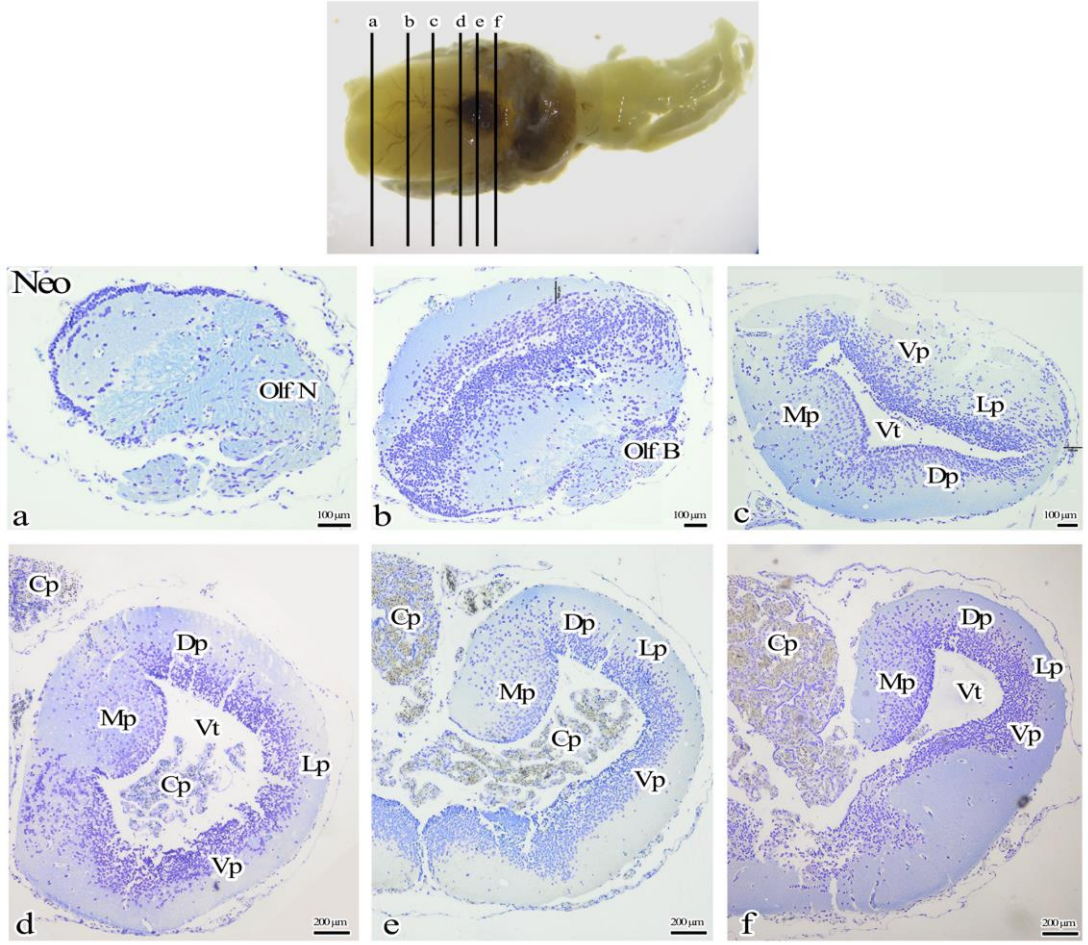
#### **4.5.4. Nöronal çekirdek antijeni (NeuN) ve çiftkörtin (DCX)**

Ki-67 işaretlemesiyle birlikte beyin gelişimini değerlendirme çalışmalarında sıklıkla kullanılan çiftkörtin (DCX) ve nöronal çekirdek antijeni (NeuN) işaretlemesi de yapılmakta, bu sayede olgunlaşan ve olgunlaşmayan nöronlar birbirinden ayırt edilebilmektedir (63). DCX, omurgalı nöronlarındaki sitoskelet mikrotübülleriyle ilişkili bir proteindir ve beyin gelişimi sırasında göç öncesinde ve sırasında olgunlaşmamış nöronlar tarafından eksprese edilir (64). NeuN (nöronal çekirdek

antijeni), merkezi sinir sisteminde çoğu granül hücrenin çekirdeğinde ve perinükleer sitoplazmasında eksprese edilen ancak olgunlaşmamış sinir hücrelerinde saptanamayan bir nöronal nükleer antijendir (65).

#### **4.6. Axolotl Beyin Histolojisi**

Axolotlın (ve diğer amfibilerin) genç-yetişkin beyni, diğer omurgalılarına benzer bölgelerden oluşur: Olfaktör bulbus, telensefalon, diensefalon, mezensefalon ve rhombensefalon (3). Ventrikülün etrafını saran tabaka radyalgia veya ependimoglia hücrelerini içermektedir (27). Telensefalon bölgesi incelendiğinde medial, lateral, ventral ve dorsal pallium olarak adlandırılan bölgelerden oluştuğu görülecektir (3). İki hemisfer arasında kalan bölgede, makroskobik olarak da ayırt edilebilen koroid pleksus bulunmaktadır. Anterior telensefalon bölgesinde ventrikül bulunmamakta, tek sıra halinde dizilmiş nöronlar ve olfaktör sinir bölgesi bulunmaktadır. Posterior telensefalon bölgesine doğru ventrikül duvarını oluşturan, birkaç tabaka halinde organize olmuş nöronlar görülebilmektedir (2).



**Resim 4.4** Neotenic axolotl beynine ait telensefalon bölgesinin farklı seviyelerden alınan kesitleri. Ön beyin başlangıç kesit görüntüsü ve olfaktör sinir (Olf N) bölgesi (a), ventrikül başlangıç bölgesi ve olfaktör bulbus bölgesi (Olf B) (b), Ependimal hücreler ile çevrelenmiş ventrikülün (Vt) net olarak görülmeye başlandığı düzey (c); ventrikül etrafındaki bölgeler; medial pallium (Mp), dorsal pallium (Dp), lateral pallium (Lp), ventral pallium (Vp), Koroid pleksus (Cp) yapısı iki ön beyin hemisferi arasında görülmektedir(d ve e), iki hemisfer yapısının birbirine yaklaştığı orta beyne doğru geçişin olduğu bölge (f). (Boya: krezil violet, Büyütme: 4X)

## 5. MATERYAL VE METOT

### 5.1. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları

Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulundan etik kurul onayı (E-38828770-772.02-49005, 22/09/2020) alındıktan sonra çalışmaya başlandı. Çalışmamızda, İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezinden (MEDİTAM) temin edilen 12 aylık 10 adet neotenik ve 10 adet metamorfoza indüklenmiş metamorfik axolotl (*Ambystoma mexicanum*) kullanıldı. Axolotlların metamorfoza indüklenmeleri, beslenmeleri ve barınmaları aynı merkezde sağlandı. Diğer çalışmalar ise İstanbul Medipol Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ve Sağlık Bilim ve Teknolojileri Araştırma Enstitüsü (SABİTA) bünyesindeki laboratuvarlarda ve Ondokuz Mayıs Üniversitesi KİTAM ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

### 5.2. Metamorfoz İndükleme

Axolotlun metamorfoza indüklemesi için L-tiroksin (T4) ile indüklenmesi gerekmektedir. Holtfreter çözeltisi içinde tiroksin çözülerek tetraiodothironin (T4 çözeltisi, 50 nM) solüsyonu hazırlandı. Her bir axolotl ayrı kaplarda olmak üzere bu solüsyonlar içerisinde barınması sağlandı (66). Metamorfoz tamamlanana kadar kaplardaki solüsyonlar her üç günde bir tazelenerek değiştirildi. T4 hormonu uygulamalarından sonraki üç hafta içinde gözlenen kilo kaybı, yüzgeçlerin kaybolması ve solungaç boyutunda azalma gibi morfolojik değişiklikler izlenerek karasal hayat koşullarına uyum sağlamaları beklendi. Hormon tedavisi, tamamen metamorfik axolotllar elde edilene kadar 3 ay boyunca devam ettirildi. Doğal yaşamlarında metamorfoz geçiren diğer semenderler larva döneminden sonra serumlarındaki T4 seviyesi yavaş biçimde artar. Neotenik axolotl barınma suyuna eklenen T4 serum içerisindeki seviyesinin artmasını sağlamış oldu (51,52).

### 5.3. Doku Takibi

#### 5.3.1. Parafin doku takibi

Sakrifiye edilen axolotllardan elde edilen dokular, 1:1 oranda hazırlanan; %4 paraformaldehit (PFA) + %4 glutaraldehit solüsyon ile bir hafta + 4 °C’de tespit edildi. Doku kasetlerine yerleştirildikten sonra, 4 saat akar su altında yıkama yapıldı. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma aşamasından sonra, parafin infiltrasyonu için ksilen-parafin karışımında (%50 ksilen + %50 parafin) 1 saat bekletildi. Dokular bir gece etüvde sıvı parafin içerisinde bekletildi ve ertesi gün parafin içerisine gömüldü. Dokuların alkol serisi ve ksilen içerisinde bekletilme süreleri aşağıda verilmiştir.

- %70 Alkol 1 saat
- %80 Alkol 1 saat
- %96 Alkol 1 saat
- %96 Alkol 1:2 saat
- %100 Alkol 1 saat
- %100 Alkol 1:2 saat
- %100 Ksilen 1 saat
- %100 Ksilen 1:2 saat

#### 5.3.2. Elektron mikroskop doku takibi

Elektron mikroskop doku takibi için klasik araldit doku takibi ve en-block boyama protokolü olmak üzere iki takip protokolü uygulandı (67,68). Neotenik ve metamorfik axolotl karşılaştırması için klasik elektron takibi protokolü kullanıldı. Seri kesitlerde gerçekleştirilen nöromelanin ve goblet benzeri hücrelerin analizlerinde en-block boyama protokolü kullanıldı.

##### 5.3.2.1. *Klasik elektron mikroskop doku takibi*

Fikse edilmiş dokular, 0.1 M PBS ile 4 kere onbeşer dk. boyunca orbital çalkalayıcıda yıkandı. Osmiyum tetroksit (OsO<sub>4</sub>) (%1) ile bir saat post-fiksasyon yapıldı. Sonrasında 0.1 M PBS ile 4 kere onbeşer dk. boyunca yıkama yapıldı. Artan aseton serileri ile dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi.

- %50 aseton 15 dk.
- %70 aseton 15 dk.
- %95 aseton 15 dk.
- %100 aseton 20 dk.
- %100 aseton 20 dk. bekletildi.

Sonrasında propilen oksit aşaması gerçekleştirildi. İki kere yirmişer dk. %100 saf propilen oksit içerisinde bekletildiler. Gömme materyali Araldit CY212 kiti kullanılarak hazırlandı.

- Araldit CY 212.....10 ml
- DDSA..... 10 ml
- BDMA..... 0,4 ml
- Dibütil folat..... 0,8 ml

Yukardaki solüsyonlar cam bir kaba eklendikten sonra 15 dk. boyunca cam karıştırıcı ile karıştırıldı.

Propilen oksit (%50) + araldit (%50) solüsyonu içerisinde dokular bir saat oda ısısında bekletildikten sonra bu karışım dokulardan uzaklaştırıldı. Sonrasında, saf araldit içerisinde bir saat bekletildi. Rezin blokların hazırlanması için taze hazırlanan araldit kalıplara döküldü ve dokular bu kalıplara yerleştirildikten sonra 48 saat boyunca 60 °C etüvde polimerizasyonu sağlandı.

Rezin bloklardan 500 nm kalınlığında yarı ince kesitler cam bıçak kullanılarak, 70 nm kalınlığında ince kesitler ise elmas bıçak kullanılarak ultramikrotom ile alındı. Lam üzerine alınan yarı ince kesitler %1 toluidin mavisi ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelendi (69). İnce kesitler ise 200 mesh'lik gridler üzerine yerleştirildi. Kontrastlama cihazı (Leica, EM AC20) kullanılarak kesitlerin kontrastlaması yapıldı. Program I ile kesitler, 45 dakika boyunca %0,5 uranil asetat (EMS,22400) ile, 15 dk. boyunca ise %3 kurşun sitrat (leica, ultrostatin II) ile kontrastlama yapıldı. Gridler üzerindeki kesitler gridbox içerisine yerleştirildi ve bir gün sonra geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) kesitlerin farklı büyütmedeki görüntüleri elde edildi.

### 5.3.2.2. *Enblock staining elektron mikroskop doku takibi*

Dokular Karnovsky fiksasyon solüsyonu ile 3 gün +4°C de fikse edildi. Fikse edilen dokular 3-4 kez beşer dk. boyunca 0.15 M cacodylate buffer (CB) (EMS, 11655) ile yıkandılar. İki farklı osmiyum tetroksit (OsO<sub>4</sub>) solüsyonu kullanıldı. Birinci osmiyum tetroksit solüsyonu, 3,3 ml %4 OsO<sub>4</sub>, 2 ml %5 potasyum ferrosiyamid solüsyonu ve 1.3 ml dH<sub>2</sub>O ile hazırlandı. Bu solüsyon içerisinde dokular 30 dk. boyunca oda ısısında bekletildiler. Distile su ile dokular 4 kez yıkandıktan sonra %5 Thiocarbohidrazide (TCH) (Sigma, 223220) solüsyonunda 30 dk. bekletildi. TCH solüsyonu, 15 mg TCH ve 3 ml dH<sub>2</sub>O ile hazırlandı, vorteks ile karıştırıldı ve 60 °C'de çözünmesi sağlandı. dH<sub>2</sub>O ile yıkama işleminin ardından ikinci osmiyum solüsyonunda (distile su ile hazırlanan %2 OsO<sub>4</sub>) 30 dk. oda ısısında bekletildi. Yıkama işlemi 3-4 kez dH<sub>2</sub>O ile yapıldıktan sonra, bir gece +4 °C'de %1 uranil asetat (EMS,22400) solüsyonunda bekletildi. Ertesi gün; dH<sub>2</sub>O ile yıkama yapıldıktan sonra 60 °C etüvde kurşun aspartat [0.066 g kurşun nitrat (EMS, 17900) ve 10 ml 0.03 M aspartik asit içerisinde çözüldü ve 1 N potasyum hidroksit çözeltisi (KOH) kullanılarak pH 5 olarak ayarlandı] içerisinde 40 dk. bekletildi. Sonrasında yıkama işlemi yapılarak artan aseton serisi ile dehidratasyon işlemi yapıldı.

- %50 aseton 15 dk.
- %70 aseton 15 dk.
- %90 aseton 15 dk.
- %100 aseton 10 dk.
- %100 aseton 10 dk.
- %100 aseton 10 dk.

İki saat 1:1 (%100 alkol + epon karışımında), 2 saat 1:2 (%100 alkol + epon karışımında), sonrasında 2 saat saf epon karışımında bekletildi. Gömme solüsyonuna yerleştirilen dokular polimerizasyon için etüvde (60 °C) bir gece bekletildi.

### **5.3.2.3. Taramalı elektron mikroskop analizi için dokuların hazırlanması**

%4 PFA + %4 glutaraldehit solüsyonu ile +4 °C'de fikse edilen beyin dokusu brain matrix kullanılarak 1 mm'lik dilimler haline getirildi. Her bir dilim PBS ile yıkandıktan sonra %1 osmiyum tetroksit (OsO<sub>4</sub>) ile post fiksasyon gerçekleştirildi. Distile su ile yıkamanın ardından aseton serilerinden onbeşer dk (%50, %70, %90, %100) geçirildi. Süper kritik kurutma cihazı (Leica, CPD300) kullanılarak kurutma işlemi yapıldı. Kurutma işlemi yapılan doku örnekleri iletken bant üzerine yerleştirilerek kaplama cihazı (Leica, EM ACE200) ile 30 sn. diffuse ayarında altın-palladium ile kaplandı. Elektron mikroskopunda (Zeiss, Gemini 500) sekonder elektron detektörü ile 3 kv EHT ile farklı büyütmelerde görüntüler çekildi.

### **5.4. Kesit Alma ve Krezil Viyole Boyama**

Parafin bloklardan mikrotomda 4 µm kalınlığında kesitler lama alındı. Kesitlerin lama sıkı tutunması ve deparafinizasyonu için 60 °C etüvde bir gece bekletildi. Daha sonra kesitler ksilen içerisinde 45 dk. bekletilerek parafinin dokulardan uzaklaştırılması sağlandı. Deparafinizasyon işleminin ardından kesitler, kademeli olarak onbeşer dk. konsantrasyonu azalan alkol serilerinden (%100, %90, %80, %70) geçirildi ve distile suya indirildi. Distile su içerisinde 5 dk. bekletildikten sonra boyama işlemi yapıldı. Etüvde (60 °C) bekletilmiş krezil viyole ile 2 dk. boyunca boyanan dokular, ayrıştırıcı içerisinde 20 sn. tutulduktan sonra artan alkol serilerinden (%70, %80, %90, %100) onbeşer dk. geçirildi. Ksilende bekletildikten sonra kesitler entellan ile kapatılarak ışık mikroskobu ile incelendi ve ilgili alanlardan fotoğraflar çekildi.

### **5.5. Stereolojik Analizler**

Stereolojik analizler için ayrılan deney hayvanları sakrifiye edildikten sonra parafin doku takibi yapıldı, parafin bloklardan 4 µm kalınlığında disektör çiftleri 1:24 örnekleme oranında alındı, deparafinizasyon işlemlerinden sonra krezil violet boyası ile boyandılar.

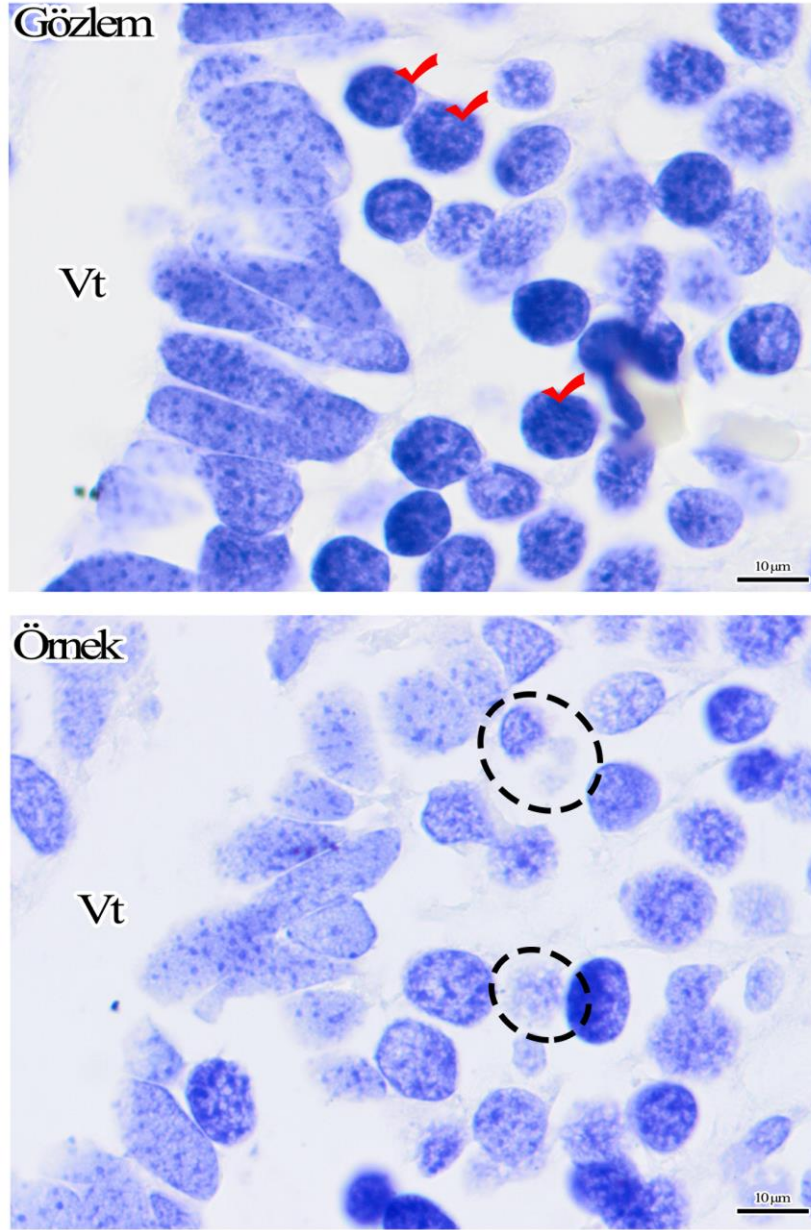
Minitab programı (versiyon 20) ile güç analizi yapıldı ve analiz testinde uygun hayvan sayısının 5 olduğu belirlendi.

**Güç analiz testi sonucu:**

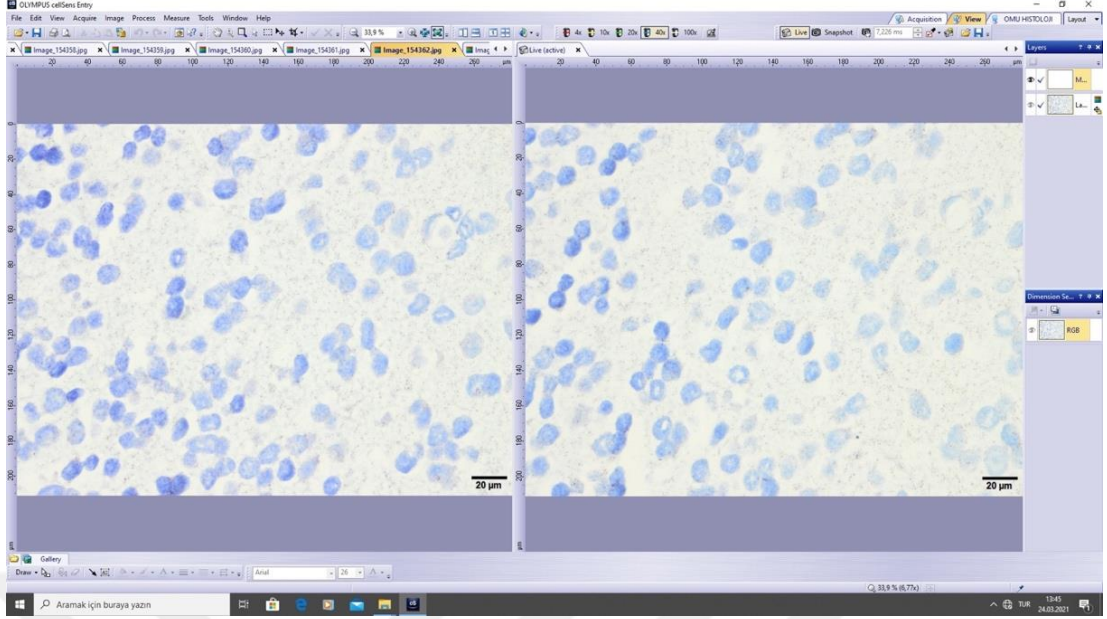
<b>Maximum Difference</b>	<b>Sample size</b>	<b>Target Power</b>	<b>Actual Power</b>
8,58	5	0,95	0,970760

Stereolojik analizler için çalışmaya alınan neotenik (n=5) ve metamorfik (n=5) hayvanların telensefalon bölgesindeki hücrelerinin hücresel yoğunlukları ve toplam hücre sayıları stereolojik bir yöntem olan fiziksel parçalama (physical fractionator) hücre sayım yöntemi kullanılarak hesaplandı (Resim 5.1).

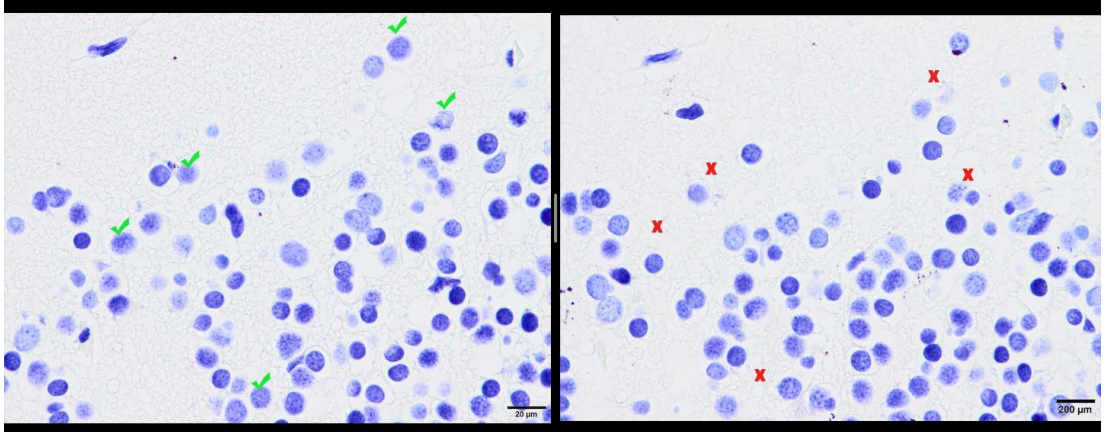
Hücre yoğunluğu ve toplam hücre sayısı hesaplamasında, sistematik rasgele örnekleme (SRÖ) yöntemi kullanıldı. Bu yöntem tüm bileşenlere eşit oranda örnekleme şansı vermektedir. Stereolojik analizler için kesit alma sırasında yapılan örnekleme ile her 24 kesitten biri SRÖ yöntemi ile alındı. Alınan kesitlerde SRÖ yöntemi ile alan örnekleme de yapılarak analizlerin gerçekleştirileceği alanların fotoğrafları ışık mikroskopunda (Olympus Tokyo, Japan) cellSens programı (Olympus SC50, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany) kullanılarak çekildi. Disektör kesitlerinin görüntülenmesi ise programın ekran bölme özelliği kullanılarak, her iki komşu kesitte aynı olan bölgenin fotoğrafları çekilerek yapıldı (**Resim 5.2 ve 5.3**). Disektör çiftlerinin analizinde, gözlem kesitte bulunup, örnek kesitte bulunmayan hücreler disektör hücre (tanecik) olarak esas alındı. Bu yöntemle beyin dokusunun ilgili alanlarının her birinde bulunan toplam hücre sayısı hesaplandı(70).



**Resim 5.1** Fiziksel parçalama yönteminde kullanılan disektör kesit çifti görülmektedir. Disektör çiftlerinin analizinde, gözlem kesitte bulunup örnek kesitte bulunmayan hücreler disektör hücre (tanecik) olarak esas alındı ve sayıldı. (Büyütme 40X)



**Resim 5.2** Olympus CellSens programı kullanılarak ardışık iki kesitte aynı iki alanın görüntülediği disektör çiftleri (Büyütme 40X)



**Resim 5.3** Disektör hücrelerinin (taneciklerinin) sayılması. Analizler bilgisayar ekranını ikiye bölerek gerçekleştirildi, ilk fotoğrafta bulunan (Gözlem), ikinci fotoğrafta (Örnek) bulunmayan nöronlar sayaç kullanılarak sayıldı (Büyütme 40X).

## 5.6. Alsiyan Mavisi Boyama

Dokulardan alınan 4 µm kalınlığındaki parafin kesitler deparafinize edildi ve alsiyan mavisi boyama kiti (Bio optica, 04-160802) protokolüne göre boyama işlemi yapıldı. Boyama işlemleri oda ısısında gerçekleştirildi.

Her bir kesit üzerine birer damla A solüsyonundan (Alsiyan mavisi pH 2,5) eklendi ve 30 dk. etki etmesi için beklenildi. Sonrasında, lam üzerinden solüsyon akıtıldı ve B solüsyonu (Sodyum tetraborat) eklendi ve 10 dk. bekletildi. Distile su ile yıkamanın ardından C solüsyonu (Mayer Carmalum) eklendi ve 5 dk. boyunca etki etmesi için bırakıldı. Distile su ile yıkamanın ardından, artan alkol serilerinden geçirildi ve ksilen ile şeffaflaştırıp ışık mikroskobu için hazır hale getirildi.

## 5.7. Periyodik Asit-Shiff (PAS) Boyama

Dokulardan alınan 4 µm kalınlığındaki parafin kesitler deparafinize edildi ve PAS boyama kiti (Bio optica, 04-130803) protokolüne göre boyama işlemi yapıldı. Boyama işlemleri oda ısısında gerçekleştirildi, +4 °C'de saklanan kit uygulama yapılmadan önce oda ısısına getirildi.

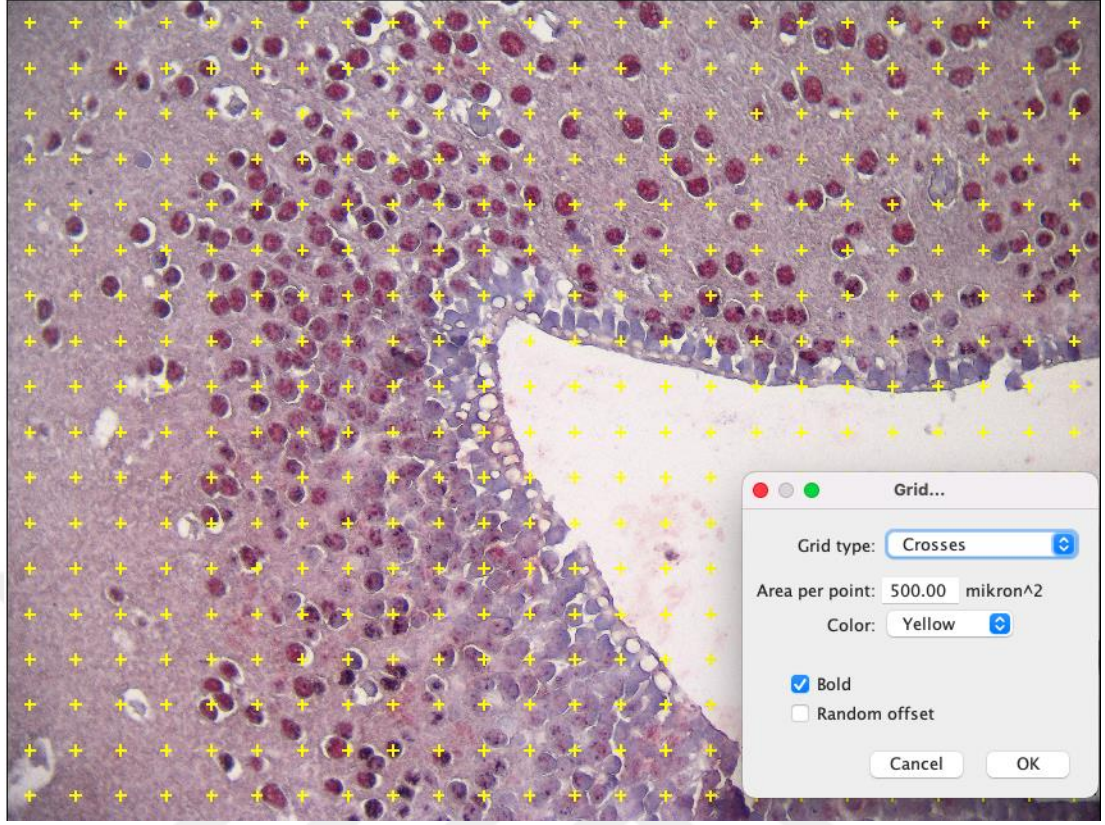
Kesitlerin üzerine A solüsyonundan (Bacillus subtilis kaynaklı amilaz) birer damla damlatıldı ve 10 dk. inkübe edildi. Distile su ile yıkamanın ardından, B solüsyonu (Periyodik asit çözeltisi) eklenerek 10 dk. maruz bırakıldı. Distile su ile yıkamanın ardından kesitlerin üzerine birer damla C solüsyonu (Schiff reaktifi Hotchkiss McManus) eklendi ve 20 dk. inkübe edildi. Distile su ile yıkamanın ardından D solüsyonu (Potasyum metabisülfid çözeltisi) eklendi ve 2 dk. inkübe edildi. Yıkama yapılmadan E solüsyonu (Fiksatif solüsyon) eklendi ve 2 dk. bekletildi. Distile su ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra F solüsyonu (Mayer Hemalum) eklendi ve 3 dk. bekledi. Akan musluk suyu altında 5 dk. boyunca yıkama yapıldı. Artan alkol serisinden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilen ile şeffaflaştırıldıktan sonra ışık mikroskopunda incelemek için hazır hale getirildi.

## 5.8. İmmünohistokimyasal Analizler:

Örnekleme yapılarak (1:180) telensefalon bölgesinin 4 farklı seviyesinden 4 µm kalınlığındaki parafin kesitler pozitif yüklü lamlara alındı. Kesitlerin lama iyice tutunmasını sağlamak ve deparafinize etmek amacıyla kesitler 60 °C etüvde bir gece

bekletildiler. Deparafinizasyon işlemi tamamlandıktan sonra pap-pen ile kesitlerin etrafı çizildi. Kit (Mouse Rabbit specific HRP/AEC ABC Detection Kit, Abcam ab93705) içerisinde bulunan hidrojen peroksit solüsyonundan birer damla kesitlerin üzerlerine damlatıldı. Üç kere PBS (P4417, Sigma-Aldrich) ile yıkama gerçekleştirildi. 10X sitrat tamponu (005000, Thermo Scientific) 1:10 oranında PBS ile seyreltildi. Kesitler sitrat buffer solüsyonu içerisine yerleştirildi ve mikrodalgada 3 dk. 800 watt ve 10 dk. 180 wattta kaynatarak antijen geri kazanım işlemi yapıldı. Sonrasında üç kere PBS yıkama gerçekleştirildi. Kitin içerisinde bulunan blocking solüsyonu her bir dokunun üzerine birer damla gelecek şekilde damlatıldı ve 15 dk. beklendi. Primer antikörlerin dilüsyonları denemelerle belirlendi ve primer antikörler (Anti Miyelin Basic Protein (ab40390) 1:50, Anti Ki-67 (ab15580) 1:500, Anti-Çift kortin (sc-271390), Anti-NeuN (MAB377) 1:500, Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (MAB360)) PBS ile seyreltildi ve kesitler 37 °C’de bir saat inkübe edildi. Sonrasında üç kere PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Kitte bulunan Biotinylated Goat Anti-Polyvalent solüsyonunu her bir dokunun üzerine birer damla gelecek şekilde yayıldı ve 15 dk. beklendi. PBS yıkamasının ardından Streptavidin Peroxidase solüsyon her bir dokunun üzerine birer damla gelecek şekilde damlatıldı ve 15 dk. beklendi. AEC solüsyonu her bir dokunun üzerine birer damla gelecek şekilde damlatıldı ve 8-10 dk. beklendi. Ardından distile su ile beş dakika yıkandı. Zıt boyama için Mayer hematoksilen kesitler üzerine damlatıldı ve 1,5 dk. bekletildi. Çeşme suyunda 10 dk. mordanlama gerçekleştirildi. Kesitler kapatılmadan bir gece +4 °C’te bekletildi, ertesi gün su bazlı kapatıcı ile kesitler kapatıldı. Boyanan antikörlerin ekspresyon analizlerinin değerlendirilmesi ışık mikroskop (Nikon, Japan) altında gerçekleştirildi.

İmmunohistokimyasal analizler, telensefalon bölgesinin 4 farklı seviyesinden alınan kesitlere uygulandı. ImageJ programı (National Institutes of Health (NIH)) kullanarak nokta başına 500  $\mu\text{m}^2$  olacak şekilde fotoğrafların üzerine noktalı alan ölçüm cetveli atıldı ve pozitif hücre oranı (%) olarak hesaplandı (Şekil 3.4). İstatistiksel analizler GraphPad (Prism 9.0.0) uygulaması kullanılarak gerçekleştirildi.



**Resim 5.4** ImageJ programı kullanılarak immünohistokimyasal analizler gerçekleştirilmesi. ImageJ programında noktalı alan ölçüm cetvelinde her bir nokta  $500 \mu\text{m}^2$  alanı temsil etmektedir (Büyütme: 20X).

### 5.9. İstatistiksel Analiz

Tez çalışmasının bulgularının istatistiksel analizleri GraphPad (Prism 9.0.0) kullanılarak gerçekleştirildi. Shapiro-wilk testi ve Student t testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık değeri  $p \leq 0,05$  olarak değerlendirildi.

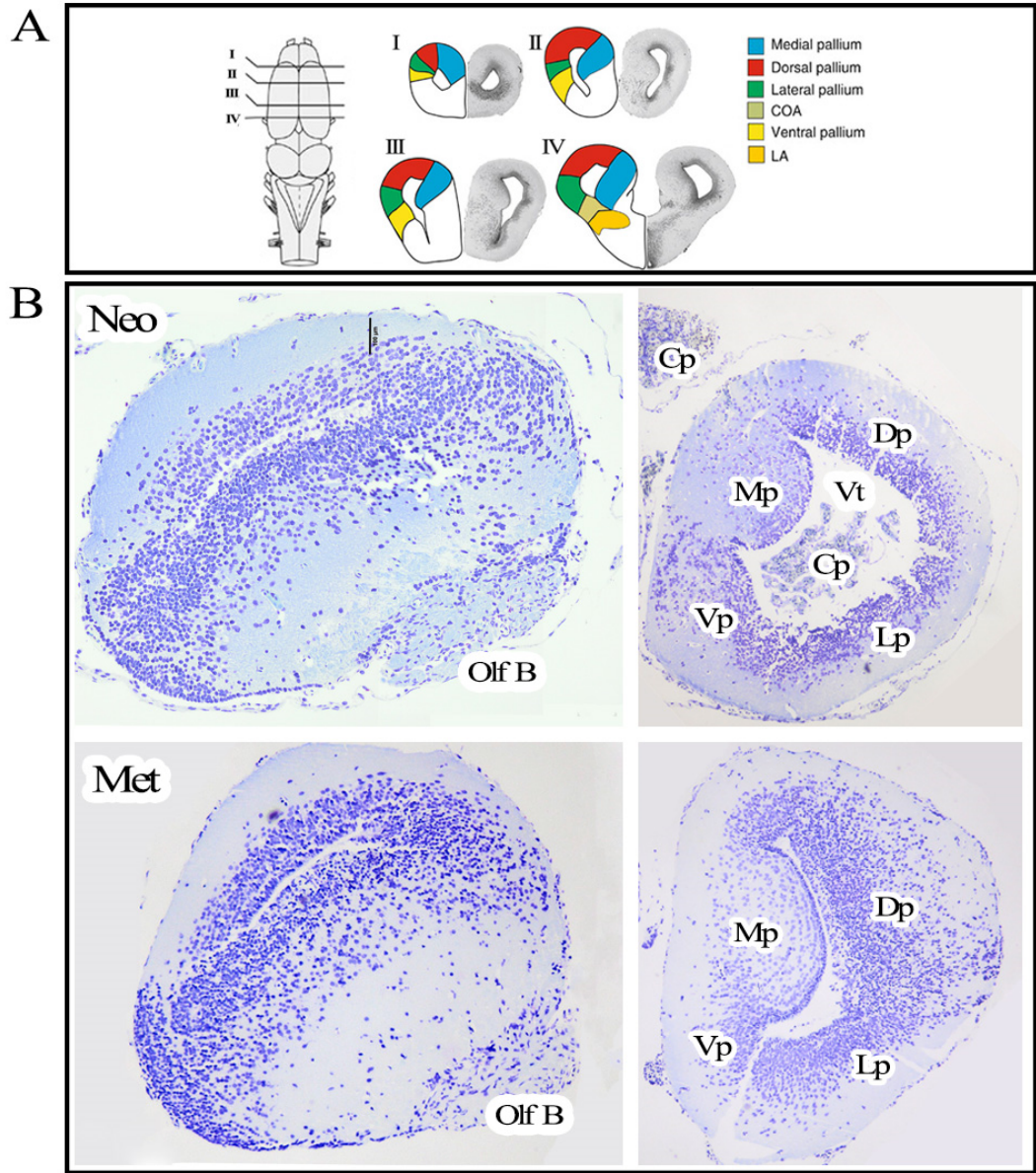
## 6. BULGULAR

Çalışmamızda neotenik evrede olan (Neo) grubu ve metamorfoz geçirmiş metamorfik (Met) grubu olmak üzere iki farklı yaşam periyodunda olan axolotllar kullanıldı. Fiziksel disektör yöntemi, immünohistokimyasal analizler için Cavalieri yöntemi ile rutin ışık mikroskopik ve elektron mikroskopik teknikler kullanılarak metamorfoz sürecinde oluşan olası gelişim ve değişimlerin beyin dokusu üzerindeki etkisi araştırıldı. Neo ve Met axolotlların telensefalon bölgelerindeki toplam nöron sayısı stereolojik yöntemlerden olan fiziksel disektör yöntemi ile hesaplandı. Ayrıca aynı kesitler üzerinde rutin histopatolojik değerlendirmeler gerçekleştirildi.

Stereolojik analizlerde ve immunohistokimyasal analizlerde güç testi 5 olarak tespit edildiği için 5 neotenik, 5 metamorfik axolotl kullanıldı. Geçirimli elektron mikroskopu analizinde 3 adet neotenik, 2 adet metamorfik axolotl kullanıldı. Taramalı elektron analizleri 2 neotenik axolotl kullanılarak gerçekleştirildi. Metamorfoza indüklenme sırasında üç axolotl öldüğünden dolayı çalışmamız yedi hayvan üzerinden gerçekleştirildi. Çalışmalar sonucunda elde edilen bulgularımız aşağıda verilmiştir.

### 6.1 Histopatolojik Bulgular

Neo ve Met axolotlların telensefalonları medial, lateral, dorsal ve ventral palliumdan oluşmaktadır. Her iki grupta da ventrikül lümeninde koroid pleksus bulunmaktadır. Neo ve Met axolotlların nöronlarında çekirdekler hücre hacminin büyük bir bölümünü kapladığı, prizmatik şekilli ependimoglia hücrelerin ventrikül duvarını döşediği görüldü. Kan hücrelerinin morfolojilerinin ise metamorfozla birlikte değiştiği tespit edilmiştir (Resim 6.27).



**Resim 6.1** Neo ve Met axolotlların beyinlerinin telensefalon bölgelerinin krezil violet boyama görüntüleri (Büyütme 10X).

## 6.2 Stereolojik Sonuçlar

Her bir hayvan ve gruba ait cresyl violet ile boyanmış kesitler üzerinde yapılan analizler sonucunda elde edilen toplam nöron sayıları tablolarda verilmiştir (Tablo 6.1-6.3, Şekil 6.2-6.3). Hata katsayısı (HK) ve değişim katsayısı (DK) değerleri sayım sonuçlarına göre hesaplandı ve her iki değer de güven aralığında olduğu gözlemlendi. Neo ve Met axolotlların beyinlerinin telensefalon bölgelerinde toplam nöron sayısının grup içi normal dağılım gösterdiği, gruplar arasında toplam nöron sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı saptandı (Şekil 6.3).

**Tablo 6.1** Neotenik axolotl beyininin telensefalon bölgesinin fiziksel disektör hücre sayım sonuçları (HK: hata katsayısı, SRÖ: sistematik rasgele örnekleme)

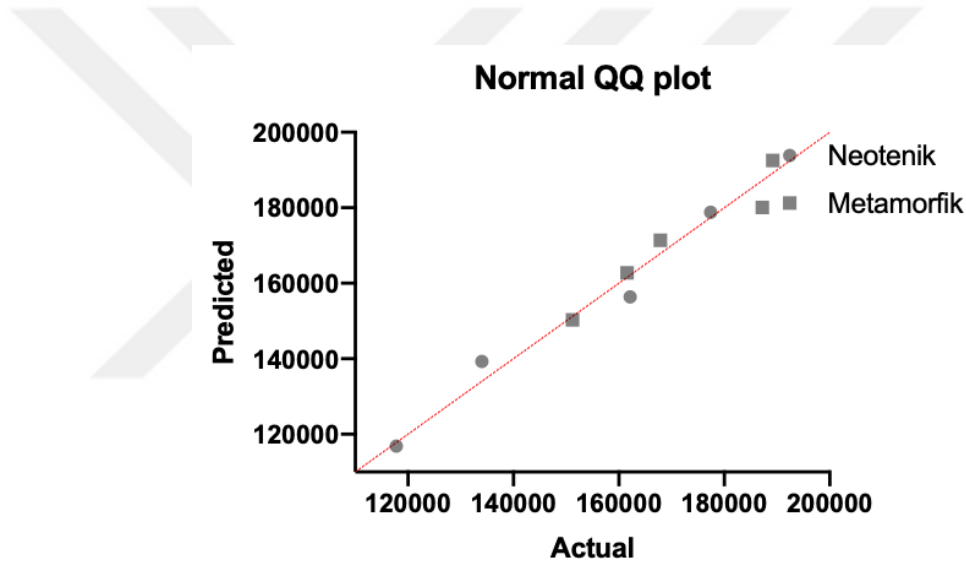
Hayvan No	Toplam Disektör hücre	Noise:	Var (SRÖ):	Toplam Var:	HK değeri	Ortalama HK değeri
Neotenik-1	1488	1712	517,212	2005,21	0,03	0,04
Neotenik-2	1396	1396	125,6	1521,6	0,03	
Neotenik-3	1689	1689	691,34	2380,34	0,03	
Neotenik-4	409	409	25,1458	3901,94	0,05	
Neotenik-5	308	308	2,65833	310,658	0,06	

**Tablo 6.2** Metamorfik axolotl beyininin telensefalon bölgesinin fiziksel disektör hücre sayım sonuçları (HK: hata katsayısı, SRÖ: sistematik rasgele örnekleme)

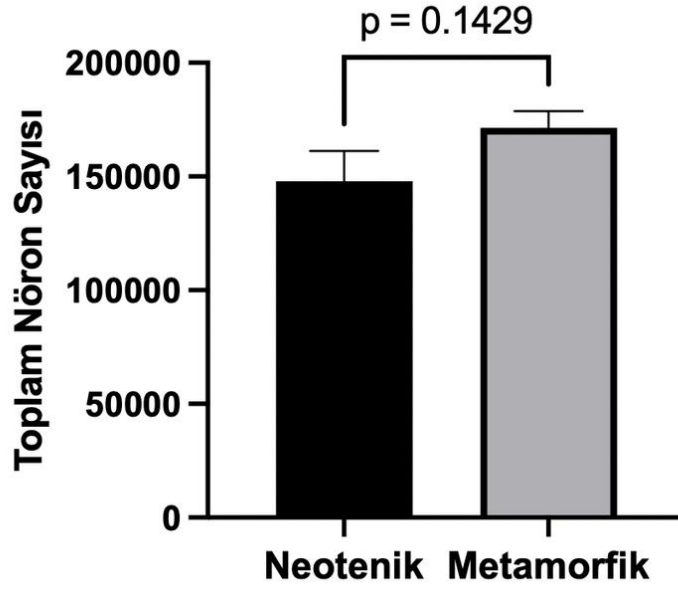
Hayvan No	Toplam Disektör hücre	Noise:	Var (SRÖ):	Toplam Var:	HK değeri	Ortalama HK değeri
Metamorfik-1	561	561	23,57	584,57	0,04	0,05
Metamorfik-2	583	583	57,92	640,92	0,04	
Metamorfik-3	525	525	21,80	546,80	0,04	
Metamorfik-4	657	657	35,51	692,51	0,04	
Metamorfik-5	325	325	31,56	356,56	0,06	

**Tablo 6.3** Neotenik ve metamorfik axolotl beyninin telensefalon bölgesinin fiziksel disektör hücre sayım sonuçları (DK: değişim katsayısı, SS: standart sapma, SEM: ortalama standart hata)

Grup	DK	SS	SEM	Ortalama Toplam Hücre Sayısı
Neotenik	0,14	23328,31	11664,15	146842
Metamorfik	0,08	14723,98	6584,76	171418



**Resim 6.2** Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgesinin hücre sayım sonuçlarının normalite grafiği.



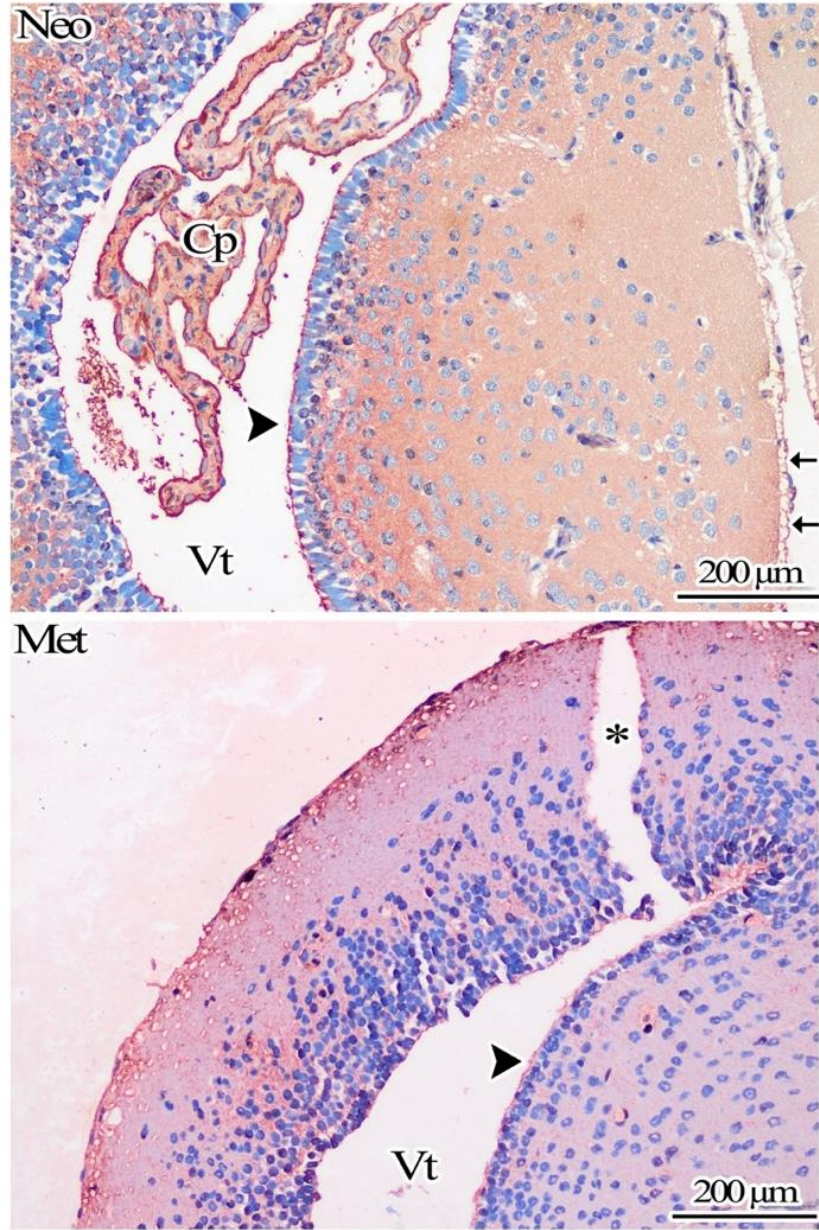
**Resim 6.3** Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerinin fiziksel disektör hücre sayım sonuçları. Sonuçlar ( $\pm$ SEM) olarak verilmiştir.

### 6.3 İmmünohistokimyasal Bulgular

İmmünohistokimyasal yöntemlerle işaretlenmiş kesitler üzerinde yapılan analizler sonucunda elde edilen toplam pozitif hücre sayılarına ait bulgular her bir hayvan ve her bir grup için aşağıdaki tablolarda verilmiştir (Tablo 6.4-7, Şekil 6.4-26).

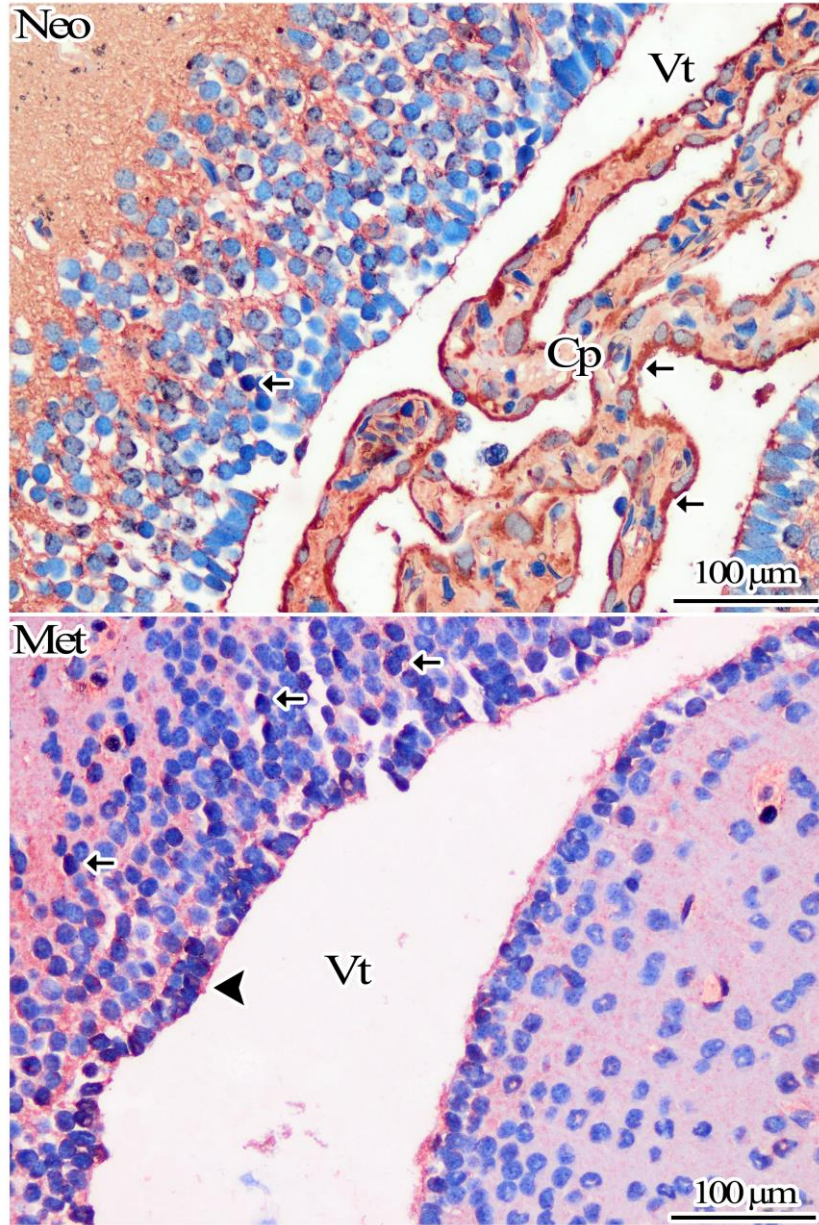
#### 6.3.1 Anti Ki-67 immünohistokimya sonuçları

İmmünohistokimya yöntemi kullanılarak örnekler anti Ki-67 ile işaretlendi ve Ki-67 ifade eden hücrelerin toplam hacmi Cavalier yöntemi ile hesaplandı. Aynı örneklerde ventriküle farklı uzaklıkta bulunan Ki-67 ifade eden hücreler tespit edilerek her iki gruptaki pozitif hücreler birbirleri ile kıyaslandı. Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinde Ki-67 ifade eden hücrelerin toplam hacimleri kıyaslandığında metamorfik grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu tespit edildi. Telensefalon bölgesinden 1:180 örnekleme ile yapılan analizler sonucunda Ki-67 ifade eden hücrelerin toplam hacimlerinin metamorfozla birlikte arttığı bulundu. Cavalieri yöntemi kullanarak yaptığımız immünohistokimyasal incelemelerimizde ayrıca koroid pleksus bölgesindeki hücrelerin de Ki-67 ifade ettiği gözlemlendi.

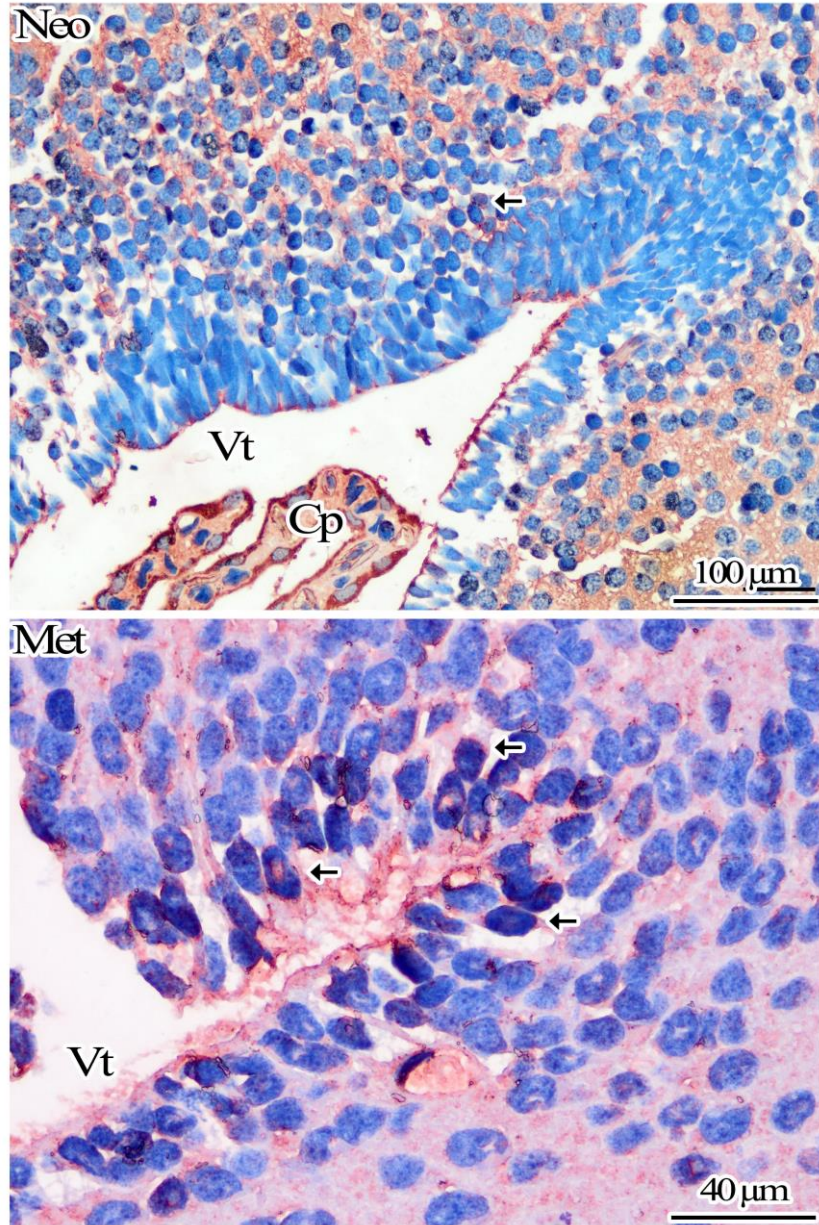


**Resim 6.4** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması (Vt: Ventrikül, Cp: koroid pleksus, ok başı: ventrikül duvarı, ok: Piamater, \*: Artefakt).

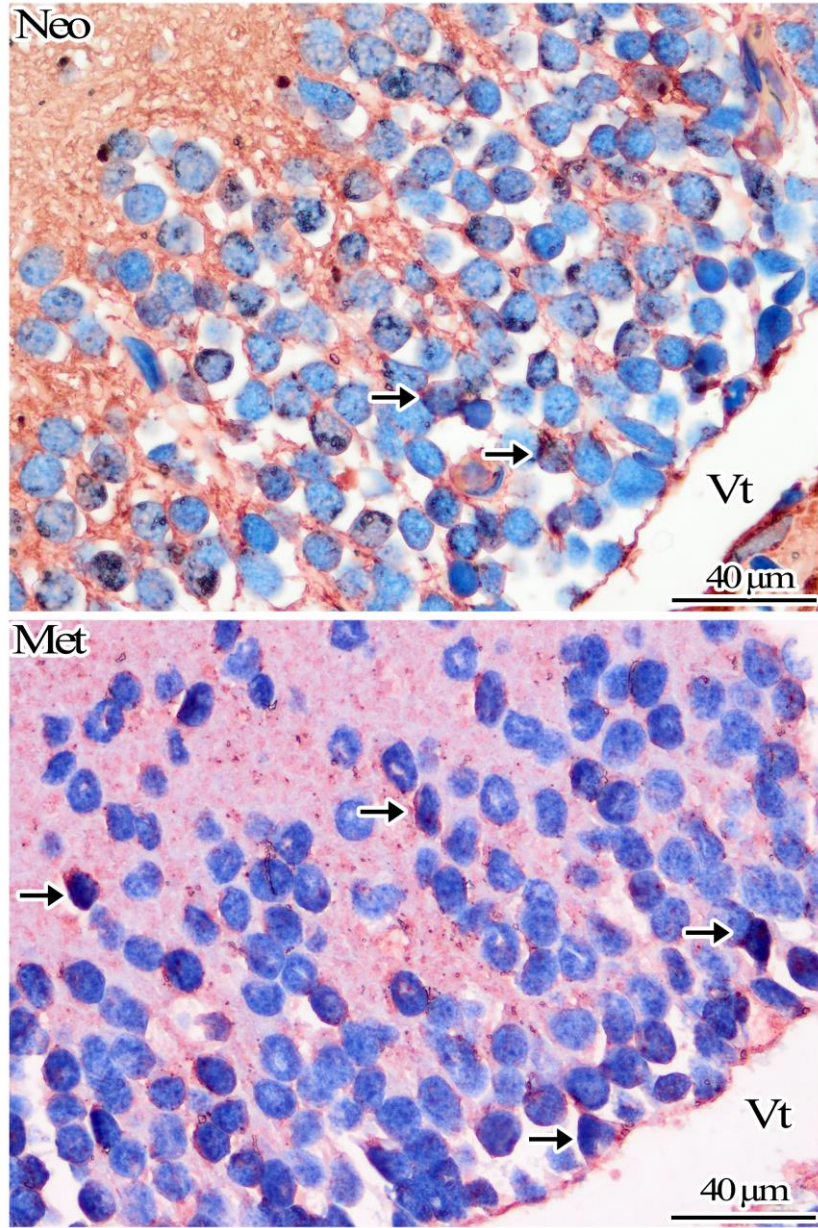
Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon kesitlerinde ependimoglia hücreleri ile radialglia hücrelerinin ventrikül duvarında buldukları ve Ki-67 ifade eden nöronların da ventriküle farklı uzaklıklarda bulunabildikleri tespit edildi (Resim 6.4-4.9).



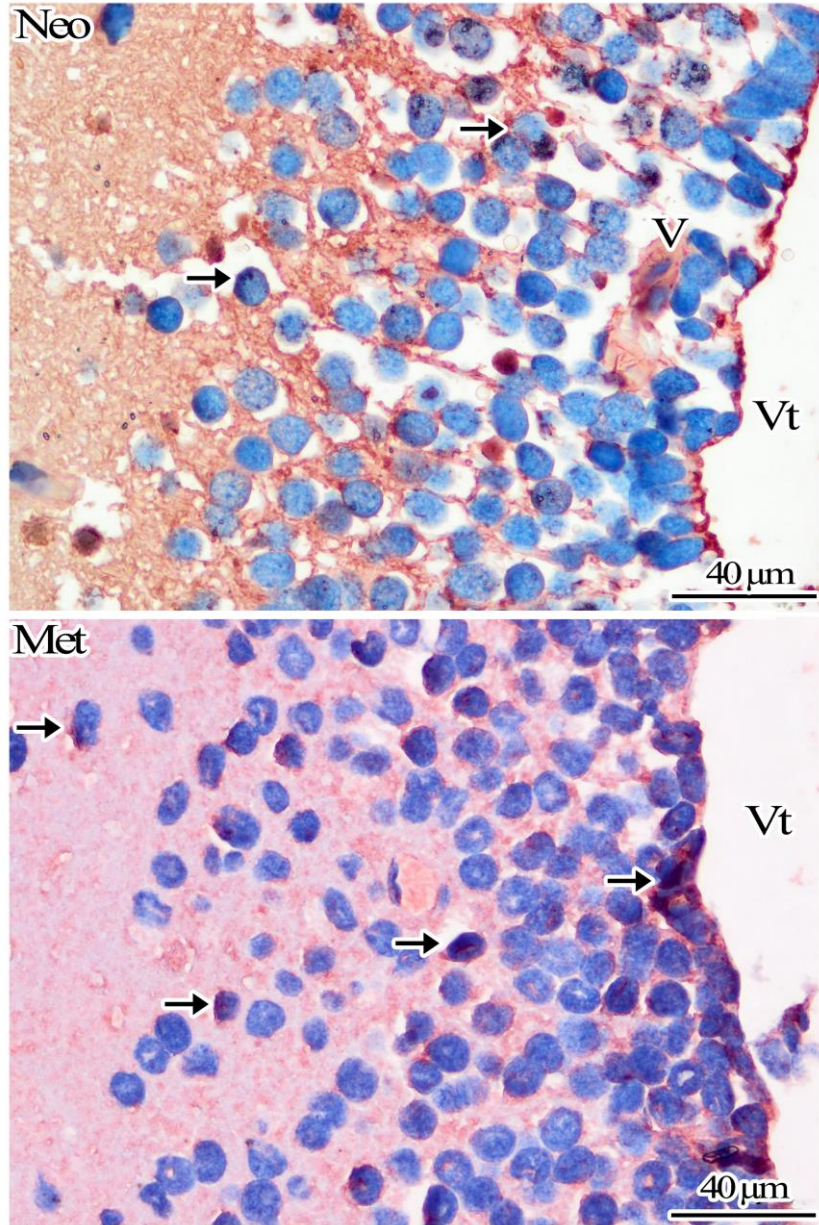
**Resim 6.5** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması (Vt: Ventrikül, Cp: koroid pleksus, ok: Anti Ki-67 ifade eden hücreler, ok başı: Ependimoglia hücre).



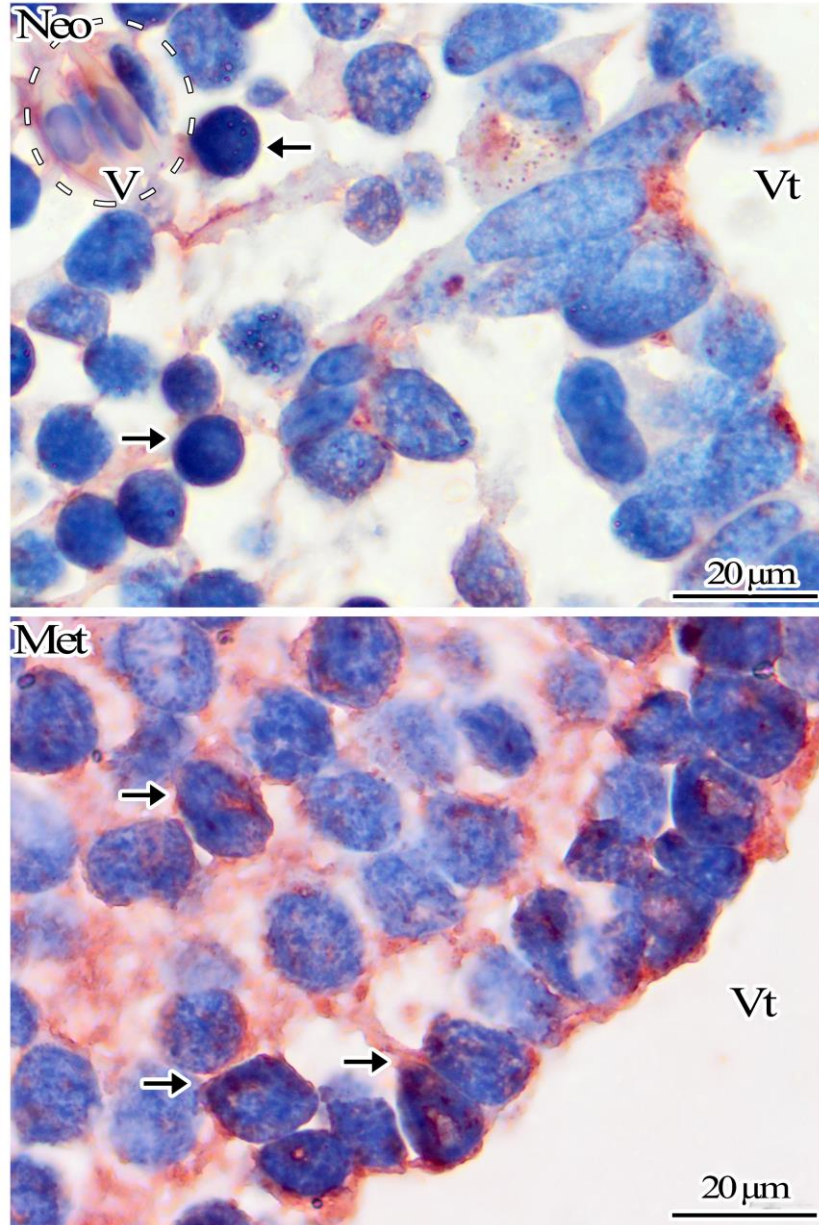
**Resim 6.6** Neotenic (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması. Ventrikül duvarında Ki-67 ifade eden hücreler (ok) bulunmaktadır. (Vt: Ventrikül, Cp: koroid pleksus)



**Resim 6.7** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması. Ventrikülden farklı uzaklıkta Ki-67 ifade eden nöronlar (ok) bulunmaktadır. (Vt: Ventrikül)



**Resim 6.8** Neotenic (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması. Ventrikülden farklı uzaklıkta Ki-67 ifade eden nöronlar (ok) bulunmaktadır. (V: Damar, Vt: ventrikül)



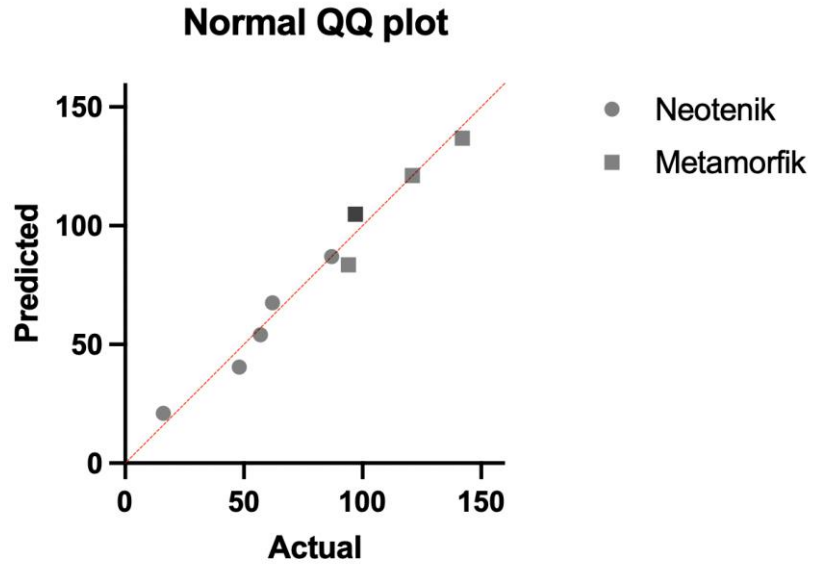
**Resim 6.9** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met)axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya boyaması. Ventrikülden farklı uzaklıkta Ki-67 ifade eden nöronlar (ok) bulunmaktadır. (V: Damar, Vt: ventrikül)

**Tablo 6.4** Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesine ait Ki-67 immünohistokimya Cavalieri yöntemi hacim sonuçları.

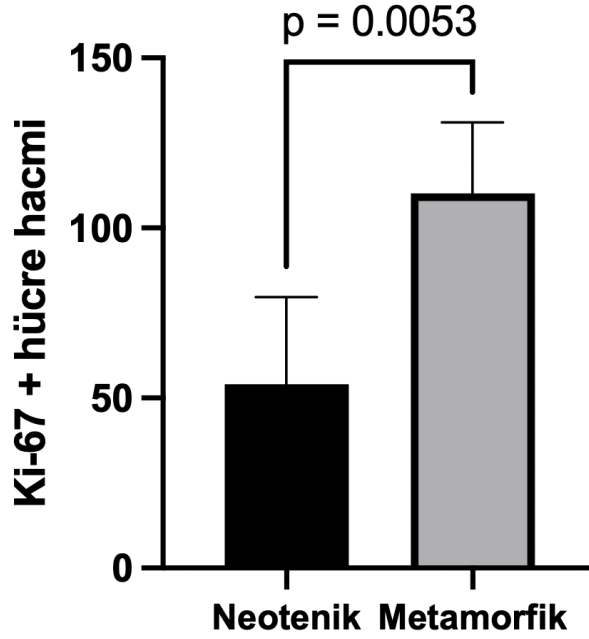
	<b>Ki-67 İfade Eden Hücrelerin Hacmi (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>				<b>Ortalama</b>
	<b>1. Bölge</b>	<b>2. Bölge</b>	<b>3. Bölge</b>	<b>4. Bölge</b>	
<b>Neotenik-1</b>	65	55	55	55	57
<b>Neotenik-2</b>	25	35	7	0	16
<b>Neotenik-3</b>	56	21	113	158	87
<b>Neotenik-4</b>	64	32	107	44	62
<b>Neotenik-5</b>	57	38	47	50	48
<b>Grup Ort.</b>	54				

**Tablo 6.5** Metamorfik axolotl beyninin telensefalon bölgesine ait Ki-67 immünohistokimya Cavalieri yöntemi hacim sonuçları.

	<b>Ki-67 İfade Eden Hücrelerin Hücre Hacmi (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>				<b>Ortalama</b>
	<b>1. Bölge</b>	<b>2. Bölge</b>	<b>3. Bölge</b>	<b>4. Bölge</b>	
<b>Metamorfik-1</b>	150	175	50	109	121
<b>Metamorfik -2</b>	83	79	116	109	97
<b>Metamorfik -3</b>	72	93	121	101	97
<b>Metamorfik -4</b>	94	77	112	92	94
<b>Metamorfik -5</b>	208	152	90	121	142
<b>Grup Ort.</b>	110				



**Resim 6.10** Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 immünohistokimya hacim sonuçları normalite grafiği.

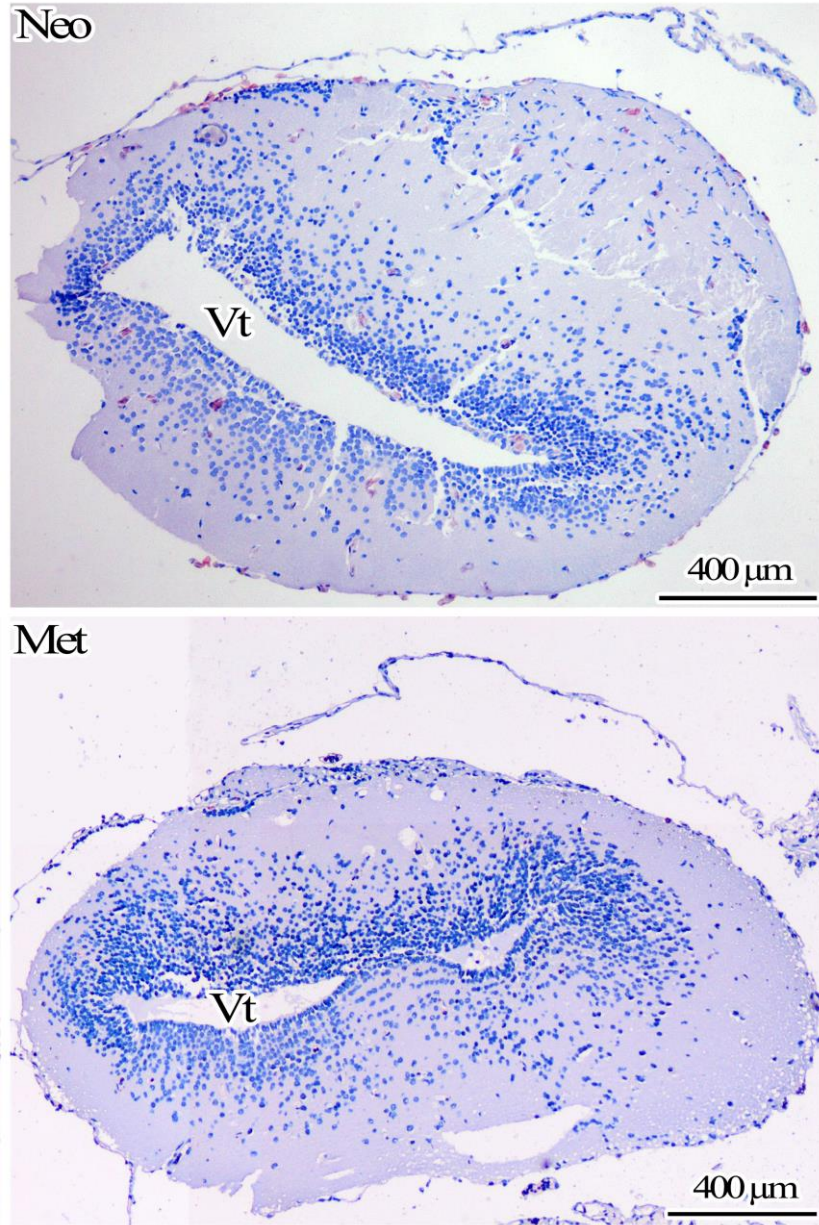


**Resim 6.11** Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait Ki-67 ifade eden toplam hücre hacmi sonuçları.

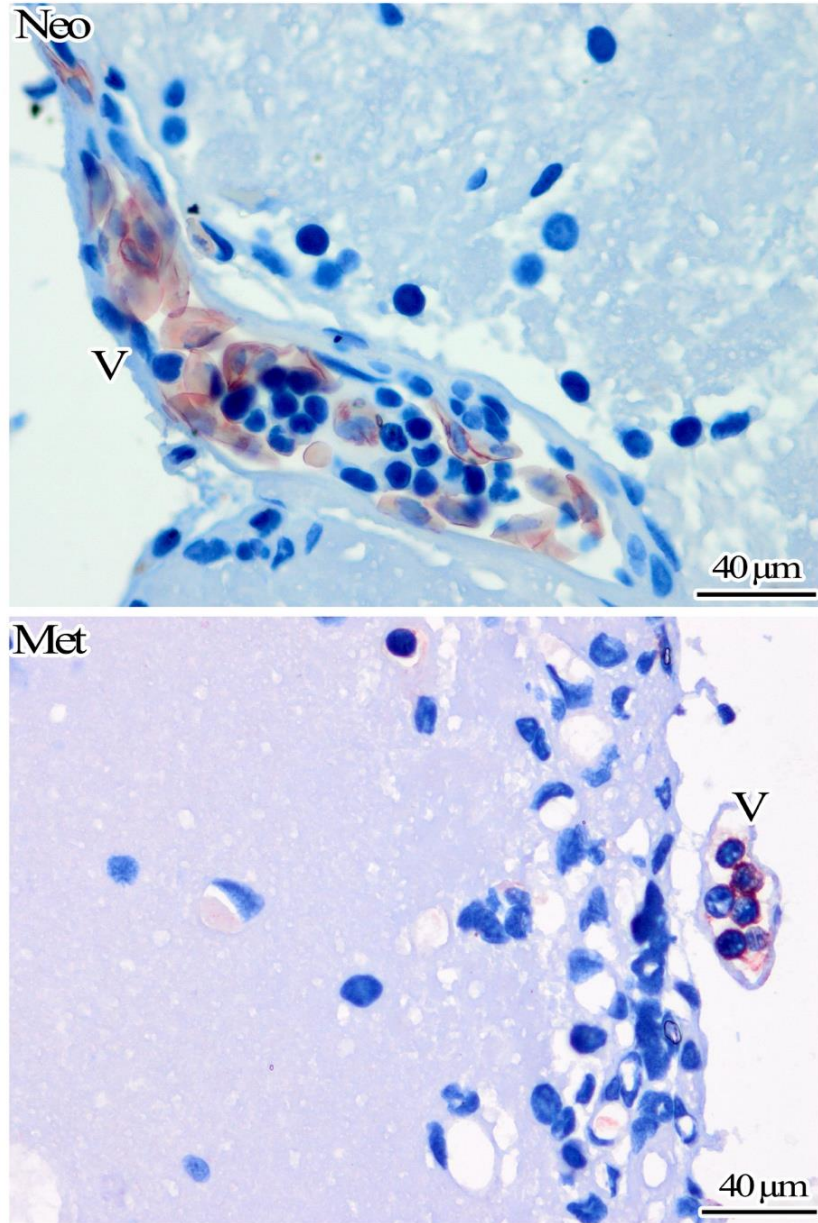
### **6.3.1 Anti - miyelin temel protein (MTP) immünohistokimya sonuçları**

#### **6.3.1.1 Telensefalon**

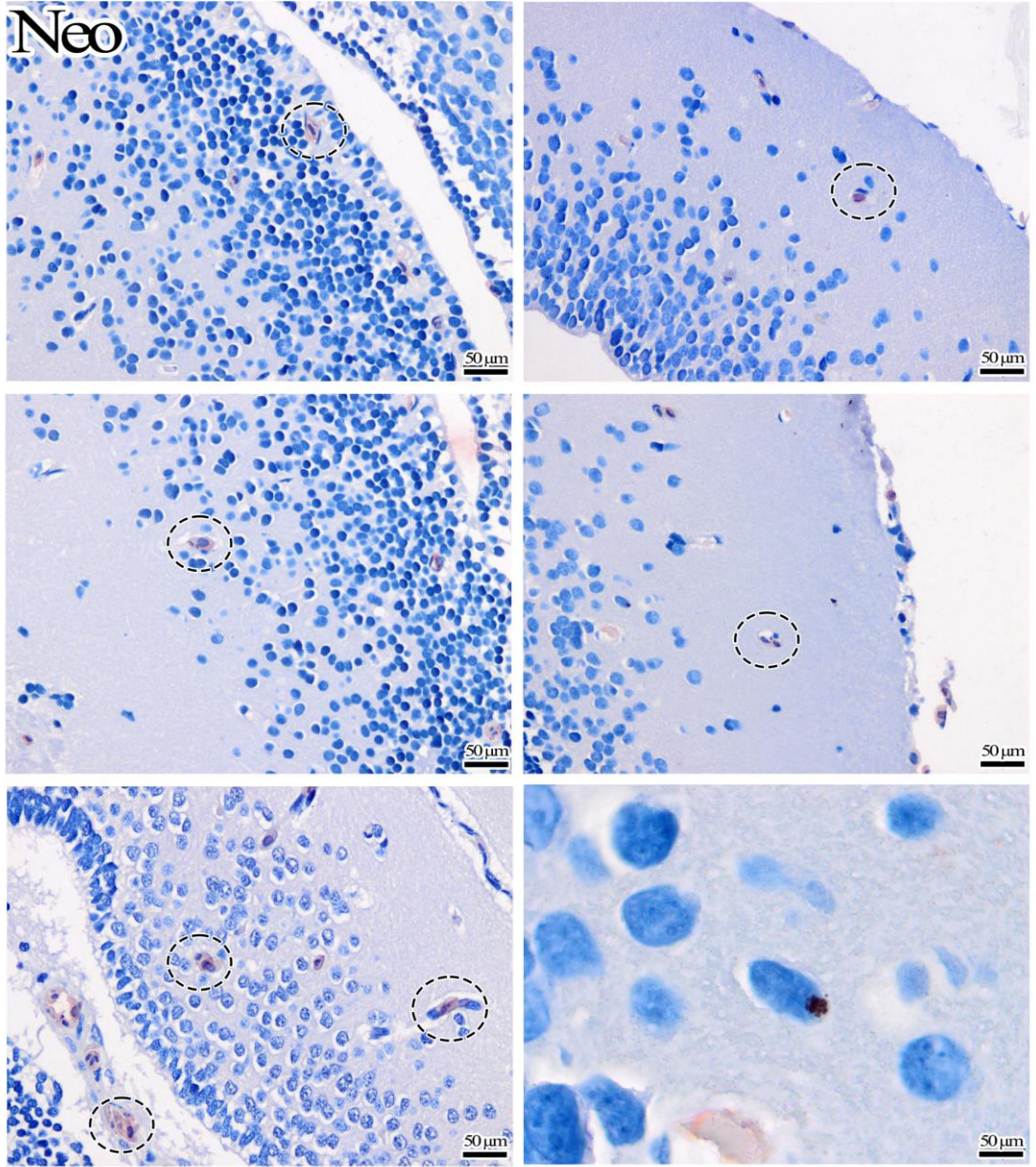
Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait kesitlerde MTP ifade eden hücreler sayıldı. Telensefalon bölgesinde 1:180 örnekleme ile yapılan analizlerde her iki gruptaki deneklere ait kan hücrelerinin MTP ifade ettiği görülürken sinir sistemi hücrelerinin MTP ifade etmediği tespit edildi. Sinir sistemi hücrelerinde MTP ifadesi tespit edilemediğinden istatistiksel analizler gerçekleştirilememiştir (Resim 6.12-4.16). MTP ifadesinin olmadığı pozitif kontrolü olması amacıyla sıçan beyin dokusu kullanıldığında hipokampus ve beyin korteksi bölgesindeki miyelinli sinir liflerinin pozitif işaretlendiği gözlenmiştir (Resim 6.17).



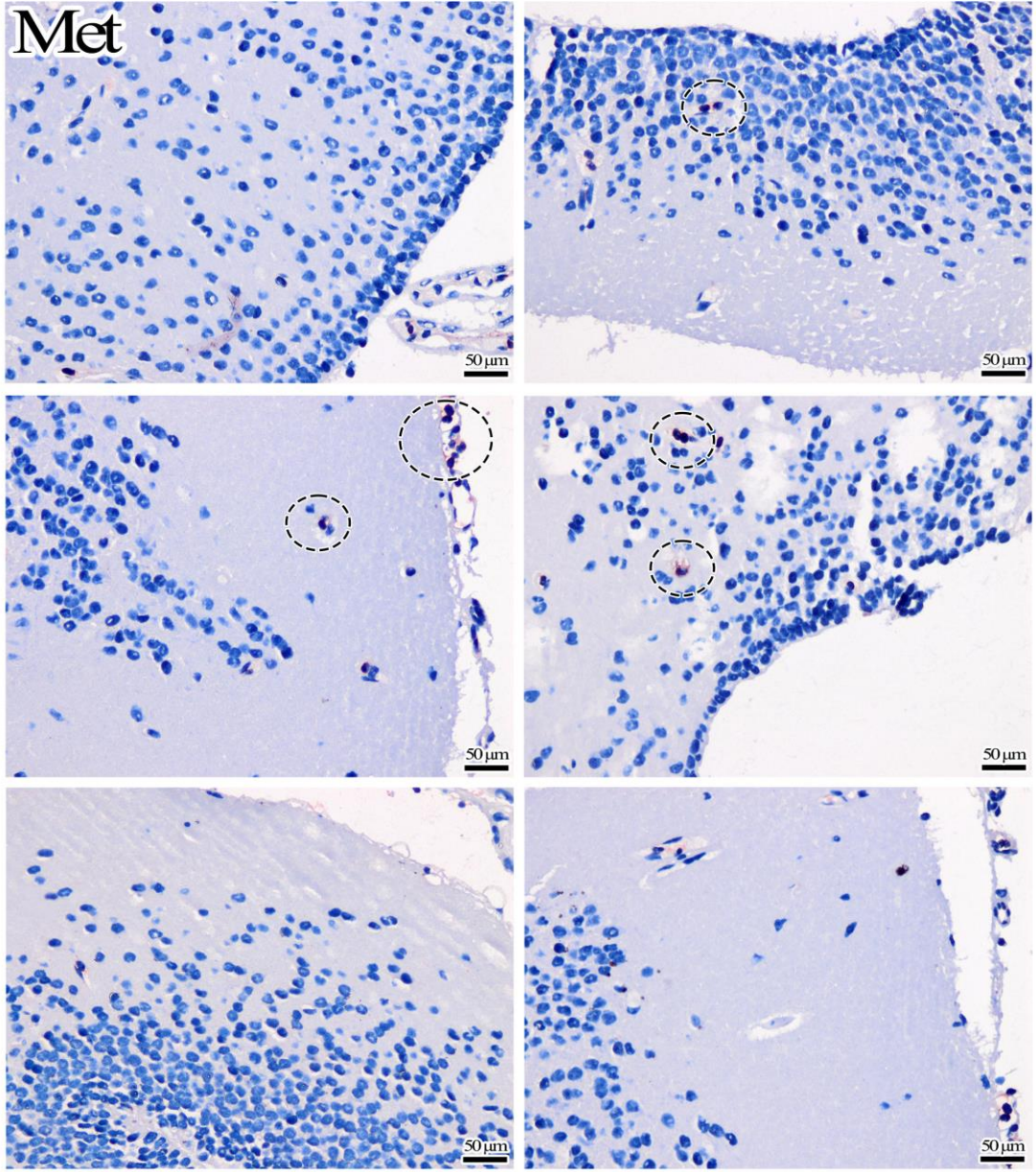
**Resim 6.12** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait MTP immünohistokimya boyaması. (Vt:Ventrikül)



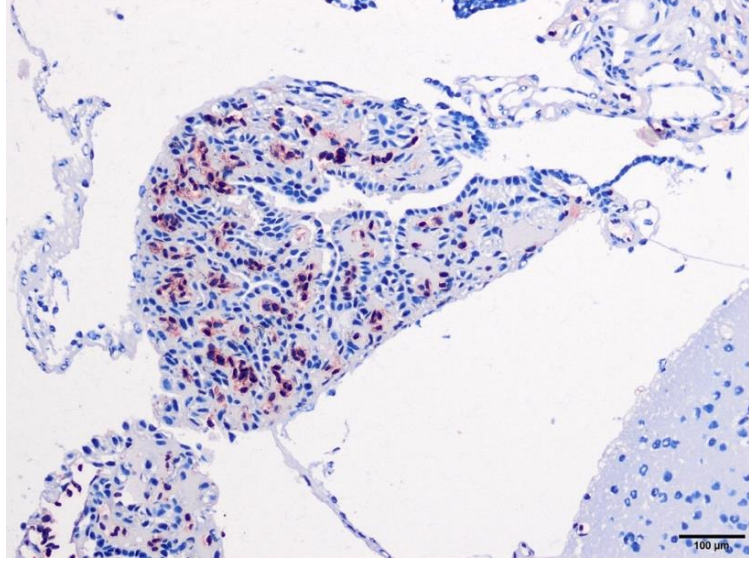
**Resim 6.13** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait MTP immünohistokimya boyaması. Piamaterde bulunan kan damarı (V) içindeki kan hücrelerinin kuvvetli MTP ifadesi açıkça görülmektedir.



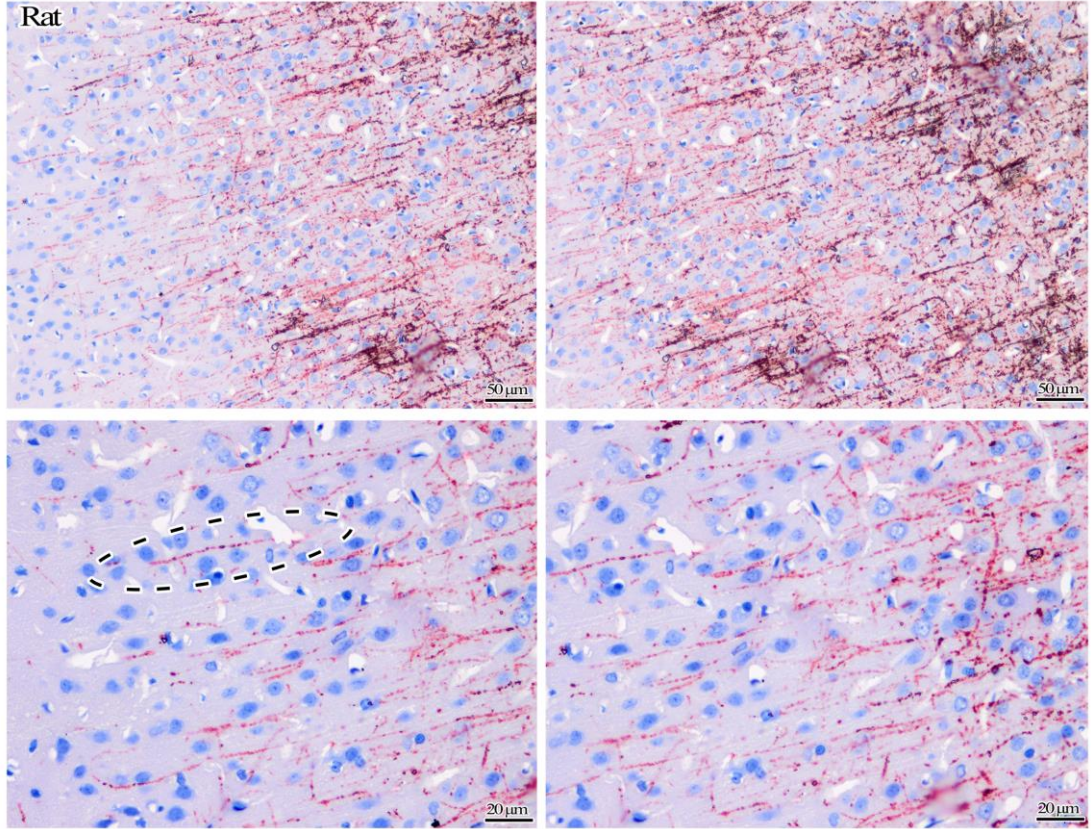
**Resim 6.14** Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesine ait MTP immünohistokimya boyaması. MTP ifade eden merkezi sinir sistemi hücreleri tespit edilememiştir. Kan hücreleri MTP ifade etmektedir.



**Resim 6.15** Metamorfik axolotl beyninin telensefalon bölgesine ait MTP immünohistokimya boyaması. MTP ifade eden merkezi sinir sistemi hücreleri tespit edilememiştir. Kan hücreleri MTP ifade etmektedir.



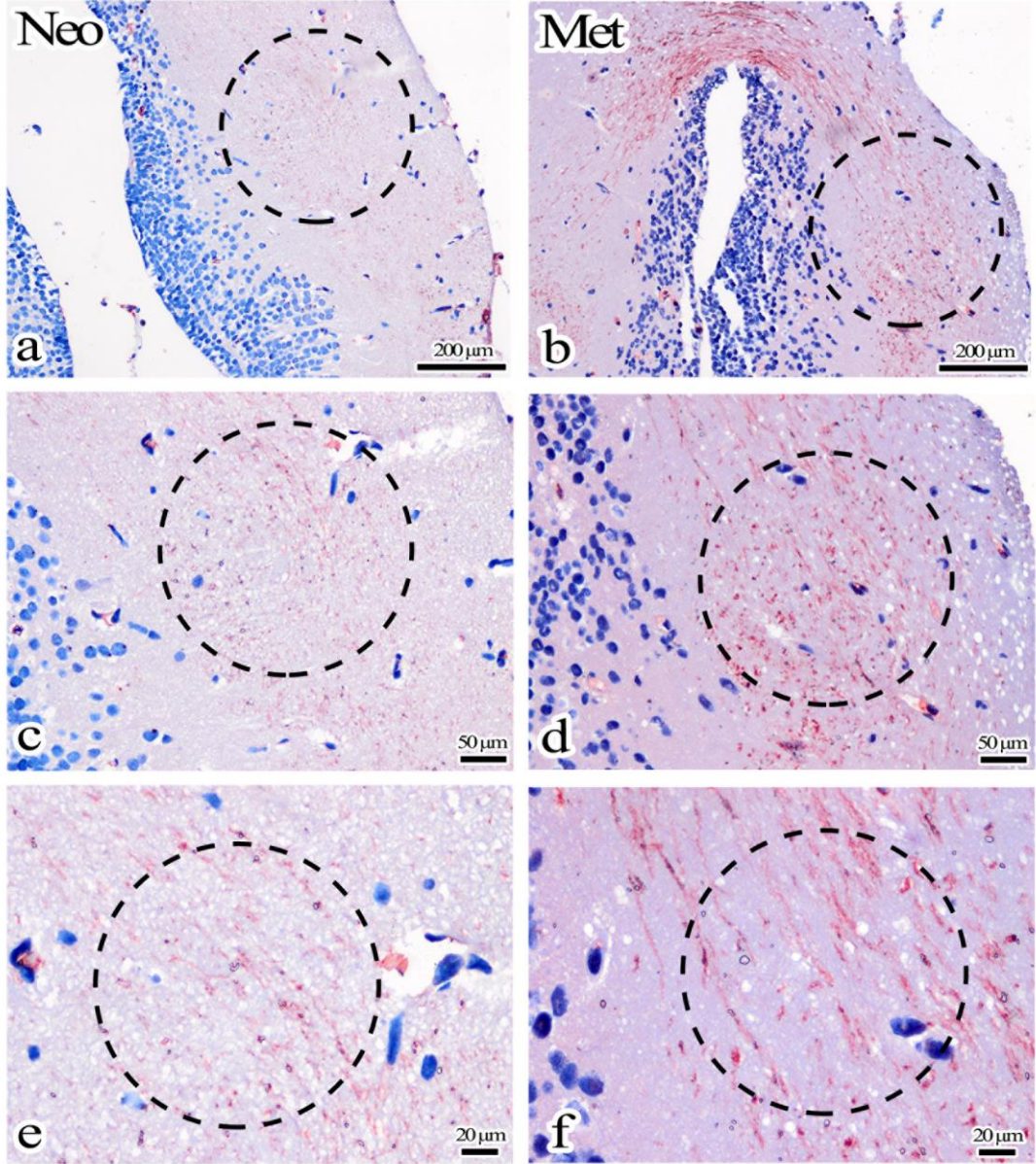
**Resim 6.16** Metamorfik axolotl beyninin telensefalon bölgesine ait MTP immünohistokimya boyaması. Koroid pleksus bölgesinde kan hücreleri MTP ifade etmektedir.



**Resim 6.17** Sıçan beyninin MTP immünohistokimya boyaması. Uzunlamasına seyreden aksonların etrafını çevreleyen miyelin kılıfında MTP ifadesi tespit edilmiştir. Halka içine alınan alanda miyelinli aksonlar belirgin bir biçimde anti MTP pozitifdir. (Büyütme 10X ve 20X)

### 6.3.1.2 Diensefalon

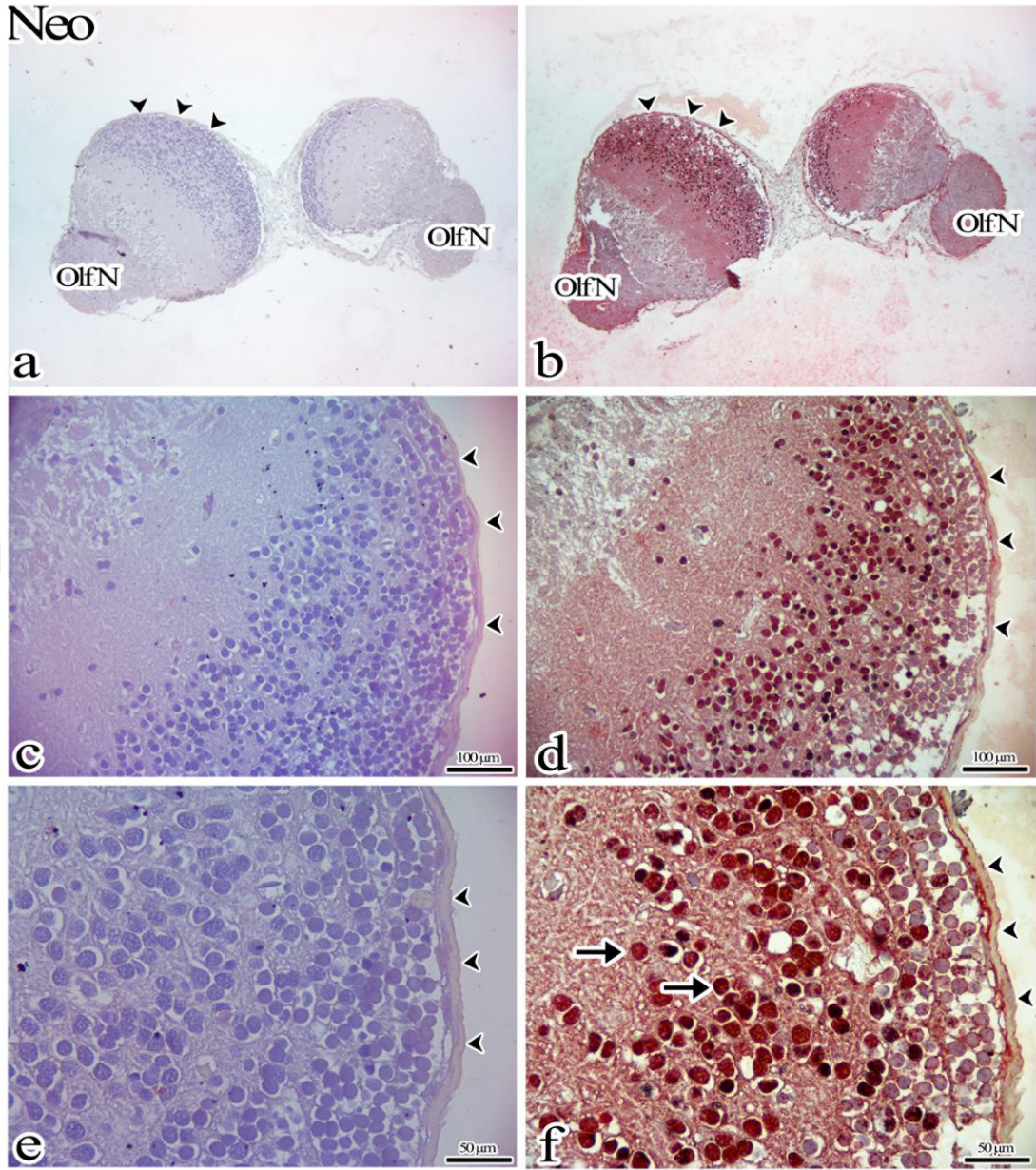
MTP immünohistokimya analizleri sonucunda her iki grupta MTP ifade eden bölgeler tespit edildi. Metamorfik axolotllarda MTP ifadesinin arttığı gözlemlendi. (Resim 6.18).



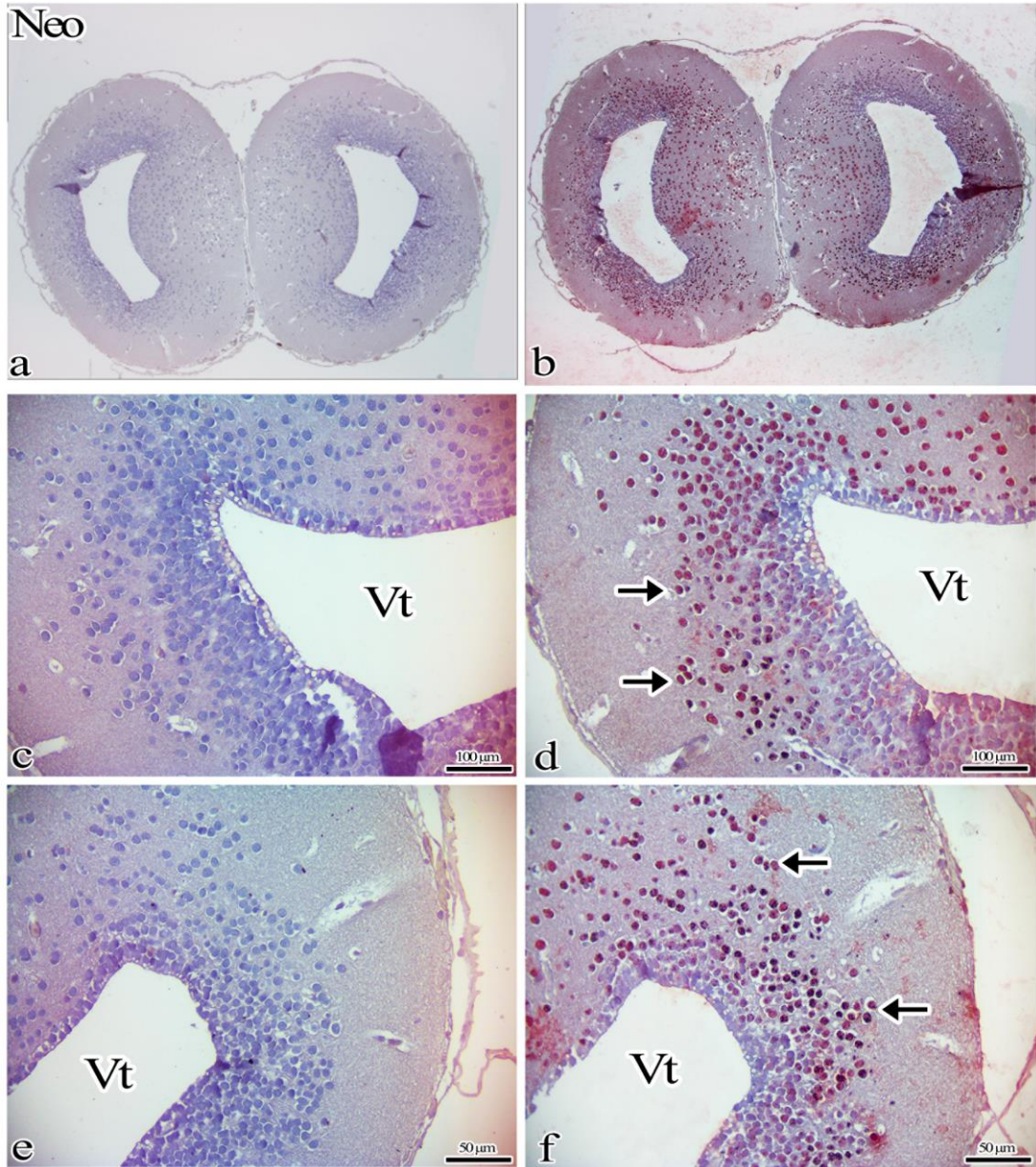
**Resim 6.18** Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin diensefalon bölgelerinin MTP immünohistokimya boyaması. Halka içerisinde gösterilen bölgede neotenik (a,c,e) ve metamorfik (b,d,f) axolotl MTP ifade eden sinir lifleri görülmektedir.

### 6.3.2 Anti-NeuN immünohistokimya sonuçları

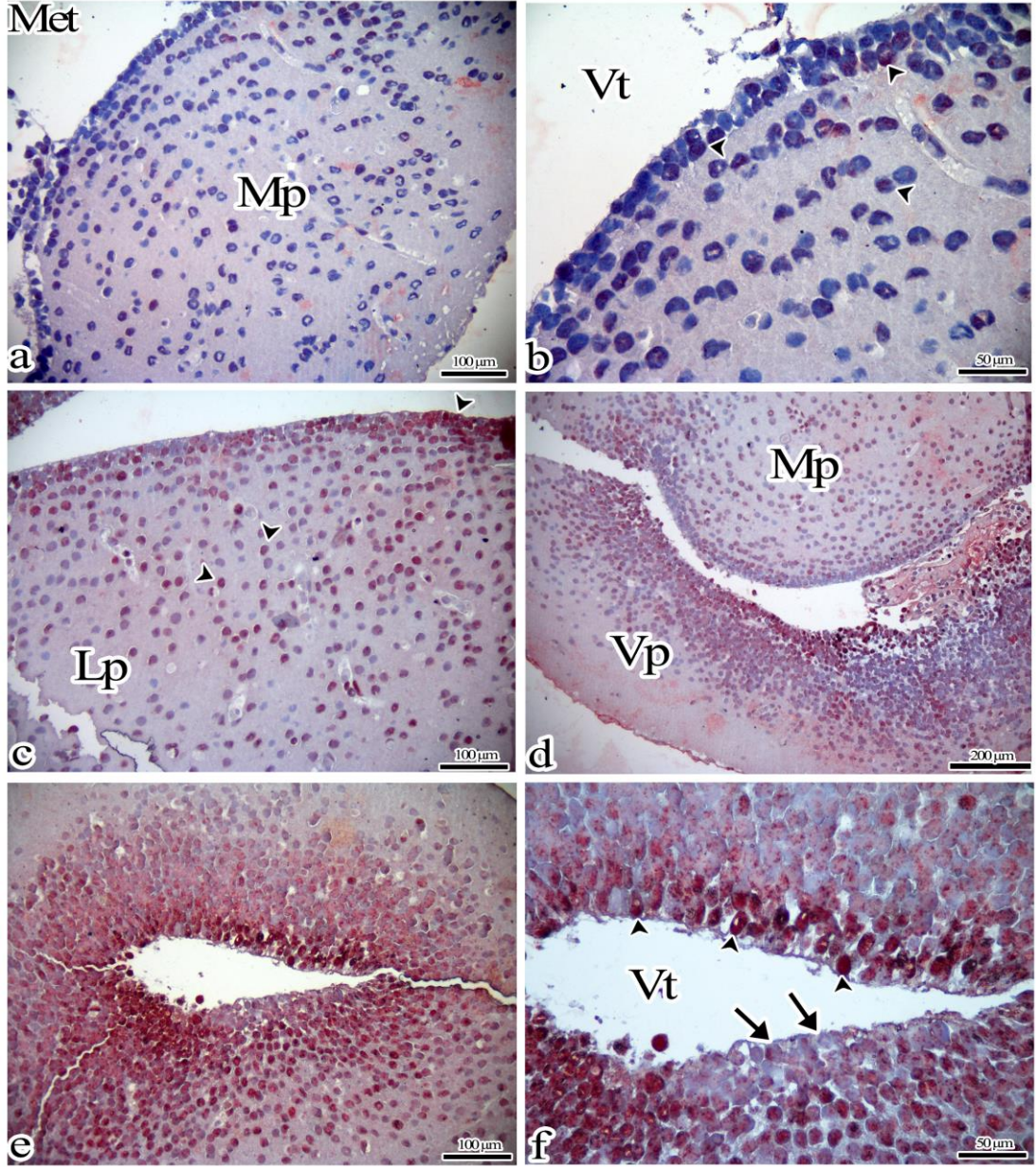
İmmünohistokimya yöntemi kullanılarak örnekler anti NeuN ile işaretlendi ve NeuN ifade eden hücrelerin toplam hacmi Cavalieri yöntemi ile hesaplandı. Telensefalon bölgesinde yapılan analizlerde her iki grupta ventrikül duvarından farklı uzaklıklarda NeuN ifade eden hücreler görülürken metamorfik grupta ventrikül duvarını döşeyen ependimoglia hücrelerin olduğu bölgelerde NeuN ifade eden hücreler tespit edildi (Resim 6.19-4.21). Aynı örneklerde NeuN ifade eden hücreler esas alınarak her iki grup birbirleri ile karşılaştırıldı (Tablo 6.6-4.7). Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinde NeuN ifade eden hücrelerin toplam hacimleri kıyaslandığında metamorfik grupta istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu tespit edildi ( $p=0,0228$ ) (Resim 6.22-4.23). Telensefalon bölgesinde yapılan analizler sonucunda NeuN ifade eden hücrelerin toplam hacimlerinin metamorfozla birlikte arttığı saptandı.



**Resim 6.19** Neotenik axolot beyninin anterior bölgesinin NeuN immünohistokimya boyaması. Piamaterden (ok başı) farklı uzaklıklarda NeuN ifade eden hücreler (ok) bulunmaktadır (b,d,f). (a,c,e: negatif kontrol, Olf N: olfaktör sinir)



**Resim 6.20** Neotenik axolot beyninin telensefalon bölgesinin NeuN immünohistokimya boyaması. Ventrikül duvarından farklı uzaklıklarda NeuN ifade eden hücreler (ok) bulunmaktadır (b,d,f). NeuN ifade eden hücreler Ventral telensefalon (d) ve dorsal telensefalon (f) ok ile gösterilmektedir (a,c,e: negatif kontrol, Vt: ventrikül).



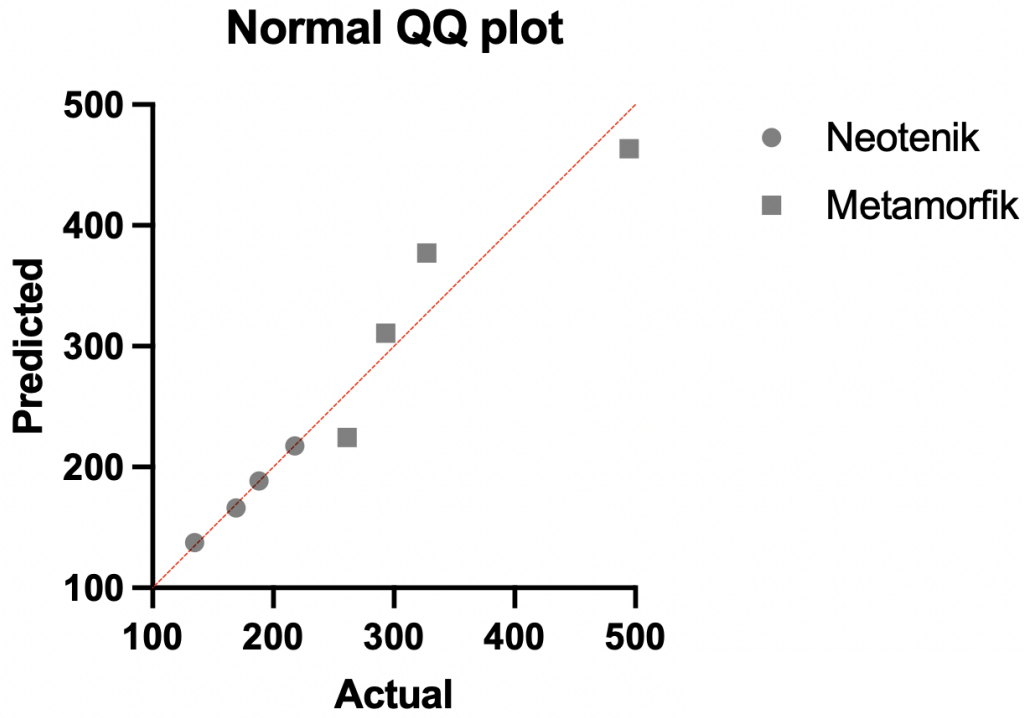
**Resim 6.21** Metamorfik axolot beyninin telensefalon bölgesinin NeuN immünohistokimya boyaması. Ventrikül duvarından farklı uzaklıklarda NeuN ifade eden hücreler (ok başı) bulunmaktadır. Anti-NeuN negatif hücreler (ok) ile gösterilmiştir. (Lp: Lateral pallium, Mp: medial pallium, Vp: ventral pallium, Vt: ventrikül)

**Tablo 6.6** Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesine ait Cavalieri yöntemi NeuN immünohistokimya hacim sonuçları

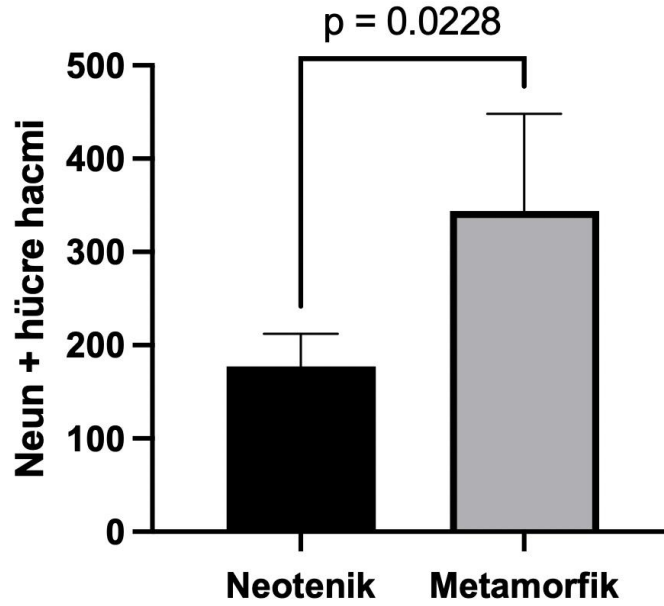
<b>NeuN Pozitif Hücre Hacmi (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>				
	<b>1. Bölge</b>	<b>2. Bölge</b>	<b>3. Bölge</b>	<b>Ortalama</b>
<b>Neotenik-1</b>	149	145	213	169
<b>Neotenik-2</b>	205	249	199	218
<b>Neotenik-3</b>	128	328	108	188
<b>Neotenik-4</b>	96	114	194	135
<b>Grup Ort.</b>	177			

**Tablo 6.7** Metamorfik axolotl beyninin telensefalon bölgesine ait Cavalieri yöntemi NeuN immünohistokimya hacim sonuçları

<b>NeuN Pozitif Hücre Hacmi (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>				
	<b>1. Bölge</b>	<b>2. Bölge</b>	<b>3. Bölge</b>	<b>Ortalama</b>
<b>Metamorfik -1</b>	318	336		327
<b>Metamorfik -2</b>	262	261,2	260,4	261
<b>Metamorfik -3</b>	307	280		293
<b>Metamorfik -4</b>	444	416	624	494
<b>Grup Ort.</b>	344			



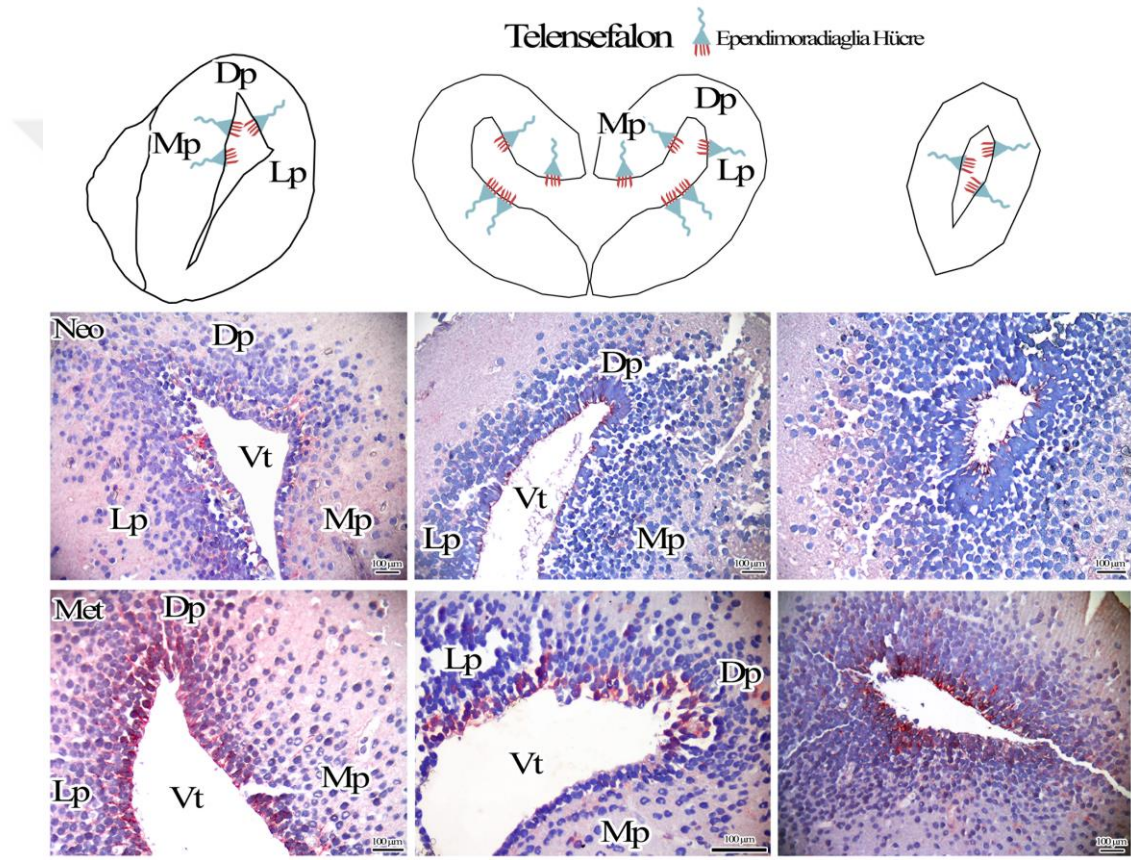
**Resim 6.22** Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait NeuN immünohistokimya hacim sonuçları normalite grafiği.



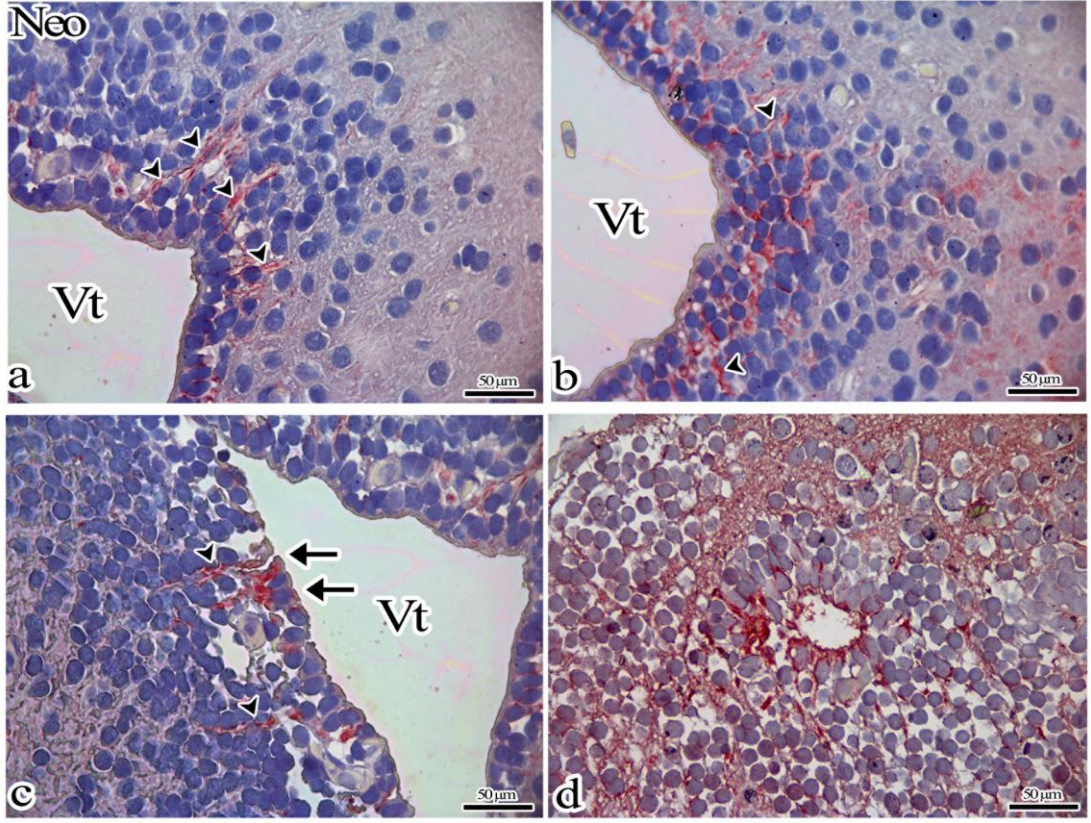
**Resim 6.23** Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait NeuN ifade eden toplam hücre hacmi sonuçları.

### 6.3.3 Anti-GFAP (Glial Fibriller Asidik Protein) immünohistokimya sonuçları

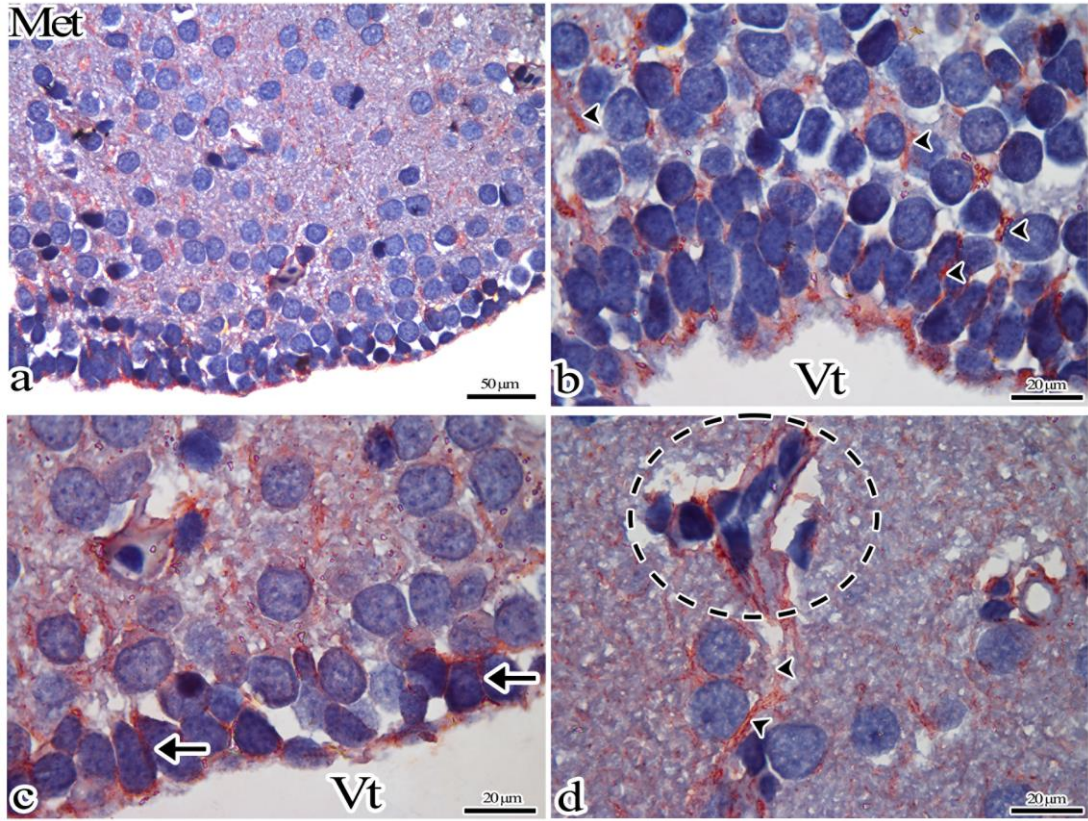
Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait kesitlerde GFAP ifade eden hücreler analiz edildi. Telensefalon bölgesinde analizlerde her iki gruptaki axolotllarda ependimoglia hücrelerinin GFAP ifade ettiği görülürken metamorfik grupta GFAP ifade eden hücre uzantılarının daha geniş alanlara uzandığı gözlemlendi (Resim 6.24-4.26).



**Resim 6.24** Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerine ait GFAP immünohistokimya boyaması. Ventrikül duvarında GFAP ifade eden hücreler bulunmaktadır. (Dp: Dorsal pallium, Lp: lateral pallium, Mp: medial pallium, Vp: ventral pallium, Vt: ventrikül)



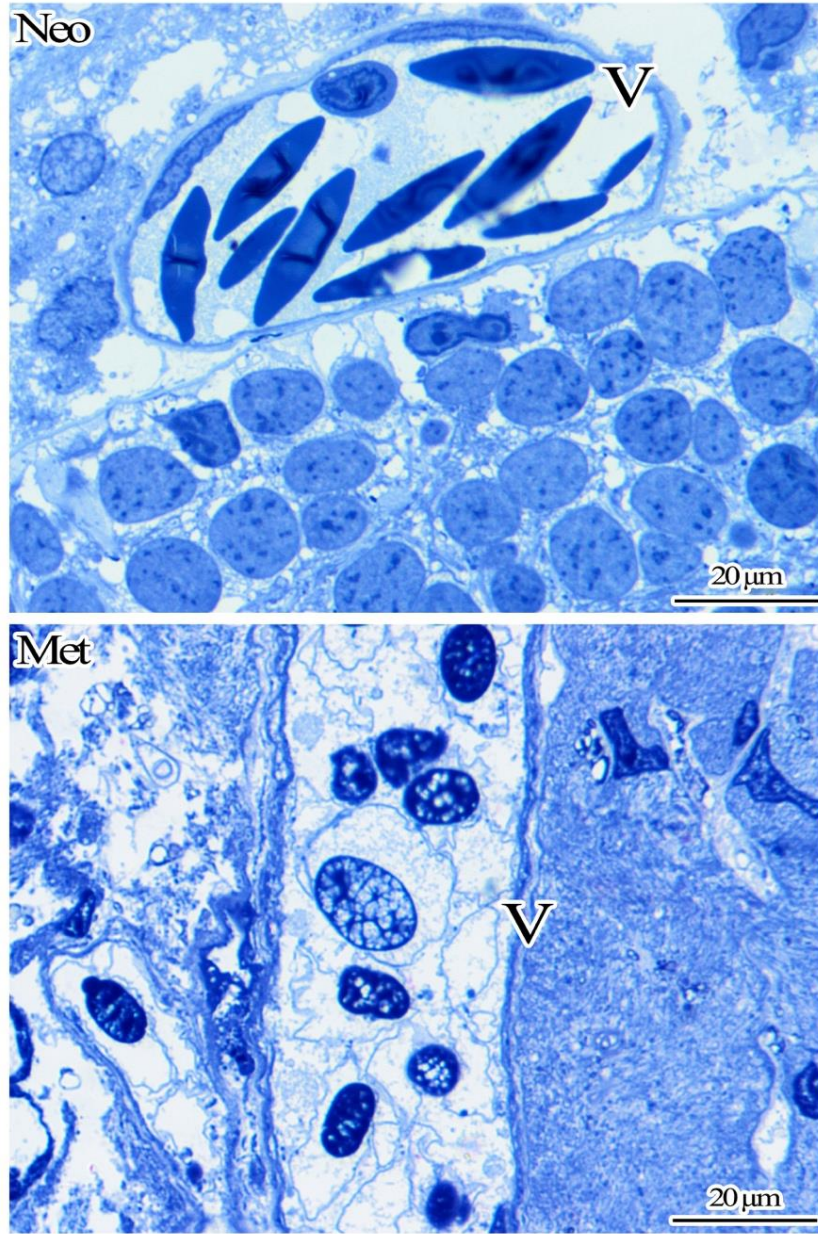
**Resim 6.25** Neotenik axolotl beyninin telensefalona ait GFAP immünohistokimya boyaması. Dorsal telensefalonda (a,c) ve ventral telensefalonda (b) ventrikül duvarında bulunan GFAP ifade eden hücreler (ok) ve uzantıları (ok başı) gösterilmiştir. Anterior telensefalonda (d) ventrikül başlangıcında bulunan GFAP ifade eden hücreler ve uzantıları görülmektedir. (Vt: Ventrikül)



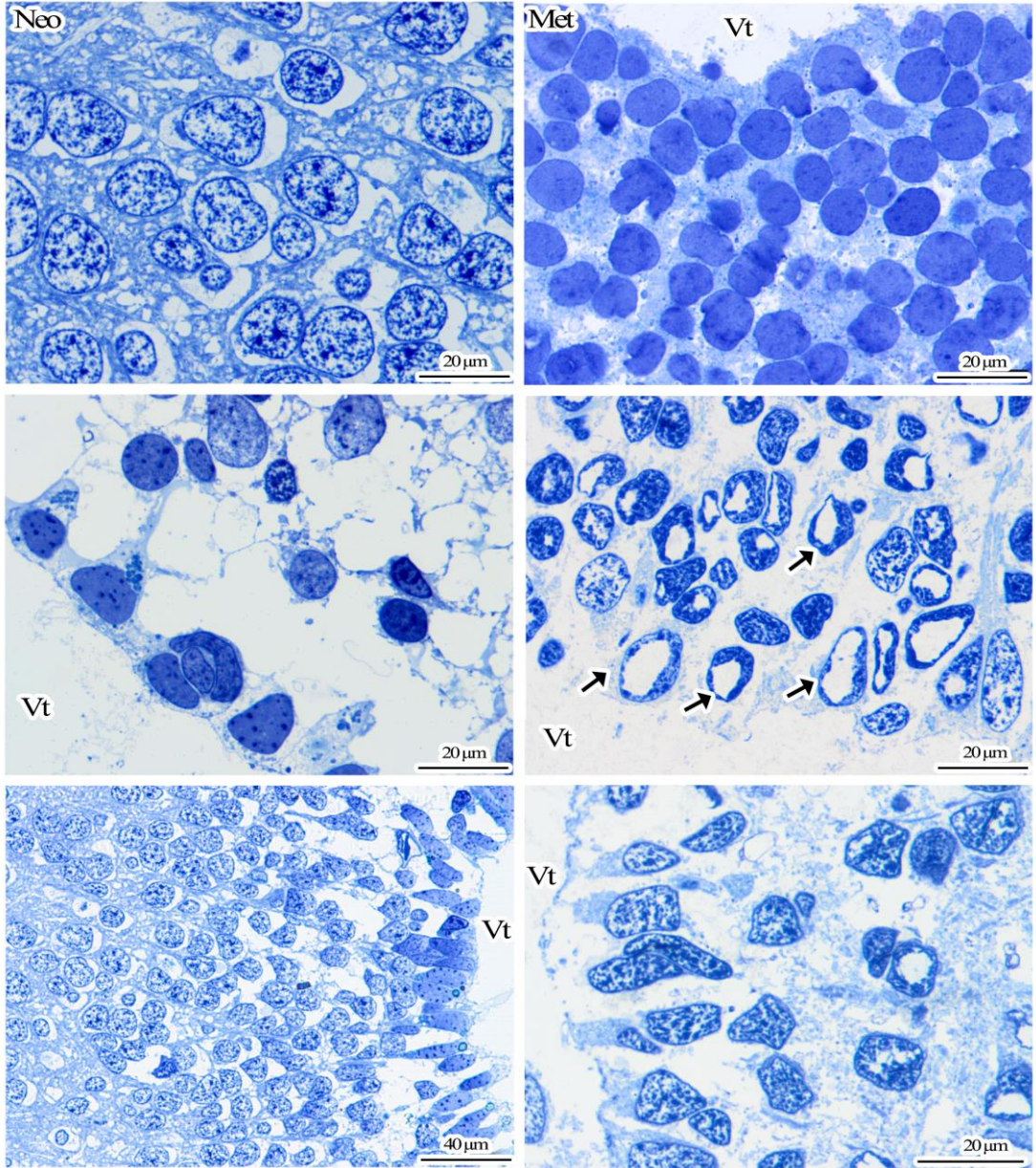
**Resim 6.26** Metamorfik axolotl beyninin telensefalonuna ait GFAP immünohistokimya boyaması. Ventrikül duvarında bulunan GFAP ifade eden hücreler (ok) ve uzantıları (ok başı) gösterilmiştir. (d) Kan damarı etrafını saran GFAP ifade eden hücre uzantıları görülmektedir. (Vt: Ventrikül)

#### **6.4 Toluidin Mavisi Boyama Sonuçları**

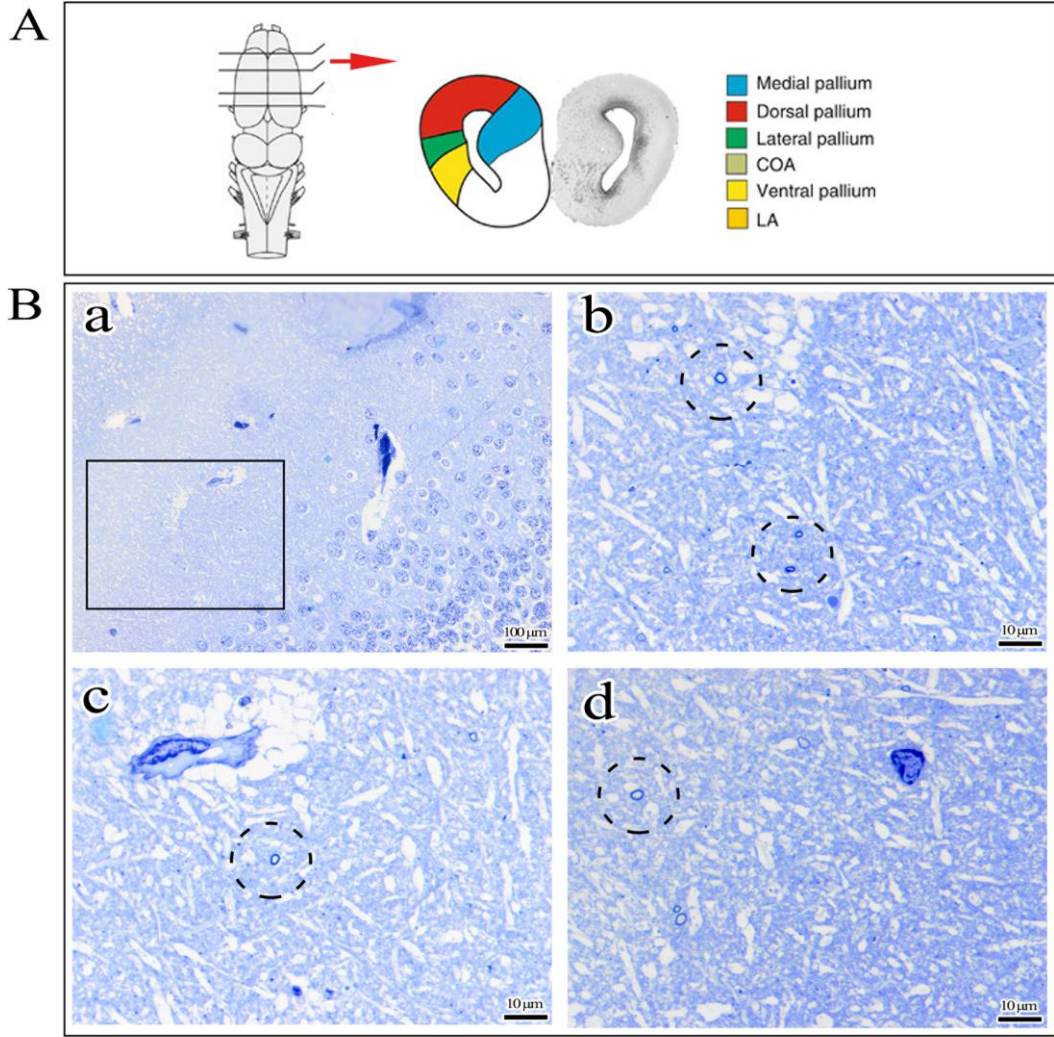
Araldite gömülen rezin bloklardan 500 nm kalınlıktaki kesitler toluidin mavisi ile boyandı ve histopatolojik analizler gerçekleştirildi. Neotenik axolotlda mekik şeklinde olan kan hücrelerinin metamorfik axolotlda oval şekilli olduğu tespit edildi (Resim 6.27). Metamorfik axolotlda ependimoglia hücrelerinde morfolojik değişiklikler gözlemlendi. Metamorfik axolotlın nöron çekirdeklerinde veziküler boşlukların varlığı belirgindi (Resim 6.28). Telensefalonda farklı büyüklük ve çaplarda miyelinli sinir lifleri tespit edildi (Resim 6.29-4.30). Neotenik axolotlın telensefalon bölgesinin lateral palliumdaki nöronlar ile medial pallium bölgesinde bulunan nöronların şekillerinin farklı olduğu tespit edildi. Lateral palliumdaki nöronlar prizmatik şekilli iken medial palliumdaki nöronların ise yuvarlak şekilli oldukları fark edildi (Resim 6.31). Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerinde ventrikül duvarında tek sıra halinde sıralanan ependimoglia hücrelerden bazılarının apikal kısmında salgı keseleri tespit edildi (Resim 6.32).



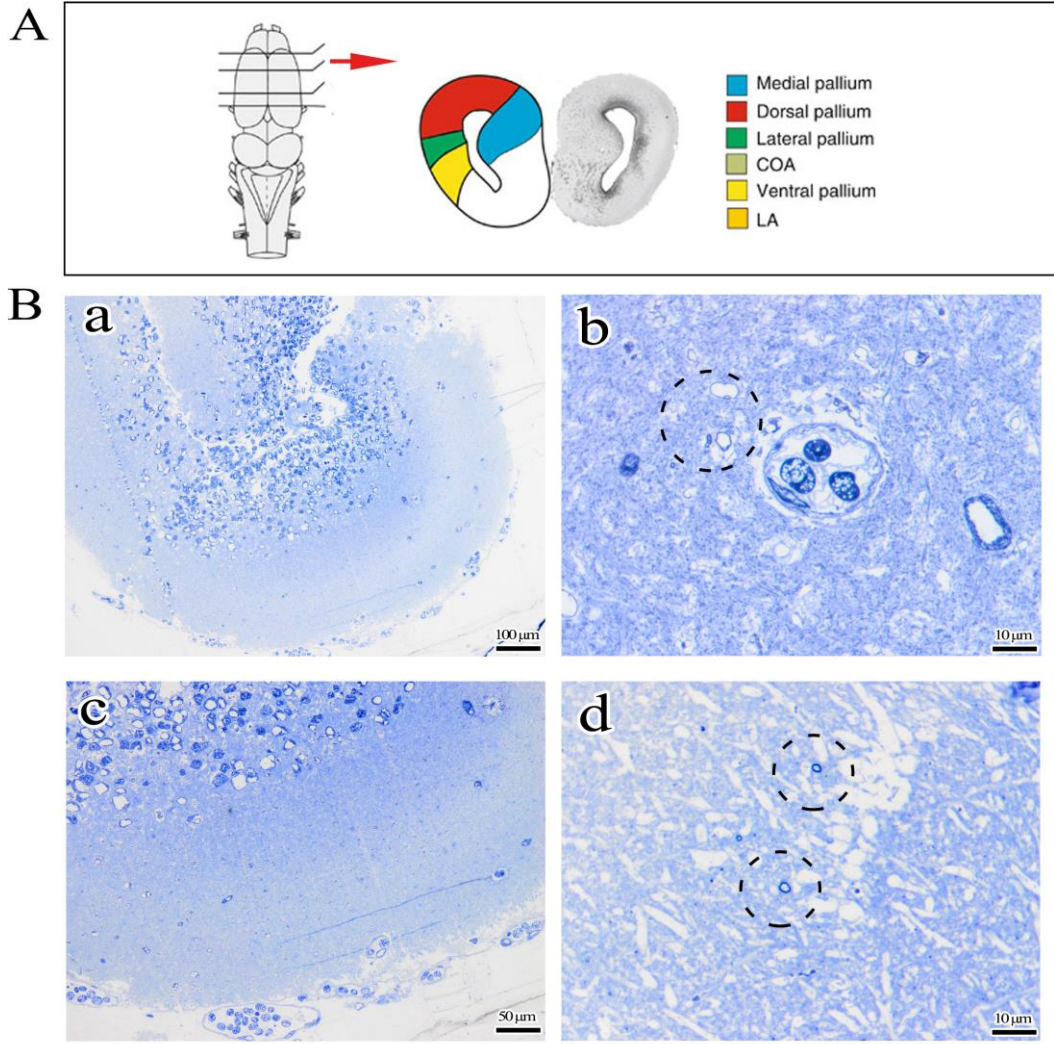
**Resim 6.27** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyninin telensefalonunda bulunan kan damarları (V), eritrositler ve diğer kan elamanları.



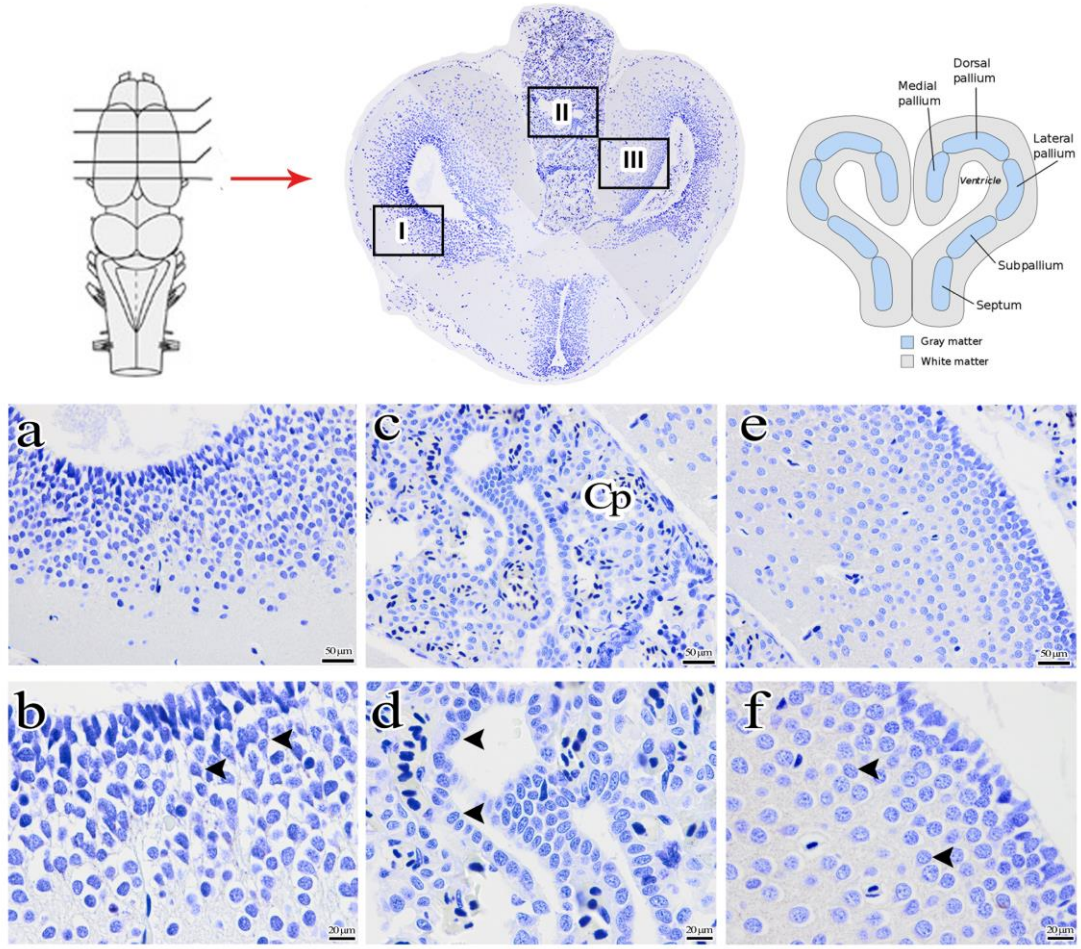
**Resim 6.28** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerinde ventrikül etrafında dizilmiş ependimoglia hücreler ve nöronlar görülmektedir. Metamorfik nöron çekirdeklerinde çok sayıda veziküler boşluklar bulunmaktadır. (Vt: Ventrikül, ok: veziküler boşluk) (Toluidin mavisi, Olympus ışık mikroskobu, büyütme 40X ve 100X)



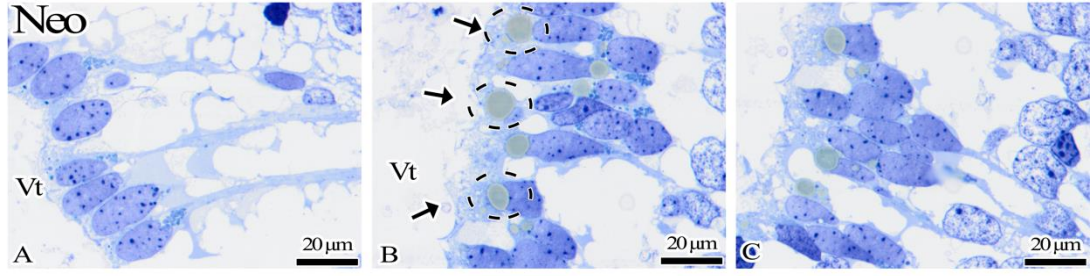
**Resim 6.29** Neotenik axolotl beyninin şematize görüntüsü ve farklı seviyelerdeki miyelinli sinir lifleri. (A) Axolotl beyninin makroskobik şematik görüntüsü, analiz için aldığımız kesitlerin alındığı düzeyi gösteren yer kırmızı okla gösterilmektedir. (B) Neotenik axolotl beyninin telensefalon görüntüleri. Telensefalon (a) bölgesinin bir bölümünün görüntüsü. Halka içerisinde miyelinli sinir lifleri (b, c, d).



**Resim 6.30** Metamorfik axolotl beyninin şematize görüntüsü ve farklı seviyelerdeki miyelinli sinir lifleri. (A) Axolotl beyninin makroskobik şematik görüntüsü, analiz için aldığımız kesitlerin alındığı düzeyi gösteren yer kırmızı okla gösterilmektedir. (B) Metamorfik axolotl beyninin telensefalonu görüntüleri. (a,c) Telensefalon bölgesinin bir bölümünün görüntüsü. (b, d), halka içerisinde miyelinli sinir lifleri.



**Resim 6.31** Neotenik axolotl beyninin şematize görüntüsü ve telensefalon ve diensefalon bölgelerinden alınan kesitlerin genel görüntüsü görülmektedir.) I numaralı alanın 40X ile çekilmiş görüntüsünde lateral pallium bölgesinde piramidal şekilli nöronlar ok başları ile gösterilmiştir (a,b). II numaralı alanın 40X ile çekilmiş görüntüsünde tek sıra halinde dizilmiş koroid pleksus hücreleri ok başları ile gösterilmiştir (c,d). III numaralı alanın 40X ile çekilmiş görüntüsünde medial pallium bölgesinde yuvarlak şekilli nöronlar ok başları ile gösterilmektedir (e,f).



**Resim 6.32** Neotenik (Neo) axolotl beyninin telensefalon bölgesinde ventrikül etrafında tek sıra halinde sıralanan ependimoglia hücrelerinin apikal kısmında (oklar) salgı ürünü görülmektedir. (Vt: Ventrikül)

## 6.5 Elektron Mikroskop Sonuçları

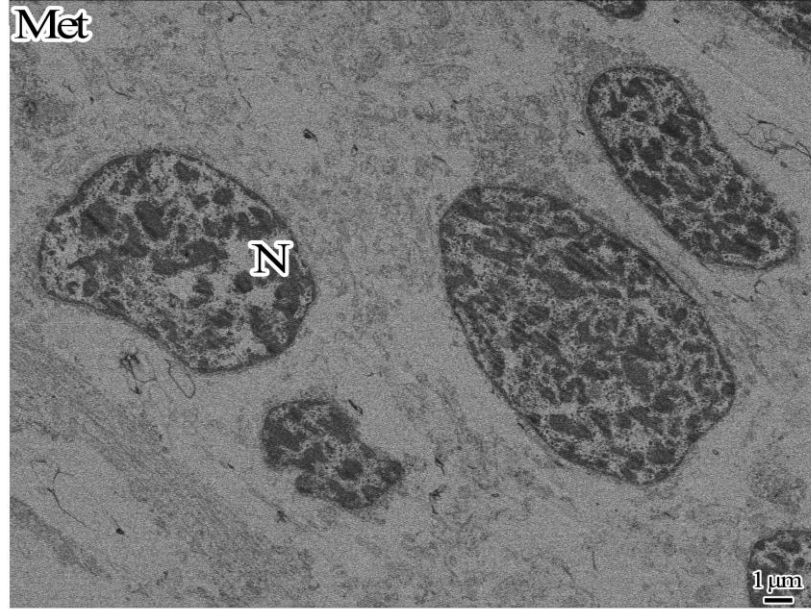
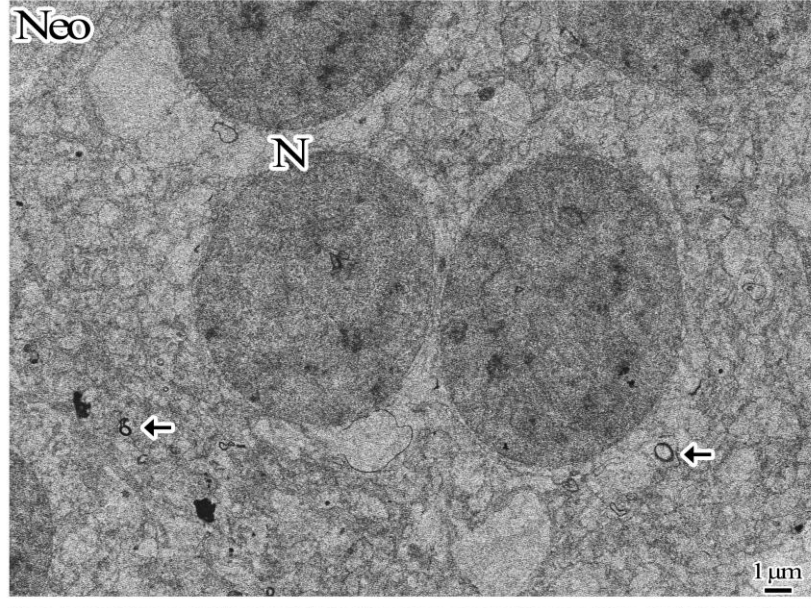
### 6.5.1 Geçirimli elektron mikroskop sonuçları

Elektron mikroskopik analizler için araldite gömülen doku bloklarından 70 nm kalınlıkta alınan kesitlerde histopatolojik analizler gerçekleştirildi. Neotenik ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerinden alınan görüntülerde analizler yapıldı. Metamorfik axolotl nöron çekirdeklerinde veziküler boşlukların varlığı belirgindi. Neotenik ve metamorfik axolotl nöron çekirdekleri sitoplazmanın büyük bir kısmını kaplamaktaydı. Neotenik axolotl nöronlarının çekirdekleri ökromatin yapıdayken, metamorfik axolotl nöronların çekirdeklerinin heterokromatik yapıda olduğu gözlemlendi (Resim 6.33-35, 39, 42). Neotenik ve metamorfik axolotl telensefalon bölgesinde miyelinli sinir liflerinin olduğu tespit edildi. Neotenik ve metamorfik axolotlların miyelin lamel yapılarının birbirlerinden farklı olduğu gözlemlendi. Telensefalonda ve omurilikte farklı büyüklük ve çaplarda miyelinli sinir lifleri tespit edildi (Resim 6.36, 39- 44). Neotenik axolotlun telensefalonu dura materinde desmozom yapıları görüntülendi. Mikroglia benzeri hücreler, oligodendroglialar ve lipofuksin benzeri yapı içeren hücreler neotenik grupta gözlemlendi (Resim 6.33-35,44).

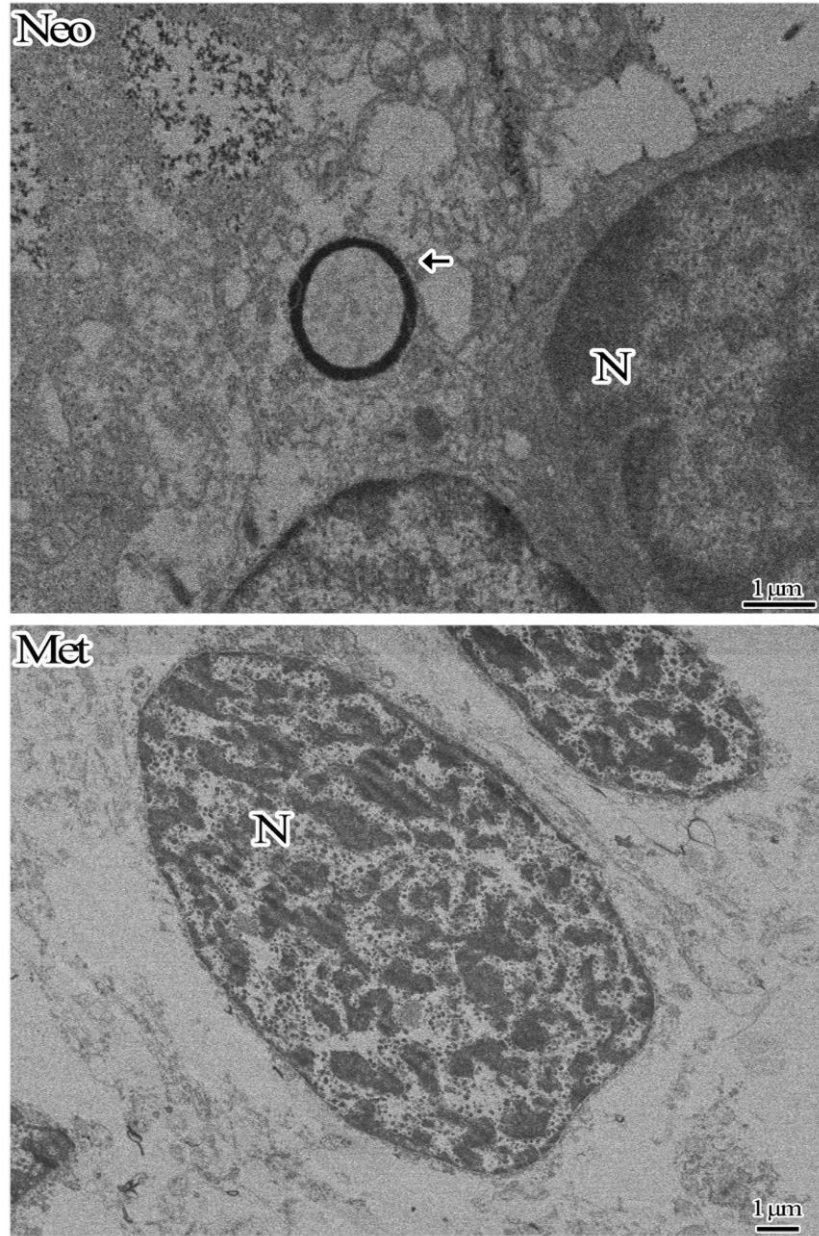
Neotenik ve metamorfik axolotl diensefalon bölgesinde immünohistokimyasal analizlerde hücre periferinde MTP pozitif granüllerin varlığı tespit edildi. Bu granüllerin MTP ifadesiyle ilişkisinin açıklanması için enblock yöntemi kullanılarak seri kesitler alındı ve elektron mikroskop analizleri gerçekleştirildi. Diensefalonda gerçekleştirilen ışık ve elektron mikroskop analizleri, bu granüllerin pigment kaynaklı

olabileceğini düşündürmektedir. Grup halinde organize olan ve sitoplazmalarında pigment içeren hücrelerin varlığı tespit edildi (Resim 6.45).

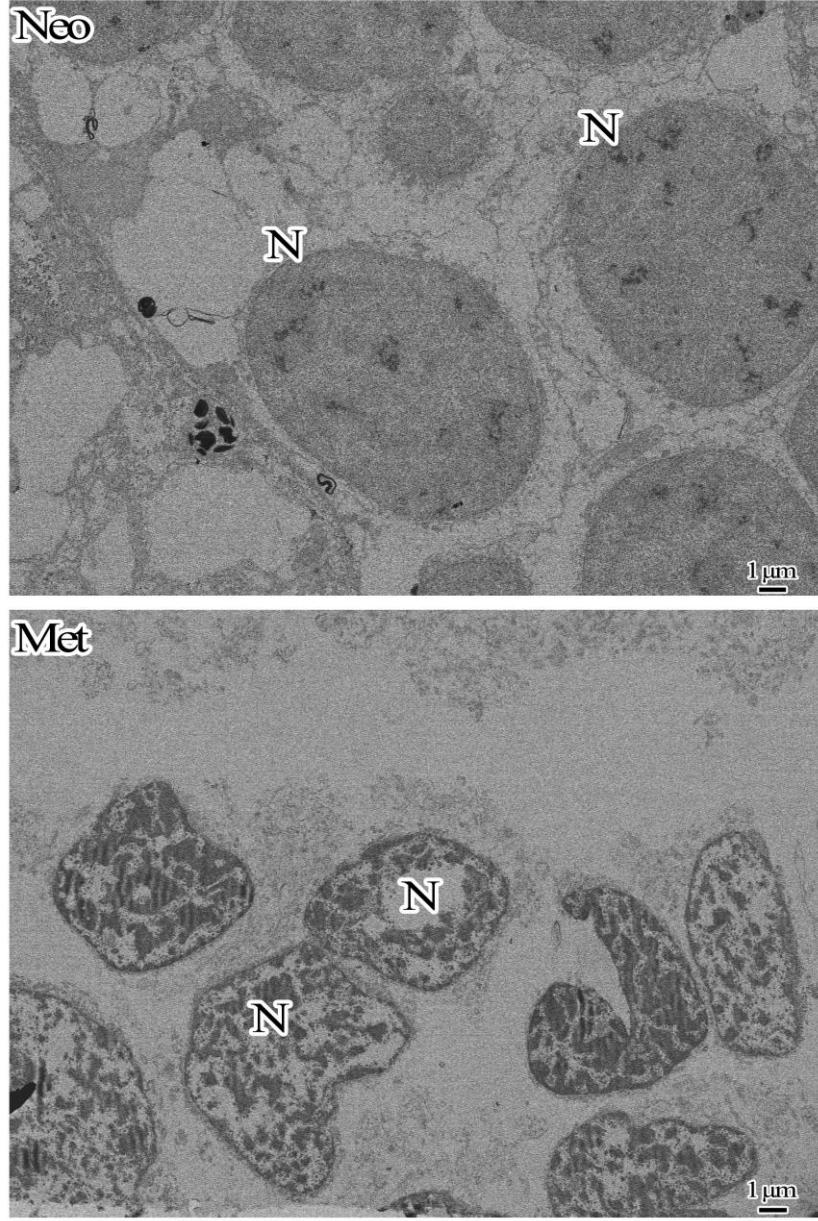
Telensefalon ve diensefalon bölgelerindeki ependimoglia hücrelerinin analizleri ışık ve elektron mikroskopları kullanılarak yapıldı. Prizmatik şekilli ependimoglia hücrelerinin ventrikül çevresinde tek sıra halinde sıkıca dizildiği ve apikallerinde büyük keselere sahip olduğu gözlemlendi. İki farklı elektron doku takibi yapılmasına karşın, elektron mikroskopik analizler sonucu salgı keselerinin içeriği kesin olarak belirlenemedi. Kese içeriğindeki maddelerin karbonhidrat olabilme ihtimali göz önünde bulundurularak parafin kesitlerinde PAS ve alsyan mavisi ile boyamalar yapıldı ve ışık mikroskopunda incelendi. Bu keseler PAS negatif iken, alsyan mavisi ile pozitif boyandılar. Karbonhidrattan zengin keselerin elektron görüntüleri ve köpüklü yapısı memeli Goblet hücrelerinde görülen salgı keselerine benzemektedir (Resim 6.46).



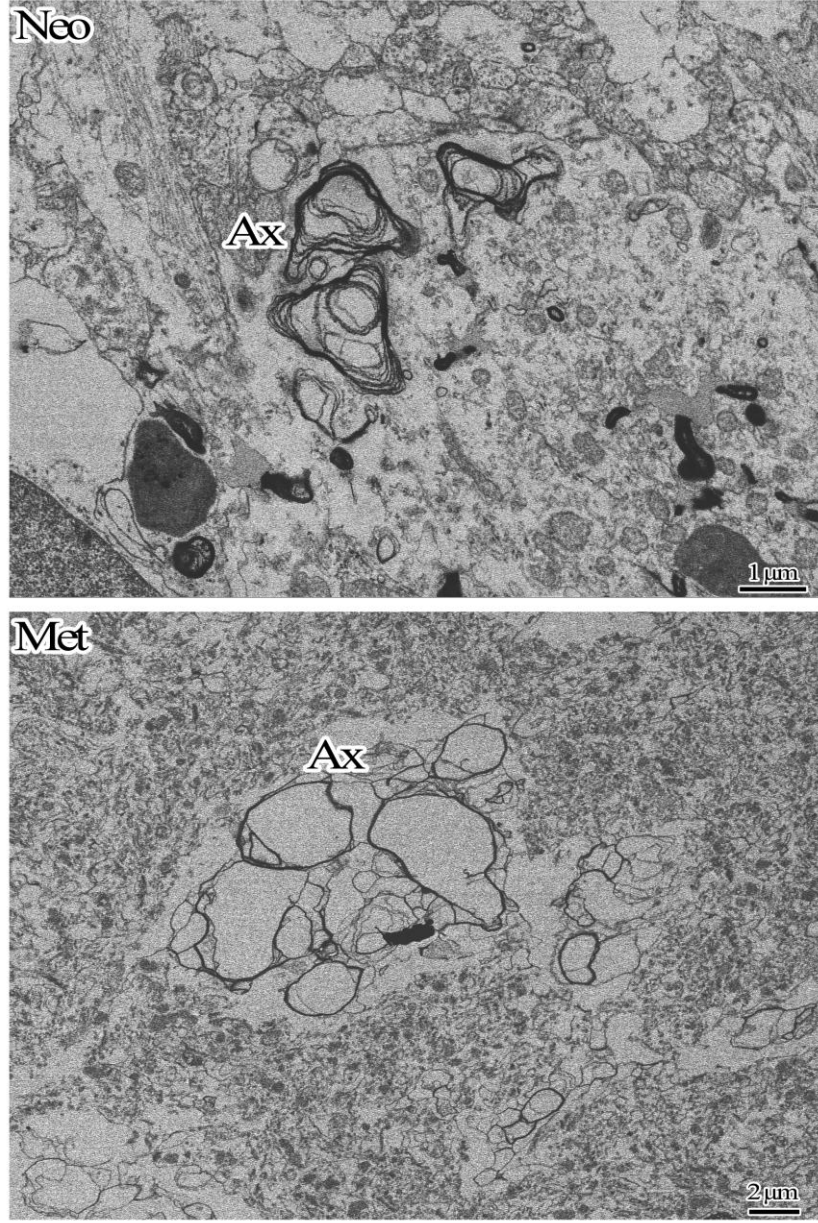
**Resim 6.33** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri. (Neo) nöronlar (N) ve miyelinli aksonlar (ok) görülmektedir. (Met) axolotlda morfolojik olarak değişime uğrayan nöronlar (N) görülmektedir.



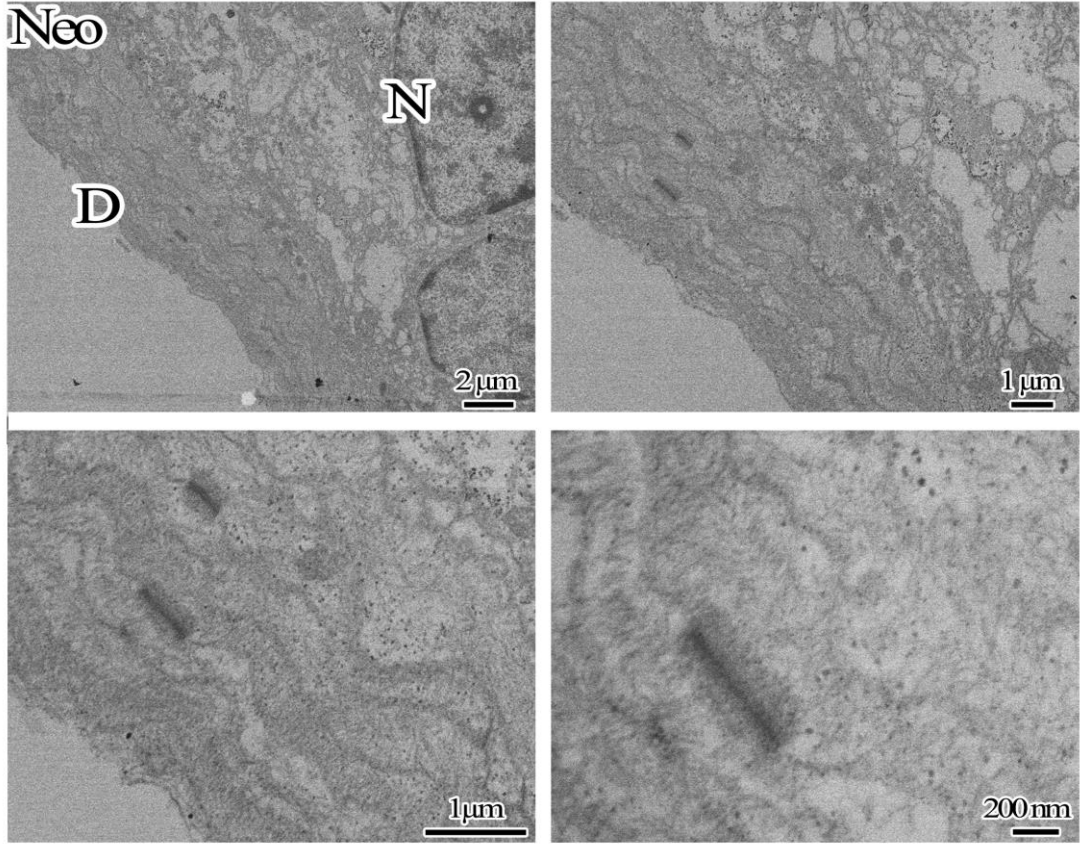
**Resim 6.34** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met) axotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri. Neotenik axotl nöronları (N) ve miyelinli aksonları (ok) görülmektedir. Metamorfik axotlda morfolojik olarak değişime uğrayan nöronlar (N) görülmektedir.



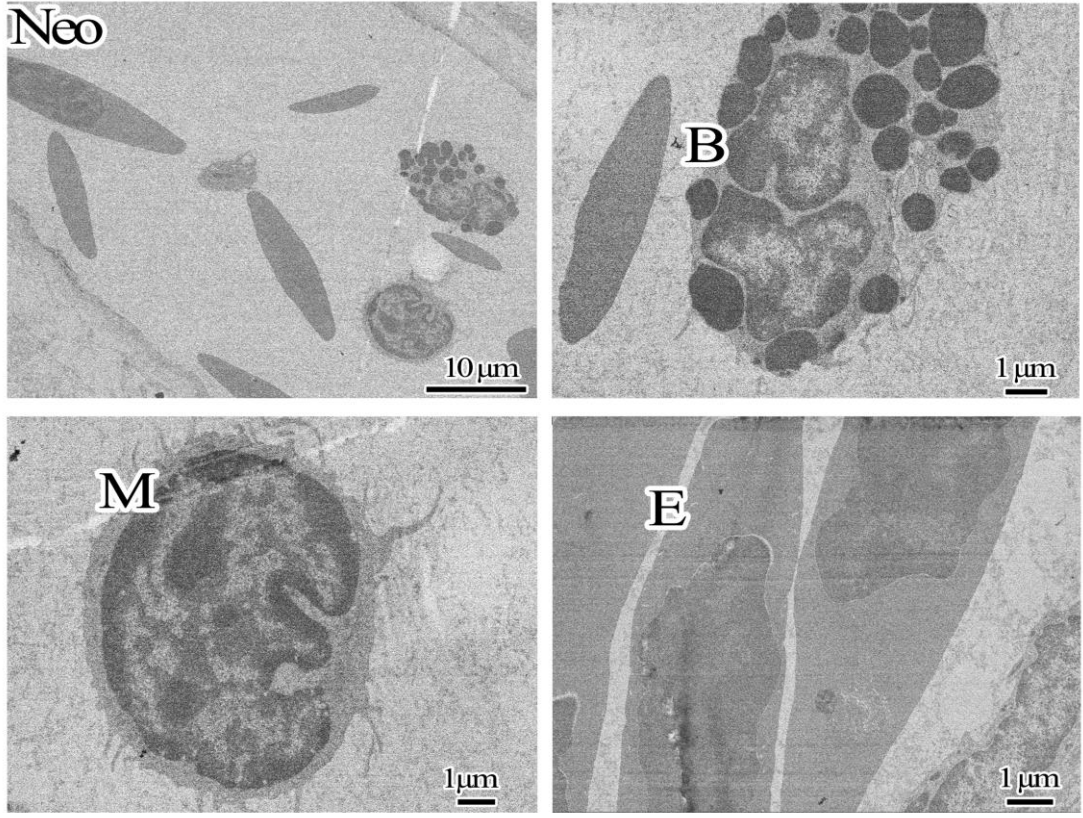
**Resim 6.35** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri. Neotenik axolotl ait nöronlar (N) görülmektedir. Metamorfik axolotl ait nöronların (N) çekirdeklerindeki yapısal değişim fark edilmektedir.



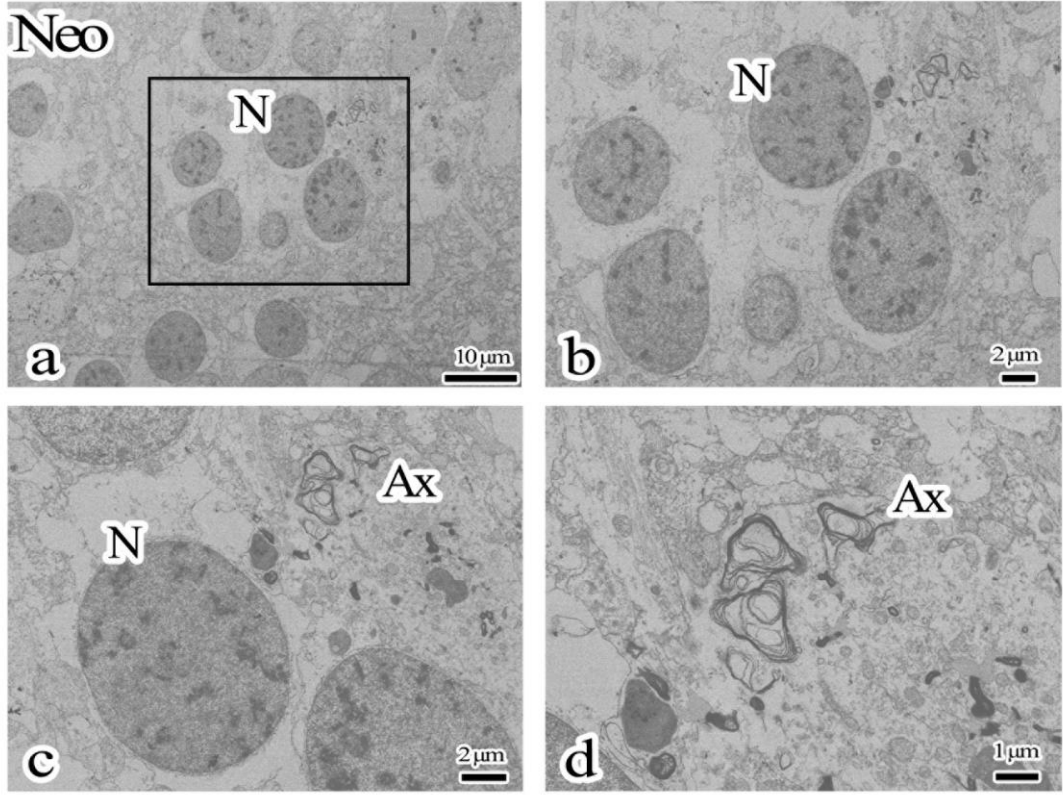
**Resim 6.36** Neotenik (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskop görüntüleri. Neotenik axolotl aksonları kompakt olmayan miyelin lamelleri ile çevrenirken, metamorfik axolotl aksonların ise daha sıkı paketlenen miyelin lamelleri ile çevrendikleri gözlenmektedir. (Ax: Miyelinli aksonlar)



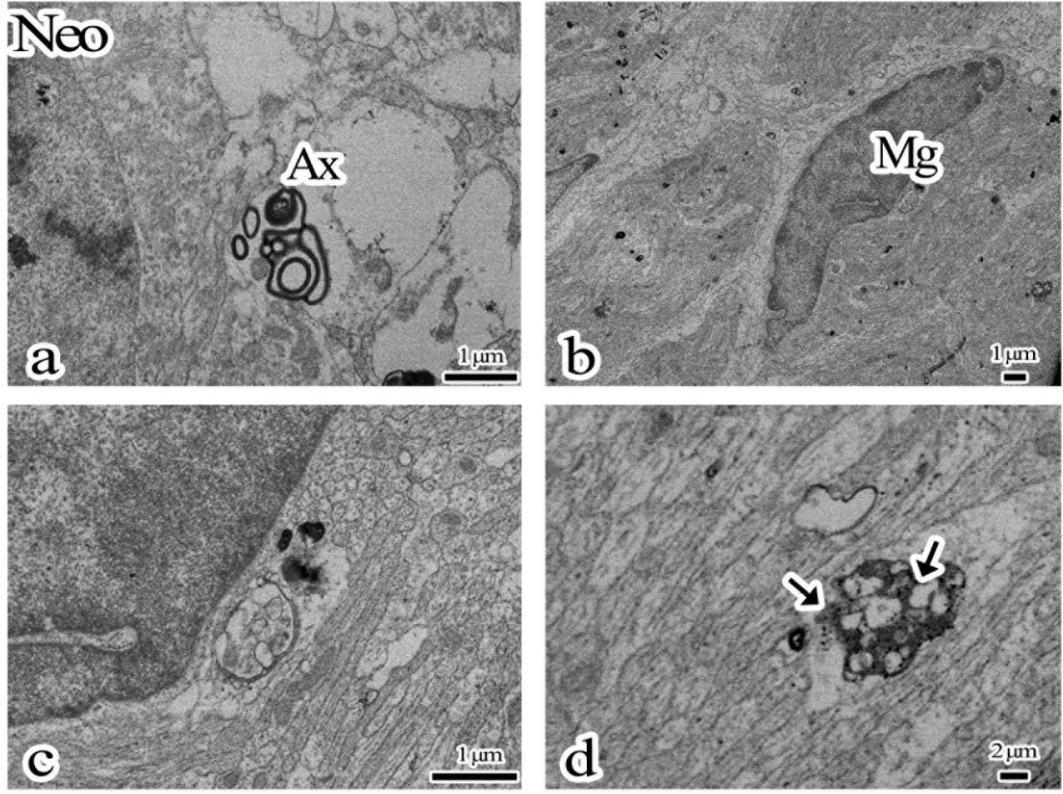
**Resim 6.37** Neotonik (Neo) axolotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskopik görüntüler. Dura materde (D) bulunan desmozomlar koyu kalın çizgiler biçiminde görülmektedir. (N: Nöron).



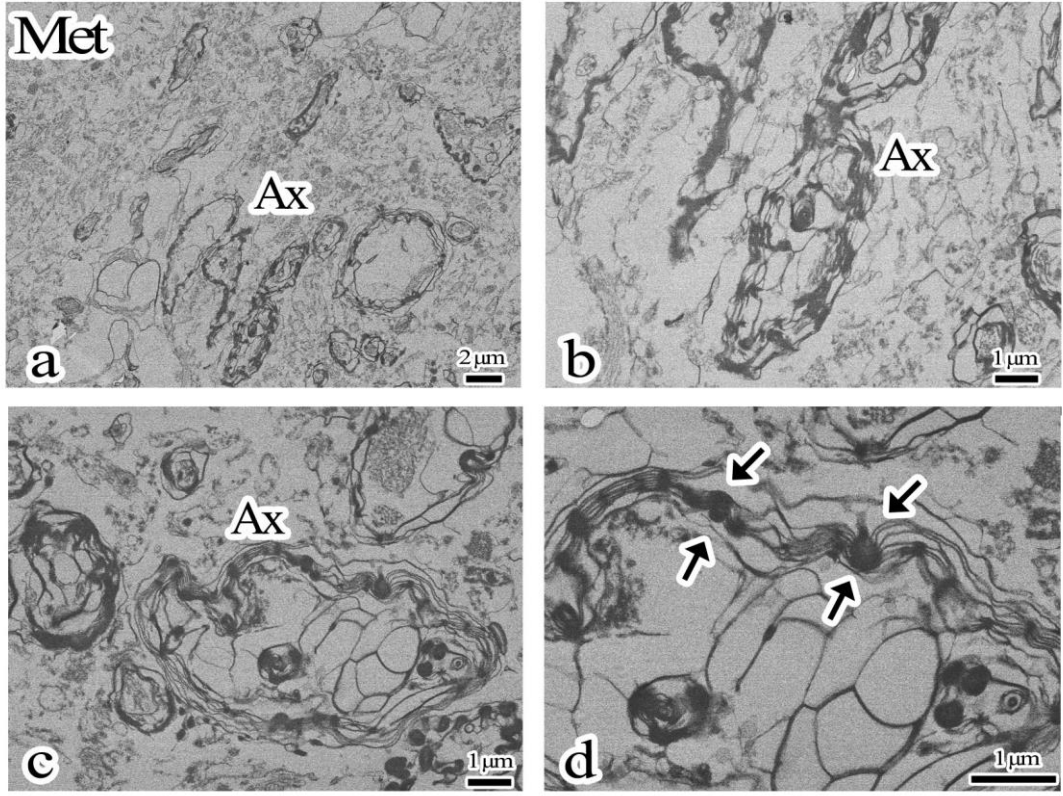
**Resim 6.38** Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesinden geçirimli elektron mikroskop ile çekilen kan hücrelerine ait görüntüler. Eritrositlerin (E) çekirdekli oldukları gözlenmektedir. Bazofil (B); Monosit (M).



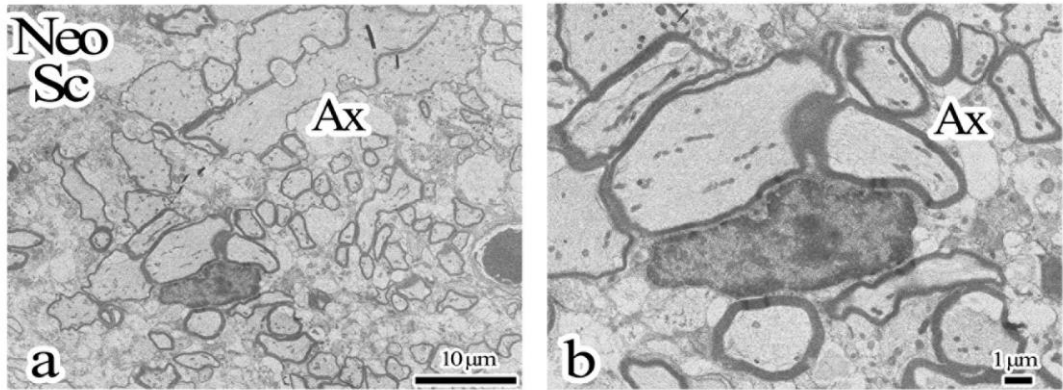
**Resim 6.39** Neotenik (Neo) axolotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskobik görüntüleri. Nöronların (N) çekirdeklerinin çok büyük, sitoplazmalarının sınırlı miktarda olduğu, ayrıca dokuda bulunan miyelinli sinir liflerinin kompakt olmayan miyelin kılıflara sahip oldukları görülmektedir.



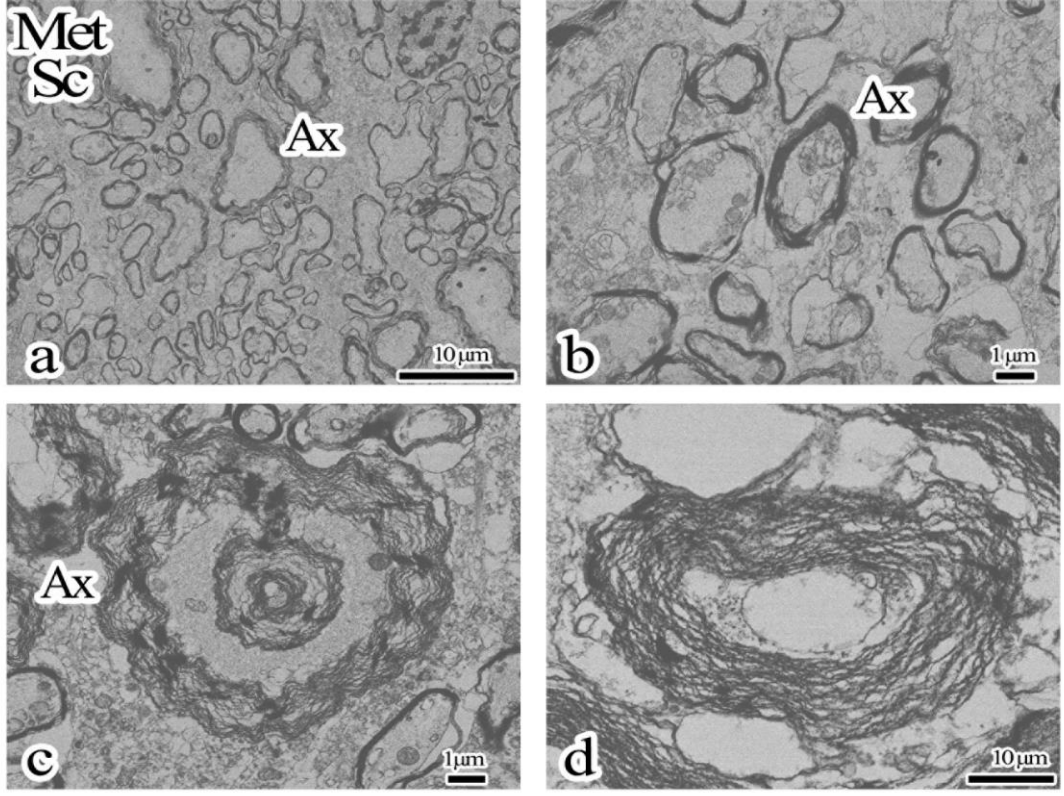
**Resim 6.40** Neotenik axolotl beyninin telensefalon bölgesinden çekilen geçirimli elektron mikroskopik görüntüler. Nöronun yanında kompakt yapıda miyelin kılıfına sahip sinir lifi demeti (Ax) görülmektedir (a). Etrafını nöropilin çevrelediği bir mikroglia benzeri hücre (Mg) (b) ve hücrenin etrafındaki nöropil (akson ve dendrit uzantıları) gözlenmektedir (c). Lipofuksin olduğu düşünülen yapı (ok) görülmektedir (d).



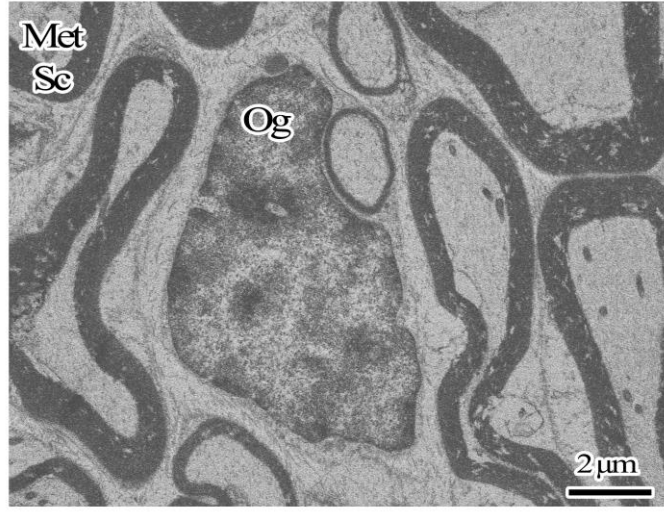
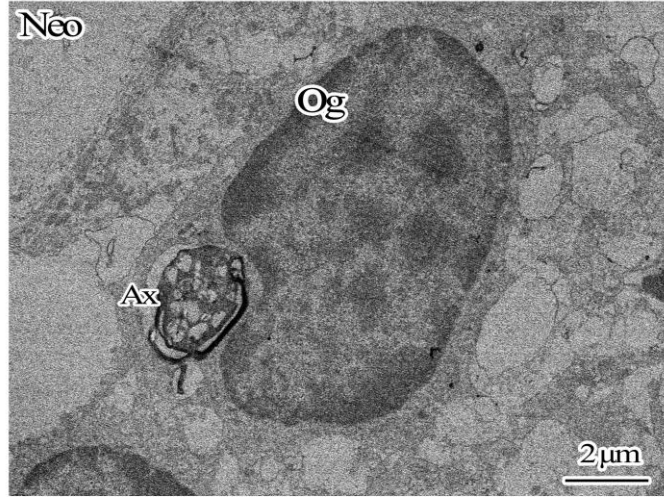
**Resim 6.41**(a-d) Metamorfik axolotl beyin dokusunun telensefalon bölgesinin gri maddesinden çekilmiş geçirimli elektron mikroskopik görüntüler. Dokudaki büyük çaplı miyelinli sinir liflerinin etrafındaki miyelin kılıflarındaki lamellerin bazı bölgelerde birbirinden ayrıldığı, boncuk biçimli yapılarla lamellerin birbirine tutunduğu gözlenmektedir.



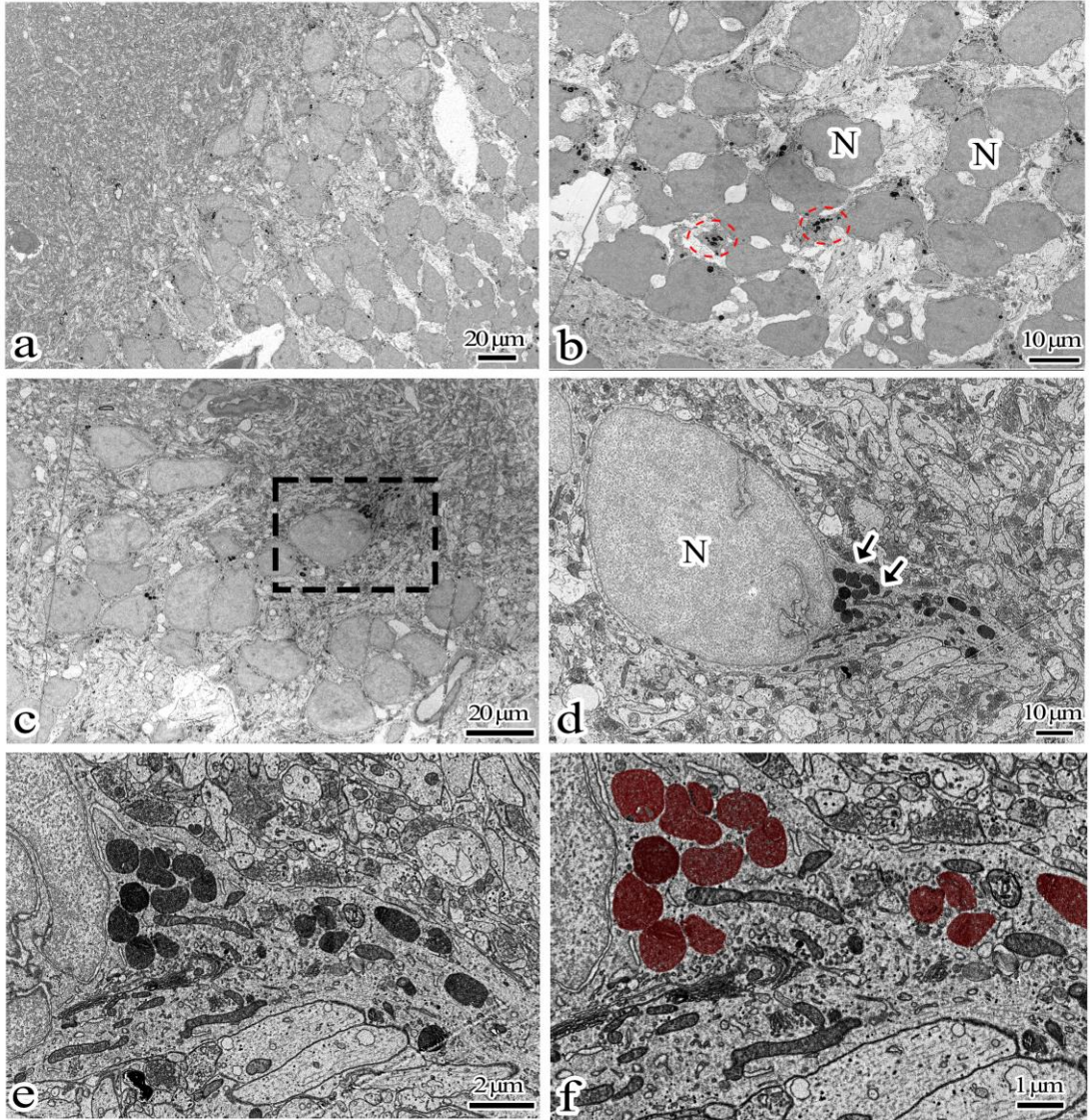
**Resim 6.42** Neotenic axolotl omurilik (Neo Sc) dokusundan çekilmiş geçirimli elektron mikroskopik görüntüler. Farklı çapta miyelinli aksonlar (Ax) görülmektedir.



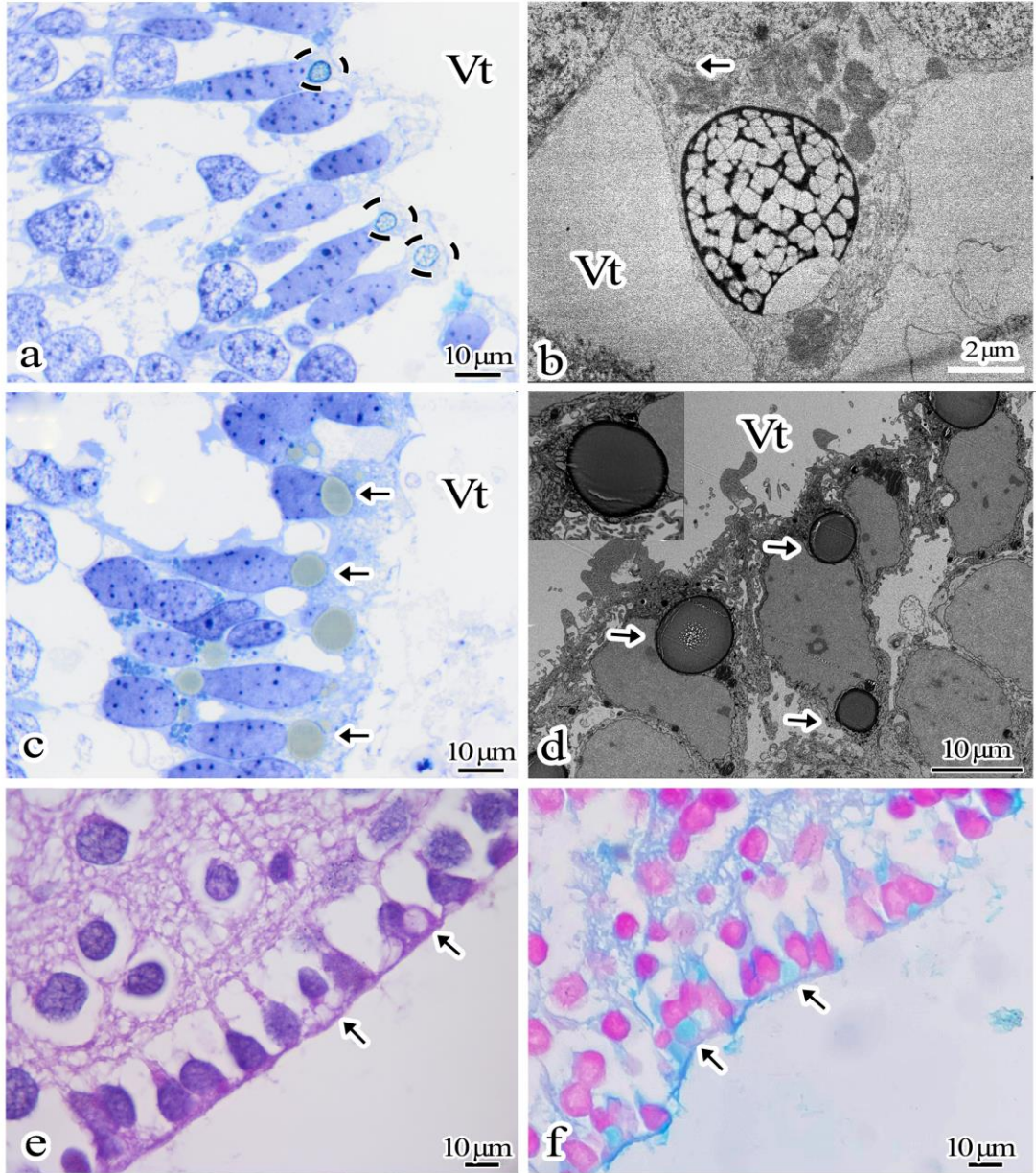
**Resim 6.43** Metamorfik axolotl omurilik (Met Sc) dokusundan çekilmiş geçirimli elektron mikroskopik görüntüler. Dokudaki büyük çaplı miyelinli sinir liflerinin etrafındaki miyelin kılıflarındaki lamellerin bazı bölgelerde birbirinden ayrıldığı, lamellerin farklı noktalardan birbirlerine tutunduğu gözlenmektedir.



**Resim 6.44** Neotenic (Neo) ve metamorfik (Met) axolotl geçirimli elektron mikroskop ile çekilmiş görüntüleri. Miyelinli aksonların (Ax) etrafındaki miyelin kılıfı üreten oligodendroglialar (Og) görülmektedir.



**Resim 6.45** Neotenic axolotl beyin dokusunun diensefalon bölgesinden çekilmiş geçirimli elektron mikroskopik görüntüler. Grup halinde organize olmuş nöronların, pial yüzeye bakan bölgelerinde siyah granüler yapılar (kırmızı kesikli daireler) tespit edilmiştir (a, b, c). Kesikli çizgi ile işaretlenmiş nöronun hücre içerisinde bulunan elektron yoğun yapılar (oklar) görülmektedir (c, d). Bu nöronlar katekolaminerjik nöron olabilir. Hücre sitoplazmasında kırmızı ile işaretlenen yapıların nöromelanin olabileceği düşünülmektedir (f).

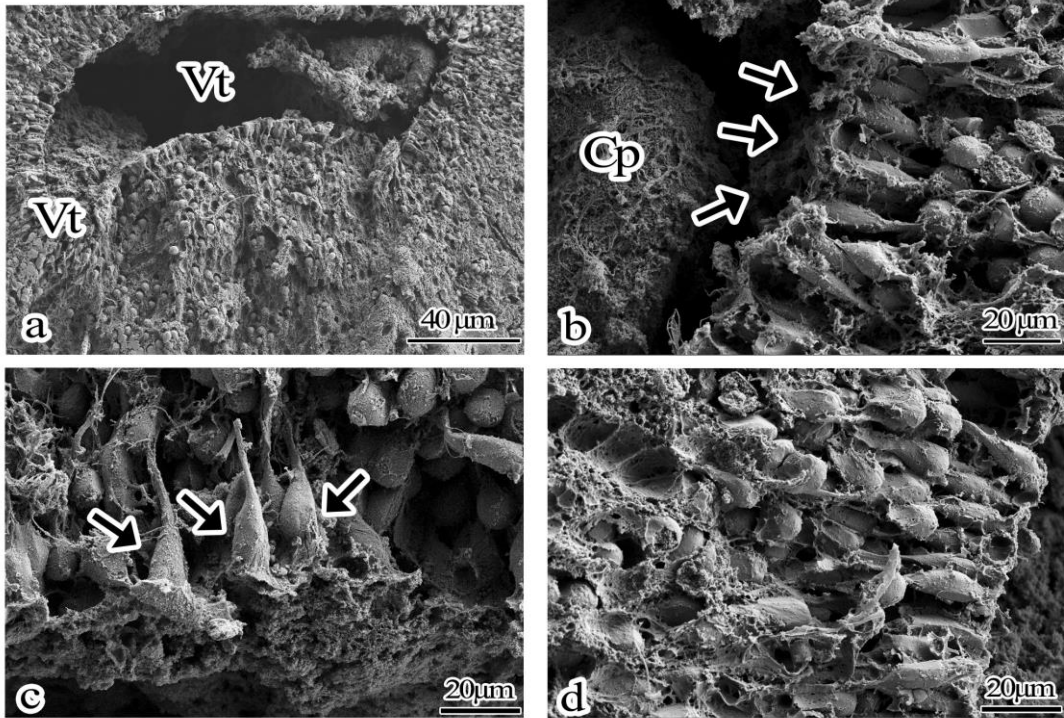


**Resim 6.46** Neotenic axolotl beyinin telensefalon bölgesinde ventrikül etrafında sıralanan ependimoglia hücrelerin apikal kısmında bulunan salgı ürününün (halka içerisinde) ışık (a,c) ve geçirimli elektron (b,d) mikroskobik görüntüleri. Salgı granülünün kristaloit yapısı dikkat çekmektedir. Neotenic axolotlın ventriküle bakan duvarının parafin kesitleri görülmektedir (e,f). Granüllerin PAS (oklar) ile boyanmadığı (e), alsiyan mavisi (oklar) ile boyandığı görülmektedir (f).

## 6.5.2 Taramalı elektron mikroskop sonuçları

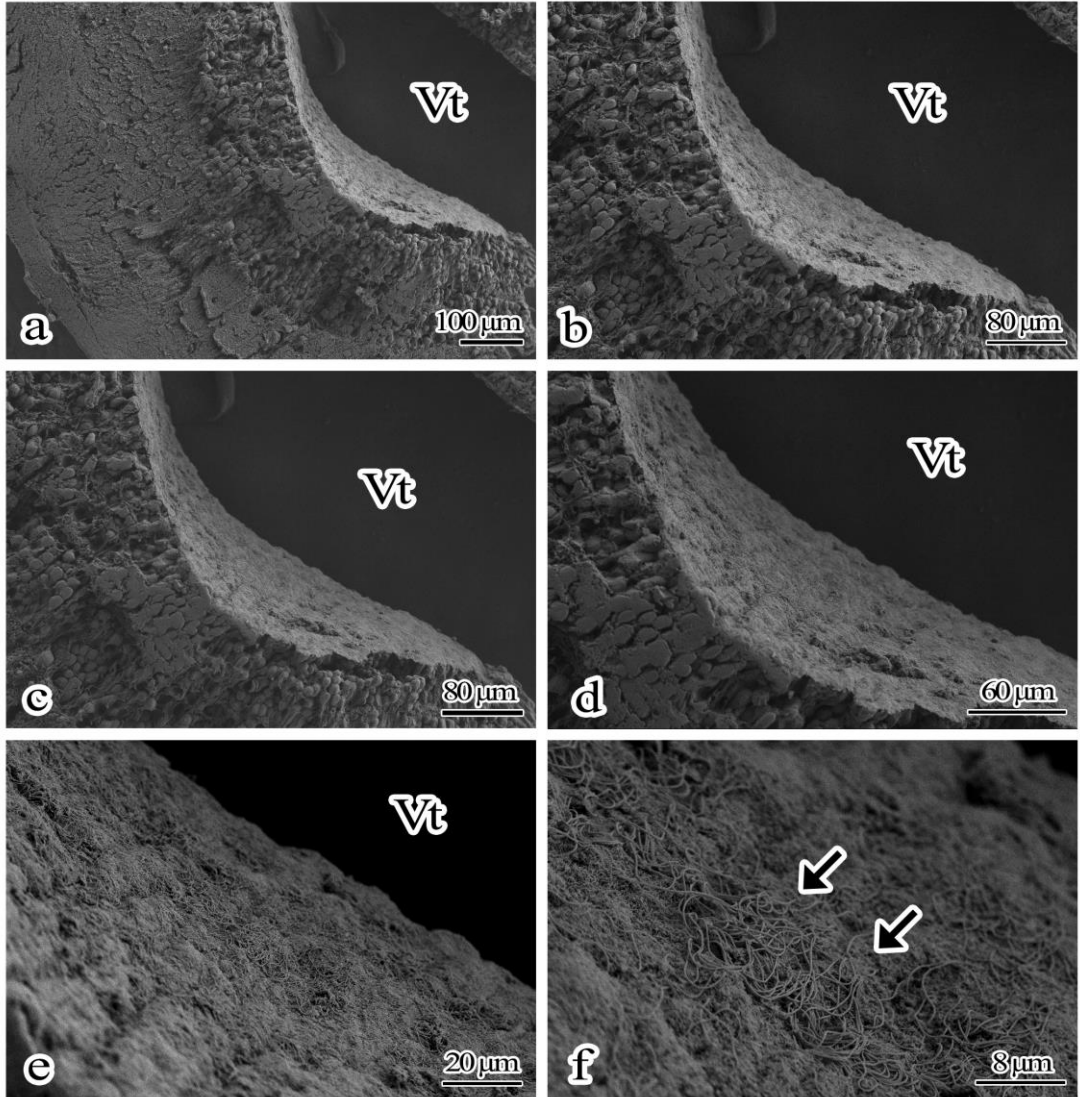
Taramalı elektron mikroskop analizleri için kritik kurutma yapılan neotenik axolotl beyninin telensefalon ve diensefalonda bulunan ependimoglia hücreler taramalı elektron mikroskobu kullanılarak incelendiğinde, prizmatik şekilli ependimoglia hücrelerinin ventrikül çevresinde tek sıra halinde sıkıca dizildiği ve bu hücrelerin ventriküler yüzeye bakan kısımlarının bir özel tabaka ile kaplandığı gözlenmektedir. Birçok silya ve hücre salgılarından oluşan örtü, ependimoglia hücrelerinin ventrikülere bakan yüzeylerinde fark edilmektedir. Orta beynin bir bölgesinde ventriküle bakan hücrelerin apikal yüzeyinde çok sayıda apikal yüzey özelleşmesi gözlemlendi. Diensefalonda bazı hücrelerin apikal yüzeyinde özel yapılar bulunmazken, diğer bir bölgesinde ise hücre apikal yüzeyinde farklı morfolojide silya yapıları gözlemlendi (Resim 6.39-4.44).

### 6.5.2.1 Telensefalon



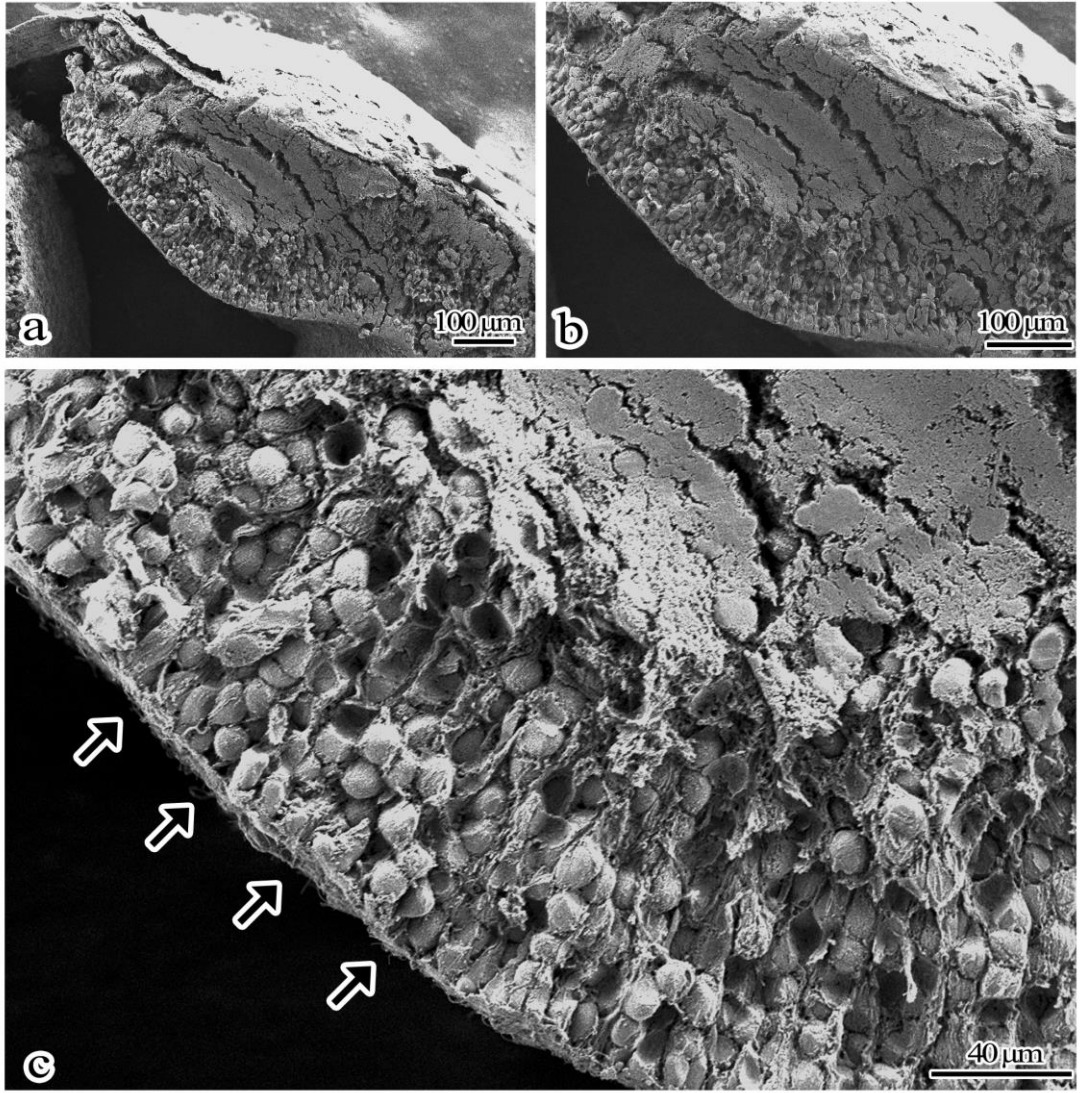
**Resim 6.47** Neotenik axolotl beyninin telensefalonundan çekilen taramalı elektron mikroskop görüntüleri. Ventrikül (Vt) lümeninde koroid pleksus (Cp) görülmektedir (a, b). Ependimoglia hücrelerinin düzenli dizilimi dikkat çekmektedir (oklar). Apikal yüzeyleri genişlemiş, bazal kısımları ise boru biçimli olan ependimoglia hücrelerinin sıralı dizilimi gözlenmektedir (oklar) (c). Ependimoglia hücrelerinin hemen alt tarafında kompakt halde düzenlenen nöronlar görülmektedir (d).

### 6.5.2.2 Diensefalon

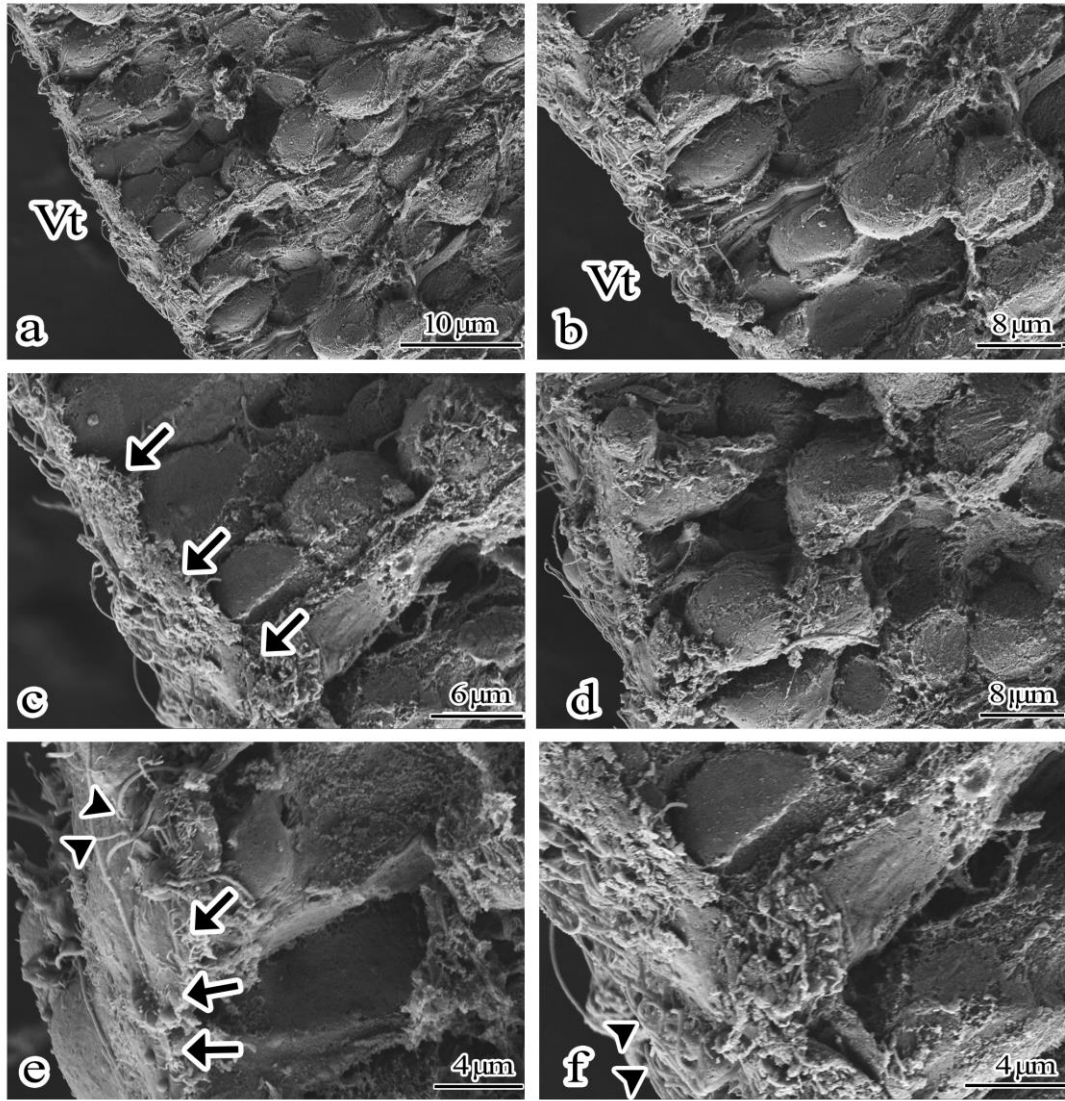


**Resim 6.48** Neotenic axolotl beyninin diensefalonun taramalı elektron mikroskop görüntüleri. Ventriküler (Vt) yüzeyde yüzeye paralel seyreden silyum olduğu düşünülen yapılar görülmektedir (oklar).

Ventrikülü sınırlandıran taraftaki hücreler çoğunlukla huni biçimli iken iç kısımlardakilerin küre biçimli olduğu, ayrıca buradaki hücrelerin sıkıca paketlenmiş, hücreler arası aralığın çok az olduğu fark edilmektedir. Ependimoglia hücrelerinin ventriküle bakan yüzeylerinde silyum ve salgı ürünlerinin oluşturduğu örtü gözlenmektedir (Resim 6.49,50).

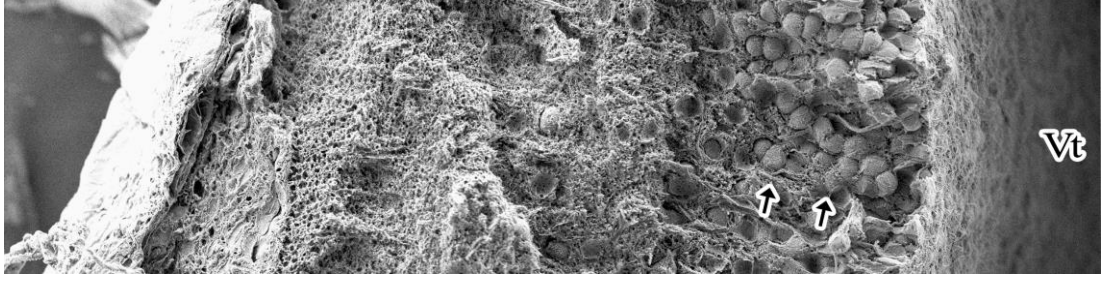


**Resim 6.49** Neotenic axolotl beyninin diensefalon bölgesinden çekilen taramalı elektron mikroskop görüntüleri. Diensefalonun ventriküle bakan duvarındaki hücrelerin organizasyonu görülmektedir (a, b, c). Ependimoglia hücrelerin ventriküle bakan yüzeylerinde silyum ve diğer hücre elemanlarının oluşturduğu örtü gözlenmektedir (oklar).



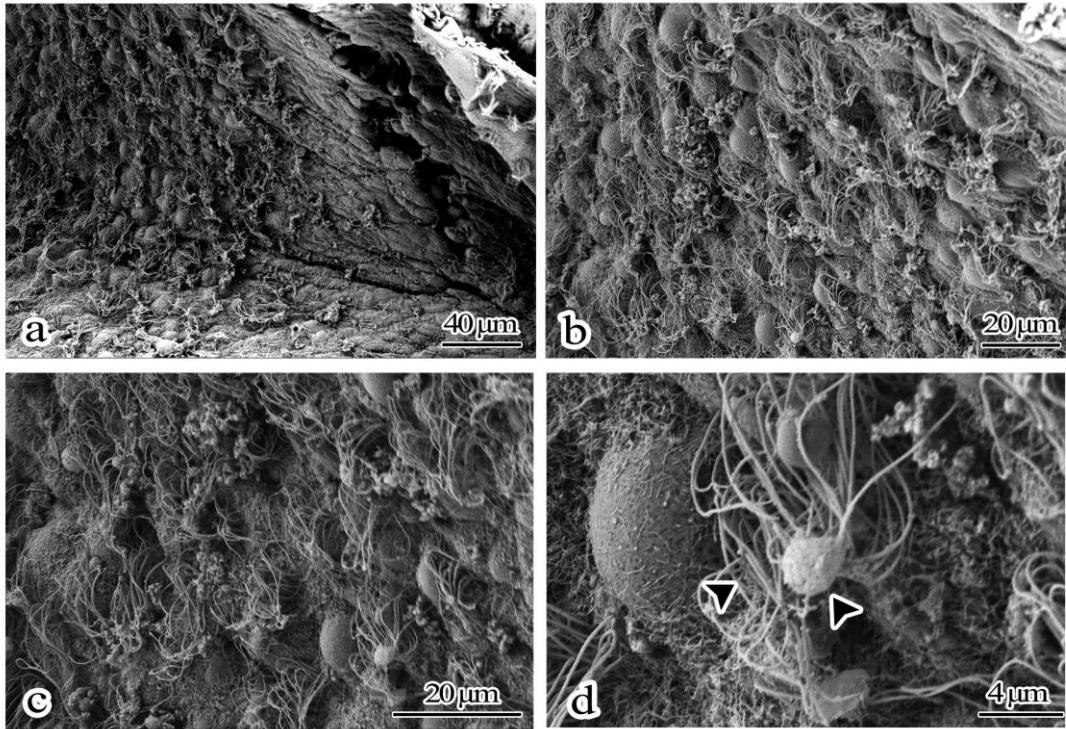
**Resim 6.50** Neotenic axolotl beyninin diensefalon bölgesinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri. Ependimoglia hücrelerinin ventriküle bakan yüzeyinde kalın bir örtü tabasının olduğu görülmektedir (oklar) (c). Ependimoglia hücrelerinin apikal yüzeyinden bakıldığında sınırlı sayıda hücrenin silyumlu olduğu (ok başı), ayrıca bu tabakadaki hücrelerin apikal yüzeye yakın sitoplazmalarında vakuoler yapıların varlığı görülmektedir (oklar) (e,f). (Vt: Ventrikül)

Ventriküle yakın olan alanda küre biçimli hücrelerin yoğunluğu, karşı tarafında ise sinir hücrelerinin uzantılarının transfer kesitlerinin oluşturduğu süngerimsi görüntü dikkat çekmektedir (Resim 6.51).



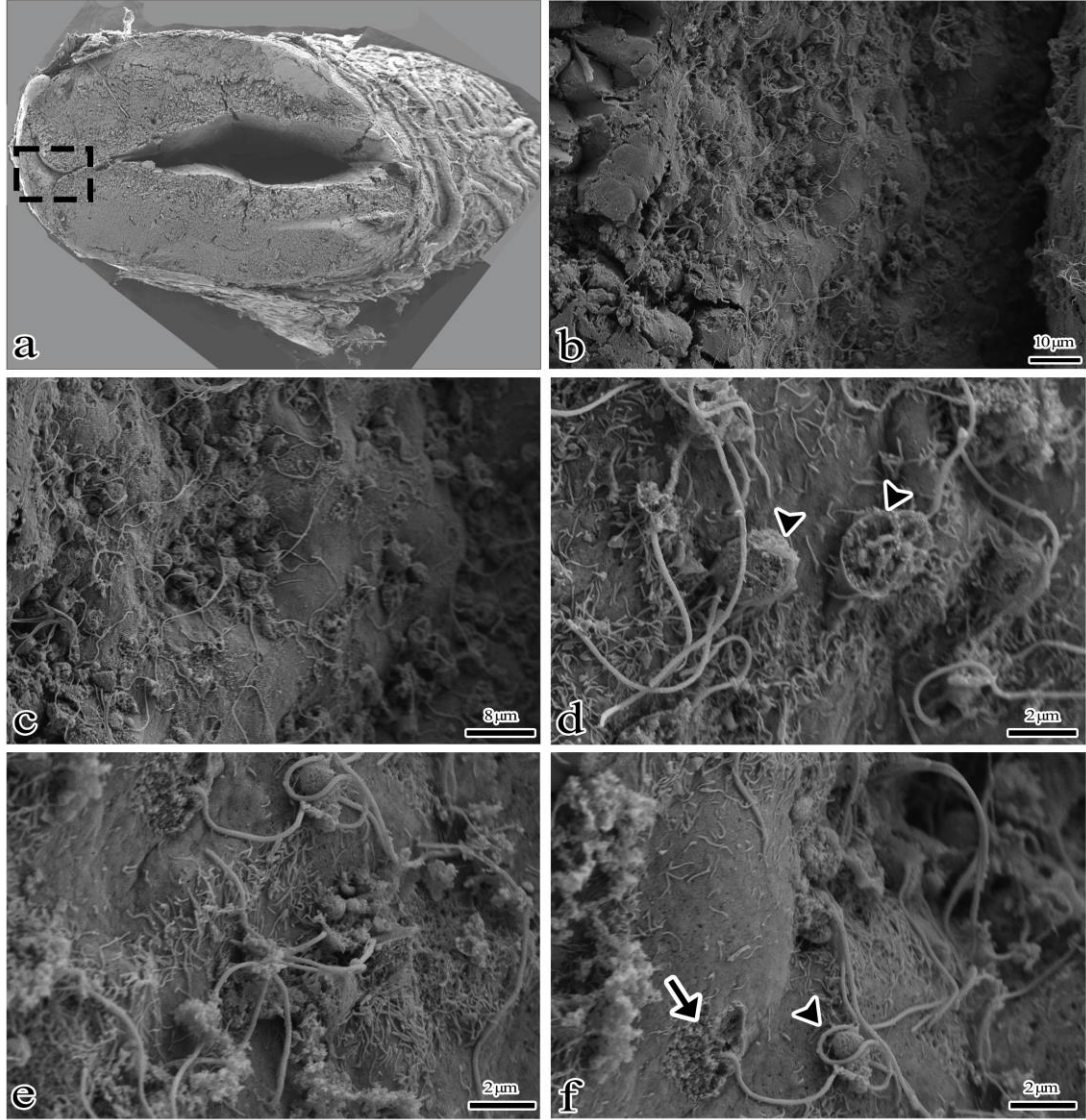
**Resim 6.51** Neotenik axolotl beyninin diensefalon duvarının ventrikül tarafından başlayıp (sağ taraf), beynin çevresini örten zarlara (sol taraf) kadar uzanan duvarın taramalı elektron mikroskop görüntüsü. (Vt: Ventrikül, ok:nöron)

Taramalı elektron mikroskopik görüntülerde, diensefalonun ventrikül duvarında bulunan hücrelerde apikal yüzey özelleşmeleri tespit edildi. Bu yapılar memelilerdeki olfaktor mukozada bulunan duyu nöronlarının apikal kısmında gözlenen olfaktor vezikül ve silyumlara benzemektedir. Yanyana organize olmuş hücrelerden birinin apikal yüzeyinde herhangi bir tipik özel yapı yokken, diğer hücre de ise apikal yüzey özelleşmesinin varlığı dikkat çekmektedir (Resim 6.52).



**Resim 6.52** Neotenik axolotl beyninin diensefalon bölgesinin taramalı elektron mikroskop görüntüleri. Duvarın ventriküle bakan yüzeyindeki hücrelerin apikal kısımlarında çok sayıda apikal yüzey özelleşmeleri (ok başı) bulunmaktadır (d).

Taramalı elektron mikroskopik görüntülerde, diensefalon hipotalamus bölgesindeki ventrikül duvarında bulunan hücrelerde farklı apikal yüzey özelleşmeleri tespit edildi. Hipotalamus bölgesinde bulunan ependimoglia hücrelerinin mikrovillus ve silyum yapıları gösterildi. Bu hücrelerin gövdesinden çıkan silyumların salgı keseleri olduğunu düşündüğümüz yapıları sardığı gösterildi (Resim 6.53).



**Resim 6.53** Neotenic axolotl beyninin diensefalon taramalı elektron mikroskop görüntüleri. Hipotalamus bölgesinde (kesikli dikdörtgen) ependimoglia hücrelerinin ventriküle bakan yüzeyindeki silyumlar ve silyumlar tarafından sarılmış salgı keseleri (ok başı) görülmektedir (d). Salgının yapıldığı hücre yüzeyi (ok) görülmektedir (f).

## 7. TARTIŞMA

Sinirbilim alanında yapılan axolotl beyin dokusuna ait histolojik çalışmaların rejenerasyon ve yeniden yapılanma hakkında önemli veriler sağlama potansiyeli vardır. Çalışmamızda metamorfoza indüklenen neotenik axolotl beyin dokusunun morfolojik ve hücresel değişikliğe uğradığı gösterildi. Bir çalışmada hem metamorfoz öncesi hem de sonrası yetişkin axolotlların, dorsal paliyumunda bölgesel yaralanma oluşturulduğunda nöronlarının yenilenebildiği gösterilmiştir (2). Axolotlın çeşitli nöron serilerini yenileyebildiği ve oluşan yeni nöronların elektrofizyolojik olarak aktif hale gelerek afferent sinyalleri aldığı gösterilmiştir (2).

Gruplardaki hayvan sayılarını belirlemek için güç analiz testi yapıldığında her grupta beş hayvan olması gerektiği saptandı. Axolotlın telensefolon bölgesindeki hücrelerin toplam sayısı stereolojik yöntemlerden olan fiziksel disektör yöntemi kullanılarak tespit edildi. Elde edilen sayım sonuçlarına göre HK ve DK değerleri hesaplandı. HK ve DK değerlerinin güven aralığı içinde olmasıyla grup içi dağılımın homojenliği ve örnekleme stratejisinin doğruluğu teyit edildi.

Birçok hücre tipi, vücudumuzun normal işlevleri için sürekli olarak çoğalır ve yenilenir. Proliferasyon, hücre bölünmesi ve çoğalması sürecidir. Bu süreç, hücre siklusunun farklı evrelerinde yer alan moleküler mekanizmalar tarafından düzenlenir. Proliferasyon belirteçleri, hücrelerin proliferasyon sürecinde hangi evrede olduklarını ve nasıl düzenlendiklerini belirlemek için kullanılan moleküllerdir. Bu belirteçler, hücre siklusunun farklı evrelerindeki gen ekspresyonu, protein seviyeleri ve aktiviteleri gibi çeşitli faktörlere dayanır. Ki-67 proteini, hücre bölünmesinin G1, S, G2 ve M fazlarında yüksek oranda ifade edilir ve hücrelerin proliferasyon hızıyla ilişkilidir (71,72).

İnsan ve birçok memeli türünde beyin gelişimi, yetişkinlik dönemine kadar devam eden karmaşık bir süreci kapsamaktadır (73). Gelişim süreci, yeni nöronların oluşumunu ve ölümünü kapsayan olaylar dizisidir. Gelişimsel hücre ölümü tüm omurgalılarda beyin gelişiminin önemli bir özelliğidir. Memelilerde başlangıçta üretilen nöronların yaklaşık yarısı perinatal dönemde apoptoza uğramaktadır. Hücre içi proteinlerin ölüme neden olan kaspaz-3 aktivasyonu ve apoptoz gelişimsel nöronal hücre ölümünde görülür (73). Ahern ve ark. tarafından yapılan çalışma sonuçlarına göre hücre ölüm periyodunun farelerde büyük ölçüde doğum sonrası ilk haftada

olduğu ve birçok beyin bölgesinde doğumdan sonraki ilk üç gün içinde en yüksek düzeyde hücre ölümünün gerçekleştiğini tespit etmişlerdir (74). Doğumla birlikte gerçekleşen hücre ölümü çeşitli hormonların ve proinflamatuvar sitokinlerin etkisi altında olabilir (73).

Telensefalon bölgesinden sistematik rasgele örnekleme ile alınan kesitlerde anti-Ki-67 proliferasyon belirteci ile immünohistokimyasal analizler yapılarak metamorfik axolotlların neotenik axolotllara göre Ki-67 ifade eden hücre sayılarının istatikselsel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. Metamorfik aksolotllarda Ki-67 ifade eden hücrelerin sayısının daha fazla oluşu nöronların aktif olarak proliferasyonu göstermektedir. Neotenik aksolotlların metamorfoz geçirmesi için kullandığımız T4 hormonu telensefalon bölgesindeki hücreleri proliferasyona indüklemiş olabilir (75).

Metamorfik aksolotlların telensefalon bölgelerinde metamorfoz ile hücre proliferasyonunun arttığı sonucunu elde ettiğimizde toplam nöron sayısında da artış gösterebileceklerine yönelik beklentimiz oldu. Fakat, stereolojik analizlerimiz telensefalon bölgesinde toplam nöron sayısının metamorfozla değişmediğini gösterdi. Metamorfoz ncesi ve sonrasında toplam nöron sayısında bir değişiklik olmadığı elde edilen verilerin istatikselsel analizleri sonucunda tespit edildi. Metamorfoz sonrasında telensefalon bölgesinde toplam nöron sayısında istatikselsel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilemezken proliferasyon belirteci olarak kullanılan Ki-67'yi ifade eden hücre sayısında istatikselsel olarak anlamlı bir artışın olması düşündürücüdür. Metamorfik ve neotenik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerindeki olgun nöronları tespit etmek için yaptığımız NeuN immünohistokimya analiz sonuçlarına göre metamorfik aksolotl beyinlerindeki olgun nöronların sayılarının neotenik aksolotlların olgun nöron sayılarına kıyasla istatikselsel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu tespit edilmiştir. Toplam hücre sayılarını karşılaştırdığımız stereolojik analiz sonuçlarımıza göre gruplar arasında toplam hücre sayılarında farklılığın olmayışı olgunlaşan hücre sayısındaki bu artış ile de açıklanabilir. Toplam hücre sayısında farklılığın olmayışı fakat proliferasyonu olan nöronların sayısının fazla oluşunun nedeni metamorfoz sürecinde hızla gerçekleşen hücre ölümleri de olabilir. Başka bir ifade ile metamorfoz memelilerin perinatal dönemlerindeki nöronal hücre ölümlerine benzer bir süreci de başlatmış olabilir. Bu sürecin hangi yönde ve mekanizma ile gerçekleştiğini belirlemek

ve farklı evrelerdeki gelişim sürecinde medial, lateral ve dorsal telensefalonlardaki apoptotik hücrelerin organizasyonları ve oranlarının açıklanması için apoptoz belirteçleri kullanılarak yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

Işık ve elektron mikroskopik tekniklerle axolotllarda ventrikülün etrafını döşeyen ependimoglia hücrelerin morfolojik organizasyonları incelendi. Neoteni ve metamorfik axolotlların ependymoglia hücrelerinin apikal yüzeyinde kese içerisinde depolanmış salgı maddeleri gözlemlendi. Elektron mikroskopik analizler için hazırlanan dokulardan alınan 500 nm kalınlıktaki kesitlerde ventrikülün etrafını döşeyen hücrelerin apikal yüzeyinde tespit edilen ürün parafin kesitlerde alsıyan mavisi ile boyandığında bunların mukopolisakkarit içerikte olduğu tespit edildi. Amfibi ve balıklara ait beyin ve omurilikler üzerinde yapılan çalışmalarda ventrikül etrafına dizilen, pial yüzeye doğru ayakçık uzatan hücrelerin varlığı ve bu hücrelerin yeni nöronların kaynağı olduğu gösterilmiştir (28,39,76). Newt ve axolotl üzerinde yapılan çalışmalarda telensefalonun ventrikül duvarını döşeyen bu hücrelerin beyin gelişimi, büyümesi ve rejenerasyonunda görev aldıkları ve yeni nöronların da kaynağı oldukları gösterilmiştir. Bu hücrelerin, astrosit belirteci olan glial fibriller asidik protein (GFAP), glutamin sentaz ve aquaporin 4'ü ifade etmesi memeli sinir sistemindeki progenitör hücreler olan radialglial hücrelere benzer özellikte olduklarını düşündürmektedir (39). Bu nedenle yetişkin amfibiler ve balıklarda bulunan bu hücreler ependimo-radyal glia (ERG) olarak adlandırılmışlardır (77). Buna ek olarak ERG'ler "radyal glia" (78), "tanisit" (79) veya "ependymoglia" olarak da isimlendirilmişlerdir (29). Lust ve ark. yaptıkları bir çalışmada onbeş farklı transkripsiyonel ERG hücre grubu tespit etmişlerdir (46). Bu hücreler üç ana grup altında sınıflandırılmış olup bunlar; sessiz (quiescent) ependimoglia, aktif ependimoglia ve nöron öncülü yeni (novel) ependimogliadır.

Urodel omurilik rejenerasyonunda ependimal hücrelerin rolü araştırılmıştır. Çalışmalarda ependimal hücrelerin büyüme faktörü ve retinoid yanıt oluşturma ile ekstrasellüler oluşum ve yıkımda görev almalarının yanı sıra hücre iskeleti değişiklikleri, aksonal büyüme ile ilişki oldukları, kök hücre görevlerinin bulunduğu ve dorsal-ventral ağın tekrar yapılanmasında görev aldıkları gösterilmiştir (80).

Yetişkin zebra balığı beyin dokusunda yapılan araştırmalarda nöronların sürekli olarak üretildiği farklı çoğalma noktaları saptanmıştır (81,82). Bu ve diğer

gözlemlerden yola çıkarak, beyindeki homeostatik nörogenezin geniş dağılımının, bu hayvanlardaki kapsamlı rejeneratif yeteneğin altında yatan bir bileşenin varlığından kaynaklandığı savunulmaktadır (83). Bununla birlikte, bu bağlantının daha fazla teste ihtiyacı vardır, çünkü doğal olarak meydana gelmediği türlerde fonksiyonel nöronal replasman için germinal olmayan bölgelerin devreye girme olasılığını için önemlidir (21).

Hayvan hücre zarında ve hücre dışı matrisinde bulunan mukopolisakkaritler veya glikozaminoglikanlar (GAG'ler), organogenez ve büyüme kontrolü, hücre adezyonu, sinyal iletimi, iltihaplanma ve patojenlerle etkileşimlerde önemli moleküllerdir (84,85). Nörodejeneratif hastalıklar hakkında yapılan araştırmalarda GAG'ların biyolojik etkileri ve seviye farklılıkları araştırılmış olup GAG'ların potansiyel terapötik ajanlar olarak kullanılabilirleri savunulmaktadır. Alsiyan mavisi hem sülfatlanmış hem de karboksillenmiş asit mukopolisakkaritleri, ayrıca sülfatlanmış ve karboksillenmiş sialomusinleri (glikoproteinler) boyamaktadır (86). Çalışmamızda ventrikül etrafına dizilmiş, apikal yüzeylerinde mukopolisakkarit keseleri olan, bazal yüzeylerinde ise daha küçük salgı ürünleri tespit edilen ependimoglia olduğu gözlenmiştir. Bu hücreleri detaylı olarak tanımlayabilmek için çalışmamızı daha ileri götürerek alsiyan mavisi boyaması ile histolojik incelemelerini ve elektron mikroskopu analizi ile de ultrastrüktürel incelemelerini gerçekleştirdik. Histolojik ve ultrastrüktürel incelememiz apikalinde kese bulunan bu ependimoglia hücrelerinin ışık ve elektron mikroskopik özelliklerinin goblet hücrelerine benzer yapıda olduğunu göstermektedir. Bu hücrelerin alsiyan mavisi boyama incelemesinde goblet hücrelerinde olduğu gibi mavi boyandıkları ve elektron mikroskopu ile ultrastrüktürel incelenmesinde de goblet hücrelerinin yapı özelliklerine sahip oldukları saptandı. Axolotl beyinde ventrikül duvarında bulunan bu goblet benzeri hücreler, herhangi bir skar oluşumu olmaksızın hücre proliferasyonu, farklılaşması ve rejenerasyonu için GAG üretiyor olabilir, beyin ventrikül gelişimine katkıda bulunuyor olabilir ve BOS akışında rol oynayabilirler. Hücre yapısı incelendiğinde bu yapısal organizasyon, hücre içerisinde bazalden apikale veya apikalden bazale doğru bir taşıma sürecinin olabileceğini düşündürmektedir.

Horstman (1954), hücresel uzantılarını geniş mesafelere yayan ependimoglia hücrelerini "tanisit" ("gerilmiş hücre") olarak isimlendirmiştir (87). Tanisitler,

omurgalıların merkezi sinir sisteminde bulunan en yaygın makroglia türüdür. Tanisitler median eminens ve sirkumventriküler organ bölgesinde sıkı bağlantılarla kan-beyin bariyerinde görev alırlar (87). Bu hücrelerin yetişkin hipotalamik nörojenezde yeni nöronların üretilmesinde görev aldığı bilinmektedir (88). Tanisitlerin, nestin gibi nöral kök hücre belirteçlerini, notch yolu bileşenlerini ve Rax gibi hipotalamik progenitöre özgü transkripsiyon faktörlerini ifade ettikleri saptanmıştır (20, 21). Tanisitler yetişkin memelilerde oldukça ince bir tabaka biçiminde beyin dokusunun belirli bölgelerinde bulunurlar. Bu bölgeler diensefalik üçüncü ventrikülün duvarı, mezensefalonun dorsal ve ventral duvarları, dördüncü ventrikülün tabanı ve omurilik merkezi kanalın ventral kısmıdır. Tanisit benzeri hücreler ayrıca yetişkin sıçanların lateral ventriküllerinde de tanımlanmışlardır. Axolotlun telensefalon bölgesinde gözlenen goblet benzeri hücrelerin, omurgalıların merkezi sinir sistemindeki tanisit hücrelerinin görevlerini üstlenen hücreler olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda gözlemlediğimiz farklı granül içeriğine sahip olan bu hücrelerin, tanisit hücreleriyle benzer görevlerinin olabileceğini düşünmekteyiz. Özellikleri karmaşık olan bu hücrelerin fonksiyonlarının ve ince yapılarının tanımlanabilmesi için ileri düzeyde çalışmalara gereksinim vardır.

Hücre çekirdeği, kromatin adı verilen fibriler yapıdan oluşur ve çekirdekteki kromatin ökromatin ve heterokromatin olarak iki farklı formda bulunmaktadır. DNA'nın aktif olmadığı, sıkıca paketlenmiş veya yoğunlaştırılmış fibrillerden oluşan kromatin, heterokromatin olarak adlandırılmıştır (90). Aktif transkripsiyonun meydana geldiği gevşek bir şekilde paketlenmiş fibriller ise ökromatin olarak tanımlanmaktadır. Aktif olarak protein sentezleyen hücrelerin çekirdeklerinde büyük miktarda ökromatin bulunurken, aktif olarak protein sentezlemeyen hücrelerin çekirdeklerinin büyük bölümü heterokromatiktir (91). Beyin gelişimi üç ana basamakta gerçekleşir; nörogenez, göç ve sinaptogenez (92). Heterokromatin, çekirdeğin hem mekanik özelliklerini hem de içinde gerçekleşen genetik süreçlerini etkileyerek hücre göç sürecini desteklemektedir. Hücre göçü, sağlık ve hastalık durumlarında kilit bir süreçtir. Hayvanlarda hücre göçü, çeşitli doku ve sistemlerin normal işlevinde olduğu kadar embriyogenezde de temel bir süreçtir. Yoğunlaştırılmış kromatin ve daha sert bir çekirdek, hareket stresine karşı nükleer dayanıklılığı artırabilir ve göç işlemi sırasında DNA hasarını önemli derecede azaltabilir. Ayrıca,

göç eden hücrelerde heterokromatinin yeniden organizasyonu, diğer birçok gereksiz transkripsiyonel değişikliğin inhibisyonu ile birlikte migrasyona özgü transkripsiyonel planın indüklenmesi için de önemlidir. Dolayısıyla hücre göçü araştırmalarında heterokromatik çekirdek incelemeleri önemli bir yer tutmaktadır. Son çalışmalarda, çeşitli hücre tiplerinde hücre göçünün uyarılması sonucunda hücre çekirdeğinde heterokromatin seviyelerinde önemli bir artış olduğu gösterilmiştir (93,94). Neotenik ve metamorfik axolotl nöronlarına ait elektron mikroskopik incelemelerimizde neotenik nöronların çekirdeklerinde ökromatik alanların, metamorfik nöronlarda ise heterokromatik alanların daha fazla olduğu gözlenmiştir. Metamorfik axolotl telensefalon nöronlarının çekirdeklerinde büyük ve çok sayıda yoğunlaşmış heterokromatik alanların olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak, metamorfoz sonrasında nöron DNA'sının aktif olmadığı, hücre metabolizmasının pasif bir duruma geçtiği söylenebilir. Ayrıca axolotlun neotenik evreden metamorfik evreye geçerken çekirdeklerdeki kromatin organizasyonunun ökromatikten heterokromatiğe dönüşerek hücresel göç sürecinde kilit bir rolü olduğunu düşünmekteyiz.

Beyin yapılarındaki katekolaminlerin histokimyasal tayinleri ile sinir hücrelerinin uzantıları analiz edilerek 17 farklı nöron grubu tanımlanmıştır (95). Beyin katekolaminerjik nöronları üç tipe ayrılır: dopaminerjik, noradrenerjik ve adrenerjik (96). Katekolamin sentezleyen nöronların üç tipinden ikisi (noradrenerjik ve dopaminerjik) nöromelanin içermektedir (95). Neuromelanin, substantia nigra ve locus coeruleus'ta bulunan katekolamin metabolizmasının ürünü olan ve dopaminerjik ve noradrenerjik nöronların belirteci olarak kullanılan koyu renkli bir pigmenttir (97). Temel morfolojik özelliklerinden biri sitoplazmalarında nöromelanin varlığı olan katekolaminerjik beyin nöronları birçok memeli türünde bulunur (95). Yüksek nöromelanin içeriğine sahip hücreler, nörodejeneratif süreçte daha erken ölürlür. Nöromelaninin bazı laboratuvar hayvan türlerinin katekolaminerjik nöronlarında bulunmaması nedeniyle nöromelaninin hücredeki rolünün karşılaştırmalı nörobiyoloji için önemli olduğu düşünülmektedir. At, koyun, köpek, zürafa ve kurbağa nöronlarında nöromelanin bulunurken, laboratuvarında sık tercih edilen fare ve sıçanlarda nöromelanin pigmenti bulunmamaktadır. İlginç olan bir durum ise nöromelanin kurbağaların hem erişkin evresinde hem de iribaş evresinde gözlenmektedir (95,98). İnsanda ise dopaminerjik nöronlarda nöromelanin birikimi

yaşa bağı olarak farklı düzeylerde gözlenmektedir. İnsanda, doğumdan iki sene sonra nöromelanin varlığı gözlenmeye başlanır, yirmili yaşlarda sitoplazmadaki nöromelanin oranı %47 seviyelerine ulaşır, yaşla birlikte bu oran artar ve ellili yaşlarda maksimum seviyeye ulaşır (95,99). Semenderlerdeki katekolaminerjik sistem incelenmiş ve bu çalışmalarda diensefalik ve mezensefalik dopaminerjik nöron popülasyonunun fonksiyonel olarak memeli ventral tegmentum ve substantia nigra ile homolog olduğunu ileri sürülmüştür (47). Axolotl omuriliğinde katekolaminerjik nöronların varlığı gösterilmiştir. Merkezi kanal iç yüzeyini döşeyen ependima tabakasında bulunan hücreler olup, kanalın lümeniyle temas eden apikal uzantıları ve hücre gövdesinden ventral medyan septuma uzanan aksonal uzantıları bulunmaktadır (100). Başka bir axolotl beyin çalışmasında katekolaminerjik nöronlardan olan dopaminerjik nöronların varlığı gösterilmiştir (28,47). Çalışmamızda, immünohistokimyasal analizleri yaparken fark ettiğimiz kromojen pozitif granülleri içeren hücre gruplarının elektron mikroskopik analizlerinde, bu hücrelerin sitoplazmasındaki granüllerin nöromelanine benzer yapıda olduğunu gözlemledik. Axolotl beyninin telensefalon ve diensefalon bölgelerinde hem parafin kesitlerde hem rezin kesitlerde nöromelanin olduğunu düşündüğümüz pigmentler içeren hücrelerin varlığı tespit edildi. Hatta herhangi bir boyama işlemi yapılmayan parafin kesitlerde bile bu granüllerin koyu kahve renkli oldukları gözlenmekteydi. Axolotl beyninde pigment içeren bu hücrelerin nöromelanin içeren katekolaminerjik nöronlar olabileceklerini düşünmekteyiz. Çalışmamızda nöromelanin içerdiğini tespit ettiğimiz ve katekolaminerjik nöron olduğunu düşündüğümüz bu hücrelerin hangi alt gruba ait olduklarını ve neotenik-metamorfik beyin dokusundaki dağılımlarının hangi düzeyde olduğunu belirlemek için daha ileri araştırmalar yapılmasının önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Doktora tezi çalışmamızda metamorfoza indüklenmiş axolotl beyninde; gelişen, olgunlaşan ve farklılaşan nöronların yerleşim yerleri ve beyin dokusunun yapısında meydana gelen morfolojik değişimleri immünohistokimyasal ve stereolojik teknikler kullanarak analiz ettik. Neotenik axolotl metamorfoza indüklendiğinde, telensefalon bölgesinde hücre yapısı ve organizasyonlarında önemli değişikliklerin gerçekleştiği histolojik, stereolojik ve ultrastrüktürel incelemelerimiz ile açığa çıkarılmıştır.

## 8. SONUÇ

Neotenic ve metamorfik axolotl beyinlerinin telensefalon bölgelerinde, toplam hücre sayısı bakımından bir farklılık gözlenmedi. Metamorfozla birlikte axolotl beyinin telensefalon bölgesinde proliferasyon indeksi ve olgun nöron sayısının artması, beyin bu bölgesinde yeni bir hücreyel organizasyonun gerçekleştiğini düşündürmektedir. Ependimoglia hücrelerin ışık ve elektron mikroskop bulguları, ventrikül duvarında bulunan bu hücrelerin histolojik olarak farklı yapıda alt gruplardan oluştuğunu göstermektedir. Bir grup ependimoglia hücrelerinin apikal kısımlarında mukopolisakkarit içerikli salgı granüllerinin varlığı tespit edilmiştir. Bu hücrelerin, tanisit benzeri hücreler olabileceği ya da proliferasyon, farklılaşma ve rejenerasyonu için ihtiyaç duyulan mukopolisakkaritleri üretiyor olabileceği düşünülmektedir. Neotenic axolotl beyinin telensefalon ve diensefalon bölgelerindeki ventrikül duvarlarında bulunan ependimoglia hücrelerin apikal yüzey özelleşmelerinin buldukları bölgeye ve ait oldukları ependimoglia hücrelerin alt gruplarına göre farklılık gösterdiği gözlemlendi. Laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan fare ve sıçan gibi deney hayvanlarında bulunmayan ama insan beyinde bulunan nöromelanin pigmentinin varlığı axolotl telensefalon ve diensefalon bölgelerinde tespit edildi. Katekolaminerjik nöron olduğu düşünülen bu hücrelerin, dopaminerjik, noradrenerjik veya adrenerjik mi olduğunun tespiti için kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 9. KAYNAKLAR

1. Yun MH. Salamander Insights Into Ageing and Rejuvenation. *Front Cell Dev Biol.* 9:1441, 2021.
2. Amamoto R, Huerta GSL, Takahashi E, Dai G, Grant AK, Fu Z, vd. Is a corresponding author Adult axolotls can regenerate original neuronal diversity in response to brain injury. *Elife.* 5:1-22, 2016.
3. Lazcano I, Cisneros-Mejorado A, Concha L, Ortiz-Retana JJ, Garza-Villarreal EA, Orozco A. MRI- and histologically derived neuroanatomical atlas of the *Ambystoma mexicanum* (axolotl). *Sci Rep.* 11(1):9850, 2021.
4. Maden M, Manwell LA, Ormerod BK. Proliferation zones in the axolotl brain and regeneration of the telencephalon. *Neural Dev.* 8(1), 2013.
5. Sun AX, Londono R, Hudnall ML, Tuan RS, Lozito TP. Differences in neural stem cell identity and differentiation capacity drive divergent regenerative outcomes in lizards and salamanders. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 115(35), 2018.
6. Tanaka HV, Ng NCY, Yang Yu Z, Casco-Robles MM, Maruo F, Tsonis PA vd. A developmentally regulated switch from stem cells to dedifferentiation for limb muscle regeneration in newts. *Nat Commun.* 7:11069, 2016.
7. Suetsugu-Maki R, Maki N, Nakamura K, Sumanas S, Zhu J, Del Rio-Tsonis K vd. Lens regeneration in axolotl: new evidence of developmental plasticity. *BMC Biol.* 10:103, 2012.
8. Joven A, Simon A. Homeostatic and regenerative neurogenesis in salamanders. *Prog Neurobiol.* 170:81-98, 2018.
9. Saha B, Peron S, Murray K, Jaber M, Gaillard A. Cortical lesion stimulates adult subventricular zone neural progenitor cell proliferation and migration to the site of injury. *Stem Cell Res.* 11(3):965-77, 2013.
10. Sun T, Hevner RF. Growth and folding of the mammalian cerebral cortex: from molecules to malformations. *Nat Rev Neurosci.* 15(4):217-232, 2014.
11. Chen VS, Morrison JP, Southwell MF, Foley JF, Bolon B, Elmore SA. Histology Atlas of the Developing Prenatal and Postnatal Mouse Central Nervous System, with Emphasis on Prenatal Days E7.5 to E18.5. *Toxicol Pathol.* 45(6):705-744, 2017.

12. Doetsch F. The glial identity of neural stem cells. *Nat Neurosci.* 6(11):1127-34, 2003.
13. Götz M, Neuron YB. Radial glial cells: Defined and major intermediates between embryonic stem cells and CNS neurons. *Neuron.* 46(3):369-72, 2005.
14. Toprak F, Fulya Toprak S, Tokdemir SS. Yetişkin Nörogenez ve Nörodejeneratif Hastalıklarda Büyüme Faktörlerinin Rolü *Experimed.* 11(1):57-66, 2021.
15. Campbell K, Götz M. Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends Neurosci.* 25(5):235-238, 2002.
16. Rakic P. The radial edifice of cortical architecture: from neuronal silhouettes to genetic engineering. *Brain Res Rev.* 55(2):204-219, 2007.
17. Lange C, Rost F, MacHate A, Reinhardt S, Lesche M, Weber A vd. Single cell sequencing of radial glia progeny reveals the diversity of newborn neurons in the adult zebrafish brain. *Development.* 147(1), 2020.
18. Alvarez-Buylla A, Lim DA. For the Long Run: Maintaining Germinal Niches in the Adult Brain. *Neuron.* 41(5):683-686, 2004.
19. Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O. Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke.* 38(11):3032-3039, 2007.
20. Zhao M, Momma S, Delfani K, Carlen M, Cassidy RM, Johansson CB vd. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(13):7925-7930, 2003.
21. Berg DA, Kirkham M, Beljajeva A, Knapp D, Habermann B, Ryge J vd. Efficient regeneration by activation of neurogenesis in homeostatically quiescent regions of the adult vertebrate brain. *Development.* 137(24):4127-34, 2010.
22. Zupanc G.K.H. Towards brain repair: Insights from teleost fish. *Semin Cell Dev Biol.* 20(6):683-90, 2022.
23. Kaslin J, Ganz J, Geffarth M, Grandel H, Hans S, Brand M. Stem cells in the adult zebrafish cerebellum: initiation and maintenance of a novel stem cell niche. *J Neurosci.* 29(19):6142-53, 2009.

24. Becker CG, Becker T, Roth G. Distribution of NCAM-180 and polysialic acid in the developing tectum mesencephali of the frog *Discoglossus pictus* and the salamander *Pleurodeles waltl*. *Cell Tissue Res.* 272(2):289-301, 1993.
25. Roth G, Nishikawa KC, Naujoks-Manteuffel C, Schmidt A, Wake DB. Paedomorphosis and simplification in the nervous system of salamanders. *Brain Behav Evol.* 42(3):137-170, 1993.
26. Gianola S, Clairambault P, Franzoni MF. Relationships between neuronal cell adhesion molecule and LHRH neurons in the urodele brain: A developmental immunohistochemical study. *Eur J Histochem.* 45(3):229-238, 2001.
27. Lust K, Tanaka EM. A Comparative Perspective on Brain Regeneration in Amphibians and Teleost Fish. *Dev Neurobiol.* 79(5):424-436, 2019.
28. Berg DA, Kirkham M, Wang H, Frisé J, Simon A. Dopamine Controls Neurogenesis in the Adult Salamander Midbrain in Homeostasis and during Regeneration of Dopamine Neurons. *Cell Stem Cell.* 8(4):426-433, 2011.
29. Kirkham M, Hameed LS, Berg DA, Wang H, Simon A. Progenitor cell dynamics in the newt telencephalon during homeostasis and neuronal regeneration. *Stem Cell Reports.* 2(4):507-519, 2014.
30. Lazzari M, Franceschini V, Ciani F. Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin in Radial Glia of *Ambystoma mexicanum* and *Triturus carnifex*: An Immunocytochemical Study. *J Hirnforsch.* 38(2):187-194, 1997.
31. Lazzari M, Franceschini V. Glial Fibrillary Acidic Protein and Vimentin Immunoreactivity of Astroglial Cells in the Central Nervous System of the African Lungfish, *Protopterus annectens* (Dipnoi: Lepidosirenidae ). *J Morphol.* 749:741-749, 2004.
32. Elmquist JK, Swanson JJ, Sakaguchi DS, Ross LR, Jacobson CD. Developmental distribution of GFAP and vimentin in the Brazilian opossum brain. *J Comp Neurol.* 344(2):283-296, 1994.
33. Rakic P. Radial Glial Cells: Brain Functions. Sayfa no: 15-21. İçinde: Squire LR, editör. *Encyclopedia of Neuroscience*. Academic Press, 2009.
34. Dahl D, Bignami A. Intermediate Filaments in Nervous Tissue. Sayfa no. 75-96. İçinde: Shay JW, editör. *Cell and Muscle Motility*. Springer US; 1985.

35. Hall AK, Miller RH. Stem Cells in the Nervous System. Sayfa no. 558-568. İçinde: Brady ST, Siegel GJ, editör. Basic Neurochemistry. Academic Press, 2012.
36. Grupp L, Wolburg H, Mack AF. Astroglial structures in the zebrafish brain. *J Comp Neurol.* 518(21):4277-4287, 2010.
37. Tazaki A, Tanaka EM, Fei J-FF. Salamander spinal cord regeneration: The ultimate positive control in vertebrate spinal cord regeneration. *Dev Biol.* 432(1):63-71, 2017.
38. Scheib J, Byrd-Jacobs C. Zebrafish Astroglial Morphology in the Olfactory Bulb Is Altered With Repetitive Peripheral Damage. *Front Neuroanat.* 14:4, 2020.
39. Becker CG, Becker T. Neuronal Regeneration from Ependymo-Radial Glial Cells: Cook, Little Pot, Cook! *Dev Cell.* 32:516-527, 2015.
40. Lindvall O, Kokaia Z, Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders—how to make it work. *Nat Med.* 10(S7):42-50, 2004.
41. Vieira WA, Wells KM, McCusker CD. Advancements to the Axolotl Model for Regeneration and Aging. *Gerontology.* 66(3):212-222, 2020.
42. Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Wenzel I, Brand M. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebrafish brain: origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev Biol.* 295(1):263-277, 2006.
43. Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 17(13):5046-5061, 1997.
44. Faiz M, Sachewsky N, Gascón S, Bang KWA, Morshead CM, Nagy A. Adult Neural Stem Cells from the Subventricular Zone Give Rise to Reactive Astrocytes in the Cortex after Stroke. *Cell Stem Cell.* 17(5):624-634, 2015.
45. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.* 8(9):963-970, 2002.

46. Lust K, Maynard A, Gomes T, Jonas SF, Camp JG, Tanaka EM vd. Single-cell analyses of axolotl forebrain organization, neurogenesis, and regeneration. *Biorxiv*. 2022.
47. Parish CL, Beljajeva A, Arenas E, Simon A. Midbrain dopaminergic neurogenesis and behavioural recovery in a salamander lesion-induced regeneration model. *Development*. 134(15):2881-2887, 2007.
48. Kirsche K, Kirsche W, Richter W. Effect of experimentally induced metamorphosis on regenerative processes in the forebrain of ambystoma mexicanum. *Z Mikrosk Anat Forsch*. 74(1):69-79,1965.
49. Page RB, Boley MA, Smith JJ, Putta S, Voss SR. Microarray analysis of a salamander hopeful monster reveals transcriptional signatures of paedomorphic brain development. *BMC Evol Biol*. 10:199, 2010.
50. Coots PS, Seifert AW. Thyroxine-induced metamorphosis in the Axolotl (*Ambystoma mexicanum*). *Methods Mol Biol*. 1290:141-5, 2015.
51. Demircan T, Ovezmyradov G, Yildirim B, Keskin İ, İlhan AE, Fesçioğlu EC vd. Experimentally induced metamorphosis in highly regenerative axolotl (*ambystoma mexicanum*) under constant diet restructures microbiota. *Sci Rep*. 8(1):10974, 2018.
52. Page RB, Voss SR. Induction of metamorphosis in axolotls (*Ambystoma mexicanum*). *Cold Spring Harb Protoc*. 4(8), 2009.
53. Borit A, Mcintosh GC. Myelin Basic Protein and Glial Fibrillary Acidic Protein in Human Fetal Brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 7(4):279-287, 1981.
54. Pinheiro T, Mayor I, Edwards S, Joven A, Kantzer CG, Kirkham M vd. CUBIC-f: An optimized clearing method for cell tracing and evaluation of neurite density in the salamander brain. *J Neurosci Methods*. 348:109002, 2021.
55. Felix L, Stephan J, Rose CR. Astrocytes of the early postnatal brain. *Eur J Neurosci*. 54(5):5649-5672, 2021.
56. Molofsky AV, Deneen B. Astrocyte development: A Guide for the Perplexed. *Glia*. 63(8):1320-1329, 2015.
57. Sloan SA, Barres BA. Mechanisms of astrocyte development and their contributions to neurodevelopmental disorders. *Curr Opin Neurobiol*. 27:75-81, 2014.

58. Müller C, Bauer NM, Schäfer I, White R. Making myelin basic protein -from mRNA transport to localized translation. *Front Cell Neurosci.* 7:169, 2013.
59. Tamai Y, Kojima H, Saito S, Uchida K, Kitajima R, Komatsu H vd. Metamorphic Changes in Glycolipids and Myelin Proteins and 2',3'-Cyclic Nucleotide 3'-Phosphohydrolase in Bullfrog and Axolotl Brains. *J Neurochem.* 60(5):1854-1863, 1993.
60. Barbarese E, Barry C, Chou CH, Nakos GA, Hyde-DeRuyscher R, Scheld K vd. Expression and localization of myelin basic protein in oligodendrocytes and transfected fibroblasts. *J Neurochem.* 51(6):1737-1745, 1988.
61. Akmal F, Mashor MY. An overview of recent counting methods for Ki67 IHC staining. *J of Biomed & Clin Sci Dec.* 3(2):10-17, 2018.
62. Eriksson Y, Boström M, Sandelius Å, Blennow K, Zetterberg H, Kuhn G, Kalm M. The anti-asthmatic drug, montelukast, modifies the neurogenic potential in the young healthy and irradiated brain *Cell Death Dis.* 9:775, 2018.
63. Zimatkin SM, Karnyushko OA. Expression of Doublecortin and NeuN in Developing Neurons in the Rat Cerebellum. *Neurosci Behav Physiol.* 47(2):122-126, 2017.
64. Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J vd. Doublecortin functions at the extremities of growing neuronal processes. *Cereb Cortex.* 13(6):620-626, 2003.
65. Gusel'nikova V V, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae.* 7(2):42-47, 2015.
66. Demircan T, Sibai M, Avşaroğlu ME, Altuntaş E, Ovezmyradov G. The first report on circulating microRNAs at Pre- and Post-metamorphic stages of axolotls. *Gene.* 768:145258, 2021.
67. Hua Y, Laserstein P, Helmstaedter M. Large-volume en-bloc staining for electron microscopy-based connectomics. *Nat Commun.* 6:7923, 2015.
68. Alkan I, Altunkaynak BZ, Kivrak EG, Kaplan AA, Arslan G. Is vagal stimulation or inhibition benefit on the regulation of the stomach brain axis in obesity? *Nutr Neurosci.* 25(4):758-770, 2022.
69. Bancroft JD, Gamble Marilyn. *Theory and Practice of Histological Techniques.* Churchill Livingstone/Elsevier; 2008.

70. Yurt KK, Kivrak EG, Altun G, Mohamed H, Ali F, Gasmalla HE vd. A brief update on physical and optical disector applications and sectioning-staining methods in neuroscience. *J Chem Neuroanat.* 93:16-29, 2018.
71. Sobecki M, Mrouj K, Camasses A, Parisis N, Nicolas E, Llères D vd. The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife.* 5:e13722, 2016.
72. Sun X, Kaufman PD. Ki-67: more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 127(2):175-186, 2018.
73. Castillo-Ruiz A, Hite TA, Yakout DW, Rosen TJ, Forger NG. Does Birth Trigger Cell Death in the Developing Brain? *eNeuro.* 7(1), 2020.
74. Ahern TH, Krug S, Carr A V, Murray EK, Fitzpatrick E, Bengston L vd. Cell death atlas of the postnatal mouse ventral forebrain and hypothalamus: effects of age and sex. *J Comp Neurol.* 521(11):2551-2569, 2013.
75. Kress E, Samarut J, Plateroti M. Thyroid hormones and the control of cell proliferation or cell differentiation: paradox or duality? *Mol Cell Endocrinol.* 313(1-2):36-49, 2009.
76. Dirian L, Galant S, Coolen M, Chen W, Bedu S, Houart C vd. Spatial Regionalization and Heterochrony in the Formation of Adult Pallial Neural Stem Cells. *Dev Cel.* 30:123-136, 2014.
77. Reimer MM, Sörensen I, Kuscha V, Frank RE, Liu C, Becker CG vd. Motor neuron regeneration in adult zebrafish. *J Neurosci.* 28(34):8510-8516, 2008.
78. Fei JF, Schuez M, Tazaki A, vd. CRISPR-mediated genomic deletion of Sox2 in the axolotl shows a requirement in spinal cord neural stem cell amplification during tail regeneration. *Stem Cell Reports.* 3(3):444-459, 2014.
79. Reichenbach A, Wolburg H. Astrocytes and Ependymal Glia. *Neuroglia.* 3rd ed. Oxford University Press New York; 2012:35-49.
80. Enos N, Takenaka H, Scott S, Salfity HVN, Kirk M, Egar MW vd. Meningeal Foam Cells and Ependymal Cells in Axolotl Spinal Cord Regeneration. *Front Immunol.* 10:2558, 2019.
81. Adolf B, Chapouton P, Lam CS, Topp S, Tannhäuser B, Strähle U vd. Conserved and acquired features of adult neurogenesis in the zebrafish telencephalon. *Dev Biol.* 295(1):278-293, 2006.

82. Chapouton P, Jagasia R, Bally-Cuif L. Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. *BioEssays*. 29(8):745-757, 2007.
83. Kaslin J, Ganz J, Brand M. Proliferation, neurogenesis and regeneration in the non-mammalian vertebrate brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 363(1489):101-122, 2008.
84. Rowlands D, Sugahara K, Kwok JCF. Glycosaminoglycans and glycomimetics in the central nervous system. *Molecules*. 20(3):3527-3548, 2015.
85. Zhang F, Zhang Z, Thistle R, McKeen L, Hosoyama S, Toida T vd. Structural characterization of glycosaminoglycans from zebrafish in different ages. *Glycoconj J*. 26(2):211-218, 2009.
86. Demirbağ E, Çınar K, Tabur MA, Aşti RN. Histochemical Structure of Stomach (Proventriculus and Gizzard) in Some Bird Species. *SDU J Nat Appl Sci*. 19(2), 115-122, 2015.
87. Reichenbach A, Bringmann A. Comparative Anatomy of Glial Cells in Mammals. *Evolutionary Neuroscience*. 397-439, 2020.
88. Lee DA, Bedont JL, Pak T, Wang H, Song J, Miranda-Angulo A vd. Tanycytes of the hypothalamic median eminence form a diet-responsive neurogenic niche. *Nat Neurosci*. 15(5):700-702, 2012.
89. Shimogori T, Lee DA, Miranda-Angulo A, Yang Y, Wang H, Jiang L vd. A genomic atlas of mouse hypothalamic development. *Nat Neurosci*. 13(6):767, 2010.
90. Carlberg C, Molnár F. Chromatin. Sayfa no:15-28. İçinde: Carlberg C, Molnár F, editör. *Human Epigenetics: How Science Works*. Springer, 2019.
91. Cuschieri A. The Nucleus: DNA, Chromatin And Chromosomes. <http://staff.um.edu.mt/acus1/03Nucleus.pdf>
92. Aoki C, Erisir A. Experience-Dependent Synaptic Plasticity in the Developing Cerebral Cortex. sayfa no.397-445. İçinde: Pickel V and Segal M, editör. *The Synapse: Structure and Function*. Academic Press, 2014.
93. Maizels Y, Elbaz A, Hernandez-Vicens R, Sandrusy O, Rosenberg A, Gerlitz G. Increased chromatin plasticity supports enhanced metastatic potential of mouse melanoma cells. *Exp Cell Res*. 357(2):282-290, 2017.

94. Nair NU, Das A, Rogkoti VM, Fokkelman M, Marcotte R , G de Jong C vd. Migration rather than proliferation transcriptomic signatures are strongly associated with breast cancer patient survival. *Sci Rep.* 9(1), 2019.
95. Sukhorukova EG, Alekseeva OS, Korzhevsky DE. Catecholaminergic neurons of mammalian brain and neuromelanin. *J Evol Biochem Physiol.* 50(5):383-391, 2014.
96. Carruth LL, Shahbazi M. Estrogen Actions in the Brain. Sayfa no.11-28. İçinde:Duncan AK, editör. Estrogen Effects on Traumatic Brain Injury: Mechanisms of Neuroprotection and Repair. Academic Press, 2015.
97. Terry A, de Natale ER, Politis M. Neuroimaging in essential tremor. Sayfa no. 491-518. İçinde: Politis M, editör. Neuroimaging in Parkinson's Disease and Related Disorders. Academic Press, 2023.
98. Zucca FA, Giaveri G, Gallorini M, Albertini A, Toscani M, Pezzoli G vd. The neuromelanin of human substantia nigra: physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Res.* 17(6):610-617, 2004.
99. Zecca L, Fariello R, Riederer P, Sulzer D, Gatti A, Tampellini D. The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 510(3):216-220, 2002.
100. Sims TJ. Identification of a second type of catecholaminergic neuron in the spinal cord of the axolotl salamander. *Exp Neurol.* 93(2):428-433, 1986.

## 10.ETİK KURUL ONAYI



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

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
17/09/2020	53		Arife Ahsen KAPLAN

“Neoteniik ve Metamorfik Axolotl (Ambystoma mexicanum) Beyninin Stereolojik ve İmmünohistokimyasal Yöntemler Kullanılarak Araştırılması” başlıklı bilimsel araştırma etik kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “Oybirliğı” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 5 yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Prof. Dr. Hanefi ÖZBEK	
Üye	Doç. Dr. Sultan Sibel ERDEM	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Burak ÇAĞLAYAN	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Çağlar BEKER	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Taha KELEŞTEMUR	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Neriman İpek KIRMIZI	
Üye	Uzm.Vet. Hek. Ekrem Musa ÖZDEMİR	
Üye	Cem GÜNEŞ	
Üye	Burak Sefa DERİBAŞ	