

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**GEBE SIÇANLARDA VALPROİK ASİT KULLANIMININ
FETÜSTE NEDEN OLDUĞU MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ
HASARINA KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRENİN ETKİSİ**

Hatice Fulya YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Nezihe Tülin BOYLU

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TPF-17017 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN-2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Hatice Fulya YILMAZ tarafından hazırlanan “Gebe Sıçanlarda Valproik Asit Kullanımının Fetüste Neden Olduğu Merkezi Sinir Sistemi Hasarına Kemik iliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrenin Etkisi” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 12/01/2018

Üye (Tez Danışmanı)	: Yrd. Doç. Dr. Nezihe Tülün BOYLU	ADÜ
Üye (İkinci Tez Danışmanı)	: Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN	ADÜ
Üye (Anabilim Dalı Başkanı):	Prof .Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN	ADÜ
Üye	: Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN	DEÜ
Üye	: Yrd. Doç. Dr. Kadri Murat GÜRSES	ADÜ

ONAY :

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatımın her anında sonsuz sabırla ve destekle yanımda olan, fikirleri ve tecrübeleriyle her daim yoluma ışık tutan sevgili annem Gülsüm YILMAZ ve sevgili babam Rıfat YILMAZ'a, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve hep yanımda olan sevgili kardeşim Ahmet Nedim YILMAZ'a çok teşekkür ederim.

Hiç çekinmeden bilgisine ve tecrübesine sığındığım bölüm başkanımız Prof. Dr. Alpaslan GÖKÇİMEN'e, yüksek lisans eğitimimde emeği çok büyük olan, bilgisini ve sevgisini içtenlikle paylaşan, olmazları olduran sevgili danışmanım Yrd. Doç. Dr. Tülin BOYLU'ya, kök hücre ve hücre kültürü çalışmalarımızda bilgisini ve desteğini esirgemeyen danışmanım Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e, yüksek lisans eğitimimde yola birlikte başladığım Prof. Dr. Kemal ERGİN'e, desteğini ve güler yüzünü hiçbir zaman esirgemeyen Prof. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, bilgi ve tecrübelerini hiç çekinmeden paylaşan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD. Öğretim görevlisi Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a teşekkürlerimi sunarım.

Emekleri ve içtenliği için çok kıymetli dostum, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD. Araştırma görevlisi Dr. Merve SEYMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Fikirleri ve tecrübeleriyle yoluma ışık tutarak, çok severek ilerlemeyi dilediğim Histoloji ve Embriyoloji alanına yönelmemi sağlayan Uzm. Dr. Özgür ÖZBEBİT'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamda emeği ve yardımları çok büyük olan ve hep yanımda olduğunu hissettiğim Biyofizik AD. Yüksek lisans öğrencisi sevgili Nagihan ERTEN'e ve çalışmamın ilerlemesi sürecinde yardımlarını esirgemeyen Anatomi AD. Araştırma görevlisi Gizem POLAT'a, Biyofizik AD. Araştırma görevlileri Didem BAKAY İLHAN ve Cem KÖKEN'e ve Fizyoloji AD. Araştırma görevlisi Dr. Cenk ORAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Deney sürecinde yardımlarını esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım Gülfem ERSOY, Gözde ALKAN, Ayşenur BOSTANCI ve Yağmur KÖSE'ye teşekkürlerimi sunarım.

Her zaman yanımda olduklarını bildiğim sevgili dostlarım İkbal Fatma GÜRSOY, Fatma GEDİK ve Ümit BABACAN'a teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
RESİMLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xv
EKLER DİZİNİ	xvi
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Epilepsi	3
2.1.1. Epilepsi Sendromları Uluslararası Sınıflandırılması	4
2.1.2. Epilepsi Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Etki Mekanizmaları	4
2.2. Valproik Asit	5
2.2.1. Valproik Asitin Etki Mekanizması	5
2.3. Sinir Sistemi Embriyolojisi	6
2.3.1. Embriyonik Germ Tabakalarının Oluşumu	6
2.3.2. Notokord Oluşumu	9
2.3.3. Nörulasyon ve Nöral Tüp Oluşumu	11
2.3.4. Nöral Krest Oluşumu.....	12
2.3.5. Somitlerin Gelişimi	13
2.3.6. Somitlerin Farklanması	14
2.4. Anormal Nörulasyon Sonucu Embriyoda Meydana Gelen Defektler	15

2.4.1. Nöral Tüp Defektleri	15
2.5. Merkezi Sinir Sistemi	16
2.5.1. Merkezi Sinir Sisteminin Organizasyonu.....	16
2.5.2. Beynin Yapısı	17
2.5.2.1. Glia Hücreleri	18
2.5.2.1.1. Astrositler	18
2.5.2.1.1.1. Fibröz astrositler	18
2.5.2.1.1.2. Protoplazmik astrositler	19
2.5.2.1.2. Oligodendrositler	19
2.5.2.1.3. Ependim hücreleri.....	19
2.5.2.1.4. Mikroglialar	19
2.5.3. Omuriliğin Yapısı	20
2.5.4. Merkezi Sinir Sistemi Histolojisi	21
2.5.4.1. Meninksler	21
2.5.4.1.1. Dura mater	21
2.5.4.1.2. Araknoid	21
2.5.4.1.3. Pia Mater	22
2.5.4.2. Koroid pleksus ve beyin-omurilik sıvısı/serebrospinal sıvı	22
2.6. Merkezi Sinir Sistemi Embriyolojisi	23
2.6.1. Omuriliğin Gelişimi.....	23
2.6.2. Meninkslerin Gelişimi	24
2.6.3. Beynin Gelişimi.....	24
2.6.3.1. Rombensefalon: Arka beyin	24
2.6.3.2. Myelensefalon	25
2.6.3.3. Metensefalon	25
2.6.3.4. Mezensefalon (Orta beyin)	26

2.6.3.5. Prosensefalon (Ön beyin)	26
2.6.3.6. Diensefalon.....	26
2.6.3.7. Telensefalon	27
2.7. Sıçanda Sinir Sisteminin Kökeni ve Anatomisi	27
2.8. Beyine Özgü Bazı Belirteçler ve Biyokimyasal Özellikleri	28
2.8.1. 14-3-3 Protein Ailesi	28
2.8.2. 14-3-2 Protein Ailesi (NSE) Nöron Spesifik Enolaz.....	28
2.8.3. S100.....	28
2.8.3.1. S100b.....	29
2.8.4. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP)	29
2.8.5. Miyelin bazık proteini (MBP)	30
2.8.6. N-asetil-L-aspartat (NAA).....	30
2.9. Kök Hücre	30
2.9.1. Farklılaşma Kapasitelerine Göre Kök Hücreler	31
2.9.2. Elde Edildikleri Kaynaklarına Göre Kök Hücreler	32
2.9.2.1. Embriyonik olmayan kök hücreler	33
2.9.2.1.1. Mezenkimal kök hücreler (MKH).....	33
2.9.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	35
2.9.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünolojik Özellikleri	35
2.9.5. Kemik İliği Kökenli Kök Hücreler (BM_MSCs).....	35
2.9.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Tercih edilme Nedenleri	36
2.9.7. Mezenkimal Kök Hücre Belirteçleri.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları	38
3.1.1. Deney Grupları	38
3.2. Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi	39

3.2.1. Hücre Kültür İşlemleri	39
3.2.1.1. RFP (Red Fluorescent Protein) ile mezenkimal kök hücrelerin işaretlenmesi	40
3.2.1.2. Hücre canlılık testi	40
3.2.1.3. Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometrik analizi	40
3.3. İmmüno Floresan İnceleme	41
3.4. Dokuların Elde Edilmesi	41
3.5. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Takibi	42
3.5.1. Hematoksilen & Eozin Boyama Protokolü	42
3.5.2. Toluidine Blue O Boyama Protokolü	43
3.6. İmmünohistokimyasal Boyama	43
4. BULGULAR	46
4.1. Hücre Kültürü ve İmmüno fenotiplendirilmesi	46
4.1.1. Sıçan Kemikiliğinden İzole Edilmiş Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü ve İmmüno fenotiplendirilmesi	46
4.1.2. Kök Hücre Belirteçleri Kullanılarak Akım Sitometri İle Hücrelerin Mezenkimal Kök Hücre Olduğunun Gösterilmesi	47
4.1.3. Kemikiliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Varlığının RFP ile ölçülmesi	49
4.2. Kontrol Grubu Beyin Dokusu Hematoksilen Eozin Histokimyasal ve S100b İmmünohistokimyasal Bulguları	51
4.3. VPA Grubu Beyin Dokusu Hematoksilen Eozin Histokimyasal ve S100b İmmünohistokimyasal Bulguları	52
4.4. VPA Grubu Beyin Dokusu Hemotoksilen Eozin Histokimyasal ve S100b İmmünohistokimyasal Bulguları	54
4.5. Kontrol Grubu Omurilik Dokusu Servikal Bölge Hematoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmünohistokimyasal Bulguları	55
4.6. Kontrol Grubu Omurilik Dokusu Torakal bölge Hemotoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmünohistokimyasal Bulguları	58

4.7. Kontrol Grubu Omurilik Dokusu Lumbar bölge Hemotoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmünohistokimyasal Bulguları	60
4.8. Kontrol Grubu Omurilik Dokusu Sakral bölge Hemotoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmünohistokimyasal Bulguları.....	63
4.9. VPA Grubu Omurilik Dokusu Servikal bölge Hemotoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmünohistokimyasal Bulguları.....	65
4.10. VPA Grubu Omurilik Dokusu Torakal bölge Hemotoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmünohistokimyasal Bulguları.....	68
4.11. VPA Grubu Omurilik Dokusu Lumbar Bölge Hematoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmunohistokimyasal Bulguları.....	70
4.12. VPA Grubu Omurilik Dokusu Sakral Bölge Hematoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmunohistokimyasal Bulguları.....	73
4.13. VPA+Kök Grubu Omurilik Dokusu Servikal Bölge Hematoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmunohistokimyasal Bulguları.....	75
4.14. VPA+Kök Grubu Omurilik Dokusu Torakal Bölge Hematoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmunohistokimyasal Bulguları	78
4.15. VPA+Kök Grubu Omurilik Dokusu Lumbar Bölge Hematoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmunohistokimyasal Bulguları.....	80
4.16. VPA+Kök Grubu Omurilik Dokusu Sakral Bölge Hematoksilen Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100b İmmunohistokimyasal Bulguları	83
4.17. Histolojik Bulgular	85
4.17.1. Beyin Dokusu Hemotoksilen Eozin Histokimyasal, İmmünohistokimyal Bulguları	85
4.17.2. Omurilik Dokusu Hemotoksilen Eozin ve Toluidin Blue Histokimyasal Bulguları.	86
4.17.2.1. S100-Beta İmmünohistokimya boyama bulguları.....	87
4.18. Makroskobik Bulgular	88
4.19. İstatistiksel Analiz	89
5. TARTIŞMA.....	93
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	95

KAYNAKLAR.....	96
EKLER	99
ÖZGEÇMİŞ.....	103



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BMSC	: Bone Marrow Stem Cell
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FGF 8	: Fibroblast Büyüme Faktörü 8
GABA	: Gama Amino Bütirik Asit
GABA-T	: Gaba Transaminaz-T
GAD	: Glutamik Asit Dekarboksilaz
GMP	: Granulosit/Monosit Progenitör Hücreler
H&E	: Hematoksilen-Eozin
MKH	: Mezenkimal Kök Hücre
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NTD	: Nöral Tüp Defekti
PAX6	: Paired Box Gene-6
PBS	: Phospat Buffer Saline
PSS	: Periferik Sinir Sistemi
RFP	: Red Fluorescent Protein
VPA	: Valproik Asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Embriyonik germ tabakalarının oluşumu	7
Şekil 2: Embriyonik diskin üçüncü hafta boyunca uzaması	8
Şekil 3: Notokord oluşumu	9
Şekil 4: Nöral oluk ve nöral tüp oluşumu	11
Şekil 5: Somitlerin gelişimi.....	14
Şekil 6: Nöral tüpün kapanmaması sonucu meydana gelen spina bifida	15
Şekil 7: Kranial bölgede kapanmama sonucu oluşan anensefali	16
Şekil 8: Farklılaşma kapasitesine göre kök hücre tipleri	32
Şekil 9: Kök Hücre Kaynakları	33
Şekil 10: Kemikliğinden izole edilen MKH'lerin immünofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları	47
Şekil 11: Mezenkimal kök hücre verilmiş sıçan akciğer dokusundaki CD34 sayımı.....	48
Şekil 12: S100-beta aktivitesinin beyindeki tutulumunun skorlanması.....	90
Şekil 13: Kontrol, VPA ve VPA+KÖK tedavi gruplarının immunohistokimyasal boyama skorlaması.....	90
Şekil 14: Kontrol grubu, VPA grubu ve VPA+KÖK uygulanmış deneklerin omuriliklerinin bölgeleri arasındaki immunohistokimya boyama skorlaması.	91
Şekil 15: Gruplar arasındaki sıçan fetüslerine ait defektlerin istatistiksel analizi	92

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Mezenkimal kök hücrelerin üçüncü pasajdaki morfolojik yapısının ışık mikroskopundaki görüntüsü.	46
Resim 2: Sıçan fetüs beyin dokusunda mezenkimal kök hücre varlığının floresan mikroskopuyla görüntülenmesi.	49
Resim 3: Sıçan fetüs beyin dokusunda mezenkimal kök hücre varlığının floresan mikroskopuyla görüntülenmesi.	49
Resim 4: Sıçan fetüs omurilik dokusunda mezenkimal kök hücre varlığının floresan mikroskopuyla görüntülenmesi.	50
Resim 5: Sıçan fetüs omurilik dokusunda mezenkimal kök hücre varlığının floresan mikroskopuyla görüntülenmesi.	50
Resim 6: Kontrol grubu beyin dokusu 4x H&E.....	51
Resim 7: Kontrol grubu beyin dokusu 10x H&E.....	51
Resim 8: VPA grubu beyin dokusu 4x H&E.....	52
Resim 9: VPA grubu beyin dokusu 10x H&E.....	52
Resim 10: VPA grubu beyin dokusu 40x H&E.....	53
Resim 11: VPA grubu beyin dokusu 40x S100-beta.....	53
Resim 12: VPA+Kök Hücre grubu beyin dokusu 4x H&E.....	54
Resim 13: VPA+Kök grubu beyin dokusu 40x H&E.....	54
Resim 14: VPA+Kök grubu beyin dokusu 40x S100-beta.....	55
Resim 15: Kontrol Grubu omurilik, servikal bölge, HE,4x.....	55
Resim 16: Kontrol Grubu omurilik dokusu, servikal bölge,ön boynuz, Toluidin Blue O, 40x.....	56
Resim 17: Kontrol Grubu omurilik dokusu, servikal bölge,arka boynuz, Toluidin Blue O, 40x.....	56
Resim 18: Konrol grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta, 10x.....	57
Resim 19: Konrol grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta, 20x.....	57

Resim 20: Kontrol grubu omurilik dokusu, torakal bölge, HE, 4x.....	58
Resim 21: Kontrol grubu omurilik dokusu, torakal böge, ön boynuz, Toluidin Blue O, 40x.....	58
Resim 22: Kontrol grubu omurilik dokusu,torakal bölge, arka boynuz, Toluidin Blue O, 40x.	59
Resim 23: Kontrol grubu omurilik dokusu,torakal bölge, S100-beta,10x.....	59
Resim 24: Kontrol grubu omurilik dokusu,torakal bölge, S100-beta,20x.....	60
Resim 25: Kontrol grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, HE,10x..	60
Resim 26: Kontrol grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, ön boynuz, Toluidin Blue O,40x	61
Resim 27: Kontrol grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, arka boynuz, Toluidin Blue O, 40x.....	61
Resim 28: Kontrol grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta,10x.....	62
Resim 29: Kontrol grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta,20x.....	62
Resim 30: Kontrol grubu omurilik dokusu, sakral bölge, HE,10x.....	63
Resim 31: Kontrol grubu omurilik dokusu, sakral bölge,ön boynuz, Toluidin Blue O,40x.....	63
Resim 32: Kontrol grubu omurilik dokusu, sakral bölge,arka boynuz, Toluidin Blue O, 40x.....	64
Resim 33: Kontrol grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 10x	64
Resim 34: Kontrol grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 20x.	65
Resim 35: VPA grubu omurilik dokusu, servikal bölge, HE,10x.....	65
Resim 36: VPA grubu omurilik dokusu, servikal bölge, ön boynuz, Toluidin Blue O, 40x.....	66
Resim 37: VPA grubu omurilik dokusu, servikal bölge, arka boynuz, Toluidin Blue O,40x.....	66
Resim 38: VPA grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta, 10x.....	67
Resim 39: VPA grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta, 40x.....	67

Resim 40: VPA grubu omurilik dokusu, torakal bölge, HE, 10x.....	68
Resim 41: VPA grubu omurilik dokusu, torakal bölge, ön boynuz, Toluidin blue O, 40x.....	68
Resim 42: VPA grubu omurilik dokusu, torakal bölge, arka boynuz, Toluidin blue O, 40x.....	69
Resim 43: VPA grubu omurilik dokusu, torakal bölge, S100-beta, 10x.....	69
Resim 44: VPA grubu omurilik dokusu, torakal bölge, S100-beta, 40x.....	70
Resim 45: VPA grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, HE,4x.....	70
Resim 46: VPA grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, ön boynuz, Toluidine Blue O, 20x.....	71
Resim 47: VPA grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, arka boynuz, Toluidine Blue O, 20x.....	71
Resim 48: VPA grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta,10x.....	72
Resim 49: VPA grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta, 20x.....	72
Resim 50: VPA grubu omurilik dokusu, sakral bölge, HE, 10x.....	73
Resim 51: VPA grubu omurilik dokusu, sakral bölge, ön boynuz, Toluidin blue O,40x.....	73
Resim 52: VPA grubu omurilik dokusu, sakral bölge, arka boynuz, Toluidin blue O, 40x..	74
Resim 53: VPA grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 10x.....	74
Resim 54: VPA grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 40x.....	75
Resim 55: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, servikal bölge, HE,10x.	75
Resim 56: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, servikal bölge, ön boynuz, Toluidin blue O, 40x	76
Resim 57: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, servikal bölge, arka boynuz, Toluidin blue O, 40x.	76
Resim 58: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta, 10x.....	77
Resim 59: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta, 20x.....	77
Resim 60: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, torakal bölge, HE, 10x.....	78

Resim 61: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, torakal bölge, ön boynuz, Toluidin blue O, 40x.	78
Resim 62: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, torakal bölge, arka boynuz, Toluidin blue O, 40x	79
Resim 63: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, torakal bölge, S100-beta, 10x	79
Resim 64: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, torakal bölge, S100-beta, 40x	80
Resim 65: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, HE,10x.....	80
Resim 66: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, ön boynuz, Toluidin blue O, 40x	81
Resim 67: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, arka boynuz, Toluidin blue, 40x	81
Resim 68: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta, 10x.....	82
Resim 69: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta, 20x.....	82
Resim 70: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, dokusu, sakral bölge, HE, 10x	83
Resim 71: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, sakral bölge, ön boynuz, Toluidin blue O, 40x	83
Resim 72: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, sakral bölge, arka boynuz, Toluidin blue O, 40x..	84
Resim 73: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 10x.....	84
Resim 74: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 20x.....	85
Resim 75: Kontrol grubuna ait sıçan fetüsü.....	88
Resim 76: VPA+MKH uygulanan sıçana ait defektli fetüs.....	88
Resim 77: VPA uygulanan sıçanlara ait defektli fetüsler.	88

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Epilepsi sendromları uluslararası sınıflandırılması	4
Tablo 2: Epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçlar ve etki mekanizmaları	4
Tablo 3: Mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçleri	37
Tablo 4: S100b İmmünohistokimyasal boyamada beyin ve omurilik dokularında şiddet ekspresyonunun skorlanması	89



EKLER DİZİNİ

Ek-1: Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu.....	99
Ek-2: Kocaeli Üniversitesi Katılım Belgesi.....	100
Ek-3: XXIII. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kurulu.....	101
Ek-4: Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	102



ÖZET

GEBE SIÇANLARDA VALPROİK ASİT KULLANIMININ FETÜSTE NEDEN OLDUĞU MERKEZİ SİNİR SİSTEMİ HASARINA KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN ETKİSİ

Yılmaz HF, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji (Tıp) Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2018.

Epilepsi; kortikal nöronlardaki anormal ve aşırı elektriksel deşarj sonucu ortaya çıkan, ani ve tekrarlayıcı tanımlanabilen bir olayla tetiklenmemiş nöbetlerle karakterize bir hastalıktır. Epilepsi hastalığı tüm dünyada yaygın bir şekilde görülür. Hiçbir etnik fark, cinsiyet ayrımı, yaş sınırı ve sosyal sınıf tanımayıp, dünyada 50 milyon insanı etkilediği tahmin edilmektedir. Epilepsi tedavisinde çeşitli antiepileptik ilaçlar kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları benzodiazepin, GABA (Gama aminobütirik asit) analogları ve hormonlardır. Epilepsi tedavisinde kullanılan diğer bir antiepileptik ilaç valproik asittir. Ancak valproik asitin gebelikte kullanımı çok önemli yan etkilere neden olmaktadır. En önemli yan etkileri; spina bifida, myelomeningosel gibi nöral tüp defektleri, kol ve bacak malformasyonları, dudak yarığı, kardiyovasküler malformasyonlar ve fasiyel dismorfizimdir. Bu verilerden yola çıkarak bu çalışmada gebe sıçanlarda valproik asitin kullanımına bağlı olarak fetüste oluşabilecek nöral tüp defektlerine ve/veya diğer konjenital malformasyonlara, merkezi sinir sistemi hasarına kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin etkinliğini araştırmayı hedefledik.

Çalışmamızda 24 erişkin “*Wistar Albino*” dişi sıçan gebeliklerinin 9. günlerinde deney ve kontrol olmak üzere 2 farklı gruba ayrıldı. Deney grubundaki gebeliklerinin 9. gününde olan 16 sıçanın 8’ine subkutan yolla valproik asit (VPA) enjekte edilirken diğer 8’ine ise hem VPA (subkutanöz) hem de sıçan kemik iliğinden elde ettiğimiz mezenkimal kök hücreler aynı gün kuyruk veninden enjekte edildi. Kontrol grubunda olan 8 sıçana ise gebeliklerinin 9. gününde kuyruk veninden Phosphate Buffered Saline (PBS) verildi. Çalışmaya dahil edilen 24 adet “*Wistar Albino*” cinsi gebe sıçandan gebeliklerinin 21. gününde alınan fetüslerin beyin ve omurilikleri çıkarıldı. Tespit edildikten sonra bu dokular Hematoksilen&Eozin ve Toluidin Blue O boyaları ile histokimyasal; S100b ile immunohistokimyasal olarak incelendi.

Anahtar Kelimeler: Epilepsi, Valproik asit, Nöral Tüp Defekti, Mezenkimal Kök Hücre, S100b.

ABSTRACT

THE EFFECT OF BONE MARROW-DERIVED MESENCYHMAL STEM CELL TO CAUSE OF CENTRAL NERVE SYSTEM DAMAGE USE OF VALPROIC ACID IN PREGNANT RATS

Yılmaz HF, Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Histology and Embiyology Program M.Sc. Thesis, Aydın, 2018

Epilepsy is a disease characterized by seizures that are not triggered by a sudden and recurrent episode that occurs in abnormal and excessive electrical discharge outcome in cortical neurons. Epilepsy is widespread throughout the world, regardless of ethnic background, age, gender, and social class. It is estimated that it affects 50 million people in the world. Various antiepileptic drugs are used in the treatment of epilepsy. Some of these are benzodiazepines, GABA (Gamma aminobutyric acid) analogs and hormones. Another antiepileptic drug used in the treatment of epilepsy is valproic acid. However, valproic acid has very important side effects in use in pregnancy. The most important side effects are neural tube defects such as spina bifida, myelomeningocele, limb malformations, lip scars, cardiovascular malformations and facial dysmorphism. We aimed to investigate the efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the neural tube defects and / or other congenital malformations that may occur in fetuses due to the use of valproic acid in pregnant rats.

In our study, 2 different groups were assigned as treatment and control on the 9th day of 24 adult "Wistar Albino" female rat pregnancies. Valproic acid (VPA) was injected subcutaneously into 8 of 16 rats on the 9th day of the pregnancies in the experimental group while mesenchymal stem cells obtained from both the VPA (subcutaneous) and rat bone marrow were injected into the other 8 via the tail vein on the same day. 8 rats in the control group were given phosphate buffered saline (PBS) in the tail vein on day 9 of their pregnancy. The brain and spinal cord of fetuses removed on the 21st day of 24 pregnant "Wistar Albino" type included in the study. After tissue embedding, these tissues were histological stained with Hematoxilen&Eosine and Toluidine Blue O; immunohistochemically stained with S100b.

Key words: Epilepsy, valproic acid, neural tube defect, S100b, mesencyhmal stem cell.

1. GİRİŞ

Epilepsi; nöronların ara sıra gelen (paroksizmal), aşırı ve düzensiz boşalmaları ile karakterize edilen ve beyinde birçok patolojik sürecin neden olduğu kompleks semptomlarla görülen bir hastalıktır (Browne ve Holmes, 2007).

Sinir dokusunun paroksizmal ve düzensiz boşalımının her derecede, her yaşta, her hastalık durumunda oluşabileceği ve sayısız koşulda gelişebileceği düşünülmektedir (Zenbilci, 1985).

Nöronal membranların ateşleme eşiği, intrinsek membran-eşikdeğer-stabilize edici mekanizmaların önleme kapasitesinin altına düştüğünde nöronlarda paroksizmal boşalmalar oluşur. Bu atak bölgesel olabileceği gibi beyin diğer bölgelerine yayılım gösterebilir (Browne ve Holmes, 2007).

Etiyolojisini etkileyen etkenler; metabolik, toksik, yapısal, enfeksiyöz ve inflamatuvar nedenlere bağlı olan akut merkezi sinir sistemi hasarıyla ortaya çıkar (Osmangazi Tıp Dergisi, 2016).

Epilepsi insidansı yılda 20-50/100.000, aktif epilepsi prevalansı 4-10/1000 olarak bildirilmiştir (WHO, Epilepsy, February, 2016).

Epilepsi tedavisinde çeşitli antiepileptik (antikonvülsan) ilaçlar kullanılmaktadır. Tedavide kullanılan antiepileptik ilaçlardan biri de valproik asit / valproattır. Karma etkili ve geniş spektrumlu bir antiepileptik olan valproik asit, anormal elektriksel uyarıların beyinde yayılmasını önler. Epilepsi nöbetlerinin çoğuna etki göstermektedir. Özellikle infatil spazmlarda jeneralize tonik-klonik nöbetlerde başarı ile kullanılmaktadır. Myoklonik nöbetlerin tedavisinde kullanılan en etkili antiepileptiktir (Mycek ve Ark, 1998).

Yapısal olarak santral sinir sisteminin ana inhibitör nöromediyatörü olan GABA'ya (Gama Amino Butirik Asit) benzemektedir. Yüksek dozda verildiğinde GABA transaminaz (GABA-T) enzimini inhibe ederek GABA yıkımını azaltır ve sinapstaki düzeyini yükseltir (Kayaalp, 1998).

Hem voltaj bağımlı sodyum kanallarından hücreye sodyum girişini inhibe eder hem de GABAmimetik etkisiyle klorür girişini kolaylaştırır. Bu iki mekanizmaya ek olarak

hücrenin polarizasyonunu artırır ve uyarılabilirliğini azaltır. GABA mimetik etkisi, voltaj bağımlı sodyum kanalları üzerine olan etkisine göre daha baskındır (Dökmeci, 2000). Valproik asitin gebelikte kullanımının embriyo ve fetüs üzerindeki teratojenik ve toksik etkileri bilinmektedir (Ornoy, 2009).

Gebelikte valproik asit kullanımı sonucu fetüste görülen başlıca malformasyonlar nöral tüp defektleri (NTD), iskelet anomalileri, lumbosakral meningomiyelose, septo-optik displazi ve konjenital kalp defektleridir (Ornoy, 2009).

İlk trimesterde valproik asit kullanımı sonrası nöral tüp defekti görülme oranı %3,8-9 arasında değiştiği gösterilmiştir (Morrow ve Ark, 2006).

Nöral tüp defektleri (NTD); nöral katlantıların gelişimin 3. ve 4. haftalarında anormal şekilde kapanması ile ortaya çıkar. Meninksleri, vertebraları, kasları ve deriyi de kapsayan anomalilerdir (Sadler, 2011).

NTD etiyolojisinde çevresel ve beslenme faktörleri yer alır. Bazı ilaçlar meningomiyelose riskini artırmaktadır. Bu ilaçlardan birisi valproik asittir ve gelişimin 4. haftasında nöral kıvrımların füzyonu (kaynaşması) sırasında alındığında NTD'lerine yol açar (Moore ve Persaude, 2016).

Mezenkimal kök hücre (MKH) erişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli oldukları için destek hücresi özelliği taşırlar. Birçok dokudan elde edebilirler ve çoğalmaya elverişli hücrelerdir (Can, 2014). Aynı zamanda MKH'ler hasarlanan dokunun onarımında ve dokunun yenilenmesinde de önemli roller üstlenmiştir. Mezenkimal kök hücreler farklılaşma ve onarım potansiyeli özelliğiyle hücre tedavilerde tercih edilmektedir (Caplan, 2008).

Bu bilgiler ışığında sıçanlarda gebeliğin 9. gününde valproik asit ve kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulamasının fetüslerin beyin ve omuriliklerindeki etkisini, histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemlerle göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Epilepsi

Epilepsi; nöronların ara sıra gelen (paroksizmal), aşırı ve düzensiz boşalmaları ile karakterize ve beyinde birçok patolojik sürecin neden olduğu kompleks semptomlarla karakterize bir hastalıktır (Browne ve Holmes,2007).

Çok değişik sendromlar halinde, farklı etiyolojik nedenlerle ve merkezi sinir sistemindeki değişik derecede ve tipte nöron gruplarını içine alacak şekilde meydana gelmektedir (Ertekin,1987).

Etyolojisini etkileyen etkenler; metabolik, toksik, yapısal, enfeksiyöz ve inflamatuvar nedenlere bağlı olan akut santral sinir sistemi hasar nedeni ile ortaya çıkar (Osmangazi Tıp dergisi, 2016).

Sinir dokusunun ara sıra gelen, aşırı ve düzensiz boşalımı, her derecede, her yaşta, her hastalık durumunda oluşabileceği ve sayısız koşulda gelişebileceği düşünülmektedir (Zenbilci, 1985).

Nöronal membranların ateşleme eşiği, intrinsek membran-eşikdeğer-stabilize edici mekanizmaların önleme kapasitesinin altına düştüğünde nöronlarda paroksizmal boşalmalar oluşur. Bu atak bölgesel olabileceği gibi beyin diğer bölgelerine yayılım gösterebilir (Browne ve Holmes, 2007).

Epilepsi insidansı yılda 20-50/100.000, aktif epilepsi prevalansı 4-10/1000 olarak bildirilmiştir (WHO,2017).

2.1.1. Epilepsi Sendromları Uluslararası Sınıflandırılması

Tablo 1: Epilepsi sendromları uluslararası sınıflandırılması

I. Parsiyel (fokal, lokal) nöbetler	II. Jeneralize nöbetler	III. Sınıflandırılmayan epileptik nöbetler
A. Basit parsiyel nöbetler 1. Motor belirtiler olanlar 2. Duyusal belirtiler olanlar 3. Otonomik bulgu ve belirtiler olanlar 4. Psikik semptomlular B. Kompleks parsiyel nöbetler 1. Basit parsiyel başlangıç, ardından gelişen bilinç bozukluğu a) Sadece bilinç bozukluğu b) Otomatizmlerle C. Sekonder jeneralize nöbetlere dönüşen parsiyel nöbetler 1. Jeneralize nöbetlere dönen basit parsiyel nöbetler 2. Jeneralize nöbetlere dönen kompleks parsiyel nöbetler 3. Jeneralize nöbetlere dönen, kompleks parsiyel nöbetlere dönüşmüş basit parsiyel nöbetler	A. Absans (petit mal) nöbetler B. Miyoklonik nöbetler C. Tonik nöbetler D. Atonik nöbetler E. Klonik nöbetler F. Tonik-klonik (grand mal) nöbetler	

*Ref.1’den modifiye edilmiştir.

2.1.2. Epilepsi Tedavisinde Kullanılan İlaçlar ve Etki Mekanizmaları

Tablo 2: Epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçlar ve etki mekanizmaları

Anti-Epileptik İlaçlar	Etki Mekanizması
Karbamazepin (Tegretol)	A,E
Klonazepam (Rivotril)	A,B
Diazepam (Diazem)	A,B
Etosüksimid (Petimid)	C
Gabapentin (Neurontin)	B,D
Lamotrigin (Lamictal)	A,B,D
Levetirasetam	E
Okskarbazepin (Trileptal)	A
Fenobarbital	EA,B,D,E
Fenitoin (Epanutin)	A,B,D,E
Mysolin (Primidone)	A,B,D,E
Tiagabin (Gabitril)	A
Topiramat (Topamax)	A,B,E
Valproik asit (Depakin, Convulex)	A,B
Zonisamid (zonegran)	A,C

A, sodyum akımları; B, Gama-aminobütirik asit-A-reseptörleri; C, T-kalsiyum akımları; D, Glutamat reseptör antagonisti; E, bilinmeyen (Browne ve Holmes, 2007).

2.2. Valproik Asit

Kimyadaki adı sodyum dipropilasetat olan, 5-8 atomlu karbon zinciri uzunluğuna ve antiepileptik aktiviteye sahip yağ veya karboksilik asitler dizisinden biridir. Dallanma ve doymamışlık ilacın aktivitesini önemli ölçüde değiştirmezken etki süresini arttırır. Ayrıca valproik asitin amid ve esterleri de aktif antiepileptik ajanlardır (Katzung, 1998).

Karma etkili ve geniş spektrumlu bir antiepileptik olan valproik asit, anormal elektriksel uyarıların beyinde yayılmasını önler. Epilepsi nöbetlerinin çoğuna etki göstermektedir. Özellikle infatil spazmlarda jeneralize tonik-klonik nöbetlerde başarı ile kullanılmaktadır. Myoklonik nöbetlerin tedavisinde kullanılan en etkili antiepileptiktir.

Yapısal olarak merkezi sinir sisteminin ana inhibitör nöromediyatörü olan GABA'ya benzemektedir. Yüksek dozda verildiğinde GABA transaminaz (GABA-T) enzimini inhibe ederek GABA yıkımını azaltır ve sinapstaki düzeyini yükseltir (Kayaalp, 1998).

Hem voltaj bağımlı sodyum kanallarından hücreye sodyum girişini inhibe eder hem de GABAmimetik etkisiyle klorür girişini kolaylaştırır. Bu iki mekanizmaya ek olarak hücrenin polarizasyonunu artırır ve uyarılabilirliğini azaltır. GABAmimetik etkisi, voltaj bağımlı sodyum kanalları üzerine olan etkisine göre daha baskındır (Dökmeci, 2000).

Valproik asitin yaklaşık olarak %90'ı plazma proteinlerine bağlanır; %3 kadarı değişikliğe uğramadan atılır; geri kalanı karaciğerde aktif metabolitlere çevrilir. P-450 sistemi tarafından metabolize edilen valproik asit, fenobarbital metabolizmasını inhibe ederek dolaşımdaki barbitürat konsantrasyonunu arttırmaktadır (Mycek ve Ark, 1998).

2.2.1. Valproik Asitin Etki Mekanizması

Valproik asitin antiepileptik aktivitesinin zamanı, ana ilacın kan veya doku seviyeleriyle iyi korele görülmediğinden hem aktif türler hem de valproik asitin etki mekanizmasıyla ilgili önemli spekülasyonlara yol açmaktadır. Valproik asit tıpkı fenitoin ve karbamazepin gibi, terapötik olarak kültürde nöronların yüksek frekanslı tekrarlayan atışlarını devam ettirmektedir. Kısmi nöbetlere olan etkileri de sodyum akımları üzerindeki

bu etkinin bir sonucu olduğu düşünölmektedir. Aynı zamanda valproik asitin GABA üzerindeki etkilerine de dikkat edilmelidir. Yapılan alışmalar valproik asit uygulamasından sonra beyinde GABA düzeylerinin arttığını göstermiştir, ancak bu artış mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Dökmeci, 2000).

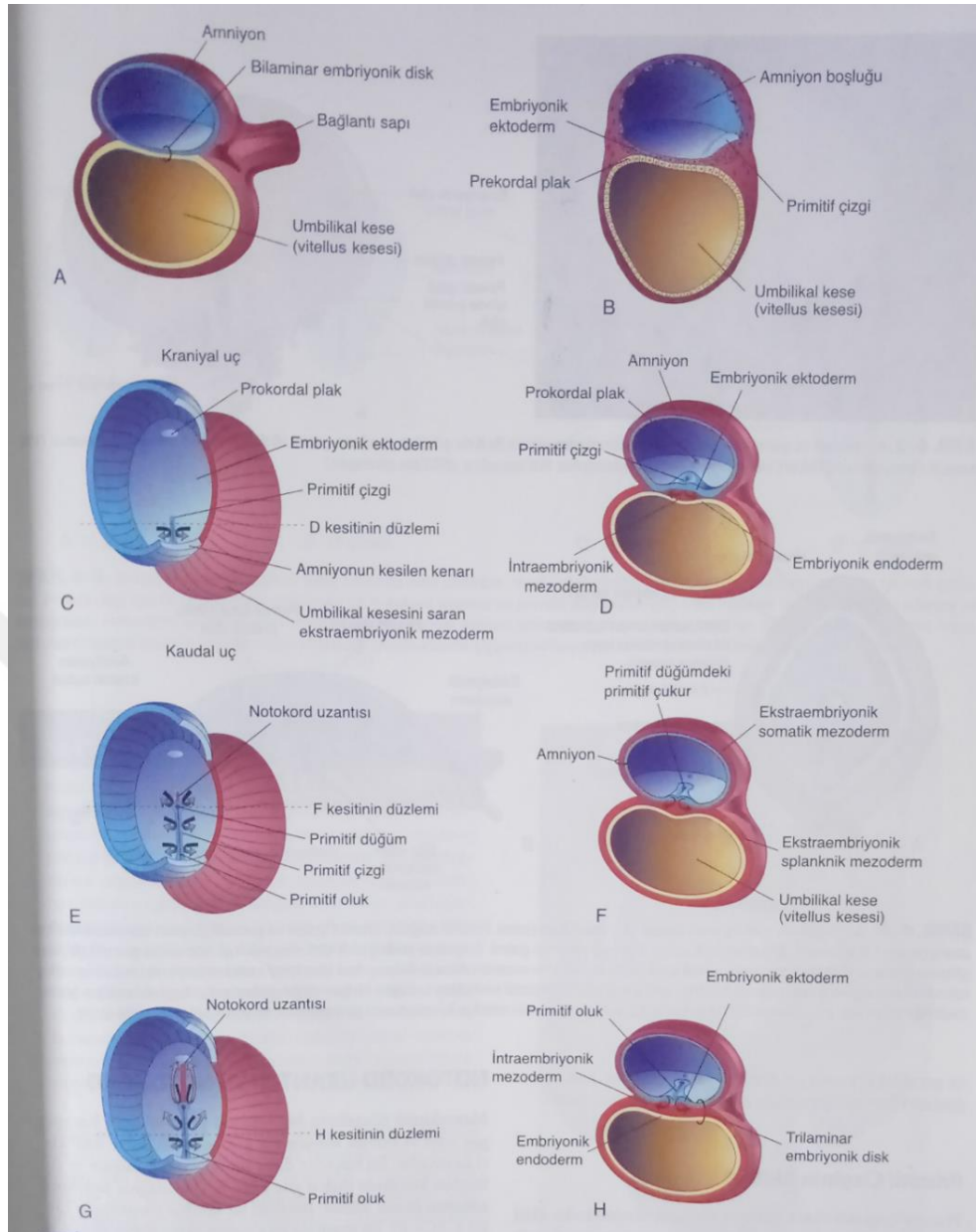
Valproik asit glutamik asit dekarboksilazı (GAD) aktif hale getirir. Yüksek konsantrasyonlarda, beyinde GABA-T yi inhibe ederek GABA'nın süksin semialdehite dönüşümünü bloke eder ve sonuç olarak GABA seviyelerini yükseltir. Ayrıca yapılan çalışmalar yüksek konsantrasyonlarda valproik asitin membran potasyum etkinliğini arttırdığı göstermiştir. Dahası, düşük valproik asit konsantrasyonu membran potansiyellerini hiperpolarize etme eğilimi göstermektedir (Katzung,1998).

2.3. Sinir Sistemi Embriyolojisi

2.3.1. Embriyonik Germ Tabakalarının Oluşumu

Tüm embriyonik dokuların kaynağı olan üç germ tabakasının şekillenme süreci gastrulasyon olarak adlandırılır ve gastrulasyon ile embriyoda aksiyal uyum tayin edilir. Bu esnada bilaminar embriyonik disk trilaminar embriyonik diske dönüşür (Moore ve Persaud, 2016).

Epiblastın yüzeyinde primitif çizginin oluşmasıyla gastrulasyon başlar. Primitif çizgi başlangıçta çok belirgin olmayıp, embriyo şekil 1'de görüldüğu gibi 15-16 günlük olduğunda iki kıyısı hafif kabarık dar bir oluk şeklinde belirgin olarak görülür (Sadler, 2011).



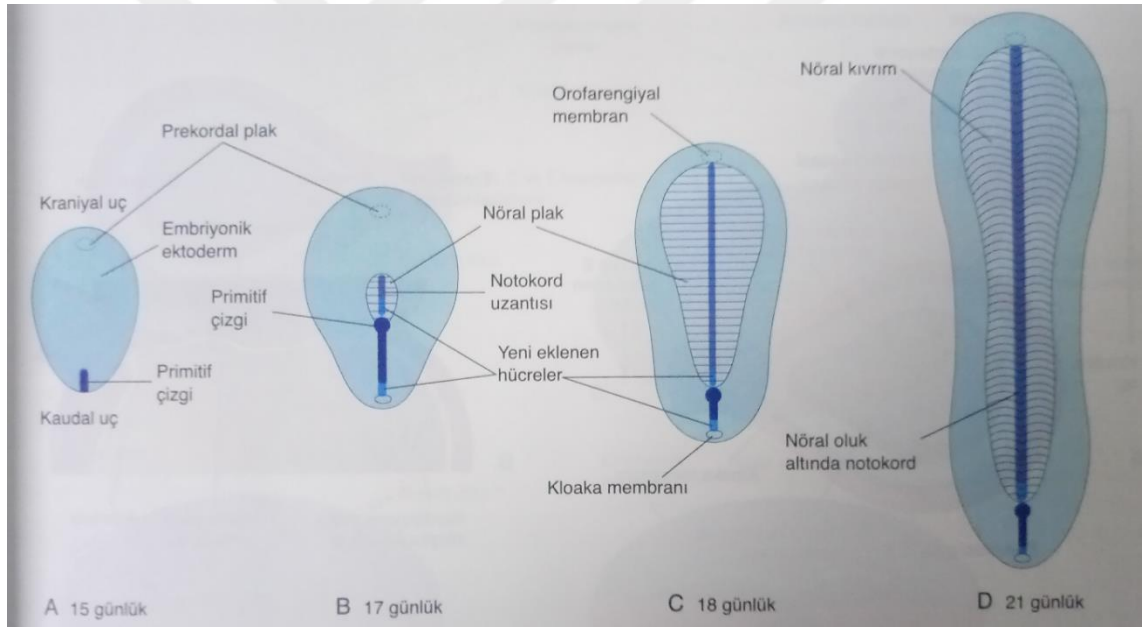
Şekil 1: Embriyonik germ tabakalarının oluşumu (Moore ve Persaude, 2016)

Epiblast hücrelerinin çoğalması ve bu hücrelerin embriyonun orta hattına göç etmesiyle primitif çizgi oluşur. Primitif çizginin kaudal ucuna hücrelerin eklenmesiyle kaudal yönde uzamaya devam ederken, kranial ucunda hücrelerin çoğalmasıyla primitif düğüm oluşur. Bu esnada primitif çizgide primitif oluk denilen dar bir oluk gelişir. Primitif oluk, primitif düğümde meydana gelen ve primitif çukur denilen bir çöküntü ile devam eder (Moore ve Persaud, 2016).

Primitif çizgi bölgesine ulaşan hücreler yassı bir şişe şeklini alır ve epiblasttan ayrılıp, primitif oluk boyunca epiblastın altına doğru kayarlar. Hücrelerin içe doğru olan bu

hareketine invajinasyon denir. Hücrelerin göç hareketi ve kendilerine has özellikler kazanmaları primitif çizgide bulunan hücrelerce yapılan fibroblast büyüme faktörü 8'in (FGF8) kontrolü altında gerçekleşir (Sadler, 2011).

Primitif çizgi şekil 2'deki gibi belirdikten hemen sonra, primitif çizginin derinlerindeki hücreler ayrılır ve az miktarda kollajen (retiküler) lifler içeren ekstrasellüler matriks içerisinde yerleşmiş küçük, iğsi hücrelerin gevşek bir şekilde dağılım gösterdiği embriyonik bağ dokusunu yani mezenkimi oluşturur. Mezenkim, vücuttaki çoğu bağ dokusu ve bezlerin bağ dokusu iskeleti gibi, embriyonun destek dokularını oluşturur. Mezenkimin bir bölümü embriyonik mezodermi meydana getiren mezoblastı oluşturur. Primitif çizgi ve primitif düğümün diğer bölümlerindeki epiblast hücreleri hipoblast arasına girerek vitellüs kesesi tavanında embriyonik endodermi meydana getirir. Embriyonik ektodermi ise epiblast tabakasında kalan hücreler oluşturur (Moore ve Persaud, 2016).

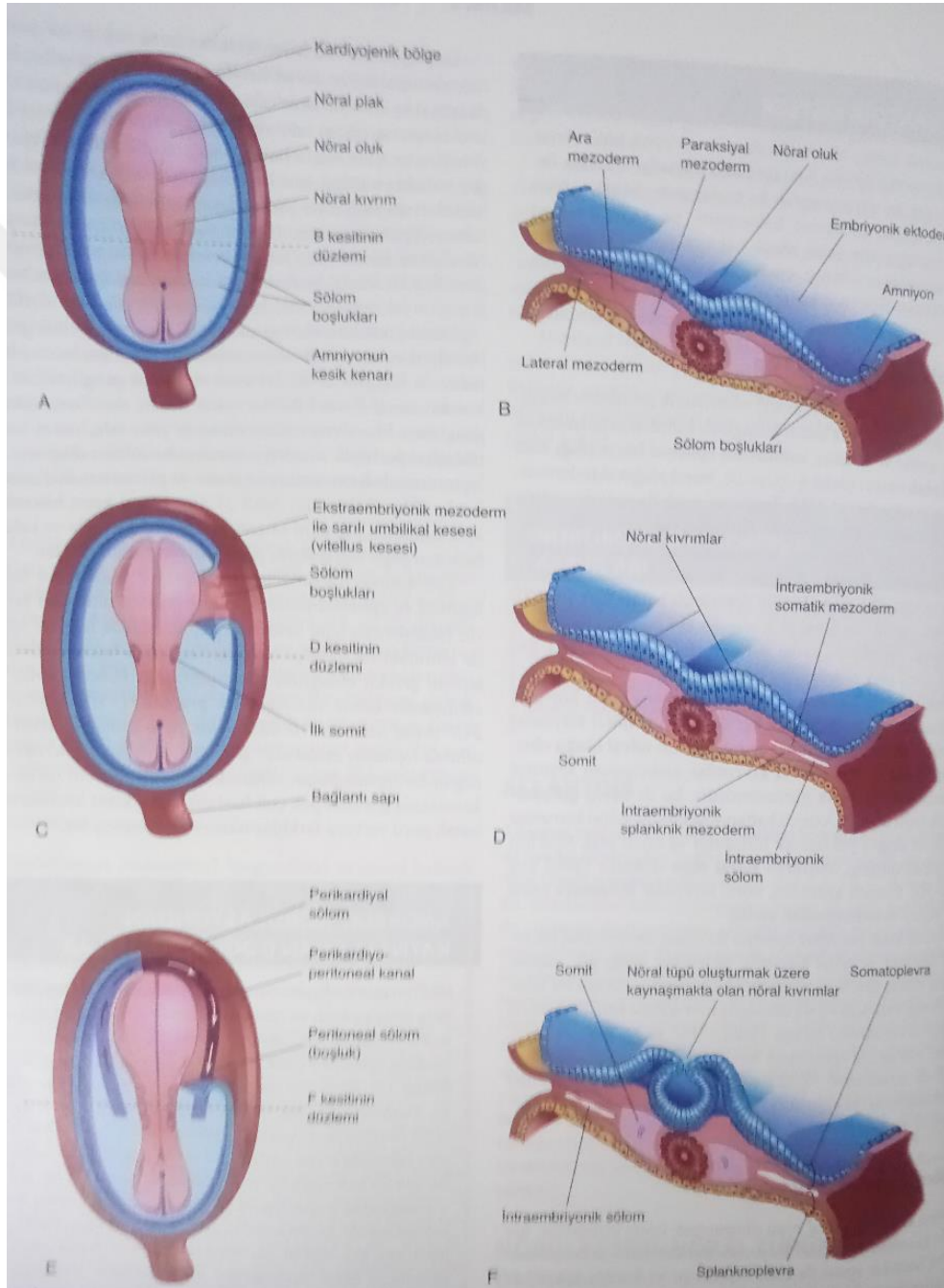


Şekil 2: Embriyonik diskin üçüncü hafta boyunca uzaması (Moore ve Persaude, 2016)

Gastrulasyon boyunca gelişimin daha sonraki aşamalarında embriyonun tüm doku ve organlarının gelişeceği üç germ yaprağının (ektoderm, mezoderm ve endoderm) kaynağı epiblasttır. Epiblast ve hipoblast tabakaları arasına giren hücrelerin sayısı arttıkça, bu hücreler sefalik ve lateral yönler doğru göç etmeye başlarlar. Zamanla hücreler embriyonik diskin sınırlarını aşarak, yolk kesesi ve amniyon boşluğunu örten ekstraembriyonik mezodermle temas kurar (Sadler, 2011).

2.3.2. Notokord Oluşumu

Mezenkimal hücreler bir kısmı primitif çizgi boyunca göç eder ve mezodermal hücre özelliği kazanırlar. Bu mezodermal hücreler daha sonra primitif düğüm ve primitif çukurdan kraniyale doğru göç eder ve orta çizgide şekil 3'te görüldüğü üzere notokord uzantısını oluşturur. Bu uzantıda bir lümen oluşur ve notokord kanalı adını alır (Moore ve Persaud, 2016).



Şekil 3: Notokord oluşumu (Moore ve Persaud, 2016)

Hipoblast yerini primitif çizgi boyunca iç tarafa doğru hareket eden endoderm hücrelerine bırakır ve notokordal plağın hücreleri de çoğalıp endodermden ayrılırlar. Bunlar daha sonra nöral tüpün altını döşeyen ve aksiyal iskeletin tabanını oluşturacak olan nihai notokordu oluştururlar. Notokordun uzaması dinamik bir süreç olduğu için, önce kranial uç oluşur ve kaudal bölgeler de primitif çizgi daha kaudal bir pozisyon kazandıkça yapıya eklenir. Notokord ve prenotokordal hücreler prekordal plağa doğru kranial yönde, primitif çukura doğru kaudal yönde uzanırlar (Sadler, 2011).

Prekordal plak, gelecekte ağız boşluğunun meydana geleceği bölgede yerleşik olan orofaringiyal membranın endodermine kaynak olur. Prekordal plak ön beyin ve gözleri içeren kranial yapıların gelişiminin kontrolünü sağlayan bir sinyal merkezi (Shh ve PAX6) olarak görev yapar. Primitif çizgi ve notokord uzantısında bulunan mezenkimal hücreler embriyonik diskin sınırlarına ulaşır. Endoderm ve ektoderm hücreleri arasında kranial ve lateral yönde mezodermal hücrelerin arasına göç eder. Bu hücreler amniyon kesesi ve vitellüs kesesini saran ekstraembriyonik mezoderm ile devam eder (Moore ve Persaud, 2016).

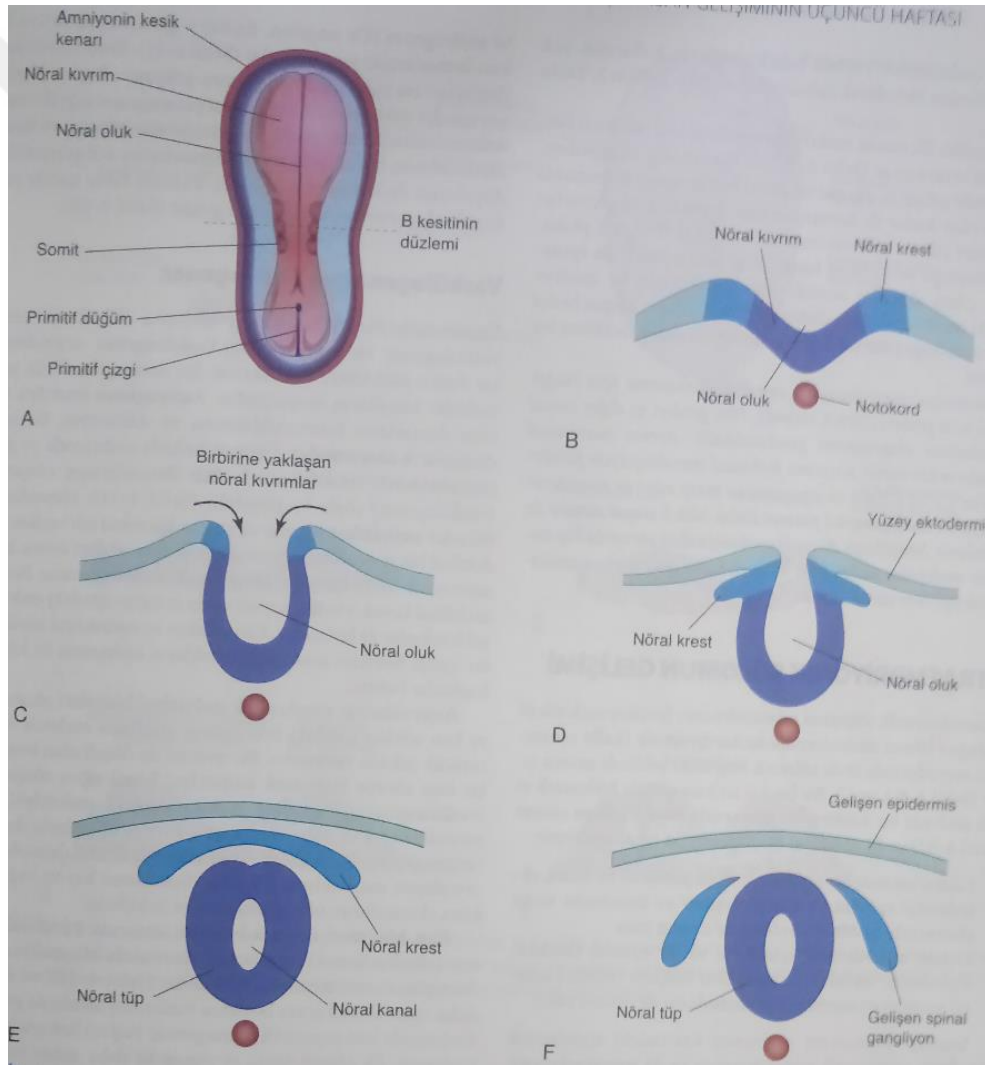
Primitif çukurun epiblasta girinti yaptığı yerde nöroenterik kanal geçici bir süre yolk kesesi ile amniyon boşluğunu birbirine bağlar. Embriyonik diskin kaudal ucunda kloakal membran oluşur. Bu esnada, yolk kesesinin arka duvarında bağlantı sapının içine uzanan küçük bir divertikül belirir. Gelişimin 16. gününde oluşan bu divertiküle allantois veya allantoenterik divertikül adı verilir (Sadler, 2011).

İntervertebral disklerin yapısına katılan notokord; embriyonun primordiyal longitudinal eksenini tayin eder ve embriyoya sertlik verir. Merkezi sinir sisteminin ve kas, iskelet yapılarının gelişimi için gerekli olan sinyallerin oluşmasını sağlar. Nöroenterik kanal notokordun gelişimi tamamlandığında kapanır. Notokord, vitellüs kesesinin endoderminden ayrılmasıyla endoderm tekrar sürekli bir tabaka haline gelir. Vertebraların gövdeleri oluşukça notokord dejenere olur, intervertebral disklerin nukleus pulpozusu içinde varlığını sürdürür. Gelişen notokord, üzerinde uzanan embriyonik ektodermin kalınlaşmasını ve merkezi sinir sisteminin primordiyumu olan nöral plağın oluşumunu uyarır (Moore ve Persaud, 2016).

2.3.3. Nörolasyon ve Nöral Tüp Oluşumu

Nöral plağın ve nöral kıvrımların oluşumu, bu nöral kıvrımların birleşerek nöral tüpü oluşturması nörolasyon esnasında şekil 4'te meydana gelen olaylardır. Dördüncü haftanın sonunda kaudal nöroporun kapanması ile bu olaylar tamamlanır (Moore ve Persaud, 2016).

Bu süreç nöral plağın nöral tüpe dönüşme sürecidir. Üçüncü haftanın sonunda, nöral plağın lateral kenarları yükselerek nöral katlantıları oluşturur; bu nöral katlantıların arasında uzanan çukura nöral oluk denir. Nöral katlantılar zamanla orta hat boyunca birbirlerine yaklaşıp kaynaşırlar. Kaynaşma servikal bölgede beşinci somit hizasında başlayıp, kranial ve kaudal yönde devam eder ve nöral tüp oluşur (Sadler, 2011).



Şekil 4: Nöral oluk ve nöral tüp oluşumu (Sadler, 2011)

Notokord gelişirken üzerindeki embriyonik ektodermi kalınlaşma oluşturmak için uyarır ve uzamış, kalınlaşmış epitelyal hücre plağı olan nöral plak meydana gelir. Merkezi

sinir sistemi, beyin ve omurilik nöral plağın ektoderminden (nöroektoderm) gelişir. Notokord uzadıkça nöral plak genişler, kranial yönde orofarengiyal membrana kadar ilerler ve nihayetinde nöral plak notokordun ötesine uzanır (Moore ve Persaud, 2016).

Nöral tüpün sefalik ve kaudal uçları kaynaşma tamamlanana kadar amniyon boşluğuyla sırasıyla kranial ve kaudal nöroporlar yoluyla ilişkilerini sürdürürler. Kranial nöropor yaklaşık yirmibeşinci günde (18-20 somit evresi), posterior nöroporda yirmisekizinci günde (25 somit evresi) kapanır. Nöroporların kapanmasıyla nörolasyon tamamlanır. Merkezi sinir sistemi artık, dar bir kaudal kısım, omurilik ve içinde birkaç dilatasyonunun, beyin keseciklerinin bulunduğu daha geniş bir sefalik parçadan ibaret kapalı tübüler bir yapı ile temsil edilir (Sadler, 2011).

2.3.4. Nöral Krest Oluşumu

Nöral tüpü oluşturmak üzere nöral kıvrımlar birleştikçe, her bir kıvrımın iç kenarı boyunca uzanan bazı nöroektodermal hücreler epitel ile olan ilişkilerini ve komşu hücrelerle olan bağlantılarını kaybederler. Nöral tüp yüzey ektoderminden ayrıldıkça, nöral krest hücreleri nöral tüp ile üzerinde uzanan ektodermi arasında nöral krest adı verilen düzensiz ve yassılaştırmış bir kitle oluşturur. Wnt/ β -catenin uyarısı ile nöral krestin gelişimi için önemli role sahip Gbx2 homeobox geni aktif hale gelir (Moore ve Persaud, 2016).

Nöral krest adı verilen bu hücre topluluğu, aktif migrasyonla nöroektodermi terk ederek altlarında bulunan mezodermin içine doğru göç ederlerken epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal hücrelere dönüşürler. Nöroektodermin gövdesinde bulunan nöral krest hücreleri dorsal ve ventral yol olmak üzere iki yolu izleyerek çeşitli hücreleri oluştururlar. Aynı zamanda nöral krest hücreleri, nöral tüp kapanmadan önce nöral tüpü terk ederek kranial nöral katlantılardan da göç ederler. Bu hücreler baş ve yüz kemiklerinin, glial hücrelerin, kranial ganglion nöronlarının ve melanositlerin ve diğer hücre tiplerinin oluşumuna katılırlar (Sadler, 2011).

Nöral plağın sınırlarının belirlenmesi ve epitelyal-mezenkimal değişimin oluşacağı yerlerin belirlenmesi için, hem yüzey epiteli hem de epitel ile altındaki mezoderm hücreleri arasında hücre etkileşiminin gerçekleşmesi gerekir. Hücreler arası bu etkileşimler Wnt, Notch, FGF sinyal proteinleri ve kemik morfogenezik proteinleri ile düzenlenir. Ayrıca efrin adı altında toplanan moleküller göç eden nöral krest hücrelerinin yönlendirilmesinde önemli

bir rol oynar. İnsanlarda görülen birçok hastalık nöral krest hücrelerinin hatalı göçü ve/veya farklılaşması sonucu meydana gelmektedir (Moore ve Persaud, 2016).

2.3.5. Somitlerin Gelişimi

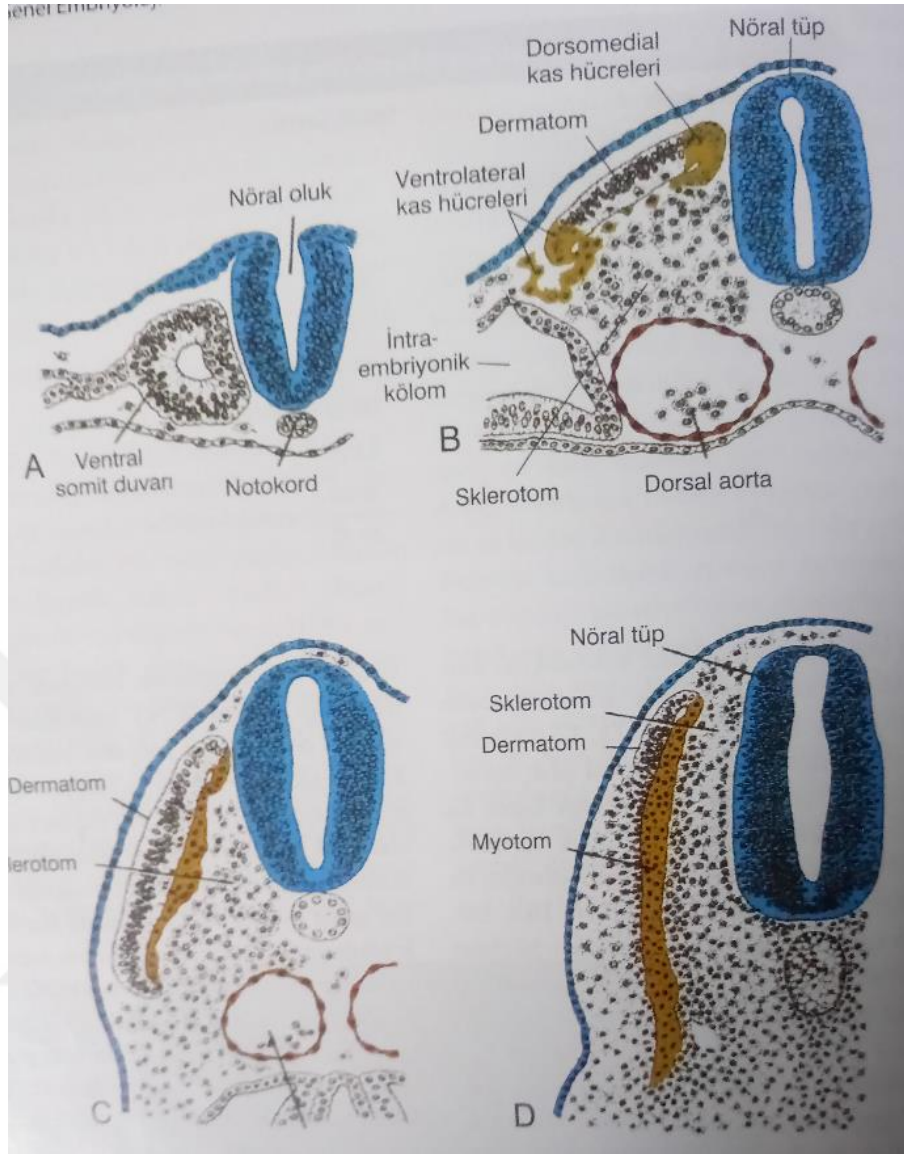
Başlangıçta orta hattın her iki tarafında ince ve gevşek bir doku halinde bulunan mezodermal germ tabakasının hücreleri, yaklaşık 17. günde orta hatta yakın bölgelerde çoğalarak paraksiyel mezodermi oluştururlar. Mezodermal tabakanın lateral kısımda inceliğini korumaya devam eden bölümüne lateral plak adı verilir. Hücreler arasındaki boşlukların belirmesi ve bu boşlukların daha sonra birleşmesiyle lateral plak iki tabakaya bölünür; amniyonu örten mezodermle devam eden somatik ya da pariyetal mezoderm tabakası ve yolk kesesini örten mezodermle devam eden splanknik ya da visseral mezoderm tabaka.

Bu iki tabaka birlikte embriyonun her iki yanında ekstra embriyonik boşlukla devamlılık gösteren intraembriyonik boşluğu çevreleyip paraksiyel mezoderm ve lateral plaklar birbirine şekil 5'te intermedier mezoderm ile bağlanır (Sadler,2011).

Üçüncü haftanın sonuna doğru paraksiyel mezodermden farklılaşıp yoğunlaşarak krania-kaudal olarak sırası ile somit adı verilen kübik cisim çiftlerine bölünmeye başlar. Gelişmekte olan nöral tüpün her iki yanında bu mezoderm blokları yer almaktadır.

İnsan gelişiminin somit evresi sırasında (20-33. gün) yaklaşık 38 çift somit meydana gelir; 5. Haftanın sonuna gelindiğinde 42-44 çift somit bulunur. Somitler 4. ve 5. haftalarda çok belirgin oldukları için embriyonun yaşının belirlenmesinde başvurulan ölçütlerden biridir (Moore ve Persaud, 2016).

Somit çiftlerinin dördü oksipital, sekizi servikal, on ikisi torasik, beşi lumbal, beşi sakral, sekiz-onu ise koksigealdir. Bir süre sonra birinci oksipital ve son 5-7 koksigeal somitler kaybolur. Kalan somitler embriyonun aksiyal iskeletini oluşturmaktadır. (Sadler, 2011).



Şekil 5: Somitlerin gelişimi (Sadler, 2011)

2.3.6. Somitlerin Farklanması

Presomitik mezodermden oluşan somitler başlangıçta fibroblast benzeri mezodermal bir hücre yumağı halinde olup bu hücreler bir süre sonra bir epitelizeasyon sürecine girerler. Dördüncü haftanın başında somitlerin ventral ve mediyal duvarlarında bulunan hücreler epitelyal özelliklerini kaybederek tekrar mezenkimal hücreler haline gelip, nöral tüp ve notokordu çevrelemek üzere yer değiştirip, vertebra ve kaburgalara farklılaşacak olan sklerotomu oluştururlar. Somitin yukarı bölgelerinin dorsomediyal ve ventrolateral kenarındaki hücreler kas hücrelerinin öncüllerini oluştururken bu iki grup arasındaki hücrelerde dermatomu oluştururlar. Bu öncül kas grubuna ait hücreler yeniden mezenkimal özellik kazandıktan sonra dermatomun altına göç ederek dermamyotomu oluştururlar.

Her myotom ve dermatom invazyonunu (sinir donanımı) hücreler nereye göç etmiş olursa olsunlar köken aldığı segmentten alır ve böylece her somit kendi skleretomunu, kendi miyotomunu ve kendi dermatomunu meydana getirir (Sadler, 2011).

2.4. Anormal Nörulasyon Sonucu Embriyoda Meydana Gelen Defektler

Merkezi sinir sisteminin primordiyumunu meydana getiren nöral plak üçüncü haftada oluştuğu ve nöral kıvrımlar ve nöral tüpün oluşumunu başlattığından, nörulasyon sırasında meydana gelen bozukluklar beyinde anensefali ve omurilikte spina bifida, myelomeningosel gibi nöral tüp defektleri, ayrıca kol ve bacak malformasyonları, dudak yarığı, kardiyovasküler malformasyonlar ve fasiyel dismorfizm gibi ciddi anomalilere neden olabilir (Moore ve Persaud, 2016).

2.4.1. Nöral Tüp Defektleri

Nöral tüpün kapanmaması sonucunda meydana gelen meninksleri, vertebraları, kasları ve deriyi de kapsayabilen anomalilere nöral tüp defektleri denir (Sadler, 2011). Nöral tüp defektleri en sık görülen konjenital anomaliler arasındadır (Moore ve Persaud, 2016).

Nöral tüpün servikal bölgenin kaudalinde kapanmaması sonucu ortaya çıkan defekte spina bifida denir. Şekil 6'da görülen spina bifida kapanma sürecinde genetik ve/veya çevresel etmenlere karşı en duyarlı bölge olan lumbosakral bölgede meydana gelmektedir.



Şekil 6: Nöral tüpün kapanmaması sonucu meydana gelen spina bifida (Sadler, 2011)

Nöral tüpün kranial bölgede kapanmaması sonucunda şekil 7’de görüldüğü gibi beynin önemli bir bölümü oluşamaz ve bu defekte anensefali denir. Anensefali ölümcül bir defekt olmakla birlikte olguların çoğu prenatal dönemde saptanabilir ve gebelik sonlandırılabilir (Sadler, 2011).



Şekil 7: Kranial bölgede kapanmama sonucu oluşan anensefali (Sadler, 2011)

Embriyonun kıvrılması sırasında nöral plakta zorlanmaya sebep olan fleksiyon derecesini etkileyen lezyonlara bağlı olarak nöral tüp defektleri oluşabilir. Spina bfidalı çocuklarda ise, lezyonun omuriliğin hangi düzeyinde ve defektin derecesine bağlı olarak bazı nörolojik fonksiyon kayıpları söz konusudur. Nöral tüp defektinin görülme sıklığı bölgelere göre değişir ve bu değişkenlik çeşitli genetik ve çevresel faktörlere bağlıdır. Bu defektlerin %70’i gebelik başlamadan 3 aylık süre ve gebelik boyunca günde 400 µg folik asit kullanımıyla büyük oranda önlenabilir (Moore ve Persaud, 2016).

2.5. Merkezi Sinir Sistemi

2.5.1. Merkezi Sinir Sisteminin Organizasyonu

Merkezi sinir sistemi (MSS), kranial kavitede bulunan beyin ve vertebral kanal içerisinde bulunan omurilikten meydana gelir. MSS, kafatası ve vertebralar tarafından korunur ve meninks adı verilen üç bağ dokusu membranıyla sarılır. Beyin ve omurilik iç iki meningeal katman arasında bulunan beyin omurilik sıvısı (BOS) içinde yüzer. Beyin (Cerebrum); beyincik (Cerebellum) ve omurilikle (Medulla spinalis) birleşen beyin sapı alt bölümlerinde ayrılır (Ross ve Pawlina, 2014).

Alınan kesitlerde beyin, beyincik ve omurilikte beyaz (ak madde/cevher) ve gri (gri madde/cevher) kısımlar görülür. Bu farklılık, miyelinin MSS'deki dağılımının farklı olması sonucu oluşur (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.5.2. Beynin Yapısı

Beyinde gri madde (cevher) dış katmanı (korteksi), beyaz madde ise iç merkezi kısmı (medullayı) meydana getirir. Beynin en dış katmanını oluşturan serebral korteks, sinapsların bulunduğu bölge olmakla birlikte sinir hücre gövdelerini, aksonları, dendritleri ve merkezi gliyal hücreleri içerir. Kortekse ek olarak, beyin ve beyinciğin derin kısımlarında bulunan gri cevher adacıklarına çekirdek (nukleus) adı verilir (Ross ve Pawlina, 2014).

Beyin korteksinde gri cevher, farklı boy ve şekillerde hücrelerden oluşan altı tabaka oluşturur ve beyin korteksinde bazı bölgelerde bulunan nöronlar (duyusal) getirici uyarılara yöneliktir; başka bölgelerde götürücü (motor) nöronlar istemli hareketleri kontrol eden motor uyarıları oluşturur. Beyincik korteksinde dışta moleküler tabaka, ortada purkinje hücrelerinden oluşan bir tabaka ve içte granüler tabaka olmak üzere üç tabaka bulunur. Purkinje hücrelerinin hücre gövdesi belirgindir ve dendritleri bir yelpaze görüntüsü oluşturacak şekilde çok gelişmiştir. Bu dendritler büyük ölçüde moleküler tabakayı doldurur ve moleküler tabakada çekirdeklerin seyrek olmasının sebebi budur. Granüler tabaka oldukça küçük nöronlardan oluşur (vücuttaki en küçük hücreler), bu nöronlar hücre yoğunluğu daha az olan moleküler tabakanın tersine daha düzenli bir görünüme sahiptir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Gri cevher ile ilişkili aksonal, dendritik ve gliyal uzantı ağı nöropil olarak adlandırılır ve nöropilin organizasyonu Luxol fast blue-PAS metodu ile gözlemlenebilir. Beyaz cevher sadece sinir hücrelerinin aksonlarını, aksonlarla ilişkili gliyal hücrelerini ve kan damarlarını içerir. Bu aksonlar özel bir bölgeden gelen ya da özel bir bölgeye giden, fonksiyonel olarak ilişkili demetler halinde gruplanarak traktus adını alır (Ross ve Pawlina, 2014).

2.5.2.1. Glia hücreleri

Glial hücrelerin sayısı memelilerin beyinde nöronlardan on kat daha fazladır; nöronların aralarında yerleşerek hem sinir hücrelerinin gövdesini hem de akson ve dendrit uzantılarını sararak nöron etkinliği için gereken mikroçevreyi sağlar (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Glial hücreler sadece mekanik olarak desteklik sağlayan hücreler değil, aynı zamanda sinir hücrelerine iletişimsel işlevlerini yerine getirmelerine yardımcı olan metabolik olarak aktif elementlerdir (Fawcett, 1994).

Merkezi sinir sistemine ait (a) Astrositler, (b) Oligodendrositler, (c) Mikroglialar, (d) Ependim hücreleri olmak üzere dört tip glial hücre (nöroglia) bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

2.5.2.1.1. Astrositler

Astrositler, çok sayıda bulunan uzantılara sahip yıldız şeklindeki hücrelerdir ve merkezi sinir sistemi nöronlarına fiziksel ve metabolit desteklik sağlarlar. Nöronları kılcal kan damarlarına ve pia mater'e bağlar (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Astrositler merkezi sinir sisteminde homeostazinin sağlanmasında önemli role sahiptir (Fawcett, 1994).

Astrositler, destekleme işlevine ek olarak nöronların iyonik ve kimyasal ortamını kontrol eder (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Potasyum iyonları (K), glutamat ve GABA artmış nöronal aktivitenin sonucu olarak ekstraselüler boşlukta birikir. Ekstraselüler boşlukta artan bu maddeler astrositlerce temizlendiği düşünülmektedir. Astrositler, glia hücreleri içerisinde sayıca en fazla bulunanıdır; morfolojik ve fonksiyonel olarak kendine özgü farklılıklar gösterir (Fawcett, 1994).

2.5.2.1.1.1. Fibröz astrositler

Beynin beyaz cevherinde daha fazla bulunan ve az sayıda, uzun, düz uzantılara sahip astrositlere denmektedir (Ross ve Pawlina, 2014).

2.5.2.1.1.2. Protoplazmik astrositler

Beynin gri cevherinde daha fazla bulunan ve çok sayıda kısa dallanmalar gösteren uzantılara sahip astrositlere denmektedir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.5.2.1.1.2. Oligodendrositler

Merkezi sinir sisteminde nöronların elektriksel yalıtımını sağlayan miyelin kılıfın oluşturulmasından sorumlu olan hücrelerdir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Miyelin kılıf, oligodendrosit plazma membranının konsantrik tabakaları tarafından oluşturulur. Astrositlerle karşılaştırıldığında daha az uzantıları olan ve sıklıkla aksonların arasında yer alan küçük hücrelerdir. Tek bir oligodendrositin uzantıları bir aksonu ya da yakın çevredeki birkaç aksonu miyelinize edebilir (Ross ve Pawlina, 2014).

2.5.2.1.1.3. Ependim hücreleri

Beyin ventriküllerini ve omurilik orta kanalını (santral kanal-canal centralis) döşeyen prizmatik epitel hücrelerdir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Tipik epitelden farklı olarak eksternal lamina ependim hücrelerinde bulunmaz. Bu hücrelerin apikal yüzeylerinde bulunan silya ve mikrovilluslarca serebrospinal sıvının hareketi ve emilimi sağlanır. Ependim hücreleri beyin ventrikül sistemi içinde, komşu kapiller halkalarından kaynaklanan materyallerin taşınmasını ve sekresyonunu yaparak serebrospinal sıvıyı üretmek üzere ileri bir modifikasyona uğramıştır. Bu modifiye ependimal hücreler ve bu hücrelerle ilişkili kapillerlere koroid pleksus adı verilir (Ross ve Pawlina, 2014).

2.5.2.1.1.4. Mikroglialar

Mikroglialar, merkezi sinir sistemi boyunca dağılmış küçük hücrelerdir. Oligodendrositlerle benzerlik gösterirler ancak oligodendrositlerden daha küçük ve daha koyu renktedirler (Fawcett, 1994).

Yetişkinde MSS'de glial hücrelerin yaklaşık %5'ini oluşturan fagositik hücrelerdir. Mikroglialar hasar ve/veya hastalık bölgelerinde proliferasyon olarak aktif fagositotik hale gelirler. Bu hücrelere reaktif mikroglial hücreler denir. Mikroglialar mononükleer

fagositik sistemin üyesi olarak kabul edilir ve granulosit/monosit progenitör hücrelerinden (GMP) köken alırlar (Ross ve Pawlina, 2014).

Erişkin MSS'de inflamasyon ve onarımda görevlidirler. Mikroglialar etkinleştiklerinde uzantılarını geri çeker ve makrofajların morfolojik görünümüne bürünerek, fagositik ve antijen sunan hücreler olarak davranırlar. Bağışıklığı düzenleyici sitokinler salgırlar ve MSS lezyonlarının yol açtığı hücrel artıkları uzaklaştırırlar (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.5.3. Omuriliğin Yapısı

Omurilik, direkt olarak beyin sapı ile devamlılık gösteren yassı ve silindirik bir yapıdır. 31 segmente bölünmüştür (8 servikal, 12 torasik, 5 lomber, 5 sakral ve 1 koksigeal) ve her segment 1 çift spinal sinir ile bağlantılıdır. Her spinal sinir, omurilikteki segmentine posterior (dorsal) ya da anterior (ventral) kökler halinde gruplaşmış birkaç kökçük ile bağlanmıştır (Ross ve Pawlina, 2014).

Omurilikten enine kesit alındığında ak cevher periferde, gri cevher ise H harfini andıracak şekilde merkezde yer alır. Bu H harfinin yatay çizgisinde bir açıklık bulunur, burası merkez kanalıdır (Canalis centralis-santral kanal), bu yapı embriyonal nöral tüp lümeninin kalıntısıdır. Bu merkez kanalı ependim hücreleri döşer. H harfinin bacaklarında bulunan gri cevher, ön boynuzları oluşturur ve burada spinal sinirlerin ventral köklerini yapan aksonlara sahip olan motor nöronları içerir. Gri cevher aynı zamanda arka boynuzları oluşturur, burası da spinal gangliyonlardaki nöronlardan duysal lifleri içerir. Omurilikteki, özellikle de büyük motor nöronların yer aldığı ön boynuzlardaki nöronlar büyük ve çok kutupludur (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Gri cevher nöronal hücre gövdelerini, aksonlarla birlikte dendritleri ve merkezi nöroglıyı içerir. Gri cevherin içindeki nöron hücre gövdelerinin (perikaryon) oluşturduğu fonksiyonel olarak ilişkili gruplara çekirdek (nukleus) adı verilir. Burada, çekirdek terimi bir grup nöronal hücre gövdesi artı lifler ve nöroglıya anlamına gelir. Merkezi sinir sistemi çekirdekleri, periferik sinir sistemindeki (PSS) gangliyonların morfolojik ve fonksiyonel olarak eş değeridir. Sinapslar sadece gri cevherde bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014).

2.5.4. Merkezi Sinir Sistemi Histolojisi

Merkezi sinir sistemi kafatası ve omurga tarafından korunur (Junqueira ve Carneiro, 2006). Aynı zamanda beyin ve omurilik ardışık üç bağ dokusu membranı (meninksler); dura mater, araknoid ve pia mater sarar (Ross ve Pawlina, 2014).

2.5.4.1. Meninksler

2.5.4.1.1. Dura mater

Spinal dura ve beyin çevresindeki kemik dokusu ile olan ilişkileri farklılık gösterir. Vertebral kanalın iç yüzeyi kendi çevresel bağ dokusu tabakası ile sarılır ve ayrı bir silindirik dural membran omuriliği gevşek biçimde sarar. Periost ve dura arasındaki epidural boşluk gevşek bağ dokusu, yağ hücreleri ve epidural venöz plexus içerir. Dura'nın iç yüzeyi mezenchim kökenli yassı hücrelerle kaplıdır ve her bir yanı omurilik sıkıca bağlı dentikül ligamentlerle örtülüdür. Genellikle dural kollagen lifler longitudinaldir ve serebral dura'dan daha az elastik lif içerir (Fawcett, 1994).

Dura mater en dıştaki tabakadır (meninks) ve kafatasının periosteumu ile devam eder. Dura mater ince bir dura altı aralıkla araknoidden ayrılır (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Dura mater'in iç yüzeyindeki yaprak benzeri uzantılar beyin bölümleri arasında bölmeler oluşturarak kraniyal kavite içerisindeki bölümleri destekler ve araknoidi beyin bazı derin kısımlarına taşırlar. Spinal kanalda vertebraların kendine ait periostları vardır ve dura mater omurilik saran ayrı bir tüp oluşturur (Ross ve Pawlina, 2014).

2.5.4.1.2. Araknoid

Araknoid, dura'nın iç yüzüne komşu olan ince bir bağ dokusu yaprağıdır (Ross ve Pawlina, 2014). Araknoidin; dura materle temas halinde olan tabaka ve pia mater ile bu tabakayı birbirine tutturarak trabekül sistemi olmak üzere iki temel bileşeni vardır. Trabeküller arasındaki boşluklar serebrospinal sıvı ile dolu araknoid altı aralığı oluşturur. Bu aralık, dura altı aralıktan tamamen ayrıdır ve merkezi sinir sistemini travmadan koruyan hidrolik bir yastık oluşturur. Beyin ventrikülleri ile bağlantı olan araknoid, kan damarı

içermeyen bağ dokusundan oluşur. Yüzey kısmı dura materi örten epitelle aynı tip yassı epitelle örtülüdür (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.5.4.1.3. Pia mater

Pia mater direkt olarak beyin ve omurilikin yüzeyinde yer alan ince bir bağ dokusu tabakasıdır ve beyin ve omurilikun kan damarlarının perivasküler bağ dokusu kılıfıyla devamlılık gösterir. Araknoidin her iki yüzeyi, pia materin iç yüzeyi ve trabeküller ince yassı bir epitel tabakası ile sarılır. Araknoid ve pia mater, kranial ve spinal sinirlerin dura materden çıktıkları açıklıkların etrafında kaynaşırlar (Ross ve Pawlina, 2014).

Kan damarları pia materle örtülü tüneller boyunca merkezi sinir sistemine girerler ve bu tünellere damar çevresi aralığı adı verilir. Kan damarları kılcal damara dönüşmeden önce pia mater kaybolur (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.5.4.2. Koroid pleksus ve beyin-omurilik sıvısı/serebrospinal sıvı

Koroid pleksus ventriküllerin iç kısmına sokulan pia materin, genişlemiş pencerelere sahip kılcal kan damarlarından zengin girintili çıkıntılı katlanmalarıyla meydana gelir. Üçüncü ve dördüncü ventriküllerin tavanında ve yan ventrikül duvarının bir kısmında bulunur. Koroid pleksus pia materin gevşek bağ dokusundan oluşur. Temel görevi çok az miktarda katı madde içeren ve ventrikülleri, omurilik merkez kanalını, araknoid altı aralığı ve damar çevresi aralığını tamamen dolduran serebrospinal sıvıyı (beyin omurilik sıvısı) yapmaktır. Ayrıca merkezi sinir sistemi metabolizmasında önemli bir rol almakla beraber mekanik darbelere karşı koruyucu işlev görmektedir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Serebrospinal sıvı berrak, düşük yoğunlukta (1004-1008 g/ml) ve protein içeriği çok az olan bir sıvıdır (Fawcett, 1994). Serebrospinal sıvı araknoid altı aralığa girdiği yerden itibaren ventriküller içinde dolaşır. Buradaki araknoid villuslar beyin omurilik sıvısının venöz dolaşıma geri emiliminde görevlidir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.6. Merkezi Sinir Sistemi Embriyolojisi

2.6.1. Omuriliğin Gelişimi

Kapanan nöral tüpün duvarı nöroepitelyal hücrelerden oluşur. Bu nöroepitelyal hücreler, duvarın tüm kalınlığı boyunca ilerleyerek kalın bir yalancı çok katlı silindirik epitel oluştururlar (Sadler, 2011).

Bu nöroepitel hücreleri, ventriküler tabakayı (ependimal tabaka) meydana getirirler ve buradan medulla spinalis'teki bütün nöronlar ve makroglial hücreler (astrositler ve oligodendrositler gibi nöroglial hücrelerin büyük olanları) oluşur. Nöroepitel hücrelerinin dış kısımlarından meydana gelen marginal tabaka kısa zamanda belirgin hale gelmektedir. Bu bölge zamanla medulla spinalisten, spinal gangliyon ve beyinden gelen sinir hücrelerinin aksonlarından medulla spinalis'in ak cevheri meydana gelir. Ventriküler tabakada bulunan bazı nöroepitel hücreleri, nöroblast adı verilen primordiyal nöronlara farklılaşırlar ve hücreler, ventriküler ve marginal tabakalar arasındaki intermediyer tabaka'yı (manto tabakası) oluştururlar (Moore ve Persaude, 2016).

Nöroblastlar, uzantılarının gelişmesiyle beraber nöronlara dönüşürler. Nöroepitel hücreleri, nöroblastları oluşturduktan sonra merkezi sinir sisteminin primordiyal destek hücreleri olan gliyoblastlara (spongiyoblastlara) farklılaşırlar ve gliyoblastlar, ventriküler tabakadan manto tabakasına göç ederler. Bazı gliyoblastlar, astroblastlara ve astroblastlar da oligodendrositlere farklılaşırlar. Nöroepitel hücreleri, nöroblastları ve gliyoblastları oluşturur ve medulla spinalis'in santral kanalını döşeyen ependimal hücrelere dönüşürler (Sadler, 2011).

Ak cevher ve gri cevher içinde dağılmış olan mikroglia hücreleri mezenkimal hücrelerden kökenlenirler ve fetal dönemin daha geç evrelerinde özellikle kan damarlarının görülmesiyle beraber merkezi sinir sistemine yayılırlar. Mikroglia hücreleri, kemik iliğinden kökenlenen ve mononükleer fagositer sisteme ait olan hücrelerdir. Nöroepitel hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması medulla spinaliste kalın duvarları, ince tavanı ve taban plağı oluşturur. Medulla spinalis'in yan duvarlarında oluşan kalınlaşmayla her iki tarafta sulcus limitans adı verilen yüzeyel longitudinal bir oluk meydana gelir. Bu oluk, dorsal bölüm olan alar plağı, ventral bölüm olan bazal plaktan ayırır. Alar ve bazal plaklar daha sonraki afferent ve efferent fonksiyonlarıyla ilişkili olduğundan bu bölgesel önem arz etmektedir (Moore ve Persaude, 2016).

Bazal plaklar, ventral motor boynuz hücrelerini içerir ve omuriliğin motor bölgelerini oluştururken, alar plaklar ise duyu bölgelerini oluşturur. Nöral tübün dorsal ve ventral orta hat bölgelerinde nöroblastlar bulunmamaktadır. Ventral motor boynuz ve dorsal duyu boynuzlarının yanında bu iki bölge arasında küme oluşturan bir grup nöron, küçük bir ara boynuz (intermediate boynuz) daha meydana getirir. İntermediate boynuzda otonom sinir sisteminin sempatik kısmına ait nöronlar bulunmakta ve bu yapıya sadece omurilik'un torasik (T1-T12) ve üst lumbar (L2-L3) kısımlarında rastlanmaktadır (Sadler, 2011).

2.6.2. Meninkslerin Gelişimi

Meninks (beyin ve medulla spinalisi saran membransal zarlar) 20. ve 35. günlerde nöral krest hücrelerinin ve mezenkimal hücrelerin nöral tüpün etrafına doğru göç etmesiyle meydana gelir. Bu membranın dış katmanı, dura materi oluşturmak üzere kalınlaşır. İç katman ise pia mater ve araknoid materden oluşur ve bu iki tabaka birlikte, ilerde subaraknoid boşluğu oluşturacak olan içi sıvı dolu boşluklar-leptomeninks olarak adlandırılır. Beyin omurilik sıvısı (BOS yada serebrospinal sıvı) ise 5. haftada oluşmaya başlar (Moore ve Persaude, 2016).

2.6.3. Beynin Gelişimi

Sırasıyla motor ve duyu alanlarını temsil eden bazal ve alar plaklar, orta hattın her iki yanında yer alan rombensefalon ve mezensefalonu bulundurlar (Sadler, 2011).

Embriyo beyini 5.haftada hızla büyür ve baş kıvrımı ile ventrale doğru bükülürken iki önemli büküntü (fleksura) ortaya çıkar; mezensefalon bölgesinde bulunan orta beyin fleksur ile medulla spinalis ve rombensefalonun geçiş yerlerinde bulunan servikal fleksur'u meydana getirir (Moore ve Persaude, 2016).

2.6.3.1. Rombensefalon: Arka beyin

Rombensefalon, beyin veziküllerinin en kaudalinde yer alan myelensefalon ve pontin fleksurdan rombensefalik istmusa kadar uzanan metensefalonu oluşturur (Sadler, 2011).

Myelensefalon, medulla oblongata'yı, metensefalon ise pons ve serebellumu oluştururken, rombensefalon'un boşluğu ise 4. ventrikül ve santral kanal halini alır (Moore ve Persaude, 2016).

2.6.3.2. Myelensefalon

Medulla oblongata'yı oluşturan bir beyin vezikülü olmakla birlikte omurilik'tan lateral duvarlarının everte olmasıyla (tersine dönmek) ayrılır (Sadler, 2011).

Myelensefalon'un kaudal kısmı hem gelişim hem de yapısal olarak medulla spinalis'e benzer. Nöral tüp merkezindeki nöral kanal, küçük santral kanalı meydana getirir. Medulla spinalis'tekilerden farklı olarak, myelensefalon'daki alar plak'tan kökenlenen nöroblastlar marginal tabakaya göç ederek lateral kısımda nucleus cuneatus, medial kısımda nucleus gracilis adı verilen izole gri madde alanlarını oluşturur. Myelensefalon'un rostral kısmı (medulla'nın açık bölümü) geniş ve oldukça yassıdır. Medulla'nın duvarlarının laterale doğru hareketlenmesiyle alar plak'lar bazal plak'ların dış tarafında yer alırlar. Plakların yerleşimleri değişirken, motor çekirdekler duysal çekirdeklerin iç tarafında gelişirler (Moore ve Persaude, 2016).

Myelensefalon'un tavan plağı, tek katlı bir ependimal hücre tabakası ve bu tabakanın üzerini örten vasküler mezenkimden yani pia mater'den oluşur. Pia mater'in aktif proliferasyonu nedeniyle, alttaki ventriküler boşluk içine doğru kesecik benzeri invajinasyonlar uzanır. Bu püskül benzeri invajinasyonlar, beyin-omurilik sıvısını üreten koroid pleksusu oluşturur (Sadler, 2011).

2.6.3.3. Metensefalon

Myelensefalon gibi metensefalon da bazal ve alar plaklarla karakterizedir. Fakat bu bölgede iki yeni bileşen bulunur: (a) bir postür ve hareket koordinasyonu merkezi görevi yapan serebellum ve (b) omurilik ile serebral ve serebellar korteksler arasında uzanan sinir liflerine zemin oluşturan pons (Sadler, 2011).

2.6.3.4. Mezensefalon (orta beyin)

Mezensefalon, arka beynin en kaudal kısmı hariç, en az değişime uğrayan beyin bölgesidir. Nöral kanal daralarak 3. ve 4. ventrikülleri birbirine bağlayan bir kanal olan aqueductus cerebri'yi meydana getirir (Moore ve Persaude, 2016).

Mezensefalonun alar plakları, başlangıçta birbirinden yüzeysel bir orta hat çöküklüğü ile ayrılmış iki uzunlamasına yükselti şeklinde belirir. Gelişimin ilerleyen evrelerinde, bu yükseltiler transver bir oluk tarafından anterior ve posterior kollikuluslara bölünür. Posterior kollikuluslar işitme reflekslerinin sinap yaptığı bir ara istasyon olarak görev yaparken, anterior kollikuluslar görsel uyarıların bir refleks ve korelasyon merkezi olmasını sağlarlar. Kollikuluslar, üst kısımdaki marjinal bölgeye göç eden nöroblast dalgaları tarafından oluşturulurlar ve burada çok katlı tabakalar şeklinde düzenlenirler (Sadler, 2011).

2.6.3.5. Prosensefalon (ön beyin)

Rostal nöropor kapandığında ön beyinin iki tarafı üzerinde optik vezikül adı verilen her iki lateral bölgede bir doku büyümesi görülür. Optik veziküller, optik sinirleri ve retina'yı meydana getirirler. Telensefalik vezikül adı verilen ikinci bir çift divertikül dorsal ve rostral olarak ortaya çıkar ve bunlar serebral hemisferler'e ve içlerindeki boşluklar ise lateral ventriküller'e dönüşür. Prosensefalon'un primordiyal serebral hemisferleri de kapsayan rostral veya ön bölümü telensefalon, kaudal ve arka bölümü ise diensefalon olarak adlandırılır. Diensefalon boşluğu ise 3. ventriküle dönüşür (Moore ve Persaude, 2016).

2.6.3.6. Diensefalon: Tavan plağı ve epifiz

Prosenfalon'un orta kısmında gelişen diensefalon, bir tavan ve iki alar plağına sahip olmasına rağmen taban ve bazal plakları olmadığı düşünülür. Ancak bir orta hat belirleyicisi olan sonic hedgehogun diensefalonun tabanından eksprese edilmesi ilgi çekicidir. Diensefalon'un tavan plağı, üzeri pia mater ile örtülü tek sıralı bir endodermal hücre tabakasından oluşur. Bu iki yapı birlikte, 3. ventrikülün koroid pleksus'unu meydana getirir. Tavan plağının en kaudal bölümünden pineal cisim veya epifiz gelişir (Sadler, 2011).

2.6.3.7. Telensefalon

Telensefalon, bir orta median bölüm ve serebral vezikül adı verilen iki lateral divertikülden oluşur. Bu veziküller, serebral hemisferler'in ilk şekilleridir (Moore ve Persaude, 2016).

Telensefalon beyin veziküllerinin en rostralinde bulunur. Hemisferlerin boşlukları yani lateral ventriküller, diensefalon'un lümenine foramen monro (interventriküler foramen) aracılığıyla bağlantı kurar (Sadler, 2011).

2.7. Sıçanda Sinir Sisteminin Kökeni ve Anatomisi

İnsan ve sıçan embriyonik gelişimi arasındaki en önemli fark gebelik süresidir. Bu süre sıçanda 21 gün, insanda yaklaşık 267 gündür. Fertilizasyon ve blastula safhaları benzerlik gösterir (Hacıaloğulları, 2005).

Sıçanda intrauterin hayatın 8-14. günleri organogenez dönemi olarak kabul edilir (Skosyeva, 1989).

Sıçanda somit oluşumu 9. günde başlar ve 16. günde tamamlanır. 4'ü oksipital, 8'i servikal, 13'ü torakal, 6'sı lumbal, 4'ü sakral, 30'u kaudal bölgede olmak üzere yaklaşık 65 somit vardır (Soysal, 2010).

Sıçanda omurilik karakteristik olarak, dorsal yarığın alt kısımlarında piramidal şekilli korkitospinal iplikler içerir. Sıçan omuriliğinin organizasyonu diğer memeli türleri ile oldukça benzerlik gösterir ve 8 servikal, 13 torakal, 6 lumbal ve 4 sakral segmentten meydana gelir. (Soysal, 2010).

Sıçanda da insanda olduğu gibi beyin; ön beyin (prosencefalon-forebrain), orta beyin (mesencefalon-midbrain) ve arka beyin (rhombencefalon-hindbrain) oluşturacak şekilde bölümlere ayrılır. Beynin en büyük kısmı olan ön beyin, diensefalon ve telensefalon olarak iki alt bölümde incelenir. İki büyük serebral hemisferden oluşan telensefalon beyin en büyük kısmını oluşturur. En önemli özellikleri; gyrus ve sulcuslar bulunması ve bulbus olfactoriusların oldukça büyük olmasıdır. Kortikal gri madde miktarı ise çok azdır (Bayramiçli ve Ark, 2005).

Beyincik bol kıvrımlı bir görünümündedir. Orta, ortanın iki yanında birer yan lob ve kafatasının periotik kapsülün içinde bulunan parafloküler loblar olarak 5 ayrı bölümden oluşur. Parafloküler loblar kemirgenlere özgü bir özelliktir. Beyin ventrikülleri insandakine benzer özelliktedir ve 12 çift cranial sinir vardır (Bayramiçli, 2005).

2.8. Beyine özgü Bazı Belirteçler ve Biyokimyasal Özellikleri

Sinir sistemindeki belirteçler, beyine özgü proteinleri travmatik, infeksiyöz ve dejeneratif kaynaklı birçok nöropatolojide yer almaktadır. Sinir sistemindeki bu belirteçler risk tayininde ve tedavi hedeflerinin belirlenmesinde önemlidir (Regan, 1980).

2.8.1. 14-3-3 Protein Ailesi

Farklı genler tarafından kodlanan, oldukça homolog proteinleri kapsar. Beyinde oldukça yaygın olmalarının yanısıra tüm dokularda bulunurlar. Başlıca fonksiyonu sinir sisteminin hücrel farklılaşması, enzim aktivitesi, protein-protein etkileşimi, nöronların büyüme ve farklılaşmasının düzenlenmesi yer alır (Fu H. Ve Ark, 2000).

2.8.2. 14-3-2 Protein Ailesi (NSE) Nöron Spesifik Enolaz

Asidik ve suda çözünabilir bir protein olan NSE, glikolitik enolaz aktivitesine sahip ve nöron spesifik enolaz olarak adlandırılmıştır. Başlıca nöronlar, dorsal kök ganglionları, otonom ganglionlar ve nöroendokrin sistemde lokalizasyon gösterir (Marangos PJ, 1987). NSE sinir sisteminin hücrel farklılaşmasında rol oynar. Bu nedenle nöroendokrin sistem ve sinir sistemi gelişiminin ve bozukluklarının izlenmesinde önemlidir (Lima JE ve Ark, 2004).

2.8.3. S100

Kalsiyum bağlayıcı protein ailesinin en geniş alt grubunu oluşturan küçük ve asidik proteinlerdir (Donato R, 2001).

Hücre içinde kinazların aktivasyonunu engelleyerek protein fosforilasyonunu inhibe ederler; enzimlerin aktivasyonu veya inhibisyonunda rol alırlar; ara filamentler ile etkileşerek hücre iskelet oluşumunda önemlidirler. Ayrıca hücre büyümesi ve farklılaşması,

hücre döngüsü, transkripsiyon, sinyal iletimi ve kalsiyum dengesinin düzenlenmesinde görev alırlar.

2.8.3.1. S100b

S100b 10.5 kDa ağırlığında bir S100 proteinidir, en fazla beyinde astrositlerde eksprese edilmektedir. Genellikle kalsiyum bağımlı etki gösterip kalsiyum bağlandıktan sonra biçimsel değişikliğe uğrar ve hedef proteinle etkileşim gösterir. Zarlar ve iskelet elemanları ile ilişkilidir; mikrotübül ve tip III ara filamentlerin bir araya gelmesinde rol alır. Bazı enzim aktivitelerinin ve hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde görev yapar (Heizmann C., 2002, Donato R. Ve ark., 2009).

Hücreler arası alanda düşük yoğunlukta S100b, nöron büyümesi ve astrosit proliferasyonunu uyarır. Bu yapıcı etki Ras-MAPK veya Cdc42/Rac yollarının ileri glikozilasyon ürünleri reseptörü (RAGE) bağımlı aktivasyonu ile NFkB'nin(nükleer kappa B faktörü) nükleer translokasyonu üzerinden gerçekleşir. Ancak yüksek yoğunlukta S100b, apoptoza bağlı olarak nöron ve astrosit ölümüne neden olur (Donato R., 2003, Donato R, ve ark., 2009, Huttunen, HJ ve ark. 2000).

S100b tümör baskılayıcı protein p53'ün fonksiyonunu inhibe eder; mitojenik kinazların (Ndr ve Akt, protein kinazB) aktivitesini artırarak hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynar. Sinaptik esnekliği düzenler, öğrenme ve bellek oluşumunda etkin rol aldığı bildirilmiştir (Donato R.,2001, Heizmann C.,2002 ve Donato R. ,2003).

2.8.4. Glial Fibriler Asidik Protein (GFAP)

Astroglialara özgü küçük ve asidik, Tip III ara filament proteinidir. Ara filament proteinler, 8-10 nm'lik fibröz proteinlerdir; sitoplazmik alan organizasyonu, hücre iskeletinin oluşması ve hücre hareketinin sağlanmasında rol oynamaktadır (Lazarides E., 1982).

α , β , γ , σ ve ϵ olmak üzere en az beş izoformu vardır. α izoformu astroglialarda en fazla bulunur (Inagaki M. Ve ark.,1990, Reeves SA ve ark., 1989).

Hücre yapı ve hareketi, mitoz, sinyal iletimi, kan-beyin bariyerinin fonksiyonel olması gibi birçok hücreyel olayda rolü vardır. GFAP astrositlerin mekanik dayanıklılığını sağlamaktadır (Goss JR ve ark.,1991).

2.8.5. Miyelin bazik proteini (MBP)

Beyine özgü diğer proteinlerin aksine bazik bir proteindir (pH 10.5). Merkezi sinir sisteminde miyelin oluşumunda ve miyelinin çok katlı sıkı yapısının stabilizasyonda görevlidir (Martini R ve ark.,1995).

2.8.6. N-asetil-L-aspartat (NAA)

Nöron ve gliaların progenitör hücrelerinde yaygın olarak bulunan ve yıkımı oligodendrositler ile düzenlene asidik bir aminoasittir. Nöronal fonksiyonda ve bütünlüğün sağlanmasında görevlidir (Baslow MH, 2003).

2.9. Kök Hücre

Kendini yenileyebilme, uzun süre bölünebilme ve gereksinime göre farklılaşarak farklı doku hücrelerine dönüşebilme özelliğine sahip hücrelere "kök hücre" denir.

Farklılaşmamış kök hücrelerin, kendi karakteristik özelliğini taşıyabilen en az bir benzer hücre oluşturabilme, tek bir hücreden birden fazla hücreye farklılaşma ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılmasını sağlayabilme özellikleri vardır (Weissman IL, 2000).

Bir dokudan elde edilen kök hücrelerin, uygun uyarılarla ve uygun ortamda farklı dokuların hücrelerine dönüşebilme yetenekleri (plastisite) vardır (Vescovi A, Gritti A, Cossu G, Galli R. 2002).

Kök hücrelerin bazıları gelişimin ilk üç ayında anne karnındaki canlının oluşmasında, dokuların ve organların şekillenmesinde görev alırken; bazıları da organizmada yıllarca sessiz kalarak gerektiği zaman faaliyet gösterir. Dolayısıyla kök hücreleri sınıflandırırken embriyo dönemine ait kök hücreler, fetüs dönemine ait kök hücreler ve yetişkin kök hücreler olarak dönemsel bir sınıflandırma yapmak gerekir. Bulundukları dokuya göre kök hücreler embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücreler

olmak üzere sınıflandırılırken; farklılaşma potansiyellerine göre ise totipotent, pluripotent, multipotent, unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılır (Can, 2014).

2.9.1. Farklılaşma Kapasitelerine Göre Kök Hücreler

Totipotent kök hücreler; sınırsız farklılaşabilen ve farklı yönlerde gidebilen, işlev gören canlı bir yapıyı oluşturan bütün hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip, ilk embriyonel hücredir. Bu anlamda zigot ve embriyonun 5. gününe kadar var olan bütün blastomerlere "totipotent hücreler" denir (Weissman IL., 2000).

Pluripotent kök hücreler; embriyonun blastosist evresindeki hücrelerdir. Blastosist; iç hücre kitlesi, trofoblastik hücreler ve blastosöl olmak üzere üç yapıdan oluşur. Embriyonik kök hücrelere kaynaklık eden iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler pluripotent kök hücreler olup, yaklaşık 250 hücre türüne dönüşebilme kapasitesine sahiptir, fakat işlev gören bir organizmayı oluşturamazlar (Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS et al., 1998).

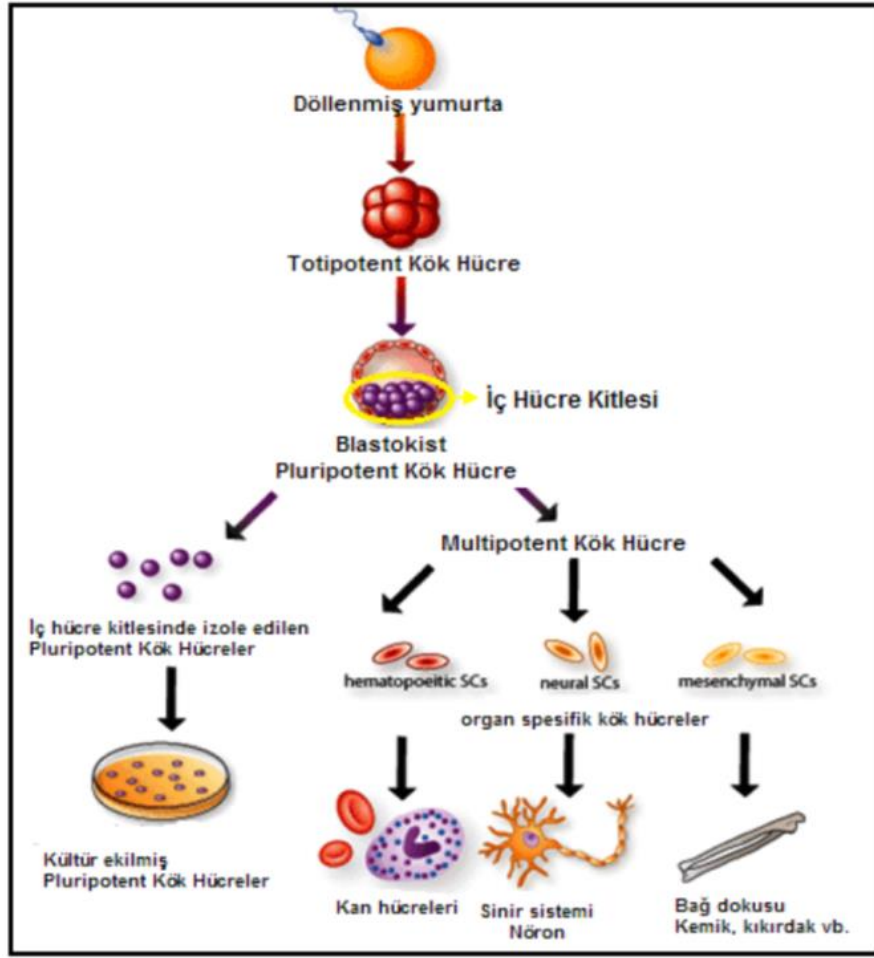
Pluripotent kök hücreler; embriyonun 3 germ yaprağına (endoderm, ektoderm, mezoderm) ait dokuları oluşturma kapasitesine sahiptirler.

Ektoderm: Sinir sistemi, epidermis, saç, hipofiz

Mezoderm: Notokord, kaslar, iskelet, dolaşım sistemi, kan hücreleri, böbrek

Endoderm: Birçok endokrin bez, sindirim kanalını döşeyen doku, karaciğer, pankreas, akciğerlerin epitelyal dokusu (Jacobson LO, Marks EK, Gaston EO, et al. 1949).

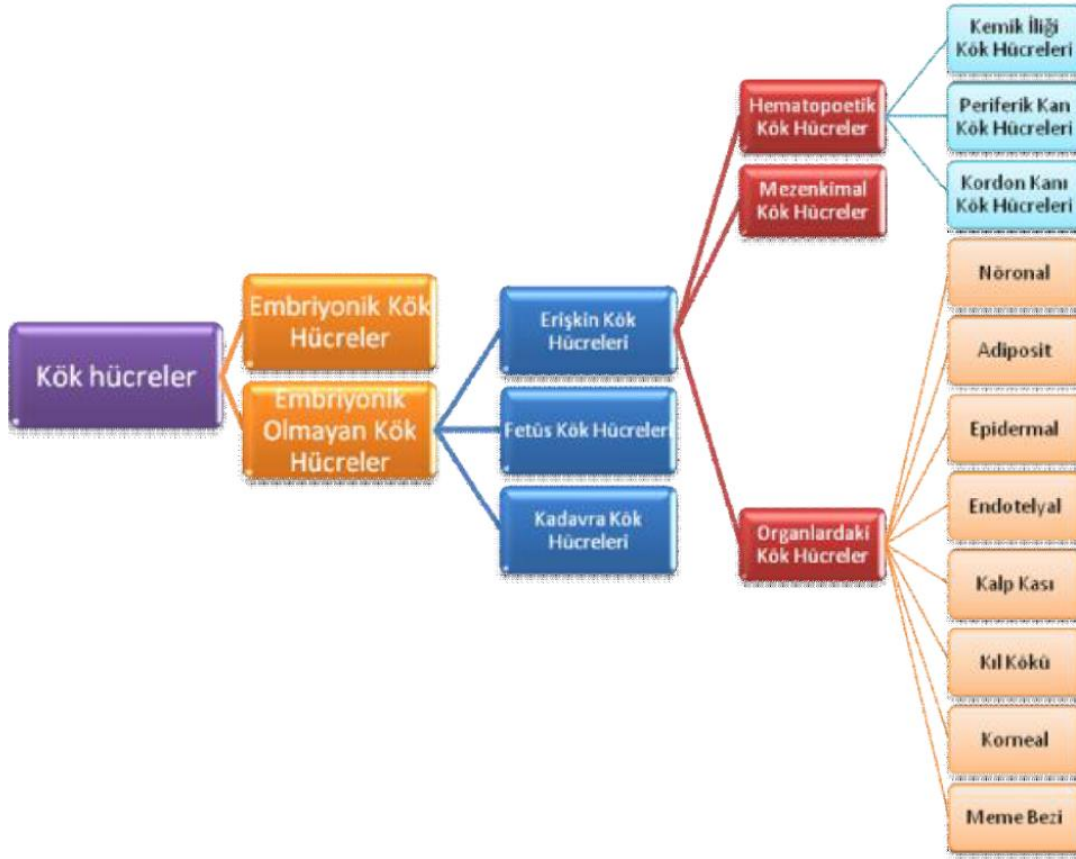
Multipotent (Unipotent) kök hücreler; erişkin kök hücrelere dönüşürler ve özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşırlar. Erişkin kök hücreleri, bulundukları dokuda var olan tüm hücre tiplerini oluşturabilme kapasitesine sahiptirler.



Şekil 8: Farklılaşma Kapasitesine Göre Kök hücre tipleri (Tyndall A, Uccelli A., 2009)

2.9.2. Elde Edildikleri Kaynaklarına Göre Kök Hücreler

Kök hücre esas olarak iki farklı kaynaktan elde edilir: Embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler.



Şekil 9: Kök Hücre Kaynakları (http://www.kokhucredernegi.org.tr/tur/kok_hucre/eriskin.htm)

2.9.2.1. Embriyonik olmayan kök hücreler

Farklılaşmış kaynaklardan elde edilir. Multipotenttirler. Köken aldıkları özelleşmiş doku ve bu dokularla ilişkili diğer dokular gelişir.

2.9.2.1.1. Mezenkimal kök hücreler (MKH)

“Mezenkim” terimi epiblastın farklılaşmasından başlayarak embriyonun gelişmesinde ve daha sonraki evrede fetüsün yaşamında önemli görev alan, gevşek bağ dokusu yapısındaki dokulara verilen isimdir. Dolayısıyla mezenkim dokusu hem embriyo hem fetüste bulunan gevşek bir bağ dokusudur (Can, 2014).

Bağ dokunun ana hücreleri olan mezenkimal kök hücreler; kemik, kıkırdak, kas, yağ, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilirler. Ayrıca bütün dokularda destek hücresi olan stromal hücrelerin de kökenini oluştururlar. Bu hücreler hematopoietik özellikte

olmayan (non-hematopoietik) pluripotent kök hücreler olup, her üç germ yaprağından köken alan hücrelere farklılaşma potansiyelindedirler (Çamurdanoğlu ve Kansu, 2011).

Önceleri “Kemik iliği stromal fibroblast”ları olarak adlandırılan bu hücreler daha sonra mezenkimal kök/stromal hücre olarak tanımlanmıştır. En fazla kemik iliğinde bulunurlar. Ayrıca yağ dokusunda, kas dokusunda, kordon kanında, amnion sıvısında, diş pulpasında, deride, korneada, retinada, sinir sisteminde ve böbreklerde de bulunmaktadır (Bassi ve ark., 2011; Matur ve Solmaz, 2011; Ra ve ark., 2011).

Mezenkimal kök hücrelerin hasarlanan doku tarafından salgılanan sitokinlere doğru hareket etme ve immünmodülatör, antiinflamatuvar ve antiapoptotik rol oynamaları gibi oldukça önemli özellikleri vardır (Matur ve Solmaz, 2011; Ra ve ark., 2011; Li ve ark., 2012; Li ve ark., 2014).

Aynı zamanda MKH’ler hasarlanan dokunun onarımında ve dokunun yenilenmesinde de önemli roller üstlenmiştir (Ra ve ark., 2011).

Kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücreler, hızlı adezyon yeteneği ve yüksek çoğalma ve farklılaşma kapasitesine sahiptir. Morfolojik olarak kültür ortamında incelendiklerinde fuziform şekilli, fibroblast benzeri görünümündedirler. İmmunofenotipik özellikleri itibarıyla CD34, CD45, HLADR ve CD14 gibi tipik hematopoietik belirteçleri eksprese etmezlerken; CD90, CD73, CD105 gibi hematopoietik olmayan hücre yüzey belirteçlerini eksprese ederler.

Mezenkimal kök hücreler için Uluslararası Hücre Tedavileri Derneği (ISCT) 3 tanımlayıcı kriter önermektedir (Ural AU, 2008).

- 1- Standart kültür ortamında plastisite göstermeleri,
 - 2- CD105, CD73 ve CD90 eksprese etmeleri, ancak CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 veya CD19 ve HLA-DR eksprese etmemeleri,
 - 3- İn vitro koşullarda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri.
- (Çetinkaya DU, 2009)

2.9.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Akım sitometri; süspansiyon haline getirilmiş olan hücrelerin yüzey veya hücre içi yerleşimli antijenik yapılarının işaretlenerek sayımının yapılması, biyokimyasal ve biyofiziksel özellikleri ile değerlendirilmesini sağlar. Akım sitometri immün fenotiplendirme, DNA analizi, apoptozis, hücre içi sitokinlerin tanımlanması, RNA ve protein içeriği gibi analizlerde kullanılmaktadır. Akım sitometri ile çeşitli monoklonal antikorlar kullanılarak kök hücrelerin karakterizasyonu belirlenir.

2.9.4. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünolojik Özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanımında immünolojik etkileri önemlidir. Mezenkimal kök hücreler sitokinler yardımıyla inflamatuvar bölgeye doğru hareket edip, anti-inflamatuvar ve anti-apoptotik etki gösterir (Ovalı, 2008).

Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin yanı sıra büyüme faktörü ve sitokin salgılaması, parakrin etkilerinin olması ve antifibrotik etkisi önemlidir (Ghannam ve ark., 2010).

Mezenkimal kök hücrelerin HLA-DR ve ko-stimülatör moleküllerini bulundurmamaları klinik kullanımda alıcının immün sisteminde sorun oluşturmaz. Mezenkimal kök hücrelerin en önemli özelliklerinden biri de bağışıklık sistemini baskılayıcı (immünsüpresif) olmalarıdır. Ayrıca mezenkimal kök hücrelerden salınan TGF- β , hepatosit büyüme faktörü (HGF), indolamin 2,3 dioksijenaz ve prostaglandin E sayesinde makrofajlar ve dentritik hücreler ile anti-inflamatuvar etki gösterirler (Yalvaç, 2011).

2.9.5. Kemik İliği Kökenli Kök Hücreler (BM_MSCs)

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin CD14, CD34, CD45 yüzey belirteçlerini eksprese etmezlerken, CD44, CD105, CD166, CD28, CD33, CD13, STRO-1, CD29, CD73, CD90, CD105, CD146, Octamer-4 (Oct4) ve evre spesifik embriyonik antijen-4 (SSEA4) eksprese ederler (Akiyama ve ark., 2012; Orbay ve ark., 2012).

2.9.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinikte Tercih edilme Nedenleri

Mezenkimal kök hücreler farklılaşma potansiyeli ve bağışıklık sistemi baskılayıcı özelliği nedeniyle hücresel tedavilerde daha çok tercih edilmektedir. Klinikte MKH kullanılmasının tercih nedenlerini şöyle sıralayabiliriz:

- 1) Üç germ tabakasına da farklılaşabilme potansiyelinin bulunması (Yüksek farklılaşma potansiyelleri)
- 2) Stromal kökenli olmalarının bütün doku hücrelerine destek hücre olma yeteneğini ve fonksiyonel ve gelişimsel olarak katkıda bulunmasını sağlamaları
- 3) İmmün sistemi baskılayıcı özelliği nedeniyle doku uyumunun aranmaması,
- 4) Migrasyon özelliği ile hasarlı dokuya hareket edebilmesi,
- 5) Transfer kolaylığı, hızlı çoğalmaları ve dayanıklılığı nedeniyle gen tedavi uygulamaları için uygun olması
- 6) Kaynaşma (Füzyon) özelliği
- 7) Büyüme faktörleri ve sitokin salınımı ile hücre veya dokuda destek hücre olarak oranım potansiyeline sahip olması

Mezenkimal kök hücrelerin klinikte kullanımında; sayılarının az olmasından in-vitro kültür ortamında çoğaltılmalarının gerekmesi ve tekrarlayan transplantasyonlarda direkt dokuya hücreleri vermenin gerektiği durumlarda özel yöntemlerin kullanılmasına ihtiyaç duyulması gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır (Uçkan, 2007; Caplan, 2008).

2.9.7. Mezenkimal Kök Hücre Belirteçleri

İnsan ve kemirgenlerin dokularından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin pozitif ve negatif seçiminde bazı belirteçler kullanılmaktadır.

Tablo 3: Mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçleri (Dominici et al., 2006; Lotfy et al., 2014)

Yüzey Belirteci	Sıçan/Fare MKH	İnsan MKH
CD29	+	+
CD44		+
CD73		+
CD90		+
CD10		+
CD13		+
CD105		+
CD106	Değişken	Değişken
CD45	-	-
Stro-1		+
CD31		-
CD34		-
CD11b		-
CD19/CD79 α		-
HLA-DR		-

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Hayvan deneyleri aşaması Adnan Menderes Üniversitesi (Adü) Hayvan Deneyleri Araştırma Laboratuvarında, hücre kültürü aşaması Adü Merkez Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Dokuların histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamaları Adü Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji laboratuvarında gerçekleştirildi. Akım sitometri analizi Adü Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde yapıldı. İmmunofloresans görüntüleme Adü Veteriner Fakültesi'nde yapıldı.

3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Deney Grupları

Çalışmamızda, ağırlıkları 180-200 gram arasında değişen, 5 tanesi mezenkimal kök hücre eldesinde, 24 tanesi deney gruplarının oluşturulmasında kullanılmak üzere toplam 29 adet erişkin “Wistar Albino” cinsi dişi sıçan kullanıldı.

3.1.1. Deney Grupları

Kontrol Grubu (K Grubu): $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, %45- 65 nem ve 14 saat aydınlık / 10 saat karanlık ortamda, yem ve suyun ad libitum sağlandığı koşullarda 8 adet dişi sıçan takip edildi. Dişi sıçanlar bir gece boyunca bir dişi+bir erkek olacak şekilde aynı kafeste bekletildi. Ertesi sabah vajinal smearlarında spermatozoon bulunan dişi sıçanın gebeliğin 0. gününde olduğu kabul edildi. Gebeliğin 9.günü sıçanlara kuyruk veninden PBS (fosfat tuzu tamponu) verildi. Gebeliğin 21.günü sıçanlara anestezik madde (Ketamin+Ksilezin) intraperitoneal yoldan verilerek servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Çıkarılan fetüslerin beyin ve omurilikleri alınarak %10'luk formaldehite konuldu.

Valproik Asit Grubu (VPA Grubu): $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, %45- 65 nem ve 14 saat aydınlık / 10 saat karanlık ortamda, yem ve suyun ad libitum sağlandığı koşullarda 8 adet dişi sıçan takip edildi. Dişi sıçanlar bir gece boyunca bir dişi+bir erkek olacak şekilde aynı kafeste bekletildi. Ertesi sabah vajinal smearlarında spermatozoon bulunan dişi sıçanın gebeliğin 0. gününde olduğu kabul edildi. Gebeliğin 9. günü sıçanlara 12 saat arayla 1 gün süreyle 400mg/kg valproik asit (VPA) (Depakin 400 mg/4 ml IV) subkutan olarak enjekte edildi. Gebeliğin 21. günü sıçanlara anestezik madde (Ketamin+Ksilezin) intraperitoneal yoldan verilerek servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Çıkarılan fetüslerin beyin ve omurilikleri alınarak %10'luk formaldehite içerisinde konuldu.

Valproik Asit (VPA) + Kök Hücre Grubu (KH Grubu): $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, %45- 65 nem ve 14 saat aydınlık / 10 saat karanlık ortamda, yem ve suyun ad libitum sağlandığı koşullarda 8 adet dişi sıçan takip edildi. Dişi sıçanlar bir gece boyunca bir dişi+bir erkek olacak şekilde aynı kafeste bekletildi. Ertesi sabah vajinal smearlarında spermatozoon bulunan dişi sıçanın gebeliğin 0. gününde olduğu kabul edildi. Gebeliklerinin 9. günü sıçanlara 12 saat arayla 1 gün süreyle 400mg/kg valproik asit (VPA) (Depakin 400 mg/4 ml IV) subkutan olarak enjekte edildi. Aynı gün kemik iliğinden elde ettiğimiz 1×10^6 mezenkimal kök hücreler 1 ml tam besi yeri içerisinde kuyruk veninden enjekte edildi. Gebeliğin 21. günü sıçanlara anestezi  madde (Ketamin+ Ksilazin) intraperitoneal yoldan verilerek servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Çıkarılan fetüslerin beyin ve omurilikleri alınarak %10'luk formaldehite konuldu.

3.2. Sıçan Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi

Mezenkimal kök hücre elde edilmesi için donör olarak 180-200 gram ağırlığındaki 5 adet “Wistar Albino” cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar ketamin (Alfamine, 10mg/ml) ve Ksilazin (Alfazyne, 20mg/ml) uygulaması ile anestezi altında sakrifiye edildi. %70'lik alkol ile  n ve arka ayakları sterilize edildikten sonra steril makas / bisturi ile sıçanların femurları çıkartıldı. Çıkarılan femurlar yumuşak dokularından temizlenip kemiklerin serbest hale gelmesi sağlanarak 40 ml PBS içeren falkon tüplerin içine konuldu. Kök hücre kültür laboratuvarına transfer edildi.

3.2.1. Hücre Kültür İşlemleri

Bu işlem esnasında Minimum Essential Medium (MEM)  ekilmiş insülin enjektörleri kullanıldı. Her kemik için 1cc, toplamda ise sıçan başına 5-7 cc MEM kullanıldı. Femur orta kısmından tutularak makas yardımı ile kemikler her iki u  kısmından kesildi ve böylece kanal açık hale getirildi. Mediumdan 5 ml çekilerek steril falkon tüplere (50 ml'lik) konuldu. Medium konulan falkon tüpe uçları kesilen kemikler dik bir şekilde pens yardımı ile falkon tüpün içerisine doğru tutularak daha önceden medium çekilen insülin enjektörlerinin iğneleri bu kemiklerin kanalından içeriye doğru sokuldu ve medium içeriği kanaldan içeri doğru akıtıldı. Kemik iliği içeriği bulunan falkon tüpü 5-10 sn çalkalandı ve sonrasında 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet üzerine medium ilave edilerek tekrar 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant

atıldı ve pellet üzerine tekrar 13 ml tam besi yeri eklenerek pipetaj yapıldı, T25 flakslara dağıtıldı. Bu sayede flakslara hücre ekimi yapılmış oldu. CO₂ inkubatörüne kaldırılan hücrelerin üç günde bir mediumu değiştirildi ve mikroskopta kontrol edildi. Hücreler üçüncü pasajın sonunda sayım yapıldıktan sonra donduruldu.

3.2.1.1. RFP (Red Fluorescent Protein) ile mezenkimal kök hücrelerin işaretlenmesi

Çalışmamızda mezenkimal kök hücrelerin immünofloresan mikroskopunda görüntülenmesi için RFP (Sigma-Aldrich PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling) kiti kullanılmıştır. Daha önceden dondurulan 8×10^6 mezenkimal kök hücre su banyosunda çözündürüldü. Her hücre için 5 ml olacak şekilde MEM (Minimum Eagle Medium) eklendi. 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atılarak ve her hücreye 5 ml olacak şekilde tekrar MEM eklendikten sonra tekrar 5 dk 1000 rpm'de santrifüj edildi. Ependorfa kitin içerisinde yer alan diluent C'den 0.8 ml ekleyip pipetaj yapıldı. Santrifüj edilen hücrelerin süpernatantı atıldı ve pellete ependorfa eklediğimiz diluent C solüsyonu eklenerek pipetaj yapıldı. Başka bir ependorfa diluent C den 1 ml alındı, boya solüsyonundan 4 mikrolitre eklenerek pipetaj yapıldı. Elde edilen karışımdan 800 mikrolitre alındı ve hücrelere eklendi. Hücrelerin üstüne 1,6 ml FBS (Fetal Boin Serum) eklenip 1 dakika bekletildi. 6 ml tam besiyeri eklendi. Sonra 5 dakika 1000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatantı atıldıktan sonra 6 ml tam besiyeri eklenip tekrar santrifüj edildi. Son olarak tekrar süpernatant atıldı ve her sıçan başına 1ml içerisinde 1×10^6 olacak şekilde toplam 8 ml tam besiyeri eklendi. Sıçanlara mezenkimal kök hücreler kuyruk veninden enjekte edildi.

3.2.1.2. Hücre canlılık testi

Kültür edilen hücreler tripsin ile muamele edildikten sonra petrilere ayrılarak 1250 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve pellet kısmına PBS ile pipetaj yapıldı. Sonra Tripan Mavisi ile 1/1 oranında dilüe edilen Neubauer lamı kullanılarak hücre sayımı yapıldı.

3.2.1.3. Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi

Akım sitometride mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin ekspresyonunu analiz etmek için CD 11b, CD 29, CD 34, CD 45 ve CD 90 antikorları kullanıldı. Buradaki

amaç süspansiyon haline gelmiş hücrelerin mezenkimal kök hücre olup olmadığının uygun monoklonal antikorlar yardımıyla analiz etmektir. Erken dönem pasajlara ait mezenkimal kök hücreler yüzey ekspresyon işaretçileriyle akım sitometrik analiz kullanılarak tanımlandı. Kültür kabının yüzeyine tutunan mezenkimal kök hücreleri %0.25 tripsin-edta (tripsin etilendiamin tetraasetikasit) ile yüzeyden kaldırıldıktan sonra kültür mediumu içeren tüplere aktarılıp santrifüj edildi. Santrifüj ve PBS'le yıkama sonrası pellet çözündürülerek ve hücreler sayıldıktan sonra 1×10^6 olacak şekilde PBS içerisinde süspanse edildi. Daha sonra, belirlenen hücre yüzey işaretçilerine özel fluorescein isothiocyanate (FITC) konjuge monoklonal CD 11b, CD 29, CD 34, CD 45 ve CD 90 antikorları % 3 BSA içeren PBS içerisinde ($1 \mu\text{g/ml}$ olacak şekilde) 30 dakika karanlıkta, oda ısısında, inkübe edildi. İnkübasyon sonrası %0.1 sodyum azide içeren yıkama solusyonu eklenip ve 5 dakika 1300 rpm'de santrifüj edilerek temizlendi. Hazırlanan hücre süspansiyonu FACS Calibur Akım Sitometri (BD Sciences) cihazında okutuldu ve analizi BD CellQuest™ software programı ile yapıldı.

3.3. İmmüno Floresan İnceleme

Gebeliğin 9. gününde, 12 saat arayla, 1 gün süreyle 400 mg/kg VPA verilmiş ve aynı gün kuyruk veninden kemik iliği kaynaklı kök hücre verilmiş sıçanlardan gebeliklerinin 21. günü alınan fetüslerin beyin ve omurilik dokusu örnekleri -196°C 'lik sıvı azot içerisinde muhafaza edilerek laboratuvara transfer edilip, $5 \mu\text{m}$ 'lik frozen kesitler alındı. PBS ile yıkanıp, 10 dakika metanol ile muamele edilip, karanlıkta bekletildi ve tekrar PBS ile yıkandı. Daha sonra PBS içerisinde 1/1000 oranında dilue edilen DAPI (4',6-diamino-2-phenylindole) boyasında 10 dakika bekletildi. Tekrar PBS ile 3 kez yıkandı. Lam üzerine mounting medium damlatılarak lamel ile kapatıldı ve dokular floresan mikroskopta incelenerek görüntülendi.

3.4. Dokuların Elde Edilmesi

Çalışmamız Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde (ADÜTF- DEHÜAM) yapıldı. Çalışma için ADÜTF- DEHÜAM'de çiftleştirilen ve "Wistar albino" cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Gebeliği belirlenen sıçanlara

ait fetüslerin beyin ve omurilikleri alındı. Dokular serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra %10'luk nötral formaldehitin içine alınıp 48 saat bekletilerek tespit işlemi yapıldı.

3.5. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Takibi

Formaldehitte tespit edilen fetüs beyin ve omurilikleri 12 saat akar su altında bekletilerek formalin solüsyonundan uzaklaştırıldı. Formalinin uzaklaşmasıyla dokuların içine nüfuz eden suyu uzaklaştırmak için dokular sırasıyla %70, %80, %96, %100, %100, %100°C'lik etil alkol serilerinden 1'er saat geçirildikten sonra ksilol ve %100°C'lik etil alkol karışımında 1 saat bekletildi. Şeffaflaştırmak ve alkolü uzaklaştırmak için daha önceden 60°C'lik etüvde ısıtılan ksilol içerisinde 2 saat bekletildi. Son olarak dokular 60°C'lik parafinde 3 saat bekletildikten sonra parafin bloklara (Tekkim) gömüldü. Her bir parafin bloktan, rotary mikrotom (Leica RM 2265, Germany) yardımıyla Plasma LS35 Mikrotom bıçağı ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitlere Hematoksilen-Eozin (Merck), Toluidin Blue O (Merck) boyama ve S100b (Sigma Aldrich) antikoru kullanılarak immünohistokimyasal boyama yapıldı. Olympus - BX50 mikroskobu ile görüntüleme yapıldı.

3.5.1. Hematoksilen & Eozin Boyama Protokolü

- 1) Parafin bloklardan lama alınan kesitler 2 x 5 dakika ksilolde bekletilerek parafinden uzaklaştırıldı.
- 2) Sırasıyla %100, %80 'lik etil alkolde 2'şer dakika bekletildi.
- 3) Distile suda 5 dakika bekletildi.
- 4) Mayer's Hematoksilen (Merck %37) solüsyonunda 5 dakika bekletildi.
- 5) Kesitler 1 dakika akar suda bekletildi.
- 6) Eozin-Y (yellowish, Merck) solusyonunda 1 dakika bekletilerek zıt boyama yapıldı.
- 7) Parlatma ve dehidratasyon için sırasıyla %80, %100'lük etil alkolde 2'şer dakika bekletildi.

8) 2 x 5 dakika ksilolden geçirildi.

9) Entellan New (Merck) damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.5.2. Toluidine Blue O Boyama Protokolü

1) Parafin bloklardan lama alınan kesitler 2 x 5 dakika ksilolde bekletilerek parafinden uzaklaştırıldı.

2) Sırasıyla %100, %80'lik etil alkolde 2'şer dakika bekletildi.

3) Distile suda 5 dakika bekletildi.

4) Dokuların üzerine Toluidine Blue O (Sigma Aldrich) solüsyonundan 2'şer damla damlatılarak 30 saniye bekletildi.

5) Kesitler 1 dakika akar suda bekletildi.

6) Parlatma ve dehidratasyon için sırasıyla %80, %100'lük etil alkolde 2'şer dakika bekletildi.

7) 2 x 5 dakika ksilolden geçirildi.

8) Entellan New (Merck) damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.6. İmmünohistokimyasal Boyama

İnceleme için fetüslerin beyin ve omuriliklerinden 5 µm kalınlığında kesitler Plasma (LS35) mikrotom bıçağıyla alındı. Alınan kesitlerdeki dokulara sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

1) Beyin ve omurilik kesitleri bir gece 37°C'de etüvde tutuldu.

2) Sırasıyla 60°C'lik etüvde 15 dakika Ksilol içerisinde, 15 dakika ksilol dışında, 15 dk ksilol içinde, 15 dk ksilol dışına konularak şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi.

3) Şeffaflaştırma işleminden sonra kesitler sırasıyla %100, 96, 80, 70'lik etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi.

- 4) Kesitler distile suda 10 dakika bekletildi.
- 5) Dokuların etrafı kurulanıp, PAP (Liquid Blocker Super PAP PEN) kalemiiyle çizildi.
- 6) Dokuların kurumaması için üzerine PBS damlatıldı.
- 7) Dokuların üzerine Tripsin-EDTA (2X dilüe edilmiş) damlatılarak 37 °C'lik etüvde 20 dakika bekletildi.
- 8) %30'luk Hidrojen Peroksit (H_2O_2) + Metanol karışımından 1:9 oranında eklendi. (1 ml H_2O_2 + 9 ml Metanol)
- 9) Dokular PBS ile yıkandı.
- 10) Blocking solüsyon (Solüsyon A) damlatılıp (İnvitrogen, Histostain – Plus Kit), 1 saat bekletildi. Bu aşamadan sonra PBS ile yıkama yapılmaz.
- 11) 1:100 oranında dilüe edilmiş primer antikor S100b (Sigma Aldrich) eklenip +4 °C'de bir gece bekletildi.
- 12) PBS ile yıkandı.
- 13) Broad spectrum second Ab (Solüsyon B) eklenip (İnvitrogen, Histostain- Plus Kit), 1 saat bekletildi.
- 14) Daha önceden oda ısısına getirilen HRP - Streptavidin (Solüsyon C) (İnvitrogen, Histostain- Plus Kit) damlatıldı, 30 dakika bekletildi.
- 15) PBS ile yıkandı.
- 16) 1 damla substrate buffer 1 ml distile su içerisine eklenip iyice karıştırıldı. Ayrı cryo tüpte 1 damla DAB chromogen ve 1 damla hidrojen peroksit eklenip iyice karıştırıldı. Sonrasında bu iki karışım birleştirilerek iyice karıştırılıp dokuların üzerine eklendi. 3-5 dakika beklendi ve 2-3 kere distile su ile yıkama yapıldı. Son olarak 1 damla DAB enhancer 1 ml distile suya damlatılarak iyice karıştırıldı ve dokuların üzerine eklendi. 1-3 dakika beklendikten sonra 2-3 kere distile su ile yıkandı (İnvitrogen, DAB-Plus Substrate Kit).

17) Mayer's Modifiye Hematoksilen (Merck) dokuların üzerine damlatılarak 30 saniye bekletildi.

18) Dokular akar su altında 5 dakika bekletildi.

19) Sırasıyla %80 ve %100'lük etil alkolde 2'şer dakika bekletildi.

20) Son olarak dokular 4 dakika ksilolde bekletildikten sonra Entellan New (Merck) ile kapatılarak ışık mikroskopunda (Olympus CX31- Japan) görüntülendi.

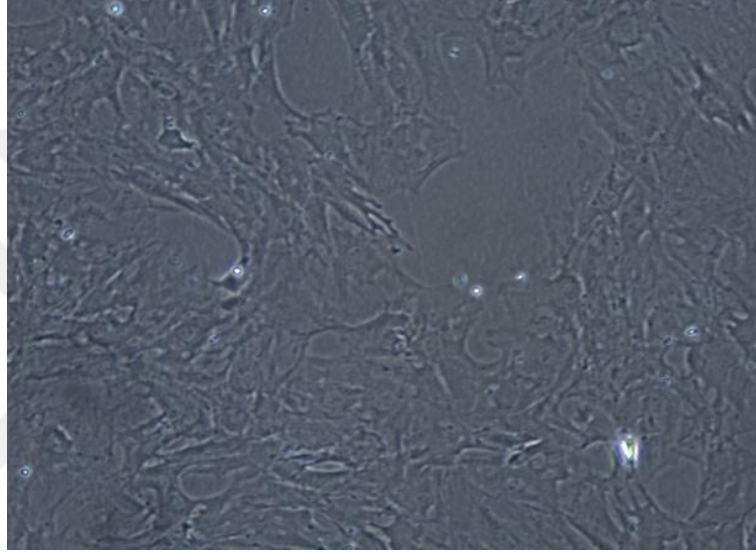


4. BULGULAR

4.1. Hücre Kültürü ve İmmünoftenotiplendirilmesi

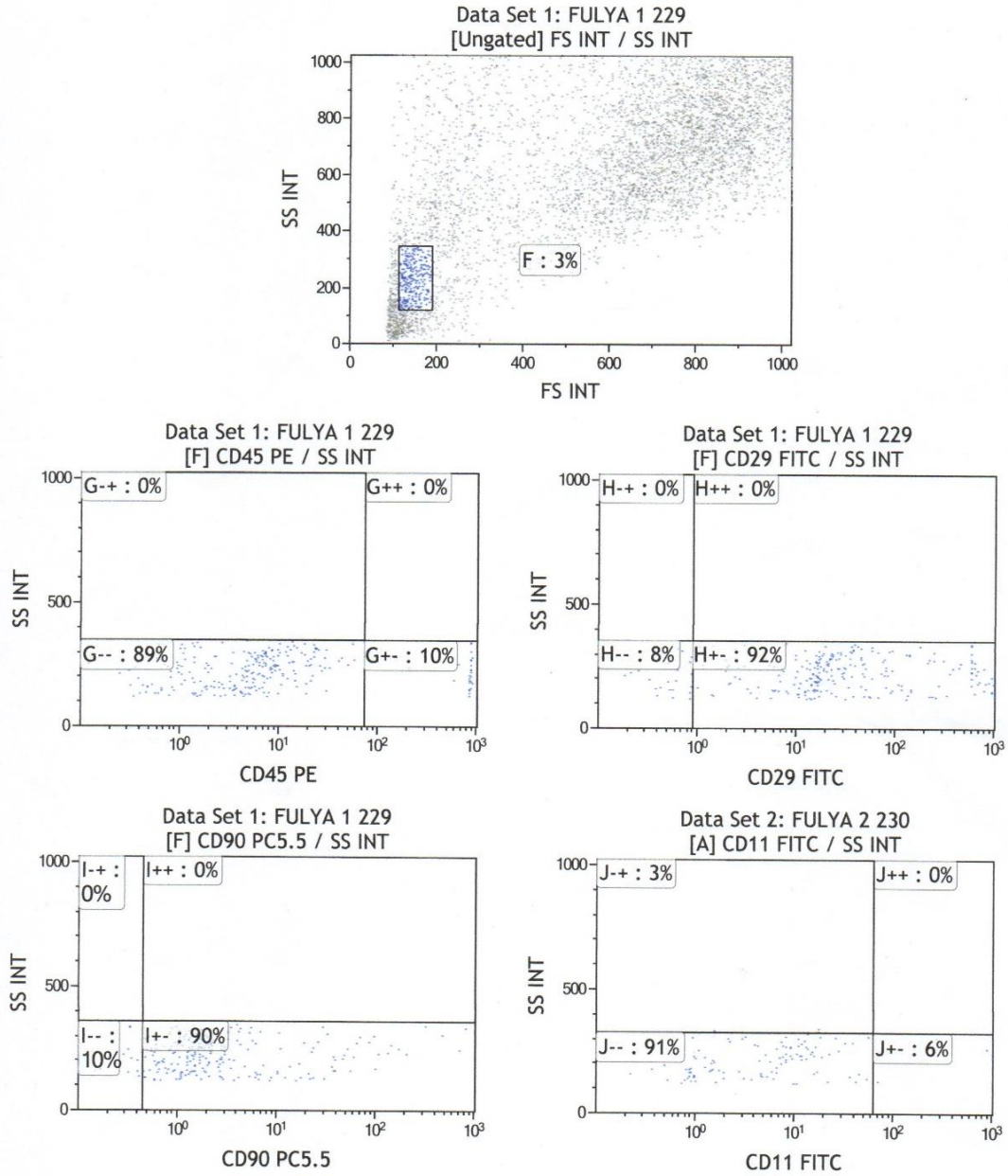
4.1.1. Sıçan Kemikiliğinden İzole Edilmiş Mezenkimal Kök Hücrelerin Kültürü ve İmmünoftenotiplendirilmesi

Kemikiliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin üçüncü pasajdaki morfolojik yapısı ışık mikroskobunda gözlemlendi (Resim 1).



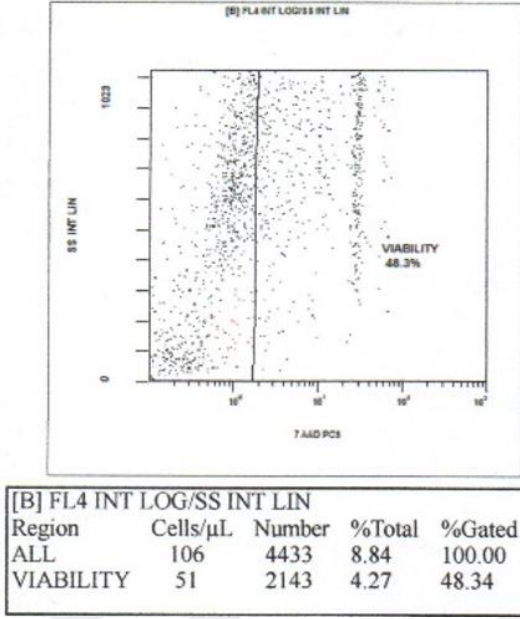
Resim 1: Mezenkimal kök hücrelerin üçüncü pasajdaki morfolojik yapısının ışık mikroskobundaki görüntüsü.

4.1.2. Kök Hücre Belirteçleri Kullanılarak Akım Sitometri İle Hücrelerin Mezenkimal Kök Hücre Olduğunun Gösterilmesi

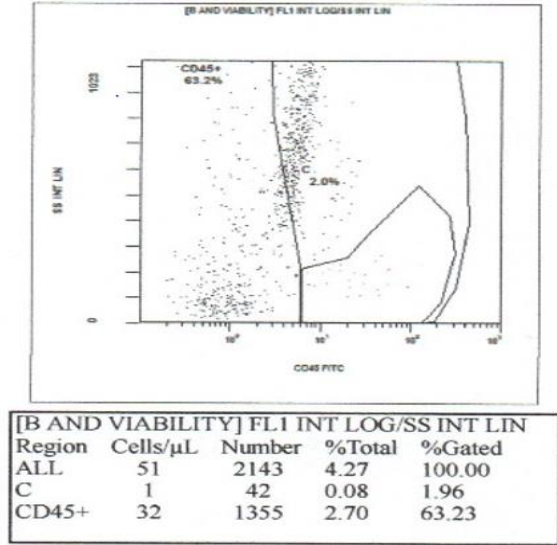


Şekil 10: Kemikliğinden izole edilen MKH'lerin immünofenotipik özelliklerinin akım sitometri sonuçları

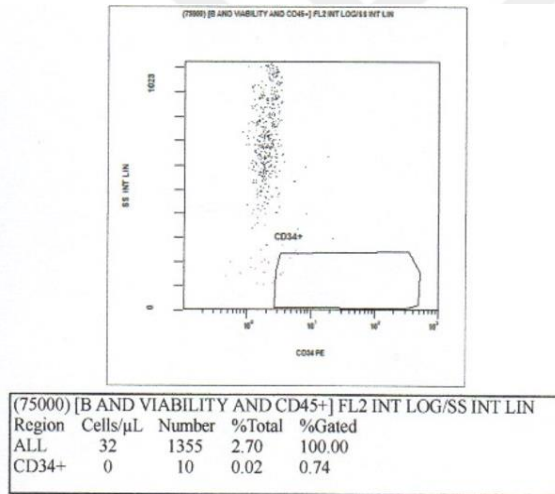
Sıçan kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücrelerin immünofenotipik karakteristik analizi için akım sitometri tekniği ile hematopoetik belirteçleri CD45 PE (% 10,0) ve CD11b FITC (% 6,0) negatif ekspresyon gösterdiği tespit edilirken, stromal belirteçleri CD29 FITC (% 92,0) ve CD90 (% 90,0) Şekil 10'da görüldüğü üzere pozitif ekspresyon göstermiştir.



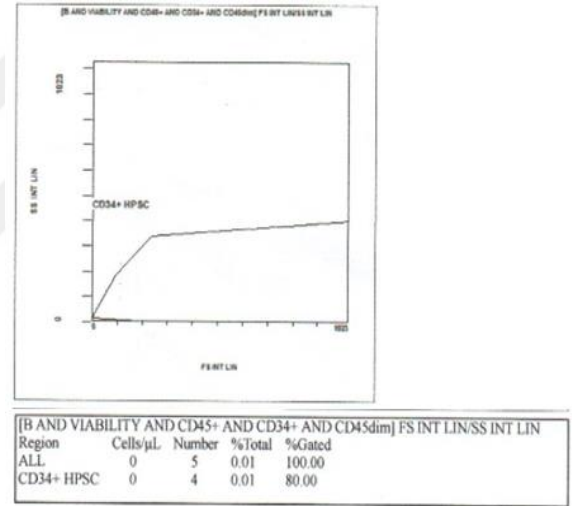
Şekil 11a:



Şekil 11b:



Şekil 11c:



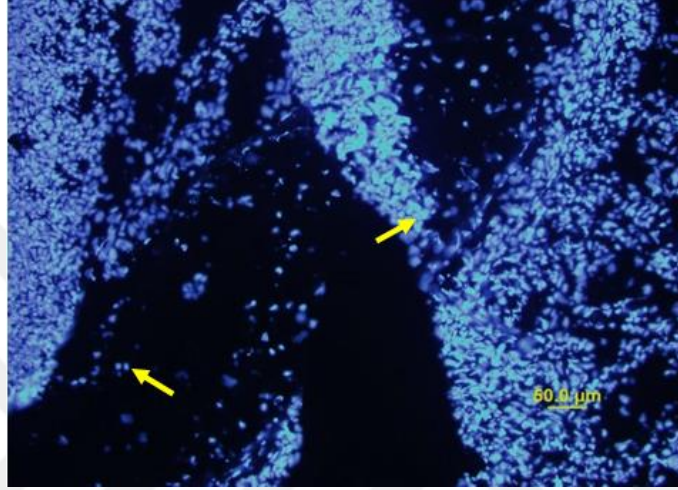
Şekil 11d:

Şekil 11: Mezenkimal kök hücre verilmiş sıçan akciğer dokusundaki CD34 sayımı.

Şekil 11a'da totalde (%48,34) oranında canlı hücre sayıldı. Şekil 11b'de totaldeki canlı hücre içerisinde CD45 oranının (%63,23); Şekil 11d'de ise CD45 içerisindeki CD34 oranının (%0,01) olduğu görüldü.

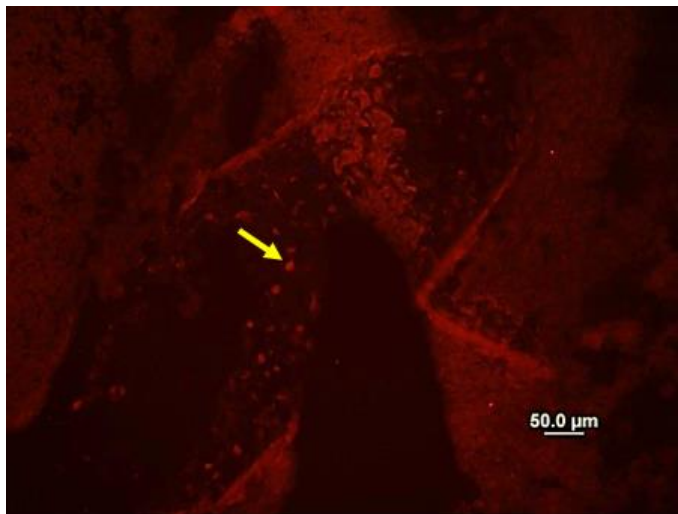
4.1.3. Kemikiliği Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Varlığının RFP (Red Fluorescent Protein) pozitifliği ile ölçülmesi

VPA + Kök hücre grubuna ait sıçanların fetüslerinden alınan beyin ve omurilik doku örneklerinde, RFP ile işaretli mezenkimal kök hücreler DAPI ve RFP için farklı filtreler kullanılarak floresan mikroskopta (Leica DMI 4000 Microsystems) görüntüleme yapılmıştır (Resim 2).



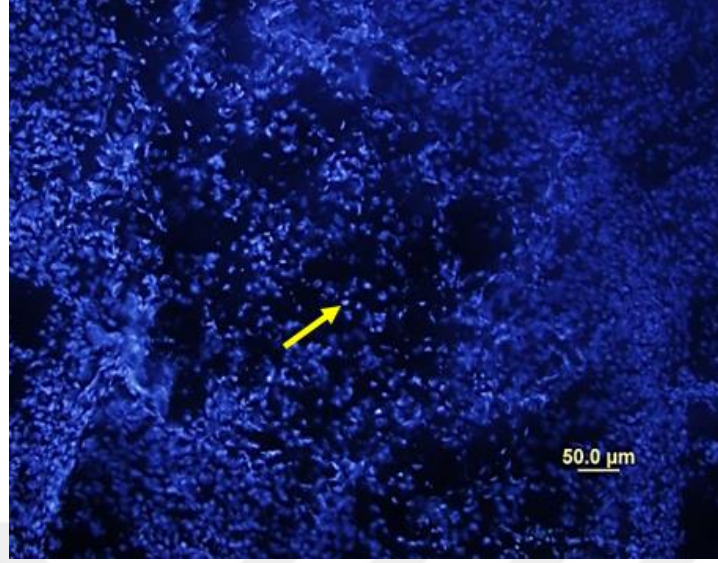
Resim 2: Sıçan fetüs beyin dokusunda mezenkimal kök hücre varlığının floresan mikroskobuyla görüntülenmesi.

Beyin dokusunda DAPI ile işaretlenen mezenkimal kök hücre çekirdekleri okla gösterildi X20.



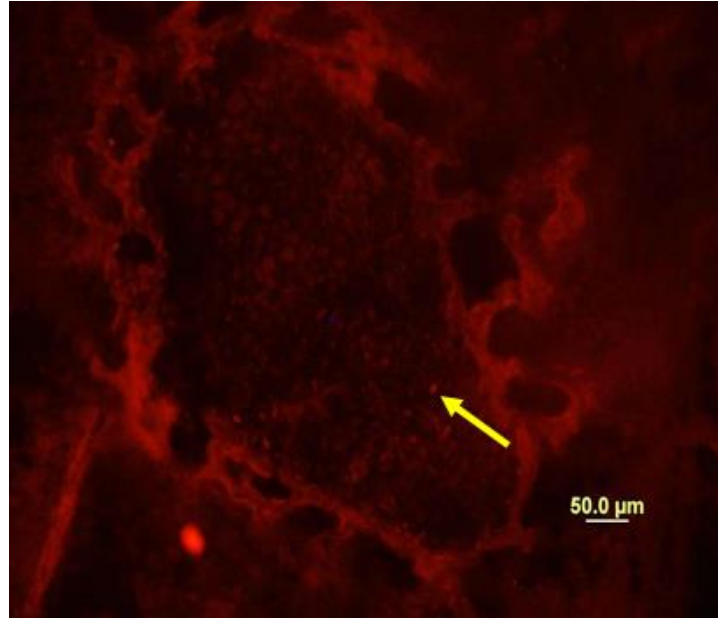
Resim 3: Sıçan fetüs beyin dokusunda mezenkimal kök hücre varlığının floresan mikroskobuyla görüntülenmesi.

Beyin dokusunda RFP ile işaretlenen mezenkimal kök hücreler okla gösterildi 20X.



Resim 4: Sıçan fetüs omurilik dokusunda mezenkimal kök hücre varlığının floresan mikroskopuyla görüntülenmesi.

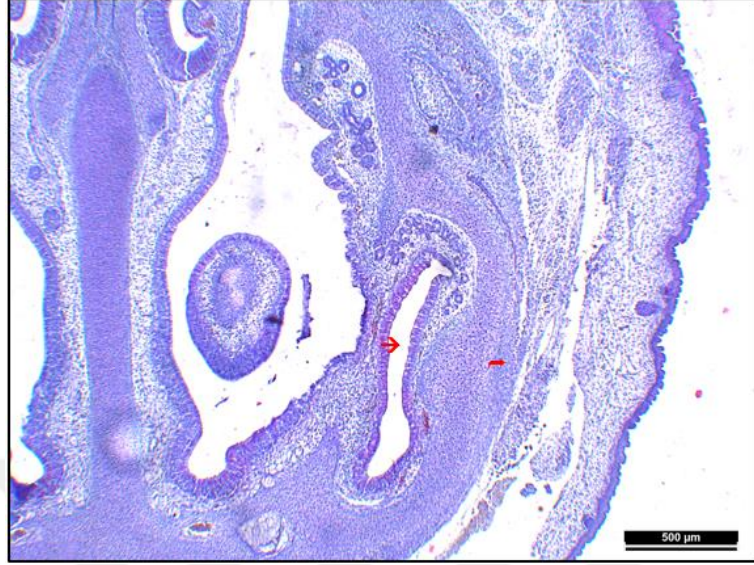
Omurilik dokusunda DAPI ile işaretlenen mezenkimal kök hücre çekirdekleri okla gösterildi X20.



Resim 5: Sıçan fetüs omurilik dokusunda mezenkimal kök hücre varlığının floresan mikroskopuyla görüntülenmesi.

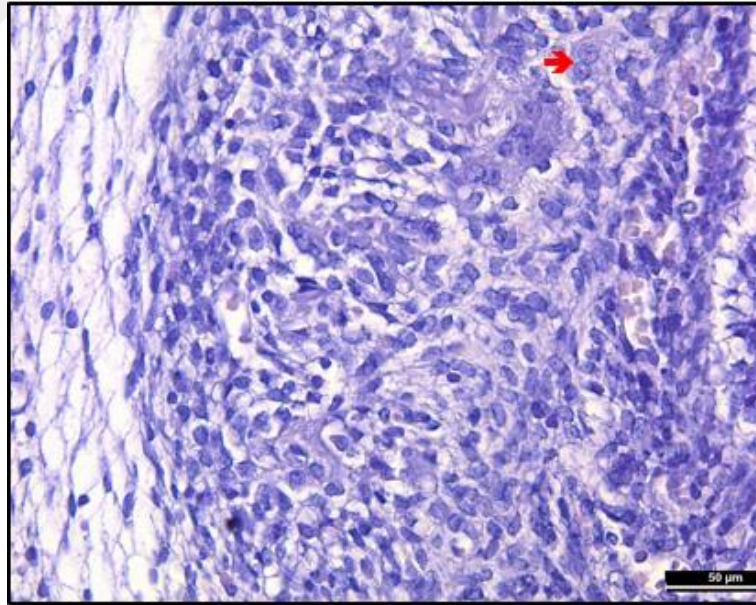
Omurilik dokusunda RFP ile işaretlenen mezenkimal kök hücreler okla gösterildi X20.

4.2. Kontrol Grubu Beyin Dokusu Hematoksilen & Eozin Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



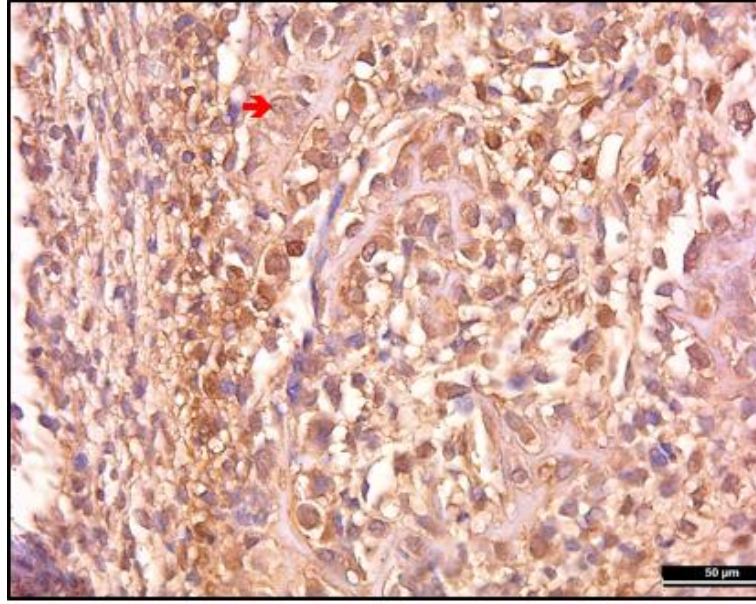
Resim 6: Kontrol grubu beyin dokusu, HE, 4x.

Lateral Ventrikül (→), Beyin (↗).



Resim 7: Kontrol grubu beyin dokusu, HE, 40x.

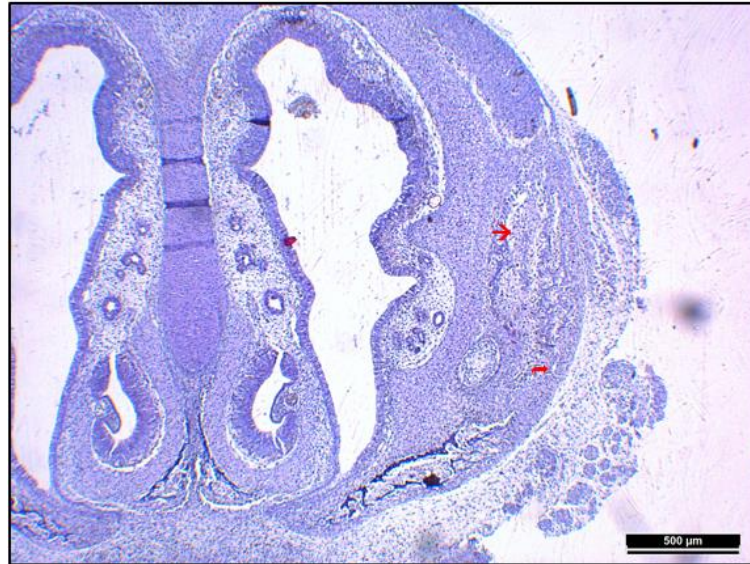
Mezenkimal Hücreler (→).



Resim 8: Kontrol grubu beyin dokusu, S100-beta, 40x.

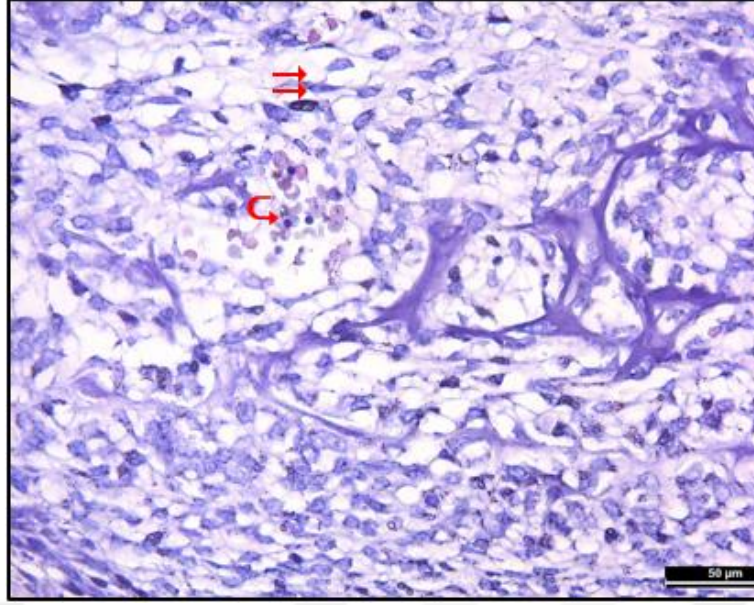
Mezenkimal Hücreler (→).

4.3. VPA Grubu Beyin Dokusu Hematoksilen & Eozin Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



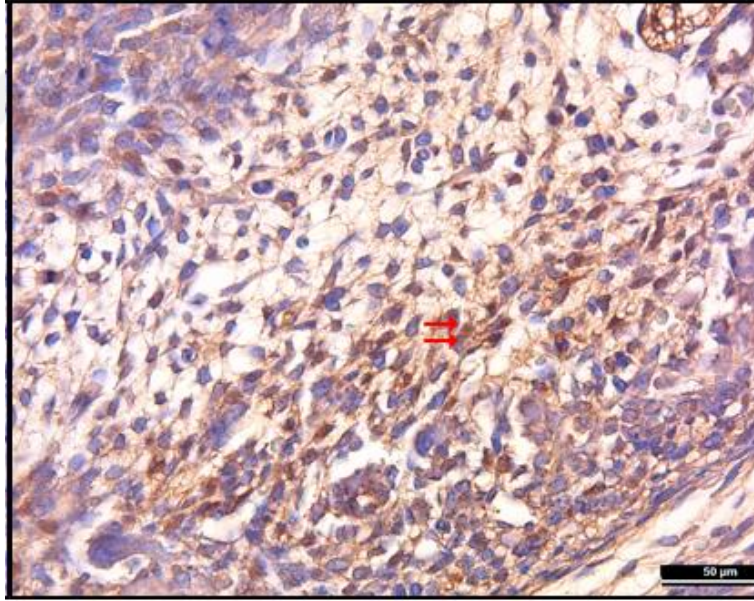
Resim 9: VPA grubu beyin dokusu, HE, 4x.

Lateral Ventrikül (→), Beyin (↖).



Resim 10: VPA grubu beyin dokusu, HE, 40x.

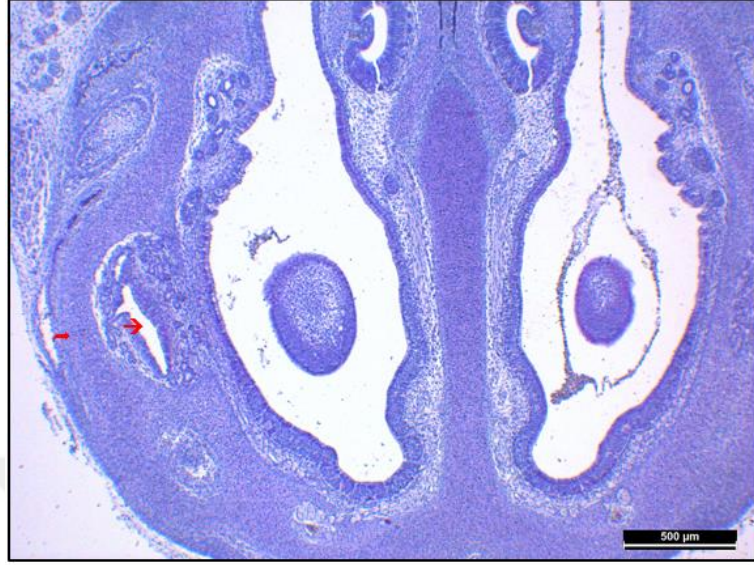
Nöron (⇒), Kan Hücreleri (↪).



Resim 11: VPA grubu beyin dokusu, S100-beta, 40x.

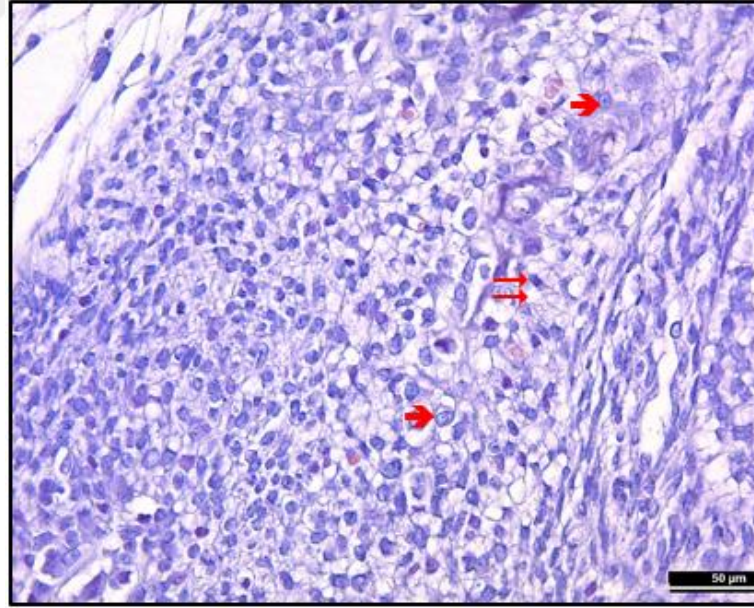
Nöron (⇒).

4.4. VPA+Kök Grubu Beyin Dokusu Hematoksilen & Eozin Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



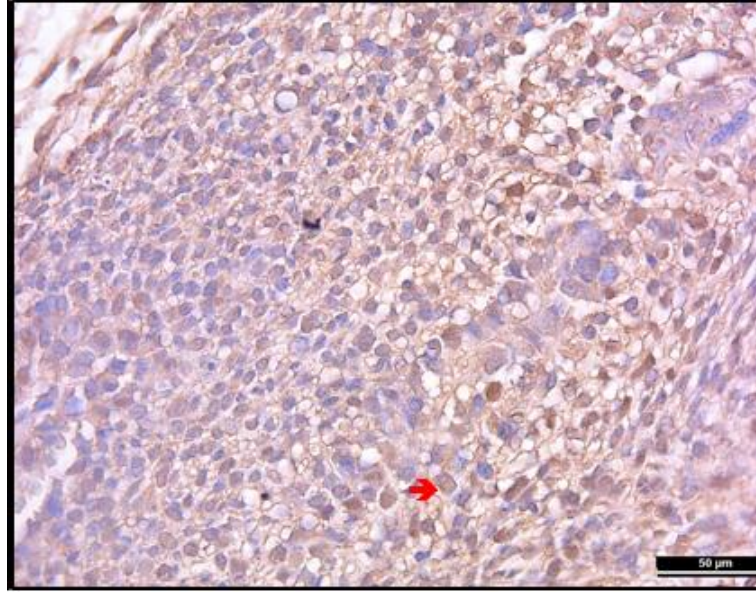
Resim 12: VPA+Kök grubu beyin dokusu, HE, 4x.

Lateral Ventrikül (→), Beyin (↗).



Resim 13: VPA+Kök grubu beyin dokusu, HE, 40x.

Nöron (→), Mezenkimal Hücreler (↗).



Resim 14: VPA+Kök grubu beyin dokusu, S100-beta, 40x.

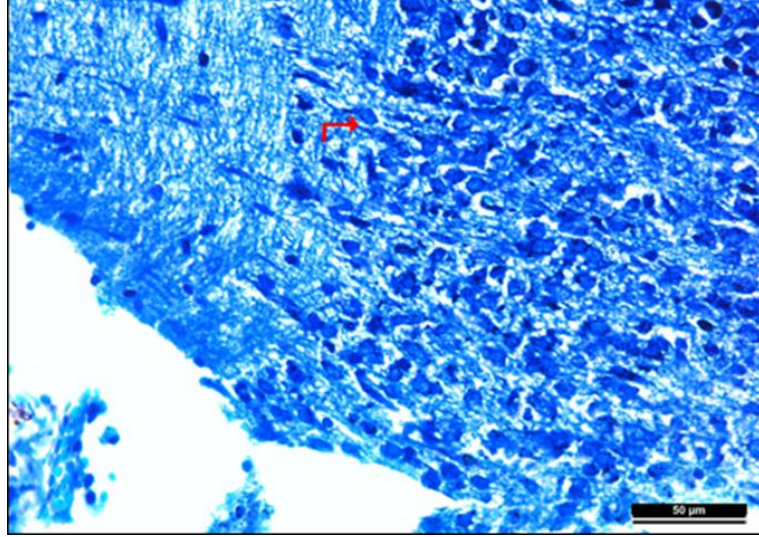
Mezenkimal Hücreler (→).

4.5. Kontrol Grubu Omurilik Dokusu Servikal Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



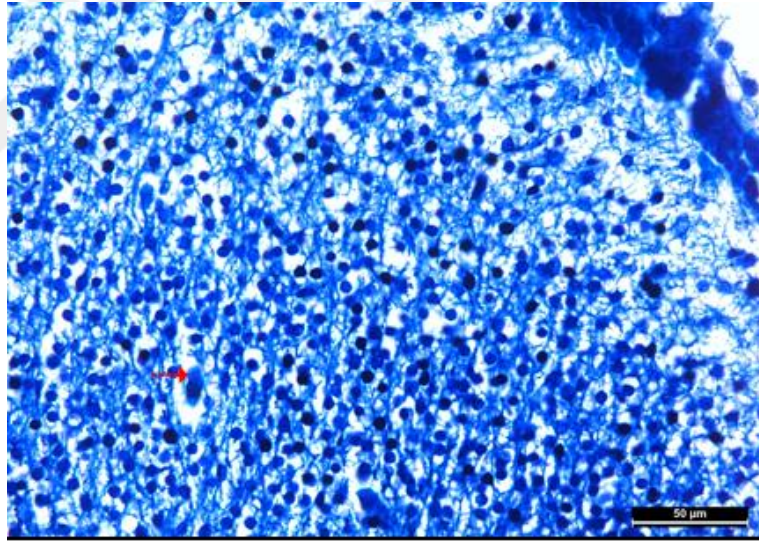
Resim 15: Kontrol grubu omurilik dokusu, servikal bölge, HE, 4x.

Pia mater (→), Substantia grisea (⇒), Substantia alba (⇨), Kanalis Sentralis ve Ependim Hücreleri (→ı), Ön Boynuz (‡), Arka Boynuz (↯).



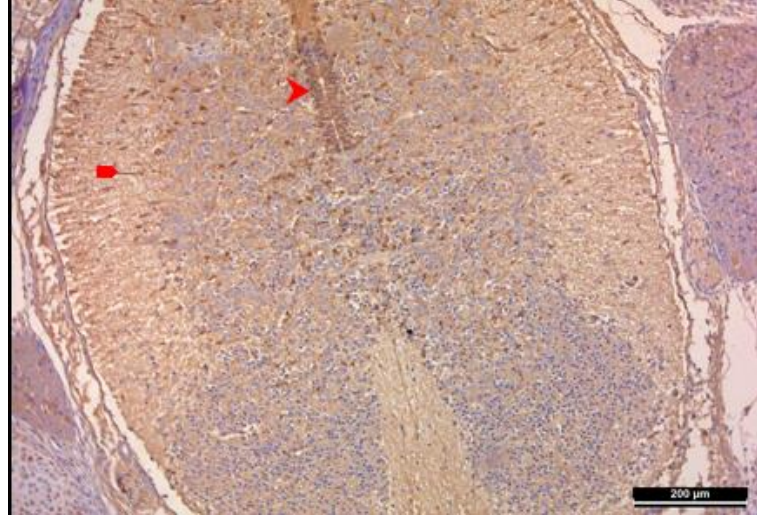
Resim 16: Kontrol grubu omurilik dokusu, servikal bölge, ön boynuz, Toluidin Blue O, 40x.

Motor Nöron (→).



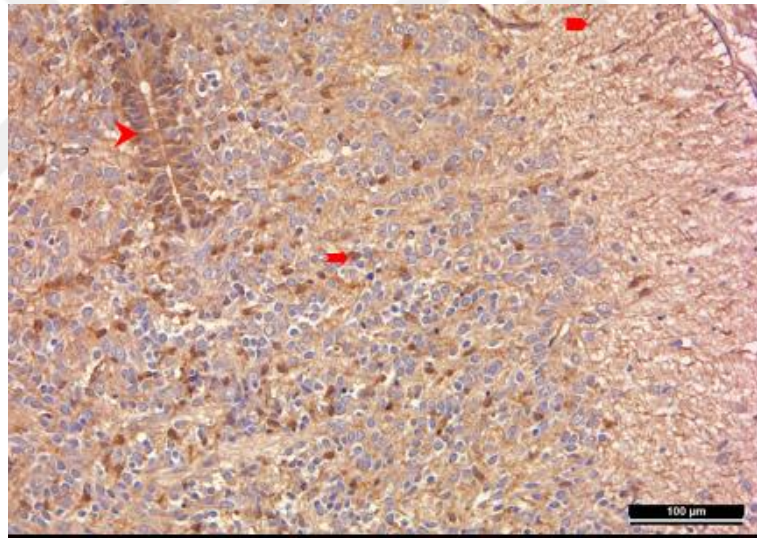
Resim 17: Kontrol grubu omurilik dokusu, servikal bölge, arka boynuz, Toluidin Blue O, 40x.

Duyu nöron (→).



Resim 18: Kontrol grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta, 10x.

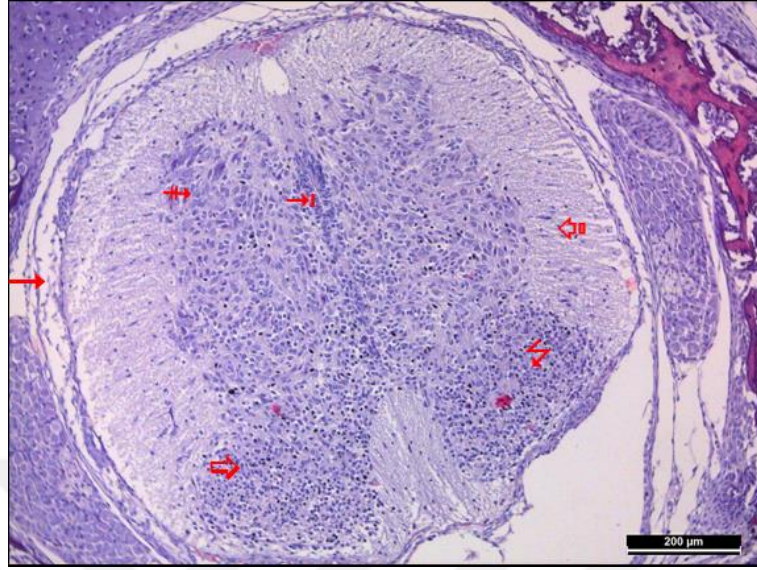
Pozitif immünreaktivite gösteren ependim hücreleri (➤), Pozitif immünreaktivite gösteren aksonlar (■).



Resim 19: Kontrol grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta, 20x.

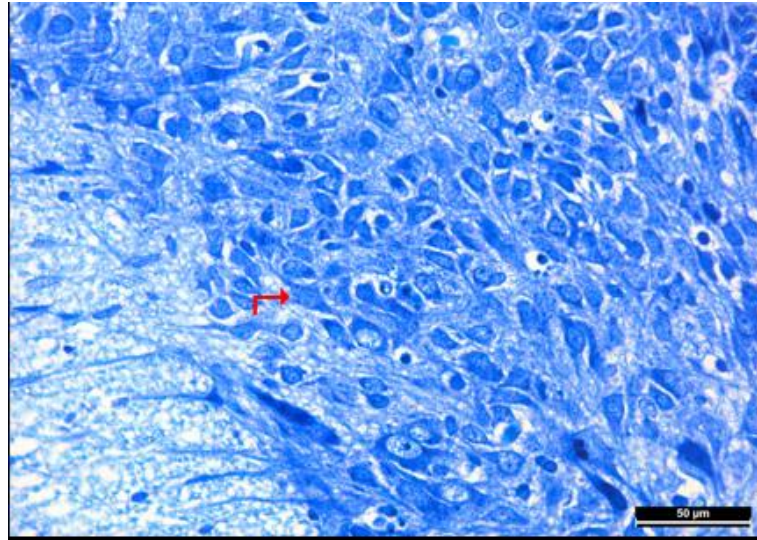
Pozitif immünreaktivite gösteren ependim hücreleri (➤), Pozitif immünreaktivite gösteren aksonlar (■), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Astrositler (➤).

4.6. Kontrol Grubu Omurilik Dokusu Torakal Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



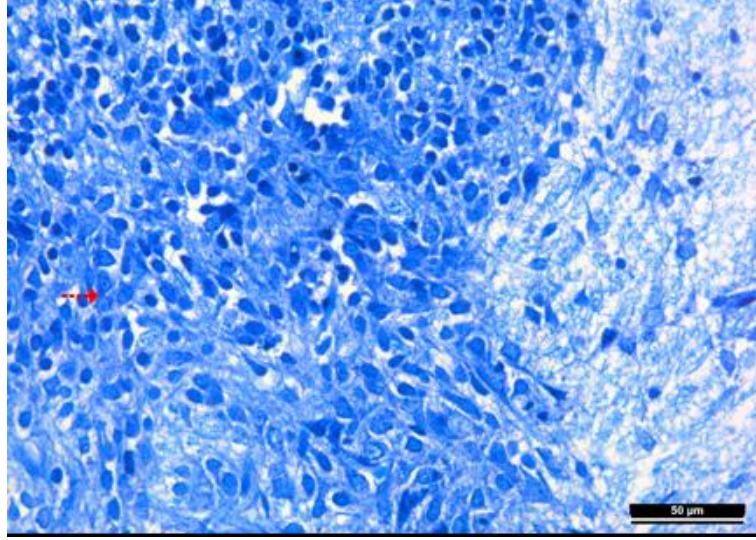
Resim 20: Kontrol grubu omurilik dokusu, torakal bölge, HE,4x.

Pia mater (→), Substantia grisea (⇨), Substantia alba (⇧), Kanalis Sentralis ve Ependim Hücreleri (→), Ön Boynuz (⌘), Arka Boynuz (↙), Motor Nöron (↗), Duyu Nöron (↘).



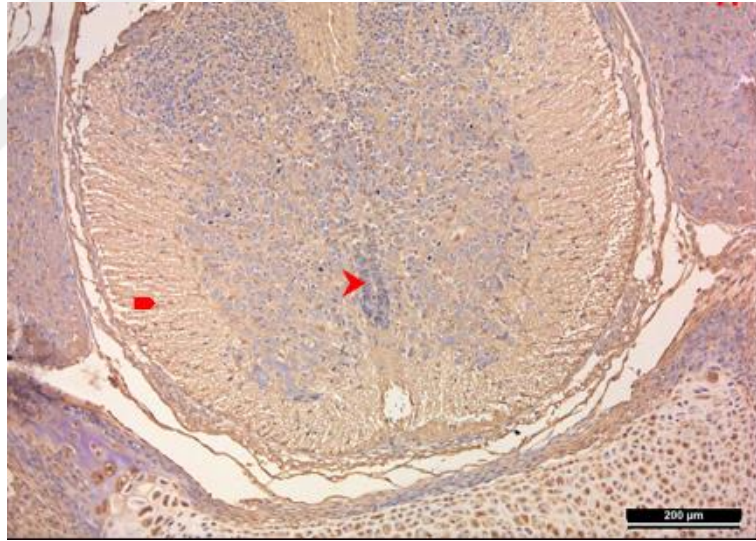
Resim 21: Kontrol grubu omurilik dokusu, torakal bölge, ön boynuz, Toluidin Blue O, 40x.

Motor nöron (↗).



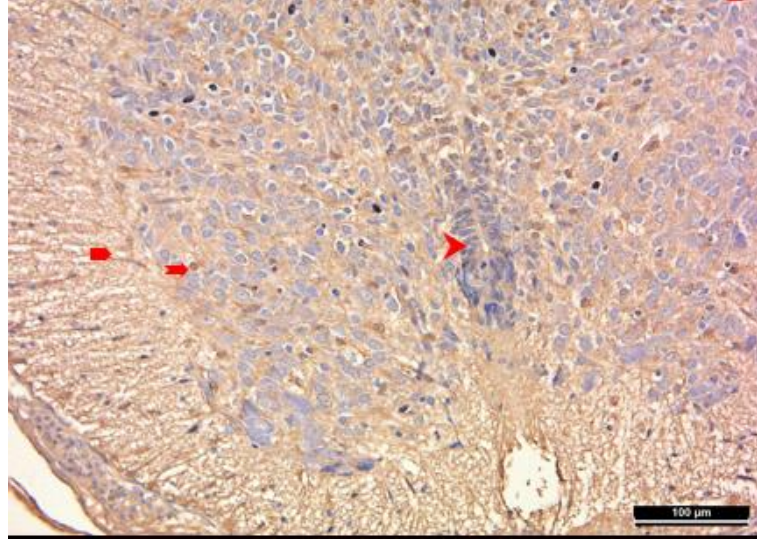
Resim 22: Kontrol grubu omurilik dokusu, torakal bölge, arka boynuz, Toluidin Blue O, 40x.

Duyu nöron (→).



Resim 23: Kontrol grubu omurilik dokusu, torakal bölge, S100-beta, 10x.

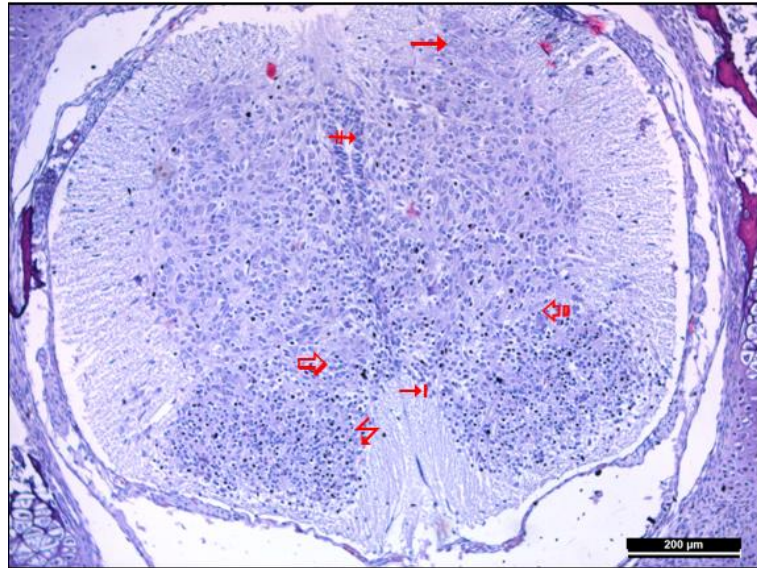
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (►), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (►).



Resim 24: Kontrol grubu omurilik dokusu, torakal bölge, S100-beta,20x.

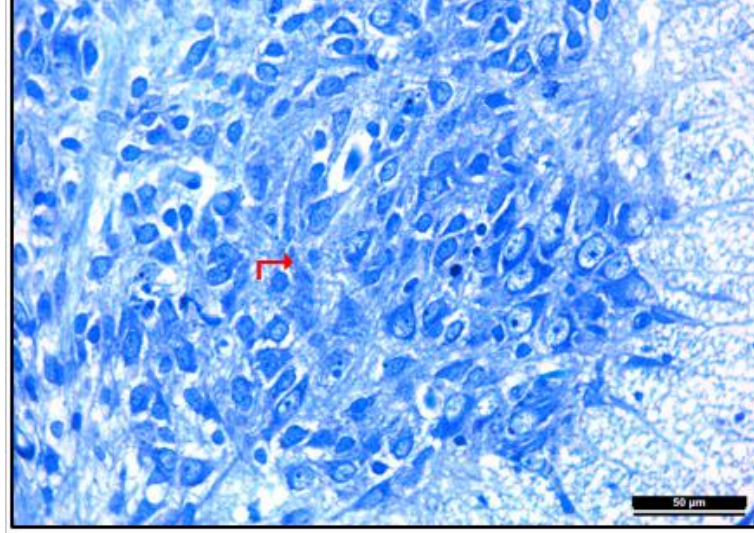
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Astrositler (➡).

4.7. Kontrol Grubu Omurilik Dokusu Lumbar Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



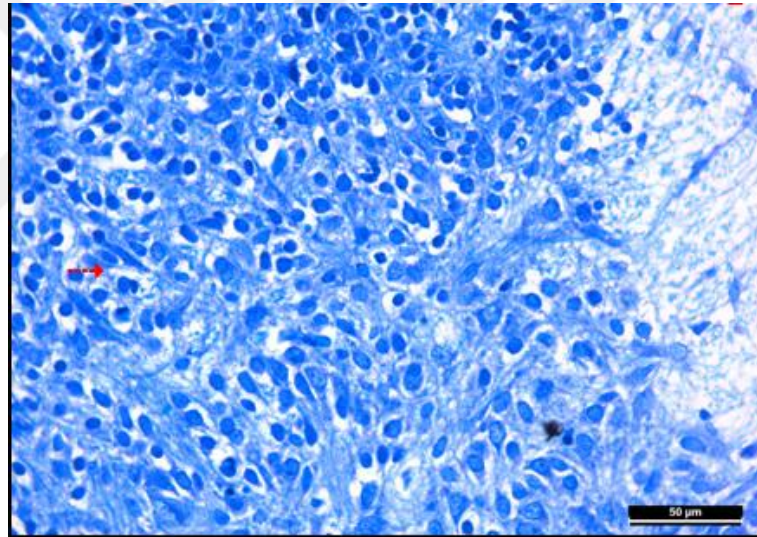
Resim 25: Kontrol grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, HE,10x.

Substantia grisea (⇨),Substantia alba (⇦),Kanalıs Sentralıs ve Ependım Hücreleri (→), Ön Boynuz (⇦),Arka Boynuz (⇨),Duyu Nöron (→).



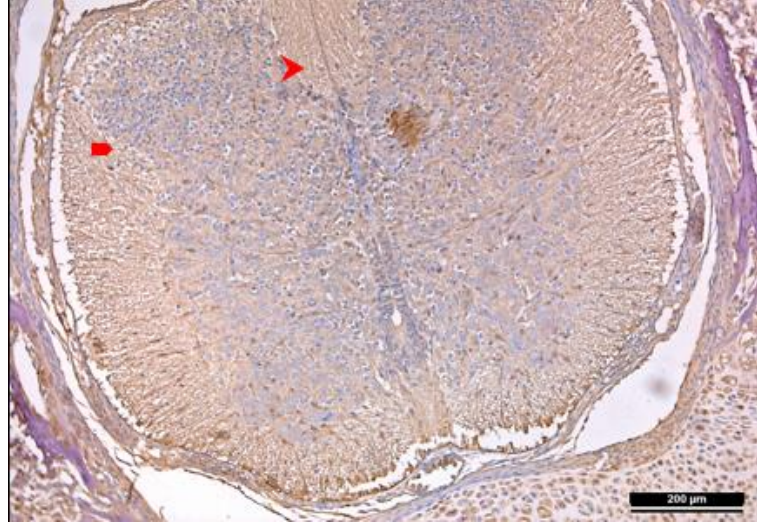
Resim 26: Kontrol grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, ön boynuz, Toluidin Blue O,40x.

Motor nöron (↗).



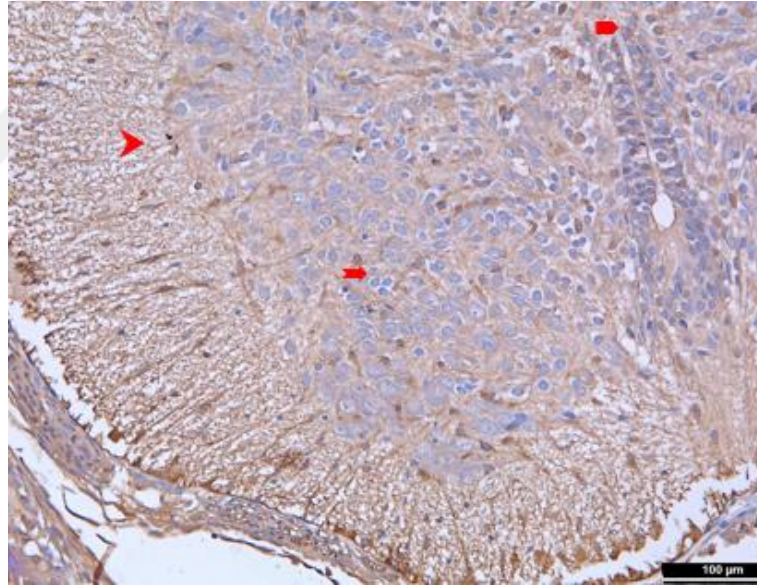
Resim 27: Kontrol grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, arka boynuz, Toluidin Blue O, 40x.

Duyu nöron (→).



Resim 28: Kontrol grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta,10x.

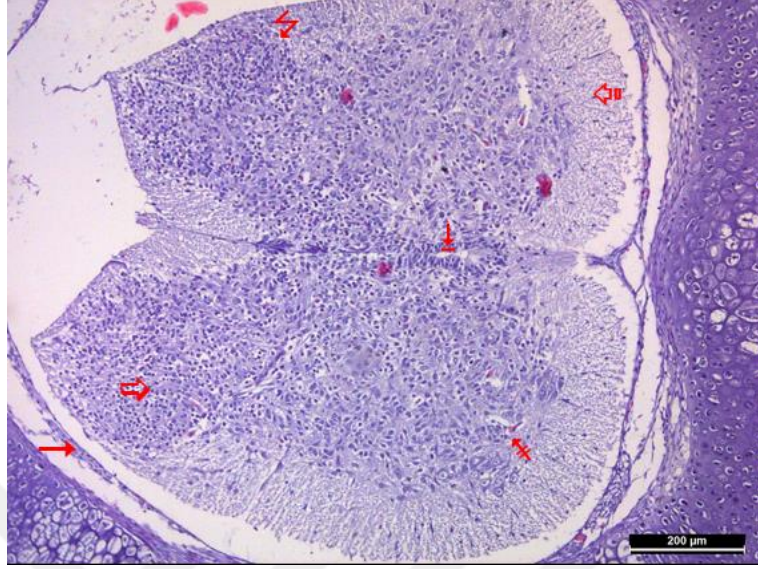
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).



Resim 29: Kontrol grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta,20x.

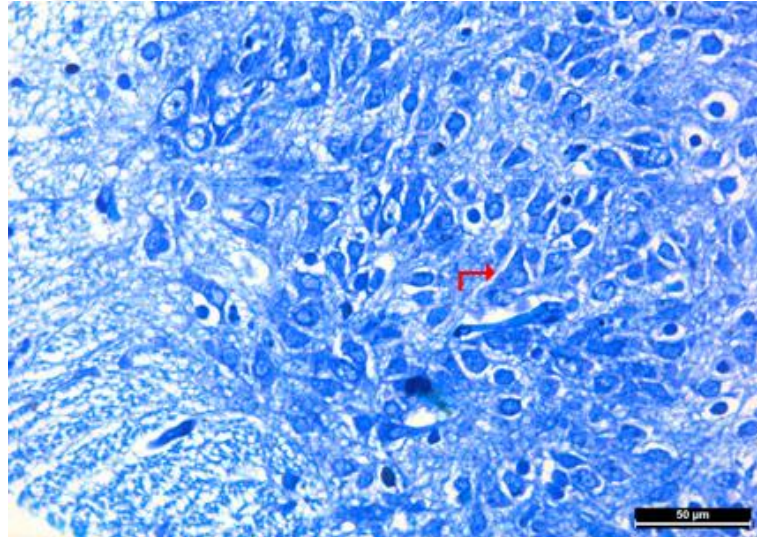
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Astrositler (➡), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).

4.8. Kontrol Grubu Omurilik Dokusu Sakral Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



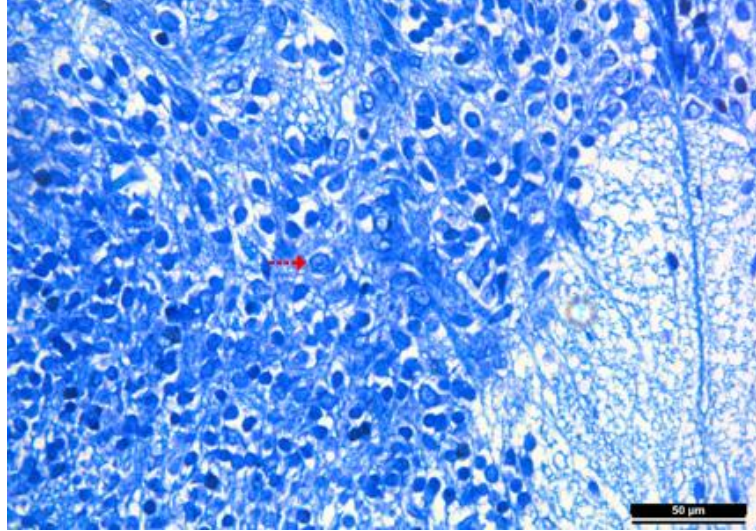
Resim 30: Kontrol grubu omurilik dokusu, sakral bölge, HE,10x.

Pia mater (→),Substantia grisea (⇒),Substantia alba (⇐),Kanalıs Sentralıs ve Ependım Hücreleri (↗),Ön Boynuz (‡),Arka Boynuz (↘).



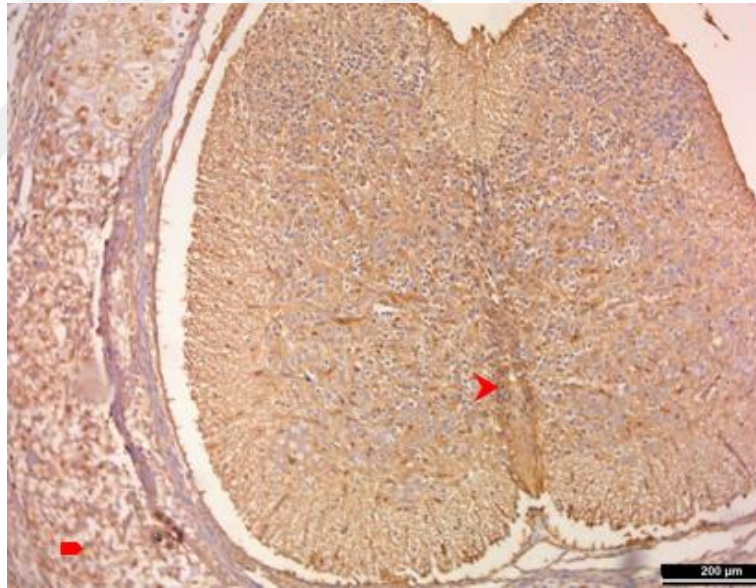
Resim 31: Kontrol grubu omurilik dokusu, sakral bölge, ön boynuz, Toluidin Blue O,40x.

Motor nöron (↗).



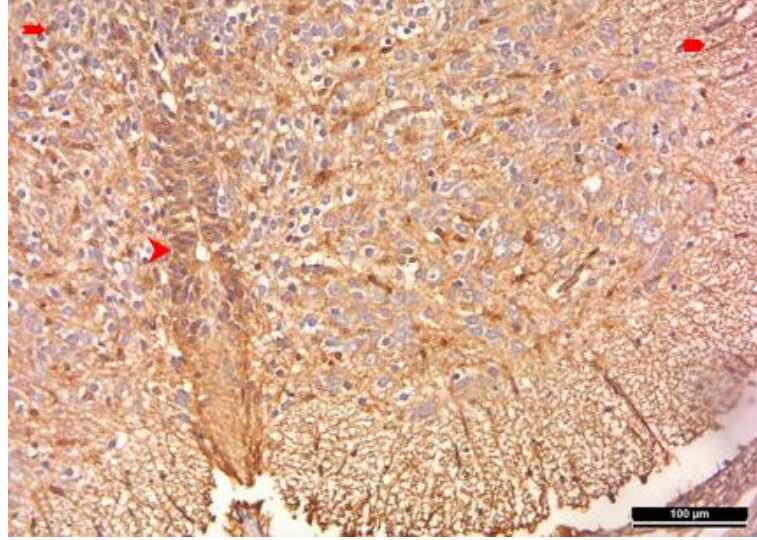
Resim 32: Kontrol grubu omurilik dokusu, sakral bölge, arka boynuz, Toluidin Blue O, 40x.

Duyu nöron (→).



Resim 33: Kontrol grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 10x.

Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).



Resim 34: Kontrol grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 20x.

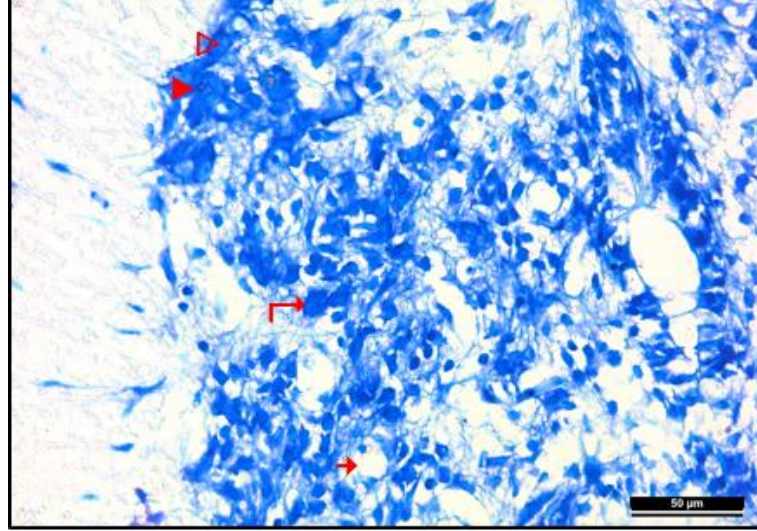
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Astrositler (➡), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).

4.9. VPA Grubu Omurilik Dokusu Servikal Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



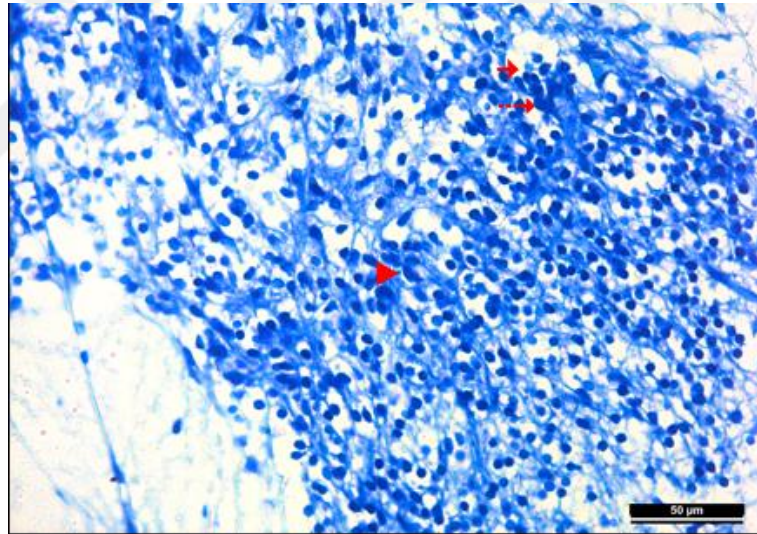
Resim 35: VPA grubu omurilik dokusu, servikal bölge, HE,10x.

Pia mater (→), Substantia grisea (⇨),Substantia alba (⇩),Kanalıs Sentralıs ve Ependım Hücreleri (→ı),Ön Boynuz (⌘),Arka Boynuz (⌘),Kanalıs Sentralıste Birleşme (⇨), Dejeneratif Nöronlar (➤).



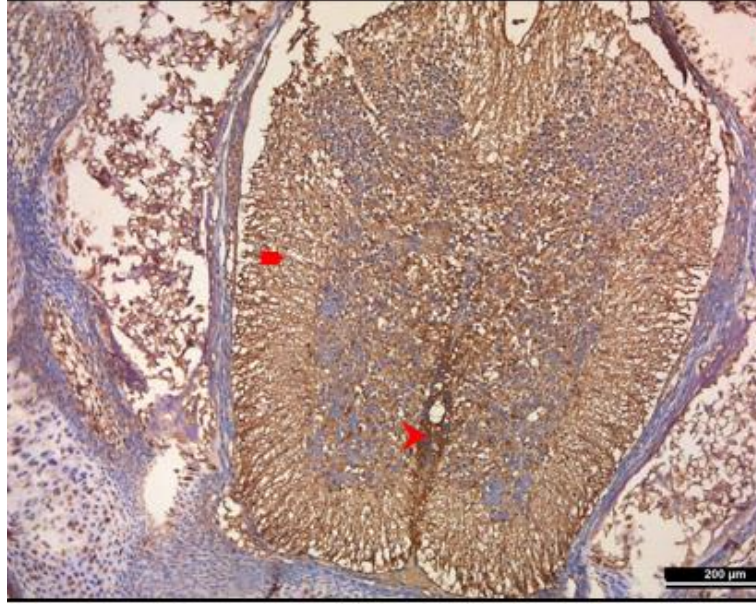
Resim 36: VPA grubu omurilik dokusu, servikal bölge, ön boynuz, Toluidin Blue O,40x.

Motor nöron (→), Dejeneratif nöronlar (▶), Gruplaşmış deforme nöronlar (▷),Ödem (→).



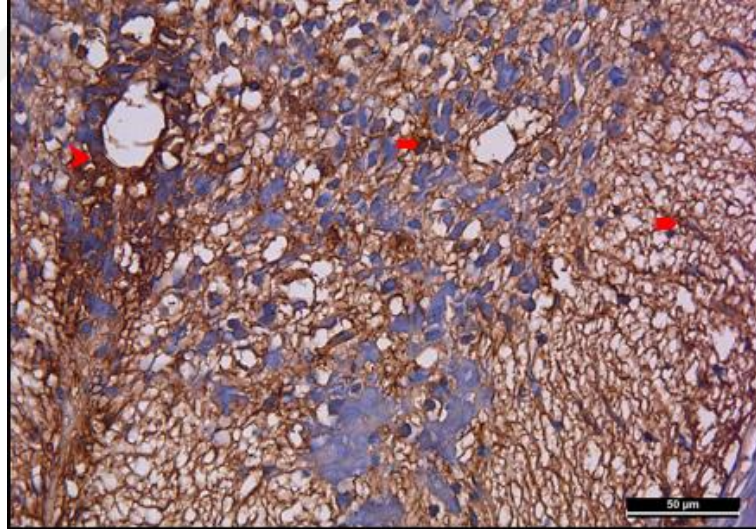
Resim 37: VPA grubu omurilik dokusu, servikal bölge, arka boynuz, Toluidin Blue O,40x.

Duyu Nöron (→), Dejeneratif Nöronlar (▶), Ödem (→).



Resim 38: VPA grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta,10x.

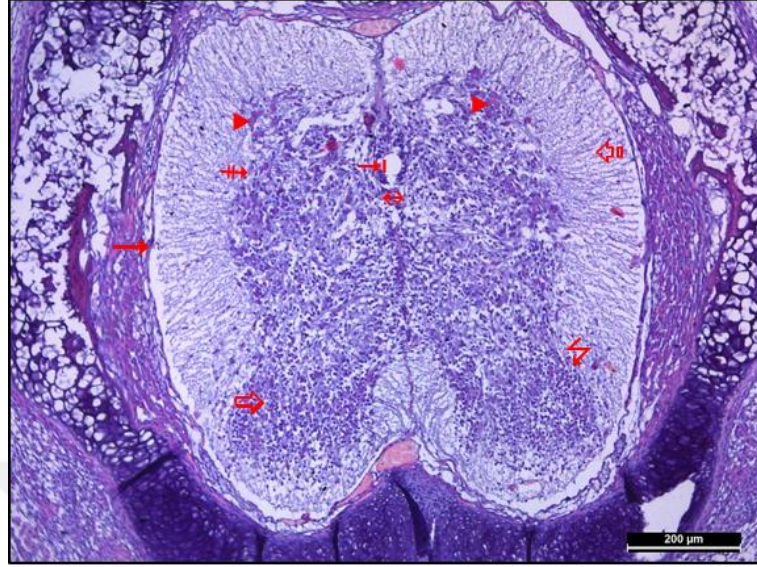
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).



Resim 39: VPA grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta,40x.

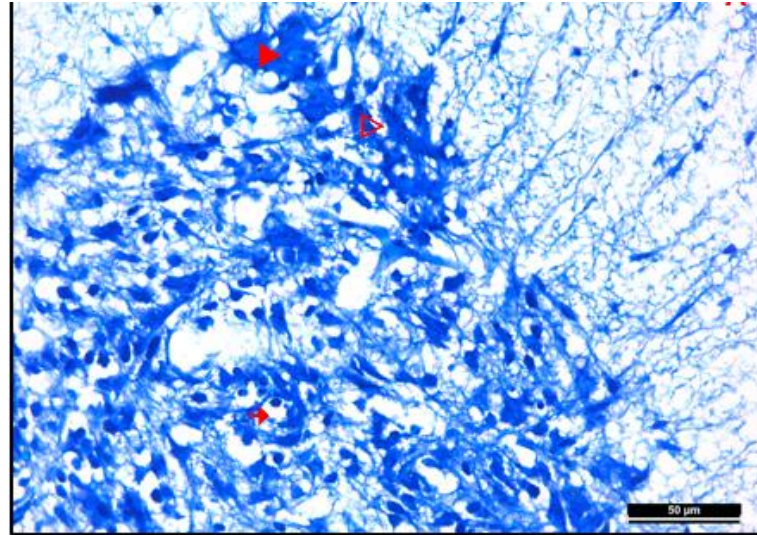
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Astrositler (➡), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).

4.10. VPA Grubu Omurilik Dokusu Torakal Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



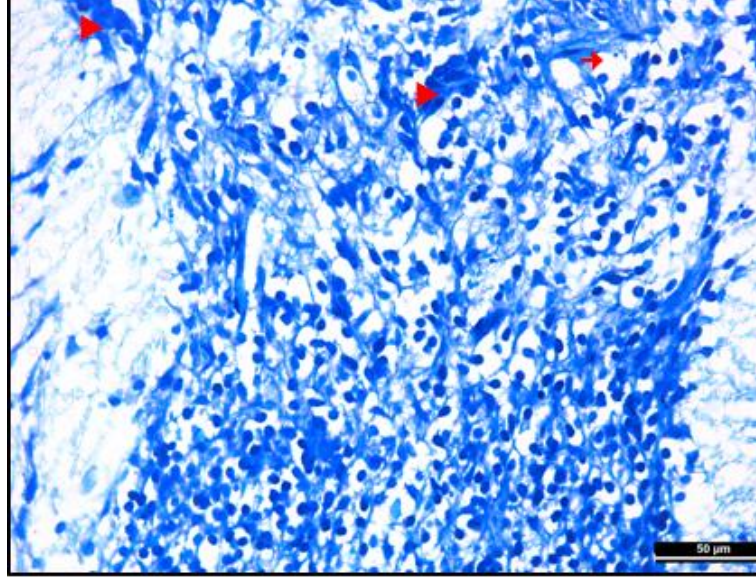
Resim 40: VPA grubu omurilik dokusu, torakal bölge, HE,10x.

Pia mater (→),Substantia grisea (⇔),Substantia alba (⇨),Kanalıs Sentralıs ve Ependım Hücreleri (→),Ön Boynuz (‡),Arka Boynuz (↵), ,Kanalıs Sentralıste Birleşme (⇔), Dejeneratif Nöronlar (►).



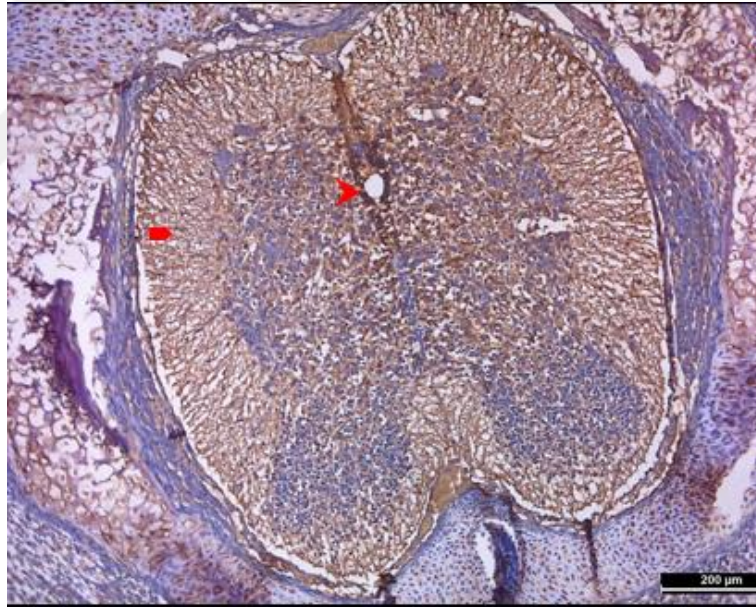
Resim 41: VPA grubu omurilik dokusu, torakal bölge, ön boynuz, Toluidin blue O, 40x.

Dejeneratif Nöronlar (►), Gruplaşmış Deforme Nöronlar (▷), Ödem (→).



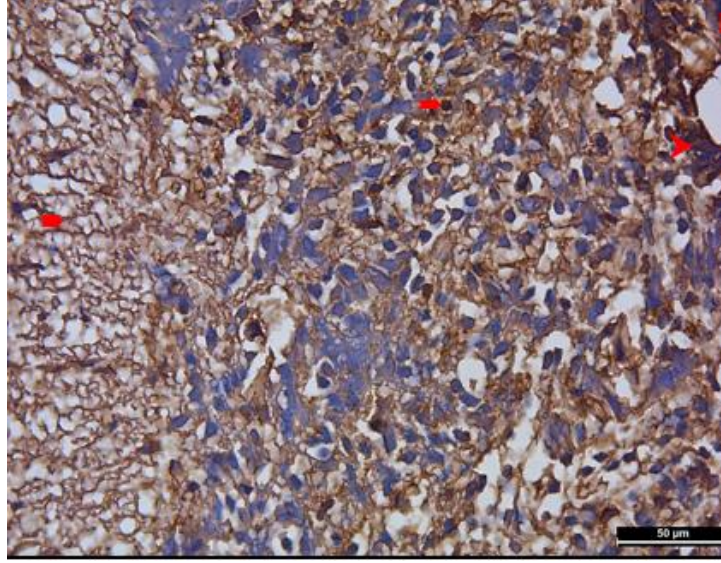
Resim 42: VPA grubu omurilik dokusu, torakal bölge, arka boynuz, Toluidin blue O, 40x.

Dejeneratif Nöronlar (►), Ödem (→).



Resim 43: VPA grubu omurilik dokusu, torakal bölge, S100-beta, 10x.

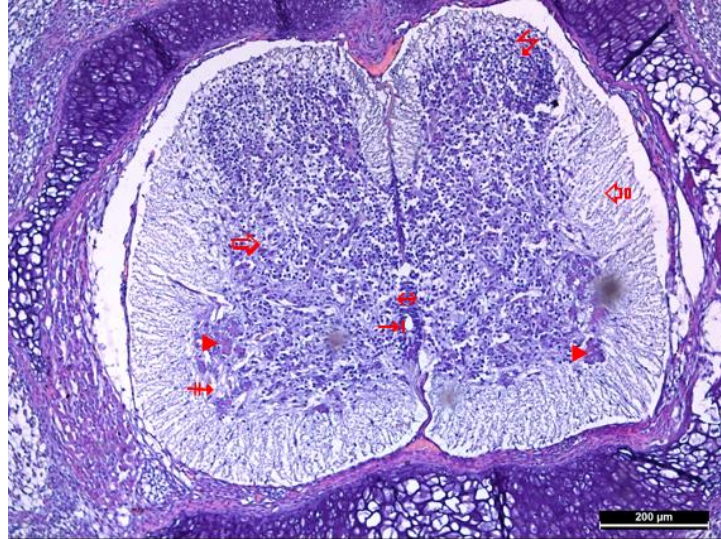
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (►), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (→).



Resim 44: VPA grubu omurilik dokusu, torakal bölge, S100-beta, 40x.

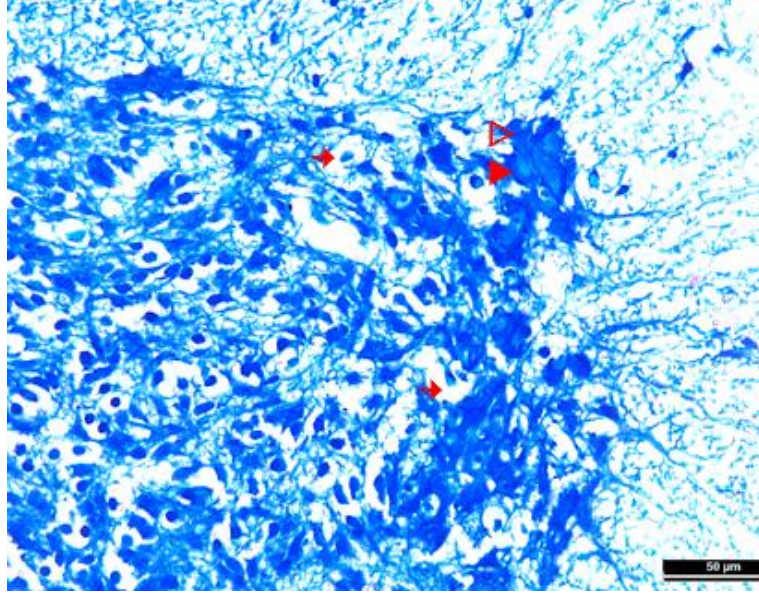
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Astrositler (➡), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➤).

4.11. VPA Grubu Omurilik Dokusu Lumbar Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



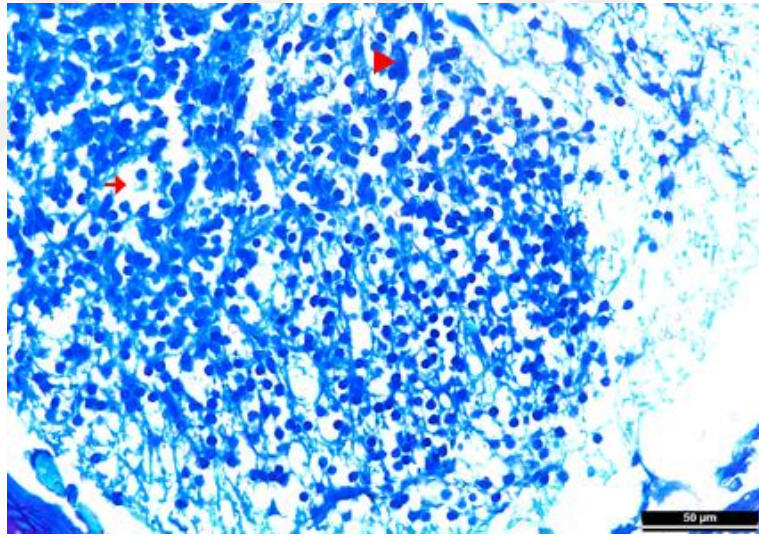
Resim 45: VPA grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, HE, 4x.

Substantia grisea (⇒), Substantia alba (⇌), Kanalis Sentralis ve Ependim Hücreleri (→), Ön Boynuz (⊕), Arka Boynuz (↵), Kanalis Sentraliste Birleşme (↔), Dejeneratif Nöronlar (➤).



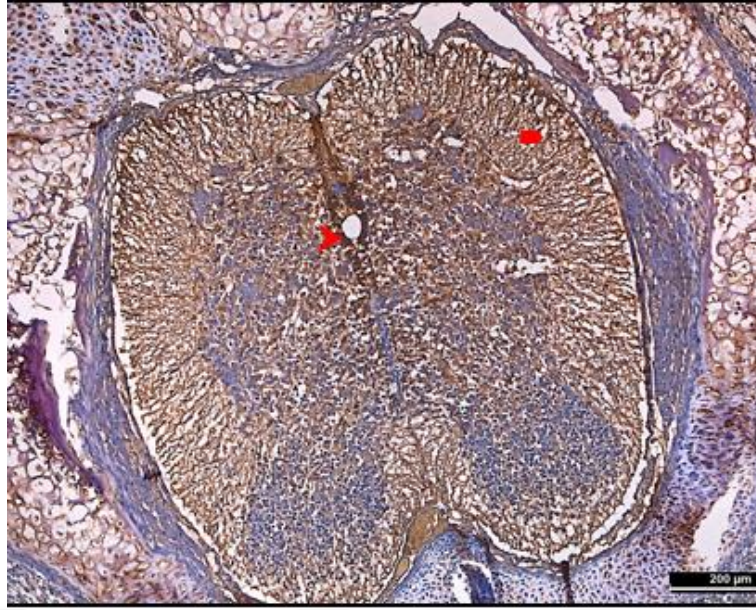
Resim 46: VPA grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, ön boynuz, Toluidine Blue O, 20x.

Dejeneratif Nöronlar (►), Gruplaşmış Deforme Nöronlar (▷), Ödem (→).



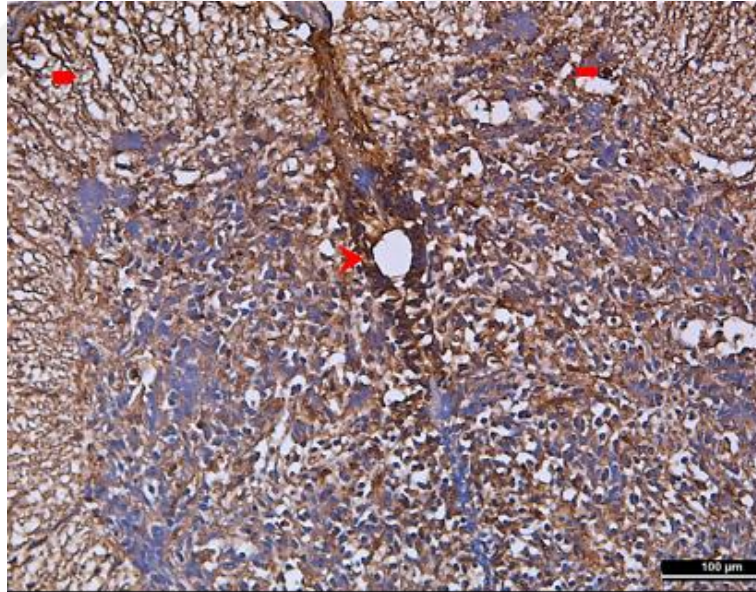
Resim 47: VPA grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, arka boynuz, Toluidine Blue O, 20x.

Dejeneratif Nöronlar (►), Ödem (→).



Resim 48: VPA grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta,10x.

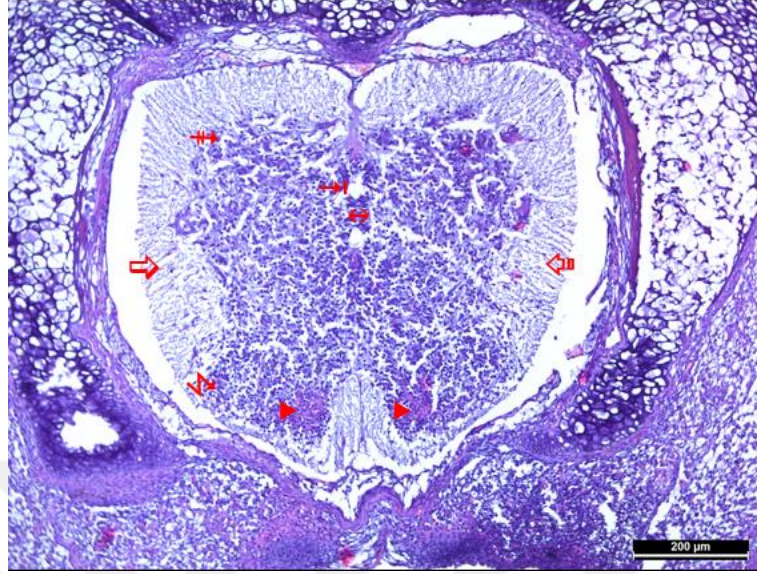
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).



Resim 49: VPA grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta, 20x.

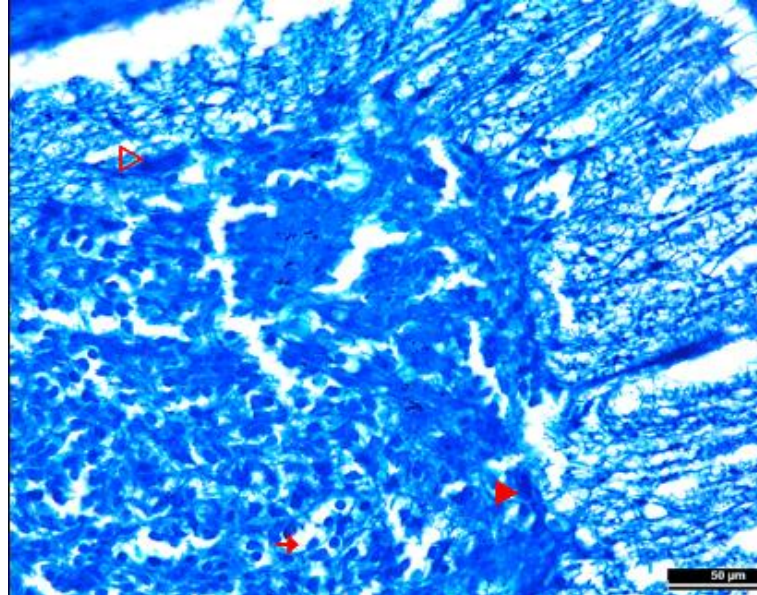
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Astrositler (➤).

4.12. VPA Grubu Omurilik Dokusu Sakral Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



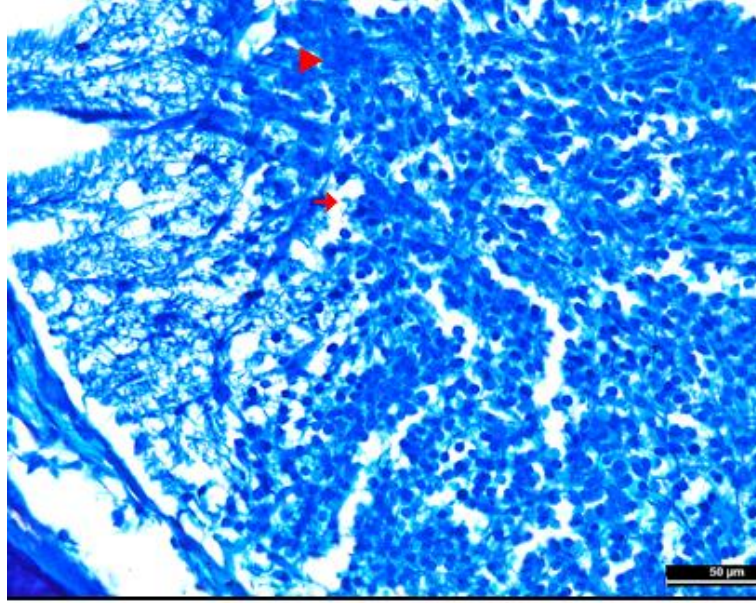
Resim 50: VPA grubu omurilik dokusu, sakral bölge, HE, 10x.

Substantia grisea (⇒), Substantia alba (⇌), Kanalis Sentralis ve Ependim Hücreleri (→), Ön Boynuz (⌘), Arka Boynuz (↵), Kanalis Sentralisde Birleşme (↔), Dejeneratif Nöronlar (▶).



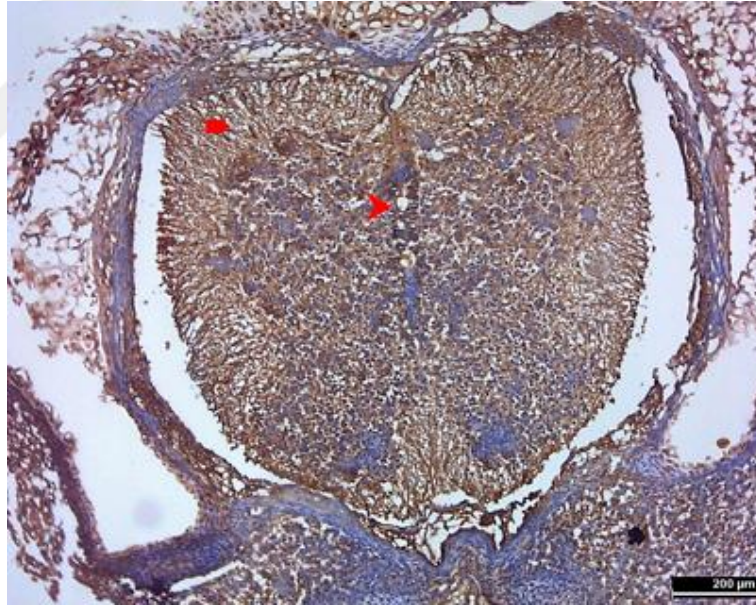
Resim 51: VPA grubu omurilik dokusu, sakral bölge, ön boynuz, Toluidin blue O, 40x.

Dejeneratif Nöronlar (▶), Gruplaşmış Deforme Nöronlar (▷), Ödem (→).



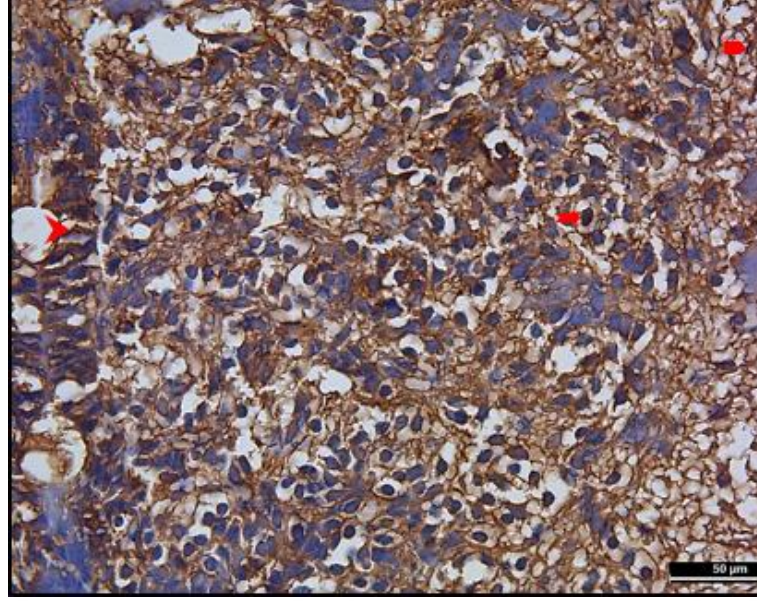
Resim 52: VPA grubu omurilik dokusu, sakral bölge, arka boynuz, Toluidin blue O, 40x.

Dejeneratif Nöronlar (►), Ödem (→).



Resim 53: VPA grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 10x.

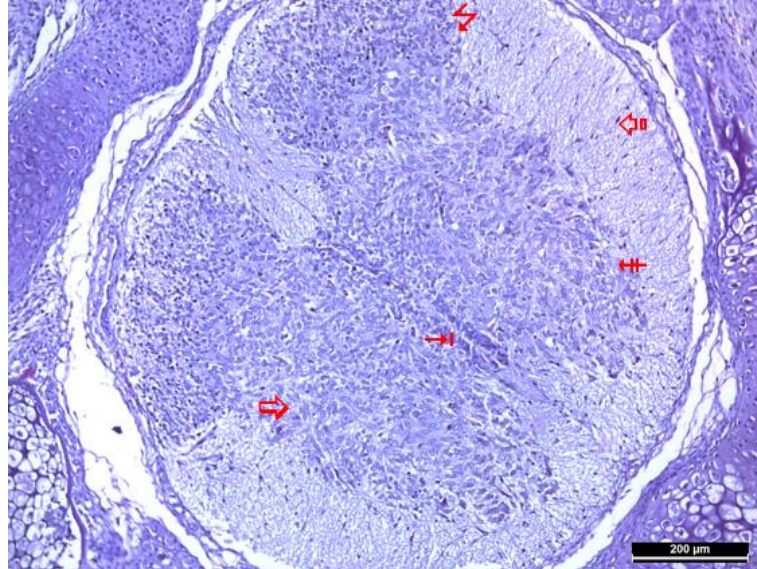
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (►), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (►).



Resim 54: VPA grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 40x.

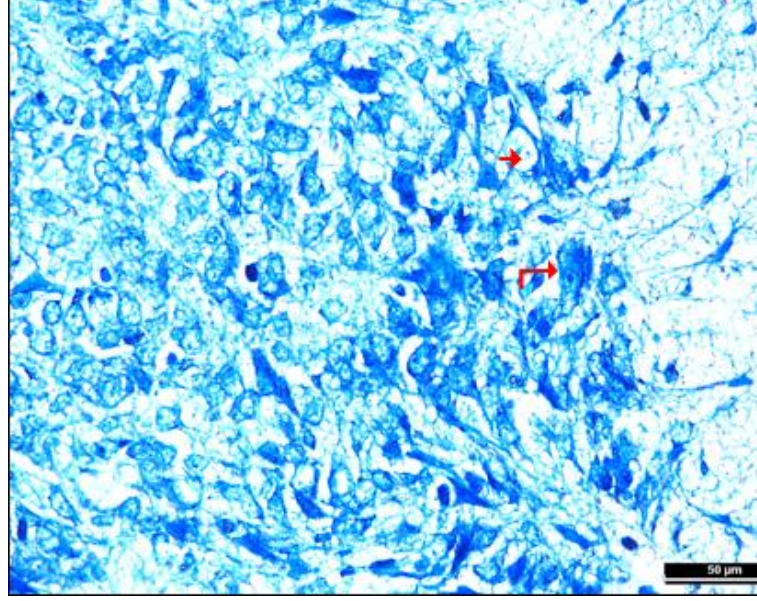
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Astrositler (➡), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).

4.13. VPA+Kök Grubu Omurilik Dokusu Servikal Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



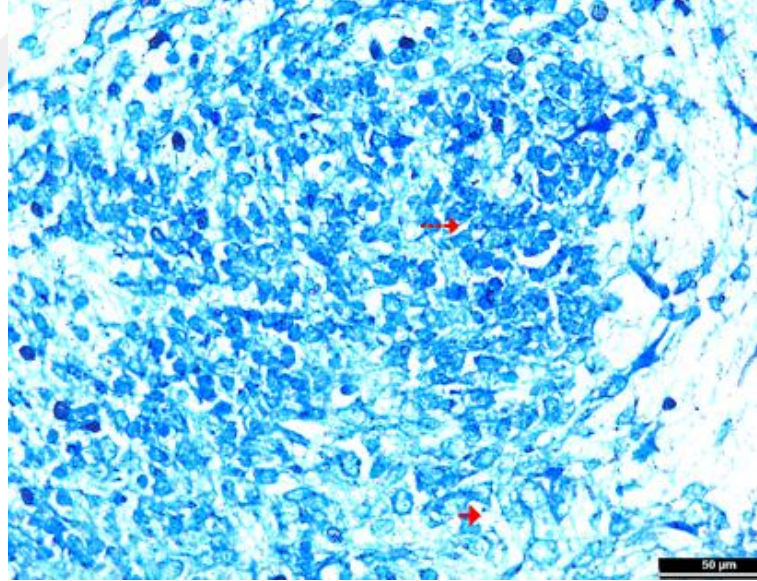
Resim 55: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, servikal bölge, HE, 10x.

Substantia grisea (➡), Substantia alba (➤), Kanalis Sentralis ve Ependim Hücreleri (➡), Ön Boynuz (➤), Arka Boynuz (➤).



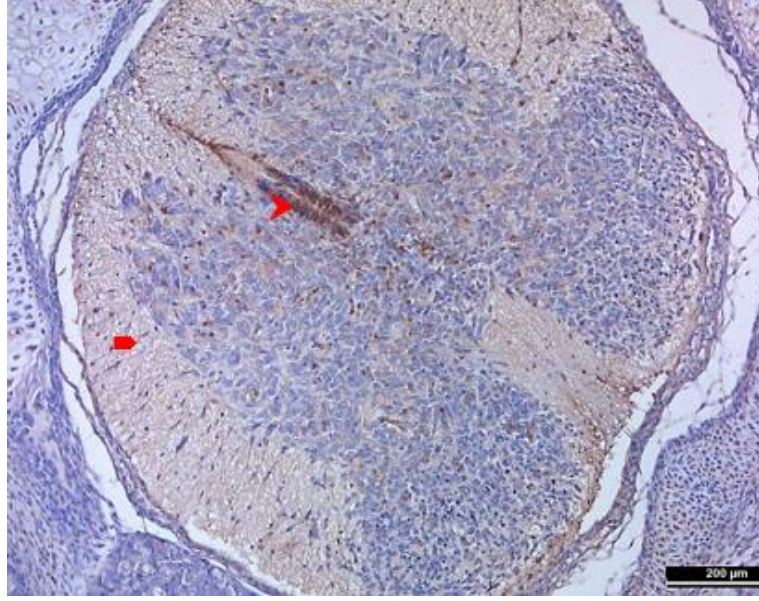
Resim 56: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, servikal bölge, ön boynuz. Toluidin blue O, 40x.

Motor Nöron (↗), Ödem (→).



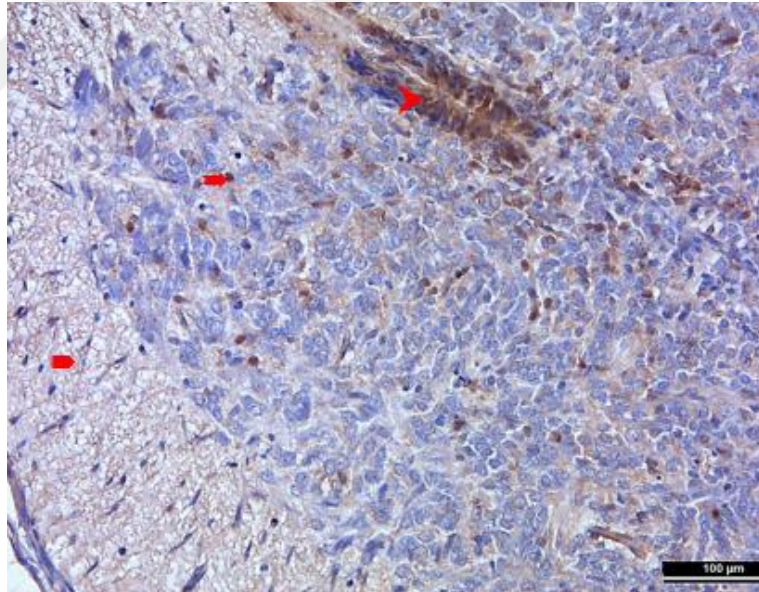
Resim 57: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, servikal bölge, arka boynuz, Toluidin blue O, 40x.

Duyu Nöron (↗), Ödem (→).



Resim 58: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta, 10x.

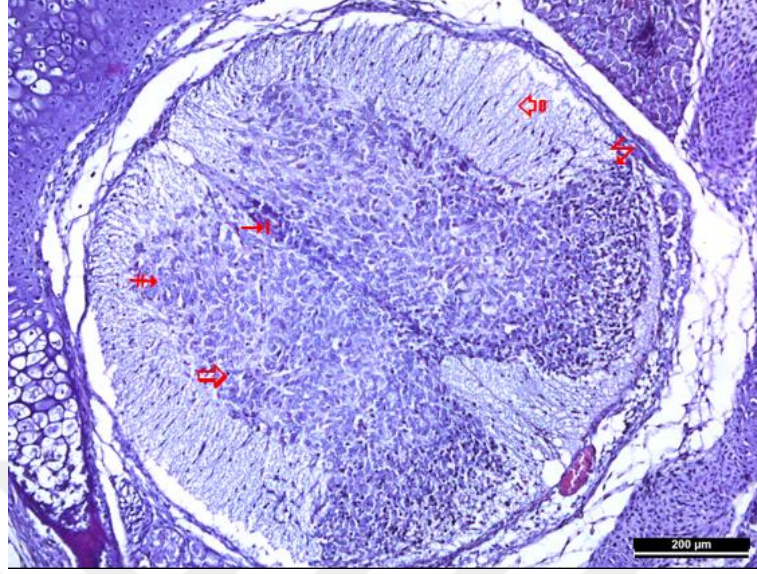
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).



Resim 59: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, servikal bölge, S100-beta, 20x.

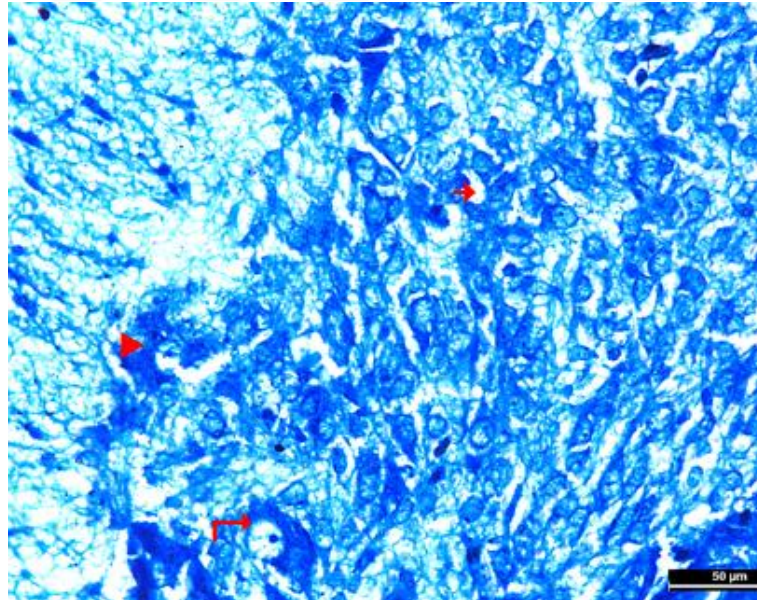
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Astrositler (➡), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).

4.14. VPA+Kök Grubu Omurilik Dokusu Torakal Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



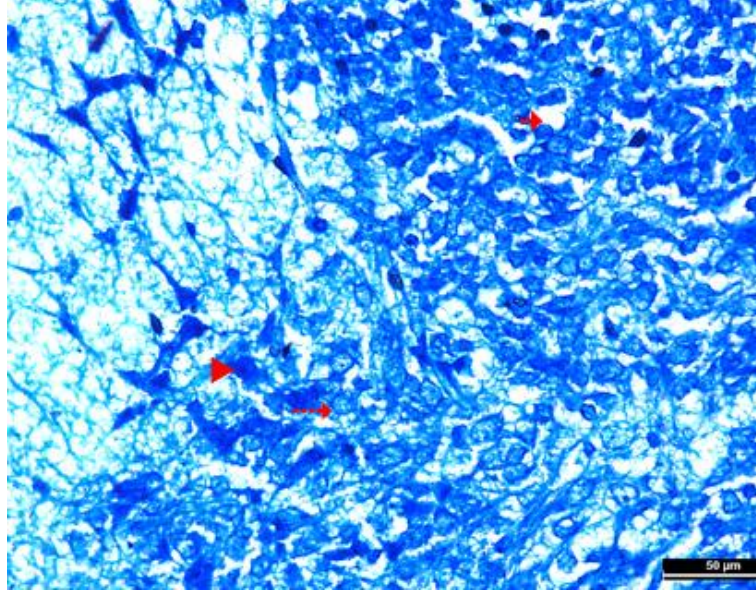
Resim 60: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, torakal bölge, HE, 10x.

Substantia grisea (⇒), Substantia alba (⇨), Kanalis Sentralis ve Ependim Hücreleri (→), Ön Boynuz (⇧), Arka Boynuz (⇩).



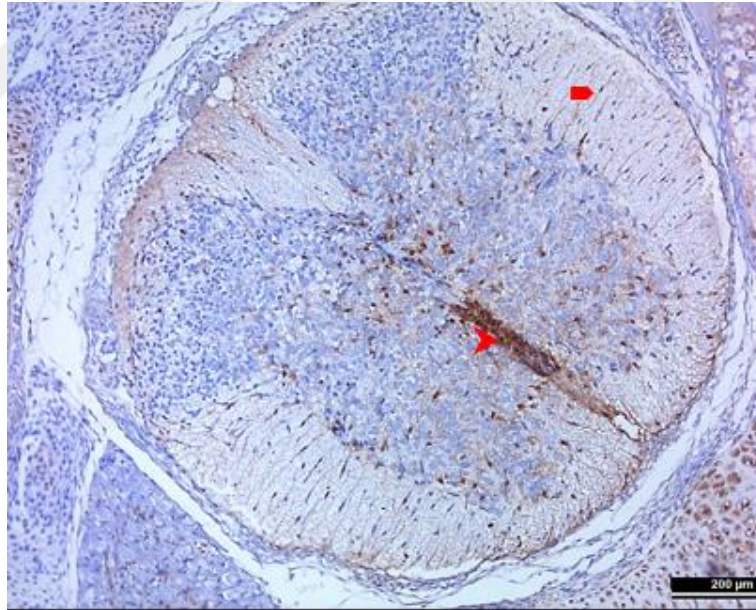
Resim 61: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, torakal bölge, ön boynuz, Toluidin blue O, 40x.

Dejeneratif Nöronlar (►), Ödem (→), Motor Nöron (⇨).



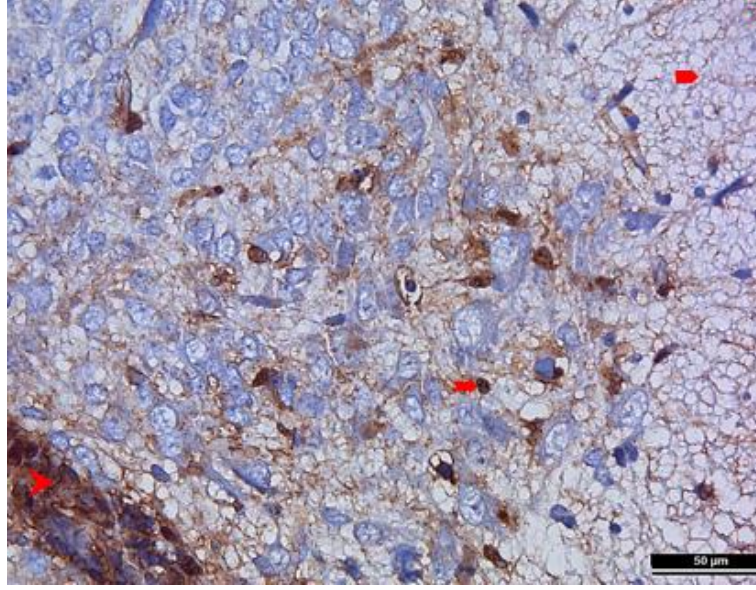
Resim 62: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, torakal bölge, arka boynuz, Toluidin blue O, 40x.

Dejeneratif Nöronlar (▶), Ödem (➔), Duyu Nöron (---➔).



Resim 63: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, torakal bölge, S100-beta, 10x.

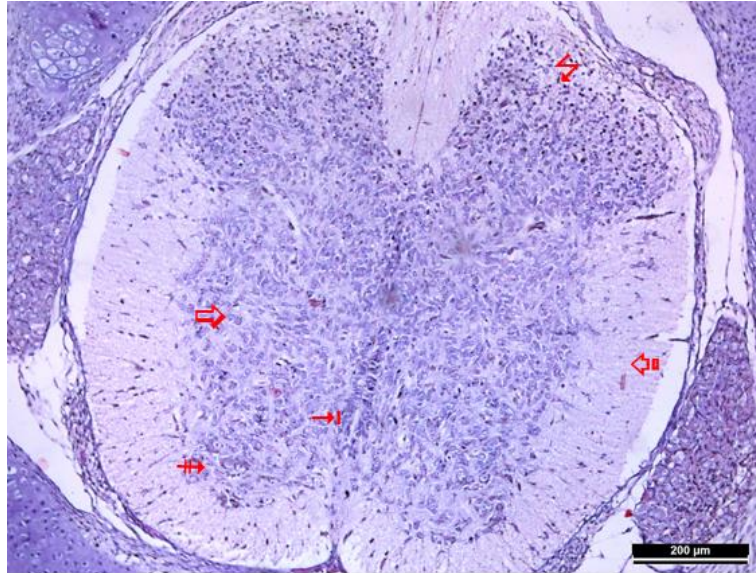
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (▶), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➔).



Resim 64: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, torakal bölge, S100-beta, 40x.

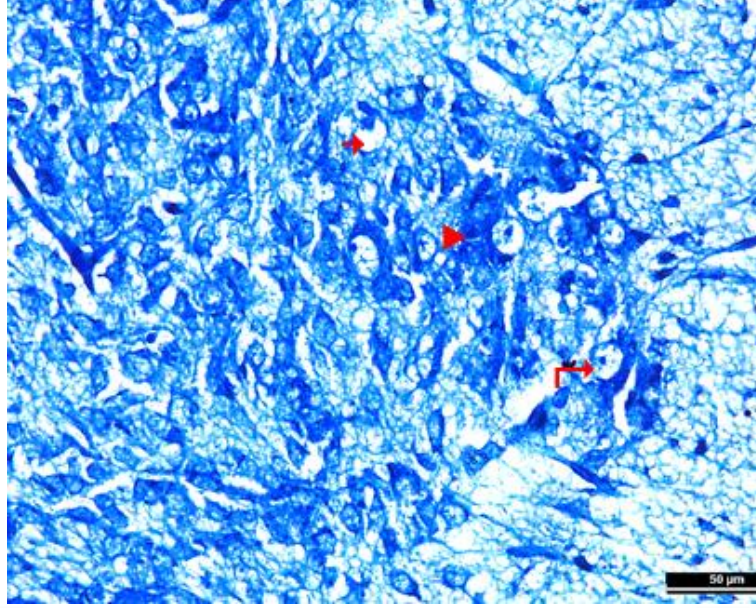
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Astrositler (➡), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).

4.15. VPA+Kök Grubu Omurilik Dokusu Lumbar Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



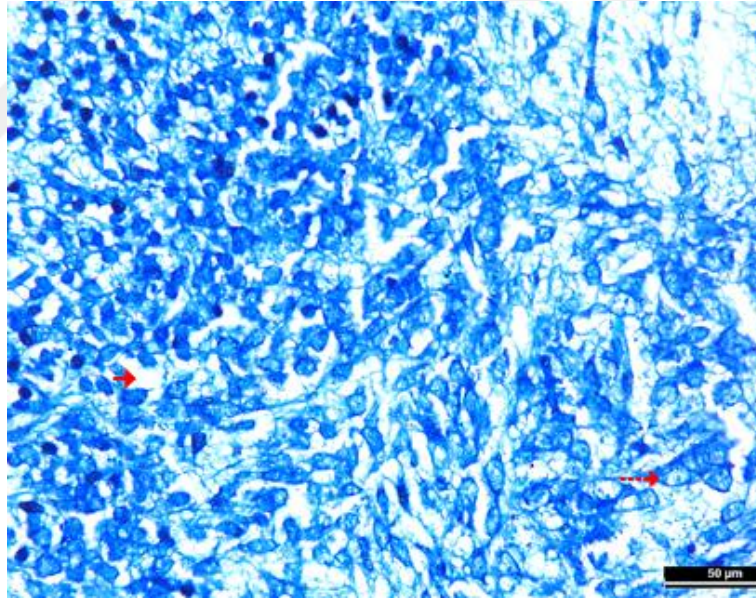
Resim 65: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, HE, 10x.

Substantia grisea (➡), Substantia alba (⇨) Kanalis Sentralis ve Ependim Hücreleri (➡), Ön Boynuz (⚡), Arka Boynuz (⚡).



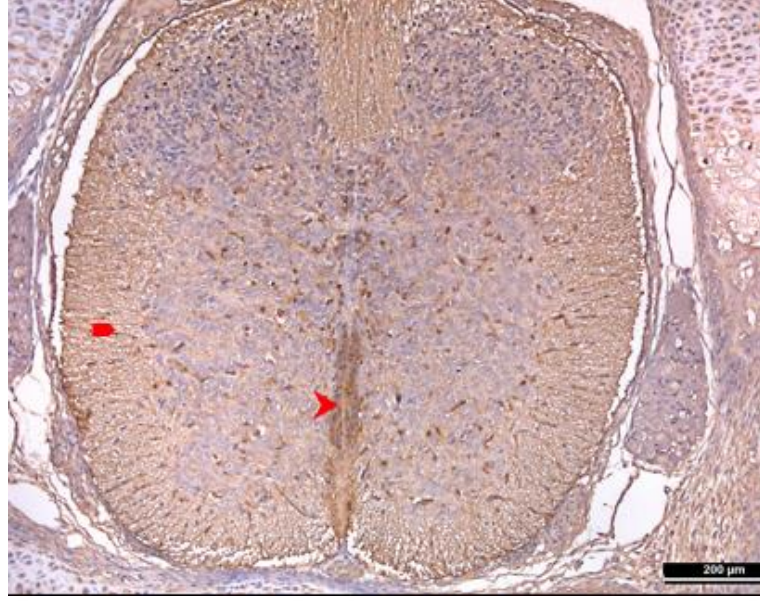
Resim 66: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, ön boynuz, Toluidin blue, 40x.

Motor Nöron (↗), Dejeneratif Nöronlar (▶), Ödem (→).



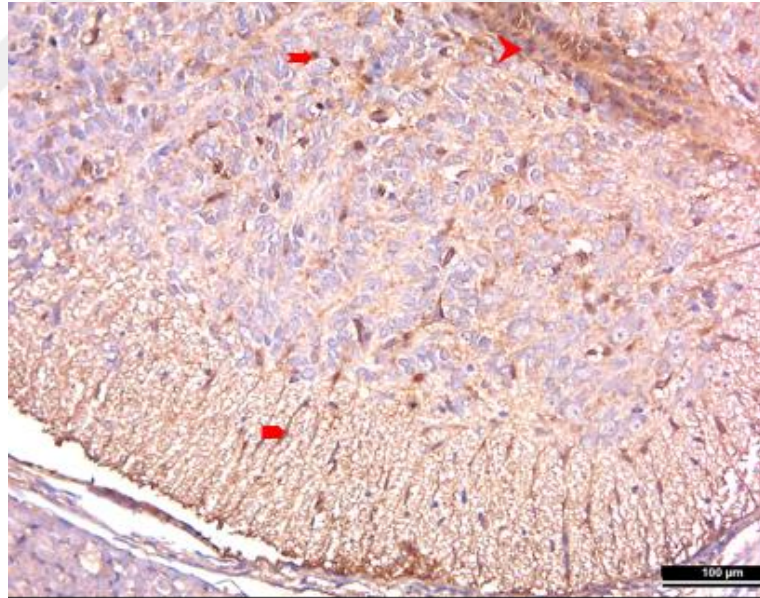
Resim 67: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, arka boynuz, Toluidin blue, 40x.

Duyu Nöron (↗), Dejeneratif Nöronlar (▶), Ödem (→).



Resim 68: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta, 10x.

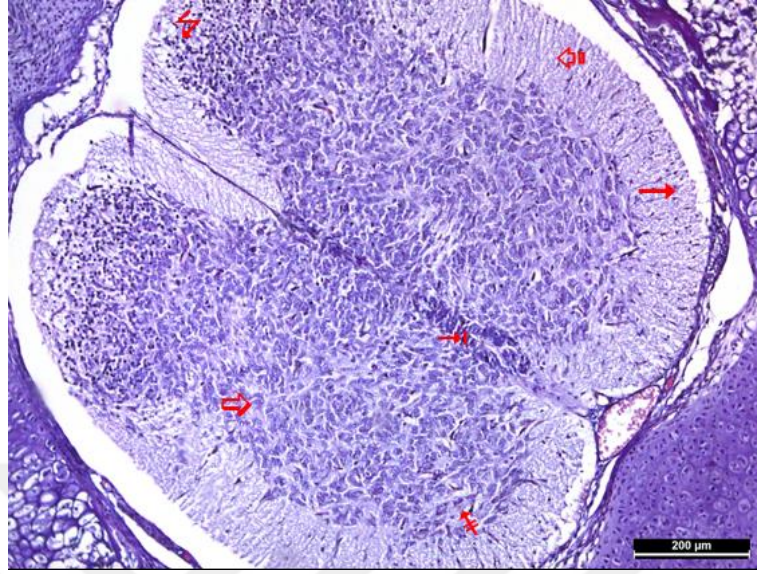
Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).



Resim 69: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, lumbar bölge, S100-beta, 20x.

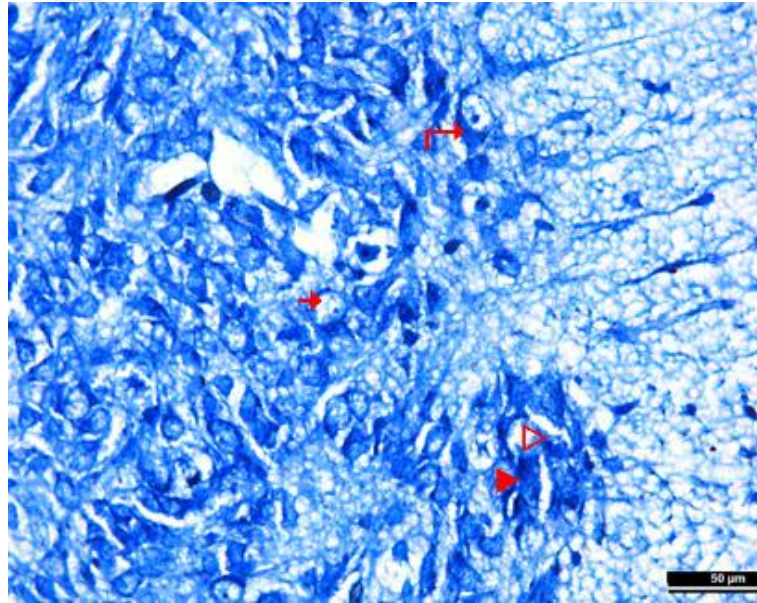
Pozitif immünreaktivite gösteren ependim hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite gösteren astrositler (➡), Pozitif İmmünreaktivite gösteren aksonlar (➡).

4.16. VPA+Kök Grubu Omurilik Dokusu Sakral Bölge Hematoksilen & Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal ve S100-beta İmmünohistokimyasal Bulguları



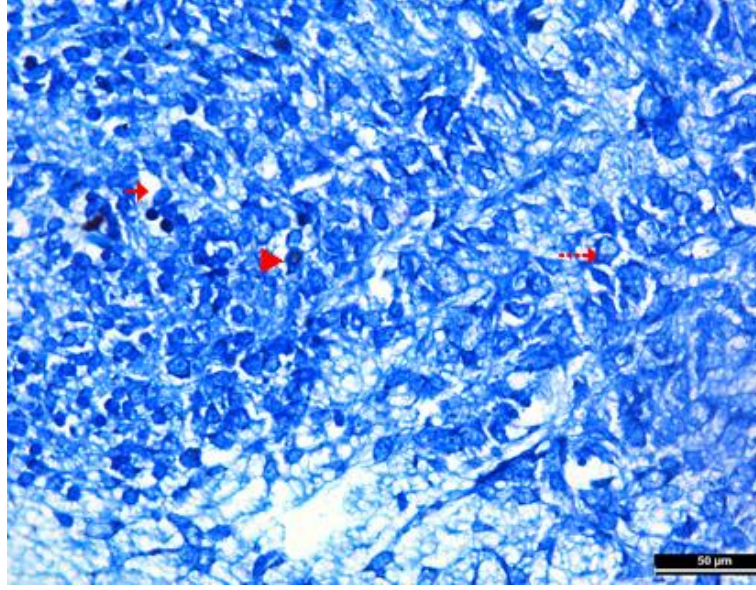
Resim 70: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, sakral bölge, HE, 10x.

Pia mater (→), Substantia grisea (⇨), Substantia alba (⇧), Kanalis Sentralis ve Ependim Hücreleri (→ı), Ön Boynuz (⌘), Arka Boynuz (↵).



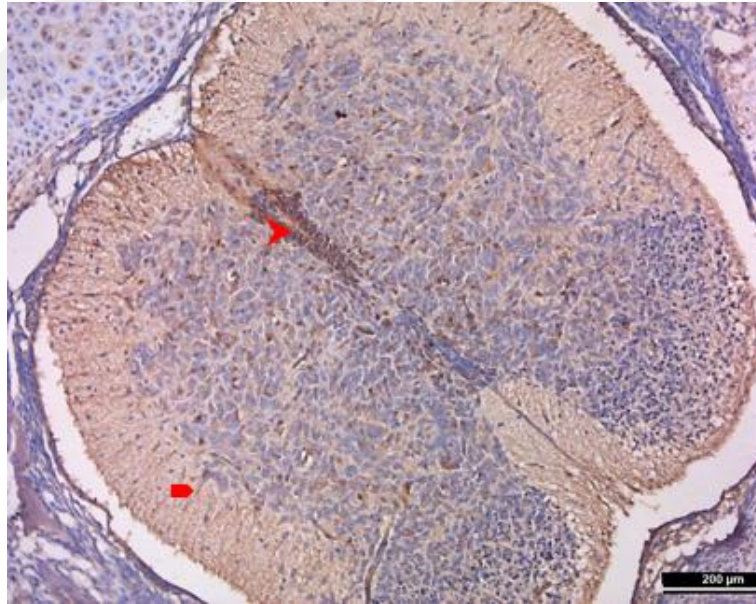
Resim 71: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, sakral bölge, ön boynuz, Toluidin blue O, 40x.

Motor nöron (⇨), Dejeneratif nöronlar (▶), Gruplaşmış deforme nöronlar (▷), Ödem (→).



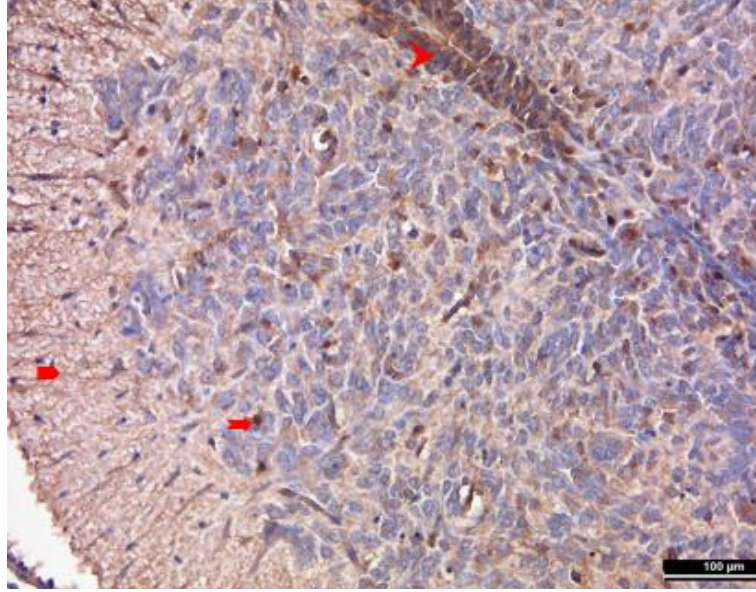
Resim 72: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, sakral bölge, arka boynuz, Toluidin blue O, 40x.

Duyu Nöron (---→), Dejeneratif Nöronlar (►), Ödem (→).



Resim 73: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 10x.

Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (►), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (►).



Resim 74: VPA+Kök grubu omurilik dokusu, sakral bölge, S100-beta, 20x.

Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Ependim Hücreleri (➤), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Astrositler (➡), Pozitif İmmünreaktivite Gösteren Aksonlar (➡).

4.17. Histolojik Bulgular

4.17.1. Beyin Dokusu Hematoksilen-Eozin Histokimyasal ve S100-Beta İmmunohistokimya Boyama Bulguları

Tüm grup ve deneklerde beyin dokusu, olfaktör bulbus düzeyinde incelendi. Bu düzeyde yapılan incelemelerde lateral ventrikül komşuluğunda, kontrol grubunda beyin dokusu ile uyumlu nöronlar izlenirken, valproik asit uygulanan grupta bu bölgede mezenkimal doku ile uyumlu görüntü tespit edildi, sinir dokusuna ise rastlanmadı. Bu gruba ait kesitlerde ayrıca dokuya invaze olmuş kan hücrelerine de rastlandı. Valproik asit ile birlikte kök hücre uygulamasının ise mezenkimal hücrelerde proliferasyona yol açtığı izlendi, bunun yanı sıra az sayıda nöron varlığı da tespit edildi. En kuvvetli S100-Beta immünreaktivitesinin valproik asit grubunda görülmesinin, henüz dokunun nöronal gelişim aşamasında olmasından kaynaklandığı ve S-100 Beta proteininin burada nörodejenerasyon yerine nörogenez sürecinde rol aldığı için immünreaktivite gösterdiği düşünüldü.

4.17.2. Omurilik Dokusu Hematoksilen-Eozin ve Toluidin Blue O Histokimyasal Boyama Bulguları

Kontrol grubu omurilik dokusuna ait yapılan incelemeler sonucunda, omurilik tüm bölgelerde (servikal, torasik, lumbar, sakral) normal histolojik görünüm sergilediği izlendi. Dışarıdan pia mater ile çevrelenmiş omurilik kesitinde substantia alba ve substantia grisea normal yerleşim ve görünümdeydi. Kanalis sentralis ependim hücreleri ile çevrelenmiş şekilde izlendi. Ön boynuzda motor nöronlar ve arka boynuzda duyu nöronları normal yoğunluk ve görünümleri ile ayırt edildi.

Valproik asit uygulanan gruba ait omurilik kesitlerinde yapılan incelemeler sonucunda, omurilik genel yapısının özellikle lumbar ve şiddetli derecede de sakral bölgede bozulmaya uğradığı belirlendi. Sakral bölgeye ait kesitlerde doku genelinde daralma ve substantia grisea yapısında yoğun deformasyon tespit edildi. Kanalis sentralis yapısının bu gruba ait kesitlerde tüm bölgelerde median ve paramedian uzanım gösterdiği belirlendi. Kanal yapısının özellikle torakal ve sakral bölgelerde yer yer karşılıklı birleşim gösterdiği izlendi, bu bölgelerdeki median uzanım oldukça belirgin olarak ayırt edildi. Servikal, lumbar ve sakral bölgelerde daha şiddetli olmak kaydıyla, bu gruba ait ön boynuz motor nöronlarında yoğun dejenerasyon tespit edildi. Bu nöronlarda çekirdek çekirdekçik ayrımının yapılamadığı, nöronların koyulaşarak gruplar halinde yoğunlaştığı izlendi. Bu tip nöronların atrofiye giden nöronlar olduğu düşünüldü. Valproik asit uygulaması ile birlikte nöron yoğunluğunun hem ön ve hem arka boynuzda görece azaldığı, nöron ve nöroglia çevresinde ödem ile uyumlu açılmaların olduğu ve dejenere nöron sayısının arttığı belirlendi.

Valproik asit ile birlikte kök hücre uygulaması yapılan gruba ait omurilik kesitlerinde, omurilik genel yapısının ve substantia grisea'ya ait dejeneratif görüntünün sakral bölge de dahil olmak üzere normale döndüğü ve kontrol grubu ile eşdeğer yapı sergilediği tespit edildi. Valproik asit uygulanan gruptan ayrıcalı olarak bu grupta tüm bölgelerde ön ve arka boynuz yapılarının net şekilde ayırt edilebildiği belirlendi. Kanalis sentralis'in median uzanımının lumbar ve sakral bölgede halen devam ettiği görüldü. Kanalın sakral bölgede yer yer karşılıklı birleşim göstermeye devam ettiği izlendi. Bu gruba ait nöronlar incelendiğinde, nöron ve nöroglia çevresindeki ödem yapısının valproik asit uygulanan gruba kıyasla azaldığı belirlendi. Nöronların genelinde çekirdek çekirdekçik ayrımının yapıldığı, perikaryon görüntüsünün net izlenebildiği tespit edildi. Valproik asit

uygulamasında izlenen nöronların atrofik hale geçerek bir arada yoğunlaştığı görüntünün bu grupta olmadığı belirlendi. Yine yer yer koyu görümlü ve atrofiye gittiği düşünülen nöronlar bu grupta da görece az olmakla birlikte izlendi. Bu tip nöronlar özellikle torakal ve sakral bölgede görüldü. Nöron yoğunluğunun görece valproik asitin tek başına uygulandığı gruba kıyasla fazla olduğu tespit edildi.

4.17.2.1. S100-Beta İmmunohistokimya boyama bulguları

S100-Beta primer antikor ile yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucunda tutulum tüm gruplara ait ependimal hücrelerde, aksonlarda ve yoğun olarak da astrositlerde izlendi.

Kontrol grubunda yapılan incelemelerde S100-Beta tutulumunun az sayıda astrositte orta şiddetli, nöronlara ait akson uzantılarında ise hafif şiddetli reaktivite gösterdiği tespit edildi. Ependim hücrelerindeki tutulumun servikal ve sakral bölgelerde orta şiddette ancak torakal ve lomber segmentlerde ise hafif şiddette olduğu izlendi.

Valproik asit uygulanan grupta omuriliğe ait tüm segmentlerde ependim hücreleri, astrositler ve aksonlarda şiddetli immünreaktivite gözlemlendi.

Valproik asit ile birlikte kök hücre uygulanan gruba ait S100-Beta immünreaktivite incelemelerinde, tutulumun tüm segmentlere ait ependim hücrelerinde ortadan şiddetliye değişen derecede devam ettiği izlendi. Astrosit ve aksonlardaki immünreaktivite en yaygın ve yoğun olarak sakral bölgede görüldü, sakral bölgedeki bu tutulumun orta şiddetli olduğu belirlendi. Tutulumun en çok servikal ve torakal segmentlerde kontrol grubu ile uyumlu olduğu tespit edildi.

4.18. Makroskopik Bulgular



Resim 75: Kontrol grubuna ait sıçan fetüsü



Resim 76: VPA+MKH uygulanan sıçana ait defektli fetüs (solda)



Resim 77: VPA uygulanan sıçanlara ait defektli fetüsler

Kontrol, VPA ve VPA+Kök gruplarına ait sıçanlardan alınan fetüsler birbirleriyle makroskopik olarak karşılaştırıldığında Kontrol ve VPA+Kök grubu arasında hem elde edilen embriyo sayıları hem de defeksiz embriyo sayıları arasında ciddi fark görülmezken; Kontrol ve VPA, VPA ve VPA+Kök grupları arasında anlamlı sayılabilecek ölçüde fark görüldü.

Kontrol grubunda Resim 75’de görüldüğü üzere makroskopik olarak hiç defektli embriyoya rastlanmazken, VPA+Kök grubunda resim 76’da görüldüğü üzere sadece 1 tane defektli embriyoya rastlandı.

VPA grubunda ise resim 77’de görüldüğü üzere defektli embriyo ve plasenta üzerinde neredeyse hiç gelişmemiş embriyolara rastlandı.

4.19. İstatistiksel Analiz

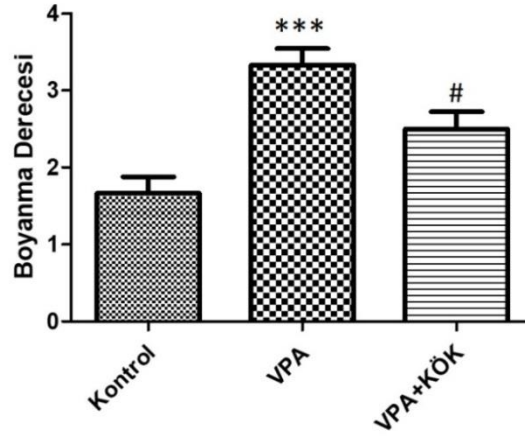
Tüm gruplarda S100b immün boyanması pozitif olan hücre sayılarının değerlendirilmesi HSCORE (Histolojik Skorlama) ile yapıldı. İmmunohistokimyasal analizde, tüm gruplar için rastgele üçer kesit seçildi. Her bir kesitte beş bölge immunohistokimyasal boyanmanın analizi için değerlendirildi. Tüm gruplarda pozitif hücrelerin boyanma şiddetleri aşağıda verilen değerlendirmelere dahil edildi.

İmmunreaktif skor: Pozitif boyanan hücrelerin şiddetinin derecesi ile boyanma yoğunluklarından elde edilen skorların birbiriyle çarpılması sonucunda yukarıdaki immunreaktif skor elde edilmiştir. Tüm gruplardaki HSCORE ölçümü üç bağımsız gözlemci tarafından değerlendirilerek yapılmıştır (Ayyıldız ve ark, 2004).

Tablo 4: S100b İmmünohistokimyasal boyamada beyin ve omurilik dokularında şiddet ekspresyonunun skorlanması.

- (0)	Negatif
+ (1)	Zayıf
++ (2)	Orta
+++ (3)	Şiddetli

S100-beta beyin immunreaktivitesi

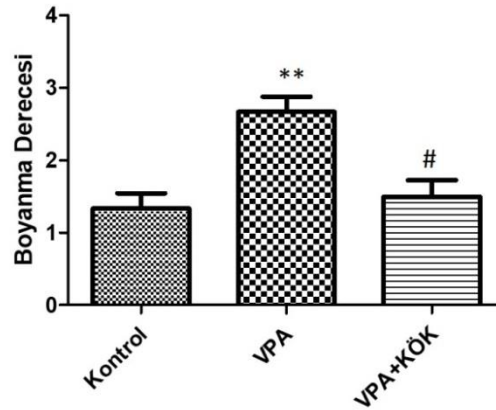


Şekil 12: S100-beta aktivitesinin beyindeki tutulumu

Kontrol, VPA ve VPA+KÖK uygulanmış gruplarda kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, VPA grubuna göre olan istatistiksel anlamlılık # işareti ile, VPA+KÖK grubuna göre anlamlılık ise ¶ işareti ile gösterilmiştir ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$).

En kuvvetli S100-Beta immünreaktivitesinin valproik asit grubunda görülmesinin, henüz dokunun nöronal gelişim aşamasında olmasından kaynaklandığı ve S100-Beta proteininin burada nörodejenerasyon yerine nörogenez sürecinde rol aldığı için immünreaktivite gösterdiği düşünüldü.

S100-beta MS (lumbar) immunreaktivitesi



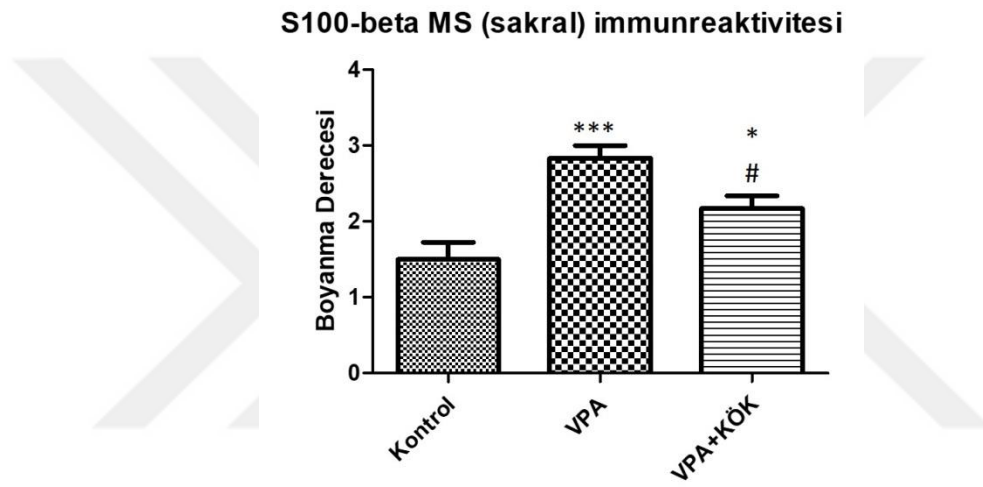
Şekil 13: S100-beta tutulumunun omurilik lumbar bölgedeki tutulumu

Kontrol, VPA ve VPA+KÖK uygulanmış gruplarda kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, VPA grubuna göre olan istatistiksel anlamlılık # işareti ile, VPA+KÖK grubuna göre anlamlılık ise ¶ işareti ile gösterilmiştir ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$).

Kontrol grubunda yapılan incelemelerde S100-Beta tutulumunun az sayıda astrositte orta şiddetli, nöronlara ait akson uzantılarında ise hafif şiddetli reaktivite gösterdiği tespit edildi. Ependim hücrelerindeki tutulumun lumbal bölgede hafif şiddette olduğu izlendi.

Valproik asit uygulanan grupta omuriliğe ait tüm bölgelerde ependim hücreleri, astrositler ve aksonlarda şiddetli immünreaktivite gözlemlendi.

Valproik asit ile birlikte kök hücre uygulanan gruba ait S100-Beta immünreaktivite incelemelerinde, tutulumun tüm bölgelere ait ependim hücrelerinde ortadan şiddetliye değişen derecede devam ettiği izlendi.

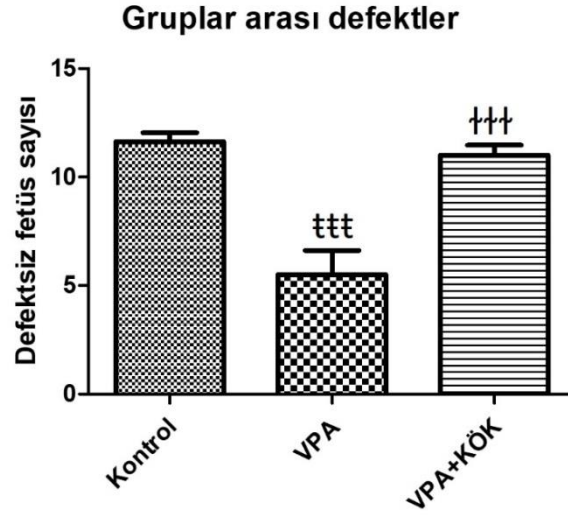


Şekil 14: S100-beta tutulumunun omurilik sakral bölgedeki tutulumu

Kontrol, VPA ve VPA+KÖK uygulanmış gruplarda kontrol grubuna göre anlamlılık * işareti ile, VPA grubuna göre olan istatistiksel anlamlılık # işareti ile, VPA+KÖK grubuna göre anlamlılık ise ¶ işareti ile gösterilmiştir ($p<0.05^*$, $p<0.01^{**}$, $p<0.001^{***}$).

Kontrol grubunda yapılan incelemelerde S100-Beta tutulumunun az sayıda astrositte orta şiddetli, nöronlara ait akson uzantılarında ise hafif şiddetli reaktivite gösterdiği tespit edildi. Ependim hücrelerindeki tutulumun sakral bölgelerde orta şiddette olduğu izlendi.

Valproik asit ile birlikte kök hücre uygulanan gruba ait S100-Beta immünreaktivite incelemelerinde, tutulumun tüm segmentelere ait ependim hücrelerinde ortadan şiddetliye değişen derecede devam ettiği izlendi. Astrosit ve aksonlardaki immünreaktivite en yaygın ve yoğun olarak sakral bölgede görüldü, sakral bölgedeki bu tutulumun orta şiddetli olduğu belirlendi.



Şekil 15: Gruplar arasındaki sıçan fetüslerine ait defektlerin istatistiksel analizi

Gebeliklerinin 9. Gününde VPA uygulanan sıçanlara ait defektli fetüslerinin istatistiksel analizinde VPA grubu fetüsleri kontrol grubundan uzaklaşırken VPA+KÖK grubu kontrol grubuna yaklaşmıştır. Defektsiz fetüs sayısı VPA grubunda düşerken VPA+KÖK grubunda defektsiz fetüs sayısı kontrole yaklaşarak artmıştır. Kontrol grubu istatistiksel anlamlılığı * ile VPA uygulanan gruba ait istatistik † ile gösterilmiş, VPA+KÖK grubu için anlamlılık ‡ işareti ile belirtilmiştir. ($p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$).

5. TARTIŞMA

Valproik asit epilepsi tedavisinde oldukça yaygın kullanılan antiepileptik bir ilaçtır. Karma etkiye ve geniş spektruma sahip olan valproik asit, anormal elektriksel uyarıların beyinde yayılmasını önlemektedir (Browne ve Holmes, 2007).

Valproik asit gebelikte kullanıldığında ise embriyo veya fetüs üzerinde nöral tüp defektlerini de içine alan merkezi sinir sistemi hasarları, anensefali, fasiyal dismorfizm, kardiyovasküler malformasyonlar, iskelet-kas anomalileri gibi çok ciddi boyutlarda teratojenite göstermektedir (Mycek ve Ark, 1998).

Bu tez çalışmasında gebe sıçanlara uygulanan valproik asitin fetüsün merkezi sinir sisteminde oluşturduğu hasara, sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrenin etkisi araştırıldı.

Petzold ve Ark (2005) kontrol grubu farelerde 16.5 ile 18.5 günlük fetüslerin serebrospinal sıvılarında beyine özel proteinlerden olan S100-beta'nın önemli bir artış gösterdiğini bildirmiştir.

Hachem ve Ark (2005) 12.5 ve 13.5 günlük fetüslerde S100-beta geninin aktivasyonunun beyin nöroepitelyumunun s100b-EGFP floresan bağımsız bölgelerinde artışa neden olduğunu göstermiştir.

Tiboni ve Ark (2015) kontrol grubundaki ve tedavi grubundaki gebelik sonuçlarına göre valproik asit uygulanan gruptaki fare embriyo ölümlerindeki sıklık %23.8 iken bu seviye %12.7'lik embriyo kaybı görülen kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğunu belirtmiştir.

Umur ve Ark (2012) kontrol grubundaki tavuk embriyolarında hiç ölüm görülmezken, valproik asit uygulanan gruptaki ölüm oranı %27 olarak belirtmiştir.

Vajda ve Ark (2013) antiepileptik ilaçlara maruz kalmayan 147 gebenin 5'inde fetal malformasyonlar ortaya çıkarken, valproik asite maruz kalan 436 gebenin 54'ünde fetal malformasyonlar görüldüğünü bildirmiştir.

Werler ve Ark (2011) birinci trimesterde antiepileptik ilaç kullanan kadınlarla hiç antiepileptik ilaç kullanmayan kadınlar karşılaştırıldığında, antiepileptik kullanan kadınlara

ait fetüslerde nöral tüp defektlerine sebep olan etkiler görülmüştür. Valproik asite maruz kalan fetüslerde 9.7 kat daha fazla nöral tüp defektlerine ve 4.4 kat daha fazla diğer doğum defektlerine rastlandığını bildirmiştir.

Hajduková ve Ark (2015) S100-beta merkezi sinir sisteminin yapısal proteinleri arasında olup, bu proteinler merkezi sinir sistemi doku hasarının spesifik biyolojik belirteçleri olarak oldukça fazla kullanıldığından bu çalışmada da ağırlıklı olarak merkezi sinir sistemi hasarına bağlı olarak kandaki S100-beta konsantrasyonlarına bakıldığı bildirilmiştir.

Sin-Gu Jeonga ve Ark (2013) valproik asitin optimal dozda ve kuluçka süresi ile verildiğinde hBM-MSCLerden çeşitli trofik faktörlerin salınımını stimüle ettiğini ve bunun da kök hücre tedavisinin etkinliğini artırabileceğini göstermiştir.

VPA tedavisi hBM-MSCLerde nöronal progenitör genler Nestin-1, Musashi, CD133 ve GFAP'ın anlamlı bir şekilde çoğaltılmasını arttırdığı immüno blot analizi ile teyit edilerek kök hücrelerinin farklılaşma potansiyelinin implantasyondan önce iyileştirilmesini gerektirdiğini önermektedir. Bu çalışmada, VPA'nın hBM-MSCLerde nöroprojenlerinin indüksiyonu ile nöronal farklılaşmayı teşvik ettiğini ve MSCLerin VPA ön muamelesinin nörodejeneratif hastalıklarda daha iyi etkinlik sağlayabileceğini önermektedir.

Bu tez çalışmasında gebe sıçanlara, gebeliklerinin 9. gününde uygulanan valproik asitin fetal malformasyonlara ve fetal kayıplara neden olduğu, valproik asitle birlikte uygulanan sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrenin fetüste özellikle merkezi sinir sistemi üzerinde protektif ve/veya onarıcı etki gösterdiği S100-beta antikoru kullanılarak immünohistokimyasal yöntemlerle gösterilmiştir.

Ayrıca valproik asit ile birlikte sıçan kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrenin uygulandığı grupta mezenkimal kök hücrenin fetal kayıpları önemli ölçüde engellediği görülmüştür.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Gebelik döneminde uygulanan valproik asitin fetüslerin omuriliklerinde dejeneratif değişimlere yol açtığı, bu dejeneratif değişimlerden en çok etkilenen bölgelerin lumbar ve özellikle sakral segmentler olduğu tespit edildi. Valproik asit ile birlikte yapılan kök hücre tedavisinin ise bu dejeneratif değişimlerin oluşumunu büyük oranda engellediği belirlendi. Nanomolar konsantrasyonlarda nöroprotektif etki gösterdiği, ancak mikromolar konsantrasyonlarda sinir sisteminde sinaptik plastisiteye ve nöron/nörogliya hücrelerinde apoptozise yol açtığı bilinen ve hasarlanmış astrositlerce salınan Ca^{2+} bağımlı protein olan S100 Beta primer antikoru ile yapılan immün boyamalar sonucunda valproik asit uygulamasının tutulumu şiddetli oranda arttırdığı tespit edildi. Bu sonuç, valproik asit uygulaması ile birlikte sinir dokusunda nörodejenerasyonun gerçekleştiği şeklinde yorumlandı. Gebelik döneminde uygulanan valproik asitin lateral ventrikül düzeyinde sinir dokunun gelişimini engellediği/geciktirdiği ve omurilikte dejeneratif değişimlere yol açtığı tespit edildi. Kök hücre uygulamalarının lateral ventrikül düzeyindeki dokuda mezenkimal hücre proliferasyonuna ve az sayıda nöron farklanmasına yol açtığı, omurilikteki değişimler üzerinde ise koruyucu/engelleyici etki gösterdiği kanısına varıldı.

Valproik asit ve kök hücre uygulamalarının beyin dokusundaki etkisi ile ilgili daha net ve kesin sonuca varabilmek için dokunun olfaktör bulbus ya da lateral ventrikül düzeyinde değil, hemisferler üzerinden değerlendirilmesinin daha uygun olacağı düşünüldü.

KAYNAKLAR

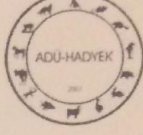
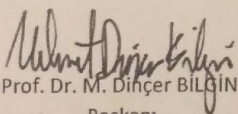
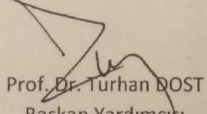
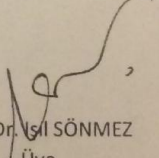
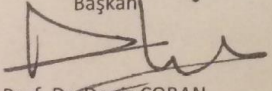
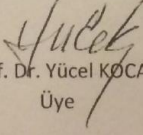
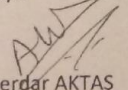
- (2017). World Health Organization'web site. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/> (18.12.2017).
- (2017).Kök Hücre derneği'web site. http://www.kokhucredernegi.org.tr/tur/kok_hucre/eriskin.htm (18.12.2017).
- Akdağ G, İlhan Algın D, Erdinç OO.** Epilepsi. *Osmangazi Tıp Dergisi*2016;38 (Özel Sayı 1):35-41.
- Akdeniz ZD, Bayramiçli M, Ateş F, Özkan N, Yücesoy CA, Ercan F.** The role of botulinum toxin type a-induced motor endplates after peripheral nerve repair. *Muscle Nerve*2015;52(3):412-8.
- Baran Y, Ural AU, Avcu F, Sarper M, Elçi P, Pekel A.** Optimization of transfection of green fluorescent protein in pursuing mesenchymal stem cells in vivo. *Turk J Haematol*2008 ;25(4):172-5.
- Browne TR, Holmes GL.** Epilepsi El Kitabı (3.baskı), Komsuoğlu SŞ (edt), Güneş Tıp Kitabevleri, 2007.
- Browne TR, Holmes GL.** Epilepsi El Kitabı (3.baskı), Komsuoğlu SŞ (edt), Güneş Tıp Kitabevleri, 2007.
- Camurdanoglu BZ, Esendagli G, Ozdemir E, Canpinar H, Guc D, Kansu E.** The effect of granulocyte colony stimulating factor receptor gene missense single nucleotide polymorphisms on peripheral blood stem cell enrichment. *Cytokine*2013;61(2):572-7.
- Can A.** Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları. Akademisyen Kitabevi, Ankara, 2013.
- Caplan AL, Nardi NB.** In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem cells* 2008;26(9):2287-99.
- Dökmeci İ.** Farmakoloji Temel Kavramlar. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2000: 607.
- Erbey F, Bayram I, Kuskonmaz B, Yilmaz S, Cetin M, Uckan D, Tanyeli A.** Thrombotic microangiopathy in allogeneic stem cell transplantation in childhood. *Exp Clin Transplant*2010;8(3):237-44.
- Ertekin C, Araç N, Bilgin S, Ediboğlu H, Ertaş M.** Subclinical anterior horn cell involvement in juvenile myoclonic epilepsy. *Epilepsia*1994;35(2):322-7.
- Fawcett DW.** A text book of histology (12.baskı), Chapman&Hall, New York, London, 1994.

- Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D.** Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther*2010;1(1):2.
- Jacobson LO, Marks EK, Gaston EO, Robson M, Zirkle RE.** The Role of the Spleen in Radiation Injury. *Experimental Biology and Medicine* 1949.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji, Aytakin Y, Solakoğlu S (edt),** Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2006:162-188.
- Katzung BG.** Antiseizure Drugs. Basic & clinical pharmacology (7.baskı). Appleton & Lange, Stamford, Conn, 1998.
- Kayaalp O.** Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (8.baskı), 2.Cilt, Hacettepe-Taş Kitapçılık, Ankara, 1998:1079.
- Landmarck CJ.** Pharmacokinetic variability of valproate in women of childbearing age. *Epilepsia*2017;58(10):142.
- Lotfy A, Salama M, Zahran F, Jones E, Badawy A, Sobh M.** Characterization of mesenchymal stem cells derived from rat bone marrow and adipose tissue: a comparative study. *Int J Stem Cells*2014;7(2):135-42.
- Moore KL, Persaude TVN, Torchia MG.** Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (10.baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2016:59-60.
- Moore KL, Persaude TVN, Torchia MG.** Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (10.baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul,2016:51-62.
- Moore KL, Persaude TVN, Torchia MG.** Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (10.baskı). Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2016: 379-475.
- Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC.** Farmakoloji (2.baskı), Atagündüz P, Oktay Ş (edt), Nobel Kitabevleri, İstanbul, 1998:148-149.
- Ornoy A.** Valproic acid in pregnancy: how much are we endangering the embryo and fetus?. *Reproductive Toxicology*2009;28: 1-10.
- Prasad SM, Czepiel M, Cetinkaya C, Smigielska K, Weli SC, Lysdahl H, Gabrielsen A, Petersen K, Ehlers N, Fink T, Minger SL, Zachar V.** Continuous hypoxic culturing maintains activation of Notch and allows long-term propagation of human embryonic stem cells without spontaneous differentiation. *Cell Proliferation in basic and clinical science*2008.
- Regan CM.** Neuronal and glial markers of the central nervous system. *Experienta*1988 44:695–697.

- Ross MH, Pawlina W.** İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile Histoloji (6.baskı), Baykal B (edt). Palme Yayıncılık, Ankara, 2014:381-386.
- Sadler TW.** Medikal Embriyoloji. Palme Yayıncılık, Ankara, 2011:294-319.
- Sadler TW.** Medikal Embriyoloji. Palme Yayıncılık, Ankara, 2011:67-79.
- Sadler TW.** Medikal Embriyoloji. Palme Yayıncılık, Ankara, 2011:73-74.
- Siclari VA, Zhu J, Akiyama K, Liu F, Zhang X, Chandra A, Nah HD, Shi S, Qin L.** Mesenchymal progenitors residing close to the bone surface are functionally distinct from those in the central bone marrow. *Bone* 2013;53(2):575-86.
- Smol'nikova NM, Skosyreva AM, Popova EN, Strekalova SN.** Antenatal action of alcohol on the morphofunctional development of the central nervous system. *Akush Ginekol (Mosk)*1985;(4):61-2.
- Soysal H, Doğan Z, Kamışlı Ö.** Effects of phenytoin and lamotrigine treatment on serum BDNF levels in offsprings of epileptic rats. *Neuropeptides*2016;56:1-8.
- Thomson JA, Eldor JI, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.** Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*1998;282:1145-1147.
- Tyndall A, Uccelli A.** Multipotent mesenchymal stromal cells for autoimmune diseases: teaching new dogs old tricks. *Bone Marrow Transplantation*2009;43:821–828.
- Unur E, Ulger H, Ekinci N, Hacıaloğulları M, Ertekin T, Kilic E.** Effect of anti-basic fibroblast growth factor (anti-bFGF) on in vitro embryonic development in rat. *Anat Histol Embryol*2009;38(4):241-5.
- Vescovi A, Gritti A, Cossu G, Galli R.** Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. *Cells Tissues Organs*2002;171(1):64-76.
- Weissman IL.** Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*2000;100(1):157-68.
- Winkelman C.** A Review of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics in Seizure Management. *Journal of Neuroscience Nursing*1999;31: 50-53.
- Yalvaç ME, Yilmaz A, Mercan D, Aydın S, Dogan A, Arslan A, Demir Z, Salafutdinov II, Shafigullina AK, Sahin F, Rizvanov AA, Palotás A.** Differentiation and neuro-protective properties of immortalized human tooth germ stem cells. *Neurochem Res.* 2011;36(12):2227-35.
- Yilmaz M, Ovali E, Akdogan E, Durmus A, Sonmez M, Dikmen T, Omay SB.** Autologous serum is more effective than fetal bovine serum on proliferation of bone marrow derived human mesenchymal stem cells. *Saudi Med J.*2008;29(2):306-9.
- Zenbilci N.** Sinir Sistemi Hastalıkları (2.baskı), Cerrahpaşa Tıp Kitabevi, İstanbul, 1985.

EKLER

Ek 1: Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

	T.C. ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (ADÜ-HADYEK)	
Aydın, 25 Ağustos 2016		
Oturum	: Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2016 Yılı VII. Oturumu	
Sayı	: 64583101/2016/143	
Proje Başlığı	: Valproik asit kullanımının embriyoda yol açtığı nöral tüp defektine mezensefimal kök hücresinin etkisi	
Proje Yürütücüsü	: N. Tülün BOYLU	
Proje Ekibi	: Fulya YILMAZ	
Bu çalışmanın hiçbir bölümünde: İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması		
Hayvan Çalışması	İnsanlarda araştırma İnsan olmayan primatların kullanılması Transgenik hayvanların kullanılması Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.	
Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.		
 Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN Başkan	 Prof. Dr. Turhan DOST Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. S. SÖNMEZ Üye
 Prof. Dr. Deniz ÇOBAN Üye	 Prof. Dr. Yücel KOCA Üye	(Yıllık İzinli) Yrd. Doç. Dr. Evrim DERELİ FİDAN Üye
 Vet. Hek. Serdar AKTAŞ Üye	(Toplantıya Katılmadı) Vet. Hek. Atilla M. UÇMAKLIOĞLU Üye	(İzinli) Yurdagül ALTINBAŞ Üye
Bu rapor, sadece Adnan Menderes Üniversitesi'nde yapılacak çalışmalar için geçerlidir.		

Ek 2: Kocaeli Üniversitesi Katılım Belgesi



Ek 3: XXIII. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kurulu



Ek 4: Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası
Certificate of Animal Use in Experimental Research

Sayın **HATİCE FULYA YILMAZ**
This is to certify that

Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 30 Mayıs - 8 Haziran 2016 tarihleri arasında düzenlenen Deney Hayvanları Kullanım Kursunu başarıyla tamamlayarak sertifika almaya hak kazanmıştır.

Has successfully completed the course on Animal Use in Experimental Research held between May 30 th and June 8th, 2016 and is awarded this certificate by Animal Research Ethics Committee of Adnan Menderes University.



Prof. Dr. Cavit BİRCAN
Rektör
Rector
Adnan Menderes University



Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı
Adnan Menderes University
Head of Animal Research Ethics Committee

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : YILMAZ, Hatice Fulya
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Ankara / 20.10.1986
Telefon : 0533 925 96 55
E-mail : h.fulyayilmaz@hotmail.com/ hfulya86@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y. Lisans	ADÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	12/01/2018
Lisans	Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji	12/06/2009

Kurslar :

1- Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Kursu

2- Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi XXIII. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları

3- Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezi XXIII. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Teknikler ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları: Kök Hücrede Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi

Seminerler :

1- Mikroskop Sistemleri, Mikroskopi Ataçmanları ve Uygulamaları, Mikroskopi Çözümleri, Mikroskopide Güncel Uygulamalar-Olympus Mikroskopi Semineri

2- Pipet Klinik, Pipetlemede Prensipler, Pipetlerde Ergonomi, Pipetlerde Dezenfeksiyon- Eppendorf Pipeti Semineri

Sertifikalar :

1- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

2- Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Sertifikası

3- Kök Hücrede Uygulamalı Flow Sitometri Sertifikası