



---

# **TAVUK VE BILDİRCİN EMBRİYOLARINDA SİALYL LEWİS-X VARLIĞININ KARŞILAŞTIRILMALI ARAŞTIRILMASI**

**Betül ŞENLİKÇİ**

**Temmuz 2012  
DENİZLİ**



**TAVUK VE BILDİRCİN EMBRİYOLARINDA SİALYL LEWİS-X  
VARLIĞININ KARŞILAŞTIRILMALI ARAŞTIRILMASI**

**Pamukkale Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisans Tezi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

**Betül ŞENLİKÇİ**

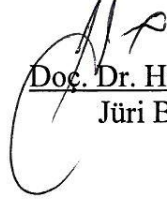
**Danışman: Yard. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ**

**İkinci Danışman: Doç.Dr. Levent KARAGENÇ**

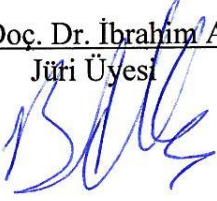
**Temmuz, 2012  
DENİZLİ**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Betül ŞENLİKÇİ tarafından, Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ yönetiminde hazırlanan “**Tavuk ve Bildircin Embriyolarında Sialyl Lewis-x Varlığının Karşılaştırılmalı Araştırılması**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Doç. Dr. Hakan AKÇA  
Jüri Başkanı

Doç. Dr. İbrahim AÇIKBAŞ  
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Levent KARAGENÇ  
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. A. Gaye TOMATIR  
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ  
Jüri Üyesi (Danışman)



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 15.8.12 tarih ve 12/13.5 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY  
Müdür



## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca ve tez çalışmam süresince bana her türlü desteği veren değerli tez danışman hocam Yard. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ'e teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmam sırasında bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen hocam Doç. Dr. Levent KARAGENÇ'e, emeği geçen bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma ve tez projemi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne çok teşekkür ederim. Aynı zamanda her zaman yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen aileme de sonsuz teşekkür ederim.

Bu tezin tasarımı, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :

Öğrenci Adı Soyadı : Betül ŐENLİKCI

## ÖZET

### TAVUK VE BILDİRCİN EMBRİYOLARINDA SİALYL LEWİS-X VARLIĞININ KARŞILAŞTIRILMALI ARAŞTIRILMASI

Betül, Şenlikci

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı  
Tez Yöneticisi: Yard. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ  
Yardımcı Danışman: Doç. Dr. Levent KARAGENÇ

Temmuz 2012, 52 sayfa

**Primitif cinsiyet hücreleri eşey hücrelerini oluşturmak üzere embriyonel gonad dokularına göç ederler. Bu göç mekanizması kanatlı türleri ve memeli türleri arasında farklılık gösterir. Kanatlı türlerinde primitif cinsiyet hücrelerinin göçü kan damarları aracılığı ile olurken memelilerde dokular arasından göç ile olur. Primitif cinsiyet hücre göçünde rol oynayan moleküllerin işlevleri ve yerleşimleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.**

**Bu çalışmanın amacı; daha önceden tavuk “*Bursa fabricius*” da ekspresse edildiği bilinen fakat bildircinde ekspresyonu bilinmeyen sialyl Lewis-X (sLe-X) molekülünün bildircin embriyolarında ekspresse edilip edilmediğini araştırmaktır. Selektinler tarafından tanınan sialyl Lewis-X molekülü, kanatlı türlerinde primitif cinsiyet hücrelerinin damar duvarı dışına çıkmasında rol oynar ve primitif cinsiyet hücrelerinin göç mekanizmasının anlaşılabilmesi için önemlidir.**

**Bildircin embriyolarında sialyl Lewis-X molekülünün ekspresyonu immunohistokimyasal analiz ile çalışıldı. Boyama için sialyl epitopunu tanıyan sialyl Lewis-X antikorunu kullanıldı.**

**Bildircin embriyolarında yaptığımız çalışmada primitif cinsiyet hücre göçü boyunca sialyl Lewis-X’in ekspresse olmadığı gösterildi.**

**Anahtar Kelimeler:** Primitif cinsiyet hücreleri, sialyl Lewis-X, İmmunohistokimyasal analiz, *Bursa fabricius*

## ABSTRACT

### COMPARATIVE INVESTIGATION OF PRESENCE OF SIALYL LEWIS-X IN CHICK AND QUAIL EMBRYOS

Betül, Şenlikci

M. Sc. Thesis in Department of Medical Biology

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Nedim KARAGENÇ

Assist. Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Levent KARAGENÇ

July 2012, 52 pages

**Primordial germ cells migrate to embryonal gonadal tissues to compose germ cells. The migrating mechanisms are different between mammalian species and avian species. While primordial germ cells in avian species migrate via blood vassels, in mammalia migration occurs between tissues. There is not enough information about location and function of molecules which may play a role in primordial cell migration.**

**The aim of this study is to search if sialyl Lewis-X molecule is expressed in quail embryos which is found to be expressed in chicken primordial cell migration. sialyl Lewis-X molecule which is recognized by selectines plays a role for extracting primordial germ cells to outside of vassel barrier in avian species and it's expression is important for understanding the migration mechanisms of primordial germ cells.**

**The expression of sialyl Lewis-X in quail embryos was studied by immunohistochemistry. Sialyl epitope recognizing antibodys were used to stain sialyl Lewis-X.**

**We have shown that sialyl Lewis-X expression does not occur during primordial germ cell migration in quail embryos, further studies will be required.**

**Key words:** Primordial germ cells, sialyl Lewis-X, Immunohistological analysis, *Bursa fabricius*



## İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
İçindekiler .....	vi
Şekiller Dizini .....	viii
Tablolar Dizini .....	ix
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini .....	x
1. GİRİŞ .....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI .....	2
2.1. Kanatlı Yumurtası ve Şekillenmesi .....	2
2.1.1. Tavuklarda Ovulasyon Döngüsü .....	2
2.1.2. Vitellin Membran .....	2
2.2. Fertilizasyon ve Kuluçka Öncesi .....	3
2.2.1. Primitif Çizgi Oluşumu Öncesi Safhalar .....	5
2.2.2. Ooplazmik Ayrılma .....	8
2.3. Kuluçka Sonrası Erken Safhalar .....	9
2.3.1. Posterior Marginal Zon ve Koller's Sickle .....	11
2.3.2. Alt Tabaka .....	12
2.3.3. Üst Tabaka (epiblast) .....	14
2.3.4. Primitif Çizgi .....	14
2.4. Kanatlılarda Genital Sistemin Embriyonik Gelişimi .....	15
2.4.1. Eşeyssel Farklılaşma .....	17
2.4.1.1. Testis .....	17
2.4.1.2. Ovaryum .....	18
2.5. Kanatlı Primitif Cinsiyet Hücrelerinin Gelişimsel Tarihi .....	18
2.6. Primitif Cinsiyet Hücreleri .....	19
2.6.1. Primitif Cinsiyet Hücrelerinin Moleküler Mekanizması .....	23
2.6.2. Kanatlı Primitif Cinsiyet Hücrelerinin Gonadal Taslağa Göçü .....	24
2.6.3. Primitif Cinsiyet Hücrelerinin Pasif Göçü .....	26
2.6.4. Primitif Cinsiyet Hücrelerinin Hareketi .....	26
2.6.5. Primitif Cinsiyet Hücrelerinin Göçünde Ekstraselüler Matriksin Rolü .....	27
2.7. Primitif Cinsiyet Hücrelerinin Göçünde sialyl Lewis-X Molekülünün Rolü .....	27
2.8. Sialyl Lewis-X'in Kansere İlişkisi .....	29

2.9. İmmünohistokimya .....	30
3. MATERYAL VE METOD .....	31
3.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar.....	31
3.2. Embriyo İzolasyonu .....	32
3.3. İmmünohistokimyasal ve İmmünofloresans Analizler .....	33
3.4. Antijen Retrieval İşlemi .....	33
4. BULGULAR .....	35
4.1. Bıldırcın Primitif Cinsiyet Hücrelerinin DAB boyaması ile Gösterilmesi .....	35
4.2. QH-1 Ekspresyonu .....	35
4.3. Bıldırcın Primitif Cinsiyet Hücrelerinde sLe-X Ekspresyonunun İncelenmesi ..	37
5. TARTIŞMA .....	41
6. SONUÇ .....	44
7. KAYNAKLAR .....	46
8. ÖZGEÇMİŞ .....	52

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 2.1 Evcil kuş sperminin morfolojisi.....	4
Şekil 2.2 İnkübe edilmemiş tavuk yumurtasının alt yüzeyi .....	9
Şekil 2.3 Area pellucida'nın anterior-posterior eksenini boyunca embriyodan kesit .....	10
Şekil 2.4 İnkübasyonun 16. Saatinde primitif çizginin anterior ucu .....	11
Şekil 2.5 Koller's sickle ve primitif çizginin oluşumu .....	12
Şekil 2.6 Tavuk embriyosu boyunca çapraz kesit.....	12
Şekil 2.7 Area pellucida'nın alt tabakasını oluşturan dokuların ilişkileri.....	13
Şekil 2.8 İnkübe edilmemiş embriyonun area pellucidasının lateral bölgesindeki epiblast hücreleri .....	14
Şekil 2.9 Primitif çizginin yapısı ve uzunluğu .....	15
Şekil 2.10 Genital bölge .....	16
Şekil 2.11 Primitif cinsiyet hücreleri .....	22
Şekil 2.12 sialyl Lewis-X molekülünün kimyasal yapısı .....	28
Şekil 2.13 sLe-X'in glikoziltransferazlar ile temsil edilmiş biyosentetik yolu.....	29
Şekil 4.1 Bıldırcın embriyo kesitinin (20HH) ışık mikroskop görüntüsü.....	35
Şekil 4.2 20HH safhasındaki bıldırcın embriyo kesitlerinin floresan mikroskop görüntüsü .....	36
Şekil 4.3 20HH safhasındaki bıldırcın embriyo kesitlerinin floresan mikroskop görüntüsü .....	37
Şekil 4.4 12. gün tavuk <i>Bursa fabricius</i> 'da CSLEX1 antikoru ile prebursal B hücrelerinin gösterilmesi .....	38
Şekil 4.5 12. gün tavuk <i>Bursa fabricius</i> 'da HECA antikoru ile prebursal B hücrelerinin gösterilmesi.....	39
Şekil 4.6 Primitif cinsiyet hücrelerinin görünümü .....	40

**TABLÖLAR DİZİNİ****Sayfa**

Tablo 2.1 Eyal-Giladi ve Kochav skörlama sistemi.....	7
Tablo 2.2 Hamburger-Hamilton skörlama sistemi.....	8

## SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>BMP:</b>	Bone Morphogenetic Protein
<b>CVH:</b>	Chicken Vasa Homolog Protein
<b>CXCR4:</b>	C-X-C Chemokine Receptor-4
<b>DAB:</b>	3.3' Diaminobenzidin Tetrahidroklorit
<b>EG-K:</b>	Eyal-Giladi ve Kochav
<b>EMA-1:</b>	Embryonic Mouse Antigen-1
<b>GS:</b>	Griffonia simplicifolia
<b>HH:</b>	Hamburger-Hamilton
<b>PAS:</b>	Periyodik Asit Schiff
<b>PBS:</b>	Fosfat Tampon Solüsyonu
<b>PG2:</b>	Primordial Germ Cell Epitope-2
<b>QIH:</b>	Ovulasyonu İndükleyen Hormon
<b>sLe-X:</b>	Sialyl Lewis-X
<b>SSEA-1:</b>	Stage Specific Embryonic Antigen-1
<b>TBS:</b>	Tris Tampon Solüsyonu
<b>TGF-<math>\beta</math>:</b>	Transforme Edici Büyüme Faktörü
<b>WFA:</b>	Wistaria floribunda

## 1. GİRİŞ

Primitif cinsiyet hücreleri, embriyonel dönemde eşey hücrelerini oluşturmak üzere farklılaşmış olan ve erişkin dönemde dişilerde yumurta hücrelerini, erkeklerde ise sperm hücrelerini oluşturacak olan embriyonel hücrelerdir. Primitif cinsiyet hücreleri bütün omurgalı hayvanlarda olduğu gibi kanatlı hayvan türlerinde de gonad dokusundan ayrı bir yerde ortaya çıkarlar. Oluşan bireyin fertil olabilmesi, primitif cinsiyet hücrelerinin ileride dişilerde ovaryumu, erkeklerde ise testis dokusunu oluşturacak olan embriyonel gonad dokularına göç etmesini gerektirmektedir. Aktif hücre göçünü gerektiren bu süreçte, kanatlı ve memeli hayvan türleri arasında çok önemli farklılıklar bulunur. Memeli hayvan türlerinde primitif cinsiyet hücrelerinin göçü dokular arasından gerçekleşirken kanatlı hayvan türlerinde primitif cinsiyet hücrelerinin göçü kan dolaşımı yolu ile gerçekleşmektedir. Primitif cinsiyet hücrelerinin damar duvarını aşarak gonadal dokulara yerleşmesinde embriyonel gonadal dokular tarafından salgılanan çeşitli kimyasal maddelerin rolü olduğu düşünülmektedir. Yine bu süreç içerisinde primitif cinsiyet hücre membran yüzeyinde bulunan çeşitli moleküllerin işlevleri bilinmemektedir. Bu çalışmanın amacı, kanatlı embriyolarında primitif cinsiyet hücrelerinin sialyl Lewis-X ( sLe-X) molekülünü taşıyıp taşımadıklarını incelemektir. sLe-X, immün sisteme ait pek çok hücrenin yüzeyinde glikoprotein ve glikolipitlere bağlı olarak bulunan glikanların son halkasını oluşturmaktadır. sLe-X selektinler tarafından tanınarak primitif cinsiyet hücrelerinin damar duvarı dışına çıkmasında rol oynamaktadırlar.

## **2. KURAMRSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI**

### **2.1. Kanatlı Yumurtası ve Şekillenmesi**

Tavuk embriyo gelişimi ile ilgili ayrıntılar The Atlas of Chick Development (Bellairs and Osmond) adlı kitapta verilmiştir. Buna göre;

Kuş yumurtaları, embriyonun şekillenmesi için kabuklarındaki küçük porlar aracılığıyla hammaddelerin girişine izin verir. Yumurta sarısı yaklaşık 2-3 cm çapında ve vitellin membran denilen ince şeffaf bir membranla kuşatılmıştır. Yumurta sarısının temel bileşenleri lipidler ve proteinlerdir.

#### **2.1.1. Tavuklarda ovulasyon döngüsü**

Gonadotropinlerden kompleks hormonal kontrol altındaki işlem anterior hipofiz bezi tarafından üretilir. Tavuklarda ovulasyonu indükleyen hormon (OIH) hipofiz tarafından salgılanır ve yeterince olgun folikül varsa yaklaşık 4-8 saat arasında yumurtlayarak OIH'ye karşılık verir.

#### **2.1.2. Vitellin membran**

Vitellin membran, tavuk yumurtasının yumurta sarısını örten şeffaf bir zardır ve yumurta sarısını albümeden ayırır. Glikoprotein bakımından zengin ovaryuma dayanan bir iç tabaka ve yumurta kanalında salgılanan dış tabaka olmak üzere iki ana tabakadan oluşur. Dış tabakanın başlıca bileşenleri; ovomucin, lizozim ve vitellüs membran dış proteinleri I ve II dir. Ovomucin, dış tabakanın lifsi yapısını oluşturur. Lizozim, ovomucin ile güç ve desteklik için elektrostatik kompleks oluşturur. İç tabakanın başlıca bileşenleri; membran glikoproteinleri I, II ve III tür. Glikoprotein II nin iç tabakanın bütünlüğü ile ilgili olduğu düşünülür.

İnkübasyonun ilk haftası boyunca albümin evaporasyonla sağladığından daha fazla su kaybeder aynı zamanda yumurta sarısı daha fazla suya ihtiyaç duyar. Bu yüzden suyun vitellin membrandan yumurta sarısına direk geçtiği farzedilmiştir ve inkübasyonun ilk haftası boyunca vitellin membrana 16 g sıvı geçişi olduğu hesaplanmıştır (Romanoff ve Romanoff 1949). Tavuk blastodermi kültürde büyüdüğü zaman sıvının membran boyunca geçtiği ve embriyonun ventral bölümünde toplandığı görülür. Eğer yıkanmış vitellin membran diyaliz membran gibi kullanılırsa yumurtadan elde edilen suda çözünebilir proteinler membran boyunca geçebilir (Jordanov vd 1966).

Yapılan bir çalışmada kuluçkaya yatan Japon tavuklarına tritiye tirozin enjekte ederek işaretlemiştir ve yumurtalarını toplamıştır. Kendi vitellin membranında olan radyoaktif olmayan yumurta sarıları enjekte edilmemiş kuluçkaya yatan tavuklardan elde edilmiştir. İşaretlenmiş albümin ve işaretlenmemiş yumurta sarısı işaretlenmemiş yumurta kabuğunda bir araya getirilmiştir ve inkübe edilmiştir. Otoradyograflar inkübasyonun ilk iki gününde albüminin vitellin membran boyunca penetre olduğunu ve blastodermin dış kısmına biriktiğini göstermiştir. Albüminden yumurta sarısına vitellin membran boyunca sodyum transportunun embriyonun ektoderminden kontrol edilebileceği görülmüştür (Callebaut 1987).

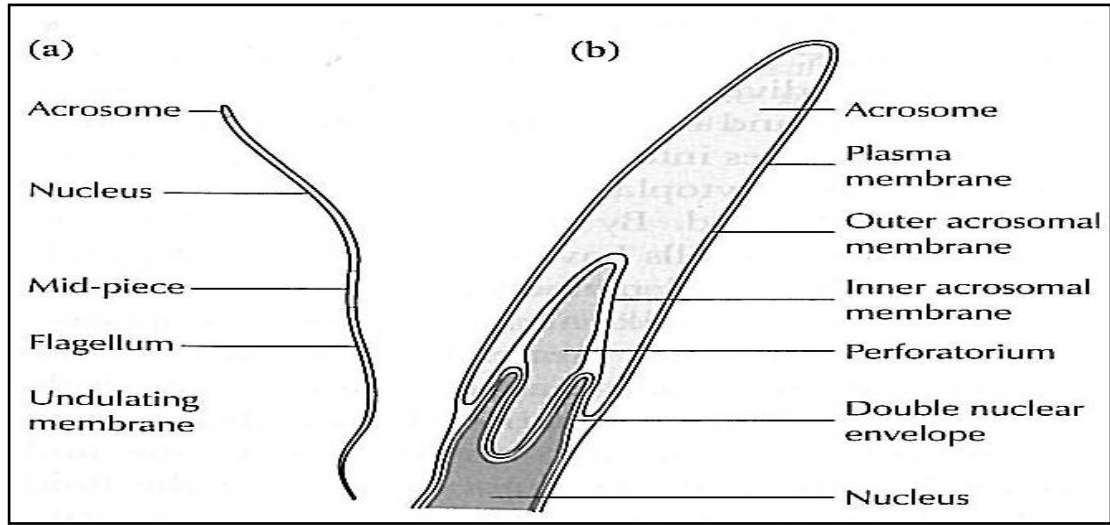
## 2.2. Fertilizasyon ve Kuluçka Öncesi

Her ne kadar embriyo gelişiminin yumurtlamadan sonra başladığı düşünülse de yumurtlamadan önce fertilizasyon dışında embriyo gelişimine yönelik pek çok önemli olay gerçekleşir.

Kanatlı spermlerinin yapısı diğer omurgalı türleriyle benzerlik gösterir. Nükleus ve akrozom içeren bir baş yapısı, ortada mitokondria ve uzun bir flagellum bulunur. Evcil kuşlarda nükleus çok uzundur ve incedir, baş kısmı pek çok omurgalı sperminin karakteristik özelliğinde olduğu gibi uzar (Şekil 2.1). Bu tip sperm ötücü olmayan kuşlara özgüdür ve ince yapısından dolayı fusiform veya vermiform olarak tanımlanır (Bellairs ve Osmond 2005). Kuş spermi memelilerin aksine kendi fertilizasyon kabiliyetlerine sahiptirler ve memelilerle bulunan bezlere sahip olmamalarına rağmen semen tavuğun genital bölgesine direk geçer (Wishart ve Harrocks 2000). Fertilizasyon,



ovulasyondan kısa bir süre sonra oviductun iç kısmında (infundibulumda) meydana gelir (Petitte vd 1997).



**Şekil 2.1** Evcil kuş sperminin morfolojisi a) spermatozoan b) akrozomal bölge (Wishart ve Harrocks 2000)

Tamamı değil bir kısmı göç ettikten sonra sperm, uterus ve vajinanın bağlantı bölgesinde konumlanmış olan sperm depolama tübüllerine transfer edilir. Hangi sperm taşınacağı ya da hangisinin taşınmayacağını hangi faktörlerin belirlediği açık değildir. İfundibulumun üst ucunda ilave sperm depolama tübülleri vardır. Bu tübüller histolojik olarak bakıldığında salgı yapıyor gibi görünmezler ve muhtemelen sadece reseptakulum olarak görev görür. Sperm, tübün epitelyumuna başı ile uygun biçimde sırayla dizilir ve kuyrukları lümende asılı durur. Bir tübülde en fazla 100 sperm depolanabilir (Bakst vd 1994). Sperm depolama tübüllerinin temel önemi; eşzamanlı çiftleşme ihtiyacı olmadan kuluçkadaki yumurtaların fertilizasyonuna olanak sağlamasıdır. Vitellin membranın dış kısmı döşendikten ve sperm girişi engellenmeden önce ovulasyondan sonra kısa bir sürede (yaklaşık 15 dak.) fertilizasyonun hemen gerçekleşmesi önemlidir (Wishart ve Harrocks 2000). Tüplerdeyken sperm muhtemelen metabolik olarak inaktif duruma geçer. Tübül sıvıdaki  $Ca^{+2}$  konsantrasyonu görünüşe göre sperm motilitesini inhibe eder, bu inhibisyon ayrılmaya bağlı olarak aktive edilir (Holm vd 2000). Spermin sürekli olarak ve oviductta herhangi bir olayın sonucuna bağlı olmaksızın salındığı görülür. Yumurta infundibulumu girdiği zaman pek çok sperm hızlı bir şekilde vitellin membranın iç kısmının yüzeyi ile bağlantı kurar ve membran boyunca akrozomdan salınan hidrolitik enzimli yapılar arasında uzanan granuler materyali çözerek geçer (Wishart ve Harrocks 2000).

İç kısma penetre olunması ile her sperm ilk önce üzerindeki karbonhidrat tabanlı olduğu bilinen reseptöre bağlanır (Robertson vd 2000). Bu sürede akrozom membranının bozulmasının terminal N-asetil glukozamin kalıntılı N-bağlı oligosakkarit tarafından indüklendiğine dair kanıtlar bulunmuştur (Harrocks vd 2000). Bunun akrozom çevresindeki membran rüptürünü tetiklediği görülür ve spermin membrandan direk geçebilmesi için vitellin membranın iç kısmındaki küçük alanı kesmeye yarayan hidrolitik enzimlerin salınmasıyla sonuçlanır (Bellairs ve Osmond 2005).

Geniş yolklu yumurtaların problemlerinden bir tanesi spermin nükleusu nasıl bulduğu ve dişi nükleus ile nasıl birleştiğidir. Bazı küçük yolklu yumurtalarda birden fazla spermin girişini önlemek için mekanizmalar bulunur, fakat kanatlılarda sperm pek çok yumurtaya girer. Bununla birlikte sadece bir tanesi başarılı olarak döller, erkek ve dişi haploid nükleus ovulasyondan 3 saat sonra diploid kromozom sayılı zigot oluşturmak için birleşirler (Waddington vd 1998). İlk mitotik bölünme yaklaşık 1 saat sonra olur. (Wishart ve Harrocks, 2000).

Eyal-Giyaldi ve Kochav 1976 (EG-K) tavuk embriyosunun gelişim aşamalarını çalışmıştır ve embriyolarda işlevsel bilateral simetri ile radial simetri yapıları gibi önemli morfolojik değişiklikleri tanımlamışlardır. Bu sistem, tavuk ve bıldırcın embriyoları için yararlı olmuştur (Petitte vd 1997). Ancak kanatlılardan tavuk ve bıldırcına göre hindinin erken gelişiminin daha farklı olduğu bulunmuştur (Gupta ve Bakst 1993).

Erken safhalar boyunca kanatlı embriyosu blastoderm olarak bilinen düz bir diske sahiptir. Üst taraftaki hücreler vitellin membran altına uzanarak dorsal kısmı oluştururken alt yüzey yolka bağlıdır ve ventral kısmı oluşturur, ventral kısım asidik dorsal kısım baziktir. Bu yüzden blastodermdeki iki bölge arasındaki farklılıklar dorso – ventral polarite oluşumunda önemli rol oynar (Stern ve Canning 1988).

### **2.2.1. Primitif çizgi oluşumu öncesi safhalar**

Primitif çizgi oluşumu öncesi safhalar I–XIV (EG–K) (Tablo 2.1) arası Romen rakamları ile gösterilmiştir ve HH (Hamburger ve Hamilton 1951) (Tablo 2.2) sınıflandırma sisteminden ayırt edilmiştir. I – VI safhalar; subgerminal boşluk ile

yumurta sarısından ayrılmış 6 hücreli embriyo formuna kadar ardı ardına bölünmelerle karakterizedir. VII–X safhalar; subgerminal boşluğun doğrudan üzerini kaplayan blastodermin merkezi bölgesinin incelmesi ile meydana gelen area pellucida şekillenmesi gibi belli morfogenetik olayları kapsar. Bu sürecin hücre dökülmesi ile gerçekleştiğine inanılmaktadır ve ayrıca yerçekimi etkisine doğru kazanılan aksiyal simetri ile de ilişkili olduğu düşünülür. Epiblastın altında bulunan hipoblastın şekillenmesi sırasında area pellucida'nın çift katmanlı hale gelmesi embriyoda bilateral simetriyi açıkça ortaya koymuştur ( safha XI–XIII ) ve sonrasında primitif çizgi gelişir ( safha 2-4 HH ). Safha XI de ventral yüzde ve hipoblastın şekillenmesinin ilk işareti olan posterior marjinal zon'a komşu olarak Koller's sickle oluşur (Petitte vd 1997). Sonrasında epiblast, gelişen hipoblast için dairesel, ağ şeklinde kalın bir hücre haline gelir (Watt vd 1993). Hipoblast epiblastın üzerini örterek primitif çizgi oluşumundan sorumludur (Eyal–Giladi vd 1994). Hipoblast şekillenmiş olan safha XIII deki embriyoda hipoblast ekstraembriyonik endoderme katkıda bulunur. Primitif çizgi şekillenmesi ve gastrulasyon başlangıcı ile hipoblast, yer değiştirir ve endodermal tabakada görünür (Petitte vd 1997).

**Tablo 2.1** Eyal-Giladi ve Koçav skorlama sistemi ( 1975 )

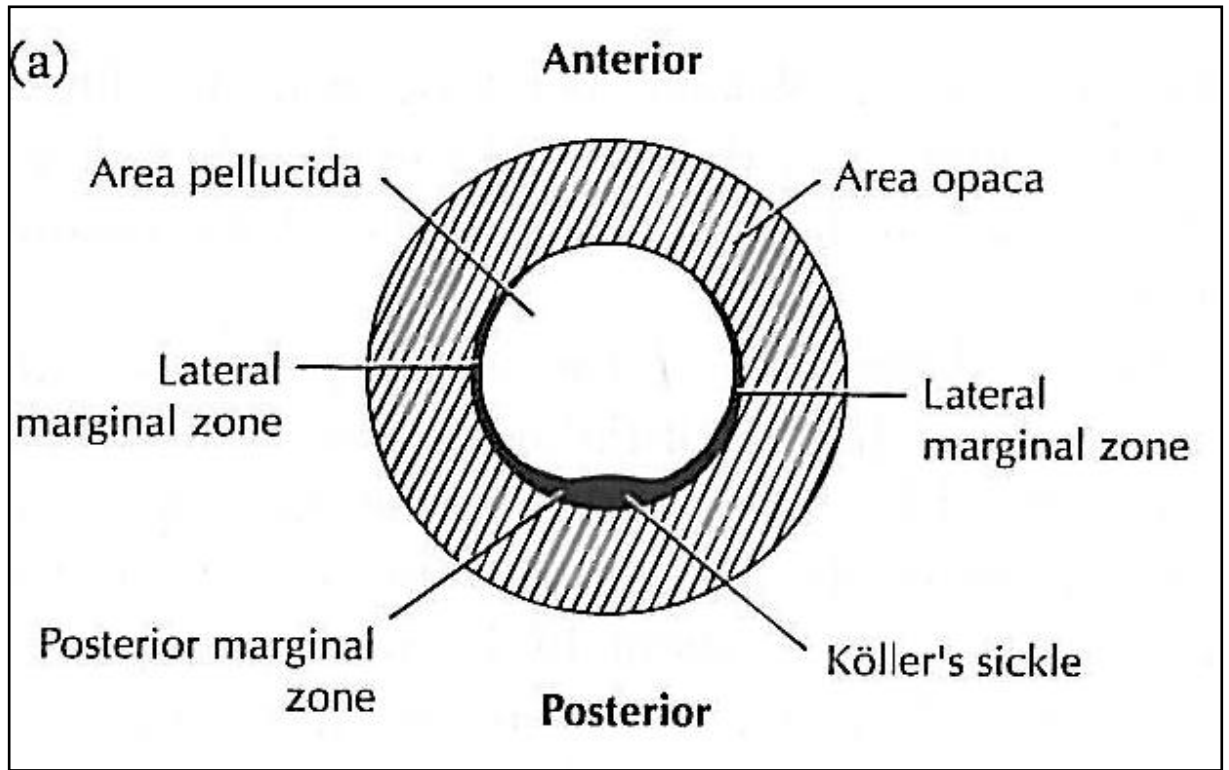
Safha I	0-1 saat	Her bir yumurta vizkoz albümen ile çevrelenmiştir ve kabuk membranı yumuşaktır.
Safha II	2 saat	Germinal diskin geri kalan kısımlarında 14-16 kapalı hücre meydana gelmiştir. Bölünme izi merkezde genişler.
Safha III	3-4 saat	Merkezde 80-90 kapalı blastomerler bulunur
Safha IV	5 saat	Üst tabakada yaklaşık 250-300 kapalı hücre bulunur. Alt tabakada hala görülebilen 80-90 kapalı hücre vardır.
Safha V	8-9 saat	Hücreler boncuk şeklindedir ve subgerminal boşluk genişlemiştir.
Safha VI	10-11 saat	Hücreler boncuk şekillerini kaybederek küçük ve yassı şekle gelirler. Tüm sitoplazma blastomer halinde yarılmıştır.
Safha VII	12-14 saat	Üst tabakadaki hücreler gitgide küçülür alt tabakada ise sadece büyük hücreler kalmıştır. Area pellucidanın ilk izi bu safhadadır.
Safha VIII	15-17 saat	Area pellucida yayılmıştır ve area opaca şekillenir.
Safha IX	17-19 saat	Area pellucida ile area opaca arası sınır henüz belirlenmemiştir.
Safha X	Area pellucida ve area opaca birbirinden ayrılmıştır.	
Safha XI	Koller's sickle şekillenir.	
Safha XII	Hipoblast şekillenmeye başlar.	
Safha XIII	Hipoblast oluşumunu tamamlar.	
Safha XIV	A.pellucida ve A.opaca arasında hücre sel bir köprü oluşur.	

**Tablo 2.2** Hamburger-Hamilton skorlama sistemi ( 72 saat )

1HH	Blastodermin yarısına karşılık embriyonik örtü görülür.
2HH	6-7 saat
3HH	12-13 saat
4HH	18-19 saat
5HH	19-22 saat
6HH	23-25 saat
7HH	23-26 saat
8HH	26-29 saat
9HH	29-33 saat
10HH	33-38 saat
11HH	40-45 saat
12HH	45-49 saat
13HH	48-52 saat
14HH	50-53 saat
15HH	50-55 saat
16HH	51-56 saat
17HH	52-64 saat
18HH	65-69 saat
19HH	68-72 saat
20HH	70-72 saat

### 2.2.2. Ooplazmik ayrılma

İnkübasyon öncesi blastoderm pek çok bölge içerir. İnkübe edilmemiş bıldırcın embriyosunun Pander'in nükleusu üzerinde uzanan ventral kısmın diyagramı şekildeki gibidir (Şekil 2.2). Koller's sickle, posterior uçta hilal şeklinde görülür ve bu ooplazmik partiküller ile paketlenmiş, area opaca tarafından bütün olarak kuşatılmıştır. Marjinal zon olarak adlandırılan bu bölge area opaca ve area pellucida arasında uzanmıştır. Endofil bölge, area pellucidanın merkezinde yerleşmiştir.



Şekil 2.2 İnkübe edilmemiş tavuk yumurtasının alt yüzeyi (Bellaris ve Osmond 2005)

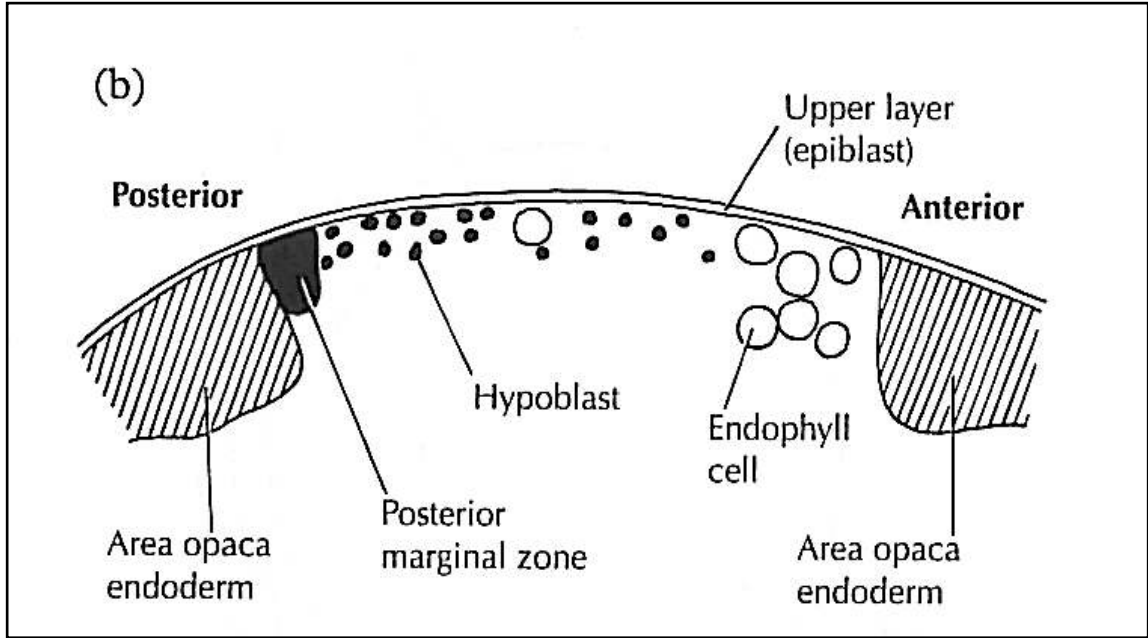
Oositin şekillenmesi süresince bildirgin germinal diski ile ilişkili 4 ooplazm ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$ ) ayırtedilmiştir. Bu işlem süresince  $\beta$  ve  $\delta$  ooplazmlar yer değiştirir ve embriyonun farklı bölgelerine dağılmış hale gelir, bu bölgeler gelişimde önemli rol oynar.  $\alpha$  ooplazm, diğer ooplazmik bölgelerden çok erken ayrılır ve yumurtlamadan önce gözden kaybolur.  $\beta$  ooplazm Köller's sickle'ı şekillendirir. Üstelik  $\delta$ , primordial germ hücrelerine ayrılır ve merkez bölgeye katkıda bulunurken  $\gamma$  ooplazm, area pellucidanın merkezi içine doğru birleşmiştir. Bu ilişki, ooplazmın 4 tipinin yeniden dağılımına ve antero-posterior eksenin kurulumuna sebep olur (Callebaut 1987).

### 2.3. Kuluçka Sonrası Erken Safhalar

Yumurtaların inkübasyon sıcaklığı, tavukların vücut sıcaklığından (yaklaşık 40 °C) daha düşüktür ve normal olarak inkübasyon sıcaklığı 37–38 °C dir. Embriyo gelişimi yaklaşık 25 °C de önemli ölçüde yavaşlar ve inkübasyon başlayana kadar durur (Bellairs ve Osmond 2005).

İlk 24 saat içerisinde meydana gelen morfolojik değişiklikler yolk yüzeyinden embriyonun kesilmesi ile incelenir. En dikkat çekici özellik saydam merkezi bölgesi

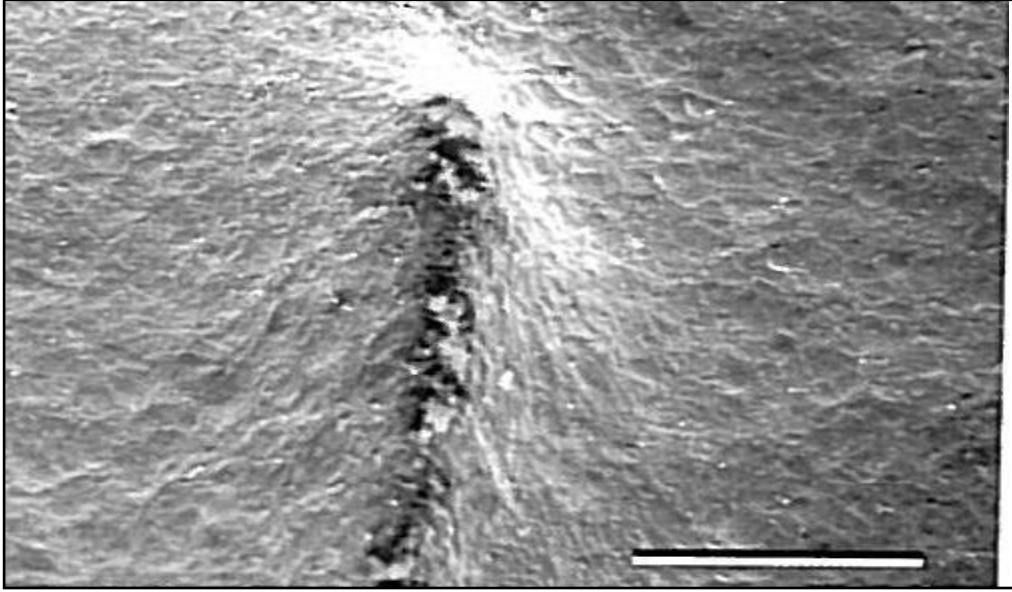
olan area pellucida içerisindeki kısımlardır ve area opaca oldukça opak, periferal halka halindedir. Area opaca boyunca en üst (epiblast) ve en altta olmak üzere 2 tabaka vardır ve area pellucidanın posterior kısmındadır (Şekil 2.3) (Bellairs ve Osmond 2005).



**Şekil 2.3** Area pellucida'nın anterior – posterior eksenini boyuncu embriyodan kesit (Bellairs ve Osmond 2005)

Area opaca'nın opaklığı, alt tabakadaki intraselüler yolk damlacıklarının sayısının fazla olmasından kaynaklanır. İntraselüler yolk damlacıkları area pellucida içerisinde de bulunur ancak area opaca'ya göre daha küçük ve daha az sayıdadır ve bu yüzden area pellucida daha şeffaftır. Area pellucida ve area opaca birlikte ekstra-embriyonik doku oluşumuna neden olur (Bellairs ve Osmond 2005).

İnkübasyonun yaklaşık 10. saatinde (safha 2HH) area pellucida da primitif çizgi görülmeye başlar. Primitif çizgi; üst tabakada koyu, üçgenimsi gibi görülür, tepe kısmı area pellucidaya uzanır ve tabanı area opaca ile sınır oluşturur. İnkübasyonun yaklaşık 18.saatine kadar (safha 4 HH) area pellucidanın bir ucundan bir ucuna uzayarak tam uzunluğuna ulaşır ve en önemli bölgesi olan Hensen nodülü; anterior uçta kabarıklık şeklinde görülmeye başlar (Şekil 2.4) (Bellairs ve Osmond 2005).



**Şekil 2.4** İnkübasyonun 16.saatinde primitif çizginin anterior ucu ( bar : 500  $\mu\text{m}$  ) (Bellairs ve Osmond 2005)

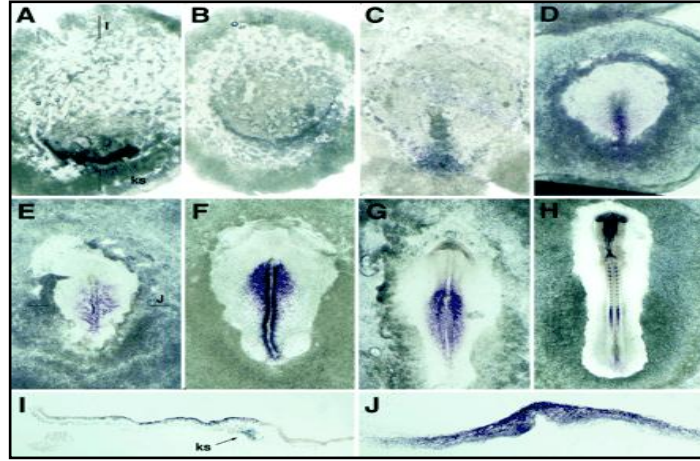
Primitif çizginin oluşumu ile ilgili iki kilit yapı posterior marjinal zon ve Koller's sickle' dır.

### **2.3.1. Posterior marjinal zon ve koller's sickle**

Marjinal zon; area opaca ve area pellucida arasında uzanır. Area pellucida'nın posterior ucunda oldukça geniş, çok katmanlı bir yapıdır ve anterior bölgenin lateralinde daha ince hale gelir. Koller's sickle; posterior marjinal zonun anterior kenarında hilal şekilli bölgedir (Callebaut ve Von Neuten 1994). Posterior marjinal zon ve Koller's sickle primitif çizginin oluşumunda önemli rol oynarlar (Şekil 2.5).

Koller's sickle ve posterior marjinal zonun her ikisinde yüksek hücre proliferasyonuna sahip olduğu bilinir (Zehavi vd 1998).

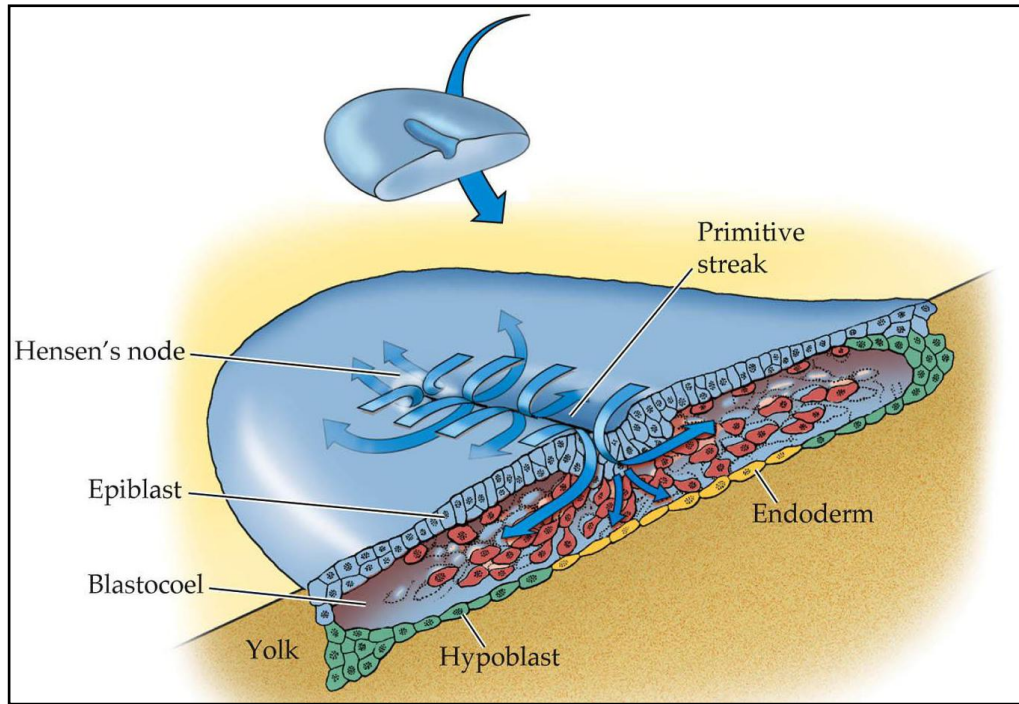




Şekil 2.5 Koller's sickle ve primitif çizginin oluşumu (Skromne ve Stern 2001)

### 2.3.2. Alt tabaka

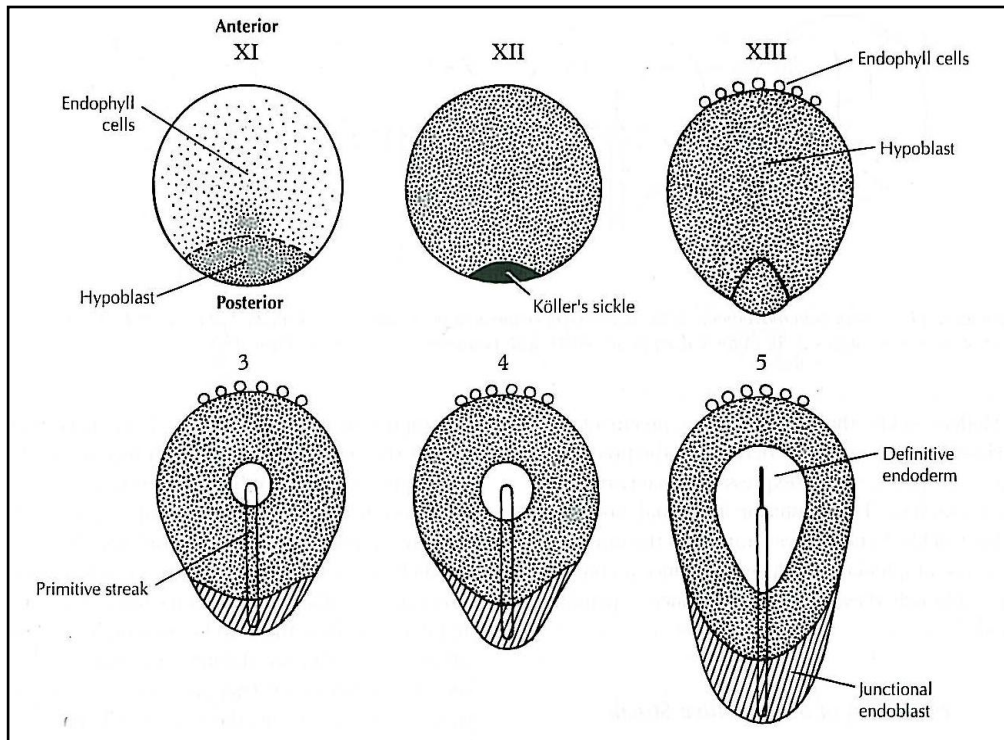
4 hücre tipi alt tabakaya katkı sağlar. Area pellucida'nın üst kısmındaki dağınık hücre kümeleri 30–50 µm çapındaki epiplastı oluşturur. Epiplast; endofil olarak adlandırılan alt tabakada gelişiminin ilk göstergesidir (Şekil 2.6). Çok fazla olmasa bile endofil hücrelerinin primordial germ hücrelerini oluşturdukları düşünülür (Stern 1990).



Şekil 2.6 Tavuk embriyosu boyunca çapraz kesit (Eoi 2012)

İnkübasyonun başlamasından kısa bir süre sonra area pellucida'nın posterior ucunda hipoblast olarak adlandırılan alt tabakanın ikinci bileşeni oluşur. Çoğunlukla Koller's

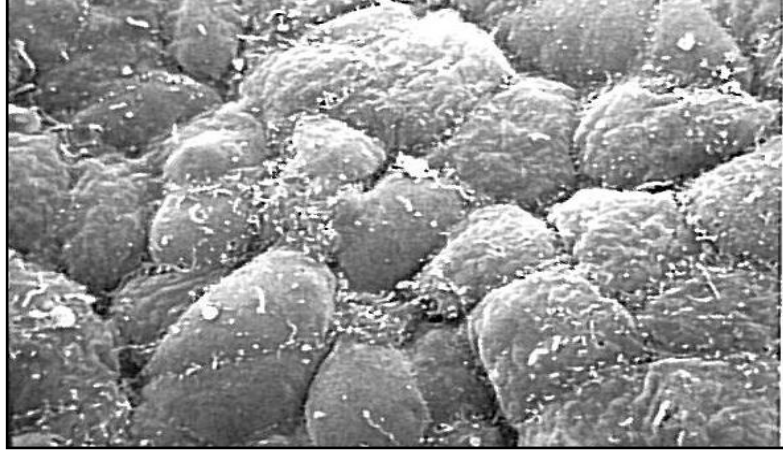
sickle'dan göç ile şekillenir ve inkübasyonun yaklaşık 12 saatinde area pellucida altında uzanır. Endofil hücrelerinin bazıları taşınarak gevşek bir tabaka oluştururlar. Sonuç olarak, “germinal crescent” bölgesinde lokalize hale gelirler. Hipoblast hücrelerinin her biri yaklaşık 15–20 µm çapındadır ve birbirlerine gevşek şekilde eklenir. Burada bazal lamina ile ilişkileri yoktur. Hipoblast hücreleri doku kültüründe hızlandırılmış sinematografi ile çalışılmıştır ve kolaylıkla göç edip yerleştiği bulunmuştur (Sanders vd 1978). 2. ve 3. safhalarda posterior hipoblast yer değiştirerek alt tabakanın 3. bileşeni olan endoblast haline gelir. Endoblast; “sickle endoplast” ve “junctional endoblast” olarak 2 tip hücre grubu oluşturur. Sickle endoblast, Koller's sickle'ın altında uzanırken “junctional endoblast” daha yanda şekillenir. Sickle endoblastın vitellüs kesesi endoderminden oluştuğu ve kan damarlarının oluşumunu etkilediği bulunmuştur (Callebaut vd 2001). Alt tabakanın sonuncu bileşeni definitive endodermdir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7 Area pellucida'nın alt tabakasını oluşturan dokuların ilişkileri (Sanders 1978)

### 2.3.3. Üst tabaka (epiblast)

Aktivitenin alt tabakada gerçekleştiği bu dönem boyunca embriyo yolk üzerinde genişler ve üst tabaka 4 hücreden 8 hücreli duruma gelerek kalınlaşır (Şekil 2.8).



**Şekil 2.8** İnkübe edilmemiş embriyonun area pellucidasının lateral bölgesindeki epiblast hücreleri (Bellairs ve Osmond 2005)

### 2.3.4. Primitif çizgi

Primitif çizgi embriyo gelişiminde önemli bir rol oynar. İlk olarak inkübasyonun 6.–7. saatlerinde (Safha 2HH) area pellucidanın posterior ucunda üçgenimsi, karanlık bir gölge şeklinde görünür hale gelir. İnkübasyonun 13. saatine kadar giderek genişler. Primitif çizgi olarak adlandırılmasının sebebi area pellucida’da uzanan koyu iki çizgi halinde görülmesidir. Bu koyuluk çok sayıda hücrenin yığılmasından kaynaklıdır (Şekil 2.9). İlkel çizgi, gelecekte vertebral eksenlerin konumunu belirler. Primitif çizgi posterior orta çizgide epiblast hücre popülasyonundan meydana gelir. Hızlandırılmış sinematograf çalışmaları göstermiştir ki epiblast hücreleri burada kümeleşir ve daha sonra ileri doğru göç eder (Bellairs ve Osmond 2005).

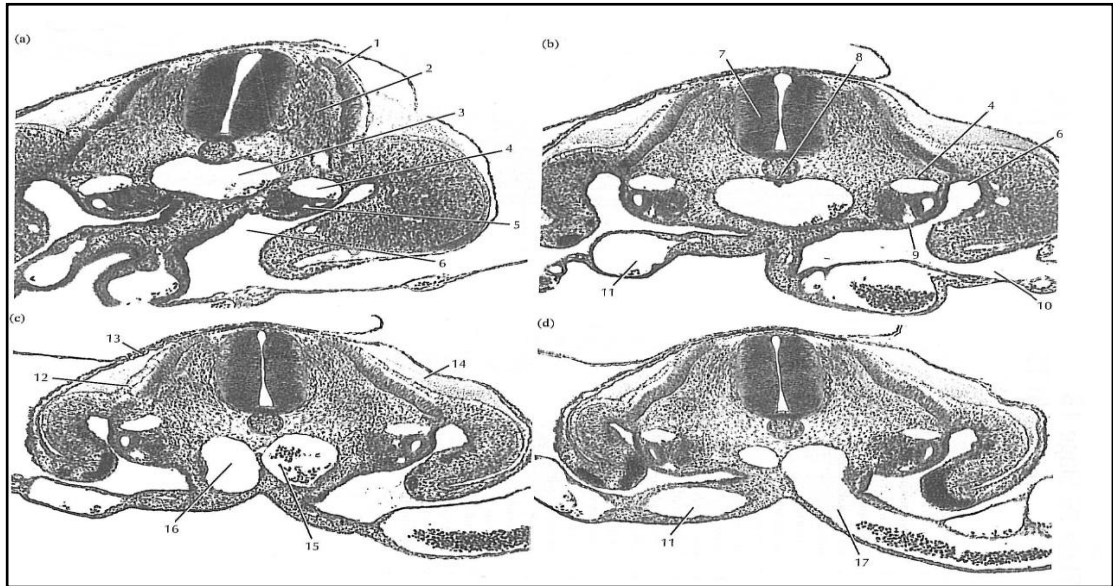
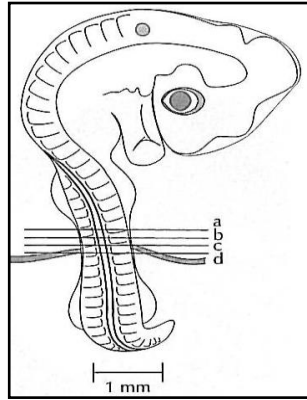




Şekil 2.9 Primitif çizginin yapısı ve uzunluğu (Bellairs ve Osmond 2005)

#### 2.4. Kanatlılarda Genital Sistemin Embriyonik Gelişimi

Genital sistem ara mezodermden şekillenir. 3. günde nefrojenik mezenşim genişler ve peritoneal boşluk içerisindeki vücut duvarından sarkan bir çift çizgi meydana gelir. Ara mezodermde ürogenital çizgi ve genital çizgi gelişir. Bu çizgiler splanknik mezodermden kaynaklanan periton ile örtülüdür. (Şekil 2.10). Embriyonun cinsiyetini belirleyecek kromozomların kontrolüne rağmen ovaryum ya da testis haline gelip gelmeyeceklerini morfolojik ya da histolojik olarak belirlemek gonad gelişiminin erken safhalarında mümkün değildir. Bu yüzden bu safha farklılaşmamış safha olarak adlandırılır. Yapılan araştırmalar farklılaşmanın daha çok hormonal aktiviteye bağımlı olduğunu göstermiştir (Bellairs ve Osmond 2005). Örneğin; inkübasyonun 3. gününde 13 günlük erkek embriyolarının testisleri dişi embriyolarına implante edilirse dişi embriyolarında testisler şekillenir (Stoll vd 1993) ve oestradiol ile erkek gonadlarının feminizasyonuna ve Muller kanalında birikimine neden olur (Faucounau vd 1995).



**Şekil 2.10** Genital bölge 1) dermatom 2) sklerotom 3) dorsal aorta 4) sol posterior ana damar 5) sol nefrik kanal 6) sol embriyonik sölom 7)nöral tüp 8) notokord 9) sol nefrojenez çizgi 10) ekstraembriyonik sölom 11) sağ omfalo mezenterik arter 12) embriyonik ektoderm 13) amniyon 14) amniyotik boşluk 15) sol dorsal aort 16) sağ dorsal aort 17) sol omfalo mezenterik arter (Bellairs ve Osmond 2005)

Kuşlarda heterogametik cinsiyet (ZW) dişi, homogametik cinsiyet (ZZ) erkektir. Memelilerde bu durum heterogametik cinsiyet (XY) erkek, homogametik cinsiyet (ZZ) dişi olmak üzere tersidir (Bellairs ve Osmond 2005).

3.5 güne kadar primitif cinsiyet hücreleri kolonize olmaya başlar. Primitif cinsiyet hücreleri 10 µm çapla peritoneal hücrelerden morfolojik olarak ayırt edilebilir. Primitif cinsiyet hücreleri sağ ve sol gonadların her ikisinde de bulunur ve 10 gün proliferasyona uğrar. Proliferasyon aşamasından sonra gonadların bir tanesi körelir. Sağ gonadın körelme derecesi sol gonada göre daha yüksektir (Ukeshima ve Fujimoto 1991). Böylece sağ ovaryum kuluçka süresi boyunca kendini köreltir.

Farklılaşmamış gonadların iki farklı bileşeni vardır. Bunlar; rete kordlar ve primer cinsiyet kordlarıdır. Rete kordlar, mezenkimal hücreler arasında 5. günde görülen epitelyum hücrelerinin katı sütunlarıdır ve gonadların anterior bölgesinde dallanan ağ şeklindedir. Geç safhada erkeklerde bulunur ve rete testis oluşumu nedeniyle primer cinsiyet kordları ve modifiye edilmiş Wolffian tübüleri arasında bağlantıyı sağlar. Dişilerde bu bağlantı bulunmaz (Bellairs ve Osmond 2005).

Primer cinsiyet kordları 5. günün sonuna doğru görülür. Erkeklerde seminal tübüller içerisinde ve dişilerde medullar kordlarda farklılaşırlar. Mezenkimal stromayı işgal eden epitelyum hücrelerinin proliferasyonu ile oluşur ve gonadlara primordial germ hücrelerini taşırlar. Her iki cinsiyette sol gonad sağ gonaddan daha büyüktür ve daha fazla primitif cinsiyet hücresi içerir. Östrojen reseptör mRNA 26. safhada dişi ve erkekler arasında hiçbir morfolojik farklılaşma meydana gelmeden hem erkek hem dişilerde mevcuttur (Andrews vd 1997). Gonadların cinsiyet farklılaşması başladıktan sonra sadece dişi ile sınırlı olan östrojen sentezi için önemli olan aromatoz geninin ekspresyonu gerçekleşir. Bu dönemde sağ ve sol gonadlar arasındaki morfolojik farklılıklardan dolayı sağ ovaryumdan daha büyük olan sol ovaryumda aromatoz geni ekspresyonunun olduğu gözlenmiştir (Villalpando vd 2000). Aromatoz inhibitörünün verilmesi dişide testis gelişimine neden olur. Aksine östrojenin verilmesi genetik olarak erkek embriyolarda ovo-testis oluşumuna neden olur (Nakabayashi vd 1998). Erkeklerin normal gelişimi anti-Mullerian hormonun üretimi ve genital çizgide Sox-9'un ekspresyonu ile karakterize edilmiştir (Bellairs ve Osmond 2005).

## **2.4.1. Eşeyssel farklılaşma**

### **2.4.1.1. Testis**

7. günün sonunda rete kordları hilum'a toplandığında cinsiyet kordları fazla miktarda proliferasyona uğrar. Seminifer tübüllerde farklılaşan primer cinsiyet kordları dallanmaya, prolifer olmaya ve anastomoza devam eder fakat yaklaşık 20. güne kadar başka yere yönelmez. Primitif cinsiyet hücreleri spermatogonia içerisinde yaklaşık 13 günde farklılaşıp ayrılmaya başlar. Sertoli hücrelerinin germinal epitelden tüvelendiği düşünülmektedir. Rete kordları kanalize olmaya başladığında, spermlerin seminifer

tübüllerden mezonefroza geçebilmesi için bir geçiş sağlar. Wolf kanalı uzun olmayan bir boşaltım kanalıdır ve sonradan kloaka sperm taşıyan sperm kanalı (vas deferens) haline gelir (Bellairs ve Osmond 2005).

#### **2.4.1.2. Ovaryum**

Ergin kuşlarda sadece sol ovaryum fonksiyoneldir. Farklılaşmamış gonad, primer cinsiyet kordlarının genişlemesine kadar olan yaklaşık 7–8 günde görülebilir hale gelir. Kordların ikinci takımı olan sekonder cinsiyet kordları epitelyumdan şekillenir. Sekonder cinsiyet kordları korteks haline gelirken primer cinsiyet kordları ovaryumun medullası haline gelir (Bellairs ve Osmond 2005).

Primitif cinsiyet hücreleri sekonder cinsiyet kordlarında bulunur ve 7 gün boyunca oogonia şekline farklılaşır. Sağ gonad sol ovaryum uzaklaştırılmadıkça gelişemez ve korteks haline gelemez. Ovaryum ve testis oluşumuna rağmen sol ovaryum yok edilirse farklılaşma gerçekleşebilir (Bellairs ve Osmond 2005).

Testislerden farklı olarak mezonefroz ve ovaryum arasında bağlantı yoktur ve erkeklerde rete testise tekabül eden bölge dışındaki bölgeler sonradan dejenere olur (Bellairs ve Osmond 2005).

### **2.5. Kanatlı Primitif Cinsiyet Hücrelerinin Gelişimi**

Primitif cinsiyet hücreleri yumurta ve spermatozoa öncülleridir. Primitif cinsiyet hücrelerinin kökeni için omurgalılar uzun zaman çalışma konusu olmuşken son zamanlarda kuyruklu ve kuyuksuz amphibilerde sıklıkla kullanılmıştır. Tüm omurgalılarda primitif cinsiyet hücreleri kökende ekstragonadaldır ancak ayırım şekilleri diğer omurgalılardan farklıdır. Örneğin kuyuksuz amphibilerde germ hattı, belirleyici elementler içeren hücrelerden belirlenmiştir. Memeliler ve kuyruklu amphibilerde cinsiyet hücreleri, pluripotent embriyonik hücrelerden gelişimin sonraki safhalarında farklı zamanlarda oluşur (Petitte vd 1997). Memelilerde primitif cinsiyet hücrelerinin epiblastik kökenli olduğuna dair kanıtlar bulunmuştur. Erken memeli primitif cinsiyet hücrelerinin belirlenmesine dayalı bilgi; farelerin presomit safhasında primitif çizginin kuyruk bölgesinde primitif cinsiyet hücrelerinin belirlenmiş olmasıdır (Ginsburg ve

Eyal-Giladi 1986). Kanatlı primitif cinsiyet hücrelerinin biyolojisi başlıca tavukta araştırılmıştır ve primitif çizginin şekillenmesinden sonra (4HH) cinsiyet hücrelerinin gelişimine ilişkin küçük farklılıklar bulunmuştur. Primitif cinsiyet hücrelerinin varlığı, gonad gelişiminden önce “germinal crescent” olarak bilinen ekstraembriyonik bölgede tanımlanmıştır (Petitte vd 1997).

## 2.6. Primitif Cinsiyet Hücreleri

Primitif cinsiyet hücreleri gametlerin embriyonik öncülleridir ve gametlerin köken aldığı gonadlarda eşey hücrelerini oluşturan hücrelerdir. Primitif cinsiyet hücreleri, gelişecek gonadların yerine oluşturulur ve göçü sonucu ovaryum ve testisler gelişir. Diğer organlardan ya da gonadlardan önce embriyonun erken embriyo süresince farklılaşırlar ve vücut boyunca germinal çizgiye doğru göç yoluyla gonad şekillenmesini sağlarlar (Bellairs ve Osmond 2005) (Şekil 2.11). Kanatlı primitif cinsiyet hücreleri ve onların öncülleri area pellucida'nın merkezi bölgesinde lokalizedir (Nakamura vd 2007). Bu hücreler tavuk embriyosunda 11. (40-45 saat) ve 14. (50-53 saat) safhalar boyunca hipoblast içerisinde yer değiştirirler (Karagenc vd 1996).

Primitif cinsiyet hücreleri hayvanlarda eşeyli üremeden sorumludur ve bir jenerasyondan diğerine genetik bilgiyi iletirler. Gelişimsel karakterlerinden dolayı kuşlar büyük değere sahiptir. Bildircin; deneysel embriyoloji, üreme biyolojisi ve biyoteknolojide geçerli bir modeldir. Bildircin ve tavuk arasındaki gelişimsel benzerlikten dolayı yeni biyoteknolojik gelişmeler bildircin üzerinde de uygulanabilir.

Kanatlı primitif cinsiyet hücreleri, erken primitif çizgi boyunca ilk olarak “germinal crescent” bölgesinde tanımlanmıştır. Primitif cinsiyet hücreleri kan damarları içinde pasif göç yaparken gonadal bölgeye geçtiklerinde aktif göç yaparlar. Bu hücreler kan yoluyla 24–25 HH safhasında farklılaşmamış gonadlara ulaşırlar. Bu yüzden, kanatlı embriyolarında primitif cinsiyet hücrelerinin gelişimi; hücre göçünü içermesinin yanı sıra proliferasyon ve morfolojik farklılaşma gerektirir. Embriyonik gelişim esnasında primitif cinsiyet hücrelerinin farklılaşması, hücre yüzeyindeki makromoleküllerin ekspresyonuna bağlıdır. Hücre membranının glikoproteinleri ve lipitlerinin oligosakkarit zincirleri, hücre bağlantısı, hücre adezyonu ve büyüme kontrolü ile ilişkili olabilir. Bu yapılar, çoğu biyolojik sistemde hücre heterojenitesi ve fonksiyonel özelleşmenin her ikisinde de marker olarak görev yapar. Sitoplazma ve plazma



membranındaki karbohidrat dağılımındaki değişiklikler embriyogenez ve farklılaşma süresince hücrel etkileşimlerin temel araçları olarak rol oynarlar (Armengol vd 2007).

Işık mikroskobu ile kanatlı primordial germ hücreleri genişlik, geniş ve küresel nükleusa sahip olma ve sitoplazmalarında büyük miktarda yağ damlacıkları bulundurma açısından memeliler, sürüngenler ve amfibiler ile benzerlik gösterir. Transmisyon elektron mikroskobisi ile sitoplazmalarında diğer somatik hücrelerin etrafından daha soluk görünen iyi gelişmiş mitokondri ve endoplazmik retikulum görülür (Kuwana 1993).

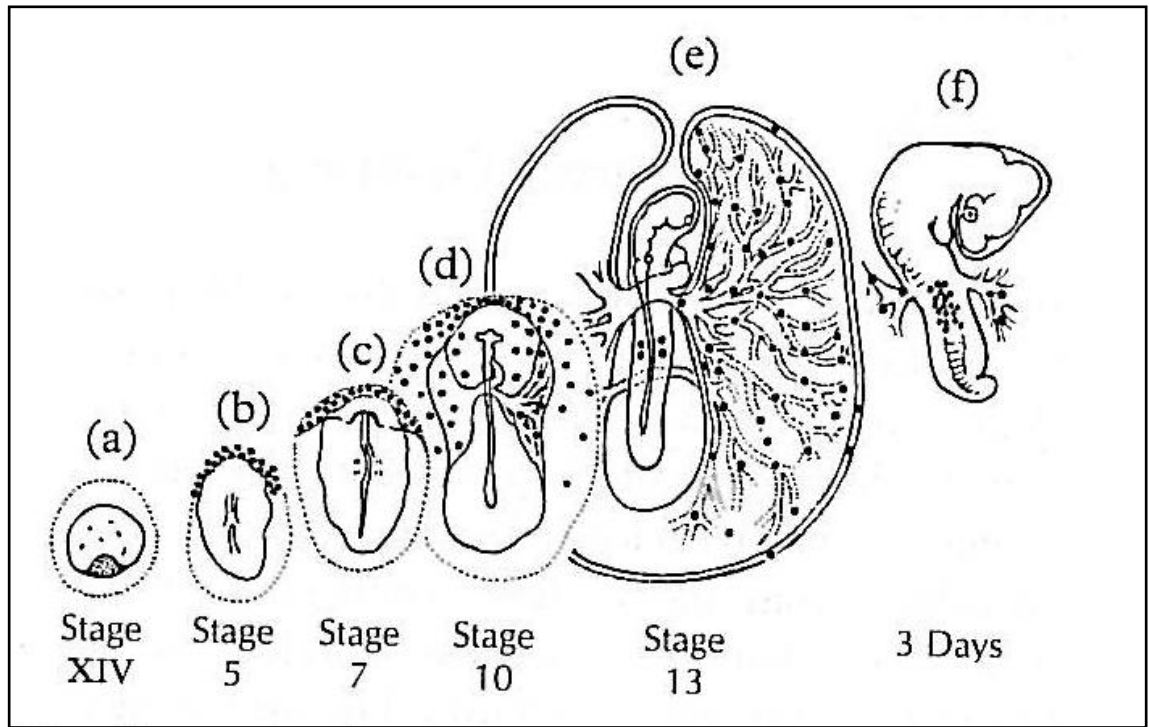
Tavuk primitif cinsiyet hücre gelişimi, yapılan çoğu çalışmada “germinal crescent”teki görünüşlerinden gonadlara yerleşimine kadar periyodik asit schiff (PAS) boyaması ile gösterilmiştir. Örneğin yapılan bir çalışmada primitif çizgi şekillenmesinden önce kanatlı primitif cinsiyet hücrelerinin oluşumunun özgün ayrıntıları türe özgü “markerlar” kullanılarak veya in vitro kültürde primitif cinsiyet hücrelerinin PAS boyaması ile belirlenebileceği gösterilmiştir. Vitellin membranda kültüre edilmiş embriyolarda area pellucida ve primitif cinsiyet hücreleri oluşumu arasındaki ilişki çalışılmış ve area pellucida tamamen şekillendiğinde (VII–IX EG-K) primitif cinsiyet hücrelerinde artış gözlenmiştir. IX- XIV safhaları arasındaki embriyolar ayrı ayrı kültüre edilmiş ve sadece safha X – XIV arasında embriyo başına 25–45 primitif cinsiyet hücresi saptanmıştır fakat safha IX blastodermelerinde cinsiyet hücreleri saptanmamıştır. Sonuç olarak; primitif cinsiyet hücrelerinin oluşumunun area pellucida şekillenmesine bağlı olduğu bildirilmiştir (Karagenç vd 1996). Primitif cinsiyet hücrelerinin dağılımı ve ileri farklılaşması epigenetik bir olaydır ve hücre-hücre etkileşimlerini gerektirdiği düşünülmektedir. (Karagenç ve Petite 2000).

Balık ve memelilerde “nuage materyali”, kuyruklu ve kuyuksuz amfibilerdeki “germinal plazm” kuş ve sürüngenlerin primitif cinsiyet hücrelerinde rapor edilmemiştir. Balık, kuş ve memelilerin primitif cinsiyet hücreleri sitoplazmalarında PAS-pozitif materyaller bulundurur. Kuşların primitif cinsiyet hücreleri memeli primitif cinsiyet hücrelerinden daha az alkalın fosfataz aktivitesine sahiptir. Hatta kuşlar arasında, tavuk primitif cinsiyet hücrelerinin sitoplazması PAS reaksiyonu ile magenta boyanır oysa ki bıldırcın primitif cinsiyet hücrelerinin sitoplazması boyanmaz. Son

zamanlarda *Wistaria floribunda* ( WFA ) ve *Griffonia simplicifolia* II ( GS-II ) gibi lektinlerin bildircin ve tavuk primitif cinsiyet hücreleri ile spesifik reaksiyon verdiği ve kanatlı türlerinde primitif cinsiyet hücrelerinin göçünde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Yoshinaga vd 1992). Tavuk ve bildircin primitif cinsiyet hücrelerinin lektin ile reaktivitesindeki bu farklılıklar bu iki tür arasındaki kimerik embriyolarda primitif cinsiyet hücrelerinin orijinlerinin belirlenmesi için faydalıdır (Kuwana 1993).

Primitif cinsiyet hücreleri, primitif çizgi oluşumu safhasından sonra belirli aralıklarla uygulanan Shiff boyaması ile boyanmıştır fakat daha erken safhalarda bu yol izlenememiştir. Chicken vasa homolog proteini (CVH proteini) gibi birkaç özgün “marker” yardımıyla primitif cinsiyet hücrelerinin sadece “germinal crescent” bölgesinde değil aynı zamanda erken safhalarda da belirlendiği bulunmuştur. Bu durumun en büyük nedeni primitif cinsiyet hücrelerinin yüzeylerinde bulunan güçlü karbonhidrat bileşenleridir (D’Costa vd 2001). Yapılan bir çalışmada poliklonal antikor CVH kullanılarak western blot analizi yöntemiyle primitif cinsiyet hücreleri belirlenmiştir. CVH proteini (80 kDa) özellikle civciv testislerinde tek bant şeklinde belirlenmiştir (Nakamura vd 2007). SSEA-1 ve EMA-1 antikorlarının her ikisinde tavuk primitif cinsiyet hücrelerinde “germinal crescent”den gonadlara yerleşene kadar ekspresse edildiği bilinir (Karagenç vd 1996). Hücre yüzey karbohidrat antijenlerini tanıyan bölge özgün SSEA-1 ve embriyonik fare antikoruna EMA-1 ile yapılan çalışmalarda SSEA-1’in farelerde epiblastik hücrelerde ve göç halindeki primitif cinsiyet hücrelerinde ekspresse edildiği fakat germ hattına özgün olmadığı bulunmuştur. EMA-1 ise fare embriyonik karsinoma hücrelerinde tespit edilmiştir ve EMA-1’in sadece fare primitif cinsiyet hücrelerini değil aynı zamanda tavuk primitif cinsiyet hücrelerini işaretlediği bulunmuştur. PAS boyaması ardından tavuklarda PAS pozitif işaretlenmiş hücrelerin germ hücre kökenini belirlemek için uygun olmadığı düşünülerek bu antikorların yeterince özgün olmadığı ve tavuklarda germ hattı ayrımının direkt gözlenmesinin uygun olmadığı belirlenmiştir (Nakamura vd 2007). Yapılan başka bir çalışmada primitif cinsiyet hücrelerinin epiblastın dorsal ve ventral yüzeyinde sayıca az olduğu tespit edilmiş ve yaklaşık 20 SSEA-1 ve EMA-1 pozitif hücrenin area pellucidada epiblastın ventral yüzeyinde bulunduğu tespit edilmiştir (Karagenç vd 1996).

Farklı araştırmacıların sonuçları arasında bazı farklılıklar olmasına rağmen primitif cinsiyet hücrelerinin kuluçka zamanında ve başlangıçta epiblastta olduğu konusunda görüş birliği vardır. Erken blastodermin parçalarının izole edildiği ve invitro olarak gelişimine izin verildiği çalışma serilerinden elde edilen bulgular primitif cinsiyet hücrelerinin pellucid alanın merkezinden geliştiğini öne sürmektedir (Karagenç vd 1996). Bu hücreler ayrıca endofil hücreler (Vakaet 1970) ya da başkaları tarafından primer hipoblast (Stern 1990) olarak da bilinmektedir. Area pellucidanın posterior ucundan anterior ucuna hipoblastik katmanın büyümesi ile primitif cinsiyet hücreleri anterior konumuna yer değiştirmiş hale gelir ancak hipoblasttan pasif taşınma mı yapıldığı ya da aktif göç mü olduğu bilinmemektedir. Safha 5'e kadar hipoblasttan ayrılan primitif cinsiyet hücreleri primitif çizgiden yayılarak "germinal crescent"e doğru aktif göç ederler. IX–XIII ( EG-K ) safhalarındaki primitif cinsiyet hücrelerinin sayısı yaklaşık 150 kadar bulunmuştur (Karagenc vd 1996).



**Şekil 2.11** Siyah noktalarla gösterilen primitif cinsiyet hücreleri erken area pellucida da endofil hücrelerinden oluşur ( a ) ve area pellucidanın anterior ucundaki germinal crescent bölgesine göç ederler ( b – d ). Daha sonra kan damarlarına giriş yaparlar ve kan damarları yoluyla dağıtırlar ( e ). En sonunda gonadlara girerler ( f ) (Nieuwkoop ve Satasurya 1979).

Primitif cinsiyet hücreleri 4–5. safhalarda "germinal crescent" bölgesine ulaşır ve safha 10 da bu bölge vaskularize hale gelinceye kadar orada kalırlar. Bu hücreler daha

sonra aktif göç ile kan damarlarının bazılarında girerler ve vücut boyunca taşınırlar. Bu vasküler yayılma kuşlarda ve bazı sürüngenlerde gösterilmiştir fakat memelilerde bulunamamıştır. 14. safhada kan dolaşımında primitif cinsiyet hücrelerinin en yüksek sayısı 10 µl başına yaklaşık 13 olarak bildirilmiştir ancak takip eden aşamalarda gonad girişinde bir azalma tespit edilmiştir (Tajima vd 1999).

Primitif cinsiyet hücrelerinin kan damarlarından ayrılıp gonadlara girişinin nasıl olduğunu açıklamak için yapılan çalışmalar sonucunda primitif cinsiyet hücrelerinin kemotaktik etkiler ile genital sırtta göçü gerçekleşmektedir (Takeuchi vd 2010). Primitif cinsiyet hücrelerinin 16 ve 17. safhalarda kan damarlarından ayrıldığı gözlenmiştir. Başlangıçta sağ ve sol gonadlara giren primitif cinsiyet hücrelerinin sayısı benzerdir fakat safha 24'e kadar primitif cinsiyet hücrelerinin sol ovaryumdaki sayısı sağ ovaryuma göre daha fazladır ve safha 27 ye kadar sol testiste sağa göre sayıca daha fazladır (Zaccanti vd 1990).

### **2.6.1. Primitif cinsiyet hücrelerinin moleküler mekanizması**

Farelerde, primitif cinsiyet hücreleri ilk olarak allantois üstünde, alkalın fosfataz pozitif hücre kümesi olarak embriyonik dönemin 7.5. gününde (E7.5) tespit edilmiştir. E9'a kadar primitif cinsiyet hücreleri arka bağırsakta birleşmiş hale gelir. E9-E9.5 arasında primitif cinsiyet hücrelerinin bağırsağın dorsal tarafından genital sırtta göç ettiği belirlenmiştir. Primitif cinsiyet hücreleri kolonize oldukları genital sırttan harekete başlarlar (Molyneaux ve Wylie 2004). BMP4/BMP8b'nin ekstraembriyonik dokulardaki ekspresyonu epiblastta primitif cinsiyet hücrelerinin düzenlenmesine neden olur (Ying vd 2001). Yapılan bir çalışmada Stella ve Fragilis/mill genleri tanımlanmıştır. Stella'nın fonksiyonu tam belirlenmeyen yeni bir gen olduğu ve Fragilis'in homotipik hücre-hücre adezyon ve hücre siklusu kontrolünde rol alan interferon uyarılabilir gen ailesi üyesi olduğu bildirilmiştir. E7.25'de fragilis, posterior epiblastta primitif cinsiyet hücrelerinin olduğu bölgede yüksek ekspresyon gösterir. Bu bölgede primitif cinsiyet hücreleri hareketli değil kümelenmiş haldedir. 24 saat sonra fragilisin ekspresyonunun düştüğü ve endoderm içinde dağınık ve hareketli primitif cinsiyet hücrelerinin olduğu gözlemlenmiştir (Saitou vd 2002). Farelerde primitif cinsiyet hücrelerinin davranışı; endoderme invazyonu, arka bağırsak içine aktif ve pasif göçü, arka bağırsak içine rastgele göçü, bağırsaktan genital sırtta göçü,

kümelenme ve orta çizgide hücre ölümünü içerir (Molyneaux vd 2001). Ayrıca yapılan bir çalışmanın sonucunda E-cadherin ve C-kit/steel proteinlerinin bağırsakta primitif cinsiyet hücrelerinin davranışlarını regüle ettiği bulunmuştur. Primitif cinsiyet hücrelerinin bağırsak dışına çıktığında E-cadherin ekspresyonunu upregüle ettiği ve primitif cinsiyet hücrelerinin kolonize olması ve sağkalımı ya da bağırsak içinde göçü için C-kit/steel proteinine gereksinim olduğu gösterilmiştir (Bendel-Stenzel vd 2000).

Memeli primitif cinsiyet hücrelerinde PG2 epitopu saptanmıştır ve PG2'nin erken gelişim sırasında ve doğum sonrasında cinsiyet hücre olgunlaşması sırasında eksprese edildiği belirlenmiştir (Püschel vd 2005) Ayrıca zebra balığı, fare ve tavukta SDF1/CXCR4 kemokin sinyalizasyonunun primitif cinsiyet hücre göçünde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Takeuchi vd 2010) ve fareler üzerinde çalışılan Nanos3 geninin de primitif cinsiyet hücrelerinin göçünde rol oynadığı bulunmuştur (Tsuda vd 2003).

*Drosophila*'da primitif cinsiyet hücreleri, kutup hücreleri haline ayrılmış maternal komponentlerde lokalize olmuştur ve gelişen embriyonun posterior kutbundan ortaya çıkar. Primitif cinsiyet hücreleri bağırsağın ventral kısmından bazal yüzeyine göç eder ve bu hücreler lateral mezoderimde somatik hücrelerle birleşirler (Molyneaux ve Wylie 2004).

Benzer şekilde zebra balığı'nda cinsiyet hücreleri maternal komponentlerde lokalizedir ve hücreler gastrulasyon sırasında hareket ederek baş ile mezoderm hattı arasında sıralanır. Hücreler her iki çizgiden lateral mezoderm içinde bir ara hedefe göç ederler ve gonadlara yerleşirler (Molyneaux ve Wylie 2004).

### **2.6.2. Kanatlı primitif cinsiyet hücrelerinin gonadal taslağa göçü**

Bütün omurgalılarda primitif cinsiyet hücreleri gelişimin erken safhalarında ortaya çıkar ve gonadlarda şekillenir. Germ hattı gelişiminin evrimsel olarak korunmuş özellikleri primitif cinsiyet hücrelerinin araştırılmasıyla belirlenmiştir. Bu da primitif cinsiyet hücrelerinin ortaya çıkış yerinden gonadlara doğru göçü ile anlaşılır. Primitif cinsiyet hücrelerinin yer değiştirmesi, embriyonik dokuların morfojenetik hareketleri

tarafından ve gonadal taslağın etrafına getirilen primitif cinsiyet hücrelerinin gonadal sırtta doğru ameboid hareketlerle pasif göçü ile gerçekleşir (Karagenç 1998).

Nöral krest hücreleri, lenfoid kök hücreler ve kan kök hücreler gibi primitif cinsiyet hücreleri erken embriyonik dönemde hedef organlarından uzak yerde oluşur ve sonra ilgili organlara göç eder. Kanatlı primitif cinsiyet hücrelerinin, tavuk–bıldırcın kimeralarının kullanıldığı deneyler tarafından kanıtlandığı gibi epiblast orijinli olduğu düşünülür. Bu kimerik embriyolar blastoderm safhasında türlerin birinin epiblastının ve diğer türlerin hipoblastlarının kombinasyonu ile yapılmış ve 3–6 somit safhasına kadar kültüre edilmiştir. Kimerik embriyolardaki primitif cinsiyet hücreleri Feulgen boyama ile histolojik olarak belirlenmiştir ve sonuçlar kanatlı germ hattının epiblast kökenli olduğunu göstermiştir. Ancak, araştırmacılar primitif cinsiyet hücrelerinin blastoderm safhasında kimeraların oluşumundan önce hipoblastlardan epiblastlara girmiş olabileceğini düşünmüşlerdir (Smith vd 1983). Primitif cinsiyet hücreleri, primitif çizgi oluşumunun erken safhaları boyunca gitgide alt bariyerlere taşınır ve primitif çizgi safhasında “germinal crescent” bölgesi olarak adlandırılan hipoblast bariyerinde lokalize hale gelir. Kuşlarda, “germinal crescent” bölgesi, olası gonadal bölgeden uzaktadır ve bu yüzden primitif cinsiyet hücrelerinin göçü memeli ve bazı reptillerden farklıdır (Kuwana 1993). Bu yüzden, kanatlı primitif cinsiyet hücreleri memeli göç yolağına ek olarak benzersiz bir dolaşım yolağı gösterir. Erken embriyonik dönemde kanda dolaşan kanatlı primitif cinsiyet hücrelerinin izolasyonu memeliler ve amfibilere oranla daha kolay olabilir. Hatta memelilerde ve amfibilerde, primitif cinsiyet hücreleri membranlarına hangisinin daha fazla zarar vereceği bilinmeden enzimatik işlemsiz veya fiziksel dağılım olmadan izole edilemez. Üstelik cerrahi teknikler uterus içindeki memeli embriyolarına göre kanatlı embriyoları için uygundur (Hara 1971), cerrahi müdahaleden sonra uterustaki embriyonik gelişimin uyarılması zordur (Kuwana ve Fujimoto 1984). Kanatlı primitif cinsiyet hücrelerinin göç mekanizması dolaşım aracılığıyla oldukça dinamik olduğu için özellikle memelilere ve diğer türlere benzerlik göstermez. Ancak; dolaşımda göç periyodundan sonra kanatlı primitif cinsiyet hücrelerinin göç mekanizması diğer türlerinkine benzerlik gösterir. Primitif cinsiyet hücrelerinin göçü için bazı olası mekanizmalar şunlardır; 1) civardaki somatik hücreler tarafından harekete yardımcı fiziksel ilişki, 2) fibronektin gibi ekstraselüler matriksler veya hücrelerin belli tipleri için spesifik affinite, 3) morfogenetik hareket tarafından pasif göç, 4) kemotaktik faktörler tarafından indüklenmiş göç. Primitif cinsiyet hücreleri

için kan dolaşımı aracılığı ile göç; gonadal taslağın çevresinde kan damarlarından geçiş ve dolaşımı istila olarak 2 farklı mekanizmayı da içerir (Kuwana 1993).

### **2.6.3. Primitif cinsiyet hücrelerinin pasif göçü**

Primitif cinsiyet hücreleri, 10.safhaya kadar embriyonik kan dolaşımının kuruluşu ile birlikte kan dolaşımında hareket etmeye başlar. 16-17. safhalarda gonadal taslağın yakınındaki kapiller aracılığıyla kan dolaşımından ayrıldıktan sonra primitif cinsiyet hücreleri inkübasyonun 2,5 günde gelişen gonadlar içinde göç eder. 16-19. safhalarda toplam primitif cinsiyet hücrelerinin yaklaşık %10-20'si tavuklarda baş bölgesinde kolonize haldedir (Kuwana 1993).

### **2.6.4. Primitif cinsiyet hücrelerinin hareketi**

Primitif cinsiyet hücrelerinin hareketleri “germinal crescent” bölgesinden gonadal sırtta doğru iki aşamada meydana gelir. İlk aşamada primitif cinsiyet hücreleri ekstraembriyonik ve intraembriyonik dolaşım yoluyla germinal sırtın çevresinde pasif olarak taşınırlar. İkincisi, primitif cinsiyet hücrelerinin kan yoluyla damarlardan ayrılması ve gonadal taslak içerisinde aktif göç yapmasıdır. Bu aktif göç aşamasında gonadlardan salınan kemotaktik sinyaller, ekstraselüler matriks bileşenleri ve gonadal epitelyum etrafındaki vasküler sistemin anatomik düzenlenmesi önemli faktörlerdendir (Petitte vd 1997).

Tavuk primitif cinsiyet hücrelerinin gonadal taslağa doğru göçünün mekanizmasını anlayabilmek için onların hareket özelliklerinin incelenmesi gerekir. Bu hareketlerin gözlenebilmesi için, 12 – 16 safhalarda primitif cinsiyet hücreleri kandan izole edildiği bir çalışmada, 13–16. safhalardaki embriyoların primitif cinsiyet hücreleri, kan damarlarından glass mikropipet ile faz-kontrast mikroskobu altında toplanmış ve primitif cinsiyet hücreleri sitoplazmalarında bir hayli bulunan kırılğan lipitler ve büyük boyutları ile kan hücrelerinden kolaylıkla ayırt edilebilmesi bu hücrelerin kan dolaşımına geçtiğini göstermiştir (Wylie ve Heasman 1982). Primitif cinsiyet hücreleri 40. safha tavuk embriyolarının dorsal mezenterinin mezodermal dokusundan elde edilmiş besleyici hücrelerle kaplanmıştır ve hareketleri hızlandırılmış fotoğraflama ile analiz edilmiştir. Primitif cinsiyet hücreleri besleyici hücrelerin uzun eksenine doğru

harekete eğilimlidir (Kuwana ve Fujimoto 1984). Üstelik tavuk primitif cinsiyet hücrelerinin diğer primitif cinsiyet hücreleri ve embriyonik fibroblast hücrelerine göre kontak inhibisyon gösterme eğilimi yoktur (Kuwana 1993).

### **2.6.5. Primitif cinsiyet hücrelerinin göçünde ekstraselüler matriksin rolü**

Tavuklar ve farelerdeki elektron mikroskopi çalışmaları göç fazındaki primitif cinsiyet hücrelerinin göç hattı boyunca komşu somatik hücreler ile yakından ilişkili olduğunu göstermiştir. Hücre yüzeyindeki veya ekstraselüler matriksteki glikoproteinler gibi bazı kimyasal maddelerin göç mekanizmasına karıştığı ileri sürülmüştür. Ayrıca fibronektin; hücre yüzeyi ve ekstraselüler matriks oluşumu ile ilişkili bir glikoproteindir, hücre adhezyon ve uzamasında önemli bir role sahiptir. *Xenopus laevis* (Heasman ve Waylie 1981), fareler (Fujimoto vd 1985), ve tavuklardaki (Fujimoto ve Yoshinaga 1986) transmisyon elektron mikroskopi çalışmalarında fibronektin, primitif cinsiyet hücrelerinin göçü başlamadan önce onların göç yolunda tespit edilmiştir.

Nöral krest hücrelerinin göç yolu primitif cinsiyet hücrelerinin genel embriyolojik hareketlerine göre fazla etkilenmez.

İn-vivo primitif cinsiyet hücre göçünde fibronektin rolü henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Muhtemelen fibronektinlerin primitif cinsiyet hücreleri yada nöral krest hücrelerinde adhezyon etkisinden başka kemotaktik etkilere de sahip olduğu ileri sürüldü. Diğer matriks bileşenlerinin yanı sıra farelerde TGF- $\beta$ 1'in, fibronektin sentezinin hedef hücrelerde başlamasını teşvik ettiği bilinmektedir (Kuwana 1993).

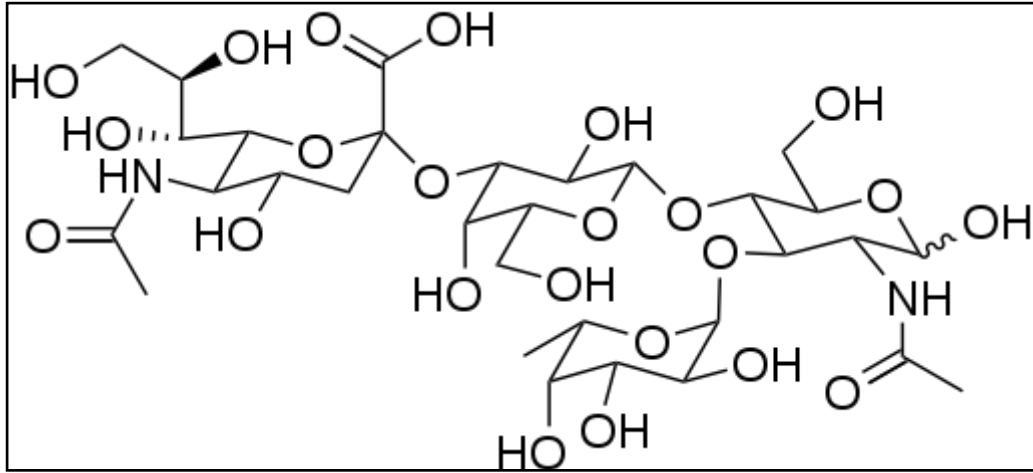
### **2.7. Primitif Cinsiyet Hücrelerinin Göçünde sialyl Lewis-X Molekülünün Rolü**

sialyl Lewis-X proteini, tavuk embriyolarında ekspresse edildiği bilinen Lewis-X proteininin sialik asit bağlanmış şeklidir (Karagenç vd 1996).

Hücre yüzey glikanlarının sürekli değişen fonksiyonları; onların çeşitli yapıları ve lektinler gibi glikan bağımlı proteinler ile güçlü etkileşimleri vardır. Glikan–lektin etkileşimleri ya ekstraselüler alanda değişiklikleri iletir ya da hücre–hücre/hücre–

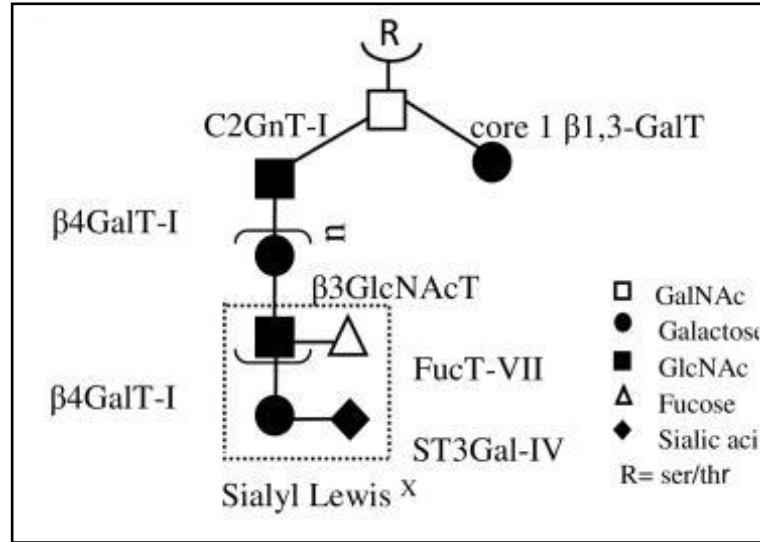


patojen bağlantılarını düzenler. Örneğin sialyl Lewis-X (sLe-X) temel olarak lökositlerde ekspresse edilen tetrasakkarit yapıda glikandır ve inflamasyonun erken safhaları boyunca civardaki dokular içerisinde kan dolaşımından lökositlerin göçüne aracılık eder (Soriano del Amo vd 2010). Moleküler formülü  $C_{31}H_{52}N_2O_{23}$  olan sialyl lewis-X molekülünün kimyasal yapısı şekilde gösterildiği gibidir (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: sialyl lewis-X molekülünün kimyasal yapısı (<http://en.wikipedia.org>)

Selektinler, tetrasakkarit sialyl Lewis-X'i tanır ve bazı endotel hücelere, glikolipitlere ve glikoproteinlere bağlı glikanların terminal bileşenidir (Silva vd 2011). sLe-X; E ve P selektinlere bağlanır, endotel hücrelerinin yüzeyinde upregüle olur ve lökositlerin damar dışına çıkmasına yol açar. Ayrıca sLe-X-E selektin etkileşimi kan aracılığı ile hematopoietik kök hücrelerin göçlerinin yönetilmesinde rol oynar ve klinik kök hücre transplantasyonunda önemlidir. sLe-X'in kimyasal sentezi yoğun bir şekilde izlenmiştir ve yapısal özelliklerin, fonksiyonel grupların senteze katkısı kabul edilmiştir (Soriano del Amo vd 2010). sLe-X biyosentezi farklı glikoziltransferazların ardışık çalışmalarını gerektirir (Şekil 2.13) (Silva vd 2011).



Şekil 2.13 sLe-X'in glikoziltransferazlar ile temsil edilmiş biyosentetik yolu (Silva vd 2011)

Selektinler, sialyllenmiş karbohidratları tanımakla yükümlüdürler ve sialyl Lewis-X bağlama yeteneğine sahiptirler. Selektinler ve ligandları, damar duvarının endotel hücrelerine lökosit bağlanmasına aracılık ederler ve bu işlemin sonunda lökositler göç ederler. Yapılan bir çalışmada selektin-karbohidrat etkileşimlerinin temel rolünün lökosit göçü olduğu ve bu göçün benzer tipinin *Bursa fabricius*'a prebursal lenfositlerin dönüşünde rol oynayadığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada prebursal B hücrelerinde ekspresse edilen bir selektin belirlenmemesine rağmen kanatlı B hücre öncülleri selektin ligandı olan sialyl Lewis-X'in özgün olarak ekspresse edildiği bulunmuştur. Ayrıca bursanın damarlarla ilgili bölgesinde sialyl Lewis-X'in tutunma özelliğinin olduğu bulunmuştur. Bu tutunma sialyl Lewis-X'e karşı antikorlar tarafından bloklanabilir. sialyl Lewis-X ekspresyonunun gelişen B hücre popülasyonu ile sınırlı olduğu ve 15-17. embriyonik günler arası bursada gelişen B hücrelerinde hücre yüzey karbohidratlarında gelişimsel bir anahtar rolünde olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucu olarak, Lewis-X karbohidrat yapısının tavuk B hücre gelişimi boyunca düzenlendiği ve *Bursa fabricius* içerisinde lokalize olabildiği gösterilmiştir (Masteller vd 1995). Ancak bıldırcın primitif cinsiyet hücrelerinde sialyl Lewis-X ekspresyona rastlanılmamıştır.

## 2.8. Sialyl Lewis-x'in Kanser ile İlişkisi

Malignant değişimler, sialyl Lewis-X antijeni gibi değişmiş karbohidrat belirteçlerinin ekspresyonu ile sonuçlanan anormal glikolizasyon ile ilişkilidir.

Değişmiş hücre yüzeyi glikozilasyonu, malignant tümör hücrelerinin önemli özelliğidir ve genellikle invazyon ve metastazı tanımlar (Dube ve Bertozzi 2005).

Tümör metastazı; primer tümörden malignant hücrelerin ayrılmasını, lenf damarlarına ya da kana invazyonu, endotelyum ile etkileşimi, hücrelerin damar dışına çıkmasını ve yeni tümör odaklarının şekillenmesini içerir. Metastazın her adımı, ekstraselüler matriks bileşenleri ve diğer hücreler ile kanser hücrelerinin spesifik etkileşimlerine dayalıdır. Bu etkileşimler; kaderinler, integrinler, immunoglobulin süper ailesi üyeleri, selektinler ve selektinlerin sialyl Lewis-a ve sialyl Lewis-X gibi karbohidrat ligandlarını içeren adezyon moleküllerinin farklı aileleri tarafından gerçekleştirilir (Kannagi vd 2004).

sialyl Lewis-X, kanser hücrelerinin damar endoteline yapışmasına aracılık eder ve metastaza yol açar. Tümör hücrelerinde sialyl Lewis-X'in sürekli ekspresse edildiği gözlenmiştir ve sialyl Lewis-X sadece bir tümör marker olarak değil kanser hücrelerinin metastaz davranışının anlaşılması için de önemlidir (Pinho vd 2007). Ayrıca Tax proteini gibi bazı genlerin sialyl Lewis-X ekspresyonunu başlattığı bilinir ve sonuç olarak bu protein yetişkin T hücrelerinde sialyl Lewis X ekspresyonu artışı ile lösemi hücrelerinin metastazına yol açar (Kannagi vd 2004).

## 2.9. İmmünohistokimya

Tüm doku sıvıları, vücut sıvıları ve iğne aspirasyon materyallerinde uygulanır. Bu materyallerdeki hücrelerin özellikle sitoplazmalarında intermedial filamentler, mikrotübüller, mikroflamanlar, nöroflamanlar ve hücre zarı reseptör proteinleri incelenir. Bu yapılar antijen kabul edilerek dışarıda özel olarak üretilen antikolar; anahtar-kilit, koenzim-substrat örneğinde olduğu gibi oluşturulan antijen-antikor kompleksi özel boyalar ile boyanarak görünür hale getirilir. En sık kullanılan boyalar; peroksidaz-antiperoksidaz, avidin-biotin peroksidaz, alkali fosfataz ve immungold'dur. Bu enzim tekniklerinin her birinin farklı makromoleküller için duyarlılıkları vardır. İmmünohistokimyasal analizi etkileyen başlıca etmenler; pH, ısı, tampon maddesi, fiksasyon, materyalin içeriği ve boyamadır.

### 3. MATERYAL – METOT

#### 3.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar

Döllü bıldırcın yumurtaları

Kuluçka makinası

Steryo mikroskop

PBS

TBS

Absolute alkol

Paraformaldehit

Paraplast

Etüv

Metal döküm blokları

Mikrotom

Apes kaplı lam

Lamel

Eldiven

Pens, Penset

Makas

Işık mikroskobu

Elektron mikroskobu

pHmetre

Su banyosu

Ksilen bazlı entellan

CSLEX-1 (BD, 10 $\mu$ g/ml)

HECA-452(10 $\mu$ g/ml)

DAB

QH-1 antikoru

Alexa Fluor-455 (Invitrogen)

DAPI (Invitrogen)

Edta-tris buffer (Tris, Edta, Tween 20)

Sodyum sitrat buffer (Tri-Sodyum Sitrat, Tween 20)

Pastör pipeti

Puvar

Mezür

Bek alevi

### **3.2. Embriyo İzolasyonu**

Döllü bildircin yumurtaları Adnan Menderes Üniversitesi (ADÜ) Veteriner Fakültesi Kanatlı Araştırma ve Uygulama Biriminde barındırılan Japon bildircin kolonilerinden elde edildi. Hamburger ve Hamilton skorlama sistemine göre, 20-21 gelişim aşamalarında bulunan embriyoların elde edilebilmesi amacıyla döllu bildircin yumurtaları 72-96 saat Standard kuluçka koşullarında (37 °C, % 65 relative nem oranı) inkube edildi. Embriyo izolasyonu steryo mikroskop altında PBS solüsyonu (pH 7.4) içerisinde gerçekleştirildi. İzole edilen embriyolar PBS içerisinde taze olarak hazırlanmış %4 paraformaldehid solüsyonu içerisinde bir gece +4 °C'de tespit edildi. Tespit edilen embriyolar PBS içerisinde birkaç kez yıkandıktan sonra standart doku takip işlemine alındılar. Bu amaçla, embriyolar PBS içerisinde hazırlanmış olan %35, 50, 70, 90 ve 100 alkol serilerinden ve Xylol serilerinden geçirilerek paraplast içerisinde bloklandı. Bloklanan embriyolardan mikrotom aracılığı ile 10 µm kalınlığında seri kesitler alınarak APES (Sigma) ile kaplı lamlara aktarıldı. Bir gece boyunca +37 °C'de kurutulan kesitlerin çevresi cam kalemi ile çizilerek, deparafinizasyon işlemi için ksilen I ve ksilen II de 5 dakika, %100 alkol I, %100 alkol II, %96 alkol, %80 alkol, %70 alkolde 3'er dakika olmak üzere azalan alkol serilerinden geçirilerek distile suda çalkalandı. Daha sonra iki kez, 5 dakika süreyle PBS (pH 7.4) içerisinde yıkanan kesitler immunohistokimya ve immunoflüoresans analizlerinin gerçekleştirilmesinde kullanıldı.

### 3.3. İmmunohistokimyasal ve immunoflöresans analizler

Primitif cinsiyet hücreleri tarafından sLe-X epitopunun eksprese edilip edilmediğini belirleyebilmek amacıyla sLe-X epitopunu tanıyan iki farklı antikor, CSLEX (BD, 10 µg/ml) ya da HECA (BD, 10 µg/ml) kullanıldı. SLe-X ekspresyonunun saptanmasında avidin-biotin peroksidaz yönteminden yararlanıldı. Bu amaçla, Universal LSAB® sistemi (DAKO Cytomation, K0690) ya da Histostain Plus (İnvitrogen) kitlerinden yararlanıldı. Antikora bağlanma gösteren hücrelerin boyanmasında 3,3' diaminobenzidin tetrahidroklorit (DAB) kullanıldı. sLe-X epitopunun *Bursa. fabricius*'a göçleri sırasında B hücre projenitörleri tarafından eksprese edildiği bilinmektedir (Masteller vd 1995). Dolayısıyla, primer ve sekonder antikordan ya da boyama yönteminden kaynaklanabilecek olası bir teknik hatayı test edebilmek amacıyla tüm immunohistokimyasal çalışmalar sırasında B hücre projenitörlerinin göç ettikleri dönem olan embriyonik gelişimin 8-12. günlerinden alınan *Bursa. fabricius* dokusu pozitif kontrol olarak kullanıldı.

sLe-X epitopunun yanı sıra, alınan bıldırcın embriyo kesitlerinde primitif cinsiyet hücrelerinin belirlenmesinde QH-1 antikorundan da yararlanıldı. Monoklonal bir antikor olan QH-1, bıldırcın embriyolarında hematopoetik, endotel ve primitif cinsiyet hücreleri tarafından eksprese edilmekte olup (Armengol 2007), bu hücrelerin tanımlanmasında bir belirteç olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle, sLe-X epitopunun ekspresyonunun belirlenmesine yönelik olarak yapılan immunohistokimyasal analizlerin sonrasında aynı kesit üzerinde QH-1 ekspresyonu da incelendi. QH-1 antikor kaynağı olarak, Developmental Studies Hybridoma Bankası'ndan (University of Iowa) elde edilen QH-1 hybridoma hücrelerinin süpernatantı kullanıldı. QH-1 epitopunu eksprese eden hücrelerin belirlenmesinde immunoflöresans yönteminden yararlanıldı. Bu amaçla, Alexa Fluor 455 (Invitrogen) ile konjuge edilmiş sekonder antikordan (İnvitrogen) kullanıldı. Çekirdek boyaması PBS içerisinde hazırlanan DAPI (200 ng/ml, İnvitrogen) ile gerçekleştirildi.

### 3.4. Antijen retrieval işlemi

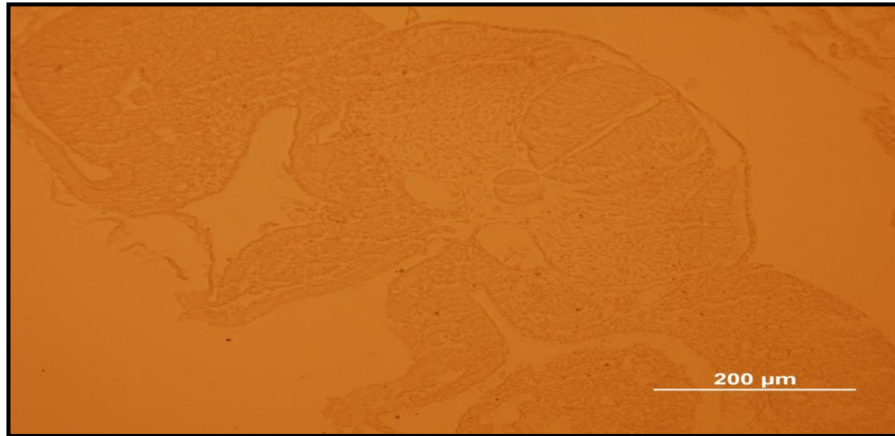
Kullanılan tespit solüsyonunun sLe-X epitopunu maskelenmesi ve buna bağlı olarak immunohistokimyasal analizler ile belirlenememesi olasılığını ortadan kaldırmak

amacıyla, embriyo kesitlerinin bazılarında antijen retrieval işlemi yapıldı. Bu amaçla, sodyum sitrat (pH 7.6) ya da EDTA–Tris Buffer solüsyonlarından yararlanıldı. Antijen retrieval işlemi, kesitlerin söz konusu bufferlar içerisinde 5 dakika süreyle kaynatılmasıyla gerçekleştirildi. Antijen retrieval işlemi sonrasında, immunohistokimyasal analizler yukarıda tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Bildircin Primitif Cinsiyet Hücrelerinin DAB Boyaması İle Gösterilmesi

DAB boyaması bildircin ve tavuk dokularını mikroskop altında göstermek amacı ile yapılmıştır. Pozitif kontroller olarak hazırlanan bildircin embriyo kesitlerine QH-1 antikoru uygulandı ve DAB boyaması sonucunda hücrelerde boyanma olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1).

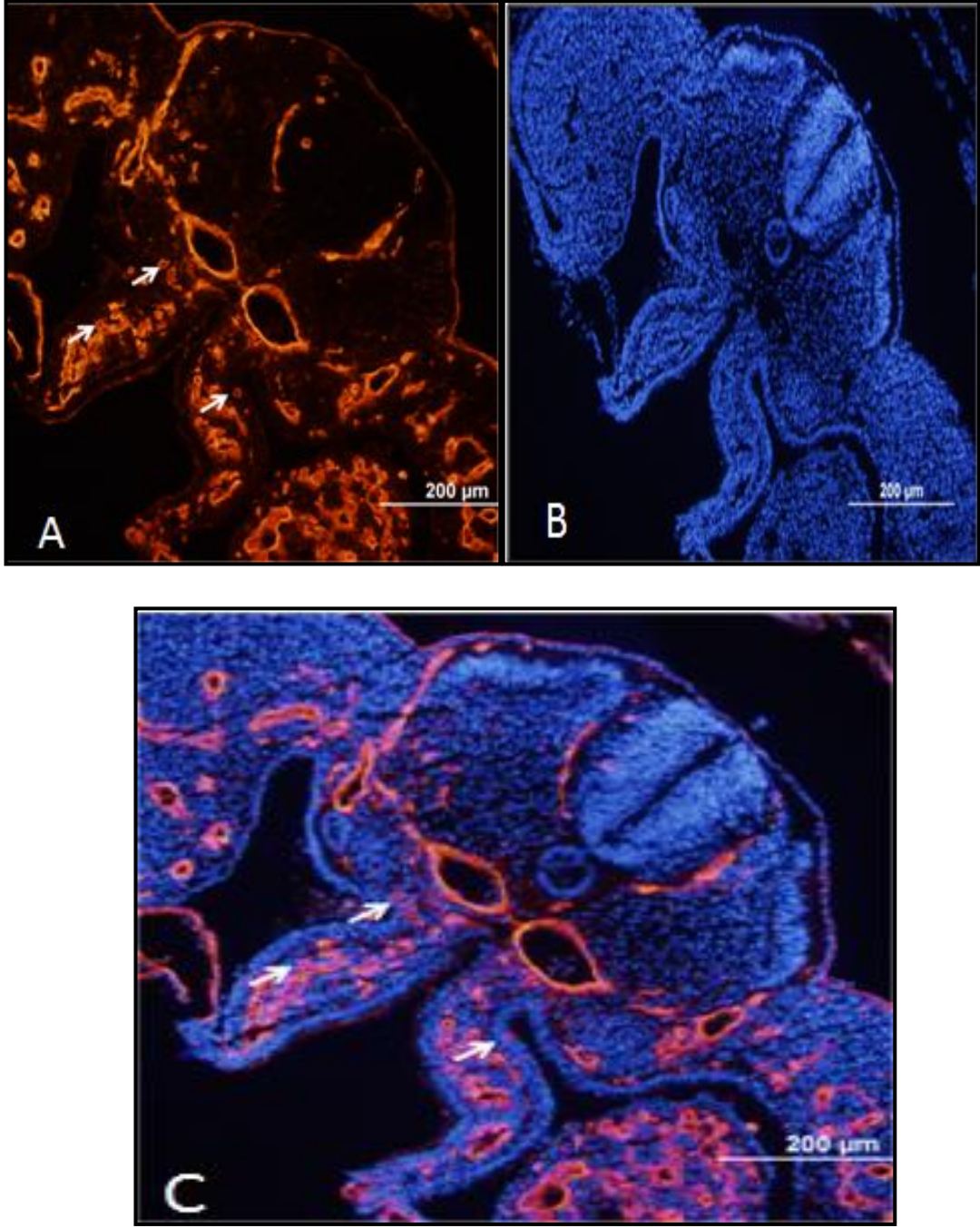


Şekil 4.1 Bildircin embriyo kesitinin (20HH) ışık mikroskopundaki görüntüsü

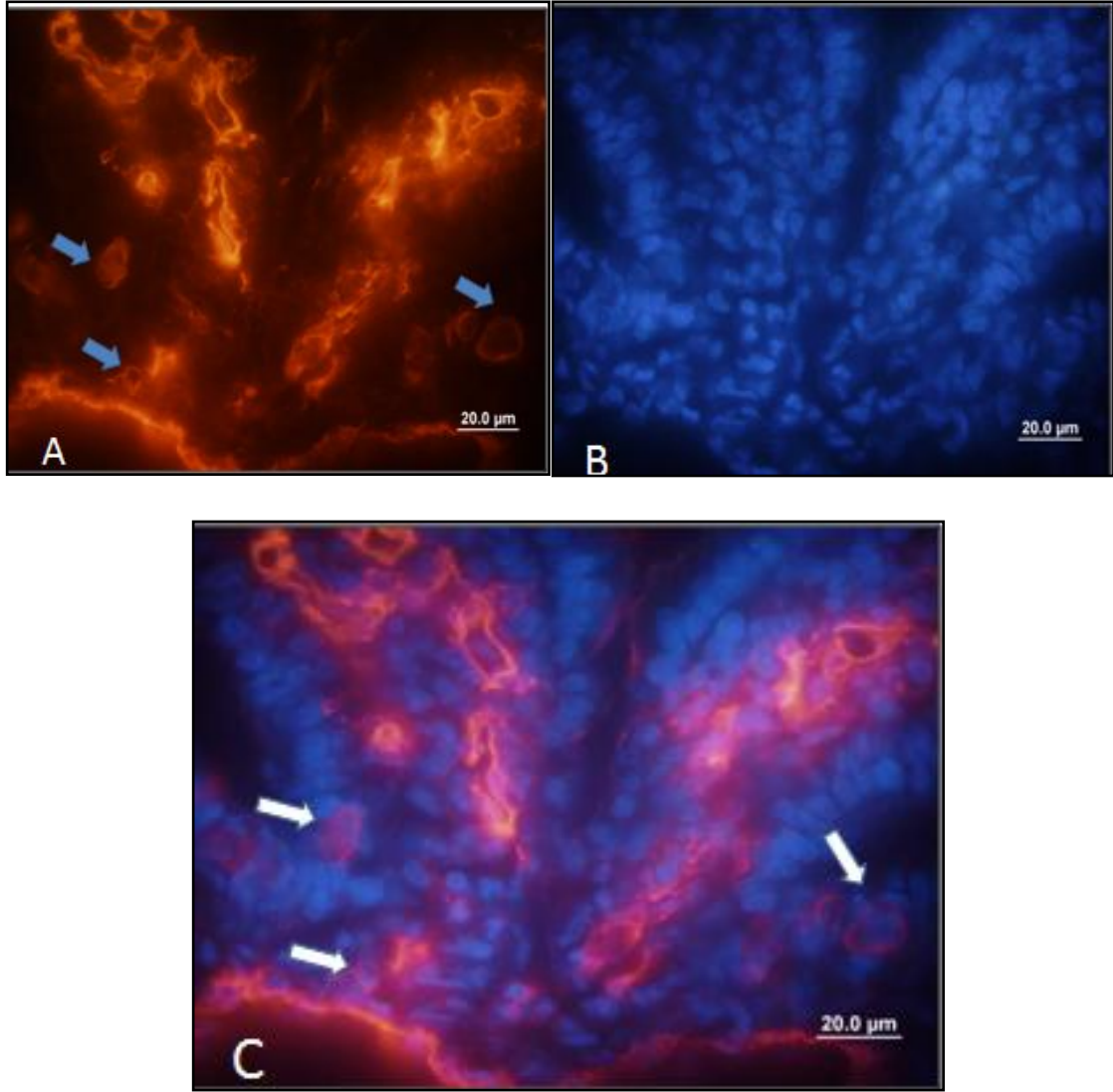
### 4.2. QH-1 Ekspresyonu

QH-1 antikoru, bildircin primitif cinsiyet hücrelerini belirlemek için en iyi araçtır. Primitif cinsiyet hücrelerinde ekspresse edildiği bilinen (Armengol vd 2007) özgün QH-1 antikoru ile yapılan immünohistokimyasal analiz sonucunda hem tavuk hem bildircin embriyo kesitlerinde DAB boyaması sonucu QH-1 ekspresyonu gözlemlendi. Ayrıca yapılan floresan boyama sonucunda da primitif cinsiyet hücrelerinde QH-1'in ekspresse edildiği gösterildi (Şekil 4.2, 4.3).





**Şekil 4.2** 20HH safhasındaki bıldırcın embriyolarından elde edilen kesitlerde flöresan mikroskop görüntüsü A) QH-1 ile primitif cinsiyet hücrelerinin floresan mikroskop görüntüsü B) DAPi çekirdek boyaması sonucu hücrelerin gösterilmesi C) QH-1 ve çekirdek boyamasının birleştirilmesi ile primitif cinsiyet hücrelerinin görünümü.

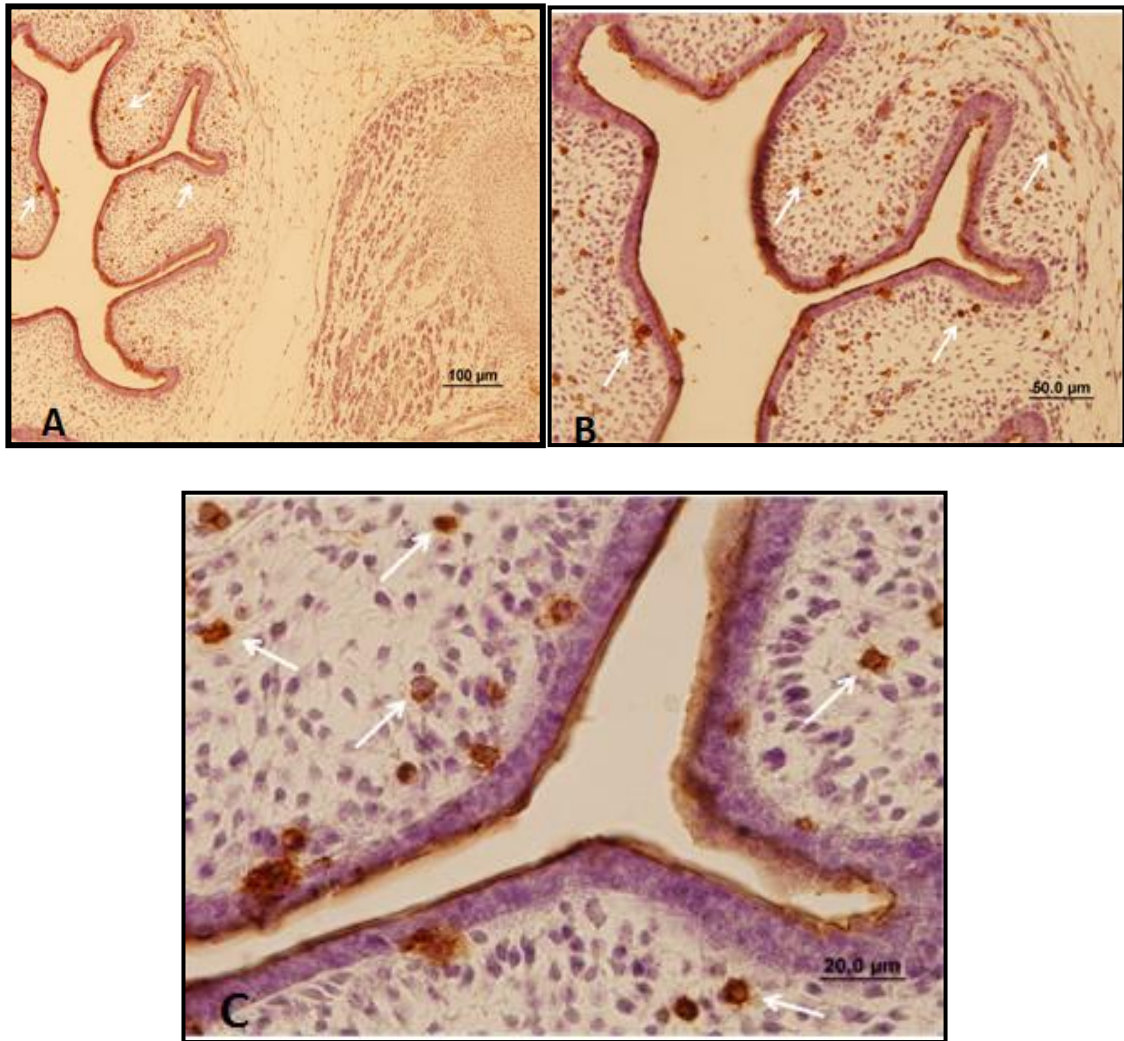


**Şekil 4.3** 20HH safhasında bildircin embriyo kesitlerinde flöresan mikroskop görüntüsü A) Primitif cinsiyet hücrelerinin QH-1 ekspresyonu B) Hücre çekirdekleri C) Primitif cinsiyet hücrelerinin QH-1 ve DAPi çakıştırılmış görüntüsü

#### 4.3. Bildircin Primitif Cinsiyet Hücrelerinde sLe X Ekspresyonunun İncelenmesi

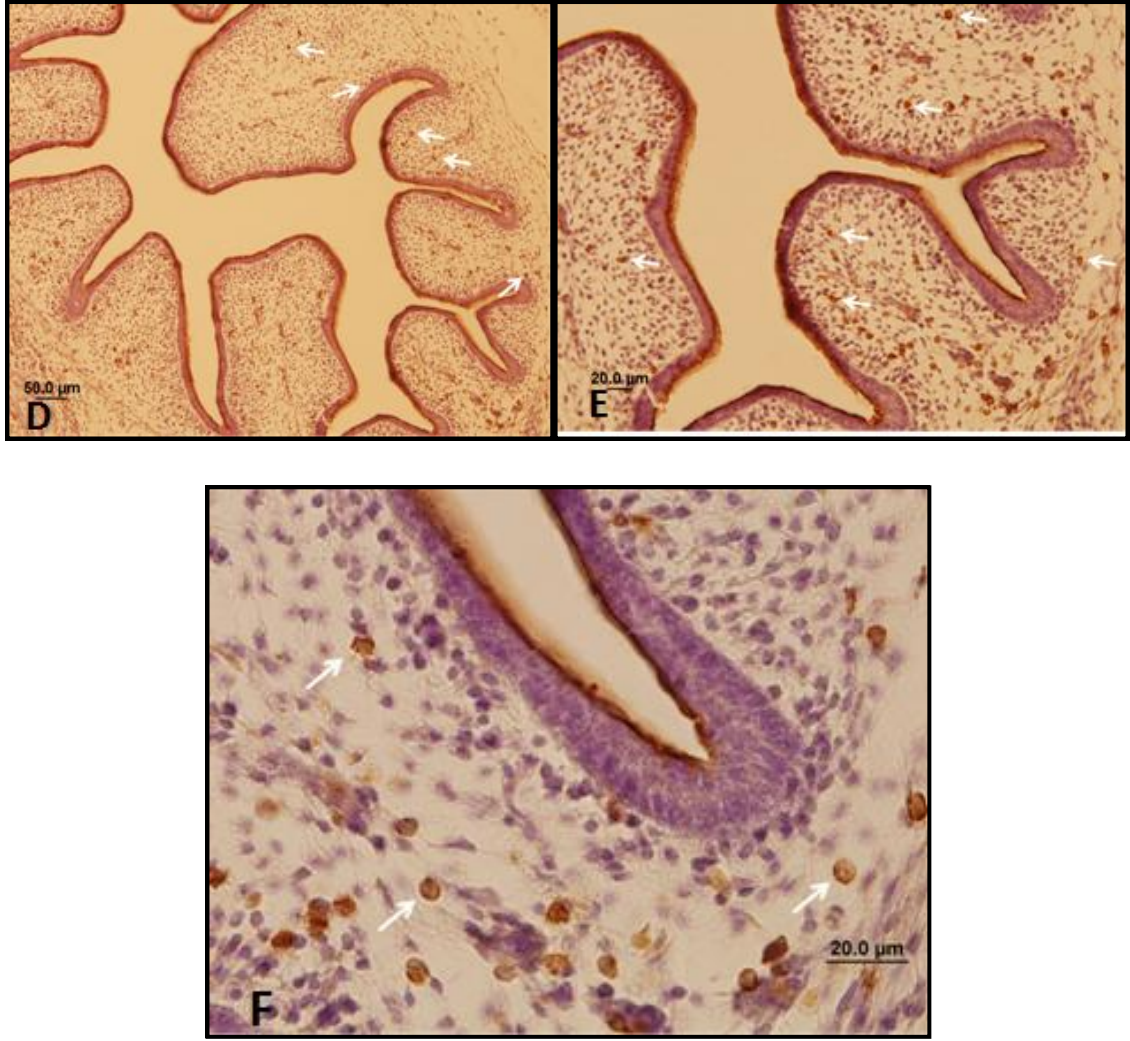
QH-1' in pozitif kontrol olarak kullanıldığı sLe-X ve QH-1 çift boyama protokolü sonucu primer antikor olarak kullandığımız sLe-X için boyama gözlenmedi. Bu sonucu desteklemek için uygulanan antijen retrieval protokolü sonucunda DAB boyamasının hemen ardından ışık mikroskopunda incelendiğinde negatif kontrollerde ve sitrat buffer uygulanan kesitlerde boyanma gözlenmemesine rağmen edta-tris buffer uygulanan kesitlerde çok az boyanma olduğu görüldü. Hemen ardından protokole devam edilerek floresan boyama sonucu kesitler incelendiğinde ise edta-tris buffer uygulanan kesitlerde embriyonun ekstraembriyonik yapılarının boyandığı fakat sLe-X için spesifik bir boyanma olmadığı gözlemlendi.

Diğer bir analizde pozitif kontrol olarak 12. ve 14. gün tavuk embriyo kesitleri kullanıldı. Bunun sebebi sLe-X'in tavuk embriyosunun *Bursa fabricius* bölgesinde ekspresse edildiğinin bilinmesidir (Masteller vd 1995). Pozitif kontrollerle birlikte yapılan ve iki farklı kit kullanılan ( CSLEX-1 ve HECA ) immün boyama sonucunda 12. ve 14. gün tavuk embriyo kesitlerinde sLe-X'in ekspresse edildiği gözlemlendi (Şekil 4.4, 4.5). Bıldırcın primitif cinsiyet hücrelerinin 20HH safhasında gonadal bölgeye göç ettiği bilinir (Kuwana 1993) fakat 20HH safhasındaki bıldırcın embriyo kesitleri ile yaptığımız immunohistokimyasal analizde primitif cinsiyet hücrelerinin gonadal göçü sırasında sLe-X ekspresyonu saptanmadı. Bıldırcın embriyo kesitlerinde sLe-X ekspresyonu olmamasına karşılık çift boyama sonucu primitif cinsiyet hücrelerinde QH-1 ekspresyonu ve göç aşamasındaki primitif cinsiyet hücreleri farklı ölçeklerde fotoğraflanarak gösterildi ( Şekil 4.6 ).

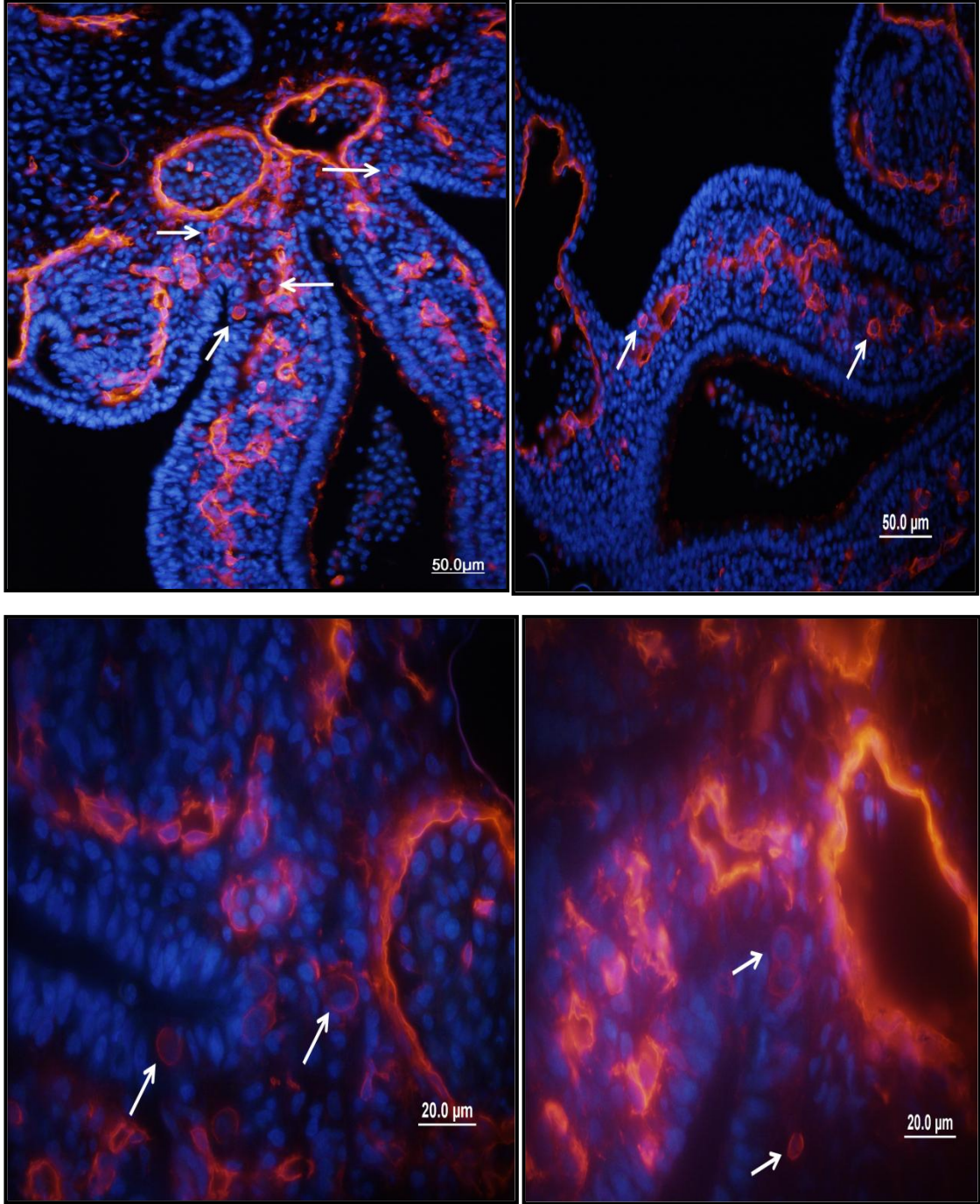


**Şekil 4.4** 12. gün tavuk *Bursa fabricius* kesitlerinde A, B , C ) CSLX-1 kiti kullanılarak prebursal B hücrelerinin gösterilmesi





**Şekil 4.5** 12. gün tavuk *Bursa fabricius* kesitlerinde D, E, F ) HECA kiti kullanılarak prebursal B hücrelerinin gösterilmesi



Şekil 4.6 Primitif cinsiyet hücrelerinin görünümü

## 5. TARTIŞMA

Gelişimsel biyolojide primitif cinsiyet hücrelerinin göç mekanizmasının anlaşılması önemlidir. Primitif cinsiyet hücrelerinin orijini, göç mekanizmaları ve fonksiyonel germ hücrelerinde farklılaşma gelişimsel biyolojinin 3 temel problemidir ve bu konu üzerinde daha fazla çalışmalar yapılmalıdır. Kanatlı embriyolarında primitif cinsiyet hücrelerinin belirlenmesi ve ekspresyon çalışmaları için özgün antikorlar ile immunohistokimyasal analizler yapılmıştır. CVH (chicken vasa homolog) proteini kullanılarak yapılan bir çalışmada primitif cinsiyet hücre yüzeylerinde bulunan karbohidrat bileşenlerinin CVH proteinini tanıması ile sadece “germinal crescent” bölgesinde değil daha erken safhalarda da primitif cinsiyet hücreleri tespit edilmiştir (Tsunakawa vd 2000). Ayrıca poliklonal antikor olan CVH ile yapılan western blot analizi sonucunda civciv testislerinde CVH protein ekspresyonu tespit edilmiştir (Nakamura vd 2007). Tavuk embriyolarında SSEA-1 ve EMA-1 antikorları kullanılarak yapılan analizlerde ekspresyon gözlenmesine karşılık SSEA-1’in germ hattına özgün olmadığı, EMA-1’in ise fare karsinoma hücrelerinde tespit edilmesi sonucu kanserle ilişkili olduğu bulunmuştur (Nakamura vd 2007). Çalışmamızda 20HH safhasındaki bıldırcın embriyolarında sialyl Lewis-X ekspresyonu araştırılmıştır ve bu safhada ekspresyon gösterilememiştir. Kanatlı türlerinde yapılan bu çalışmaların sonuçları gelecekteki çalışmalar için pozitif kontroller olarak kullanılabilir.

sialyl Lewis-X hücre yüzeyindeki glikanlara yapışan tetrasakkarit karbohidrat epitopudur. sialyl Lewis-X, hücre göçünde rol oynar ve evrimsel süreç içerisinde korunmuştur. sialyl Lewis-X’in hücre göçündeki rolü nedeni ile ekspresyonu sıkı bir şekilde kontrol edilir.

Spektrofotometrik analizler ile yapılan bir çalışmada insanda yumurtaya spermin bağlandığı, yumurtayı kaplayan zona pellucida için sialyl lewis-X’in önemli bir karbohidrat ligandı olduğu tespit edilmiştir (Pang vd 2011). İlerleyen çalışmalarda

memeli primitif cinsiyet hücrelerinin davranışlarında sialyl lewis-X molekülünün rolü araştırılmalıdır.

Kanatlı B lenfosit progenitör hücreleri, olgun B hücreleri içinde gelişmek için özelleşmiş bir primer lenfoid organa göç etmek zorundadırlar (Masteller vd 1995). Tavuk lenfosit progenitör hücreleri, ilk 5-6. embriyonik günde yumurta sarısında sonradan ise kan ve çeşitli hematopoetik organlarda saptanmıştır (Reynaud vd 1992). İşlenmiş tavuk B lenfosit progenitör hücreleri *Bursa fabricius* içerisine 10-15. embriyonik günler arasında göç etmeye başlar ve esas girişin 12. günde meydana geldiği tespit edilmiştir. Tavuk B lenfosit progenitör hücrelerinin kan dolaşımına geçtikleri zaman sialyl Lewis-X'i ekspresse ettiği ve *Bursa fabricius*'a geldiklerinde sialyl epitopunun ekspresyonunun durduğu dolayısıyla hücre göçünün sonlandığı tespit edilmiştir (Masteller vd 1995).

Çalışmamızda sialyl Lewis-X ekspresyonu için 3. gün bildircin embriyolarında sialyl epitopunu tanıyan antikor kullanıldı. Tavuk *Bursa fabricius* pozitif kontrolü ile yapılan uygulamada tavuk ve bildircin embriyo kesitleri için sialyl epitopunu tanıyan ancak lewis-x'i tanımayan CSLEX-1 ve HECA antikorları kullanıldı.

Bıldircin primitif cinsiyet hücre göçünün gerçekleştiği 20HH safhasında sialyl Lewis-X ekspresyonu bulunamadı. Bıldircin embriyolarında sialyl Lewis-X ekspresyonunun gözlenememesinin nedeni karbohidrat epitopunun farklı olmasından dolayı ya da sLe-X'in bıldircin primitif cinsiyet hücrelerinin göçünde rol oynamaması olabilir.

Gonadal göçün gerçekleştiği 20HH safhasında sialyl Lewis-X proteininin ekspresyonu bulunamamasına karşılık daha önceki ya da daha sonraki safhalarda ekspresyon olabilir ve bunun araştırılması gerekmektedir.

sialyl Lewis-X'in ekspresyonu sıkı bir şekilde kontrol edildiği için ekspresyonu belli zamanlarda olur ve görevi bittiğinde ekspresyonu durur (Masteller vd 1995). Tavuk B progenitör hücrelerinin dolaşımdayken sialyl Lewis-X ekspresyonunu gerçekleştirdiği ancak bu hücrelerin bursa fabricius'a göç etmeleri sonucu sialyl epitopunun ekspresse olmayıp sadece lewis-x ekspresyonunun gerçekleşmesi ve hücre göçünün durması sialyl

Lewis-X ekspresyonunun zamana bağlı olduğu ve sıkı bir şekilde kontrol edildiğinin göstergesidir.

sialyl Lewis-X proteininin kanser hücrelerinde de eksprese olduğu ve kanser metastazında rol oynadığı tespit edilmiştir (Pinho vd 2007). Tümör hücrelerinde sLe-X ekspresyonu düzeyindeki artış bu ya da benzer proteinlerin sadece gonadal hücre göçünde değil diğer hücrelerin göçünde de etkili olduğunu gösterir.

Yapılan bir çalışmada insan karsinoma hücrelerinde sLe-X ekspresyonunda önemli derecede artış gözlenmiştir ayrıca çoğu klinik çalışmada tümör ilerlemesinin ve metastazın sLe-X ekspresyonu ile ilişkisi olduğu desteklenmiştir (Fukuda 1996). Tümör hücrelerinde sLe-X ekspresyonundaki artış ve metastazın çalışılması kansere yaklaşımda önemli olabilir.

sialyl Lewis-X'in gonadal hücre göçünde rol oynaması ve kanser hücrelerinde özellikle metastazdaki rolü bu molekülün moleküler mekanizmasının ortaya çıkarılmasını gerektirmiştir.

İnsan kanser hücrelerinde hücre adezyon molekülü E-selektin için bir ligand olarak bilinen sialyl lewis-X'in flow sitometri yöntemi ile ekspresyonunun incelendiği bir çalışmada SGC-7901, BGC-823 ve MGC-803 olarak üç mide kanser hücre hattında sialyl lewis-X ekspresyon düzeyinin yüksek olduğu fakat normal mide epitelyum hücre hattı olan GES-1'de sialyl lewis-X'in düşük ekspresyon düzeyi olduğu gösterilmiştir ve bu çalışma immunohistokimyasal analizlerde teyit edilmiştir( Liu vd 2011). Ayrıca kolon kanser hücrelerinde ve üroteliyal kanser hücrelerinde yapılan çalışmalarda da kanser hücrelerinde sialyl lewis-X ekspresyon düzeyi normal hücrelere göre yüksek bulunmuştur (Malagolini vd 2007, Fujii vd 2000).

Bu molekülün kanser hücrelerinin göçündeki etkisinin araştırılması kanser çalışmalarında önemlidir ve bu molekülün kanser hücrelerinde çalışılması kanser hücre davranışlarının belirlenmesine ışık tutar.



## 6. SONUÇ

Embriyonal dönemde eşey hücrelerini oluşturmak için farklılaşmış olan primitif cinsiyet hücreleri; erişkin dönemde erkeklerde testisleri, dişilerde yumurta hücrelerini oluşturur ve bu yüzden primitif cinsiyet hücreleri embriyonal gonad dokularına göç ederler. Kanatlı türleri ve memeli türleri arasında primitif cinsiyet hücrelerinin göç yolağı farklılık gösterir. Kanatlı primitif cinsiyet hücrelerinin göçü kan dolaşımı yoluyla gerçekleşirken memeli primitif cinsiyet hücrelerinin göçü dokular arasında gerçekleşir.

Kanatlılarda primitif cinsiyet hücrelerinin varlığı gonad gelişiminden önce “germinal crescent” olarak bilinen ekstraembriyonik bölgede tanımlanmıştır. Daha sonra CVH proteini ile yapılan bir ekspresyon çalışmasında primitif cinsiyet hücrelerinin “germinal crescent” den daha erken safhalarda da bulunduğu saptanmıştır. Primitif cinsiyet hücreleri 4-5HH safhasında “germinal crescent” bölgesine ulaşır ve buradan kan dolaşımı ile gonadlara göç ederler. Hücre göçü esnasında primitif cinsiyet hücrelerinin gelişimi hücre yüzeyindeki makromoleküllerin ekspresyonuna bağlıdır. Kanatlı primitif cinsiyet hücrelerinin belirlenmesi ve özgün antikolar yardımıyla ekspresyon analizleri yapılmıştır.

Bu amaçlar doğrultusunda gerçekleştirilen araştırmanın sonuçları aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Bu çalışmada 20HH safhasında bulunan bıldırcın embriyolarına bıldırcın primitif cinsiyet hücrelerinde ekspresyonu bilinen QH-1 antikoru uygulandı ve ardından yapılan DAB boyaması sonucu primitif cinsiyet hücreleri saptandı 20HH safhasında primitif cinsiyet hücrelerinin gonadal bölgeye göçe başladığı tespit edildi. Sonuç olarak; QH-1 ile saptama, DAB ile görüntüleme yapıldı.
- Primitif cinsiyet hücreleri tarafından sLe-X epitopunun ekspresse edilip edilmediğini belirlemek için pozitif kontrollerle birlikte immunohistokimya ve

immunfloresans analizler yapıldı. Sadece sialyl x epitopunu tanıyan CSLEX-1 ve HECA antikorları ile sLe-X – QH-1 çift boyama yapıldı

- SLe-X – QH-1 çift boyama sonucunda pozitif kontrol olarak kullandığımız tavuk *Bursa fabricius*'da her iki antikor için de sLe-X ekspresyonu gösterildi.
- QH-1 ile tespit edilen bildircin primitif cinsiyet hücrelerinde ise sLe-X'in ekspresse edilmediği gösterildi.
- sLe-X epitopunun maskelenmesi ve bu yüzden immunohistokimyasal analizin belirlenememesi ihtimaline karşılık yapılan antijen retrieval sonucunda sitrat buffer ve edta-tris buffer solüsyonları ile muamele edilen kesitlerde de DAB boyaması sonucu boyanma gözlenmedi.
- sLe-X'in tavuk embriyolarında primitif cinsiyet hücrelerinin gonadal taslağa göçünde rol oynadığı bilinir ancak bu moleküler mekanizmanın tüm kanatlı türlerinde bulunduğunu gösteren bir çalışma yoktur. Çalışmamızda 20HH safhasındaki bildircin embriyoları kullanılarak sLe-X ekspresyonu araştırılmış ve ekspresyonu bilinen tavuk embriyoları pozitif kontrol olarak çalışılmıştır. Araştırmamız sonucunda sLe-X epitopunun bildircin primitif cinsiyet hücrelerinde ekspresse edilmediği tespit edilmiştir.

## 7. KAYNAKLAR

- Andrews, J. E., Smith, C. A., Sinclair, A. H. (1997) Sites of oestrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 108: 182-90.
- Armengol, C., Carretero, A., Nocher, V., Ruberta, J., Navarro, M. (2007) Carbohydrate characterization of quail primordial germ cells during migration and gonadal differentiation. *J. Anat.*, 210: 98-111.
- Bakst, M. R., Brillard, J. P., Wishart, G. J. (1994) Sperm selection, transport and storage in the ovarian oviduct. *Poultry Sci. Rews.*, 5: 143-77d.
- Bellaris, R., Osmond, M. (2005) The atlas of chick development. *Elsevier*, USA, 247s.
- Bendel-Stenzel, M. R., Gomperts, M., Erson, R., Heasman, J., Wylie, C. (2000) The role of cadherins during primordial germ cell migration and early gonad formation in the mouse. *Mech. Dev.*, 91: 143-52.
- Callabaut, M. (1987) Ooplasmic localization and segregation in quail germs fate of the four ooplasm. *Arch. Biol.*, 98: 441-73.
- Callabaut, M., Harrison, F. Bortier, H. (2001) Effect of gravity on the interaction between the avian germ and neighbouring ooplasm in inverted egg yolk balls. *Eur. J. Morph.*, 39: 27-38.
- Callabaut, M., Von Neuton E. (1994) Koller's sickle the early gastrulation organiser of the avian blastoderm. *Eur. J. Morph.*, 32: 35-48.
- D'Costa, S., Pordue, S. L., Petite, J. N. (2001) Comparative development of avian primordial germ cells and production of germ line chimeras. *Avian Poultry Biol. Rev.*, 12: 151-68.
- Dube, D. H., Bertazi, C. R. (2005) Glycans in cancer and inflammation potential for therapeutics and diagnostics. *Nature Reviews*, 4:477-488.
- Eyal-Giladi, H., Lotton, I., Levin, I., Avner, O., Hochman, J. (1994) Avian marginal zone cells function as primitive streak inducers only after their migration in the hypoblast. *Development*, 120: 2501-2509.
- Faucounou, N., Ichas, F., Stoll, R., Maraud, R. (1995) Action of testosterone on the estradiol-induced feminisation of the male chick embryo. *Anat. Embryol.*, 191: 377-9.

- Fujii, Y., Yoshida, M., Chien, L. J., Kihara, K., Kageyama, Y., Yasukochi, Y., Oshima, H. (2000) Significance of carbohydrate antigen sialyl Lewis X, sialyl lewis-A, and possible unknown ligands to adhesion of human urothelial cancer cells to activated endothelium. *Urol. Int.*, 64(3): 129-33.
- Fujimoto, T., Yoshinaga, K., Kono, I. (1985) Distribution of fibronectin on the migratory pathway of primordial germ cells in mice. *Anat. Rec.*, 211. 271-278.
- Fujimoto, T., Yoshinaga, K. (1986) The role of fibronectin in the interstitial migration of primordial germ cells in amniotes. *Cong. Anom.*, 26: 187-196.
- Fukuda, M. (1996) Possible roles of tumour-associated carbohydrate antigens. *Cancer Res.*, 56: 2237-2244.
- Ginsburg, M., Eyal-Giladi, H. (1986) Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 95: 53-71.
- Gupta, S. K., Bakst, M.R. (1993) Turkey embryo staging from cleavage through hypoblast formation. *J. Morphol.*, 217: 313-325.
- Hamburger, V., Hamilton, H. L. (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, 88: 49-92.
- Heasman, J., Wylie C. C. (1981) Contact relations and guidance of primordial germ cells on their migratory route in embryos of *Xenopus laevis*. *Proc. R. Soc. Lond.*, 213: 41-58.
- Hara, K. (1971) Micro-surgical operation on the chick embryo in ovo without vital staining-A modification of the intra-coelomic grafting technique. *Mikroskopie*, 27: 267-270.
- Harrocks, A. J., Stewart, S., Jackson, L., Wishart, G. J. (2000) Induction of acrosomal exocytosis in chicken spermatozoa by inner previtelline-derived N-linked glycans. *Biochem. Biophys. Res.*, 278: 84-9.
- Holm, L., Ekwall, H., Wishart, G. S., and Ridderstrale, Y. (2000) Localization of calcium and zinc in the sperm storage tubules of chicken and turkey using X-ray microanalysis. *J. Reprod. Fertil.*, 118: 331-6.
- Jordanov, J., Georgiev, I., Boyadjieva-Mihailova, A. (1966) Physicochemical and electron microscopical investigations on the vitelline membrane of the hen's egg with a view to its permeability to macromolecules. *C. R. Acad. Bulg. Sci.*, 19: 153-6.
- Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyzaki, K., Kimura, N. (2004) Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci.*, 95: 377-384.

- Karagenç, L., Cinnamon, Y., Ginsburg, M., Petite, J. N. (1996) Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Dev. Genet.*, 19: 290-301.
- Karagenç, L. (1998) Development of avian primordial germ cells in vivo and in vitro. Doktora tezi, *North Carolina State University*, A.B.D.
- Karagenç, L., Petite, J. N. (2000) Soluble factors and emergence of chick primordial germ cells in vitro. *Poultry Science*, 79: 80-85.
- Kuwana, T. (1993) Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Develop. Growth & Differ.*, 35(3): 237-243.
- Kuwana, T., Fujimoto, T. (1984) Locomotion and scanning electron microscopic observations of primordial germ cells from the embryonic chick blood in vitro. *Anat. Rec.*, 209: 337-343.
- Liu, F. R., Jiang, C. G., Li, Y. S., Li, J. B., Li, F. (2011) Cimetidine inhibits the adhesion of gastric cancer cells expressing high levels of sialyl Lewis X in human vascular endothelial cells by blocking E-selectin expression. *International Journal of Molecular Medicine*, 27(4): 537-44.
- Malagolini, N., Santini, D., Chiricolo, M., Dall'Olio, F. (2007) Biosynthesis and expression of the Sd<sup>a</sup> and sialyl Lewis x antigens in normal and cancer colon. *Glycobiology*, 17(7): 688-97.
- Masteller, L., Larsen, R. D., Carlson, L. H., Pickel, J. M., Nickoloff, B., Lowe, J., Thompson, C. B., Lee, K. P. (1995) Chicken B cells undergo discrete developmental changes in surface carbohydrate structure that appear to play a role in directing lymphocyte migration during embryogenesis. *Development*, 121: 1657-1667.
- Molyneaux, K. A., Stallock, J., Schaible, K., Wylie, C. (2001) Timelapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev. Biol.*, 240: 488-98.
- Molyneaux, K., Wylie, C. (2004) Primordial germ cell migration. *Int. J. Dev. Bio.*, 48: 537-544.
- Nakabayashi, O., Kikuchi, H., Kikuchi, T. (1998) Differential expression of genes for aromatase and oestrogen receptor during gonadal development in chicken embryos. *J. Mol. Endocrinal.*, 20: 193-202.
- Nakamura, Y., Yamamoto, Y., Usui, F., Mushika, T., Ono, T., Setioko, A. R., Takeda, K., Nirosawa, K., Kagami, H., Tagami, T. (2007) Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poultry Science*, 86: 2182-2193.
- Pang, P. C., Chiu, P. C., Lee, C. L., Chang, L. Y., Panico, M., Morris, H. R., Haslam, S. M., Khoo, K. H., Clark, G. F., Yeung, W. S., Dell, A. (2011) Human sperm binding is mediated by the sialyl-Lewis(x) oligosaccharide on the zona pellucida. *Science*, 23;333(6050): 1761-4.

- Petitte, J. N., Karagenç, L., Ginsburg, M. (1997) The origin of the avian germ line and transgenesis in birds. *Poultry Science*, 76: 1084-1092.
- Pinho, S. S., Matos, A., Lopes, C., Marcos, N. T., Carvalhiera, J., Reis, C. A., and Gartner, F. (2007) Sialyl Lewis-X expression in canine malignant mammary tumours: correlation with clinicopathological features and E-cadherin expression. *BMC Cancer*, 7: 124.
- Püschel, B., Demus, U., Viebahn, C. (2005) Subcellular characterization of the primordial germ cell antigen PG2 in adult oocytes. *Histochem. Cell Biol.*, 124(3-4): 275-84.
- Reynaud, C. A., Imhof, B. A., Anquez, V., and Weill, J. C. (1992) Emergence of committed B lymphoid progenitors in the developing chicken embryo. *Embo J.*, 11: 4349-4358.
- Robertson, L., Wishart, G. J., Harrocks, A. J. (2000) Identification of previtellic N-linked glycan as mediators of sperm-egg interaction in chickens. *J. Reprod. Fertil.*, 120: 397-403.
- Romanoff, A. L., Romanoff, A. J. (1949) The avian egg. *J. Wiley*, New York, 1949s.
- Saitou, M., Barton, S. C., Surani, M. A. (2002) A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*, 418: 293-300.
- Sanders, E. J., Bellairs, R., Portch, P. A. (1978) In vivo and in vitro studies on the hypoblast and definitive endoblast of avian embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 46: 187-205.
- Silva, Z., Tong, Z. Q., Guadalupe Cabral, M., Martins, C., Castro, R., Reis, C., Trindade, H., Konstantopoulos, K., Videira, P. A. (2011) Sialyl Lewis-X dependent binding of human monocyte-derived dendritic cells to selectins. *Biochemical and Biophysical research communications*.
- Smith, L. D., Michael, P., Williams, M. A. (1983) Does a predetermined germ line exist in amphibians? In current problems in germ cell differentiation. *Cambridge Univ. Press*, London, pp. 19-39.
- Soriano del Amo, D., Wang, W., Besanceney, C., Zheng, T., He, Y., Gerwe, B., Seidel, R. D., Wu, P. (2010) Chemoenzymatic synthesis of the sialyl lewis-x glycan and its derivatives. *Carbohydr. Res.*, 345: 1107.
- Stern, C. D. (1990) The marginal zone and its contribution to the hypoblast and primitive streak of the chick embryo. *Development*, 109: 667-82.
- Stern, C. D., Canning, d. R. (1988) Changes in the expression of the carbohydrate epitope HNK-1 associated with mesoderm induction in the chick embryo. *Development*, 104: 643-55.

- Stoll, R., Iches, F., Fancounan, N., Maraud, R. (1993) Action estradiol and tamoxifen on the testis-inducing activity of the chick embryonic testis grafted to the female embryo. *Anat. Embryol.*, 188: 587-92.
- Tajima, A., Hayashi, H., Kamizumi, A., Ogura, J., Kuwana, T., Chikamune, T. (1999) Study on the concentration of circulating primordial germ cells in early chick embryos. *J. Exp. Zool.*, 284: 759-64.
- Takeuchi, T., Tanigawa, Y., Minamide, R., Ikenishi, K., Komiya, T. (2010) Analysis of SDF-1/CXCR4 signaling in primordial germ cell migration and survival or differentiation in *Xenopus leavis*. *Mech. Dev.*, 127(1-2): 146-58.
- Tsuda, M., Sasaoka, Y., Kisa, M., Abe, K., Haraquchi, S., Kabayashi, S., Saga, Y. (2003) Conserved role of nanos proteins in germ cell development. *Science*, 29,301(5,637): 1239-41.
- Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T., and Noce, T. (2000) Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development*, 127: 2741-2750.
- Ukeshima, A., Fujimoto, T. (1991) A fine morphological study of germ cells in asymmetrically developing right and left ovaries of the chick. *Anat. Rec.*, 230: 378-86.
- Waddington, D., Gribbin, C., Sterling, R. C., Sang, H., Perry, M. M. (1998) Chronology of events in the first cell cycle of the polyspermic egg of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Int. J. Dev. Biol.*, 42: 625-8.
- Watt, J. M., Petite, J. N., Etches, R. J. (1993) Early development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 215: 165-182.
- Wishart, G., Harrocks, A. J. (2000) Fertilization in birds. In fertilization in protozoa and metazoa animals. *Springer-Verlog*, Heidelberg, pp. 193-222.
- Wylie, C. C., Heasman, J. (1982) Effect of the substratum on the migration of primordial germ cells. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.(B)*, 299: 177-183.
- Vakaet, L. (1970) Cinephotomicrografic investigations of gastrulation in the chick blastoderm. *Arch. Biol.*, 81: 387-426.
- Villalpando, I., Sanchez-Bringes, G., Pedernera, E. (2000) The P450 aromatase gene is asymmetrically expressed in a critical period for gonadal sexual differentiation in the chick. *Gen. Comp. Endocrinal*, 117: 325-34.
- Ying, Y., Qi, X., Zhao, G. Q. (2001) Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8b signalling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98: 7858-62.

- Yoshinaga, K., Fujimoto, T., Nakamura, M., Terakura, H. (1992) Selective lectin-binding sites of primordial germ cells in chick and quail embryos. *Anat. Rec.*, 233: 625-632.
- Zaccanti, F., Vallisneri, M., Quagia, A. (1990) Early aspects of sex differentiation in the gonads of chick embryos. *Differentiation*, 43: 71-80.
- Zehavi, N., Reich, V., Khoner, O. (1998) High proliferation rate characterizes the site of axis formation in the avian blastula-stage embryo. *Int. J. Dev. Biol.*, 42: 95-8.



## 8. ÖZGEÇMİŞ

Betül Şenlikci 1984 yılında Eskişehir’de doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi İzmir’in Buca ilçesinde tamamladı. 2006 yılında Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı ve bu bölümden 2010 yılında mezun oldu. 2010 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.