

***Triturus karelinii* (URODELA: SALAMANDRIDAE)
TÜRÜNDE SİYATİK SİNİR REJENERASYONUNUN
DAVRANIŞSAL, ELEKTROFİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

**INVESTIGATION OF THE SCIATIC NERVE
REGENERATION IN *Triturus karelinii* (URODELA:
SALAMANDRIDAE) BY BEHAVIORAL,
ELECTROPHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS**

SEÇİL KARAHİSAR TURAN

PROF. DR. MEHMET ALİ ONUR

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. FATMA DUYGU ÖZEL DEMİRALP

İkinci Tez Danışmanı

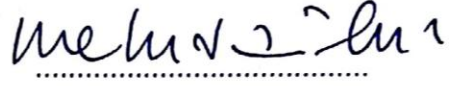
Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim- Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

SEÇİL KARAHİSAR TURAN'ın hazırladığı "*Triturus karelinii* (Urodela: Salamandridae) Türünde Siyatik Sinir Rejenerasyonunun Davranışsal, Elektrofizyolojik ve Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Dürdane KOLANKAYA
Başkan



Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR
Danışman



Prof. Dr. Nurhayat BARLAS
Üye



Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN
Üye



Doç. Dr. Murat KASAP
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Canım babama...

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

02/06/2015

SEÇİL KARAHİSAR TURAN

ÖZET

***Triturus karelinii* (URODELA: SALAMANDRIDAE) TÜRÜNDE SİYATİK SİNİR REJENERASYONUNUN DAVRANIŞSAL, ELEKTROFİZYOLOJİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Seçil KARAHİSAR TURAN

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

İkinci Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fatma Duygu ÖZEL DEMİRALP

Haziran 2015, 162 sayfa

Periferal sinir yaralanmaları sık karşılaşılan bir olgudur. Yaralanma şekli, hasarın konumu ve tedaviye başlama zamanına bağlı olarak tedavi edilebilirliği değişmekle birlikte, tedavi oranları genellikle düşüktür. Bir çok memeli dokusunda embriyonik dönemle sınırlı kalan bir özellik olan rejenerasyon yeteneği, urodele amfibilerde ergin dönemde de devam etmektedir. Bu tez çalışması kapsamında, omurgalı hayvanlar arasında rejenerasyon yeteneği en yüksek grubu oluşturan ve amfibi sınıfına ait bir takım olan semenderlerden *Triturus karelinii* türünde siyatik sinir hasarı sonrası iyileşme sürecinin, yürüme testleri, elektrofizyolojik ölçümler ve proteomik stratejilerle aydınlatılması amaçlanmıştır.

Siyatik sinir dokularında kesik hasarı oluşturulan semenderlerin, iyileşme dönemleri operasyon sonrası 0-3. ve 24. saat, 7., 14., 21. ve 35. günler olmak üzere altı zaman aralığında incelenmiştir.

Çalışmamızda yürüme testleri ve birleşik kas aksiyon potansiyeli verileri ile iyileşme süreci gözlenmiştir. Bottom-up proteomik stratejilerin kullanıldığı çalışmada, periferal sinir rejenerasyonu sürecindeki moleküler mekanizmayı en iyi yansıtan grubun kesik hasarı sonrası distal ve proksimal sinir uçların ayrı incelenmesi ile elde edildiği belirlenmiştir. İki boyutlu jel elektroforezi ile elde edilen protein profillerinden zaman aralıkları ve gruplara göre ifadesi artan azalan protein kümeleri tespit edilmiştir. Her bir zaman aralığına ait distal sinir ucu örnekleri kendi aralarında test edildiğinde 28 protein kümesi; proksimal sinir ucu örnekleri kendi

aralarında test edildiğinde ise 38 protein kümesinin ifadesindeki değişim $p < 0.05$ güven aralığında anlamlı bulunmuştur. Fosfoproteomik ve glikoproteomik incelemeler ile sinir rejenerasyonu sürecinde etkili olabilecek translasyon sonrası modifikasyonlar gösterilmiştir.

MALDI-TOF kütle spektrometresi ile sinir rejenerasyonu sürecine katıldığı tespit edilen toplam otuz dört adet protein, peptit kütle parmak izi yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır. Bu proteinler, hücre iskeleti proteinleri, enzim aktivitesi olan proteinler, ubikütinasyon mekanizması ile ilgili proteinler, sinyal molekülleri ve reseptörleri, taşıyıcı proteinler, hücre adezyon molekülleri ve düzenleyici proteinler şeklinde sınıflandırılmıştır. Tanımlanan proteinlerin doku ve organ morfogenezini, hücre ve doku gelişimi, büyüme, hücre farklılaşması, nöron homeostasisi, mikrotübüle bağlı hareketler, sinyal yollarının pozitif düzenlenmesi gibi fonksiyonlara sahip olduğu bulunmuştur. Taşıyıcı proteinler, büyüme faktörleri, sinyal molekülleri ve düzenleyici moleküllerin distal sinir ucunda; nörit uzaması ile ilgili moleküllerin, özellikle hücre iskeleti proteinlerinin ise proksimal sinir ucunda daha yüksek ifade edildiği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Siyatik sinir, *Triturus karelinii*, rejenerasyon, yürüme testi, elektrofizyoloji, 2D-PAGE, MALDI-TOF

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE SCIATIC NERVE REGENERATION IN *Triturus karelinii* (URODELA: SALAMANDRIDAE) BY BEHAVIORAL, ELECTROPHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR METHODS

Seçil KARAHİSAR TURAN

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR

Co-supervisor: Assoc. Prof. Dr. Fatma Duygu ÖZEL DEMİRALP

June 2015, 162 pages

Peripheral nerve injuries are frequently observed cases. The curability rate can change due to injury type, location of the damage and time to start treatment, although treatable cases are generally low. The regenerative capacity is limited to the embryonic period in many mammalian tissues, but in urodele amphibians it continues during adulthood. Within the scope of this thesis, it is aimed to clarify the recovery period of *Triturus karelinii* species after sciatic nerve damage. As a result of the study, this species which belongs to class Amphibia, order Urodela, has the highest regenerative capacity through the vertebrates, which is assessed by walking track analysis, electrophysiological recordings and proteomic strategies.

The sciatic nerves of the newts were transected and the recovery period is examined in six time points which are 0-3rd and 24th hours, 7th, 14th, 21st and 35th days postoperatively.

In this study, regeneration process is observed by walking track analysis and compound muscle action potential data. In the study by which bottom-up proteomic strategies are used in order to assess the underlying molecular mechanism of regeneration period, the transection damage group where distal and proximal nerve endings are analysed separately is identified as the most effective group. From the protein profiles of two dimensional gel electrophoresis, protein spots which have different expression levels between time points and groups are

determined. When distal nerve stumps from different time intervals were statistically tested, 28 protein spots were found to be significant and 38 for proximal nerve stumps ($p < 0.05$). By phosphoproteomic and glycoproteomic analysis, posttranslational modifications which can be effective in nerve regeneration period is indicated.

Totally 34 proteins which relate to nerve regeneration process are identified with peptide mass fingerprinting analysis by using MALDI-TOF mass spectrometry. These proteins were classified as cytoskeletal proteins, enzymes, proteins involved in ubiquitination, signal molecules and receptors, transport proteins, cell adhesion molecules and regulatory proteins. These proteins function as tissue and organ morphogenesis, cell and tissue growth, development, cell differentiation, neural homeostasis, microtubule driven movements, positive regulation of signal pathways.

Transport proteins, growth factors, signal and regulatory molecules are highly expressed in distal nerve stumps, whereas proteins related with neurite elongation process, and especially cytoskeletal proteins are highly expressed in proximal nerve stumps.

Keywords: Sciatic nerve, *Triturus karelinii*, regeneration, walking track analysis, electrophysiology, 2D-PAGE, MALDI-TOF

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bana yol gösteren, çalışmaya teşvik eden, hedef ve isteklerimi gerçekleştirilmeme destek olan, tez çalışmamın ilk dört yılında danışmanlığımı yürüten ve emekli olduktan sonra da katkılarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Ali DEMİRİSOY'a,

Tez çalışmamın konusunun belirlenmesi aşamasından itibaren fikirleri ve desteğiyle yanımda olan, her türlü laboratuvar imkanından faydalanmamı sağlayan ve ilerleyen süreçte danışmanlığımı üstlenen sayın hocam Prof. Dr. Mehmet Ali ONUR'a,

Bilgisi, çalışkanlığı, motivasyonu ve enerjisiyle örnek aldığım, tez çalışmamın en umutsuz aşamalarında her zaman ilgisini ve desteğini hissettiğim, çalışmalarım ve hayatıma büyük katkıları olan çok sevgili hocam ve ikinci danışmanım Doç. Dr. Fatma Duygu ÖZEL DEMİRALP'e

Tezin düzenlenmesi aşamasında çok değerli önerileriyle beni yönlendiren ve önemli katkılar sağlayan sevgili hocam Doç. Dr. Özer Aylin GÜRİPİNAR'a,

Tez çalışmalarımın sürdürülebilmesinde 113Z124 numaralı proje ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK- KBAG'a,

Arazi çalışmalarım destek olan Ayşegül Elif- Tarkan YORULMAZ ve Hatice-Sabri DEMİRCİ çiftlerine ve Ercan YALÇINKAYA'ya,

Davranış ve elektrofizyolojik ölçümlerin yapıldığı Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalı, Fizyoloji katındaki sevgili asistan arkadaşlarıma,

Tezin moleküler çalışmalarının tamamlandığı Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne ve beni öğrencileri gibi eğiten Proteobilim Grubu'ndaki çok sevgili arkadaşlarım, Selen PEKER, Naşit İĞCİ, Beycan AYHAN ve Hatice YILDIZHAN'a, Tanıştığımız günden beri dostluğunu esirgemeyen, en zor zamanlarımda hep yanımda olan, çalışmalarımındaki yardımlarının yanı sıra her an ulaşabileceğim ve beni hep sevgiyle dinleyen canım arkadaşım. N. Pınar BARKAN'a,

Beni sevgi dolu bir ortamda büyüten, koşulsuzca destek olan ve tez çalışmamın tamamlanabilmesinde fiziksel ve ruhsal olarak en büyük katkıyı sağlayan sevgili aileme, yokluğunu her an hissettiğim canım babama ve bu süreçte hep yanımda olan sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER	x
ÇİZELGELER.....	xiii
KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Rejenerasyon ve Rejenerasyon Çalışmalarının Tarihi	1
1.2. Amfibilerde Rejenerasyon	4
1. 3. Sinir Sistemi ve Hücreleri	6
1.4. Periferel Sinirlerin Anatomisi ve Fonksiyonları	7
1.5. Siyatik Sinir.....	8
1.6. Periferel Sinirlerde Rejenerasyon Süreci.....	9
1.6.1. Aksotomi Sonrası Distal ve Proksimal Sinir Uçlarında Gerçekleşen Olaylar	13
1.6.1.1. Proksimal Sinir Ucunda Gerçekleşen Olaylar	13
1.6.1.2. Distal Sinir Kökündeki Büyüme Ortamı.....	14
1.6.1.3. Wallerian Dejenerasyonu	15
1.7. Rejenerasyonla İlgili Moleküller	17
1.7.1. Nörotrofik Faktörler ve Reseptörleri.....	17
1.7.2. Hücre Adezyon Molekülleri.....	21
1.7.3. Ekstraselüler Matriks Proteinleri	22
1.8. Rejenerasyon Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler	23
1.8.1. Periferel Sinir Sistemi Rejenerasyonu İlgili Davranış Çalışmaları	23
1.8.2. Periferel Sinir Rejenerasyonu Çalışmalarında Elektrofizyolojik Ölçümler ...	27
1.8.3. Periferel Sinir Dokusunun Proteomik Tabanlı Çalışmalarla Değerlendirilmesi	27
2. MATERYAL- METOT	35
2.1. Canlı Materyal ve Arazi Çalışmaları	35
2.2. Laboratuvar Bakımı	36
2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar	36

2.4. Deneysel Sinir Hasarının Oluşturulması.....	37
2.5. Ön Çalışmalar ve Deney Planı	38
2.6. Yürüme Testleri	42
2.7. Elektrofizyolojik İncelemeler	45
2.7.1. EMG Kaydının Alınması	47
2.8. Proteomik Çalışmalar	47
2.8.1. Protein Eldesi ve Protein Miktar Tayini.....	47
2.8.2. İki Boyutlu Jel Elektroforezi ile Protein Profillerinin Çıkarılması.....	48
2.8.3. Jellerin Analizi	49
2.8.4. Protein Kümelerinin Jelden Kesilmesi ve Tripsin ile Peptitlerine Ayrılması.	49
3. SONUÇLAR	51
3.1. Ön Çalışma Sonuçları ve Deney Planı	51
3.2. Yürüme Testi Analizleri.....	56
3.3. Elektrofizyolojik Ölçümler	59
3.4. Proteomik Çalışma Verileri	62
3.4.1. Protein Miktar Tayini.....	62
3.4.2. İki Boyutlu Jel Elektroforezi ile Protein Profil Haritalarının Eldesi ve Jellerin Analizi.....	64
3.4.3. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Elde Edilen Peptit Kütle Parmak İzi Verileri	69
3.4.4. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Tanımlanan Proteinlerin Görevleri... ..	80
3.4.4.1. Hücre İskeleti Proteinleri.....	82
3.4.4.1.1. Tubulin alfa ve beta zincirleri	82
3.4.4.1.2. Aktin, sitoplazmik 1	83
3.4.4.1.3. Periferin	84
3.4.4.1.4. Vimentin 1/2	85
3.4.4.1.5. Faskin.....	85
3.4.4.2. Enzim Aktivitesi Olan Proteinler	85
3.4.4.2.1. Sitosolik pürin 5'- nükleotidaz	85
3.4.4.2.2. Kazein kinaz 2 alfa alt birimi	86
3.4.4.2.3. Retinol dehidrogenaz 10- A.....	87
3.4.4.2.4. Ran GTPaz aktive edici protein 1	88
3.4.4.2.5. Efrin tip- B reseptör 1- A.....	89
3.4.4.3. Ubikütinasyon Mekanizması İle İlgili Proteinler.....	90

3.4.4.3.1. F- kutusu/ LRR- tekrar proteini 15	90
3.4.4.3.2. E3 ubikutin- protein ligaz TM 129	90
3.4.4.3.3. TNF reseptör ilişkili faktör 6-B	90
3.4.4.4. Sinyal Molekülleri ve Reseptörleri	91
3.4.4.4.1. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 4	91
3.4.4.4.2. Nöritin B.....	92
3.4.4.4.3. Östrojen reseptörü.....	92
3.4.4.4.4. Asetilkolin reseptör alfa 1A alt birimi.....	93
3.4.4.4.5. Proenkefalin A-A.....	94
3.4.4.5. Taşıyıcı Proteinler	94
3.4.4.5.1. Ekspotin 7- B.....	94
3.4.4.5.2. Ras-ilişkili protein Rab-19.....	95
3.4.4.5.3. Sınıflandırıcı neksin 33	95
3.4.4.5.4. Kalsiyum bağımlı salgılama aktivatörü 1	96
3.4.4.6. Hücre Adezyon Molekülleri.....	96
3.4.4.6.1. Katenin alfa 2	96
3.4.4.7. Düzenleyici Proteinler.....	96
3.4.4.7.1. Nükleostemin benzeri protein	96
3.4.4.7.2. Paralemin- 3	97
3.4.4.7.3. Çinko parmak ve BTB domain içeren protein 18	97
3.4.4.7.4. Transforme edici büyüme faktörü beta-1 ile indüklenen transkript 1 proteini	98
3.4.4.7.5. Yüksek hareketli grup proteini 20A.....	98
3.4.4.7.6. Protein simiate.....	99
3.4.4.7.7. Amiloid beta A4 öncül protein bağlama ailesi B üye 1 ile etkileşen protein	99
3.4.4.7.8. Evrimsel olarak korunmuş Toll yolu ara sinyal proteini.....	99
3.4.4.7.9. Kordin	99
3.4.4.7.10. REST korepresör 2.....	100
3.4.5. MASCOT Sunucusu İle Tanımlanmış Proteinlere Ait Ağ (Network) Analizleri (Protein Etkileşimleri)	100
4. TARTIŞMA.....	112
4.1. Yürüme Testleri	112
4.2. Elektrofizyolojik Ölçümler	116

4.3. Proteomik Çalışmalar	120
KAYNAKLAR.....	133
EKLER	147
EK 1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde ve Cihaz Listesi	147
EK 2. Proteomik Çalışmalarda Kullanılan Protokoller.....	149
EK 3. Şekil 3. 37’de gösterilen protein- protein etkileşim ağlarında yer alan protein kod ve adları.....	155
EK 4. Tanımlanan proteinlerin STRAP 1.5 programı ile sınıflandırılması	159
ÖZGEÇMİŞ	162

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1. 1. Rejenerasyon süreciyle ilgili temel kavramlar	3
Şekil 2. 1. Arazi bölgeleri	35
Şekil 2. 2. Arazi çalışmalarında semender örneklerinin yakalanması	36
Şekil 2. 3. Semender terraryumlarının görünümü	37
Şekil 2. 4. <i>T. karelinii</i> örneğinde siyatik sinirin görünümü	38
Şekil 2. 5. Operasyon sonrası anesteziden çıkma süreci	38
Şekil 2. 6. Tez çalışmasının genel planı	41
Şekil 2. 7. Yürüme platformu alttan görünüm	42
Şekil 2. 8. Yürüme platformu üstten görünüm	42
Şekil 2. 9. Fotoğraf karesine dönüştürülen yürüme kayıtları	43
Şekil 2. 10. Fotoğraf karesine dönüştürülen yürüme kayıtlarından Image J programı ile arka ayak ölçümlerinin alınması	43
Şekil 2. 11. SFI formüllerinde kullanılan ölçüm bölgeleri	45
Şekil 2. 12. EMG kayıtlarında kullanılan deney düzeneği	46
Şekil 2. 13. EMG dalgalarında ölçüm yapılan bölgeler	46
Şekil 3. 1. Hasar sonrası 24. saat fosfoprotein boyası görüntüleri	53
Şekil 3. 2. Hasar sonrası 24. saat glikoprotein boyası görüntüleri	53
Şekil 3. 3. Seçilen bazı protein kümelerindeki protein ifade farklılıklarının üç boyutlu gösterimi	55
Şekil 3. 4. Siyatik sinir kesik hasarı sonrası yedi günlük SFI değişim grafiği	56
Şekil 3. 5. Siyatik sinir kesik hasarı sonrası on dört günlük SFI değişim grafiği	57
Şekil 3. 6. Siyatik sinir kesik hasarı sonrası yirmi bir günlük SFI değişim grafiği ..	57
Şekil 3. 7. Siyatik sinir kesik hasarı sonrası otuz beş günlük SFI değişim grafiği .	57
Şekil 3. 8. Zaman aralıklarına göre rejenerasyon hızı grafiği	58
Şekil 3. 9. Kontrol ve deney gruplarına ait örnek EMG dalgaları	60
Şekil 3. 10. Zaman aralıklarına göre gruptaki genlik değişimi	61
Şekil 3. 11. Zaman aralıklarına göre gruptaki yanıt süresi değişimi	61
Şekil 3. 12. Bradford yönteminde kullanılan BSA standartları ile elde edilen kalibrasyon eğrisi örneği	62
Şekil 3. 13. Siyatik sinir dokusuna ait genel protein profili görünümü	65
Şekil 3. 14. Tüm zaman aralıklarına ait protein profil haritaları	65
Şekil 3. 15. Tüm grupta eşleştirilen protein kümeleri	66
Şekil 3. 16. Protein tanımlamalarının yapıldığı protein kümeleri	69

Şekil 3. 17. Hasar sonrası 24. saate ait fosfoprotein ve glikoprotein boyaması ile elde edilen haritalarda MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanmış proteinlere karşılık gelen protein kümeleri	70
Şekil 3. 18. Sekiz numaralı protein kümesinin (Tubulin alfa zinciri) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	72
Şekil 3. 19. Dokuz numaralı protein kümesinin (Tubulin beta-2 zinciri) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	73
Şekil 3. 20. On iki numaralı protein kümesinin (Aktin sitoplazmik 1) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	73
Şekil 3. 21. On numaralı protein kümesinin (Periferin, Asetilkolin reseptör alfa 1-A alt birimi, Sınıflandırıcı neksin-33, Vimentin-1/2) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	74
Şekil 3. 22. On altı numaralı protein kümesinin (F-kutusu/LRR-tekrar protein 15, Protein simiate) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	74
Şekil 3. 23. Dört numaralı protein kümesinin (Eksportin 7-B, Kordin) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	75
Şekil 3. 24. İki numaralı protein kümesinin (Katenin alfa-2) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	75
Şekil 3. 25. On yedi numaralı protein kümesinin (Ras-ilişkili protein Rab-19, Nöritin-B) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	76
Şekil 3. 26. Üç numaralı protein kümesinin (TNF-reseptör ilişkili faktör 6-B) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	76
Şekil 3. 27. Bir numaralı protein kümesinin (Kalsiyum bağımlı salgılama aktivatörü 1) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	77
Şekil 3. 28. Altı numaralı protein kümesinin (Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 4, Çinko parmak ve BTB domain içeren protein 18, Evrimsel olarak korunmuş Toll yolu ara sinyal proteini) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	77
Şekil 3. 29. On beş numaralı protein kümesinin (Proenkefalin A-A) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	78
Şekil 3. 30. Yedi numaralı protein kümesinin (Transforme edici büyüme faktörü beta-1 ile indüklenen transkript 1 proteini) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	78

Şekil 3. 31. On bir numaralı protein kümesinin (Sitosolik pürin 5'-nükleotidaz, Nükleostemin benzeri protein, Paralemm-3, Östrojen reseptörü, REST korepresör 2) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	79
Şekil 3. 32. On dört numaralı protein kümesinin (Kazein kinaz 2 alfa alt birimi) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	79
Şekil 3. 33. Beş numaralı protein kümesinin (Faskin) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği	80
Şekil 3. 34. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre dağılımları	81
Şekil 3. 35. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin hücresel konumlarına göre dağılımları.....	81
Şekil 3. 36. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre dağılımları	81
Şekil 3. 37. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile tanımlanan proteinlerden elde edilen protein- protein etkileşim ağları.....	105

ÇİZELGELER

Sayfa

Çizelge 2. 1. Deney grupları, zaman aralıkları ve yapılan çalışmalar	40
Çizelge 3. 1. Gruplar arasında protein ifade farklılıkları olan protein kümesi sayıları	51
Çizelge 3. 2. Kesik hasarı alt grupları arasında ANOVA ve post Hoc testlerine göre ifade farklılığı istatistiksel olarak anlamlı olan protein kümesi sayıları	52
Çizelge 3. 3. Zaman aralıklarına göre SFI grafiği eğimlerindeki değişim	58
Çizelge 3. 4. Gruplara göre bileşik kas aksiyon potansiyeli ölçüm zamanları	59
Çizelge 3. 5. Bradford yöntemi ile belirlenen toplam protein miktarları	63
Çizelge 3. 6. Birinci boyut ayırım için IPG şeritlere yüklenmiş örnek ve rehidrasyon tamponu miktarları	64
Çizelge 3. 7. Zaman aralıklarına göre distal sinir ucunda ifadesi artan/ azalan protein kümeleri	67
Çizelge 3. 8. Zaman aralıklarına göre proksimal sinir ucunda ifadesi artan/ azalan protein kümeleri	68
Çizelge 3. 9. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin listesi	70
Çizelge 3. 10. <i>X. laevis</i> türünde tanımlanan proteinlerin <i>R. norvegicus</i> ve <i>M. musculus</i> 'a ait eşlenikleri	101
Çizelge 4. 1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler	147
Çizelge 4. 2. Deneylerde kullanılan cihazlar ve programlar	148
Çizelge 4. 3. Şekil 3.37 (a) grafiğindeki protein kod ve adları	155
Çizelge 4. 4. Şekil 3.37 (b) grafiğindeki protein kod ve adları	156
Çizelge 4. 5. Şekil 3.37 (c) grafiğindeki protein kod ve adları	156
Çizelge 4. 6. Şekil 3.37 (d) grafiğindeki protein kod ve adları	156
Çizelge 4. 7. Şekil 3.37 (e) grafiğindeki protein kod ve adları	157
Çizelge 4. 8. Şekil 3.37 (f) grafiğindeki protein kod ve adları	157
Çizelge 4. 9. Şekil 3.37 (g) grafiğindeki protein kod ve adları	157
Çizelge 4. 10. Şekil 3.37 (h) grafiğindeki protein kod ve adları	157
Çizelge 4. 11. Şekil 3.37 (i) grafiğindeki protein kod ve adları	157
Çizelge 4. 12. Şekil 3.37 (j) grafiğindeki protein kod ve adları	158
Çizelge 4. 13. Şekil 3.37 (k) grafiğindeki protein kod ve adları	158
Çizelge 4. 14. Şekil 3.37 (l) grafiğindeki protein kod ve adları	158

Çizelge 4. 15. Tanımlanan proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre dağılımları	159
Çizelge 4. 16. Tanımlanan proteinlerin hücresel konumlarına göre dağılımları ..	160
Çizelge 4. 17. Tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre dağılımları	161

KISALTMALAR

2D-PAGE	İki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi
ACTH	Adrenokortikotropik Hormon
BDNF	Beyin kökenli nörotrofik faktör
BKAP	Bileşik kas aksiyon potansiyeli
BMP	Kemik morfojenetik proteini
BSA	Sığır serum albumini
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
CAMs	Hücre adezyon molekülleri
CAS	Hücrel apoptosiss hassas protein
CAT	Kolin asetiltransferaz
CGRP	Kalsitonin gen ilişkili peptit
CNTF	Kirpiksi nörotrofik faktör
CRMP-2	Kollapsin yanıt aracılı protein 2
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EMG	Elektromiyografi
ERK	Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz 1,2
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FRS2 α	Fibroblast büyüme faktörü reseptörü substrat 2 α
GAP-43	Büyüme ilişkili protein 43
GCSF	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GDNF	Glial hücre hattı türevli nörotrofik faktör
Glu-Fib	Glu 1- fibrinopeptid B
HSPG	Heparan sülfat proteoglikan
IAA	İyodoasetamid
IEF	İzoelektrik odaklama
IEG	Akut erken faz gen ailesi
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-6	İnterlökin-6
IPG	İmmobilize pH gradiyent
ITF	Ara parmak açıklığı faktörü
ITS	Ara parmak açıklığı

kV	Kilovolt
kV/sa	Kilovolt/ saat
LIF	Lösemi inhibitör faktör
m/z	Kütle/ Yük
MAG	Miyelin ilişkili glikoprotein
MALDI-TOF MS	Matriks eşliğinde lazer iyonlaştırıcılı ve uçuş zamanıyla ölçüm yapan kütle spektrometresi
MAPK	Mitojen-aktif protein kinaz
MBP	Miyelin temel protein
N-CAM	Nöral hücre adezyon molekülü
Ng-CAM	Nöron glia hücre adezyon molekülü
NGF	Sinir büyüme faktörü
NLS	Çekirdek lokalizasyon sinyali
NOS	Nitrik oksit sentaz
NT3	Nörotrofin 3
NT-4/5	Nörotrofin 4/5
ONC	Onkostatin M
PFI	Peroneal sinir fonksiyon indisi
PI3K	Fosfatidilinositol-3 kinaz
PKA	Protein kinaz A
PL	İz uzunluğu
PLF	İz uzunluğu faktörü
PMF	Peptit kütle parmak izi
PMP22	Periferel miyelin protein 22
RGP51	Retrograd protein 51
SCb	Yavaş bileşen b
SCIP	Baskılanmış cAMP ile indüklenebilen POU
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SFI	Siyatik fonksiyon indisi
SSI	Statik siyatik indis
STAT1	Sinyal transdüser ve transkripsiyon aktivatör 1
TEMED	Tetrametiletildiamin
TFI	Tibial fonksiyon indisi
TGF-β	Transforme edici büyüme faktörü beta

TOR	Rapamisin hedefi
TRAF 6	TNF reseptör ilişkili faktör 6
TrkA	Tirozin kinaz reseptör A
TS	Parmak açıklığı
TSF	Parmak açıklığı faktörü
V	Volt

1. GİRİŞ

1.1. Rejenerasyon ve Rejenerasyon Çalışmalarının Tarihi

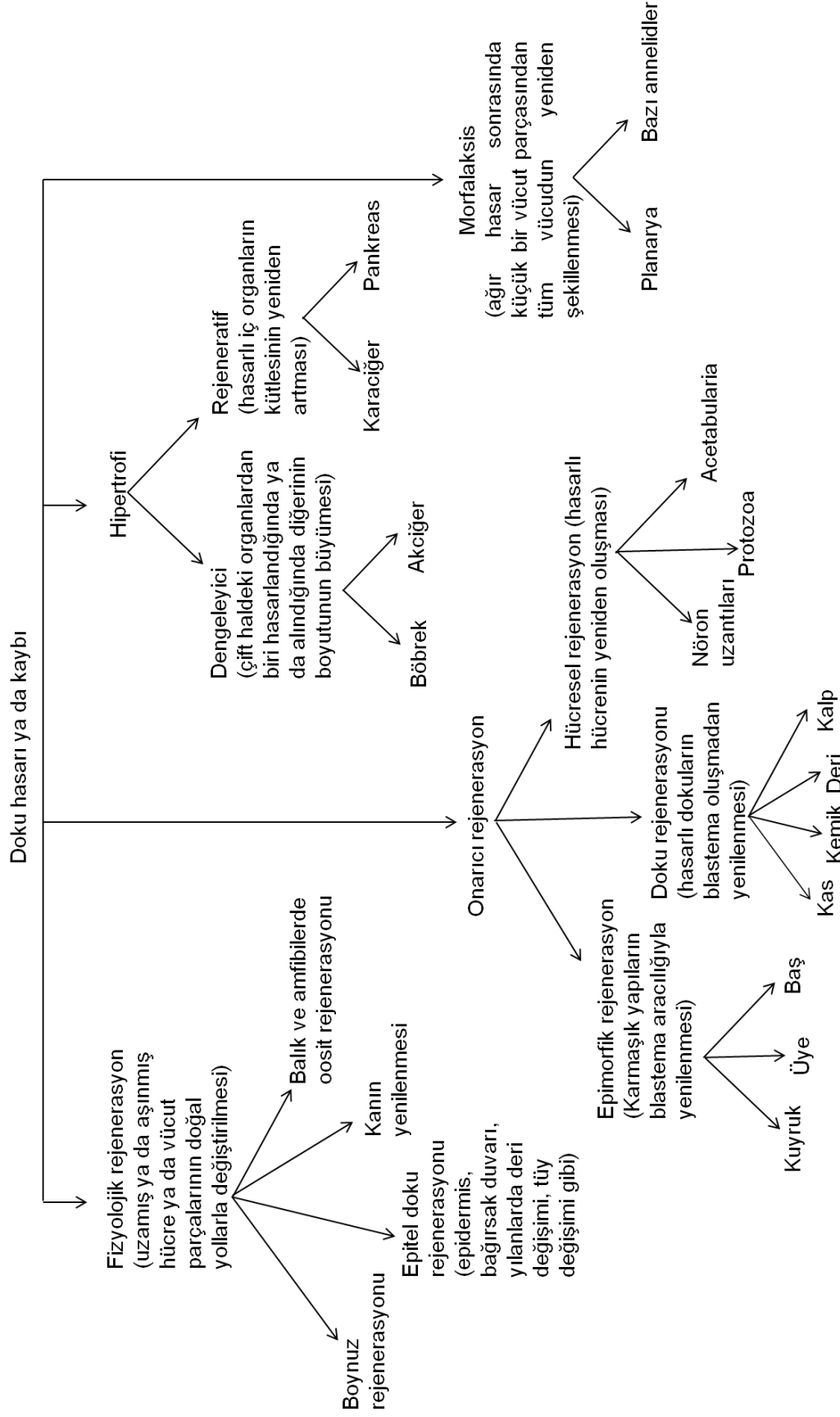
Rejenerasyon, biyoloji tarihindeki en eski çalışma alanlarından biridir. Rejenerasyonla ilgili kaydedilmiş ilk bilimsel gözlemler, 1712'de, René-Antoine Ferchault de Réaumur tarafından yapılan ve istakozlarda üye rejenerasyonunun ayrıntılı bir tanımının yer aldığı çalışmadır. Sonraki yarım yüzyıl boyunca farklı organizmalarda farklı araştırmacılar rejenerasyonla ilgili gözlemlerde bulunmuştur: Abraham Trembley (1740) hidralarda, Charles Bonnet (1745) annelidlerde, Spallanzani (1769) amfibilerde, P. S. Pallas (1770) planaryalarda çeşitli gözlemler yapmıştır. Onsekizinci yüzyılda gerçekleştirilen rejenerasyon çalışmaları, sonraki yüzyıllarda gelişerek devam edecek olan deneysel biyoloji, gelişim biyolojisi ve genetik gibi çalışma alanlarının kökeni olarak kabul edilmektedir. Ondokuzuncu yüzyılın başlarında, çok sayıda hayvanda rejenerasyonun varlığı gösterilmiştir; ancak 1838'de hücre teorisinin aydınlatılmasıyla ve histolojik tekniklerin geliştirilmesiyle, rejenerasyon çalışmaları da yeniden ele alınmıştır. Charles Darwin ünlü Beagle seyahatinde planaryalarda rejenerasyon çalışmaları yapmış ve evrim teorisinde bu konuyu da tartışmıştır. Mendel öncesi genetik çağında, Weismann (1892) üye rejenerasyonunda morfogenez konusuyla ilgili ilk teoriyi ortaya atmıştır. Yirminci yüzyıl birçok türdeki rejeneratif süreçlerle ilgili detaylı histolojik tanımlamalarla başlamış, ancak birkaç on yıl sonrasında, memeli rejenerasyonuna ilgi, birçok insan dokusunda rejenerasyon yeteneğinin olmaması nedeniyle azalmıştır. Amfibilerde üye rejenerasyonu çalışmaları, teorik tanımlamalardan, belirli doku bileşenlerinin rejenerasyon üzerine etkisinin gösterildiği deneysel çalışmalara taşınmıştır. Moleküler devrim, rejenerasyon alanındaki çalışmaları yeniden etkilemiş olsa da, günümüzde herhangi bir dokudaki rejenerasyonun moleküler yapısıyla ilgili bilgi sınırlıdır. Yirmibirinci yüzyılın başlarında kök hücre çalışmaları ve kök hücrelerin insan dokularında rejenerasyonu destekleme potansiyellerinin keşfedilmesi ile birlikte, rejenerasyon çalışmalarından elde edilecek sonuçlarla ilgili yüksek beklentiler oluşmuştur [1, 2].

Rejeneratif tıp ve biyomühendislik uygulamaları ile, kopan ya da hasarlanan doku ve organların yeniden yapılandırılması ile ilgili çalışmalar ise yirmibirinci yüzyılın popüler çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır.

Rejenerasyon kelimesinin sözlük anlamı, kopan ya da hasarlanan bir bölgenin yeniden geliştirilmesi ya da yeniden yapılandırılması, diğer bir deyişle bir çeşit aseksüel üreme şeklidir. Ancak bu tanım, canlılarda birbirinden çok farklı mekanizmalarla gerçekleşen tüm durumların açıklanması için yeterli değildir. Hücre ya da doku hasarları, yıkım ve iyileşme süreçlerini içeren bir seri olayın başlamasına neden olur. Bu süreç genel anlamda, rejenerasyon ve onarım olarak iki kısma ayrılabilir. Rejenerasyon kaybedilen ya da hasarlanan dokunun tamamen eski durumuna dönmesiyle sonuçlanırken; onarımda ise bazı orijinal yapılar eski haline dönerken, kollajen birikimi ve yara oluşumu da görülür. Rejenerasyon, amfibilerde kopan üyelerin yeniden büyümesinde olduğu gibi, kayıp dokuların yerini doldurmak üzere, hücrelerin ve dokuların proliferasyonunu ifade eder. Memelilerde, bir organın tamamı ya da kompleks dokular nadiren rejenerere olur ve rejenerasyon terimi genellikle kısmi parça alınması ya da nekroz sonrasında karaciğerin büyümesi gibi süreçler için kullanılır; ancak bunlar gerçek rejenerasyondan çok, hasarı telafi edecek büyüme durumlarıdır [3].

Rejenerasyon tipleri ve sınıflandırılması Şekil 1.1'de örnekleriyle birlikte verilmiştir. Rejenerasyonun hayvanlar âlemindeki filogenetik dağılımına bakıldığında, çok hücreliliğin kökeniyle eş zamanlı olarak, ilkin hayvanlarda ortaya çıktığı düşünülmektedir. Filogenik incelemelerden elde edilen verilere göre, rejenerasyon çok hücreli hayvanlarda primordiyal bir özelliktir ve henüz açıklanamamış nedenlerle bazı gruplarda sonradan kaybolmuştur [4].

Hayvanlar alemindeki rejeneratif potansiyel incelendiğinde, bazı ilkel formlarda rejenerasyon yeteneği bulunmazken, bazı yakın akraba gruplarda rejenerasyon yeteneği bakımından farklılıkların bulunduğu görülür. Örneğin, bazı Annelida türleri (halkalı solucanlar) küçük vücut parçalarından tüm vücutlarını geliştirebilirken; neredeyse benzer karmaşıklığa sahip Nematoda (yuvarlak solucan) türlerinde rejenerasyon gözlenmez. Benzer şekilde urodela amfibileri omurgalı rejenerasyonunun şampiyonlarıyken, anuran amfibilerininin rejeneratif kapasitesi belirgin ölçüde daha düşüktür. Organizmanın gelişmişliği, rejeneratif kapasitenin gösterilmesi için uygun bir belirteç değildir [5, 6].



Şekil 1. 1. Rejenerasyon süreciyle ilgili temel kavramlar

Sölenterler ve yassı solucanlar gibi bazı hayvanlar küçük vücut parçalarından bütün vücutlarını rejenerere edebilirken; nematodlar, sülükler, kuşlar ve memeliler gibi bazı hayvanlarsa rejenerasyon yeteneklerini büyük oranda ya da tamamen kaybetmiştir. Ergin dönemde sabit hücre sayısına sahip olan rotiferler ve nematodlar gibi bazı şubelerin üyelerinde rejenerasyon yeteneği yoktur. Ayrıca, rejenerasyon yeteneğine sahip türler içeren şubelerde de türler arasında önemli farklılıklar görülür [4].

Doğal popülasyonlardaki en yaygın doku kaybı, öldürücü olmayan predasyon nedeniyle oluşur. Subletal (öldürücü olmayan sakatlıklar) predasyon, birçok hayvan neslinde rejenerasyonun korunmasını sağlayan baskın kuvvet olmuştur. Bazı habitatlarda, subletal predasyon ve sonrasında avın yaralı doku ve organlarının rejenerasyonu çok yaygındır ve kommunité dinamiklerinde önemli role sahiptir. Doğal popülasyonlarda subletal predasyon dışında, tür içi mücadeleler, deri değişimi ve tüy dökme sırasındaki komplikasyonlar ya da toksine maruz kalan vücut kısmının ototomi ile uzaklaştırılması ve abiyotik fiziksel hasarlar da doku kaybına neden olan diğer mekanizmalardır [4, 5].

1.2. Amfibilerde Rejenerasyon

Amfibilerde gelişim biyolojisi ve rejenerasyonla ilgili çalışmalar onsekizinci yüzyılın ortalarında başlamıştır. Sperry [7], gelişme evresinde, göz sinir uzantıları tahrip edilen *Bufo terrestris*, *Hyla cinerea*, *Hyla crucifer* türlerine ait kurbağa ve *Triturus viridescens* türü semenderlerin retinasındaki sinir hücresi aksonlarının büyük bir doğrulukla merkezi sinir sistemindeki yerlerini bulabildiğini ve görme işlemini yeniden gerçekleştirebildiğini bulmuştur. Bu denemelerle, kesilen göz siniri 180° döndürüldükten sonra tekrar yerine bağlandığında, sinir gelişiminin yine meydana geldiği; fakat kurbağanın herhangi bir av görmesi halinde avın üzerine değil, 180° tersine zıpladığı gözlenmiştir [7]. Kurbağalarla yapılan bir başka deneyde ise, göz merceği çıkarılmış kurbağa larvalarında üst iris kenarından yeni bir mercek oluştuğu görülmüştür. Mercek, normalde göz çukurunun ön kısmını örten derinin ektoderminden meydana gelmektedir. Yenilenmede, ilk olarak iris hücreleri bölünmeye, pigmentlerini yitirmeye ve embriyonal blastem şeklini almaya başlar. Bu sırada, önceden etkin halde olmayan gen sistemleri işler hale geçirilir. Bu gen sistemleri, özel mercek proteininin sentezlenmesini sağlar. Burada, önceden melanin pigmenti

sentezleyen iris kökenli hücreler, yepyeni bir işlevi üzerlerine alır ve bu hücrelerde metaplazi görülür. Çıkarılan mercek, tekrar göz boşluğunun içerisine yerleştirildiğinde, iristen yeni mercek oluşmadığı; ancak merceğin üzeri parafinle kapatılarak yerleştirildikten sonra iristen yine mercek oluştuğu görülmüştür. Böylece, mercekten salınan bazı özel maddelerin, mercek oluşumunu önlediği yorumu yapılmıştır [8]. Okada ve Mikami [9], *Triturus pyrrhogaster*'de optik çukurun olduğu alana, burun taslağı, kulak vezikülü, beyin, kalp, karaciğer, erken embriyolardan dorsal arkenteron duvarı, nöral plaka, baş bölgesindeki ektoderm, mezoderm ve endoderm gibi, çok sayıda farklı dokuyu yerleştirmiş ve lens gelişiminin indüklendiğini tespit etmişlerdir. Bu tarihlerden itibaren, amfibilerin farklı dokularındaki rejenerasyonla ilgili birçok çalışma kaydedilmiştir. Ancak, ilerleyen yıllarda çalışmaların çoğu laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan, belirli model organizmalarla sınırlandırılmıştır. Günümüzde geliştirilen yeni moleküler tekniklerin yardımıyla, geçmişte yapılan bu çalışmalarda mekanizmaların aydınlatılması, literatürdeki eksikliğin giderilmesinin yanı sıra, çeşitli hastalık ve sakatlıkların tedavisinde uygulanabilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesine de katkı sağlayacaktır.

Urodela amfibileri, kuyruk, bacak, lens, retina, çene ve kalplerinin büyük bir kısmını rejenere edebilmektedir; ancak evrimsel süreçte memelilerde herhangi bir dokunun ya da organın tamamen rejenere olabilme kapasitesi ortadan kalkmıştır. Memelilerde gerçek rejenerasyonun görülmemesi nedeni olarak, rejenerasyon için gerekli hücrelerin kaynağını oluşturan blastema yapısının olmaması ve yaralanma sonrası hızlı fibroproliferatif cevap oluşması gösterilmektedir. Rejenerasyon sürecinde çeşitli hücresel yolların rol oynadığı bilinmektedir. Örneğin, Wnt/ β -catenin yolağı, planarya rejenerasyonunda, zebra balıklarının yüzgeç ve kalp rejenerasyonunda ve sucül semenderlerin bacak rejenerasyonunda blastema ve kalıp (pattern) oluşumuna katılan, yüksek oranda korunmuş bir yolaktır. Memelilerde de benzer şekilde, Wnt/ β -catenin bağırsak epitelinde, kemik iliğinde ve kasta kök hücre fonksiyonlarını düzenlemekte, kısmi hepatektomi sonrasında karaciğer rejenerasyonuna katılmakta ve karaciğer hasarı sonrasında oval hücre proliferasyonunu uyarmaktadır [3].

Amfibi rejenerasyonunun, yoğun hücresel transdiferansiyasyon aracılığı ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Rejenerasyonun gerçekleşebilmesi için,

amputasyon bölgesinin uç kısımlarındaki farklılaşmış hücreler önce primitif hallerine döner (de-differentiate) ve daha sonra kaybolan parçayı oluşturmak üzere yeniden farklılaşırlar (re-differentiate). Bu durum, transdiferansiyasyonun pankreastaki endotel hücreler ya da periferik sinir sistemindeki Schwann hücreleri gibi yalnızca birkaç hücre tipinde gözlemlendiği memelilerdeki duruma benzerlik göstermez. Son yıllarda, amfibilerdeki rejenerasyonda kök hücrelerin de rolü olduğu ortaya çıkarılmış, böylelikle bu hayvanlardaki rejeneratif kapasitenin hem farklılaşmış hem de farklılaşmamış hücreleri içerdiği öne sürülmüştür [10].

1. 3. Sinir Sistemi ve Hücreleri

Sinir sistemi, özellikle beyin dokusu, vücuttaki en karmaşık ve en yüksek organizasyona sahip sistemdir. Sinir sisteminin yapısı ve gelişmişlik derecesi, bulunduğu hayvanın yaşama şeklini yansıtmaktadır. Aktif hayvanlar daha gelişmiş ve karmaşık sinir sistemlerine sahipken; pasif olanlarda sinir dokusu daha küçük ve az gelişmiştir. Hayvanlar aleminde birbirinden farklı sinir sistemi modelleri gelişmiş olsa da, süngerler (Porifera) ve knidliler (Cnidaria)'dan yukarı taksonlarda görülen sinir sistemi yapısı genel olarak, bilgileri işleyen bir merkezi bölge ve çevredeki bilgileri merkeze, merkezdekileri de çevreye taşıyan sinir fibrillerinden oluşan bir periferik bölgeye ayrılmaktadır. Omurgalılarda, merkezi sinir sistemi beyin ve omuriliği içerirken; periferik sinir sistemi de kranial ve spinal sinirlerden oluşmaktadır. Spinal sinirler; omurilik ile üyeler, boyun ve gövde arasında iki yönlü iletişim sağlamaktadır. Her bir spinal sinir, omurilikten iki küçük dala ayrılır. Dorsal kök (posterior ya da duyu kökü) genişleyerek dorsal kök gangliyoni oluşturur. Bu gangliyonda duyu nöronlarının hücre gövdeleri yer alır. Bunların dendritleri periferik vücut kısımlarına impuls iletir. Her bir spinal sinirin ventral kökü (anterior ya da motor kök) ise, hücre gövdeleri omuriliğin gri maddesinde bulunan motor nöronların aksonlarından oluşmaktadır [11].

Sinir sistemi hücreleri nöronlar ve nöroglia hücreleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Küresel şekilli nöroblast hücrelerinden farklılaşan nöronlar, asimmetrik yapıda olup; hücre çekirdeğinin bulunduğu hücre gövdesinin bir ucunda sinyalleri alan dendritler bulunurken, diğer uca ise sinyal iletiminde görevli olan aksonlar uzanmaktadır. Bu asimmetrik yapı sonucunda, hücrelerde dendritlerden aksonlara doğru tek yönlü sinyal iletimi gerçekleşmektedir. Glia hücrelerinin ise, elektriksel impuls iletiminde rol almamalarına karşın; miyelin kılıfın oluşturulması

ile impuls iletiminin kontrol edilmesi, büyüme faktörleri ve diğer sinyal moleküllerin salınması, nöronlardan sinyallerin alınması ve sinaps oluşumunun kontrolü gibi önemli görevleri bulunmaktadır [11, 12].

1.4. Periferel Sinirlerin Anatomisi ve Fonksiyonları

Periferel sinirler, vücutla beyin ve omurilik arasındaki bağlantıyı sağlamaktadır. Periferel sinir sistemi, merkezi sinir sisteminden birçok yönüyle farklılık göstermektedir. Periferel aksonlar, kas, bağ doku, deri ve vücuttaki bütün organları içeren çok çeşitli lokal çevrelerle ilişki halindedir. Periferel sinir sistemi hücreleri, hasar ya da hastalıklara verdikleri yanıt, destekledikleri akson yapıları ve birlikte görev aldıkları diğer hücreler yönünden merkezi sinir sistemindeki sinir hücrelerinden ayrılmaktadır [13].

Periferel sinir gövdesinde, beyin ve omurilik ile iskelet kasları arasındaki bağlantı motor nöronlar; beyin ve omurilik ile duyu organları arasındaki bağlantı ise duyu nöronları aracılığıyla sağlanmaktadır. Merkezi sinir sistemi ile düz kaslar, ter bezleri, kan damarları ve diğer yapılar arasındaki iletişimi ise otonom sinir sistemi aksonları gerçekleştirmektedir. Sinir gövdeleri boyunca uzanan aksonların nöron hücre gövdeleri (perikarya) beyin kökünde, omurilikte ve gangliyonlarda bulunmaktadır [13].

Periferel sinirlerin fonksiyonel birimleri aksonlardır. Aksonlar, hem elektriksel iletim, hem de madde taşınımı için özelleşmiştir. Periferel aksonların boyutları, fonksiyonel özelliklerine bağlı olarak farklılık göstermektedir. Tüm periferel aksonlar, periferel sinir sisteminin gliyası olan Schwann hücreleriyle ilişkidir. Akson Schwann hücresi ilişkisine aracılık eden çeşitli özgül moleküler etkileşimler vardır. Periferel aksonlar çok sayıda bağ doku tabakasıyla sarılarak periferel siniri oluşturmaktadır [14].

Periferel sinirler, dıştan içe doğru epinöryum, perinöryum ve endonöryum olmak üzere üç bağ dokusu kılıfı ile çevrelenir. Periferel sinir gövdesinin dış tabakasını oluşturan epinöryum kollajen doku kılıfı, kan ve lenf damarları, makrofajlar, fibroblastlar ve mast hücrelerini içermektedir. Kalınlığı değişkenlik gösterebilen epinöryum tabakasının komşu dokularla çok az bağlantısı vardır. Baskın olarak Tip I kollajen içerse de, elastik fibriller de bulunmaktadır. Epinöryumdaki lokal kan akımı endonöryumdakine oranla daha fazladır. Epinöryumun altında yer alan perinöryum, endonöral fasikülleri çevreler ve korur. Perinöryumun bazal laminası,

kollajen, fibronektin, laminin ve glikozaminoglikanları içermektedir. Endonöryum ise, sinir gövdesinin en önemli kısmıdır ve aksonları ve aksonları destekleyen Schwann hücrelerini içermektedir. Bunlara ek olarak, mast hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar ve kan damarları da bulunmaktadır. Tip I ve III kollajenlerini içeren endonöryumda, iki tip akson yer almaktadır. Miyelinli aksonların çapları daha büyük olup, her biri bir Schwann hücresi tarafından lamelli yapıdaki lipid miyelin kılıfı ile çevrelenmektedir. İkinci önemli akson tipi de miyelin kılıfı ile kaplanmamış olanlardır. Bu aksonların birkaç tanesi bir Schwann hücresi ile ilişkilidir. Aksonlar bu yapısal çerçeve içinde rastgele dağılmak yerine, dereceli olarak organize olup merkezi sinir sisteminden çevreye doğru dağılırken özgül sinir kollarını oluşturmaktadırlar [13, 14].

1.5. Siyatik Sinir

Siyatik sinir, vücudun en uzun ve en geniş siniridir. Siyatik sinirin; tibial, peroneal ve sural sinirler olarak adlandırılan kolları, arka bacağın farklı bölgelerinde bulunan kaslara, deri reseptörlerine, damarlara, ter bezlerine doğru farklı oranlarda motor, duyu ve otonom sinirlere ait aksonlar iletmektedir [15, 16].

Siyatik sinir, siyatik arter ile birlikte, uyluk bölgesinden aşağıya doğru inerken, dize yakın bir bölgede kollara ayrılmaktadır. Öncelikle, bir ya da daha fazla kutanöz dal, *Musculus pubo-ischio-tibialis* ve *Musculus ischio-flexorius* kasları arasında uyluktan ayrılır. *Nervus cutaneus surae medialis*'i oluşturan bu dallar, dizin distalinde bacağın ventral yüzeyindeki deri örtüsünü uyarmaktadır. Bu sinirlerden biri, *Musculus ischio-flexorius* kasının pars plantaris'inin yakınından ya da içinden geçerek, ince bir kol ile bu bölgeyi sinirlendirmektedir. Diğer kol, siyatik siniri bu kutanöz dalların yakınında terk ederek kaslara yönelir ve *Musculus femoro-fibularis*'i sinirlendirmek üzere, *Musculus flexor primordialis communis*'e girer. Sinir, bu kas içinde sonlanabilir ya da aşağıya doğru devam ederek *Nervus fibularis* ile birleşebilir. *Nervus fibularis* ile birleştiği durumda; küçük bir dal bu kasa uzanarak kasın sinir iletimini sağlamaktadır [17].

Kalça ile diz arasında bir bölgede, siyatik sinir, siyatik arterin içinden geçebilmesi için ikiye ayrılmaktadır. Diz bölgesinde yeniden birleşen bu kolların ayrıldığı alanın uzunluğu, türler arasında büyük çeşitlilik göstermektedir. Siyatik sinir, *Musculus flexoris fibularis* kasının dorsalinde uyluktan ayrılmakta ve bacağına *Musculus pubo-ischio-tibialis* insersiyonu ile *Musculus flexor primordialis*

communis'in başlangıç noktası arasından girmektedir. Siyatik sinir, dizin proksimalinde ikiye ayrılmadıysa bu bölgede ayrılır. Dizin distalinde ayrılan, siyatik sinirin iki temel kolu, *Nervus fibularis* ve *Nervus interosseus* isimlerini almaktadır [17].

1.6. Periferal Sinirlerde Rejenerasyon Süreci

Sinir sistemine ait yapılar, yaralanma sonrası diğer birçok dokuya oranla daha zor rejenere olmaktadır. Bunun en önemli nedenlerinden biri, aksonal ve dendritik bağlantıların doğru şekilde rejenere olamamasıdır. Genel olarak, periferal sinir sistemindeki aksonlar, merkezi sinir sistemine oranla daha iyi rejenere olabilmektedir. Bu özelliğin, hücresel ilişkilerdeki farklılığa, özellikle destekleyici hücrelerdeki farklılığa ve miyelin bileşimine bağlı olduğu düşünülmektedir [4].

Sinir rejenerasyonu ve hedefin yeniden sinirlendirilmesi işlemleri, nöron, büyüme ortamı ve hedefle ilgili çok sayıda faktörden etkilenmektedir. Başarılı bir iyileşme süreci için, öncelikle nöronlar yaralanma sonrası hayatta kalmalı ve rejenerasyonu başlatmak için etkili bir metabolik yanıt oluşturmalıdır. İkinci olarak, yaralanma bölgesinin distalindeki sinir kökünün büyüme ortamı, rejenere olan aksonlar için yeterli desteği sağlamalıdır. Üçüncü olarak, başarılı bir şekilde rejenere olan akson uygun hedefi yeniden sinirlendirmeli ve hedef yeniden sinirlendirilme ve denerve atrofiden kurtulma yeteneğini korumalıdır [18].

Yaralanma sonrası nöronun canlılığını koruması nöron tipi, yaş, yaralanma derecesi ve yaralanmanın hücre gövdesinden uzaklığı gibi faktörlere bağlıdır. Genel olarak, spinal motor nöronlar hasar sonrası hücre ölümüne karşı, kraniyal motor nöronlardan ve duyu nöronlarından daha az duyarlıdır. Erginlerdeki olgun nöronlar, gelişen ve gelişmekte olan olgunlaşmamış nöronlardan; yaralanma bölgesi hücre gövdelerinden uzakta olan nöronlar, hücre gövdelerine yakın olanlardan daha dayanıklıdır. Ayrıca hasarın proksimo-distal konumlu olması da nöronun hayatta kalması açısından önemlidir [18].

Akson rejenerasyonu, tek bir hücre uzantısının, uzun bir substrat boyunca büyümesini gerektiren bir süreçtir. Aksonların merkezi sinir sistemi ve çevresel sinir sistemi şeklinde iki ana bileşen altında incelenmesi ve rejenere olan aksonların sinir sisteminin farklı kısımlarında farklı yanıt vermesi de, bu süreci daha karmaşık hale getirmektedir. Normal koşullarda, çevresel sinir sistemindeki aksonlar merkezi sinir sistemine oranla daha iyi rejenere olurlar. 1980'li

yılların ortalarından itibaren yapılan çalışmalar bu farklılığın nedenini kısmen açıklayabilmiştir. Eldeki bilgilere dayanarak günümüzde hem çevresel, hem de merkezi sinir sisteminde akson rejenerasyonunu arttıracak teknikler tasarlanmaktadır [1].

Sinir hasarı sonrasında hedef dokularda ve nöron hücre gövdesi ve akson bölgesindeki glial hücrelerde, fibroblastlarda, makrofajlarda nörotrofik faktörler ifade edilmekte ve salınmaktadır. Aksotomi sonrasında, nöron dışındaki hücreler, özellikle de Schwann hücreleri tarafından sentezlenen çok sayıda nörotrofik faktör aksonların hayatta kalması için gereklidir. Kesilen bir periferel sinirin proksimal ucunun kaplanması, distal sinir ucunda akson rejenerasyonunu engelleyerek dorsal kök gangliyonundaki sinirlerin % 50'sinin ölmesiyle sonuçlanır. Bu gözlem distal sinir ucu ya da hedef organdan salınan trofik faktörlerin, yaralanmadan sonra sinirlerin hayatta kalmasında önemli bir role sahip olduğunu desteklemektedir. Ancak, nörotrofik destek sağlayan tek kaynağın distal sinir ucu ya da hedef organlar olmayabileceği de düşünülmektedir [18].

Canlı kalan nöronlar, iletili moddan büyüme moduna geçmeleri sonucu, morfolojik, fizyolojik ve moleküler değişikliklere uğramaktadır. Bir aksonun fiziksel bütünlüğü bozulduğunda, saniyeler içinde bir seri moleküler değişim görülmektedir. Nöron hücre gövdelerindeki en çarpıcı ve kalıcı morfolojik değişiklikler, kromatolitik değişiklikler olarak adlandırılan, Nissl cisimciklerinin erimesi, çekirdek şeklinin bozulması, çekirdekçiğin genişlemesi ve hücrenin şişkinleşmesidir. Kromatolizis, akson lezyonları hücre gövdesine yakın olan nöronlarda daha şiddetli şekilde ve daha erken dönemde görülmektedir. Kromatolizis şiddeti ile hedef bağlantıları sağlayacak aksonal büyüme arasında bir ilişki olduğu düşünülmektedir. Ancak kromatolizis başarılı rejenerasyon için bir ön koşul değildir. Örneğin, dorsal kök gangliyonu nöronları çok az kromatolizis ile başarılı bir rejenerasyon gerçekleştirebilmektedir [13, 18].

Nissl cisimciklerini oluşturan ribozomlar ve düzenli granüler endoplazmik retikulum dizilerinin çözülmesi, protein sentezinin artışıyla ilişkili morfolojik olaylardır ve aksotomize nöronlarda mRNA sentezinin artışıyla bağlantılıdır. Akut erken faz (immediate-early genes) genlerinin ifadesi ve bununla bağlantılı olarak hücre iskeleti proteinlerinin, nörotransmitterlerin ve büyüme faktörü

reseptörlerinin üretimindeki değişiklikler, iletici moddan büyüme moduna geçişin belirteçleri olarak bilinir ve nöronların canlı kalabilmesi ve rejenerasyonları için bir ön koşuldur. Örneğin, aksotomize motor nöronlarda gen ifadesi modeli, kolinerjik nörotransmisyondan büyümeye geçişle uyumludur. Transkripsiyon faktörü junB ve c-jun mRNA'larındaki erken artıştan sonra, bu oran kolin asetil transferaz (choline acetyltransferase, CAT) enziminin miktarını azaltmakta, kalsitonin gen ilişkili peptit (calcitonin gene-related peptide, CGRP) nöropeptidi, hızlı iletilen büyüme ilişkili protein (growth-associated protein, GAP-43) ve yavaş iletilen hücre iskelet proteinleri aktin ve tubulin miktarları arttırılmaktadır. Akut erken faz gen ailesi (IEG) arasında, jun, fos, krox genleri bulunmakta ve yalnızca jun ailesi üyeleri aksotomize motor ve duyu nöronlarından seçici olarak ifade edilmektedir. Ancak, bu değişikliklerin rejenerasyon ile geçici ilişkide olmaları rejenerasyonun mutlak şartı olmadıklarının göstergesidir. Aksotomize nöronlarda, c-jun ve nitrik oksit sintaz (nitric oxide synthase, NOS) ifadesinin, hem nöronların ölümüyle hem de rejenerasyon ile ilişkili olduğu bilinmektedir [13, 18].

Aksonların normal büyümesi sırasında, aksonla substrat (Schwann hücreleri ya da bazal lamina) arasındaki iletişim, aksonların bazal laminasındaki laminin'e ya da Schwann hücrelerindeki nöral hücre adezyon molekülüne (Neural cell adhesion molecule, N-CAM), transmembran protein L1'e, N- ve E-cadherin'e bağlanan reseptörler aracılığıyla etkin şekilde gerçekleştirilmektedir. Miyelinli bir akson dengeli bir yapıya ulaştığında, aktif reseptör substrat etkileşimlerinin çoğu sonlanmakta, ancak hasar durumunda ve erken rejenerasyon sırasında uygun moleküller aksonun plazma membranında yeniden ifade edilmektedir. Miyelinsiz aksonlarda ise, bu bağlantılar denge koşullarında bile korunmaktadır [1]. Başarılı bir rejenerasyon süreci, hasar gören aksonun yeniden miyelin kılıfla çevrenmesini de gerektirmektedir. Atipik miyelin kaplı sağlam aksonlar fonksiyonel bozukluklara sahiptir ve insanlarda ve benzer hayvan modellerinde görülen periferik nöropatilerin birçoğunun altında yatan neden budur [19]. Miyelinli bir aksonun kesilmesi, özgül bir seri olayın başlamasına neden olmaktadır. Oldukça erken bir dönemde, Schwann hücre gövdesi miyelin kılıftan ayrılırken, üstünde uzanan bazal lamina bozulmamış halde kalır. Miyelin kılıfın bu şekilde dökülmesi, Schwann hücrelerinin dedifferansiyasyonu (özelleşmiş yapı ya da fonksiyonun kaybı) olarak adlandırılmakta ve Ras/Raf/ERK sinyal yolu

(extracellular signal- regulated kinase) üzerinden gerçekleşmektedir [20]. Makrofajlar bazal laminanın içinden geçerek, aksonun uzaması için inhibitör etkiye sahip olan ayrılmış miyelin kılıf materyalini sindirmeye başlar. Makrofajlar ayrıca, Schwann hücrelerinin hücre döngüsüne girmesini ve mitotik bölünmelerini uyaran mitojenleri de salmaktadır. Proliferasyon sonrasında, Schwann hücreleri, rejenere olan aksona rehberlik etmek üzere, Büngner bantları ya da Schwann hücre kolonları denilen sitoplazma bantlarını uzatırlar. Aksonal filizler, Ranvier boğumlarının bulunduğu bölgeden çıkarak, çeşitli integrinlerin ve adezyon moleküllerinin sayısını artırır ve Schwann hücre kolonları ile bazal lamina tüpü arasındaki boşlukta uzamaya başlar. Uzama fazında, rejenere olan akson ile çevreleyen substrat (bazal lamina ve Schwann hücre kolonları) arasındaki bağlantılar, akson rejenerasyonunun başarısı için önemlidir. Schwann hücreleri akson rejenerasyonunda önemli olmalarına karşın, bazal lamina sağlam kaldığı sürece Schwann hücreleri olmadan da başarılı rejenerasyon gerçekleşmektedir [21].

Rejenerasyon sürecinde substratın diğer bir önemli görevi ise, büyüme faktörleri ve trofik maddelerin üretilmesi ve salınmasıdır. Hem bazal lamina, hem de Schwann hücreleri bu görevi gerçekleştirmektedir. Schwann hücreleri tarafından üretilen fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor, FGF) rejenere olan aksonların büyümesinde trofik etkilere yol açar ve rejenere olan aksonlar bazal laminayı fiziksel bir substrat olarak kullanarak bu büyüme faktörüne doğrudan ulaşırlar. Schwann hücreleri de, büyümeye rehberlik eden Schwann hücre kolonları oluşturmanın dışında, artan miktarlarda sinir büyüme faktörü (nerve growth factor, NGF) ve beyin kaynaklı nörotrofik faktör (brain derived neurotrophic factor, BDNF) üretirler. Bu sentezleme aktiviteleri, göç eden makrofajlarca üretilen interlökin-1'in Schwann hücrelerini proliferere olmaları için uyarılmasından sonra gerçekleşmektedir. NGF seviyesi aksotomi sonrasında 24 saat içinde normal seviyenin on- on beş katına yükselmekte ve en az iki hafta boyunca bu seviyede kalmaktadır. Motor, duyu ve simpatik sinirlerin rejenerasyonunu destekleyen BDNF seviyesi ise, üç- dört gün içinde yükselmekte ve yaklaşık dört hafta içinde en yüksek seviyesine ulaşmaktadır. Aksonun uzaması tamamlandığında, büyüme faktörlerinin miktarları normal denge seviyesine yeniden düşmektedir [1].

Substratta yer alan bazı elemanlar ise akson rejenerasyonunu geciktirmektedir. Distal sinir segmentindeki miyelinin çoğu makrofajlar tarafından uzaklaştırılırsa da, kalan miyelin rejenerasyonu inhibe edici etkiye sahiptir. Kondroitin sülfat ve keratin sülfat yan zincirleri gibi belirli proteoglikanlar da rejenerasyonu geciktirici etki göstermektedir. Özellikle periferel sinir graflarında bu yan zincirlerin enzimatik olarak uzaklaştırılmasıyla akson rejenerasyonunun kolaylaştırıldığı bilinmektedir [1].

1.6.1. Aksotomi Sonrası Distal ve Proksimal Sinir Uçlarında Gerçekleşen Olaylar

1.6.1.1. Proksimal Sinir Ucunda Gerçekleşen Olaylar

Yaralanma sonrası nöron hücre gövdesi hayatta kalan bir sinirde, lezyonun proksimalindeki sinir kökü genellikle ilk Ranvier noduna kadar travmatik dejenerasyona uğramaktadır. Bu geriye doğru yıkım, kalsiyum akımı ve kalsiyum-ilişkili proteazların aktivasyonu ile ilgilidir. Proksimal sinir ucunun şişkinleşmesinin, hücre gövdesinden yavaş ya da hızlı aksoplazmik iletim ile hedefe doğru sürekli taşınan hücre iskelet proteinleri ve organellerin birikmesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Sinir iki bölgeden ezildiğinde, şişkinleşme sadece hücre gövdesiyle ilişkisi süren proksimal ezik bölgesinde gerçekleşir ve hasar sonrası birkaç saat içinde proksimal sinir bölgesinden ince sinir fibrilleri ortaya çıkmaya başlar [18].

Hasar sonrası aksonal uzama süreçlerinin çoğu gelişim aşamasındaki olayların benzeridir; ancak yeniden uzayan aksonun hedef dokusuyla tekrar bağlantı kurabilmesi için katedeceği mesafe embriyonik dönemdeki mesafeden çok daha uzundur. Hasarlı akson, dinamik olarak uzayan bir büyüme konisine ihtiyaç duyar. Büyüme konisi, hücre iskeletinin kalsiyum bağımlı olarak yeniden şekillenmesiyle gerçekleşir. Bu başlangıç aşaması aynı zamanda, hücre gövdesindeki transkripsiyonel olayların katkısı olmadan gerçekleşen lokal protein sentezini de gerektirir. Büyüme ilişkili protein 43 (GAP-43) ergin nöronlarda, akson uzamasının önemli bir bileşenidir [22].

Büyüme konisi oluşumu hücre gövdesinin doğrudan desteği olmadan gerçekleşir ve aksonda lokal olarak hazır bulunan maddelere bağlıdır. Var olan hücre iskelet elemanları, proksimal sinir kökünden oluşmaya başlayan yeni aksonlara taşınır. Mikrotübüller eski aksonlar ile yeni oluşan aksonlar arasında, aksonal büyüme

için gerekli diğer maddelerin iletimi için bir köprü görevi görmektedir. Rejenere olan aksonların büyüme konisi oluşumu sırasında bağımsız protein sentezi yapma kapasiteleri çok az olduğu için, hücre gövdesinden aksonal iletim yoluyla sağlanan maddeler, akson uzamasında ana kaynakları oluşturmaktadır [18].

Rejenerasyon hızı, özellikle de rejenerasyonun erken dönemlerinde, hasar tipi, yaş ve türe bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Aksonal köklerin büyümesi, sinir kılıfının ve bazal membranın korunduğu ezik yaralanmalarında, kesik yaralanmalarına göre daha hızlıdır. Rejenere olan akson kökleri, yaralanma bölgesinin proksimalindeki ilk Ranvier boğumundan ortaya çıkmaya başlar. Proksimal sinir kökünden çıkan ilk sinir fibrilleri çok sayıda kola ayrılmaktadır. Rejenere olmakta olan aksonlar, distal sinir kökü gibi herhangi bir rehberin bulunmaması durumunda, olgunlaşmamış sinir fibrilleri ve bağ dokudan oluşan nöromaları yapar. Bu yapı, organize olmamış aksonal büyümenin göstergesidir. İlk aksondan gelişen çok sayıda ince sinir fibrili, distal sinir kökünün destekleyici çevresel özellikleri ile birlikte distal köke doğru uzar. Bu aksonal kökler rejenerasyon birimini oluşturur ve aksonlar hedef bağlantılarını kurana kadar burada kalırlar. Hedef ile bağlantı kurulduktan sonra, yeni oluşmuş akson filizleri kademeli olarak geri çekilir. Distal sinir kökünde rejenere olan aksonların çapları genişlese de, fonksiyonel bağlantılarını kurmadan önce normal boyutlarına ulaşamazlar [13, 18].

Rejenere olan aksonların yeniden miyelinle kaplanması aksolemma ile Schwann hücreleri arasındaki ilişki ile başlamaktadır. Bu etkileşim, Schwann hücrelerinde, galaktoserebrosit sentezini ve miyelin-ilişkili proteinlerin ifadesini uyarır ve miyelin kılıfın sarılmasını başlatır. Miyelin kılıf Schwann hücreleri tarafından sentezlense de, miyelinizasyon miktarını Schwann hücreleri ile birlikte uzamakta olan aksonlar da belirlemektedir [18].

1.6.1.2. Distal Sinir Kökündeki Büyüme Ortamı

Periferal sinir rejenerasyonunun başarısı, akson ve miyelin kalıntılarının uzaklaştırılmasının ardından, distal sinir kökündeki büyüme ortamına önemli ölçüde bağlıdır. Rejenere olan aksonlar, sinirsiz kalan hedeflerine doğru; sağlam aksonlar ve miyelin kılıfların daha önce hazırladığı endonöral tüpler içinde büyürler. Ezik hasarlarında endonöral tüpün devamlılığı korunduğu için, ezik hasarları sinir kılıfının koptuğu ve cerrahi onarıma ihtiyaç duyulan kesik

hasarlarına göre daha başarılı rejenerasyon ve fonksiyonel iyileşme ile sonuçlanmaktadır. Kesik yaralanmalarında, rejeneren olan aksonlar, proksimal ve distal sinir kökleri arasında kalan boşluğu geçmek zorundadır. Prolifere olan Schwann hücreleri ve fibroblastlar, hem proksimal hem de distal sinir kökünden göç edip, boşlukta köprü kurarak hücre-matriks tabakası oluştursalar da, bu boşluğu başarılı bir şekilde geçen rejeneren akson sayısı yine de optimum sayının altında kalmaktadır. Bunun dışında, boşluk rejeneren olan aksonların kendi orijinal endonöral tüplerine doğru büyüme olasılıklarını da azaltmaktadır. Rejeneren olan aksonal kökler çok sayıda dal oluşturur ve boş endonöral tüplere rastgele girerler. Bunun sonucunda rejeneren olan aksonların çoğu kendi orijinal hedeflerini sinirlendiremez ve bu yanlış yönlendirme memelilerdeki optimal fonksiyonel iyileşmenin sağlanamamasındaki en büyük problemlerden birisi olarak bilinmektedir [18].

Distal sinir kökündeki çok sayıda değişiklik, uygun büyüme ortamını sağlamaktadır. Bu uygun büyüme ortamı, istilacı makrofajlar ve yerli Schwann hücrelerinin etkili fagositozunun ve nöron dışı hücreler ve ekstraselüler matriks tarafından sağlanan nörotrofik desteğin ve substrat desteğinin sonucudur. Yerleşik olarak bulunan nöron dışındaki hücreler; Schwann hücreleri, endo-, peri- ve epinöryumun fibroblastları ve yerel makrofajları içerir ve her biri sinir hasarına yanıt vermektedir [18].

1.6.1.3. Wallerian Dejenerasyonu

Hasar sonrası distal sinir kökündeki ilk değişiklikler dejeneratiftir ve parçalanmış aksonların ve miyelin artıklarının uzaklaştırmasını içeren 'Wallerian dejenerasyonu' ile ilişkilidir. Akson hasarının distalinde, sinir hücre gövdesi ile bağlantısı kesilmiş dalların fagosite edilerek kaybolmasına, Wallerian dejenerasyonu adı verilmektedir. Bu süreç sonunda, geriye bir bağ dokusu iskelesi ile destekleyici Schwann hücrelerini içeren denerve bir distal sinir ucu kalmaktadır. Hem Schwann hücreleri hem de makrofajlar fagositoz yapar; ancak aktivitelerinin zamanı ve mekanizması farklılık göstermektedir. Yaralanmadan sonraki iki gün boyunca makrofaj göçü en az seviyededir ve fagositoz baskın olarak Schwann hücrelerince gerçekleştirilirken; daha sonra makrofajlar ana katılımcı haline gelmektedir. Wallerian dejenerasyonu, aksonların yeniden uzamasını destekleyen bir mikroçevre oluşturulmasında önemlidir [13, 16, 18].

Makrofajların fagositik aktivitesi, miyelinle ilişkili olan inhibitör maddeleri uzaklaştırarak sinir rejenerasyonunu doğrudan etkilerken; başarılı hücre onarımı için önemli olan çok sayıda faktörü salgılayarak da dolaylı olarak etkiler. Miyelin ve aksonları uzaklaştırarak distal sinir kökünün endonöral kılıfını boşaltmak, rejenerasyonun gerçekleşmesi için hayati önem taşımaktadır. Çünkü rejenere olan aksonlar dejenere olmamış bir sinire yönlendirildiklerinde, aksonal büyüme gerçekleşmemektedir. Dejenere olmamış sinirin miyelininde rejenerasyonu inhibe eden bazı maddelerin varlığı kanıtlanmıştır. Olası inhibitörlerden biri, miyelin-ilişkili glikoprotein (myelin-associated glycoprotein, MAG)dır ve nörit büyümesini etkili şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. Makrofajlar tarafından mitojenler ve sitokinler de salınmaktadır. Mitojenler, Schwann hücreleri ve fibroblastları, sitokinlerse sinir kılıfındaki nöron dışı hücreler ve kan damarlarındaki endotel hücreler tarafından büyüme faktörlerinin ve adezyon moleküllerinin sentezini uyarmaktadır [18].

Hasar öncesi mitotik olarak durgun olan Schwann hücreleri, aksonal iletişim kaybolunca ve distal sinir köküne makrofaj göçü başlayınca, prolifer olmaya ve endonöral tüpün boş bazal membranı boyunca doğrusal diziler (Büngner bantları) oluşturmaya başlarlar. Olgun nöronların, iletili moddan büyüme moduna dönüşüne benzer şekilde, Schwann hücreleri de distal sinir kökünde, rejenere olan aksonların büyümelerini desteklemek için elektriksel olarak aktif olan aksonların miyelinlenmesini gerçekleştirmek üzere fonksiyon değiştirirler. Sinir hasarı sonrası üç gün içinde, Schwann hücrelerinde DNA ve RNA sentezi artmaktadır. Po proteini, miyelin temel proteini (myelin basic protein, MBP), miyelin ilişkili glikoprotein (myelin associated glycoprotein, MAG) ve periferel miyelin protein 22 (peripheral myelin protein 22, PMP22) gibi miyelin ilişkili proteinleri kodlayan genlerin ifadeleri azalırken, normalde sadece miyelinsiz aksonlarda ifade edilen, Nörotrofin reseptörü p75 ve büyüme ilişkili protein 43 (Growth associated protein 43, GAP-43) gibi proteinlerin miktarları artmaktadır [13, 16, 18].

Miktarları artan diğer proteinler;

a) Normal periferel sinirde, miyelin oluşturmayan Schwann hücrelerince seçici olarak ifade edilen transkripsiyon faktörleri; c-fos ve c-jun gibi.

b) Nörotrofik faktörler; nörotrofin ailesinin üç üyesini içerir; sinir büyüme faktörü (nerve growth factor, NGF), nörotrofin 4/5 (neurotrophin 4/5, NT-4/5), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (brain derived neurotrophic factor, BDNF) ve bunların düşük affiniteli reseptörü (p75), epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF) ve reseptörü, insülin benzeri büyüme faktörleri I ve II (insulin-like growth factor, IGF-I ve IGF-II) ve Glial- Hücre Kökenli Nörotrofik Faktörler (glial cell line- derived neurotrophic factor, GDNF).

c) Hücre adezyon molekülleri (cell adhesion molecules, CAMs), L1, N-CAM, N-cadherin gibi.

d) Bazal membran bileşenleri, laminin, fibronektin, trombospondin, çeşitli proteoglikanlar, kollajenler, tenascin/ entactin/ J1.

Yaralanma sonrası, distal sinir kökündeki tüm DNA sekanslarının %1'inden azı indüklenir ya da baskılanır. En bol bulunan mRNA sekansı, Schwann hücrelerince ifade edilen ara filament proteini vimentine aittir ve denerve distal sinir kökünde çok fazla bulunduğu immunohistokimyasal olarak da gösterilmiştir. Bu moleküllerin çoğu, normal sinirdeki miyelin oluşturmayan Schwann hücrelerince ifade edilir ve rejenere olan aksonları destekler [18].

1.7. Rejenerasyonla İlgili Moleküller

Akson rejenerasyonunu doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyen moleküller, nörotrofik faktörler, hücre adezyon molekülleri ve ekstrasellüler matriks proteinleri olmak üzere genel olarak üç gruba ayrılmaktadır. Bununla birlikte, bizim de çalışmamız sonucunda tanımladığımız ve akson rejenerasyonunda etkili olabileceği bilinen proteinler Çizelge 3.9'da verilmiştir. Bu proteinlere bulgular bölümünde ayrıntılı olarak yer verilmiş ve fonksiyonları tartışılmıştır.

1.7.1. Nörotrofik Faktörler ve Reseptörleri

Yaralanan sinirlerdeki distal sinir kökünde nörotrofik faktörlerin artması ve akson rejenerasyonu ve hedefin yeniden sinirlendirilmesi sonrasında tekrar normal seviyelerine inmesi, bu faktörlerin rejenerasyon ile doğrudan ilişkili olduklarını göstermektedir[18].

Rejenerasyon sürecinde çok sayıda moleküler olay yer almaktadır. Büyüme konisinin güçlenmesini sağlayan stathmin, GAP-43, CRMP-2 (collapsin response mediator protein 2) gibi aksonal büyümeyi destekleyen protein seviyeleri artar.

Çok sayıda pozitif akson hasarı sinyalinin geriye doğru (retrograde) taşınması, rejeneratif cevabın başlatılmasında önemli rol oynar. Şaperonlar (crystallin, HSp27) ve antioksidan proteinler (Prdx2) akson rejenerasyonuna ve kollateral filizlenmeye katkı sağlar [22]. Kiffmeyer ve ark. [23], yaptıkları çalışmada ergin axolotllarda, bir plazma proteini olan transferrinin, siyatik sinirlerde sinir rejenerasyonu sırasında miktarının arttığını tespit etmiş ve immunohistokimyasal olarak hem aksonlarda hem de Schwann hücrelerinde bu proteini göstermişlerdir. Üye rejenerasyonunun her evresinde transferrinin anterograd yönde taşındığını bulmuşlardır.

Aksotomi PKA (protein kinase A) ve ERK (extracellular-signal regulated kinase 1,2) yollarının aktivasyonunu başlatmaktadır ve bunun sonucunda yeni büyüme konileri oluşmaktadır. Bu aktivasyon süreci kalsiyum içermekte ve iki enzim arasında yoğun iletişim sonucu gerçekleşmektedir. Her iki kinaz enzimi de akson büyümesiyle ilgili genlerin transkripsiyonunu indüklemektedir; ancak rejenerasyonun başlangıç cevabı olarak aksotomiden sonraki ilk birkaç saat içinde, yeni gen ifadesi mümkün değildir. Ergin sıçan dorsal kök gangliyonlarında ve hücre gövdelerinden ayrılmış embriyonik civciv aksonlarında da yeni büyüme konilerinin olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle, aktive olmuş PKA ve ERK enzimlerinin lokal hedeflerin fosforilasyonu ile hücre iskeletinde değişikliklere neden olduğu düşünülmektedir. PKA'nın, aktin dinamiklerinde temel düzenleyici olan, Rho GTP-ase aktivitesini ayarlayabildiği, ERK'in ise mikrotübül ilişkili proteinleri ve nörofilamentleri fosforile ettiği bilinmektedir. ERK ve PKA'nın, hücre iskeleti proteinlerinin doğrudan düzenlenmesinin yanı sıra, aksonlarda bulunan mRNA'lardan büyüme ilişkili proteinlerin sentezini de destekleyebileceği düşünülmektedir [24].

Hasar sonrası aksonlarda sentezlenen bir diğer protein grubu da importin/karyopherin α ve β aileleridir. Hanz ve ark. [25] importinlerin, aksonlarda hücre gövdesinden önemli uzaklıklarda bulunduğu ve importin β proteininin aksonal mRNA'nın lokal translasyonu sonucu hasarlı sinirde arttığını göstermişlerdir. Çalışma sonucunda, importin α proteininin aksonlardaki retrograde motor dinein ile ilişki kurarken, importin β 'nin sadece mRNA olarak bulunduğu görülmüştür. Lezyon sonucu, importin β 'nin lokal sentezi, dinein'e bağlı yüksek affiniteli α/β -heterodimerinin oluşumuna neden olmaktadır.

Aksoplazmadaki nükleer lokalizasyon sinyalleri (nuclear localization signal, NLS) taşıyan sinyal proteinleri, fosforilasyon gibi bazı modifikasyonları sonucunda, α/β yüksek afiniteli NLS bağlanma bölgesine bağlanan sinyal taşıyıcı sistemi oluşturarak, retrograde taşıma yolağına ulaşmaktadır [25].

Yapılan son çalışmalar, lokal protein sentezinin, sentez bölgesinde fizyolojik yanıt oluşturarak, aksonal taşıma yönlerinin belirlenmesinde de rol aldığını göstermektedir. Geleneksel yaklaşımla, akson proteinlerinin tek kaynağının hücre gövdesi olduğu düşünölmekteydi. Ancak dendritlerdeki postsinaptik bölgelerin altında bulunan poliribozomların keşfi ve dendritlerde çok sayıda mRNA türünün bulunuyor olması, nöronlardaki protein sentezinin bölümlere ayrıldığı fikrini doğurmuştur. Yapılan son çalışmalarla aksonlar üzerinde de protein sentezinin gerçekleşebildiğı kanıtlanmıştır [26, 27].

Periferal akson lezyonlarının iç büyüme kapasitesini aktive etme mekanizması şu şekildedir: Hücreler arası siklik adenozin monofosfat (cAMP) periferal sinir lezyonu sonrasında artmaktadır. cAMP aktivitesi protein kinaz A (PKA) aracılığıyla başlamaktadır. PKA, hücre iskeleti organizasyonunu Rho'yu inaktive ederek ve aksonun uzamasını destekleyerek gerçekleştirmektedir. cAMP ve PKA'nın rejenerasyon üzerindeki etkileri, transkripsiyona bağlıdır. Birçok gen periferal sinir hasarı sonrasında transkripsiyonel olarak düzenlenir. Poliamin sentezine katılan bir enzim olan Arjinaz I miktarı, periferal sinir hasarı sonrasında cAMP ve PKA tarafından arttırılır. Poliaminler akson rejenerasyonu için gerekli olan diğer genlerin ekspresyonlarını indükleyebilir ya da doğrudan hücre iskelet düzenini etkileyerek aksonun uzamasını destekler [19].

Hücre içi büyüme kapasitesinin aktive edilmesi rejenerasyon yeteneğini arttırmaktadır, ama fonksiyonel rejenerasyon uygun bir çevreye ve aksonların doğru hedeflere yönlenmelerini sağlayan rehber işaretlere de bağlıdır. Rehber moleküller, periferal sinirlerde ifade edilen, hücre dışı matriks proteinlerine ve nöronal adezyon moleküllerine bağlı olabilmektedir [19].

Aksotomi öncesinde, hasarsız akson, importin β 1 ve vimentini de içeren, birçok nöronal proteinin transkriptlerini içermektedir. Aksonda bulunan importin α 3 proteini, dineinle kompleks oluşturmaktadır. Aksotomi ile, aksonun distal kısmı Wallerian dejenerasyonuna girer ve hedef dokusunun inervasyonu sonlanır.

Büyüme konisi oluşumu, rapamisin (TOR) ve kaspaz-3 bağımlı proteozom aracılı yolaklar üzerinden, lokal protein sentezini gerektirir. Aksotomi aynı zamanda, aksonal importin β 1 ve vimentin mRNA'larının translasyonunu da tetikler. Vimentin proteini, proteolitik proteinler oluşturan, kalpain kırığına geçer ve fosfo-Erk'i importin β 1'e bağlar. Bu daha sonra importin α 3-dinein kompleksine bağlanır ve retrograde olarak hücre gövdesine taşınır, sonuçta rejeneratif kapasite artmış olur. Lokal protein sentezini ve proteolizisi başlatan ilk sinyal bilinmemekle birlikte, aksotomi sonrasında kalsiyum miktarındaki artışın büyüme konisi oluşumu için gerektiği bilinmektedir [28].

Nörotrofinlerin akson rejenerasyonu üzerine doğrudan etkileriyle ilgili az sayıda kanıt vardır. Ancak, nörotrofinlerin, büyüme ortamında, nöron dışı hücreler aracılığıyla etkilerini gösterdikleri kanıtlanmıştır. Kesilen siyatik ya da fasiyal sinir uçları arasındaki silastik sinir köprülerine NGF uygulandığında, rejenerasyon hızı artmaktadır. Rejenerasyon hızındaki bu artış, nöron dışı hücrelerin odacıklar içine doğru büyümesindeki artış ile ilgilidir. Schwann hücrelerinin bu odacıklara göçü, rejenerasyon için bir ön koşuldur ve rejenerasyon hızında NGF uygulaması sonucu artış, NGF'nin nöron dışı hücrelerin göçünü destekleyici dolaylı etkisine bağlıdır. NGF'nin rejenere olan aksonlar üzerinde büyümeyi doğrudan destekleyici bir etkisi bulunmamaktadır. NGF'nin silikon köprüler ile rejenerasyon üzerindeki bir diğer etkisi de, anjiyogenezi arttırması ve rejenere olan aksonlara kan akışını sağlamasıdır. Ezik hasarı modelinde duyu nöronları üzerine NGF'nin etki etmemesi, ezilmiş periferel sinir hasarlarında, nöron dışı hücrelerin ve kan akışının aksonal büyüme üzerinde sınırlayıcı etkisinin olmadığına göstergesidir [18, 26].

Sitokin ailesinin nörotrofik faktörleri olan kirpiksi nörotrofik faktör (CNTF), interlökin-6 (IL-6), oncostatin M (ONC), granülosit koloni uyarıcı faktör (GCSF) ve lösemi inhibe edici faktör (leukemia inhibitory factor, LIF), aynı reseptör bileşenlerine bağlanır ve JAK/STAT sinyal yolunu kullanırlar. Yaralanma sonrasında, hem merkezi hem çevresel sinir sisteminde bu moleküllerin ifadelerinin artması, en azından yaralanma sonrası ilk ay boyunca bu moleküllerin yaralı nöronların hayatta kalmasını desteklediğini düşündürmektedir. CNTF'nin ezik ya da kesik yaralanmalarında akson rejenerasyonuna katıldığı kanıtlanmıştır. CNTF'nin sistemik ya da lokal enjeksiyonu, aksonal uzama hızını,

yeniden sınırlendirilen kas uç plaka sayısını, kas kütlesini ve fonksiyonel iyileşmeyi arttırmaktadır [18].

Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF), akson rejenerasyonunu, proksimal ve distal sinir uçları arasındaki kollajen kaplı sinir ya da sentetik köprüler arasında akson uzamasını arttırmaktadır [18].

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörlerinin (IGFs), distal sinir kökünde aksotomi sonrasında miktarları artmakta ve aksonlar proksimal uçtan distal sinir köküne kadar rejenere olduklarında miktarları azalmaktadır [18].

1.7.2. Hücre Adezyon Molekülleri

Hücre adezyon molekülleri aksonlar, Schwann hücreleri ve bazal membran arasındaki ara birimi oluşturmaktadır. Bu moleküller, membran ve moleküllerin hareketleri için gerekli hücre dışı yakalama (clutch) alanları sağlamaktadır. Adezyon molekülleri sinir rejenerasyonu sırasında, bazal membranlarla, Schwann hücrelerinin rehber uzantılarıyla ya da öncül aksonlar rehberliğinde demet halinde uzamakta olan diğer aksonlarla birlikte akson uzamasına destek olmaktadır. Ayrıca, hücre adezyon moleküllerinin hücre iskeleti elemanlarıyla bağlantıları da hücre hareketini etkilemektedir. Nöronlar, Schwann hücreleri ve komşu bazal membranlar tarafından ifade edilen ve akson uzamasını etkileyen çok sayıda adezyon molekülü vardır. Sinir rejenerasyonunda görev yapan hücre adezyon molekülleri, yapısal özelliklerine göre, cadherinler, integrinler ve immunoglobulin-benzeri moleküller olmak üzere üç ana aile içinde gruplandırılmaktadır. Rejenerasyon sürecinde, miyelin yapıcı bir fenotipten, miyelin yapmayan bir fenotipe geçiş, immunoglobulin süper ailesine üye L1/ Ng-CAM/NILE, N-CAM ve N-cadherin gibi hücre adezyon moleküllerinin ve laminin, kollajen, fibronektin, tenascin-C gibi ekstraselüler matris proteinlerinin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu moleküllerin çoğu akson ve akson, akson ve Schwann hücresi, akson ve bazal membran arası adezyona katılarak, distal sinir kökündeki akson büyümesini düzenlemektedir [13, 18, 29].

N-cadherin normalde, diğer Schwann hücreleri ve miyelinsiz akson membranlarıyla iletişim halinde olan tüm Schwann hücre membranlarında ifade edilmektedir. Yaralanma sonrası proliferen olan Schwann hücreleri, distal sinir köklerinde N-cadherin ekspresyonuna devam etmektedir. Aksonlar distal sinir köküne kadar rejenere olduklarında, N-cadherin immunoreaktivitesi, akson ve

Schwann hücre membranında, akson- akson ya da akson-Schwann hücresinin temas ettiği noktada sınırlanır. Bu durum, N-cadherinin, akson ve Schwann hücreleri arasında adezyonu sağlayarak aksonal büyümeye katıldığını düşündürmektedir [18].

1.7.3. Ekstraselüler Matriks Proteinleri

Ekstraselüler matriks bileşenleri sinir sisteminin gelişiminde ve rejenerasyonunda yer alan diğer faktörler arasındadır. Bazal lamina ve endonöriumdaki moleküller, periferel sinirlerin Schwann hücreleri ve fibroblastları tarafından sentezlenip salınan, farklı bir nörit uyarıcı molekül sınıfını içerir. Bunlar; laminin, fibronektin, entaktin/J1/tenaskin, heparan sülfat proteoglikan (HSPG), tip IV ve V kollajenler ve değişik miktarlarda fibronektini içermektedir. Bazal laminanın, Schwann hücrelerince onarılması için aksonal temas gereklidir. Ancak, bazal laminanın, laminin gibi bazı bileşenleri denerve durumlarda da sentezlenmeye devam etmektedir. Laminin ve HSPG proteinleri antikoları ile incelendiğinde, distal sinir kökündeki bazal laminanın, yaralanma sonrası 3-4 hafta bozulmadan kaldığı erken morfolojik çalışmalarla desteklenmiştir. Daha uzun süreler sonrasında, Schwann hücresi bazal laminası parçalara ayrılmakta ve rejenerasyonun gerçekleşmemesi halinde, laminin mRNA'sı ve immunoreaktivitesi azalmaktadır [18, 29].

Laminin rejenere olabilen sinir sistemlerinde bulunurken; rejenere olamayan sinir sistemlerinde bulunmamaktadır. Bu durum, lamininin başarılı bir akson rejenerasyonu için bir ön koşul olduğunu göstermektedir. Periferel sinirlerin bazal laminasında laminin bulunması rejenerasyon yeteneğinin varlığıyla ilişkilidir ve merkezi sinir sistemi aksonlarının periferel sinir greftlerinde büyümesi de bunun göstergesidir. Başarılı bir rejeneratif yanıt için, hem laminin hem de Schwann hücrelerinin ortamda bulunması gereklidir. Rejenere olan aksonların, distal sinir kökünde, Schwann hücreleri ile bazal membran arasında hareket etmeleri de, bu sonucun göstergesidir. Tenascin C, normalde Ranvier boğumu etrafındaki ekstraselüler matriks ile perinörium arasında sınırlandırılmıştır. Yaralanma sonrası, tenascin-C distal sinir kökünün uzunluğu boyunca, proksimal ve distal sinir kökleri arasındaki köprüden ifade edilmektedir. İmmunoreaktivitesi, Schwann hücresi bazal laminası ile ilişkilidir. İn vivo, distal sinir kökünde tenascin pozitif bölgelerin rejenere aksonlarla yakın ilişkide olduğu gözlenmiştir [13, 18].

Periferal sinir sistemi aksonlarının rejenerasyonunu oluşturan çevre, Schwann hücreleri ve bazal laminaları, fibroblastlar, kollajen, dejenere olan miyelin ve fagositik hücrelerden oluşmaktadır. Bu bileşenler arasında, Schwann hücreleri akson rejenerasyonu için vazgeçilmez elemanlardır. Yara bölgesindeki Schwann hücreleri uzaklaştırıldığı zaman akson büyümesinde azalma görülür. Sinir hasarına bağlı akson kesilmesini takiben, Schwann hücreleri sabit miyelin yapısının bulunduğu durgun bir evreden, proliferatif ve trofik bir evreye geçerek, sinirsel iletimi kolaylaştıran ve sinir rejenerasyonunu teşvik eden bir çevre oluşturmaktadır. Sakatlanmaya bağlı akson kopmasından birkaç gün sonra, miyelin lipitleri ve miyelin proteinlerini de içeren miyelin bileşenleri önemli şekilde azalırken; distal uçtaki Schwann hücrelerinde bazı proteinlerin ifadeleri artar. Bunlar nöronun hayatta kalmasını ve sinir rejenerasyonunu destekleyen nörotrofik faktörler olan; sinir büyüme faktörü (NGF), beyin kaynaklı nörotrofik faktör (BDNF), insülin benzeri büyüme faktörü-1, glial hücre kaynaklı nörotrofik faktör ve aksonlarla Schwann hücreleri arasındaki bağlantıların kurulmasını sağlayarak nöritlerin büyümesini destekleyen L1 hücre adezyon molekülü, nöral hücre adezyon molekülü (N-CAM) ve N-kaderin gibi hücre adhezyon molekülleridir [30].

1.8. Rejenerasyon Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler

1.8.1. Periferal Sinir Sistemi Rejenerasyonu İlgili Davranış Çalışmaları

Periferal sinir rejenerasyonu çalışmalarında deneysel siyatik sinir hasarı yaygın kullanılan bir yöntemdir. Siyatik sinir hasarı oluşturulmasında en çok kullanılan yöntemler ise, sinirin tamamen kesilmesi (neurotmesise benzer şekilde), ezik hasarı (axonotmesise benzer) ve kronik konstriktif hasarlar (neuropraxiaya benzer şekilde)dir [19].

Periferal sinir çalışmalarında model hayvan olarak en çok tercih edilen grup sıçanlardır. Sıçanlarda fonksiyonel periferal sinir iyileşmesinin ölçülmesi için, yürüme şablonu (walking track) analizi uygun bir yöntemdir. Ayak izleri incelenerek arka üyelerin performansının analiz edilmesine dayanan bu nicel yöntem, Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFI) olarak bilinir ve bazı eksik yönleri olmasına karşın, çok çeşitli siyatik sinir hasarlarında fonksiyonel iyileşmenin değerlendirilmesi için geniş ölçüde kullanılmaktadır [31].

Nöral rejenerasyon deneylerinde kullanılan, periferel sinir hasarı ve iyileşmesinden sonra uygulanan elektrofizyoloji ve histomorfometri gibi geleneksel yöntemler, motor ve duyu fonksiyonlarının geri kazanımıyla yeterli derecede bağlantılı değildir. Bu nedenle, sinir iletim hızı, aksiyon potansiyel şiddeti, bileşik aksiyon potansiyel alanı gibi elektrofizyolojik parametrelerin ekstrapolasyonu, fonksiyonun geri kazanımıyla ilgili eksik yorumlara neden olabilir. Davranış testlerinin tercih edilmesinin nedeni, canlıya herhangi bir cerrahi uygulama yapılmaksızın, rejenerasyon sürecinin dışarıdan gözlenmesini olanaklı kılmasıdır. Siyatik sinirin; tibial, peroneal ve sural sinirler olarak adlandırılan kolları, arka bacağın farklı bölgelerinde bulunan kaslara, deri reseptörlerine, damarlara, ter bezlerine doğru farklı oranlarda motor, duyu ve otonom sinirlere ait aksonlar iletir. Bu nedenle, siyatik sinirdeki herhangi bir hasar, canlının arka üyelerinin hareket şekli, vücuda göre konumu, ayakların zemine uyguladığı basınç, parmakların konumu gibi türün hareket modeliyle ilgili çok sayıda özelliğin etkilenmesine yol açmaktadır. Ayak tabanının en lateral bölgesine düşük bir elektriksel akım uygulandıktan sonra alınan tepkinin ölçülmesi, sadece periferel sinir hasarından sonra duyu fonksiyonunun geri kazanımını göstermektedir. Akson sayımı ve miyelinizasyon derecesi çalışmaları sonucunda, aksonların uygun hedef organlara ulaşım ulaşımadığının anlaşılması ise mümkün değildir. Kapalı bir yürüme yolu kullanılarak sıçanlarda yürüyüş şeklinin analizi ile 1979 yılında Hruska ve arkadaşları, hareket yeteneğinde bozukluklara neden olan nörolojik hastalıkların hayvan modelleri üzerinde çalışılabilmesi için, yeni ve görece daha kolay bir yöntem geliştirmiştir. Sıçanlarda normal yürüme şablonunun analizi, serbest ve doğal hareketin hayvanlarda oldukça tutarlı ve ölçülebilir olduğunu göstermiştir. Yürüme şekli analizlerini de içeren, nörodavranışsal testlerin standart bir takımı, çeşitli ataksik sendromların belirlenmesi, ölçülmesi ve ayırt edilmesinde hassas ve güvenilir teknikler sağlamıştır [32]. Newby- Schmidt ve Norton (1981), tavuklardaki motor fonksiyonun değerlendirilmesi için tavuk ayak izlerinin kaydedildiği yeni bir metot tasarlamıştır [31]. De Medinaceli ve arkadaşları [33], sıçanlardaki siyatik sinir fonksiyonunun analizi için, X-ray filmi üzerindeki ayak izlerinin çeşitli ölçümlerine dayanan, Siyatik Fonksiyon İndeksi (SFI) olarak da bilinen, nicel bir yöntem geliştirmiştir. Birçok araştırmacı SFI'yi siyatik sinir lezyonları ve iyileşmesinden sonra arka üyelerdeki fonksiyonun ölçülmesinde güvenilir ve ayak izlerinden

yürüme şablonlarının ölçülmesi ile kolaylıkla belirlenebilen bir yöntem olarak kullanmıştır [31]. Bervar [34], sabit koşullar için, statik siyatik indis (SSI) adı verilen, yeni bir fonksiyonel kayıp indisi oluşturmuştur.

Ayak izlerinden çok sayıda ölçüm alınmaktadır: (i) topuk ile üçüncü parmak arası uzunluk, iz uzunluğu (print length, PL); (ii) birinci parmak ile beşinci parmak arası uzunluk, parmak açıklığı (toe spread, TS); (iii) ikinci parmak ile dördüncü parmak arası mesafe, ara parmak mesafesi (intermediary toe spread, ITS). Tüm ölçümler, hem uygulama hem de kontrol gruplarından alınmaktadır. SFI, ilk olarak De Medinaceli ve arkadaşları (1982) tarafından geliştirilmiş, daha sonra Carlton ve Goldberg (1986) tarafından formül üzerinde bazı değişiklikler yapılarak, SFI yeniden düzenlenmiştir [31]. Bain ve ark. (1989), De Medinaceli ve ark. ve Carlton ve Goldberg tarafından geliştirilen siyatik fonksiyon indislerinden elde edilen değerlerin, oluşturulan sinir lezyonları için belirleyici olmadığını bildirmiştir. Bu nedenle, SFI, şu şekilde yeniden şekillendirilmiştir: (i) iz uzunluğu faktörü (print length factor) (PLF)= (EPL-NPL)/NPL; (ii) parmak açıklığı faktörü (toe spread factor) (TSF)= (ETS- NTS)/ NTS; (iii) ara parmak açıklığı faktörü (intermediary toe spread factor) (ITF)= (EIT-NIT)/NIT. Bu faktörler daha sonra Bain- Mackinnon- Hunter (BMH) siyatik fonksiyon indisi formülü ile birleştirilmiştir ve şu formül geliştirilmiştir: $SFI = - 38,3 \times PLF + 109,5 \times TSF + 13,3 \times ITF - 8,8$. SFI değeri sıfır olduğunda normal; - 100 olduğunda ise, siyatik sinirin bütün olarak kesilmesinde olacağı gibi, tamamen sakat olduğunun göstergesidir. Yürüme şablonu analizi, arka üye kas fonksiyonları ile iz ölçümleri arasında doğrudan ilişki olduğunu göstermiştir [31, 34].

Hare ve ark. [35], siyatik sinirin kesilmesinin ardından hayvanların yarısında kasılma olduğunu gözlemiştir. Bu sorun nedeniyle, tibial fonksiyon indisi (TFI) ve peroneal sinir fonksiyon indisi (PFI)'nin da kullanılmasını önermişlerdir. Sinir kesimi ve iyileşmesinden sonra, SFI, TFI ve PFI'yi karşılaştırarak, fonksiyonel iyileşme seviyesinin ilgili sinire göre farklılık gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu değerleri ise şu şekilde belirlemişlerdir: SFI, % 41; TFI, % 54; PFI % 100 [35].

Inserra ve ark. [36], sinir hasarları sonrasındaki fonksiyonel iyileşmenin gösterilmesi için, sıçanlardaki SFI'den yola çıkarak; siyatik, peroneal ve posterior tibial sinir hasarları için farelerde kullanılmak üzere, fonksiyonel indisler geliştirmiştir.

Dijkstra ve ark. [37]'de, sıçanlardaki geri çekme refleksi, elektriksel uyarı verilerek sağlanmıştır ve duyu sinirlerinin fonksiyonlarını kazanıp kazanmadığının gözlenmesinde kullanılmıştır. Motor sinirlerin iyileşmelerini gözlemek içinse, yürüme modelleri kullanılmıştır.

Yaralanmadan sonra motor sinir iyileşmesinin gösterilmesinde, ayak izlerinin kaydedilmesi ile sıçanların yürüyüş modelinin incelenmesi, iyi geliştirilmiş ve geniş çapta uygulanan bir yöntemdir [33, 35, 37]. Ancak sıçanlar parmaklarını sakatladığında ya da parmaklarda kasılmalar oluştuğunda problemler ortaya çıkmıştır. Yürüme modellerinin video kaydının yapılması bu çalışmalar için umut verici bir yöntemdir [38, 39]. Dijkstra ve ark. [37]'de, sıçanlarda fonksiyonel sinir iyileşmesinin ölçülmesi için farklı yöntemler araştırılmıştır. Duyu sinirlerinin iyileşmesinin ölçümü için geri çekme testleri uygulanırken; motor sinir iyileşmesinin gözlenmesi için üç farklı yöntem karşılaştırılmıştır. Fotoğraf kağıdı ile sıçan arka üyesinde film banyo ilacını; normal kağıt ile ayak izi boyasını ve video kayıtlarını kullanmıştır. Bu çalışmadan önce siyatik fonksiyon indislerinin ölçümünde video analizlerinin kullanıldığı bir kaynak bulunamamıştır. Çalışmanın sonucunda, fonksiyonel motor sinir iyileşmesinin ölçümünde, yürüme hareketlerinin ve adımların analizleri için video kayıt yönteminin kullanılmasının tam ve kesin sonuçlar verdiği bulunmuştur [37].

Periferik sinir sisteminde mekanik hasar oluşturulduğunda, nöron içindeki mikrosirkülasyon da zarar görür. Bu etkiye bağlı olarak, demiyelinizasyon, remiyelinizasyon, aksonal dejenerasyon ve rejenerasyon, fokal, multifokal ya da difüz sinir fibrili kayıpları ve endonöral ödemler oluşabilir. Ayrıca serbest oksijen radikallerinin arttığı ve dokuda tahribata neden olduğu da bilinmektedir. Aksiyon potansiyel genliği, alanı ve latensinin ölçülmesi, zardan sodyum ve potasyum taşınımı ile ilgili bilgi verebilir. Bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) genliği, alanı ve latensi, sodyum taşınımı ve aksiyon potansiyeli ile pozitif korelasyon gösterir ve aktive edilmiş sinir fibrili sayısının tahmininde kullanılabilir [40].

Kropf ve ark. [15], axolotlarda yaptığı siyatik sinir rejenerasyonu çalışmasında, rejenerasyonun gösterilmesi için fonksiyonel yüzme analizleri yapmış ve alınan sonuçları elektrofizyolojik ve radyografik ölçümler ile desteklemiştir. Yüzme analizleri, sıçanlarda siyatik sinir hasarı sonrasında kullanılan yürüyüş analizi (video gait analysis) metodunun semenderlere uyarlanmış modeli üzerinden

yapılmıştır. Sürekli ve tek yönlü su akıntısı oluşturulan yüzme tankında axolotların ritmik yüzme hareketi göstermeleri sağlanmıştır. Dijital video ile kaydedilen görüntüler üzerinden arka üyelerin eklem açıları ölçülmüştür. Siyatik sinirler dışarı çıkarıldığında doğrudan elektrofizyolojik ölçümler alınmış, ayrıca arka üyelerinin distal kas yapıları da radyografik görüntüleme ile kontrol edilmiştir [15].

1.8.2. Periferel Sinir Rejenerasyonu Çalışmalarında Elektrofizyolojik Ölçümler

Periferel sinir hasarı sonrasında sinir dokusundaki iyileşmenin tespit edilmesinde kullanılan yöntemlerden biri de elektrofizyolojik ölçümlerdir. Dokuda hasar oluştuktan sonra gelişen ilk yanıtlardan biri dokunun elektriksel yapısındaki değişikliklerdir. Rejeneratif yanıtın başlatılmasında bu değişimin de etkisi olduğu düşünülmektedir. Ancak bu ölçümler motor ve duyu fonksiyonlarındaki geri kazanımla her zaman doğrudan ilişkili olmayabilir. Nöronal sinyaller, akson membranındaki elektriksel farklar aracılığıyla kontrol edilmektedir. Elektrofizyolojik ölçümler kapsamında, elektromiyografi (EMG) kayıtları alınmaktadır. EMG, uyarı sonucu kasta oluşan elektriksel aktivitenin kaydedilmesidir. Nöral rejenerasyonun belirlenmesinde kullanılan ölçümler, iletim hızı ve bileşik kas aksiyon potansiyelidir. Rejenerasyon sonrasında yeniden sinirlenme etkisi sonucu, bileşik kas aksiyon potansiyeli ölçümleri dolaylı olarak rejenerel olan aksonların sayısını yansıtmaktadır. Motor birim sayıları, kası uyaran sinirin maksimum uyarımı için oluşturulan EMG dalgasının genliğinin, ilk 5-15 motor birim potansiyellerinin ortalama genliklerine bölünmesi ile belirlenebilmektedir. EMG ile sinirin cilt yoluyla uyarılması ve kas içi kayıt alma imkanları nedeniyle uzun süreli ölçümlerin yapılması sağlanabilmektedir.

1.8.3. Periferel Sinir Dokusunun Proteomik Tabanlı Çalışmalarla Değerlendirilmesi

Proteomik hasarlı ve sağlam dokular arasında, proteinler ve ifadeleri, ifade düzeylerindeki farklılıklar, proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları ve protein-protein ilişkilerindeki farklılıkların anlaşılmasında, sinyal yollarının ve biyolojik süreçlerin incelenmesinde kullanılabilir, ancak periferel sinir sisteminde proteomik analiz çalışmaları az sayıdadır [41]. Nöral dokulardaki hücre tiplerinin heterojen yapısı ve karmaşık morfoloji ve anatomileri nedeniyle, sinir dokuda proteomik çalışma yapılması zordur [42].

Biyopolimerlerin tamamen yapılandırılmamış durumdan yüksek derecede düzenli durumlarına geçişleri, yapısal biyolojide çözülmeyi bekleyen en önemli konulardan biridir. Bu kodun çözülmesindeki anahtar nokta; tanıma, transport, sinyal iletimi ve biyosentez gibi çeşitli biyolojik süreçlerin moleküler seviyede anlaşılmasından geçmektedir. Çünkü proteinlerin ve diğer biyomoleküllerin biyolojik aktivitelerindeki özgüllük, onların yüksek düzendeki yapılarından kaynaklanmaktadır. Proteinler doğal hallerinde dahi, lokal yapısal dalgalanmalardan geniş kapsamlı konformasyonel değişikliklere kadar şaşırtıcı ölçüde esneklik göstermektedir. Proteinlerin bu doğal dinamikleri genellikle fonksiyonlarının devamlılığı için hayati önem taşır ve protein yapılarının moleküler seviyede anlaşılabilmesi için bu yapıların karakterize edilmesi gereklidir [43].

Sinir rejenerasyonu çalışmalarında, lokal protein sentezinin ve translasyon sonrası modifikasyonların öneminin anlaşılması ile birlikte, protein haritalarının çıkarılması ve protein miktarlarındaki değişimlerin tespit edilmesi, rejenerasyon mekanizmasının anlaşılması için önemli hale gelmiştir. Sade oluşu, kütle bilgisindeki kesinliği, yüksek çözünürlüğü ve hassasiyeti sonucunda, MALDI-TOF halen, peptit haritalanması olarak da bilinen, proteinlerin tanımlanmasında en fazla kullanılan yöntemdir. Bu yöntemde proteinlerin tanımlanması, veritabanında bulunan her bir peptide ait hesaplanmış peptit kütlesi listesi ile deneysel olarak elde edilen peptit kütlelerinin eşleştirilmesine dayanmaktadır. Kütle haritalaması çok iyi saflaştırılmış bir hedef proteine ihtiyaç duyduğu için, bu teknik genellikle bir ya da iki boyutlu jel elektroforezi ile protein fraksiyonlanmasından sonra uygulanmaktadır [44].

Sinir dokusunun anatomik özelliği nedeniyle, özellikle periferel sinirlerde, akson uzantısıyla hücre çekirdeği arasındaki mesafe oldukça büyüktür. Biyosentez çoğunlukla hücre gövdesi ve dendritlerle sınırlı olarak gerçekleştiği için, hücrenin bu kısımlarından aksona doğru sürekli bir madde akımı olmalıdır. Bu şekilde hücre gövdesinden aksona doğru iletim anterograd aksonal taşıma olarak adlandırılırken; bu maddelerin hücre gövdesine geri dönüşü retrograd aksonal taşıma ile gerçekleşmektedir. Yapılan çalışmalar ile farklı proteinlerin akson üzerinde farklı hızlarda hareket ettiği belirlenmiştir. Anterograd taşıma kendi içinde en az beş farklı taşıma hızına ayrılmıştır. Membranöz maddelerin iletimini

içeren hızlı anterograd taşıma hızlarına göre iki alt sınıfa ayrılmaktadır. Memelilerde birinci sınıfa üye polipeptitler ~100- 400 mm/gün hızında, ikinci sınıfa üye polipeptitler ise ~20-70 mm/ gün hızında hareket etmektedir. Hareket hızlarındaki fark, taşınmakta olan membranöz organellerin boyutlarına bağlı olup, hareket mekanizmalarında herhangi bir fark bulunmamaktadır. Membranöz organellerin boyutları, aksoplazmadaki hücre iskeleti kafesi içinden geçerken taşınım hızlarının değişmesine neden olmaktadır. Üçüncü sınıfa ait polipeptitlerin taşınma hızı ~3- 20 mm/ gün olup, polipeptit içerikleri yavaş taşınan sınıflara benzemektedir. Dördüncü ve beşinci sınıf ise yavaş taşınan polipeptitlerden oluşmakta ve yavaş bileşen b ve a olarak adlandırılmaktadır. Hücre iskeleti ve bileşenleri ile sitoplazmik enzimler gibi ilişkili proteinleri içeren bu grubun taşınım hızı ~ 0.1-4 mm/ gündür. Retrograd taşınım hızları ise daha geniş bir aralığa sahip olup en fazla ~ 300 mm/gün hızına ulaştığı belirtilmektedir. Hızlı taşımada en önemli görevi mikrotübüllerin gerçekleştirdiği bilinmektedir. Aynı zamanda nöral dokularda mikrotübüllerle etkileşimde olan üç motor protein, kinesin, dinein ve dinaminin de önemli olduğu belirtilmektedir [45]. Bir akson hasarlandığında, hücre gövdesiyle bağlantılı olmayan sinir segmenti dejenere olmaktadır. Rejenerasyon sürecinde, aksonun dejenere olan kısmı, proksimal uçtaki büyüme ile kapatılmaktadır. Aktin, tubulin, nörofilamentler gibi hücre iskeleti proteinleri, bu süreçte görev almaktadır. Bu proteinler hücre gövdesinde sentezlenerek yavaş aksonal iletim ile rejenerasyon olan sinir uçlarına taşınmaktadır. Gelişmekte olan aksonlarda yüksek yoğunlukta bulunan aktin ve tubulinler, aksonal uzamada önemli görevler üstlenmektedir[46]. Ayrıca periferik sinirlerin anatomik yapıları nedeniyle, yaralanma sonrası ilk birkaç saatte gerçekleşen olaylar, hücre gövdesindeki yeni transkripsiyon sürecinden bağımsız olarak çalışır. Bu süreçte, hasarlı aksonda proteinlerin yıkımı, lokal protein sentezleri ve translasyon sonrası modifikasyonların gerçekleştiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [22, 47, 48].

Kütle spektrometresi temelli proteomik, sinirbiliminde hem temel hem de klinik araştırmalarda, protein ifade farklarının, protein-protein etkileşimlerinin ve translasyon sonrası modifikasyonların incelenmesi amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Hasar ya da hastalık sonrası aksonlardaki değişiklikler genellikle hücre gövdesindeki transkripsiyonel olaylardan bağımsız gerçekleştiği için, proteomik yaklaşımlar, özellikle sinir rejenerasyonu ve dejenerasyonu

mekanizmalarının anlaşılmasında kullanılmaktadır. Sağlıklı ve hastalıklı dokulardaki akson fonksiyonuyla ilgili bilgiler, proteolizis, lokal aksonal protein sentezi ve bir seri translasyon sonrası modifikasyonun etkili olduğunu göstermektedir. Akson dejenerasyonu ve rejenerasyonu, post-genomik süreçlerdir ve proteomik yaklaşımlar aracılığıyla aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Temel dejeneratif mekanizmaların, oksidatif stres, aksonal taşıma ve mitokondri, şaperon, ubikutin proteozom sistemlerinde fonksiyon kayıpları nedeniyle olduğu belirtilmektedir. Sinir rejenerasyonunu düzenleyen mekanizmanın da, benzer şekilde, aksonal taşıma, hücre iskeleti, şaperonlar ve bunlara ek olarak sinyal yollarındaki değişiklikler nedeniyle olduğu düşünülmektedir [22].

Nöronlar polarize hücrelerdir ve gelişmeleri ve fonksiyonlarının devamlılığı hücreler arası sinyal iletim yollarına bağlıdır. Aksonların uzunluğu genellikle nöron hücre gövdesinden daha büyüktür. Nöronların farklılaşması, hayatta kalmaları ve fonksiyonları için, anterograd (akson terminaline doğru) ve retrograd (nöron gövdesine, somaya doğru) aksonal taşıma yollarıyla uzak mesafelerdeki sinaptik gövdeler ile hücre gövdesi arasında bağlantı kurulması gerekmektedir [22].

Sinir rejenerasyonuna destek olan üç farklı hasar sinyal mekanizması vardır. Bunlar, akson potansiyellerinin hasar sonrası deşarjı, retrograd yönde hedefe doğru taşınan faktörlerin kesintisi ve hasar bölgesinden hücre gövdesine doğru retrograd yönde iletilen hasar sinyalleridir [22].

Son yıllarda çok sayıda araştırmacı aksonların yeniden büyümesinde ve onarımında, aksonal protein sentezinin rolü üzerinde çalışmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda, aksonların da dendritlere benzer şekilde, lokal mRNA'ların translasyonu yoluyla otonom olarak yeni proteinler oluşturabildiği anlaşılmıştır. Ergin nöronların aksonlarında lokal olarak sentezlenen proteinlerin rejenerasyonu kolaylaştırdığı gözlenmiştir. Safılaştırılmış aksonlar üzerinde yapılan proteomik çalışmalar, hasar sinyallerinin ve sinyal yollarının tanımlanmasını sağlamıştır [22]. Willis ve ark.[49]'nın hasarlı dorsal kök gangliyonlarından hazırladıkları kültürlerdeki safılaştırılmış aksonların metabolik işaretlenmesi sonrasında yaptıkları proteomik analizler ve revers transkripsiyon incelemeleri sonrasında, 40 adet lokal olarak sentezlenen protein tespit edilmiştir. Bu proteinler arasında, hücre iskeleti, ısı şoku proteinleri, antioksidanlar, metabolik ve resident

endoplazmik retikulum proteinleri ve nörodejeneratif hastalıklarla bağlantılı proteinler tespit edilmiştir. Jel tabanlı bir proteomik yöntem tercih edildiği için, lokal olarak sentezlenen toplam protein miktarı elde edilememiştir [49]. Perlson ve ark.[50], tatlısu salyangozu cinsi olan *Lymnaea*'nın sağlam ve hasarlı sinirlerinde farklı proteomik yöntemler kullanarak, hasar sonrası gerçekleşen retrograd sinyalleri tanımlamaya çalışmıştır. Tanımlanan 40 protein arasında, 51 kDa'luk Retrograd Protein (RGP51) bulunmaktadır ve bu protein memelilerdeki ara filament vimentinin homologudur. RNA interferens tekniği ile RGP51/vimentin fonksiyonu inhibe edildiğinde, *Lymnaea* nöron kültürlerinde rejeneratif büyümenin engellendiği gözlenmiştir. Hasarlı sıçan siyatik sinirinde, vimentinin lokal translasyonu ve proteolitik bölünmesiyle birlikte hasar sonrası motor protein dinein ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Vimentinin aynı zamanda hasar sonrasında mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) Erk1 ile etkileştiği, MAPK-Erk1'in defosforile olmasını engelleyerek; hasar sinyalinin uzun taşınımı boyunca aktivasyonunun bozulmasını da önlediği bulunmuştur. Vimentinin rejenerasyondaki önemi, vimentin taşımayan hayvanların siyatik sinirlerinde lezyon sonrası nörit uzamasının ve duyu yanıtlarının azalmasının gözlenmesiyle doğrulanmıştır. Çekirdek import sistemi (nuclear import machinery) bileşenleri de akson hasarı sonrasında lokal olarak sentezlenmekte ve MAPK hasar sinyallerini dineine bağlayarak retrograd taşınımı sağlamaktadır. Bu çalışmalar, aksonların hasara karmaşık protein populasyonları sentezleyerek cevap verebildiğini göstermektedir [22].

Sinir hasarı sonrasında, MAPK sinyal moleküllerini dinein/dinactin-bağımlı retrograd taşıma sistemine bağlayan bir diğer adaptör protein de, c-jun H-terminal kinase (JNK) scaffolding protein Sunday Driver (syd/JIP3/JSAP1)'dir. Syd ve JNK aksonlardaki vezikül yapılarında bulunur ve anterograd ve retrograd yönlerde taşınır. Sinir hasarı sonrasında, aktive olan JNK ve syd, syd ve dinein/dinactin kompleksi arasındaki artan etkileşim sonucunda, öncelikle retrograd taşınır [22]. Abe ve ark.[51]'nin yaptıkları çalışma sonucunda, syd'nin, diğer küçük anterograd vezikül sınıflarıyla etkileşim yoluyla akson büyümesini desteklediği ve büyüme yönünün belirlenmesi için rehberlik yaptığı anlaşılmıştır. Son yıllarda magnetik izolasyon ve proteomik yöntemlerle karakterize edilen bir diğer aksonal endozom grubu ise nörotrofinler ve aksonlar boyunca retrograd

yerleşen nörotrofin reseptörleridir. Akson hasarı, hücre gövdesine ulaşan nörotrofin sinyallerin miktarını sınırlayabilir ve negatif hasar sinyali oluşumuna yol açabilir. Farklı organellerin, endozomların ve protein komplekslerinin aksonal taşınımının, periferel sinirlerin rejenerasyonunu destekliyor olabileceği öngörülmektedir. Merkezi sinir sisteminde rejeneratif büyüme kapasitesinin olmaması, hasar sinyallerini oluşturmamalarına ya da iletememelerine bağlı olabilir. Periferel sinirlerde yapılan bu çalışmalar, hasar yerinin ve yapısının belirlenmesi ve hücre gövdesinde uygun cevabın oluşabilmesi için, çok sayıda hasar sinyal yolları arasındaki koordinasyonun önemini vurgulamaktadır [22].

Jimenez ve ark. [52] yaptıkları jel tabanlı proteomik çalışmada, ezik hasarının distalinde kalan sıçan siyatik sinirindeki protein ekspresyonlarında zamana bağlı değişiklikleri incelemiştir. Hasar sonrası, 5 - 35. günler arasında çeşitli zaman aralıklarıyla, hasar bölgesinin distalinde kalan parçadan siyatik sinir segment lizatı hazırlanmıştır. Bir ya da daha fazla zamanda değişiklik gösteren 121 protein, hücresel kökenlerine ve farklı fonksiyonel görevlerine göre kümelenmiştir. Stres cevabı ve hücre iskeleti ilişkili proteinler dışında, protein sentezi, olgunlaşması ve degradasyonu ile ilgili, çok sayıda daha önce sinir rejenerasyonu ile ilişkisi bildirilmemiş olan protein tespit edilmiştir. Bu proteinlerden biri, Anneksin A9/31, siyatik sinirlerde hasar sonrası artmıştır. Periferel sinir sistemi makrofajlarında bulunan Anneksin I, sinir onarımı sırasında inflamasyonun endojen düzenleyicisidir ve Anneksin III miktarı ise hasarlı motor nöronlar çevresindeki uyarılmış mikroglialarda artmıştır. Bu artış, Anneksin III'ün, hasar sonrası mikroglialardaki morfolojik değişimlerden sorumlu olabileceğini göstermektedir. Ancak bu çalışmada, sinir hasarı sonrasında Schwann hücrelerinde indüklendikleri bilinen reseptörler, sitokinler, büyüme faktörleri gibi, düşük yoğunluktaki proteinler tespit edilememiştir. Bu durum, jel tabanlı yaklaşımların, *in vivo* siyatik sinir ezik hasarlarında düşük yoğunluktaki proteinlerin belirlenmesi için yeterli hassasiyete sahip olmadığını göstermektedir [22, 52].

Periferel sinir rejenerasyonuna neden olan moleküler ve hücresel değişiklikler oldukça karmaşıktır ve bu süreçte etkili olan proteinlerin tanımlanması nöral rejenerasyonla ilgili bilgilerin aydınlatılmasında önemlidir. Rejenere olan sinirlerdeki protein ifade modellerinin proteomik analizleri, proteinleri ve protein

izoformlarını doğrudan inceler ve sınırlarda, nöron hücre gövdelerinde ve dolaşım gibi dış kaynaklarda bulunan proteinlerin tespit edilmesini sağlar. Proteomun kalitatif ve kantitatif incelenmesi, yüksek çözünürlüklü ve kantitatif protein ifade haritalarının elde edildiği iki boyutlu jel elektroforezi ve sonrasında belirlenmiş proteinlerin tanımlandığı kütle spektrometresi yöntemlerinin birleştirilmesi ile gerçekleştirilebilir [52]. Memeli nöronlarında aksonal lezyon bölgesi ile hücre çekirdeği arasındaki mesafe birkaç santimetreye kadar, insanlarda ise 1 metreye kadar ulaşabilmektedir. Bu nedenle, yaralanma sonrası ilk birkaç saat içinde, geriye doğru (retrograd) sinyal mekanizması hücre gövdesindeki yeni transkripsiyon olaylarından bağımsız çalışır. Proteolizis, lokal protein sentezi ve fosforilasyon gibi, translasyon sonrası sinyal modifikasyonları geriye doğru sinyal sisteminin oluşmasını sağlayan yollardır. Transkripsiyon sonrası bu tip süreçlerin bulunmasıyla, geriye doğru sinyal mekanizmasının anlaşılması için proteomik yaklaşımların kullanılması gerektiği fark edilmiştir. Rodent siyatik sinirlerinde yapılan bir çalışmada, memeli ara filament vimentinin akson yaralanması sonrasında akson mRNA'sının lokal translasyonu ile üretildiği ve sonrasında calpain aracılı proteolize girdiği bulunmuştur [41].

Jiménez ve ark. [52], deneysel olarak oluşturulmuş ezik hasarı sonrası, sıçan siyatik sinirlerindeki anlık ekspresyon profillerini belirlemek için proteomik yöntemler kullanmıştır. Ergin, erkek Wistar sıçanların siyatik sinirleri, anestezi altında çıkarılıp, 30 saniye hemostat ile sıkıştırılarak sinir hasarı oluşturulmuştur. İyileşmenin 5, 10 ve 35. günlerinde deney sonlandırılmış, siyatik sinirler alınarak iki boyutlu jel elektroforezi ve kantitatif görüntü analizleri uygulanmıştır. Her bir jelden elde edilen yaklaşık 1.500 protein kümesinden, 121 tanesi en az bir zaman aralığında belirgin ifade farklılığı göstermiştir. Kümeleme analizleri kullanılarak, bu proteinlerin ifade profillerindeki azalış ya da artışlar gruplandırılmıştır. Kütle spektrometresi ile yapılan incelemeler sonucu, akut-faz proteinleri, antioksidan proteinleri, protein sentezi/ olgunlaşması ve degradasyonu ile ilgili proteinler, hücre iskeletinin organizasyonu ile ilgili proteinler ve lipid metabolizmasıyla ilgili proteinler gibi çeşitli fonksiyonel sınıflara üye, 82 protein tanımlanmıştır. Sinir rejenerasyonu ile ilgisi olduğu daha önce tespit edilmeyen proteinler de bulunmuştur. Bunlar arasında, translasyonel olarak kontrol edilen tümör

proteinleri, anneksin A9/31, vitamin-D bağlayan protein, α -kristalin B, α -synuclein, dimetilarjinazlar ve reticulocalbin yer almaktadır [52].

Qualtieri ve ark. [53], proteomik analizler için, iki boyutlu jel elektroforezinde örnek hazırlanmasının hayati bir rol oynadığını belirtmiş ve her doku ya da hücre kültürü örneği için özgül yöntemler kullanılmasının gerekliliğini bildirmiştir. Bu çalışmada, sığır siyatik sinirleri ve insan sural sinirleri kullanılmıştır. Çalışma sonucunda, periferal sinirlerde yapılacak olan iki boyutlu jel elektroforezi için örnek hazırlama protokolünü optimize etmişlerdir. Bu çalışmada kullanılan örnek hazırlama yöntemi, günümüzde periferal sinirlerden miyelin proteinlerinin elde edilebildiği ve farklı miyelin protein ifade analizlerinin eldesini sağlayan tek yöntemdir [53].

Golding ve ark. [54]'de, sağlam ve kesik hasarlı axolotl siyatik sinir segmentlerinde, radyoaktif işaretli metiyoninin, sentezlenen, salınan ve izoelektrik noktaları 2.4-10.6, moleküler ağırlıkları 3.6-200 kDa aralığında olan proteinlere *in vitro* bağlanma durumlarını karşılaştırmak üzere, iki boyutlu jel elektroforezi ve otoradyografi yöntemleri kullanılmıştır. Lezyonlu sinirlerde en az altı proteinin metiyonin bağlamasında artış olduğu tespit edilmiştir. Bu proteinlerin çoğunlukla, makrofaj ürünleri değil, kılıf hücrelerinin ürünleri olduğu bulunmuştur [54].

King ve ark. [55]'de, *Xenopus laevis* türü kurbağalarda larval dönemde üye rejenerasyonu ile ilgili incelemeler yapılmıştır. Amputasyon sonrası gelişmekte olan üyedeki proteom değişikliklerinin tespit edilmesi ve lokal inflammatuar etkinin rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, üye amputasyonu anında ve amputasyondan 3 gün sonra *Xenopus laevis* larvalarındaki abundant protein profilleri karşılaştırmalı olarak incelenmiş ve toplam 1517 peptit tanımlanmıştır [55].

2. MATERYAL- METOT

2.1. Canlı Materyal ve Arazi Çalışmaları

Çalışmanın canlı materyalini, *Triturus karelinii* türü semenderler oluşturmaktadır. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü B.23.0.DMP.0.15.01-510.02-9165 sayılı araştırma izni ve Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu B.30.2.HAC.0.05.06.00/17 sayılı etik kurul iznini takiben, herhangi bir koruma statüsünde bulunmayan *T. karelinii* türüne ait bireyler yaban hayatından toplanarak uygun şartlarda laboratuvara getirilmiştir. Örnekler, 19-21 Mayıs 2011 tarihinde İnebolu (Kastamonu), 02-03 Haziran 2012 tarihinde Ağlı ve İnebolu (Kastamonu), 01-02 Haziran 2013 tarihinde Ağlı (Kastamonu)'ya yapılan arazi çalışmaları ile yakalanmış, ergin *T. karelinii* bireyleri laboratuvara canlı olarak getirilmiştir (Şekil 2. 1). Deneklerin sulak alanlardan toplanması için bez fileler kullanılmıştır (Şekil 2. 2). Denekler, üst kapakları kesilerek yerine tel yerleştirilen plastik kutular içerisinde laboratuvara canlı olarak taşınmıştır.



Şekil 2. 1. Arazi bölgeleri (Toplanan hayvan sayıları parantez içinde gösterilmiştir).



Şekil 2. 2. Arazi çalışmalarında semender örneklerinin yakalanması

2.2. Laboratuvar Bakımı

Laboratuvar ortamına adaptasyonun sağlanabilmesi için arazi sonrasında en az on beş gün semenderlere herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Laboratuvarda 12 saat gündüz- 12 saat gece ortamında tutulan örnekler, haftada iki kez canlı yem (*Tubifex sp.*) ile beslenmiştir.

Semenderlerin bakımı için, üst kapakları kesilerek yerine tel yerleştirilen plastik kutular kullanılmıştır. Her bir kutuya yaklaşık 15 cm derinliğinde dinlendirilmiş musluk suyu, ince akvaryum kumu, canlı ve plastik bitkiler, hayvanların saklanabilmesi için kiremit parçaları ve taşlar yerleştirilerek, doğal ortamlarına benzer yaşama alanları oluşturulmuştur (Şekil 2. 3).

2.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Tez çalışması kapsamında kullanılan kimyasallar moleküler biyoloji ve/veya proteomik çalışmalarda kullanılmaya uygundur. Deneylerde kullanılan kimyasalların, cihazların ve programların listesi ve kullanım amaçları Ek 1 kısmında yer almaktadır (Çizelge 4.1- 4. 2).



Şekil 2. 3. Semender terraryumlarının görünümü

2.4. Deneysel Sinir Hasarının Oluşturulması

Amfibilerde yaygın olarak kullanılan anestezi MS-222 (Tricaine methane sulphonate) olup, en sık kullanılan yöntem ise immersiyon yöntemidir. İmmersiyon yöntemi ile anestezi semenderler, distile su ile hazırlanan anestezi madde solüsyonu dolu bir kap içerisinde bekletilmektedir. Ancak farklı türler için gerekli olan anestezi madde dozu ve anestezi süresi literatürde bulunmamaktadır. Bu nedenle ilk olarak uygun anestezi madde dozu belirlenmiştir. Cerrahi uygulamalar 1 g/L MS-222 (Sigma- Aldrich, ABD) immersiyonu ile anestezi gerçekleştirildikten sonra yapılmıştır.

Deneylerde, kesik ve ezik olmak üzere iki farklı sinir hasarı uygulanmıştır. Her iki hasar tipinde de, tüm örneklerin sol siyatik sinirleri kontrol grubunu oluşturmaktadır. Ezik hasarı, sağ siyatik sinirin mikroportegü ile orta uyluk bölgesinden 60 saniye süresince sıkıştırılmasıyla oluşturulmuştur. Sol siyatik sinirde ise herhangi bir hasar oluşturulmadan yalnızca siyatik sinir görünür hale getirilmiş ve sonrasında cilt 4.0 emilemeyen ipek suturla kapatılmıştır (sham operated, pozitif kontrol).

Kesik hasarında ise, sağ uyluk posteriyordan yapılan longitudinal insizyonla siyatik sinire ulaşıldıktan sonra, siyatik sinir orta uyluk bölgesinden kesilmiş ve

distal ve proksimal bölgelere ayrılmıştır. Sol siyatik sinir ise kontrol olarak bırakılmıştır. Operasyon sonrasında cilt 4.0 emilemeyen ipek suturla kapatılmıştır. Semenderler, akvaryum pompası ile oksijenlendirilen temiz su tankına alınarak, anesteziden çıkmaları sağlanmıştır (Şekil 2.5).



Şekil 2. 4. *T. karelinii* örneğinde siyatik sinirin görünümü



Şekil 2. 5. Operasyon sonrası anesteziden çıkma süreci

2.5. Ön Çalışmalar ve Deney Planı

Semenderlerin laboratuvar ortamına adaptasyon süreçleri dolduktan ve uygun anestezik madde dozu ve süresi belirlendikten sonra, deneysel çalışma takviminin belirlenmesi için ön çalışmalar yapılmıştır. Ön çalışmalar kapsamında öncelikli olarak, davranış testleriyle ilgili deney planı hazırlanmıştır. Yüzme ve yürüme deneyleriyle ilgili çeşitli sistemler denenmiştir. Yürüme deneyleri iki ucu açık ve boyutları 7 cm (en) x 75 cm (boy) x 5 cm (yükseklik) olarak hazırlanan 3 mm'lik şeffaf pleksiglas üzerinde yapılmıştır. Yürüme analizleri, pleksiglas platform üzerine uygun boyutlarda parşömen kağıdı yerleştirildikten sonra, arka

ayakları su bazlı mürekkep ile boyanan semenderlerin yürütülmesi ve platformun alt tarafına yerleştirilen video kamera ile yürüme kayıtlarının alınması ile gerçekleştirilmiştir.

Elektrofizyolojik incelemeler için kullanılan BioPac MP35 (BioPac Systems, Inc., ABD) veri toplama sistemi ve BioPac SS2L model elektrotlar (BioPac Systems, Inc., ABD), sıçan çalışmalarına uygun olarak tasarlandığı için, kullanılan iğne elektrotların sadece uç kısımları açık bırakılıp, üst kısımlarının yalıtımı sağlandıktan sonra semenderlerden ölçüm alınmıştır. Ölçümlerde, üçer dakika süresince 0.5, 1, 1.5, 2 ve 2.5 volt uyarı şiddetleriyle siyatik sinir uyarılmış ve bileşik kas aksiyon potansiyeli kayıtları alınmıştır.

Proteomik çalışmalarda, iki boyutlu jel elektroforezi ile protein profillemesi ve MALDI-TOF kütle spektrometresi (Waters, ABD) ile protein kimliklendirme yöntemleri kullanılmıştır. Ön çalışmalar ile, protein izolasyonu için uygun lizis tamponu, tek bir bireyden elde edilen toplam protein miktarı, birinci boyut ayırımın yapılacağı lineer immobilize pH gradiyent şeritlerin özellikleri ve yükenecek toplam protein miktarı belirlenmiştir. Tek bir bireyin siyatik sinir dokusundan elde edilen toplam protein miktarının, teknik tekrarlarıyla birlikte iki boyutlu jel elektroforezi çalışmasına yetmeyeceği tespit edilmiş ve altı bireye ait hasarlı ve sağlam siyatik sinirler ayrı ayrı havuzlanarak kullanılmıştır.

Çalışmanın takip edileceği ve proteomik deneylerin uygulanacağı zaman aralıklarının belirlenmesi için ön çalışmalar kapsamında iki semenderin sağ siyatik sinirinde kesik hasarı oluşturulmuştur. Hasar oluşturulduktan sonra, gün aşırı yürüme kayıtları ve yedi günde bir elektrofizyolojik kayıtlar alınmıştır. Bu iki birey 44 gün boyunca takip edilmiş ve deneyin sonlandırıldığı 44. gün distal ve proksimal sinir uçlarının tamamen birleştiği tespit edilmiştir. Üç teknik tekrarlı iki boyutlu protein profillerinin eldesi için gereken birey sayısı ve ön çalışmalarda yapılan yürüme deneyleri ve EMG kayıtlarına ait veriler incelenerek, çalışma altı zaman aralığına bölünmüştür. Erken dönem akut faz reaktanlarının belirlenmesi için ilk iki zaman aralığı olarak operasyon sonrası 3. ve 24. saatler seçilmiştir. Laboratuvar ortamında bulunan semender sayısı da göz önüne alınarak, sonraki inceleme grupları için de operasyon sonrası 7., 14., 21. ve 35. günler belirlenmiştir. Semenderler araziden toplanırken, dişi ve erkek birey sayılarının eşit olması sağlanamadığı için gruplar farklı sayılarda dişi ve erkek içerecek

şekilde oluşturulmuştur. Çalışmanın sonuçları açısından dişi ve erkeklerde gözlenebilecek bireysel farklılıkların önemi bulunmamaktadır.

Ön çalışmalar sonucunda kesik ve ezik hasarlarının ayrı ayrı değerlendirilmesi yerine, dokuda daha büyük stres yaratan ve daha aktif yanıtlar oluşmasına yol açan, ayrıca memeli gruplarda iyileşmesi mümkün olmasa da semenderlerde korunmuş bir mekanizma olan ve herhangi bir uygulama yapılmadan hem onarımın hem de fonksiyonel iyileşmenin gerçekleştiği kesik hasarının incelenmesine karar verilmiştir. Kesik hasarında ise, distal ve proksimal uçların ayrı ayrı ve birlikte havuzlandığı iki boyutlu jel elektroforezi deneyleri sonucunda; moleküler mekanizmanın daha iyi anlaşılabilmesi için distal ve proksimal uçların ayrı ayrı değerlendirilmesi yapılmıştır. Çizelge 2.1'de deney grupları, zaman aralıkları ve yapılan çalışmalar gösterilmektedir.

Çizelge 2. 1. Deney grupları, zaman aralıkları ve yapılan çalışmalar

Deney Grupları	Dişi (♀) ve erkek (♂) birey sayıları	Kesik hasarı sonrası canlı bireyde yapılan uygulamalar	Siyatik sinir dokuları alındıktan sonra yapılan uygulamalar
0- 3. saat	3 ♀, 3 ♂	0- 3. saatte yürüme deneyi ve EMG kaydı	Protein izolasyonu, iki boyutlu jel elektroforezi, MALDI-TOF kütle spektrometrisi ile peptit kütle parmak izi analizi
24. saat	4 ♀, 2 ♂	24. saatte yürüme deneyi ve EMG kaydı	
7. gün	4 ♀, 2 ♂	İki günde bir yürüme deneyleri ve 7. günde EMG kaydı	
14. gün	5 ♀, 1 ♂	İki günde bir yürüme deneyleri ve 7., 14. günlerde EMG kaydı	
21. gün	4 ♀, 2 ♂	İki günde bir yürüme deneyleri ve 7., 14., 21. günlerde EMG kaydı	
35. gün	4 ♀, 2 ♂	İki günde bir yürüme deneyleri ve 7., 14., 21., 28., 35. günlerde EMG kaydı	

Orman ve Su İşleri Bakanlığı Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden ve Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul'undan alınan izinler kapsamında, Kastamonu (İnebolu ve Ağlı) illerinden arazi çalışmaları ile semender örneklerinin toplanması ve laboratuvara getirilmesi (n=36)



Araziden toplanan semender örneklerinin laboratuvar ortamına uyum sağlamaları için en az 15 gün uygulama yapılmamıştır.

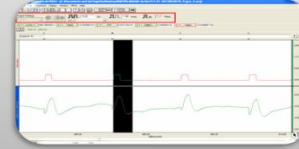
Her bir zaman aralığı için 6 semenderden oluşan grupların hazırlanması ve semenderlerin siyatik sinirlerinde kesik hasarının oluşturulması



Operasyon sonrası 0-3. saat, 24. saat, 7. gün, 21. gün ve 35. gün gruplarında yürüme testlerinin uygulanması, fonksiyonel iyileşmenin gösterilebileceği ölçümlerin alınması



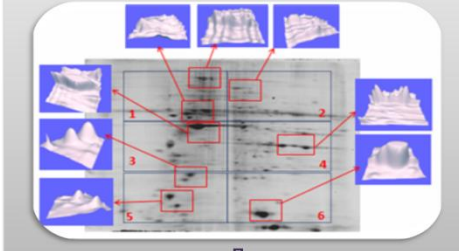
Operasyon sonrası 0-3. saat, 24. saat, 7. gün, 21. gün ve 35. gün gruplarında elektromiyografi (EMG) kayıtlarının alınması



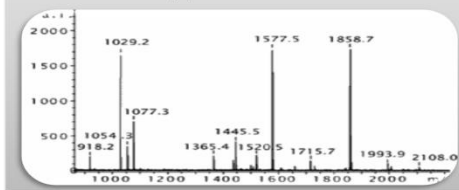
Operasyon sonrası 0-3. saat, 24. saat, 7. gün, 21. gün ve 35. gün gruplarındaki semenderler yürüme testleri ve EMG kayıtları tamamlandıktan sonra yüksek doz anestezi ile sakrifiye edilmiş ve siyatik sinirleri proteomik çalışmalarda kullanılmak üzere çıkarılarak -80°C buzdolabında saklanmıştır.



İki boyutlu jel elektroforezi ile protein haritalarının hazırlanması ve PDQuest 8.0.1. programı ile gruplar arası ifade farklılıklarının belirlenmesi



Gruplar arası ifade farklılıkları anlamlı olan protein kümelerinden MALDI-TOF kütle spektrometresi ile peptit kütle parmak izi yöntemiyle protein tanımlamalarının yapılması



Şekil 2. 6. Tez çalışmasının genel planı

2.6. Yürüme Testleri

Sinir hasarı oluşturulduktan sonra, iyileşme sürecinde 0- 3. saat, 24. saat, 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 35. günlerde davranış testleri uygulanmıştır. Semenderler için kabul edilen herhangi bir test yöntemi bulunmadığı için, sıçanlarda yapılan üye ölçümleri değiştirilerek yüzme ve yürüme kayıtlarından elde edilen veriler için kullanılmıştır. Semenderlerden davranışsal verilerin alınabilmesi için 7 cm (en)x 75 cm (boy)x 5 cm (yükseklik) boyutunda pleksiglas bir platform hazırlanmıştır. Zemini parşömen kağıdı ile kaplandıktan sonra, arka ayak tabanları su bazlı mürekkep ile boyanan semenderler bu hat boyunca yürütülmüştür. Platformun altına yerleştirilen kamera ile de ayak izleri kaydedilmiştir (Şekil 2.7- 2.8). Video kayıtları her bir adımda durdurularak fotoğraf görüntüsü şeklinde kaydedildikten sonra (Şekil 2.9- 2.10), Image J (Ulusal Sağlık Enstitüsü, ABD) programı ile ilgili ölçümler alınmış (Şekil 2. 11) ve siyatik fonksiyon indisleri literatürdeki formüller ile hesaplanmıştır (Formül 2.1- 2.4, sayfa 44).



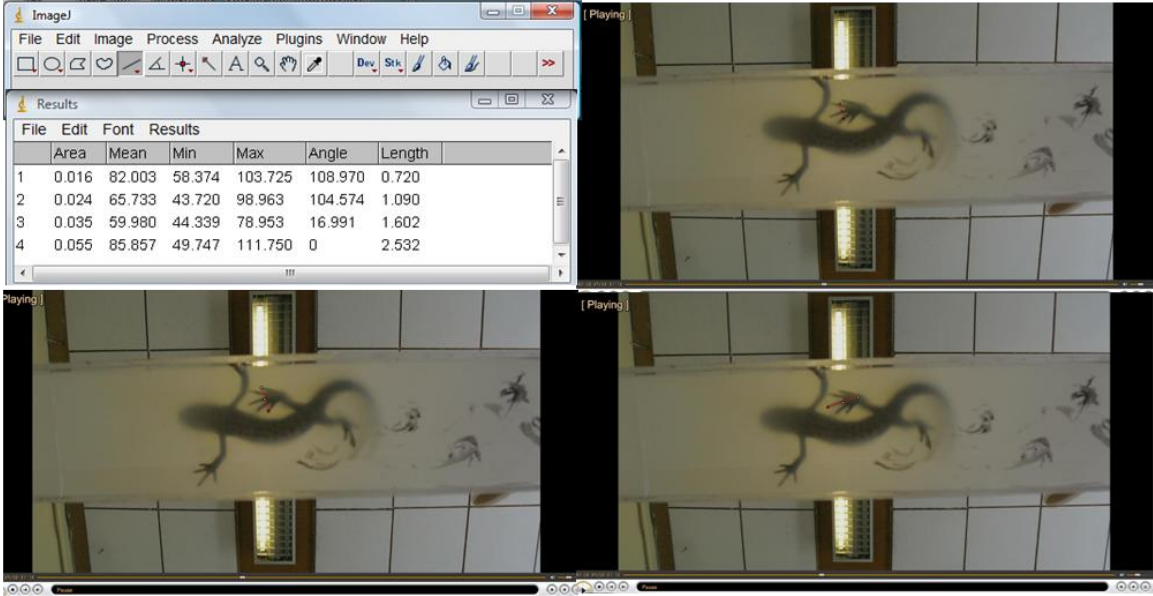
Şekil 2. 7. Yürüme platformu alttan görünüm



Şekil 2. 8. Yürüme platformu üstten görünüm



Şekil 2. 9. Fotoğraf karesine dönüştürülen yürüme kayıtları



Şekil 2. 10. Fotoğraf karesine dönüştürülen yürüme kayıtlarından Image J programı ile arka ayak ölçümlerinin alınması

Yürüme testi analizlerinde model hayvan olarak sıçan kullanılan çalışmalarda sinir hasarı sonrası iyileşmeye bağlı olarak fonksiyonun kazanılmasıyla ilgili sıklıkla kullanılan dört farklı formül bilinmektedir. Bunlar, De Medinaceli, Freed ve Wyatt tarafından 1982 [33] yılında geliştirilmiş; Carlton ve Goldberg tarafından 1986 yılında [56] ve Bain, Mackinnon ve Hunter tarafından da 1989 [57] yılında güncellenmiş olan siyatik fonksiyon indisi formülleri ile Bervar'ın 2000 [34] yılında geliştirdiği statik siyatik indisidir. Bu araştırmacıların geliştirdiği formüller aşağıda verilmektedir:

a) De Medinaceli, Freed ve Wyatt (1982):

$$* SFI = \left[\left(\frac{ETOF-NTOF}{NTOF} \right) + \left(\frac{NPL-EPL}{EPL} \right) + \left(\frac{ETS-NTS}{NTS} \right) + \left(\frac{EIT-NIT}{NIT} \right) \right] \frac{220}{4} \quad (\text{Formül 2.1})$$

b) Carlton ve Goldberg (1986):

$$* SFI = \left[\left(\frac{NPL-EPL}{EPL} \right) + \left(\frac{ETS-NTS}{NTS} \right) + \left(\frac{EIT-NIT}{NIT} \right) \right] \frac{220}{3} \quad (\text{Formül 2.2})$$

c) Bain, Mackinnon ve Hunter (1989):

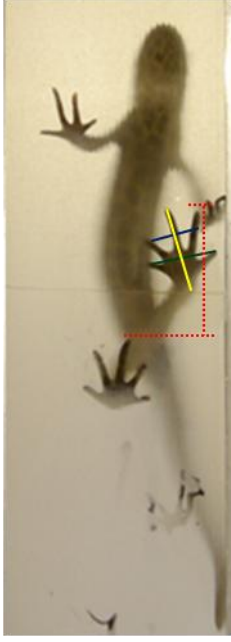
$$* SFI = -38.3 \left(\frac{EPL-NPL}{NPL} \right) + 109.5 \left(\frac{ETS-NTS}{NTS} \right) + 13.3 \left(\frac{EIT-NIT}{NIT} \right) - 8.8 \quad (\text{Formül 2.3})$$

d) Bervar (Statik Siyatik İndisi, 2000):

$$** SSI = 108.44 \times TSF + 31.85 \times ITF - 5.49 \quad (\text{Formül 2.4})$$

* Formüllerde geçen E harfi deney grubuna ait verileri, N harfi ise kontrol grubuna ait verileri sembolize etmektedir.

** Statik siyatik indisinde, TSF ve ITF birimlerinde F ile sembolize edilen değer, diğer formüllerde açık olarak ifade edilmiş olan, “(deney grubu-kontrol grubu)/kontrol grubu” formülüne karşılık gelmektedir.

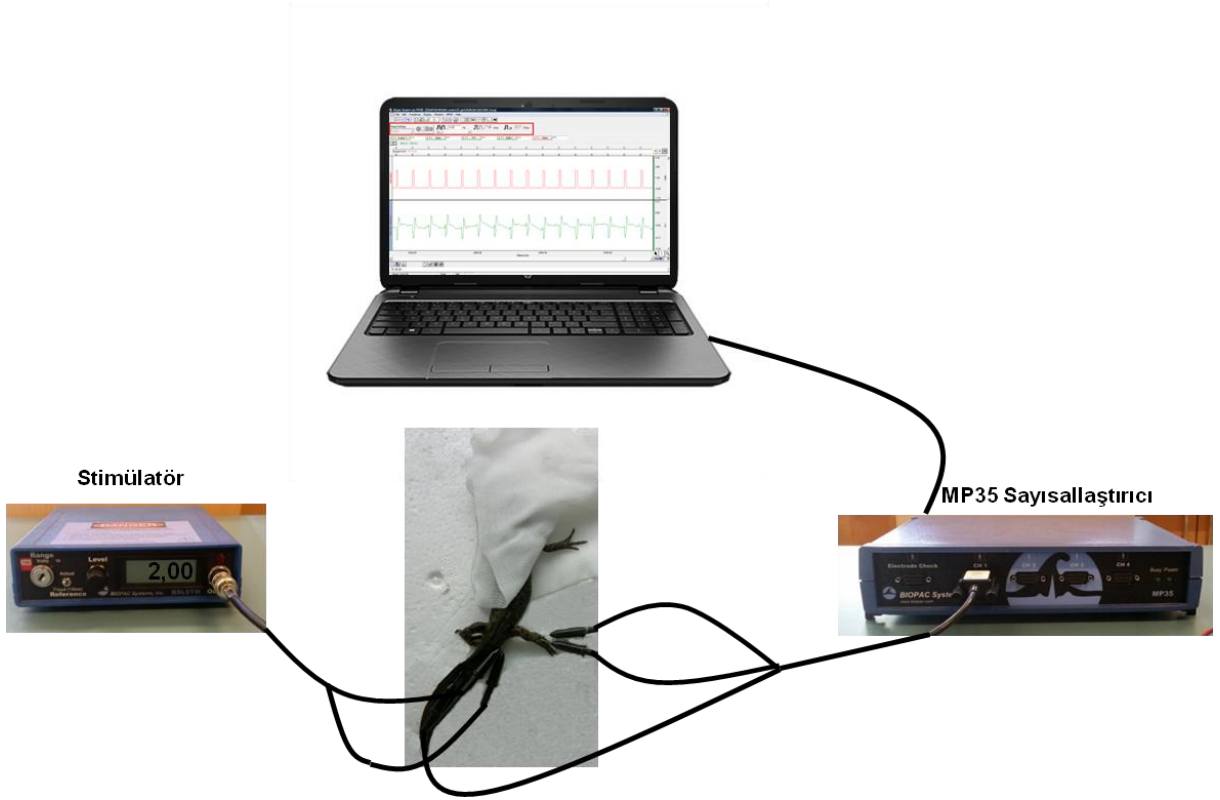


- IT: İkinci parmak ile dördüncü parmak arası mesafe, ara parmak açıklığı
- TS: Birinci parmak ile beşinci parmak arası mesafe, parmak açıklığı
- PL: Üçüncü parmak ile topuk arası mesafe, iz uzunluğu
- TOF: Ardışık iki adım arası mesafe

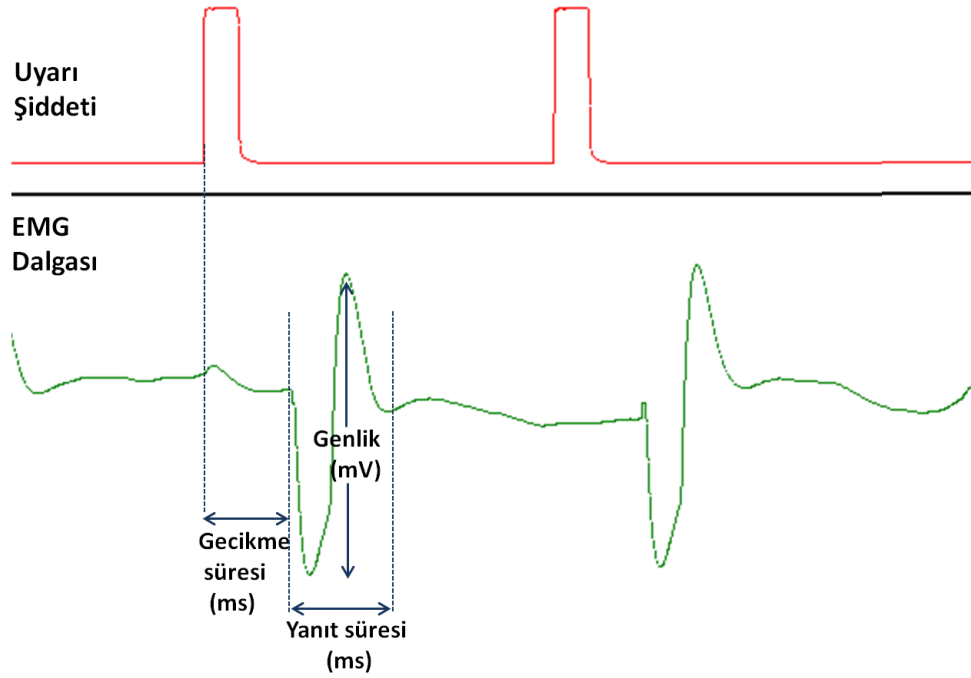
Şekil 2. 11. SFI formüllerinde kullanılan ölçüm bölgeleri

2.7. Elektrofizyolojik İncelemeler

Elektrofizyolojik ölçümler, 0-3. saat, 24. saat, 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 35. günlerde alınmıştır. Ölçümler, BioPac MP35 (BioPac Systems, Inc., ABD) veri toplama sistemi ile yapılmıştır. EMG kayıtları, iğne elektrotlar kullanılarak siyatik sinirin supramaksimal olarak uyarılması ile alınmıştır. Uyarım elektrotları, diz bölgesinin arka kısmına; kayıt elektrotları 2. ve 3. parmaklar ile 3. ve 4. parmaklar arasına, referans elektrodu ise kuyruğa yerleştirilmiştir (Şekil 2.12). Uyarım 0.5 V, 1 V, 1.5 V, 2 V ve 2.5 V şiddetlerinde üçer dakika, 0.50 Hz/ saniye ve bir uyarımın süresi de 1 milisaniye olacak şekilde verilmiştir. Uyarımı alan iğne elektrotların filtre frekansı 5-500 Hz'dir. Sürekli uyarım ile kayıt alınmış ve örnekleme hızı 100.000 olarak ayarlanmıştır. Birleşik kas aksiyon potansiyelleri (BKAP) BioPac Pro 3.7 (BioPac Systems, Inc., ABD) yazılımı ile hesaplanmıştır.



Şekil 2. 12. EMG kayıtlarında kullanılan deney düzeneği



Şekil 2. 13. EMG dalgalarında ölçüm yapılan bölgeler

2.7.1. EMG Kaydının Alınması

EMG dalgalarının incelendiği birçok çalışmada BKAP dalgasına ait genlik ve gecikme süresi verileri değerlendirilmektedir. Bu iki parametre kolay ölçülebilir olmaları ve rejenere olmakta olan sinirlerde belirgin farklılıklar göstermeleri nedenleriyle tercih edilmektedir [58]. Çalışmamızda BKAP dalgalarının değerlendirildiği EMG kayıtlarında, genlik, yanıt süresi ve gecikme süresi olmak üzere aksiyon potansiyeline ait üç farklı ölçüm verisi kullanılmıştır (Şekil 2.13). Ölçüm alanı içindeki motor birimlerdeki aktif kas fibrili sayısını gösteren 'genlik (amplitüt)' değeri milivolt cinsinden kaydedilmiştir ve aksiyon potansiyelinin pozitif ile negatif piki arasındaki farkın milivolt cinsinden değeridir. Uyarı sonrası, aksiyon potansiyelinin ilk pozitif pikine kadar geçen süre 'gecikme süresi (latans)' değerine karşılık gelmektedir. 'Yanıt süresi', tekli kas fibrillerinin deşarjı arasındaki senkronizasyonu yansıtmaktadır. Kas fibrilleri eş zamanlı aktive olduğunda yanıt süresi kısa iken; kas fibrillerinin iletim hızları arasındaki farkın yüksek olması durumunda yanıt süresi uzamaktadır. Çalışmamızda, yanıt süresi BKAP dalgasının başlangıcından bitişine kadar geçen sürenin milisaniye cinsinden değeri olarak alınmıştır. Şekil 3.9'da kontrol ve deney gruplarına ait örnek EMG dalgaları gösterilmiştir.

2.8. Proteomik Çalışmalar

2.8.1. Protein Eldesi ve Protein Miktar Tayini

Siyatik sinir dokuları anestezi altındaki semenderlerden cerrahi operasyon ile çıkarılmıştır. Her bir zaman aralığında altı semendere ait siyatik sinir dokusu bulunmaktadır. Her bir bireyin sol bacağı kontrol grubu olarak bırakılmış, sağ bacaklarında ise kesik hasarı oluşturulmuştur. Kesik hasarı oluşturulan siyatik sinirin distal ve proksimal uçları ayrı gruplar halinde havuzlanmıştır. Elde edilen örnekler proteomik çalışmalar yapılana kadar -80°C buzdolabında saklanmıştır. Protein eldesi için, siyatik sinirler bisturi ile küçük parçalara ayrıldıktan sonra sıvı azot içinde dövülmüştür. İki tam siyatik sinir için 50 µl üreliz lizis tamponu [7 M üre (Bio-Rad, ABD), 2 M tiyoüre (Bio-Rad, ABD), % 4 CHAPS (Amresco, Ohio), % 1 DTT (Fluka, İsviçre), % 2 taşıyıcı amfolitler (pH 3-10, Fluka, İsviçre), 1 tablet proteaz inhibitör kokteyl (Roche, İsviçre)] eklenmiş ve örnekler 40 genlikte 5 kez 5 saniye aralıklarla uç sonikasyona tabi tutulmuş, 10 dakika da su banyolu sonikatörde tutulduktan sonra 45 dakika 4 °C, 20.000 g'de (RCF) santrifüj

edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı LoBind tüplere (Eppendorf, Almanya) alınmış, pellet kısmı da - 20°C'de saklanmaya devam edilmiştir. Protein miktar tayinleri Bradford test yöntemiyle spektrofotometrik olarak yapılmıştır. Bradford testi için, örnekler 1:10 sulandırılmıştır. Standart olarak, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml konsantrasyonlarında sığır serum albumini (BSA, Thermo-Scientific, ABD) kullanılmıştır. Standartlar ve örnekler dört tekrarlı olarak yüklenmiş, ölçüm sonucunda en çok sapma gösteren kuyucuk analizden çıkarılarak, kalan üç kuyucuğun ortalamaları kullanılmıştır. 5 µl örnek, 245 µl boya (Thermo-Scientific Coomassie Blue, ABD) ile 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, 595 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır (Çizelge 3.5). Bradford testi sonuçlarına göre, her bir örneğin iki boyutlu jel elektroforezi çalışmalarında en az üç teknik tekrarlı olarak elde edilebilmesi için, jel başına toplam 45 µg protein yüklenmesine karar verilmiştir. Bradford testi sonuçları kullanılarak, jel başına toplam 45 µg protein yüklemek için gerekli olan örnek ve rehidrasyon tamponu hacimleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.6).

2.8.2. İki Boyutlu Jel Elektroforezi ile Protein Profillerinin Çıkarılması

Mikrolitresindeki total protein miktarı tayin edilmiş örnekler birinci boyut ayrımı için lineer immobilize pH gradiyent şeritlere (IPG şeritler, pH 3-10, 7 cm, Bio-Rad, ABD) tespit edilmiştir. Öncelikle rehidrasyon tamponu [7 M üre, 2 M tiyoüre, %4 CHAPS, %1 amfolit (pH 3-10), 10 mM DTT] ile örnekler 1. boyut ayrımına hazırlanmıştır. Proteinlerin IPG şeritlere tespit edilmesi amacıyla 16 saat 50 V'de aktif rehidrasyon işlemi uygulanmıştır.

Rehidrasyon aşaması tamamlanan IPG şeritler proteinlerin izoelektrik noktalarına göre dağılımını sağlamak amacı ile izoelektrik odaklanma (IEF) için Protean IEF Cell (Bio-Rad, ABD) cihazında 6-8 saat kuru elektroforeze tabi tutulmuştur (15 dakika 250 V, 3 saat 10 kV, toplamda 60 kV/sa değerine ulaşana kadar 10 kV).

Bu işlemin ardından şeritler, ikinci boyut ayrımına hazır hale gelmeleri için, çalkalayıcı üzerinde 15 dakika dengeleme tamponu I [6 M üre, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8, Bio-Rad, ABD), %2 SDS (Bio-Rad, ABD), %20 gliserol (Sigma-Aldrich, ABD), %2 DTT] ve 15 dakika dengeleme tamponu II [6 M üre, 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8), %2 SDS, %20 gliserol, %2.5 iyodoasetamit (Bio-Rad, ABD), eser miktarda Bromofenol mavisi (Bio-Rad, ABD)] ile muamele edildikten sonra, moleküler ağırlıklarına göre ayırımın gerçekleşeceği ikinci boyut ayırım işlemi olan SDS-

PAGE'de ayırma tabi tutulmuştur. SDS-PAGE için % 4'lük toplama jeli [0.5 M Tris-HCl pH 6.8, akrilamit-bisakrilamit %40 (Bio-Rad, ABD), %10 SDS, ultra saf su, %10 amonyum persulfat (Bio-Rad, ABD), TEMED (Bio-Rad, ABD)] ve %12'lik ayırma jeli [1,5M Tris-HCl pH 8.8, akrilamit-bisakrilamit %40, %10 SDS, ultra saf su, %10 amonyum persulfat, TEMED] kullanılmıştır.

IPG şeritler jelde yürütüldükten sonra pH ve moleküler ağırlıklarına göre ayrılmış proteinler 90 dakika floresan özellikteki Oriole (BioRad, ABD) boyası ile boyanmış ve protein kümeleri görünür hale getirilmiştir. Jel görüntüleri VersaDoc 1000 (Bio-Rad, ABD) jel görüntüleme sistemi ile elde edilmiştir.

Ön çalışmalar kapsamında, 24. saat grubunun distal ve proksimal sinir ucu örneklerine ait jeller, toplam protein boyamasının yanı sıra glikoprotein ve fosfoprotein boyaları ile de boyanarak translasyon sonrası modifikasyonlar incelenmiştir. Glikoprotein boyaması Pro-Q Emerald 300 (Life Technologies, Thermo- Fisher Scientific, ABD) ve fosfoprotein boyaması da Pro-Q Diamond (Life Technologies, Thermo- Fisher Scientific, ABD) boyaları ile yapılmıştır. Bu boyamalara ait görüntüler, uygun filtrelerin kullanıldığı ChemiDoc MP Sistemi (Bio-Rad, ABD) ile elde edilmiştir.

2.8.3. Jellerin Analizi

Jellerdeki protein kümelerinin analizi için PDQuest 8.0.1 (BioRad, ABD) programı kullanılmıştır. Gruplar arasında ifadeleri yokken var, varken yok olan; ya da ifade artış ve azalışı olan protein kümeleri belirlenerek, SPSS programı (IBM SPSS Statistics Version 20, Armonk, New York) ile istatistiksel olarak anlamlı azalış ve artış gösteren protein kümeleri seçilmiş ve kütle spektrometresi ile protein tanımlaması aşamasına geçilmiştir.

2.8.4. Protein Kümelerinin Jelden Kesilmesi ve Tripsin ile Peptitlerine Ayrılması

PDQuest programı ile seçilen protein kümeleri, Proteome Works Spot Cutter (Bio-Rad Laboratories, ABD) cihazı ile kesildikten sonra, proteinler Shevchenko ve ark. [59]'a göre tripsin ile enzimatik olarak parçalanmış ve ZipTip (Millipore, Fransa) ile muamele edildikten sonra MALDI-TOF örnek yükleme plakasına (Waters, ABD) yüklenmiştir.

Kütle spektrometresi analizleri için MALDI-TOF kütle spektrometresi kullanılmıştır. MALDI-TOF örnek yükleme plakasındaki triptik peptitler, MassLynx

4.0 (Waters, ABD) programı ile analiz edilmiştir. Tüm spektrumlar pozitif iyon modunda alınmıştır. Dış kalibrasyon için, Substance- P (Sigma, ABD), anjiyotensin-1 (Sigma, ABD), renin-14 (Sigma, ABD), Adrenokortikotropik Hormon (ACTH, Sigma, ABD) ve Glu 1- fibrinopeptid B (Glu-Fib, Sigma, ABD)'den oluşan beş peptit karışımı kullanılmıştır. Protein tanımlamaları MASCOT sunucusu (<http://www.matrixscience.com/>) kullanılarak yapılmıştır. Proteomik yöntemlerin protokolleri ayrıntılı olarak Ek 2 kısmında yer almaktadır.

3. SONUÇLAR

3.1. Ön Çalışma Sonuçları ve Deney Planı

Tez çalışması planlanırken yapılan ön çalışmalar kapsamında elde edilen elektrofizyolojik ölçüm ve yürüme testleri verileri kullanılarak, çalışmanın yapılacağı zaman aralıkları 0-3. saat, 24. saat, 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 35. gün olarak belirlenmiştir. Proteomik çalışmalar için yeterli protein miktarına ulaşılması ve istatistiksel olarak anlamlı sonuçların elde edilmesi için grup başına gereken en az semender sayısının altı olduğu da ön çalışmalar sonucunda bulunarak, her bir grubun eşit sayıda bireyden oluşması sağlanmıştır.

Ön çalışmalar kapsamında, iki boyutlu jel elektroforezinin sinir dokusu için optimizasyonu yapıldıktan sonra, deney gruplarının belirlenmesi amacıyla, sinir hasarı sonrası 24. saatte deneyin sonlandırıldığı ve kesik hasarı (distal ve proksimal sinir uçlarının hem ayrı ayrı hem de birlikte değerlendirildiği iki grup), ezik hasarı ve sağlam siyatik sinirlerden oluşan kontrol gruplarına ait siyatik sinir örneklerinin 2D-PAGE ile hazırlanan protein profilleri karşılaştırılmıştır. Ezik ve kontrol grubunu oluşturan örneklerde bir bacağa ait siyatik sinir bütün olarak kullanılırken; kesik grubu distal ve proksimal uçların birlikte ve ayrı ayrı incelendiği iki alt gruba ayrılmıştır. Protein kümelerinin yoğunlukla pH 4-9 aralığında dağılım gösterdiği belirlenmiştir. PDQuest 8.0.1 analizlerine göre, beş grup arasında ifadesi artan/ azalan ve varken yok, yokken var olan toplam 205 protein kümesi eşleştirilmiştir (Çizelge 3.1- 3.2).

Çizelge 3. 1. Gruplar arasında protein ifade farklılıkları olan protein kümesi sayıları

	GRUPLAR				
	Distal/ Kontrol	Proksimal/ Kontrol	Distal+ Kontrol	Proksimal/ Kontrol	Ezik/ Kontrol
İfade farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı protein kümesi sayısı ($p<0.05$)	30	29	29	32	25
0.5 ile 2 kat arasında ifade farklılığı olan toplam protein kümesi sayısı	47	54	45	35	58

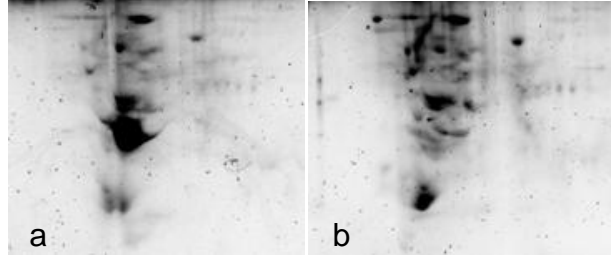
Çizelge 3. 2. Kesik hasarı alt grupları arasında ANOVA ve post Hoc testlerine göre ifade farklılığı istatistiksel olarak anlamlı olan protein kümesi sayıları ($p < 0.05$)

	Proksimal/ Distal+Proksimal	Distal/ Distal+ Proksimal	Proksimal/ Distal
Anlamlı protein kümesi sayısı	14	13	14

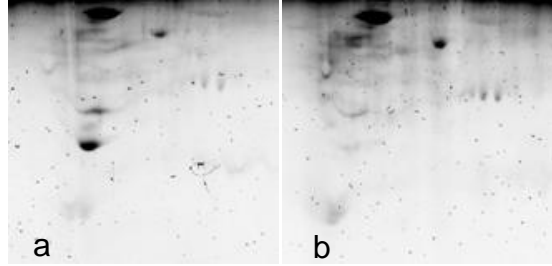
Ön çalışmalar kapsamında, protein profillerinin karşılaştırılmasının yanı sıra, akson rejenerasyonunda önemi bilinen translasyon sonrası modifikasyonların belirlenmesi amacıyla glikoprotein ve fosfoprotein boyamaları da yapılmıştır (Şekil 3.1- 3.2). Hem glikoprotein hem de fosfoprotein boyamalarında, distal ve proksimal sinir uçlarına ait profillerde farklı protein kümelerinin boyandığı tespit edilmiştir. Dolayısıyla kesik hasarı alt grupları içinde distal ve proksimal sinir uçlarının ayrı ayrı değerlendirilmesinin moleküler mekanizmanın aydınlatılabilmesi için daha uygun olduğu bir kez daha gösterilmiştir.

Deneylerde kullanılan glikoprotein boyası (Pro-Q Emerald 300) periyodat ile okside olan karbohidrat grupları ile etkileşerek, çok küçük miktarlardaki glikozile proteinlerin tespit edilmesini sağlamaktadır. Fosfoprotein boyası (Pro-Q Diamond) ise fosfat gruplarının tirozin, serin ya da treonin kalıntılarına seçici olarak bağlanarak fosfoproteinlerin belirlenmesini sağlamaktadır. Birçok proteinin fosforilasyon, glikozilasyon, amidasyon ve asetilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlar aracılığıyla fonksiyonel yapılarına ulaştıkları bilinmektedir. Yapılan glikoprotein ve fosfoprotein boyamaları ile de, distal ve proksimal uçların ayrı ayrı incelenmesinin önemi tekrar onaylanmış ve translasyon sonrası modifikasyonların belirlenmesi ile rejenerasyon yeteneğini kazandıran moleküler mekanizmaların aydınlatılabileceği düşünülmüştür.

Nöral rejenerasyonda translasyon sonrası modifikasyonların önemi ise, sinir hasarı sonrası modifiye protein miktarındaki hızlı ve yüksek artış olarak gösterilmektedir [48]. Ayrıca nöronların hasar sonrası hayatta kalmalarında önem taşıyan aksoplasmik hasar sinyal proteinleri de, önceden hücrede bulunan aksonal mRNA'lar ile ya da endojen aksonal proteinlerin fosforilasyon gibi enzimatik modifikasyonları sonucu yeniden sentezlenmesi ile translasyon sonrası modifikasyonlar seviyesinde düzenlenmektedir [60].



Şekil 3. 1. Hasar sonrası 24. saat fosfoprotein boyası görüntüleri, a) Distal sinir ucu b) Proksimal sinir ucu



Şekil 3. 2. Hasar sonrası 24. saat glikoprotein boyası görüntüleri, a) Distal sinir ucu b) Proksimal sinir ucu

Hayvan modeli kullanılan sinir rejenerasyonu çalışmalarında, moleküler mekanizmayı en detaylı açıklayabilecek, karşılaştırmalı ve tekrarlanabilir veri eldesine imkan sağlayan sinir hasarının belirlenmesi önemli bir basamaktır. Siyatik sinir dokusu, kolay ulaşılabilir ve görece uzun olan anatomik yapısıyla en çok tercih edilen periferel sinirlerden biridir. DNA düzeyindeki çalışmalardan farklı olarak, proteinlerin dinamik yapıları nedeniyle, deney planı yapılmadan önce, uygun doku ve hasar tipinin belirlenmesi, dokunun sinir hasarı yanıtlarını yansıtabilecek kısımlarının kullanılması gibi aşamaların test edilmesi, doğru moleküler yolların tespit edilmesi açısından önemlidir. Ayrıca sinir rejenerasyonu çalışmalarında proteomik stratejilerin kullanılması, özellikle de periferel sinirlerde hasar sonrası gerçekleşen ilkin moleküler değişimler sinir hücre gövdesinden bağımsız gerçekleştiği ve translasyon sonrası modifikasyonlar bu süreçte önem kazandığı için özellikle tercih edilmektedir. Ön çalışmalar kapsamında kesik ve ezik sinir hasarına ait protein profilleri karşılaştırılarak, deneylerin tamamlanması için en uygun yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca kullanılan hayvan türü laboratuvarında üretilmediği için, deneylerde bireylerin ontogenetik olarak rejenerasyon kapasitelerindeki olası farklılıkları en az seviyeye indirebilmek amacıyla, aynı hasarın uygulandığı siyatik sinir örneklerinin havuzlanarak kullanılması uygun bulunmuştur. Bu sayede hem bireysel farklılıkların önüne

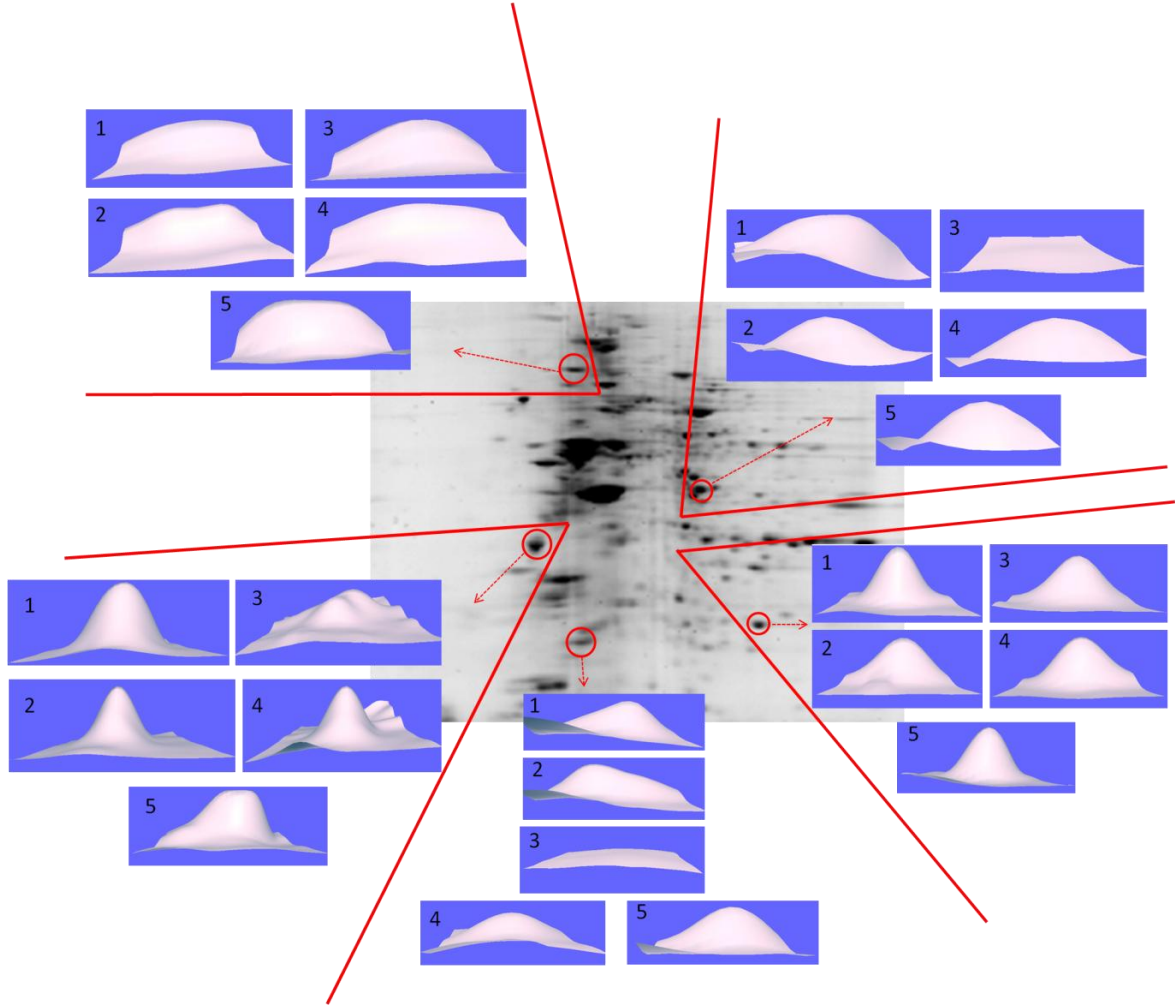
geçilmiş, hem de deneylerin tekrarlı olarak uygulanabilmesi için yeterli olacak protein miktarına ulaşılmıştır.

Ön çalışmalardan elde edilen verilere göre, protein profil haritaları incelendiğinde, ezik hasarı profilinin kontrol grubuna en yakın profili gösterdiği bulunmuştur. Kesik hasarı ise distal ve proksimal uçların ayrı ayrı incelenmesine olanak sağladığı için ezik hasarına göre daha fazla bilgi elde edilmesi açısından avantajlı olmaktadır. Şekil 3.3'de kesik hasarı alt grupları, ezik hasarı ve kontrol örnekleri arasında ifade farklılıkları olan bazı protein kümelerinin ifade miktarları üç boyutlu resimler ile gösterilmektedir. Üç boyutlu gösterimlerin altında kalan alanlar, ilgili protein kümesindeki proteinlerin ifade miktarlarını göstermektedir. Distal ve proksimal örneklerin bir arada incelenmesinin, bazı protein kümelerinde ifade miktarlarını maskeleyesi ve distal ya da proksimal uçta daha fazla ya da daha az ifade olmuş olan protein kümeleri için ortalama ifade düzeylerini göstermesi nedeniyle bulguların eksik ya da hatalı değerlendirilmesine yol açabileceği görülmüştür.

Kesik hasarı sonrasında, distal ve proksimal uçların hasar yanıtlarının farklı olduğu literatür bilgilerinde yer almaktadır. Distal sinir ucu, rejeneratif süreçte proksimal ucun başarılı şekilde rejenerasyon olarak uygun hedefe doğru uzamasını sağlayacak mikroçevreyi düzenleyen sinyalleri oluştururken; proksimal uç hücre gövdesiyle bağlantısını sürdürmekte ve aksonların uzamasını destekleyecek bazı morfolojik değişikliklere uğramaktadır. Bu nedenle, sinir hasarı sonrasında, distal ve proksimal uçlarda aynı protein kümelerinin ifadelerinde farklılıklar olabileceği gibi, farklı protein kümelerinin de ifade edilmeleri mümkündür.

Kesik hasarı siyatik sinir dokusunun iki ucunun birbiriyle iletişimini keserek, hem anatomik yapıda hem de moleküler sinyal iletiminde bozulmaya neden olduğu için ezik hasarına göre daha büyük bir yıkıma yol açmaktadır. Bu nedenle kesik hasarının, daha fazla moleküler yolu aktive ederek daha fazla bilgi sağlayacağı düşünülmüştür. Ezik hasarı oluşturulan gruptaki siyatik sinir dokularında hasara göre distal ve proksimal sinir uçları, kesik hasarı dokularındaki gibi net bir şekilde belirlenemediği için, ezik hasar grubunda siyatik sinirler bütün olarak incelenmiştir. Kullandığımız moleküler yöntemlerin ayırım gücü ile elde edilen protein profil haritaları bakımından ezik hasarının farklı bir bilgi sağlamadığı belirlenmiştir. İki kesik ucun birlikte değerlendirildiği distal+ proksimal örnek grubunda olduğu gibi, ezik hasarına ait protein profillerinde de bazı protein

kümelerinin ifadelerinin baskılanması ile distal ve proksimal uçların ayrı değerlendirildiği gruptan farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.



Şekil 3. 3. Seçilen bazı protein kümelerindeki protein ifade farklılıklarının üç boyutlu gösterimi (1: Kontrol grubu, 2: Distal uç grubu, 3: Proksimal uç grubu, 4: Distal ve proksimal uç grubu, 5: Ezik hasar grubu)

Kesik hasarının tercih edilmesinin bir diğer sebebi ise, ezik hasarı sonrası memelilerde zayıf da olsa bir miktar iyileşmenin gerçekleşmesidir. Ancak semenderlerin model organizma olarak kullanıldığı bu çalışmada, omurgalılar arasında semenderlerde ergin dönemde de korunmuş olan rejenerasyon yeteneğinin moleküler mekanizmasının aydınlatılması amaçlandığı için, çalışmaya kesik hasarıyla devam edilmiştir.

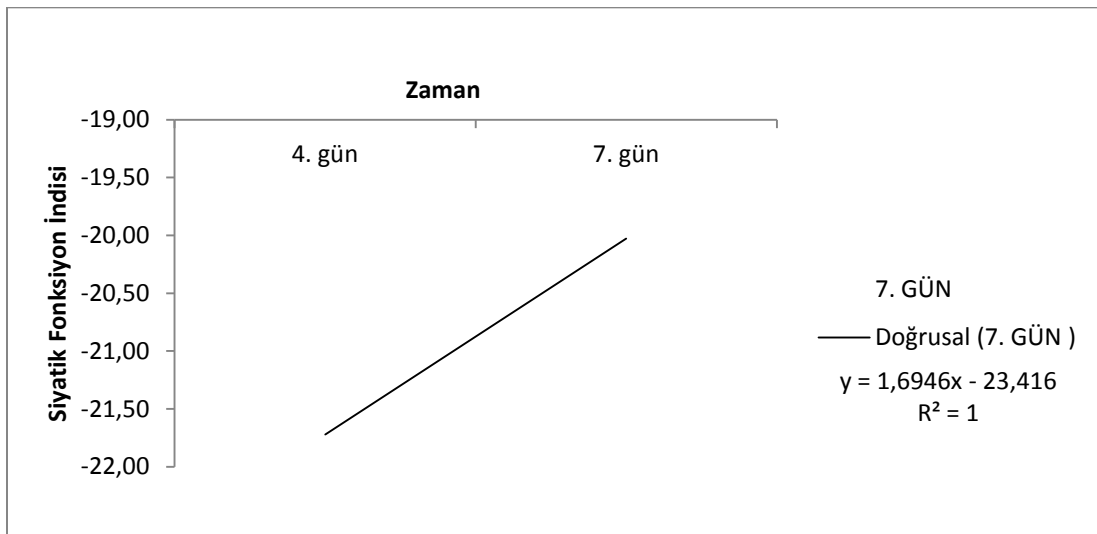
Ön çalışmalar sonucunda kesik ve ezik hasarlarının ayrı ayrı değerlendirilmesi yerine, dokuda daha büyük stres yaratan ve daha aktif yanıtlar oluşmasına yol açan, ayrıca memeli gruplarda iyileşmesi mümkün olmasa da semenderlerde korunmuş bir mekanizma olan ve herhangi bir uygulama yapılmadan hem

onarımın hem de fonksiyonel iyileşmenin gerçekleştiği kesik hasarının incelenmesine karar verilmiştir. Kesik hasarı sonrasında ise, distal ve proksimal uçların ayrı ayrı ve birlikte havuzlandığı iki boyutlu jel elektroforezi deneyleri sonucunda; moleküler mekanizmanın daha iyi anlaşılabilmesi için distal ve proksimal uçlar ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

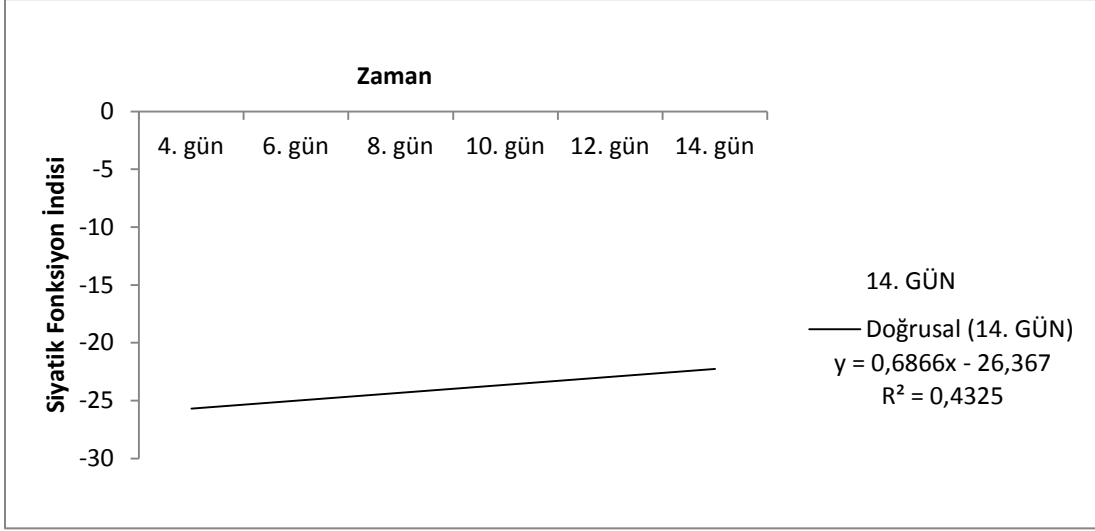
3.2. Yürüme Testi Analizleri

Semender yürüme izlerinden alınan ölçümler materyal- metot bölümünde detaylı olarak açıklanmış olan dört farklı formül ile ayrı ayrı hesaplanmıştır. Siyatik fonksiyon indisi, sıfır ile eksi yüz arasında bir değerdir. Tamamen kesik hasarı oluşturulan sıçanlarda bu değer -100 ve tamamen sağlıklı olanlarda ise sıfır olduğu kabul edilmektedir. Bu bilgi kapsamında, her bir gruptaki altı bireyin eşit sayıdaki ayak izi ölçümleri dört formüle uygulanmış ve zaman aralıklarına göre siyatik fonksiyon indisi ve Bervar [34]'e göre statik siyatik indisi verileri elde edilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde, Bain ve ark.'larının [57] geliştirdiği formülün, semenderlerin yürüme izi analizleri için en uygun sonucu verdiği tespit edilmiştir.

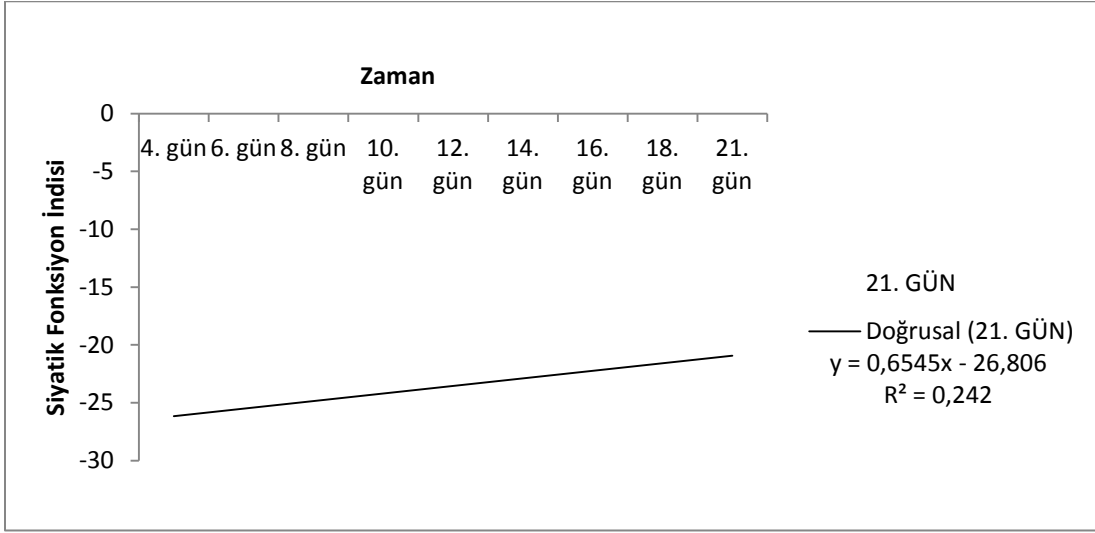
Elde edilen ölçüm sonuçlarına göre, yeni bir indis belirlenememiştir. Ancak literatürde bulunan ve Bain ve ark. [57] tarafından geliştirilmiş olan, sıçanlara uygun olarak hazırlanmış siyatik sinir fonksiyon indisine göre farklı zaman aralıklarına ait hesaplamalar yapılarak, aşağıdaki grafikler elde edilmiştir. Grafikler incelendiğinde, her bir zaman aralığında, indis değerinin giderek arttığı ve pozitif değerlere yaklaştığı görülmektedir (Şekil 3.4-3.7).



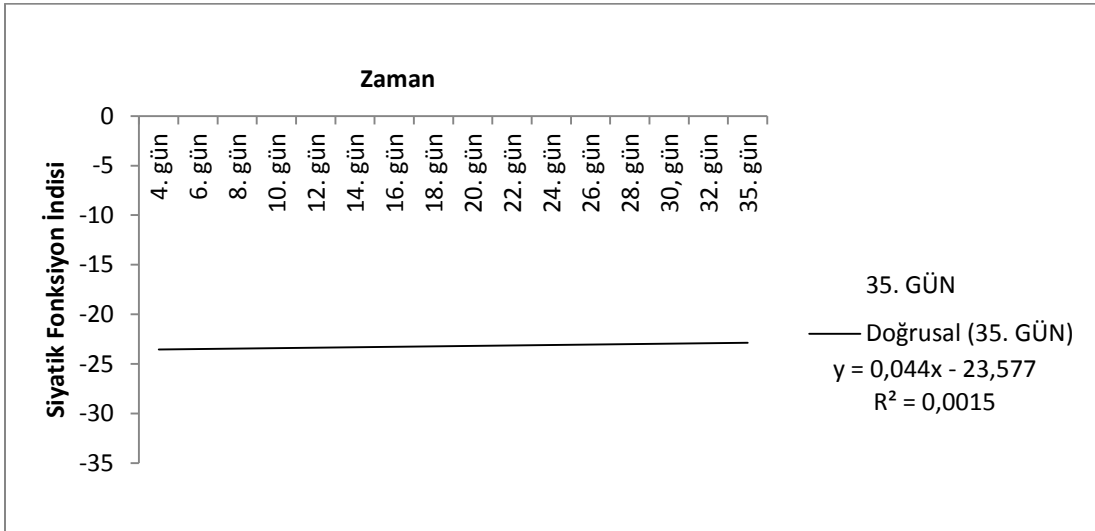
Şekil 3. 4. Siyatik sinir kesik hasarı sonrası yedi günlük SFI değişim grafiği



Şekil 3. 5. Siyatik sinir kesik hasarı sonrası on dört günlük SFI değişim grafiği



Şekil 3. 6. Siyatik sinir kesik hasarı sonrası yirmi bir günlük SFI değişim grafiği

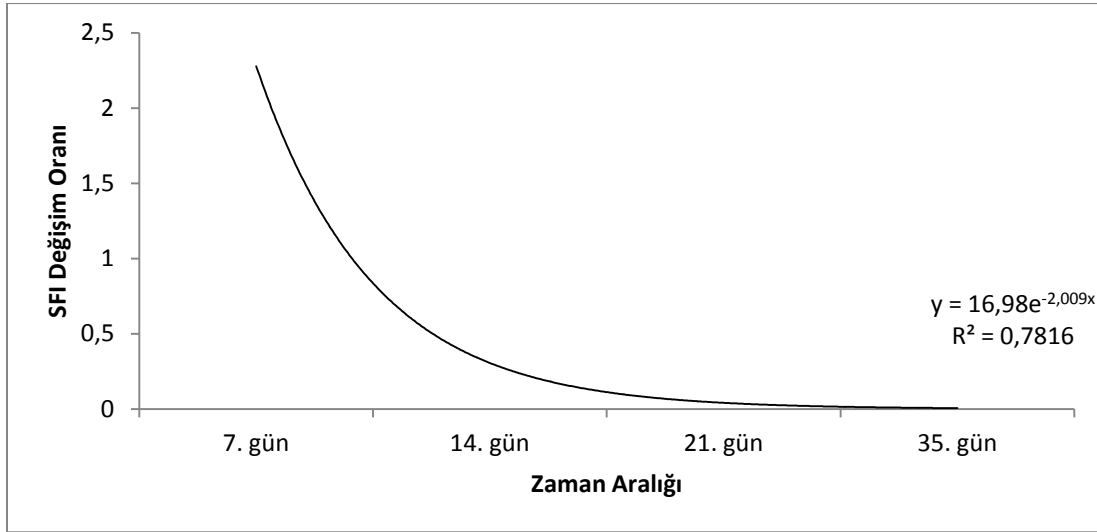


Şekil 3. 7. Siyatik sinir kesik hasarı sonrası otuz beş günlük SFI değişim grafiği

Zamana bağılı olarak SFI değişim grafikleri incelendiğinde, iyileşme sürecinin ilerlemesiyle eğrilerin eğimlerinin azaldığı gözlenmektedir. Bu değişim rejenerasyon hızının hasar sonrası erken dönemde daha yüksek iken, iyileşme sürecinin ilerleyen dönemlerinde giderek azaldığını göstermektedir (Çizelge 3.3, Şekil 3. 8).

Çizelge 3. 3. Zaman aralıklarına göre SFI grafiği eğimlerindeki değişim

Zaman Aralığı	R ²
7. gün	1
14. gün	0,4325
21. gün	0,242
35. gün	0,0015



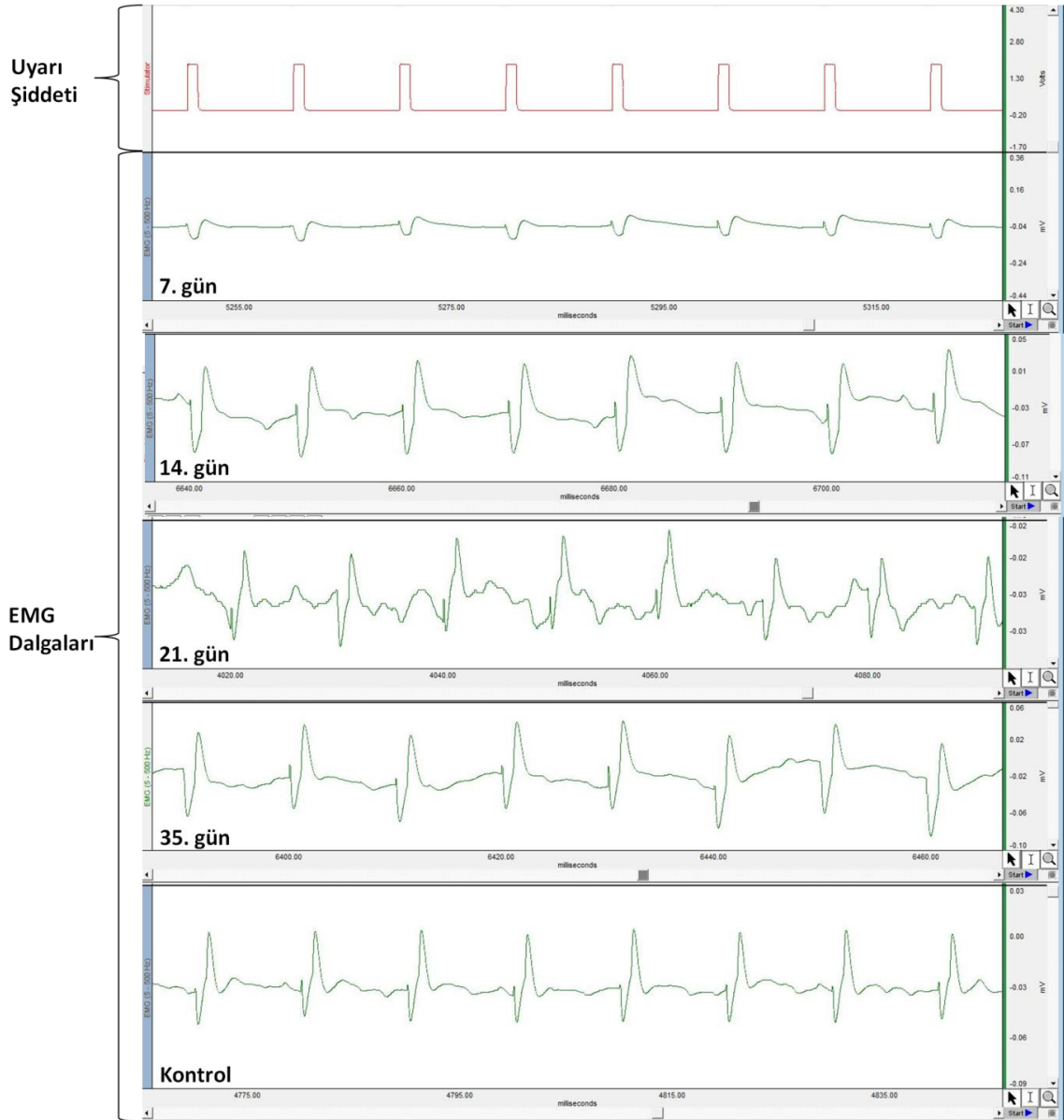
Şekil 3. 8. Zaman aralıklarına göre rejenerasyon hızı grafiği

3.3. Elektrofizyolojik Ölçümler

Her bir zaman aralığında, örneklerin hem kontrol grubunu oluşturan sol bacaklarından hem de kesik hasarının bulunduğu sağ bacaklarından kayıt alınmıştır. Sağlam ve hasarlı siyatik sinire sahip bacaklardan alınan kayıtlarda, bileşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) verileri değerlendirilmiştir. Her bir bireye ait kayıttaki, 2V ile uyarım sonucu oluşan bileşik kas aksiyon potansiyeli dalgalarından 10 tanesinin ortalaması alındıktan sonra, her bir grubun bireylerine ait ölçümlerin de ortalaması alınarak, grupların ortalaması elde edilmiştir. Genlik (pikler arası mesafe, milivolt), yanıt süresi (dalga'nın uzunluğu, milisaniye) ve gecikme süresi (uyarı ile yanıt arasında geçen süre, milisaniye) verileri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Her bir grup için yapılan uygulamalar ve zamanları Çizelge 3.4'de gösterilmektedir.

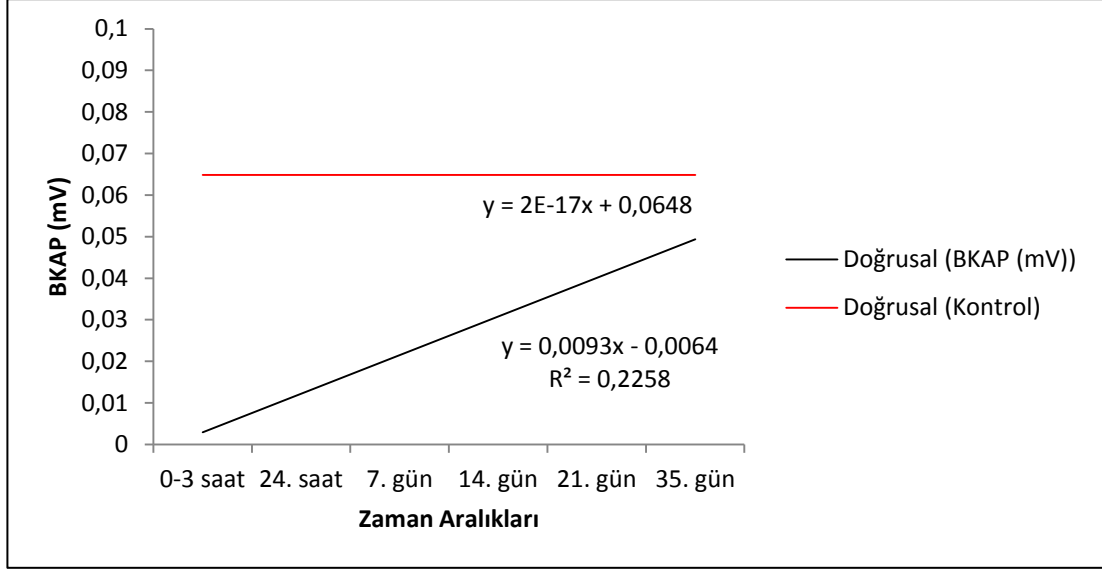
Çizelge 3. 4. Gruplara göre bileşik kas aksiyon potansiyeli ölçüm zamanları

Gruplar	Operasyon öncesi	Operasyon sonrası
0-3. saat	Sağ bacak	0- 3. saat, sağ ve sol bacaklar
24. saat	Sağ bacak	24. saat, sağ ve sol bacaklar
7. gün	Sağ bacak	7. gün, sağ ve sol bacaklar
14. gün	Sağ bacak	7. ve 14. günler, sağ ve sol bacaklar
21. gün	Sağ bacak	7., 14. ve 21. günler, sağ ve sol bacaklar
35. gün	Sağ bacak	7., 14., 21., 28. ve 35. günler, sağ ve sol bacaklar



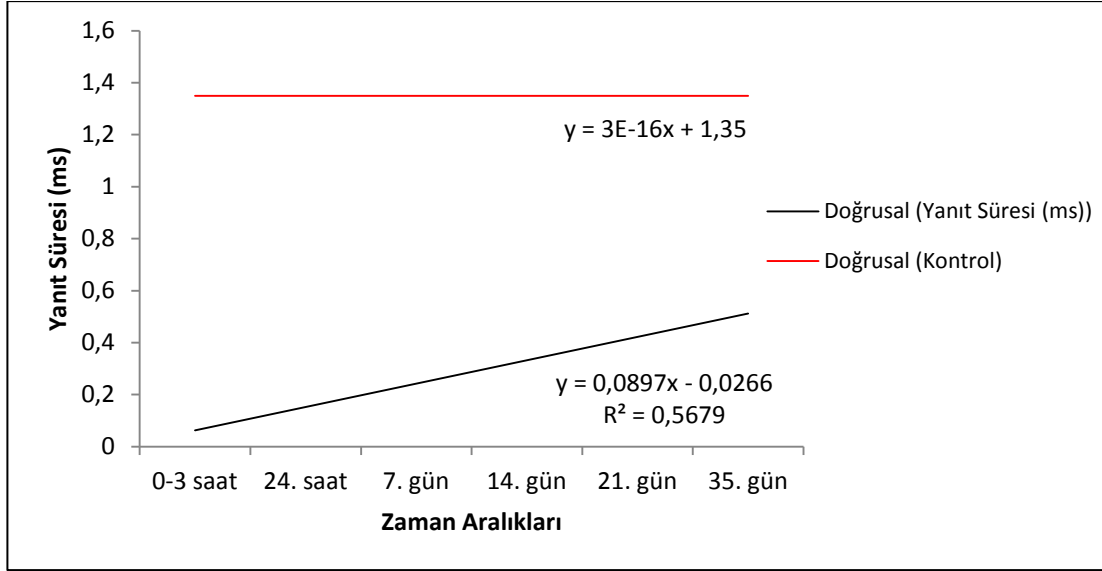
Şekil 3. 9. Kontrol ve deney gruplarına ait örnek EMG dalgaları

Her bir gruba ait Birleşik Kas Aksiyon Potansiyellerinin (BKAP) genlik değerlerinin tüm zaman aralıklarına göre değişimini gösteren grafik çizildiğinde, kesik hasarı sonrası genlik değerlerinin zamana bağlı olarak yükseldiği görülmüştür (Şekil 3.10).



Şekil 3. 10. Zaman aralıklarına göre gruplardaki genlik değişimi

Her bir grup için elektriksel uyarı sonrası yanıt sürelerinin zamana bağlı olarak değişimlerine ait grafik Şekil 3.11'de gösterilmektedir. Grafiğe göre, rejenerasyon sürecinin ilerlemesine bağlı olarak elektriksel uyarıya yanıt verme süresinin arttığı görülmektedir.



Şekil 3. 11. Zaman aralıklarına göre gruplardaki yanıt süresi değişimi

Ayrıca BKAP dalgalarından, gecikme süresi verileri de alınmıştır. Zaman aralıklarına göre $0,14 \pm$ ile $0,19 \pm$ değerleri arasında değişim gösteren gecikme

sürelerinde, gruplar arasında anlamlı fark bulunmadığı için veriler grafiğe aktarılmamıştır ($p < 0.05$).

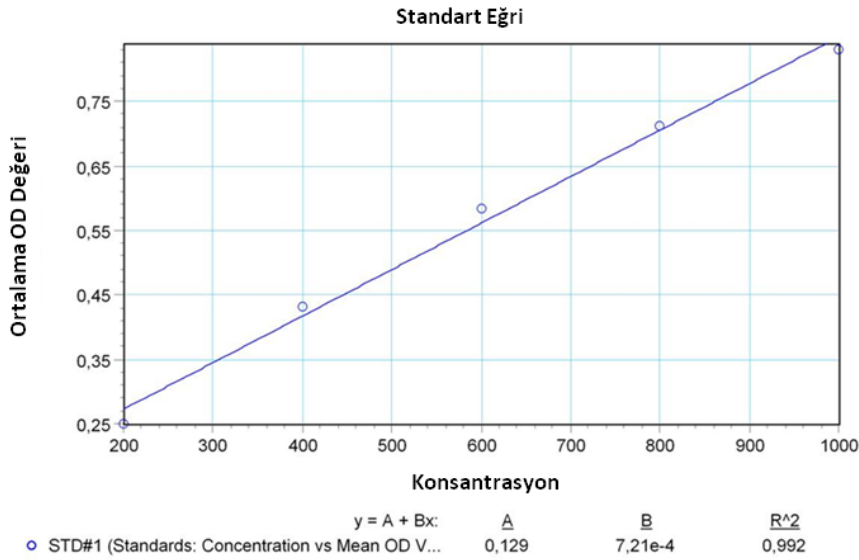
3.4. Proteomik Çalışma Verileri

3.4.1. Protein Miktar Tayini

Deneysel sinir hasarı oluşturulduktan sonra belirlenen zaman aralıklarında sonlandırılan deney gruplarının distal, proksimal sinir uçları ve kontrol sinirleri ayrı Eppendorf tüplerine alınarak -20°C 'de saklanmıştır. Her bir gruptaki altı hayvanın distal sinir uçları, proksimal sinir uçları ve kontrol sinirleri kendi aralarında havuzlandıktan sonra, Bradford yöntemi ile toplam protein miktarları belirlenmiştir. Spektrofotometrik ölçümde, R^2 değeri en az 0,96 olan ölçümlerden elde edilen veriler kullanılmıştır (Şekil 3. 12).

Standartlar ($\mu\text{g/ml}$)

Sample	Concentration	Back Calc Conc	Wells	OD Values	Mean OD Value	Std.Dev.	CV%
St01	200,000	167,884	A1	0,250	0,251	0,017	6,9
		145,003	A2	0,234			
		192,845	A3	0,268			
St02	400,000	405,288	B1	0,422	0,431	0,012	2,8
		437,182	B2	0,445			
		411,389	B3	0,426			
St03	600,000	625,913	C1	0,581	0,585	0,052	8,9
		705,649	C2	0,638			
		562,402	C3	0,535			
St04	800,000	732,967	D1	0,658	0,713	0,053	7,5
		880,789	D2	0,765			
		813,812	D3	0,716			
St05	1000,000	947,074	E1	0,812	0,831	0,021	2,6
		966,904	E2	0,827			
		1004,900	E3	0,854			



Şekil 3. 12. Bradford yönteminde kullanılan BSA standartları ile elde edilen kalibrasyon eğrisi örneği ($R^2 = 0.99$)

Çizelge 3. 5. Bradford yöntemi ile belirlenen toplam protein miktarları ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)

Zaman Aralıkları	Örnekler	Toplam Protein Miktarı ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
0-3. saat örnekleri	Distal Sinir Ucu	2,52
	Proksimal Sinir Ucu	3,67
24. saat örnekleri	Distal Sinir Ucu	2,59
	Proksimal Sinir Ucu	3,90
	Kontrol	2,10
7. gün örnekleri	Distal Sinir Ucu	4,81
	Proksimal Sinir Ucu	6,01
14. gün örnekleri	Distal Sinir Ucu	5,73
	Proksimal Sinir Ucu	8,51
	Kontrol	4,82
21. gün örnekleri	Distal Sinir Ucu	3,46
	Proksimal Sinir Ucu	5,32
	Kontrol	4,23
35. gün örnekleri	Hasarlı (Distal ve proksimal bir arada)	5,42
	Kontrol	4,23

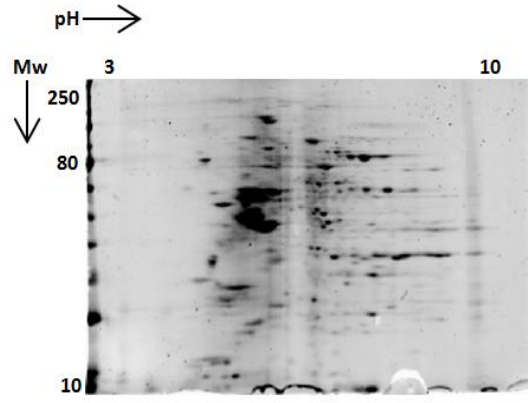
Bradford yöntemi ile miktar tayini yapılan örneklerden, jel başına toplam $45 \mu\text{g}$ protein yüklenmesi için gerekli olan örnek ve rehidrasyon tamponu hacimleri hesaplanmıştır. Her bir havuzda altı semendere ait siyatik sinir dokusu bulunmaktadır. Örnekler birinci boyut ayrımı için, rehidrasyon tamponu ile birleştirildikten sonra, pH 3-10, 7 cm'lik immobilize pH gradiyent (IPG) şeritlere yüklenmiştir. Her bir örnek için, üç teknik tekrarlı jeller hazırlanmıştır. 0-3. saat ve 7. gün örneklerine ait kontrol grubu dokular optimizasyon çalışmalarında kullanıldığı için bu kısımda yer almamaktadır.

Çizelge 3. 6. Birinci boyut ayırım için IPG şeritlere yüklenmiş örnek ve rehidrasyon tamponu miktarları

Zaman Aralıkları	Örnekler	Örnek Miktarı (µl)	Rehidrasyon Tamponu Miktarı (µl)
0-3. saat örnekleri	Distal Sinir Ucu	17,90	107,10
	Proksimal Sinir Ucu	12,26	112,74
24. saat örnekleri	Distal Sinir Ucu	17,37	107,63
	Proksimal Sinir Ucu	11,53	113,47
	Kontrol	21,42	103,58
7. gün örnekleri	Distal Sinir Ucu	9,36	115,64
	Proksimal Sinir Ucu	7,49	117,51
14. gün örnekleri	Distal Sinir Ucu	7,85	117,10
	Proksimal Sinir Ucu	5,29	119,70
	Kontrol	9,34	115,70
21. gün örnekleri	Distal Sinir Ucu	13,00	112,00
	Proksimal Sinir Ucu	8,46	116,50
	Kontrol	10,64	114,40
35. gün örnekleri	Hasarlı (Distal ve proksimal bir arada)	8,30	116,70
	Kontrol	10,64	114,36

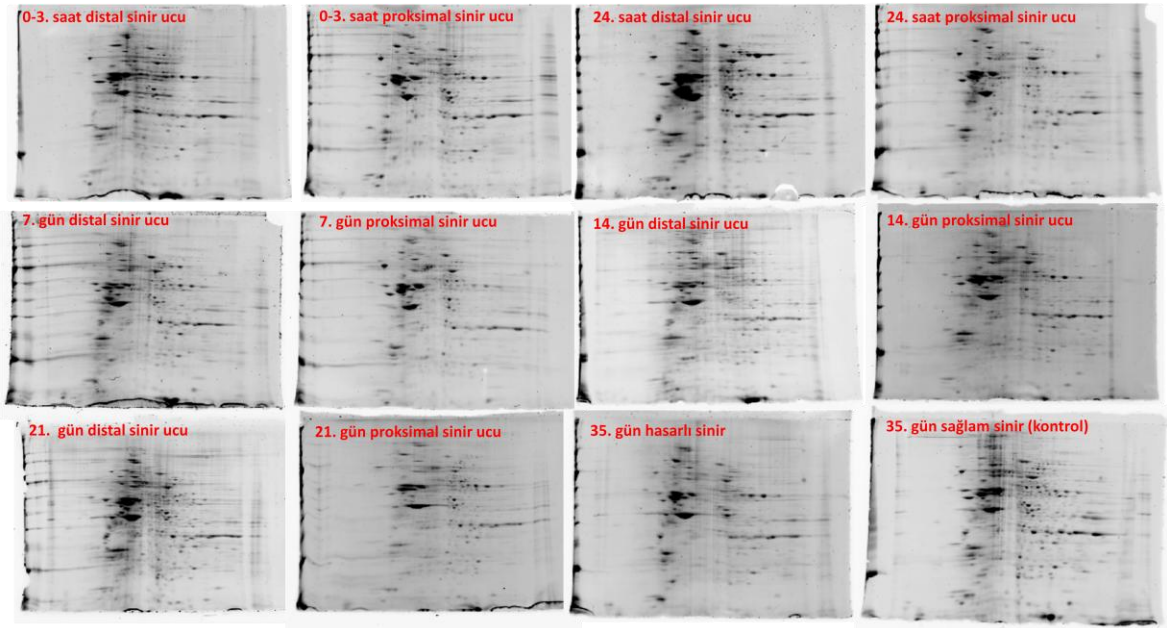
3.4.2. İki Boyutlu Jel Elektrofrezisi ile Protein Profil Haritalarının Eldesi ve Jellerin Analizi

İki boyutlu jel elektrofrezisi ile tüm zaman aralıklarına ait grupların üç teknik tekrarlı olacak şekilde, protein profil haritaları elde edilmiştir. Protein profil haritaları incelendiğinde, protein kümelerinin 20-200 kDa arasında dağılım gösterdiği ve yoğunlukla 40-80 kDa ve pH 4-8 arasında bulunduğu gözlenmiştir (Şekil 3.13- 3.14). Yatay zincirler halinde dağılım gösteren protein kümelerinin varlığı, izoformlar ya da translasyon sonrası modifikasyonların bulunması olasılığına işaret etmektedir. Özellikle, akson rejenerasyonunda translasyon sonrası modifikasyonların etkili olduğu bilinmektedir.

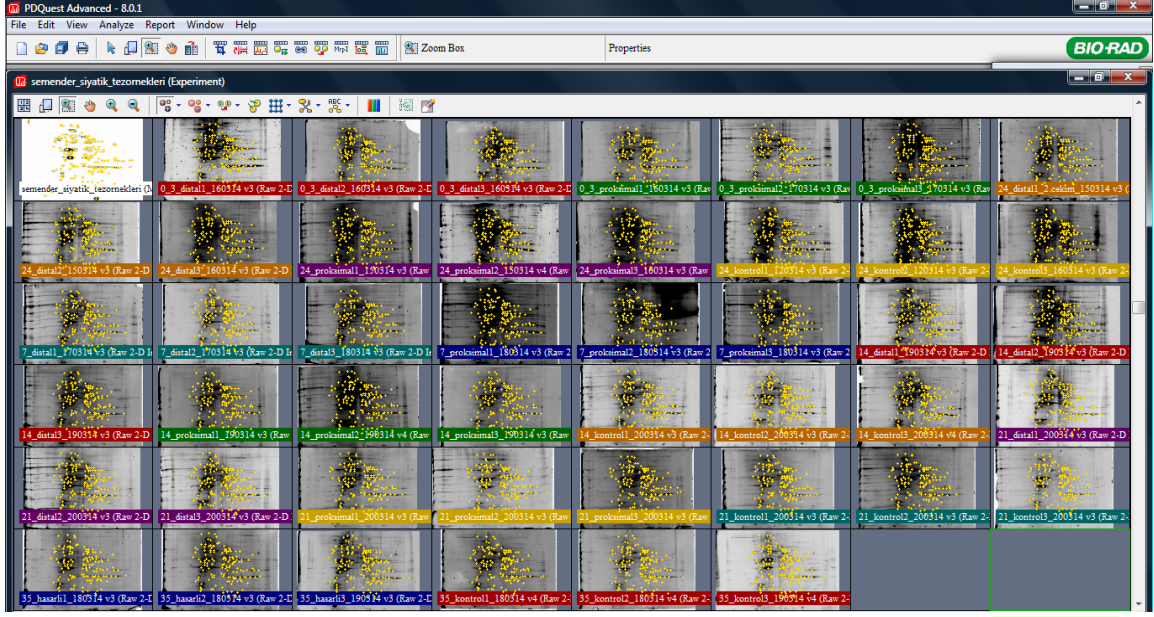


Şekil 3. 13. Siyatik sinir dokusuna ait genel protein profili görünümü (24. saat distal sinir ucu örneği)

Her bir gruba ait üç tekrarlı jeller PdQuest 8.0.1 programı ile analiz edilmiş ve ifade artış ve azalışları arasındaki anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post- Hoc testleriyle değerlendirilmiştir. PDQuest analizi ile toplam 138 protein kümesi tüm jellerde eşleştirilmiştir (Şekil 3.15).



Şekil 3. 14. Tüm zaman aralıklarına ait protein profil haritaları



Şekil 3. 15. Tüm gruplarda eşleştirilen protein kümeleri (Sarı ile işaretli alanlar).

Farklı zaman aralıklarında distal sinir ucu örnekleri kendi aralarında test edildiğinde, 28 protein kümesi; proksimal sinir ucu örnekleri kendi aralarında test edildiğinde ise 38 protein kümesinin ifadesindeki değişim ANOVA ve post-Hoc testlerine göre % 95 güven aralığında ($p < 0,05$) anlamlı bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı ifade farklılığı olan protein kümeleri, PDQuest 8.0.1 programında hazırlanan eşleştirme analizi sonuçlarında verilen protein kümesi numaraları ile birlikte Çizelge 3.7 ve 3.8’de verilmiştir. Bu çizelgelerde, iki zaman aralığı arasında anlamlı ifade farklılığı olan protein kümeleri eş sayıda yıldız ile belirtilmiştir. Örneğin, distal sinir ucu 2203 numaralı protein kümesi için Çizelge 3.7 incelendiğinde, 0-3. saat ve 14. gün; 0-3. saat ve 21. gün ve 24. saat ve 21. gün örneklerinin ifadeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 3. 7. Zaman aralıklarına göre distal sinir ucunda ifadesi artan/ azalan protein kümeleri (ANOVA ve post-Hoc testleriyle % 95 güven aralığında test edilmiştir)

Protein Kümesi Numarası (SSP No)	Zaman Aralıkları (Distal Sinir Ucu)				
	0-3. saat	24. saat	7. gün	14. gün	21. gün
2203	*** 1	***		*	** *** 1
3103	*** 1		*	**	
3201	*	** ** 1	***	**	** * ** 1 1
3402		*			*
3501		*	*		
3705		* ** 1	*	**	
4602	** * ** * ** * 1 1 1	*	**	***	****
4802	** * ** * ** * 1 1 1	*	**	***	****
5508	*			*	
5804		*	*		
6304				*	*
6305	** * ** * 1 1		*	**	***
6405		*			*
6406	* ** * ** * 1 1		*	**	***
7202	*			*	
7304		*	*		
7506	** * ** * ** * 1 1 1	*	**	***	****
8101		** * ** * 1 1	*	**	***
8204	*			*	
8206	* ** 1			*	**
8302	*			*	
8303	** * ** * 1 1	*	**	***	
8502	** * ** * 1 1		*	**	***
8504	* ** 1		*		**
8603	** * ** * ** * 1 1	* * ** * 1	** * ** * 1	** * 1	** * ** * ** * 1 1
8703	*	* ** * ** * 1 1		**	***
8704	*	* ** * ** * ** * 1 1 1	**	***	****
8706	* ** 1	* ** * ** * ** * 1 1 1	** * ** * ** * 1 1	** * ** * 1	****

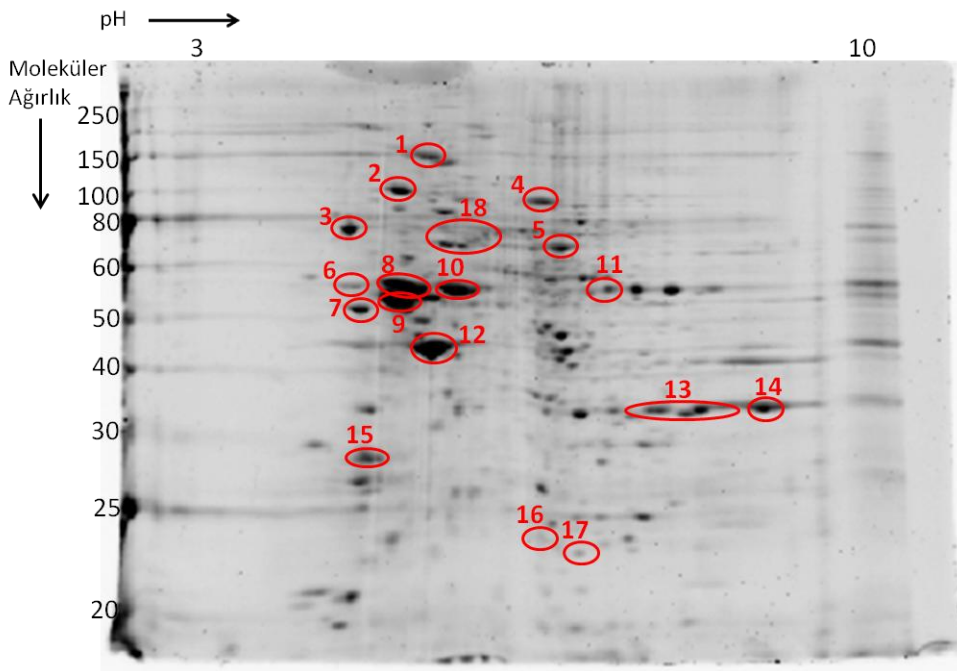
Çizelge 3. 8. Zaman aralıklarına göre proksimal sinir ucunda ifadesi artan/ azalan protein kümeleri (ANOVA ve post-Hoc testleriyle % 95 güven aralığında test edilmiştir).

Protein Kümesi Numarası (SSP No)	Zaman Aralıkları (Proksimal Sinir Ucu)				
	0-3. saat	24. saat	7. gün	14. gün	21. gün
2203	*				*
2604			* **	*	**
3302	* ** ***	*		**	***
3308	*			*	
3501	*	**	* ** *** ****	***	****
3502	*				*
3705	* **		*** ****	* ***	** ****
3802	*		**		* **
4202		*			*
4901			*	* **	**
5201		*		*	
5305	*		*		
5504	* **	* *** ****	*** ****	** *****	****
5703	*				*
5804	*	**		***	* ** ***
6405	* ** *** ****	*	**	***	****
6406	*				*
6507	*				*
6801				*	*
7101	* **			*	**
7303		*	**	***	* ** ***
7304	* ** *** ****	*	**	***	****
7406	*		*		
7407	* **	*** ****	*****	* *** *****	** *****
7601		*			*
8005	* ** *** ****	*	**	***	****
8101	* **		*		**
8203		* **	*		**
8215	*		* **	**	
8301			*	*	
8302		*		*	
8303	*		*		
8306	*	*			
8502	*		*		
8504	*	**	* **		
8603	*		**	* **	
8706			*		*
9203	*	**	***		* ** ***

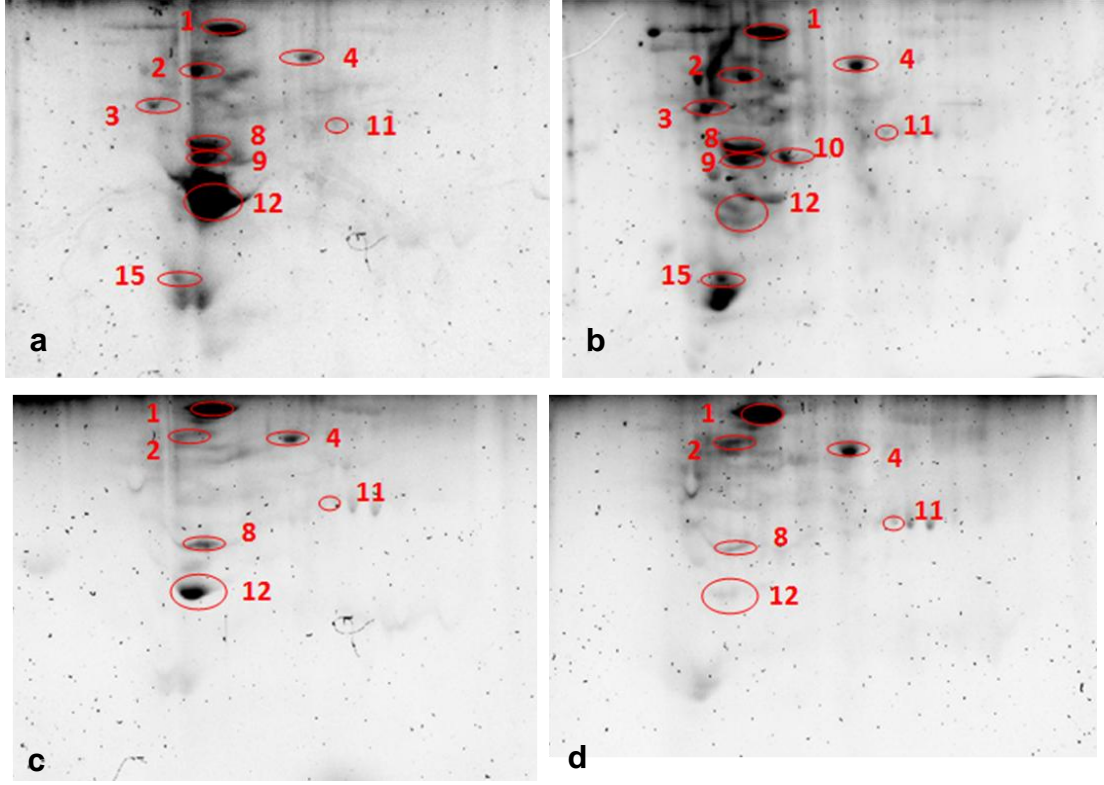
3.4.3. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Elde Edilen Peptit Kütle Parmak İzi Verileri

MALDI-TOF kütle spektrometresinin dış kalibrasyonu beş peptit karışımı ile yapıldıktan sonra, örnek kuyucukları okutulmuş ve tripsin (Promega, ABD) enzimi ile kesilmiş olan peptitlere ait kütle/ yük (m/z) değerleri elde edilmiştir.

Proteinlerin tanımlanmasında MASCOT sunucusuna ait Peptit Kütle Parmak İzi (PMF) yöntemi kullanılmıştır [61]. Tüm aramalar, veri tabanında taksonomik olarak semenderlere en yakın grubu oluşturan ve genomu belirlenmiş tür olan *Xenopus laevis*'e (Afrika tırnaklı kurbağası) ait veriler üzerinden yapılmıştır. *Triturus karelinii* türü siyatik sinir dokusunun protein profili daha önce incelenmemiş olduğundan, PDQuest programı ile gruplar arası ifade farklılığı bulunan proteinlerin yanı sıra kullanılan yöntemle tespit edilebilen diğer tüm protein kümeleri de jelden geri kazanılarak MALDI-TOF kütle spektrometresi ile protein tanımlamaları yapılmıştır. Bu yöntemle toplam otuz dört protein tanımlanmıştır ve tanımlanan proteinlere (Şekil 3.16) ait liste Çizelge 3.9'da verilmiştir. Ön çalışmalar kapsamında hasar sonrası 24. saat örneklerine uygulanan fosfoprotein ve glikoprotein boyamaları ile elde edilen protein haritaları, toplam protein boyamalarından elde edilen haritalarla eşleştirilerek, tanımlama yapılan proteinlere karşılık gelen protein kümeleri de belirlenmiştir (Şekil 3.17).



Şekil 3. 16. Protein tanımlamalarının yapıldığı protein kümeleri



Şekil 3. 17. Hasar sonrası 24. saate ait fosfoprotein ve glikoprotein boyaması ile elde edilen haritalarda MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanmış proteinlere karşılık gelen protein kümeleri [a) Distal sinir ucu fosfoprotein boyası, b) Proksimal sinir ucu fosfoprotein boyası, c) Distal sinir ucu glikoprotein boyası, d) Proksimal sinir ucu glikoprotein boyası]

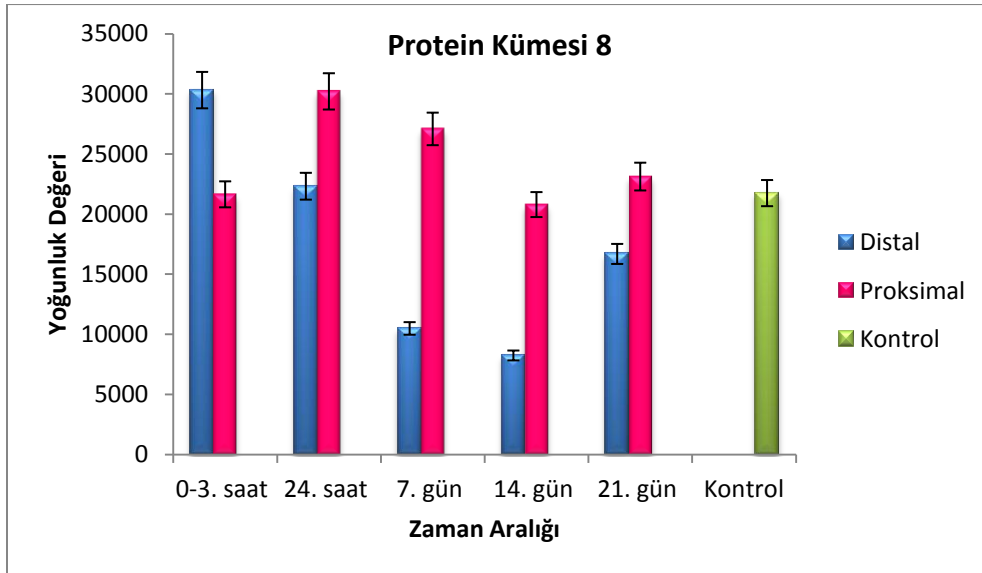
Çizelge 3. 9. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin listesi (Liste yüksek skorlu proteinlerden düşük skorlu proteinlere göre sıralanmıştır).

Protein Kümesi Numarası	SwissProt Erişim Numarası	Tanımlanan Protein	Skor	Teorik p/Mw (kDa)	Deneysel p/Mw (kDa)	Dizi Kapsama Yüzdesi (%)	Eşleşen/ Eşleşmeyen Peptit Sayısı
8	TBA_XENLA	Tubulin alpha chain	150	4.96/ 50.5	5.0/ 57.8	33	10/4
9	TBB2_XENLA	Tubulin beta-2 chain	103	4.81/ 50.1	5.0/ 53.8	27	8/ 9
12	ACTB_XENLA	Actin, cytoplasmic 1	52	5.30/ 42.1	5.3/ 42.7	17	5/19
10	PERI_XENLA	Peripherin	43	5.23/ 52.1	5.5/ 57.4	15	9/46
11	5NTC_XENLA	Cytosolic purine 5'-nucleotidase	40	5.45/ 66,7	6,9/ 58,8	13	5/14
16	FXL15_XENLA	F-box/LRR-repeat protein 15	35	6.69/ 33.8	7.0/ 27.0	12	2/4
18	RAGP1_XENLA	Ran GTPase-activating protein 1	33	4.53/ 63.5	5.4/73.8	10	5/ 19
4	XPO7B_XENLA	Exportin-7-B	32	5.84/ 124.6	6.2/ 133.3	4	3/ 5

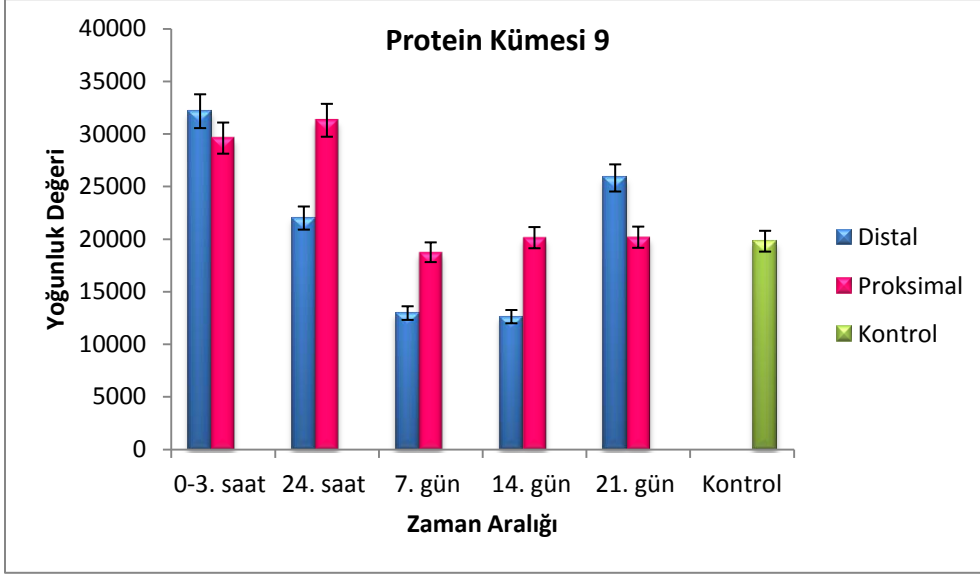
14	CSK21_XENLA	Casein kinase II subunit alpha	32	7,29/45,3	8,4/ 36	11	3/9
2	CTNA2_XENLA	Catenin alpha-2	30	5.52/107.8	5/ 111.2	5	3/ 13
18	EPHB3_XENLA	Ephrin type-B receptor 3	27	5.71/109.7	5.4/73.8	6	5/18
11	GNL3_XENLA	Nucleostemin like protein	27	8,37/61,6	6,9/ 58,8	6	3/16
17	RAB19_XENLA	Ras-related protein Rab- 19	26	6.38/24.3	6.5/24.5	15	2/9
11	PALM3_XENLA	Paralemmin-3	24	4,66/66,5	6,9/ 58,8	5	3/16
11	ESR1_XENLA	Estrogen receptor	24	7,59/66,8	6,9/ 58,8	5	3/16
3	TRF6B_XENLA	TNF receptor-associated factor 6-B	23	5.84/65.0	4.5/ 80	4	2/4
1	CAPS1_XENLA	Calcium-dependent secretion activator 1	22	5.50/149.8	5.20/ 150	3	4/ 14
6	FGFR4_XENLA	Fibroblast growth factor receptor 4	22	5.36/94.4	5.4/73.8	5	4/ 19
6	ZBT18_XENLA	Zinc finger and BTB domain-containing protein 18	21	5.66/59.6	4.5/ 57.3	6	2/ 5
18	AB1IP_XENLA	Amyloid beta A4 precursor protein binding family B member 1-interacting protein	21	6.02/73.1	5.4/73.8	7	3/ 20
5	FASC_XENLA	Fascin	21	7,05/53,6	6,4/ 73,9	7	2/ 11
15	PENKA_XENLA	Proenkephalin-A-A	20	5.16/30.4	4.7/ 31.1	6	3/ 10
6	ECSIT_XENLA	Evolutionary conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial	20	5,55/48,0	4,5/ 57,3	9	2/5
10	ACHAA_XENLA	Acetylcholine receptor subunit alpha-1-A	20	6,17/52,8	5,5/ 57,4	8	2/ 15
7	TGFI1_XENLA	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	19	5.61/57.6	4.6/ 51.5	5	2/ 13
13	RD10A_XENLA	Retinol dehydrogenase 10-A	19	7.89/39.2	7.4/35.9	7	2/ 10
13	HM20A_XENLA	High mobility group protein 20A	18	6.86/39.7	7.4/35.9	4	2/ 9
4	CHRD_XENLA	Chordin	18	6,17/107,5	6,2/ 133,3	4	3/5
13	TM129_XENLA	E3 ubiquitin-protein ligase TM129	17	7.57/41.8	7.4/35.9	3	2/9

11	RCOR2_XENLA	REST corepressor 2	16	7,16/56,3	6,9/ 58,8	7	3/ 16
10	SNX33_XENLA	Sorting nexin-33	16	5.99/63.5	5.5/ 57.4	5	1/16
17	NRN1B_XENLA	Neuritin- B	16	6.06/16.2	6.5/24.5	15	1/10
10	VIM1_XENLA	Vimentin-1/2	15	5.16/52.9	5.5/ 57.4	5	2/15
16	F206A_XENLA	Protein Simiate	15	7.55/21.2	7.0/ 27.0	8	1/5

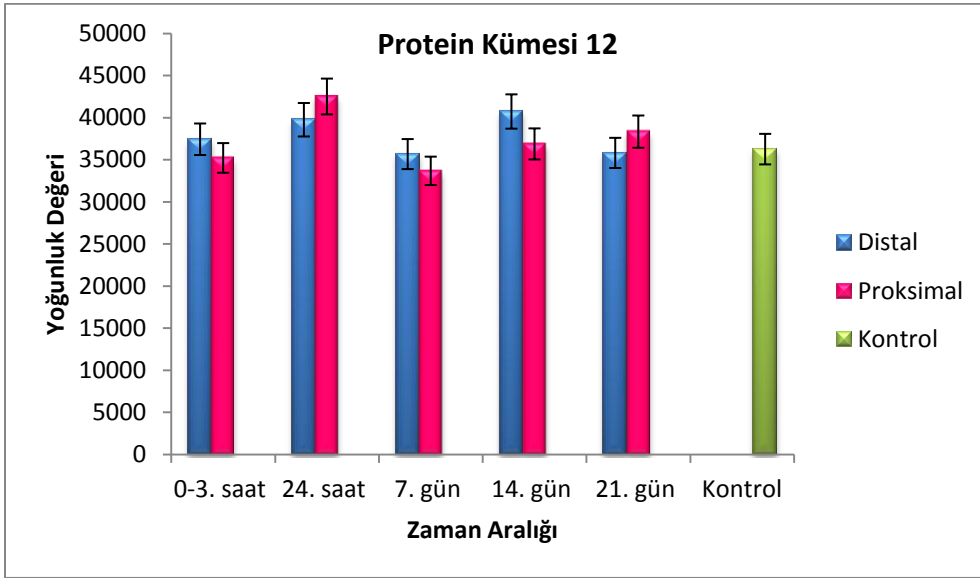
Protein tanımlaması yapılan protein kümelerinin gruplar arasındaki ifade farklılıkları PDQuest programından alınan yoğunluk değerleri kullanılarak grafiklere aktarılmıştır. Her bir protein kümesi için distal ve proksimal uçlara ait veriler beş ayrı zaman aralığına göre ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Otuz beşinci güne ait sinir örnekleri, siyatik sinirin distal ve proksimal uçları birleşmiş olduğu için bu değerlendirmede kullanılmamıştır. Ayrıca Şekil 3.16'da gösterilen ve protein tanımlaması yapılan protein kümelerinden 13 ve 18 numara ile belirtilen protein grupları için distal ve proksimal uçlara ait ifade farklılığı grafikleri, bu protein kümeleri gruplar halinde kesilerek incelendiği için hazırlanmamıştır. Protein tanımlaması yapılmış olan diğer protein kümelerine ait distal ve proksimal uçlardaki ve kontrol grubundaki ifade değişimlerini gösteren grafikler Şekil 3.18-3.33'de verilmektedir.



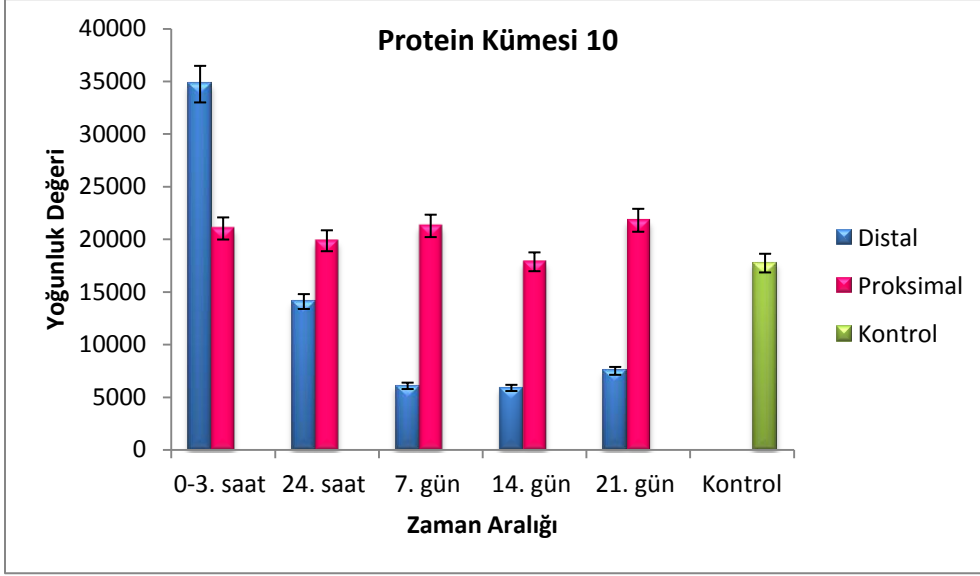
Şekil 3. 18. Sekiz numaralı protein kümesinin (Tubulin alfa zinciri) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



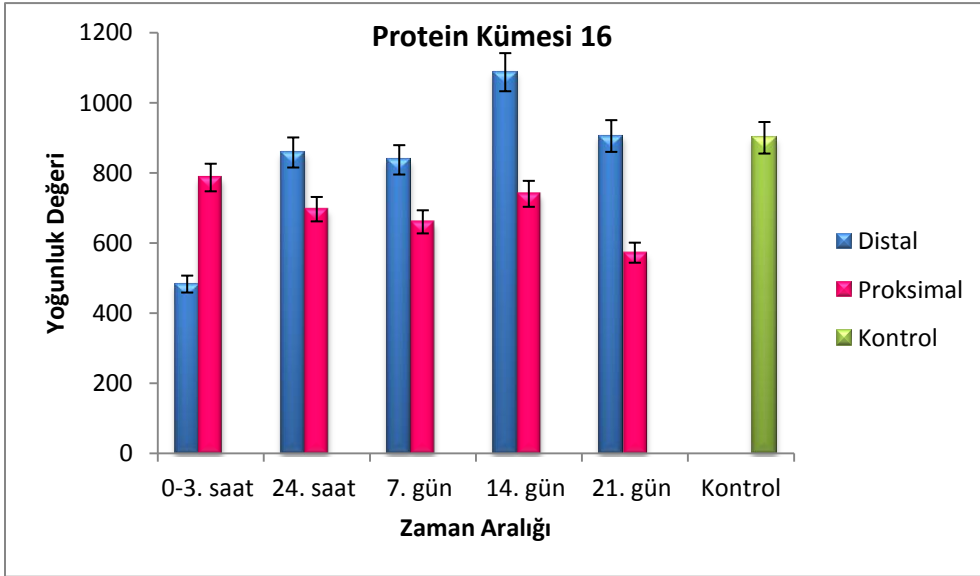
Şekil 3. 19. Dokuz numaralı protein kümesinin (Tubulin beta-2 zinciri) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



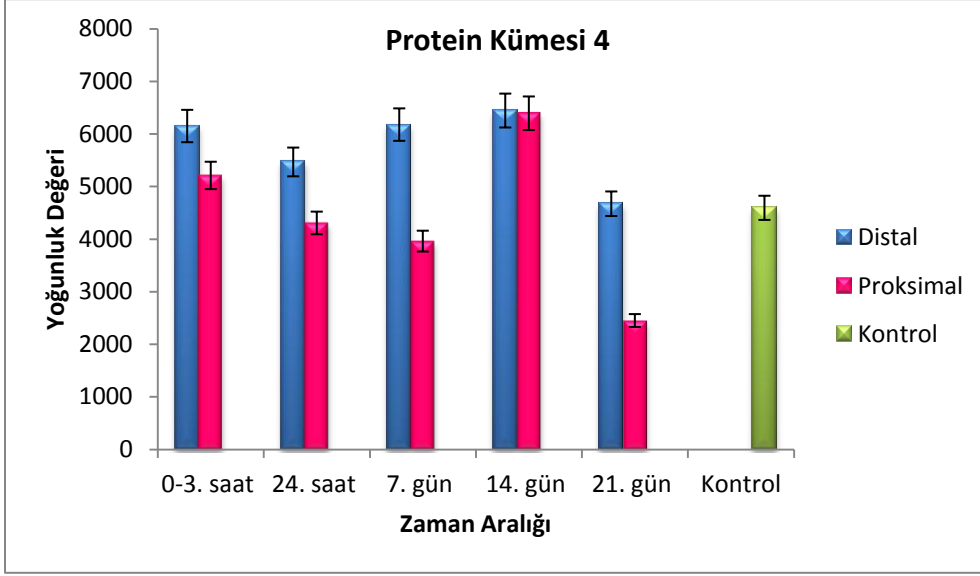
Şekil 3. 20. On iki numaralı protein kümesinin (Aktin sitoplazmik 1) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



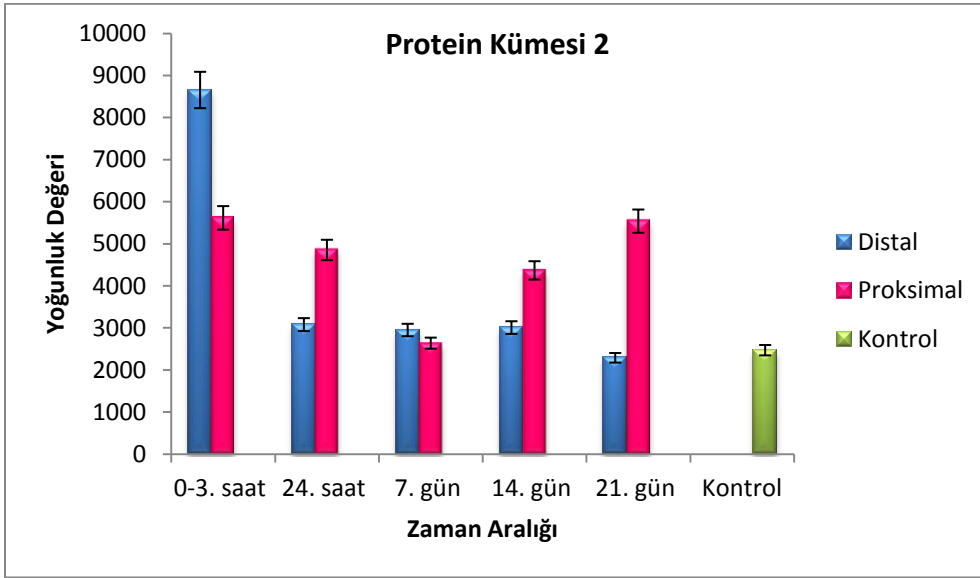
Şekil 3. 21. On numaralı protein kümesinin (Periferin, Asetilkolin reseptör alfa 1-A alt birimi, Sınıflandırıcı neksin-33, Vimentin-1/2) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



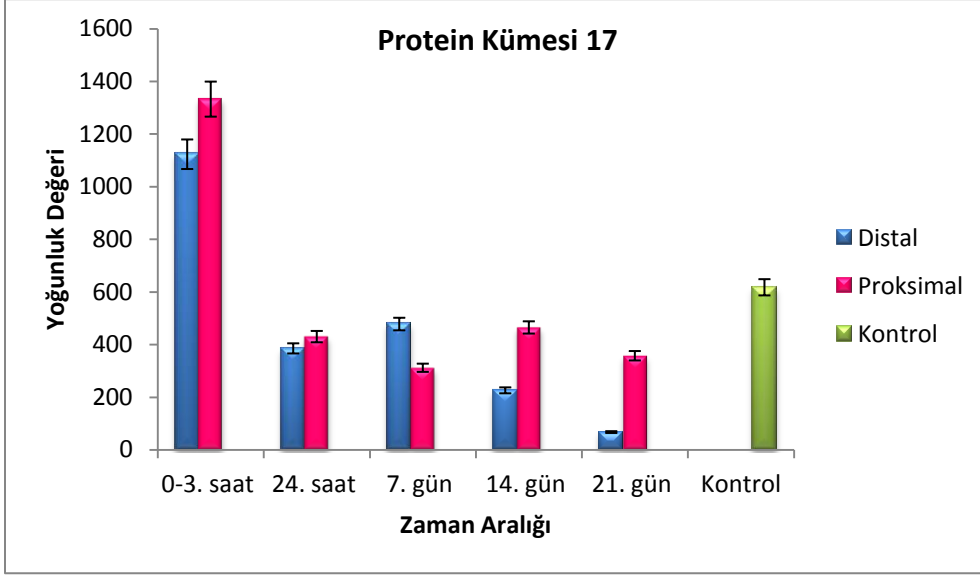
Şekil 3. 22. On altı numaralı protein kümesinin (F-kutusu/LRR-tekrar protein 15, Protein simiate) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



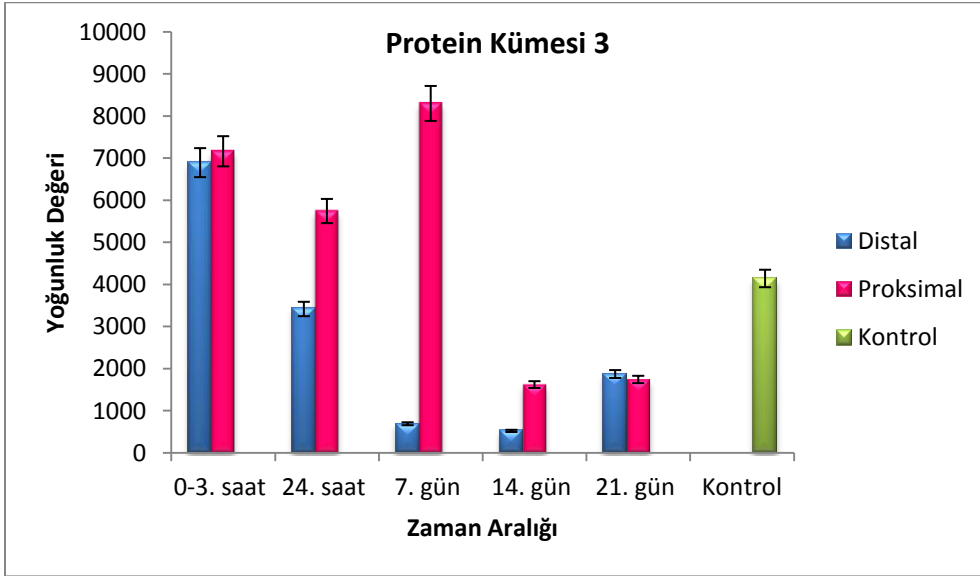
Şekil 3. 23. Dört numaralı protein kümesinin (Eksportin 7-B, Kordin) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



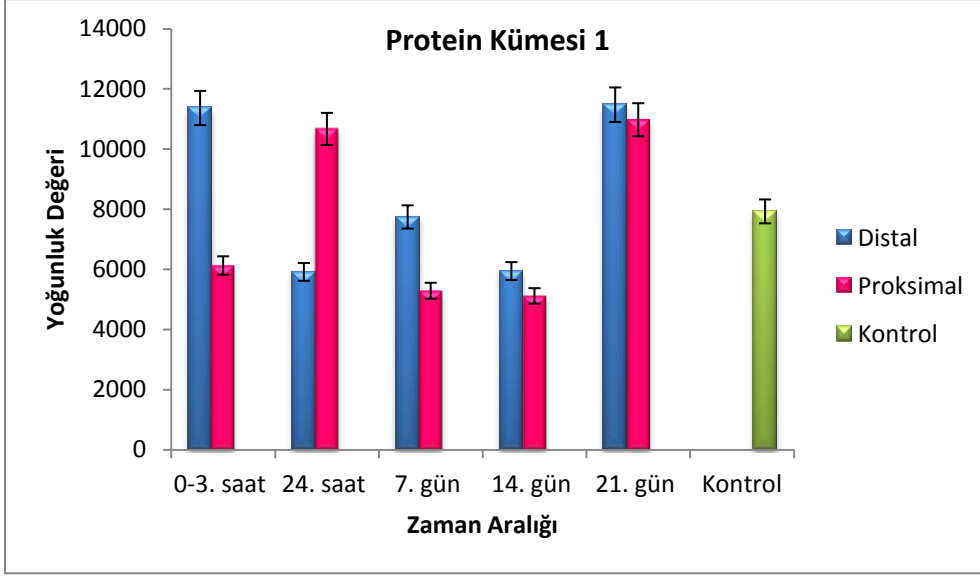
Şekil 3. 24. İki numaralı protein kümesinin (Katenin alfa-2) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



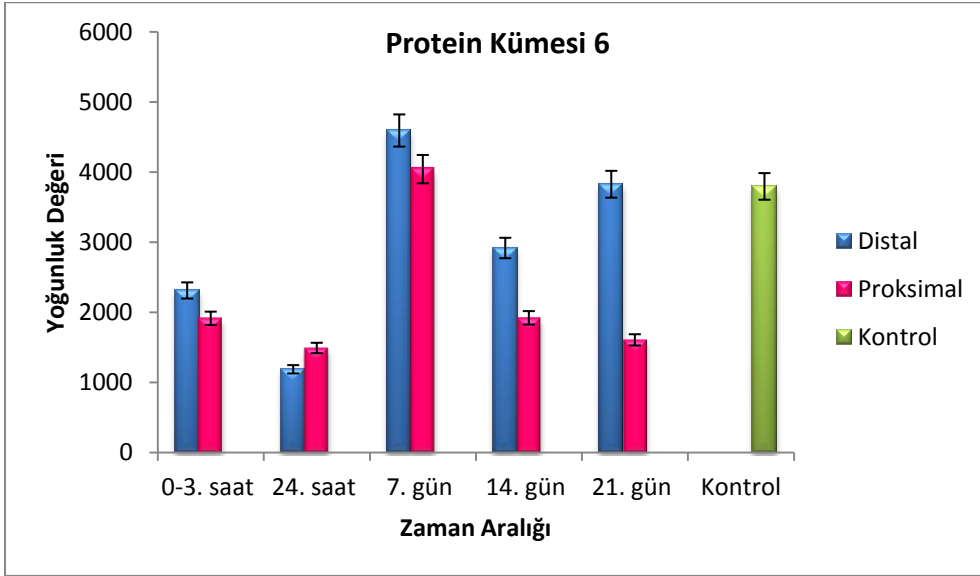
Şekil 3. 25. On yedi numaralı protein kümesinin (Ras-ilişkili protein Rab-19, Nöritin-B) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



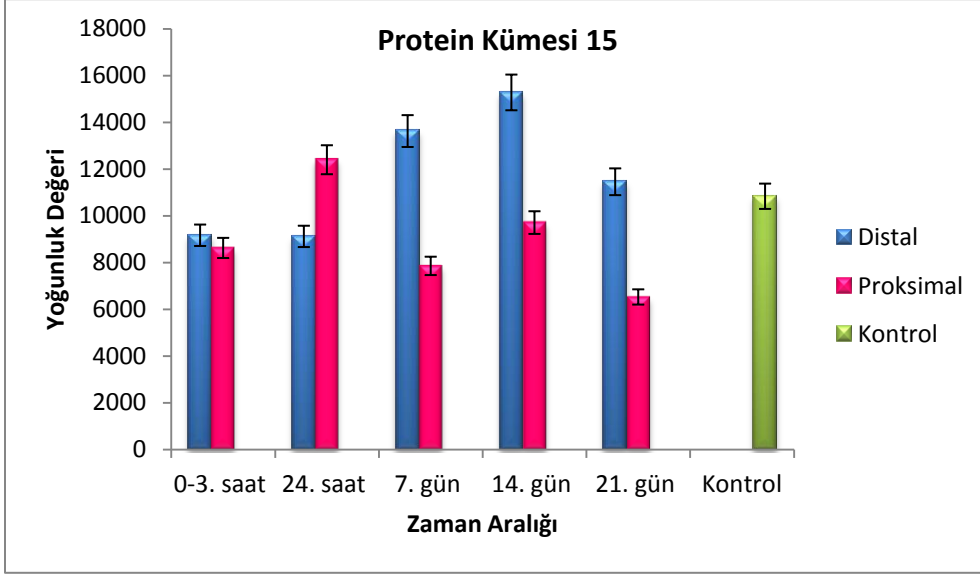
Şekil 3. 26. Üç numaralı protein kümesinin (TNF-reseptör ilişkili faktör 6-B) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



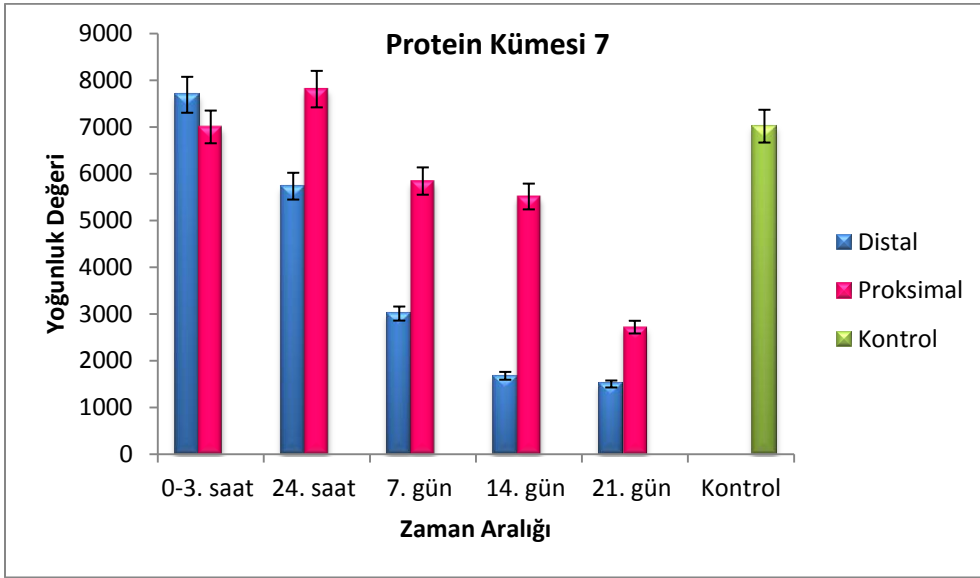
Şekil 3. 27. Bir numaralı protein kümesinin (Kalsiyum bağımlı salgılama aktivatörü 1) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



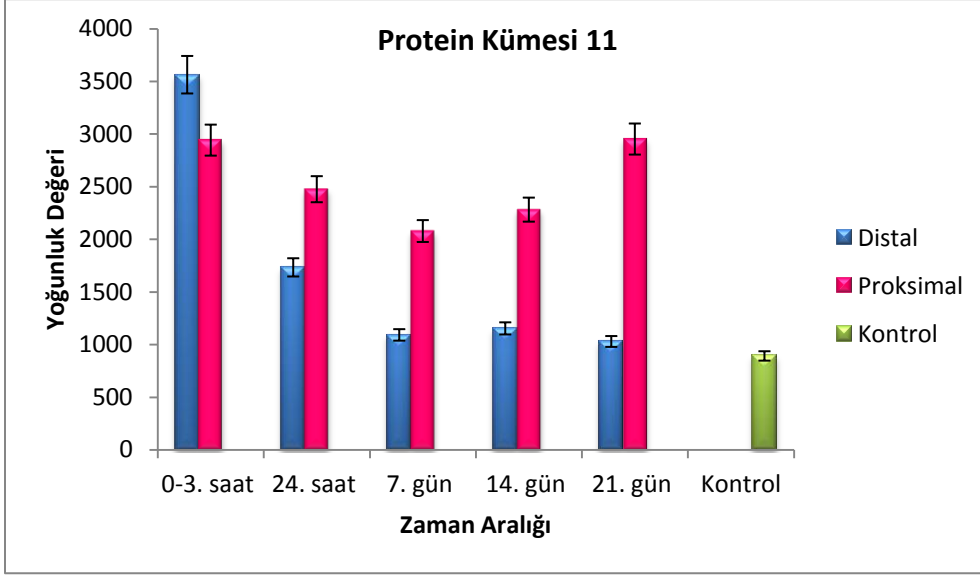
Şekil 3. 28. Altı numaralı protein kümesinin (Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 4, Çinko parmak ve BTB domain içeren protein 18, Evrimsel olarak korunmuş Toll yolu ara sinyal proteini) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



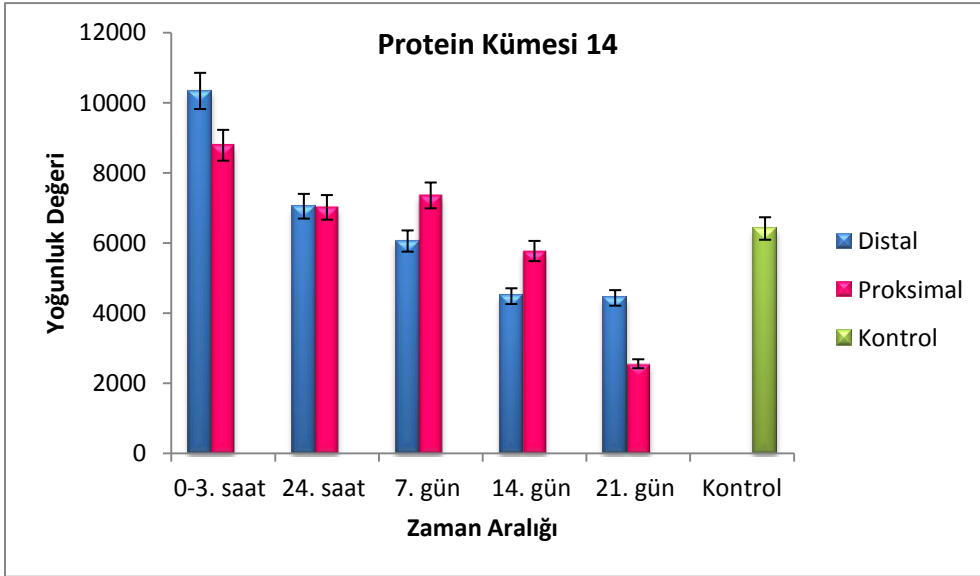
Şekil 3. 29. On beş numaralı protein kümesinin (Proenkefalin A-A) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



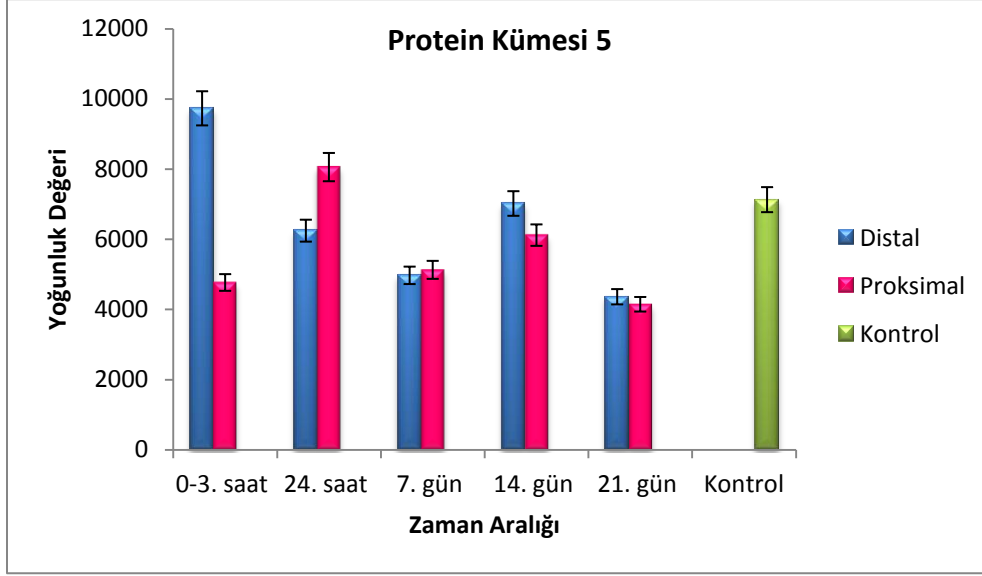
Şekil 3. 30. Yedi numaralı protein kümesinin (Transforme edici büyüme faktörü beta-1 ile indüklenen transkript 1 proteini) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



Şekil 3. 31. On bir numaralı protein kümesinin (Sitosolik pürin 5'-nükleotidaz, Nükleostemin benzeri protein, Paralemin-3, Östrojen reseptörü, REST korepresör 2) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



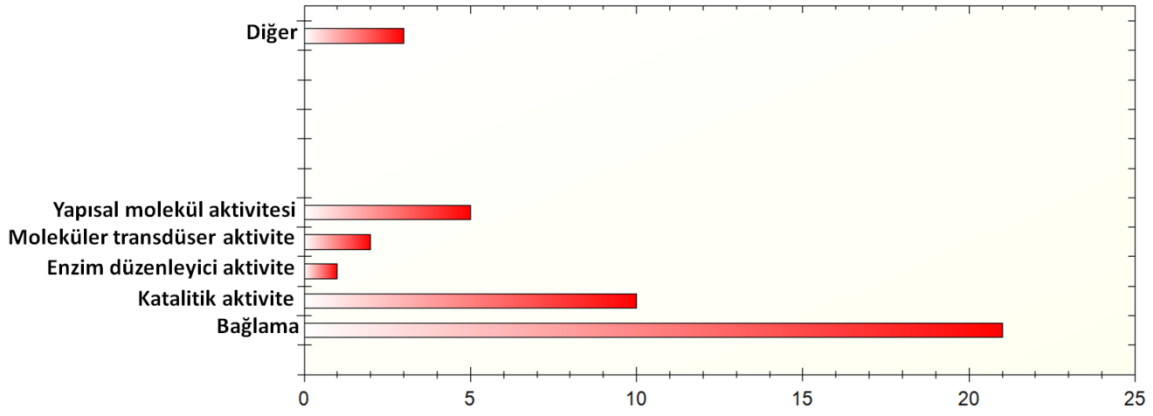
Şekil 3. 32. On dört numaralı protein kümesinin (Kazein kinaz 2 alfa alt birimi) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği



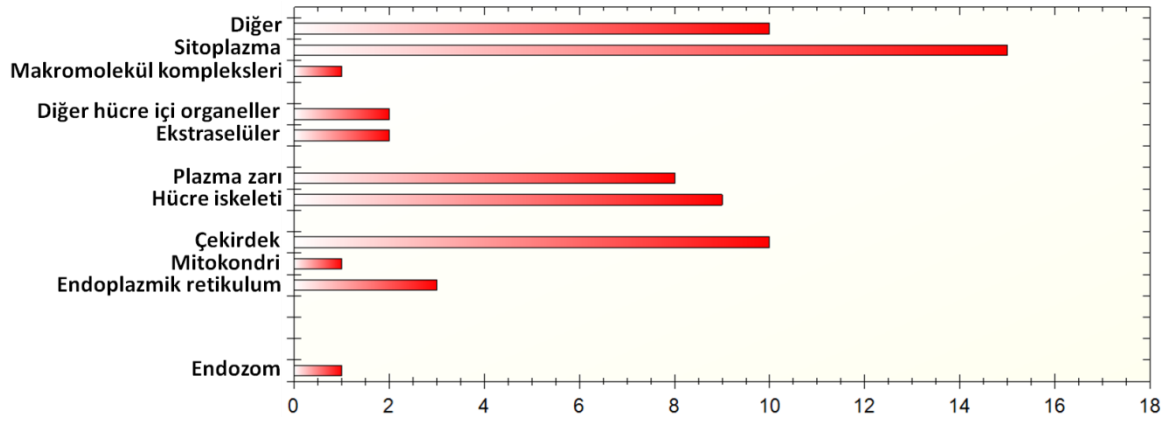
Şekil 3. 33. Beş numaralı protein kümesinin (Faskin) zaman aralıklarına göre ifade değişimi grafiği

3.4.4. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile Tanımlanan Proteinlerin Görevleri

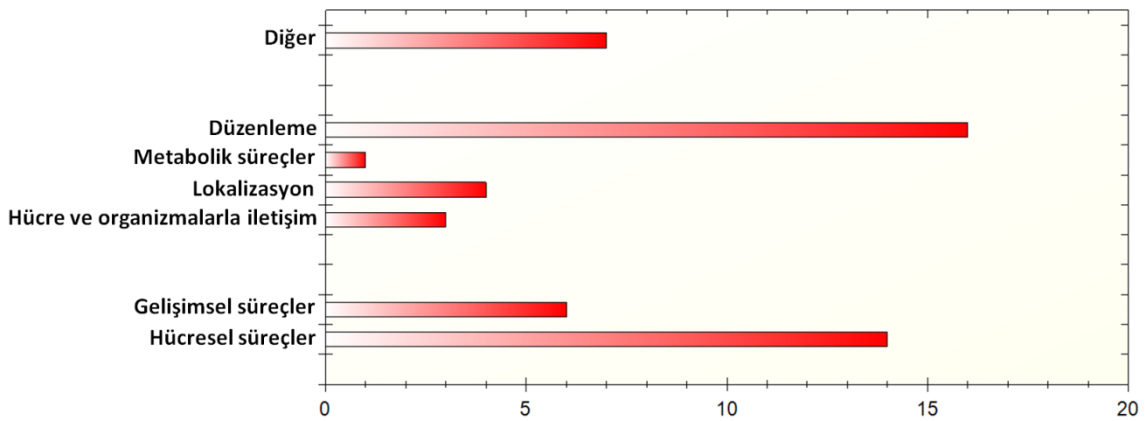
Çalışmamızda bu yöntemle toplam 34 adet protein tanımlanmıştır. Bu proteinler, hücre içi konumlarına, moleküler ve biyolojik fonksiyonlarına göre STRAP 1.5 programı ile sınıflandırılmıştır (Şekil 3.34- 3.36). STRAP 1.5 (Software Tool for Rapid Annotation of Proteins, ABD), Boston Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kardiyovasküler Proteomik Merkezi'nde geliştirilmiş bir programdır. Program verilen protein listesini, UniprotKB, EBI ve GO veri tabanlarında arayarak, bulunduğu eşleştirmelerle proteinlerin fonksiyonlarına ve hücre içi konumlarına göre ayrılmasını sağlamakta ve hem metin formatında hem de Gen Ontoloji (GO) grafikleri şeklinde proteinleri sınıflandırmaktadır. Bu sınıflandırmanın tanımlanan proteinler arasındaki dağılımı Ek 4 kısmında yer almaktadır (Çizelge 4. 15- 4. 17).



Şekil 3. 34. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre dağılımları (STRAP 1.5)



Şekil 3. 35. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin hücresel konumlarına göre dağılımları (STRAP 1.5)



Şekil 3. 36. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre dağılımları (STRAP 1.5)

Her bir proteinin sinir rejenerasyonu süreci ile ilişkili görevleri, hücre iskeleti proteinleri, enzim aktivitesi olan proteinler, ubiquitinasyon mekanizması ile ilgili proteinler, sinyal molekülleri ve reseptörleri, taşıyıcı proteinler, hücre adezyon molekülleri ve düzenleyici proteinler başlıkları altında detaylı olarak açıklanmıştır.

3.4.4.1. Hücre İskeleti Proteinleri

3.4.4.1.1. Tubulin alfa ve beta zincirleri

Tubulin molekülü, mikrotübüllerin ana bileşenidir. Mikrotübüller alfa ve beta tubulin alt birimlerinden oluşmaktadır. Başarılı akson rejenerasyonu için hasarlı nöronlarda büyüme ilişkili bazı genlerin ifadelerinin artması gerekmektedir. Tubulin izotipleri de bu büyüme ilişkili genler arasında yer almaktadır. Memeli merkezi sinir sistemine ait nöronlarda, alfa tubulin ifadesinin nöronların uzantılarını uzattıkları süreçte arttığı, beta tubulinin ise post-mitotik nöronlarda bulunduğu belirtilmektedir. Büyümekte ve rejenere olmakta olan nöronlarda tubulin alt birimlerinin ifadelerinin arttığı bilinmektedir [62]. Tubulin moleküllerinde gözlenen translasyon sonrası modifikasyonlar, mikrotübüllerin yapısı ve özelliklerinin düzenlenmesinde ve hücre bölünmesi, hücre içi iletişim gibi mikrotübül aracılı fonksiyonların gerçekleşmesinde önemlidir. Tubulin moleküllerinin, detirozinasyon, glutamilasyon, glisilasyon, asetilasyon, fosforilasyon gibi translasyon sonrası modifikasyonlara uğradıkları bilinmektedir [63]. Aksotomi sonrasında gen ifadesinin değişmesiyle, hedefin yeniden sinirlendirilmesi sonrası bu değişimin geri dönmesi, gen ürününün sinir rejenerasyonunda fonksiyonel bir rolü olduğunun göstergesidir. Buna bir örnek, T α ve sınıf II β tubulin izoformlarının, aksotomi sonrası ifadelerinin artması ve hedef yeniden sinirlendirildiğinde baskılanmalarıdır. Tubulin ve aktinin yavaş bileşenleri b'lerin (SCb) taşınma hızlarıyla, aksonal rejenerasyon hızı arasında da bir ilişki vardır. Bu ilişki ile birlikte, aksotomi sonrasında, tubulin ve aktin mRNA'larının miktarlarının artması ve nörofilament proteinlerinin miktarlarının azalması, rejenere olan aksonların, aksonal büyüme için büyüme konilerine daha fazla miktarda aktin ve tubulin sağlayarak, gelişmekte olan aksonları yeniden düzenledikleri kanıtlanmıştır. Başarılı bir rejenerasyon süreci için aksotomize nöronlar iletili durumdan büyüme durumuna geçmeli ve hepsi akson rejenerasyonunu destekleme potansiyelinde olan, GAP-43, tubulin, aktin, bir seri farklı nöropeptitler ve sitokinler gibi büyümeyle ilişkili proteinleri ifade etmelidir

[18]. Sağlam sinirlerde mikrotübüller distal kısımda + uçları olacak şekilde tek yöne doğru dizilmektedir. Hasar sonrasında, büyüme konilerinin oluşumuna destek olacak veziküllerin taşınmasını kolaylaştırmak üzere konumları da değişmektedir [13].

3.4.4.1.2. Aktin, sitoplazmik 1

Aktin, tüm ökaryotik hücrelerde bulunan ve hücre içi hareketin çeşitli aşamalarında görev alan bir proteindir. Polimerleşmiş aktin filamentleri mikrotübüller ve nörofilamentlerle birlikte, aksonların temel hücre iskeleti elemanlarıdır. Aktin filamentlerinin olgun aksonlardaki en önemli görevi plazma zarının altında bir iskele oluşturarak plazma zarını sabitlemek ve çeşitli özel zar bölgelerine ait protein grupları için bağlanma alanı sağlamaktır. Buna ek olarak, miyozin motor proteinleri ile etkileşerek organellerin kısa mesafelerde taşınmasını sağlamaktadır. Bu görevler aktin filamentlerinin aksonal homeostasisin yapısal bileşeni olarak yer aldığını göstermektedir. Aktin büyük oranda nöron gövdesindeki poliribozomlarda sentezlenmekle birlikte, küçük miktarlarda da aksonlarda sentezlenmektedir. Bu oran küçük olsa da, büyümekte olan aksonlarda, olgun akson uçlarında ve rejenerasyon olmakta olan aksonlarda aksonal aktinlerin mRNA translasyonunun düzenlenmesi hayati önem taşımaktadır. Ayrıca gelişmekte olan büyüme konilerinde de aktin mRNA'sı yoğun olarak bulunmaktadır. Akson hasarları da lokal aktin sentezini arttırmaktadır. Akson ezilme ya da hasarlanmaları sonrasında, zar bütünlüğünün bozulması hasar bölgesinin proksimalinde kalan sinir segmentini uyararak, proteolizis ve sitoplazmik yıkımı başlatır ve akto-miyozin aracılı geri çekilme gerçekleşir. Aksonların bu süreç sonunda iyileşmeleri durumunda proksimal uçta ileri doğru hareketlenme yeniden başlar ve bir büyüme konisi oluşur. Büyüme konisinin oluşmasında, proteazlar, kinazlar ve lokal protein sentezi etkilerinin yanı sıra, filament aktin dinamiklerinin yenilenmesi ve aktin mRNA'larının translasyonu yaralanmadan kısa bir süre sonra gerçekleşerek, rejenerasyon başarısında önemli görevler üstlenmektedir [64].

Nöronların hücre iskeleti elemanları olan mikrotübüller, aktin filamentleri ve nörofilamentler asimetric hücre morfolojisinin korunmasının yanı sıra, hücre içi organellerin taşınmasında da önemlidir. Motor proteinler, bu filamentlerin polaritesine ve yerleşimine bağlı olarak filamentler boyunca ya hücre

gövdesinden aksonlara doğru ya da tam tersi yönde hareket etmektedirler. Aktin filamentleri üzerinden kısa mesafelere taşınım gerçekleşirken; mikrotübüller üzerinden daha uzun mesafelere taşınım gerçekleşmektedir. Aktine bağlı organel taşınımı özellikle dendrit uzantıları ya da aksonal büyüme konileri gibi, mikrotübüller bakımından zengin olmayan akson ve dendrit bölgelerinde önemlidir. Yavaş aksonal taşınım ise, hücre iskeletini oluşturan proteinlerin sentezlendikleri hücre gövdesinden akson boyunca hareketini ifade etmektedir [65].

Aktin-temelli hücre iskeleti, büyüme konisinin hareketlerinde ve rehber moleküllere ait işaretlerin tanınmasında önemli görevler üstlenmektedir [66]. Genel olarak, aktin filamentlerinin bir araya toplanması ya da birbirlerinden ayrılması, rejenerasyonun başarılı olmasında önemli olan büyüme konisinin dayanıklılığı ve ileri doğru uzaması ya da içe doğru çökmesi gibi hareketlerini etkilemektedir [13].

3.4.4.1.3. Periferin

Periferin, periferik sinir sisteminde ifade edilen, 58 kDa büyüklüğünde tip III ara filament proteinidir ve merkezi sinir sisteminde de belirli nöron alt gruplarında bulunmaktadır. Periferin, oldukça esnek olan nöron hücre iskeletinin gelişiminde birleştirici görev alır ve uç noktalarda farklılaşan nöronlara mekanik destek sağlar [67].

Başarılı bir akson rejenerasyonu sırasında, hücre iskeleti ara filamentlerinin (nörofilamentlerin) moleküler yapısı olgun durumdan gelişmekte olan aksonlardaki haline döner. Hem az, hem çok gelişmiş omurgalılara ait rejenerasyon olan aksonlarda periferin miktarında artış görülür ve rejenerasyonun tamamlanması ile birlikte periferin ifadesi hasar öncesi seviyeye kadar düşer. Nörofilament alt birimlerinin ifadelerindeki bu değişiklikler hem taşınma, esneklik, ve hücre içi alanların düzenlenmesinde, hem de diğer hücresel bileşenlerle etkileşiminde önemlidir. Hücre iskeletindeki bu değişiklikler, akson büyümesi ve sinaptogenez için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Bu değişimler aynı zamanda akson- hedef ve akson- sinyal yolu etkileşimleriyle doğrudan ilişkili olup, aksonların yeniden uzaması ve bağlantıların düzenlenmesinde de önemlidir [68].

3.4.4.1.4. Vimentin 1/2

Vimentin, tip III ara filament proteinidir. Gelişimin erken dönemlerinde hem glioblast hem de nöroblastlarda ifade edilmektedir. Bazı Schwann hücreleri ve astrositler de vimentin içermektedir [69]. Vimentin proteini sinir sisteminde en çok glial hücreler tarafından ifade edilmektedir ancak gelişimin erken dönemlerinde ve hasarlanma sonrasında nöronlar tarafından da ifade edildiği bilinmektedir. Perlson ve ark. [70], yaptıkları çalışmada sıçan siyatik sinir aksoplazmasında vimentin ifadesinin hasar sonrasında arttığını tespit etmiştir.

3.4.4.1.5. Faskin

Faskin, bir globüler aktin- paketleme proteinidir ve hücre uzantıları ve sitoplazmik aktin demetleri üzerinde önemli görevleri vardır. Faskin ve aktin etkileşimi, hücre dışı matriks, peptit faktörleri ve diğer aktin-bağlayan proteinlerin düzenlenmesi ile sağlanmaktadır. Faskin hücre dışına doğru uzantılarda, hem ekstraselüler matriks, hem de insülin benzeri büyüme faktörü ve sinir büyüme faktörünün etkileriyle uyarılmaktadır [71].

Nöronal büyüme konileri, aksonların hedefine doğru yönlendirilmesinde önemli görevleri olan hareketli yapılardır. Uzunlukta olan sinirlerin büyüme konilerinin distal uçları aktin filament demetleri içermektedir. Bu nedenle aktin bağlayan özgül proteinler büyüme konisinin hareketleri açısından önemlidir. *Helisoma* nöron kültüründe hasarlanmış aksonların uçlarında yeni büyüme konisi yapıları oluşmaktadır. Sinirlerde kesik oluşturulduktan sonra faskin proteininin aktin hücre iskeletine büyüme konisi oluşumunun başlangıcından itibaren bağlandığı görülmüştür. Ancak faskin bağlanması yeni lamellipod uzatan aktin demetlerinde daha yoğun gözlenmiştir. Ayrıca faskinin aktin filamentlerinin retrograd akışıyla eş zamanlı olarak geriye doğru hareket ettiği de gözlenmiştir. Faskin, perinuklear sitoplazma, dendritler ve büyüme konilerine yerleştiği sinir sisteminde yüksek seviyede ifade edilmektedir [72].

3.4.4.2. Enzim Aktivitesi Olan Proteinler

3.4.4.2.1. Sitosolik pürin 5'- nükleotidaz

Nükleotitler, sinir sistemi de dahil tüm dokularda bulunan sinyal molekülü sınıfıdır. ATP, UTP ve diadenozin polifosfatların sinir sisteminde fizyolojik rolleri vardır. Nükleotitler hem nöral hem de nöral olmayan dokulardan salınabilir. Nörotransmisyon, transmitter salınımının düzenlenmesi ve nöral gelişim

süreçlerinde görevleri vardır. Sadece sinir hücreleri değil, düz ve çizgili kas hücreleri ve glial hücrelerde de nükleotit reseptörleri bulunmaktadır [73]. 5'-nükleotidaz enzimleri, pürin ve pirimidin nükleotitlerini nükleozitlere parçalayarak birçok dokuda önemli fizyolojik görevler üstlenmektedir. Hücre dışı boşluğa salınan nükleotidler genellikle hücre zarını geçememektedir. Bu nükleotidler, 5'-nükleotidaz enzimi aracılığıyla zarı geçebilen forma dönüşerek geri kazanılmakta ve yeniden kullanılmaktadır. Hem merkezi, hem de periferel sinir sisteminde, ATP'nin bir taşıyıcı olarak görev yaptığı ve pürinerjik nöronlardan salındığı bilinmektedir. Bu durumda, sinaptik boşlukta ATP'nin inaktive edilmesi için gerekli enzimatik mekanizma, nörotransmitter asetilkolinin asetilkolinesteraz enzimi ile hücre dışı hidrolizine benzetilmektedir. Buna ek olarak, asetilkolin ve noradrenalin gibi nörotransmitter maddelerle birlikte aynı hücre sel organeller olan sinaptik veziküllerde ATP'nin de depolandığı bilinmektedir [74]. 5'-nükleotidazlar hem gelişmekte olan sinir hücrelerinin yüzeylerinde, hem de sinaps gelişimi ve yeniden şekillenmesi sırasında sinapslarda ifade edilmektedir ve nörit uzamasında 5'-nükleotidazların trofik etkisi olabileceği belirtilmektedir [75].

Pürin nükleotitleri, nörit uzamasını ve glial hücrelerin proliferasyonunu düzenlemektedir. Pürin nükleotitleri ayrıca, nörotrofin ve pleiotrofin sentezi ve salınımını düzenlemekte, mikrogliaların aktivasyonunda ve glial skar oluşumunda görev almaktadır. Pürin nükleotitleri ve nükleozitleri sinir sistemi hücrelerinde, glial hücreleri hedef alarak, nöronal farklılaşmayı düzenleyen fonksiyonel değişiklikleri indükleyebilir; nöronal ve nöronal olmayan hücrelerden trofik faktörlerin sentezi ve salınımını uyarabilir; büyüme faktörlerinin hedef hücreler üzerindeki etkilerini artırabilir; nöronlarla ya da nöron öncülleriyle etkileşime girerek nöritogenezin başlamasını, biyokimyasal farklılaşmayı, mevcut nöritlerin korunmasını ya da nöronların hayatta kalma oranlarının artırılmasını sağlarken; tüm bu durumlarla ilgili trofik ajanlar olarak da görev almaktadır. 5'-ektonükleotidaz enzim aktivitesi, nöritlerin ileri doğru uzamasında önemli bir gelişimsel rol üstlenmektedir. Bu enzimin aktivitesinin engellendiği durumlarda, nörit uzamasının durduğu gözlenmiştir [76].

3.4.4.2.2. Kazein kinaz 2 alfa alt birimi

Tüm nöral ağların fonksiyon gösterebilmeleri sinaptik bağlantılara bağlıdır. Bu bağlantılar gelişim sürecinde kurulmakta ve duyu alımı, bilgi işleme ya da motor

davranış durumlarına göre değişikliğe uğramaktadır. Bulat ve ark. [77], sinaps stabilitesini kontrol eden düzenleyici mekanizmaları aydınlatmak üzere, *Drosophila* kinom ve fosfatomunda yüksek çözünürlüklü RNAi görüntüleme yöntemini uygulamıştır. Sinaps dayanıklılığını anlamak için özellikle kazein kinaz 2 üzerine odaklanılmıştır. Kazein kinaz 2, iki katalitik, iki düzenleyici alt birimden oluşan bir serin-treonin kinazdır. Nöron gelişimi ve fonksiyon kazanmasıyla ilgili süreçlerde düzenleyici olarak görev aldığı düşünülmektedir. Çalışma sonucunda kazein kinaz 2α alt biriminin sinaptik dayanıklılığı ve sürekliliği sağlamada görevli olduğu bulunmuştur [77]. Kazein kinaz 2'nin çeşitli fizyolojik hedefleri olduğu ve hücre yaşayabilirliğinin sağlanması da dahil olmak üzere bir seri hücre fonksiyonu olduğu bilinmektedir. Sinir büyüme faktörünün kazein kinaz 2'yi aktive etmesiyle tetiklenen hücrenin aksonun ileri doğru uzamasını desteklediği bulunmuştur [78]. Kazein kinaz 2'nin şekil değiştiren ve proliferasyon yapan hücre ve dokulardaki aktivitesi yüksektir. Bu nedenle, proliferasyon belirteci olarak bilinmektedir. Mitojenik olarak uyarılan ve farklılaşma sinyalleri artan hücre hatlarında bu molekülün aktivitesinin arttığı bulunmuştur [79]. Ayrıca kazein kinaz 2 proteininin, aksonal hücre iskeletindeki mikrotübül dinamiklerini düzenleyici etkisi olduğu ve tubulin polimerizasyonunu desteklediği de bilinmektedir. Nöronların morfolojik ve fonksiyonel gelişme aşamaları, bir akson ve gelişmekte olan ilkin akson segmenti ile başlamaktadır. Bu ilkin akson segmenti bir difüzyon ve sitoplazmik iletim bariyeri olarak görev yapmaktadır. Yüksek yoğunlukta membran proteinlerinin, iyon kanallarının ve hücre adezyon proteinlerinin bulunduğu ilkin akson segmenti nörondaki aksiyon potansiyelinin de olduğu bölgedir. Kazein kinaz 2, ilkin akson segmentinin gelişimine, mikrotübül yapılarının oluşumu ve dayanıklılığını düzenleyerek katkı sağlamaktadır [80].

3.4.4.2.3. Retinol dehidrogenaz 10- A

Retinoik asit, özellikle embriyonik gelişim sırasında önemli olduğu bilinen, gen ifadesinin transkripsiyonel düzenleyicisidir. Farklılaşmış sinir hücrelerindeki akson rejenerasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu bilinmektedir [81]. Retinoik asit, nöral farklılaşmanın uyarılması, motor aksonların uzaması ve nöral yapının oluşmasında önemlidir. Ergin bireylerde artan retinoik asit sinyali aksonların ileri doğru uzaması ve sonuçta sinir rejenerasyonunu tetiklemektedir. Periferel sinirlerde, retinoik asit sinir hasarına verilen yanıtta dahil olmaktadır. Periferel

sinirdeki ezik hasarı sonrasında, retinoik asit sinyali artmaktadır. Bu sinyal yoluyla ilgili molekül ve reseptörlerin, ezik hasarının distalinde ve Schwann hücrelerindeki ifadeleri artmaktadır. Embriyoda bulunan retinol dehidrogenaz 10 proteini, retinolü retinaldehite ve retinaldehiti de retinaldehit dehidrogenazlar aracılığıyla retinoik asite dönüştürmektedir [82]. Retinol dehidrogenaz 10, SDR ailesi üyesi bir proteindir ve NAD^+ -bağımlı olarak retinolü retinale okside eder ve farelerin embriyonik ve fetal evrelerinde dokuya özgül olarak ifade edilir. Bu molekülün üye, kraniyofasiyal ve organ gelişimi sırasında retinoik asit biyosentezi için önemli fonksiyonlar üstlendiği belirtilmiştir [83]. Retinol dehidrogenaz 10 geninin fonksiyonunun durdurulması, küçük optik vezikül ve göz gelişimi, anormal arka beyin ve posterior branşiyal yaylar, anormal kalp tüpü, küçük ön bacak tomurcukları ve akciğer, bağırsak, pankreas ve böbreklerin organogenezinde hasarlar oluşmasına yol açmaktadır [84].

3.4.4.2.4. Ran GTPaz aktive edici protein 1

Küçük Ran GTPaz ve efektörleri olan Ran-bağlayıcı protein 1 ve Ran-GTPaz aktive edici protein, nükleositoplazmik taşınmayı kontrol etmektedir. Akson yaralanması sonrasında lokal Ran- bağlayıcı protein 1 translasyonunun yardımıyla, aksondaki hasar hücre gövdesine iletilmektedir [85]. Nükleer taşınma düzenleyicisi olan Ran GTPaz, normal koşullarda aksonlarda GTP-bağlı bir şekilde bulunmaktadır ve retrograd taşınmayı gerçekleştiren importin- α -dinein motor kompleksine kargo proteinlerinin bağlanmasını önlemektedir. Sinir hasarı retrograd bir sinyal oluşumuna neden olmaktadır. Bu sinyalin oluşabilmesi için lokal protein sentezi gerekmektedir. Normal koşullarda retrograd dinein motor kompleksi Ran GTPaz ile inaktif durumda tutulmaktadır. Sinir hasarı Ran-spesifik GTPaz-aktif edici proteinin lokal sentezini uyararak, dinein motordaki Ran molekülünün yerini değiştirmektedir. Importin- β 1 proteini de sinir hasarı sonrası lokal olarak sentezlenmekte ve Ran'ı uzaklaştırılmış dinein motor kompleksine bağlanarak, dinein motor kompleksinin aktive olmasını sağlamaktadır [86].

Yudin ve Fainzilber [87], sıçan siyatik sinirinde hücre gövdesinden 4-6 cm uzakta Ran'ın hem GTP- hem de GDP-bağlı formlarını bulmuştur. Hasarsız aksonlarda, RanGTP CAS (hücre sel apoptos hassas protein), importin- α ve dinein molekülleri kompleks halinde bulunmaktadır. Ran-bağlayıcı protein 1 ve

RanGAP molekülleri RanGTP'nin RanGDP'ye hidrolizini kolaylaştırmaktadır ve hasarsız sinirlerdeki ifade miktarları azdır. Sinir hasarı sonrasında akson sitoplazmasındaki konsantrasyonları ise belirgin ölçüde artmaktadır. Bu artış, aksondaki Ran-bağlayıcı protein 1 mRNA'sının lokal translasyonuna bağlı olarak gerçekleşmektedir [87].

3.4.4.2.5. Efrin tip- B reseptör 1- A

Efrinler, hücelere konumsal bilgi iletmekle görevli geniş bir reseptör tirozin kinaz ailesidir. Reseptör tirozin kinazlar, birçok büyüme faktörünün reseptörü olarak görev yaparlar. Gelişme sırasında, hücre göçünü yönlendirir, doku oluşumunu düzenler ve doku sınırlarının oluşturulmasına destek olurlar. Efrin ligandları ile Eph reseptörleri arasındaki iletişim karmaşık çift yönlü sinyal iletimini tetikler ve büyük oranda aktin hücre iskeletinin yeniden organizasyonu ile hücre adezyonunu ve hücrelerin birbirlerinden uzaklaşmasını düzenler. Sinir rejenerasyonunda rol oynayan büyüme faktörleri de bu reseptörler aracılığıyla etkilerini göstermektedir.

Periferel sinir sisteminde kesik hasarı sonrası Schwann hücrelerinin önemli görevleri vardır. Schwann hücreleri bu süreçte progenitor/ kök hücelere yeniden farklılaşarak aksonların uzamasını desteklemektedir. Sinir kesiği sonrasında fibroblastlar ile Schwann hücreleri arasındaki efrin-B/ EphB2 sinyalleri aracılığıyla, Schwann hücrelerinin yara bölgesi yakınında uzamakta olan aksonlara rehberlik etmek üzere sinir ucundan dışarıya doğru belirli bir yönde göç ettikleri bilinmektedir. EphB2 sinyalinin *in vivo* olarak ortadan kaldırılmasının, Schwann hücre göçünün bozulmasına ve aksonal büyümenin yanlış yönleneşine yol açtığı gözlenmiştir. Ephrin- B/ EphB sinyalinin, kesik hasarı sonrasında periferel sinir onarımının erken dönemlerini yönettiği bilinmektedir [88]. Reseptör tirozin kinazların aracılık ettiği sinyal iletimi reseptörün aktivasyonu için gerekli olan fosforilasyon süreci ile başlar ve bir seri fosforilasyon sürecini içerir. Çalışmamızda bu protein kümesinin fosfoprotein boyası ile boyanmış olması, protein modifikasyonlarının rejenerasyon sürecindeki etkilerinin incelenmesinin önemini de vurgulamaktadır.

3.4.4.3. Ubikütinasyon Mekanizması İle İlgili Proteinler

3.4.4.3.1. F- kutusu/ LRR- tekrar proteini 15

Bu protein BMP (kemik morfogenetik proteini) sinyal yolunun pozitif düzenleyicisidir. Dorsal/ ventral yapının oluşmasında gereklidir [89]. Son yıllarda yapılan çalışmalarla lösince zengin tekrar (leucine-rich repeat, LRR) birimleri içeren proteinlerin, aksonlara rehberlik ederek ve sinaps oluşumu sırasında hedef belirleyerek nöral bağlantıları düzenlemesinin yanı sıra, sinir sistemi bozukluklarının birçoğunda önemli görevleri olduğu bulunmuştur. Bu proteinler LRR-birimleri sayesinde çok çeşitli gruplarla bağlantı kurabilmektedir [90].

3.4.4.3.2. E3 ubikütin- protein ligaz TM 129

Ubikütin proteozom sistemi, nöral gelişim, nöral bağlantılar, dallanmalar ve reseptör ifadeleri üzerinde etkileri olan önemli bir sinyal yoludur. Bir proteinin ubikütinlenmesi, birçok enzimin aktivitesi ile gerçekleşmektedir. Bu sürecin sonucunda ortaya çıkan protein, ubikütin proteozom sistemi tarafından yıkılması için bir sinyal olan poliubikütin zinciri ile işaretlenmektedir. Ubikütin proteozom sistemi, bir ubikütin aktive edici enzim (E1), bir ubikütin konjuge edici enzim (E2) ve bir ubikütin ligaz (E3)'den oluşmaktadır. Substratın tanınması E3 ligazlar aracılığıyla gerçekleşmektedir. E3 ligazlardan biri olan Nedd4 (nöral öncül hücrelerce ifade edilen ve gelişimsel olarak ifadesi azalan protein 4) molekülünün siyatik sinirlerde akson hasarı sonrasında ifade edildiği bilinmektedir. Ubikütin proteozom sisteminin ergin duyu nöronu kültürlerinde nörit uzaması için gerekli olduğu ve hasar sonrası sinir rejenerasyonunu kontrol eden sistemlerden biri olduğu bildirilmektedir [91].

3.4.4.3.3. TNF reseptör ilişkili faktör 6-B

TRAF6, p75 nörotrofin reseptörü de dahil olmak üzere tümör nekroz faktörü reseptörleri ve Toll-benzeri reseptör süper ailelerinden gelen sinyallerin iletilmesinde görevli bir E3 ubikütin ligazdır. p75 reseptörü nöritlerin büyümesi, miyelinizasyon ve hücre yaşayabilirliği gibi çeşitli biyolojik süreçlerde etkilidir. Birçok hücrede reseptörün seçici aktivasyonunun apoptosise yol açtığı bilinmektedir [92, 93].

Nörotrofin reseptör p75 TNF süperalesinin bir üyesidir. p75 hücre içeriğine bağlı olarak, nörotrofin uyarımı sonrasında ya hücrenin hayatta kalmasını destekler ya da apoptosise indükler. Hücre canlılığını destekleyici sinyali NFκB aracılığıyla

gerçekleştirirken, apoptotik sinyal ise JNK aktivasyonu ile gerçekleşmektedir. TRAF6, TrkA (tirozin kinaz reseptör A)'nın sinir büyüme faktörüne bağlı olarak hücre içine alınması ve sinyal iletimi için gerekli bir moleküldür. TRAF6 sinyal iletimindeki bozukluklar, kemik metabolizması, deri döküntüleri, nöron gelişimi, inflamasyon ve immün yanıtla ilgili hastalıklara neden olmaktadır. Bu nedenle TRAF6'nın aktive ya da inhibe edilmesi temeline bağlı yöntemler ile bu hastalıkların tedavi edilmesi mümkün olabilmektedir [94].

3.4.4.4. Sinyal Molekülleri ve Reseptörleri

3.4.4.4.1. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 4

Fibroblast büyüme faktörleri, nematodlardan insana kadar tüm organizmalarda bulunan polipeptit büyüme faktörleri ailesidir. Omurgalı grupları arasında gen yapısı ve amino asit sekansı bakımlarından yüksek oranda korunmuştur. Heparan sülfat proteoglikanlara yüksek afinite gösterirler ve FGF hücre yüzey reseptörlerinin aktif hale gelmesi için heparan sülfata ihtiyaç duyarlar. Embriyonik gelişim sırasında hücre proliferasyonu, göçü ve farklılaşması sırasında çeşitli görevleri vardır. Ergin dönemde, homeostatik faktörler olarak görev alırlar ve doku onarımı ve hasar yanıtının oluşturulmasında etkilidirler. FGF ailesinin bir alt grubu, merkezi ve periferel sinir sisteminde nöronlar arası sinyal iletiminde önemli rollere sahiptir [95].

Temel fibroblast büyüme faktörü ve reseptörleri dorsal kök gangliyonunda ve periferel sinirlerde ifade edilmektedir. Periferel sinir hasarı sonrası dorsal kök gangliyonunda ve distal ve proksimal sinir uçlarında FGF ifadelerinin arttığı bilinmektedir. Sinirin lezyonlu bölgelerinde Schwann hücreleri ve göç eden makrofajlar, fibroblast büyüme faktörü ve reseptörlerinin temel hücresel kaynağını oluşturmaktadır. Bu moleküllerin sinir rejenerasyonu sırasında fizyolojik bir görevi olduğu düşünülmektedir. FGF'ler mezoderm ve nöroektoderm kökenli hücrelerin mitogenezi desteklemekte ve embriyonik gelişim sırasında proliferasyon ve farklılaşma gibi çeşitli süreçlerin düzenlenmesi ve ergin canlılarda doku onarımı sırasında doku bütünlüğünün korunmasında etkilidir. Periferel sinirlerde FGF-2 ve FGFR 1-3 (fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1,2 ve 3) normal şartlarda az miktarda ifade olmaktadır. Siyatik sinir hasarı sonrası beşinci saatten itibaren distal ve proksimal sinir uçlarında FGF-2 ifadesinde protein ve mRNA seviyesinde artış olduğu ve dört hafta boyunca bunun devam

ettiği bildirilmiştir. FGFR 1-3 moleküllerinin ise lezyonun proksimal ve distal bölgesinde transkript seviyesinde ifade artışlarının olduğu tespit edilmiştir [96]. FGF ile heparan sülfat proteoglikanın FGFR'nin hücre dışı ligandına bağlanması reseptör dimerizasyonu, aktivasyonu ve reseptör molekülünün sitoplazmik bölgesindeki çok sayıda tirozin kalıntısının otofosforilasyonunu indüklemektedir. FGF uyarımı ile Shc, phospholipase-Cg, STAT1, Gab1 ve FRS2α gibi çeşitli sinyal proteinleri fosforile olarak, hücre proliferasyonu, farklılaşması, göçü, canlılığı ve şeklini kontrol eden hücre içi sinyal yollarının uyarılmasına yol açmaktadır [97]. Zhang ve ark. [98], *Pleurodeles waltl* türü semenderlerde omurilik iyileşmesiyle ilgili yaptıkları çalışmada, FGFR1 molekülünün rejenerasyonun erken döneminde epandimal hücrelerdeki ifadesinin arttığını, FGFR4 molekülünün ise amputasyon sonrası omurilik rejenerasyonunun ikinci haftasında büyük oranda artış gösterdiğini belirtmiştir. Bu sonuç, FGFR1'in aktivasyonu ile nöral progenitörlerin proliferasyonunun arttığı, FGFR4'ün ise nöral farklılaşmanın erken dönemlerinde rol aldığı şeklinde yorumlanmıştır [98].

3.4.4.4.2. Nöritin B

Nöritin proteini, ilk defa sıçan beyinde tanımlanmış olup, nöron aktivitesini uyarıcı bir gen ürünüdür. Nöritinin nöronlarda fazla ifade edilmesi ya da nöronlara nöritin uygulanması nöritogenezi, nörit dallanmasını, akson uzamasını hem *in vitro* hem *in vivo* ortamlarda indüklemektedir. Bu morfolojik değişiklikler akson rejenerasyonunun ilk evrelerinde gözlenmektedir. Periferik sinir sistemindeki aksonlarda da rejenerasyon sırasında nöritin ifadesinin arttığı bilinmektedir [99]. Karamoysoylu ve ark. [100], nöritinin sıçan siyatik sinirinde retrograd ve anterograd taşındığını göstermiştir. Siyatik sinirde ligasyon, bağlanan bölgenin distalinde ve proksimalinde nöritin seviyelerinde artışa neden olmuştur. İmmunohistokimyasal çalışma ile ligasyon yapılan siyatik sinirdeki nöritin seviyelerinin artışı tespit edilirken, ligasyon yapılmayan sağlam siyatik sinirde nöritine rastlanmamıştır. Bu nedenle nöritin proteinin akson boyunca iki yönlü taşınabildiği sonucuna varılmıştır [100].

3.4.4.4.3. Östrojen reseptörü

Östrojenler, gonadlar, kardiyovasküler sistem, karaciğer, iskelet ve sinir sistemi gibi birçok hedef organ üzerinde pleiotropik ve önemli fizyolojik etkileri olan steroid hormonlardır. Bu pleiotropik sinyal iletimi sırasında fizyolojik olarak en aktif olan

molekül östradioldür. Östradiol sinir sisteminin gelişiminde beyindeki ağların oluşumunda önemli bir moleküldür. Aynı zamanda, hücre göçü ve hücreyel farklılaşma, plastisite süreçlerinin kontrolüne de katılmakta ve nöral hücrelerin hayatta kalmasına destek olmaktadır. Östrojen üretimi ile nörogenesis süreçlerinin ilişkili olduğu tespit edilmiştir [101]. Bhattacharjee ve ark. [102] yaptıkları çalışmada primer dorsal kök gangliyonu nöron kültürlerinde hormonların akson uzamasını etkilediğini tespit etmiştir. Östrojen hormonunun da, östrojen reseptör α aracılığıyla akson gelişimini arttırdığı bildirilmektedir [102]. Melcangi ve ark. [103]'de, sıçan siyatik sinir dokusunda, östrojen reseptörlerinin özellikle Schwann hücreleri tarafından ifade edildiği belirtilmektedir. Yeni doğan ve ergin sıçan siyatik sinir segmentlerinden alınan dokulardan hazırlanan kültür ortamında, östrojen gibi nöroaktif steroidlerin Schwann hücrelerinin proliferasyonuna etkisi araştırılmıştır. Östrojenlerin erkek yeni doğan ve ergin bireylerinden alınan örnekler üzerinde Schwann hücre proliferasyonunu arttırdığı, ancak dişi bireylerin siyatik sinir segmentleri üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür. Progesteron hormonununsa tam ters bir etkisi olduğu ve dişi bireylerin Schwann hücrelerindeki proliferasyonu arttırdığı tespit edilmiştir [103].

3.4.4.4.4. Asetilkolin reseptör alfa 1A alt birimi

Ligand bağlı nörotransmitter reseptörlerden olan asetilkolin reseptörleri, metabotropik muskarinik reseptörler ve iyonotropik nikotinik reseptörler olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır. Her iki reseptör grubu da endojen asetilkolin nörotransmitteri aracılığıyla aktive edilmekte olup, hem nöronlar hem de nöron dışı hücreler tarafından ifade edilmektedir [104]. Asetil kolin reseptörleri, birçok nöron öncülü hücrelerde ve nöronlarda sinaps oluşumu öncesinde ifade edilmektedir. Bu reseptörlerin sinir sistemi gelişiminin erken dönemlerdeki görevinin, nöronların hayatta kalmasına ve morfolojilerine destek olduğu ve yüksek kalsiyum geçirgenlikleri ile nöron gelişimindeki diğer süreçlere de önemli etkileri olduğu düşünülmektedir. Genel olarak asetil kolin reseptörlerinin post-mitotik nöronların hayatta kalmalarına destek olduğu bilinmektedir. Ayrıca bu reseptörlerin nörit uzamasında, sinaps oluşumunda ve sinaptik yapıların yeniden oluşturulmasında etkileri olduğu belirtilmektedir [105]. Wang ve ark. [106] sıçanlarda oluşturdukları siyatik sinir ezik hasarı sonrasında, 1-5. günlerde nikotinik asetilkolin reseptör α -7'nin ifadesinin arttığını immunohistokimyasal

olarak göstermiştir. İmmunoreaktivite, miyelin kılıfta, Schwann hücrelerinin sitoplazmasında, kılcak damarların endotel hücrelerinde ve inflamatuvar hücrelerde tespit edilmiştir. Kontrol grubu olan siyatik sinirlerde aynı zaman aralıklarında bu reseptörün ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik ise gözlenmemiştir. Bu çalışma ile, kolinerjik aktivitenin iyileşmenin erken dönemlerinde TNF- α -aracılı inflamasyonu baskılayarak lokal proinflamatuvar yanıtı azaltması sonucu akson rejenerasyonunu artırdığı belirtilmektedir [106].

3.4.4.4.5. Proenkefalin A-A

Proenkefalin proteinini kodlayan genlerin ifadesi, nörotransmitterler ve büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmektedir. Gelişme sırasında, proenkefalin mezodermal hattan gelen farklılaşmamış hücreler tarafından ifade edilirken, erginlerde postmitotik nöronlar ve immün hücreleri, üreme hücreleri ve glial hücreler gibi proliferen olan çeşitli hücrelerce ifade edilmektedir. Gelişmekte olan ve ergin sinir sisteminde, büyüme ve nörotrofik faktörlerin proenkefalin geninin ifade edilmesinde önemli bir rol üstlendiği bilinmektedir [107].

3.4.4.5. Taşıyıcı Proteinler

3.4.4.5.1. Ekspörtin 7- B

Ekspörtinlerin çoğu protein taşıyıcıları ya da ribonükleer proteinler olarak görev yaparlar [108]. Ökaryotik hücrelerde, sitoplazma ile çekirdek arasında proteinlerin ve RNA moleküllerinin taşınmasında importin ve ekspörtin proteinleri görevlidir [109]. Hücre içinde çekirdek ile sitoplazma arası protein ve RNA taşınmasıyla ilgili bilgiler, tüm ökaryotik hücrelerin hem çekirdeğinde hem de sitoplazmasında bulunan küçük ve çözünebilir bir GTPaz olan Ran molekülünün görevlerinin anlaşılmasıyla büyük miktarda açıklığa kavuşmuştur. Ran molekülü, çekirdekte guanin nükleotid değişimini ve sitoplazmada GTP hidrolizini destekleyen faktörlerin hücre içindeki asimetric dağılımına bağlı olarak, çekirdekte GTP'ye sitoplazmada ise GDP'ye bağlanmaktadır. Çekirdekteki Ran-GTP birlikteliğinin görevlerinden biri ekspörtin ve RNA, RNP (ribonükleer protein) ya da protein gibi çekirdekte dışarı taşınacak kargolardan oluşan yapıları desteklemektir. Sitoplazmada ise Ran-GTP'nin bu kompleksten ayrılması ile kararlılık bozulmakta ve dışarı taşınan kargonun salınmasına yol açmaktadır. Ran-GTP ile bağlanan ve çekirdek por kompleksi üzerinden translokasyona aracılık eden çok sayıda protein ekspörtin olarak tanımlanmıştır. Ekspörtinlerin çoğu protein ya da

ribonükleer proteinlerin taşıyıcıları olarak görev yaparlar. Örneğin eksportin 1, protein kinaz A inhibitörü gibi lösince zengin nükleer taşıma sinyali içeren proteinlerin taşınmasında görevlidir [108]. Eksportin-2 proteini, hücrel apoptos duyarlılık geninin protein ürünü olarak da bilinmektedir ve apoptos ve hücre proliferasyonu süreçlerine katılmaktadır [87]. Izdebska ve ark. [110], akciğer kanseri hücrelerinde yaptıkları çalışmada, eksportin-6'nın ifadesinin azalmasıyla, hücredeki transkripsiyonel aktivitelerin de azaldığını ve nekrotik hücre ölümlerinin arttığını tespit etmiştir.

3.4.4.5.2. Ras-ilişkili protein Rab-19

Ras ilişkili proteinler, Ras proteinleri, Rho/ Rac proteinleri ve Rab proteinleri olmak üzere, üç ana aileye ayrılmaktadır. Rab protein ailesinin üyeleri, farklı hücre içi bölmeler arasında veziküllerin taşınımını düzenlemektedir. Her bir Rab proteini bir membran tipine ya da vezikül tipine özgüdür [111]. Rab proteinleri küçük GTP-bağlayıcı proteinlerdir ve Ras süper ailesinin en büyük grubunu oluşturmaktadır. Bu proteinler, membran-bağlantılı moleküler anahtarlar gibi davranarak, veziküler trafik yollarını düzenlemektedirler [112].

3.4.4.5.3. Sınıflandırıcı neksin 33

Sınıflandırıcı neksin protein ailesi, endositoz ve protein taşınmasından sorumludur. Bu protein ailesi, çeşitli fosfatidilinositol fosfatazlara bağlanarak proteinlerin hücre zarına hedeflenmesini sağlayan, Phox biriminin varlığıyla karakterizedir [113]. Aksonal büyüme, hücre dışı rehber moleküllerden hücre içi büyüme konisinin hareketlerini etkileyen moleküllere kadar çok çeşitli faktörün ortaklaşa görev almasıyla düzenlenmektedir. Bu karmaşık sürecin ilerleyişinin kolaylaşması için moleküllerin aktif olarak dağıtılması ve sınıflandırılması gereklidir. Otuzdan fazla üyesi olan sınıflandırıcı neksin ailesi üyeleri, plazma zar reseptörlerinin hücre içi trafiğinin düzenlenmesinden sorumlu endozomal sınıflandırma sisteminde görev almaktadır. Sınıflandırıcı neksin 33 proteini, SNX9 alt grubuna üyedir. SNX9 kltrin-aracılı endositozda etkilidir ve ayrıca endositoz sırasında zarın yeniden yapılanmasında aktin dinamikleri ile ilişkiye girerek, endositik yolun düzenlenmesinde görev almaktadır [114]. Zhang ve ark. [115]'e göre, SNX33 molekülü hücre iskeletini etkileyerek hücre döngüsü sürecini kontrol etmektedir.

3.4.4.5.4. Kalsiyum bağımlı salgılama aktivatörü 1

Kalsiyum bağımlı salgılama aktivatörü 1 proteini, salgı veziküllerinin kalsiyum aracılı ekzositozu için gerekli olan nöral/ endokrin özellikte sitosolik ve periferel membran proteini ve nörotransmitter ve nöropeptit veziküllerinin ekzositozunda yer almaktadır. Nöral ve endokrin hücrelerinde nörotransmitter ve peptit hormonların düzenli olarak salgılanmaları, salgı veziküllerinin plazma membranına birleşmeleri ile sağlanmaktadır. Özgül olarak, büyük yoğun çekirdek veziküllerinin kalsiyum bağımlı ekzositozuna aracılık etmektedir [89, 116].

3.4.4.6. Hücre Adezyon Molekülleri

3.4.4.6.1. Katenin alfa 2

Alfa kateninler, kaderin hücre- hücre adezyon molekülleriyle ilişkili bir grup proteindir ve kaderinlerin adezyon fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri için zorunlu moleküllerdir [117]. Alfa N- katenin yalnızca sinir dokusuna özgüdür. Alfa katenin proteinleri hem hücre adezyonunu hem de hücre proliferasyonunu düzenlemektedir [118]. Kaderin- katenin kompleksinin sağlamlığı ve aktin hücre iskeletiyle doğru şekilde bağlantı kurmuş olması, hücre göçü, hücre kümelenmesi ve hücreler arası bağlantı yapıları için gereklidir [119].

3.4.4.7. Düzenleyici Proteinler

3.4.4.7.1. Nükleostemin benzeri protein

Nükleostemin proteini, birçok kök hücre ve kanser hücresinde marker olarak bilinmektedir ve hücrede p53 mekanizmasının düzenlenmesinde etkilidir. Hücresel yapıya göre, hem bir onkoprotein hem de bir tümör baskılayıcı olarak görev yapabilmektedir. Nükleolar yapı, rRNA işlenmesi ve telomeraz aktiviteleri için de önemli olduğu bulunmuştur [120]. Kök hücreler, organogenez sürecinin temel yapıtaşlarıdır ancak erginlerde doğal hücre kayıplarında ve hasar sonrası iyileşmeyi desteklemede görev almaktadır. Nükleostemin geni, nöral kök hücreler, embriyonik kök hücreler ve birçok kanser hattı hücreleri tarafından ifade edilmektedir. Kök hücrelerin ve kanser hücrelerinin hücre döngüsüne girebilmeleri için gereklidir ve bu hücrelerin proliferasyon hızları nucleostemin aktivitesiyle düzenlenmektedir [121]. Nükleostemin geni tarafından kodlanan protein, proliferatör olmakta olan kök hücreler tarafından bol miktarda ifade edilirken, farklılaşmanın başlaması ile birlikte neredeyse tamamen yok olmaktadır. Nükleostemin, embriyogenez sırasında nöroepitelial hücre

öncüllerince ifade olmakta ve merkezi sinir sistemi gelişimi sürecinde ifadesi sonlanmaktadır. Kök hücrelerde ve çeşitli kanser hatlarında ifadesi sürerken, tamamen farklılaşmış hücrelerde ifade edilmiyor olması nedenleriyle, nükleostemin proteinin kök hücrelerde ve kanser hücrelerinde yenilenme ve proliferasyon süreçlerini düzenlediği düşünülmektedir [122].

Nükleostemin bir nukleolar GTP-bağlantı proteindir ve prolifere olan birçok hücre çeşitinde yüksek miktarda ifade edilirken, hücreler hücre döngüsünü tamamlarken ifadeleri azalmaktadır. Nükleosteminin, p53-aracılı sinyal yolu üzerinde yer alan hücre döngüsü düzenleyicisi olarak görev aldığı bilinmektedir. Hücre döngüsünü düzenleyici etkisinin yanı sıra, ribozom biyogenezinde de önemli olduğu belirtilmektedir [123].

3.4.4.7.2. Paralemin- 3

Paralemin, plazma membranı ile ilişkili morforegülatör bir proteindir. Postsinaptik özelleşmelerin, aksonal ve dendritik uzantıların ve perikaryonların plazma membranlarının sitoplazmik tarafıyla bağlantılıdır. Nöron plazmalemmasında aralıklarla yerleşmiştir [124]. Paralemin-1 proteini plazma membran dinamikleri, filopod, nörit ve dendritik uçların gelişimi ve kanser hücrelerinin metastatik özellikleri üzerinde etkilidir. Ancak diğer paralemin formları ve fonksiyonları ile ilgili çok az bilgi bulunmaktadır [125].

3.4.4.7.3. Çinko parmak ve BTB domain içeren protein 18

Çinko parmak proteinleri ökaryot genomlarında en bol bulunan proteinler arasındadır. Bu aileye üye proteinlerin, DNA tanıma, RNA paketleme, transkripsiyonel aktivasyon, apoptosisin ve protein katlanmasının düzenlenmesi ve lipit bağlama gibi çok çeşitli fonksiyonları vardır [126]. Çinko parmak ve BTB domain içeren proteinler, yeni tanımlanmakta olan transkripsiyon faktörleridir ve genellikle bir DNA bağlayıcı çinko parmak grubu ve transkripsiyon baskılayıcı BTB grubu taşırlar [127]. BTB grubu, tüm ökaryotlarda bulunan protein-protein iletişim motifi olarak bilinmektedir. BTB- grupları, aktin dinamiklerinden hücre döngüsünün düzenlenmesine kadar pek çok hücresel süreçte görev almaktadır [128]. Zbtb18 proteini ise, çeşitli gelişimsel süreçlerde transkripsiyon baskılayıcı olarak görev almaktadır [129].

3.4.4.7.4. Transforme edici büyüme faktörü beta-1 ile indüklenen transkript 1 proteini

TGF- β proteinleri, akson Schwann hücresi ilişkisinin aracısı olarak görev yapmaktadır. TGF- β proteinleri, gelişmekte olan birçok sistemde, hücre büyümesinin ve farklılaşmasının düzenleyicisi olarak yer almaktadır. Aynı zamanda, Schwann hücreleri üzerinde mitojenik etkileri bulunmaktadır. Einheber ve ark. [130], TGF- β 'nin saflaştırılmış Schwann hücresi kültürlerinde mitojenik etki yaparken, nöronlarla indüklenmiş Schwann hücresi kültürlerinde ise Schwann hücrelerinin proliferasyonunu engellediği tespit edilmiştir. Aynı çalışmaya göre, TGF- β 1 premiyeline Schwann hücrelerindeki NCAM (nöral hücre adezyon molekülü) ve SCIP (baskılanmış cAMP ile indüklenebilen POU) gibi belirteçlerin ifadesini artırmaktadır. TGF- β 1'in aksonların indüklemesiyle Schwann hücresi proliferasyonu ve farklılaşması üzerinde önemli etkileri olduğu ve gelişim sırasında ise Schwann hücresi proliferasyonu ve miyelinizasyonun inhibitörü olarak görev aldığı bilinmektedir. Periferik sinir sisteminde, TGF- β 1 Wallerian dejenerasyonu ile devam eden rejeneratif yanıtın oluşmasından sorumlu bir moleküldür [130]. TGF- β , immün fonksiyonlar, gelişim, anjiyogenez, ekstraselüler matris oluşumu ve kanser gibi çeşitli hücre fonksiyonları olan kompleks bir büyüme faktörüdür. Sinir sisteminde ise, nöronlarla glial hücreler arasındaki sinyal iletimini etkilemektedir. TGF- β 1 ve TGF- β 2 moleküllerinin hipokampal nöronların dallanması ve uzamasında, dopaminerjik nöronların toksisiteden korunmasında etkileri vardır. TGF- β fibroblast büyüme faktörü 2, sinir büyüme faktörü, siliar nörotrofik faktör ve GDNF gibi çeşitli nörotrofik faktörlerin potansiyelini artırmaktadır. Fasiyal nöronlarda ve dorsal kök gangliyonunda ezik hasarı sonrasında TGF- β ifadesinin arttığı tespit edilmiştir [131].

Transforme edici büyüme faktörü beta-1 ile indüklenen transkript 1 proteini ise, çoklu protein- protein etkileşimlerinin koordinasyonunda görevlidir. Hem Wnt hem de steroid sinyal yollarını düzenler ve hücre büyümesi, proliferasyon, hücre göçü, farklılaşması gibi süreçlerde görev alır [132].

3.4.4.7.5. Yüksek hareketli grup proteini 20A

Yüksek hareketli grup proteinleri düşük moleküler ağırlıklı proteinlerdir ve DNA'ya bağlanarak ve kromatin düzenlenmesini değiştirerek transkripsiyon düzenleyici

görev üstlenirler. Hücre proliferasyonu ve farklılaşmaya yardımcı olan bu protein grubunun, memeli gelişiminin erken evrelerinde ifadesi yüksektir [133]. Yüksek hareketli grup proteini 20'nin ise nöral farklılaşmada önemli olduğu belirtilmektedir [134].

3.4.4.7.6. Protein simiate

Simiate, protistlerden memelilere kadar tüm gruplarda görülen evrimsel olarak korunmuş bir proteindir. Transkripsiyon aktivasyonu düzenleyicisi olan simiate proteininin, G- ve F-aktinlerle doğrudan ilişkili olduğu ve aktin polimerizasyonunu etkilediği de bilinmektedir. Gelişmekte olan nöronlarda, filopod dinamiklerini etkileyerek proksimal dendritlerin dallanmasını artırmaktadır [135, 136].

3.4.4.7.7. Amiloid beta A4 öncül protein bağlama ailesi B üye 1 ile etkileşen protein

Bu protein hücre içi adaptör proteindir. Bu protein, amiloid öncül proteine (APP) bağlandığında, APP-bağlı hücre sinyal iletimi, APP kırılması ve salınması, apoptosis ve nörit uzamasında görevli hale gelmektedir [137]. Ras aktivasyonu aracılığıyla aktin hücre iskeletinin yeniden yapılanmasında sinyal iletiminden sorumlu bir proteindir [138]. Çok çeşitli sinyal yollarında rol aldığı bilinmektedir [137].

3.4.4.7.8. Evrimsel olarak korunmuş Toll yolu ara sinyal proteini

Ecsit, Toll-benzeri ve BMP (kemik morfogenetik proteini) sinyal iletim yolları aracılığıyla inflamatuvar yanıt ve embriyonik gelişim için gerekli bir sitosolik adaptör proteindir. Aynı zamanda, mitokondriyal formu da bulunan proteinin, mitokondriyal fonksiyonların gerçekleşmesinde önemli bir rolü olduğu belirtilmektedir [139].

3.4.4.7.9. Kordin

Kordin/ BMP sistemi, hayvan gelişimindeki hücre dışı sinyal düzenlenmesinin en önemli örneklerinden biridir. Omurgalı ve omurgasızlardaki dorsoventral yapılaşma kemik morfogenetik proteinleri ve kordin moleküllerinin birbirine zıt etkileriyle gerçekleşmektedir. Zebra balıklarında kordin aracılığıyla BMP sinyal iletiminin inhibe olması, nöral plaka ve dorsal mezodermin düzgün gelişimi için gereklidir. *Xenopus* türü kurbağalarda, kordin geninin ifadesinin engellenmesinin, nöral plakanın indirgenmesine ve ventral mezodermin normalden fazla gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir [140].

Kordin ifadesinin, kurbağa larvalarında operasyon sonrası 5., 7. ve 12 .günlerde rejeneren üyelerde kuvvetli olarak arttığı bulunmuştur. Ancak rejeneren olan aksolotl türü semender bacaklarında tespit edilememiştir. Kordin bir BMP antagonistidir ve omurgalı hayvanların embriyonik dokularında ventralizasyonu sağlayan BMP'lere bağlanarak bu moleküllerin reseptörleriyle etkileşimini engeller ve dorsal yapıların oluşumunu sağlar [141].

3.4.4.7.10. REST korepresör 2

İyon kanalları, nörotransmitterler, sinaptik proteinler ve hücre adezyon molekülleri gibi nöral fenotipik özellikleri kodlayan çok sayıda gen yalnızca nöronlar tarafından ifade edilmektedir. Nöral özgüllüğü sağlayan mekanizmalardan birisi de DNA'ya bağlanan REST/ NRSF sistemidir ve hedef genlerin nöron dışı dokularda ifade olmasını engellemektedir [142]. Transkripsiyon baskılayıcı molekül olan REST bir çinko parmak proteinidir. Farklılaşmamış nöron dışı hücrelerde REST'in susturulması ise, CoREST proteinleri ile bağlanarak gerçekleştirilmektedir [143].

Zeng ve ark. [144], yaptıkları çalışmada *Xenopus laevis* türü kurbağalarda rest korepresör 2 geninin gelişmekte olan sinir sisteminde ifade olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada nöral dönemde baskın olarak nöral plakadan, kuyruk tomurcuğu aşamasında ise beyin, omurilik, gözler, otik veziküller ve branşiyal yaylardan ifade olduğu belirtilmektedir [144].

3.4.5. MASCOT Sunucusu İle Tanımlanmış Proteinlere Ait Ağ (Network) Analizleri (Protein Etkileşimleri)

MALDI-TOF kütle spektrometresi ile tanımlanan proteinlerin birbirleriyle etkileşimlerinin belirlenmesi için Cytoscape 3.1.1 [145] programı kullanılmıştır. Cytoscape 3.1.1, gen anotasyonlarını, gen ifade profillerini ve mevcut veri tabanlarındaki diğer bilgileri kullanarak, moleküler etkileşim ağlarının ve biyolojik yolların görsel olarak ifade edilmesini sağlayan bir yazılımdır. Ancak benzer birçok yazılımda olduğu gibi, Cytoscape analizleri için de kurbağa veya semender modeliyle ilgili verilerin kullanılması mümkün değildir. Bu nedenle, MASCOT sunucusundan elde edilen ve *Xenopus laevis* türüne ait protein listesinin fare ve sıçanlara ait eşlenikleri, UniProt programı kullanılarak belirlenmiştir. Tanımlanan proteinlerin tamamına sadece sıçan ya da sadece fare veri tabanından ulaşılamadığı için elde edilen son listede hem *Mus musculus* hem de *Rattus*

norvegicus'a ait proteinler ve bu proteinlerin *X. laevis* proteinleri ile sekans kapsama ve benzerlik yüzdeleri yer almaktadır (Çizelge 3.10). Bu yeni protein listesi ile *Xenopus laevis* proteinleri arasındaki homoloji NCBI içindeki Protein Blast algoritması kullanılarak karşılaştırıldıktan sonra, Cytoscape 3.1.1 programı ile protein- protein etkileşimleri incelenmiştir.

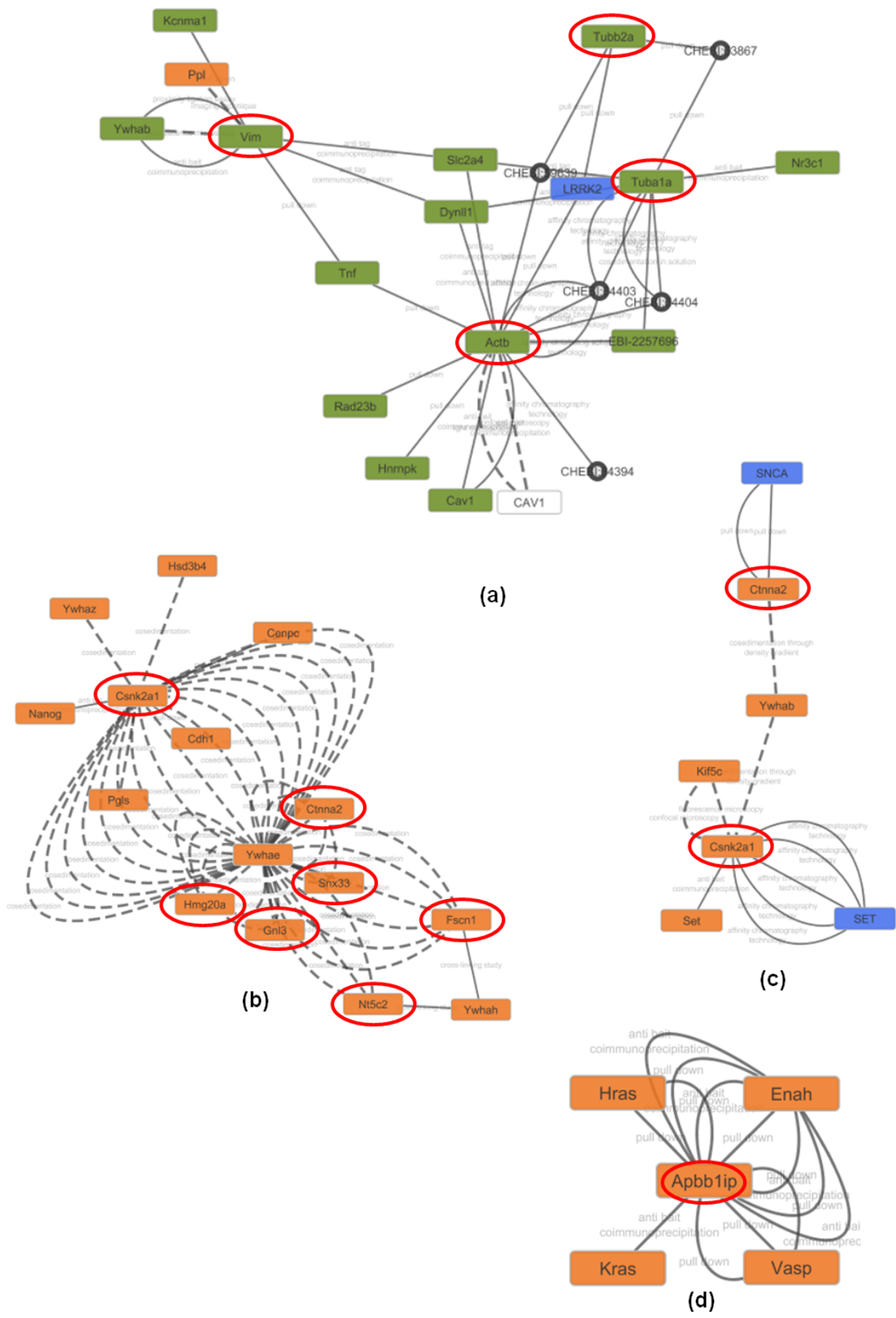
Çizelge 3. 10. *X. laevis* türünde tanımlanan proteinlerin *R. norvegicus* ve *M. musculus*'a ait eşlenikleri

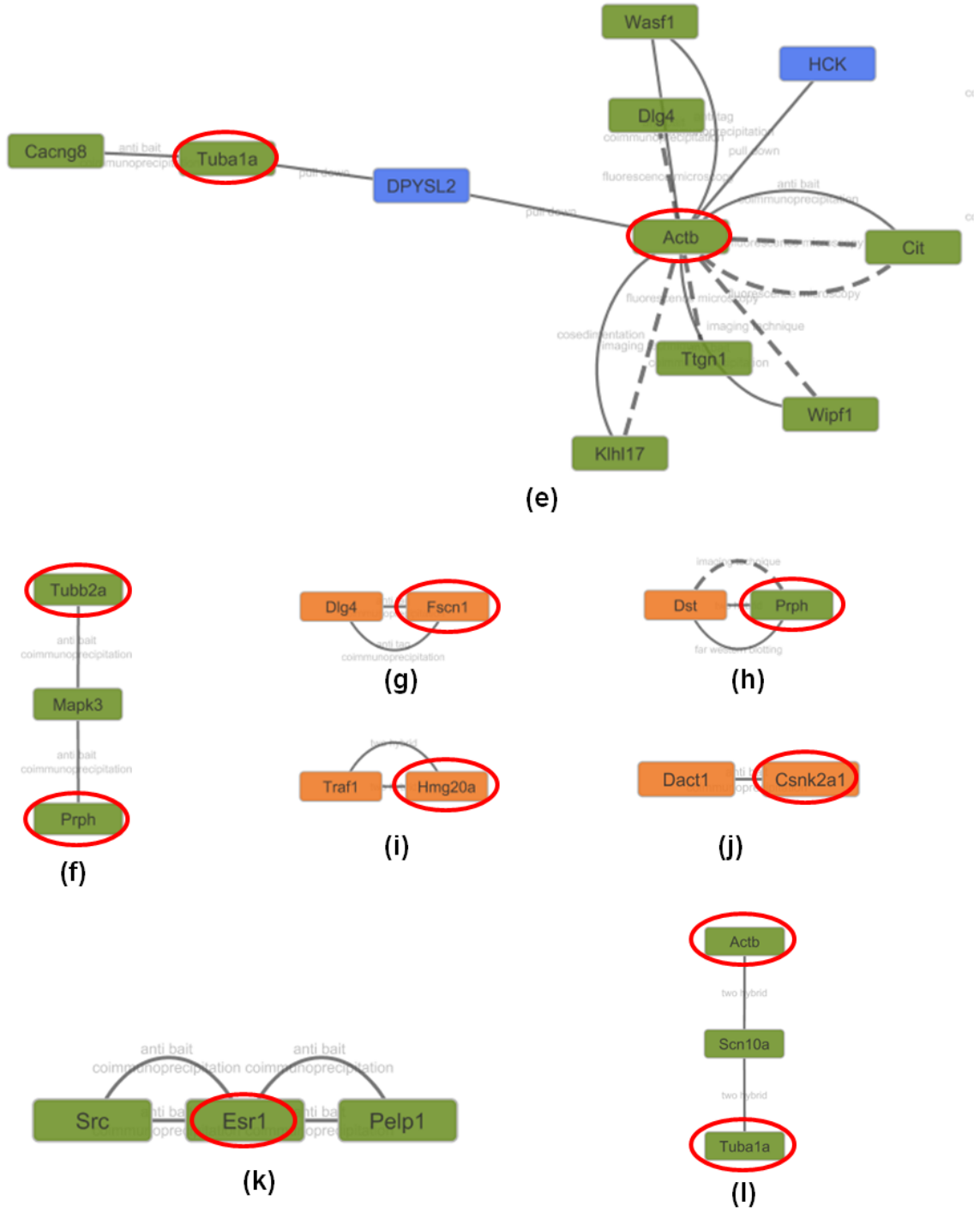
UniProt Erişim Numarası (<i>Xenopus laevis</i>)	Tanımlanan Protein (<i>Xenopus laevis</i>)	Tanımlanan proteinlerin sıçan ve faredeki eşleniklerine ait UniProt erişim Numaraları	Eşlenik Proteinler (<i>Rattus norvegicus</i> ve <i>Mus musculus</i>)	Sekans Kapsama Yüzdesi * (Query coverage %)	Benzerlik Yüzdesi (Ident %)
TBA_XENLA	Tubulin alpha chain	TBA1A_RAT	Tubulin alpha 1A chain	100	97
TBB2_XENLA	Tubulin beta-2 chain	TBB2A_RAT	Tubulin beta 2A chain	99	99
ACTB_XENLA	Actin, cytoplasmic 1	ACTB_RAT	Actin, cytoplasmic 1	100	99
PERI_XENLA	Peripherin	PERI_RAT	Peripherin	97	69
5NTC_XENLA	Cytosolic purine 5'-nucleotidase	5NTC_MOUSE	Cytosolic purine 5'-nucleotidase	96	92
FXL15_XENLA	F-box/LRR-repeat protein 15	FXL15_RAT	F-box/LRR-repeat protein 15	99	57
RAGP1_XENLA	Ran GTPase-activating protein 1	Q66H32_RAT	Ran GTPase-activating protein 1	61	80
XPO7B_XENLA	Exportin-7-B	XPO7_MOUSE	Exportin-7	100	92
CTNA2_XENLA	Catenin alpha-2	CTNA2_MOUSE	Catenin alpha 2	100	95
EPHB3_XENLA	Ephrin type-B receptor 3	EPHB3_MOUSE	Ephrin type b receptor 3	98	78
GNL3_XENLA	Nucleostemin like protein	GNL3_MOUSE	Nucleostemin like protein	100	46
CSK21_XENLA	Casein kinase II subunit alpha	CSK21_MOUSE	Casein kinase II subunit alpha	100	94
RAB19_XENLA	Ras-related protein Rab-19	RAB19_RAT	Ras-related protein Rab- 19	96	73
PALM3_XENLA	Paralemmin-3	PALM3_MOUSE	Paralemmin-3	13	38
ESR1_XENLA	Estrogen receptor	ESR1_RAT	Estrogen receptor	100	69
TRF6B_XENLA	TNF receptor-associated factor 6-B	TRAF6_RAT	TNF receptor-associated factor 6	99	63

CAPS1_XENLA	Calcium-dependent secretion activator 1	CAPS1_RAT	Calcium-dependent secretion activator 1	99	87
FGFR4_XENLA	Fibroblast growth factor receptor 4	FGFR4_MOUSE	Fibroblast growth factor receptor 4	44	100
ZBT18_XENLA	Zinc finger and BTB domain-containing protein 18	ZBT18_RAT	Zinc finger and BTB domain-containing protein 18	100	84
AB1IP_XENLA	Amyloid beta A4 precursor protein binding family B member 1-interacting protein	AB1IP_MOUSE	Amyloid beta A4 precursor protein binding family B member 1-interacting protein	72	61
PENKA_XENLA	Proenkephalin-A-A	PENK_RAT	Proenkephalin-A	96	61
ECSIT_XENLA	Evolutionary conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial	ECSIT_RAT	Evolutionary conserved signaling intermediate in Toll pathway, mitochondrial	97	50
TGF11_XENLA	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	TGF11_RAT	Transforming growth factor beta-1-induced transcript 1 protein	100	43
RD10A_XENLA	Retinol dehydrogenase 10-A	RDH10_RAT	Retinol dehydrogenase 10	100	88
HM20A_XENLA	High mobility group protein 20A	HM20A_MOUSE	High mobility group protein 20A	99	55
CHRD_XENLA	Chordin	CHRD_MOUSE	Chordin	96	51
FASC_XENLA	Fascin	FSCN1_MOUSE	Fascin	98	69
ACHAA_XENLA	Acetylcholine receptor subunit alpha-1-A	ACHA_RAT	Acetylcholine receptor subunit alpha	97	78
TM129_XENLA	E3 ubiquitin-protein ligase TM129	TM129_MOUSE	E3 ubiquitin-protein ligase TM129	100	75
RCOR2_XENLA	REST corepressor 2	RCOR2_RAT	REST corepressor 2	99	62
SNX33_XENLA	Sorting nexin-33	SNX33_MOUSE	Sorting nexin-33	100	70
NRN1B_XENLA	Neuritin-B	NRN1_RAT	Neuritin	98	65
VIM1_XENLA	Vimentin-1/2	VIME_RAT	Vimentin	97	79
F206A_XENLA	Protein Simiate	F206A_MOUSE	Protein Simiate	91	76

* **Sekans kapsama yüzdesi:** Karşılaştırılan protein sekansları arasındaki örtüşme yüzdesi.

Cytoscape 3.1.1 programı ile elde edilen protein-protein etkileşim ağları Şekil 3.37’de gösterilmiştir. Bu şekillerde literatürde tanımlanmış bir sinyal yoluna ait tam bir harita yer almamaktadır. Ancak sinyal yollarının belirli aşamalarında, çalışmamızda tanımlanmış proteinlerin etkileşimleriyle ilgili ağlar bulunmaktadır. Bu protein etkileşim ağlarında yer alan proteinlerin fonksiyonları genel olarak incelendiğinde iki temel mekanizma üzerinde yoğunlaştıkları gözlenmektedir. Bu iki mekanizma, hücre döngüsü ve proliferasyonun düzenlenmesi ile hücre iskeleti organizasyonudur. Bu iki mekanizma da akson rejenerasyonunda etkin bir şekilde görev almaktadır ve çalışmamızın bulguları ile uyum göstermektedir. Şekil 3.37’de yer alan protein kod ve adlarını içeren tablolar EK 3 kısmında yer almaktadır.





Şekil 3. 37. MALDI-TOF Kütle Spektrometresi ile tanımlanan proteinlerden elde edilen protein- protein etkileşim ağları (a-l); (Tez çalışması kapsamında tanımlanan proteinler kırmızı daire içinde gösterilmiştir).

Şekil 3.37’de gösterilen her bir protein protein etkileşim grafiğindeki moleküllerin biyolojik fonksiyonlarına ait açıklamalar aşağıda anlatılmaktadır. Bu moleküllerin fonksiyonlarıyla ilgili bilgilerde özellikle UniProt veri tabanından (www.uniprot.org) yararlanılmıştır.

(a) ile gösterilen grafikte yer alan proteinlerin fonksiyonları incelendiğinde, bunların, PKB/AKT aracılı sinyal yolu, CaMKK/AMPK sinyal yolu, STAT-5 sinyal yolu ve CTNNB1- aracılı sinyal yolunda yer aldıkları görülmüştür. *Kalsiyum ile aktive olan potasyum kanalı alt birim alfa- 1*(Kcnma1) molekülünün aktivasyonu sitosolik kalsiyum konsantrasyonunu artırmakta ve hücre zarının depolarize olmasına neden olmaktadır [146].

Periplakin (Ppl) molekülü, PKB/AKT aracılı sinyal yolunda lokalizasyon sinyali olarak görev almaktadır [147]. PKB/ AKT yolunun görevleri arasında, hücre döngüsünü düzenlemek ve apoptosisi inhibe etmek yer almaktadır. Aynı zamanda AKT’nin nörit uzamasında etkili olduğu da bilinmektedir [148, 149].

14-3-3- protein beta/ alfa (Ywhab), birçok sinyal yolunun düzenleyicisidir [150]. *Vimentin* (Vim) proteini, bir ara filament proteini. Periferel sinir hasarı sonrası mitojen-aktif protein kinaz (MAPK) Erk 1 ile etkileştiği ve hasar sinyalinin hücre gövdesine retrograd olarak iletiminin devam etmesini sağladığı bilinmektedir [22]. *Tümör nekroz faktörü* (Tnf) sitokinler içinde yer almaktadır ve belirli koşullarda hücre farklılaşmasını indükleyerek proliferasyona katkı sağladığı belirtilmektedir [151].

Solute taşıyıcı aile 2 kolaylaştırılmış glukoz taşıyıcı üye 4 (Slc2a4) molekülü, glukoz taşınmasında görev almaktadır [152].

Sitoplazmik dinein hafif zincir 1 (Dyln11), dineinin fonksiyonlarını düzenleyen ve dinein molekülü ile kargoların ve adaptör proteinlerin bağlanmasını sağlayan bir moleküldür. Veziküllerin ve organallerin mikrotübüller üzerinde retrograd taşınmasında önemlidir [153].

Tubulin beta 2a zinciri (Tubb2a) ve *tubulin alfa 1a zinciri* (Tuba1a), hücre iskeletini oluşturan mikrotübüllerin ana bileşenleridir [154, 155].

Lösince zengin tekrar birimli serin/treonin- protein kinaz 2 (Irrk2), CaMKK/AMPK sinyal yolunun kalsiyum bağımlı aktivasyonu ile otofajiyi düzenlemektedir. Aynı zamanda merkezi sinir sisteminde nöron uzantılarının morfolojilerini düzenlediği belirtilmektedir [156].

Nükleer reseptör alt ailesi 3 grup C üye 1 (Nr3c1) molekülü bir glukokortikoid reseptörüdür. Hem transkripsiyon faktörü, hem de transkripsiyon faktörlerinin düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır. Hücre proliferasyonu ve hedef dokulara farklılaşmada etkilidir. Büyüme hormonlarını uyararak STAT5-bağımlı transkripsiyonda koaktivatör olarak yer almaktadır. STAT5 sinyal yolu özellikle sitokin sinyal iletiminde önemlidir [157, 158].

Sitoplazmik aktin (Actb), hücre iskeleti elemanlarından ve çeşitli hücresel hareketlerin gerçekleştirilmesinde etkilidir. Aksonlarda hasar sonrası rehber molekül olarak görev almaktadır [159].

UV eksizyon onarım proteini RAD23 homolog B (Rad23b) molekülü, proteozom degradasyonunun düzenlenmesine katılmaktadır. DNA hasarı sonrasında hasarlı bölgeye bağlanmakta ve hücresel yanıt oluşturmaktadır [160].

Heterojen nükleer ribonükleoprotein K (Hnrnpk), mRNA öncüllerinin bağlanma bölgelerinden biridir ve DNA hasar yanıtı mekanizmalarında ve transkripsiyonun aktivasyonu ve baskılanmasında etkilidir [161].

Caveolin 1 (Cav 1) proteini, Wnt yolu üzerinden CTNNB1-aracılı sinyal iletimini düzenlemektedir. Wnt yolu proliferasyon, hayatta kalma, farklılaşma, göç etme ve polaritenin sağlanması gibi önemli süreçleri etkilemektedir [162, 163].

(b) ile gösterilen grafikte, özellikle hücre döngüsü, mitoz bölünme ve proliferasyonla ilişkili moleküller bulunduğu görülmektedir. *3 beta-hidroksisteroid dehidrogenaz tip 4 (Hsd3b4)* proteini, steroid hormonların biyosentezinde etkilidir [164].

14-3-3 protein zeta/delta (Ywhaz), *14-3-3 protein epsilon (Ywhae)* ve *14-3-3 protein eta (Ywhah)* proteinleri, hücre döngüsünün düzenlenmesi, transkripsiyon, apoptosis gibi birçok hücre içi süreçte etkilidir [165-168].

Homeobox protein NANOG (Nanog), transkripsiyon düzenleyicisi görevindedir ve fazla ifade edilmesi hücrelerin S fazına girmelerine ve proliferolmalarına neden olmaktadır [169].

Kazein kinaz 2 alt birim alfa (Csnk2a1) proteini, hücre döngüsü, apoptosis ve transkripsiyon gibi hücresel süreçlerde yer almaktadır [170].

Sentromer protein C (Cenpc), kinetokor proteinlerinin yerleşimi, mitotik ilerleme ve kromozom ayrılmasında görev almaktadır [171].

Kaderin 1 (Cdh1), kalsiyum bağımlı hücre adezyon proteini. Özellikle epitel hücrelerinde, hücre- hücre adezyonu, hücre hareketi ve proliferasyonda düzenleyici rol almaktadır [172].

6-fosfoglukonolaktonaz (Pgl3) enzimi, karbohidrat metabolizmasında görevlidir [173]. *Katenin alfa 2* (Ctnna2), hücre hücre adezyonunda ve sinir sisteminin farklılaşmasında etkilidir [174].

Yüksek hareketli grup proteini 20a (Hmg20a), nöronal farklılaşmada önemli bir moleküldür [175].

Sınıflandırıcı neksin proteini (Snx33) ise, özellikle interfazda ve mitotik hücre bölünmesinin son aşamalarında, mitozun ve sitokinezin düzenli ilerlemesinden sorumludur. Hücre iskeleti, endositoz ve hücre içi veziküllerin hareketlerinin düzenlenmesinde de görev almaktadır [176].

Guanin nükleotit bağlayıcı protein benzeri 3 (Gnl3) molekülü, kök hücrelerin proliferatif kapasitelerinin sağlanmasında etkilidir [177].

Faskin (Fscn1) proteini, filamentöz aktinlerin paketlenmesinde ve hücre uzantılarının oluşmasında rol almaktadır [178].

Sitosolik pürin 5' nükleotidaz (Nt5c2), hücre içi pürin/ pirimidin nükleotit oranını sabit tutmada görevlidir. 5'-nükleotidazlar gelişmekte olan sinir hücrelerinin yüzeyinde ve sinapslarda ifade edilir, nörit uzamasında etkili olabileceği belirtilmektedir [75, 179].

(c) ile gösterilen grafikte yer alan, *alfa-synuclein* (Snca) hücre içi hareketin düzenlenmesinde ve sinaps organizasyonunda görevlidir [180].

Katenin alfa 2 (Ctnna2), hücre hücre adezyonunda ve sinir sisteminin farklılaşmasında etkilidir [174].

14-3-3 protein beta/alfa (Ywhab), pek çok sinyal yolağının düzenleyicisidir [150].

Kinesin hafif zinciri izoform 5 C (Kif5c), mRNA'ların dendritik hareketine aracılık etmekte ve mikrotübül aracılı organel taşınımında görev almaktadır [181].

Kazein kinaz 2 alt birim alfa (Csnk2a1) ve *protein Set* (Set) hücre döngüsü, apoptosis ve transkripsiyon gibi hücresel süreçlerde yer almaktadır [170, 182].

(d) ile gösterilen grafikte yer alan *GTPaz Hras* (Hras) ve *GTPaz Kras* (Kras) molekülleri, GTPaz aktivitesine sahiptir ve hücre proliferasyonu, hücre döngüsü, Erk1 ve Erk2 sinyal yollarının düzenlenmesinde görevlidir [183, 184]. Erk 1 ve Erk 2 sinyal yolları ise, temel olarak hücre adezyonu, hücre döngüsünün

ilerlemesi, hücre göçü, hücrelerin hayatta kalması, farklılaşması, metabolizma, proliferasyon ve transkripsiyon süreçlerinde etkilidir [185].

Protein etkin homolog (Enah) ve *vazodilatör ile uyarılan fosfoprotein* (Vasp) molekülleri, aktin ilişkili proteinlerdir. Bu proteinler, hücre iskeletinin yeniden yapılanması, hücre polaritesinin oluşması ve akson rehberliği gibi görevler üstlenmektedir [186, 187].

Amiloid beta A4 öncül protein bağlama ailesi B üye 1 ile etkileşen protein (Apbb1p), Ras aktivasyonu aracılığıyla aktin hücre iskeletinin yeniden modellenmesinde görev almaktadır [188].

(e) ile gösterilen grafikte genel olarak, hücre iskeleti elemanları ve hücre iskeletinin yeniden yapılanması ile ilgili proteinlerin bulunduğu görülmektedir. *Voltaaj bağımlı kalsiyum kanal gamma-8 alt birimi* (Cacng8), AMPA-seçici glutamat reseptörlerindeki hareketin ve geçiş özelliklerinin düzenleyicisidir [189].

Tubulin alfa 1a zinciri (Tuba1a), hücre iskeletindeki mikrotübüllerin ana bileşenlerinden biridir [155].

Dihidropirimidinaz-ilişkili protein 2 (Dpysl2), nöron gelişimi ve polaritesinin sağlanması, akson büyümesi, büyüme konisinin geri çekilmesi, hücre göçü ve hücre iskeletinin yeniden yapılanmasında etkilidir [190].

Wiskott-Aldrich sendrom protein ailesi üye 1 (Wasf1), tirozin kinaz reseptörleri ve küçük GTPaz'lardan aktin hücre iskeletine sinyallerin iletiminde etkili bir moleküldür [191].

Büyük disk homolog 4 (Dlg4) proteini, özellikle glutamat reseptörlerinin sinyal iletiminde sinaptik plastisitenin sağlanmasında önemlidir [192].

Hücre iskeleti elemanlarından *sitoplazmik aktin* (Actb), aksonlarda hasar sonrası rehber molekül olarak görev almaktadır [159].

Tirozin protein kinaz HCK (HCK), aktin hücre iskeletinin yeniden yapılanmasında, aktin polimerizasyonu ve hücre uzantılarının oluşumunu desteklemektedir [193].

Citron Rho-etkileşimli kinaz (Cit) proteini, sitokinezin düzenlenmesinde rol almaktadır [194].

Trans- golgi ağı integral membran protein 1 (Ttgn1), membran hareketlerinin düzenlenmesinde yer almaktadır [195].

Kelch- benzeri protein 17 (Klh17) ve *WAS/WASL-etkileşimli protein ailesi üye 1* (Wipf1) molekülleri de aktin hücre iskeletinin organizasyonunda görevlidir [196, 197].

(f) ile gösterilen grafikte, tubulin, periferin ve mitojen ile aktive protein kinaz 3 molekülleri yer almaktadır. *Mitojen ile aktive protein kinaz 3* (Mapk3) molekülü, MAP kinaz sinyal iletim yolunun önemli bir parçasıdır. Bu sinyal yolu, hücre büyümesi, adezyon, hücrelerin hayatta kalması ve farklılaşmasında etkilidir. Bu görevlerini transkripsiyon, translasyon ve hücre iskeleti elemanlarının yeniden düzenlenmesi aracılığıyla gerçekleştirmektedir [198].

Tubulin beta 2a zinciri (Tubb2a) hücre iskeletini oluşturan mikrotübüllerin ana bileşenlerinden biridir ve *periferin* (prph) ise, sınıf III nöronal ara filament proteindir [154, 199].

(g) ile gösterilen grafikte yer alan *büyük disk homolog 4* (Dlg4) ve *faskin* (Fscn1) proteinlerinin aktin filamentinin organizasyonunda etkili oldukları bilinmektedir [200].

(h) ile gösterilen grafikte, periferin ve distonin olmak üzere iki protein yer almaktadır. *Periferin* (Prph) özellikle periferel sinirlerde bulunan bir hücre iskeleti elemanıdır.

Distonin (Dst) ise duyu nöronlarında mikrotübül ağının düzenlenmesi ve devamlılığının sağlanmasında görev alarak aksonal iletme katkı sağlayan bir moleküldür [201].

(i) ile gösterilen grafikte yer alan *TNF reseptör ilişkili faktor 1* (TRAF1) molekülü, NF-kappa- B ve JUN aktivasyonuna aracılık eden bir E3 ubiquitin protein ligaz molekülüdür [202]. Ubikutin protein ligazlar, nöron gelişimi, nöral bağlantıların kurulması, nörit uzaması gibi süreçlerde etkilidir [91].

Yüksek hareketli grup proteini 20A (Hmg20a) ise, nöronal farklılaşmada önemli bir moleküldür [175].

(j) ile gösterilen grafikte yer alan *Dapper homolog 1* (Dact 1) proteini, gelişme sırasındaki hücre içi sinyal yollarının düzenlenmesine katılmaktadır ve özellikle Wnt sinyal yolunda önemli olduğu bilinmektedir. Nöronal farklılaşma sırasında, uyarıcı sinaps oluşumunda, dendrit oluşumu ve uzantıların düzenlenmesinde görev almaktadır [203].

Kazein kinaz 2 alt birim alfa (Csnk2a1) proteini ise hücre döngüsü, apoptos ve transkripsiyon süreçlerinde önemli görevler almaktadır [170].

(k) ile gösterilen grafikte yer alan, *nöronal protonkogen tirozin protein kinaz Src* (Src) molekülü, transkripsiyon, immun yanıt, hücre adezyonu, hücre döngüsü,

apoptosis, hücre göçü gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri kontrol eden sinyal yollarına katılmaktadır [204].

Östrojen reseptörü (Esr1), hedef dokulardaki ökaryotik gen ifadesinin düzenlenmesi, hücresel proliferasyon ve farklılaşmanın kontrolünde görev almaktadır [205].

Prolin- glutamik asit ve lösince zengin protein 1 (Pelp1) ise, östrojen resptör aracılı transkripsiyonda koaktivatör görevi gören bir moleküldür. Çeşitli büyüme faktörü sinyal bileşenleri ile etkileşim halindedir [206].

(I) ile gösterilen grafikteki proteinlerden, *sodyum kanal protein tip 10 alt birim alfa* (Scn10a), nöropatik ağrı mekanizmasında görev alan, voltaj bağımlı sodyum kanalıdır [207].

Sitoplazmik aktin (Actb) ve *tubulin alfa zinciri* (Tuba1a) proteinleri ise hücre iskeletini oluşturan temel elemanlardandır [155, 159].

4. TARTIŞMA

Yapılan tez çalışmasında *Triturus karelinii* türü semenderlerde deneysel olarak oluşturulmuş siyatik sinir hasarının iyileşme süreci üç temel kriter üzerinden değerlendirilmiştir:

- Davranışsal yöntemler (Yürüme Testi)
- Elektrofizyolojik yöntemler (EMG ölçümleri)
- Proteomik yöntemler (Protein izolasyonu, 2D-PAGE, MALDI-TOF kütle spektrometresi)

4.1. Yürüme Testleri

Sinir rejenerasyonu çalışmalarında rejenerasyonla ilgili kantitatif veri alınmasında elektrofizyolojik ölçümler, histomorfometri ve yürüme analizleri, bilek açılarının ya da postürün belirlenmesi gibi fonksiyonel testler sıklıkla kullanılmaktadır [208]. Ancak test edilecek hipoteze uygun yöntemin seçilmesi, çalışmanın planlanması aşamasında önem taşımaktadır. De Medinaceli ve ark. [33] tarafından 1982 yılında tanımlanan ve sonraki yıllarda çeşitli araştırmacılar tarafından geliştirilen yürüme analizleri, sıçan siyatik sinir hasar modelinde motor ve duyu sinir fonksiyonlarının belirlenmesinde en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Bu tez çalışması kapsamında, sinir hasarı sonrasında iyileşme döneminin incelenmesinde ve proteomik analizler için uygun zaman aralıklarının belirlenmesinde kullanılan yöntemlerden biri yürüme testleridir.

Yürüme testleri, yürüme modellerinin belirlenmesi ve rejenerasyon sürecindeki iyileşmenin takip edilmesinde yaygın olarak kullanılmalarına karşın, hareket (lokomosyon), yürüme analizleri ve kinematik terimlerinin anlamlarıyla ilgili karışıklıklar söz konusudur. Hareket (lokomosyon), bacak segmentlerinin koordineli hareketleriyle tüm vücudun öne doğru ilerlemesidir. Yürüme analizi, lokomosyonun özelliklerini gösteren sistematik ölçümler, tanımlamalar ve sayısal değerlendirmeler anlamına gelmektedir. Hareket bilim olarak da bilinen kinematik terimi ise, harekete yol açan iç ve dış kuvvetlerden bağımsız olarak hareketin tanımlanması anlamına gelmektedir [209].

Sıçanlarda periferik sinir rejenerasyonunun fonksiyonel değerlendirilmesi için geliştirilmiş ve yaygın olarak kullanılan üç parametre, siyatik fonksiyon indisi,

duruş faktörü (hareket sırasında ayak tabanının yer ile temas ettiği süreç) ve ayak bileği açılarının hesaplanmasıdır [209].

Siyatik fonksiyon indisi (SFI) olarak da bilinen yürüme testi, sıçanlarda farklı hasar modelleri sonrası siyatik sinirlerde iyileşme ve fonksiyon kazanma sürecinin gözlenmesi için, ayak izlerinin ölçülmesiyle arka bacaklardaki performansın belirlenmesini sağlayan kantitatif bir yöntemdir [31]. Bir yürüme platformu ve su bazlı mürekkep ile basit şekilde uygulanabilen bu yöntem için günümüzde tam otomatik kameralı ve bilgisayar yazılımlı sistemler geliştirilmiş olup, sinir sistemi hastalıkları ve hasarlarıyla ilgili sıçan ve fare modellerinde bu cihazlar yaygın olarak kullanılmaktadır.

Literatürde sıçanlar üzerinde yapılan sinir rejenerasyonu çalışmalarında yürüme analizlerine sıkça rastlanmakla birlikte, semenderlerin model olarak kullanıldığı benzer çalışmalar çok az sayıdadır. Kropf ve ark. [15], *Ambystoma mexicanum* türü Meksika semenderleri (axolotl) üzerinde yaptıkları siyatik sinir hasar modelinde, fonksiyonel, elektrofizyolojik ve radyografik verilerle farklı sinir hasarları sonrası iyileşme derecesi ve zamanını tanımlamaya çalışmıştır. Kinematik ölçümlerin ilki sinir hasarı oluşturulmadan önce olmak üzere, hasar oluşturulduktan sonra da 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 ve 12. haftalarda alınmıştır. Kayıtlar, tek yönlü sabit su akımının yaratıldığı yüzme tankının alt yüzeyine yerleştirilen kamera ile alınmış ve arka bacak açıları ölçülerek axolotl siyatik sinir fonksiyon indisi (ASFI) geliştirilmiştir [15].

Bu çalışma dışında literatürde semenderlerin yürüme modellerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar yer almaktadır. Semenderler yaşayan tetrapodlar arasında ilkin karasal omurgalılara en yakın gruptur ve sucul habitatlardan karasal habitatlara geçişle birlikte hareketteki evrimsel değişimlerin en iyi gözlenebileceği grubu oluşturmaktadır. Semenderler, sucul ortamlarda yüzme ve karasal ortamlarda adım atma şeklinde, temel iki hareket biçimine sahiptir. Yüzme şekilleri anguilliform (yılan balığına benzer şekilde) olup, karada ise bacak hareketleriyle koordineli olarak vücut S-şeklinde dalgalanırken adım atmaktadırlar. Semender türlerinin çoğunda karada yürüme sırasındaki adım atma döngüsünde kuyruk ve gövdenin bir kısmı zeminle temasını sürdürmektedir. Semenderlerdeki iki hareket şekli karşılaştırıldığında, yüzme sırasındaki hareket frekansının yürümeye göre 2-3 kat fazla olduğu bulunmuştur. Semenderler bu iki

farklı hareket modeli arasındaki geçişin nöral mekanizmalarının incelenmesi için uygun bir canlı grubudur. Chevallier ve ark. [210], semenderlerdeki motor hareketleri oluşturan spinal lokomotor ağları ve hareket şekillerindeki değişimlerin kas ve sinir sistemi ile bağlantılarını incelemiştir. Ashley-Ross [211] çalışmasında *Dicamptodon tenebrosus* türü semenderlerde karasal hareket sırasında arka bacakların kinematik özelliklerini göstermiştir. Bennett ve ark. [212], *Ambystoma tigrinum* türü semenderlerin yürüme ve yüzme modellerinde hipaksiyal kasların görevlerini incelemiştir. Gillis [213], *Siren intermedia* türü semenderlerde yüzme hareketinin mekanizmasını çözmek amacıyla video kayıt sistemlerini kullanmıştır.

Ashley-Ross ve Bechtel [214], *Taricha torosa* türü semenderlerin sucul ve karasal hareketleri arasındaki geçişin kinematik özelliklerini incelemiştir. Çalışmada yarısı su içine gömülü, diğer yarısı 15°'lik açıyla yukarı doğru kaldırılmış bir platform hazırlanmıştır. Video kayıtlar bu platformun üst ve yan yüzeylerinden alınmıştır. Yapılan analizler sonucunda karasal ve sucul ortamlardaki temel hareket modellerinin aynı olduğu bulunmuş ve yürüme ya da yüzme hareketine ait olduğu bilinmeden alınan ölçümlere bakıldığında çok az ölçümün hayvanın suda ya da karada olduğuyla ilgili bilgi sağladığı belirlenmiştir.

Deban ve Schilling [215], *Ambystoma maculatum* türü sucul semenderlerde yaptıkları çalışmada bu grubun sudaki ve karadaki hareketleri sırasında gövde kaslarının aktivite durumlarını incelemiştir. Bu çalışmada, semenderlerin hızlı yürüme hareketlerinde sürekli bir lateral dalgalanma olduğu ve bu hareketin yüzme hareketinin gerçekleştiremeyeceği sığ su içinde karada olduğundan belirgin ölçüde daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Su içinde yürüme sırasında yerçekimine karşı direnç ihtiyacı daha az olduğu için, dört bacak için ortalama güç faktörü, karada harekete göre çok düşük bulunmuştur.

Semenderlerde hareket modelinin araştırılması ile ilgili bilgisayar simülasyonları ve robotik çalışmalar da yapılmaktadır. Bu şekilde geliştirilen mekanik- kas modellerinin uygun nöral kumandalarla kullanılmasıyla ilerleyen yıllarda *in silico* nörofizyolojik deneylerin yapılmasının mümkün olacağı belirtilmektedir [216].

Siyatik fonksiyon indisinin sıçanlarda sinir hasarı sonrası sinir dokunun fonksiyon kazanmasıyla ilgili doğru bilgi verdiği bilinmekte ve invaziv olmayan bir yöntem

olması nedeniyle tercih edilmektedir. Gasparini ve ark. [217]'de, sıçan siyatik sinirinde ezik hasarı sonrası fonksiyonel iyileşme sürecinin ayak izleri ile test edildiği ve sonuçların el ile ve bilgisayar tabanlı ölçümler ile değerlendirildiği yöntemler karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada operasyon öncesi ve ezik hasarı sonrası 1., 7., 14. ve 21. günlerde üç farklı yöntemle ayak izi ölçümleri alınmıştır. Öncelikle SFI formüllerinin geliştirildiği dönemde kullanıldığı gibi uygun boyutlardaki tahta yürüme yoluna yerleştirilen kağıtlar üzerinde çıkan ayak izleri cetvel ile ölçülmüştür. Aynı izler tarayıcı ile bilgisayara aktarıldıktan sonra bilgisayarda ölçümü yapılmıştır. Üçüncü ölçüm içinse tahta yolla aynı boyutta saydam akrilik bir yürüme yolu hazırlanmış ve yürüme modelleri platformun altına yerleştirilmiş dijital video kamera ile kaydedilmiştir. Her bir ölçümden alınan veriler Bain ve ark. [57] formülü ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, üç yöntemin birbiriyle pozitif korele sonuçlar verdiği; ancak video kayıt yöntemiyle en kullanılabilir verilerin elde edildiği ve klasik yöntemlerde anlaşılamayan bazı ayak izlerinin bu şekilde daha iyi değerlendirilebildiği belirtilmiştir. Yaptığımız tez çalışmasında, semenderler için saydam bir yürüme yolu hazırlandıktan sonra, zemine parşömen kağıtları yerleştirilmiş ve su bazlı mürekkep ile arka ayakları boyanmış semenderler bu yolda yürütülürken, yolun alt tarafına yerleştirilen kamera ile de kayıtlar alınmıştır. Bu sayede her iki yöntemin bir arada değerlendirilmesi sağlanmıştır.

Bu tez çalışmasında farklı araştırmacılar tarafından geliştirilen siyatik fonksiyon indisi formülleri incelendikten sonra; çalışmamıza uygunluğu açısından Bain ve ark. [57] tarafından geliştirilen siyatik fonksiyon indisi kullanılmıştır.

Semenderlerle sıçanların yürüme modelleri birbirinden farklıdır. Hatta herhangi bir sinir hasarı oluşturulmamış semenderlerin ölçümleri değerlendirildiğinde bile, örnekler arası farklı sonuçlar görülmüştür. Semenderlerin sığ su, derin su ya da karadaki hareketleri, yürüyüş modellerini de etkilemektedir. Karada hareket sırasında, parmaklar arasındaki açı korunamamakta ve yere basış açısı her zaman zemine paralel olmamaktadır. Bu nedenle elde edilen ölçüm sonuçları ile bu gruba ait yeni bir siyatik fonksiyon indisi formülü oluşturulamamıştır. Ancak sıçanlar için hazırlanmış siyatik fonksiyon indisinin temel mantığına uygun olacak şekilde, semender SFI sonuçlarında da iyileşme süreci zamana bağlı olarak incelendiğinde hasar oluşturulduktan sonra daha negatif olan SFI değerlerinin

iyileşme dönemine bağlı olarak sifıra yaklaştığı belirlenmiştir. Yürüme kaydı alınan hayvan sayısının artırılmasıyla, matematiksel farklılıkların optimize edilerek, bu türe ait yürüme testi formülünün geliştirilebileceği düşünülmektedir.

Yedinci, on dördüncü, yirmi birinci ve otuz beşinci gün iyileşme periyotlarına ait SFI grafiklerinin eğimleri tablo halinde karşılaştırıldığında (Çizelge 3. 3, Şekil 3. 8), iyileşmedeki değişimin hasar sonrası ilk evrelerde hızlı iken, otuz beşinci gün seviyelerinde giderek yavaşladığı görülmüştür. Bu değişim, protein çalışmasından elde edilen, özellikle aksonal rejenerasyonun ilkin dönemlerinde yoğun aktivite gösterdiği bilinen hücre iskeleti proteinlerinin ve sinyal moleküllerinin ifadelerindeki değişimle de paralellik göstermektedir.

4.2. Elektrofizyolojik Ölçümler

Elektrofizyolojik ölçümler sinir sistemi hasar ve hastalıklarının çoğunda kesin tanı konulmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu ölçümler, dokudaki anormal sinyal iletiminin belirlenmesi temeline dayanmaktadır ve kantitatif veri sağlamaları nedeniyle önemlidir. Kastaki elektriksel aktivitenin kaydına dayalı ölçümler elektromiyografi (EMG) olarak bilinmektedir. Bu ölçümlerle, miyopatik, nörojenik kas zayıflıkları ve hastalıkları, kronik denervasyon ya da klinik olarak normal olan kaslardaki fasikülasyonlar tespit edilebilmektedir. Aynı zamanda nörojenik anomalilerin dağılımı ve periferik nöropati, aksonal dejenerasyon ve demiyelinizasyonla ilgili bulgular da elde edilmektedir [218].

Bir motor birim, motor nöronlar, aksonlar ve aksonal dallar tarafından inerve edilen kas fibrillerinden oluşmaktadır. Her bir motor birime ait kas fibrilleri diğer motor birimlere ait kas fibrilleri ile iç içe geçerek, mozaik bir görünüm oluşturmaktadır. Nörojenik bozukluklarda, bazı motor nöronlar dejenere olurken, hayatta kalan diğer bazı nöronların da yeni aksonal uzantılar geliştirdikleri ve denerve kas fibrilleriyle sinaptik bağlantılar kurdukları bilinmektedir. Bunun sonucunda motor birim daha yoğun ve geniş hale gelmektedir. İğne elektromiyografisi, motor birim boyutu ve iç yapısındaki değişikliklerin belirlenmesinde etkilidir ve anormal fonksiyonları ortaya çıkarmaktadır. Aynı zamanda, iğne EMG'si ile spontan olarak kasılan tek kas fibrillerinin aksiyon potansiyellerinin (fibrilasyon potansiyelleri) belirlenmesi de mümkündür. Bu potansiyeller denervasyonun önemli sinyalleridir ve yüzey elektrotları ile tespit edilememektedir. İğne EMG'si fasikülasyonlar, kompleks tekrarlı deşarjlar,

miyotonia ve nöromiyotonik deşarjlar gibi normal ve anormal diğer spontan aktivitelerin ayırımında da kullanılabilir. Kasılmakta olan bir kasa yerleştiren iğne elektrot ile bir motor birimin aksiyon potansiyeli ölçülebilmektedir. Periferel düzeyde bakılacak olursa, iğne EMG'si ile kaslarda sinir kaybına (denervasyona) neden olan lezyonların etkileri, sinirlerdeki rejenerasyon yeteneği (reinervasyon), miyopatiler, kas distrofileri gibi kas fibrilini etkileyen hastalıklar ve miyastenia gravis gibi nöromuskuler bağlantı hastalıkları çalışılabilir. Yüzey elektrotları ise çoğunlukla davranış, aktivitenin temporal şekilleri, kas ya da kas gruplarındaki yorulmalar gibi çalışmaların yapılması için uygundur [219].

Bu tez çalışması kapsamında da, EMG yöntemi deneysel sıyatik sinir hasarı oluşturulmuş semenderlerdeki rejenerasyon sürecinin izlenmesi amacıyla kullanıldığı için iğne EMG'si yöntemi tercih edilmiştir.

EMG kayıtlarında üç farklı parametrenin zaman aralıklarına göre değişimleri değerlendirilmiştir. Bu parametreler, EMG dalgasının genliği, yanıt süresi ve gecikme süresidir (Şekil 2.13).

Bir EMG dalgasının genliği, minimum pikle maksimum pik arasındaki voltaj farkıdır. Dalganın yanıt süresi ise motor birim fibrillerinin aktive olmaya başladıkları andan repolarizasyon fazını tamamladıkları ana kadar geçen süredir. Genlik ve alan verisinden farklı olarak, yanıt süresi elektrot hareketlerinden fazla etkilenmemektedir. Genlik değeri ise, elektrot hareketlerine çok duyarlıdır [220].

EMG dalgasında ölçülen genlik değeri, birleşik kas aksiyon potansiyeli (BKAP) değerine karşılık gelmektedir. Kane ve Oware [221]'de belirtildiği gibi, farklı hasar tipleri sonrasında BKAP dalgasında gözlenen değişiklikler şu şekildedir: Demiyelinizasyon ve bazı aksonların zarar gördüğü ancak epinöryumun sağlam kaldığı aksonotmesis durumlarında genlik değeri azalırken; tüm aksonların ve epinöryumun hasarlandığı nörotmesis durumunda ise uyarı cevabı oluşmayacağı için genlik değeri gözlenememektedir.

EMG sinyali, sinir-kas aktivitesine bağlı kas kasılması sonucu ortaya çıkan elektriksel akımın ölçülmesidir. Kasılma ve gevşeme gibi kas aktiviteleri her zaman sinir sisteminin kontrolü altındadır. EMG sinyali, sinir sistemi tarafından kontrol edilen ve kasların anatomik ve fizyolojik özelliklerine bağlı karmaşık bir

sinyaldir. Bu sinyal farklı dokulardan geçerken, gürültü (EMG dalgası dışındaki istenmeyen dalgalar) oluşumuna neden olmaktadır [222]. EMG ölçümü ile elde edilen elektrik sinyali, yüzey elektrodlarında elektrodun altında kalan, iğne elektrotlarında ise elektrodun yerleştirildiği kas grubundaki tüm aksiyon potansiyellerinin toplamından oluşmaktadır [223].

EMG kayıtlarının alınması sırasında, elektrot ve kabloların çevresindeki bir elektriksel alan, elektronik cihazlar, kayıt cihazları, harekete bağlı artefaktlar ya da bilgisayarlar, monitörler ve floresan lambalar ile oluşabilen ortam gürültüsü de gerçek EMG kaydının maskelenmesine neden olabilmektedir [223]. Tezin canlı materyalini oluşturan sucul semenderlerden alınan kayıtlarda, hem canlının derisinin nemli olması, hem de sıçanlar için hazırlanan düzenekte bazı değişiklikler yapılarak semenderlere uygun hale getirilmesi nedenleriyle gürültü ve artefaktlar oldukça fazla yer almıştır. Motor artefaktlar, elektrotla derinin temas ettiği noktadan ya da elektrotun amplifikatöre bağlandığı kablodan kaynaklanmaktadır [223]. Bunların önlenmesi için sistemde mevcut olan filtreler kullanılmıştır ancak yine de tamamen engellenememiştir. Semenderler anestezi altında olmalarına rağmen, stimülatörden verilen uyarı ile kayıt alınan bacakta hareket oluşmakta ve vücut tamamen hareketsiz şekilde tutulamamaktadır. Daha küçük deney hayvanlarında da kullanılabilecek bir sistemin kurulmasıyla, kayıt kalitesinin artırılacağı düşünülmektedir.

Farklı hayvan modelleri ve sinir hasarı tiplerinin kullanıldığı sinir rejenerasyonu çalışmalarının birçoğunda iyileşme süreci EMG ölçümleri ile takip edilmektedir. Launay ve ark. [224]'de bir sucul semender türü olan *Pleurodeles waltlii*'de arka bacak amputasyonu sonrasında egzersizin arka bacak rejenerasyonu üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmada femurun orta bölgesinden kesilen arka bacaklar ile sağlam bacakların EMG verileri incelendiğinde, rejenere olmakta olan sinirlerdeki genlik değerinin sağlam sinirlere oranla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun rejenere olan sinirdeki kas fibrili sayısının daha az olmasına bağlı olarak görüldüğü belirtilmiştir [224].

Bakhtyari ve ark. [225], sıçanlarda yaptıkları siyatik sinir rejenerasyonu çalışmasında, siyatik sinirde kesik hasarı oluşturduktan sonra, deney grubunda Schwann hücreleri eklenmiş silikon tüpleri, kontrol grubunda ise sadece silikon tüpleri kullanarak kesik sinir uçlarını birleştirmiş ve allograft Schwann hücrelerinin

kesik hasarı üzerindeki etkilerini elektrofizyolojik bulgularla test etmiştir. Transplantasyon sonrası sekizinci haftada elektrofizyolojik ölçümler yapılmış ve deney grubundaki sinir aksiyon potansiyeli değerlerinin kontrole göre daha yüksek, gecikme süresi değerlerinin ise daha düşük olduğu tespit edilerek, Schwann hücre transplantasyonunun sinir onarımı üzerinde olumlu etkisi olduğu belirtilmiştir.

Wang ve ark. [226], sıçan siyatik sinirlerinde ezik hasarı oluşturduktan sonra, sekiz hafta boyunca haftalık olarak BKAP verilerini kaydetmiştir. Ölçümler gastrocnemius kasından alınmış, yüzeysel olarak uygulanan elektriksel uyarım deri üstünden ischial yumru ve major trochanter arasından bipolar kanca elektrotlar aracılığıyla iletilmiştir. Operasyon sonrası sekizinci haftada doğrudan sinirin uyarıldığı ve yüzeysel uyarımın yapıldığı BKAP verileri arasında genlikler bakımından anlamlı bir fark bulunmazken, gecikme süresinin yüzeysel uyarımda görece daha uzun olduğu bulunmuştur. Bu çalışma ile yüzeyden uyarıma dayalı periyodik BKAP kayıtlarının, kemirgen modellerde periferik sinir rejenerasyonu ilerleyişinin incelenmesinde uygun bir yöntem olduğu tespit edilmiştir.

Vleggeert-Lankamp [58]'e ait inceleme makalesinde, 1975-2004 yılları arasında yayınlanan ve farklı onarım yöntemlerinin kullanıldığı periferik sinir rejenerasyonu çalışmalarını karşılaştırılmış ve uygulanmış yöntemlerin yeterliliği sınanmıştır. Siyatik sinir iyileşmesinde kullanılan yöntemlerden biri olarak elektriksel uyarı sonrası birleşik kas aksiyon potansiyeli ölçümlerine yer verilmiş ve sıklıkla seçilen hedef kasların da gastrocnemius, tibial ya da plantar kaslar olduğu belirtilmiştir. Yazar bu çalışmada gecikme süresi verisinin kullanıldığı on dört, genlik verisinin kullanıldığı dokuz yayını incelemiştir. Bu yayınlar içinde kontrol ve deney gruplarındaki BKAP farklılıkları karşılaştırıldığında, bir yayın dışında tamamında uygulama yapılmamış hayvanlarda gecikme sürelerinin daha kısa, genlik değerinin ise daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu değerlendirmeye göre, BKAP dalgasına ait gecikme süresi ve genlik verileri kolaylıkla ölçülebilen parametreler olup, yayınların çoğunda rejenere olan sinirlere ait belirgin BKAP farklılıklarından bahsedildiği için ilerleyen yıllarda yapılacak çalışmalarda da bu verilerin kullanılması tavsiye edilmektedir. Yayınlar incelendiğinde, gecikme süresi ya da genlik verisi arasında tercih yapılmadığı ve milivolt ya da milisaniye sonuçlarının her ikisinin de kullanılabileceği bildirilmektedir. Tez çalışmamız kapsamında, her

iki parametre de değerlendirilmiş olup, sonuçlarımız bu makaledekilerle uygunluk göstermektedir. Tez çalışmasında ölçülen BKAP genlik değerleri zaman aralıklarına bağlı olarak değerlendirildiğinde, iyileşme sürecinin ilerlemesiyle hem genlik değerlerinin, hem de yanıt sürelerinin arttığı görülmüştür. Gecikme süresi verileri arasında ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

4.3. Proteomik Çalışmalar

Moleküler çalışmalarda bottom-up proteomik stratejiler kullanılmıştır. Ön çalışmalarla, kesik ve ezik hasarı olmak üzere iki farklı sinir hasarı uygulanan siyatik sinir örneklerinden elde edilen protein profilleri karşılaştırılmıştır. PDQuest 8.0.1 jel analiz programı ile karşılaştırılan jellerde, ezik hasarının kesik hasarına göre kontrol grubuna daha yakın profil gösterdiği belirlenmiştir. Literatür bilgisine göre kesik hasarı sonrası sinirin distal ucu ile proksimal ucu farklı görevler üstlenmekte ve farklı moleküllerin salgılanmasına yol açmaktadır. Bu bilgiye dayanarak kesik hasar grubu, siyatik sinirin distal ve proksimal uçlarının ayrı ayrı ve birlikte havuzlandığı iki alt grup içinde incelenerek, protein profil farklılıkları karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırma ile, proksimal ve distal uçların ayrı ayrı değerlendirilmesinin hem her iki grupta ifade olan proteinlerin ifade seviyelerindeki farklılığın belirlenmesinde, hem de gruplar arasında varken yok, yokken var olan protein ifadelerinin incelenmesinde uygun olacağı sonucuna varılmıştır. Protein kümelerindeki yoğunluk farklarının ölçümü ile kantitatif veri sağlayan PDQuest analiz programı ile her iki ucun birlikte incelendiği grupta belirli protein kümelerinin ifade seviyelerinin maskelendiği görülmüştür. Ayrıca sinir rejenerasyonunda önemli olduğu bilinen translasyon sonrası modifikasyonlar da bu ön çalışma kapsamında incelenerek, distal ve proksimal uçların farklı fosfoprotein ve glikoprotein profillerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu sebeplerle, kesik hasarı sonrasında siyatik sinirin distal ve proksimal uçları ayrı ayrı incelenmiştir.

Çalışmada laboratuvar üretimi olmayan bir sucul semender türü kullanılmıştır. Arazi çalışmaları sonucu elde edilen semenderler arasında standart laboratuvar hayvanlarına oranla daha yüksek bireysel farklılıkların olma olasılığını önlemek ve istatistiksel analizler için gereken teknik tekrarlara yetecek protein miktarına ulaşmak için aynı gruptaki altı bireyden alınan örnekler havuzlanarak çalışılmıştır.

Bu çalışma ile *Triturus karelinii* türü semenderlere ait siyatik sinir protein profil haritaları çıkarılarak, literatüre katkıda bulunulmuştur. Deneysel sinir hasarı oluşturulduktan sonra ilk ve ikinci örneklemeler 0-3. saat ve 24. saatte alınmıştır. Sonraki zaman aralıkları ise, 7. gün, 14. gün, 21. gün ve 35. gün olarak belirlenmiştir. Tüm zaman aralıklarına ait distal uç, proksimal uç ve kontrol grubu örneklerinden toplam 138 protein kümesi PDQuest programı ile manuel olarak eşleştirilmiştir. Her bir zaman aralığına ait distal sinir ucu örnekleri kendi aralarında test edildiğinde 28 protein kümesi; proksimal sinir ucu örnekleri kendi aralarında test edildiğinde ise 38 protein kümesinin ifadesindeki değişim $p < 0.05$ güven aralığında anlamlı bulunmuştur.

Golding ve Tonge [54], yaptıkları çalışmada, *Ambystoma mexicanum* türü semenderlerde, iki boyutlu jel elektroforezi ve otoradyografi yöntemlerini kullanarak normal ve lezyon oluşturulmuş siyatik sinirlerdeki protein sentezini karşılaştırmıştır. Lezyon oluşturulmuş sinirlerden salınan en az altı proteinin metiyonin bağlamasında artış olduğu bulunmuştur. Moleküler ağırlıkları ve izoelektrik noktaları verilen bu proteinlerin miyelin kılıf hücrelerinin ürünleri olduğu belirtilmektedir [54].

Lu ve ark. [40], sıçan beyincik, omurilik ve siyatik sinirlerindeki membran proteinlerine ait profilleri karşılaştırmıştır. Siyatik sinir dokusundan, 1009 tanesi membran proteini olmak üzere, toplam 1649 protein tanımlanmıştır.

Qualtieri ve ark. [53] yaptıkları örnek hazırlamayla ilgili optimizasyon çalışmasında, sığır siyatik siniri ve insan sural sinir biyopsi örneklerini kullanarak iki boyutlu jel elektroforezi için örnek hazırlama yöntemlerini karşılaştırmıştır. Bu çalışmada sığır siyatik sinirine ait iki boyutlu jellerden elde edilen 29 protein kümesinden, farklı nörofilament alt tipleri, periferin, albumin, serotransferin, vimentin, kristalin gibi proteinleri de içeren, toplam 23 protein tanımlanmıştır.

Capitanio ve ark. [227], sıçan siyatik sinir dokusunda yaşlanmaya bağlı gelişen değişimleri proteom ve morfoloji düzeyinde incelemiştir. Siyatik sinirlerde yaşlanmayla birlikte katlanmalar, invaginasyonlar, yumru şeklinde şişkinleşmeler, bozulmalar ve aksonal atrofi gözlenmiştir. İki boyutlu jel elektroforezini takiben MALDI-TOF kütle spektrometresiyle yapılan proteomik analizlerle, morfolojik değişikliklere paralel olarak, metabolik, kontraktıl ve hücre iskelet proteinlerinde

anomaliler, demir homeostasisinde düzensizlik, kalsiyum dengesinde ve stres yanıt proteinlerinde değişiklikler, miyelin membran adezyon proteinlerinde ve nöron çapını düzenleyen proteinlerde bozulmalar tespit edilmiştir. Siyatik sinir dokusundan tanımlanan proteinler fonksiyonlarına göre, anaerobik metabolizma, taşıyıcı proteinler, yapısal proteinler ve diğerleri şeklinde sınıflandırılmıştır.

Jiménez ve ark. [52] yaptıkları çalışmada, sıçan siyatik sinir dokusunda, ezik hasarı sonrası dönemdeki protein profil değişimlerini araştırmıştır. Operasyon sonrası, 5, 10 ve 35. günlerde alınan siyatik sinir doku örneklerinden 121 tanesi en az bir zaman aralığında anlamlı fark göstermiştir. Akut- faz proteinleri, antioksidanlar, protein sentezi, olgunlaşması ve yıkımında görevli proteinler, hücre iskeletinin yeniden yapılanmasıyla ilgili ve lipit metabolizmasında görevli proteinler olmak üzere toplam 82 protein tanımlanmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında, toplam 34 protein tanımlanmıştır. Tanımlanan proteinlerin gen ontoloji veritabanındaki (Gene Ontology Database, <http://geneontology.org/>) moleküler fonksiyonlarına göre dağılımlarına bakıldığında, 21 proteinin bağlama aktivitesi, 10 proteinin katalitik aktivitesi, 5 proteinin yapısal molekül aktivitesi, 2 proteinin moleküler transdüser aktivitesi ve 1 proteinin enzim regülatör aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Tanımlanan bu proteinler aynı zamanda, hücresel düzenleme, gelişimsel ve metabolik süreçler ve biyogenez gibi biyolojik aktiviteler de göstermektedir.

Protein tanımlamaları, MALDI-TOF kütle spektrometresinden elde edilen peptit kütlelerinin MASCOT sunucusuna aktarılması ve belirlenen arama kriterlerine göre mevcut veritabanı bilgisi ile programa yüklenen spektrum verilerinin karşılaştırılması sonucu belirlenmektedir. Günümüzde pek çok canlıya ait genomik veritabanları mevcut olsa da, bu tez çalışması kapsamında model hayvan olarak seçilmiş semenderlere ait yeterli moleküler bilgi henüz kütüphanelerde bulunmamaktadır. Bu nedenle, MASCOT sunucusunda arama yapılırken, semenderlere evrimsel olarak en yakın grubu oluşturan ve genomik ve proteomik veri tabanlarında bilgileri bulunan *Xenopus laevis* türü seçilerek, tüm protein aramaları bu grup üzerinden yapılmıştır. Bu nedenle protein tanımlamalarındaki eksikliklerin, semender genomundaki sekans haritalarının tam olmamasına ya da semender genomu ile *Xenopus* genomu arasındaki homolojinin az olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir. İki boyutlu jel

elektroforezi çalışmasında teknik tekrarların sağlanabilmesi için jel başına toplam 45 µg protein yüklenmiştir. MALDI-TOF için de bu jellerden kesilen spotlar kullanılmıştır. Jellere yüklenen toplam protein miktarının artırılmasıyla, kütle spektrometresinden elde edilen verilerin kalitesinin de artacağı ve tanımlamalarda ardışık kütle spektrometresi (Tandem-MS) kullanılması halinde daha kesin sonuçlara ulaşılabileceği düşünülmektedir.

Elde edilen protein listesine bağlı olarak protein-protein etkileşimleri ile ilgili analizler Cytoscape 3.1.1 programı kullanılarak yapılmıştır. Bu programda da semender ya da kurbağa bilgileri kullanılamamaktadır. Bu nedenle, UniProt veri tabanında bulunan ve *Xenopus laevis* türünde tanımlanmış olan protein listesine karşılık gelen fare ve sıçan proteinleri belirlenmiştir. Bu proteinler ile *X. laevis* proteinleri arasındaki homoloji NCBI içindeki Protein Blast algoritması ile karşılaştırıldıktan sonra, Cytoscape 3.1.1 programında bu veriler kullanılmıştır.

Tanımlanan proteinler Cytoscape 3.1.1 ile uyumlu BINGO programında incelendiğinde, doku ve organ morfogenezi, hücre ve doku gelişimi, büyüme, hücre farklılaşması, nöron homeostasisi, mikrotübüle bağlı hareketler, sinyal yollarının pozitif düzenlenmesi gibi fonksiyonlara sahip proteinler olduğu bulunmuştur.

Ergin ve sağlam bir periferik sinir aksonu, aksolemma tarafından sarılmış, mikrofilamentler, nörofilament ara proteinleri ve mikrotübül proteinlerini içeren bir iskeleden oluşmaktadır. Mikrofilamentler subaksolemmal hücre iskeleti tarafından ifade edilirken, nörofilamentler ve mikrotübüller akson boyunca yayılmaktadır. Periferik nöronlar, üç nörofilament alt birimi, periferin ve α -interneksin olmak üzere, beş ana tip ara filament ifade etmektedir. Nörofilamentler sınıf IV ara filamentleridir ve hücre gövdelerinde az fosforile durumda iken, aksonal nörofilamentler yoğun şekilde fosforile durumdadır. Ayrıca nörofilamentler glikozilasyona da uğramaktadır. Periferin, sınıf IIIF ara filamentidir ve küçük duyu ve otonom nöronlarda bulunmaktadır. Alfa interneksin ise sadece sağlam motor nöronlarda düşük seviyelerde ifade edilmektedir. Nörofilament alt birimlerinin, periferin ve α -interneksinin kaybı, motor nöron dejenerasyonuna neden olmamaktadır. Aksonların çap kalınlığıyla ilgili olan bu proteinler susturulduğunda aksonal atrofiye neden olurken, aksonal uzama için gerekli değildir [13].

Mikrotübüller ise polimerize tubulin alt birimlerinden oluşmaktadır. Akson boyunca uzunlamasına yerleşmiştir ve akson çapı azaldıkça paketlenme yoğunlukları artmaktadır. α ve β olmak üzere, iki tubulin alt birimi bir dimer yapısı oluşturmaktadır. Sinirlerde tubulin alt birimlerinin farklı tipleri bulunabilir. Örneğin, farelerde αI , αII ve βII , βIII ve βIVa alt birimleri ifade edilmektedir. Motor ve duyu aksonlarında βII ve βIII alt birimleri taşınarak mikrotübüllere katılmaktadır. αI tubulin aynı zamanda rejenere olan aksonlarla bağlantılıdır [13].

Bir akson fiziksel olarak hasara uğratıldığında, dakikalar içinde hızlı moleküler değişimler gerçekleşmeye başlamaktadır. Kesilen aksonlar birkaç saat içinde kesik uçlarını kapatarak aksoplazma kaybını önlemektedir. Aksonların hızlı onarımı yeni membran sentezini gerektirmektedir. Periferik sinir gövdeleri kesildiğinde, proksimal aksondaki ilk Ranvier düğümüne kadar retrograd dejenerasyon gerçekleşmektedir. Bu süreç, Wallerian dejenerasyondaki gibi Schwann hücrelerinin aktivasyonu ve hasarlı bölgeye makrofaj göçünü de içermektedir. Distal akson uçlarında hasar sonrası yapısal değişimler görülmektedir. Kesik hasarı sonrası birkaç saat içinde, mikrotübüller önce parçalarına ayrılmakta ve sonrasında veziküllerin birikebileceği şekilde yeniden yapılanmaktadır. Sağlam aksonlarda mikrotübüller tek bir yönde uzunlamasına yerleşmiş polar yapılardır ve + uçları tek bir yöne bakacak şekilde distal olarak yönelmiştir. Hasar sonrasında bu konumları değişir ve tek bir yöne bakmak yerine + ve - uçlar zıt yönlerde bakmaya başlar. Bu yapıya pozitif tuzak denmektedir ve anterograd yönde taşınacak veziküllerin bu alanda toplanması ile ilgilidir. Bu veziküller ise büyüme konisi yapısının oluşturulmasında etkili olmaktadır. Aksonun daha distal bölgesinde yer alan negatif tuzak yapısı ise eski membran materyalinin pozitif tuzaktan uzak tutulmasını sağlamaktadır [13].

Kesik hasarı sonrası aksonun proksimal ucunda yapısal değişiklikler oluşmaya devam eder. Hasar sonrası 24- 48 saat içinde proksimal akson ucu şişer ve akson uçlarında yumrular oluşur. Bu yumrulara aksoplazmik materyal, depolimerize nörofilamentler ve fonksiyonel moleküller yer almaktadır. Bu uç noktadaki yumrulara salınan moleküller hasarlı sinir gövdesindeki diğer hücreleri de etkilemektedir. Bir nöropeptit olan kalsitonin gen-ilişkili peptit yavaşça salınır ve hücre dışı alana yayıldığında bu alandaki kılcal damarlar üzerinde vazodilatör etki yaparken, Schwann hücreleri üzerinde mitojen etkisi

bulunmakta ve aynı zamanda P maddesi ile sinerjistik etki yaparak lokal ektopik deşarjlarla nöropatik ağrıyı başlatmaktadır. Aynı zamanda bu yumru bölgeleri ektopik akson impulslarının ve ağrının oluşumuna neden olan sodyum kanallarının toplandığı ve ağrı sinyalinin hafifletilmesini sağlayan μ opioid reseptörlerinin ifade edildiği bölgelerdir [13].

Akson büyüme konisi hasar sonrası birkaç saat içinde oluşmaya başlamaktadır. Nöronlardan ilk uzayan yapılar, membran çıkıntılarıdır. Nöritlerin uzamasını destekleyen proteinlerden biri protrudindir ve Rab 11 gibi diğer membran proteinleri ile etkileşime girerek, membran trafiğinin yönünün belirlenmesine destek olmaktadır. Kesik hasarında aksonlar eş zamanlı hasar görmesine rağmen, bir sinir gövdesindeki tüm sinirlerin uzaması eş zamanlı olarak gerçekleşmemektedir. Sinir hasarının distalinde kalan kısımda rejenere olan aksonlar eşzamanlı büyümeleri nedeniyle farklı olgunluk derecelerinde bulunmaktadır. Bu kademeli büyümenin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, bazı ilkin aksonların diğerlerine rehberlik edecek yolu belirledikleri düşünülmektedir [13].

Büyüme konileri, aktin filamentlerinin etrafına yerleşmiş parmak benzeri filopodlar içermektedir. Büyüme konisinin hareketlerinin ve yönünün belirlenmesinde kalsiyum geçişleri etkili olmaktadır. Bu etki, kalmodulin bağımlı protein kinaz II gibi kalsiyum bağımlı sinyal enzimleri sayesinde yaratılmaktadır. Büyüme konisi davranışlarının düzenlenmesinde, anahtar sinyal mekanizması fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K) yolağındaki bir sinyal mekanizması etkilidir ve akson dallanması için gereklidir. Büyüme konisinin ileri ya da geri hareketine katılan proteinler arasında RHO ailesi GTPazları, aktin ve mikrotübüllerle etkileşen proteinler yer almaktadır. Büyüme faktörleri uzamayı desteklerken, bazı diğer sinyaller ise büyüme konisinin geri çekilmesine neden olmaktadır. Aksonlar kesik hasarı sonrasında ilerlemeleri gereken yönü doğru tespit edebilirken, Schwann hücrelerinin böyle bir seçim yapamadığı ve her iki yöne doğru göç ettikleri belirlenmiştir [13].

Sinir hasarı sonrasında, distal uçta Wallerian dejenerasyonu gerçekleşmektedir. Bu süreçte, Schwann hücreleri proliferer olur, göç eder, fenotiplerini değiştirir ve büyüme faktörlerini salgılar. Hasar bölgesine makrofaj göçü, kan akımında lokal bir artış ve anjiyogenez görülür. Hücrelerin davranışları ve sitokinlerin sentezi, aktif inflamatuvar bir ortamın göstergesidir. Yeniden sinirlenmenin önlenmesi

halinde, bu özellikler zamanla kaybolmaktadır. Denerve olan distal sinir ucundaki mikroçevre zamanla rejenerasyonu desteklemez hale gelmektedir. Bu durumda Schwann hücrelerinin proliferasyonu azalmakta ve daha az büyüme faktörü ve sitokin salınmaya başlamaktadır. Daha da uzun zaman geçtiğinde Schwann hücreleri de azalarak, atrofik hale gelmektedir [13].

Periferel sinir hasarı, başarılı bir rejenerasyon süreci için, nörit uzaması, denerve olan hedef organın yeniden sinirlendirilmesi ve fonksiyonun geri kazanılması ile ilişkili bir seri moleküler, hücrenel ve yapısal yanıtın ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Hasarlı aksonlardan iletilen en hızlı sinyaller, hasarlı aksonun iletilen fenotipten büyümeyi destekleyici fenotipe dönüşmesini sağlamaktadır. Bu değişim, transkripsiyon faktörleri, adezyon molekülleri, hücre iskeleti elemanları, büyüme faktörleri, sitokinler, nöropeptitler ve rejenerasyonla ilgili diğer molekülleri içeren bir seri rejenerasyon ilişkili genin ifadesinin artması ile gerçekleşmektedir. Bu moleküler değişikliklerin yanı sıra, hayatta kalan nöronlarda morfolojik değişiklikler de gelişmektedir. Proksimal uçta büyüme konileri hızla gelişirken; distal uçta ise Wallerian dejenerasyonu ile akson ve miyelin yıkıntıları fagozite edilmektedir [228]. Akson hasarı sonrası nöronlarda üç temel sinyal oluşmaktadır. Birincisi trofik sinyallerin retrograd akımıdır. Hasar sonrası 12- 24 saat içinde normalde baskılanmış olan trofik sinyaller aktif hale gelmektedir. Bu sinyaller hasarlı aksonun ucundan komşu aksonlara ve Schwann hücrelerine ulaşarak, LIF (Lösemi inhibitör faktör), CNTF (Kirpiksi nörotrofik faktör), FGF (Fibroblast büyüme faktörü) ve NT3 (Nörotrofin 3) gibi büyüme faktörlerini aktive etmektedir. Bu iki süreç ile aktive edilen moleküller importinlere bağlanarak dinein motorları aracılığıyla hücre gövdesine doğru taşınmaktadır. Bu durum, aksonlarla hücre dışı matris arasındaki sıkı iyonik konsantrasyon gradiyentini bozarak, kalsiyum ve sodyum gibi hücre dışı iyonların plazmalemmadan hücre içine hızlı akışını sağlamaktadır. Bu geçiş depolarizasyonla sonuçlanarak, hasar nedeniyle oluşan aksiyon potansiyellerinin başarıyla iletimini sağlamaktadır. Bu moleküler ve elektriksel sinyallerin iletimi ise, kalsiyum ve cAMP'nin hızla yükselmesi ve bir seri sinyal yolunun aktive olmasıyla sonuçlanmaktadır [228]. Voltaj-bağımlı iyon kanallarından kalsiyum akımı ile, kalsiyum/kalmodulin bağımlı kinaz 2 (CMAK2), protein kinaz A (PKA), protein kinaz C (PKC) ve Erk1, Erk2, c-jun N-terminal kinaz (JNK) ve P38 kinaz gibi mitojen- aktive protein kinazlar (MAPK) gibi çeşitli

protein kinaz sinyal yolları aktive olmaktadır [229]. Bu hasar sinyalleri, transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu ve nükleer lokalizasyon ile takip edilmektedir. Fosfoproteomik ve mikroarray çalışmaları ile yaklaşık 400 tane aksonal sinyal ağının 39 transkripsiyon faktörüne bağlandığı tespit edilmiştir [228].

Periferel sinir hasarı sonrası rejenerasyon sürecinde etkili olduğu bilinen transkripsiyonel sinyal yolları arasında, cAMP/ PKA/ CREB, JNK/c-Jun, ATF3, JAK/ STAT3, Ac-p53 ve BMPs/Smad1 yer almaktadır [230].

Tez çalışması kapsamında iki boyutlu jel elektroforezi ile elde edilen protein profil haritaları protein kümelerinin yoğunluk değerleri açısından incelendiğinde (Şekil 3.18- 3.33), tubulin zincirleri, aktin, periferin, vimentin, neksin gibi hücre iskeleti ile ilişkili proteinlerin hasarlı sinirlere ait distal ve proksimal örneklerdeki ifadelerinin kontrol grubunu oluşturan sağlam siyatik sinirlerdeki ifadelerine göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Hücre iskeletindeki değişimlerin düzenlenmesinde etkili olan kazein kinaz 2 proteini de kontrol grubuna göre hasar gruplarında ifadesi artan bir protein olarak bulunmuştur. Bu bulgumuz, literatürde yer alan, akson hasarı sonrası hücre iskeleti ile ilişkili proteinlerin ifadelerindeki artış ve düzenlenmelerindeki değişim ile nörit uzaması sürecinin hızlandığı bilgisiyile uyumlu sonuçlar vermiştir. Distal ve proksimal sinir uçları arasındaki ifade farklarına baktığımızda ise, literatürle uyumlu olacak şekilde, distal sinir ucundan mikroçevreyi düzenleyici ve yeni uzamakta olan nöritlere rehberlik edecek faktörlerin salgılandığı; proksimal uçta ise nörit uzaması ile ilgili özellikle hücre iskeleti proteinlerinin ifadelerinin arttığı görülmektedir. Tubulin alfa ve beta 2 zincirlerinin ifadeleri, hasar sonrası 0-3. saat grubunda distal örneklerde yüksekken; 24. saat örneğinden itibaren tüm zaman aralıklarında proksimal uçtaki ifadesi distal uçtakinden ve kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. Aktin proteininin ifadesi ise, tüm zaman aralıklarındaki distal ve proksimal örneklerde kontrol grubundan çok yüksek iken; 24. saat ve 21. gün örneklerinde proksimal uçtaki ifadesi, distal ucu geçmiştir. Ancak distal ve proksimal uçlardaki ifadeleri arasındaki fark çok yüksek bulunmamıştır. Periferin, vimentin ve neksin proteinleri aynı protein kümesinden tanımlanmıştır. Bu proteinlerin de, 0-3. saat aralığı dışındaki tüm zaman aralıklarında proksimal uçta distal uçtan daha fazla ifade edildiği gözlenmiştir. Hücre iskeletinin yapılanması

ile ilgili tanımlanmış diğer bir protein faskin proteindir. Bu proteinin zaman aralıklarına göre gruplardaki ifadesi incelendiğinde, 24. saat ve 7. gün gruplarında proksimal uçtaki ifadesinin distal uçtakinden yoğun olduğu gözlenmiştir.

Distal sinir ucunda proksimal uca oranla ifadesi daha yüksek olan proteinlerin ise, çoğunlukla taşıyıcı proteinler, büyüme faktörleri, sinyal molekülleri ve düzenleyici moleküller arasında oldukları görülmüştür. Bunlar arasında BMP sinyal yolunda görevli olan F- kutusu/ LRR- tekrar proteini 15'in ifadesi, 0-3. saat dışındaki tüm zaman aralıklarında, distal uçta proksimal uçtan daha yüksek olarak bulunmuştur. Transkripsiyon aktivitesini düzenleyen ve aktin polimerizasyonunu etkileyen simiate proteininin ifadesi de 0-3. saat aralığı dışındaki gruplarda distal uçta proksimal uçtan daha yüksek bulunmuştur. Ökaryotik hücrelerde, sitoplazma ile çekirdek arasında protein ve RNA moleküllerinin taşınmasında görevli olan eksportin proteininin ifadesinin tüm zaman aralıklarında distal uçta proksimal uçtan fazla olduğu bulunmuştur. BMP yolunun antagonisti olan kordin proteini de tüm zaman aralıklarında distal uçta daha fazla ifade edilmiştir. Ras ilişkili protein Rab-19 ve Nöritin- B proteinlerinin ifadeleri ise, 0-3. zaman aralığında hem distal hem de proksimal uçta kontrole ve diğer zaman aralıklarına göre daha fazla ifade edilirken; diğer zaman aralıklarındaki ifade miktarı daha azdır. Rab proteinlerinin, GTP-bağlayıcı özelliği vardır ve veziküllerin hareketini düzenlemektedir. Nöritin proteininin ifadesinin hasar sonrası arttığı ve bu proteinin akson boyunca her iki yönde de taşındığı bilinmektedir.

TNF reseptör ilişkili faktör 6-B proteini, nöron gelişiminde etkili olan bir E3 ubikutin ligazdır. Bu reseptörün aktivasyonu bir çok hücrede apoptosise yol açmaktadır. Sinyal iletim mekanizmalarında etkili olan bu proteinin ifadesi de 21. gün dışında tüm zaman aralıklarında proksimal uçta distal uca göre daha fazladır.

Kalsiyum bağımlı salgılama aktivatörü 1, nörotransmitter ve nöropeptit veziküllerin ekzositozunda görevlidir ve 24. saat grubu dışındaki zaman aralıklarında distal uçtaki ifadesi proksimal uçtakinden yüksek bulunmuştur.

Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 4 proteininin ifadesi, 24. saat örnekleri dışında proksimal uçta distal uçtan daha yüksek görülmüştür. Bu protein ailesi,

doku onarımı ve hasar yanıtının oluşturulmasında görevlidir. Literatürde hasar sonrası hem distal hem de proksimal uçtaki ifadesinde artış gözlemlendiği belirtilmektedir [96, 97, 98].

Çinko parmak proteinlerinden olan Zbtb18 proteini, gelişimsel süreçlerde transkripsiyon baskılayıcı olarak bulunmaktadır ve gruplar arası ifadelerine bakıldığında, 24. saat dışındaki tüm gruplarda distal uca proksimal uca göre daha fazla ifade edildiği görülmektedir. Aynı ifade profilini gösteren Ecsit proteini Toll- benzeri ve BMP sinyal iletim yollarında görevli iken, proenkefalin proteininin ifadesi ise büyüme faktörleri ve nörotrofik faktörler tarafından düzenlenmektedir.

Transforme edici büyüme faktörü beta-1 ile indüklenen transkript 1 proteini, hücre büyümesi ve farklılaşmasının düzenleyicisi olarak birçok dokuda yer almaktadır. Periferik sinir sisteminde, Wallerian dejenerasyonu ile devam eden rejeneratif yanıtın oluşmasından sorumlu olduğu ve Wnt ve steroid sinyal yollarını düzenlediği bilinmektedir. Tez çalışması kapsamında, 0-3. saat dışındaki tüm zaman aralıklarında proksimal uca daha fazla ifade edildiği gözlemlenmiştir.

5'-nükleotidazlardan olan Sitosolik pürin 5'- nükleotidazın nörit uzamasında trofik etkisi olduğu bilinmektedir. Gruplar arası ifade düzeylerine bakıldığında, 0-3. saat dışındaki tüm zaman aralıklarında proksimal uçtaki ifadesinin distal uçtan daha yüksek olduğu görülmektedir.

Morforegülatör protein olan ve nörit uzamasında etkili paralemmin proteininin de ifadesi, 0-3. saat dışındaki zaman aralıklarında proksimal uca distal uca oranla daha yüksek bulunmuştur. Özellikle Schwann hücrelerinde ifade edildiği bilinen östrojen reseptörünün, Schwann hücrelerinde proliferasyonu artırdığı bilinmektedir. Proksimal uca, 0-3. saat örnekleri dışındaki zaman aralıklarındaki ifadesi distal uca göre daha yüksektir ve distal uca da rejenerasyon sürecinin ilerlemesiyle ifadesi giderek azalmaktadır. Kazein kinaz proteini ise, sinir büyüme faktörleri tarafından aktive edilerek akson uzamasını desteklemektedir ve hücre iskeletindeki dinamikleri de düzenleyici etkisi bulunmaktadır. Bu proteinin ifadesi 7. ve 14. günlerde proksimal uca yüksekken; diğer zaman aralıklarında distal uca yüksek bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında tanımlanan proteinlerin birbirleriyle olan ilişkilerini gösteren Cytoscape analizi sonuçları ile, özellikle hücre proliferasyonu, transkripsiyon ve

hücre iskeleti elemanlarının düzenlenmesiyle ilişkili biyolojik süreçleri yansıtan sinyal yollarına ait veriler elde edilmiştir. Bu süreçlerin, akson rejenerasyonunda gözlenen moleküler değişikliklerle de uyumlu olduğu bilinmektedir.

Sonuç olarak bu çalışma ile doğadan toplanan bir semender türünde siyatik sinir dokusunun rejenerasyon süreci ile ilgili davranışsal, elektrofizyolojik ve moleküler veriler elde edilmiş ve bu bilgiler literatüre ilk kez kazandırılmıştır. Semenderler rejenerasyon yeteneği en yüksek olan omurgalı grubudur. Bu nedenle bu gruba ait protein-protein etkileşimlerinin belirlenmesi, rol oynayan büyüme faktörlerinin tespit edilmesi ve bu faktörlerin hücre içindeki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi gibi detaylı veriler, diğer memeli grupları ve özellikle insanları kapsayan çalışmalar için bilgi sağlayacaktır. Semender türlerinde rejenerasyon başarısını artıran bir faktörün tespit edilmesi halinde, bu faktörün diğer canlılarda ve insanda oluşabilecek sinir hasarlarının tedavisine yeni bir yaklaşım getirebileceği ve ticari olarak kullanılabilir ürünlere yönelik çalışmaları destekleyeceği düşünülmektedir. Amfibi türlerinde rejenerasyon mekanizmasının incelendiği ve ilk bilgilerin değerlendirildiği çalışmalar onsekizinci yüzyıla dayanmaktadır. Bu dönemlerde çok önemli bulgulara ulaşılmasına karşın, kullanılan yöntemlerin yetersizliği nedeniyle detaylı analizler yapılamamıştır. Bu nedenle rejenerasyon sürecinin anlaşılması için yeni nesil moleküler tekniklerin ve farklı model organizmaların kullanıldığı çalışmalar önem taşımaktadır. Bu bakımdan yaptığımız tez çalışmasının sonuçları, temel bilimlere katkı sağlamanın yanı sıra, ülkemizde semender modelinin kullanılacağı deneysel çalışmalara da öncülük etmektedir. Günümüz teknolojileri ile elde edilen sonuçların, rejenerasyon sürecindeki temel mekanizmaların açıklanmasındaki öneminin yanı sıra, özellikle biyoteknoloji, tıp ve eczacılık gibi uygulamalı alanlardaki çalışmalara da ışık tutacağı düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde yapılan araştırma ile;

1. Yürüme modeli sıçana göre farklılık gösteren semender örnekleri için yürüme analizlerinde kamera kayıtlarının kullanılması uygun bulunmuş, bu semender türüne ait yürüme modelinin ve siyatik sinir iyileşme sürecinin takip edilmesi için geliştirilecek formüllerde, hem alttan alınan yürüme kayıtları ile ayak tabanı ölçümlerinin, hem de üstten yapılacak kayıtlar ile

- bacak ile vücut arasında kalan açılar değerlendirilmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. Bu doğrultuda, elde edilen verilere ek olacak yeni yürüme kayıtları ile bir formül geliştirilmesi mümkün olabilecektir.
2. BKAP ölçümlerinde, literatürle uyumlu olacak şekilde, siyatik sinir hasarı sonrasında genlik değerlerinin ve yanıt süresi uzunluğunun rejenerasyon sürecinin ilerlemesiyle birlikte arttığı gözlenmiştir. Elektrofizyolojik ölçümler için semender boyutuna uygun bir sistemin kullanılabilmesi halinde, tez çalışması kapsamındaki kayıtlarda görülen gürültü dalgalarının önlenmesi ve daha temiz kayıt alınması mümkün olacaktır.
 3. Proteomik çalışmalarda kullandığımız yöntemlerin ayırım gücüne göre kesik hasarı ile çalışmanın daha uygun olduğu tespit edilmiştir. Bu hasar tipindeyse distal ve proksimal sinir uçlarının ayrı ayrı çalışılması halinde farklı proteinlerin ifadeleri arasındaki değişimin gösterilmesinin daha güvenilir sonuçlar vereceği görülmüştür. İki boyutlu jel elektroforezi ve MALDI-TOF kütle spektrometresi ile alınan sonuçların yanı sıra, fosfoproteomik ve glikoproteomik boyamalardan elde edilecek verilerin de mekanizmanın aydınlatılmasında önemli basamaklardan birini oluşturduğu düşünülmektedir. Özellikle fosforilasyonun proteinlerin biyolojik yapısını ve aktivitesini önemli ölçüde etkilediği ve hücrel proteinlerin yaklaşık olarak üçte birinin fosforile olabildiği bilinmektedir. Bu nedenle, çalışmanın bir sonraki adımında her bir zaman aralığına ait iki boyutlu jellerin fosfoproteomik ve glikoproteomik olarak incelenmeleri ile yeni bulgular elde edileceği düşünülmektedir.
 4. Bu çalışmada kullanılan canlı materyal olan *T. karelinii* türü semenderlerin genomu henüz aydınlatılmamıştır. MALDI-TOF kütle spektrometresi ile elde edilen bazı spektrumların veri tabanlarında karşılığı bulunmadığı için protein tanımlamalarında düşük skorlu sonuçlar elde edilmiştir. Örneklerin ardışık kütle spektrometreleri ile değerlendirilmesi halinde, hasarlı ve sağlam sinir dokularına ait daha kesin veriler elde edilebilecektir.
 5. Tez çalışması kapsamında, hasar sonrası iyileşme süreci altı zaman aralığında incelenmiştir. Periferin, katenin alfa, nöritin, TNF reseptör ilişkili faktör 6-b gibi bazı proteinlerin akut dönemde ifadeleri yüksek iken, iyileşme sürecinin ilerlemesiyle birlikte ifadelerinde büyük bir azalma olduğu gözlenmiştir. Fibroblast büyüme faktörü reseptörü 4, Çinko parmak

ve BTB domain içeren protein 18, evrimsel olarak korunmuş Toll yolağı ara sinyal proteini gibi bazı proteinlerin tanımlandığı protein kümelerinin ise hasar sonrasında ifadeleri az iken, iyileşme sürecinin ilerleyen dönemlerinde ifadelerinin arttığı ve kontrol grubu değerlerine yaklaştığı görülmüştür. Bu veriler, çalışmada belirlenen zaman aralıklarının iyileşme sürecinin takip edilmesi için uygun olduğunu göstermektedir. İyileşme sürecinin daha uzun bir süre takip edilmesi halinde, tüm protein kümelerinin ifadelerinin kontrol grubu değerlerine yaklaşacağı düşünülmektedir.

6. Bu çalışmanın canlı materyali olan semender örnekleri doğadan toplandığı için mümkün olan en az sayıda hayvanın kullanılması amaçlanmıştır. Ancak çalışmada hasar sonrası daha uzun süreli gözlemler yapabilmek ve bu bilgilere destek verecek ek histolojik çalışmaların ve protein tanımlamalarını onaylamak üzere western blot çalışmalarının yapılması ile daha kapsamlı sonuçlar elde edilebilecektir.
7. Bu tez çalışması, TÜBİTAK/ KBAG 113Z124 numaralı projenin ilk aşaması olarak gerçekleştirilmiştir. Bu proje kapsamında aynı deney planı sıçanlar üzerinde de uygulanacak ve amfibi ve memeli siyatik sinirlerinin rejenerasyon sürecindeki değişimleri karşılaştırılacaktır. Bu çalışma ile semenderlerdeki rejenerasyon başarısıyla ilgili yeni bulguların elde edilmesinin yanı sıra, memelilerle semenderler arasındaki farklılıkların da tespit edilmesi hedeflenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Carlson, B., *Principles of Regenerative Biology*, Academic Press, **2007**.
- [2] Okada, T. S., A Brief History of Regeneration Research—for Admiring Professor Niazi's Discovery of the Effect of Vitamin a on Regeneration, *Journal of Biosciences*, 21, 3, 261-271, **1996**.
- [3] Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N., and Aster, J., Tissue Renewal, Regeneration and Repair, *Pathologic basis of disease*, 8. Baskı, Elsevier, Philadelphia, 79-110, **2010**.
- [4] Tsonis, P. A., Regenerative Biology: The Emerging Field of Tissue Repair and Restoration, *Differentiation*, 70, 8, 397-409, Ekim, **2002**.
- [5] Bely, A. E., Nyberg, K. G., Evolution of Animal Regeneration: Re-Emergence of a Field, *Trends Ecol Evol*, 25, 3, 161-170, Mart, **2010**.
- [6] Stoick-Cooper, C. L., Moon, R. T., Weidinger, G., Advances in Signaling in Vertebrate Regeneration as a Prelude to Regenerative Medicine, *Genes Dev*, 21, 11, 1292-1315, Haziran, **2007**.
- [7] Sperry, R. W., Optic Nerve Regeneration with Return of Vision in Anurans, *Journal of Neurophysiology*, 7, 1, 57-69, **1944**.
- [8] Demirsoy, A., *Yaşamın Temel Kuralları (Cilt I-Kısım II)*, Ankara: Meteksan, **1997**.
- [9] Okada, Y. K., Mikami, Y., Inductive Effect of Tissues Other Than Retina on the Presumptive Lens-Epithelium, *Proceedings of the Imperial Academy*, 13, 7, 283-285, **1937**.
- [10] Alvarado, A. S., Tsonis, P. A., Bridging the Regeneration Gap: Genetic Insights from Diverse Animal Models, *Nature Review Genetics*, 7, 11, 873-884, **2006**.
- [11] Smith, C. U., *Elements of Molecular Neurobiology*, 3. Baskı, John Wiley & Sons, Ltd, **2002**.
- [12] Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H., and Matsudaira, P., *Molecular Cell Biology*, 4. Baskı, W. H. Freeman and Company, **2000**.
- [13] Zochodne, D. W., *Neurobiology of Peripheral Nerve Regeneration*, Cambridge University Press, **2008**.
- [14] Brushart, T. M., *Nerve Repair*, Oxford University Press, **2011**.
- [15] Kropf, N., Krishnan, K., Chao, M., Schweitzer, M., Rosenberg, Z., Russell, S. M., Sciatic Nerve Injury Model in the Axolotl: Functional, Electrophysiological, and Radiographic Outcomes, *Journal of Neurosurgery*, 112, 4, 880-889, Nisan, **2010**.
- [16] Rodríguez, F. J., Valero-Cabré, A., Navarro, X., Regeneration and Functional Recovery Following Peripheral Nerve Injury, *Drug Discovery Today: Disease Models*, 1, 2, 177-185, **2004**.
- [17] Francis, E., *The Anatomy of the Salamander*, Ithaca, New York, Society for the Study of Amphibians and Reptiles, **2002**.

- [18] Fu, S. Y., Gordon, T., The Cellular and Molecular Basis of Peripheral Nerve Regeneration, *Molecular Neurobiology*, 14, 1-2, 67-116, Şubat-Nisan, **1997**.
- [19] Chen, Z. L., Yu, W. M., Strickland, S., Peripheral Regeneration, *Annual Review of Neuroscience*, 30, 209-233, **2007**.
- [20] Harrisingh, M. C., Perez-Nadales, E., Parkinson, D. B., Malcolm, D. S., Mudge, A. W., Lloyd, A. C., The Ras/Raf/Erk Signalling Pathway Drives Schwann Cell Dedifferentiation, *The Embo Journal*, 23, 15, 3061-3071, Ağustos 4, **2004**.
- [21] Fugleholm, K., Schmalbruch, H., Krarup, C., Early Peripheral Nerve Regeneration after Crushing, Sectioning, and Freeze Studied by Implanted Electrodes in the Cat, *The Journal of Neuroscience*, 14, 2659-2673, Mayıs, **1994**.
- [22] Sun, F., Cavalli, V., Neuroproteomics: Towards understanding neuronal regeneration and degeneration, *Molecular and Cellular Proteomics*, Aralık, **2009**.
- [23] Kiffmeyer, W. R., Tomusk, E. V., Mescher, A. L., Axonal Transport and Release of Transferrin in Nerves of Regenerating Amphibian Limbs, *Developmental Biology*, 147, 2, 392-402, Ekim, **1991**.
- [24] Chierzi, S., Ratto, G. M., Verma, P., Fawcett, J. W., The Ability of Axons to Regenerate Their Growth Cones Depends on Axonal Type and Age, and Is Regulated by Calcium, Camp and Erk, *European Journal of Neuroscience*, 21, 8, 2051-2062, Nisan, **2005**.
- [25] Hanz, S., Perlson, E., Willis, D., Zheng, J. Q., Massarwa, R., Huerta, J. J., Koltzenburg, M., Kohler, M., van-Minnen, J., Twiss, J. L., Fainzilber, M., Axoplasmic Importins Enable Retrograde Injury Signaling in Lesioned Nerve, *Neuron*, 40, 6, 1095-1104, Aralık 18, **2003**.
- [26] Abe, N., Cavalli, V., Nerve Injury Signaling, *Current Opinion in Neurobiology*, 18, 3, 276-283, Haziran, **2008**.
- [27] Piper, M., Holt, C., Rna Translation in Axons, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 20, 505-523, **2004**.
- [28] Willis, D. E., Twiss, J. L., The Evolving Roles of Axonally Synthesized Proteins in Regeneration, *Current Opinion in Neurobiology*, 16, 1, 111-118, Şubat, **2006**.
- [29] Martini, R., Expression and Functional Roles of Neural Cell Surface Molecules and Extracellular Matrix Components During Development and Regeneration of Peripheral Nerves, *Journal of neurocytology*, 23, 1, 1-28, **1994**.
- [30] Araki, T., Nagarajan, R., Milbrandt, J., Identification of Genes Induced in Peripheral Nerve after Injury. Expression Profiling and Novel Gene Discovery, *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 36, 34131-34141, Eylül 7, **2001**.
- [31] Varejao, A. S., Meek, M. F., Ferreira, A. J., Patricio, J. A., Cabrita, A. M., Functional Evaluation of Peripheral Nerve Regeneration in the Rat:

- Walking Track Analysis, *Journal of Neuroscience Methods*, 108, 1, 1-9, Temmuz 15, **2001**.
- [32] Jolicoeur, F. B., Rondeau, D. B., Hamel, E., Butterworth, R. F., Barbeau, A., Measurement of Ataxia and Related Neurological Signs in the Laboratory Rat, *Canadian Journal of Neurological Sciences*, 6, 2, 209-215, Mayıs, **1979**.
- [33] De Medinaceli, L., Freed, W. J., Wyatt, R. J., An Index of the Functional Condition of Rat Sciatic Nerve Based on Measurements Made from Walking Tracks, *Experimental Neurology*, 77, 3, 634-643, **1982**.
- [34] Bervar, M., Video Analysis of Standing--an Alternative Footprint Analysis to Assess Functional Loss Following Injury to the Rat Sciatic Nerve, *Journal of Neuroscience Methods*, 102, 2, 109-116, Ekim 30, **2000**.
- [35] Hare, G. M., Evans, P. J., Mackinnon, S. E., Best, T. J., Bain, J. R., Szalai, J. P., Hunter, D. A., Walking Track Analysis: A Long-Term Assessment of Peripheral Nerve Recovery, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 89, 2, 251-258, Şubat, **1992**.
- [36] Inserra, M. M., Bloch, D. A., Terris, D. J., Functional Indices for Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Mouse, *Microsurgery*, 18, 2, 119-124, **1998**.
- [37] Dijkstra, J. R., Meek, M. F., Robinson, P. H., Gramsbergen, A., Methods to Evaluate Functional Nerve Recovery in Adult Rats: Walking Track Analysis, Video Analysis and the Withdrawal Reflex, *Journal of Neuroscience Methods*, 96, 2, 89-96, Mart 15, **2000**.
- [38] Walker, J. L., Evans, J. M., Meade, P., Resig, P., Siskin, B. F., Gait-Stance Duration as a Measure of Injury and Recovery in the Rat Sciatic Nerve Model, *Journal of Neuroscience Methods*, 52, 1, 47-52, **1994**.
- [39] Westerga, J., Gramsbergen, A., The Development of Locomotion in the Rat, *Developmental brain research*, 57, 2, 163-174, **1990**.
- [40] Lu, A., Wisniewski, J. R., Mann, M., Comparative Proteomic Profiling of Membrane Proteins in Rat Cerebellum, Spinal Cord, and Sciatic Nerve, *Journal of Proteome Research*, 8, 5, 2418-2425, Mayıs, **2009**.
- [41] Michaelevski, I., Medzihradzky, K. F., Lynn, A., Burlingame, A. L., Fainzilber, M., Axonal Transport Proteomics Reveals Mobilization of Translation Machinery to the Lesion Site in Injured Sciatic Nerve, *Molecular and Cellular Proteomics*, 9, 5, 976-987, Mayıs, **2010**.
- [42] Goto, A., Wang, Y. L., Kabuta, T., Setsuie, R., Osaka, H., Sawa, A., Ishiura, S., Wada, K., Proteomic and Histochemical Analysis of Proteins Involved in the Dying-Back-Type of Axonal Degeneration in the Gracile Axonal Dystrophy (Gad) Mouse, *Neurochemistry International*, 54, 5-6, 330-338, Mayıs-Haziran, **2009**.
- [43] Kaltashov, I. A., Eyles, S. J., Studies of Biomolecular Conformations and Conformational Dynamics by Mass Spectrometry, *Mass Spectrometry Reviews*, 21, 1, 37-71, Ocak-Şubat, **2002**.
- [44] Aebersold, R., Mann, M., Mass Spectrometry-Based Proteomics, *Nature*, 422, 6928, 198-207, Mart 13, **2003**.

- [45] Vallee, R. B., Bloom, G. S., Mechanisms of Fast and Slow Axonal Transport, *Annual Review of Neuroscience*, 14, 1, 59-92, **1991**.
- [46] Hoffman, P. N., Lasek, R. J., Axonal Transport of the Cytoskeleton in Regenerating Motor Neurons: Constancy and Change, *Brain Research*, 202, 2, 317-333, **1980**.
- [47] Navarro, X., Vivó, M., Valero-Cabré, A., Neural Plasticity after Peripheral Nerve Injury and Regeneration, *Progress in Neurobiology*, 82, 4, 163-201, **2007**.
- [48] Ingoglia, N. A., Chakraborty, G., Yu, M., Luo, D., Liu, C., Posttranslational Modification of Nerve Proteins by Amino Acids, *Restorative Neurology and Neuroscience*, 1, 3, 245-252, Ocak 1, **1990**.
- [49] Willis, D., Li, K. W., Zheng, J. Q., Chang, J. H., Smit, A. B., Kelly, T., Merianda, T. T., Sylvester, J., van Minnen, J., Twiss, J. L., Differential Transport and Local Translation of Cytoskeletal, Injury-Response, and Neurodegeneration Protein Mrnas in Axons, *The Journal of Neuroscience*, 25, 4, 778-791, Ocak 26, **2005**.
- [50] Perlson, E., Medzihradzsky, K. F., Darula, Z., Munno, D. W., Syed, N. I., Burlingame, A. L., Fainzilber, M., Differential Proteomics Reveals Multiple Components in Retrogradely Transported Axoplasm after Nerve Injury, *Molecular and Cellular Proteomics*, 3, 5, 510-520, Mayıs, **2004**.
- [51] Abe, N., Almenar-Queralt, A., Lillo, C., Shen, Z., Lozach, J., Briggs, S. P., Williams, D. S., Goldstein, L. S., Cavalli, V., Sunday Driver Interacts with Two Distinct Classes of Axonal Organelles, *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 50, 34628-34639, Aralık 11, **2009**.
- [52] Jimenez, C. R., Stam, F. J., Li, K. W., Gouwenberg, Y., Hornshaw, M. P., De Winter, F., Verhaagen, J., Smit, A. B., Proteomics of the Injured Rat Sciatic Nerve Reveals Protein Expression Dynamics During Regeneration, *Molecular and Cellular Proteomics*, 4, 2, 120-132, Şubat, **2005**.
- [53] Qualtieri, A., Le Pera, M., Urso, E., Bono, F., Valentino, P., Scornaienchi, M. C., Quattrone, A., Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Peripheral Nerve Proteins: Optimized Sample Preparation, *Journal of Neuroscience Methods*, 159, 1, 125-133, Ocak 15, **2007**.
- [54] Golding, J. P., Tonge, D. A., Protein Synthesis and Release by Normal and Lesioned Axolotl Peripheral Nerves, *Experimental Neurology*, 134, 1, 94-101, Temmuz, **1995**.
- [55] King, M. W., Neff, A. W., Mescher, A. L., Proteomics Analysis of Regenerating Amphibian Limbs: Changes During the Onset of Regeneration, *International Journal of Development Biology*, 53, 7, 955-969, **2009**.
- [56] Carlton, J., Goldberg, N., Quantitating Integrated Muscle Function Following Reinnervation, *Surgical Forum*, 37, 611-612, **1986**.
- [57] Bain, J., Mackinnon, S., Hunter, D., Functional Evaluation of Complete Sciatic, Peroneal, and Posterior Tibial Nerve Lesions in the Rat, *Plastic and Reconstructive Surgery*, 83, 1, 129-136, **1989**.

- [58] Vleggeert-Lankamp, C. L., The Role of Evaluation Methods in the Assessment of Peripheral Nerve Regeneration through Synthetic Conduits: A Systematic Review. Laboratory Investigation, *Journal of Neurosurgery*, 107, 6, 1168-1189, Aralık, **2007**.
- [59] Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., Mass Spectrometric Sequencing of Proteins from Silver-Stained Polyacrylamide Gels, *Analytical Chemistry*, 68, 5, 850-858, **1996**.
- [60] Perlson, E., Hanz, S., Medzihradzky, K. F., Burlingame, A. L., Fainzilber, M., From Snails to Sciatic Nerve: Retrograde Injury Signaling from Axon to Soma in Lesioned Neurons, *Journal of Neurobiology*, 58, 2, 287-294, Şubat 5, **2004**.
- [61] http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=PMF, (Mart, **2015**).
- [62] Liu, H. H., Brady, S. T., Camp, Tubulin, Axonal Transport, and Regeneration, *Experimental Neurology*, 189, 2, 199-203, Ekim, **2004**.
- [63] Hammond, J. W., Cai, D., Verhey, K. J., Tubulin Modifications and Their Cellular Functions, *Current Opinion in Cell Biology*, 20, 1, 71-76, Şubat, **2008**.
- [64] Letourneau, P. C., Actin in Axons: Stable Scaffolds and Dynamic Filaments, *Results and Problems in Cell Differentiation*, 48, 65-90, **2009**.
- [65] Baas, P. W., Buster, D. W., Slow Axonal Transport and the Genesis of Neuronal Morphology, *Journal of Neurobiology*, 58, 1, 3-17, **2004**.
- [66] Ravenall, S. J., Gavazzi, I., Wood, J. N., Akopian, A. N., A Peripheral Nervous System Actin-Binding Protein Regulates Neurite Outgrowth, *European Journal of Neuroscience*, 15, 2, 281-290, Ocak, **2002**.
- [67] Nixon, R. A., Yuan, A., *Cytoskeleton of the Nervous System*, Springer, **2011**.
- [68] Ananthkrishnan, L., Szaro, B. G., Transcriptional and Translational Dynamics of Light Neurofilament Subunit Rnas During *Xenopus Laevis* Optic Nerve Regeneration, *Brain Research*, 1250, 27-40, Ocak 23, **2009**.
- [69] Byrne, J. H., Heidelberger, R., Waxham, M. N., *From Molecules to Networks: An Introduction to Cellular and Molecular Neuroscience*, Academic Press, **2014**.
- [70] Perlson, E., Hanz, S., Ben-Yaakov, K., Segal-Ruder, Y., Seger, R., Fainzilber, M., Vimentin-Dependent Spatial Translocation of an Activated Map Kinase in Injured Nerve, *Neuron*, 45, 5, 715-726, Mart 3, **2005**.
- [71] Adams, J. C., Roles of Fascin in Cell Adhesion and Motility, *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 5, 590-596, Ekim, **2004**.
- [72] Cohan, C. S., Welnhof, E. A., Zhao, L., Matsumura, F., Yamashiro, S., Role of the Actin Bundling Protein Fascin in Growth Cone Morphogenesis: Localization in Filopodia and Lamellipodia, *Cell Motility and the Cytoskeleton*, 48, 2, 109-120, Şubat, **2001**.

- [73] Zimmermann, H., Biochemistry, Localization and Functional Roles of Ecto-Nucleotidases in the Nervous System, *Progress in Neurobiology*, 49, 6, 589-618, Ağustos, **1996**.
- [74] Kreutzberg, G., Reddington, M., and Zimmermann, H., Cellular Biology of Ectoenzymes, Springer -Verlag Berlin Heidelberg, **1986**.
- [75] Zimmermann, H., Braun, N., Kegel, B., Heine, P., New Insights into Molecular Structure and Function of Ectonucleotidases in the Nervous System, *Neurochemistry International*, 32, 5-6, 421-425, Mayıs-Haziran, **1998**.
- [76] Rathbone, M. P., Middlemiss, P. J., Gysbers, J. W., Andrew, C., Herman, M. A., Reed, J. K., Ciccarelli, R., Di Iorio, P., Caciagli, F., Trophic Effects of Purines in Neurons and Glial Cells, *Progress in Neurobiology*, 59, 6, 663-690, Aralık, **1999**.
- [77] Bulat, V., Rast, M., Pielage, J., Presynaptic Ck2 Promotes Synapse Organization and Stability by Targeting Ankyrin2, *The Journal of Cell Biology*, 204, 1, 77-94, Ocak 6, **2014**.
- [78] Oinuma, I., Ito, Y., Katoh, H., Negishi, M., Semaphorin 4d/Plexin-B1 Stimulates Pten Activity through R-Ras Gtpase-Activating Protein Activity, Inducing Growth Cone Collapse in Hippocampal Neurons, *The Journal of Biological Chemistry*, 285, 36, 28200-28209, Eylül 3, **2010**.
- [79] Pinna, L. A., Casein Kinase 2: An 'Eminence Grise' in Cellular Regulation?, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1054, 3, 267-284, Eylül 24, **1990**.
- [80] Sanchez-Ponce, D., Munoz, A., Garrido, J. J., Casein Kinase 2 and Microtubules Control Axon Initial Segment Formation, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46, 1, 222-234, Ocak, **2011**.
- [81] Zhelyaznik, N., Schrage, K., McCaffery, P., Mey, J., Activation of Retinoic Acid Signalling after Sciatic Nerve Injury: Up-Regulation of Cellular Retinoid Binding Proteins, *European Journal of Neuroscience*, 18, 5, 1033-1040, Eylül, **2003**.
- [82] Maden, M., Retinoic Acid in the Development, Regeneration and Maintenance of the Nervous System, *Nature Review Neuroscience*, 8, 10, 755-765, Ekim, **2007**.
- [83] Strate, I., Min, T. H., Iliev, D., Pera, E. M., Retinol Dehydrogenase 10 Is a Feedback Regulator of Retinoic Acid Signalling During Axis Formation and Patterning of the Central Nervous System, *Development*, 136, 3, 461-472, Şubat, **2009**.
- [84] Rhinn, M., Dolle, P., Retinoic Acid Signalling During Development, *Development*, 139, 5, 843-858, Mart, **2012**.
- [85] Rishal, I., Fainzilber, M., Axon-Soma Communication in Neuronal Injury, *Nature Review Neuroscience*, 15, 1, 32-42, Ocak, **2014**.
- [86] Jung, H., Yoon, B. C., Holt, C. E., Axonal Mrna Localization and Local Protein Synthesis in Nervous System Assembly, Maintenance and Repair, *Nature Review Neuroscience*, 13, 5, 308-324, Mayıs, **2012**.

- [87] Yudin, D., Fainzilber, M., Ran on Tracks--Cytoplasmic Roles for a Nuclear Regulator, *Journal of Cell Science*, 122, 587-593, Mart 1, **2009**.
- [88] Escriva, H., Bertrand, S., Laudet, V., The Evolution of the Nuclear Receptor Superfamily, *Essays in Biochemistry*, 40, 11-26, **2004**.
- [89] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6GLR7>, (Mart, 2015).
- [90] de Wit, J., Hong, W., Luo, L., Ghosh, A., Role of Leucine-Rich Repeat Proteins in the Development and Function of Neural Circuits, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 697-729, **2011**.
- [91] Christie, K. J., Martinez, J. A., Zochodne, D. W., Disruption of E3 Ligase Nedd4 in Peripheral Neurons Interrupts Axon Outgrowth: Linkage to Pten, *Molecular and Cellular Neuroscience*, 50, 2, 179-192, Temmuz, **2012**.
- [92] Geetha, T., Kenchappa, R. S., Wooten, M. W., Carter, B. D., Traf6-Mediated Ubiquitination Regulates Nuclear Translocation of Nrif, the P75 Receptor Interactor, *The Embo Journal*, 24, 22, 3859-3868, Kasım 16, **2005**.
- [93] Takatsuna, H., Kato, H., Gohda, J., Akiyama, T., Moriya, A., Okamoto, Y., Yamagata, Y., Otsuka, M., Umezawa, K., Semba, K., Inoue, J., Identification of Tifa as an Adapter Protein That Links Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6 (Traf6) to Interleukin-1 (Il-1) Receptor-Associated Kinase-1 (Irak-1) in Il-1 Receptor Signaling, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 14, 12144-12150, Nisan 4, **2003**.
- [94] Wu, H., *Tnf Receptor Associated Factors (Trafs)*, Springer Science+Business Media, **2007**.
- [95] Ornitz, D. M., Itoh, N., Fibroblast Growth Factors, *Genome Biology*, 2, 3, 1-12, **2001**.
- [96] Grothe, C., Nikkhah, G., The Role of Basic Fibroblast Growth Factor in Peripheral Nerve Regeneration, *Anatomy and Embryology (Berl)*, 204, 3, 171-177, Eylül, **2001**.
- [97] Eswarakumar, V. P., Lax, I., Schlessinger, J., Cellular Signaling by Fibroblast Growth Factor Receptors, *Cytokine and Growth Factor Review*, 16, 2, 139-149, Nisan, **2005**.
- [98] Zhang, F., Clarke, J. D., Santos-Ruiz, L., Ferretti, P., Differential Regulation of Fibroblast Growth Factor Receptors in the Regenerating Amphibian Spinal Cord in Vivo, *Neuroscience*, 114, 4, 837-848, **2002**.
- [99] Shimada, T., Sugiura, H., Yamagata, K., Neuritin: A Therapeutic Candidate for Promoting Axonal Regeneration, *World Journal of Neurology*, 3, 4, 138-143, **2013**.
- [100] Karamoysoyli, E., Burnand, R. C., Tomlinson, D. R., Gardiner, N. J., Neuritin Mediates Nerve Growth Factor-Induced Axonal Regeneration and Is Deficient in Experimental Diabetic Neuropathy, *Diabetes*, 57, 1, 181-189, Ocak, **2008**.
- [101] Diotel, N., Vaillant, C., Gabbero, C., Mironov, S., Fostier, A., Gueguen, M. M., Anglade, I., Kah, O., Pellegrini, E., Effects of Estradiol in Adult Neurogenesis and Brain Repair in Zebrafish, *Hormones and Behavior*, 63, 2, 193-207, Şubat, **2013**.

- [102] Bhattacharjee, A., Liao, Z., Smith, P. G., Trophic Factor and Hormonal Regulation of Neurite Outgrowth in Sensory Neuron-Like 50b11 Cells, *Neurosci Letters*, 558, 120-125, Ocak 13, **2014**.
- [103] Melcangi, R. C., Cavarretta, I. T., Ballabio, M., Leonelli, E., Schenone, A., Azcoitia, I., Miguel Garcia-Segura, L., Magnaghi, V., Peripheral Nerves: A Target for the Action of Neuroactive Steroids, *Brain Research Reviews*, 48, 2, 328-338, Nisan, **2005**.
- [104] Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Alkondon, M., Rogers, S. W., Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function, *Physiological Reviews*, 89, 1, 73-120, Ocak, **2009**.
- [105] Maue, R. A., *Molecular and Cellular Insights to Ion Channel Biology*, Gulf Professional Publishing, **2004**.
- [106] Wang, D., Wang, X., Geng, S., Bi, Z., Axonal Regeneration in Early Stages of Sciatic Nerve Crush Injury Is Enhanced by Alpha7nacr in Rats, *Molecular Biology Reports*, 42, 3, 603-609, Mart, **2015**.
- [107] Tan, Y., Low, K. G., Boccia, C., Grossman, J., Comb, M. J., Fibroblast Growth Factor and Cyclic Amp (Camp) Synergistically Activate Gene Expression at a Camp Response Element, *Molecular and Cellular Biology*, 14, 11, 7546-7556, Kasım, **1994**.
- [108] Dahlberg, J. E., Lund, E., Functions of the Gtpase Ran in Rna Export from the Nucleus, *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 3, 400-408, Temmuz, **1998**.
- [109] Weis, K., Importins and Exportins: How to Get in and out of the Nucleus, *Trends in Biochemical Science*, 23, 5, 185-189, Mayıs, **1998**.
- [110] Izdebska, M., Gagat, M., Grzanka, D., Halas, M., Grzanka, A., The Role of Exportin 6 in Cytoskeletal-Mediated Cell Death and Cell Adhesion in Human Non-Small-Cell Lung Carcinoma Cells Following Doxorubicin Treatment, *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 52, 3, 195-205, **2014**.
- [111] Boguski, M. S., McCormick, F., Proteins Regulating Ras and Its Relatives, *Nature*, 366, 6456, 643-654, Aralık 16, **1993**.
- [112] Pereira-Leal, J. B., Seabra, M. C., Evolution of the Rab Family of Small Gtp-Binding Proteins, *Journal of Molecular Biology*, 313, 4, 889-901, Kasım 2, **2001**.
- [113] Thornhill, P. B., Cohn, J. B., Drury, G., Stanford, W. L., Bernstein, A., Desbarats, J., A Proteomic Screen Reveals Novel Fas Ligand Interacting Proteins within Nervous System Schwann Cells, *FEBS Letters*, 581, 23, 4455-4462, Eylül 18, **2007**.
- [114] Nakazawa, S., Gotoh, N., Matsumoto, H., Murayama, C., Suzuki, T., Yamamoto, T., Expression of Sorting Nexin 18 (Snx18) Is Dynamically Regulated in Developing Spinal Motor Neurons, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 59, 2, 202-213, Şubat, **2011**.
- [115] Zhang, J., Zhang, X., Guo, Y., Xu, L., Pei, D., Sorting Nexin 33 Induces Mammalian Cell Micronucleated Phenotype and Actin Polymerization by Interacting with Wiskott-Aldrich Syndrome Protein, *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 32, 21659-21669, Ağustos 7, **2009**.

- [116] Loyet, K. M., Kowalchuk, J. A., Chaudhary, A., Chen, J., Prestwich, G. D., Martin, T. F., Specific Binding of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate to Calcium-Dependent Activator Protein for Secretion (Caps), a Potential Phosphoinositide Effector Protein for Regulated Exocytosis, *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 14, 8337-8343, Nisan 3, **1998**.
- [117] Hirano, S., Takeichi, M., Differential Expression of Alpha N-Catenin and N-Cadherin During Early Development of Chicken Embryos, *International Journal of Development Biology*, 38, 2, 379-384, Temmuz, **1994**.
- [118] Stocker, A. M., Chenn, A., Differential Expression of Alpha-E-Catenin and Alpha-N-Catenin in the Developing Cerebral Cortex, *Brain Research*, 1073-1074, 151-158, Şubat 16, **2006**.
- [119] Gavard, J., Lambert, M., Grosheva, I., Marthiens, V., Irinopoulou, T., Riou, J. F., Bershadsky, A., Mege, R. M., Lamellipodium Extension and Cadherin Adhesion: Two Cell Responses to Cadherin Activation Relying on Distinct Signalling Pathways, *Journal of Cell Science*, 117, 257-270, Ocak 15, **2004**.
- [120] Adams, N. M., Freemont, P. S., *Advances in Nuclear Architecture*, Springer Science & Business Media, **2010**.
- [121] Tsai, R. Y., McKay, R. D., A Multistep, Gtp-Driven Mechanism Controlling the Dynamic Cycling of Nucleostemin, *The Journal of Cell Biology*, 168, 2, 179-184, Ocak 17, **2005**.
- [122] Malakootian, M., Mowla, S. J., Saberi, H., Asadi, M. H., Atlasi, Y., Shafaroudi, A. M., Differential Expression of Nucleostemin, a Stem Cell Marker, and Its Variants in Different Types of Brain Tumors, *Molecular Carcinogenesis*, 49, 9, 818-825, Eylül, **2010**.
- [123] Romanova, L., Kellner, S., Katoku-Kikyo, N., Kikyo, N., Novel Role of Nucleostemin in the Maintenance of Nucleolar Architecture and Integrity of Small Nucleolar Ribonucleoproteins and the Telomerase Complex, *The Journal of Biological Chemistry*, 284, 39, 26685-26694, Eylül 25, **2009**.
- [124] Kutzleb, C., Sanders, G., Yamamoto, R., Wang, X., Lichte, B., Petrasch-Parwez, E., Kilimann, M. W., Paralemmin, a Prenyl-Palmitoyl-Anchored Phosphoprotein Abundant in Neurons and Implicated in Plasma Membrane Dynamics and Cell Process Formation, *The Journal of Cell Biology*, 143, 3, 795-813, Kasım 2, **1998**.
- [125] Hultqvist, G., Ocampo Daza, D., Larhammar, D., Kilimann, M. W., Evolution of the Vertebrate Paralemmin Gene Family: Ancient Origin of Gene Duplicates Suggests Distinct Functions, *PLoS One*, 7, 7, **2012**.
- [126] Laity, J. H., Lee, B. M., Wright, P. E., Zinc Finger Proteins: New Insights into Structural and Functional Diversity, *Current Opinion in Structural Biology*, 11, 1, 39-46, Şubat, **2001**.
- [127] Lim, J. H., Zinc Finger and Btb Domain-Containing Protein 3 Is Essential for the Growth of Cancer Cells, *BMB Reports*, 47, 7, 405-410, Temmuz, **2014**.

- [128] Perez-Torrado, R., Yamada, D., Defossez, P. A., Born to Bind: The Btb Protein-Protein Interaction Domain, *Bioessays*, 28, 12, 1194-1202, Aralık, **2006**.
- [129] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q801P1> (Mart, **2015**).
- [130] Einheber, S., Hannocks, M. J., Metz, C. N., Rifkin, D. B., Salzer, J. L., Transforming Growth Factor-Beta 1 Regulates Axon/Schwann Cell Interactions, *The Journal of Cell Biology*, 129, 2, 443-458, Nisan, **1995**.
- [131] Birge, R. B., Wadsworth, S., Akakura, R., Abeysinghe, H., Kanojia, R., Maclelag, M., Desbarats, J., Escalante, M., Singh, K., Sundarababu, S., Parris, K., Childs, G., August, A., Siekierka, J., Weinstein, D. E., A Role for Schwann Cells in the Neuroregenerative Effects of a Non-Immunosuppressive Fk506 Derivative, Jnj460, *Neuroscience*, 124, 2, 351-366, **2004**.
- [132] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q2TCH4> (Mart, **2015**).
- [133] Hui, P., Li, N., Johnson, C., De Wever, I., Sciot, R., Manfioletti, G., Tallini, G., Hmga Proteins in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor and Synovial Sarcoma: Preferential Expression of Hmga2 in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor, *Modern Pathology*, 18, 11, 1519-1526, Kasım, **2005**.
- [134] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6AZF8> (Mart, **2015**).
- [135] Derlig, K., Ehrhardt, T., Giessler, A., Brandstatter, J. H., Enz, R., Dahlhaus, R., Simiate Is an Actin Binding Protein Involved in Filopodia Dynamics and Arborization of Neurons, *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, 99, **2014**.
- [136] Derlig, K., Giessler, A., Brandstatter, J. H., Enz, R., Dahlhaus, R., Identification and Characterisation of Simiate, a Novel Protein Linked to the Fragile X Syndrome, *PLoS One*, 8, 12, **2013**.
- [137] Nensa, F. M., Neumann, M. H., Schrotter, A., Przyborski, A., Mastalski, T., Susdalzew, S., Loobetae, C., Helling, S., El Magraoui, F., Erdmann, R., Meyer, H. E., Uszkoreit, J., Eisenacher, M., Suh, J., Guenette, S. Y., Rohner, N., Kogel, D., Theiss, C., Marcus, K., and Muller, T., Amyloid Beta A4 Precursor Protein-Binding Family B Member 1 (Fe65) Interactomics Revealed Synaptic Vesicle Glycoprotein 2a (Sv2a) and Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium Atpase 2 (Serca2) as New Binding Proteins in the Human Brain, *Molecular and Cellular Proteomics*, 13, 2, 475-488, Şubat, **2014**.
- [138] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q6DCV1> (Mart, **2015**).
- [139] Vogel, R. O., Janssen, R. J., van den Brand, M. A., Dieteren, C. E., Verkaart, S., Koopman, W. J., Willems, P. H., Pluk, W., van den Heuvel, L. P., Smeitink, J. A., Nijtmans, L. G., Cytosolic Signaling Protein Ecsit Also Localizes to Mitochondria Where It Interacts with Chaperone Ndufaf1 and Functions in Complex I Assembly, *Genes and Development*, 21, 5, 615-624, Mart 1, **2007**.
- [140] Bachiller, D., Klingensmith, J., Shneyder, N., Tran, U., Anderson, R., Rossant, J., De Robertis, E. M., The Role of Chordin/Bmp Signals in

- Mammalian Pharyngeal Development and Digeorge Syndrome, *Development*, 130, 15, 3567-3578, Augustos, **2003**.
- [141] Rao, N., Song, F., Jhamb, D., Wang, M., Milner, D. J., Price, N. M., Belecky-Adams, T. L., Palakal, M. J., Cameron, J. A., Li, B., Chen, X., Stocum, D. L., Proteomic Analysis of Fibroblastema Formation in Regenerating Hind Limbs of *Xenopus Laevis* Froglets and Comparison to Axolotl, *BMC Developmental Biology*, 14, 32, **2014**.
- [142] Andres, M. E., Burger, C., Peral-Rubio, M. J., Battaglioli, E., Anderson, M. E., Grimes, J., Dallman, J., Ballas, N., Mandel, G., Corest: A Functional Corepressor Required for Regulation of Neural-Specific Gene Expression, *PNAS*, 96, 17, 9873-9878, Aug 17, **1999**.
- [143] Ballas, N., Grunseich, C., Lu, D. D., Speh, J. C., Mandel, G., Rest and Its Corepressors Mediate Plasticity of Neuronal Gene Chromatin Throughout Neurogenesis, *Cell*, 121, 4, 645-657, Mayis 20, **2005**.
- [144] Zeng, W., Kong, Q., Li, C., Mao, B., *Xenopus Rcor2* (Rest Corepressor 2) Interacts with *Zmynd8*, Which Is Involved in Neural Differentiation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394, 4, 1024-1029, Nisan 16, **2010**.
- [145] Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., Ideker, T., Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks, *Genome Research*, 13, 11, 2498-2504, Kasım, **2003**.
- [146] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q08460> (Mayis, **2015**).
- [147] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9r269> (Mayis, **2015**).
- [148] Lawlor, M. A., Alessi, D. R., Pkb/Akt a Key Mediator of Cell Proliferation, Survival and Insulin Responses?, *Journal of Cell Science*, 114, 16, 2903-2910, **2001**.
- [149] Read, D. E., Gorman, A. M., Involvement of Akt in Neurite Outgrowth, *Cellular and molecular life sciences*, 66, 18, 2975-2984, **2009**.
- [150] <http://www.uniprot.org/uniprot/P31946>, (Mayis, **2015**).
- [151] <http://www.uniprot.org/uniprot/P06804>, (Mayis, **2015**).
- [152] <http://www.uniprot.org/uniprot/P14142>, (Mayis, **2015**).
- [153] <http://www.uniprot.org/uniprot/P63168>, (Mayis, **2015**).
- [154] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q7tmm9>, (Mayis, **2015**).
- [155] <http://www.uniprot.org/uniprot/P68369>, (Mayis, **2015**).
- [156] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q5s006>, (Mayis, **2015**).
- [157] <http://www.uniprot.org/uniprot/P06537>, (Mayis, **2015**).
- [158] Nakajima, H., Brindle, P. K., Handa, M., Ihle, J. N., Functional Interaction of Stat5 and Nuclear Receptor Co-Repressor Smrt: Implications in Negative Regulation of Stat5-Dependent Transcription, *The Embo Journal*, 20, 23, 6836-6844, **2001**.
- [159] <http://www.uniprot.org/uniprot/P60709>, (Mayis, **2015**).

- [160] <http://www.uniprot.org/uniprot/P54728>, (Mayıs, 2015).
- [161] <http://www.uniprot.org/uniprot/P61979>, (Mayıs, 2015).
- [162] <http://www.uniprot.org/uniprot/P49817>, (Mayıs, 2015).
- [163] Anastas, J. N., Moon, R. T., Wnt Signalling Pathways as Therapeutic Targets in Cancer, *Nature Reviews Cancer*, 13, 1, 11-26, 2013.
- [164] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q61767>, (Mayıs, 2015).
- [165] <http://www.uniprot.org/uniprot/P63102>, (Mayıs, 2015).
- [166] <http://www.uniprot.org/uniprot/P62259>, (Mayıs, 2015).
- [167] <http://www.uniprot.org/uniprot/P68510>, (Mayıs, 2015).
- [168] Hermeking, H., Benzinger, A., 14-3-3 Proteins in Cell Cycle Regulation, *Seminars in Cancer Biology*, 16, 3, 183-192, Haziran, 2006.
- [169] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q80z64>, (Mayıs, 2015).
- [170] <http://www.uniprot.org/uniprot/P19784>, (Mayıs, 2015).
- [171] <http://www.uniprot.org/uniprot/P49452>, (Mayıs, 2015).
- [172] <http://www.uniprot.org/uniprot/P09803>, (Mayıs, 2015).
- [173] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9cq60>, (Mayıs, 2015).
- [174] <http://www.uniprot.org/uniprot/P26232>, (Mayıs, 2015).
- [175] <http://www.uniprot.org/uniprot/H0yng8>, (Mayıs, 2015).
- [176] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q4vaa7>, (Mayıs, 2015).
- [177] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8ci11>, (Mayıs, 2015).
- [178] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q61553>, (Mayıs, 2015).
- [179] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q3v1l4>, (Mayıs, 2015).
- [180] <http://www.uniprot.org/uniprot/P37840>, (Mayıs, 2015).
- [181] <http://www.uniprot.org/uniprot/O60282>, (Mayıs, 2015).
- [182] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q01105>, (Mayıs, 2015).
- [183] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q61411>, (Mayıs, 2015).
- [184] <http://www.uniprot.org/uniprot/P32883>, (Mayıs, 2015).
- [185] Roskoski, R., Jr., Erk1/2 Map Kinases: Structure, Function, and Regulation, *Pharmacological Research*, 66, 2, 105-143, Ağustos, 2012.
- [186] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q03173>, (Mayıs, 2015).
- [187] <http://www.uniprot.org/uniprot/P70460>, (Mayıs, 2015).
- [188] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8r5a3>, (Mayıs, 2015).
- [189] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8vhw2>, (Mayıs, 2015).
- [190] <http://www.uniprot.org/uniprot/O08553>, (Mayıs, 2015).
- [191] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8r5h6>, (Mayıs, 2015).
- [192] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q62108>, (Mayıs, 2015).

- [193] <http://www.uniprot.org/uniprot/P08103>, (Mayıs, **2015**).
- [194] <http://www.uniprot.org/uniprot/P49025>, (Mayıs, **2015**).
- [195] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q62313>, (Mayıs, **2015**).
- [196] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q0vge6>, (Mayıs, **2015**).
- [197] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8k1i7>, (Mayıs, **2015**).
- [198] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q63844>, (Mayıs, **2015**).
- [199] <http://www.uniprot.org/uniprot/P15331>, (Mayıs, **2015**).
- [200] http://www.Broadinstitute.Org/Gsea/Msigdb/Geneset_Page.Jsp?Genesetname=Actin_Filament_Organization, (Mayıs, **2015**).
- [201] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q03001>, (Mayıs, **2015**).
- [202] <http://www.uniprot.org/uniprot/P39428>, (Mayıs, **2015**).
- [203] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9nyf0>, (Mayıs, **2015**).
- [204] <http://www.uniprot.org/uniprot/P05480>, (Mayıs, **2015**).
- [205] <http://www.uniprot.org/uniprot/P19785>, (Mayıs, **2015**).
- [206] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9dbd5>, (Mayıs, **2015**).
- [207] <http://www.uniprot.org/uniprot/Q9y5y9>, (Mayıs, **2015**).
- [208] Sarikcioglu, L., Demirel, B. M., Utuk, A., Walking Track Analysis: An Assessment Method for Functional Recovery after Sciatic Nerve Injury in the Rat, *Folia Morphologica*, 68, 1, 1-7, Şubat, **2009**.
- [209] Varejao, A. S., Cabrita, A. M., Patricio, J. A., Bulas-Cruz, J., Gabriel, R. C., Melo-Pinto, P., Couto, P. A., Meek, M. F., Functional Assessment of Peripheral Nerve Recovery in the Rat: Gait Kinematics, *Microsurgery*, 21, 8, 383-388, **2001**.
- [210] Chevallier, S., Jan Ijspeert, A., Ryczko, D., Nagy, F., Cabelguen, J. M., Organisation of the Spinal Central Pattern Generators for Locomotion in the Salamander: Biology and Modelling, *Brain Research Reviews*, 57, 1, 147-161, Ocak, **2008**.
- [211] Ashley-Ross, M., Hindlimb Kinematics During Terrestrial Locomotion in a Salamander (*Dicamptodon Tenebrosus*), *The Journal of Experimental Biology*, 193, 1, 255-283, Ağustos, **1994**.
- [212] Bennett, W. O., Simons, R. S., Brainerd, E. L., Twisting and Bending: The Functional Role of Salamander Lateral Hypaxial Musculature During Locomotion, *The Journal of Experimental Biology*, 204, 1979-1989, Haziran, **2001**.
- [213] Gillis, G., Anguilliform Locomotion in an Elongate Salamander (*Siren Intermedia*): Effects of Speed on Axial Undulatory Movements, *The Journal of Experimental Biology*, 200, 767-784, **1997**.
- [214] Ashley-Ross, M. A., Bechtel, B. F., Kinematics of the Transition between Aquatic and Terrestrial Locomotion in the Newt *Taricha Torosa*, *The Journal of Experimental Biology*, 207, 461-474, Ocak, **2004**.

- [215] Deban, S. M., Schilling, N., Activity of Trunk Muscles During Aquatic and Terrestrial Locomotion in *Ambystoma maculatum*, *The Journal of Experimental Biology*, 212, 18, 2949-2959, Eylül 15, **2009**.
- [216] Harischandra, N., Cabelguen, J. M., Ekeberg, O., A 3d Musculo-Mechanical Model of the Salamander for the Study of Different Gaits and Modes of Locomotion, *Frontiers in Neurobotics*, 4, 112, **2010**.
- [217] Gasparini, A. L. P., Barbieri, C. H., Mazzer, N., Correlation between Different Methods of Gait Functional Evaluation in Rats with Ischiatic Nerve Crushing Injuries, *Acta Ortopédica Brasileira*, 15, 5, 285-289, **2007**.
- [218] Mills, K. R., The Basics of Electromyography, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 76 Ek 2, ii32-35, Haziran, **2005**.
- [219] Merletti, R., Parker, P. A., *Electromyography: Physiology, Engineering, and Non-Invasive Applications*, John Wiley & Sons, **2004**.
- [220] Ignacio, R.-C., Luis, G.-U., Armando, M.-T., *Motor Unit Action Potential Duration: Measurement and Significance*, InTech, **2012**.
- [221] Kane, N. M., Oware, A., Nerve Conduction and Electromyography Studies, *Journal of Neurology*, 259, 7, 1502-1508, Temmuz, **2012**.
- [222] Raez, M. B., Hussain, M. S., Mohd-Yasin, F., Techniques of Emg Signal Analysis: Detection, Processing, Classification and Applications, *Biological Procedures Online*, 8, 11-35, **2006**.
- [223] Siriprayoonsak, S., Real-Time Measurement of Prehensile Emg Signals, San Diego State University, **2005**.
- [224] Launay, T., Cabelguen, J. M., Marini, J. F., Chanoine, C., Effects of Locomotor Training on Hindlimb Regeneration in the Urodele Amphibian *Pleurodeles Waltlii*, *The Journal of Physiology*, 535, 241-248, Ağustos 15, **2001**.
- [225] Bakhtyari, M., Abootaleb, H., Mansouri, K., Electrophysiological Study of Sciatic Nerve Regeneration through Tubes Seeded with Schwann Cells, *Basic and Clinical Neuroscience*, 1, 3, 49-56, **2010**.
- [226] Wang, Y., Wang, H., Mi, D., Gu, X., Hu, W., Periodical Assessment of Electrophysiological Recovery Following Sciatic Nerve Crush Via Surface Stimulation in Rats, *Neurological Sciences*, 36, 3, 449-456, Mart, **2015**.
- [227] Capitanio, D., Vasso, M., Fania, C., Moriggi, M., Vigano, A., Procacci, P., Magnaghi, V., Gelfi, C., Comparative Proteomic Profile of Rat Sciatic Nerve and Gastrocnemius Muscle Tissues in Ageing by 2-D Dige, *Proteomics*, 9, 7, 2004-2020, Nisan, **2009**.
- [228] Patodia, S., Raivich, G., Role of Transcription Factors in Peripheral Nerve Regeneration, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5, 8, **2012**.
- [229] Wu, D., Murashov, A. K., Molecular Mechanisms of Peripheral Nerve Regeneration: Emerging Roles of Micrnas, *Frontiers in Physiology*, 4, 55, **2013**.
- [230] Tedeschi, A., Tuning the Orchestra: Transcriptional Pathways Controlling Axon Regeneration, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4, 60, **2011**.

EKLER

EK 1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde ve Cihaz Listesi

Çizelge 4. 1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler

Kimyasalın Adı	Markası
Adrenokortikotropik Hormon	Sigma
Agar	Sigma
Akrilamit/ Bisakrilamit (%40)	Bio-Rad
Amfolitler	Fluka
Amonyum bikarbonat	Sigma
Amonyum persulfat	Bio-Rad
Anjiyotensin-1	Sigma
Asetik asit	Merck
Asetonitril	Sigma- Aldrich
Bromofenol mavisi	Bio-Rad
CHAPS	Amresco
CHCA	Sigma
Coomassie Blue	Thermo-Scientific
DTT	Fluka
Etanol	Sigma
Formik asit	Merck
Gliserol	Sigma-Aldrich
Glisin	Bio- Rad
Glu 1- fibrinopeptid B	Sigma
Hidroklorik asit	Merck
İyodoasetamit	Bio-Rad
Metanol	Sigma
Mineral yağı	Bio-Rad
MS-222	Sigma- Aldrich
Oriole	BioRad
Pro-Q Diamond	Life Technologies, Thermo- Fisher Scientific
Pro-Q Emerald 300	Life Technologies, Thermo- Fisher Scientific
Proteaz inhibitör kokteyli	Roche
Protein moleküler ağırlık belirteci	BioLabs
Renin-14	Sigma
SDS	Bio-Rad
Siğır serum albumini (BSA)	Thermo-Scientific
Substance- P	Sigma
TEMED	Bio-Rad
Tiyüre	Bio-Rad
Trifloro asetik asit	Sigma-Aldrich
Tripsin	Promega
Tris	Bio-Rad
Üre	Bio-Rad
ZipTip	Millipore

Çizelge 4. 2. Deneylerde kullanılan cihazlar ve programlar

Cihazın Adı- Modeli	Markası	Kullanım Amacı
- 20 °C derin dondurucu	Sanyo	Deneylerde kullanılacak malzeme ve örneklerin saklanması
- 80°C derin dondurucu	Sanyo	Deneylerde kullanılacak malzeme ve örneklerin saklanması
+ 4°C buzdolabı	Sanyo	Deneylerde kullanılacak malzeme ve örneklerin saklanması
BioPac MP35	BioPac Systems, Inc.	EMG kayıtlarının alınması
BioPac SS2L model elektrotlar	BioPac Systems, Inc.	EMG kayıtlarının alınması
ChemiDoc MP Sistemi jel görüntüleme sistemi	Bio-Rad	Fosfoprotein ve glikoprotein boyaması yapılan jellerin görüntülenmesi
Hassas terazi	Schimidzu	Örnek ve çözelti hazırlanması
MALDI-TOF kütle spektrometresi (Micromass M@LDI)	Waters	Protein tanımlamalarının yapılması için m/z değerlerinin elde edilmesi
Protean IEF Cell	Bio-Rad	İzoelektrik odaklama işleminin yapılması
Protean xi Cell	Bio-Rad	İkinci boyutlu jel elektroforezinde ikinci boyut ayırımının yapılması
Proteome Works Spot Cutter	Bio-Rad Laboratories	Protein kümelerinin jelden kesimi
Saf su sistemi	Millipore	Moleküler analizlerde kullanılacak ultra saf suyun eldesi
Soğutmalı santrifüj	Sigma	Örnek hazırlanması
Ultrasonik su banyosu	Elma	Örnek hazırlanması
VersaDoc 1000 jel görüntüleme sistemi	Bio-Rad	Jellerin görüntülenmesi
BioPac Pro 3.7	BioPac Systems, Inc.	EMG kayıtlarının analizi
Cytoscape 3.0.1		Protein-protein etkileşim ağlarının eldesi
Image J	Ulusal Sağlık Enstitüsü, ABD	Ayak izlerinin ölçülmesi
MASCOT		Protein tanımlamalarının yapılması
MassLynx 4.0	Waters	MALDI-TOF kütle spektrometresinden m/z değerlerinin alınması
PDQuest 8.0.1	Bio-Rad	İki boyutlu jellerin analizi
SPSS	IBM SPSS Statistics Version 20	İstatistiksel analizlerin yapılması
STRAP 1.5		Tanımlanan proteinlerin görevlerine ve hücredeki konumlarına göre sınıflandırılması

EK 2. Proteomik Çalışmalarda Kullanılan Protokoller

Siyatik sinir dokusu örneğinden protein eldesi

1. Siyatik sinir dokusu bistüri ile mümkün olduğunca küçük parçalara ayrılır.
2. Bu parçalar tüp içine alındıktan sonra üzerlerine sıvı azot eklenerek pens yardımıyla örnekler parçalanır.
3. Kullanılan siyatik sinir dokusu çok küçük olduğu için, gerekli lizis tamponu miktarı dokunun toplam ağırlığına göre hesaplanmamıştır. Bu çalışmada iki tam siyatik sinir için 50 µl olacak şekilde üreli lizis tamponu eklenen örnekler vortekslenmiştir.
 - Üreli lizis tamponu: 7 M üre, 2 M tiyoüre, % 4 CHAPS, % 1 DTT, % 2 taşıyıcı amfolitler (pH 3-10), 1 tablet proteaz inhibitor kokteyli.
4. İçlerinde doku örneği ve lizis tamponu olan tüpler, buz içinde uç sonikasyonu ile 40 amplitüt şiddetinde sonike edilir. Bu işlem yaklaşık 5 saniye aralıklarla 5 kez uygulanır.
5. Su banyolu sonikatörde 10 dakika homojenizasyona devam edilir.
6. Homojenize olmuş örnekler, 4 °C'de 20.000x g'de 45 dakika santrifüj edilir.
7. Santrifüj sonrası, süpernatant ayrı bir tüpe alınır. Semender sinir dokusu örneklerinde pellet kısmı neredeyse ayırt edilmeyecek kadar az olduğu için, aynı tüp ile çalışmaya devam edilebilir.

Bradford yöntemi ile protein miktar tayini

1. 200, 400, 600, 800 ve 1000 µg/ml'lik BSA standartları hazırlanır.
2. Protein miktar tayini yapılacak örneklerdeki protein yoğunluğuna bağlı olarak örnekler standartların aralığında olacak şekilde seyreltilir.
3. Kör (blank) kuyucuğu için 5 µl su yüklenir. BSA standartları her bir kuyucukta 5 µl olacak şekilde dört tekrarlı olarak yüklenir.
4. Protein miktar tayini yapılacak örnekten 5'er µl dört tekrarlı olarak kuyucuklara yüklenir.
5. Su, standartlar ve örneklerin üzerine 245'er µl reaktif boyası (Coomassie Blue) eklenir ve 15 dakika ışık geçirmeyen ortamda inkübe edilir.
6. Spektrofotometrede 595 nm'de ölçüm yapılır.

İki boyutlu poliakrilamit jel elektroforezi (2D-PAGE)

Rehidrasyon

1. Protein miktar tayini sonuçlarına göre, kullanılacak IPG şerit jel için gerekli olan rehidrasyon tamponu ve örnek hacimleri hesaplanır ve örnekler rehidrasyon tamponu ile karıştırılır.
 - Rehidrasyon tamponu: 7 M üre, 2 M tiyoüre, %4 CHAPS (w/v), %1 amfolit (pH: 3–10), 10 mM DTT, pipet ucuyla az miktarda bromofenol mavisi.
2. Aktif rehidrasyon için kullanılan elektrotlu IEF tepsisine örnek ve rehidrasyon karışımı yüklenir ve üzerlerine IPG şeritler (7 cm, pH 3-10) jel yüzü aşağıya bakacak şekilde yerleştirilir.
3. On beş dakika beklendikten sonra, şeritlerin üzeri mineral yağı ile kaplanarak, IEF cihazında 50 V'da 16 saat aktif rehidrasyon yapılır.

İzoelektrik Odaklama (1. Boyut Ayrımı)

1. Temiz bir IEF tepsisinde elektrotların üzerine ultra saf su ile ıslatılan elektrot kağıtları konulduktan sonra rehidrasyonu tamamlanan şeritler jel yüzü aşağı bakacak şekilde yerleştirilir. Şeritlerin üstündeki pozitif uç tepsideki pozitif uca denk gelecek şekilde yerleştirilmelidir.
2. Her bir şeridin üzeri mineral yağı ile kaplandıktan sonra tepsi IEF cihazına yerleştirilir. 15 dakika 250 V, 3 saat 10 kV, toplamda 60 kV/sa değerine ulaşana kadar 10 kV yürütülür.

Dengeleme (2. Boyut Ayrımına Hazırlık)

1. IEF'i tamamlanan jeller, temiz bir tepsiye jel yüzü yukarı bakacak şekilde yerleştirilir.
2. Üzerine dengeleme 1 tamponu eklenen örnekler, 15 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edilir.
 - Dengeleme (equilibration) 1 tamponu: 6 M üre, 0.375 M Tris-HCl, %2 SDS, %20 gliserol ve % 2 DTT
3. Dengeleme 1 tamponu uzaklaştırıldıktan sonra, şeritlerin üzerine dengeleme 2 tamponu eklenir ve 15 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edildikten sonra tampon uzaklaştırılır.
 - Dengeleme (equilibration) 2 tamponu: 6 M üre, 0.375 M Tris-HCl, %2 SDS, %20 gliserol ve % 2.5 iyodoasetamit

2D-PAGE (2. Boyut Ayrım)

1. % 12'lik ayırma ve % 4'lük yığıma jeli hazırlanır. IPG şeritlerin yüklenmesine uygun olacak düz taraklar yerleştirilir. Jeller polimerize olduktan sonra tarak çıkarılır.
 - % 12'lik ayırma jeli: 3.5 ml 1,5M Tris-HCl pH 8.8, 4.2 ml akrilamit-bisakrilamit %40, 140 µl %10 SDS, 6.083 ml ultra saf su, 70µl %10 amonyum persulfat, 7 µl TEMED.
 - % 4'lük yığıma jeli: 1.25 ml 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 500 µl akrilamit-bisakrilamit %40, 50 µl %10 SDS, 3.17 ml ultra saf su, 25 µl %10 amonyum persulfat, 5 µl TEMED.
2. Jelin sol tarafında tarak ile hazırlanmış olan boşluğa 5 µl moleküler ağırlık markeri (BioLabs 7703S, New England Biolabs Inc., USA) yüklenir.
3. 1 X yürütme tamponunda hazırlanan % 0.5'lik agar çözeltisi ısıtıldıktan sonra tarağın çıkarıldığı boşluğa dökülür ve hızlıca şeritler bu boşluğa yerleştirilir.
4. Elektroforez tankları 1X yürütme tamponu ile doldurulduktan sonra, jeller 15 dakika 100 V'da, sonrasında ise izleme boyası olarak kullanılan Bromofenol mavisi jelin alt yüzüne ulaşana kadar 140 V'da yürütülür.
 - 10X SDS yürütme tamponu: 30.3 g tris, 144 g glisin, 10 g SDS, ultra saf su ile 1 litre içerisinde hazırlanır.

Protein kümelerinin jelden kesimi

1. Kesilen jel parçalarının içine atılacağı V-tabanlı 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 200 µl ultra saf su koyulur.
2. Protein kümelerinin kesileceği jel, Proteome Works Spot Cutter cihazına yerleştirilir ve görüntüsü alınır.
3. Bilgisayar ekranında görülen jel fotoğrafı üzerinden kesilmek istenen protein kümeleri seçilir.
4. Cihaz seçilen protein kümelerini jelden keserek, V-tabanlı 96 kuyucuklu plakada istenilen kuyucuğa bırakır.

Tripsin enzimi ile jelden kesilen proteinlerin jel içinde sindirimi

1. Tripsinizasyon aşamasında kullanılacak çözeltiler aşağıda listelenmiştir:
 - 100 mM amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3)
 - 50 mM NH_4HCO_3
 - % 100 asetonitril (ACN)

- 10 mM DTT (50 mM NH_4HCO_3 içerisinde)
 - 55 mM iyodoasetamit (50 mM NH_4HCO_3 içerisinde)
 - Ekstraksiyon tamponu: Ultra saf su içinde % 1 formik asit, % 2 ACN
 - Dizileme kalitesinde tripsin (5 ng/ μl)
2. Tripsinizasyon yapılacak örneklerin bulunduğu her bir kuyucuğa % 50 100mM NH_4HCO_3 , % 50 ACN içeren yıkama solusyonundan 200 μl ilave edilir. 1-2 dakika vortekslendikten sonra 5 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübe edilir.
 3. Solüsyon pipetle çekildikten sonra, ikinci madde tekrar edilir.
 4. 200 μl ACN tüm kuyucuklara ilave edilir. 1-2 dakika vortekslendikten sonra 5 dakika çalkalayıcı üzerinde inkübe edilir. ACN pipetle geri çekilir ve kalan ACN'nin uçurulması için 5 dakika 37°C'lik etüvde bekletilir.
 5. 50 mM NH_4HCO_3 ile hazırlanan 10 mM DTT çözeltisinden 100 μl kuyucuklara eklenir. 1- 2 dakika vortekslendikten sonra 30 dakika 37° C'de inkübe edilir. Solüsyon geri çekilir.
 6. 50 mM NH_4HCO_3 ile hazırlanan 55 mM iyodoasetamit çözeltisinden 100 μl kuyucuklara eklenir. 1- 2 dakika vortekslendikten sonra karanlıkta 30 dakika 37° C'de inkübe edilir. Solüsyon geri çekilir.
 7. İkinci madde tekrarlanır.
 8. Dördüncü madde tekrarlanır.
 9. On beş dakika oda sıcaklığında bekletilir.
 10. 5 ng/ μl tripsin 50 mM NH_4HCO_3 çözeltisi içinde hazırlanır.
 11. Her kuyucuğa 30 μl dilue tripsin eklenir.
 12. Bir saat oda sıcaklığında bekletilir. Jel parçalarının tripsin solüsyonunu emerek şişmesi gerekmektedir. Süre yeterli gelmezse, + 4°C'de 1 saat daha inkübasyona devam edilebilir.
 13. Bu süre sonunda kuyucuklarda tripsin çözeltisi kaldıysa, pipetle geri çekilir. Üzerine jelleri kaplayacak kadar (30- 50 μl) 50 mM NH_4HCO_3 solüsyonu eklenir.
 14. Plakanın üzeri kapatılarak 37°C'de gece boyu inkübe edilir.
 15. Süre sonunda plaka 15 dakika çalkalayıcıda soğumaya bırakılır.
 16. Plaka 1-2 dakika vortekslenir ve kuyucuklara 30 μl taze hazırlanmış ekstraksiyon tamponu eklenir, üstü kapatılarak 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde inkübe edilir.

17. Plaka 1- 2 dakika vortekslendikten sonra sıvı faz etiketlenmiş LoBind tüplere alınır.
18. 12 µl ekstraksiyon tamponu ve 12 µl ACN her bir kuyucuğa tekrar eklenir ve 30 dakika oda sıcaklığında çalkalayıcı üstünde inkübe edilir.
19. Plaka 1- 2 dakika vortekslendikten sonra sıvı faz etiketlenmiş LoBind tüplerin üzerine eklenir.
20. On sekiz ve 19. maddeler tekrarlanır.
21. Tüm işlemler sonunda Vacuum Speed Santrifüj ile LoBind tüplerin içindeki hacim 20 µl'nin altına indirilir.

ZipTip C₁₈ Pipet Uçları ile Örneklerin Saflaştırılması

1. Tripsinizasyon aşamasından sonra örnekleri konsantre etmek ve tuz, deterjan gibi kalıntıları uzaklaştırarak MALDI-TOF analizlerine geçmeden önce örnekleri safılaştırmak için Millipore Ziptip C₁₈ pipet uçları (Millipore) üretici firmanın önerdiği protokole göre kullanılmıştır.
2. ZipTip C₁₈ pipet ucu takıldıktan sonra, 10 µl ACN çekilir, bırakılır. Bu işlem iki kez tekrar edilir.
3. 10 µl yıkama solüsyonu çekilir, bırakılır. Bu işlem iki kez tekrar edilir.
 - Yıkama Solüsyonu: Ultra saf su içinde % 0.1 TFA ve % 5 metanol ile hazırlanır.
4. Tripsinizasyonu tamamlanmış ve LoBind tüplere alınmış olan peptit karışımı ZipTip pipet ucuyla 10 kez çekip bırakılır.
5. Üçüncü madde tekrarlanır.
6. İçinde 3-4 µl elüsyon solüsyonu bulunan yeni bir LoBind tüp hazırlanır. Örneklerle muamele edilip yıkanmış olan ZipTip ucu ile bu solüsyon üç kez çekilip bırakılır.
 - Elüsyon Solüsyonu: 1 birim örnek solventi (% 50 ACN, % 0.1 TFA) ve 1 birim matriksli solüsyon (% 75 ACN, % 0.1 TFA içinde çözülmüş CHCA (α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid))'den oluşur.
7. Ziptip ile muamele edilmiş peptit karışımını içeren bu solüsyondan 1.5 µl alınır ve MALDI-TOF plakasına yüklenir.

MALDI-TOF KütLe Spektrometresi ile Ölçüm Yapma

1. ZipTip pipet uçlarıyla saflaştırılan ve matris ile karıştırılan örneklerden 1.5 µl MALDI-TOF plakasına yüklenir.
2. Kalibrasyonda kullanılacak olan beş peptit karışımını oluşturan, adrenokortikotropik hormon (ACTH), (Glu1)-fibrinopeptit B (Glu-Fib), substance P, renin-14 ve angiotensin 1 peptitleri son yoğunlukları 10-40 pmol/µl olacak şekilde stok çözeltilerden örnek çözücü tamponuyla (% 50 ACN, % 50 ultra saf su, % 0.1 TFA) seyreltilir ve kuyucuklara 1.5 µl yüklenir.
3. Tüm örnekler yüklendikten sonra, MALDI-TOF plakası laminar kabin altında kurumaya bırakılır. Kuruyan plaka, cihaza yerleştirilir, çalışmadan önce vakumun düşmesi beklenir ve sonrasında voltaj değerleri ayarlanır.
4. MALDI-TOF kütle spektrometresinin kalibrasyonu için, öncelikle moleküler ağırlıkları bilinen beş peptit karışımı okutularak, ölçümün doğruluğu kontrol edilir.
5. Kalibrasyon yapıldıktan sonra örneklerin okunması gerçekleştirilir. Elde edilen spektrumlardaki kütle/ yük oranları MASCOT sunucusundaki peptit kütle parmak izi yöntemi ile değerlendirilir.

EK 3. Şekil 3. 37’de gösterilen protein- protein etkileşim ağlarında yer alan protein kod ve adları

Çizelge 4. 3. Şekil 3.37 (a) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
Kcnma1	Calcium- activated potassium channel subunit alpha-1
Ppl	Periplakin
Ywhab	14-3-3- protein beta/ alpha
Vim	Vimentin
Tnf	Tumor necrosis factor
Slc2a4	Solute carrier family 2 facilitated glucose transporter member 4
Dynll1	Dynein light chain 1, cytoplasmic
Tubb2a	Tubulin beta 2A chain
LRRK2	Leucine-rich repeat serine/ threonine protein kinase 2
Tuba1a	Tubulin alpha 1A chain
Nr3c1	Nuclear receptor subfamily 3 group C member 1
Actb	Actin, cytoplasmic
Rad23b	UV excision repair protein RAD23 homolog B
Hnrnpk	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K
Cav1	Caveolin 1
CHEBI 63867	N-(hexanoyl)sphing-4-enine
CHEBI 59639	5-(6-aminohexanamido)isatin
CHEBI 64404	8-(6-aminohexylamino)-2'-O-methyl 3',5'-cyclic AMP
CHEBI 64394	2-(6-aminohexylamino) 3',5'-cyclic AMP
CHEBI 64403	8-(6-aminohexylamino) 3',5'-cyclic AMP
EBI 2257696	(E)-3-(5-chloro-2-methyl anilino)-1-(2,4-dichlorophenyl)prop-2-en-1-one

Çizelge 4. 4. Şekil 3.37 (b) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
Hsd3b4	3 beta hydroxysteroid dehydrogenase type 4
Ywhaz	14-3-3 protein zeta/ delta
Nanog	Homeobox protein NANOG
Csnk2a1	Casein kinase 2 subunit α
Cenpc	Centromere protein C
Cdh1	Cadherin 1
Pgls	6- phosphogluconolactonase
Ctnna2	Catenin α -2
Ywhae	14-3-3 protein epsilon
Hmg20a	High mobility group 20A protein
Snx33	Sorting nexin 33
Gnl3	Guanine nucleotide binding protein like 3
Fscn1	Fascin
Nt5c2	Cytosolic purine 5'-nucleotidase
Ywhah	14-3-3 protein eta

Çizelge 4. 5. Şekil 3.37 (c) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
SNCA	Alpha-synuclein
Ctnna2	Catenin alpha 2
Ywhab	14-3-3 protein β/ α
Kif5c	Kinesin heavy chain isoform 5c
Csnk2a1	Casein kinase 2 subunit α
Set	Protein Set

Çizelge 4. 6. Şekil 3.37 (d) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
Hras	GTPase HRas
Enah	Protein enabled homolog
Apbb1ip	Amyloid beta A4 precursor protein-binding family B member 1-interacting protein
Kras	GTPase KRas
Vasp	Vasodilator-stimulated phosphoprotein

Çizelge 4. 7. Şekil 3.37 (e) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
Cacng8	Voltage dependent calcium channel gamma 8 subunit
Tuba1a	Tubulin alpha-1A chain
DPYSL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2
Wasf1	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 1
Dlg4	Disks large homolog 4
Actb	Actin, cytoplasmic
HCK	Tyrosine protein kinase HCK
Cit	Citron Rho-interacting kinase
Ttgn1	Trans-Golgi network integral membrane protein 1
Klhl17	Kelch-like protein 17
Wipf1	WAS/WASL-interacting protein family member 1

Çizelge 4. 8. Şekil 3.37 (f) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
Tubb2a	Tubulin beta-2A chain
Mapk3	Mitogen activated protein kinase 3
Prph	Peripherin

Çizelge 4. 9. Şekil 3.37 (g) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
Dlg4	Disks large homology 4
Fscn1	Fascin

Çizelge 4. 10. Şekil 3.37 (h) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
Dst	Dystonin
Prph	Peripherin

Çizelge 4. 11. Şekil 3.37 (i) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
Traf1	TNF receptor- associated factor 1
Hmg20a	High mobility group protein 20A

Çizelge 4. 12. Şekil 3.37 (j) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
Dact1	Dapper homolog 1
Csnk2a1	Casein kinase 2 subunit α

Çizelge 4. 13. Şekil 3.37 (k) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
Src	Neuronal proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src
Esr1	Estrogen receptor
Pelp1	Proline-, glutamic acid- and leucine-rich protein 1

Çizelge 4. 14. Şekil 3.37 (l) grafiğindeki protein kod ve adları

Protein Kodu	Protein Adı
Actb	Actin, cytoplasmic
Scn10a	Sodium channel protein type 10 subunit α
Tuba1a	Tubulin α -1a chain

EK 4. Tanımlanan proteinlerin STRAP 1.5 programı ile sınıflandırılması

Çizelge 4. 15. Tanımlanan proteinlerin biyolojik fonksiyonlarına göre dağılımları

UniProt Numarası	Hücreyel Süreçler	Gelişimsel Süreçler	Biyolojik Fonksiyonlarına Göre			Düzenleme	Diğer
			Hücre ve organizmalarla İletişim	Lokalizasyon	Metabolik Süreçler		
TBA_XENLA	Δ						Δ
TBB2_XENLA	Δ						Δ
ACTB_XENLA							
PERI_XENLA							
FXL15_XENLA	Δ	Δ				Δ	
RAGP1_XENLA						Δ	
XPO7B_XENLA				Δ			
CTNA2_XENLA		Δ	Δ			Δ	Δ
EPHB3_XENLA	Δ		Δ			Δ	Δ
RAB19_XENLA				Δ		Δ	
FGFR4_XENLA						Δ	
TRF6B_XENLA	Δ	Δ	Δ			Δ	
CAPS1_XENLA	Δ			Δ			
ZBT18_XENLA	Δ					Δ	
AB1IP_XENLA						Δ	
PENKA_XENLA						Δ	
TGFI1_XENLA	Δ					Δ	
RD10A_XENLA							
HM20A_XENLA	Δ					Δ	
SNX33_XENLA	Δ			Δ			Δ
NRN1B_XENLA		Δ					
VIM1_XENLA							
F206A_XENLA							
ACHAA_XENLA							
GNL3_XENLA						Δ	
CSK21_XENLA						Δ	
PALM3_XENLA	Δ	Δ					
ESR1_XENLA	Δ						
ECSIT_XENLA					Δ	Δ	Δ
RCOR2_XENLA						Δ	
5NTC_XENLA	Δ						
CHRD_XENLA		Δ					
FASC_XENLA							Δ
TM129_XENLA	Δ						

Çizelge 4. 16. Tanımlanan proteinlerin hücresel konumlarına göre dağılımları

UniProt Numarası	Endozom	Endoplazmik Retikulum	Mitokondri	Çekirdek	Hücresel Konumlarına Göre							
					Hücre İskeleti	Plazma Zarı	Ekstraselüler	Diğer hücre içi organeller	Makromolekül Kompleksleri	Sitoplazma	Diğer	
TBA_XENLA					0						0	
TBB2_XENLA					0						0	
ACTB_XENLA					0						0	
PERL_XENLA					0							
FXL15_XENLA									0		0	
RAGP1_XENLA											0	
XPO7B_XENLA				0							0	
CTNA2_XENLA					0	0					0	0
EPHB3_XENLA						0						0
RAB19_XENLA						0						
FGFR4_XENLA	0	0				0						0
TRF6B_XENLA											0	
CAPS1_XENLA								0				0
ZBT18_XENLA				0								
AB11P_XENLA					0	0					0	
PENKA_XENLA							0					
TGFI1_XENLA				0	0						0	0
RD10A_XENLA		0										0
HM20A_XENLA				0								
SNX33_XENLA								0			0	0
NRN1B_XENLA						0						0
VIM1_XENLA					0							
F206A_XENLA				0								
ACHAA_XENLA						0						0
GNL3_XENLA				0								
CSK21_XENLA												
PALM3_XENLA				0		0					0	
ESR1_XENLA				0								
ECSIT_XENLA			0	0							0	
RCOR2_XENLA				0								
SNTC_XENLA											0	
CHRD_XENLA							0					
FASC_XENLA					0						0	
TM129_XENLA		0										0

Çizelge 4. 17. Tanımlanan proteinlerin moleküler fonksiyonlarına göre dağılımları

UniProt Numarası	Bağlama	Moleküler Fonksiyonlarına Göre				Diğer
		Katalitik Aktivite	Enzim Düzenleyici Aktivite	Moleküler Transdüser Aktivite	Yapısal Molekül Aktivitesi	
TBA_XENLA	♦	♦			♦	
TBB2_XENLA	♦	♦			♦	
ACTB_XENLA	♦					
PERI_XENLA					♦	
FXL15_XENLA						
RAGP1_XENLA			♦			
XPO7B_XENLA						
CTNA2_XENLA					♦	
EPHB3_XENLA	♦	♦				
RAB19_XENLA	♦					
FGFR4_XENLA	♦	♦				
TRF6B_XENLA	♦	♦		♦		
CAPS1_XENLA	♦					
ZBT18_XENLA	♦					
AB11P_XENLA						
PENKA_XENLA						
TGF11_XENLA	♦					
RD10A_XENLA		♦				
HM20A_XENLA	♦					
SNX33_XENLA	♦					
NRN1B_XENLA						
VIM1_XENLA					♦	
F206A_XENLA						
ACHAA_XENLA						♦
GNL3_XENLA	♦					
CSK21_XENLA	♦	♦				
PALM3_XENLA	♦					
ESR1_XENLA	♦			♦		♦
ECSIT_XENLA		♦				
RCOR2_XENLA	♦					♦
5NTC_XENLA	♦	♦				
CHRD_XENLA	♦					
FASC_XENLA	♦					
TM129_XENLA	♦	♦				

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Seçil KARAHİSAR TURAN

Doğum Yeri: Ankara

Medeni Hali: Evli

E-posta: secilk@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Beytepe/ ANKARA

Eğitim

Lise: 1998-2001 Yıldırım Beyazıt Anadolu Lisesi

Lisans: 2001-2005 Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans: 2005-2008 Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Doktora: 2008-2015 Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce- İyi

İş Deneyimi

2007- Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Deneyim Alanları

Semender biyolojisi, sinir doku rejenerasyonu

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçeleri

TÜBİTAK/ KBAG 113Z124 numaralı proje "Amfibi ve Memeli Örneklerinde Çeşitli Siyatik Sinir Hasarları Sonrası Rejenerasyonda Protein Cevapları ve Davranışsal, Elektrofizyolojik İncelemeler"- Bütçe: 309.136,00 –TL

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

Karahisar, S., Peker, S., Demirsoy, A., Demiralp, D., "A Preliminary Study of Differently Damaged Sciatic Nerve Tissues of a Newt, *Triturus karelinii*, By Bottom-Up Proteomic Strategies", 20th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques, 6-9 Ekim 2013, Puerto de la Cruz, Tenerife, Kanarya Adaları, poster sunumu