

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS)

**FARE EMBRİYOLARINDA GONADAL GELİŞİM
ÜZERİNE RETİNOİK ASİTİN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

TÜRKAN SARIOĞLU

**DANIŞMAN
PROF. DR. LEYLA TAPUL**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2009

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

10 / 11 / 2009



Prof. Dr. Tamer DEMİRALP
Enstitü Müdürü (Vekil)

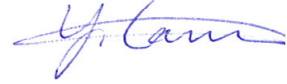
Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Histoloji ve Embriyoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Türkan SARIOĞLU
Tez Başlığı : Fare Embriyolarında Gonadal Gelişimi Üzerine Retinoik Asitin Etkilerinin Araştırılması
Sınav Yeri : İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
Sınav Tarihi : 02 / 11 / 2009

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. Prof. Dr. Leyla TAPUL (Danışman) - İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
2. Prof. Dr. Yurdagül CANBERK - İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
3. Prof. Dr. Suzan DAĞLIOĞLU - İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
4. Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU - İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
5. Doç. Dr. Meral KOYUTÜRK - İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve
Anabilim Dalı











BEYAN

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

Türkan SARIOĞLU



İTHAF

*Bu eğitimime başlarken kaybettiğim anneannem Fatma OVA'ya ve bitirken hayata
merhaba diyen yeğenim Elif Mercan YAZICI'ya ithaf ediyorum*

TEŞEKKÜR

Derslerimden tez konumun seçilmesinde kadar benimle ilk günden itibaren çok ilgilenen, bana yol gösteren, değerli bilgilerini benimle paylaşan, desteğini hiç esirgemeyen, sayın hocam Prof. Dr. Leyla TAPUL'a,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca yardımlarını gördüğüm İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof Dr. Yurdagül CANBERK ve değerli öğretim üyeleri Prof Dr Ayhan BİLİR, Prof Dr. Seyhun SOLAKOĞLU ve Doç Dr. Bülent AHISHALI'na,

Laboratuar çalışmalarım esnasında birlikte çalıştığımız Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı elemanları; Arş. Gör. Tuğba KOTİL, Bio. Funda ONAR, Bio. Ebru KARABULUT, Bio. Fadime AKTAR, Lab. Tek. Selahattin ÜNAL, Lab. Tek. Füsün ÖNCÜ ve Lab. Tek. Sibel DOĞAN, Patoloji Anabilim Dalı 7 no'lu Laboratuvarı Lab. Tek Fatma Ay ve Cengiz Artuk'a,

Bu eğitime birlikte başladığım meslektaşlarım Bio. Mine GÜLTOMRUK ve Bio. Nilay ŞAHİNARSLAN'a,

10 yılı aşkın çalışmakta olduğum İstanbul Bilim Üniversitesinin, Tıp Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Hakan BERKKAN, Temel Tıp Bilimleri Bölümü Başkanı Prof. Dr Diler ÇOŞKUN, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç Dr Meral KOYUTÜRK ve tüm çalışma arkadaşlarıma destekleri için,

Tanıştığımız günden beri her türlü desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Yard. Doç. Suzan BOZKURT ve Yard. Doç. Şukran Nazlı İZGÜ'ye,

Hayatım boyunca benden maddi manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, her koşulda benim yanımda olan, bana güç ve moral veren, umutsuz anlarımda umudum olan çok sevdiği ailemin her bir bireyine tek tek,

teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2394

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	X
ÖZET	XI
ABSTRACT.....	XII
RESUME	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Primordial germ hücreleri	3
2.1.1. Primordial germ hücrelerin göçü	4
2.2. Retinoik asit	6
2.2.1. Metabolizması.....	6
2.2.2. İsoetretinoin	7
2.3. Alkalen Fosfataz	8
2.4. c-kit	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	11
3.1. Hayvan Deneyi Uygulaması	11
3.2 Işık Mikroskopu Takibi.....	11
3.2. Histokimyasal boyamalar.....	12
3.2.1. Hematoksilen & Eozin	12
3.2.2. Alkalen fosfataz boyama.....	12
3.3. İmmünohistokimya uygulaması.....	13
3.4. İstatistiksel İnceleme.....	14
4. BULGULAR.....	15
4.1. Mikroskop Değerlendirmeleri:.....	15
5. TARTIŞMA	24

KAYNAKLAR	28
ETİK KURUL KARARI	32
ÖZGEÇMİŞ	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 6,5 günlük embriyo. (DH: desidual hücreler; TDH: trofoblastik dev hücreler; VK: vitellus kesesi; EXE: ekstraembriyonik ektoderm; M: mesoderm; EE: embriyonik ektoderm).....	4
Şekil 2-2 8,5 günlük embriyo. (S: somit; K: kalp tomurcuğu; B: Baş bölgesi).....	5
Şekil 2-3 isotretinoin formülü.....	7
Şekil 2-4 c-kit, Tip III tirozin kinaz protein reseptörü (3).....	9
Şekil 4-1. Kontrol grubu. DH: Desidual hücreler; TDH: Trofoblastik dev hücreler; VK: Vitellus kesesi; NE: Nöroektoderm; EN: Endodermal hücreleri; A: Allantois. Hematoksilen&Eozin boyası (x4).....	15
Şekil 4-2 Kontrol grubu. Primordial germ hücrelerinin (oklar) işaretlenmesi. Alkalen Fosfataz (x4).	16
Şekil 4-3 Kontrol grubu. Şekil 4-2'nin büyük büyütmesi. Primordial germ hücrelerinin (oklar) sitoplazmalarında alkalen fosfataz reaksiyonu. Alkalen Fosfataz (x40).	16
Şekil 4-4 Kontrol grubu. Primordial germ hücrelerinin c-kit (+) immünreaksiyonu (oklar) genel görünümü (x10).....	17
Şekil 4-5 Şekil 4-4'ün büyük büyütmesi: membranda daha yoğun olmak üzere c-kit (+) immünreaksiyonu (oklar) (x40).	17
Şekil 4-6 Deney grubu. TDH: Trofoblastik dev hücreler; EN: Embriyoya ait endodermal hücreler; A: Allantois. Hematoksilen&Eozin (x10).	18
Şekil 4-7 Deney grubu. Embriyoda alkalen fosfataz aktivitesini gösteren primordial germ hücreleri (oklar). TDH: Trofoblastik dev hücreler; A: Allantois. Alkalen Fosfataz (x10).....	19
Şekil 4-8 Deney grubu. Şekil 4-5 in büyütülmüş ışık mikroskopi resmi. Alkalen fosfataz reaksiyonu pozitif primordial germ hücreleri (oklar). Alkalen Fosfataz (x40). 19	
Şekil 4-9 Deney grubu. TDH: Trofoblastik dev hücreler; NE: Nöroektoderm hücreleri; VK: Vitellus kesesi. Hematoksilen&Eozin (x4).....	20
Şekil 4-10 Deney grubu. Alkalen fosfataz aktivitesini gösteren primordial germ hücreleri (oklar). Alkalen Fosfataz (x4).	21
Şekil 4-11 Deney grubu. Şekil 4-10'nun büyütülmüş ışık mikroskopi resmi. Alkalen fosfataz reaksiyonu pozitif primordial germ hücreleri (oklar). Alkalen Fosfataz (x10)..	21

Şekil 4-12 Primordial germ hücrelerinin c-kit (+) immunreaksiyonu (oklar) genel görünüm (x10).	22
Şekil 4-13 Şekil 4-12 büyütülmüş mikroskopik resmi. c-kit reaksiyonu (+) primordial germ hücreleri (oklar) (x40)	22
Şekil 4-14 Kontrol ve deney grubu primordial germ hücrelerinin c-kit ile işaretlenmelerinin karşılaştırılmasının grafik ile gösterimi.	23

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AMP: Adenozin monofosfat

BMP 4: Kemik morfogenez protein 4

CRBP: (Cellular Retinol Binding protein) hücresel retinol bağlayıcı protein

CRABP: (Cellular Retinoid Acid-Binding Protein) hücresel retinoid asit bağlayıcı protein

E1A: Alkalen fosfataz ekspresyonunu sağlayan promotor

H&E: Hematoksilen&Eozin

I.M.: Işık mikroskopisi

IUB: Uluslararası Biyokimya Birliği

PBS: Fosfat tamponu

SCF: (Stem Cell Factor) kök hücre faktörü

TGF β : Transforme edici büyüme faktörü

TNAP: Dokuya özgü olmayan alkalen fosfataz

ÖZET

Sarioğlu T. Fare Embriyolarında Gonadal Gelişim Üzerine Retinoik Asitin Etkilerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2009.

Fare embriyolarında, primordial germ hücreleri, embriyonik gelişiminin 6,5 gününde proksimal epiblastta oluşmaya başlar, 7,5. günden itibaren gonadlara doğru göç ederek yaklaşık 10,5- 11,5 günleri arasında gonadlara girerler. Retinoik asit, embriyonal gelişimde hücresel gelişimin düzenlenmesi ve farklılaşmada önemli rol oynar. Tirozin kinaz reseptörü olan c-kit ise embriyonik gelişim esnasında gametogenez, hematogenez, mast hücresi gelişimi ve işlevi ile melanogenez gibi olaylarda önemlidir.

Bu çalışmada fare primordial germ hücrelerinin gelişimi üzerine retinoik asitin etkilerini araştırmak üzere 12 adet Balb/c gebe dişi fare kullanıldı. Deney grubu hayvanlarına gebeliklerinin 5,5; 6,5 ve 7,5 günlerinde 3 gün gavaj yoluyla 80mg/kg retinoik asit verildi. Kontrol ve deney gruplarına ait hayvanların tümü, gebeliklerinin 8,5. gününde eter anestezisi altında sakrifiye edilerek embriyoları alındı. Primordial germ hücreleri alkalen fosfataz ve c-kit ile boyandı. Primordial germ hücrelerinin alkalen fosfataz aktivitelerinin, deney grubu hücrelerinde daha şiddetli olduğu, c-kit (+) immünreaksiyonu gösteren primordial germ hücrelerinin sayısının deney gruplarında kontrol grubuna nazaran daha fazla olduğu ayrıca hem deney hem de kontrol grubunda immünreaksiyonun hücre membranında ve sitoplazmasında görüldüğü tespit edildi. Bu bulgulara göre; retinoik asitin primordial germ hücrelerinin gelişiminde önemli rol oynadığı kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: Embriyo, Primordial germ hücre, Retinoik Asit, Alkalen fosfataz, c-kit

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2394

ABSTRACT

Sarioglu T. The Research of The Effects of The Retinoic Acid on The Development of Gonad In the Mouse Embryos. İstanbul University, Institute of Health Science, Histology and Embryology Department. Master (Msc). İstanbul. 2009.

In mouse embryos, the primordial germ cells occur in proximal epiblast at 6.5 dpc, since 7.5 dpc they migrate through the gonads. In embryonic development, as for retinoic acid play an essential role in differentiation and regulation of cellular development. During embryonic development, c-kit who a tyrosine kinase receptor is essential for gametogenesis, hematopoiesis, development and function of mast cell and melanogenesis.

For research the effect of the retinoic acid on the primordial germ cell development there used 12 pregnant Balb/c mice. During three day (5,5; 6,5 and 7,5), 80 mg/kg retinoic acid given via by gavage to the animals of the experimental group. At the 8.5 dpc, all embryos of the control and the experimental groups were taken to the animals who under ether inhalation anesthesia and after this they sacrificed. The primordial germ cells are stained for alkaline phosphatase and immunohistochemical detection of c-kit. The primordial germ cells alkaline phosphatase activity is strong in the experimental group than the control group. The c-kit (+) immunoreactions who showed primordial germ cell's number are more in the experimental groups compared to the control group; furthermore the (+) reaction is seen in membrane and cytoplasmic localization of both group the control and the experimental group. There results according to deduce retinoic acid play a considerable role in the development of primordial germ cells.

Key Words: Embryo, Primordial germ cell, retinoic acid, Alkaline phosphatase, c-kit

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 2394

RESUME

Sarioglu T. Recherche des Effets de l'Acide Rétinoïque sur le Développement des Gonades Chez la Souris. Département d'Histologie et d'Embryologie, Institut des Sciences de la Santé, Université d'Istanbul (Thèse de Master 2) İstanbul 2009.

Chez les embryons de souris, les cellules germinales primordiales commencent à se former entre les cellules de l'épiblaste proximal le 6,5^{ème} jour de leur développement, à partir du 7,5^{ème} jour ils commencent à migrer vers les gonades. Au environ du 10,5^{ème} et 11,5^{ème} jours ils entrent dans les gonades. L'acide rétinoïque joue un rôle essentiel dans la régulation du développement cellulaire et dans la différenciation lors du développement embryonnaire. c-kit qui est un récepteur kinase, lors du développement embryonnaire joue un rôle important pendant la gamétogénèse, l'hématopoïèse, le développement et la fonction des mastocytes et la mélanogénèse.

Pour rechercher les effets d'acide rétinoïque sur le développement des cellules germinales primordiales de la souris, il a été utilisé 12 souris de race Balb/c en gestation. 80mg/kg d'acide rétinoïque a été donné par voie orale, trois jour à la suite (5,5^{ème} ; 6,5^{ème} ; 7,5^{ème}) au groupe expérimentale. Les embryons ont été prélevé le 8,5^{ème} jour, de toutes les souris anesthésié qui à la suite ont été sacrifiés. Les cellules germinales primordiales ont été colorées avec la colorisation d'alcaline phosphatase et une détection immune histochimique de c-kit. L'activité d'alcaline phosphatase des ces cellules a été plus forte chez les cellules germinales primordiales du groupe expérimentale, le nombre de cellules à immun réaction (+) de c-kit étant plus nombreux dans le groupe expérimentale par rapport au groupe de contrôle de plus l'immun réaction a été relevé au niveau membranaire mais aussi au niveau cytoplasmique. D'après ces résultats il a été conclu que l'acide rétinoïque joue un rôle important dans le développement des cellules germinales primordial.

Mots clés: Embryo, cellule germinale primordiale, acide rétinoïque, Alcaline phosphatase, c-kit.

Ce travail présent a été soutenu par le Fonds de Recherche de l'Université d'Istanbul. Projet No. 2394

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Primordial germ hücreleri, türlerin sürekliliği ve genetik bilginin gelecek nesillere geçişinden sorumlu gametlerin öncülleridir (4). Primordial germ hücrelerinin öncülleri ise; farelerde embriyonal gelişimin 6 ile 6,5 günleri arasında, proksimal epiblastı oluşturan hücre topluluğundan BMP4 faktörünün etkisi ile oluşur (2,18). Bu progenitör hücreler aynı günlerde, alkalen fosfataz ile histokimyasal olarak saptanabildiği gibi, c-kit, SSEA-1, F9, EM-1, Oct4 ve Stella genlerinin ekspresyonu ile de saptanabilirler (4, 23, 40). 7-7,5 günler arasında gelecekteki gonadların oluşacağı bölgeye doğru göç başlar. Göç evresi boyunca primordial germ hücreleri aktif bir şekilde çoğalırlar (19). Gelişimin 10,5 ile 11,5 günleri arasında primordial germ hücreleri gonadlara girer (24). Artık gonosit olarak adlandırılan bu hücreler gonadlarda toplandıktan bir süre sonra, dişide yaklaşık 12,5 günde mayoz bölünme başlar. Ancak profaz I' de durur (19). Erkeklerde ise gelişimin 13,5 gününde mitotik durgunluğa girer ve G₁/G₀'da doğumdan sonraya kadar kalırlar (5, 25)

Retinoik asitler, embriyonik gelişimde, temel fizyolojik süreçler için gereklidir (21). Özellikle embriyonal ve fetal gelişim boyunca, hücre gelişimin düzenlenmesinde ve farklılaşmada önemli rol oynar (28). Prenatal ve postnatal hayat esnasında spesifik yerel bölgelerde çeşitli zamanlarda üretilir ve kullanılır (6). Retinoik asit ergin organizmanın farklılaşmasını ve gelişmesini destekler, ama embriyonun gestasyonunu desteklemek için tek başına yetersizdir (34). Primordial germ hücrelerinin proliferasyonunu uyarabildikleri (mitotik etki) ve dejenerasyonlarını geciktirdikleri ileri sürülmüştür (18). Bu etkilerinden dolayı in vitro çalışmalarda çeşitli hücre tiplerini farklılaştırma ve geliştirmede kullanılır (19).

c-kit/SCF kompleksi, primordial germ hücrelerinin vitellus kesesindeki gelişim süreçlerinde, gonadlara göçlerinde, devamındaki gelişmelerinde ve hayatta kalımlarında çok önemlidir (31). c-kit, farede primordial germ hücreleri tarafından embriyolojik gelişimin 7. gününden itibaren ekprese edilmeye başlar, gelişimin 12. gününe kadar göç yolu boyunca sekresiyonu devam eder. Bu hücrelerin c-kit ekspresyonu, oogeneze veya spermatogeneze geçişleri için mayoza girerken kesilir (40). Dişide gonadların oositlerinde c-kit tekrar 17,5. günde ekprese edilmeye başlarken erkek gonadlarda c-kit ekspresyonu ancak doğumdan hemen sonra yeniden başlar (24, 43).

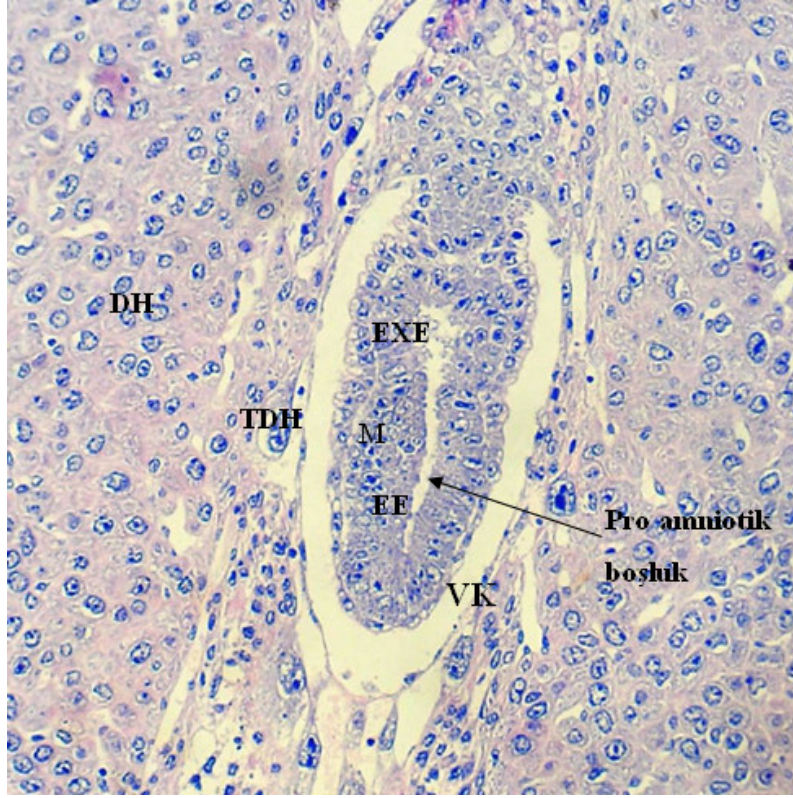
Çalışmamızda, retinoik asitin fare embriyonlarında primordial germ hücreleri üzerine etkilerinin morfolojik olarak hem alkali fosfataz reaksiyonu bakımından hemde c-kit immün reaksiyonu açısından değerlendirilmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Primordial germ hücreleri

Primordial germ hücre öncülleri fare embriyosunda gelişimin 6,25-6,5. gününde ekstraembriyonik ektodermin yakınında, bir dizi hücre şeklinde epiblastın proksimalinde ve posteriyorunda oluşmaya başlar (4). Bu hücreler gelişimin 6,25. gününde yaklaşık 6 hücre iken gelişimin 7. gününde 40 hücreye ulaşır. Lawson ve Hage'ın çalışmasında epiblast da yaklaşık 40 hücre, progenitör hücre topluluğu olarak değerlendirilmektedir. Bu hücreler, genelde küçük yalancı ayak şeklinde yuvarlak uzantılarla hareketli hücre görünümündedirler (2). İlk 6 hücre embriyonun posteriyorunda var olan epiblast hücrelerinden türemiş olabilir, diğer kalan kısım olasılıkla proksimal epiblast boyunca dağılmış epiblasttan türeyip gastrulasyon esnasında embriyonun posteriyor kısmına hareketlenmiş olabilir.

Viseral endoderm ve ekstraembriyonik ektoderm primordial germ hücrelerin meydana gelmelerinde önemli bir rol oynar. Viseral endoderm ve ekstra embriyonik ektoderm, gastrulasyon esnasında modelleme görevlerinin yanında primordial germ hücre öncülerinin doğru indüklenmesinden de sorumludurlar (7). Ekstra embriyonik ektodermin salgıladığı TGF β ailesinin üyelerinden BMP4, proksimal epiblastın, ya primordial germ hücresine ya da allantoise farklılaşmasını sağlar (23). Ancak beklenildiği gibi primordial germ hücrelerinin spesifikleşmesine direkt etkili değildir. Bu iki dokunun primordial germ hücre gelişiminde önemli oldukları fakat farklı rol oynadıkları görülmüştür. Primordial germ hücre öncülleri, spesifik primordial germ hücresi oluşturmak için yeterli değildirler; olasılıkla ekstraembriyonik mezodermden salınan sinyallerle primordial germ hücre spesifikleşmesi belirir(7).



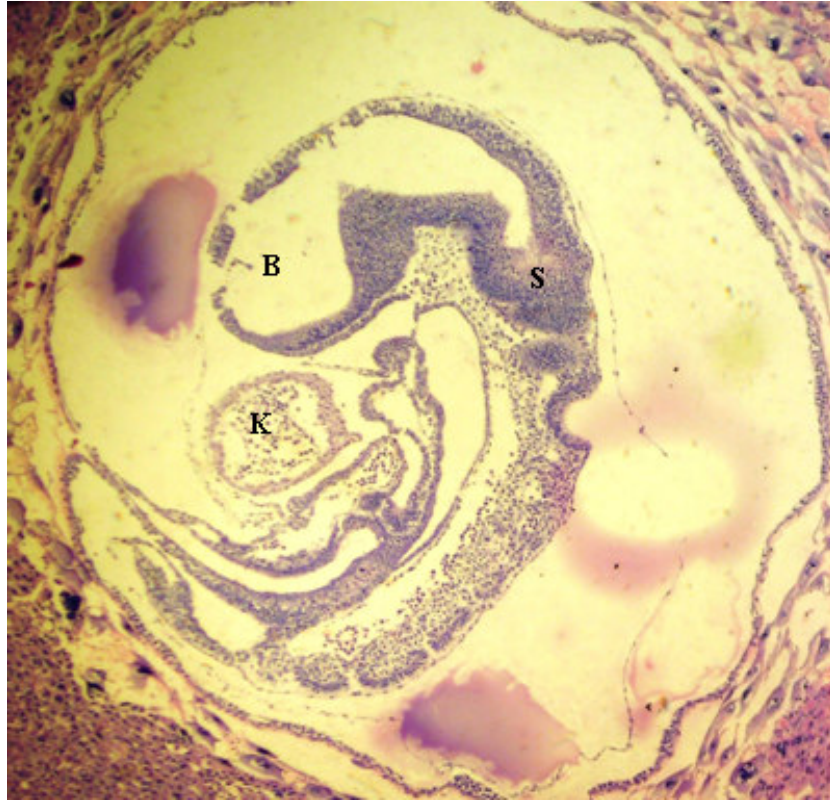
Şekil 2-1 6,5 günlük embriyo. (DH: desidual hücreler; TDH: trofoblastik dev hücreler; VK: vitellus kesesi; EXE: ekstraembriyonik ektoderm; M: mesoderm; EE: embriyonik ektoderm)

2.1.1. Primordial germ hücrelerin göçü

Gelişimin 7-7,5. günlerinde primordial germ hücreleri, arka bağırsağın oluşacağı bölgededirler. 7,5-8,5. günleri arasında endoderm, arka bağırsağı oluşturmak üzere invaginasyon yapar ve primordial germ hücreleri endoderm hücreleri ile ileriye taşınır (26). İnvaginasyon sonucunda primordial germ hücreleri embriyo içine kıvrılıp arka bağırsağın duvarına gömülmeye başlar (4). Diğer bir değişle; embriyo sefalokaudal fleksiyon sonucunda tüp şeklini almaya başladığında, vücudu laterallerden de katlanır, böylece primordial germ hücreleri pasif olarak embriyo içine geçip primitif arka bağırsak epitelinin endodermal hücreleri arasında tek tek hücreler şeklinde görülmeye başlarlar (30).

Epiblast hücrelerinde hücre döngüsü 6-7 saat sürmesine karşın primordial germ hücrelerinde iki katı yani 12-14 saattir (2). 1954 yılında Chiquoine tarafından, primordial germ hücrelerinin yüksek düzeydeki dokuya özgü olmayan alkalen fosfataz (TNAP; tissue non spesifik alkaline phosphatase) aktivitesinin fare embriyonlarında gelişimin 8,5 gününde tanımlanabildiği ileri sürüldü (26). Tam ve Snow (39) ise

gelişimin 8,5 ile 13,5 günleri arasında TNAP ekspres eden primordial germ hücre sayısının 150 den 26000'e her 12–14 saat katlanarak arttığını saptamışlardır (41).



Şekil 2-2 8,5 günlük embriyo. (S: somit; K: kalp tomurcuğu; B: Baş bölgesi)

Gelişimin 9,5. gününde bu hücreler arka bağırsaktan ayrılmaya başlar. Başlangıçta, arka bağırsak duvarında ventral pozisyonda yerleşmesine rağmen primordial germ hücreleri vücut duvarının içine notokord ve aortaya doğru, iki taraftan hareket eder. Bu zaman diliminde, arka bağırsak sölomik boşluğa henüz inmemiştir, böylece erken göçücüler ürogenital sırt oluşumlarının içine direkt göç ederler. Daha geç evrede ayrılan primordial germ hücreleri ise hedeflerine varmadan önce dorsal mezenter boyunca göç etmek zorunda kalırlar (4).

Göç esnasında primordial germ hücreleri, yalancı ayağa benzer çıkıntıları olan, geniş, yuvarlak veya oval şekilde hücrelerdir. Işık mikroskopunda, birkaç merkezi yerleşimli nukleolus içeren veziküllü nukleusları olduğu saptanmıştır. Transmisyon elektron mikroskobu ile primordial germ hücrelerinin sitoplazmalarının geniş mitokondriyonlar, bol ribozom ve veziküllü golgi komplekslerine sahip oldukları ancak endoplazmik retikulumun sisternaları açısından fakir bulundukları tespit edilmiştir. Önemli bir yapısal özellikte, yağ damlaları kadar bol miktarda glikojen granüllerinin

varlığıdır. Bu ultra yapısal özellikler insanda ve farede elektron mikroskopik düzeyde primordial germ hücrelerinin saptanmasını sağlar (30).

İn vivoda, göç boyunca primordial germ hücreleri çevrelerindeki somatik hücreler ile etkileşirler (14). Arka bağırsağın içinde primordial germ hücrelerin davranışını iki protein düzenler, E-kadherin ve c-kit/steel. Primordial germ hücreleri arka bağırsakta yokken, arka bağırsağın epitelyum hücreleri Ca^{++} 'a bağımlı E-kadherin eksprese ederler. Bu güçlü adezif etkileşimler primordial germ hücrelerinin bağırsak içinde özgürce hareket etmelerini sağlayabilmektedir. Steel /c-kit etkileşimi primordial germ hücrelerinin bağırsak içinde kolonizasyonu, hayatta kalımı ve/veya göçü için gereklidir. Primordial germ hücreleri c-kit eksprese ederken arka bağırsak hücreleri Steel ekspres ederler; bu etkileşim primordial germ hücrelerin göçleri kadar bu çevrede hayatta kalımları için gerekli olabilir (27). Germ hücreleri, arka bağırsaktan çıktıktan sonra, genişleme sürecinde, ağ oluşturmak için her biri diğerine ulaşma eğilimindedir. Laminin'in belki hücre yüzeyindeki proteoglikan ve/veya integrin ekspresyonu düzenlemesi ile hücre adezyonu primordial germ hücre rehberliği için bir rol oynayabilir (26).

Gelişimin 11,5. gününde hemen hemen tüm primordial germ hücreleri genital sırtlara ulaşmış ve birbirleriyle kümeleşmeye başlamışlardır (4). Hareketlilik özelliklerini kaybettikleri ve daha dairesel şekil aldıkları görülür. Aynı zamanda, glikojen içerikleri anlamlı şekilde azalır (30).

2.2. Retinoik asit

“Retinoidler” hem A vitaminin (retinol) doğal diyet metabolitlerini hem de aktif sentetik analoglarını içeren genel bir terimdir. Organizmada genellikle retinol, retinal, retinoik asit ve retinil fosfat şeklinde bulunur. Retinoik asit (RA) A vitaminin biyolojik türevidir.

Hem klinik hem de deneysel çalışmalar, retinoidleri; embriyolojik morfogenez ve organogenezde, hücre gelişimi, farklılaşma, apoptoz, homeostaz ve bazı çeşitli temel biyolojik süreçleri düzenlediğini göstermektedir (12, 20).

2.2.1. Metabolizması

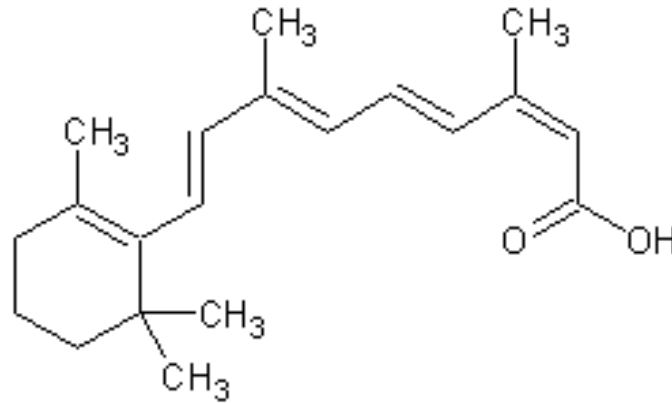
A vitamini hayvansal kaynaklı besinlerde retinol ve retinol esterleri şeklinde bulunurken bitkisel kaynaklı besinlerde karotenoidler şeklinde bulunmaktadır. Sindirim

kanalında retinol esterleri bir lipaz enzimi tarafından hidrolize edilir ve epitelyum hücreleri tarafından absorbe edilen retinol serbestleşir. Hedef dokuların hücrelerinde retinol ve türevleri CRPB (cellular retinol binding protein) ve CRAPB (cellular retinoid acid-binding protein) diye adlandırılan taşıyıcılara bağlanırlar. Bu taşıyıcıların rolü nükleus içine retinol ve retinoik asidin geçişini sağlamaktır (8).

Retinolün oksitlenmesi sonucu retinoik asit oluşur. Retinoik asit, retinolün tüm etkileri olmasada hücre proliferasyonu stimüle etme ve epitel dokusunun normal durumların sürekliliğini güçlendirme etkilerini gösterir. Retinoik asit retinole dönüşmez.

Retinol ve retinal birbirlerine dönüşerek A vitamini tüm etkilerini yerine getirirken retinoik asit bu maddelere dönüşemediğinden A vitaminin etkilerinden sadece hücre proliferasyonunu ve farklılaşmayı destekleme ile epitelin normal durumunu sürdürmesini sağlar. Retinoik asit ve onun fosforile türevi, dokularda glikoprotein sentezine katkıda bulunur (17).

2.2.2. İsoetreinoin



Şekil 2-3 isotreinoin formülü

İsoetreinoin (13-*cis*-retinoik asit, 13CRA, Roaccutane®) çeşitli dermatolojik hastalıkların tedavilerinde kullanılan bir ilaçtır (35). Yağ bezlerinde sebum üretimini inhibe etmesi sebebiyle tretinoine cevap vermeyen kistik nodüller ve ağır püstüller akne vakalarının tedavisinde oral olarak kullanılır. Ayrıca epidermiste keratinizasyonu, proliferasyonu ve farklılaşmayı inhibe eder; bu nedenle hiperkeratotik cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Antiinflamatuvar etkisinin olduğu ve ayrıca hücre-aracılı sitotoksik reaksiyonları uyardığı ileri sürülmüştür. İlk bulunan retinoidler olup kimyasal yapı bakımından retinoik asite çok benzerler. Yüksek derecede lipofilik olan isotreinoinin yemek ile birlikte alındığında kolay emilmesinden dolayı biyoyararlılığı

açken alınmasına oranla 2 katına çıkar. Plazma proteinlerine bağlanma oranı yüksektir ve albümin en önemli bağlanma proteini olarak görülür. Oral yolla alımından hemen sonra kanda görülen metaboliti 4-okso-isotretinoindir. Birde in vivo alternatif bir yolla tretinoin izomer ürünü (all-trans-retinoik aist) oluşturur (1). İnsanda metabolitlerin glukuronidasyonu kesin olarak ispatlanmamasına rağmen hayvanlarda gerçekleştirilen çalışmalarda, metabolizasyonun geçerli yolunun glukuronidasyon olduğu düşünülmektedir. İnsanda ve köpekte yapılan çalışmalar, bireyden bireye isotretinoin plazma konsantrasyonunda farklılık görülmesi de katkısı olabilecek bir enterohepatik geri dolaşıma dikkat çekmektedir. İso-tretinoin, hemen hemen yalnızca hepatik metabolizasyon ve ardından safra atılımı yoluyla uzaklaştırıldığı görülmektedir. Oral yoldan alınmasından sonra değişmemiş ilaç eliminasyon yarı ömrü 7–39 (ortalama: yaklaşık 20 saat) saattir (17).

2.3. Alkalen Fosfataz

Dokularda yaygın olarak bulunan alkalen fosfatazlar, monofosfat esterlerin hidrolizini katalizleyen hücre membranına bağlı enzimlerdir (22). Uluslararası Biyokimya birliği'nin (IUB) adlandırma sistemine göre sistematik ismi; ortofosforik monoester fosfohidrolaz (alkalen optimum) EC.3.1.3.1.'dir. Alkalen fosfatazlar alkali pH da maksimum aktivite gösteren fosfatazları kapsamaktadır ve farklı birçok enzimi içermektedir. Alkalen fosfatazların hepsi glikoprotein yapıda olup aktif bölgelerinde Zn^{+2} ve Mg^{+2} içerir. Alkali pH da bu enzim fosfat ester gruplarından inorganik fosfatı serbestleştirir (42). Farede var olan 3 izoformu, embriyonik, intestinal ve dokuya özgü olmayan alkalen fosfatazlardır (tissue non-specific alkaline phosphatase: TNAP). Sonuncusu hemen hemen tüm embriyonik gelişim esnasında ve birçok dokuda ekspres edilir. Farede TNAP 4. kromozomda 50 kb lik 12 ekzona uzanmış şekilde yerleşimlidir. Bu genin çıkartılması primordial germ hücrelerinin göçü dahil olmak üzere embriyo gelişimine engel olmaz, ancak doğumdan birkaç gün sonra ölümlere sebep olur (22).

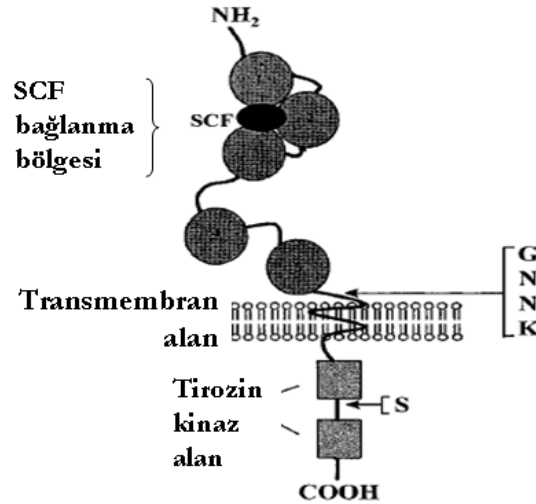
Bu enzim ailesinin fizyolojik rolleri hakkında fazla bilgi yoktur. Tabiatta çok yaygın olarak bulunan bu enzim, karaciğer, ince bağırsak, pankreas, kemik, tiroid bezi, plasenta, meme bezi, diş minesi, seminifer tübülleri, lökosit hücre membranı, endoplazmik retikulum, mitokondri, nukleus zarı ve hücre membranında da bulunur (42). Omurgalı gelişimi esnasında primordial germ hücreleri başta olmak üzere, çeşitli hücrelerde yüksek düzeyde ekspresyonu, morfogenetik ile farklılaşma merkezlerinde

yaygın olarak bulunmalarına bağlanabilir (9). Alkalen fosfatazlarda bir ekstrasellüler matriks protein bağlama alanının varlığı bu enzimi eksprese eden göçücü hücreler ile ilgili olabilir (22).

Primordial germ hücreleri Ginsburg ve arkadaşları tarafından farede gelişimin 7.günde tanımlanmıştır ve alkalen fosfataz pozitif göçücü primordial germ hücrelerinin mitoz bakımından çok aktif oldukları ileri sürülmüştür (13). Alkalen fosfataz eksprese eden çeşitli embriyonik hücre soylarında, bu ekspresyonun promotörü E1A dır. Embriyonik kök hücrelerinde, bu promotörün transkripsiyonal aktivitesi retinoik asit tarafından düzenleniyor. Fare gelişiminin 8,5. gününden 12,5. güne kadar göçücü primordial germ hücrelerinde E1A transkripti saptanmıştır. Escalante-Alcalade ve arkadaşları, alkalen fosfataz'ın ekspresyonunun retinoik asit nükleer reseptör aracılığı ile ve özellikle alkalen fosfataz promotörü E1A'nın direkt etkisi ile açıklamışlardır (9).

2.4. c-kit

c-kit, membrana bağlı Tip III tirozin kinaz protein reseptörüdür (11). Tirozin kinaz protein reseptörlerinin tümü aynı topolojiye katılırlar: bir ekstrasellüler ligand-bağlayıcı alan (domain), bir tek transmembraner segment ve bir sitoplazmik kinaz alanı (32).



Şekil 2-4 c-kit, Tip III tirozin kinaz protein reseptörü (3)

SCF c-kitin ligandıdır. c-kite bağlanmış Stem Cell Factor (SCF), reseptörün dimerizasyonuna ve protein kinaz aktivitesine yol açmaktadır. Aktivasyon esnasında reseptör tirozin uçlarında otofosforillenmeye başlamakta; sonuçta oluşan fosfotirozin artıkları, fosfotirozin-bağlanma alanları ve SH2 içeren molekül sinyal transdüksiyonu

için kenetlenme alanları gibi işlev görmektedir. Aktiflenmiş Kit substrat fosforilasyonlarında katalizler.

c-kit proto onkogeni farelerinin 5. kromozomunun *W* locus'unda, insanda ise 4. kromozomunda tanımlanmıştır. c-kitin mutasyonu ergin farede ve gelişimi esnasında gametogenez ile hematopoezde bozukluklara yol açmaktadır (10). c-kit/ SCF sinyalleşmesi, gametogenez ve hematogenezin yanı sıra mast hücresi gelişimi ve işlevi ile melanogeneze de önemlidir (33).

Farede c-kit/SCF sistemi, *W* ve *Sl* mutant farelerin gonad sırtlarında primordial germ hücrelerin sayısında şiddetli azalma gözlemlenmesi, embriyogenez esnasında bu sistemin germ hücrelerinin gelişiminde de esas bir rolü olduğunu gösterdi. Embriyonal gonad da, c-kit primordial germ hücrelerinde genital sırtlara doğru göçlerinden önce ve sonra saptanabilir (15). Gonadal sırtlara uzanır uzanmaz primordial germ hücreleri olgun gametlerin üretimine yol açan farklılaşma sürecine girerler. SCF/c-kit sistemi olgun germ hücrelerin üretimleri ve hayatta kalmalarını destekleyerek erkek ve dişi gonad gelişiminde de esas rol oynar (37)

Fare gametogenezinde c-kit ve SCF nin rolü yalnızca embriyonal dönem ile sınırlı değildir, postnatal spermatogeneze de önemli rol alırlar (15).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünden (DETAE) alınan 13.02.2008 tarih ve 13 numaralı Deney Hayvanları Etik Kurulunun onayı ile yapılmıştır. 6 aralık 2008 tarihinde malzemelerin tesliminden sonra çalışmamız başlamıştır.

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Biyolojisi ve Biyomedikal Uygulama Teknikleri Anabilim Dalı Laboratuvarlarında üretilmiş Balb/c soyu, 3-4 aylık, erişkin, 30 ± 5 g ağırlığında 12 adet dişi fare kullanıldı. Deney hayvanları standart kafeslerde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ve ısısı $22-24^{\circ}\text{C}$ olan fizyolojik ortamlarda tutulup uygun koşullarda barındırıldı. Aynı biyolojik koşullar altında tuttuğumuz hayvanlar standart pellet yem ve musluk suyu ile serbest beslemeye tabi tutuldular.

3.1. Hayvan Deneyi Uygulaması

Dişi fareler gece boyunca erkek farelerin yanında tutularak ertesi sabah vajinal plak (+) bulunduğunda gebeliklerinin 0,5. günü kabul edildi ve gebe fareler ayrı kafeslere alındı. Kontrol gruplarında bulunan hayvanlara herhangi bir ilaç uygulaması yapılmadı. Deney gruplarına uygulanacak olan 13-*cis* retinoik asit (ROCHE Roaccutane 20mg, isotretinoin) mısır yağı-alkol karışımında süspanse edildi. 80 mg retinoik asit, 4,5 ml mısır yağ ve 0,5 ml absolü etil alkol içinde çözüldü. Bu şekilde hazırlanan solüsyon 0,2 ml yani 80 mg/kg dozunda gebeliğin 5,5; 6,5 ve 7,5 günlerinde gavaj yoluyla uygulandı. Kontrol ve deney gruplarına ait hayvanların hepsi 8,5 günde eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Alınan embriyolar ışık mikroskopik incelemeler için %10 tamponlu formalin ve 7:1 oranında absolü etil alkol: glasiyal asetik asit tespit solüsyonlarında tespit edildi.

3.2 Işık Mikroskobu Takibi

% 10 tamponlu formalinde 24 saat fikse edilen embriyolar yükselen alkol (etanol Riedel-de Haën) serilerinden (her birinde 24 saat tutmak suretiyle) geçirilerek doku içindeki su uzaklaştırıldı. Daha sonra dokular toluol (Merck) ile saydamlaştırıldı. 7:1 absolü etil alkol: glasiyal asetik asit tespit solüsyonunda 1 saat $+4^{\circ}\text{C}$ de tespit edilenler, 24 saat $+ 4^{\circ}\text{C}$ de 2 kez absolü etil alkol de dehidrate edilip, 2 kez 1'er saat $+4^{\circ}\text{C}$ de

kloroformda saydamlaştırıldı. Daha sonra tüm embriyolar 58°C'lik etüvde (Herdaus) eriyen sıvı parafinde (Kimetsan) 3 saat bekletildi ve parafin bloklar içine gömüldü. LEICA RM marka mikrotom ile alınan 3 mikronluk (μm) kesitler hematoksilin & eozin (H&E) ve alkalen fosfataz ile boyandı. Preparatlar Olympus CX21 marka ışık mikroskobu kullanılarak histolojik olarak değerlendirildi.

3.2. Histokimyasal boyamalar

3.2.1. Hematoksilin & Eozin

Dokuların genel görünümünü ayırd edebilmek amacıyla H&E boyası uygulandı

Boyanın yapılışı:

- Parafinin dokudan uzaklaştırılmasını takiben kesitler etil alkol serilerinden (%100, 96, 90, 70) geçirilerek distile suya indirildi.
- Hematoksilinde 15 dakika boyandı.
- Çeşme suyunda çalkalandıktan sonra boyanın fazlası asit alkolle giderilip çeşme suyunda 1 saat bekletilerek morarmaları sağlandı.
- Eozinde 2 dakika boyandı ve distile suya alındı.
- Yükselen etil alkol serilerinden (% 70, 90, 96, 100) sonra toluolden geçirilerek kanada balzamu ile (AppliChem 8007-47-4) ile kapatıldı.

İşlem sonunda, hücre nükleusu mavi mor, sitoplazma ise pembe renkte izlendi.

3.2.2. Alkalen fosfataz boyama

Alkalen fosfataz aktivitesi yüksek hücreleri tespit edebilmek için Ginsburg ve arkadaşlarının kullandığı yöntem uygulandı (13).

Boyanın yapılışı:

- Parafini uzaklaştırılan kesitler, inen etil alkol serilerinden 5'er dakika geçirilerek distile suda iki kez 10'ar dakika bekletildi
- Alkalen fosfataz boya solüsyonunda 20-30 dakika inkübe edildi.
- Tekrar distile suya alınıp daha sonra suyu uzaklaştırılarak 1:1 PBS/gliserin karışımı ile kapatıldı.

Alkalen fosfataz boyaması gösteren hücrelerin sitoplazmaları kırmızı-kahve boyandı.

3.3. İmmünohistokimya uygulaması

Primordial germ hücrelerin işaretlenmesi amacı ile c-kit immünohistokimyasal boyanması yapıldı.

- Parafin bloklardan alınan 3,5 mikronluk parafin kesitler Poly-L-Lysine sürülmüş lamalar üzerine alındı. Parafinlerinin giderilmesi için 1 gece 56°C etüvde tutuldu.
- Aşağıda belirtilen serilerden geçirilerek distile suya kadar indirildi.

Toluen	2x10 dakika
Saf Alkol	2x5 dakika
%96 Alkol	2x5 dakika
%90 Alkol	2x5 dakika
%70 alkol	2x5 dakika
Distile Su	1x5 dakika

- Antijeninin geri dönüşümünü sağlamak amacıyla kesitler 10mM (pH=6) Sitrata Tamponu içeren düdüklü tencereye yerleştirilerek 1,5-2 dakika kaynatıldılar.
- 20 dakika bekletildikten sonra kapağı açılarak 10 dakika soğumaya bırakıldılar.
- Endojen peroksidazı maskelemek için kesitler 20 dakika karanlıkta %3 H₂O₂-methanolde bekletildiler.
- 2 dakika distile suda bekletildiler.
- 5 dakika PBS ile yıkandılar.
- 1/40 oranında sulandırılan primer antikör (Santa Cruz, Rabbit polyclonal antibody c-kit) gece boyu +4°C de uygulandı.
- 2x5 dakika PBS ile yıkandılar.
- 30 dakika Biotinlated Goat Anti-Rabbit (Zymed 85-9043) sekonder antikoru uygulandı.
- 2x5 dakika PBS ile yıkandılar.

- 30 dakika Streptavidin peroxidase (Zymed 85-9043) uygulandı.
- 2x5 dakika PBS ile yakandılar.
- 8 dakika kromojen (Zymed AEC Substrate Kit) karanlıkta dokulara uygulandı.
- Distile su ile 2 dakika çalkalandı
- 10 dakika Mayer Hematoksilen ile zıt boyanmaları gerçekleştirildi.
- 15 dakika çeşme suyunda bekletildiler.
- Preparatlar dikkatlice kurutulduktan sonra uygun kapatıcı (LabVision, Vision Mount) ile kapatıldılar.

3.4. İstatistiksel İnceleme

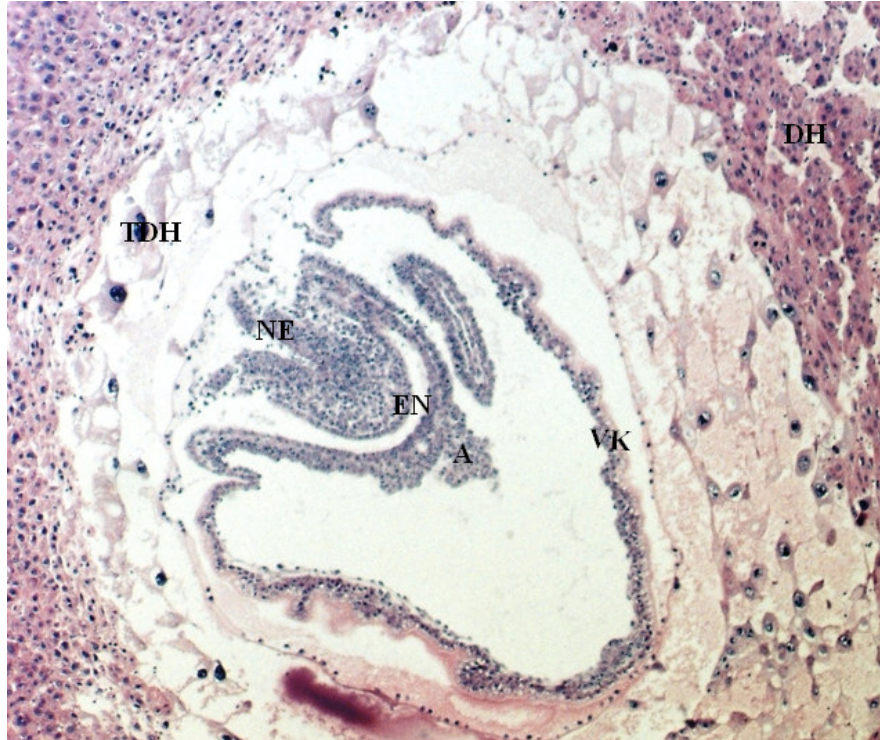
Sonuçların istatistiksel analizi istatistik paket programı (SPSS 12) kullanılarak yapıldı. Kontrol ve deney gruplarından 3'er adet dişi fareden 6'şar embriyo bloğundan toplam 8'er alan sonuçları ortalama $\pm$ standart hata ortalaması (S.E.M) olarak grafik şeklinde gösterildi. Gruplararası c-kit ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması sonucu görülen fark p değeri 0.05'ten küçük değerler için istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Mikroskop Değerlendirmeleri:

Kontrol grubu: Hematoksilen-eozin boyası uygulanan uterus kesitlerinde desidual hücreler, trofoblastik dev hücreler ve vitellus kesesi ile çevrili amnion boşluğunun içinde embriyonal endoderme ait hücreler ayırdedildi (Şekil 4-1). 8,5 günlük embriyolarda, embriyonal endodermal hücreler arasında bulunduğu bilinen primordial germ hücreleri, alkalin fosfataz boyası ile reaksiyon verme özelliğinden dolayı, kırmızı kahve renkte tespit edildi (Şekil 4-2). Aynı kesitler büyük büyütme ile incelendiğinde primordial germ hücrelerinin alkalin fosfataz reaksiyonu sitoplazmalarında yaygın olarak izlendi (Şekil 4-3).

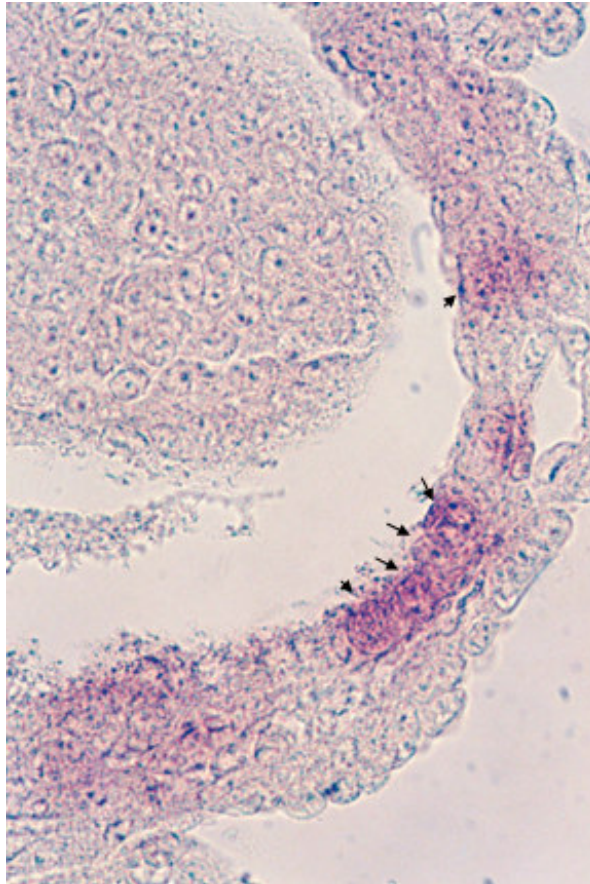
Kesitlerin c-kit immünohistokimyasal olarak boyaması sonucunda ise, primordial germ hücrelerinin membranında yoğun olmak üzere sitoplazmik olarak da işaretlendiği görüldü (Şekil 4-4 ve 4-5). Ayrıca c-kit sadece primordial germ hücrelerinde değil vitellus kesesine ait yapılarda ve trofoblastik hücrelerde de izlendi (Şekil 4-4).



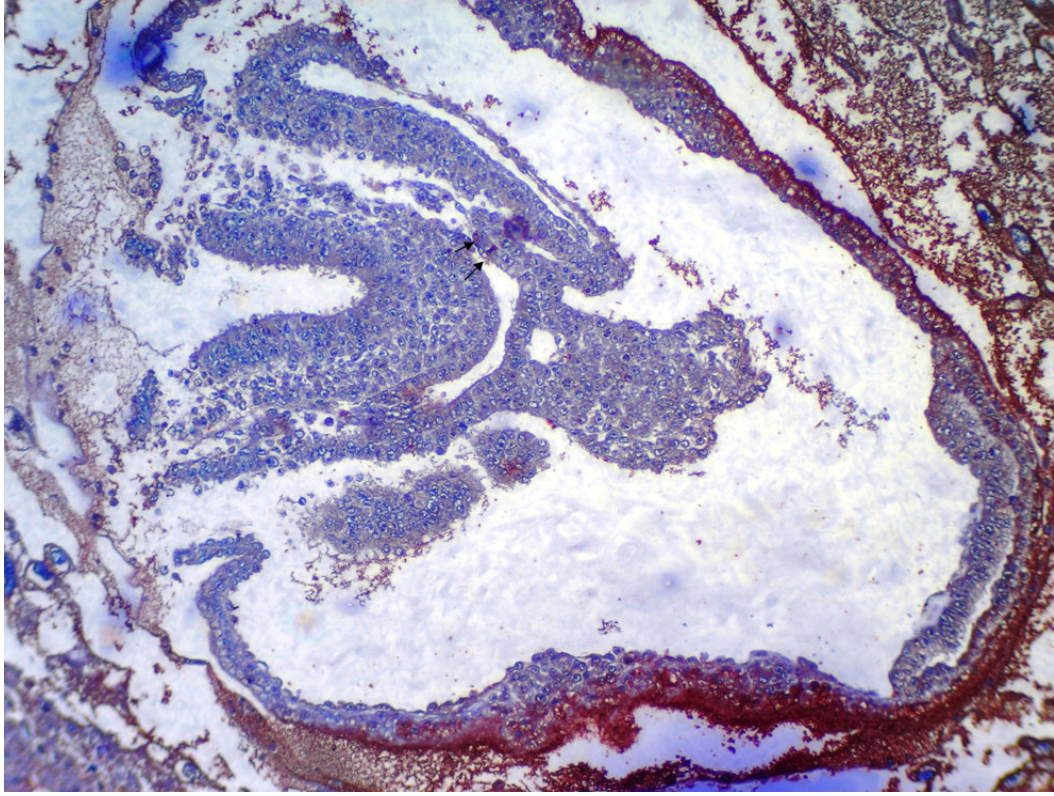
Şekil 4-1. Kontrol grubu. DH: Desidual hücreler; TDH: Trofoblastik dev hücreler; VK: Vitellus kesesi; NE: Nöroektoderm; EN: Endodermal hücreleri; A: Allantois. Hematoksilen&Eozin boyası (x4).



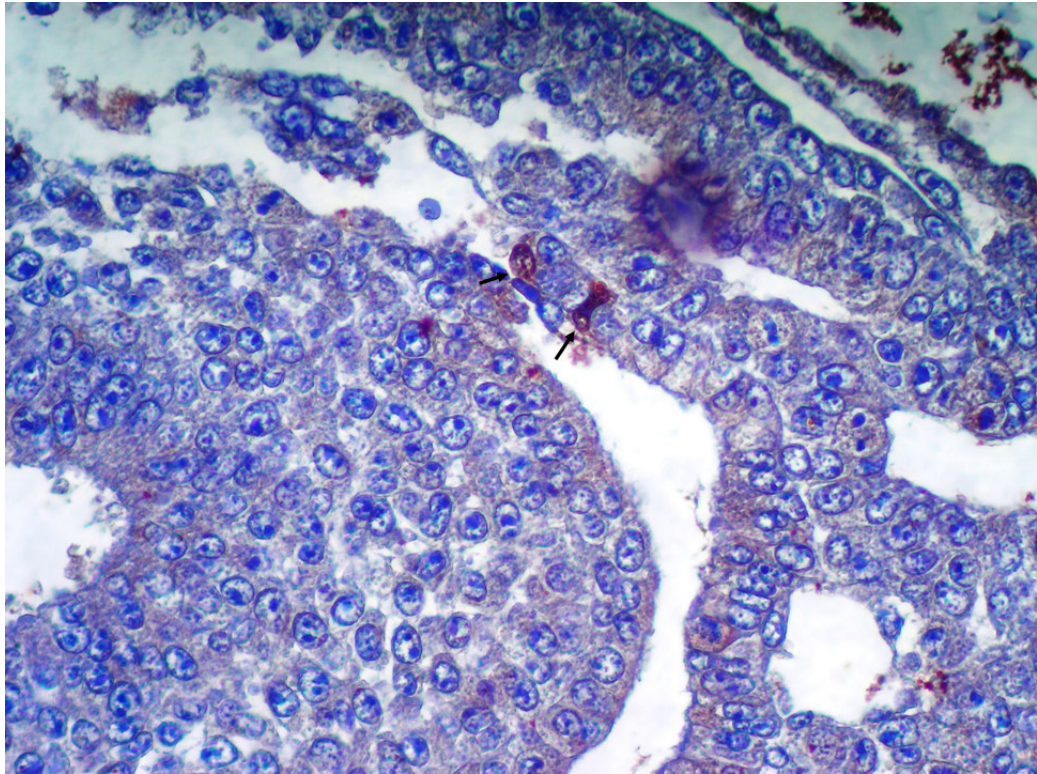
Şekil 4-2 Kontrol grubu. Primordial germ hücrelerinin (oklar) işaretlenmesi. Alkalen Fosfataz (x4).



Şekil 4-3 Kontrol grubu. Şekil 4-2'nin büyük büyütmesi. Primordial germ hücrelerinin (oklar) sitoplazmalarında alkalen fosfataz reaksiyonu. Alkalen Fosfataz (x40).



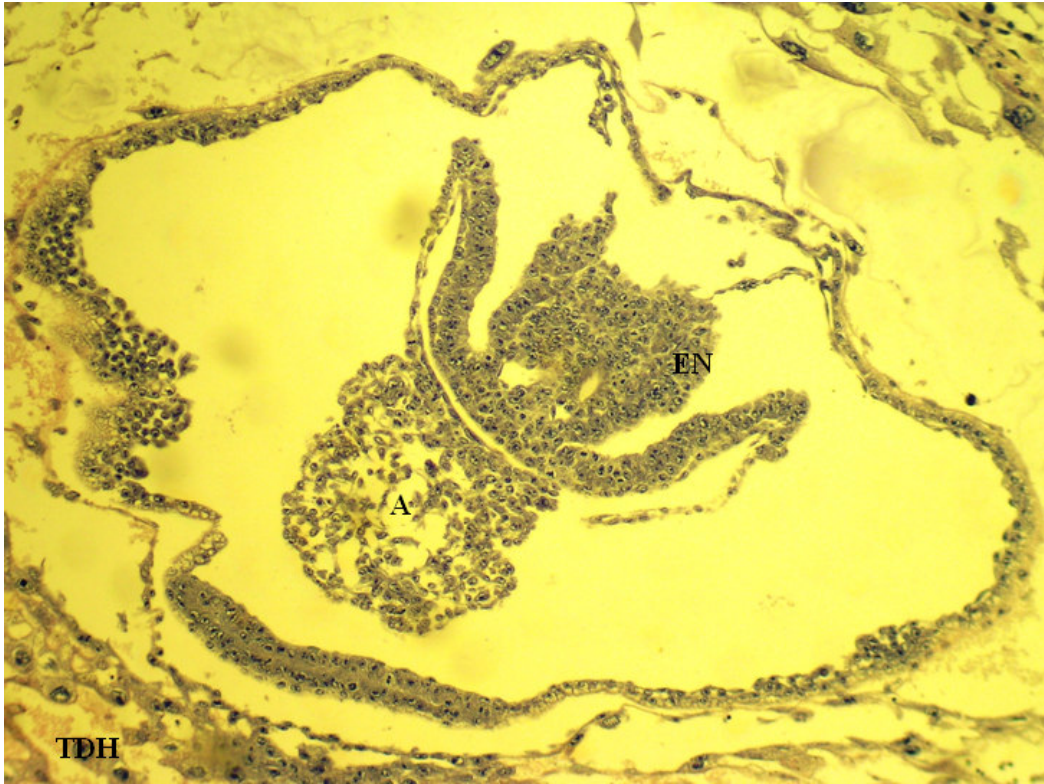
Şekil 4-4 Kontrol grubu. Primordial germ hücrelerinin c-kit (+) immünreaksiyonu (oklar) genel görünümü (x10).



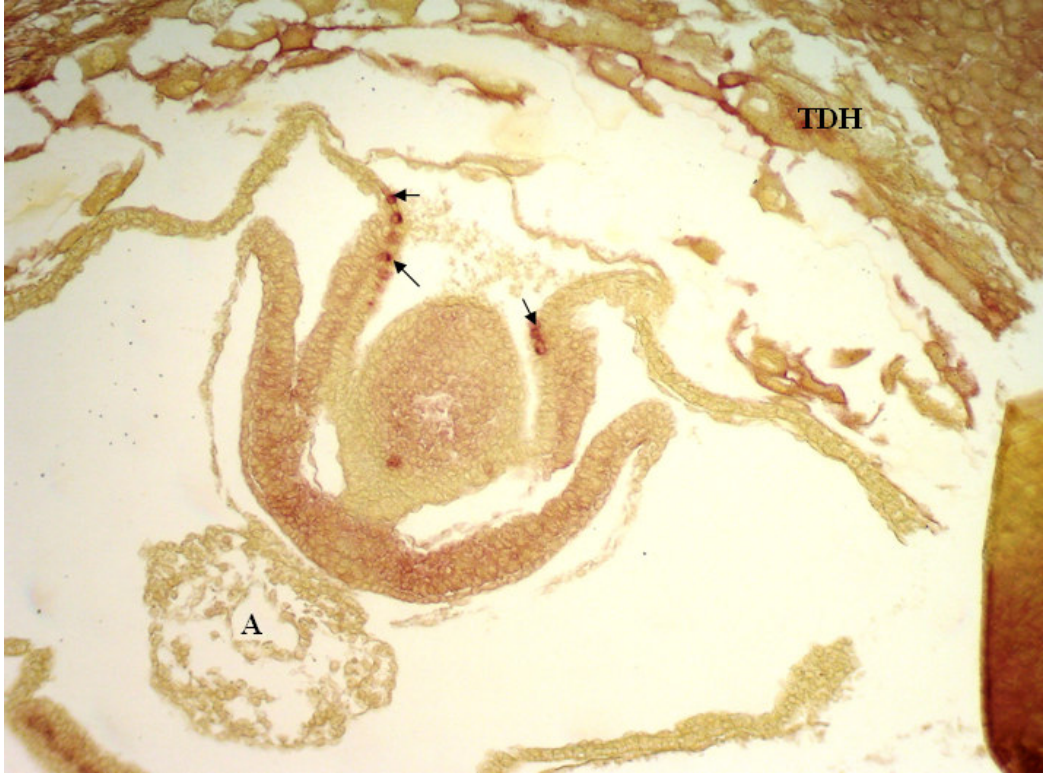
Şekil 4-5 Şekil 4-4'ün büyük büyütmesi: membranda daha yoğun olmak üzere c-kit (+) immünreaksiyonu (oklar) (x40).

Deney grubu: Hematoksilen-eozinle boyanılan kesitlerde kontrol grubundakilere benzer dönem ve pozisyonadaki embriyo kesitleri tespit edildi (Şekil 4-6 ve 4-9). Alkalen fosfataz boyası ile, primordial germ hücrelerinin kontrole göre daha kuvvetli pozitif ve kırmızı-kahve boyanarak bağırsak epitel hücreleri arasında yer aldığı izlendi (Şekil 4-7 ve 4-10). Büyük büyütmede ise alkalen fosfataz reaksiyonunun yine primordial germ hücrelerinin sitoplazmalarında yaygın olduğu görüldü (Şekil 4-8 ve 4-11).

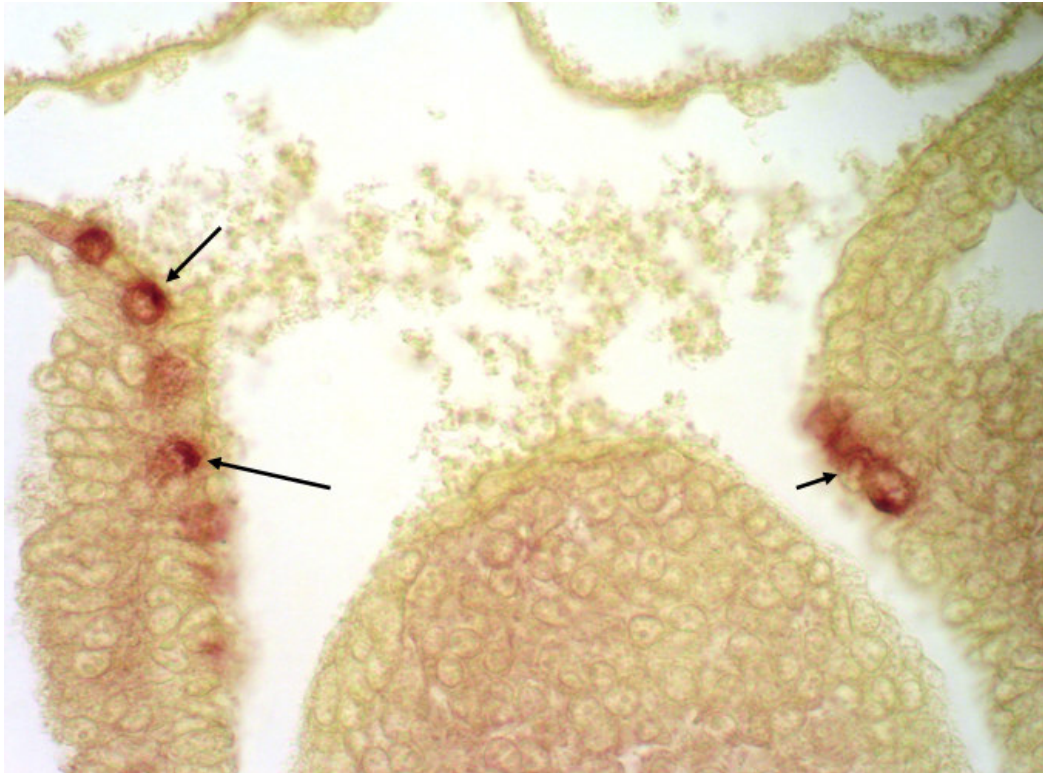
Deney grubuna ait kesitlere c-kit immünohistokimya uygulaması sonucunda, primordial germ hücrelerini daha önce saptadığımız bölgede boyandığı görüldü (Şekil 4-12). c-kit immün reaksiyonu hücre membranlarında daha yoğun olmak üzere sitoplazmik alanda da izlendi (Şekil 4-13). Ayrıca kontrol grubu kesitlerinde olduğu gibi burada da c-kit faktörü yalnızca primordial germ hücrelerinde değil trofoblastik dev hücrelerinde ve vitellus kesesi hücrelerinde de mevcuttu (Şekil 4-12).



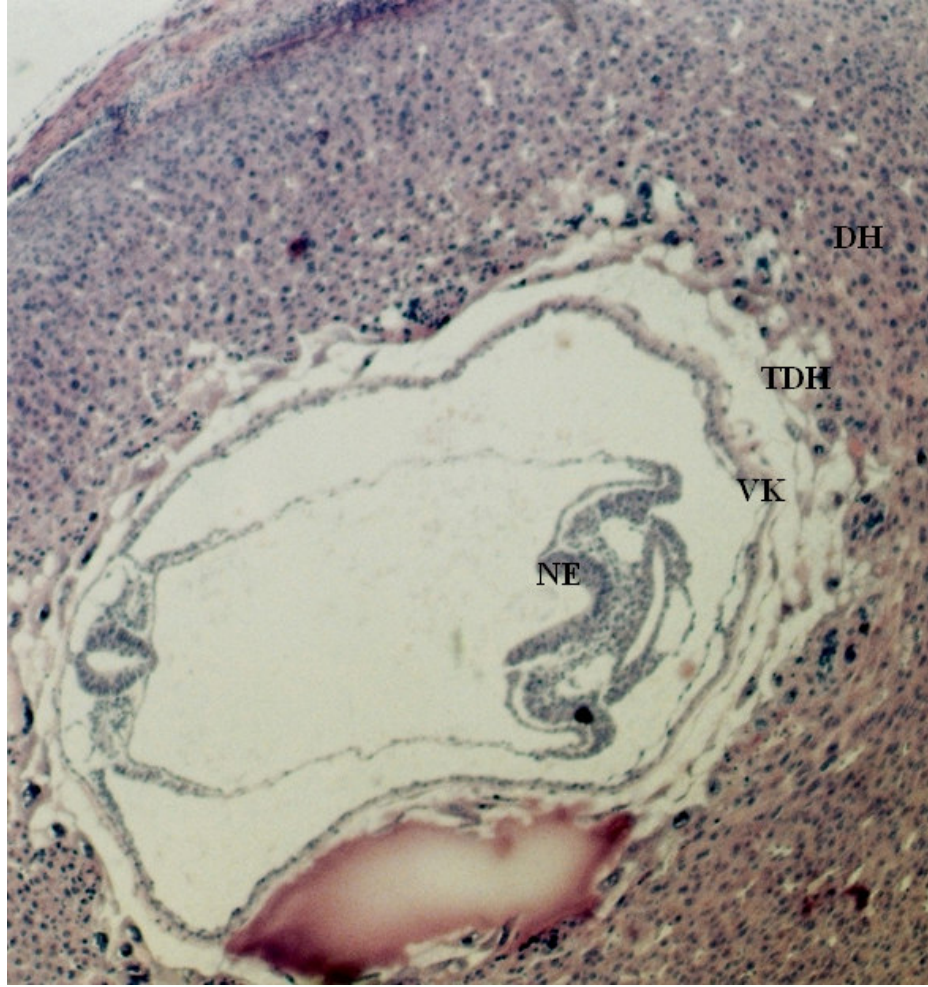
Şekil 4-6 Deney grubu. TDH: Trofoblastik dev hücreler; EN: Embriyoya ait endodermal hücreler; A: Allantois. Hematoksilen&Eozin (x10).



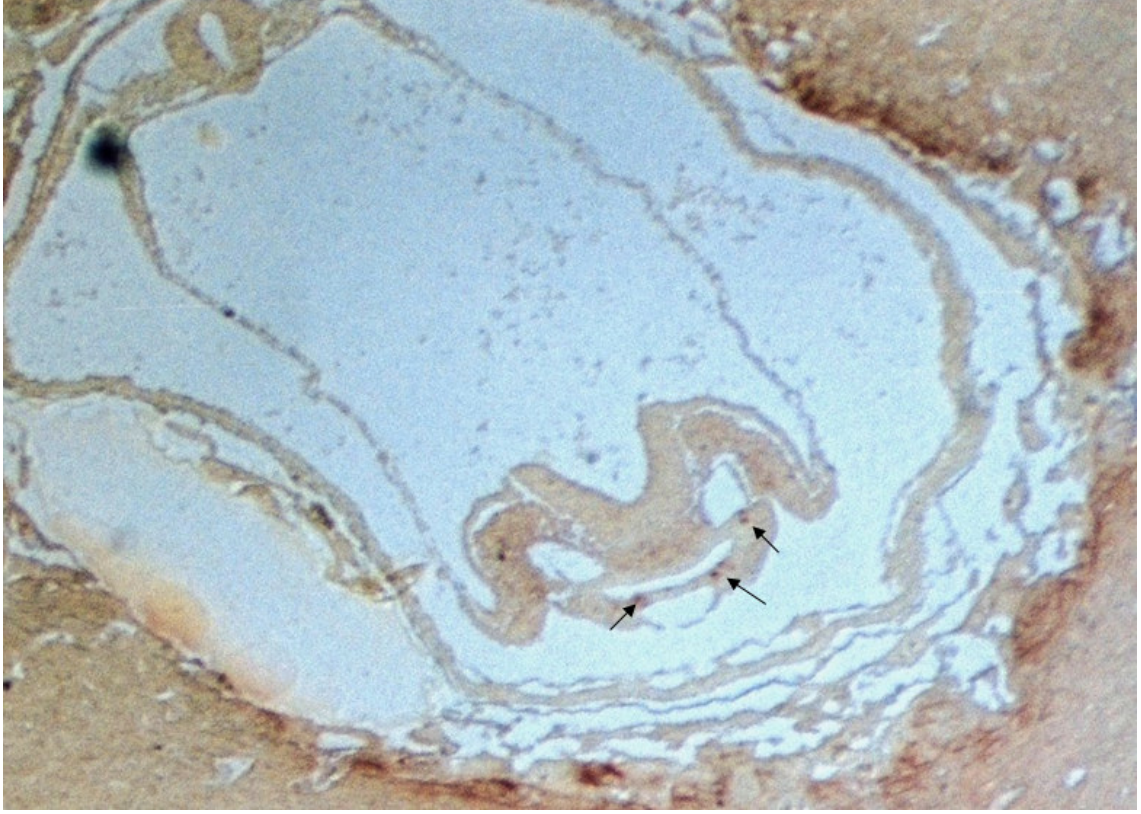
Şekil 4-7 Deney grubu. Embriyoda alkalen fosfataz aktivitesini gösteren primordial germ hücreleri (oklar). TDH: Trofoblastik dev hücreler; A: Allantois. Alkalen Fosfataz (x10).



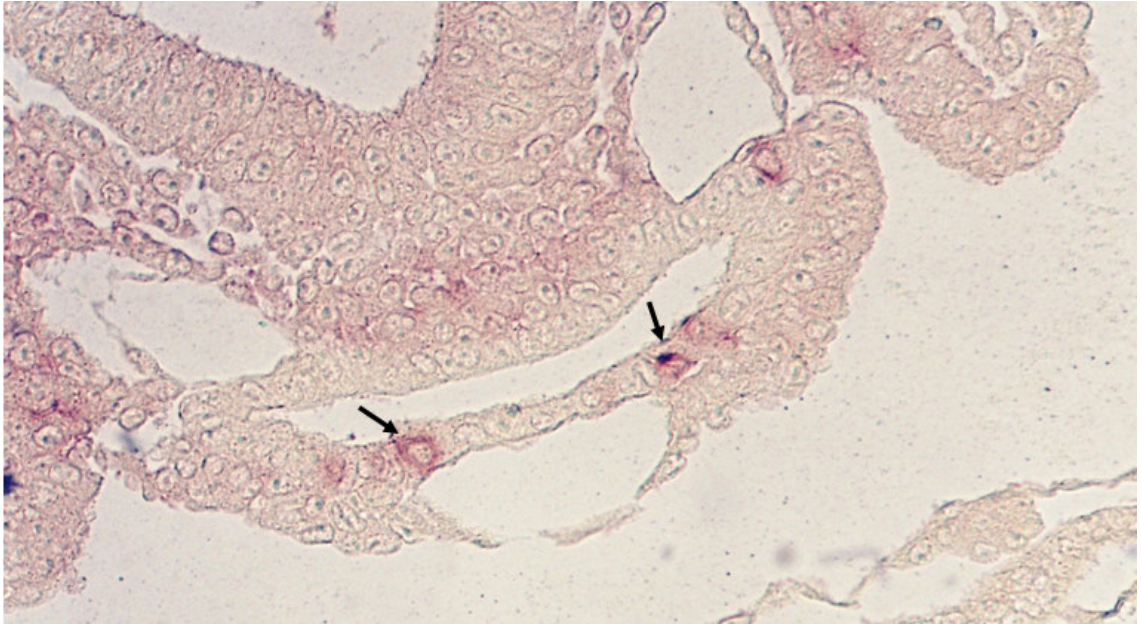
Şekil 4-8 Deney grubu. Şekil 4-5 in büyütülmüş ışık mikroskopi resmi. Alkalen fosfataz reaksiyonu pozitif primordial germ hücreleri (oklar). Alkalen Fosfataz (x40).



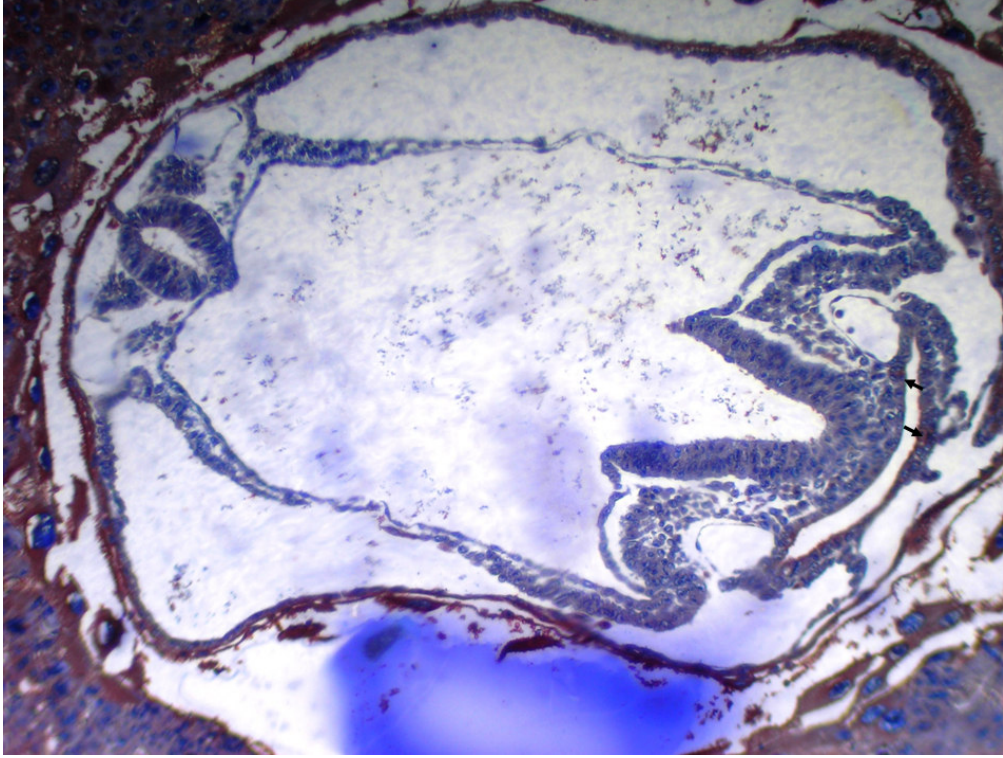
Şekil 4-9 Deney grubu. TDH: Trofoblastik dev hücreler; NE: Nöroektoderm hücreleri; VK: Vitellus kesesi. Hematoksilen&Eozin (x4).



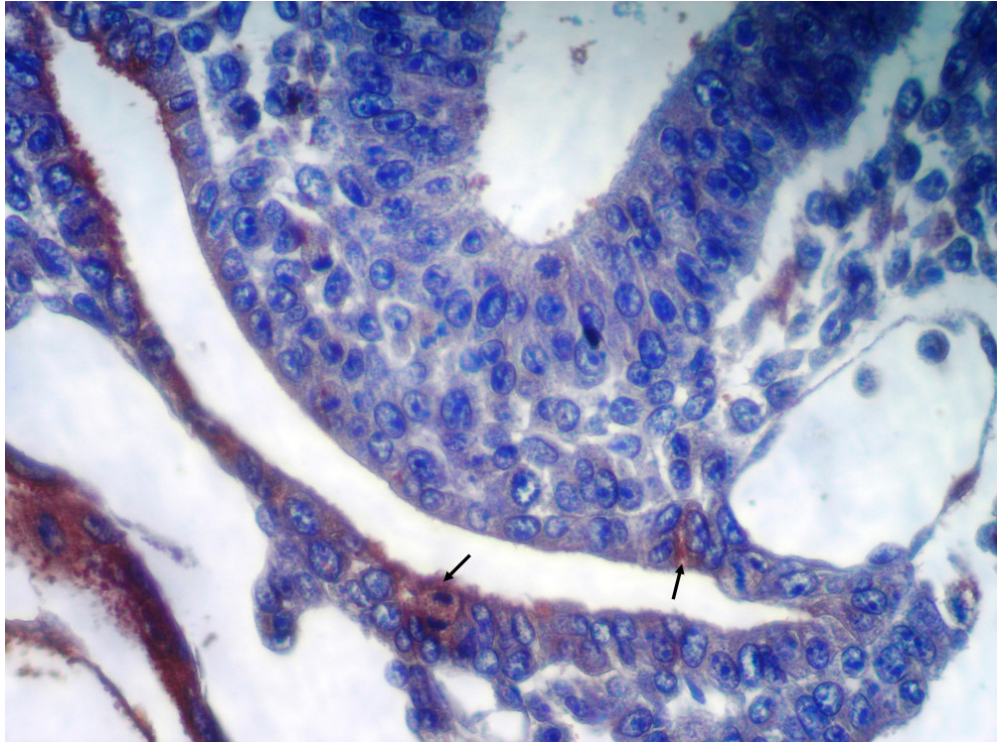
Şekil 4-10 Deney grubu. Alkalen fosfataz aktivitesini gösteren primordial germ hücreleri (oklar). Alkalen Fosfataz (x4).



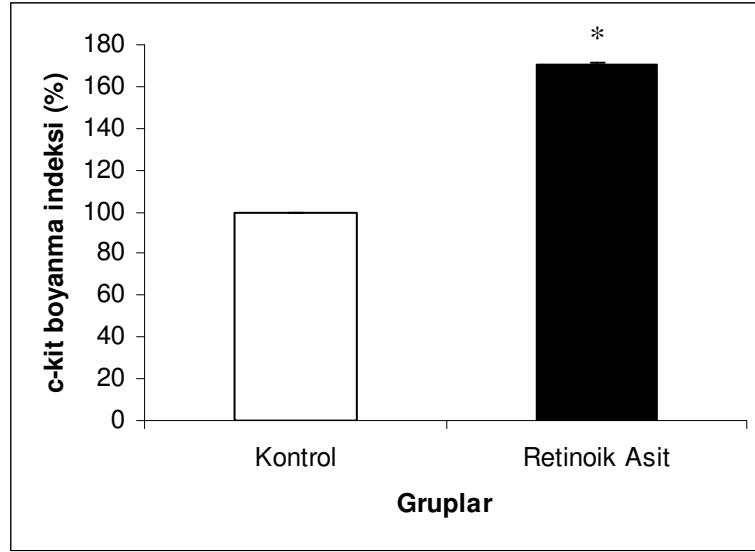
Şekil 4-11 Deney grubu. Şekil 4-10'nun büyültülmüş ışık mikroskobisi resmi. Alkalen fosfataz reaksiyonu pozitif primordial germ hücreleri (oklar). Alkalen Fosfataz (x10).



Şekil 4-12 Primordial germ hücrelerinin c-kit (+) immunreaksiyonu (oklar) genel görünüm (x10).



Şekil 4-13 Şekil 4-12 büyütülmüş mikroskopik resmi. c-kit reaksiyonu (+) primordial germ hücreleri (oklar) (x40)



Şekil 4-14 Kontrol ve deney grubu primordial germ hücrelerinin c-kit ile işaretlenmelerinin karşılaştırılmasının grafik ile gösterimi.

Grafikteki sonuçlar ortalama $\pm$ SEM olarak % olarak ifade edilmiştir. *: $p_{t\text{-test}} < 0.01$.

c-kit ekspresyonunun deney grubunda kontrol grubuna göre % 70 arttığı saptandı ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p_{t\text{-test}} < 0.01$).

5. TARTIŞMA

Primordial germ hücrelerinin gelişim mekanizmaları hakkında daha fazla bilgi edinmek, son yıllarda çok sayıda araştırmanın ana konusunu oluşturmaktadır (2, 5, 10, 25, 26, 27). Bu amaçla yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda alkalen fosfataz reaksiyonu ile primordial germ hücreleri histokimyasal olarak belirlenmektedir (9, 10, 29, 38). Bu hücreler için çok sayıda başka marker ortaya çıkmasına rağmen kolay uygulanabilir olması dolayısıyla bu boya yöntemi hala önemini korumaktadır. Birçok alkalen fosfataz boyası metodu mevcuttur. Bizim çalışmamızda alkalen fosfataz aktivitesini göstermek için 1990 yılında Ginsburg ve arkadaşlarının uyguladığı boyama metodu kullanıldı. Bu çalışma, embriyonal gelişimin 7. ve 8. günündeki farelerden alınmış etanol: asetik asit fiksatifinde tespit edilmiş embriyolarda gerçekleştirilmiştir. Alkalen fosfataz aktivitesi gösteren primordial germ hücrelerinin çoğunlukla yan yana birer çift olacak şekilde izlenmesi dolayısıyla mitoz bakımından oldukça aktif olduklarını ileri sürülmüştür (13).

Alkalen fosfataz aktivitesinin primordial germ hücrelerinde biyolojik bir rolü olduğu ancak bu rolün yalnızca bu hücrelere özgü olmadığı kabul edilmektedir (9, 13, 29). Primordial germ hücrelerinin spesifikleştiği evreden itibaren farklılaşma evrelerine kadar mitotik çoğaldıkları bilindiğinden alkalen fosfataz enziminin inorganik fosfatı serbestleştirdiği için hücre döngüsünde görev alabileceği düşünülmektedir (29, 39).

Escalante-Alcalde ve arkadaşlarının dokuya özgü olmayan alkalen fosfatazın aktivitesini düzenleyen mekanizmasını anlamak için, AB-1 soyu embriyonik kök hücre kültüründe bu fosfatazın promotörleri olan ekzon 1A (E1A) ve ekzon 1B (E1B)'in transfeksiyon kültürlerini all trans-retinoik asite maruz bırakılmıştır. Ayrıca 8,5; 10,5; 11,5 ve 12,5 günlük transgenik embriyolardan elde ettikleri saflaştırılmış primordial germ hücrelerinin ekstraksiyonları ile in vitro örneklerinin alkalen fosfataz aktivitelerini in situ jel analizi ile belirlemişler ve alkalen fosfataz mRNA RT-PCR metodunu uygulamışlardır. Bunların sonucunda retinoik asite maruz bırakılan embriyonik kök hücrelerinde, ekzon 1A promotörünün dokuya özgü olmayan alkalen fosfataz ekspresyonunu düzenlediğini, gelişimin 8,5. ila 12,5 günleri arasındaki embriyolara direkt etki ederek arttırdığını ileri sürmüşlerdir (9). Bizim çalışmamızda deney

gruplarına ait hücrelerde kontrol grubuna nazaran daha kuvvetli pozitif alkalen fosfataz reaksiyonu tespit etmemiz bu literatür bulgusu ile paraleldir.

Germ hücrelerinde retinoik asit etkisinin moleküler mekanizması henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. 1995 yılında Koshimizu ve arkadaşlarının primordial germ hücresi gelişimi mekanizmaları hakkında daha fazla bilgi edinmek için in vitro kokültür sistemi kullanarak gerçekleştirdikleri bu çalışmada 8,5 günlük embriyolardan saflaştırılmış göçücü primordial germ hücrelerine retinoik asit uygulandığında, primordial germ hücrelerinin proliferasyonunu çarpıcı bir şekilde arttırdığını gözlemlemişlerdir. Yine bu hücrelerin kültürdeki 2. ve 3. günler sonrasında retinoik asite maruz gruplarının sayıları kontrollere göre %200 oranda arttığını, BrdU inkorporasyonu sonucunda kontrole göre proliferasyon aktivitelerindeki artışın yüksek derecede anlamlı olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada 11,5. günlük embriyolardan alınan primordial germ hücrelerinin kokültür sistemi koşulları birkaç günde hızlı bir düşüş gösterdiğini ancak retinoik asitin eklenmesi sonucunda primordial germ hücrelerinin mitotik aktivitelerinin uyarıldığını ve farklılaşmalarının geciktirildiğini saptamışlardır.

Morita ve Tilly'nin yaptıkları bir çalışmada; retinoik asitin fetal fare yumurtalıklarının gelişiminde germ hücre proliferasyonunun aktivatörü ve hayatta kalımlarını sağlamak gibi işlevleri olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Aynı çalışmada retinoik asit tarafından oogoniyalarda yeni gen ekspresyonunu ve buna özgü protein sentezini gerçekleştirdiğini iddia etmişlerdir (28).

c-kit faktörü, primordial germ hücrelerine özgü bir gen değildir, ancak gelişim esnasında bu hücrelerin proliferasyonlarında, göçlerinde, hayatta kalmalarında ve farklılaşmalarında etkili olduğu bilinmektedir (26, 27, 36). c-kit ligantı ise Stem Cell factor olarak bilinen SCF'dir ve reseptörün ekstrasellüler alanına bağlanarak etkileşirler (33, 36). Farini ve arkadaşları in vitroda 10,5 ve 11,5 günlük izole edilmiş primordial germ hücreleri ile gerçekleştirdikleri çalışmada c-kit/SCF etkileşiminin, bu hücrelerin proliferasyonları, farklılaşmaları, gelişmeleri, hayatta kalmaları yanısıra göçleri esnasındaki adezyon ve kemoatraktan görevi ile etkili olduğunu gözlemlemişlerdir (10).

Farklı dokularda da ekspres edilen c-kit, genelde yerleşimi sebebiyle hücre membranında reaksiyon verir. 2005 yılında Stoop ve arkadaşlarının, insan fetal gonad dokularında, proliferasyonda ve farklılaşmada etkili çok sayıdaki çeşitli faktörlerin

ekspresiyonlarını incelemek amacı ile gerçekleştirdikleri bir immünohistokimyasal çalışmada, erken dönemde germ hücrelerinin c-kit immünohistokimyasal uygulaması sonucu membraner ve sitoplazmik boyandığını tespit etmişlerdir (38). Bu bulguları, bizim uyguladığımız immünohistokimyasal boyama sonucu oluşan c-kit pozitif reaksiyonunun membranda yoğun olmak üzere sitoplazmada da saptanması ile uyumludur.

Yakın zamanlı çalışmalarda retinoik asitin, dişi ve erkek gonadların her ikisinde de mayozun başlaması için temel olan *Stra8* gen ekspresyonunun indüklediği gösterilmiştir (20, 44). c-kitin retinoik asit ile etkileşimleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Yaklaşık 10 yıl önce farklılaşmamış F9 teratoma hücreleri ile gerçekleştirilen bir çalışmada, hücrelere c-kit dizisi klonlanarak retinoik asitin etkisine bakılmıştır. Sonucunda ise retinoik asitin c-kit ekspresyonunu arttırdığı ve bunun 2 farklı transkripsiyonel bölgeden gerçekleştiği izlenmiştir. Bu bulgular c-kit genin transkripsiyonunun bir kontrol kompleksi tarafından düzenlendiğini ve retinoik asit ile sıklık AMP'ye cevap veren farklı kontrol bölgeleri olduğu ileri sürülmüştür (16).

Neonatal fare testis kısa süreli kültürlerinde, germ hücrelerinin invitro farklılaşmalarını retinoik asitin indükleyip indüklediğini anlamak amacı ile Zhou ve arkadaşları bir çalışma gerçekleştirdiği çalışmada in vitroda retinoik asitin, 1) *Stra 8* ve c-kit ekspresyonu artırdığını, 2) DNA replikasyonu artırdığı, 3) spermatogonial farklılaşma marker geni *kit*'in ekspresyonunu indüklediği ve 4) anlamlı şekilde retinoid metabolizmasına, taşınmasına ve sinyalleşmesine dahil gen grubunun ekspresyonunu uyardığı gözlemlenmiştir (44). Bu çalışmadaki retinoik asitin c-kit ekspresyonunun artış bulgusu, bizim çalışmamızdaki c-kit ekspresyonunun deney grubunda kontrol grubuna göre % 70 artış gösterdiği ve istatistiksel olarak anlamlı olan bulgumuz ile uyumludur.

Sonuç olarak in vivoda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda, primordial germ hücrelerinin, alkalin fosfataz aktivitelerinin deney grubu hücrelerinde daha şiddetli olması, c-kit (+) reaksiyonlarının deney grubunda daha fazla izlenmesi retinoik asitin primordial germ hücrelerinin gelişimini arttırdığını düşündürüyor. Retinoik asitin gonadal gelişime etkisinin daha net sonuçlarına ulaşabilmek için, in vivoda

embriyoların daha ileri farklı evrelerinde primordial germ hücrelerinde bu parametrelere ek olarak ekstrasellüler ve somatik faktörlerini de incelemek gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Allenby G., Bocquel M. Saunders M., Kazmer S., Speck J., Rosenberger M., Lovey A., Kastner P., Grippo J.F., Chambon P. And Levin A.A. Retinoic acid reseptor and retinoid X reseptors: interaction with endogenous retinioic acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993; **90**: 30-34
2. Anderson R., Trevor K., Copeland B., SchoÈlerc, Heasmana J., Wylie C. The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mechanisms of Development*. 2000; **91**: 61- 68
3. Ashman L.K. The biology of stem cell factor and its receptor c-kit. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 1999, **31**:1037-1051.
4. Bendel-Stenzel M, Robert Anderson, Heasman J and Wylie C. The origine and migration of primordial germ cell in the mouse. *Cell& Developmental biology*. 1998; **9**: 393-400
5. Bowles J and Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development*. 2007; **134**: 3401- 3411
6. Carlson B.M. *Human Embryology and Developmental Biology*; Philadelphia USA: Mosby; Elsevier 2009 (pp 80)
7. Chuva de Sousa Lopes S., Hayashi K. And Surani M. A. Proximal viseral endoderm and extraembryonic ectoderm regulate the formation of primodial germ cell precursors. *Biomed Central Developmental Biology* 2007; **7**:140
8. Dökmeci İ. *Farmakoloji Temel Kavramlar*. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevleri; 2000 (pp 810-811)
9. Escalante-Alcalde D., Recillas-Taga F., Hernandez-Garcia D., Castro-Obrgon S., Tero M. Garattini E. And Corvarrubias L. Retinoic acid and methylation cis-regulatory elements control the mouse tissue non-spesific alkaline phosphatase gene expression. *Mechanisms of Development* 1996; **57**: 21-32
10. Farini D., La Sala G., Tedesco M. , DeFelici M. Chemoattractant action and molecular signalling pathways of kit ligand on mouse primordial germ cell. *Developmental Biology*. 2007, **306**: 572-583
11. Feng H.L., Sandlow J.I. and Zheng L.J. c-kit receptor and its possible function in human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 2004, **70**:103-110.

12. Germain p., Chambon P., Eichele G., Evans M.R., Lazar M.A., Leid M., De Lera A.R., Lotan R., Mandelsdrof D.J.and Gronemeyer H. International union of pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. *Pharmacological Reviews*. 2006; **58**:712-725
13. Ginsburg M., Snow M.L.and McLaren A. Primordial germ cell in the mouse embryo during gastrulation. *Development*. 1990; **110**: 521-528
14. Gomperts M., Garcia-Castro M., Wylie C.and Heasman J. Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development*.1994; **120**:135-141
15. Grimaldi P., Rossi P., Dolci S., Ripamonti B. And Geremia R. Molecular genetics Of male infertility: stem cell factor/c-kit system. *American Journal of Reproductive Immunology* . 2002, **48**: 27-33
16. Hayashi S.-I., Kunisada T., Ogawa M. and Nishikawa S.-İ. Identification of the control region for mouse c-kit gene transkription induced by retinoic acid. *DNA Research*. 1995.**2**: 211-218
17. Kayaalp O.(ed) *Rasyonel Tedavi Yöniünden Tıbbi Farmakoloji* Ankara Hacettepe-taş 2005 (pp 1307-1314)
18. Koshimizu U., Tetsuya T, Watanabe M., Saito M., Shirayosohi Y, Kishimoto T and Nakatsuji N. Functional requirement of gp130- mediated signalling for growth and survival of mouse primordial germ cells in vitro and derivation of embriyonic germ cells (EG). *Development*. 1996;**122**:1235-1242
19. Koshimizu U., Watanabe M and Nakatsuji N. Retinoic is an potent growth activator of mouse primordial germ cell in vitro. *Developemental Biology* 1995; **168**:683-685
20. Koubova J., Douglas B.M., Zhou Q., Capel B., Griswold M.D.snd Page D.C. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.2005; **103**: 2474-2479.
21. Li H. and Kim K.H.. Retinoic acid inhibits rat XY gonad development by blocking mesonephric cell migration and decreasing the number of gonocytes. *Biology of Reproduction* 2004; **70**: 687-693
22. MacGregor G: R. Zambrowicz B.P and Soriano P. Tissue non-spesific alakaline phosphatase is expressed in both embriyonic and extra embriyonic lineage

- during embryogenesis but not required for migration of primordial germ cell. *Development* 1995;**121**:1487-1496
23. Machev N., Fuhrmann G., Viville S. Ontogenèse des cellules Germinales primordiales. *Medecine/Sciences*. 2004 **20**:1091-1095
 24. Maudit C, Hamamah S. and Benahmed M. Stem Cell Factor/ c-kit system in spermatogenesis. *Human Reproduction*. 1999; **5**:535-545
 25. McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2000; **163**: 3-9
 26. McLaren A. primordial germ cell in mouse. *Developmental Biology*. 2003; **262**: 1-15
 27. Molyneaux K. Wylie C. Primordial germ cell migration. *International Journal of Development Biology*. 2004. **48**: 537-544
 28. Morita Y. and Tilly J.L. Segregation of retinoic acid effects on fetal ovarian germ cell mitosis versus apoptosis by requirement for new macromolecular synthesis. *Endocrinology*. 1999; **140**: 2696-2703
 29. Narisawa S. Hofmann M, Ziomek C.A. and Millan J.L. Embryonic alkaline phosphatase is expressed at M-phase in the mouse spermatogenic lineage of the mouse. *Development*. 1992; **116**: 159-165
 30. Pereda J., Zorn T. ve Soto-Suazo M. Migration of human and mouse primordial germ cells and colonization of developing ovary: an ultrastructural and cytochemical study *Microscopy Research and Technique*. 2006. **69**: 386-395
 31. Robinson L.L., Gaskell T.L., Saunders P.T.K., Anderson R.A. Germ specific expression of c-kitin human fetal gonad. *Molecular Human Reproduction* 2001. **9**: 845-852
 32. Roskoski Jr.R. Signaling by kit protein-tyrosine kinase-the stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005. **337**: 1-13
 33. Roskoski Jr.R. (2005) Structure and regulation of kit protein-tyrosine kinase- the stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338** 1307-1315
 34. Ross S. A., McCaffery, Drager U.C. and De Luca L. Retinoids in embryonal development. *Physiological Reviews*. 2000.**80**: 1021-1054.

35. Rülh R., Plum C., Elmazar M.M.A. and Nau H. Embryonic subcellular distribution of 13-cis- and all-trans retinoic acid indicates differential cytosolic/nuclear localization. *Toxicological Sciences*. 2001. **63**: 82-89
36. Saiti D. And Lacham-Kaplan O. Mouse germ cell development in-vivo and in-vitro. *Biomarker Insights*. 2007; **2**, 241- 252
37. Sette C., Dolci S., Geremia R. Ve Rossi P. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene Products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *International Journal of Development Biology*. 2000. **44**: 599-608
38. Stoop H., Honecker F., Cools M., de Krijger R., Bokemeyer C. and Looijenga. Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. *Human Reproduction*. 2005. **20**: 1466-1476.
39. Tam P.P.L. and Snow Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *Journal of Experimental Morphology*. 1981. **64**: 133-147
40. Thinet C. Interets diagnostique et pronostique de la détection immunohistochimique du produit d'expression du proto- oncogene c-kit dans les tumeurs cutanées a mastocytes du chien et du chat (diplôme d'état de docteur vétérinaire tezi) école nationale vétérinaire de nantes (Fransa) 2004. (pp 78)
41. Tsang T.E., Khoo PL, Jamieson R.V., Zhou S.X. Ang SL., Behringer R. Ve Tam P.P:L. The Allocation and differentiation of mouse primordial germ cells. *International Journal of Developmental Biology*. 2001. **45**: 549-555
42. Uzunoğlu N. Alkalen Fosfataz Enziminin Fizikokimyasal Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 1998; **18**: 69-76
43. Yoshida H., Takakura N., Kataoka H., Kunisada T. and Nishikawa S. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology*. 1997; **184**: 122- 137.
44. Zhou Q., Li Y., Nie R., Mitchell D., Evanoff R.M., Pouchnik D., Banasik B., McCarrey J.R. and Small C. Griswold M.D. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (stra 8) and maturation of murine gonocytes and induced by retinoic acid in vitro. *Biology of Reproduction*. 2008. **78**: 537-545.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 19

13.02.2008

Sn. Prof. Dr. Leyla Tapul, İ. Ü. İstanbul Tıp Fakültesi

Karar No: 13
Başvuru Tarihi: 17.01.2008

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, YLÖ. Türkan Sarıoğlu'na ait "Fare embriyolarında gonadal gelişim üzerine retinoik asitin etkilerinin araştırılması." isimli proje Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

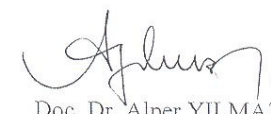

Prof. Dr. Mehmet KAYA
İ. Ü. HADYEK Başkanı


Prof. Dr. Müjdat UYSAL
Üye


Prof. Dr. Nuriye AKEV
Üye

Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN
Üye (Raporlu)

Prof. Dr. Cüneyt K. ORAL
Üye


Doç. Dr. Alper YILMAZ
Üye


Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye


Avukat Safiye ALTUN
Üye


Mak. Müh. Seyyettin AVCI
Üye

İstanbul Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı
Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü
Vakıf Güreba Caddesi 34280 Şehremini-İSTANBUL
TEL : (0 212) 414 20 00/33375
E mail : deneyhyv@istanbul.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Türkan	Soyadı	SARIOĞLU
Doğ.Yeri	Essonne, FRANSA	Doğ.Tar.	05/05/1975
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	31255856500
Email	turkansarioglu@gmail.com	Tel	05367647643

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	
Lisans	İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2005
Ön Lisans	İ.Ü. S.H.M.Y.O Tıbbi Laboratuvar Programı	1997
Lise	Galatasaray Lisesi	1994

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Laboratuvar teknikeri	İstanbul Bilim Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Multi Disipliner Laboratuvarları	-2006-....
2.	Laboratuvar teknikeri	Kadir Has Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıp fakültesi Temel Tıp Bilimleri Multi Disipliner Laboratuvarı	1999-2006-
3.	Laboratuvar teknikeri	İstanbul Mikrocerrahi hastanesi Tüp Bebek ünitesi Genetik Lab.	1999-
4.	Laboratuvar teknikeri	Acıbadem hastanesi merkez laboratuvarı Hematoloji Lab.	1998-1999
5	Laboratuvar teknikeri	Yedigen biyoteknoloji araştırma merkezi	1997-1998

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
Fransızca	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	91	

İngilizce	İyi	Orta	Orta		
------------------	-----	------	------	--	--

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	58,791	48,450	54,622
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows office	İyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Katıldığı kurslar:

- Deney Hayvanları Biyolojik Araştırmalarda Kullanılması Kursu, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı (2007)

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Kültür Bilincini Geliştirme Vakfının “Kültür Karıncaları” projesinin 2005 den beri aktif gönüllüsü.