

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANNE SÜTÜ KAYNAKLI MİKROKİMERİZMDE
MİKROKİMERİK HÜCRELERİN TESPİTİ VE ANALİTİK
TANIMLANMASI**

Mehmet Şerif AYDIN

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

KONYA-2016

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANNE SÜTÜ KAYNAKLI MİKROKİMERİZMDE
MİKROKİMERİK HÜCRELERİN TESPİTİ VE ANALİTİK
TANIMLANMASI**

Mehmet Şerif AYDIN

DOKTORA TEZİ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

2. Danışman

Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK

KONYA-2016

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Mehmet Şerif AYDIN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Hasan CÜCE
KTO Karatay Üniversitesi

İmza 

Danışman: Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Selçuk Üniversitesi

İmza 

Üye: Prof. Dr. S. Serpil KALKAN
Necmettin Erbakan Üniversitesi

İmza 

Üye: Prof. Dr. H. Hüseyin DÖNMEZ
Selçuk Üniversitesi

İmza 

Üye: Yrd. Doç. Dr. Nadir KOÇAK
Selçuk Üniversitesi

İmza 

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ender ERDOĞAN
Enstitü Müdürü V.

ÖNSÖZ

Bu çalışmada, anne sütü yoluyla anne ve yavru arasındaki hücre geçişi ve hücrelerin yavrunun sinir sistemi içerisindeki akıbetleri araştırılmıştır.

Eğitimim aşamasında her türlü ilgisini ve desteğini gördüğüm, gerek akademik gerekse hayat bilgilerini benimle paylaşan çok kıymetli danışman hocalarım Prof. Dr. Ender ERDOĞAN ve Prof. Dr. Gürkan ÖZTÜRK'e,

Eğitim ve tez hayatımda bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, her zaman yanımda olan çok değerli hocam Prof. Dr. Mukaddes EŞREFOĞLU'na ve çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Nihan BAYINDIR ve Arş. Gör. Olgu Enis TOK'a,

Çalışmamın her aşamasında bana çok önemli yardımları dokunan sevgili arkadaşlarım Yük. Lis. Öğrencileri Emre VATANDAŞLAR ve Esra Nur EKMEKÇİOĞLU'na,

Hayatım boyunca her konuda destek olan babam Prof. Dr. Sabahattin AYDIN, annem Uzm. Dr. Sibel AYDIN kardeşlerim Muhammed İkbâl ve Mahmut Emre AYDIN'a; her zaman sevgisini, ilgisini ve desteğini gördüğüm, ömrümü paylaştığım sevgili eşim Merve ve canım kızım Mîna'ya sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
ÖZET.....	vii
SUMMARY	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Anne Sütü	2
1.1.1. Bileşimi	2
1.1.2. Meme Bezi ve Laktasyon	5
1.2. Mikrokimerizm	9
1.2.1. Fetal Mikrokimerizm.....	10
1.2.2. Maternal Mikrokimerizm	10
1.3. Sinir Sistemi	13
1.3.1. Sinir Sistemi Hücreleri	15
2. GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
2.1. Deney Grupları	20
2.2. Genotipleme	21
2.3. İmmünohistokimyasal Boyama	23
2.4. Hücrelerin Elde Edilmesi	24
2.4.1. Sütteki Hücreler.....	24
2.4.2. Kan Hücreleri	24
2.4.3. Beyin Dokusundaki Hücreler	24
2.5. İmmünohistokimyasal Boyama	25
2.6. Akım Sitometrisi Analizi.....	25
2.7. Kantitatif PCR (qPCR) Yöntemi	27
2.8. DNA İzolasyonu.....	30
2.9. Mikroskopik İnceleme.....	30
2.10. İstatistiksel Analiz	30
3. BULGULAR	31
3.1. Süt Örneklerinin İncelenmesi	31
3.2. Kan Örneklerinin İncelenmesi	34
3.3. Beyin Örneklerinin İncelenmesi	38
3.3.1. Akım Sitometrisi Analizi	38
3.3.2. Mikroskopik İncelemeler	41
3.3.3. qPCR Sonuçları	51

4. TARTIŞMA	54
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	62
6. KAYNAKLAR.....	63
7. EKLER.....	69
8. ÖZGEÇMİŞ	70



SİMGELER ve KISALTMALAR

FHM: Fetal hücre mikrokimerizmi

MHM: Maternal hücre mikrokimerizmi

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

HLA: İnsan lökosit antijeni

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

FACS: Floresan aktive hücre ayırıştırma

FISH: Floresan in situ hibridizasyon

qPCR: Kantitatif PCR

VEGF: Vasküler endoteliyal büyüme faktörü

MSS: Merkezi sinir sistemi

PSS: Periferik sinir sistemi

SSS: Somatik sinir sistemi

OSS: Otonom sinir sistemi

gER: Granüllü endoplazmik retikulum

GFAP: Gliyal fibriller asidik protein

PLP: Proteolipid protein

MOG: Miyelin oligodendrosit protein

OMgp: Oligodendrosit miyelin glikoprotein

MPB: Miyelin bazik protein

GMP: Granülosit/monosit progenitör

PBS: Fosfat tamponlu tuz

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

FITC: Floresan isotiyosiyanat

rpm: Dakika/devir sayısı

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Anne Sütü Kaynaklı Mikrokimerizmde Mikrokimerik Hücrelerin Tespiti ve Analitik Tanımlanması

Mehmet Şerif AYDIN
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2016

Anne sütü, doğumdan itibaren bebeklerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan tüm enerji ve besin maddelerini içeren vazgeçilmez bir besin kaynağıdır. Anne sütü içerisinde çeşitli karbonhidrat, yağ ve proteinlerin yanı sıra farklı tipte hücreler de bulunmaktadır. Çalışmamızda bu hücrelerin emzirme yoluyla yavrunun sinir sistemine geçişleri ve farklılaşma özellikleri araştırılmıştır.

Anne sütündeki hücrelerin yavruya geçişini araştırmak amacıyla, tüm hücrelerinde yeşil floresan protein üretebilme yeteneğindeki transgenik fareler anne olarak kullanılmıştır. Bu farelerin emzirdiği normal tipteki farelerde, anne sütünden emzirme yoluyla gelen yeşil floresan protein üreten hücreler mikroskopik inceleme, akım sitometrisi ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu teknikleriyle araştırılmıştır.

Emzirme sonrası farklı bekleme süreleri sonunda yapılan incelemelerde; emzirme yoluyla anneden gelen hücrelerin yavrunun sindirim sisteminden geçerek kan dolaşımına katıldığı görülmüştür. Bu hücrelerin kan dolaşımından yavrunun beyin dokusuna geçtiği belirlenmiştir. Beyin dokusunda tespit edilen bu hücrelerin NeuN ve GFAP eksprese edebilen nöron ve glia benzeri hücrelere farklılaştıkları görülmüştür.

Çalışmamız sonucunda anne sütünden emzirme yoluyla yavrunun beyin dokusuna hücre geçebileceği ortaya koyulmuştur. Bu hücrelerin farklılaşabilme yeteneğinde oldukları ve beyin dokusundaki hücrelere dönüşebildikleri belirlenmiştir. Tüm bunlar anne sütünün yavru için vazgeçilmez bir besin kaynağı olmasının ötesinde, yavru için yenilenebilir ve sürekli bir hücre kaynağı da olabileceğini göstermiştir. Önümüzdeki çalışmalarda bu hücrelerin yavrudaki fizyolojik ve patolojik süreçlerle ilişkilerinin ortaya çıkarılması bu alanda önemli bir adım olacaktır.

Anahtar Sözcükler: Anne sütü; merkezi sinir sistemi; mikrokimerizm

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Detection and Analytical Description of Microchimeric Cells in Breast Milk Induced Microchimerism

Mehmet Şerif AYDIN
Department of Histology and Embryology

PhD THESIS / KONYA-2016

Breast milk is an indispensable food source which contains all the energy and nutrients necessary for growth and development of infants from birth. There are different types of cells in breast milk as well as a variety of carbohydrates, fat and protein. In our study the passage to the nervous system of baby through breast-feeding and differentiation properties of these cells are investigated.

With the purpose of investigation of the passage of cells in breast milk to infant, transgenic mice with the ability of producing green fluorescent protein in all cells were used as mothers. On normal type mice breast fed by these mice, the cells producing green fluorescent protein that were passed from milk through breast-feeding were investigated by microscopic examination, flow cytometry and quantitative polymerase chain reaction techniques.

At the end of the examinations with various waiting times after breast-feeding, it was seen that the cells passed from the mother through breast-feeding entered the bloodstream of the baby by passing through the digestive system. It was determined that these cells were passed from the bloodstream to brain tissue of the baby. It was seen that these cells detected in brain tissue differentiated into neurons and glia-like cells which express NeuN and GFAP.

As a result of our study, it has been demonstrated that maternal cells could pass from breast milk to brain tissue of the baby through breast-feeding. It was determined that these cells are capable to differentiate to the cells of brain tissue. All of the data showed that breast milk could also be a renewable and constant source of cells as well as being an indispensable food source for the baby. Through further studies, the identification of the relationships of these cells with physiological and pathological processes on the baby will be an important step in this area.

Keywords: Breast milk; central nervous system; microchimerism

1. GİRİŞ

Anne sütü, doğumdan itibaren bebeklerin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olan tüm enerji ve besin maddelerini içeren vazgeçilmez bir besin kaynağıdır. Anne sütünün ve emzirmenin bebekler için başta beslenme olmak üzere, bağışıklık, gelişimsel ve psikolojik yönden pek çok yararı vardır.

Meme bezi, gebelikte ve emzirme sürecinde süt üretip salgılamak üzere epitel ve bağ dokusundaki değişimlerle olgunlaşan bir organdır. Memede gerçekleşen bu değişimler memede bulunan kök hücreler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu kök hücrelerin pluripotent özellikleri sayesinde sadece memeye özgü hücelere değil, aynı zamanda farklı tipteki dokuların hücrelerine de dönüşebildiği gösterilmiştir (Hassiotou ve ark 2012). Anne sütü içerisinde meme bezinden kaynaklanan kök hücrelerin bulunması, bu hücrelerin farklılaşma kapasitelerinin ve emzirme sonrası yavru ile olan ilişkilerinin araştırılması konusunda ilham vericidir.

Mikrokimerizm, bir bireyin az miktarda hücresinin genetik olarak farklı başka bir bireyde immün yanıt oluşturmada bulunması durumudur. Mikrokimerizmin en yaygın kaynağı gebeliktir. Gebelik sırasında fetal hücreler kan dolaşımı ve plasenta yolu ile annenin dolaşımına geçerek fetal hücre mikrokimerizmine (FHM) neden olurlar. Aynı şekilde gebelikte annenin hücrelerinin yavrulara geçmesine ise maternal hücre mikrokimerizmi (MHM) adı verilir. Bir diğer mikrokimerizm şekli ise, gebelikte iki fetüs arasındaki hücre geçişidir (van Dijk ve ark 1996). Bunların dışında doğum sonrasında emzirme sırasında anne sütü yoluyla anneden yavruya geçebilecek olan hücreler de MHM kapsamında değerlendirilebilir.

Annenin yavrusunu emzirmesinin maternal mikrokimerizm ile olan ilişkisi hakkında çok sınırlı bilgi bulunmaktadır. Doğum sonrasında annenin yavruyu emzirmesiyle birlikte, kalıtsal olmayan maternal antijenlerin yavruya geçmesine bağlı olarak yavru karaciğerinde halihazırda görülen MHM oranında artış olduğu gösterilmiştir (Dutta ve Burlingham 2010). Sütte bulunan çeşitli hücre tipleri dışında mRNA ve microRNA gibi çeşitli hücre materyallerinin de mikro veziküller içerisinde süt yoluyla yavruya geçebildiği bildirilmiştir (Zhou ve ark 2012). Bu durumda sütte bulunan bu yapıların yavruların hücrelerine geçerek gen ekspresyonuna katılması ve çeşitli fonksiyonel özellikler ortaya çıkarması muhtemeldir. Böylece hem çeşitli

hücrelerin hem de hücrel materyallerin süt yoluyla yavruya geçerek çeşitli sinyal mekanizmalarını etkilemesi ihtimal dahilindedir.

Sütte bulunan kök hücre popülasyonuna herhangi cerrahi bir metot kullanılmaksızın yalnızca emzirme sırasında süt yoluyla ulaşılabilmesi, bu konuyla ilgili hem insan hem de hayvan çalışmaları yapılabilmesi açısından çok önemli bir avantajdır. Tüm bu bilgiler, sütte bulunan kök hücrelerin fizyolojik özellikleri ve rejeneratif uygulamalar amacıyla kullanılması açısından yeni bir ufuk açmaktadır. Bu açıdan, sütte bulunan kök hücrelerin diğer hücrelere farklılaşma özelliklerinin belirlenmesinin yanı sıra emzirme sırasında anne-yavru arasındaki muhtemel geçiş yollarının ve hedef yapıların detaylı olarak araştırılması gerekmektedir. Çalışmamızda, emzirme sırasında anne sütü aracılığıyla anne ve yavru arasında geçiş yaparak sinir sistemine yerleşen hücrelerin tespiti, fenotipik ve başkalaşım özelliklerinin tanımlanması, fizyolojik ve patolojik süreçlerle ilişkilerinin aydınlatılması amaçlanmaktadır.

1.1. Anne Sütü

Anne sütü ile beslenme bebeğin fiziksel, ruhsal ve zihinsel gelişiminin en iyi şekilde sağlanması açısından son derece önemlidir. Anne sütü ile beslenme, sadece beslenme sürecinde değil, yaşamın ileri dönemlerinde de olumlu etkiler sağlar. Doğum sonrası anne sütü ile beslenme bebeklerde başta enfeksiyon hastalıkları olmak üzere birçok hastalığın görülme sıklığını azaltmaktadır. Anne sütü ile beslenen bebeklerde ileri yaşlarda alerjik hastalıklar, şişmanlık, tip I diyabet, kanser, multipl skleroz, ateroskleroz gibi hastalıklara, alkol bağımlılığı gibi davranış sorunlarına daha az rastlanmaktadır (Gartner 1997). Doğumdan sonra ilk altı ayda bebeklerin sadece anne sütü ile beslenmesi gerektiği, altıncı aydan sonra ek gıdaların yanında anne sütüne ile beslemeye devam edilmesi Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilmektedir (World Health Organization 2003).

1.1.1. Bileşimi

Anne sütünün içerisindeki maddelerin miktarı kişiden kişiye değişiklik göstermekle birlikte, aynı kişide farklı laktasyon dönemlerine ve emzirme zamanının uzunluğuna göre de değişiklik gösterebilir. Annenin beslenme alışkanlığı, ilaç kullanımı, yaşı, genetik yapısı ve çevresel etkenler de anne sütünün içeriğini

etkilemektedir. Anne sütünün büyük bir bölümünü (%88) sudan oluşmakla birlikte çeşitli proteinler, vitaminler, mineraller ve yağ içermektedir (Çizelge 1.1.) (Samur 2008). Bunların dışında oligosakkaritler, hormonlar, enzimler, immünoglobülinler, laktoferrin, büyüme faktörleri, sitokinler, antienflamatuvar ajanlar ve mikrobiyal faktörleri gibi immün sistem gelişimde etkili olabilecek çeşitli biyoaktif maddeleri de içermektedir (Walker 2010).

Çizelge 1.1: Anne sütünün içerdiği maddeler (yaklaşık değerler).

Enerji ve Besin Öğeleri	Anne Sütündeki Miktar (100ml)
Enerji (kcal)	69
Protein (g)	1,3
Laktoz (g)	7
Yağ (g)	4,1
Protein (%)	7
Laktoz (%)	42
Yağ (%)	51
Vitaminler	
Retinol (µg)	60
B karoten (µg)	27
D (IU)	0,52
E (mg)	0,34
K (µg)	0,21
Tiamin (mg)	0,02
Riboflavin (mg)	0,03
Nikotinik asit (mg)	0,22
B12 (µg)	0,1
B6 (mg)	0,01
Folat (µg)	5

Çizelge 1.1 (Devam): Anne sütünün içerdiği maddeler (yaklaşık değerler).

Pantotenik asit (mg)	0,25
Biotin (µg)	0,7
C (mg)	3,7
Mineraller	
Sodyum (mg)	14
Potasyum (mg)	58
Klor (mg)	42
Kalsiyum (mg)	34
Fosfor (mg)	14
Magnezyum (mg)	3
Demir (mg)	0,07
Bakır (mg)	0,04
Çinko (mg)	28
İyot (µg)	3
Manganez (µg)	0,1
Selenyum (mg)	14
Taurin (mg)	46
Kükürt (mg)	14
Böbrek solüt yükü (mmol/l)	75-80

Anne sütünde bulunan proteinler kazein ve whey proteinleridir. Kazein/whey proteinleri oranı 40/60'dır. Bu oran anne sütü proteinlerinin bebek tarafından kolay sindirilmesini ve emiliminin yüksek olmasını sağlar. Anne sütü içerisindeki whey proteinlerinden α -laktalbümin, laktoferrin, lizozim, immünoglobülinler ve serum albümin enfeksiyonlara karşı etkili olan proteinlerdir. Laktoferrin anne sütündeki total proteinlerin %10-25'ini oluşturarak bebekleri gastrointestinal enfeksiyonlardan korur. Aynı zamanda anne sütündeki demirin biyo-yararlılığını artırır (Samur 2008).

Anne sütündeki karbonhidratların çoğunluğunu laktoz oluşturur. Laktoz; glikoz ve galaktozdan oluşmaktadır, kalsiyum ve magnezyum gibi minerallerin emilimini artırır. Süt içerisinde bulunan laktaz enzimi laktozu glikoz ve galaktoza ayırarak beyin gelişiminde vazgeçilmez olan galaktolipidler için önemli bir galaktoz kaynağı sağlar (Kawasaki 2005). Anne sütünde önemli miktarlarda glikoz, galaktoz gibi basit şekerler dışında çocuğu enfeksiyonlardan koruma özelliği olan oligosakkaritler ve diğer bazı karbonhidratlar da bulunmaktadır (Samur 2008).

Anne sütünün yağlarının %98'i trigliseritlerden oluşmaktadır. Trigliserit yapısında en fazla bulunan yağ asitleri ise palmitik ve oleik asitlerdir. Anne sütü içerisinde eicosapentaenoik asit, dakosaheksaenoik asit ve linoleik asit gibi yağ asitleri de bulunmaktadır. Anne sütü yağının sindirim ve emilimi inek sütüne oranla çok daha kolaydır. İçerdiği yağ asitleri bileşimi ve lipaz enzimi bebekte yağ emilimini kolaylaştıran etmenlerdendir (Samur 2008). Anne sütü içerisinde bulunan çoklu doymamış yağ asitleri besinsel değerlerinin dışında nöronal membranların esas yapısal elemanı olmaları ve beyin gelişimine katkıda bulunmaları gibi metabolik fonksiyonları açısından da son derece önemlidir (Collado ve ark 2015).

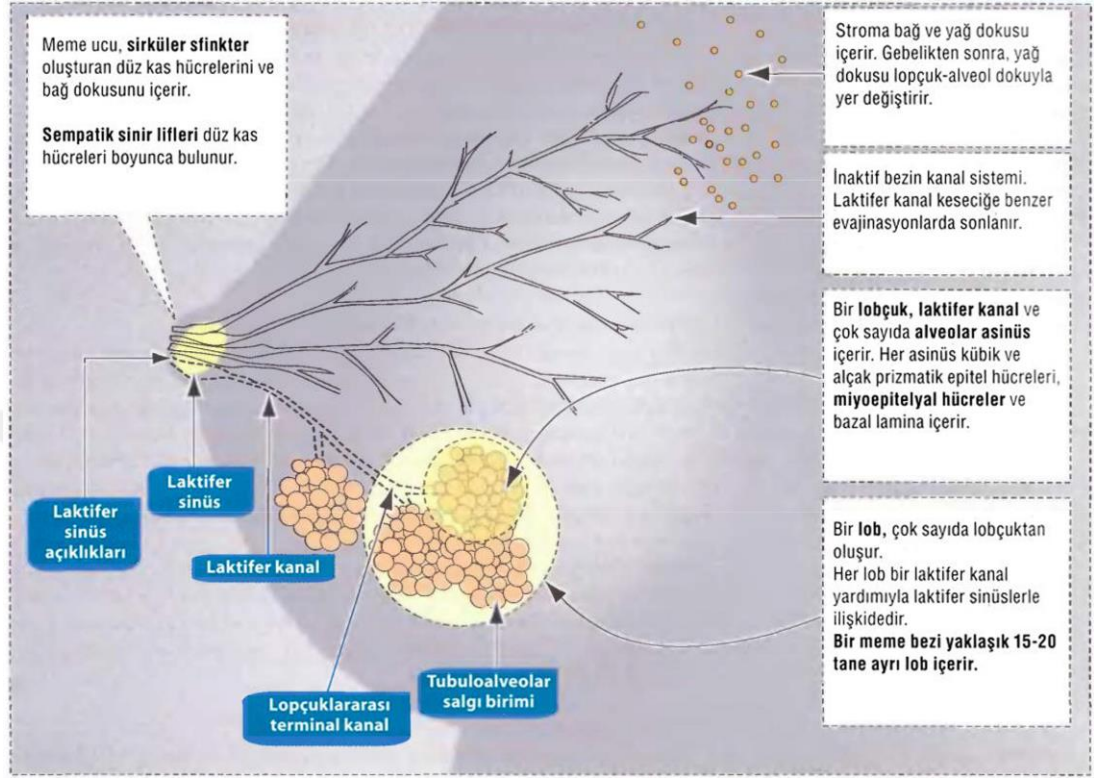
Anne sütü içerisinde interlökin, interferon, makrofaj koloni stimüle edici faktör, tümör nekrozis faktör- α ve granülosit koloni stimüle edici faktör vb. gibi sitokinler bulunmaktadır (Garofalo 2010). Bu sitokinler emzirme yoluyla bebeğe geçerek antijen uyarımı sonrası inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde ve immün sistemin oluşmasını ve gelişmesinde rol oynarlar (Gregory ve Walker 2013). Büyüme faktörleri gibi diğer moleküller enterik ve merkezi sinir sistemi gibi son derece önemli yapıların gelişmesinde rol oynarlar (Dangat ve ark 2013).

1.1.2. Meme Bezi ve Laktasyon

Göğüs veya meme bezi epidermisten gelişir. Meme ucu bol miktarda yağ bezleri içeren modifiye olmuş areola adını alan bir deri ile kaplanmıştır. Yaklaşık 15-20 tane laktifer kanal özelleşmiş laktifer süt sinüsleri boyunca meme ucunun tepesine açılır. Süt üreten meme bezinde her laktifer kanal bir lobun sütünü taşır. Meme ucu bağ doku ve dairesel sfinkter oluşturan düz kas hücrelerini içerir (Kierszenbaum 2006).

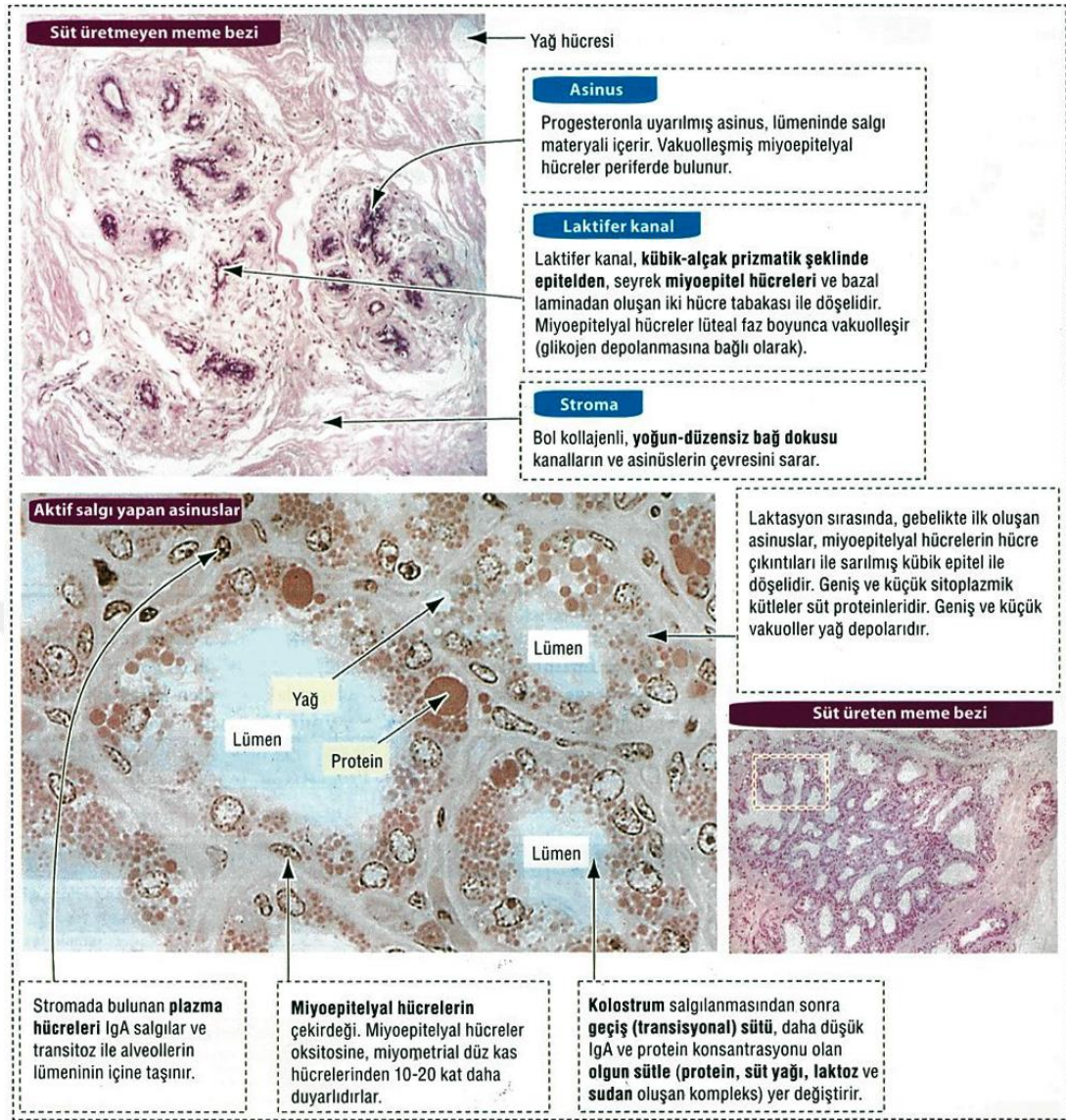
Birleşik bezlerin çoğunda olduğu gibi meme bezi de kanal sistemi, lob ve lobüllerden oluşur. Her lob göğüs yağ dokusu içine doğru genişleyen dallanmış laktifer

kanal içerir (Resim 1.1). Her laktifer kanal prizmatik veya kübik epitelle ve bunların çevresinde kesintili olarak yerleşen miyoepiteliyal hücrelerle döşelidir. Her kanal gevşek bağ dokusu ve kapiller ağ ile sarılmıştır (Kierszenbaum 2006).



Resim 1.1: Olgun dişi meme bezi yapısı (Kierszenbaum 2006).

Dinlenme fazında, gebeliğin olmadığı durumlarda, meme bezi her biri dışarıya doğru açılan kör keseciklerde sonlanan laktifer kanallar içerir. Gebelik sırasında, kanallar dallara ayrılır ve bir lobülü oluşturarak alveollerden veya asinüslerden oluşmuş keselerde sonlanır. Her lobül çeşitli salgı yapan tübüloasinar birimler içerir. Bir lob, bir tane laktifer kanala boşalan bir grup lobülden oluşur. Meme bezinde, gebeliğin olmadığı durumlarda, lobüller ve loblar görülmez (Resim 1.2).



Resim 1.2: İnaktif ve aktif meme bezinin histolojisi (Kierszenbaum 2006).

Meme bezinin gelişimi maternal prolaktin, plasental östrojen ve progesteronun etkisiyle uyarılır. Gelişim epiteliyal ve mezenşimal etkileşimleri kapsayan meme ucunun oluşumu ve meme bezinin gelişimi olmak üzere iki fazdan oluşur.

Meme ucu, içeri girmiş meme ucu adını alan bir çöküntüyle, ektoderme ait epitel hücrelerin meme hattı boyunca birikimi sonucu 6. haftadan itibaren görülebilir. Doğumdan sonra, meme ucu bölgesi dışarı çıkar ve meme ucunun etrafında areolar bezler gelişince areola belirginleşir.

Meme bezlerinin kendi kendine gelişimi sırasında, meme tomurcuğu adı verilen ektodermal epitel hücre tomurcuğu, mezodermin altına girer ve epiteliyal tomurcuklar birinci üç aylık dönemde epiteliyal meme kordonları halinde gelişir. İkinci

üç aylık dönemde, meme kordonları çukurlaşır ve üçüncü üç aylık dönemin sonunda alveoller gelişir. Meme kanalları, laktifer kanallara dönüşür (Kierszenbaum 2006).

Mezoderm, meme ucunun bağ dokusu ve yağ doku stroması ile düz kas halinde farklılaşır. Kanalların ve alveollerin lümen epitel hücreleri, döşeyici epitelin bazal bölgesine göç eden miyoepitel hücrelerin öncülleridir. Epitel-miyoepitel değişimi olgun meme bezinde de meydana gelir.

Laktifer kanalları döşeyen epitel hücreleri sitoplazmalarında ve çekirdeklerinde östrojen reseptörleri içerirler. Progesteron, ovaryan siklusun sonunda kaybolan, eski ve gerilemiş tomurcukların, yeni alveolar tomurcuklarla yer değiştirerek oluşumunu uyarır. Bu siklik değişimler her menstrual siklusta meydana gelir. Gebelik sırasında, östrojen, progesteron ve büyüme faktörlerinin varlığında prolaktin süt kanallarının ve dallara ayrılmış kanalların sonlarında yer alan salgı yapan alveollerin gelişimini uyarır. Laktasyon sırasında, laktifer kanal sistemi ve lobüler alveolar doku tam gelişmiştir ve fonksiyoneldir. Prolaktin, alveolar hücreleri salgı yapmaları için uyarır (Kierszenbaum 2006).

Laktogenez meme bezinin süt salgılar hale gelmesi sürecidir ve iki evreden oluşur. Laktogenez I, gebeliğin ikinci trimesterinde meme bezinin süt bileşenlerini salgılama yeteneği kazanmasıdır (Kulski ve Hartmann 1981). Kandaki prolaktin seviyesinin artışına bağlı olarak salgılanmasında artış görülen bir bileşen laktozdur. Emzirme henüz gerçekleşmediği için sentezlenen bileşenler kan dolaşımına katılır. Laktoz kanda metabolize edilmez ve idrarda görülür. İdrar laktoz seviyesindeki artış, gebelik sırasında meme bezinden laktoz üretimini ve dolayısıyla laktogenez I'in gerçekleştiğinin göstergesidir (Arthur ve ark 1991, Cox ve ark 1999).

Laktogenez II, doğumdan hemen sonra başlayan süt salınımı aşamasıdır. Laktogenez II için prolaktin, insülin ve adrenal kortizol gereklidir ve doğum sonrası dolaşımdaki progesteronun azalması ile tetiklenir (Kulski ve ark 1977). Bunlara ek olarak tiroid hormonu da laktogenez II için gereklidir, hipotiroid hayvanların emziremediği görülmüştür (Thrift ve ark 1999). Laktogenez II'de meme bezlerinde ani bir doluluk sonrası süt salımı gerçekleşir. Emzirme sırasında sürekli olarak oksitosin salınarak dolaşıma katılır. Oksitosin olmadığı durumlarda çok az bir miktar süt salınımı gerçekleşir.

Laktogenez II'de süt miktarındaki artışın dışında sütün içeriğinde de önemli değişiklikler meydana gelir. Kolostrum, doğumdan sonra ilk 4-5 gün içinde anneden yavruya verilen süttür. Kolostrum, başlangıçta yüksek miktarda protein, yüksek konsantrasyonlarda sodyum ve klorid ile düşük konsantrasyonlarda kazein, laktoz, potasyum, sitrat, kalsiyum ve fosfat içeriği ile salınır. Laktogenez II sırasında sütün lipid içeriği, kazein, laktoz, potasyum, sitrat, kalsiyum ve fosfat konsantrasyonları artar (Neville ve ark 1991, Kunz ve Lonnerdal 1992). Bu değişiklikler doğumdan sonraki ilk 5 gün içinde meydana gelir. Daha sonraki dönemlerde bu maddelerin konsantrasyonlarında belirgin bir değişiklik olmaz (Kent 2007).

1.2. Mikrokimerizm

Bir bireye ait çok az miktarda hücre ya da DNA'nın genetik olarak farklı başka bir bireyde bulunması durumuna mikrokimerizm adı verilir. Mikrokimerizm, doku transplantasyonu veya kan transfüzyonu gibi iatrojenik müdahalelerle gerçekleşebileceği gibi, en yaygın olarak gebelik sırasında anne ile fetüs arasında gerçekleşir (Gammill ve Nelson 2010). Mikrokimerizm, ikiz gebeliklerde iki fetüs arasında da gerçekleşebilir. Teorik olarak, ilk gebelik sırasında fetüsten anneye geçen hücreler, daha sonraki gebeliklerde diğer yavrulara da geçebilir (Adams ve Nelson 2004). Gebelik sırasında annenin hücrelerinin fetüse geçmesi maternal mikrokimerizm, fetüse ait hücrelerin anneye geçmesine ise fetal mikrokimerizm adı verilir.

Gebelikte anneye ya da yavruya geçiş yapan mikrokimerik hücrelerin hangi durumlarda bulunduğu ve işlevleri bütünüyle belirlenebilmiş değildir. Bu hücrelerin insan sağlığına faydalı ya da zararlı etkilerinin olup olmadığı tartışma konusudur. Gebelik sırasında doğal olarak edinilen bu fetal ve maternal hücrelerin sistemik skleroz, sistemik lupus eritematozus ve neonatal lupus sendromu gibi çeşitli otoimmün hastalıklardaki potansiyel rolüyle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır (Adams ve Nelson 2004).

1.2.1. Fetal Mikrokimerizm

Gebelik sırasında fetüse ait hücrelerin ya da DNA'nın anneye geçmesi duruma fetal mikrokimerizm adı verilir. Literatüre bakıldığında fetal mikrokimerizmin anne sağlığı açısından olumlu etkileri olduğunu gösteren çalışmalarla birlikte çeşitli

problemlere yol açtığını belirten çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin, fetal hücrelerin maternal yara iyileşmesinde rol aldıklarının (Mahmood ve O'Donoghue 2014) yanı sıra preeklampsi ve düşük gibi gebelik komplikasyonlarıyla ilişkili olabilecekleri gösterilmiştir (Gammill ve ark 2013, Peterson ve ark 2013). Fetal hücrelerin ayrıca, meme kanseri, serviks kanseri, tiroid kanseri ve melanomlar gibi çeşitli tümör bölgelerinde bulundukları da bildirilmiştir (Kallenbach ve ark 2011).

Yapılan çalışmalara göre fetal hücrelerin anne sağlığı üzerindeki etkileri ile ilgili üç temel hipotez ortaya çıkmaktadır: fetal hücreler zararlıdır, inflammatuar yanıt oluşturarak maternal doku hasarı meydana getirirler; fetal hücreler koruyucudur, fetal progenitör hücreler maternal dokuların iyileşmesine yardımcı olurlar; fetal hücrelerin anne üzerinde bir etkisi yoktur (Fugazzola ve ark 2011). Bu olası durumlara rağmen fetal hücrelerin anne sağlığı üzerindeki kesin etkileri belli değildir.

1.2.2. Maternal Mikrokimerizm

Maternal mikrokimerizm, maternal hücrelerin fetüs ve yavrunun organlarında ve kan dolaşımında bulunması durumudur. Maternal hücreler gebelik yoluyla ve emzirme yoluyla yavruya geçebilir. Bu hücrelerin çeşitli fenotiplerde olmaları, yavru da çok farklı alanlarda yerleşim göstermeleri ve insanlarda otoimmün hastalıklar bağlamında belirlenebilmeleri, maternal mikrokimerizm ile geçiş yapan hücrelerin önemini arttırmaktadır (Stelzer ve ark 2015).

Maternal mikrokimerizmin insanlardaki önemi daha çok çocuklardaki immün yanıt ve tolerans oluşumu çerçevesinde ele alınmıştır. Mikrokimerizm ile uyarılmış toleransın, allograft doku transplantasyonunda ve graft-versus-host hastalığında paternal dokulardan yapılan transplantasyona göre etkili olduğu gösterilmiştir (van Rood ve ark 2002, Nijagal ve ark 2012). Bunun aksine, maternal hücrelerin yüksek miktarlarda bulunmasının çeşitli otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Nelson ve ark 2007, Ye ve ark 2014).

Maternal Mikrokimerizm Tespit Yöntemleri

Maternal mikrokimerizm ile ilgili bilgiler artmasına rağmen, bu hücreler ile ilgili insan çalışmaları fetal ve maternal dokulara erişimin kısıtlı olması nedeniyle oldukça sınırlıdır. Bu nedenle hayvan modelleri maternal hücre mikrokimerizmi çalışmaları açısından büyük bir önem arz etmektedir. İnsanlarda yapılan

mikrokimerizm çalışmalarında anneye ve yavruya ait hücrelerin belirlenebilmesi için kullanılan metotlardan biri insan lökosit antijenleri (HLA) haplotipidir. HLA haplotipi farklı polimeraz zincir reaksiyon (PCR) yöntemleriyle ve floresan aktive hücre ayırıştırma (FACS) metoduyla belirlenebilir. Bunlara ek olarak, seks kromozomunun belirlenmesi bağlı olarak floresan in situ hibridizasyon (FISH) yöntemiyle de yavrunun dokusu içerisindeki tek bir mikrokimerik hücre tespiti yapılabilir. İmmüno floresan boyama ve PCR yöntemleri bir arada kullanılarak mikrokimerik hücreler morfolojik ve genetik olarak belirlenebilirler.

Günümüzde hayvan modelleri kullanılarak yapılan çalışmalarda yavruardaki mikrokimerik hücrelerin tespitini kolaylaştırmak için LacZ ya da yeşil floresan protein (eGFP) geni eksprese edebilme özelliği kazandırılmış transgenik anneler kullanılmaktadır. Bu yolla, mikrokimerik hücreler hücre morfolojisi ve dokudaki yerleşim yerleri açısından çeşitli mikroskobik yöntemlerle yavru da tespit edilebilmektedir. EGFP uygun eksitasyon ışığı altında yeşil ışıma yapan, mikroskobik incelemeler için oldukça uygun bir işaretleyicidir (Okabe ve ark 1997). Ancak PCR ve akım sitometrisi yöntemleriyle karşılaştırıldığında mikroskobik yöntemler belirli bir kesit ya da alanın incelenmesine bağlı olarak genellikle semi-kantitatif bir bilgi sunarlar.

Akım sitometrisi hücrelerin tespit edilmesinin yanında bu hücrelere ait fenotipik özelliklerine imkn sağlar. Ancak, bu hücrelerin belirlenmesinde oto floresan ışımalar, non-spesifik antikor bağlanmaları ve kullanılan floresan boyalara ait emisyonların çakışması analizleri olumsuz yönde etkilemektedir. eGFP kullanılan deney modellerinde mikrokimerik hücreler, başka bir madde ya da spesifik antikora gerek olmadan eGFP'ye uygun eksitasyon ve emisyon dalga boylarında analizler yapılarak akım sitometrisiyle belirlenebilmektedir (Stelzer ve ark 2015).

Kantitatif PCR (qPCR) metodu yavruarın organlarındaki mikrokimerik hücrelerin genetik olarak tespiti ve ölçümünü yapmak için kullanılmaktadır. Çalışmalarda, mikrokimerik hücrelerin tespiti amacıyla yapılan protokollerle H-2 haplotipi ve eGFP geninin varlığını tespit edilebilmektedir (Stelzer ve ark 2015). PCR gibi DNA-temelli metotların kısıtlayıcı yanı ise analiz yapılan hücrelerin fenotipik özellikleri ya da fonksiyonları ile ilgili bir veri elde edilememesidir.

Mikrokimerik Hücrelerin Göçü

Mikrokimerizmin trans-plasental hücre trafiğinden köken aldığı düşünülse de, hangi hücrelerin hangi mekanizma ile bu geçişi gerçekleştirdiği belirsizliğini korumaktadır. Gebeliğin erken dönemlerinde maternal hücrelerin plasentadan trans-endotelial göç yoluyla fetal dolaşıma ulaşabilmeleri için mononükleer trofoblast hücre tabakasını, multinükleer sinsityotrofoblast tabakasını geçerek bazal membran ve fetal endotelial hücre tabakalarını geçmeleri gerekir (Rossant ve Cross 2001). Lenfositlerin plasentadaki hücre göçlerinin kan-beyin bariyerindekine benzer olduğu da tahmin edilmektedir (Dawe ve ark 2007).

Mikrokimerik hücrelerin plasentadan geçişlerinin çeşitli kimyasalların miktarlarına bağlı olabileceği de düşünülmektedir. İnsanlarda gebelik sırasında vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)-A maternal kandan göbek kordonu kanına doğru artan konsantrasyonda bulunmaktadır. İnsanlarda ve sıçanlarda VEGF-A'nın VEGFR-1 ve integrinler ($\alpha 4\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ ve $\alpha 5\beta 1$) yoluyla hücre göçünü uyarıcı etkisi olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark 2008).

Plasenta maternal hücrelerin yavruya geçişi için tek yol değildir. Yapılan çalışmalarda doğum sonrası anne sütü yoluyla maternal hücrelerin yavruya geçerek yerleşebileceği belirtilmiştir. Anne sütü içerisinde bulunan lökositlerin postnatal 3. ve 6. günlerde yavrunun karaciğerinde bulunabildiği gösterilmiştir (Zhou ve ark 2000). Benzer şekilde bir başka çalışmada da anne sütü ile beslenmenin yavru karaciğerine maternal hücrelerin geçişini sağladığı belirtilmiştir (Dutta ve ark 2009). Bunlara ek olarak immün yetmezliği olan farelerde anne sütü ile emzirme sonrası IgG sekresyonu yapan B lenfositlerinin varlığı gösterilmiştir (Arvola ve ark 2000). Anne sütü yoluyla yavrunun dolaşımına geçen maternal hücrelerin sindirim sistemi içerisindeki asidik ortam ve sindirim enzimlerinden nasıl geçtiği belirsizliğini korumaktadır (Dutta ve Burlingham 2011).

Mikrokimerik Hücrelerin Yerleşimi

Maternal mikrokimerik hücreler yavrularda fetal ve postnatal dönemlerde periferik kan, lenfoid organlar ve çeşitli dokularda tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda gebelik sırasında plasenta yoluyla gerçekleşen maternal hücre göçü üzerinde yoğunlaşmış ve yavrunun timus, ince bağırsak (Leveque ve ark 2014), lenf nodu,

akciğer, kalp, karaciğer (Dutta ve ark 2009, Dutta ve Burlingham 2010), kemik iliği (Vernochet ve ark 2005), dalak, beyin (Kaplan ve Land 2005) ve böbrek (Lopez-Guisa ve ark 2011) dokularında maternal hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Plasenta yoluyla gerçekleşen mikrokimerizme göre anne sütüne bağlı oluşan maternal mikrokimerizm ile ilgili kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Anne sütü yoluyla oluşan mikrokimerizm yavrunun sadece karaciğer (Zhou ve ark 2000), kan ve dalak (Arvola ve ark 2000) dokularında gösterilmiştir.

Maternal hücrelerin yavruda bu kadar farklı dokuda yerleşim göstermesi, bu hücrelerin yavrunun başta immün sistemi olmak üzere tüm sistemlerinin gelişiminde rol aldıklarını düşündürmektedir. Mikrokimerik hücrelerin yavrunun somatik dokularında yer alması oldukça dikkat çekicidir, ancak yavrunun dokularındaki fizyolojik etkileri yeterince belirlenememiştir. Bu hücrelerin yavrulardaki potansiyel etkilerini belirleyebilmek amacıyla öncelikle tüm dokulardaki fenotipik özelliklerinin belirlenmesi gerekmektedir.

1.3. Sinir Sistemi

Sinir sistemi, vücudun iç ve dışında oluşan değişimlere yanıt vermesini sağlar. Organların ve organ sistemlerinin fonksiyonel aktivitelerini kontrol eder. Sinir sistemi anatomik olarak merkezi ve periferik sinir sistemi olmak üzere iki bölümde incelenir. Merkezi sinir sistemi (MSS), kraniyal kavite ve spinal kanal içerisinde yer alan beyin, beyincik ve medulla spinalisten oluşur. Periferik sinir sistemi (PSS), MSS'ye gelen ve MSS'den giden impulsları ileten kraniyal, spinal ve periferik sinirlerden, MSS dışında sinir hücre topluluklarını içeren gangliyonlardan ve özelleşmiş sinir sonlanmalarından oluşmaktadır.

Sinir sistemi fonksiyonel olarak somatik sinir sistemi (SSS) ve otonom sinir sistemi (OSS) olmak üzere iki bölümde incelenmektedir. SSS, MSS ve PSS'nin somatik kısımlarından oluşmaktadır. SSS, refleks arkı haricinde, bilinçli, istemli kontrol altında olan fonksiyonlarını kontrol eder. İç organlar, düz kas, kalp kası ve bezler dışında vücudun bütün kısımlarının duyu ve motor inervasyonunu sağlar. OSS, MSS ve PSS'nin otonomik kısımlarından oluşmaktadır. OSS, düz kasların, kalbin iletim sisteminin ve bezlerin efferent istemsiz motor inervasyonunu sağlar. Ayrıca iç organların afferent duyu inervasyonunu sağlar. OSS, kendi içinde sempatik bölüm ve parasempatik bölüm olmak üzere ikiye ayrılır. OSS'nin bir diğer

bölümü olan enterik bölüm sindirim kanalı ile ilişkilidir. Enterik bölüm, MSS ile parasempatik ve sempatik sinir lifleri aracılığı ile bağlantı kurabildiği gibi, OSS'nin diğer iki kısmından bağımsız olarak da fonksiyon yapabilir (Michael H. Ross 2011).

Sinir dokusu esas olarak nöronlar ve destek hücreleri olmak üzere iki tip hücreden oluşur. Bu hücreler sinir sisteminin fonksiyonel birimidir. Nöron, nükleusu içeren hücre gövdesi ile değişken uzunluklarda uzantılardan oluşmaktadır. Sinir hücreleri, başka hücrelerden uyarıları almak ve uzantıları aracılığı ile sistemdeki diğer kısımlara elektriksel uyarılar göndermek üzere özelleşmişlerdir. Nöronların aralarında, bilginin bir nörondan diğerine aktarılmasını sağlayan özelleşmiş temas noktaları sinaps olarak adlandırılmaktadır.

Destek hücreleri, nöronlara yakın yerleşimli hücrelerdir ve nöroglia ya da gliya olarak adlandırılırlar. MSS'de oligodendrositler, astrositler, mikroglia ve ependim hücreleri olmak üzere dört tip gliya hücresi bulunmaktadır. Schwann hücreleri ve satellit hücreleri ise PSS'nin gliya hücreleridir. Gliya hücrelerinin, nöronlar için fiziksel destek, sinir hücrelerinin gövdelerini ve uzantılarını çevreden izole ederek sinir impulslarının hızlı iletimini sağlamak, nöronal hasarın onarımı, MSS'nin iç sıvı ortamını düzenlemek, sinaptik aralıklardan nörotransmitterleri uzaklaştırmak, vasküler sistem ve sinir sistemi nöronları arasında metabolik değişim sağlamak gibi çok önemli fonksiyonları vardır.

MSS ve PSS'de nöron ve destek hücrelerine ek olarak, bol miktarda damar bulunmaktadır. Kan damarları sinir dokusundan bazal lamina ve damarın çapına göre değişebilen miktarda bağ dokusu ile ayrılmıştır. MSS'de kan damarları ile sinir dokusu arasındaki sınır, normalde diğer dokularda kan damarından dokuya geçebilen pek çok maddenin sinir dokusuna girişini engellemektedir. Kandaki maddelerin MSS'ye geçişini engelleyen bu seçici alana kan-beyin bariyeri denir (Michael H. Ross 2011).

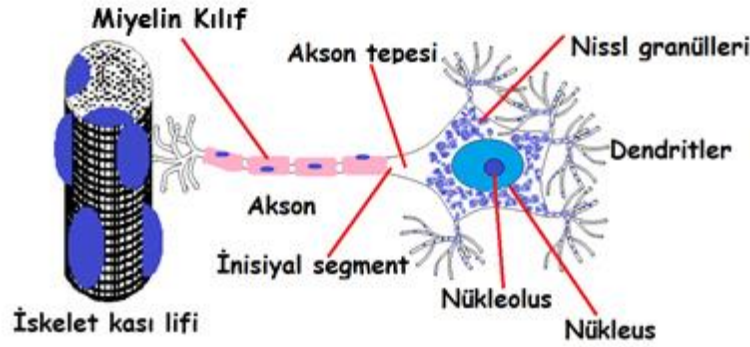
1.3.1. Sinir Sistemi Hücreleri

Nöronlar

Nöron, sinir sisteminin yapısal ve fonksiyonel birimidir. İnsan sinir sisteminde 10 milyardan fazla nöron bulunmaktadır. Nöronlar vücutta şekil ve büyüklük olarak en fazla çeşitliliğe sahip hücreler olmakla birlikte, duysal, motor ve ara nöronlar olmak üzere üç genel kategoriye ayrılabilirler.

Duysal nöronlar, reseptörlerden gelen impulsları MSS'ye iletirler. Bu nöronların uzantıları somatik afferent ve visseral afferent sinir liflerinin içinde yer alırlar. Motor nöronlar, MSS'den ya da gangliyonlardan efektör hücrelere impuls iletirler. Bu nöronların uzantıları somatik afferent ve visseral efferent sinir lifleri içinde seyrederler. Ara nöronlar, duysal ve motor nöronlar arasında iletişimi sağlayarak enterge bir ağ oluştururlar. Bütün nöronların %99,9'dan fazlasının bu grupta olduğu tahmin edilmektedir.

Bir nöronun fonksiyonel bölümleri hücre gövdesi, akson, dendritler ve sinaptik bağlantılardır. Nöronun hücre gövdesinde, nükleus ve diğer sitoplazmik organeller bulunur. Çoğu nöronun tek aksonu vardır. Akson genellikle hücrenin en uzun uzantısıdır ve impulsları hücre gövdesinden uzağa, sinaps bölgesine iletir. Sinaps başka bir nöron ya da efektör hücre ile bağlantı kurar. Bir nöronun genellikle çok sayıda dendriti bulunur ve bunlar periferden aldıkları impulsları hücre gövdesine ileten kısa uzantılardır.



Resim 1.3: Nöronun yapısal bölümleri (Eşrefoğlu 2016).

Nöronların, hücre gövdesinden çıkan uzantı sayısına göre de sınıflandırılırlar. Multipolar nöronların bir aksonu, iki ya da daha fazla dendriti vardır. İmpulsların yönü dendritten hücre gövdesine oradan da aksona doğru ya da hücre gövdesinden aksona doğrudur. Hücrenin iletici kısmı aksondur. Aksonun plazma membranı impuls iletimi için özelleşmiştir. Aksonun son kısmı olan sinaptik sonlanma bölgesi, çeşitli nörotransmitter maddeleri içerir. Sinir sisteminde multipolar nöronların büyük kısmını motor nöronlar ve ara nöronlar oluşturur. Bipolar nöronların bir aksonları ve bir dendritleri vardır. Bipolar nöronlar nadir bulunur. Genellikle özel duyu reseptörleri ile

ilişkilidirler. Yüzeysel yerleşim gösterirler ve diğer nöronlara göre çok yavaş olarak yenilenirler. Psödounipolar nöronların tek uzantısı vardır. Bu akson hücre gövdesinin yakınında iki uzun aksonal dal halinde dallanır. Bir dal periferik, diğeri MSS'ye uzanır. Her iki aksonal dal da iletici birimlerdir. İmpulslar nöronun periferik dallanmalarında üretilirler. Psödounipolar nöronların büyük çoğunluğu MSS'ye yakın yer alan duysal nöronlardır. Duysal nöronların hücre gövdeleri arka kök gangliyonlarında ve kranial sinir gangliyonlarında yer almaktadırlar.

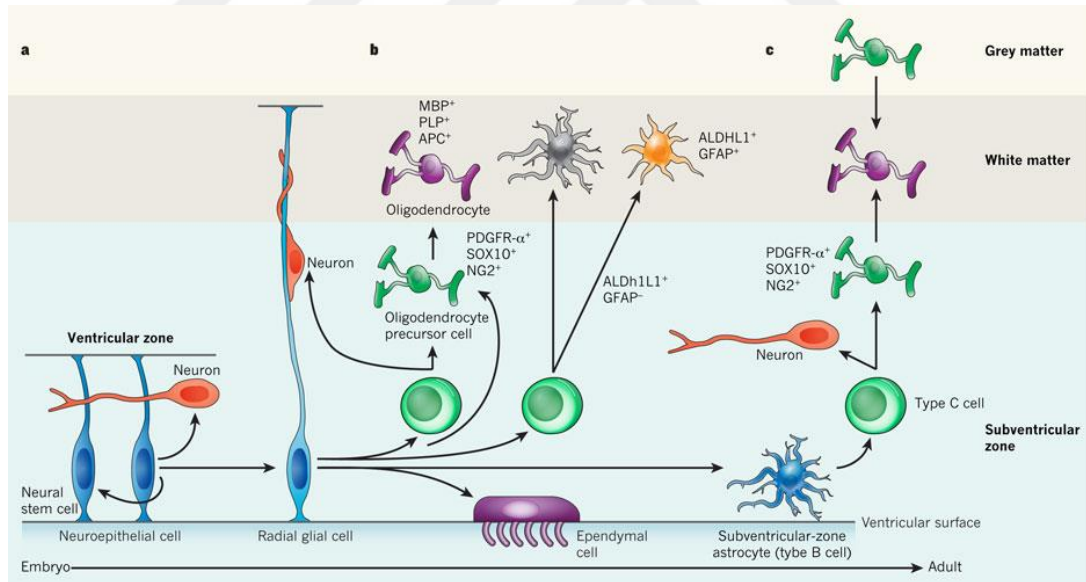
Nöronun hücre gövdesi protein üreten hücre karakteristiklerine sahiptir. Belirgin nükleoluslu, büyük, ökromatik bir nükleusu ve çevresindeki perinüklear sitoplazmayı içeren genişlemiş kısımdır. Perinüklear sitoplazma protein sentez aktivitesi ile uyumlu bir özellik olarak bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum (gER) ve serbest ribozomlar sergiler. Işık mikroskopunda ribozomal içerik bazik boyalarla koyu renkte, tiyoin boyaları ile metakromatik olarak boyanan ve Nissl cisimciği adı verilen küçük cisimcikler olarak izlenir. Her Nissl cisimciği bir gER kümesine karşılık gelir. Perinüklear sitoplazma çok sayıda mitokondriyon, büyük bir perinüklear Golgi aygıtı, lizozomlar, mikrotübüller, nörofilamentler, transport vezikülleri ve inklüzyonlar da içermektedir. Nissl cisimcikleri ve serbest ribozomlar dendritlerin içine uzanabilirler ancak aksonun içine uzanmazlar. Hücre gövdesinin aksone uzanan bölgesine akson tepeciği denir. Akson tepeciğinde büyük sitoplazmik organeller bulunmaz ve bu özellik mikroskopik olarak akson ile dendritin ayırt edilmesinde referans olarak kullanılır.

Nöronlar bölünemediği halde, nöronların hücre içi yapıları düzenli olarak yenilenir. Bu yapılar, saatler, günler ve haftalar ile ölçülen yaşam sürelerine sahiptirler. Bununla birlikte yetişkin beyninin rejenerasyon potansiyeli sergileyen bazı hücreler içerdiği gösterilmiştir. Bulbus olfactoryus ve hipokampusün dentat girusu gibi beynin belirli bölgelerinde bu nöral kök hücreler bölünerek yeni nöronları oluşturabilmektedirler. Bu hücreler, 240 kDa'lık bir ara filament proteini olan nestinin ekspresyonu ile karakterizedirler ve nestin, histokimyasal metotlarla bu hücrelerin tanımlanması için kullanılmaktadır. Nöral kök hücreler hasara uğramış bölgelere göç ederek yeni sinir hücrelerine de farklılaşabilirler (Michael H. Ross 2011).

Nörogliya

MSS’de dört tip gliya hücresi bulunmaktadır; astrositler, oligodendrositler, mikrogliya ve ependim hücreleri. MSS’nin rutin ışık mikroskopik incelemelerinde gliyal hücrelerin sadece nükleusları ayırt edilebilir. Morfolojilerinin tam olarak izlenebilmesi için ağır-metal boyaması ya da immünohistokimyasal metotlar gerekir.

Gliyal hücrelerin fiziksel anlamda uzun süredir destekleyici hücreler olarak tanımlanmalarına rağmen, günümüzde gliyal hücrelerle nöronların fonksiyonel olarak birbirlerine bağımlı oldukları belirtilmektedir. Fiziksel desteğin en belirgin örneği gelişim sırasında oluşur. Beyin ve medulla spinalis embriyonik nöral tüpten gelişir. Nöral tüp baş bölgesinde belirgin kalınlaşma ve katlanmaya uğrar ve sonuçta beyin gelişir. Bu gelişimin erken dönemlerinde embriyonik gliyal hücreler nöral tüpün bütün kalınlığı boyunca radyal şekilde uzanırlar. Bu radyal gliyal hücreler fiziksel bir iskelet şeklinde görev yaparak nöronların beyindeki uygun yerlerine doğru göçlerini yönlendirirler (Resim 1.3).



Resim 1.4: Gliya hücrelerinin gelişimi ve farklılaşması (Rowitch ve Kriegstein 2010).

Astrositler gliyal hücrelerin en büyüğüdürler. Nöronları desteklemek ve onların aktivitelerinin çoğunu düzenlemek için MSS’de bir hücre ağı oluşturarak nöronlarla iletişim halinde bulunurlar. Bazı astrositler beyin tüm kalınlığı boyunca uzanarak beyin gelişimi sırasında göç etmekte olan nöronlar için bir iskelet oluştururlar. Diğer astrositler uzantılarını kan damarlarından nöronlara uzatırlar.

Uzantıların uçları genişleyerek son ayakları oluşturur. Son ayaklar damar ya da aksolemmanın dış yüzeyi üzerinde geniş alanları kaplar. İki çeşit astrosit ayırt edilmiştir. Protoplazmik astrosit, beynin dış bölgesi olan gri cevherde daha yaygındır. Bu astrositlerin çok sayıda, kısa ve dallanma gösteren sitoplazmik uzantıları vardır. Fibröz astrositler, beynin beyaz cevheri bölgesinde daha yaygındır. Bu astrositlerin daha az ve daha düz uzantıları vardır. Her iki tip astrosit de gliyal fibriller asidik proteinden (GFAP) oluşan, belirgin ara filament demetleri içermektedir. Bu filamentler fibröz astrositlerde daha fazladır. Kesitlerde ve doku kültürlerinde astrositleri ayırt etmek için GFAP antikorları ile immünohistokimyasal boyama yapılmaktadır.

Astrositler metabolitlerin nöronlara ulaştırılmasında ve artık ürünlerin nöronlardan uzaklaştırılmasında önemli rol oynarlar. Kapillerlerin kan-beyin bariyerini oluşturan sıkı bağlantılarının sürdürülmesine yardım ederler. Ayrıca astrositler miyelinli aksonların açıkta kalan kısımlarını, örneğin Ranvier düğümlerini ve sinapsları kaplarlar. Nörotransmitterleri sinaptik yarıktan sınırlandırır ve fazlasını pinositozla uzaklaştırır. Beyin ve medulla spinalis yüzeyindeki protoplazmik astrositler uzantılarını pia materin bazal laminasına uzatarak, nispeten geçirgen olmayan ve MSS'yi saran gliya limitansı oluştururlar.

Oligodendrositler, MSS miyelininin oluşturulmasından sorumlu olan hücrelerdir. MSS'de miyelin kılıf oligodendrosit plazma membranının konsantrik tabakaları tarafından oluşturulur. Oligodendrositler, astrositlerle kıyaslandığında daha az uzantıları olan küçük hücreler olarak görülürler. Sıklıkla aksonların arasında diziler halinde görülürler. Her oligodendrosit aksonlara doğru uzanarak, her biri aksonun bir bölgesini saran birkaç tane dil şeklinde uzantı verir ve bu uzantılar miyelinin internodal segmentini oluştururlar. Tek bir oligodendrositin birden fazla uzantısı bir aksonu ya da yakın çevrede bulunan birkaç aksonu miyelinize edebilir. Oligodendrositin nükleus içeren bölgesi miyelinize ettiği aksondan uzakta olabilir. Oligodendrositlerin miyelin yapımı sırasında proteolipid protein (PLP), miyelin oligodendrosit protein (MOG)i miyelin bazik protein (MBP) ve oligodendrosit miyelin glikoprotein (OMgp) proteinleri görev yapar.

Mikroglia hücreleri fagositik hücrelerdir. Normalde yetişkinde MSS'de gliyal hücrelerin yaklaşık %5'ini oluştururlar, fakat hasar ve hastalık bölgelerinde prolifer

olarak aktif fagositik hale gelirler ve reaktif mikroglial hücreler adını alırlar. Mikroglialar mononükleer fagositik sistemin üyesi olarak kabul edilmektedirler ve granülosit/monosit progenitör hücrelerinden (GMP) köken alırlar. Mikroglia öncü hücreleri MSS parankimine damar sisteminden girerler.

Mikroglia hücreleri, glial hücrelerin en küçüğüdür ve nispeten küçük, yassı nükleusu vardır. Ağır metallere boyandığında mikroglia kısa, kıvrık uzantılar sergiler. Hem uzantıları hem de hücre gövdesi çok sayıda dikensi çıkıntılarla kaplıdır. Bu dikensi çıkıntılar diğer fagositik hücrelerde görülen kırıxık kenar eşdeğeri olabilir. Mikroglia içerisinde çok sayıda lizozom, inklüzyon ve vezikül görülür, ancak mikroglia da gER, mikrotübül ve aktin filamentleri az miktarda bulunmaktadır (Rowitch ve Kriegstein 2010).

Ependimal hücreler MSS'nin sıvı ile dolu kavitelerinin epitel benzeri döşemesini oluşturan hücrelerdir. Tek katlı kübik-prizmatik hücrelerdir ve sıvı transportu yapan hücrelerin morfolojik ve fizyolojik karakteristiklerine sahiptirler. Apikal yüzeylerinde bulunan bağlantı kompleksleri ile birbirlerine sıkıca bağlanmışlardır. Tipik epitelden farklı olarak eksternal lamina bulunmaz. Hücrenin apikal yüzeyinde silya ve mikrovilluslar bulunur. Mikrovilluslar beyin omurilik sıvısının emiliminde görev yaparlar.

Beyin ventrikül sistemi içinde bu epitel benzeri döşeme komşu kapiller halkalarından kaynaklanan materyallerin transportunu ve sekresyonunu yaparak serebrospinal sıvıyı üretmek üzere daha ileri modifikasyona uğramıştır. Modifiye ependimal hücreler ve bunlarla ilişkili kapillerlere koroid pleksus adı verilir.

MSS nöronları ve mikroglia hariç olmaz üzere merkezi nöroglia nöral tüpün nöroektodermal hücrelerinden gelişir. Gelişmekte olan nöronlar nöral tüp içinde önceden belirlenmiş olan bölgelerine göç edip farklılaştıktan sonra artık bölünemezler. Bununla birlikte, yetişkin memeli beyinde gelişimden kalan çok az sayıdaki nöral kök hücre bölünme yeteneğini korumaktadır. Aktif yetişkin nörojenezi, normal koşullar altında beyinde nörojenik bölgeler olarak isimlendirilen 2 bölgede devam etmektedir; dentat granül hücrelerinin olduğu hippokampal subgranüler zon ve yeni nöronların oluşup rostral göç zinciri ile internöronları oluşturmak üzere olfaktör bulba gönderildiği, lateral ventrikülün subventriküler zonu (Gage 2000).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Deney Grupları

Çalışmamızda C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)1Osb/J tür transgenik fareler (GFP+) ve C57BL/6 tür fareler (normal) kullanılmıştır. C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)1Osb/J tür fareler ABD'deki üreticiden (The Jackson Laboratory, ME, USA, #003291) temin edilerek ve deney gruplarını oluşturmak için İstanbul Medipol Üniversitesi Tıbbi Araştırma Merkezinde (MEDİTAM) yeterli sayıda üretildi. Çalışmamızın etik kurul onayı İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 12.02.2014 tarihi ve 3 no'lu kararı ile alındı.

Deney grupları aşağıdaki şekilde belirlendi;

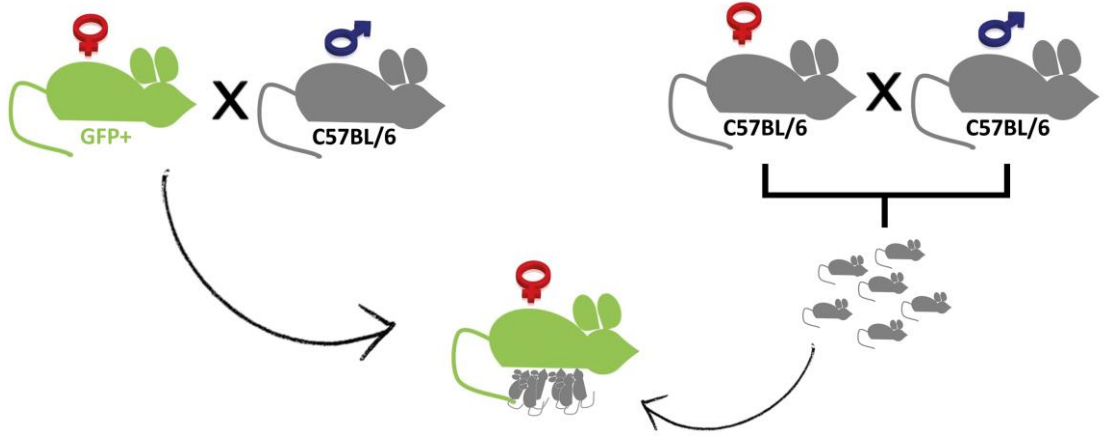
7 Günlük Kontrol Grubu (n=6): Herhangi bir işlem yapılmamış 7 günlük normal farelerden kan ve beyin dokusu alındı.

30 Günlük Kontrol Grubu (n=6): Herhangi bir işlem yapılmamış 30 günlük normal farelerden kan ve beyin dokusu alındı.

7 Günlük Grup (n=6): GFP+ annelerin yeni doğan normal yavruları emzirmesi sağlandı. 7 günlük emzirme süresi sonrasında yavrulardan kan ve beyin dokusu alındı.

30 Günlük Grup (n=6): GFP+ annelerin yeni doğan normal yavruları emzirmesi sağlandı. 30 günlük emzirme süresi sonrasında yavrulardan kan ve beyin dokusu alındı.

Deney gruplarında kullanılan GFP+ dişi farelerin normal fareleri emzirebilmesi için GFP+ dişi fareler ile normal erkek fareler çiftleştirilerek gebelik oluşturuldu. Gebelik sonunda GFP+ dişi fareler kendi yavrularından ayrıldı. GFP+ dişi farelerin yanına, normal tür yeni doğan fareler koyularak emzirmeleri sağlandı (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: GFP+ ve normal farelerle oluşturulan deney gruplarının şematik olarak gösterimi.

Deney gruplarında belirlenen süreler sonunda (7. ve 30. gün) emzirilen fareler ketamin (100 mg/kg) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg) ile derin anestezi uygulandı. Kan örnekleri alınan fareler dekapitasyon yoluyla kurban edildi. Kurban edilen farelerden beyin dokusu alındı. Alınan örnekler daha sonraki incelemelerde kullanılmak üzere kuru buz üzerine alınarak -80°C’de saklandı.

2.2. Genotipleme

Üreticiden (The Jackson Laboratory, ME, USA, #003291) alınan C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)10sb/J tür fareler C57BL/6 tür normal fareler ile çaprazlanarak yeni fareler üretildi. Doğan yavrulardan 3 hafta sonra anestezi altına kulağından “punch biopsisi” ile genotipleme yapmak amacıyla doku örnekleri alındı. Alınan dokular 75 µl, 25mM NaOH/EDTA içeren 0.2ml’lik PCR tüplerine alındı. PCR tüpleri 98°C’de Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific) cihazında 1 saat bekletildi. 1 saat sonunda 75 µl, 40mM Tris/HCl eklenerek 3 dakika 4000 rpm’de santrifüj edilen dokulardan 100 µl alınarak yeni PCR tüplerine aktarıldı. DNA içeren örnekler elde edildikten sonra PCR karışımı hazırlanarak analiz yapıldı (Çizelge 2.1, 2.2, 2.3).

Çizelge 2.1: Tek bir örnek için PCR karışımı.

Bileşenler	Konsantrasyon	Miktar µl
ddH ₂ O		3
OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer		6
10 uM Transgen Primer ileri	0.4 uM	0.5
10 uM Transgen Primer geri	0.4 uM	0.5
10 uM Kontrol Primer ileri	0.4 uM	0.5
10 uM Kontrol Primer geri	0.4 uM	0.5
DNA		1
Toplam miktar		12

Çizelge 2.2: Kullanılan primer dizileri.

Primer	Dizi 5' → 3'	Primer Tipi
oIMR0872	AAG TTC ATC TGC ACC ACC G	Transgen
oIMR1416	TCC TTG AAG AAG ATG GTG CG	Transgen
oIMR7338	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	İç Pozitif Kontrol Forward
oIMR7339	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C	İç Pozitif Kontrol Reverse

Çizelge 2.3: Thermal Cycler PCR protokolü.

Aşama	Sıcaklık °C	Zaman	Not
1	95	1 dk	
2	95	30 sn	
3	60	30 sn	
4	68	1 dk	
5			2-4 no'lu aşamaları 38 kere tekrar
6	72	5 dk	
7	4		dur

PCR ürünlerinin jele yüklenip görüntülenmesi için 3 gr agaroz tartılarak üzerine 100 µl 1X TAE tampon çözelti eklenip ve mikrodalga fırında 3 dakika 200 °C'de kaynatıldı. Kaynadıktan sonra içerisine 5 µl SafeView™ (Applied Biological Materials Inc., Richmond, BC, Kanada) eklendi. Hazırlanan kasete dökülerek ve 30 dakika donması beklendi. Donduktan sonra jel tanka yerleştirildi. Tankın içerisi 1X TAE tampon çözelti dolduruldu. PCR ürünlerinden 10 µl alınarak içerisine 2 µl yükleme boyası eklendi. İlk kuyuya 5 µl işaretleyici (marker) koyuldu. İkinci kuyuya hazırlanan kontrol koyuldu ve sırası ile tüm kuyular örnekler ile dolduruldu. Daha sonra 30 dk 80 Volt'ta yürütüldü.

Yürütülen jel görüntülenmek için çıkarıldı. ChemiDoc™ MP System (Bio Rad, CA, A.B.D.) cihazına yerleştirilerek görüntüsü alındı. Görüntüleme sonunda çift bant görülenler transgenik (GFP+) olarak ayrıldı.

2.3. İmmünohistokimyasal Boyama

Dondurulan beyin örneklerinden kriyomikrotom (Leica Biosystems, CM 1850) ile pozitif şarj kaplamalı lam (ThermoFisher Scientific, 10143352) üzerine 20µm kalınlıkta kesitler alındı. Alınan kesitler 37°C'de 10 dk süre ile kurutuldu ve %4'lük paraformaldehit (pH 7,4) içerisinde 30 dk boyunca fikse edildi. Fiksasyonun ardından fosfat tamponlu tuz (pH 7,2-7,4 0,01M) (PBS) içerisinde 3 kere 5'er dk yıkama yapıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için PBS içerisinde hazırlanmış %0,3'lük

hidrojen peroksit içerisinde 1 dk bekletildikten sonra PBS içerisinde 3 kere 5'er dk yıkama yapıldı. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak için kesitlere 30 dk bloklama solüsyonu (%3 bovine serum albumin, %0,3 sodyum azid, %1 keçi serumu, %0,1 Triton X-100) uygulandı. Bloklama sonrası kesitler üzerine Antibody Diluent (ThermoFisher Scientific, 003218) ile belirtilen oranlarda sulandırılmış konjuge primer antikorlar uygulanarak gece boyunca 4°C'de nemli ortamda bekletildi: anti-GFAP (Novus Biologicals, NBP2-33184R, 1:1000 sulandırma), anti-NeuN (Merck Millipore, MAB377A5, 1:500 sulandırma), anti-GFP (Novus Biologicals, NB600-310AF405, 1:100 sulandırma). Primer antikor uygulaması sonrasında PBS içerisinde 3 kere 5'er dk yıkama yapıldı. Zıt boyama için kesitler 1:1000 oranında PBS içerisinde sulandırılmış TO-PRO®3 (ThermoFisher Scientific, T3605) içinde 30 dk süre ile bekletildi. PBS içerisinde 3 kere 5'er dk yıkama yapıldıktan sonra kesitler Fluoroshield™ (Sigma-Aldrich, F6182) damlatılarak lamel ile kapatıldı.

2.4. Hücrelerin Elde Edilmesi

Dokulardaki GFP+ hücrelerin belirlenebilmesi için yapılan akım sitometrisi analizlerine uygun numune elde edilmesi amacıyla süt, kan ve beyin örneklerinden çeşitli yöntemlerle hücreler izole edildi.

2.4.1. Sütteki Hücreler

Gebelik sonrası emzirebilme yeteneğindeki dişi farelere intraperitoneal 200µl oksitosin (Vetaş, VETAŞ0017) verilerek süt salınımı artırıldı ve anestezi altında enjektör vasıtasıyla süt örnekleri alındı. Alınan süt örnekleri 3 kere PBS ile yıkanarak 800g'de 10 dk santrifüj edildi. Süt içerisindeki yağ ve bileşenlerin yer aldığı süpernatant atıldı. Pellet içerisinde yer alan hücreler elde edildi.

2.4.2. Kan Hücreleri

Farelerden alınan kan örneklerine eritrositlerin uzaklaştırılması için lizis işlemi uygulandı. Farelerden alınan 200 µl kan örneği üzerine 2 ml BD Pharm Lyse™ (BD Biosciences, 555899) eklenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. 200g'de 5 dk santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Pellet üzerine 2 ml PBS eklenerek 200g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan pellet üzerine 500 µl PBS eklenerek hücreler elde edildi.

2.4.3. Beyin Dokusundaki Hücreler

Farelerden elde edilen beyin dokuları, jilet ile 1 mm kalınlığında parçalara bölünerek Hibernate-A solüsyonu içerisine alındı. İçerisine 4 mg/ml papain (Sigma-Aldrich, P3125) eklenerek enzimatik parçalanma için 1 saat 30°C’de bekletildi. Süre sonunda üstteki solüsyon çekilip atıldı. Elde edilen doku parçalarına 1 ml tritürasyon solüsyonu eklendi, tritürasyon işlemi yapılarak homojen bir süspansiyon haline getirildi. 500g’de 5 dk santrifüj edilip süpernatant atıldıktan sonra pellet içerisinde hücreler elde edildi.

2.5. İmmünohistokimyasal Boyama

Farelerden alınan süt, kan ve beyin örneklerinden elde edilen hücreler immünohistokimyasal metot ile boyandı. Elde edilen hücreler BD Cytotfix/Cytoperm (BD Biosciences, 554722) ile 20 dk 4°C’de fikse edildi. Fiksasyonun ardından 400g’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pellet üzerine 250µl BD Perm/Wash (BD Biosciences, 554723) eklenerek 2 kere 400g’de 10 dk santrifüj yapıldı. Yıkama işleminin ardından özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak için hücrelere 30 dk bloklayıcı solüsyonu (%3 bovine serum albumin, %0,3 sodyum azid, %1 keçi serumu, %0,1 Triton X-100) uygulandı. BD Perm/Wash içerisinde belirtilen oranlarda sulandırılmış konjuge primer antikorlar uygulanarak 1 saat oda sıcaklığında bekletildi: anti-GFP (Novus Biologicals, NB600-310AF647, 1:100 sulandırma), anti-mouse Lineage Cocktail (Biolegend, 133306, 1:100 sulandırma) ve anti-Oct4 (Novus Biologicals, NB100-2379V). Boyama sonrasında 400g’de 10dk santrifüj edilen hücreler BD Stain Buffer (BD Pharmingen, 554675) ile yıkandı. Yıkama sonrasında 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (ThermoFisher Scientific, D1306), SYTOX Green (ThermoFisher Scientific, S7020) ve TO-PRO3 (ThermoFisher Scientific, T3605) ile zıt boyamalar yapıldı. Zıt boyama sonrasında 400g’de 10 dk santrifüj edilen hücreler BD Stain Buffer ile yıkandı.

2.6. Akım Sitometrisi Analizi

Süt, kan ve beyin dokularından elde edilen hücre süspansiyonları Thoma lamı ile sayılarak 1 milyon/ml hücre olacak şekilde ayarlandı. Sayım sonrası hücre süspansiyonlarına, kümelenmenin engellenmesi için, 50 mg/ml oranında Deoksiribonükleaz I (Sigma, D4513) ile eklendi. Örnekler 70 µm’lik filtrelerden

(Corning Inc., CLS431751) geçirildi. Hücre süspansiyonları 5 ml'lik polipropilen tüp (Corning Inc., 352002) içerisine alındı.

Akım sitometrisi cihazının (BD Biosciences, BD Influx™ Cell Sorter with Bioprotect IV Safety Cabinet) lazer kalibrasyonu için 8 boyalı parlak floresan ışıma veren boncuklar (BD Biosciences, BD Rainbow Calibration Particles 8 peaks, 559123), hücre ayrıştırma (sort) kalibrasyonu için parlak floresan ışıma veren boncuklar (BD Biosciences, BD FACS AccuDrop Beads, 345249) kullanıldı. Kalibrasyon işlemlerinin ardından polipropilen tüpler içerisindeki hücre süspansiyonları akım sitometrisi cihazına yüklendi. Örneklerdeki GFP sinyalinin otofloresan ışımalardan ayırt edilebilmesi için negatif kontrol (C57BL/6) ve pozitif kontrol (C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)) hayvanlara ait hücre örnekler de kullanılmıştır. Antikorlarla işaretlenmiş olan hücrelerdeki özgün olmayan bağlanmadan kaynaklanan zemin boyanmalarının tespit edilebilmesi için IgG1- κ Alexa Fluor 647 (BioLegend, 400130) izotip antikorla işaretlenmiş hücre örnekleri kullanıldı.

Boyanmış olan örneklerdeki DAPI, GFP ve anti-GFP sinyallerinin akım sitometrisi ile değerlendirmesi için sırasıyla 355nm, 488nm ve 640nm lazerler ile 460/40, 530/40 ve 670/30 filtre kombinasyonu kullanıldı. Akım sitometrisi analizi sırasında örnekler içerisindeki hücre dışı partiküllerin analiz dışında bırakılması için yalnızca nükleusları DAPI ile işaretlenmiş olan hücreler alt grup olarak seçilerek daha sonraki incelemeler bu hücreler içerisinde yapıldı. Örneklerdeki hücre çiftleri ve hücre kümelerinin analiz dışı bırakılması (doublet and multiplet discrimination) için sırasıyla Side Scattered-W (SSC-W)/SSC-H değerlendirmesi ve Forward Scattered-W (FSC-W)/FSC-H değerlendirmesi yapılarak yalnızca tekli hücreler elde edildi. Hücre süspansiyonlarının hazırlık aşamaları sırasında fiziksel ve kimyasal etkilere bağlı olarak parçalanmış hücrelerden açığa çıkan hücre artıklarının tespit edilmesi amacıyla büyüklükleri hücrelerden küçük olan partiküller FSC/SSC değerlendirmesi yapılarak analiz dışı bırakılmıştır.

Analiz sırasında aynı anda DAPI ve anti-GFP antikorları ile boyanmış olan GFP+ hücreler; 460/40[355]/FSC, 530/40[488]/FSC ve 670/30[640]/FSC değerlendirmeleriyle alt kapılara (gate) alınarak gruplandırıldı. Gruplanan hücreler, anne sütü yoluyla yavruya geçen GFP+ hücreler olarak belirlendi. Belirlenen hücrelerin (20.000 hücre) tüm hücre popülasyonu içerisindeki oranları istatistiksel

olarak belirlendi. Hücrelerin mikroskopik olarak incelenmesi için, belirlenen hücreler tüm hücre süspansiyonu içerisinde ayrı bir tüpe sort edildi.

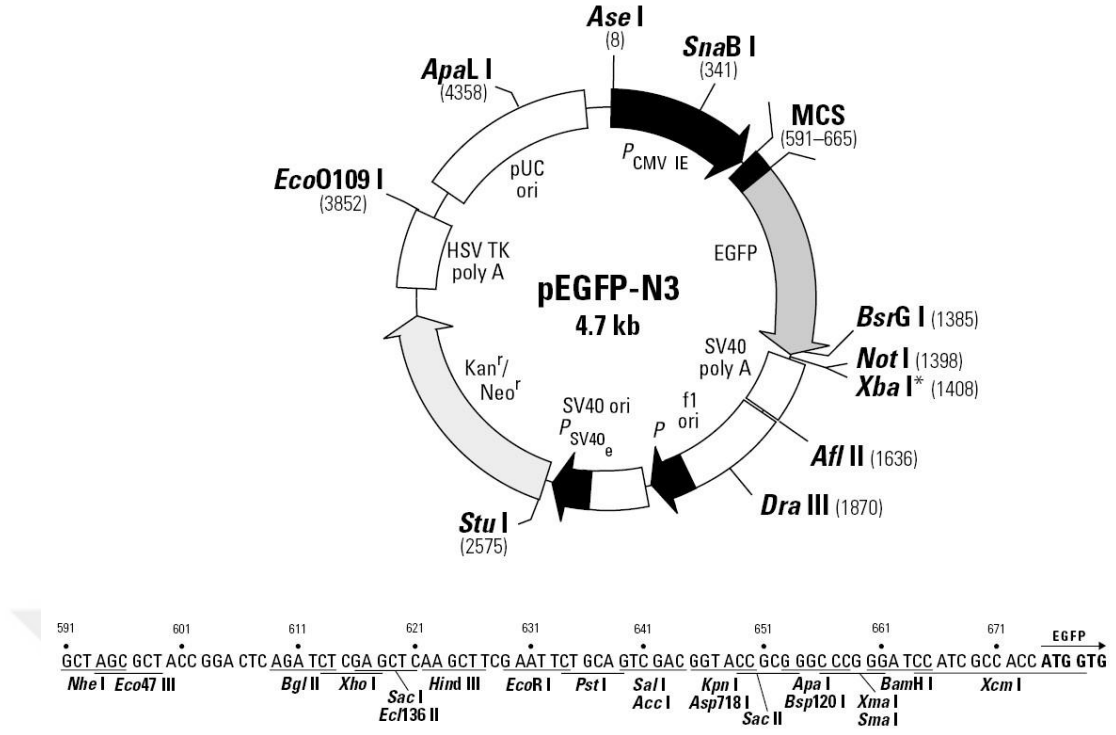
2.7. Kantitatif PCR (qPCR) Yöntemi

qPCR analizleri Bio-Rad CFX Connect™ (Bio Rad, CA, A.B.D.) cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Eşik döngü (Ct) değerleri her amplifikasyonda hesaplanarak, hedeflenen gen bölgelerinin miktarı CFX Manager™ Software programı ile otomatik olarak analiz edildi. Pozitif kontrol olarak konsantrasyonu bilinen deneye özgü plazmid standartları kullanılırken, negatif kontrol olarak da moleküler çalışmalara uygun su kullanıldı.

Standart eğrinin oluşturulabilmesi için GFP geni içeren plazmidler (pEGFP-N3) kullanıldı (Şekil 2.2). Plazmid konsantrasyonu Qubit® 2.0 Fluorometer (ThermoScientific, CA, USA) kullanılarak ölçüldü. Elde edilen ortalama değerler aşağıdaki formül kullanılarak ng/μL'den kopya/μL değerine çevrildi (Joshi ve ark 2008).

$$m = [n] \left[\frac{1 \text{ mol}}{6,02 * 10^{23}} \right] \left[\frac{660 \text{ g}}{\text{mol}} \right] = [n] \left[1,096 * 10^{-21} \frac{\text{g}}{\text{bç}} \right]$$

n = DNA boyu, bç= baz çifti, m = kütle, 1 mol çift sarmal DNA molekülünün ortalama moleküler ağırlığı = 660 g/mol



Şekil 2.2: pEGFP-N3 plazmidine ait restriksiyon haritası ve klonlama bölgeleri.

Standart eğri oluşturmak için plazmidler 2, 20, 200, 2.000, 20.000 ve 200.000 kopya/µl aralığında su kullanılarak seyreltilerek kullanıldı. Seri seyreltmeden sonra qPCR analizi yapıldı. Analiz sonrası örnekler ait elde edilen C_T değerleri ve oluşturulan standart eğri denklemi kullanılarak örneklerdeki GFP kopya sayısı belirlendi (Joshi ve ark 2008). qPCR analizi için Çizelge 2,4'deki karışım ve Çizelge 2,5'deki reaksiyon koşulları kullanıldı.

Çizelge 2.4: GFP gen amplifikasyonu için qPCR bileşenleri.

Bileşenler	Miktar
SsoAdvanced Universal Probes Supermix (2x)	5 µl
GFP ileri (F) primer (10µM stok) 5' AGT GCT TCA GCC GCT ACC 3'	0.5 µl
GFP geri (R) primer (10µM stok) 5' GAA GAT GGT GCG CTC CTG 3'	0.5 µl
GFP Probe 5' FAM TTC AAG TCC GCC ATG CCC GAA NON FLUORESCENT QUENCHER 3'	0.25 µl
DNA	1 ul
Su	2.75 µl
Toplam miktar	10 µl

Çizelge 2.5: qPCR döngü koşulları.

Program	Döngü Sayısı	Sıcaklık (°C)	Süre
Polimeraz aktivasyonu / DNA Denatürasyonu	1	95	10 dk
Denatürasyon	50	95	10 sn
Bağlanma / Uzama		60	1 dk

2.8. DNA İzolasyonu

Örneklerden DNA izolasyonu Qiagen DNeasy kiti (Qiagen, Valencia, CA, USA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Üretici firmanın önerdiği protokole uygun olarak doku beyin dokusu örnekleri küçük parçalara parçalanıp 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. Üzerine 180 µl ATL Buffer ve 20 µl proteinaz K eklenerek karıştırıldı. Süspansiyon üzerine 200 µl AL Buffer eklenerek 56°C’de 10 dk bekletildi. Üzerine 200 µl saf etanol eklenerek karıştırıldı. Tüm süspansiyon “DNeasy Mini spin” kolonlarına koyularak 6.000g’de 1 dk santrifüj edildi. Kolon altında toplanan solüsyon atıldı. Üzerine 500 µl AW1 Buffer eklenerek 6.000g’de 1 dk santrifüj edildi. Kolon altında toplanan solüsyon atıldı. Üzerine 500 µl AW2 Buffer eklenerek 17.000g’de 5 dk santrifüj edildi. Kolon altında toplanan solüsyon atıldı. Spin kolon yeni 1,5 mikrosantrifüj tüpü içerisine alındı. Üzerine 200 µl AE Buffer eklenip 6.000g’de 1 dk santrifüj edilerek saf DNA tüp içerisinde toplandı.

2.9. Mikroskopik İnceleme

İmmünohistokimyasal olarak işaretlenen beyin dokusu kesitleri ve FACS sonrası elde edilen hücreler lazer taramalı konfokal mikroskobu (LSM 780, Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) ile görüntülendi. İncelenen örneklerdeki GFP+ ve GFP- hücrelerin floresan ışıma yoğunluk değerleri 100 hücre üzerinden ölçüldü. İmmünohistokimyasal olarak boyanan kesitlerde anti-GFP antikoru ve GFP’ye ait floresan sinyallerinin lokalizasyonlarının belirlenmesi amacıyla hücreler seçilerek kolokalizasyon analizleri için floresan ışıma yoğunlukları ölçüldü. Tüm ölçümler ZEN 2012 (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) programı kullanılarak yapıldı.

2.10. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Graph Pad Prism 6 programı (Graphpad Software Inc., CA, ABD) kullanıldı. Mikroskopik incelemelerde GFP+ olarak belirlenen hücrelerin floresan ışıma yoğunluğu GFP- hücrelerle *t* testi ile karşılaştırıldı. Aynı hücrede bulunan GFP+ floresan ışıma ve beraberindeki immünohistokimyasal markırlardan alınan floresan ışımaların kolokalizasyon karşılaştırmaları Pearson korelasyon analizi ile yapıldı. qPCR sonuçları *t* testi ile karşılaştırıldı.

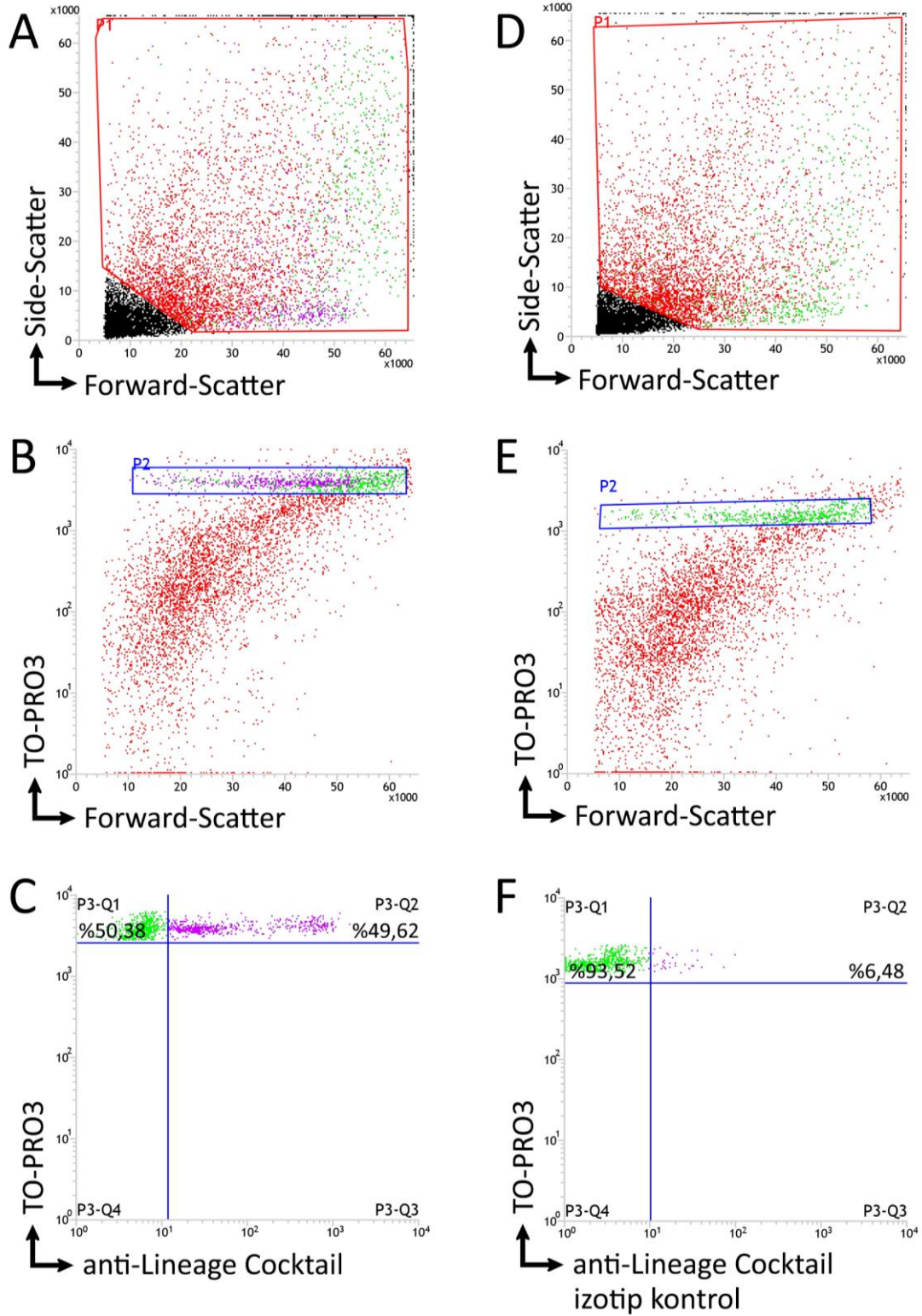
3. BULGULAR

3.1. Süt Örneklerinin İncelenmesi

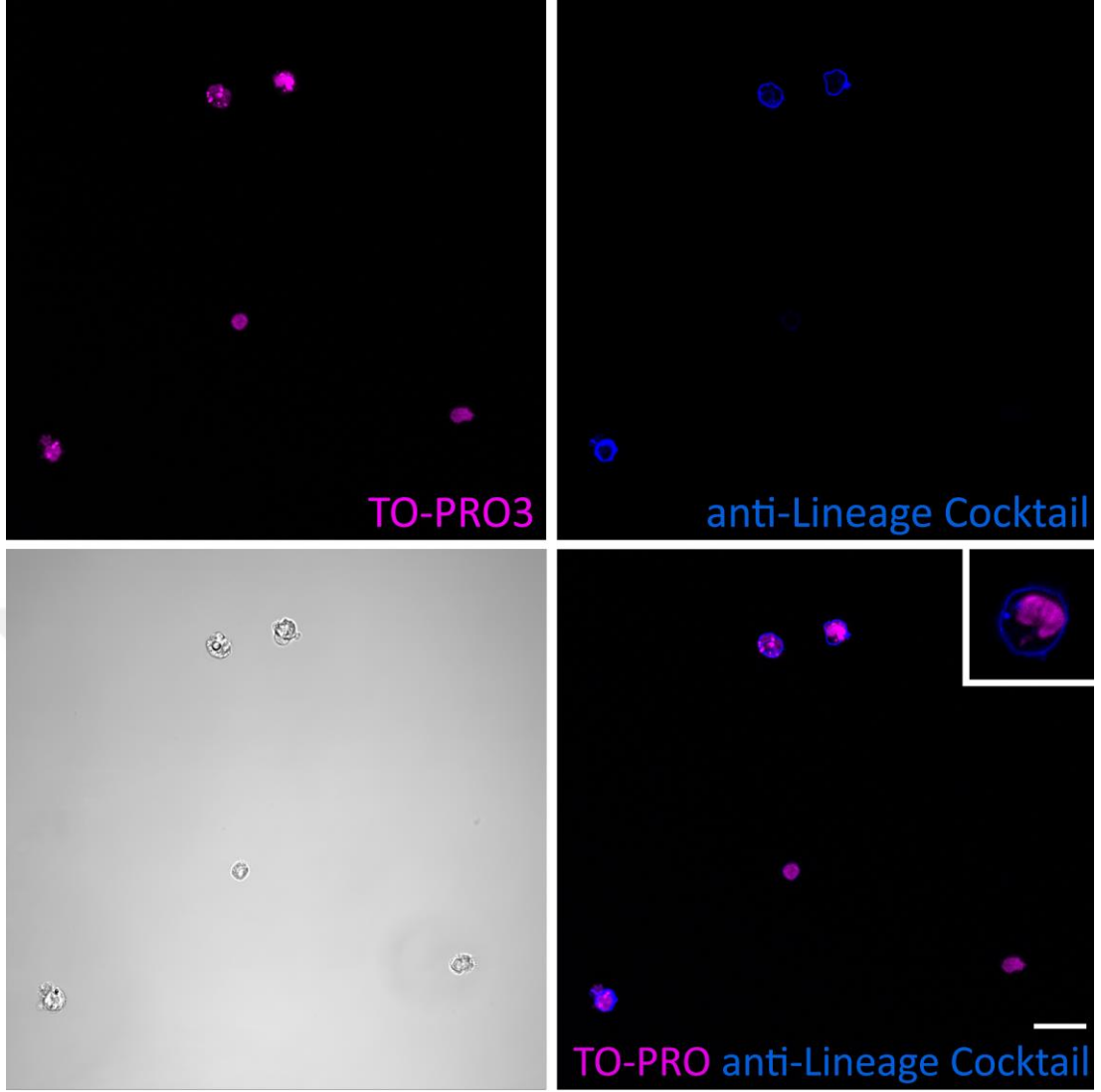
Emzirme dönemindeki dişi farelerden alınan süt örnekleri akım sitometrisi ile incelendi. Süt içerisindeki farklı hücre tiplerinin belirlenebilmesi amacıyla T lenfositleri, B lenfositleri, monosit/makrofaj serisi, granülositler, NK hücreleri için Pacific Blue™ konjuge anti-Lineage Cocktail (anti-CD3, anti-Ly-6G/Ly-6C, anti-CD11b, anti-CD45R/B220, anti-TER-119) antikorları ile immünohistokimyasal boyama yapıldı. Spesifik olmayan immünohistokimyasal bağlanmaları belirlemek için aynı süt örnekleri Pacific Blue™ izotip kontrol antikoru ile boyama yapıldı. Yapılan boyamalarda tüm hücrelerin nükleusları TO-PRO3 ile boyandı.

İmmünohistokimyasal boyama sonrasında süt içerisindeki hücreleri, yağ damlları ve diğer partiküllerden ayırabilmek amacıyla akım sitometrisinde side-scatter/forward-scatter analizi ile olası hücre grupları belirlendi. Belirlenen grup içerisinde TO-PRO3 ile işaretli olan hücreler seçildi. Bu hücreler içerisinde aynı zamanda anti-Lineage Cocktail ve Pacific Blue™ izotip kontrol ile boyanan hücrelerin miktarları belirlendi. Süt içerisindeki hücrelerin %6,48'i spesifik olmayan bağlanma gösterirken, %49,62'si anti-Lineage Cocktail ile boyandı (Şekil 3.1).

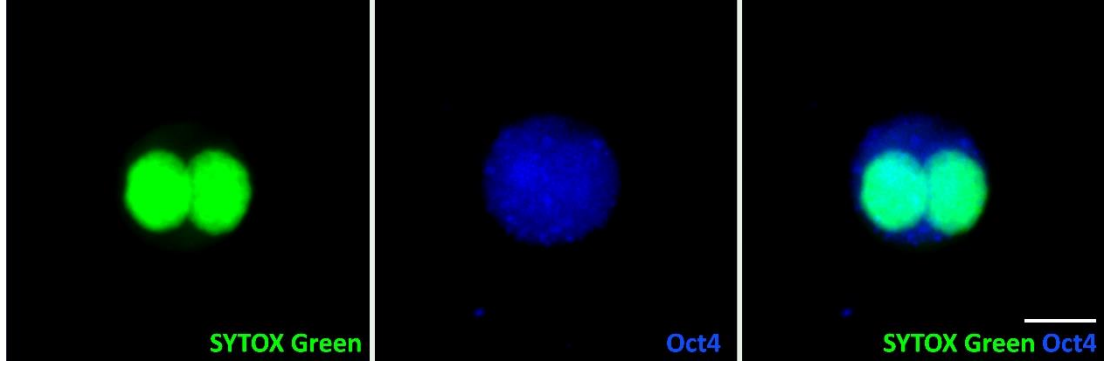
Akım sitometrisi analizi sonrası hücreler mikroskopik inceleme için sort edildi. Konfokal mikroskop ile yapılan incelemelerde sort edilen hücrelerin anti-Lineage Cocktail ve TO-PRO3 ile boyandıkları görüldü (Resim 3.1). Bu hücrelerin dışında anti-Oct4 ile boyanan hücreler tespit edildi (Resim 3.2).



Şekil 3.1: Süt örneklerine yapılan anti-Lineage Cocktail (A, B, C) ve izotip kontrol (D, E, F) boyaması akım sitometrisi analizi sonuçları. Grafiklerde görülen P1 bölgeleri (A, C) olası hücre gruplarını, P2 bölgeleri (B, E) nükleusları TO-PRO3 ile boyanan hücreleri, P3-Q2 bölgeleri (C, F) hem TO-PRO3 hem de Pacific Blue™ ile işaretlenen hücreleri göstermektedir.



Resim 3.1: Süt örneklerine yapılan anti-Lineage Cocktail boyaması sonrası akım sitometrisi ile sort edilen hücrelerin mikroskopik görüntüsü. Hücre yüzeylerindeki anti-Lineage Cocktail (mavi) ve TO-PRO3 ile boyanan nükleuslar (mor) görülmektedir. Böbrek şekilli nükleusa sahip anti-Lineage Cocktail ile boyanan bir monosit (inset). 40x/1.4 yağlı objektif, ölçek: 20 μ m.



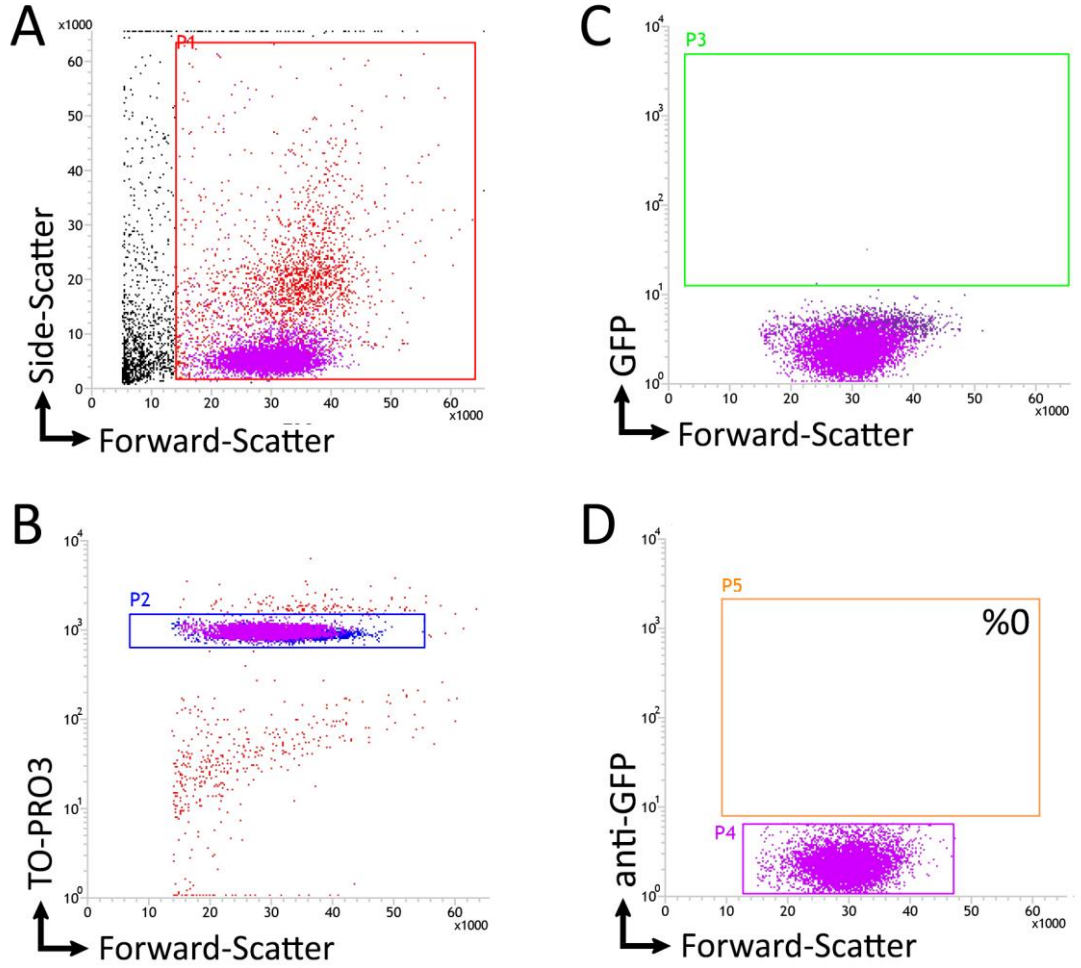
Resim 3.2: Süt örneklerine yapılan anti-Oct4 boyaması sonrası elde edilen hücrelerin mikroskopik görüntüsü. Hücre içerisindeki anti-Oct4 (mavi) ve SYTOX Green ile boyanan nükleuslar (yeşil) görülmektedir. 20x/0,8 objektif, ölçek: 10µm.

3.2. Kan Örneklerinin İncelenmesi

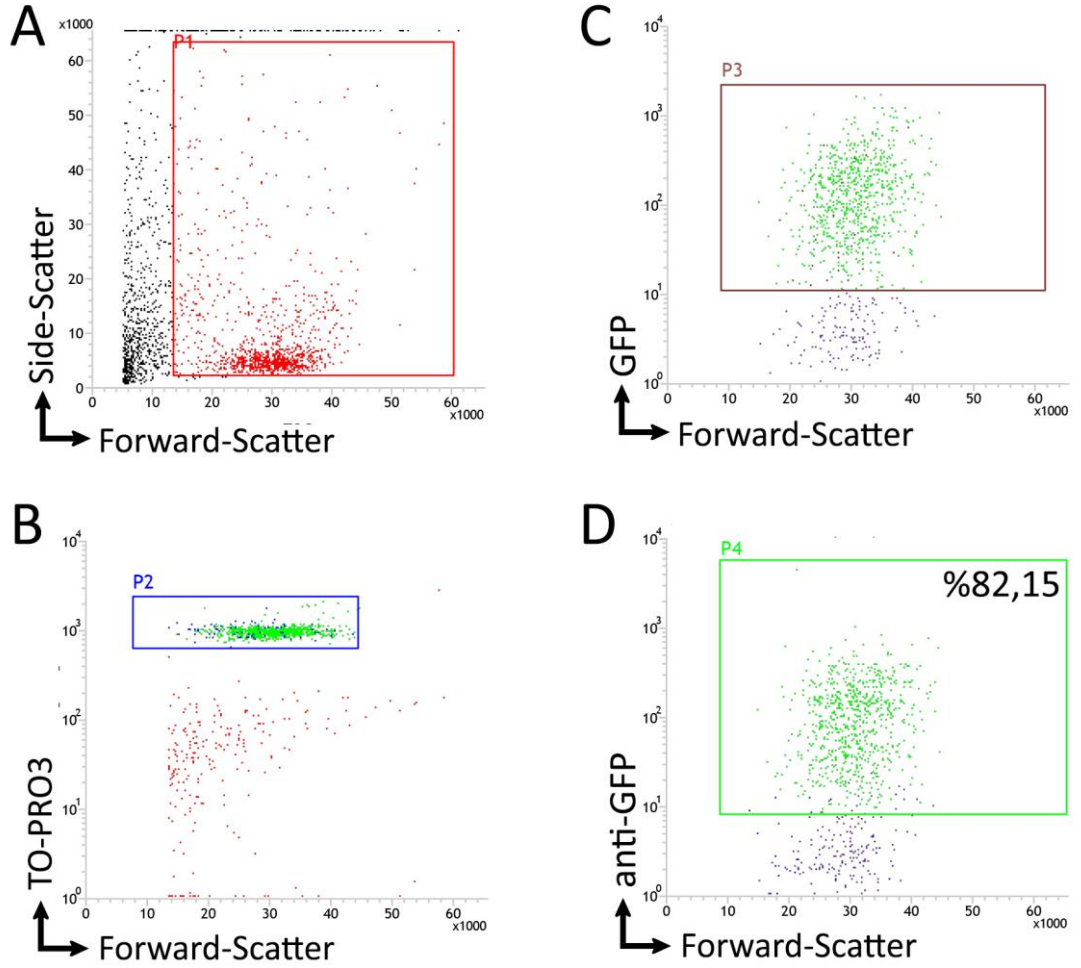
GFP+ anneler tarafından emzirilen normal farelerden alınan kan örnekleri akım sitometrisi ile incelendiler. Kan hücreleri içerisinde GFP+ hücrelerin varlığı araştırıldı. Bu amaçla deney gruplarından alınan kan örnekleri ile birlikte GFP+ ve normal tip (GFP-) farelerden alınan kan örnekleri de pozitif ve negatif kontrol olarak kullanıldı. İncelenen tüm örnekler, GFP'ye ait sinyalin doğrulanması amacıyla, Alexa Fluor 568 ile konjuge anti-GFP antikoruna ile immünohistokimyasal olarak işaretleme yapıldı. Yapılan boyamalarda tüm hücrelerin nükleusları TO-PRO3 ile boyandı.

İmmünohistokimyasal boyama sonrasında kan örnekleri içerisindeki olası tüm hücre grupları akım sitometrisinde side-scatter/forward-scatter analizi ile belirlendi. Belirlenen grup içerisinde TO-PRO3 ile işaretli olan hücreler seçildi. Pozitif ve negatif kontrol örnekleri üzerinden GFP ve anti-GFP'ye ait sinyaller için sınır belirlendi. Belirlenen hücreler içerisinde GFP+ ve anti-GFP antikoruna ile boyanan hücrelerin miktarları belirlendi. Negatif kontrol örneklerinde %0, pozitif kontrol örneklerinde %82,15 oranında GFP+ hücre görülürken GFP anneler tarafından emzirilen farelere ait kan örneklerinde %5,18 oranında kimerik hücre (GFP+, anti-GFP+) belirlendi (Şekil 3.2-3.4).

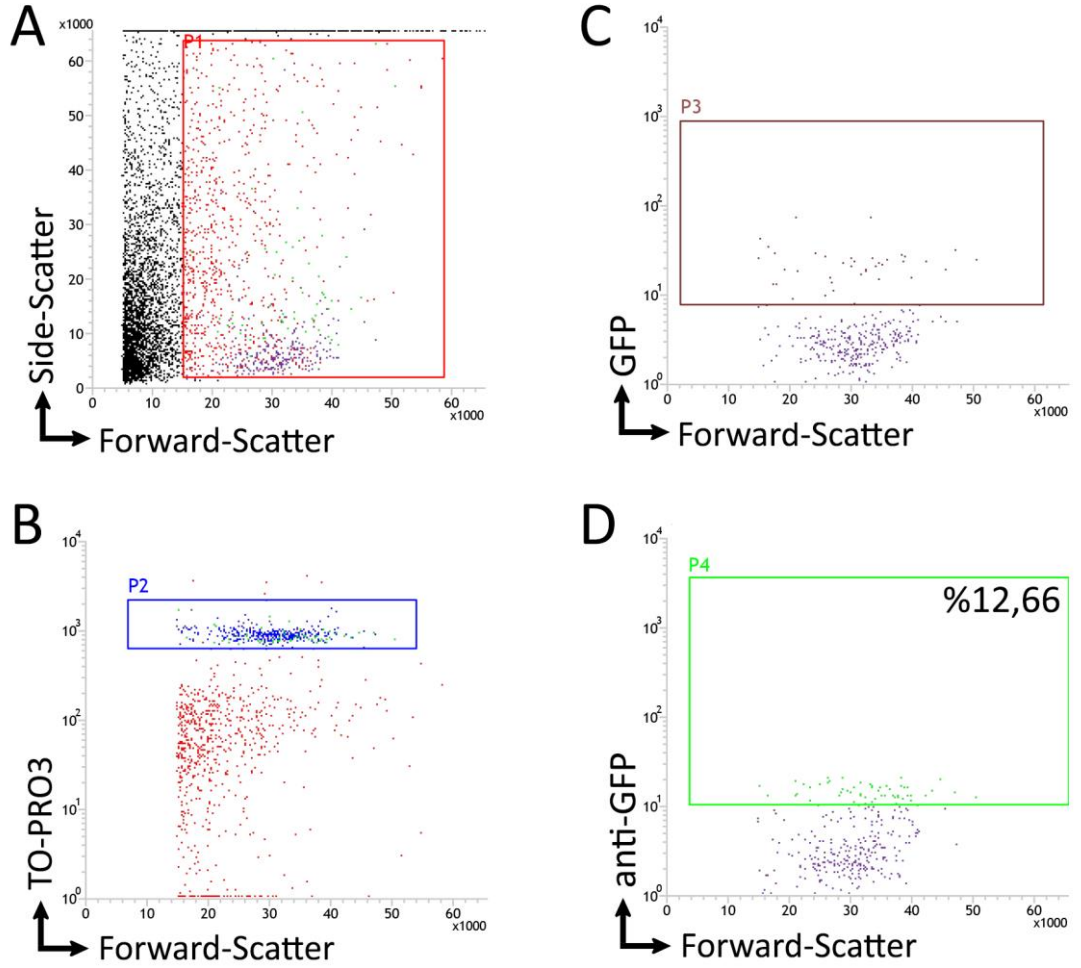
Akım sitometrisi analizi sonrası belirlenen kimerik hücreler mikroskopik inceleme için sort edildi. Konfokal mikroskop ile yapılan incelemelerde sort edilen hücrelerin GFP+ olup anti-GFP antikoruna ve TO-PRO3 ile boyandıkları görüldü (Resim 3.3).



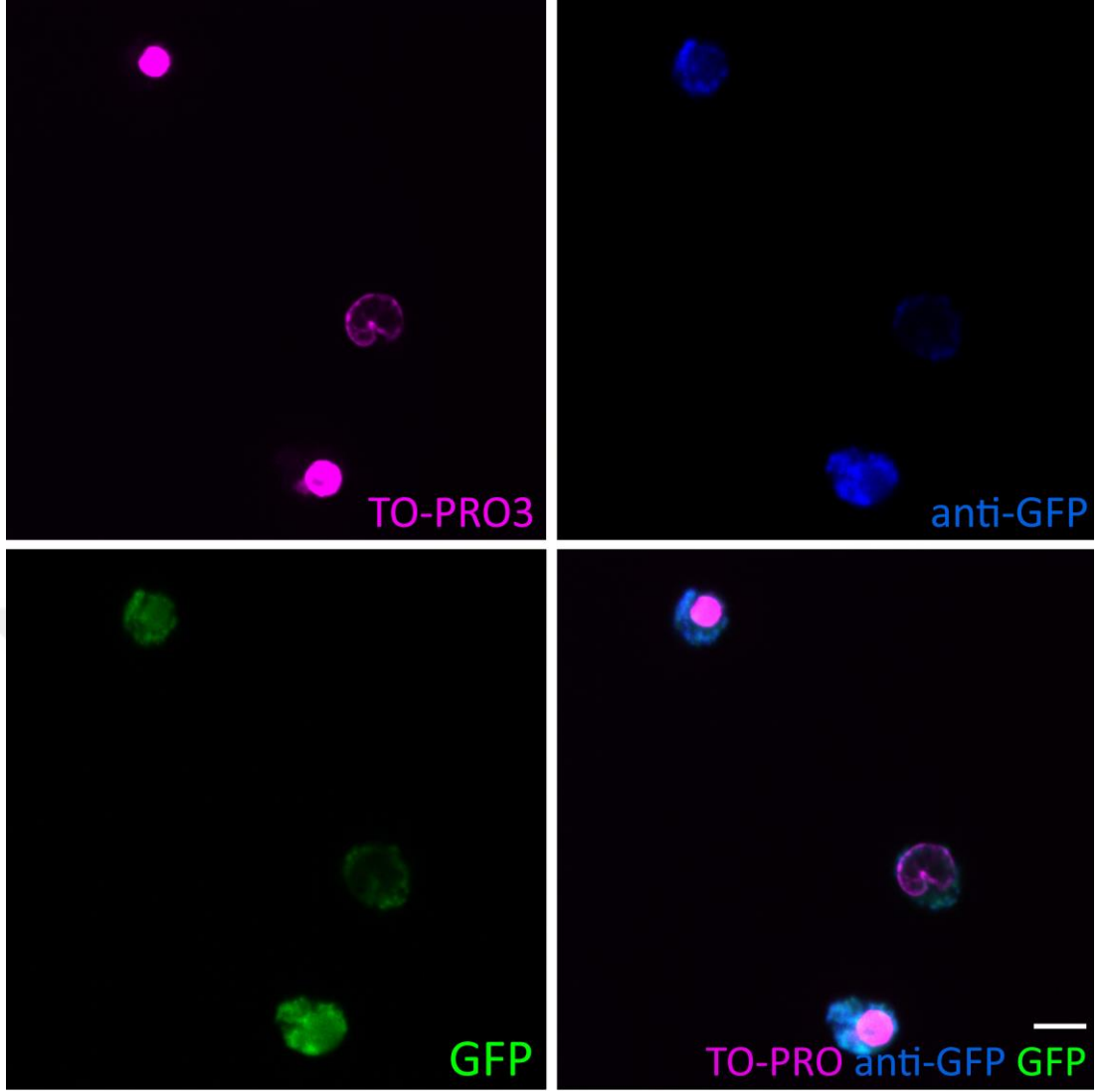
Şekil 3.2: Normal farelerden alınan kan örneklerine yapılan anti-GFP immünohistokimyasal boyaması akım sitometrisi analizi sonuçları. Grafiklerde görülen P1 bölgesi (A) olası hücre gruplarını, P2 bölgesi (B) nükleusları TO-PRO3 ile boyanan hücreleri, P3 bölgesi (C) GFP+ hücreleri, P4 bölgesi (D) anti-GFP boyaması ile işaretlenmeyen hücreleri, P5 bölgesi (D) anti-GFP antikoru ile boyanan hücreleri göstermektedir.



Şekil 3.3: GFP+ farelerden alınan kan örneklerine yapılan anti-GFP immünohistokimyasal boyaması akım sitometrisi analizi sonuçları. Grafiklerde görülen P1 bölgesi (A) olası hücre gruplarını, P2 bölgesi (B) nükleusları TO-PRO3 ile boyanan hücreleri, P3 bölgesi (C) GFP+ hücreleri, P4 bölgesi (D) anti-GFP antikoru ile boyanan hücreleri göstermektedir.



Şekil 3.4: GFP+ anneler tarafından emzirilen normal farelerden alınan kan örneklerine yapılan anti-GFP immünohistokimyasal boyaması akım sitometrisi analizi sonuçları. Grafiklerde görülen P1 bölgesi (A) olası hücre gruplarını, P2 bölgesi (B) nükleusları TO-PRO3 ile boyanan hücreleri, P3 bölgesi (C) GFP+ hücreleri, P4 bölgesi (D) anti-GFP antikoru ile boyanan hücreleri göstermektedir.



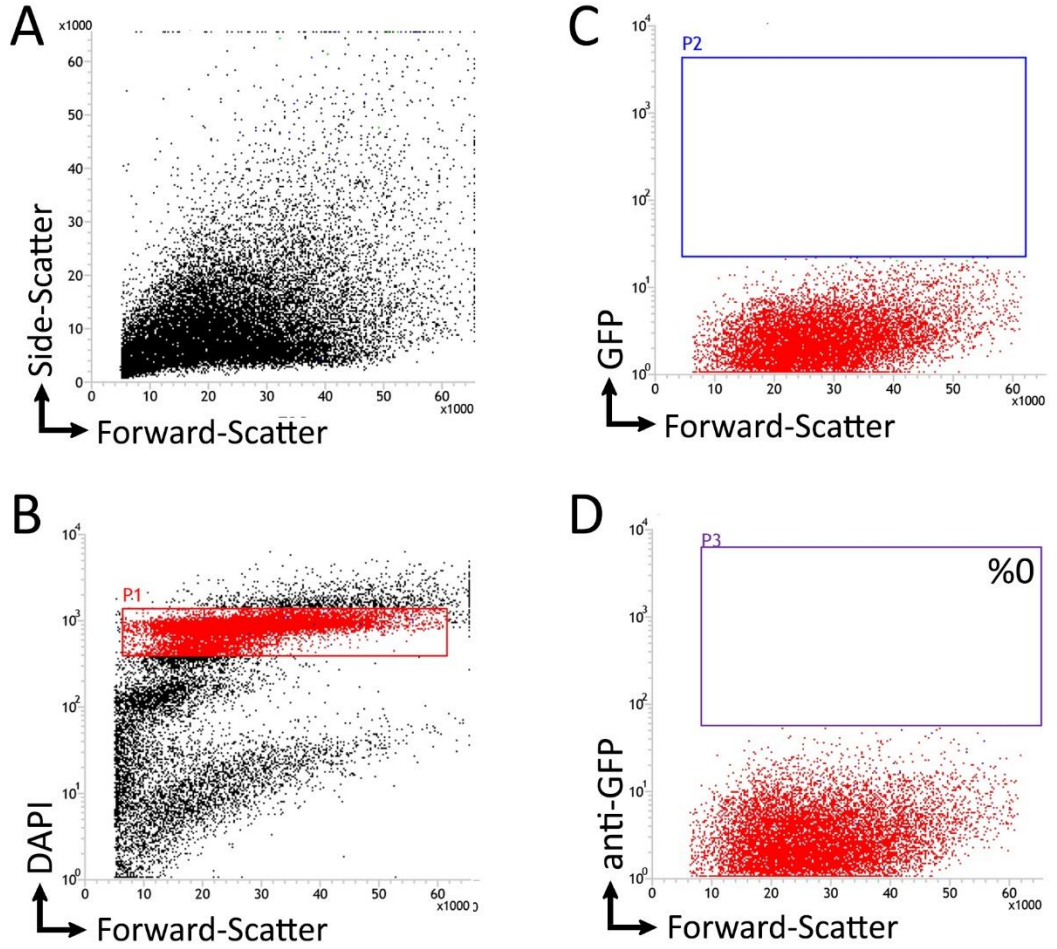
Resim 3.3: GFP+ anneler tarafından emzirilen normal farelere ait kan örneklerine yapılan anti-GFP boyaması sonrası akım sitometrisi ile sort edilen hücrelerin mikroskopik görüntüsü. GFP+ olan kimerik hücrelerin (yeşil) anti-GFP (mavi) ve TO-PRO3 ile (mor) boyandığı görülmektedir. 40x/1.4 yağlı objektif, ölçek: 10µm.

3.3. Beyin Örneklerinin İncelenmesi

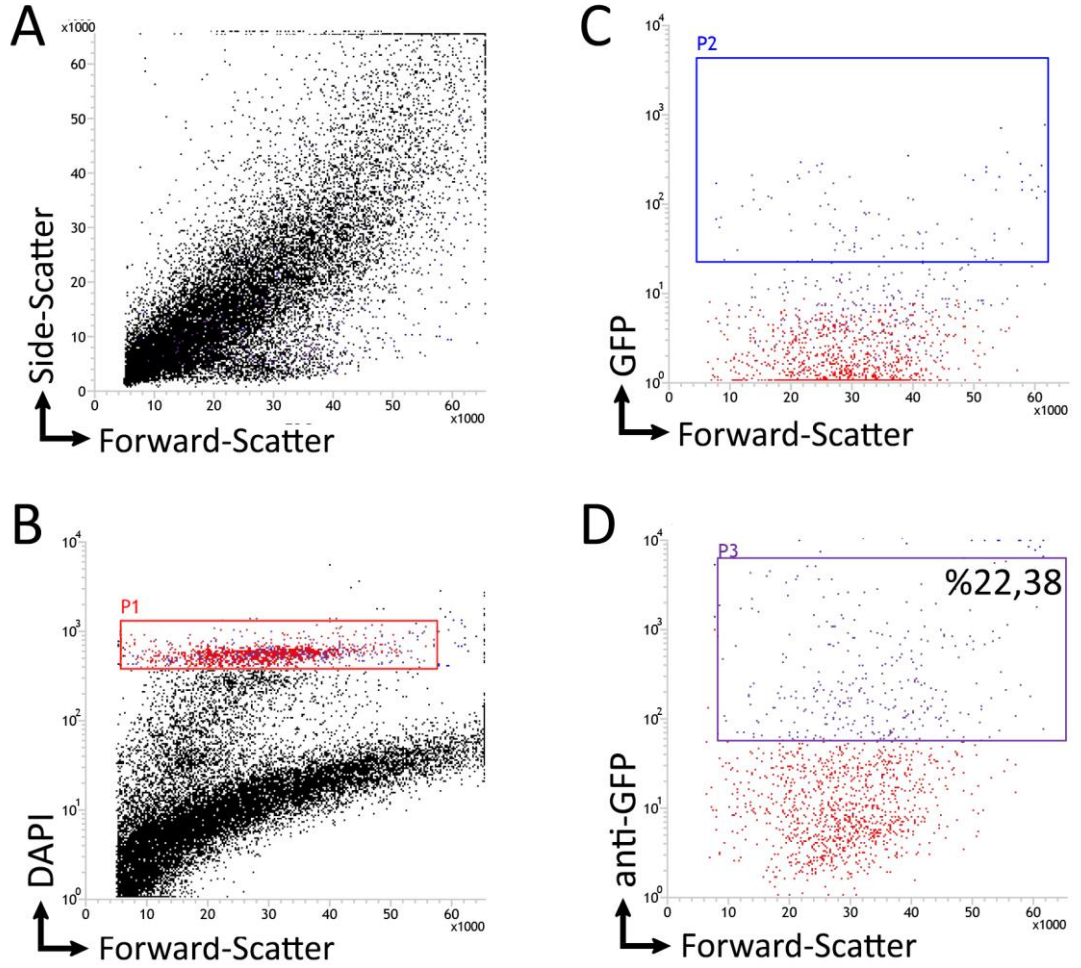
3.3.1. Akım Sitometrisi Analizi

GFP+ anneler tarafından emzirilen normal farelerden alınan beyin örnekleri akım sitometrisi ile incelendiler. Beyin hücreleri içerisinde GFP+ hücrelerin varlığı araştırıldı. Bu amaçla deney gruplarından alınan beyin örnekleri ile birlikte GFP+ ve normal tip (GFP-) farelerden alınan beyin örnekleri de pozitif ve negatif kontrol olarak kullanıldı. İncelenen tüm örneklerle, GFP'ye ait sinyalin doğrulanması amacıyla, Alexa Fluor 568 ile konjuge anti-GFP antikoru ile immünohistokimyasal olarak işaretleme yapıldı. Yapılan boyamalarda tüm hücrelerin nükleusları DAPI ile boyandı.

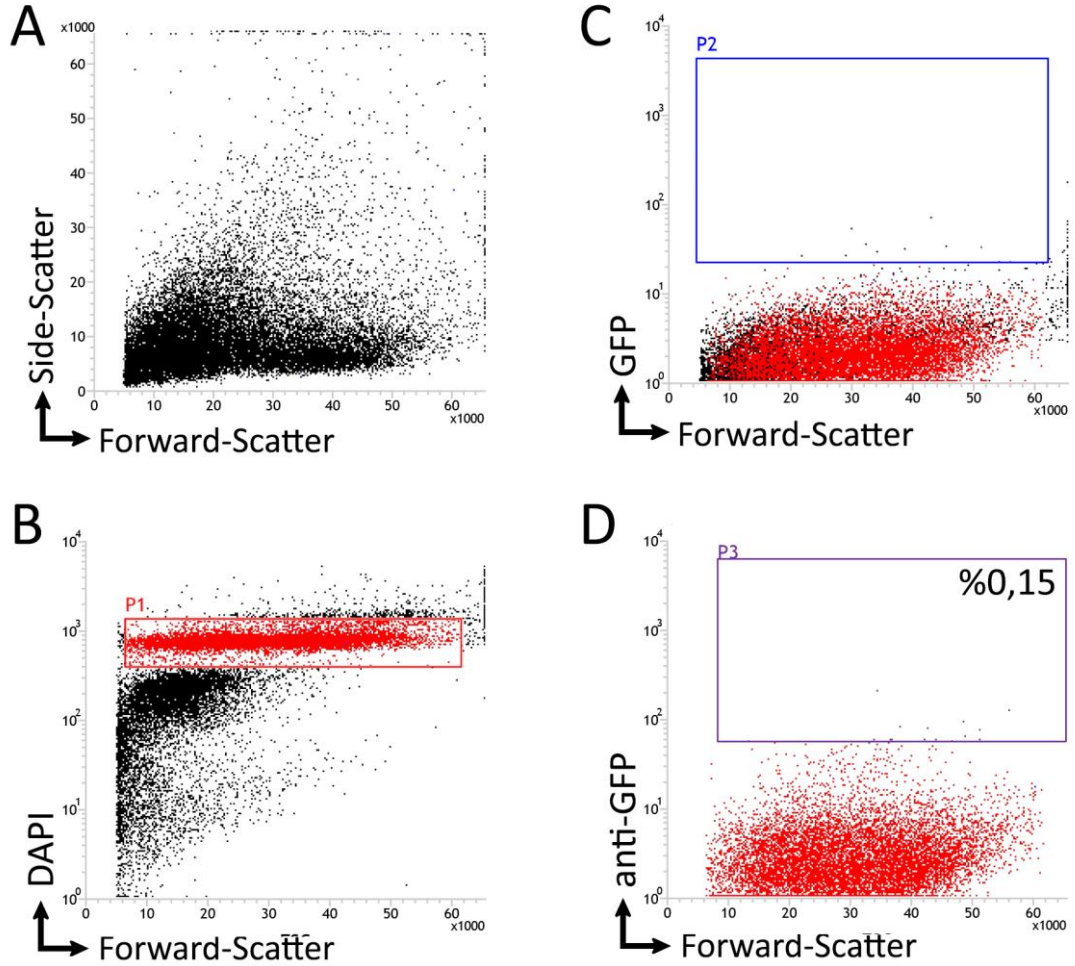
İmmünohistokimyasal boyama sonrasında beyin örnekleri içerisindeki yapılar sitometrisinde side-scatter/forward-scatter analizi ile incelendi. Tüm örneklerin içerisindeki DAPI ile işaretli olan hücreler seçildi. Pozitif ve negatif kontrol örnekleri üzerinden GFP ve anti-GFP'ye ait sinyaller için sınır belirlendi. Belirlenen hücreler içerisinde GFP+ ve anti-GFP antikoru ile boyanan hücrelerin miktarları belirlendi. Negatif kontrol örneklerinde %0, pozitif kontrol örneklerinde %22,38 oranında GFP+ hücre görülürken GFP anneler tarafından emzirilen farelere ait beyin örneklerinde %0,15 oranında kimerik hücre (GFP+, anti-GFP+) belirlendi (Şekil 3.5-3.7).



Şekil 3.5: Normal farelerden alınan beyin örneklerine yapılan anti-GFP immünohistokimyasal boyaması akım sitometrisi analizi sonuçları. Beyin örnekleri içerisindeki tüm yapılar SSC-FSC grafiğinde görülmektedir (A). Grafiklerde görülen P1 bölgesi (B) nükleusları DAPI ile boyanan hücreleri, P2 bölgesi (C) GFP+ hücreleri, P3 bölgesi (D) anti-GFP antikoru ile boyanan hücreleri göstermektedir.



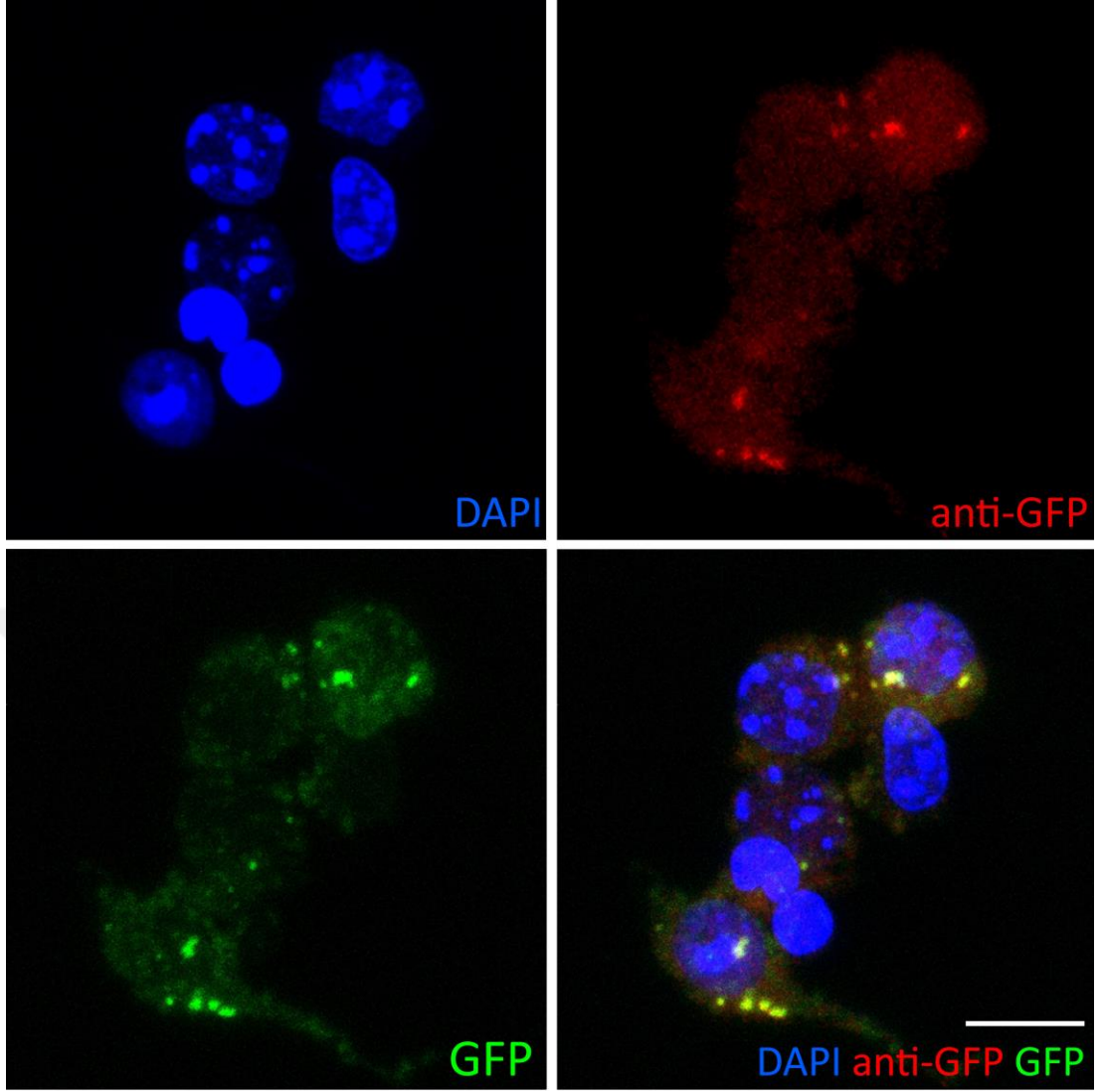
Şekil 3.6: GFP+ farelerden alınan beyin örneklerine yapılan anti-GFP immünohistokimyasal boyaması akım sitometrisi analizi sonuçları. Beyin örnekleri içerisindeki tüm yapılar SSC-FSC grafiğinde görülmektedir (A). Grafiklerde görülen P1 bölgesi (B) nükleusları DAPI ile boyanan hücreleri, P2 bölgesi (C) GFP+ hücreleri, P3 bölgesi (D) anti-GFP antikoru ile boyanan hücreleri göstermektedir.



Şekil 3.7: GFP+ anneler tarafından emzirilen normal farelerden alınan beyin örneklerine yapılan anti-GFP immünohistokimyasal boyaması akım sitometrisi analizi sonuçları. Beyin örnekleri içerisindeki tüm yapılar SSC-FSC grafiğinde görülmektedir (A). Grafiklerde görülen P1 bölgesi (B) nükleusları DAPI ile boyanan hücreleri, P2 bölgesi (C) GFP+ hücreleri, P3 bölgesi (D) anti-GFP antikoruna ile boyanan hücreleri göstermektedir.

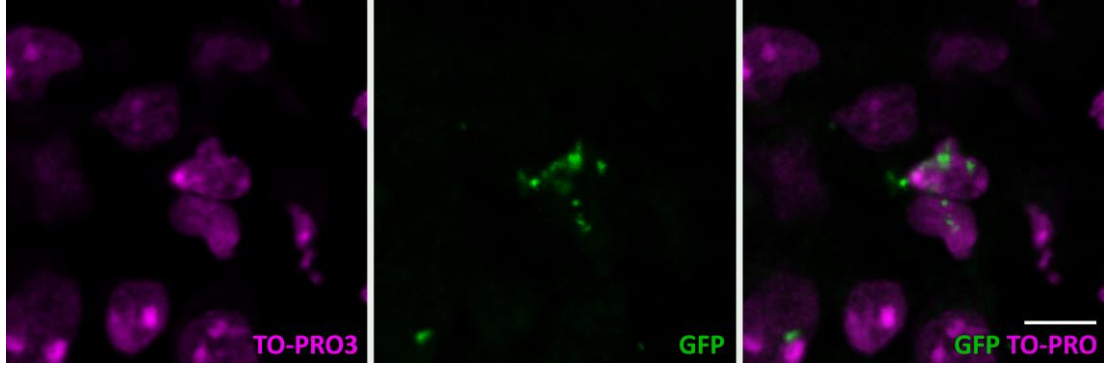
3.3.2. Mikroskopik İncelemeler

Akım sitometrisi analizi sonrası beyin örneklerinde belirlenen kimerik hücreler mikroskopik inceleme için sort edildi. Konfokal mikroskop ile yapılan incelemelerde sort edilen hücrelerin GFP+ olup anti-GFP antikoruna ve DAPI ile boyandıkları görüldü (Resim 3.4).



Resim 3.4: GFP+ anneler tarafından emzirilen normal farelere ait beyin örneklerine yapılan anti-GFP boyaması sonrası akım sitometrisi ile sort edilen hücrelerin mikroskopik görüntüsü. GFP+ olan kimerik hücrelerin (yeşil) anti-GFP (kırmızı) ve DAPI ile (mavi) boyandığı görülmektedir. 40x/1.4 yağlı objektif, ölçek: 10µm.

Doğumdan sonra 7 gün ve 30 gün boyunca GFP+ anneler tarafından emzirilen gruplarda beyin dokularından kesitler alınarak mikroskopik olarak incelendi. Nükleuslar TO-PRO3 ile boyanan kesitlerde yeşil floresan ışıma yapan hücreler, emzirme yoluyla anneden yavruya geçiş yapan GFP+ hücreler olarak değerlendirildi (Resim 3.5).



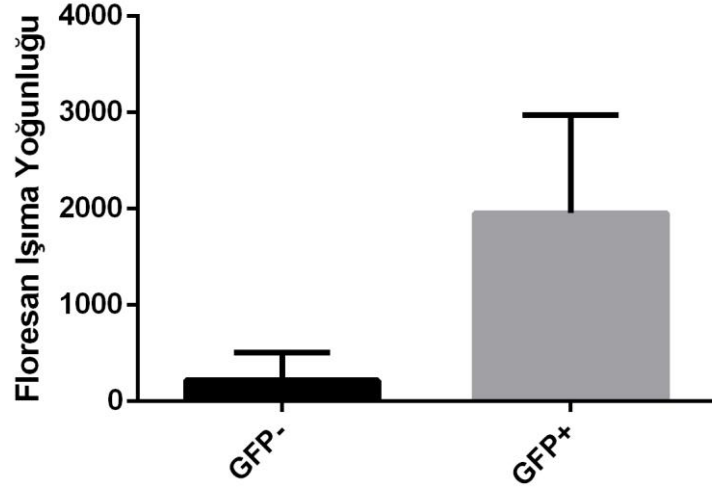
Resim 3.5: GFP+ anneler tarafından emzirilen hayvanların beyin dokularının mikroskopik görüntüsü. GFP+ annenin sütünden yavruya geçiş yapan GFP+ hücreler (yeşil) ve GFP- hücreler nükleusları TO-PRO3 ile işaretlenmiş (mor) olarak görülmektedir. 40x/1.4 yağı objektif, ölçek: 10µm.

GFP+ olarak belirlenen hücrelerdeki yeşil ışımının doğrulanması amacıyla GFP+ hücrelerin floresan ışımaya yoğunlukları kontrol grubundaki GFP- hücreler ile karşılaştırıldı. GFP+ olarak belirlenen hücrelerin GFP- hücrelere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde ($p < 0.0001$) daha yüksek floresan ışımaya yaptıkları belirlendi (Çizelge 3.1, Şekil 3.8).

Çizelge 3.1: GFP+ ve GFP- hücrelerin floresan ışımaya yoğunlukları karşılaştırması.

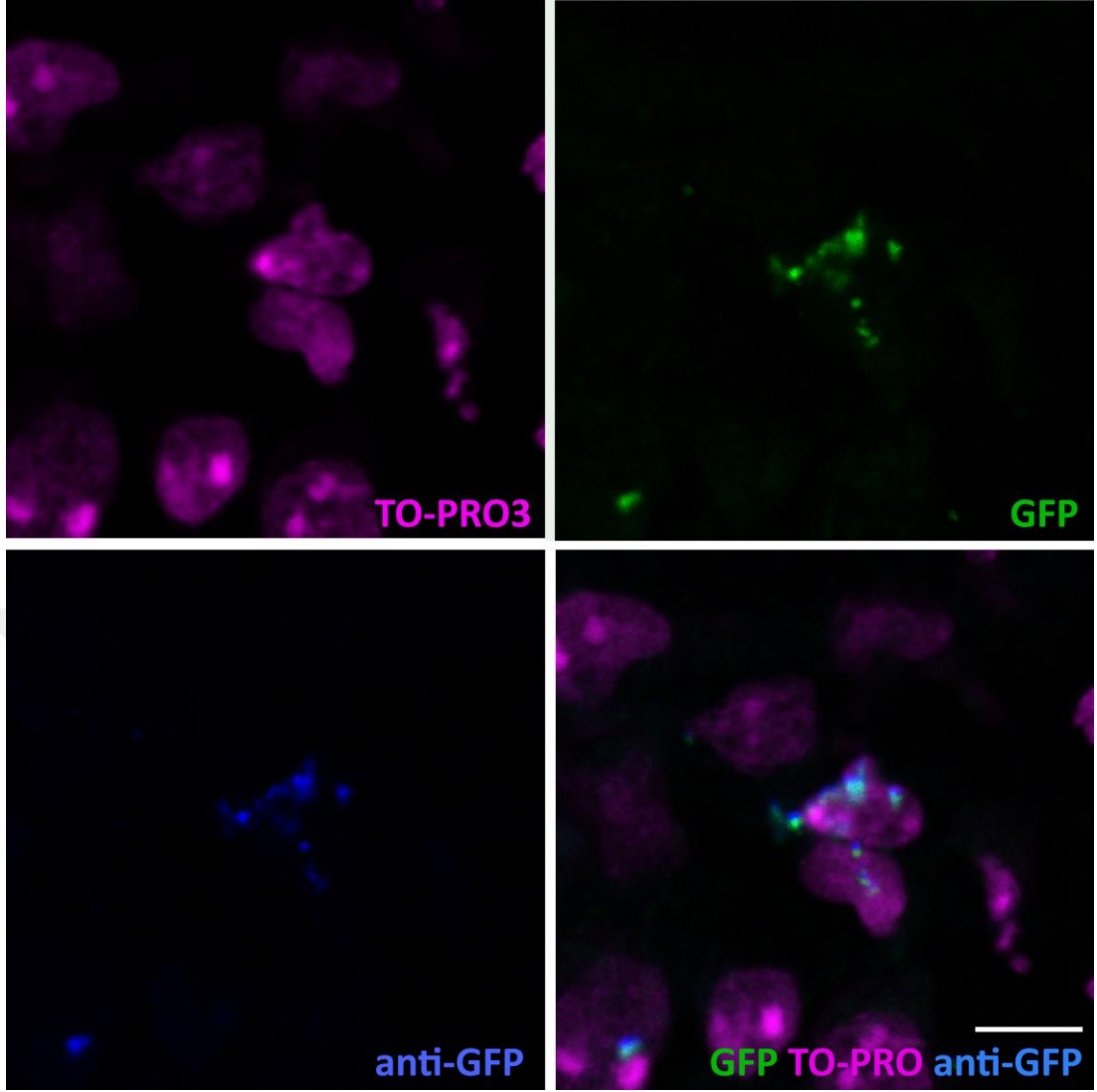
	n	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata Ortalaması	%95 Farkların Güven Aralığı		p Değeri
					Düşük	Yüksek	
GFP-	50	216.72	291.69	41.25	133.82	299.62	
GFP+	50	1954.68	1018.31	144.01	1665.289	2244.08	<0.0001

GFP+ ve GFP- hücrelerin ışımaya değerleri Student's *t* test ile istatistiksel olarak karşılaştırıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

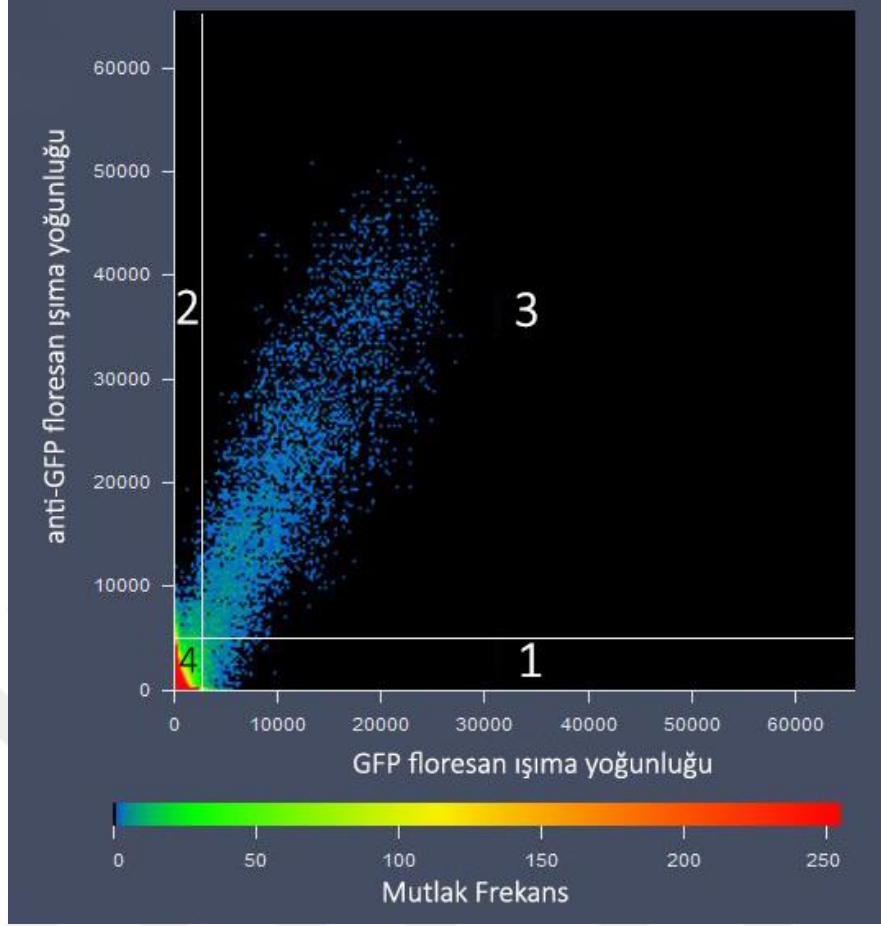


Şekil 3.8: GFP+ ve GFP- hücrelerin floresan ışıma yoğunluklarının grafiği.

Doku kesitlerinde yeşil renkte floresan ışıma yapan hücrelerin spesifik olarak GFP+ hücreler olduğunu doğrulamak amacıyla kesitlere Alexa 405 konjuge anti-GFP antikoru ile immünohistokimyasal boyamalar yapıldı. Bu şekilde aynı hücrede görülen yeşil (GFP+) ve mavi(anti-GFP) floresan ışıma ile hücrelerin anneden emzirme yoluyla gelen GFP+ hücreler oldukları doğrulandı. Kesitler içerisinde GFP+ hücrelerin alanları ayrı ayrı işaretlenerek her bir hücre içerisindeki GFP ve anti-GFP'ye ait floresan ışıma miktarları ölçüldü (Şekil 3.9, Resim 3.6). Ölçüm yapılan hücredeki GFP ve anti-GFP'ye ait floresan ışımlar arasındaki korelasyon düzeyi istatistiksel olarak Pearson Two-Tailed Korelasyon Testi ile belirlendi. Analiz sonucunda anti-GFP antikoru ile işaretlenen hücrelerde, aynı hücredeki GFP ve anti-GFP ışıma miktarları arasındaki Pearson korelasyon katsayısı $r=0.9106$ (yüksek korelasyon) olarak belirlendi. Korelasyon katsayısının önemliliği Two-tailed test ile belirlendi ($p<0.001$) (Çizelge 3.2, Şekil 3.10).



Resim 3.6: GFP+ anneler tarafından emzirilen hayvanların beyin dokularının mikroskopik görüntüsü. GFP+ annenin sütünden yavruya geçiş yapan GFP+ hücreler (yeşil), anti-GFP+ hücreler (mavi) ve nükleuslar TO-PRO3 ile işaretlenmiş (mor) olarak görülmektedir. GFP ve anti-GFP'nin aynı yerde 40x/1.4 yağlı objektif, ölçek: 10µm.

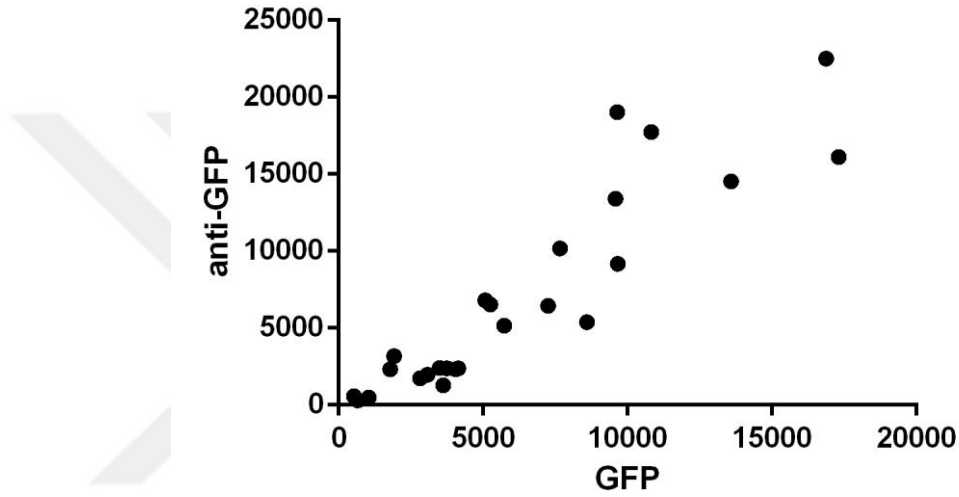


Şekil 3.9: Aynı hücre içerisindeki GFP ve anti-GFP floresan ışımlarına ait kolokalizasyon grafiği. Grafikteki her bir nokta floresan ışıma yapan piksellerin karşılıklı olarak yoğunluğunu göstermektedir. Grafikte numaralandırılmış olan bölgeler, ayrı kanallara ait ışıma yapan pikselleri göstermektedir; 1 numaralı bölgedeki piksellerde yüksek miktarda GFP sinyali varken düşük miktarda anti-GFP sinyali vardır, 2 numaralı bölgede yüksek miktarda anti-GFP sinyali varken düşük miktarda GFP sinyali vardır. 3 numaralı bölge hem GFP hem de anti-GFP'nin yüksek miktarda ışıma yaptığı pikselleri göstermektedir, 4 numaralı bölge ise hem GFP hem de anti-GFP sinyallerinin düşük miktarda olduğu arka plan gürültüsü ile ilgili pikselleri içermektedir. 3 numaralı bölge GFP ve anti-GFP'nin kolokalize oldukları alan olarak seçilerek floresan ışıma yoğunlukları bu seçim kriterlerine göre ölçüldü.

Çizelge 3.2: Aynı hücre içerisindeki GFP ve anti-GFP'ye ait floresan ışıma sinyallerinin karşılaştırması.

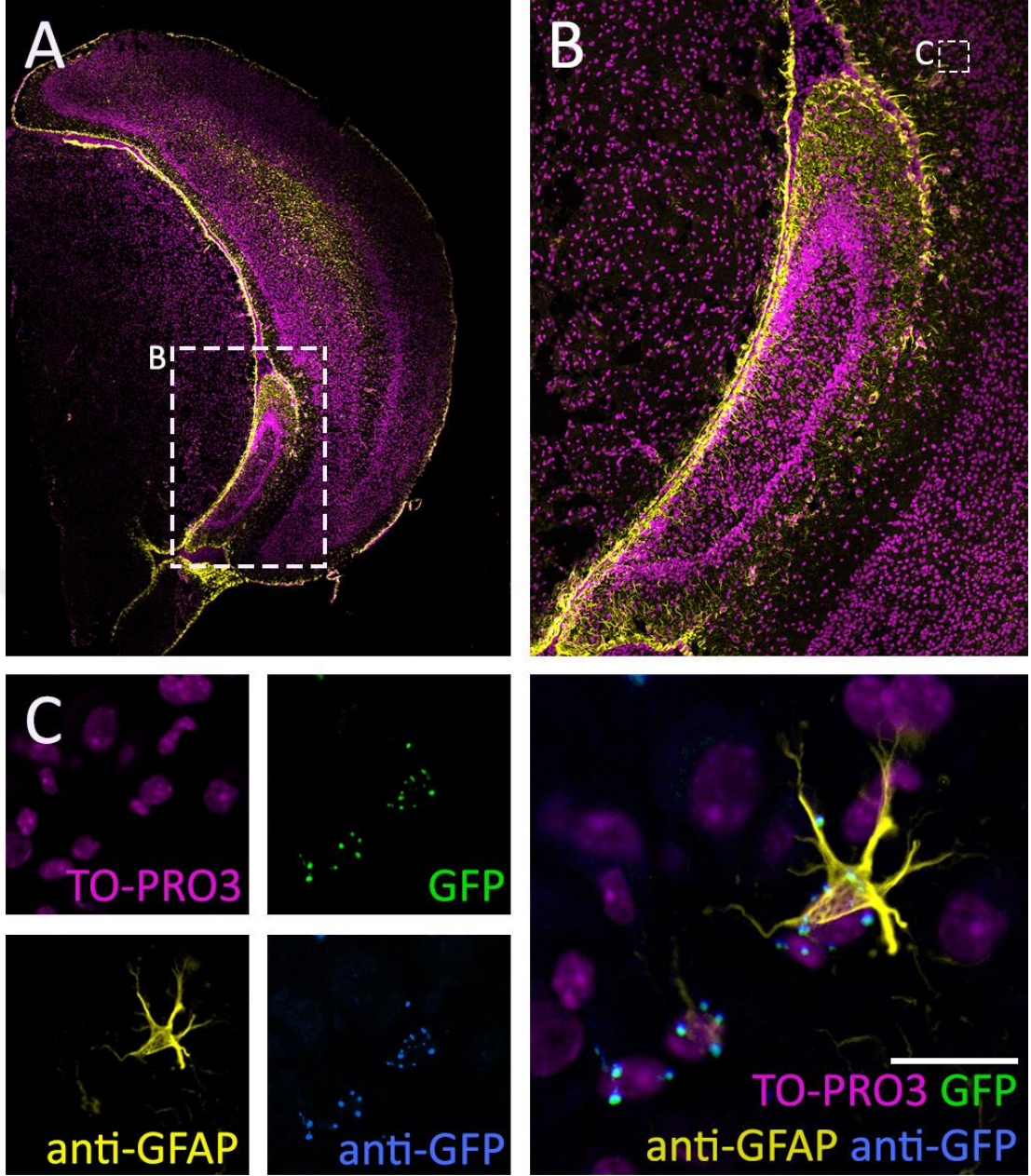
	n	Pearson r	R-kare	p Değeri (two-tailed)
GFP - Anti-GFP	25	0.9106	0.8292	<0.0001

Karşılaştırmalar Pearson Two-tailed Korelasyon Testi ile yapılarak $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. GFP ve anti-GFP sinyalleri arasında %91 oranında korelasyon görülmektedir.

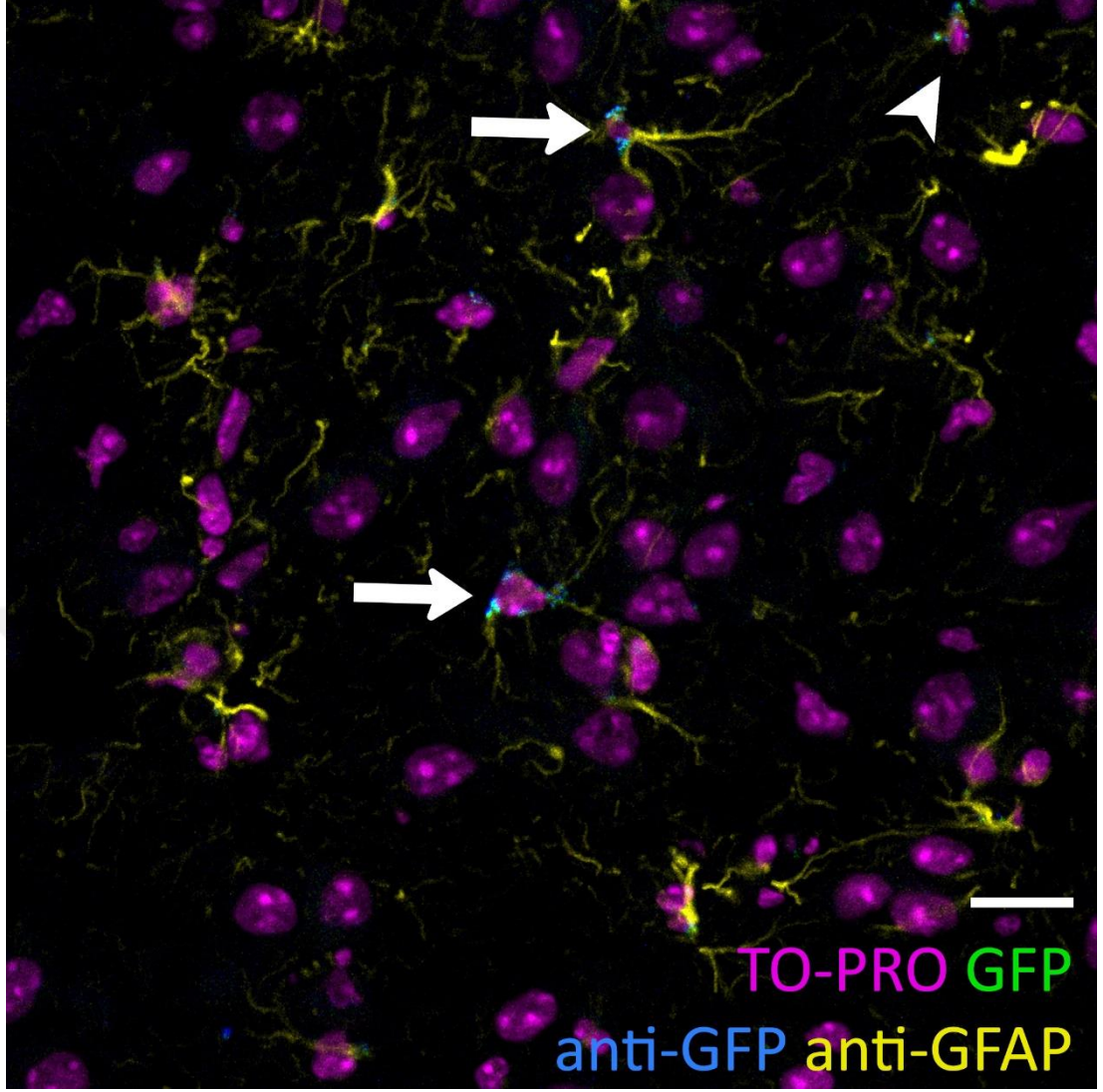


Şekil 3.10: Aynı hücre içerisindeki GFP ve anti-GFP'ye ait floresan ışıma yoğunluklarının karşılaştırmalı grafiği.

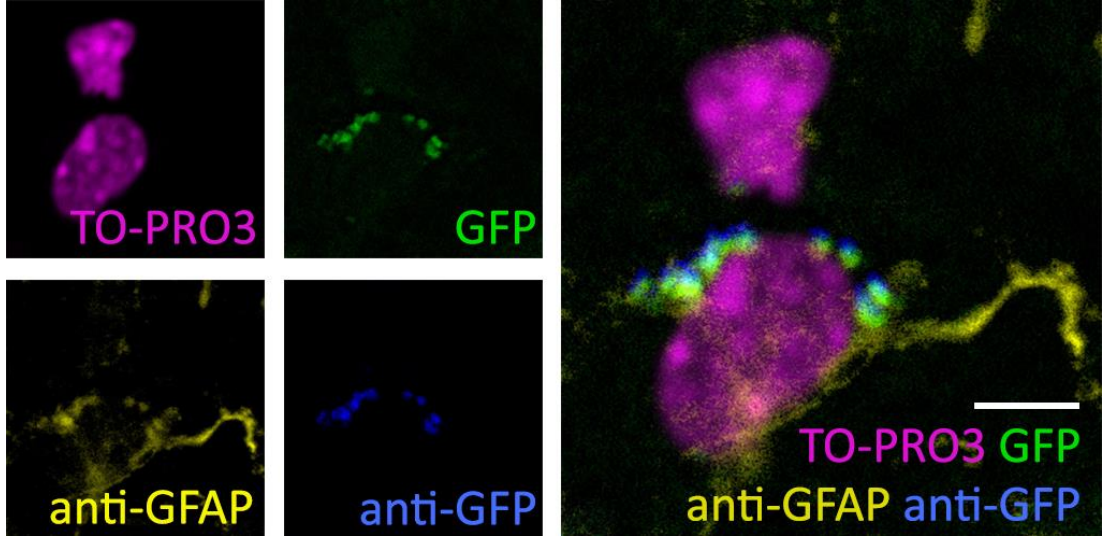
Deney gruplarında görülen yeşil floresan ışıma yapan hücrelerin, floresan ışıma miktarı karşılaştırması ve anti-GFP antikoru ile işaretlenerek, GFP+ hücreler olduklarının doğrulanmasının ardından bu hücrelerin beyin dokusu hücrelerine farklılaşma özellikleri belirlendi. Bu amaçla GFP+ anneler tarafından emzirilen yavrulara ait beyin dokuları gliyal hücre farklılaşmasını belirlemek amacıyla anti-GFAP ve nöronal farklılaşmayı belirlemek amacıyla anti-NeuN antikorları ile immünohistokimyasal olarak boyandı. Boyama sonucunda hem 7 günlük hem de 30 günlük deney gruplarında anneden yavruya emzirme yoluyla geçiş yaparak GFAP+ ve NeuN+ hücrelere dönüşen kimerik hücreler tespit edildi. Bu hücrelerin beyin içerisindeki özel bir bölgeden ziyade yaygın bir yerleşim gösterdikleri görüldü (Resim 3.7-3.11).



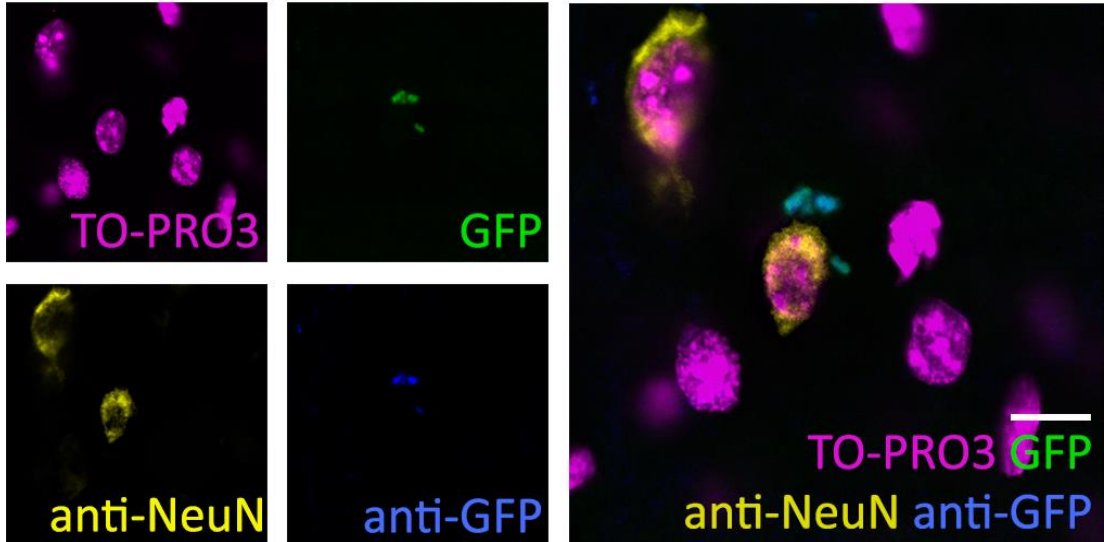
Resim 3.7: 7 günlük deney grubundaki hayvanlarda ait beyin dokusundaki anti-GFAP immünohistokimyasal boyaması genel görüntüsü (A), hippocampus bölgesi (B), anneden emzirme yoluyla yavruya geçerek yavrunun beyin dokusuna yerleşen kimerik hücreler (C). Yeşil ışıma yapan GFP+ hücreler doğrulama amacıyla anti-GFP (mavi) ile işaretlendiler. Aynı bölge içerisinde yan yana anti-GFAP (sarı) ile işaretli olan ve olmayan GFP+ kimerik hücreler ile yavrunun kendi hücreleri sadece nükleusları TO-PRO3 (mor) ile boyalı olarak görülmektedir. 20x/0.8 (A ve B) ve 40x/1.4 yağı (C) objektif, ölçek: 20µm.



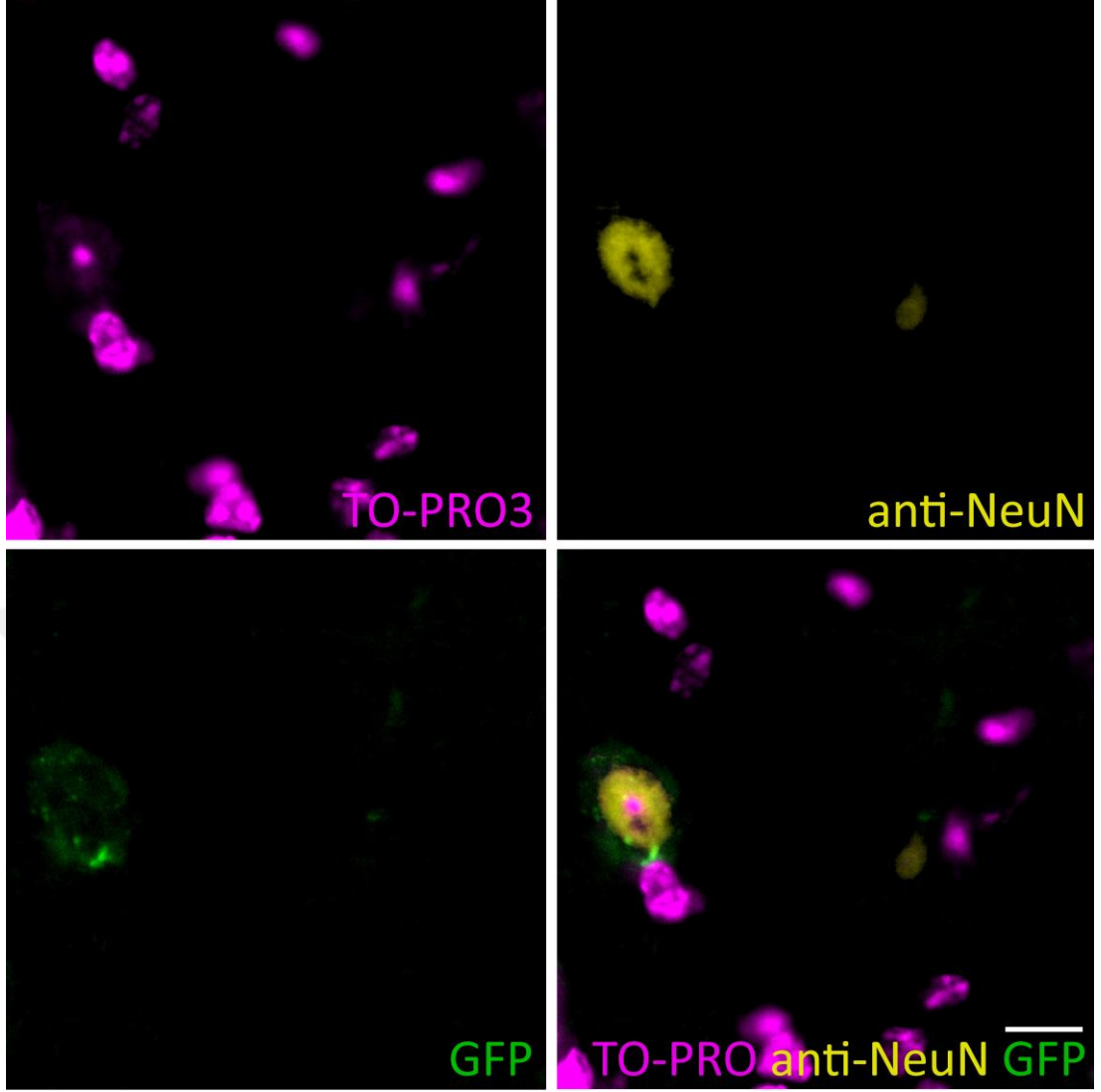
Resim 3.8: 30 günlük deney grubundaki hayvanlarda ait beyin dokusundaki anti-GFP ve anti-GFAP immünohistokimyasal boyaması görüntüsü. Anneden emzirme yoluyla yavruya geçerek yavrunun beyin dokusuna yerleşen kimerik hücreler görülmektedir (GFP+, anti-GFP+). Bu hücreler içerisinde anti-GFAP antikoruna ile boyanarak gliyal hücrelere farklılaşan hücreler (ok) olduğu gibi anti-GFAP ile işaretlenmemiş (ok başı) farklı tipte olan hücreler bulunmaktadır. 40x/1.4 yağlı objektif, ölçek: 20µm.



Resim 3.9: 30 günlük deney grubundaki hayvanlarda ait beyin dokusundaki anti-GFP ve anti-GFAP immünohistokimyasal boyaması görüntüsü. Emzirme yoluyla anneden yavruya geçerek beyin dokusuna yerleşen gliyal hücre fenotipine sahip (anti-GFAP+) kimerik hücre görülmektedir. 40x/1.4 yağlı objektif, ölçek: 5µm.



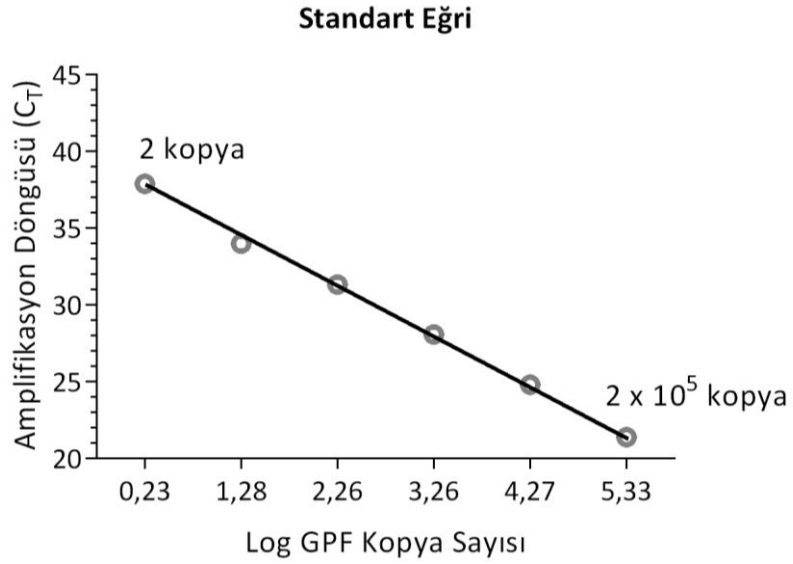
Resim 3.10: 7 günlük deney grubundaki hayvanlarda ait beyin dokusundaki anti-NeuN immünohistokimyasal boyaması görüntüsü. Yeşil ışıma yapan GFP+ hücreler doğrulama amacıyla anti-GFP (mavi) ile işaretlendiler. Aynı bölgede anti-NeuN (sarı) ile işaretli olan GFP+ kimerik nöron ile GFP- hücreler görülmektedir. Nükleuslar TO-PRO3 (mor) ile boyalıdır. 40x/1.4 yağlı objektif, ölçek: 10µm.



Resim 3.11: 30 günlük deney grubundaki hayvanlarda ait beyin dokusundaki anti-NeuN immünohistokimyasal boyaması görüntüsü. Anti-NeuN (sarı) ile işaretli olan GFP+ kimerik nöron ile GFP- hücreler görülmektedir. Nükleuslar TO-PRO3 (mor) ile boyalıdır. 40x/1.4 yağlı objektif, ölçek: 10µm.

3.3.3. qPCR Sonuçları

Deney gruplarından elde edilen beyin örneklerinden elde edilen DNA örnekleri ile birlikte 2 – 2×10^5 kopya/µl arasında değişen miktarlarda plazmidler kullanılarak analizler yapılarak standart eğri oluşturuldu (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: Farklı konsantrasyonlarda kullanılan pEGFP-N3 plazmidi ile elde edilen standart eğri grafiği. Standart eğri denklemi; $y = -3,235 \times + 38,637$; amplifikasyon etkinliği: %103,8, $R^2 = 0,998$.

Analiz sonrası 7 günlük ve 30 günlük deney gruplarına ait belirlenen GFP C_T (döngü eşiği) değerleri ile standart eğri denklemi kullanılarak ($y = -3,235 \times + 38,637$; y: GFP C_T değeri, x: logaritmik GFP kopya sayısı) Log GFP kopya sayısı hesaplandı. Elde edilen değerlerden örneklerdeki GFP kopya sayısı belirlendi. qPCR analizleri sonucunda anne sütü yoluyla yavrulara geçen hücreler 7 günlük ve 30 günlük deney gruplarına ait örneklerde beyin dokusunda tespit edildi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3: qPCR analizi sonuçları.

Örnek	Ortalama C_T <i>GFP</i>	Log Kopya Sayısı /100 ng	Kopya Sayısı /100 ng	GFP+ kimerik hücre sayısı /100 ng
Negatif kontrol: su	-	-	-	-
Negatif kontrol: normal fare DNA'sı	-	-	-	-
Pozitif kontrol: GFP+ fare DNA'sı	23,02±0,0 2	4,8±0,004	53652	26826
7 günlük grup	34,74±1,0	1,2±0,3	197	98
30 günlük grup	34,98±1,2	1,1±0,3	165	83

Gruplar içerisinde belirlenen C_T değerleri ve GFP+ kimerik hücre sayıları görülmektedir. Ortalama C_T değerleri her bir gruptaki örneklerin (n=6) 3 tekrarlı olarak analiz edilmesiyle belirlendi. Elde edilen kopya sayıları ve hücre sayıları her bir örnek için 100 ng DNA içerisindeki değerlerdir. $\pm$ değerler standart sapma olarak verilmektedir.

4. TARTIŞMA

Çalışmamızda anne sütü yoluyla yavruya geçiş yapan hücrelerin sinir sistemi içerisindeki farklılaşma özellikleri araştırılmıştır. Literatürde emzirme sırasında anne sütünden yavruya hücre geçişi ile ilgili birkaç tane çalışma bulunmaktadır. Bunlar içerisinde hücrelerin yavrunun karaciğer dokusuna geçtiği gösterilmekle birlikte bu hücrelerin farklılaşma özellikleri belirtilmemiştir (Zhou ve ark 2000). Bir diğer çalışmada anne sütünde bulunan çeşitli lenfosit tiplerinin emzirme yoluyla yavrunun bağırsağında Peyer plaklarına yerleştiği gösterilmiştir (Cabinian ve ark 2016). Buna ek olarak anne sütü içerisinde kök hücre özelliğinde hücrelerin bulunduğu ve bu hücrelerin çeşitli dokuların hücrelerine farklılaşabileceği in vitro olarak gösterilmiştir (Hassiotou ve ark 2012). Çalışmamızda anne sütündeki hücrelerin yavruya geçişinin belirlenerek bu hücrelerin sinir sistemi içerisinde farklı hücre tiplerine dönüşümleri ilk defa gösterilmiştir.

Mikrokimerizm, gebelik sürecinde doğal yollardan gerçekleşebildiği gibi kan transfüzyonu, kök hücre, kemik iliği ve doku nakli gibi durumlarda sonradan da gerçekleşebilmektedir (Gammill ve Nelson 2010, Konuma ve ark 2016, Stikvoort ve ark 2016). Mikrokimerizm ile ilgili yapılan çalışmaların büyük bir bölümü sonradan kazanılmış mikrokimerizmle ilişkili olduğu düşünülen hastalıklar ve çeşitli hematolojik hastalıklar üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bunların yanı sıra transplantasyon sonrası oluşan mikrokimerizmin dokular üzerindeki rejeneratif katkısı gibi çalışmalar da bulunmaktadır (Filip ve ark 2014). Gebelik sürecinde doğal yolla gerçekleşen mikrokimerizm ile ilgili çok daha kısıtlı literatür bilgisi mevcuttur. Bunlar içerisinde mikrokimerizmin meme kanseri gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili olabileceği (Nemescu ve ark 2016) gibi tam aksine tiroid kanseri (Cirello ve Fugazzola 2014) ve yara iyileşmesi (Mahmood ve O'Donoghue 2014) gibi durumlarda koruyucu ve pozitif etkilerinin olabileceğini belirten çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda anne sütünden yavrunun sinir sistemine geçen hücrelerin nöron ve gliya hücrelerine farklılaştığı belirlenmiştir. Oluşan bu hücrelerin fizyolojik veya patolojik olaylarla ilişkisi açısından bir inceleme yapılmamakla birlikte, anne sütü yoluyla oluşan bu hücrelerin mevcut hücre popülasyonuna destek niteliğinde hücreler olabileceği düşünülmektedir. Tüm bu bilgiler mikrokimerizmin bireyler üzerindeki olası pozitif ya da negatif etkileri konusunda belirsizlik devam etmektedir.

Gebelik sürecinde gerçekleşen mikrokimerizm anne-yavru arasında iki yönlü olarak plasenta yardımıyla gerçekleşir. Bu şekilde gerçekleşen hücre geçişi uzun yıllardan beri bilinmektedir (Tuffrey ve ark 1969). Anne sütünden emzirme yoluyla gerçekleşen hücre geçişi ise diğer mikrokimerizm oluşum şekillerine göre çok daha yeni bir kavramdır. Bundan dolayı emzirme sırasında hücrelerin yavruya hangi yolla ve nasıl geçtiği belirsizliğini korumaktadır. Çalışmamızda anne sütündeki hücrelerin emzirme yoluyla yavrunun, sindirim sisteminden geçerek, kan dolaşımına ve beyin dokusuna ulaştığı görülmüştür. Yeni doğanlarda sindirim sisteminde yer alan sindirim enzimleri ve mide asidinin daha zayıf olduğu bilinmektedir (Tatematsu ve ark 1975, Jakaitis ve Denning 2014). İki haftalık farelerde emzirmeyi takiben mideden lümeninden alınan örneklerdeki hücrelerin %80 oranında canlılığa sahip olduğu bildirilmiştir (Ma ve ark 2008). Başta geçirgenliği fazla olan az gelişmiş bağırsaklar ilerleyen gelişimle birlikte geçirgenlikteki azalmaya bağlı olarak makro moleküllerin bağırsaktan geçişi azalmaktadır (Cummins ve ark 1988). Bağırsak kapanması olarak isimlendirilen bu olay kemiricilerde postnatal birkaç günde gerçekleşmeye başlamaktadır. Maternal kolostrum içerisinde yer alan epiteliyal büyüme faktörü ve transforming büyüme faktörü gibi faktörlerle bağırsaktaki bu değişimler uyarılır (Cummins ve Thompson 1997). Bu sayede yeni doğanlarda süt içerisindeki makro moleküller ve hücreler mide ve bağırsaklardan sindirilmeden geçerek dolaşıma katılabilirken, ilerleyen gelişim dönemlerinde bu geçiş kısıtlanarak hücrelerin geçişi engellenebilir. Bunun dışında bağırsaklarda Peyer plaklarının yüzeyinde bulunan epitelin geçirgenliğinin diğer bağırsak bölgelerine göre daha fazla olduğu ve lümendeki hücrelerin bu bölgedeki epitelden geçişinin mümkün olduğu da bildirilmiştir (Cabinian ve ark 2016).

Süt yoluyla anneden yavruya hücre geçişi ile ilgili ilk çalışmalarda geleneksel boyama yöntemleri kullanılmaktaydı. Weiler ve arkadaşları (Weiler ve ark 1983) içerisinde rodamin ve floresan isotiyosiyanat (FITC) ile işaretlenmiş hücreler bulunan süt ile fare yavrularını besleyerek işaretli lenfositleri yavruda tespit etmişlerdir. Anne ve yavru arasındaki hücre geçişinin deney hayvanları üzerinde araştırılması için günümüzde kullanılan en yaygın model hücrelerinde çeşitli işaretleyiciler bulunan transgenik hayvanlar kullanılmasıdır. Özellikle mikroskopik inceleme imkânı sağlayarak belirlenen hücrelerin morfolojileri ve dokudaki yerleşimleri hakkında bilgi vermesi açısından transgenik hayvanların kullanımı en etkin yöntemlerden biridir.

Transgenik hayvanların ticari olarak üretiminin ve kullanımının son yıllarda yaygınlaşmaya başlamasından sonra bu alandaki çalışmalar da hız kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda LacZ üretebilme yeteneğindeki annelere normal hayvanlardan elde edilen embriyolar transfer edilerek oluşturulan gebelikler sırasında anneden gelen hücrelerin fetüste kemik iliği (Marleau ve ark 2003), timus, karaciğer, akciğer ve kalpte (Piotrowski ve Croy 1996) yerleştikleri gösterilmiştir. GFP, hücreler üzerinde toksik etkisinin olmaması, herhangi bir ekstra uyarıcıya gerek olmaksızın mavi dalga boyundaki ışık altında parlak ve spesifik ışıma vermesi ve hem mikroskop sistemleri hem de akım sitometrisi ile analize uygun olması (Chalfie ve ark 1994) gibi avantajları sayesinde transgenik hayvanlarda en sık tercih edilen floresan proteindir. GFP üretebilme yeteneğindeki transgenik hayvanlar kullanılarak yapılan çalışmalarda, gebelik sırasında anne ve yavru arasında iki yönlü olarak hücre geçişinin gerçekleştiği gösterilmiştir (Vernochet ve ark 2007). Bir diğer çalışmada, gebelik sırasında ve emzirme döneminde anneden yavruya GFP+ lenfositlerin geçiş yaptığı belirtilmiştir (Zhou ve ark 2000). Benzer şekilde çalışmamızda da tüm hücrelerinde β -aktin'e bağlı olarak GFP üretebilme yeteneğindeki dişi fareler kullanılmıştır. Bu farelerden emzirme yoluyla yavrulara geçen GFP+ hücreler farklı yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Bu şekilde yavrunun dokularında belirlenen GFP+ hücrelerin anneden emzirme yoluyla geçen hücreler olduğu kesin olarak belirlenebilmiştir. Çalışmamızda kullanılan transgenik farelerin hücrelerindeki GFP molekülü, her hücrenin temel iskelet elemanı olan β -aktin'e bağlı olarak üretilmektedir. Bu sayede süt yoluyla yavruya geçen GFP+ hücreler mitoz bölünme geçirdiklerinde ya da başka bir hücre tipine farklılaştıklarında da GFP üretebilme yeteneklerini koruyarak bulundukları doku içerisinde tespit edilebilmektedirler.

Mikrokimerizm ile ilgili yapılan araştırmalarda genel olarak kullanılan araştırma yöntemleri mikroskobik inceleme, PCR ve akım sitometrisidir. Bu yöntemlerden akım sitometrisi ve PCR yaygın olarak kullanılmakla birlikte mikroskobik inceleme yöntemleri dokular içerisindeki az miktardaki kimerik hücrenin tespit edilmesindeki teknik zorluklar nedeniyle daha az tercih edilmektedir. Transgenik olarak hücrelerinde LacZ üretebilme yeteneğindeki hayvanlar kullanılarak yapılan çalışmalarda gebelik sırasında anneden yavrunun timus, dalak ve karaciğer (Piotrowski ve Croy 1996) dokularına geçen LacZ+ hücreler histokimyasal boyama ve akım sitometrisi yöntemleriyle belirlenmiştir. Benzer bir çalışmada histokimyasal

boyama ve PCR yöntemleriyle yavrunun timus, dalak, karaciğer ve kemik iliği dokularında LacZ⁺ hücreler gösterilmiştir (Marleau ve ark 2003). Hücrelerinde floresan bir protein olan luciferase üretebilen transgenik hayvanların kullanıldığı bir çalışmada yalnızca qPCR yöntemi kullanılarak gebelik sırasında anneden yavrunun çeşitli organlarına hücrelerin geçiş yaptığı bildirilmiştir (Su ve ark 2008). Anneden yavruya anne sütü yoluyla lenfositlerin geçişi yalnızca akım sitometrisi yöntemi kullanılarak (Cabinian ve ark 2016) gösterilirken, benzer bir çalışmada buna ek olarak floresan mikroskopik incelemelerle de bu veriler desteklenmiştir (Zhou ve ark 2000). Bir diğer çalışmada qPCR ve akım sitometrisi bir arada kullanılarak anneden yavruya antijen ve hücrelerin geçtiği gösterilmiştir (Dutta ve ark 2009). Çalışmamızda anne ve yavru arasındaki anne sütü kaynaklı hücre geçişini tespit etmek amacıyla literatürde belirtilen mikroskopik inceleme, qPCR ve akım sitometrisi yöntemlerinin üçü bir arada kullanılmıştır. Yavrunun dokularında bulunan az sayıdaki kimerik hücrenin mikroskopik olarak tespit edilmesi son derece meşakkatli bir yöntem olmakla birlikte bu hücrelerin morfolojileri ve yerleşimleri hakkında diğer tekniklerle elde edilmesi mümkün olmayan bilgiler vermektedir. Beyin dokusundaki karmaşık hücre organizasyonu ve hücrelerin morfolojik farklılıklarının önemi göz önüne alındığında beyin dokusu içerisinde yer alan kimerik hücrelerin mikroskopik olarak incelenebilmesi çok büyük bir önem arz etmektedir. Bu nedenle, literatürde mikrokimerizm konusunda yaygın olarak kullanılan qPCR ve akım sitometrisi yöntemlerinin beyin dokusunda mikroskopik inceleme verileriyle ilk defa bir arada kullanılması çalışmamızın önemini arttırmaktadır.

Çalışmamızda emzirme yoluyla yavruların beyin dokularına geçen GFP⁺ hücreler beyin dokusundan alınan kriyo kesitlerde mikroskopik olarak araştırılmıştır. Beyin dokusunda yapılan floresan mikroskopik incelemelerde serotonin gibi nörotransmitterlerin herhangi bir boyama yapılmaksızın otofloresan ışığa yaptıkları bilinmektedir (Crespi ve ark 2004). Fikse edilmiş dokulardaki otofloresan ışığı engellemek amacıyla sodyum borohidrit ve kuprik asit içerisindeki amonyum asetat tamponu gibi kimyasallar kullanılsa da, beyin dokusunda belirli nöron gruplarındaki yeşil otofloresan engellenememektedir (Spitzer ve ark 2011). Anne sütüne bağlı hücre geçişinin araştırıldığı bir çalışmada 510nm dalga boyunda ışık ile uyarılarak yeşil ışığa veren hücrelerin 617nm dalga boyunda ışık ile uyarıldığında ışığa vermediği görülmüş ve yeşil ışığa veren hücreler GFP⁺ hücreler olarak değerlendirilmiştir (Zhou

ve ark 2000). Bir diğer çalışmada bağırsak dokusundaki GFP+ hücreler sinyali gücünü yükseltmek amacıyla GFP ile aynı dalga boyunda ışıma veren Alexa Fluor 488 kullanılarak anti-GFP ile işaretlenmiştir (Ma ve ark 2008). Gebelik sırasındaki anne ve yavru arasındaki hücre geçişinin araştırıldığı bir çalışmada ise annenin beyin dokusunda floresan mikroskop altında yeşil ışıma yapan hücrelerin yavrudan anneye geçen GFP+ hücreler olup nöronlara dönüştükleri belirtilmiştir (Sunami ve ark 2010). GFP+ hayvanlar kullanılarak yapılan hücre göçü ile ilgili çalışmalarda yapılan mikroskopik incelemelerde yeşil ışıma yapan hücrelerin GFP+ olarak doğrulanabilmesi için anti-GFP antikoruyla işaretlenmesi gerektiği vurgulanmaktadır (Spitzer ve ark 2011). Bu amaçla çalışmamızda anne sütünden yavruya geçtiğini düşündüğümüz GFP+ hücreleri belirlemek amacıyla anti-GFP antikor ile boyamalar yapılmıştır. Çalışmalarda beyin dışındaki dokularda GFP sinyalinin güçlendirilmesi amacıyla 488 nm dalga boyunda yapılan anti-GFP işaretlemelerinin (Cabinian ve ark 2016), beyin dokusunda GFP+ hücrelerin ışıma yaptığı dalga boyunda otofloresan ışıma yapan çeşitli nöron grupları olması nedeniyle kullanılması güvenilir değildir. Bu nedenle çalışmamızda GFP+ hücreleri doğrulamak amacıyla yaptığımız anti-GFP boyamalarında 405 nm veya 647 nm dalga boylarında uyarılan floresan boyalar kullanılmıştır. Bu şekilde beyin dokusunda yalnızca yeşil ışımaya bakılarak elde edilmesi muhtemel yanlış pozitif sonuçlar engellenmiştir.

Anne süt içerisinde farklı tipte hücrelerin bulunduğu bilinmektedir. Bu hücrelerin süt içerisinde bulunma miktarları ile ilgili literatürde çeşitli bilgiler bulunmaktadır. Doğum sonrası farklı dönemlerde hücrelerin süt içerisindeki oranları değişmekle birlikte kolostrum içerisinde tüm hücrelerin %13-70 arasında lökositlerden oluştuğunu, herhangi bir enfeksiyon durumunda ise bu oranın %94'e kadar çıktığı bildirilmiştir (Hassiotou ve ark 2013). Meme bezi kanallarında bulunan epitel hücrelerinin ve süt üretimi yapan laktositlerin de süt içerisinde %32-86 arasında değişen oranlarda bulundukları gösterilmiştir (Hassiotou ve ark 2013). Bu hücrelerin dışında nestin ve sitokeratin 5 gibi nöroektodermal kök hücre markırlarını eksprese eden progenitör hücrelerin %4,17 ve %0,9 oranlarında de süt içerisinde yer aldığı belirtilmiştir (Fan ve ark 2010). Yapılan çalışmalarda da uygulandığı şekilde farklı hücre tiplerini belirlemek amacıyla kullanılan en uygun yöntem immünohistokimyasal boyamadır. Çalışmamızda süt içerisinde bulunan hücreler izole edilip uygun antikorlarla immünohistokimyasal olarak işaretlenerek bu hücrelerin tipleri

belirlenmiştir. T lenfositler, B lenfositler, granülositler, monosit/makrofaj serisi hücreler ve NK hücrelerine uygun antikorlar ile yapılan incelemelerde süt içerisindeki tüm hücrelerin %49,62'sinin bu hücrelerden oluştuğu görülmüştür. Bunların dışında kalan hücrelerin tipleri ile ilgili elimizde net bir sonuç bulunmamaktadır. Ancak yavruların beyin dokularında, anne sütü yoluyla gelerek nöronal hücrelere farklılaşmış hücreleri tespit etmiş olmamız, süt içerisinde bu hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahip olan hücrelerin bulunmasını zorunlu kılmaktadır. Anne sütü içerisinde Oct4, SOX2, NANOG, SSEA4 ve TRA-1-60 gibi çeşitli embriyonik kök hücre markörlerini taşıyan hücrelerin in vitro ortamda β -III tübülün üretebilen nöronal hücrelere dönüşebilmeleri (Hassiotou ve ark 2012) bu düşüncemizi desteklemektedir.

Süt içerisindeki tüm hücre tiplerinin belirlenebilmesi, bu hücrelerin kökenleri, özellikleri ve fonksiyonlarının açığa çıkarılabilmesi açısından önemlidir. Özellikle emzirme sonrası bu hücrelerin yavruya geçerek çeşitli dokulara yerleştikleri göz önüne alındığında süt içerisindeki hücrelerle ilgili daha geniş kapsamlı araştırma yapılması gerektiği görülmektedir. Hücre tiplerinin belirlenmesi amacıyla, hücrelerdeki çeşitli antijenlerin antikorlarla immünohistokimyasal olarak işaretlemesi bu açıdan verimli bir yöntem olmakla birlikte kendi içerisinde zorlukları da içermektedir. Önceden belirlenmiş bir hücre tipini işaretlemek için uygun antikorlar seçilebilmektedir. Ancak hücre tipi bilinse bile, özellikle kök hücrelerde, birden çok antikor ile aynı hücrede işaretleme yapılması gerekmektedir. Dahası, belirli tahminlerin ve varsayımların dışında, içerisinde ne tip hücrelerin olduğunu tam olarak bilmediğimiz bir hücre grubu içerisindeki hücre tiplerini farklı antikorlar deneyerek immünohistokimyasal olarak belirlemeye çalışmak oldukça uzun ve zahmetli bir süreçtir. Bu sebeple bu alanda immünohistokimyasal işaretleme yöntemlerinin yanında farklı teknikler de kullanarak yapılacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Emzirme sırasında anne sütü içerisindeki protein, yağ, karbonhidrat ve vitaminler gibi çeşitli besin öğelerinin yanında süt içerisindeki hücre ve hücresel elemanların da yavruya geçmesi bilinen bir durumdur. Literatürde anne sütünün besinsel değeri ve etkileri yaygın bir araştırma konusu olmasına rağmen hücresel içeriği ve özellikleri ile ilgili çalışmalar lenfositler ve immünolojik etkileri çerçevesinde kısıtlı kalmıştır. Bu çalışmalarda anne sütünde bulunan lökositlerin yavru karaciğerinde emzirme sonrası 5. ve 6. günlerde en yüksek seviyesine ulaşp 9. günden sonra tespit edilemediği belirtilmiştir. (Zhou ve ark 2000). Anne sütü içerisindeki

makrofajların yavrunun sindirim sisteminde antijen sunan hücreler olarak görev yapabilecekleri bildirilmiştir (Hughes ve ark 1988). Anne sütündeki CD4+ ve CD8+ lökositlerin yavrunun bağırsaklarında Peyer plaklarında emzirme başlangıcından 18 gün sonra bile tespit edilebildiği gösterilmiştir (Cabinian ve ark 2016). Bir diğer çalışmada anne sütü yoluyla yavrunun bağırsak, dalak ve timus dokularına geçen hücrelerin emzirmenin 1. ve 2. haftalarında bu dokularda bulunduğu, geçiş yapan hücrelerin ise makrofaj veya B lenfosit olmayıp CD4+ ve CD8+ T lenfositler olduğu belirtilmiştir (Ma ve ark 2008). Buna karşı transgenik olarak B lenfosit üretmeyen hayvanlar ile tüm hücrelerinde GFP üreten hayvanları birlikte kullanarak anne sütündeki IgG sekresyonu yapan hücrelerin yavrunun dalak dokusuna geçtiğini göstermiştir (Arvola ve ark 2000). Bunların dışında, anne sütü içerisinde bulunan Oct4+, Nanog+ ve CD49f+ kök hücrelerin ilk defa emzirme yoluyla yavruya geçerek doğumdan 3 hafta sonrasında mide duvarında ve timus dokusunda yerleştiği gösterilmiştir (Hassiotou ve ark 2014). Aynı grup tarafından süt içerisindeki kök hücrelerin in vitro ortamda miyoepitelial hücrelere, laktositlere, nöron benzeri hücrelere, hepatositlere, pankreas β hücrelerine, osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere dönüşebildiği gösterilmekle birlikte (Hassiotou ve ark 2012) literatürde bu hücre farklılaşmalarının in vivo ortamda gösterildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızla birlikte bu alanda ilk defa, anne sütü içerisinde bulunan farklılaşabilme yeteneğindeki hücrelerin yavrunun beyin dokusuna geçerek burada NeuN+ ve GFAP+ nöronal hücrelere dönüştüğü gösterilmiştir. Beyin dokusunda görülen bu hücre göçü ve farklılaşması, emzirme başlangıcından itibaren 7 günlük sürede gerçekleşebildiği gibi 1 aylık süre sonunda da tespit edilebilmektedir.

Kan beyin bariyeri, kandan beyine girecek olan besin maddeleri, iyonlar ve diğer maddelerin geçişini düzenleyen sıkı bir kontrol bölgesidir. Kan beyin bariyerinden geçecek olan moleküller 400 Da'dan küçük ve yağda çözünbilme özelliğinde olmalıdırlar (Peterson ve ark 2013). Normal şartlarda hücrelerin kan beyin bariyerinden serbestçe geçişi mümkün olmamakla birlikte kök hücrelerin kan beyin bariyerinden geçebilmektedirler. Omurilik hasarı verilen hayvanlarda kan dolaşımına verilen kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücrelerin hasar bölgesine gelerek nöral ve gliyal hücre markırlarını eksprese ettikleri gösterilmiştir (Osaka ve ark 2010). Ayrıca kemik iliği kökenli kök hücrelerin omurilik hasarı sonrasında kan dolaşımından hasar bölgesine gelerek miyelinizasyona katkıda bulundukları bildirilmiştir (Akiyama

ve ark 2002). Lökositler kan beyin bariyerinden geçiş sırasında, endotele selektin ve VCAM-1 molekülleri ile bağlanırlar. Daha sonrasında G-proteini aracılı aktivasyon ve integrinlerle endotele yapışırlar. Kan beyin bariyerinden geçişleri ise endotel hücreleri ve perisitlerin arasından veya içinden gerçekleşebilir (Wilson ve ark 2010). Çalışmamızda anne sütündeki hücrelerin yavruların dolaşımından beyin dokusuna geçerek nöral ve gliyal hücrelere farklılaşabilmesi, kök hücrelerin kan beyin bariyerinden geçerek merkezi sinir sistemine girmesi ile mümkün olabilir. Bu hücrelerin kan beyin bariyerinden nasıl geçtiği belirsizliğini korumakla birlikte lenfositlerin geçiş mekanizmasına benzer bir yol izlemeleri muhtemeldir.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda, emzirme sırasında anne sütü yoluyla yavruya geçen hücrelerin yavrunun beyin dokusundaki akıbetleri mikroskopik inceleme, akım sitometrisi ve qPCR metotlarıyla araştırılmıştır. Literatürde ilk defa, anne sütünden emzirme yoluyla yavrulara geçen hücrelerin 7 günlük ve 30 günlük yavrularda beyin dokusunda bulundukları gösterilmiştir. Buna ek olarak anne sütü yoluyla yavruların beynine göç eden bu hücrelerin, NeuN ve GFAP eksprese eden nöron ve glia benzeri hücrelere farklılaştıkları belirlenmiştir.

Çeşitli kök hücrelerin sistemik dolaşımdan kan beyin bariyerini geçerek merkezi sinir sistemindeki hasar durumlarında fonksiyonel olarak rol almaları (Akiyama ve ark 2002, Osaka ve ark 2010), süt yoluyla yavrunun beyin dokusuna geçişini gösterdiğimiz hücrelerin beyin içerisinde normal durumlarda fizyolojik olarak yer almalarının ötesinde olası hasar durumlarında da etkili olabileceklerini düşündürmektedir. Bu bağlamda bu hücrelerin fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesinin yanı sıra otoimmün hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, sinir sistemini etkileyen yaralanma ve çeşitli hasarlar gibi patolojik durumlarda verdikleri tepkilerin ortaya çıkarılması gerekmektedir. Çalışmamızın araştırma kapsamı yalnızca beyin dokusu ile sınırlı tutulmakla birlikte, anne sütü yoluyla yavrunun diğer dokularına geçen hücrelerin de tüm yönleriyle araştırılması gerekmektedir. Tüm bunlar, bu hücrelerin anne sütünden yavruya göç etme sebeplerini, yavru üzerindeki etkilerini ve anne sütünün bilinenin çok daha ötesinde bir öneme sahip olduğunu anlamamız açısından büyük bir önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adams KM, Nelson JL, 2004. Microchimerism: an investigative frontier in autoimmunity and transplantation. *Jama*, 291, 9, 1127-31.
- Akiyama Y, Radtke C, Honmou O, Kocsis JD, 2002. Remyelination of the spinal cord following intravenous delivery of bone marrow cells. *Glia*, 39, 3, 229-36.
- Arthur PG, Kent JC, Potter JM, Hartmann PE, 1991. Lactose in blood in nonpregnant, pregnant, and lactating women. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 13, 3, 254-9.
- Arvola M, Gustafsson E, Svensson L, Jansson L, Holmdahl R, Heyman B, Okabe M, Mattsson R, 2000. Immunoglobulin-secreting cells of maternal origin can be detected in B cell-deficient mice. *Biology of Reproduction*, 63, 6, 1817-24.
- Cabinian A, Sinsimer D, Tang M, Zumba O, Mehta H, Toma A, Sant'Angelo D, Laouar Y, Laouar A, 2016. Transfer of Maternal Immune Cells by Breastfeeding: Maternal Cytotoxic T Lymphocytes Present in Breast Milk Localize in the Peyer's Patches of the Nursed Infant. *PloS one*, 11, 6, e0156762.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC, 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N.Y.)*, 263, 5148, 802-5.
- Chen CP, Lee MY, Huang JP, Aplin JD, Wu YH, Hu CS, Chen PC, Li H, Hwang SM, Liu SH, Yang YC, 2008. Trafficking of multipotent mesenchymal stromal cells from maternal circulation through the placenta involves vascular endothelial growth factor receptor-1 and integrins. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26, 2, 550-61.
- Cirello V, Fugazzola L, 2014. Positive effect of fetal cell microchimerism on tumor presentation and outcome in papillary thyroid cancer. *Chimerism*, 5, 3-4, 106-8.
- Collado MC, Santaella M, Mira-Pascual L, Martinez-Arias E, Khodayar-Pardo P, Ros G, Martinez-Costa C, 2015. Longitudinal Study of Cytokine Expression, Lipid Profile and Neuronal Growth Factors in Human Breast Milk from Term and Preterm Deliveries. *Nutrients*, 7, 10, 8577-91.
- Cox DB, Kent JC, Casey TM, Owens RA, Hartmann PE, 1999. Breast growth and the urinary excretion of lactose during human pregnancy and early lactation: endocrine relationships. *Experimental Physiology*, 84, 2, 421-34.
- Crespi F, Croce AC, Fiorani S, Masala B, Heidbreder C, Bottiroli G, 2004. Autofluorescence spectrofluorometry of central nervous system (CNS) neuromediators. *Lasers in Surgery and Medicine*, 34, 1, 39-47.
- Cummins AG, Steele TW, LaBrooy JT, Shearman DJ, 1988. Maturation of the rat small intestine at weaning: changes in epithelial cell kinetics, bacterial flora, and mucosal immune activity. *Gut*, 29, 12, 1672-9.
- Cummins AG, Thompson FM, 1997. Postnatal changes in mucosal immune response: a physiological perspective of breast feeding and weaning. *Immunology and Cell Biology*, 75, 5, 419-29.

- Dangat K, Kilari A, Mehendale S, Lalwani S, Joshi S, 2013. Higher levels of brain derived neurotrophic factor but similar nerve growth factor in human milk in women with preeclampsia. *International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of The International Society for Developmental Neuroscience*, 31, 3, 209-13.
- Dawe GS, Tan XW, Xiao Z-C, 2007. Cell Migration from Baby to Mother. *Cell Adhesion & Migration*, 1, 1, 19-27.
- Dutta P, Burlingham WJ, 2010. Stem cell microchimerism and tolerance to non-inherited maternal antigens. *Chimerism*, 1, 1, 2-10.
- Dutta P, Burlingham WJ, 2011. Microchimerism: tolerance vs. sensitization. *Current Opinion in Organ Transplantation*, 16, 4, 359-65.
- Dutta P, Molitor-Dart M, Bobadilla JL, Roenneburg DA, Yan Z, Torrealba JR, Burlingham WJ, 2009. Microchimerism is strongly correlated with tolerance to noninherited maternal antigens in mice. *Blood*, 114, 17, 3578-87.
- Eşrefoğlu M, 2016. Özel Histoloji, İstanbul, İstanbul Tıp Kitabevi, p.
- Fan Y, Chong YS, Choolani MA, Cregan MD, Chan JK, 2010. Unravelling the mystery of stem/progenitor cells in human breast milk. *PloS one*, 5, 12, e14421.
- Filip S, Mokry J, Vavrova J, Sinkorova Z, Micuda S, Sponer P, Filipova A, Hrebikova H, Dayanithi G, 2014. The peripheral chimerism of bone marrow-derived stem cells after transplantation: regeneration of gastrointestinal tissues in lethally irradiated mice. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 18, 5, 832-43.
- Fugazzola L, Cirello V, Beck-Peccoz P, 2011. Fetal microchimerism as an explanation of disease. *Nature reviews. Endocrinology*, 7, 2, 89-97.
- Gage FH, 2000. Mammalian neural stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 287, 5457, 1433-8.
- Gammill HS, Aydelotte TM, Guthrie KA, Nkwopara EC, Nelson JL, 2013. Cellular fetal microchimerism in preeclampsia. *Hypertension*, 62, 6, 1062-7.
- Gammill HS, Nelson JL, 2010. Naturally acquired microchimerism. *The International Journal of Developmental Biology*, 54, 2-3, 531-43.
- Garofalo R, 2010. Cytokines in human milk. *The Journal of Pediatrics*, 156, 2 Suppl, S36-40.
- Gartner LM, 1997. Breastfeeding and the use of human milk. *American Academy of Pediatrics. Work Group on Breastfeeding. Pediatrics*, 100, 6, 1035-9.
- Gregory KE, Walker WA, 2013. Immunologic Factors in Human Milk and Disease Prevention in the Preterm Infant. *Current Pediatrics Reports*, 1, 4.
- Hassiotou F, Beltran A, Chetwynd E, Stuebe AM, Twigger AJ, Metzger P, Trengove N, Lai CT, Filgueira L, Blancafort P, Hartmann PE, 2012. Breastmilk is a novel source of stem cells with multilineage differentiation potential. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 30, 10, 2164-74.

- Hassiotou F, Geddes DT, Hartmann PE, 2013. Cells in human milk: state of the science. *Journal of Human Lactation: Official Journal of International Lactation Consultant Association*, 29, 2, 171-82.
- Hassiotou F, Heath B, Ocal O, Filgueira L, Geddes D, Hartmann P, Wilkie T, 2014. Breastmilk stem cell transfer from mother to neonatal organs. *FASEB J.*, 28:216.4.
- Hassiotou F, Hepworth AR, Metzger P, Tat Lai C, Trengove N, Hartmann PE, Filgueira L, 2013. Maternal and infant infections stimulate a rapid leukocyte response in breastmilk. *Clinical & Translational Immunology*, 2, 4, e3.
- Hughes A, Brock JH, Parrott DM, Cockburn F, 1988. The interaction of infant formula with macrophages: effect on phagocytic activity, relationship to expression of class II MHC antigen and survival of orally administered macrophages in the neonatal gut. *Immunology*, 64, 2, 213-8.
- Jakaitis BM, Denning PW, 2014. Human Breast Milk and the Gastrointestinal Innate Immune System. *Clinics in Perinatology*, 41, 2, 423-35.
- Joshi M, Keith Pittman H, Haisch C, Verbanac K, 2008. Real-time PCR to determine transgene copy number and to quantitate the biolocalization of adoptively transferred cells from EGFP-transgenic mice. *BioTechniques*, 45, 3, 247-58.
- Kallenbach LR, Johnson KL, Bianchi DW, 2011. Fetal cell microchimerism and cancer: a nexus of reproduction, immunology, and tumor biology. *Cancer Research*, 71, 1, 8-12.
- Kaplan J, Land S, 2005. Influence of maternal-fetal histocompatibility and MHC zygosity on maternal microchimerism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 174, 11, 7123-8.
- Kawasaki MP, 2005. *Mothering with Breastfeeding and Maternal Care*, New York, iUniverse, p. 20.
- Kent JC, 2007. How breastfeeding works. *Journal of Midwifery & Women's Health*, 52, 6, 564-70.
- Kierszenbaum AL, 2006. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Ankara, Palme Yayıncılık, p. 601-604.
- Konuma T, Kato S, Oiwa-Monna M, Ishii H, Tojo A, Takahashi S, 2016. Early phase mixed chimerism in bone marrow does not affect long-term outcomes of myeloablative single-unit cord blood transplantation for adult patients with hematological malignancies. *Leukemia & Lymphoma*, 1-7.
- Kulski JK, Hartmann PE, 1981. Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 59, 1, 101-14.
- Kulski JK, Smith M, Hartmann PE, 1977. Perinatal concentrations of progesterone, lactose and alpha-lactalbumin in the mammary secretion of women. *The Journal of Endocrinology*, 74, 3, 509-10.

- Kunz C, Lonnerdal B, 1992. Re-evaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Paediatrica* (Oslo, Norway : 1992), 81, 2, 107-12.
- Leveque L, Hodgson S, Peyton S, Koyama M, MacDonald KPA, Khosrotehrani K, 2014. Selective organ specific inflammation in offspring harbouring microchimerism from strongly alloreactive mothers. *Journal of Autoimmunity*, 50, 51-8.
- Lopez-Guisa JM, Howsmon R, Munro A, Blair KM, Fisher E, Hermes H, Zager R, Stevens AM, 2011. Chimeric maternal cells in offspring do not respond to renal injury, inflammatory or repair signals. *Chimerism*, 2, 2, 42-9.
- Ma LJ, Walter B, Deguzman A, Muller HK, Walker AM, 2008. Trans-epithelial immune cell transfer during suckling modulates delayed-type hypersensitivity in recipients as a function of gender. *PloS One*, 3, 10, e3562.
- Mahmood U, O'Donoghue K, 2014. Microchimeric fetal cells play a role in maternal wound healing after pregnancy. *Chimerism*, 5, 2, 40-52.
- Marleau AM, Greenwood JD, Wei Q, Singh B, Croy BA, 2003. Chimerism of murine fetal bone marrow by maternal cells occurs in late gestation and persists into adulthood. *Laboratory Investigation; A Journal of Technical Methods and Pathology*, 83, 5, 673-81.
- Michael H. Ross WP, 2011. *Histology: A Text and Atlas*, Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins, p.
- Nelson JL, Gillespie KM, Lambert NC, Stevens AM, Loubiere LS, Rutledge JC, Leisenring WM, Erickson TD, Yan Z, Mullarkey ME, Boespflug ND, Bingley PJ, Gale EA, 2007. Maternal microchimerism in peripheral blood in type 1 diabetes and pancreatic islet beta cell microchimerism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 5, 1637-42.
- Nemescu D, Ursu RG, Nemescu ER, Negura L, 2016. Heterogeneous Distribution of Fetal Microchimerism in Local Breast Cancer Environment. *PloS One*, 11, 1, e0147675.
- Neville MC, Allen JC, Archer PC, Casey CE, Seacat J, Keller RP, Lutes V, Rasbach J, Neifert M, 1991. Studies in human lactation: milk volume and nutrient composition during weaning and lactogenesis. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54, 1, 81-92.
- Nijagal A, Fleck S, Hills NK, Feng S, Tang Q, Kang SM, Rosenthal P, MacKenzie TC, 2012. Decreased risk of graft failure with maternal liver transplantation in patients with biliary atresia. *American Journal of Transplantation: Official Journal of The American Society of Transplantation and The American Society of Transplant Surgeons*, 12, 2, 409-19.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y, 1997. 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Letters*, 407, 3, 313-9.
- Osaka M, Honmou O, Murakami T, Nonaka T, Houkin K, Hamada H, Kocsis JD, 2010. Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. *Brain Res*, 1343, 226-35.

- Peterson SE, Nelson JL, Gadi VK, Gammill HS, 2013. Fetal cellular microchimerism in miscarriage and pregnancy termination. *Chimerism*, 4, 4, 136-8.
- Piotrowski P, Croy BA, 1996. Maternal cells are widely distributed in murine fetuses in utero. *Biology of Reproduction*, 54, 5, 1103-10.
- Rossant J, Cross JC, 2001. Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nat Rev Genet*, 2, 7, 538-48.
- Rowitch DH, Kriegstein AR, 2010. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*, 468, 7321, 214-22.
- Samur G, 2008. Anne Sütü, Ankara, Sağlık Bakanlığı p. 7-17.
- Spitzer N, Sammons GS, Price EM, 2011. Autofluorescent cells in rat brain can be convincing impostors in green fluorescent reporter studies. *J Neurosci Methods*, 197, 1, 48-55.
- Stelzer IA, Thiele K, Solano ME, 2015. Maternal microchimerism: lessons learned from murine models. *Journal of Reproductive Immunology*, 108, 12-25.
- Stikvoort A, Sundin M, Uzunel M, Gertow J, Sundberg B, Schaffer M, Mattsson J, Uhlin M, 2016. Long-Term Stable Mixed Chimerism after Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients with Non-Malignant Disease, Shall We Be Tolerant? *PloS One*, 11, 5, e0154737.
- Su EC, Johnson KL, Tighiouart H, Bianchi DW, 2008. Murine maternal cell microchimerism: analysis using real-time PCR and in vivo imaging. *Biology of Reproduction*, 78, 5, 883-7.
- Sunami R, Komuro M, Tagaya H, Hirata S, 2010. Migration of microchimeric fetal cells into maternal circulation before placenta formation. *Chimerism*, 1, 2, 66-8.
- Tatematsu M, Takahashi M, Tsuda H, Hirose M, Furihata C, 1975. Precocious differentiation of immature chief cells in fundic mucosa of infant rats induced by hydrocortisone. *Cell Differentiation*, 4, 5, 285-94.
- Thrift TA, Bernal A, Lewis AW, Neuendorff DA, Willard CC, Randel RD, 1999. Effects of induced hypothyroidism on weight gains, lactation, and reproductive performance of primiparous Brahman cows. *Journal of Animal Science*, 77, 7, 1844-50.
- Tuffrey M, Bishun NP, Barnes RD, 1969. Porosity of the mouse placenta to maternal cells. *Nature*, 221, 5185, 1029-30.
- van Dijk BA, Boomsma DI, de Man AJ, 1996. Blood group chimerism in human multiple births is not rare. *American Journal of Medical Genetics*, 61, 3, 264-8.
- van Rood JJ, Loberiza FR, Jr., Zhang MJ, Oudshoorn M, Claas F, Cairo MS, Champlin RE, Gale RP, Ringden O, Hovs JM, Horowitz MH, 2002. Effect of tolerance to noninherited maternal antigens on the occurrence of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation from a parent or an HLA-haploidentical sibling. *Blood*, 99, 5, 1572-7.

- Vernochet C, Caucheteux SM, Gendron MC, Wantyghem J, Kanellopoulos-Langevin C, 2005. Affinity-dependent alterations of mouse B cell development by noninherited maternal antigen. *Biology of Reproduction*, 72, 2, 460-9.
- Vernochet C, Caucheteux SM, Kanellopoulos-Langevin C, 2007. Bi-directional cell trafficking between mother and fetus in mouse placenta. *Placenta*, 28, 7, 639-49.
- Walker A, 2010. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *The Journal of Pediatrics*, 156, 2 Suppl, S3-7.
- Weiler IJ, Hickler W, Sprenger R, 1983. Demonstration that milk cells invade the suckling neonatal mouse. *American journal of reproductive immunology : AJRI : official journal of the American Society for the Immunology of Reproduction and the International Coordination Committee for Immunology of Reproduction*, 4, 2, 95-8.
- Wilson EH, Weninger W, Hunter CA, 2010. Trafficking of immune cells in the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation*, 120, 5, 1368-79.
- World Health Organization U, 2003. Global strategy for infant and young child feeding, p. 1-30.
- Ye J, Vives-Pi M, Gillespie KM, 2014. Maternal microchimerism: increased in the insulin positive compartment of type 1 diabetes pancreas but not in infiltrating immune cells or replicating islet cells. *PloS One*, 9, 1, e86985.
- Zhou L, Yoshimura Y, Huang Y, Suzuki R, Yokoyama M, Okabe M, Shimamura M, 2000. Two independent pathways of maternal cell transmission to offspring: through placenta during pregnancy and by breast-feeding after birth. *Immunology*, 101, 4, 570-80.
- Zhou Q, Li M, Wang X, Li Q, Wang T, Zhu Q, Zhou X, Wang X, Gao X, Li X, 2012. Immune-related microRNAs are abundant in breast milk exosomes. *International Journal of Biological Sciences*, 8, 1, 118-23.

7. EKLER

EK A: Etik Kurul Kararı



T.C.

İSTANBUL MEDİPOL ÜNİVERSİTESİ,

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İMÜ-HADYEK)

ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi	Karar No	İlgi	Proje Yürütücüsü
12/02/2014	3		Prof. Dr. Ender ERDOĞAN

“Anne-Yavru Mikrokimerzminde Mikrokimerik Hücrelerin Tespiti ve Analitik Tanımlanması” başlıklı bilimsel araştırma Etik Kurulumuzda görüşülmüş olup, çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna “oybirliği” ile karar verilmiştir.

Etik Onay Geçerlilik Süresi: 2 Yıl

GÖREVİ	ADI SOYADI	İMZA
Başkan	Doç. Dr. Hanefi Özbek	
Başkan Yardımcısı	Prof. Dr. Dr. Ertuğrul Kılıç	
Üye	Doç. Dr. Mustafa Öztürk	
Üye	Yard. Doç. Emir Yüzbaşıoğlu	
Üye	Yard. Doç. Dr. Sine Özmen Toğay	
Üye	Taha Keleştemur	
Üye	Dr. Mehmet Yalçın Günel	
Üye	Özge Şeyda Durgut	
Üye	Ekrem Musa Özdemir	

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mehmet Şerif AYDIN

Doğum Tarihi: 07.06.1988

E-mail: mehmetserifaydin@gmail.com

Unvanı: Araştırma Görevlisi

1. Öğrenim Durumu

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji	İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi	2004-2008
Yüksek Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi	2008-2010
Doktora	Histoloji ve Embriyoloji	Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi	2011-.....

2. Yayınlar

2.1. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)

1. Esrefoglu M, Tok OE, **Aydın MS**, Iraz M, Ozer OF, Selek S, Iraz M. Effects of beta-glucan on protection of young and aged rats from renal ischemia and reperfusion injury. Bratisl Lek Listy. 2016 117(7):530-538.
2. Said I, Bolayirli IM, Inan O, **Aydın MS**, Bilgin IA, Sayan I, Esrefoglu M, Seven A. The effects of genistein supplementation on fructose induced insulin resistance, oxidative stress and inflammation. Life Sciences. 2016 158(1):57-62.
3. Altintas O, Altintas MO, **Aydın MS**, Baran O, Antar V, Esrefoglu M, Talip A. Neuroprotective effects of chronic fenofibrate treatment via modulating the immunoreactivity of cleaved caspase-3 in stroke induced by transient middle cerebral occlusion rat model. Turkish Neurosurgery. 2016

4. Orhan I, Dogan R, Soylu E, Aksoy F, Veyseller B, Ozturan O, Esrefoglu M, **Aydin MS**. Histopathological evaluation of Ankaferd blood stopper use in the rabbit septoplasty model. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2015 79(3):305-309.
5. Iraz M, Iraz M, Esrefoglu M, **Aydin MS**. Protective effect of β -glucan on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*. 2015 45:261-267.
6. Cebe T, Yanar K, Atukeren P, Ozan T, Kuruç AI, Kunbaz A, Sitar ME, Mengi M, **Aydin MS**, Eşrefoğlu M, Aydın S, Cakatay U. A comprehensive study of myocardial redox homeostasis in naturally and mimetically aged rats. *Age (Dordr)*. 2014 Dec;36(6):9728.
7. Kazancioglu HO, Bereket MC, Ezirganli S, **Aydin MS**, Aksakalli S. Effects of caffeic acid phenethyl ester on wound healing in calvarial defects. *Acta Odontol Scand*. 2014 Nov 6:1-7.
8. Ezirganli S, Kazancioglu HO, Mihmanli A, Sharifov R, **Aydin MS**. Effects of different biomaterials on augmented bone volume resorptions. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Sep 27.
9. Ezirganli S, Kazancioglulu HO, Mihmanli A, **Aydin MS**, Sharifov R, Alkan A. The effect of local simvastatin application on critical size defects in the diabetic rats. *Clin Oral Implants Res*. 2014 Aug;25(8):969-76.
10. Kazancioglu HO, Ezirganli S, **Aydin MS**. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. *J Craniofac Surg*. 2013 Nov;24(6):2141-6.
11. **Aydin MS**, Senturk GE, Ercan F. (2013). Cryopreservation increases DNA fragmentation in spermatozoa of smokers. *Acta Histochemica*, 115(4), 394-400.
12. Karakoyun B, Uslu U, Ercan F, **Aydin MS**, Yuksel M, Velioglu Ogunc A, Alican I. (2011). The effect of phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate on inflammation and apoptosis in rat experimental colitis. *Life Sci*, 89(11), 402-407.

2.2. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında (Proceedings) basılan bildiriler

1. Esrefoglu M, **Aydin MS**, Tok OE, Iraz M, Kesgin S, Kocyigit A. The effects of melatonin on hepatic regeneration after partial hepatectomy in young and aged sprague-dawley rats. 12th Multinational Congress on Microscopy. Macaristan, 2015.
2. Meral I, Esrefoglu M, Akgun-Dar K, Ustunova S, **Aydin MS**, Demirtas M, Arifoglu Y. Effect of nigella sativa in brain cortical and hippocampal neurons in pentylenetetrazol induced kindling in rats. 12th Multinational Congress on Microscopy. Macaristan, 2015.
3. Sitar ME, Aydin S, Yanar K, Sitar G, **Aydin MS**, Esrefoglu M, Atukeren P, Cakatay U. Vascular, Ischemic and oxidative effects of alpha lipoic acid on experimental NSAID induced gastropathy. FEBS-EMBO 2014. Fransa, 2014.
4. Bozbay E, Dominici F, Gokbuget AY, Guida L, Cintan S, **Aydin MS**, Pilloni A. Effects of the different periodontal treatment methods on the root and cementum. 18th International Microscopy Congress, Prague, Czech Republic, 2014.
5. Eşrefoğlu M, Tok OE, **Aydin MS**, IrazM, Selek S, Ozer OF, Kocyigit A. Protective effect of beta-glucan on renal ischemia and reperfusion injury in young and aged rats. 18th International Microscopy Congress, Prague, Czech Republic, 2014.
6. **Aydin MS**, Ercan F, Erkanlı G. Effect of cryopreservation on sperm parameters and DNA fragmentation in cigarette smokers. 17th International Microscopy Congress, Brazil, Rio de Janerio, 2010.

2.3. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1. **Aydin MŞ**, Ozturk G, Ekmekcioglu EN, Vatandaslar E, Müdok T, Erdoğan E. Anne sütü kaynaklı mikrokimerizm. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi. İzmir, Türkiye 2016

2. Aksakalli S, **Aydın MŞ**, Birlik M, Kazancıoğlu HO, Eziganlı S. Üzüm çekirdeğinin sıçanlarda premaksiller sütür kemikleşmesine etkisi. XIV. Uluslararası Türk Ortodonti Derneği Sempozyumu. Eskişehir, Türkiye, 2015
3. **Aydın MŞ**, Ercan F, Erkanlı G. Kriyoprezervasyonun sigara içenlerde sperm parametreleri ve DNA fragmentasyonu üzerine etkileri. X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir, Türkiye, Mayıs 2010
4. Yıldız SD, **Aydın MŞ**, Tok OE, Kıran D, Çilingir ÖT. In vivo görüntüleme tekniklerinde quantum dot kullanımı: ön çalışma. X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir, Türkiye, Mayıs 2010
5. **Aydın MŞ**, Şahin E. Çetinel E, Yeğen B. Egzersizin indometazin ile oluşturulan mesane inflamasyonuna etkisi ve oksitosin reseptörünün olası rolü. 19. Uluslararası Elektron Mikroskopisi Kongresi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, Türkiye, Haziran 2009