



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

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN NÖRAL TÜP DEFİKTİNDE  
MEZENKİMAL VE HEMOPOETİK KÖK HÜCRELERİN  
BELİRLENMESİ**

**ZEYNEP DENİZ ŞAHİN İNAN**

**DOKTORA TEZİ  
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SİVAS - 2015**

**T.C.**  
**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN NÖRAL TÜP**  
**DEFEKTİNDE MEZENKİMAL VE HEMOPOETİK KÖK**  
**HÜCRELERİN BELİRLENMESİ**

**ZEYNEP DENİZ ŞAHİN İNAN**  
**DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**  
**PROF. DR. SERPİL ÜNVER SARAYDIN**

**SİVAS 2015**

Bu çalışma Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof.Dr. Sevinç İNAN

Üye Prof.Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN

Üye Prof.Dr. Emel KOPTAGEL

Üye Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR

Üye Doç.Dr. Vedat SABANCIOĞULLARI

ONAY

Bu tez çalışması, 05.03.2015 tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

---

Prof.Dr. Ali ÇELİKSÖZ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

Bu tez, Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 24.09.2008 tarihli ve 007 sayılı toplantısında kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzu adlı yönergeye göre hazırlanmıştır.

Yokluğu içimde her gün fırtınalar koparan

Canım **BABAM**'ın

Onurlu, erdemli, kısacık hayatına

Saygıyla..

## ÖZET

### DENEYSEL OLARAK OLUŞTURULAN NÖRAL TÜP DEFEKTİNDE MEZENKİMAL VE HEMOPOETİK KÖK HÜCRELERİN BELİRLENMESİ

Zeynep Deniz ŞAHİN İNAN

Doktora Tezi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN

2015

Kök hücreler gelişimin erken dönemlerinde görülmeye başlayan, hem sinir hem de diğer sistemlerin gelişiminde önem taşıyan hücre grubudur. Nöral tüp defektleri nöral tüp oluşum sürecinde nöral tüpün kapanmamasıyla oluşan anomalilerdir. Bu çalışmada nöral tüp defekti oluşum sürecinde seçilen mezenkimal ve hemopoetik kök hücre belirteçlerinin erken ve geç dönemdeki lokalizasyonları immünohistokimyasal olarak belirlenerek, defekt oluşum mekanizmasındaki değişimin tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada gebe sıçanlara 40 mg/kg all-trans retinoik asit uygulanarak deneysel nöral tüp defekti oluşturulmuştur. Sıçanların E10,5 ve E15,5 deney (D1-D2) ve kontrol (K1-K2) gruplarına rutin ışık mikroskopik teknikler uygulanarak histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalar yapılmıştır. Boyamalarda nöroepitel, nöroepiteli saran bazal membran, somitler, primitif endodermal tabaka, pleksus koroideus değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda mezenkimal kök hücre antikorlarından CD44, CD56, CD90 ve CD105'in kontrol grubu erken dönemde geç döneme oranla daha yüksek miktarda lokalize olduğu, CD73'ün fetal dönemde lokalizasyonunun arttığı CD271'in ise değişmediği görülmüştür. Deneysel nöral tüp defekti oluşturulan gruplarda CD105, CD271 lokalizasyonlarının kontrol gruplarına oranla arttığı, CD56, CD73, CD90 lokalizasyonlarının azaldığı ve CD44 lokalizasyonunun embriyoner dönemde azaldığı fetal dönemde arttığı belirlenmiştir. Hemopoetik kök hücre antikorlarından CD14 ve CD45'in kontrol gruplarında fetal döneme doğru immünohistokimyasal lokalizasyonlarının arttığı izlenmiştir. Nöral tüp defekti oluşturulan deney gruplarında CD14, kontrol gruplarına oranla embriyoner dönemde yoğunken fetal dönemde immünohistokimyasal lokalizasyonunun azaldığı belirlenmiştir. Nöral tüp defekti oluşturulan deney gruplarında CD45 lokalizasyonu kontrole oranla embriyoner dönemden fetal döneme doğru artış göstermiştir. Nöral tüp defekti oluşumu sırasında pek çok gen bölgesinin çalışma

mekanizması ve hücre içi işleyiş mekanizması etkilenir. Çalışmada mezenkimal ve hemopoetik kök hücre antikorlarının erken ve geç dönemde değişen ekspresyonları belirlenerek, kök hücrelerin defekt oluşumuna etkisi belirlenmiştir. Böylece ileride yapılacak çalışmalarda nöral tüp defektlerinin patogenezinin ortaya çıkarılmasında fayda sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Deneysel nöral tüp defekti, atRA, CD14, CD44, CD45, CD56, CD73, CD90, CD105, CD271

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF MESENCHYMAL AND HAEMOPOETIC STEM CELLS IN EXPERIMENTALLY DEVELOPED NEURAL TUBE DEFECTS

Zeynep Deniz ŞAHİN İNAN

PhD Thesis, Department of Histology–Embryology

Supervisor: Prof. Dr. Serpil ÜNVER SARAYDIN

2015

Stem cells are a critically important cell group that play crucial roles in the development of both nervous and other body systems during the early developmental stages. Neural tube defects are congenital anomalies occurs *via* not closing of the neural tube during the neurulation process. The aim of the present study was to determine the early and late stage localizations of selected mesenchymal and haemopoetic stem cell markers immunohistochemically throughout the neural tube defect formation procedure along with the determination of their role in the defect formation mechanisms.

The constitution of neural tube defect was done by the application of 40 mg/kg all-trans retinoic acid to pregnant rats. Following the conventional light microscopical tissue processing techniques, tissue sections were visualized using histochemical and immunohistochemical methods in the E10,5 and E15,5 experimental groups (D1-D2) and in the control groups (K1-K2). Neuroepithelium, basement membrane covering of the neuroepithelium, somits, primitive endymal layer and plexus choroideus were evaluated in the stained tissue sections.

While mesenchymal stem cell antibodies CD44, CD56, CD90 and CD105 were found to be highly localized in early stages of development, CD73 localization was found to be higher in fetal period and CD271 localization was seen unchanged throughout all developmental stages. On the other hand, in the experimental neural tube defect groups CD56, CD105, CD271, localizations were increased when compared to the controls whereas CD73, CD90 localizations were decreased and CD44 localization was decreased in the embryonal stage and increased in the fetal stage. Localizations of haemopoetic stem cell antibodies CD14 and CD45 were found to be increased in the control groups through the fetal period. In the experimental neural tube defect groups,



while CD14 localization was more intense during the embryonal period than the controls, their immunolocalizations was decreased in the fetal period. CD45 localization was started to increase from the embryonal period through the fetal period when compared to the control groups.

During the neural tube defect formation process, the operation and intracellular action mechanisms of many gene regions are affected. In the present study, expressions of mesenchymal and haemopoetic stem cell antibodies were determined and effects of stem cells on defect formation was also found out. Therefore findings of the present study could give a new perspective to the future studies on the determination of neural tube defect pathogenesis.

**Key Words:** Experimental neural tube defect, atRA, CD14, CD44, CD45, CD56, CD73, CD90, CD105, CD271

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresinde bana maddi manevi her türlü desteği karşılıksız veren, bilgi birikimlerinden her zaman yararlandığım, karşılıksız yol gösteren, bana verdikleri emeği asla ödeyemeceğim saygıdeğer danışman hocam;

*Prof. Dr Serpil ÜNVER SARAYDIN'a*

Gereken her an kapılarımı açık tutan, bilgi birikimlerini karşılıksız sunan hocalarım,

*Prof. Dr. Emel KOPTAGEL 'e*

*Prof. Dr Eray BULUT, Prof.Dr.Celal KALOĞLU'na*

Anabilim dalımızda bulunan neşeli, yardımsever arkadaşlarım,

*Berna ÖZDENOĞLU, Sevinç ŞİMŞEK'e*

Her an neşe kaynağım, yaşama sebebim kızlarım,

*Berru İdil İNAN, Bilge İpek İNAN'a*

Can yoldaşım, yol arkadaşım ve ellerimi bırakmadan yürümeye devam etmemi sağlayan eşim *Cem İNAN'a*

Bu tezin bitmesi için beni sürekli yüreklendiren dedem,

*Muzaffer ÖZDEN'e*

İçimde saklı çocuk gülüşleri her fırsatta açığa çıkaran kardeşim, can parçam,

*Asude ŞAHİN'e*

Ve benim için anlamını tarifleyemediğim, sakin bir liman gibi her zaman huzur bulduğum annem,

*Asuman ŞAHİN'e*

Zamansız gidişiyile her an özlemle, hasretle anacağım, hayatta erdemli ve onurlu olmayı öğrendiğim, mücadelesine, enerjisine hayran olduğum babam

*Hulusi ŞAHİN'e*

Sonsuz **TEŞEKKÜRLER**

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Nöral Tüp Gelişimi .....	3
2.2. Nöral Tüp Defektleri.....	14
2.2.1. Nöral Tüp Defektlerinin Çeşitleri.....	14
2.2.1.1. Anensefali ve eksensefali.....	14
2.2.1.1.a. Ensefalosel.....	14
2.2.1.1.b. İniensefali.....	15
2.2.1.2. Spina Bifida .....	15
2.2.1.2.a. Kranioraşısız.....	15
2.2.1.2.b. Miyelomeningosel (Spina Bifida; Spina Bifida Aperta).....	15
2.2.2. Nöral Tüp Defektlerinin Etyolojisi.....	17
2.2.2.1. İzole gelişimsel nöral tüp defekti.....	17
2.2.2.1.a. Çevresel faktörler .....	17
2.2.2.1.b. İlaç kullanımı ve nöral tüp defekti .....	18
2.2.2.1.c. Hiperemi ve nöral tüp defekti.....	19
2.2.2.1.d. Diabetes mellitus ve nöral tüp defekti.....	19
2.2.2.1.e. Obezite ve nöral tüp defekti .....	19

2.2.2.2. Multiple nöral tüp defekti (spesifik bir etyolojiye bağlı ve genelde başka malformasyonlarla birlikte görülenler).....	19
2.2.3. Nöral Tüp Defekti Epidemiyolojisi ve İnsidansı.....	19
2.3. Retinoik Asit .....	21
2.3.1 Retinoik Asit'in Etki Mekanizması .....	22
2.3.2. Retinoik asitin dişi ve erkek üreme sistemine etkisi .....	23
2.3.3. Retinoik asitin maternal / fetal taşınması .....	24
2.3.4. Retinoik asitin sinir sistemiyle ilişkisi.....	25
2.3.5. Embriyoda Retinoik asit metabolizması.....	26
2.4. Kök Hücreler.....	29
2.4.1. Embriyonik kök hücreler.....	31
2.4.2. Yetişkin kök hücreler .....	33
2.4.2.1. Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri ve belirteçleri.....	33
2.4.2.1.a. CD44 .....	34
2.4.2.1.b. CD56 (NCAM, Neural Cell Adhesion Molecule).....	35
2.4.2.1.c. CD73 (ekto 5' nukleotidas).....	36
2.4.2.1.d. CD90 (Thy-1).....	36
2.4.2.1.e. CD105 (endoglin).....	37
2.4.2.1.f. CD271, P75 (NGF (nervous growth factor, sinir büyüme faktörü- p75NTR) .....	37
2.4.2.2. Hemopoetik kök hücrelerin özellikleri ve belirteçleri .....	38
2.4.2.2.a. CD14 .....	40
2.4.2.2.b. CD45 .....	41
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER .....	42
3. 1. Gebelik için siklusların belirlenmesi.....	43
3.2. Retinoik asit'in hazırlanması.....	43
3.3. Stereomikroskop ve ışık mikroskopi.....	43

3.4. İmmünohistokimya .....	44
3.5. Kullanılan Cihazlar .....	45
3.6. Kimyasal Maddeler .....	45
4. BULGULAR.....	48
4.1. Retinoik Asit Doz Bulguları.....	48
4.2. Vajinal Sürüntü Bulguları .....	49
4.3. K1-D1 grupları bulguları.....	51
4.3.1. K1 grubu stereomikroskop ve H&E boyama bulguları.....	51
4.3.2. D1 grubu stereomikroskop ve H&E boyama bulguları.....	52
4.3.3. K1-D1 Grupları immünohistokimya bulguları .....	53
4.3.3.1. K1 grubu CD44 bulguları .....	54
4.3.3.2. K1 grubu CD56 bulguları .....	55
4.3.3.3. K1 grubu CD73 bulguları .....	56
4.3.3.4. K1 grubu CD90 bulguları .....	57
4.3.3.5. K1 grubu CD105 bulguları .....	58
4.3.3.6. K1 grubu CD271 bulguları .....	59
4.3.3.7. K1 grubu CD14 bulguları .....	60
4.3.3.8. K1 grubu CD45 bulguları .....	61
4.3.3.9. D1 grubu CD44 bulguları .....	62
4.3.3.10. D1 grubu CD56 bulguları .....	63
4.3.3.11. D1 grubu CD73 bulguları .....	64
4.3.3.12. D1 grubu CD90 bulguları .....	65
4.3.3.13. D1 grubu CD105 bulguları .....	66
4.3.3.14. D1 grubu CD271 bulguları .....	67
4.3.3.15. D1 grubu CD14 bulguları .....	68
4.3.3.16. D1 grubu CD45 bulguları .....	69

4.4. K2-D2 gruplarının bulguları .....	70
4.4.1. K2 grubu stereomikroskop ve H&E boyama bulguları .....	70
4.4.2. D2 grubu stereomikroskop ve H&E boyama bulguları .....	70
4.4.3. K2-D2 Gruplarının İmmünohistokimya Bulguları .....	72
4.4.3.1. K2 grubu CD44 bulguları .....	73
4.4.3.2. K2 grubu CD56 bulguları .....	74
4.4.3.3. K2 grubu CD73 bulguları .....	75
4.4.3.4. K2 grubu CD90 bulguları .....	76
4.4.3.5. K2 grubu CD105 bulguları .....	77
4.4.3.6. K2 grubu CD271 (p75, NGFR) bulguları .....	78
4.4.3.7. K2 CD14 bulguları .....	79
4.4.3.8. K2 grubu CD45 bulguları .....	80
4.4.3.9. D2 grubu CD44 bulguları .....	81
4.4.3.10. D2 grubu CD56 bulguları .....	82
4.4.3.11. D2 grubu CD73 bulguları .....	83
4.4.3.12. D2 grubu CD90 bulguları .....	84
4.4.3.13. D2 grubu CD105 bulguları .....	85
4.4.3.14. D2 grubunda CD271 (p75, NGFR) bulguları .....	86
4.4.3.15. D2 grubu CD14 bulguları .....	87
4.4.3.16. D2 grubunda CD45 bulguları .....	88
5. TARTIŞMA .....	97
6. SONUÇLAR .....	124
7. KAYNAKLAR .....	127
EK 1 .....	147
Etik kurul kararı .....	147
ÖZGEÇMİŞ .....	148

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 1.</b> Nörulasyon, 20. ve 21.günde nöral tüp oluşumunun şematize edilmiş görüntüsü. ....	3
<b>Şekil 2.</b> Nöral tüp kapanma süreci.....	6
<b>Şekil 3.</b> Erken embriyoner dönemde sinyal bölgeleri.....	8
<b>Şekil 4.</b> Erken embriyoner dönemde nöral tüp uzaması. ....	8
<b>Şekil 5.</b> Fare ve insanda nörulasyon. ....	9
<b>Şekil 6.</b> Fare embriyolarında rostrokaudal nöral tüp kapanma süreci. ....	10
<b>Şekil 7.</b> Nöroepitelde bulunan hücre sitoplazmalarında mikrofilamanlar.....	11
<b>Şekil 8.</b> Nöral tüpün kapanmasında apoptoz hücrelerin ve nörofilamanların görevi....	13
<b>Şekil 9.</b> Fare embriyosunda defektler. ....	16
<b>Şekil 10.</b> Dünya genelinde nöral tüp defekti sıklığı. ....	21
<b>Şekil 11.</b> Dawling ve Wald'in şeması .....	23
<b>Şekil 12.</b> Retinolden retinoik asit oksidasyon metabolizması .....	23
<b>Şekil 13.</b> Nöral dokular gelişirken kök hücrelerin yerleşimi.....	32
<b>Şekil 14.</b> Vajinal sürüntü bulguları.....	49
<b>Şekil 15.</b> Çiftleşme sonrası alınan vajinal sürüntü .....	50
<b>Şekil 16.</b> K1 grubu embriyoları .....	51
<b>Şekil 17.</b> D1 grubu embriyoları. ....	52
<b>Şekil 18. A,B,C,D.</b> K1 ve D1 grubu değerlendirme alanları.....	53
<b>Şekil 19.</b> K1 grubu CD44 boyama.....	54
<b>Şekil 20.</b> K1 grubu CD56 boyama.....	55
<b>Şekil 21.</b> K1 grubu CD73 boyama.....	56
<b>Şekil 22.</b> K1 grubu CD90 boyama.....	57
<b>Şekil 23.</b> K1 grubu CD105 boyama.....	58
<b>Şekil 24.</b> K1 grubu CD271 boyama.....	59
<b>Şekil 25.</b> K1 grubu CD14 boyama.....	60
<b>Şekil 26.</b> K1 grubu CD45 boyama.....	61
<b>Şekil 27.</b> D1 grubu CD44 boyama.....	62
<b>Şekil 28.</b> D1 grubu CD56 boyama.....	63
<b>Şekil 29.</b> D1 grubu CD73 boyama.....	64

<b>Şekil 30.</b> D1 grubu CD90 boyama.....	65
<b>Şekil 31.</b> D1 grubu CD105 boyama.....	66
<b>Şekil 32.</b> D1 grubu CD271 boyama.....	67
<b>Şekil 33.</b> D1 grubu CD14 boyama.....	68
<b>Şekil 34.</b> D1 grubu CD45 boyama.....	69
<b>Şekil 35.</b> K2 grubu embriyolar .....	70
<b>Şekil 36.</b> D2 grubu embriyoları .....	71
<b>Şekil 37.</b> K2-D2 değerlendirme alanları.....	72
<b>Şekil 38.</b> K2 grubu CD44 boyama.....	73
<b>Şekil 39.</b> K2 grubu CD56 boyama.....	74
<b>Şekil 40.</b> K2 grubu CD73 boyama.....	75
<b>Şekil 41.</b> K2 grubu CD90 boyama.....	76
<b>Şekil 42.</b> K2 grubu CD105 boyama.....	77
<b>Şekil 43.</b> K2 grubu CD271 boyama.....	78
<b>Şekil 44.</b> K2 grubu CD14 boyama.....	79
<b>Şekil 45.</b> K2 grubu CD45 boyama.....	80
<b>Şekil 46.</b> D2 grubu CD44 boyama.....	81
<b>Şekil 47.</b> D2 grubu CD56 boyama.....	82
<b>Şekil 48.</b> D2 grubu CD73 boyama.....	83
<b>Şekil 49.</b> D2 grubu CD90 boyama.....	84
<b>Şekil 50.</b> D2 grubu CD105 boyama.....	85
<b>Şekil 51.</b> D2 grubu CD271 boyama.....	86
<b>Şekil 52.</b> D2 grubu CD14 boyama.....	87
<b>Şekil 53.</b> D2 grubu CD45 boyama.....	88



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.</b> Carnegie aşamaları .....	5
<b>Çizelge 2.</b> Grupların belirlenmesi.....	42
<b>Çizelge 3.</b> Çalışmada kullanılan antikolar, markaları ve antijen geri dönüşümünde kullanılan tamponlar. ....	47
<b>Çizelge 4.</b> Verilen retinoik asitin, uygulandığı tarih, gebeliğin günü, denemede kullanılan miktarları ve bunlara bağlı rezorbe embriyo sayısı. ....	48
<b>Çizelge 5.</b> K1-D1 gruplarının, CD44 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu .....	89
<b>Çizelge 6.</b> K2-D2 gruplarının, CD44 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu .....	89
<b>Çizelge 7.</b> K1-D1 gruplarının, CD56 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu. ....	90
<b>Çizelge 8.</b> K2-D2 gruplarının, CD56 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu .....	90
<b>Çizelge 9.</b> K1-D1 gruplarının, CD73 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu .....	91
<b>Çizelge 10.</b> K2-D2 gruplarının, CD73 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu. ....	91
<b>Çizelge 11.</b> K1-D1 gruplarının, CD90 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu. ....	92
<b>Çizelge 12.</b> K2-D2 gruplarının, CD90 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu .....	92
<b>Çizelge 13.</b> K1-D1 gruplarının, CD105 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu. ....	93
<b>Çizelge 14.</b> K2-D2 gruplarının, CD105 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu .....	93
<b>Çizelge 15.</b> K1-D1 gruplarının, CD271 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu. ....	94
<b>Çizelge 16.</b> K2-D2 gruplarının, CD271 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu. ....	94
<b>Çizelge 17.</b> K1-D1 gruplarının, CD14 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu. ....	95

<b>Çizelge 18.</b> K2-D2 gruplarının, CD14 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu .....	95
<b>Çizelge 19.</b> K1-D1 gruplarının, CD45 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu. ....	96
<b>Çizelge 20.</b> K2-D2 gruplarının, CD45 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu. ....	96

## KISALTMALAR DİZİNİ

<b>CD</b>	Cluster of Differentiation
<b>SHH</b>	Sonic Hedgehog
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming Growth Factor
<b>BMP</b>	Bone Morphogenic Protein
<b>FGF</b>	Fibroblast Growth Factor
<b>HOX</b>	Home Box
<b>PCP</b>	Planar Cell Polarity
<b>ADH</b>	Alkol Dehidrogenazlar
<b>RDH</b>	Retinol Dehidrogenazlar
<b>AtRA</b>	All Trans Retinoik Asit
<b>RALDH</b>	Aldehit Dehidrogenaz
<b>RBP</b>	Retinol Binding Protein
<b>RAR/RXR</b>	Retinoik Asit Reseptörü
<b>RARE</b>	Retinoik Asit Response Element
<b>CoRep</b>	Koreseptör Komplain
<b>Nav</b>	Nöron Navigatör
<b>CD105</b>	Endoglin
<b>CD 73</b>	Ekto 5' nukleotidas
<b>CD90</b>	Thy-1
<b>CD271 (P75,NGF)</b>	Nervous Growth Factor
<b>CD56 (NCAM)</b>	Neural Cell Adhesion Molecule
<b>TNFR (p75NTR)</b>	Tümör Nekroz Faktör
<b>BDNF</b>	Brain Derived Neurotrofik Faktör
<b>NT</b>	Nörotrofin
<b>AGM</b>	Aort-Gonad-Mezonefroz
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor

## 1. GİRİŞ

Nörülasyon ismi de verilen nöral tüp oluşum süreci insanda fertilizasyonun yaklaşık 17.gününde (3.haftanın başı), farede 8. gününde ve ratlarda 8,5. gününde gelişmeye başlar (O'Rahilly ve Müller F., 1987; Sadler T.W., 1998; Padmanabhan R., 2006; Au K.S., ve ark 2010). Notokordun ve prekordal mezodermin ortaya çıkmasıyla bu yapıların üzerini kaplayan ekdoderm kalınlaşır ve böylece nöral plak oluşur. Nöral katlantıların arasında kalan çukur, nörülasyon sürecinin devamında nöral oluğu meydana getirir. Nöroporların kapanmasıyla nörülasyon tamamlanmış olur. Merkezi sinir sistemi, beyin keseciklerinin bulunduğu geniş bir sefalik parça ve dar bir kaudal parça olan spinal korddan meydana gelir (Carlson B.M., 2009). Nörülasyon gerçekleşirken, ekstraselüler matriks elemanları, farklı gen bölgeleri önemli rol oynarlar. Bunlar kraniokaudal eksenin organizasyonunda ve segmentasyonunda önemlidir. Aynı zamanda çeşitli gen bölgelerinin ekspresyonunu düzenlemede rol oynar (Copp A.J., ve ark 2003 (a); Wallingford J.B., 2005; Au K.S., ve ark 2010).

Nöral tüpün kapanmaması ile oluşan anomaliler, nöral tüp defektleri olarak ifade edilmektedir. Nöral tüp defekti oluşumu, nöral tüpün gelişmeye başladığı andan itibaren pek çok mekanizma ve gen bölgesinin işleyiş bozukluğuna bağlı olabilir. Nöral tüp defektlerinin oluşumunda genetik ve çevresel faktörler etkindir (Au K.S., ve ark 2010). Yapılan son çalışmalarda dünya genelinde %6,42 oranında görüldüğü belirlenmiştir (Li Z. ve ark 2006; Au K.S., 2010; Yu M. ve ark 2015). Ülkemizde ise yetersiz veriler olmasına rağmen nöral tüp defekti sıklığı yaklaşık % 0.15-0.63 arasında değişmektedir (Yeşilipek M.A., ve ark 1989; Güvenc H., ve ark 1993; Tunçbilek E., 2004). İnsanlarda meydana gelen nöral tüp defektini anlamak için genellikle deney hayvanlarına teratojen ajan verilerek gerekli bilgiler toplanır. Bilinen en iyi teratojen maddelerden biri retinoik asittir (Moise A.R., ve ark 2007). Deneysel nöral tüp defekti oluşturmak için kullanılan retinoik asit embriyonun gelişimi sırasında çok önemlidir. Fazlalığı veya azlığı ciddi defektlere neden olur (Maden M., ve ark 1996; Clagett-Dame M. ve DeLuca H.F., 2002). Nöral tüp defektleri oluşurken, pek çok gen bölgesinin çalışmasını bozarak hücre içi işleyiş mekanizması etkilenmektedir. Yapılan çalışmalarda aşırı retinoik asit verilerek oluşturulan deneysel nöral tüp defektlerinde kök hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve metabolizması etkilenmektedir (Sulik K.K. ve Dehart D.B. 1988). Bunun yanında nöroepitelde bulunan kök hücrelerin aktiviteleri bozulur, embriyonun

gelişim döneminde aksiyal rotasyon gibi anomaliler meydana gelir (Rogers J.M., ve ark. 1985; Wei X., ve ark. 2012). Ayrıca retinoik asit verilerek oluşturulan deneysel nöral tüp defektlerinde vasküler akış bozulur, yeni damar oluşum mekanizmaları etkilenecek defekt oluşumuna neden olur (Oikawa T., ve ark. 1989; Lai L., ve ark. 2003).

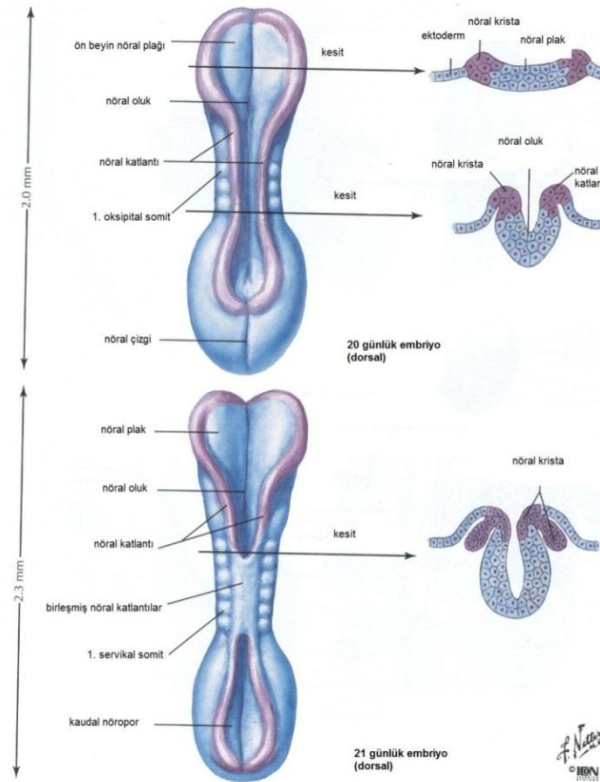
Kök hücreler, uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneğinde olan, özelleşmemiş, farklı hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğinde ve hasarlı dokularda dokunun işlevini kazanmasını sağlayan hücrelerdir. Kök hücreler erken embriyoner dönemden itibaren embriyoda yaygın şekilde bulunur ve ilerleyen dönemlerde farklılaşır. (Kalyani A., ve ark. 1997; Kalyani A., ve ark. 1998). Günümüzde üzerinde çok çalışılan yetişkin kök hücre tipleri hemopoetik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler, nöral kök hücreler, bağırsak kök hücreleri ve endotel kök hücreleridir (Temple S., 2001; Can A., 2014). Arnold Caplan 1991 yılında bu hücre serilerinde ‘mezenkimal kök hücre’ ve buna benzeyen başka bir kök hücre hattı olan ‘hemopoetik kök hücre’ tanımını ortaya koyarak sınıflandırma yapmıştır. Kök hücreler hücre yüzeylerinde bulunan CD (cluster of differentiation) türlerine göre sınıflandırılır. Mezenkimal kök hücrelerin özgün yüzey belirteçleri CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD271 olarak belirtilmektedir. Hemopoetik hücrelerin özgün yüzey belirteçlerinden bazıları ise CD14 (Dominici M., ve ark. 2006) ve CD45’tir (Sally A. ve Jones B., 2012).

Bu çalışmada sıçanlara 40 mg/kg all-trans retinoik asit uygulanarak nöral tüp defekti oluşturulmuştur. Sıçanların embriyoner dönem (E10,5) ve fetal dönem (E15,5) deney (D1-D2) ve kontrol (K1-K2) gruplarına histokimyasal ve immünohistokimyasal yöntemler uygulanmıştır. Toplanan embriyolara, mezenkimal kök hücreleri belirlemek amacıyla CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD271 ve hemopoetik kök hücreleri belirlemek için ise CD14 ve CD45 belirteçleri uygulanmıştır. Seçilen mezenkimal ve hemopoetik kök hücre belirteçlerinin normal ve nöral tüp defektli gruplarda embriyoner ve fetal dönemde ne şekilde değiştiğini ifade eden çalışmalar yetersizdir. Buradan hareketle, mezenkimal ve hemopoetik kök hücre belirteçlerinden faydalanarak nöral tüpün normal gelişim ve defekt oluşum sürecindeki dağılımlarını belirlemek amaçlanmıştır. Böylece, kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşma mekanizmalarının tespit edilmesi beraberinde defekt patogenezinin ortaya çıkarılmasında fayda sağlayacağı düşünülmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Nöral Tüp Gelişimi

Nöral tüp, beyinden başlayıp, omuriliği de içine alacak şekilde aşağı doğru uzanan yapıdır. Bu yapı, fertilizasyonun yaklaşık 17.gününde (3.haftanın başı) gelişmeye başlar (Sadler T.W.,1998; Padmanabhan R., 2006; Au K.S., ve ark 2010). Bu haftanın başında ektodermal germ yaprağı sefalik bölgede geniş, kaudalde daha dar yassı bir disk biçimindedir. Notokordun ve prekordal mezodermin ortaya çıkmasıyla bu yapıların üzerini kaplayan ektoderm kalınlaşır ve böylece nöral plak oluşur. Nöral plak oluşumunda, ektoderm kaynaklı E-kaderin ve nöral plak kaynaklı N-CAM gibi hücre adezyon moleküllerinin ekspresyonu önemlidir (Şekil 1-2) (Carlson B.M., 2009; Au K.S., ve ark 2010).



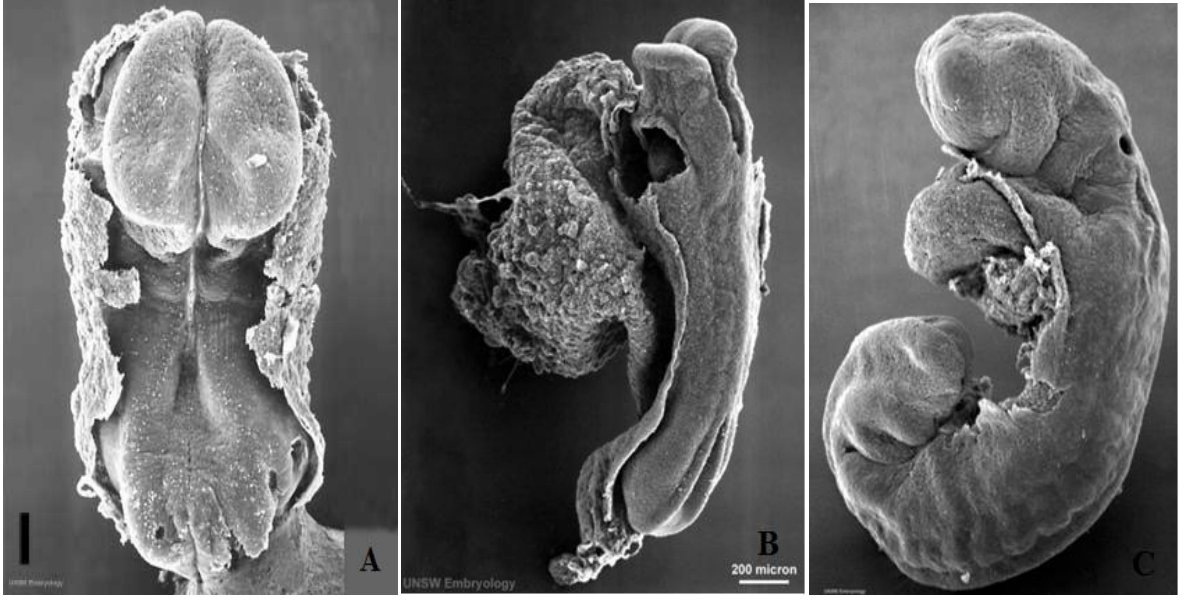
**Şekil 1.**Nöralasyon, 20. ve 21.günde nöral tüp oluşumunun şematize edilmiş görüntüsü (Cochard L.R., 2002).

Vertebralı gelişimsel embriyolojisini, insan ve diğer türlerle karşılaştırmak amacıyla, 23 aşamayla standardize edilen ve Carnegie evreleri adı verilen kronolojik tablodan yararlanılmaktadır. İlk olarak 1942'de Streeter daha sonra ise O'Rahilly ve Müller'in 1987'de yaptıkları çalışmalarla, Washington Carnegie Enstitüsü'nde biraraya getirildiği için aynı adlı enstitünün ismini almıştır. Bu aşamalar, Çizelge 1'de özetlenmiştir. Carnegie aşamalarına göre, sıçan ve farelerde nörolasyon yaklaşık olarak 7,5. günde başlar 11,5. günde sonlanır (Streeter G.L., 1942; O'Rahilly R. ve Müller F., 1986).

**Çizelge 1.** Carnegie aşamaları (O’Rahilly R. ve Müller F., 1986)

Türler	Stage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<b><u>İnsan</u></b>	günler	<u>1</u>	<u>2-3</u>	<u>4-5</u>	<u>5-6</u>	<u>7-12</u>	<u>13-15</u>	<u>15-17</u>	<u>17-19</u>	<u>20</u>	<u>22</u>	<u>24</u>	<u>28</u>	<u>30</u>	<u>33</u>	<u>36</u>	<u>40</u>	<u>42</u>	<u>44</u>	<u>48</u>	<u>52</u>	<u>54</u>	<u>55</u>	<u>58</u>
<b>Fare</b>	günler	1	2	3	<u>4</u>	5	6	7	8	<b>9.0</b>	<u>9.5</u>	<u>E10</u>	<u>10.5</u>	<u>11</u>	<u>11.5</u>	<u>12</u>	<u>12.5</u>	<u>13</u>	<u>13.5</u>	<u>E14</u>	<u>14.5</u>	<u>15</u>	<u>15.5</u>	<u>16</u>
<b>Sıçan</b>	günler	1	3.5	4-5	5	6	7.5	8.5	9	10.5	11	11.5	12	12.5	13	13.5	14	14.5	15	15.5	16	16.5	17	17.5





**Şekil 2.** Nöral tüp kapanma süreci SEM mikroskop görüntüsü. A) Carnegie safha 9 olarak ifade edilen görüntü ratlarda 10,5.güne karşılık gelmektedir. Nöral tüpün kapanmaya başladığı, kranial ve kaudal nöroporların açık olduğu izlenmektedir B) Carnegie safha 10 olarak ifade edilen görüntü, ratlarda 11.güne karşılık gelmektedir. Nöral tüp kapanmaya başlamış ancak kranial ve kaudal nöroporlar açıktır. C) Carnegie safha 11 olarak ifade edilen görüntü, ratlarda 11,5.güne karşılık gelmektedir. Nöral tüp dorsalde kapanmış, embriyo kıvrılmaya başlamış, kranial nöropor kapanmış ancak kaudal nöropor tam olarak kapanmamıştır.

([http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Carnegie\\_stage\\_9-10-11](http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Carnegie_stage_9-10-11)).

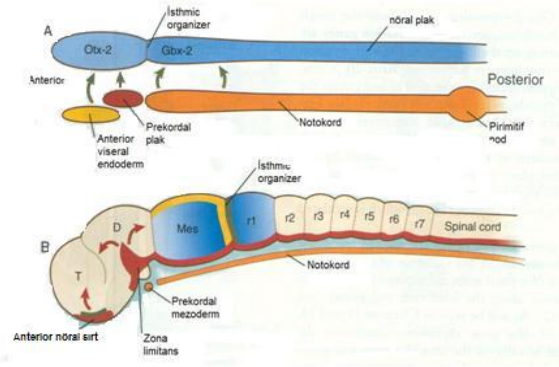
Ekstraselüler matriks, özellikle nöral katlantılar oluşurken sürecin devamı için önemlidir. Matrikste nöral tüpün oluşumu için gerekli sinyallerde meydana gelen bozuklukların anensefali, spina bifida gibi nöral tüp defektlerine neden olduğu bildirilmiştir. (Morris-Kay G.M., 1982).

Başlangıçta matriks hiyalüronik asitçe zenginken, ilerleyen dönemde kondroitin sülfat ve diğer maddeler artmaya başlar. Plağın hücreleri nöroektodermi oluşturur ve bu hücrelerin indüksiyonu nörolasyon sürecinin başlangıcını temsil eder (Carlson B.M., 2009).

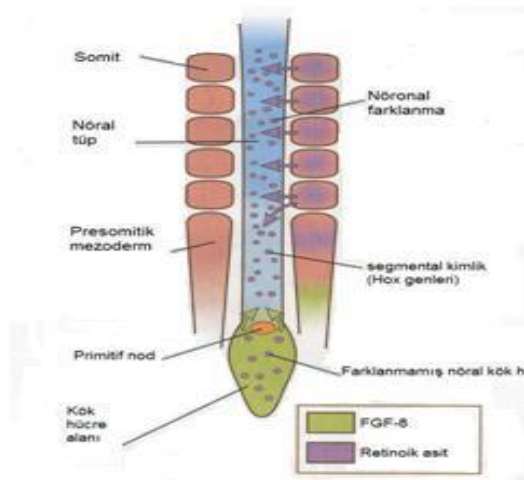
Nöral katlantıların arasında kalan çukur, nörolasyon sürecinin devamında nöral oluşu meydana getirir. Nöral katlantılar zamanla orta hat boyunca birbirlerine doğru yaklaşır ve kaynaşır. Kaynaşma sırasında burada bulunan hücrelerin şekli alçak

kübikten çok katlı yassıya doğru değişir (Wallingford J.B, 2005). Bu sırada SHH ve WNT sinyalleri ile düzlemsel hücre kutuplaşması (planar cell polarity, PCP) adı verilen bir mekanizma ile kaynaşma sırasındaki hücre şekilleri değişir (Copp A.J., ve ark 2003).

Vertebralılarda nöral tüp oluşumunda rol oynayan pek çok gen bölgesi bulunmaktadır (Wallingford J.B., 2005; Au K.S., ve ark 2010). Bu gen bölgelerinden biri transforming büyüme faktörü  $\beta$  dır (TGF- $\beta$ ). TGF- $\beta$  ailesinin üyelerinden biri olan kemik morfogenetik protein 4 (BMP-4), ektoderm ve endodermin ventralizasyonundan sorumludur. Ektoderm ve endoderm ventralizasyonu sırasında, BMP-4 aktivitesi bloke edilir ve fibroblast büyüme faktörü (FGF) aktive olur. FGF sinyalinin aktive olması nöral plağın oluşumunu başlatır ve bu sinyal bir yandan da BMP transkripsiyonunu baskılayan chordin ve noggin ekspresyonunu artırır. Gastrulasyon döneminde, BMP-4 sinyaliyle ektoderm epidermise, mezoderm ise paraksiyal mezoderme dönüşür. BMP; noggin, chordin ve follistatin gibi moleküllerin salgılanmasıyla baskılandığından, ektodermden sinir dokusu şekillenmeye başlar. Noggin, chordin, follistatin primitif düğüm, notokord ve prekordal mezodermdde mevcuttur. Bu proteinler ektodermi nötralize eder, mezodermin de dorsalizasyonunu sağlar (notokord ve paraksiyal mezoderme dönüştürür). Ancak bu proteinler sadece ön beyin ve orta beyin gibi dokuları etkileyebilirler. Arka beyin ve spinal kord gibi kaudal yapıların gelişimi WNT ve FGF gibi proteinlerin salınmasıyla başlar ve bu iki proteinin uyardığı bazı gen bölgeleriyle beraber nöral tüpün segmentasyonu gerçekleşir. Bunlara ek olarak kraniokaudal eksenin organizasyonunda ve segmentasyonunda retinoik asitin (RA) kritik bir rolü vardır. RA aynı zamanda homeobox genlerinin (HOX, PAX, SLUG gibi) ekspresyonunu düzenler (Şekil 3, 4).



**Şekil 3.** Erken embriyoner dönemde sinyal bölgelerinin şematik gösterimi. A) Anterior viseral endodermden (sarı), prekordal plak (kırmızı), notokord (turuncu) ve nöral tüpten FGF8 (yeşil ok) sinyalleri aracılığı ile Otx-2 gelecekte ön ve orta beyin bölgelerini oluşturmak üzere, Gbx-2 ise orta beyin bölgesini oluşturmak üzere eksprese edilir. B) Gelişimin devamında FGF-8 (yeşil oklar) ve Wnt-1 (sarı) sinyalleri ile En-1 ve En-2 (Engrailed 1,2) (mavi) azalan miktarda salınarak istmik bölge organizasyonu şekillenir. Diğer organizmer alan anterior nöral sırttır. Buradan salınan Sonic Hedgehog (SHH) (kırmızı) ve FGF-8 (yeşil) alanlarla nöral tüpten salınan SHH ile zona limitans ve ventral bölüm şekillenir (Carlson B.M., 2009).

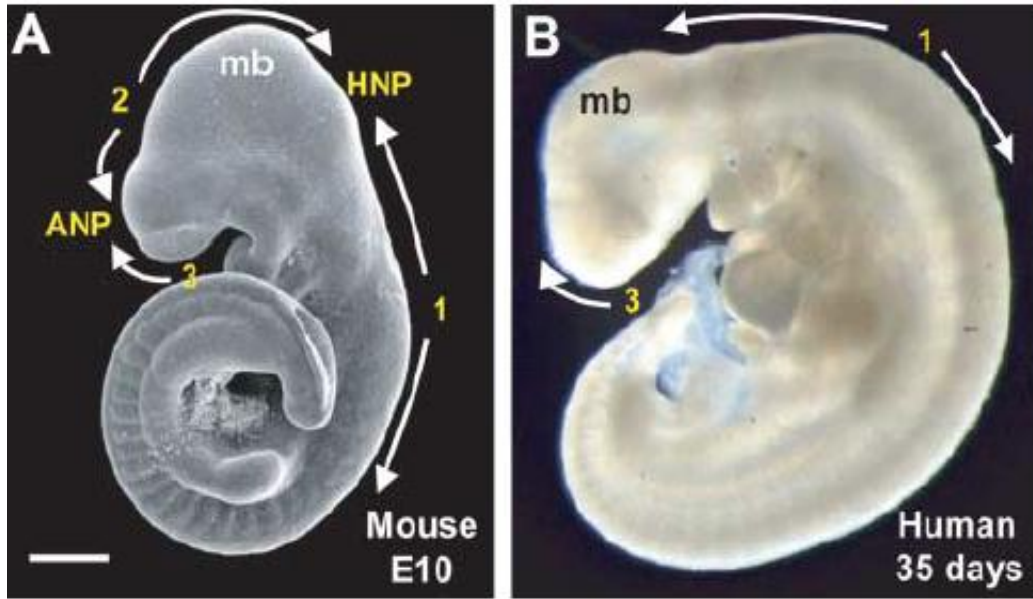


**Şekil 4.** Erken embriyoner dönemde nöral tüpün uzaması. Presomit paraksiyal mezodermden FGF-8 salınımıyla hücreler daha posterior alandan proliferasyona devam eder, yeni oluşan somitlerden retinoik asit salınarak nöronal farklanmayı uyarır (Carlson B.M., 2009).

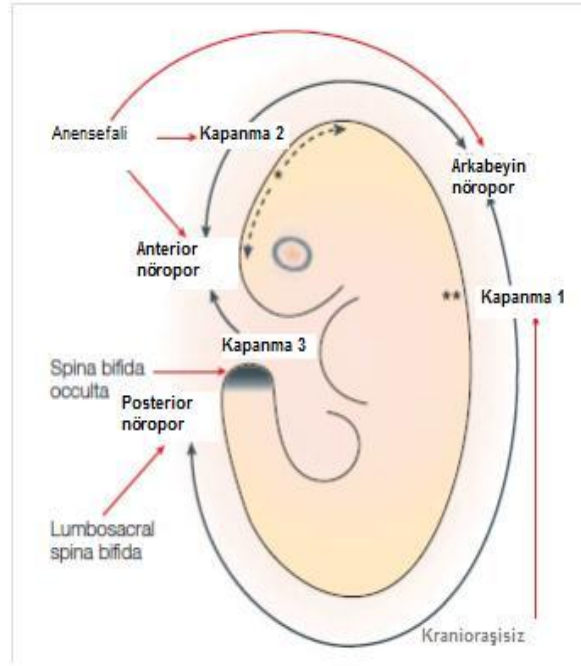
Yapılan son çalışmalara göre nöral tüpün kapanması embriyonun dorsal sınırı boyunca birkaç bölgede olabilir (O’Rahilly R. ve Müller F., 2002; Copp A.J., 2005;

Padmanabhan R., 2006). Kaynaşma servikal bölgede beşinci somit hizasından başlar, kranial ve kaudal yönlerde devam eder. Sonuçta nöral tüp oluşur (Şekil 2). Bu durum türlere göre değişkenlik göstermektedir. O’Rahilly ve Müller’in 2002 yılında yaptığı çalışmaya göre insan embriyolarında iki bölgeden, yaklaşık 25. günde kranial nöropor, 27. günde kaudal nöropor kapanır. Buna karşılık fare ve ratlarda 3 bölgede kapanma gerçekleşmektedir (Şekil 5-6) (Copp A.J., 2005; Padmanabhan R., 2006).

Nöroporların kapanmasıyla nörolasyon tamamlanmış olur. Bu aşamadan sonra merkezi sinir sistemi beyin keseciklerinin bulunduğu geniş bir sefalik parça ve dar bir kaudal parça olan spinal korddan ibarettir (Carlson B.M., 2009).



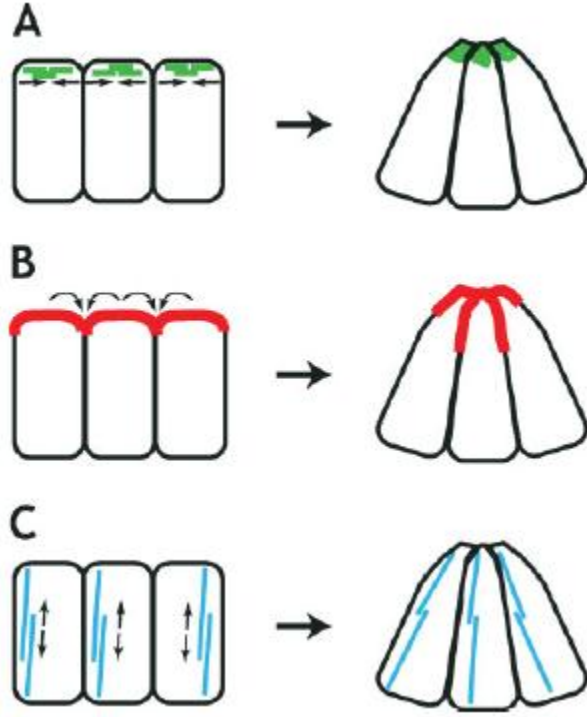
**Şekil 5.** Fare (10. gün), insan (35. gün) de nörolasyon. A) Fare embriyosunda 3 temel kapanma bölgesi olduğu görülmektedir. B) İnsan embriyosunda 1 ve 3 numaralarla gösterilen iki kapanma bölgesi görülmektedir (Van Straaten H.W.M. Copp A.J. 2001; Padmanabhan R., 2006).



**Şekil 6.** Fare embriyosunda rostrokaudal nöral tüp kapanma bölgeleri. Embriyonun 8,5. gününde 6-7 somitlik evrede orta beyin/servikal sınırda 1. kapanma bölgesi, ön beyin ile orta beyin sınırında 2. kapanma bölgesi ve ön beyin bölgesinde ise 3. kapanma bölgesi bulunmaktadır. 2. ve 3. kapanma bölgeleri birleştiğinde anterior veya rostral bölüm tamamlanmış olur. Daha sonra 2. ve 1., en sonunda da 1. kapanma bölgeleri ile birleşerek kaudalde 36 saat içinde kapanma tamamlanır (Copp A.J., ve ark 2003 (b)).

Nörülasyon sürecinde ve nöral tüp oluşumunda bazı temel olaylar etkin rol oynar (Copp A.J., 2005). Bu olayları aşağıdaki gibi özetleyebiliriz;

**1) Aktin Mikrofilamanlar:** Aktin mikrofilamanlar kapanma bölgesi hücrelerinde bükülerek nöral tüpün kapanmasını sağlar (Wallingford J.B., 2005). Yapılan bazı çalışmalarda nöral tüpte bulunan hücrelerin sitoskelet yapısında (özellikle aktin mikrofilaman) bozulmayla beraber nöral tüp defektine yol açtığı rapor edilmiştir (Smedley M.J.ve Stanisstreet M., 1986). Aktin molekülü ile ilgili shroaom, mena, rho GAP gibi birçok gen bölgesinin etkin olduğu bulunmuştur. Bu gen bölgelerinde meydana gelebilecek bozukluğun, aktin molekülünün yapısının bozulmasına neden olacağı ifade edilmektedir (Wallingford J.B., 2005) (Şekil 7- 8).



**Şekil 7.** Nöroepitelde bulunan hücrelerin sitoplazmasında bulunan kasılabilir elemanların kapanmaya etkisi gösterilmiştir. A ve B'de apikal yüzeyde bulunan kasılabilir elemanların büzülmeyle, C'de ise hücrenin boyuna uzanan kasılabilir elemanların kapanmaya etkisi gösterilmektedir (Wallingford J.B., 2005).

**2) Nöral Krista Hücreleri ve Göçü:** Nöral katlantılar birbirlerine doğru yaklaşırken, nöroektodermin lateral sınırı veya sırtında yer alan hücreler komşularından uzaklaşmaya başlarlar. Nöral krista olarak bilinen bu hücreler aktif göçle nöroektodermden ayrılıp altlarındaki mezodermin içine doğru göç ederlerken epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal hücrelere dönüşürler. Nöroektoderm gövdesinde bulunan bu hücreler, kapanmanın ardından iki yoldan birini izleyerek göç ederler;

- Dermis içinden geçen dorsal yolu izleyerek ektoderme bazal lamina içinden geçer ve deri ve kıl folliküllerindeki melanositleri oluştururlar.
- Her somitin önünden geçerek ventral yolu izlerler, böylece duyu gangliyonlarını, sempatik ve enterik nöronları, Schwann hücrelerini ve adrenal medulla hücrelerini oluştururlar.

Nöral krista hücreleri aynı zamanda, nöral tüp kapanmadan önce kranial nöral katlantılardan da göç ederler. Bu hücreler baş ve yüz kemiklerinin kranial gangliyon nöronlarının, glial hücrelerin, melanositlerin ve diğer hücre tiplerinin oluşumuna katılırlar. Nöral krista hücreleri nöral plakla yüzey ektodermi (epidermis) sınırında

gerçekleşecek karşılıklı bir etkileşim olmadan harekete geçemezler. Noggin ve chordin, BMP düzeyini kontrol ederler. Orta düzeydeki BMP konsantrasyonu FGF ve WNT proteinleriyle birlikte PAX3 ve diğer transkripsiyon faktörlerini harekete geçirerek nöral plağın sınırını belirler. Buna karşılık aynı faktörler nöral krista hücrelerine kimliğini veren FOXD3, nöral krista hücrelerinin ektodermden ayrılmasını sağlayan SLUG gibi ikinci dalga transkripsiyon faktörlerini harekete geçirir. Tüm ektoderm tabakasının düzenlenimi BMP'ye bağlıdır. BMP aynı zamanda nöral krista hücrelerinin göçünü, çoğalmasını ve farklanmasını düzenlemektedir (Sadler T.W., 2006).

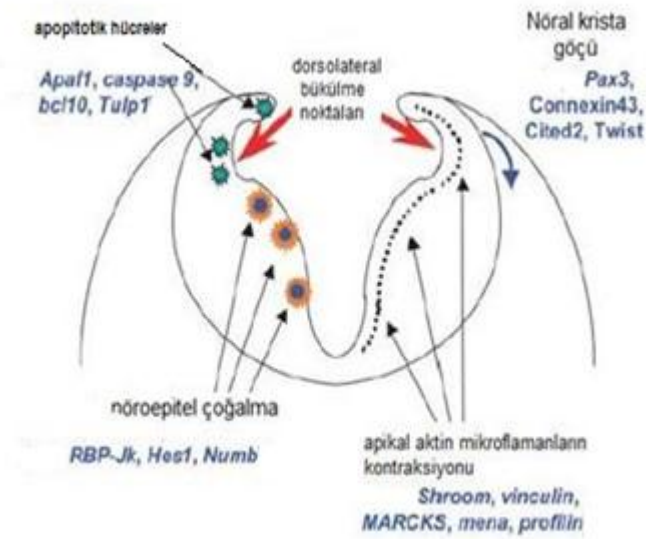
Beyin ve omurga gelişimiyle ilgili nöral krista hücreleri farklı özelliklere sahiptir. Orta ve arka beyinde nöral krista kök hücreleri nöral katlantının tepesinden ayrılmaya başlar ve nöral tüpün kapanma bölgesine göç eder (Morriss-Kay G. ve Tan S.S., 1987). Buna zıt olarak spinal alanda nöral krista hücreleri, nöral tüpün kapanmasından saatler sonra göç etmeye başlarlar. Kranial nöral krista hücrelerinin nasıl göç ettiği, nöral katlantıların dorsolateral kısımlarını nasıl şekillendirdiği tam olarak anlaşılamamıştır (Erickson C.A. ve Weston J.A., 1983). Yapılan araştırmalarda, özellikle kranial alanda nöral tüp kapanmasının önemli olduğu, Cited2, Pax3 (splotch), twist genlerinin kapanmayı kontrol ettiği ortaya konmuştur (Şekil 8). Çalışmalarda farede bu gen bölgelerinin kapatılması kranial nöral krista hücre defekti ve anensefaliye neden olmuştur (Copp A.J., ve ark 2003 (b)). Kranial bölgede, nöral krista hücrelerinin yolundan saparak nöral krista hücre yoğunluğunda da azalmaya neden olması ve nöroepitelin mekanik esnekliğinin azalmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Copp A.J., 2005).

**3) Hücre Çoğalması ve Farklanmasındaki Denge:** Nörülasyonda hücreler proliferatiftir. Nörülasyon tamamlandıktan sonra farklanma sürecine girerler. Notch sinyallerinin bu dönüşümde önemli olduğu ortaya konmuştur. Bunun yanı sıra, RBP-Jk, Hes 1 ve Nmb gibi gen bölgelerinin farklanmada önemi belirlenmiştir (Zhong W.M., ve ark 2000). Hücre farklanması erken dönemde olursa, nöral tüpün mekanik olarak bükülmesi engellenmiş olur. Böylece defektlere yol açar. Yapılan bir çalışmada, aşırı Notch3 ekspresyonunun, aşırı hücre çoğalmasına yol açarak kranial nöral tüp defektine neden olduğu gösterilmiştir (Lardelli M., ve ark 1996).

**4) Nöroepitelde Apoptoz:** Nöroepitelde ölen hücrelerin varlığının apoptoz ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Lawson A. ve ark 1999). Apaf-1, Casp9, p53 gibi bazı gen bölgeleri kapatıldığında apoptozun engellendiği ve eksensefali olduğu görülmüştür.

Buna karşılık Ap-2, apoB, bcl10, mdm4 gibi gen bölgeleri kapatıldığında kranialde, nöral katlantı bölgesinde apoptotik hücrelerin arttığı belirlenmiştir. Apoptotik hücrelerin artması ya da azalması durumu ensefalosele yol açmaktadır (Harris B.S., ve ark 1997).

Apoptotik hücreler, kranial bölgede, nöral katlantıların dorsolateralinde ve tepesinde yer alır. Dorsolateral bölgedeki hücre ölümü, nöral krista hücrelerinin göçü ile ilişkilidir. Bu ilişki nöral katlantıların bikonveksten bikonkava dönüşümüne izin verir. Nöral katlantıdaki apoptozdan sonra hücreler arası bağlantılar kurulur ve yapışma gerçekleşir (Şekil 8) (Weil M., ve ark 1997).



**Şekil 8.** Nöral tüpün kapanmasında apoptotik hücrelerin, nöral krista hücrelerinin, nöroepitel hücrelerinin, aktin filamanların görevi ve bunlarla ilişkili moleküller özetlenmiştir (Copp A.J., ve ark 2003 (a, b)).

Nöral tüp kapandıktan sonra ileri farklılaşma için ektoderm, endoderm ve mezodermin çeşitli yapılara dönüşmesi gerekmektedir. Başlangıçta düz ve yassı olan embriyonik disk, organ sistemlerin oluşumu ve merkezi sinir sisteminin hızla büyümesiyle sefalokaudal yönde hızla kıvrılır. Böylece baş ve kuyruk katlantıları oluşur. Bu kıvrılma gerçekleşirken, embriyonun transvers yönde de (lateral katlantılar) katlanmasıyla embriyonun bedeni kabaca silindirik bir görünüm alır (Carlson B.M., 2009).



## **2.2. Nöral Tüp Defektleri**

Embriyo şekillenirken pek çok mekanizma rol oynamaktadır. Nöral tüpün kapanmaması ile oluşan anomaliler nöral tüp defektleri olarak ifade edilmektedir. Nöral tüp defekti oluşumu nöral tüpün gelişmeye başladığı andan itibaren pek çok mekanizma ve gen bölgesinin işleyiş bozukluğuna bağlı olabilir. Nöral tüpün kranial bölgede kapanamaması durumunda beynin önemli bölümü oluşamaz. Bu tip defekte anensefali, tüpün kaudalinde bir yerde kapanamaması sonucunda oluşan defekte spina bifida denir. Spina bifidanın en sık görüldüğü alanın lumbosakral bölge olması bu bölgedeki kapanma sürecinin genetik ve/veya çevresel faktörlere karşı en duyarlı bölge olduğunu gösterir.

### **2.2.1. Nöral Tüp Defektlerinin Çeşitleri**

Temelde anensefali ve spina bifida olmak üzere iki çeşit nöral tüp defekti tanımlansa da çok sayıda alt tipi bulunmaktadır (Au K.S., ve ark 2010) (Şekil 9).

#### **2.2.1.1. Anensefali ve eksensefali**

Beyin bölgesini oluşturacak olan nöral katlantıların açık kalması, kranial nöral tüpün kapanmaması, beyin dokusunun dış ortamla temas halinde olması ile oluşan defektir (Şekil 9, 1a). Büyüme ve farklılaşma sürecinin devamında nöroepitel, gelişen beyin bölgesinde dışarıya doğru çıkıntı yapmış şekilde görülür (Şekil 9, 1b). Anensefali nöral tüp defektlerinin en sık görüleni (1/1000) ve en ağır tipidir. Genellikle öldürücüdür (%80). Kızlarda daha sık görülür (kız/erkek 4/1dir). Anensefali olarak adlandırılan defekte kemik doku oluşmamıştır. Kraniumun oluşmamasına akrani veya eksensefali denir. Nöral dokular ise dejenerasyon nedeniyle gelişmemiştir (Şekil 9, 1c). İnsanda anensefali beynin rostral bölgesinde (meroacrania), posterior bölgesinde (holoacrania) olmak üzere alt gruplara ayrılabilir (Seller M.J., 1995). Farelerde benzer şekilde ön beyin, orta beyin, arka beyin ve bu alanlara bağlı bölgeler etkilenir (Copp A.J. ve Greene N.D., 2013).

#### **2.2.1.1.a. Ensefalosel**

Kranial nöral tüpün kapanmasındaki bozukluktur. En az görülen nöral tüp defektidir. Kranial mezodermden kaynaklanır. Kafatası oksipital ve paryetal kısımları veya frontomedial alanı ekstrakranial içeriğin meninslerden fitikleşmesine yol açacak şekilde açık kalır. Bazı şiddetli durumlarda, beyin dokusu da fitikleşir. Beyin dokusuna

yapılacak patolojik incelemelerde morfolojinin normal olduğu ortaya çıkar (Harding B.N., ve Copp A.J., 2008).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada ensefalosel ile Meckel-Gruber sendromu arasında bir ilişki bulunmuştur. Meckel-Gruber sendromunda, primer silya yapısı ve işlevinde anahtar rol oynayan gen bölgelerinde bozulmalar görülmüştür. Bu durum siliyopati olarak ifade edilir. İnsanda pek çok hastalığın ortaya çıkmasının yanı sıra siliyopati, nöral tüp defektlerine de neden olmaktadır. Siliyopatinin oluşumunu sağlayan gen bölgelerinin, nörolasyon sürecine zarar vermesiyle ensefalosel olduğu söylenebilir (Logan C.V., ve ark 2010). Spinal meningosel ensefalosel oluşumundan sorumludur ve tamamen meningeal dokuları da içeren iskelet açıklığı (vertebral kolonda) fitiklaşmasıdır. Meningoselin etyolojisi ve patogenezi ensefaloselden daha az bilinir. Hayvan modelleri bu defektin anlaşılmasında avantaj sağlar (Logan C.V., ve ark 2010).

#### **2.2.1.1.b. İniensefali**

Nadir görülen bir defektir. Servikal ve üst torakal omurgada açıklık vardır. Bifid nöral arklar, iskeletin geriye doğru bükülmesi ve ekstremitelerin kısa olması karakteristiktir. Oksipital ensefalosel ile birlikte görülür. Bu hastalığın nörolasyon sırasında mı yoksa sonradan servikal iskelet oluşum sürecinde mi ortaya çıktığına karar vermek için çok az bulgu vardır (Erdinçler P., ve ark 1998).

#### **2.2.1.2. Spina Bifida**

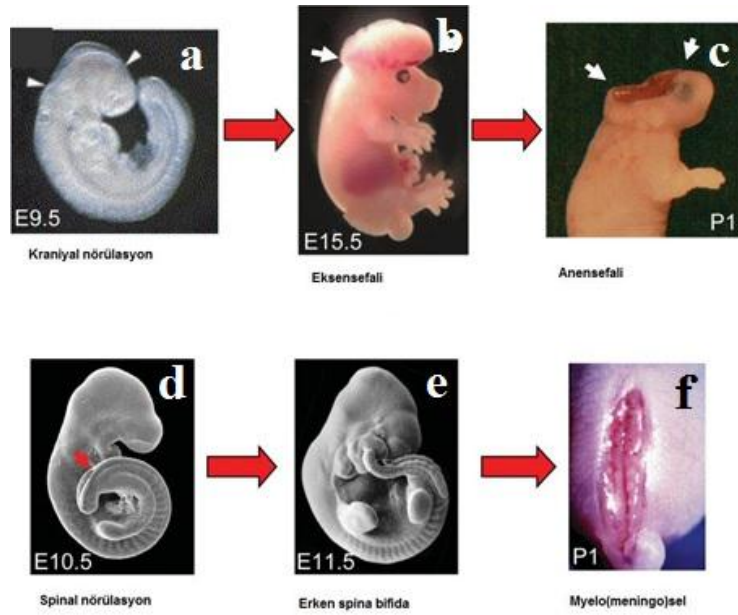
##### **2.2.1.2.a. Kranioraşisiz**

Kranial ve spinal nöral tüpün ayrı ayrı lezyonlarıdır. Nöral tüp defektlerinin yaklaşık %10 una karşılık gelir. Orta beyinden alt spinal bölgeye kadar kalan açık nöral tüpü ifade eder. Kısa rostrakaudal vücut planı en tipik görüntüsüdür. Düzlemsel hücre kutuplaşması (Planar cell polarity, PCP) ile ilgili sinyaller yoluyla oluşan bu morfojenik olaylar, özellikle **kranioraşisiz** olarak tanımlanır (Copp A.J. ve Greene N.D., 2013)

##### **2.2.1.2.b. Miyelomeningosel (Spina Bifida; Spina Bifida Aperta)**

Spinal nörolasyon vücut eksenini boyunca ciddi hasara uğrarsa spina bifida adı verilen defektle sonuçlanır. Morfolojik görünümü Şekil 9, 1d-f'deki gibidir. Spina bifida okkulta, nöral dokuların veya vertebral patolojilerin açıkta olmadığı bir durumdur, burada spinal kanalda bir genişleme dışında bulgu görülmeyebilir.

**Spina bifida aperta veya sistika** ise; nöral dokuların ve meninklerin bir keseyle çevrili olmasıyla oluşan temel şekildir. Meningosel ve meningomyelosel ultrasound bulgularında ayırt edilmez ancak meningoselde nöral doku direkt amnion sıvı ile ilişkilidir. Nöral dokular meningeal kese içindeyse **miyelomeningosel** tanımı kullanılır. Normal embriyolarda, kapanan nöral tüpün çevresinde kıkırdak ve kemik farklılaşmasının altında vertebral arklar, aksiyal mezodermin sklerotomal bileşenlerinden gelişir. Nöral katlantılar açık kaldığında sklerotom, nöroepiteli karşılayamaz duruma gelir ve iki eşit parçadan oluşan (bifid) yapı ortaya çıkar (Copp A.J. ve Greene N.D., 2013).



**Şekil 9.** Fare embriyosunda a-c: açık kranial defektler, d-f: spinal bölgede nöral tüp defektleri (Copp A.J. ve Greene N.D., 2013).

## **2.2.2. Nöral Tüp Defektlerinin Etyolojisi**

Yıllardır detaylı epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar yapıyor olmasına rağmen nöral tüp defektlerinin tam olarak etyolojisi anlaşılamamıştır. Nöral tüp defektlerinin gelişiminde genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerin de etkili olduğu bilinmektedir (Au K.S., ve ark 2010). Nöral tüp defektlerini etyolojik açıdan izole gelişimsel nöral tüp defekti ve multifaktoriyel nöral tüp defekti olmak üzere iki grupta inceleyebiliriz.

### **2.2.2.1. İzole gelişimsel nöral tüp defekti**

İzole nöral tüp defektlerin multifaktoriyel etyolojiye sahip olduğu bilinmektedir. Multifaktoriyel kalıtım ile geçen hastalıklar, tüm genetik bozukluklar içinde toplumda insidansı ve prevalansı en yüksek olan grubu oluşturur. Multifaktoriyel kalıtım ile geçen hastalıkların iki ya da daha çok sayıda mutant gen ve çevresel faktörlerin birlikte etkileşimi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Çocuklarda konjenital kalp anomalileri, konjenital kalça çıkığı, pilor stenozu, yarı damak-dudak gibi sık görülen izole konjenital malformasyonlar, erişkinlerde ise iskemik kalp hastalıkları, şizofreni, alerjik hastalıklar, hipertansiyon multifaktoriyel kalıtım ile geçen bozukluklara örnektir.

#### **2.2.2.1.a. Çevresel faktörler**

Nöral tüp defekti, coğrafi bölgeye, ebeveynin sosyoekonomik durumuna (eğitim durumu, yaşı, beslenmesi, kullandığı ilaçlar gibi), mevsimsel değişikliklere göre farklı insidans gösterir. Bu durum etyolojik açıdan nöral tüp defektinin çevresel faktörlerden etkilendiğini gösterir. Sosyoekonomik düzeyi düşük olan ve evsiz gebelerde nöral tüp defekti insidansının yüksek olması gebelerin daha yetersiz beslenmelerine bağlanmaktadır (Farley T.F., ve ark 2002; Meyer R.E., ve Siega-Riz A.M., 2002).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada Kaliforniya'da yaşayan düşük eğitim durumlu gebelerin, yüksek eğitim durumlu olan gebelerden daha fazla nöral tüp defekli bebek dünyaya getirdiği bildirilmiştir (Grewal J., ve ark 2008). Bu bulgular annelerin eğitim durumu ile gebelik döneminde haberdar oldukları koruyucu önlemlerden biri olan folik asit kullanımıyla ilgili olabileceği ve böylece nöral tüp defektinin daha az görülmesinin nedeni olacağı düşünülmüştür (Brough L., ve ark 2009).

Nöral tüp defekti ile ilgili risk faktörleri araştırıldığında, anomali sıklığında annenin yaşının etkili olduğu, 19 yaşından az, 40 yaşın üzerindeki gebeliklerde nöral

tüp defekti riskinin arttığı belirlenmiştir (Vieira A.R. ve Taucher S.C., 2005). Gebelik yaşı kadar potansiyel risk oluşturan diğer durum da gebeliğin planlanmasıdır. Planlı gebeliklerde nöral tüp defekti riski daha azdır (Vieira A.R., 2003).

Coğrafik farklılıklar ve etnik kimlik nöral tüp defektlerini etkilemektedir. Amerika'da 2003-2005 yılları arasında yapılan çalışmalarda, nöral tüp defektli doğum oranının beyazlarda yaklaşık 1000 doğumda 2 iken, İspanyollarda 1.96, siyah ırkta ise 1.74 olarak belirlenmiştir (Boulet S.L., ve ark 2009). Nöral tüp defekti görülme sıklığı Kuzey Afrika zencilerinde her 1000 doğumda 1.99 iken bu oran 1000 doğumda 1.74 olan Amerika zencilerinden fazladır (Njamnshi A.K., ve ark 2008).

Yapılan çalışmalarda çalışan gebe bireylerin çalışma koşulları içerisinde kimyasallara maruz kalanlarla nöral tüp defekti arasında bağlantı olduğu gözlenmiştir (Brender J.D. ve Suarez L., 1990). Kaliforniya'da 2002 yılında yayınlanan bir çalışmada, 1989-1991 yıllarını kapsayan dönemde, 538 nöral tüp defektli olgu rapor edilmiştir. Bu kişilerin gebelik döneminde temizlikçilik, çiftçilik gibi kimyasallarla karşı karşıya kalınan mesleklerde çalıştıkları belirtilmiştir (Shaw G.M., ve ark 2002).

#### **2.2.2.1.b. İlaç kullanımı ve nöral tüp defekti**

Gebelikte maternal folik asit eksikliği nöral tüp defekti riskini artırır. Folik asit alımı nöral tüp defekti ile ilişkili önemli bir etyolojik faktördür. Amerika, Hollanda, Norveç, Macaristan, Avustralya gibi çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalar günde 400 µg folik asitin gebelik öncesi dönemde kullanılmaya başlandığında nöral tüp defektini azalttığı gösterilmiştir (Coşar E., ve ark 2009). Annenin hamilelik döneminde aldığı ilaçlar folik asit düzeyini olumsuz yönde etkileyerek nöral tüp defektine neden olur. Folik asit antagonistleri (metotreksate, trimetreksate, trimetoprim) başta olmak üzere (Matok I., ve ark 2009) antimalaryal ilaçlar, antibakteriyal ilaçlar (Crider K.S., ve ark 2009), antikonvülzanlar (fenitonin, valpronik asit, karbamazepin), psikiyatrik ilaçlar (fenotiazin, trisiklik antidepressanlar) antiasitler, safra asidi bağlayıcıları, eritropoetinler, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar gibi birçok ilacın nöral tüp defektinde etkili olduğu bildirilmiştir (Hernandez-Diaz S., ve ark 2001). Özellikle nöral tüp gelişimi sırasında annenin bu ilaçları kullanmasının fetüste nöral tüp defekti riskini artırdığı gözlenmiştir (Schultz A.W., 1999). İlaçlar yanında gebelikte kafein alımı ile ilgili de çalışmalar yapılmış, gebelikte yoğun miktarda kafein alımının özellikle spina bifida gibi nöral tüp defektine yol açtığı belirlenmiştir (Schmidt R.J., ve ark 2009).

### **2.2.2.1.c. Hiperemi ve nöral tüp defekti**

Vücut sıcaklığının 41 °C veya daha yüksek bir değere ulaşmasıyla termoregülatör mekanizmaların bozulmasına hipertermi denilmektedir. Artmış vücut ısısı, hücrelerin çoğalmasını, göçünü, farklanmasını ve apoptozunu etkiler. Gebelerin ilk üç ayında (sinir sistemi gelişimi sırasında) influenza gibi enfeksiyonlardan dolayı hipertermi veya fizyolojik olmayan yüksek sıcaklığa maruz kalmaları durumunda nöral tüp defektleri izlenmiştir (Frey L. ve Hauser W.A., 2003). Yapılan bir çalışmada yüksek ısıya maruz kalmış gebe kadınlar, yüksek ısıya maruz kalmayanlara oranla üç kat fazla nöral tüp defekti riskine sahip olduğu vurgulanmıştır (Moretti M.E., ve ark 2005).

### **2.2.2.1.d. Diabetes mellitus ve nöral tüp defekti**

Çalışmalarda insüline bağlı diyabetli annelerin, diyabet olmayanlara oranla 15 kat fazla anensefali ve spina bifida riski oluşturduğu belirtilmiştir. Nöral tüp defekti oluşmaması için, kan glikoz düzeyinin ayarlanması ve gebeliğe böyle başlanması konusunda çalışmalar yapılmıştır (Frey L. ve Hauser W.A., 2003).

### **2.2.2.1.e. Obezite ve nöral tüp defekti**

Günümüze kadar yapılan çalışmalarda gebelerin kilosu ile nöral tüp defekli bebek sahibi olma riski arasında bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Nöral tüp defekli bebek sahibi olma riskinin 50-59 kg arasındaki kadınlara kıyasla 80-89 kg ağırlığındaki kadınlarda iki kat, 110 kg üstü kadınlarda 4 kat arttığı saptanmıştır (Rasmussen S.A., ve Sterling B.S., 2008).

### **2.2.2.2. Multiple nöral tüp defekti (spesifik bir etyolojiye bağlı ve genelde başka malformasyonlarla birlikte görülenler)**

Nöral tüp defektinin küçük bir grubu ise, kromozom anomalileri ya da tek gen defektlerinden (trizomi 9, 13 ve 18) kaynaklanmakta ve Meckel's sendromu gibi spesifik sendromlara eşlik etmektedir (Trinkle B.M., ve ark 1997; Padmanabhan R., 2006).

### **2.2.3. Nöral Tüp Defekti Epidemiyolojisi Ve İnsidansı**

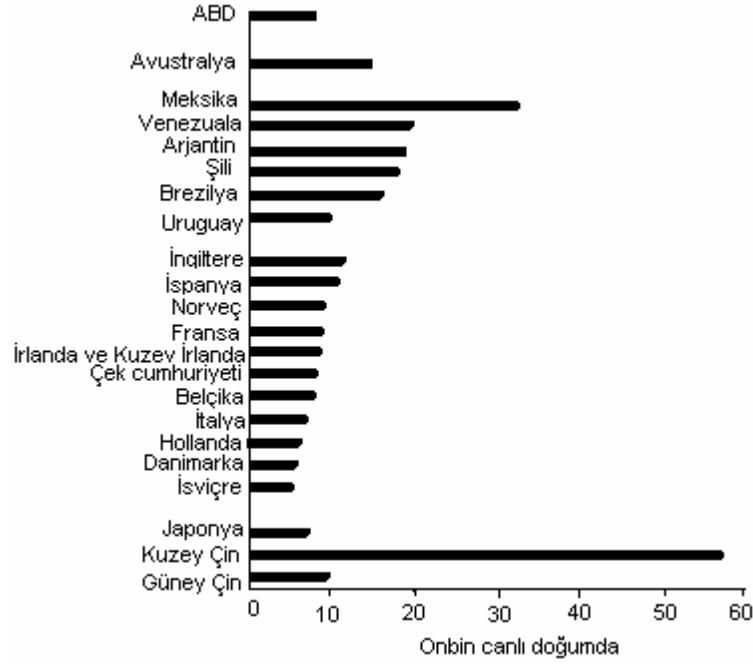
Nöral tüp defektinin epidemiyolojisinin değişik ülkelerde, farklı coğrafi bölgelerde ve farklı ırklarda değişik olduğu bildirilmiştir. Dünya genelinde ortaya konan çalışmalara göre nöral tüp defekti sıklığı %0.057 ile %1.387 arasında bulunmuştur (Au K.S. ve ark.,

2010; Li Z. ve ark 2006). Dünyada insidansın en yüksek olduğu bölgeler, Çin'in kuzey bölgesi %1,387 (Li Z., ve ark 2006), Hindistan %0.65-0.821 (Cherian A., ve ark 2005) olarak dikkati çekmiştir. Komşularımızdan İran'da %0.287 (Golalipour M.J., ve ark 2007), Yunanistan'da %0.145 olarak verilmiştir (Lekea V., ve ark 1988).

Amerika Birleşik Devletleri'nde beyazlar arasında %0.148, siyahlarda %0.087 (Stevenson R.E., ve ark 2000), Birleşik Arap Emirlikleri'nde %0.123 (Samson G.R., 2003), Avustralya yerlilerinde 2.56, Avustralya'ya sonradan yerleşen göçmenlerde 1.29 olarak bulunmuştur. Avustralya yerlilerinde göçmenlere göre iki kat daha fazla nöral tüp defekti görülmesi yerlilerin gebelik öncesi dönemde folik asit desteğine ve folik asitle takviye edilmiş yiyeceklere daha az ulaşmalarına bağlanmıştır (Bower C., ve ark 2004).

Diğer Avrupa ülkelerine göre nöral tüp defekti sıklığı çok yüksek olan İngiltere ve Kuzey İrlanda'da 1980 lerde %0.45 olan nöral tüp defekti sıklığı yıllar içinde azalmış, 2000 yılında %1'e yakın olarak bulunmuştur (Busby A., ve ark 2005). En düşük nöral tüp defekti sıklığı bildirilen ülke %0.058 ile İsviçre olmuştur (Nikkila A., ve ark 2006). Dünyanın çeşitli bölgelerindeki nöral tüp defekti sıklığı Şekil 10'da verilmiştir (Botto L.D., ve ark 1999).

Ülkemiz sağlık kayıt sisteminin iyi olmaması nedeni ile pek çok değişken gibi çeşitli doğumsal bozuklukların sıklığı ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Türkiye'de yapılan çalışmaların sonuçlarına göre, nöral tüp defekti sıklığı %0.15-0.63 arasında değişmektedir (Yeşilipek M.A., ve ark 1989; Güvenc H., ve ark 1993; Tunçbilek E., 2004). Himmetoğlu ve arkadaşlarının 1996'da yaptığı insidans çalışmasında, Türk popülasyonunda nöral tüp defekti insidansı %0.27 olarak bulunmuştur. Bunlardan en sık spina bifidaya, 2. olarak anensefaliye rastlanmıştır. Ülkemizde, nöral tüp defekti sıklığının Kuzey ve Doğu Anadolu'da en yüksek Batı Anadolu'da en düşük olduğu saptanmıştır. Annenin eğitiminin olmadığı grupta %0.91'e kadar olan nöral tüp defekti sıklığı yüksek okul mezunları arasında %0.13'e kadar düşmüştür. Bu durum sosyoekonomik düzeyle nöral tüp defekti ilişkisine bağlanmaktadır (Tunçbilek E., 2004).



Şekil 10. Dünya genelinde nöral tüp defekti sıklığı (Botto L.D., ve ark 1999).

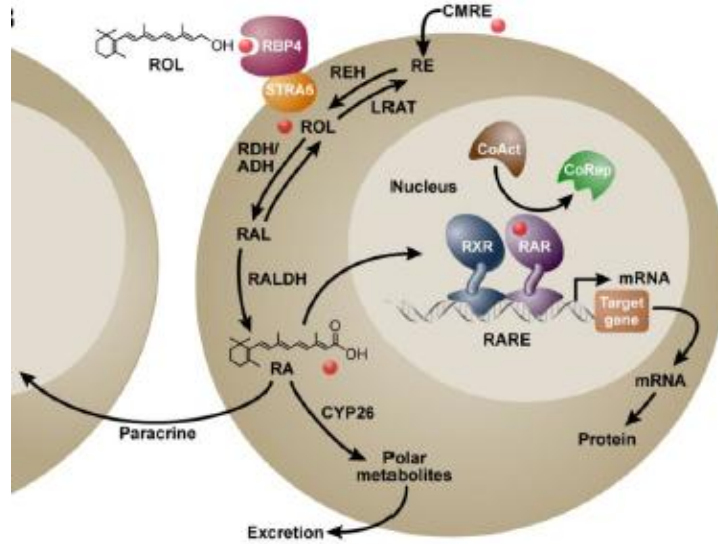
### 2.3. Retinoik Asit

A vitamini yağda çözünebilen berrak sarı bir kristaldir. A vitamininin gözün retinasında görevli formuna retinol denir. Retinol doğal olarak uzun zincirli halde bulunur. Retinol'ün aldehit formuna retinaldehit adı verilirken, asidik formu retinoik asit olarak isimlendirilir. Retinal; görmede, retinol; üremde, retinoik asit ise büyüme ve farklılaşma gibi diğer fonksiyonlarda görevlidir (Kayaalp O., 2000; Moise A.R., ve ark 2007). A vitamini ve türevleri (retinoidler), besinler içinde çeşitli şekillerde bulunurlar. Türevlerinden vücutta en yaygın olanı retinol'dür. Bu madde kimyasal olarak, izopren birimlerden oluşan doymamış bir alifatik zincirin ucunda  $\beta$ -iyanon (siklohekzenil) halkası içeren ve yağda çözünen bir primer alkoldür. Pek çok hayvansal besinde, uzun zincirli yağ asitleri ile esterleşmiş şekilde bulunur. En fazla bulunan esteri retinolpalmitat'tır. Bitkisel besinler ise bunun öncülü olan karotenleri içerirler. Bunların kaynağı ise sarı veya kırmızı renkli meyve ve sebzelerdir (Clagett-Dame M., DeLuca, H.F., 2002). Retinoik asit; etkisini alt basamaklarındaki hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eden veya baskılayan çekirdek reseptör proteinlerine bağlanarak göstermektedir (Chambon P., 1996; Pares X., ve ark 2008).

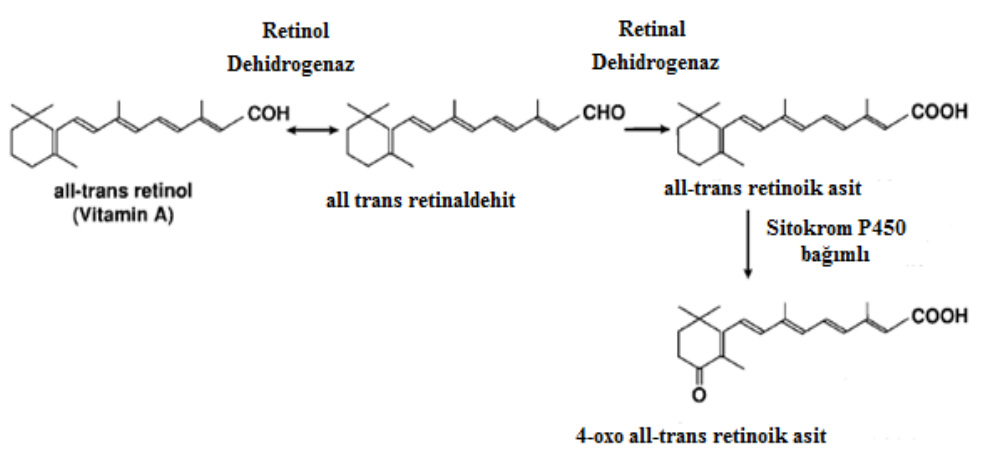


### 2.3.1 Retinoik Asit'in Etki Mekanizması

Retinol veya A vitamini olarak bilinen all-trans retinol, bitkisel kaynaklarda karotenler, hayvansal kaynaklarda ise retinil esterler olarak bulunur. Retinol ya esterleşerek dokularda depo edilir ya da oksidatif metabolizma ile önce all-trans retinaldehite ardından ise retinoik asite (RA) okside olmuş halde bulunur. Burada ilk ürün retinolden retinoik asittir (Moise A.R., ve ark 2007). Sitosolik alkol dehidrogenazlar (ADH) ve mikrozomal retinol dehidrogenazlar (RDH) ile all-trans retinaldehite dönüşür. Burada ilk geri dönüşlü ve bir oksidasyon ürünü olan all-trans retinaldehit, all trans retinoik asite birkaç aldehit dehidrogenaz (RALDH) ile katalizlenir (Pares X., ve ark 2008). RALDH bağımlı retinolden, retinoik asit dönüşümü CYP ile de gerçekleşir. Bu dönüşüm sitokrom CYP26 ailesi üyesi olan sitokrom p450 enzimiyle olur (Taimi, M., ve ark 2004; White R.J. ve Schilling T.F., 2008). Vitamin A ve metabolitleri serumda serbest halde bulunurlar ve hücrenel bağlanma proteini olan retinol bağlayıcı proteine (retinol binding protein, RBP veya RB4) bağlanır. Sonrasında RBP, hücre yüzeyinde bulunan STRA6 reseptörüne de bağlanarak retinolün çekirdek içine alımı gerçekleşir (Kawaguchi R., ve ark 2007). Nükleusta retinoik asit reseptörü ve RXR kompleksi (RAR/RXR), DNA'nın özel bir dizisine bağlanır ve retinoik asit response element (RARE) olarak isimlendirilir (Blomhoff R. ve Blomhoff H.K. 2006). Bu bağlanma sonrasında koreseptör komplain (CoRep) salınımını ve ardından retinoik asitin çok daha ileri oksidasyonunu sağlayan CYP26 ailesinin üyesi olan P450 ile polar bir metabolite dönüşür. Bu dönüşümle birlikte artık bir lipofilik molekül olan retinoik asit, kendine benzer hücrelere otokrin mekanizma ile etki edebilir veya yakınındaki hücrelere difüze olarak parakrin mekanizmayla etki edebilir (Şekil 11-12) (Clagett-Dame M ve Knutson D., 2011).



**Şekil 11.** Dawling ve Wald'in 1960 yılında yaptığı çalışmadan alınmıştır. Vitamin A'nın (retinol) all-trans retinoik asit'in (RA) hücre içindeki dönüşüm metabolizması özetlenmiştir.



**Şekil 12.** Retinolden retinoik asit oksidasyon metabolizması özetlenmiştir (Ross A.S., ve ark 2000).

### 2.3.2. Retinoik asitin dişi ve erkek üreme sistemine etkisi

Dişide üremenin gerçekleşebilmesi için A vitamini gereklidir. Retinoik asitin fazlalığı veya eksikliğinin üremeye etkisi çeşitli çalışmalara konu olmuştur. Çiftleşmeden önce yüksek dozda A vitaminine maruz kalan dişilerin, vajinal sürüntülerinde kornifiye hücreler görülmeye devam etmektedir. Dolayısıyla üreme implantasyondan önce

sekteye uğramaktadır. Vajinal epitelin değişmiş görünümüne rağmen A vitamini eksikliği bulunan dişilerde ovulasyon devam etmektedir. Ayrıca ovaryumda corpus luteumlar, düzenli veya düzensiz aralıklarla oluşmaya devam etmektedir (Clagett-Dame M. ve DeLuca H.F., 2002). Warkany ve Schraffenberger'in 1946 yılında yaptığı çalışmada, vitamin A eksikliğinin çiftleşme, fertilizasyon ve implantasyona etkisinin olmadığını ancak embriyoner dönemin ortalarında, embriyo ölümleri ile sonuçlandığını bildirmişlerdir. Dişi ratlara verilen retinoik asit oranı günlük 2 ile 12 mg/g arasında olduğunda, normal embriyonik gelişim izlenmiş, embriyoner dönemin 8.5. gününde (geç gastrula/erken nörolasyon), bu oranın günlük 250 mg/g'a çıkarılmasıyla, rezorbe embriyolar gelişmiştir (See A.W., ve ark 2008).

Wolbach ve Howe'un 1925'te yaptığı çalışmada, Vitamin A eksik erkek farelerde epididimis, prostat ve vesiküla seminalis epitelinin çok katlı yassı keratinize epitele dönüştüğü ve dolayısıyla spermatogenezi durdurduğu görülmüştür. Sonraki çalışmalarda, A vitamini eksikliğinin, sıçan testislerinde az sayıda spermatosit bulunması ve sertoli hücrelerinde yapısal bozukluğun görülmesiyle (Mitranond V., ve ark 1979), farede ise spermatogenezin spermatogonyum sürecinde tamamen durmasıyla sonuçlanmıştır (Van Pelt A.M. ve De Rooij D.G. 1990).

### **2.3.3. Retinoik asitin maternal / fetal taşınması**

Retinoidler embriyoya annenin dolaşım sistemi vasıtasıyla ulaşmaktadır. Retinol, retinaldehit ve retinoik asitin taşınımı; bu kimyasalların gebe hayvanlara yüksek dozlarda verilmesiyle ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir (Collins M.D. ve Mao G.E., 1999; Sass, J.O., ve ark 1999). Kemirgenlerde vitellus kesesi plasentası, retinolün anne tarafından fetus tarafına taşınmasında önemli bir işlev üstlenmektedir. Bu işlev gebelik boyunca da önemini korumaktadır (Jacobsson C. ve Granström G., 1997). Kemirgenlerin tersine, insanlarda vitellus kesesi geçici ve ilk trimesterin sonunda dejenere olan bir organdır, bu organın yerini koriyoallantoik plasenta almaktadır (Dancis J., ve ark 1992). Retinoidler anneden fetusa iki yolla taşınır. Birincisi, retinolün özel retinol bağlayıcı proteine (retinol binding protein, RBP) bağlanması ile olur (Quadro L., ve ark 2005). İkincisi ise, retinil esterlerinin düşük veya çok düşük yoğunluklu lipoproteinleri, şilomikron parçaları şeklinde taşınmasıdır. RBP, plasantasyonun erken dönemlerinde embriyo çevresini saran vitellus kesesi viseral duvarının endoderminde, ileri dönemde ise vitellus kesesi membranları ve uterusda (desidua basalis) lokalize olur (Soprano D.R., ve ark 1986). RBP plasentadan fetal

dolaşıma geçemez (Quadro L., ve ark 2004). Maternal retinol, fetal RBP'lere transfer edilip bağlanabilir veya alternatif olarak, retinol esterleşerek lipoproteinlerle taşınabilir. Genetik olarak RBP'i olmayan embriyolar, genetik olarak RBP'i olmayan annelerden, vitamin A takviyeli diyetle besleyerek normal şekilde gelişebilir. Ancak vitamin A alımı kısıtlandığında, embriyogenezde defektler görülmeye başlanır (Farese R.V., ve ark 1996). RBP yoksa, retinil esterleri dolaşımda varlığını gösterir, retinoidlerin anneden embriyoya geçişi, maternal vitamin A takviyesi ile yeterli hale gelir (Quadro L., ve ark 2004).

#### **2.3.4. Retinoik asitin sinir sistemiyle ilişkisi**

Retinoik asit sinir sistemi gelişimi ve nöral doku farklılaşmasında önemli bir yer tutar (Clagett-Dame M., ve ark 2006). Retinoik asitin işlevi ile ilgili bilinen en iyi çalışma arka beyin ve spinal kord gelişimi ile ilgilidir. Retinoik asit nöral plağın anterioposterior taslağının oluşumunda ve arka beyin segmentasyonunda, Hox geni kontrolünde WNT ve FGF sinyalleri eşliğinde gelişir (Maden M., 2006). Maden M. ve arkadaşlarının 1996'da yaptıkları çalışmada, A vitamini eksikliği oluşturulan ratlarda, 4. ve 7. rhombomer bölgesinin oluşmadığı gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada, gebelik öncesi dönemde A vitamini eksikliği oluşturulan ratların, gebelik sonrasında embriyoları incelendiğinde, posterior bölgede rhombomer eksikliği izlenmiş, buna ek olarak ektopik optik vezikül şekillenmiştir (White J.C. ve ark 2000). Özellikle posterior beyin bölgesi ve medulla spinalis gelişiminde retinoik asit sentezi için gerekli olan RALDH'nin, anterior paraksiyal mezodermden salınması, periferik sinir sistemi oluşumunda önemlidir. RALDH mRNA'sının paraksiyal mezodermden salınmasından sonra, hem somitler hem de presomitik mezodermden salındığı görülmüştür (Sirbu I.O. ve Dueter G., 2006). CYP26 ailesi üyeleri de arka beyin ve rhombomer oluşumunda kritiktir. Burada rhombomere özgü CYP sentezi yapılır. Örneğin arka beyin posterizasyonunda CYP26A1, anterior epiblast ve nöral plaktan eksprese edilmeye başlar ve r2/r3 segmentasyonu şekillenir (Pennimpe T., ve ark 2010). Daha sonra, r2/r4 rhombomerlerin oluşumu, CYP26C1 varlığında gerçekleşir (Sakai Y., ve ark 2001; Pennimpe T., ve ark 2010). RALDH mutant farelerde nöroepitelin ince olduğu (Ribes V., ve ark 2009), spinal kordda azalmış nöron sayısı ve daha küçük somitlerin var olduğu görülmüştür (Maden M., ve ark 1996). Motor nöronların oluşumu ve gelişmesinde Hox genleri önem taşır. Spinal kordda, lumbosakral bölgede Hox genleri ile birlikte RALDH'nin, motornöron farklılaşmasında önemli olduğu belirtilmiştir (Misra

M., ve ark 2009). Farklı embriyoner dönemlerde kültüre edilen sempatik nöronların büyüme ve gelişmesinin all-trans retinoik asit (atRA) varlığında, nörotropinlerin etkinliğinin artmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. Artan nörotropinler aksonların da oluşumundan sorumludurlar (Plum L.A., ve ark 2001). Bunun yanında son yıllarda retinoik asit bağımlı Nöron Navigatör 2 (Nav2) ve Nedd9 isimli iki gen keşfedilmiştir. Bu genler retinoik asit varlığında nöron öncüllerinin oluşumu, bu hücrelerden nöritlerin gelişimini sağlamaktadırlar (Clagett-Dame M. ve Knutson D., 2011). Yapılan bir çalışmada, Nav 2 geni susturulmuş farelerin nöritlerinin yeterince uzun olmadığı bildirilmiştir (Knutson D.C., ve Clagett-Dame M., 2008).

Transgenik fare embriyosunun posterior bölümünde ve primitif çizginin anteriorunda (Hensen's nodu) güçlü retinoik asit bağlanması izlenmiştir. Somit oluşumu ve nöral tüpün kapanması sırasında, gelişen rhombensefalon'un, 2. ve 3. rhombomerleri arasındaki sınırı şekillendiren bölgede belirgin bir sınır oluşturacak boyanma gözlenmiştir. Bu sonuçlar, retinoid haberleşmesinin kritik yer ve zamanda aktive edilmesinin, erken aksiyal şekillenmenin yanı sıra, gelişen rhombensefalonda da önemli bir rol oynadığı fikrini desteklemektedir (Ulven S.M., ve ark 2000).

Gelişimin daha ileri safhalarında; somitlerde, kalpte, lens, nöral retina, bağırsağın endoderm tabakası, ekstremite tomurcuklarının tabanındaki mezenkimde, medulla spinalis'in servikal ve lumbal bölümlerinde retinoik asit varlığı görülmüştür. (Reynolds K., ve ark 1991; Colbert M.C., ve ark 1993; Moss J.B., ve ark 1998). Sonraki süreçte, retinoik asit bağlanması, nazal plakotta mandibula ve maksilla arasında, gelişen kulak, deri, somit kaynaklı dokular, bazı organlar (mide, metanefrik böbrek), göz ve gelişen ekstremitelerde saptanmıştır (Rossant J., ve ark 1991). Bunlara ek olarak, mezen/rhombensefalon sınırında ventral prosensefalonun ganglionik kabartısında da retinoik asit bağlanması görülmüştür (Mata de Urquiza A., ve ark 1999).

### **2.3.5. Embriyoda Retinoik asit metabolizması**

Embriyo gelişiminde retinoik asit temel maddelerden biridir. Retinoik asitin metabolik zamanlamasının ve retinoik asitin gerekli olduğu doku alanının düzenlenmesi kritik bir öneme sahiptir. A vitamini bakımından yetersiz beslenmenin doğumsal şekil bozukluklarına neden olabileceği ile ilgili ilk bilgiler, Hale'in 1935'te yaptığı çalışmada, domuzları A vitamini bakımından yetersiz bir diyetle beslediği çalışmaya dayanmaktadır. Yeni doğanların çoğu gözsüz doğmuştur, bazılarının sadece tek bir gözü bulunurken, bazılarının bir büyük ve bir küçük gözü olmuştur. Yarı damak, tavşan

dudak, küçük dış kulaklar ve böbreklerde gelişim bozukluğu gibi diğer kusurlar da daha düşük bir sıklıkta gözlenmiştir. Tüm kusurlar, kontrol grubu besinine, Avitamini yönünden zengin gıdalar (balık ciğeri yağı veya yeşil yem) verilmesiyle önlenmiştir. Bu çalışmalar, yukarıda bahsi geçen defektlerden sorumlu olan faktörlerin kalıtsaldan ziyade, besinsel olduğunu göstermektedir.

1940'larda yapılan çalışmalar, A vitamini eksikliğine bağlanabilecek geniş bir doğumsal bozukluklar spektrumunu tanımlamıştır. Bu spektrum; "A vitamini eksikliği sendromu" olarak adlandırılmıştır (Warkany J., ve Schiaffenberger E., 1946). Gastrula safhasında retinoid gereksinimin arttığı kritik bir pencere bulunmaktadır. Bu gereksinimin karşılanmadığı durumlarda, embriyonun gelişen dolaşım ve sinir sisteminde çeşitli şekil bozuklukları meydana gelmektedir. Bunların sonucunda da embriyonun ölümü gerçekleşmektedir. A vitamini eksikliği bulunan ve atRA ile desteklenen sıçanların kullanıldığı modeller ile A vitamini'nin erken ve geç embriyonik gelişimdeki rolünü ortaya koymak mümkün olmuştur. Bu çalışmalar, Warkany ve arkadaşları tarafından 1940 ve 1950'lerde açıklanan şekil bozukluklarının yanı sıra, içerisinde erken rhombensefalon, kraniyofasiyal bölge, kraniyal sinirler, faringeal arkusların, otik vezikülün, kardinal venin, sinoatrial kapakçığın, aksiyal iskelet ve ön ekstremitelerin de bulunduğu şekil bozukluklarını da tanımlamıştır (Warkany J. ve Schraffenberger E., 1944; Wilson J.G. ve Warkany J., 1948; Wilson J.G. ve Warkany J., 1949; Wilson J.G. ve ark 1953). Bu klinik tablolar, artık A vitamini eksikliği sendromu'nun içerisinde dikkate alınmaktadır (Clagett-Dame M., DeLuca H.F., 2002). Retinoik asit sentez ve miktar ayarlamasıyla ilgili enzim fonksiyonlarının etkisi önemlidir. CYP, RARE gibi moleküller, retinoik asit metabolizmasında anahtar rol oynar. Bir çalışmada embriyoner dönemin 13. gününde, RDH10 geni eksik olan farelerde, embriyoner defekt ve ölüm izlenmiştir (Sandell L.L., ve ark 2012). RALDH1 mutant fare embriyolarında, ölümler erken dönemde görülmüş, böylece RALDH'ın erken embriyoner dönemde (E7,5-8,5) eksprese edilerek etki gösterdiği düşünülmüştür (Dupe V., ve ark 2003). Erken embriyoner dönemde RALDH enzimi, visseral endodermden (ekstraembriyonik) daha sonra vitellus kesesinden, damar gelişimi sağlandığında da gelişen embriyo yapılarından sağlanmaktadır. Embriyoner dönemin yaklaşık 2.5. gününde, RALDH2 endometrial stroma ve desiduada yüksek oranda eksprese edilir, implantasyondan sonra yüksek oranda kalır ve devam eden günlerde giderek azalır (Bohnsack B.L., ve ark 2004).

Retinoik asit metabolizmasında önemli bir yere sahip olan CYP ve tüm alt birimlerin (CYP26A1, B1 ve C1) gen susturma çalışmalarında, embriyoner dönemin yaklaşık 9.5-10.5 günlerinde ölümcül etki yarattığı ifade edilmiştir. CYP ailesinin bir üyesi olan CYP26A1'in susturulmasıyla embriyoların, embriyoner dönemin orta-geç sayılabilecek diliminde, retinoik asit toksitesinden kaynaklı eksensefali nedeniyle öldüğü belirtilmiştir (Sakai Y., ve ark 2001; Pennimpede T., ve ark 2010). Benzer bir çalışmada, CYP26B1 geni susturulmasıyla oluşturulan fare embriyolarının, doğumun hemen sonrasında hızla öldüğü ve bu embriyoların anormal ekstremitelere ve kraniofasial defektlere sahip olduğu görülmüştür (MacLean G., 2007). İmplantasyon sonrasında embriyoda, nöral plağın oluşmasında CYP26 ailesi üyelerinin her biri için yapılan genetik silinme sonrasında, embriyo vücut ekseninin duplike olduğu gösterilmiştir. Burada özellikle CYP26 aile üyelerinin ifadesinin embriyoda susturulması, retinoik asit alımının maternal kaynaklı olarak devam ettiğini göstermektedir. Bu durum da, RALDH2 nin anne endometrial stroması ve deciduasından eksprese edildiğini desteklemiştir (Vermot J., ve ark 2000). Retinoik asit yanıt elemanı (RARE, Retinoic acid response element), retinoik asitin RAR ile ilişkiye geçtiğinde aşırı derecede bulunarak, retinoik asitin nükleus içine alınmasını sağlayan bir moleküldür (Rossant J., ve ark 1991).

Retinoidler iyi bilinen teratojenlerdir (Collins M.D. ve Mao G.E., 1999). Fazla A vitamini ile teratojen etkisi ilk kez 1953 yılında Cohlan tarafından bildirilmiştir. Cohlan, 35,000 IU/gün verdikleri vitamin A'nın, embriyoner dönemin 2-16. günlerinde, eksensefali, yarı damak, yarı dudak, göz bozuklukları oluşturduğunu belirlemiştir. Bundan sonra da birçok çalışma A vitamini ve metabolitlerinin teratojenik etkisini onaylamıştır (Shenefelt R.E., 1972; Holson R.R., ve ark 1999). Benzer anomaliler aşırı retinoid verilen maymun, tavşan, sıçan, fare ve hamster gibi farklı hayvan türlerinde, vitamin A ve bunların metabolitleri ile de gösterilmiştir. Öncelikle anomalinin hayvanlarda, retinoik asitin veriliş zamanına bağlı olduğu ifade edilir. Erken postimplantasyon denilen embriyoner dönemin 8-10. günlerinde tipik olarak kraniofasial ve santral sinir sistemi bozukluklarına yol açtığı, 12-14. günlerde ise ekstremiteler ve genitoüriner defektlere yol açtığı görülmüştür (Kistler A., 1981). Verilen retinoik asitin dozu, teratojen olması anlamında önemlidir (Seegmiller R.E., ve ark 1997). Yapılan çalışmalarda organogenez süreci sırasında verilen retinoik asitin düşük doz olarak ifade edilen miktarının 10 mg/kg olduğu, yüksek doz olarak ifade edilenin

ise 100 mg/kg olduğu belirlenmiştir (Ross A.S., ve ark 2000). Yüksek dozda A vitamini; retinoid sinyal iletimi ile beraber retinoid reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna neden olmaktadır. Retinoidlerin embriyoner gelişimdeki etkileri, bir yapının veya sistemin aşırı bozulduğunun gözlendiği çalışmalardan anlaşılabilmiştir. Embriyoner dönemin 11.gününde fare embriyolarının aşırı retinoik asite maruz kalmaları sonucunda, RAR'ın mRNA miktarının arttığı gösterilmiştir. Böylece RAR (veya RXR) kompleksinin mRNA miktarınının artışı anormal gelişimin nedeni olmuştur (Harnish D.C., 1992; Soprano D.R. ve Soprano K.J., 1995). Anomaliye neden olan retinoik asit fazlalığı durumunda reseptör artışı, reseptörlerin eksprese edildiği yollardaki gen bölgelerinin uyarılmasıyla olur. Yapılan bir çalışmada, retinoik asite maruz kalan embriyolarda HOXb1 geni değişmiş, buna bağlı olarak RAR/RXR ekspresyonu artmış ve retinoik asitin defektlere yol açtığı düşünülmüştür (Marshall H., ve ark 1994). Retinoik asit ile oluşturulan embriyo defekt modelleriyle, insandaki anomaliler anlaşılmaya çalışılmıştır. Kochlar'ın 1977'de yaptığı çalışmada, fazla retinoidlerin, kıkırdak öncülü olan alanda, hücre ölümlerini artırdığını, böylece kraniofasial defektlere neden olduğunu göstermiştir. Sulik ve Dehart daha sonra 1988'de yaptığı çalışmayla, hem mezenkimal hücrelerin hem de ektodermal hücre çoğalmasının, göçünün ve hücre metabolizmasının, aşırı retinoik asit ile etkilendiğini bildirmişlerdir. Sulik ve Alles ise 1991 yılında, retinol ve metabolitlerinin aşırı verilmesinin, hayvan modellerinde benzer bozukluklara neden olduğunu göstermişlerdir. All trans retinoik asit ile fetal ratlarda oluşturulan spina bifidada, nörolasyon sürecinde nöroepitelde bulunan nöral progenitör hücrelerin çoğalması ve apoptozu araştırılmıştır. Embriyoner dönemin 11-13. gününde kontrolle kıyaslandığında, nöroepitelde aşırı miktarda apoptoz buna karşılık çok az nöral progenitör hücre çoğalması izlenmiş ve defektin nedeni yapılan bu çalışmayla ifade edilmiştir (Wei X., ve ark 2012). Yapılan başka bir çalışmada ise aşırı retinoik asitin, fare pluripotent p19 hücre hatlarına etkisi araştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda verilen retinoik asitin, kendi metabolizmasındaki enzimlerin ekspresyonunu artırdığını ve Hox genlerini aktif olarak çalıştırdığını bildirmiştir (Chen Y., ve David H., 2013).

#### **2.4. Kök Hücreler**

Kök hücre; uzun zaman dilimleri boyunca bölünebilme ve kendini yenileyebilme yeteneğinde olan, özelleşmemiş, farklı hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğinde ve



hasarlı dokularda dokunun işlevini kazanmasını sağlayan hücrelerdir. Bu özellikleriyle vücuttaki somatik hücrelerden farklıdır.

Kök hücre terimi ilk kez botanik ile ilgili eski yazılarda karşımıza çıkar. Bitkinin gelişmekte olan kök meristeminin ucunda, bölünme hızı çok yüksek olan hücreleri tanımlamak için kullanılan kök hücre kavramı, günümüzde buna benzer davranış içinde olan hücreler için kullanılmaya başlanmıştır. Doğal olarak, organizmayı meydana getiren ilk hücreler için de kök hücre terimi kullanılmıştır. Basitçe düşünülürse kök hücreler yaşamın öncüsüdür. Bu zincirin en başında iki haploit gametin (spermatozoon ve oosit) bir araya gelişiyle meydana gelen zigot adı verilen hücre bulunur. Bunun mitoz bölünmeleriyle ortaya çıkan hücreler (blastomerler), canlıdaki en yüksek farklanma kapasitesine sahip (totipotent) hücrelerdir. Kısa süre sonra embriyoya sonrasında da tüm dokuların ortaya çıkmasına öncülük ederler. Üç haftalık embriyoda ilkel cinsiyet hücreleri (İCH; primordiyal germ hücreleri) görülür ve ileride gamet hücrelerine dönüşür. Öte yandan yetişkindeki hücre ve dokuların yenilenmesi ve onarımı yetişkin kök hücrelerle sağlanır ki, bazı dokular için bu yenilenme ve onarım süreci kesintisiz ve oldukça hızlıdır. Dolayısıyla, organizmada üç tip hücre bulunur. Bunlar; kök hücreler, farklılaşmanın çeşitli aşamalarında bulunan somatik hücreler (çoğalan geçici hücreler ve sonuna kadar farklılaşmış hücreler) ve germ hücreleridir. Günümüzde kanser dahil pek çok hastalığın kök hücre çoğalma ve farklanma sürecindeki düzensizlikten kaynaklandığı konusunda somut veriler bulunmaktadır. Bu nedenle kök hücrelerin çoğalma ve farklanmasını kontrol eden mekanizmaların ortaya çıkarılması, hastalık patogenezi ortaya koymanın yanı sıra metabolik, dejeneratif ve immünolojik hastalıkların hücre ve genlerle tedavisinde yeni bir dönemin açılmasına öncülük edecek güçtedir (Can A., 2014).

Kök hücreler kendi kendini yenileme, klon oluşturma, farklılaşma gibi özelliklere sahiptir. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri incelendiğinde, farklı özellikteki kök hücrelerle karşılaşırız. Hiyerarşinin en üst sırasında totipotent hücreler yer almaktadır. Totipotent hücreler, embriyonun döllenmeden sonra yaklaşık 4. gününe kadar oluşan, embriyoyu ve embriyoya ait ekstraembriyonik membran ve dokuları oluşturabilen hücrelerdir (Gerecht-Nir S. ve Hskowitz-Eldor J., 2004). Totipotent hücrelerin oluşumu zigotun 5-6 kez bölünmesiyle başlar. Fertilizasyonun yaklaşık 5. gününde bu hücreler blastosist denen içi boşluklu hücre topluluklarına dönüşür. Burada bulunan hücreler, sırayla önce ara oluşumları, sonra da kalıcı tüm doku ve organları oluşturmak üzere

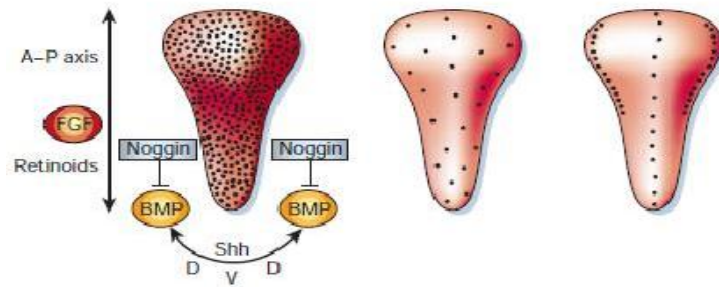
giderek çoğalır (proliferasyon), kararlı hale geçer (commitment, determination) ve farklanır (differansiasyon). Blastosistin iç hücre kitlesi (embriyoblastlar) embriyo kök hücreleridir. Embriyo gövdesine ait bütün hücre tabakaları, onlardan köken alacak doku ve organları oluşturma yeteneğine sahiptir. Endoderm, mezoderm ve ektodermden köken alan hücrelere farklanırlar ve bu özelliğe sahip hücreler pluripotent hücrelerdir. Pluripotent hücreler (embriyonik kök hücreler), embriyoya ait üç germ yaprağından gelişen tüm hücreleri oluşturabilirler fakat ekstraembriyonik yapıları oluşturamazlar. Bu nedenle bir embriyoyu oluşturabilme yeteneğinden yoksundurlar.

Gelişim ilerledikçe hücreler pluripotent özelliklerini kaybederek daha özelleşmiş hücrelere dönüşürler. Buldukları dokuya özgü hücreleri oluşturabilen kök hücreler multipotent kök hücreler diye adlandırılır. Son dönemde multipotent kök hücrelerle yapılan çalışmalarda, sadece buldukları dokuya ait hücreleri değil farklı dokulara ait hücreleri de meydana getirebildikleri gösterilmiştir (Vats A. ve ark., 2002). Hiyerarşinin en altında ise unipotent kök hücreler ya da progenitor hücreler bulunur. Progenitor hücreler, sadece spesifik hatlara farklılaşma eğilimi gösterirler (Gerecht-Nir S. ve Iskowicz-Eldor J., 2004). Öte yandan, gelişmekte olan organizmada (fetüs, prenatal, postnatal, infant ve çocukluk dönemleri) embriyo kök hücresi varlığından söz etmek mümkün değildir. Ancak başta kemik iliği olmak üzere, çeşitli organlarda ve bu organların belirli doku bölgelerinde, gerektiğinde kendini çoğaltabilen, kararlı hale geçebilen ve farklılaşabilen hücreler bulunur. Bunlara yetişkin kök hücreler veya dokuya özgü kök hücreler adı verilmektedir (Can A., 2014).

#### **2.4.1. Embriyonik kök hücreler**

Embriyonik kök hücreler 5-6 günlük erken dönem embriyo formu olan blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilmektedirler. Bu iç hücre kitlesinde yaklaşık olarak 200 hücre bulunabilmektedir. Bu hücreler embriyonun 3 germ tabakasını ve germ hattı yapılarını oluşturduğu saptanmıştır. Embriyonik kök hücreler, embriyonun implantasyonu öncesi hücrelerine oldukça benzemektedir. Ancak gerçekte aynı değildirler. Embriyo içerisinde geniş ölçüde çoğalan bu hücreler, erişkin zamanda ortaya çıkacak tüm hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğindedir. Aynı zamanda bunları izole etmek ve eks vivo'da yetiştirmek mümkündür. Embriyonik kök hücreler; sadece pluripotent kök hücrelerin yapabileceği ektodermal, mezodermal ve endodermal kökenli farklı kök hücrelere farklılaşabilir (Brivanlou A.H. ve ark., 2003). Gelişimin erken dönemlerinde (fertilizasyonun 5. gününden sonra) pluripotent kök hücrelerin ne zamandan itibaren

multipotent kök hücelere ve hatta erişkin kök hücre formlarına dönüştükleri ile ilgili araştırmalar vardır. Örneğin nöral kök hücelere, projenitör hücelerin alt tipidir ve ilerde nöron ve glial hücelere dönüşür. Erken embriyoner dönemde pluripotent veya multipotent kök hücelere ne zaman nöral kök hücelere dönüşürler? Nöral plak ilk oluşmaya başladığında sadece farklılaşmamış kök hücelere dönüşürler mi oluşmaktadır? (Temple S., 2001). Bu sorulara cevap bulabilmek için yapılan çalışmalarda, erken embriyoner dönemde, embriyoner kök hücelerin yaygın varlığını göstermiş, ilerleyen dönemde farklılaştığı bildirilmiştir (Şekil 13). Ratlarda spinal nöral tüpte, embriyoner dönemin 8. gününde (E8), yaklaşık %50'nin üzerinde canlı kök hücre bulunduğu ve varlıklarını 24 saat boyunca devam ettirdikleri gösterilmiştir (Kalyani A., ve ark. 1997; Kalyani A., ve ark. 1998). Embriyoner dönemin 10. gününde ise, fare beyninin telensefalon bölgesinde, kök hücre oranı %20 den %5 e düşmüştür (Qian X., ve ark. 2000). Embriyoner dönem ilerledikçe, kök hücre sayısı hızlı bir şekilde ve giderek azalır. Yapılan bir çalışmada, rat spinal kordunda, E12 de, %10 oranında görülen kök hücelere doğum sonrası 1. günde %1e kadar düşmüştür (Kalyani A., ve ark. 1997; Kalyani A., ve ark., 1998). Yapılan başka bir çalışmada ise, özellikle kök hücelerin embriyonun belli bölgelerinde sayıca az olduğu bildirilmiştir. Fare embriyolarında E8,5 da, anterior nöral plakta, yalnızca %0.3 kök hücre işaretlenmiştir (Tropepe V., ve ark.,1999).



**Şekil 13.** Nöral dokular gelişirken kök hücelerin yerleşimi. Vertebralılarda solda tüm nöral dokuların multipotent kök hücelere kaplı olduğu, BMP, Noggin, Retinoik asit, SHH, FGF etkisiyle anterior-posterior ve dorsal-ventral yönler belirlenirken hücelere giderek özelleşmeye başlar ve daha çok orta hatta seyrek şekilde varlıklarını devam ettirirler. En sağda ise ilerleyen dönemde nöral kök hücelerin sadece perifer ve orta hatta bulunduğu görülmektedir (Temple S., 2001).

## 2.4.2. Yetişkin kök hücreler

Yetişkin kök hücreler erken embriyo gelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan kök hücreler olarak tanımlanır. Yetişkin organizmadaki çoğalan geçici hücrelerin öncüsü olan bu hücreler, hasarlanan dokuların yenilenmesinde de görev alır. Somatik kök hücreler olarak da bilinen bu hücreler dokuya özgü kök hücreler olarak isimlendirilir. Embriyoner kök hücreler kısmında belirtilen pluripotent embriyo kök hücreleri, ilkel cinsiyet hücreleri, nöral kista kök hücrelerinin bir bölümü ve embriyo dışı mezoderm kaynaklı bazı kök hücreleri bir kenara bırakılırsa kalan tüm kök hücreler yetişkin kök hücre olarak ifade edilir. Günümüzde üzerinde çok çalışılan yetişkin kök hücre tipleri hemopoetik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler, nöral kök hücreler, bağırsak kök hücreler ve endotel kök hücrelerdir. Bunun dışında kalp, karaciğer, akciğer, pankreas, göz, burun, kulak gibi organlarda yer alan parankim hücrelerinin köken aldığı kök hücreler bu hücreler arasında yer alır.

Yetişkin kök hücreler arasında multipotent olanların yanında unipotent olanlara da rastlanabilir. Yetişkin kök hücrelerin hiçbiri doğrudan farklılaşmaya giderek organizmada işlev kazanan farklılaşmış hücrelere dönüşmezler. Bunun yerine her organdakiler farklı sayıda bölünerek önce çoğalan geçici hücreleri meydana getirirler. Daha sonra bunların birçoğu çoğalma süreci sonunda farklılaşarak, sonuna kadar farklılaşmış hücre adı verilen hücrelere dönüşürken bir bölümü de yok olur (Temple S., 2001; Can A., 2014).

### 2.4.2.1. Mezenkimal kök hücrelerin özellikleri ve belirteçleri

Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri 1970'lerin sonlarında, plastiğe yapışan, yüksek proliferatif hücreler olarak ifade edilmiş, devamında bu hücrelerin kemik, kıkırdak ve fibroblasta dönüştüğü *in vivo* olarak gözlenmiştir. (Friedenstei A.J., 1976; Friedenstein R.K. ve ark., 1987) Arnold Caplan ise 1991 yılında bu hücre serilerinde 'mezenkimal kök hücre' ve buna benzeyen başka bir kök hücre hattı olan 'hemopoetik kök hücre' tanımını ortaya koyarak sınıflandırma yapmıştır.

Hücre yüzey molekülleri standart isimlendirmesi "cluster of differentiation" CD olarak adlandırılır. İlk mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri Pittenger ve arkadaşlarının 1999 yılında yapmış oldukları çalışmada, multipotent hücrelerden yağ, kıkırdak, kemik hattına doğru belirlenmiştir. Mezenkimal kök hücreleri, hücre popülasyonlarında tanımlayabilmek için çok çeşitli monoklonal antikolar

bulunmaktadır. Bu hücreler genel olarak TGF üzerindeki epitop bölgesi olan CD105 ile özgün olarak bağlanan SH2 pozitif hücrelerdir. Bu özellik kullanılarak hücrelerin immünomanyetik ayırımı sağlanabilmektedir (Cheifetz S. ve ark., 1992). Aynı zamanda bu hücreler membrana bağlı ekto-5-nükleotidaz epitopuna (CD73) özgün olarak bağlanan SH-3 ve SH-4 pozitif hücrelerdir (Barry F., ve ark 2001). Bu iki belirteç yanında CD90 da mezenkimal hücrelerin yüzeyinde bulunan ve uluslararası hücre tedavisi topluluğu (International Society of Cell Therapy, ISCT) tarafından mezenkimal kök hücre belirteci olarak tanımlananlar arasına katılmıştır (Dominici M. ve ark, 2006). Mezenkimal kök hücrelerin özgün yüzey belirteçleri CD13, CD29, CD44, CD49e, CD73, CD90, CD105 ve bunların yanında CD146, CD166, CD271, SSEA4, Stro-1, W8-B2/MSCA-1 ile de karakterize edilir (Sally A. ve Jones B., 2012).

#### **2.4.2.1.a. CD 44**

İlk tanımlanan, yüksek polimorfik hücre membran glikoproteinidir. T lenfosit, granülosit ve beyin hücrelerinde belirlenmiştir. Rat mukozal damar duvarı endotel hücrelerinde damar adezyonu ile ilişkilendirilmiştir. CD44 hemopoetik formu hyaluronik asite, intraselüler parçaları sitoskelete bağlanır. Beyin dokusunda CD44'ün hemopoetik formu beyaz cevherde izlenmiştir. Multiple skleroz, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda ekspresyonunun arttığı ifade edilmiştir (Akiyama H., ve ark 1993). Lökosit, damar endoteli, epitelyal keratinosit, sindirim yolları, endometriyumun hem epiteli hem de stromasında izlenmiştir. İmplantasyon ve embriyogenezde CD44 ekspresyonunun özellikle implantasyonda ve erken dönem embriyoner gelişimde önemi bildirilmiştir (Campbell S., ve ark 1995). Yapılan bir çalışmada 8-20 somitlik dönemlerde tavuk embriyosunda CD44 lokalizasyonuna bakılmıştır. Bu çalışmada ilk olarak 5 somitlik evrede CD44 lokalizasyonu izlenmiş, nöral tüp kapandıktan hemen sonra da nöral krista hücrelerinin hyaluronik asitçe zengin bölgelere göç etmesi varsayımıyla beraber, CD44 pozitif alanların başta sefalik bölge sonrasında kuyruk tomurcuğu mezenkiminde bulunduğu bildirilmiştir. Böylece CD44'ün, nöral krista hücrelerinin göç yolunda önemli olduğu bildirilmiştir (Corbela C., ve ark 2000). Fagositoz yapan hücrelerin fagositozunu, ekstraselüler matrikse bağlanmasını, lenfosit hareketini kontrol etme gibi önemli görevleri vardır. CD44'ün düşük konsantrasyonu lenfosit dokularında (makrofaj ve T hücreler gibi), yüksek konsantrasyonu ise tümör ve keratinositlerde bulunmuştur (Kennel S.J., ve ark 1993). CD44'ün görevleri; morfogenez, organogenez, hemopoez, lenfositlerin homing

mekanizmasını sağlama, hücrelerin göçü, lökosit aktivasyonu, hücreler için bir efektör görevi, hücre ölümünün düzenlenmesi olarak özetlenebilir. Yapısında ya da sinyal mekanizmasında meydana gelebilecek herhangi bir bozulma ile hematolojik malignansi, otoimmün hastalıklar ve tümör oluşumu gerçekleşir. Farelerde CD44 geninin kapatılmasıyla morfogenez ve organogenez sürecinde bozulmalar meydana gelmiştir (Marhaba R., ve Zoller M., 2004. Zoller'in 2011 yılında yaptığı çalışmada, CD44 molekülündeki yapısal bozulmalarla birlikte matriks yapısında değişim, apoptoz dengesinde değişim ve homing mekanizmasında aksaklıklar meydana geldiği, böylece pek çok kanser türünde etkisi olduğu belirtilmiştir (Zoller M., ve ark 2011). Ayrıca yapılan bir çalışmada, CD44'ün hyaluronik asite bağlanarak mezenkimal hücrelerin göçünde etkin rol oynadığını belirtilmiştir (Zhu H., ve ark 2006).

#### **2.4.2.1.b. CD56 (NCAM, Neural Cell Adhesion Molecule)**

CD 56 (NCAM, neural cell adhesion molecule), nöral hücre adezyon molekülü olarak bilinen, yaklaşık 140 kDa ağırlığında bir hücre yüzey proteinidir (Kusafuka K., ve ark 2011). Heparan sülfat ve kollajen gibi ekstraselüler matriks proteinleri arasında kalsiyum bağımlı heterofilik adezyonu düzenler. Erken embriyoner dönemden itibaren eksprese edilmeye başlar. Çeşitli büyüme faktörleri, cAMP, hormon ve transmitterler ile düzenlenir. Hem embriyoner hem de daha ileri dönemde sinir sisteminin gelişim ve organizasyonunda önemli olan bir belirteçtir. Mezenkimal dokuların gelişim sürecinde (kalp, düz ve çizgili kas, kıkırdak, böbrek epiteli, deri) etkindir. Ayrıca CD56 sinir sistemi dışında gelişen gonadlardan, endokrin hücrelerden, Leydig hücrelerinden, mikrovasküler endotel hücrelerden, damar düz kas hücrelerinden, böbrek epitel hücrelerinden, hemopoetik hücrelerden, natural killer hücrelerden, kondrositlerden de eksprese edilir. Gelişim döneminde CD56 ekspresyonu aşırı miktarda ve geniş alanlarda bulunur, erişkin bireylerde ise buna oranla daha azdır. Erişkinlerde özellikle sinir ve kas doku yenilenmesinde, doku bütünlüğü sağlamada, yara iyileşmesinde önemlidir. Akciğer karsinomları, nöroblastoma polimiyelosiz gibi bazı hastalıklarda aşırı eksprese olur. Ratlarda CD56'nın beyincik, medulla spinalis ve otonomik sinirlerde lokalizasyonuna bakılan bir çalışmada, beyincik Purkinje hücrelerinin çok zayıf, beyin korteksinin moleküllere tabakasında orta seviyede, medulla spinalisin endepimal hücrelerin bulunduğu alanlar ile otonomik sinir sistemine ait yapılarda yüksek miktarda lokalize olduğu bildirilmiştir (Filiz S., ve ark 2002). Tüm bunlar yanında, CD56'nın naturel killer hücreler, nöron ve kas hücreleri için özel bir belirteç olduğu da

vurgulanmıştır (Zola H., ve ark 2007). Kemik iliğinden köken alan mezenkimal hücrelerin alt birimleri tarafından eksprese edildiği bulunmuş ve mezenkimal hücrelerin çoğalmasında önemli olduğu ortaya konmuştur (Battula V.L., ve ark 2009).

#### **2.4.2.1.c. CD 73 (ekto 5'nukleotidas)**

CD73, yaklaşık olarak 70 kDa ağırlığında, glikosilfosfatidilinositol bağlı hücre membran glikoproteinidir. Yüzey bağımlı CD73 adenoin 5 monofosfat metabolizmasında görev alır. CD73 lenfositler ve alt tiplerinde, endotel hücrelerde ve epitel hücrelerde eksprese edilir (Colgan S.P., ve ark 2006; Mills J.H., ve ark 2008). Epitelyal sıvı iyon transferi ve hücreler arası bariyer olma gibi pekçok fizyolojik olayı kontrol eder. İnflamasyon veya herhangi bir nedene bağlı hipoksi durumunda, ATP dönüşümü ile, hücrenin ve dokunun adaptasyonunu sağlar. CD73 geni olmayan farelerle yapılan çalışmalarda, glomerular filtrasyonda azalma başta olma üzere böbrek fonksiyonlarında bozulmalar izlenmiştir. Bunun yanında artan hipoksi nedeniyle, damarlarda sızıntı ve kaçaklar görülmüştür. Aynı zamanda CD73, adozin hedefli pek çok ilaç yapısına katılarak, tedavide kullanılmaya başlanmıştır. (Colgan S.P., ve ark 2006). Ecto-5'-nucleotidaz (CD73) kemik iliği stromal etkileşimlerde (Barry F., ve ark 2001), mezenkimal hücrelerin göçünde ve mezenkimal hücrelerin adaptif bağışıklıktaki potansiyel modülasyonunda (Ode A., ve ark 2011) etkilidir. Tüm bu özellikleri yanında CD73 beyinde nöromodülasyon ve homeostazı sağlar. Ecto-5'-nucleotidase enzimi miyelin, astrosit ve aktive olmuş mikroglia belirteci olarak tanımlanmıştır (Langer D., ve ark 2008).

#### **2.4.2.1.d. CD90 (Thy-1)**

CD90, moleküler ağırlığı 17.500 olan, hücre yüzey membran glikoproteinidir. İlk olarak fare beyin ve timüs dokusunda tanımlanmıştır (Reif A.E. ve Allen J.M.V., 1964). Yetişkin rat beyin dokusunda nöronlarda gözlenmiş ancak glial hücrelerde görülmemiştir. Fare ve ratlarda beyin dokusunda, Thy-1 miktarı doğumla birlikte azalır. Doğum sonrası 3.hafta sonuna kadar giderek artar. Yapılan bir çalışmada, rat embriyoner gelişim döneminde ilk defa beyinciğin beyaz cevherinde izlenmiştir. Postnatal dönemde 0.günden itibaren doğuma kadar beyin dokusunda miktarı artar (Barclay A.N., 1978). T hücrelerinin kendi aralarında ve çevre hücreler ile olan etkileşimine aracılık ettiği öne sürülmüştür (Haeryfar S.M.M ve Hoskin D.W., 2004).

Bununla birlikte, T hücrelerin fibroblast ve endotel hücrelerine monosit ve lökositlerin yapışmasından sorumlu olabileceği belirtilmiştir (Saalbach A., ve ark 2000).

#### **2.4.2.1.e. CD105 (endoglin)**

CD105, endoglin olarak da bilinen, TGF  $\beta$  reseptör kompleksine ait yaklaşık olarak 95 kDa ağırlığında, disülfid bağlı monodimerik membran proteindir (Dagdeviren A., ve ark 1998). Endotel hücreleri, embriyoner dönemin 8,5-10,5. günlerinde görülmeye başlar. Dolayısıyla endoglin, gastrula aşamasını takiben, ekstraembriyonik mezoderimde izlenmeye başlar (Ema M., ve ark 2006). Özellikle embriyoner dönem ve kardiyovasküler sistem için temel olaylardan biri olan anjiyogenezde, eritrositlerin göç yolunun düzenlenmesi, sitoskelet organizasyonu ve canlılığının korunmasında önemlidir (Mark P., ve ark 2013). CD105 kültüre edilen insan mezenkimal kök hücrelerde hızlı ve oldukça iyi bir belirteçtir (Mark P., ve ark 2013). Yapılan bir çalışmada, endoglin geni bloke edilen fare embriyolarında, 10,5. günde yoğun hemoraji, çeşitli embriyoner ve kardiyovasküler bozukluklar meydana geldiği izlenmiştir (Kitabayashi A.N., ve ark 2009). Çeşitli insan kanser dokularında, kanserli bölgede erken dönemde küçük kan damarları çevresinde CD105 pozitif immüno lokalizasyon gösterdiği bildirilmiştir (Fonsatti E., ve Maio M., 2004). Dokuda bulunan damarlarda, kan akımının azalmasıyla meydana gelen hipoksik durumlarda, CD105 gen bölgesi TGF uyarısı ile artar ve yeni kan damarları oluşumu başlatılır. Endotel hücrelerinin kültürü ile endoglin geni susturulmuş hücrelerin hızla apoptoza gittiği, endoglin geni olan hücrelerde ise hipoksik durumun yeni damar oluşumunu hızlandırmasıyla, endoglin ekspresyonunu artırdığı ve apoptozu engellediği belirlenmiştir (Li C., ve ark 2003). Endoglinin, mezenkimal kök hücreler dışında hemopoetik kök hücreler ve nöral kök hücrelerden de eksprese edildiğine dair çalışmalar vardır (Pierelli L., ve ark 2001).

#### **2.4.2.1.f. CD271, P75 (NGF (nervous growth factori sinir büyüme faktörü-p75NTR)**

CD271, p75 (NGF; nervous growth factori sinir büyüme faktörü-p75NTR) olarak da adlandırılan, tümör nekroz faktör (TNFR) süperailisi üyesi bir transmembran hücre yüzeyi reseptörüdür (Rogers M.L., ve ark 2008). 1986 yılında insan melanoma hücrelerinden elde edilen, sinir gelişim faktörü olarak ifade edilen, 75 kDa ağırlığında moleküldür (Johnson D., ve ark 1986). CD271 (P75) reseptörleri tümör nekroz faktöre (TNF) bağlanarak aktive olur. Bu reseptörlerden bazıları p75NTR, BDNF (Brain



derived neurotrofik faktör), Nörotrofin 3 (NT3) ve Nörotrofin 4'dür (NT4) (Barrett G.L., 2000). Embriyoner gelişim döneminde farklı türlerden farklı embriyoner aşamalarda farklı miktarda p75 (CD271) ve reseptörleri (nörotrofinler) eksprese edilir. Nörotrofinler, embriyoner dönemde nöron öncüllerinin çoğalması, farklanması, nöron canlılığının korunması, erken dönem nöron olgunlaşması ve nöronların apoptozun düzenlenmesinde görevlidir (Davies A.M., 1994). CD271'in yetişkinlerde, periferik sinir sistemi, olfaktör glialar ve beyincik purkinje nöronlarından eksprese edildiği ifade edilmektedir. Ayrıca nöronal olmayan dokularda da eksprese edildiği ortaya konmuştur. Miyoblast, kıl follikülleri, böbrek, akciğer, testis dokuları bunlardan bazılarıdır (Rogers M.L., ve ark 2008). CD271, nöronal doku yaralanmalarında, iyileşme bölgesinden fazlaca eksprese edilir. Bunun yanında, Alzheimer, lateral skleroz, nöral krista tümörleri, iskemi, beyincik Purkinje hücresi dejenerasyonu, şizofreni gibi çeşitli nörolojik hastalıklarda CD271 ekspresyonunun azaldığı ifade edilmektedir (Rogers M.L., ve ark 2008). Osteojenik kapasite için erken dönem yüzey belirteci olarak CD271 kullanılmıştır (Alexander D., ve ark 2009). Başka bir çalışmada CD271, dental pulpa kök hücre kültürlerinde ileri farklanmayı engellediği bildirilmiştir (Mikami Y., ve ark 2011). Diğer bir görüş, nöral krista hücre belirteci olması yönündedir (Civenni G., ve ark 2011). İnsan için %100 mezenkimal hücre belirteci değildir, düşük düzeyde hemopoetik hücrelerde de görülebilir (Cuthbert R., ve ark 2012).

#### **2.4.2.2. Hemopoetik kök hücrelerin özellikleri ve belirteçleri**

Hemopoetik kök hücreler, yetişkin kök hücre olarak kabul edilse de memelilerde çok ilginç bir farklılaşma seyri izlerler. Farede hemopoetik kök hücrelerin ilk görüldüğü zaman aralığı gastrulasyonun hemen sonrasındır (E7.5). Ancak bu hücreler yetişkindeki etkinliğini ancak 10.5. günde kazanır (Orkin S.H., 1996). Fötal dönemdeki hemopoez ise birçok dokuda farklı zaman dilimleri içinde var olur. Bu bulgular embriyoda/fetusta hemopoetik kök hücrenin yetişkin döneme benzemeyen bir programa sahip olduğunu düşündürür. Hemopoetik kök hücreler embriyoda/fetusta birden çok noktada eş zamanlı olarak veya ardışık zamanlarda ortaya çıkmakta ve belki de, farklılaşmış, mitoz bölünmesini tamamlamış kan hücrelerinin sayısından bağımsız olarak öncü hücreleri üretmektedir. Memelilerde hemopoezin ilk görüldüğü bölge vitellus kesesidir. Daha sonra aort-gonad çıkıntısı-mezonefroz (AGM) bölgesine taşınır. Bu bölge aynı zamanda mezenkimal kök hücrelerin, endotel öncüsü hücrelerin ve büyük olasılıkla hemanjiyoblastların da köken aldığı bölgedir (Minasi M.G., ve ark 2002). Erişkin bir

insanda hemopoetik kök hücreler ve bunların türevleri kan hücrelerini oluşturmak ve kendi öncüllerini meydana getirmekten sorumludurlar. Yukarıda da bahsedildiği gibi hemopoez ile ilkel kan hücreleri prenatal yaşamın erken dönemlerinde embriyo dışı hemopoez bölgelerinden embriyo içi hemopoez bölgesine geçişle başlar. Embriyoda hemopoez ilk olarak 3. haftanın başında vitellus kesesini oluşturan mezoderm yaprağı içindeki mezenkim hücrelerden farkanmaya başlar. Burada, hemanjiyoplast adı verilen multipotent kök hücrelerden gerçekleşir. Bu hücreler, hem hemopoetik hem de anjiyopoetik öncü hücrelerin ortak atası olarak kabul edilmektedir. Vitellus kesesinde farede 7,5. günde, insanda 20. günde saptanır (Dzierzak E., ve Speck N.A., 2008). Vitellus kesesi hemopoezin başlangıç bölgesi olsa da kalıcı hemopoezin AGM bölgesinden, insanda dördüncü haftada, farede 10,5. günde ortaya çıktığı belirtilmiştir (Boisset J.C., ve ark 2010). Hemopoez farede 11-12. günlerde, insanda 5. hafta ortalarında AGM'den plasentaya ve karaciğere taşınır. Karaciğer fetus dönemindeki en belirgin hemopoez bölgesidir. Fare embriyosunda 14. günde dalağa geçen hemopoez 18. günde kemik iliğine geçer. İnsanda gebeliğin 6. ayında kemik iliğine taşınır ve doğum sırasında hemopoezin büyük kısmını kemik iliği üstlenmiştir. Schofield'in 1978 yılında kemik iliği yapımının düzenlenmesine ilişkin tanımlamasında önerdiği gibi, hem ilkel hem kalıcı hemopoez, hücrelerin mikroçevresinden yani nişten gelen uyarılara şiddetli gereksinim duyar. Burada niş, kök hücre işlevini zaman ve mekan bakımından uygun sinyallerle destekleyen bir mikroçevre olarak tanımlanabilir. Burada hemopoetik kök hücre ve öncüllerine destek görevi yapan, onların işlevini doğrudan etkileyen stroma hücreleri bulunur. Bunların bir bölümü hemopoetik kök hücre sınıfındadır.

Çevre mezenkim hücreleri tarafından FGF2 etkisi, hemanjiyoplastlarda HOXB5 geninin uyarılmasına ve hücrelerin FGF2'ye yanıt vermesini sağlar. Diğer mezenkim hücreleri arasında şekillenmeye başlayan ilkel kan adacığının ortasında kalan hemanjiyoplastlar, hemopoetik kök hücre olarak farklanırken çevredeki hemanjiyoplastlar endotel hücrelere farklanır. İlerleyen aşamalarda ise VEGF, PDGF gibi pek çok büyüme faktörü ve bunların salınımını sağlayan Notch yolağı gibi yollar görevlidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda özellikle nöral tüp gelişiminde de etkisi olan sinyal mekanizmalarının hemopoetik kök hücre davranışlarına etkisi araştırılmıştır. Embriyo vücut planının oluşmasında ve organogenezde önemi olan HOX geni olmayan farelerin hemopoetik kök hücre yapılarında da bozulmalar izlenmiştir (Akala O.O., ve Clark M.F., 2006).

Hemopoetik hücreleri *in vitro* olarak tanımlayabilmek için birçok yöntem geliştirilmiştir. Günümüzde büyük ve karışık bir hücre grubu içinde az sayıda bulunabilen kök hücrelerin tanınması ve tespiti “Floresanla aktive hücre ayırma (FACS)” yöntemi ile mümkün olmaktadır (Ploemacher R.E., 1997). Bu yöntemde; floresan boya ile işaretli monoklonal antikorlarla tanımlanabilen hücre yüzey proteinlerinden yararlanılmaktadır. İnsan hemopoetik kök hücreleri için tanımlanmış belirteçler şunlardır; CD31, CD34, CD45, CD117 (Sally A. ve Jones B., 2012), CD11, CD14 ve HLA-DR (Dominici M., ve ark 2006).

#### **2.4.2.2.a. CD14**

CD 14; 55 kDa ağırlığında glikoprotein yapıda bir hücre yüzey reseptörüdür. Hemopoetik kök hücrelerin temel moleküler belirteci olması yanında, monosit farklılaşma antijeni olarak ve T hücrelerinin proliferasyonundan sorumludur. Bir diğer görevi de hücre-hücre ilişkisini sağlamaktır. Çeşitli sitokinlerin etkisiyle monositlerin endotel hücrelerine yapışmasını sağlar. Akut monositik lösemi ve akut miyelomonositik lösemi belirteci olarak kullanılır. Burada CD14 negatif olan durumlarda çoğalamayan ve artık olgunlaşmış hücre varlığından söz edilebilir (Ziegler-Heidbrock H.W.L., ve Ulevitch R.J., 1993; Sally A. ve Jones B., 2012). CD14’ün karaciğer, akciğer ve böbrek yaralanmalarında önemi belirtilmiştir. Bu çalışmalarda karaciğer, akciğer ve böbrekte lipopolisakkaritlere karşı oluşturulan bir mekanizmanın ortaya çıktığı gözlenmiştir. Lipopolisakkaritler, tüm gram negatif bakterilerin dış membranında glikolipit yapıda bir moleküldür. Normalde bağırsak mukozasında yaşayan bu bakterilerin lipopolisakkaritleri, vücudun kendine ait koruyucu mekanizmaları ile tolere edilir. Ancak yaralanma veya patolojik bir durumda artan lipopolisakkaritler karaciğerde Kupffer hücrelerinin, alveolar makrofajların, böbrek glomerül hücrelerinin daha fazla aktive olmasını ve CD14’ün pozitif reaksiyon vermesini sağlar. Patolojik durumlarda monosit öncülü hücrelerin aktive olmasından, CD14 pozitif reaksiyon verdiği düşünülmektedir (Tianxin Y., ve ark 1999; Maus U., ve ark 2001; Su G.L., ve ark 2002). Alzheimer hastalığı gibi kronik nöroinflamasyon hastalıklarında, beyin mikroglyal hücrelerinde CD14 pozitifliğinin arttığı belirtilmiştir (Fassbender K., ve ark 2003). Yapılan başka bir çalışmada, HIV enfeksiyonlu insan beyin dokusunda, parankimal mikroglyal hücrelerde ve makrofajlarda CD14 ile CD45’in yoğun pozitiflik gösterdiği bildirilmiştir (Cosenza M.A., ve ark 2002).

#### 2.4.2.2.b. CD45

CD45; lökosit antijeni (Leucocyt common antigen, LCA) olarak bilinir. Hemopoetik kök hücre hattında bulunan tüm hücrelerin yüzeyinde bulunan, yaklaşık 170-220 kDa ağırlığında, transmembran glikoproteinidir. Yetişkin bireylerde CD45, olgun T lenfositlerde bulunur. Bunun yanında, tüm hemopoetik kök hücrelerde (Sally A. ve Jones B., 2012), trombositler ve olgun eritrositlerin hüce yüzey belirtecidir. Ayrıca CD45'in RA, RB, RO olarak ifade edilen çeşitli alt birimleri bulunmaktadır (Craig W., ve ark 1994; Altın J.G., ve Sloan E.K., 1997). CD45 genellikle diğer hücre yüzey molekülleri ile ilişki kurarak hücreler arası etkileşimleri düzenler. Hücreler arasında ilişkiyi sağlayan moleküller, hücre yüzey proteinleri ve karbonhidrat birimleridir. Tavuk ve farelerde yapılan araştırmalarda, embriyoner ve erişkin dönemlerde CD45'in makrofaj/mikroglia özel belirteci olduğu belirtilmiştir (Cuadros M.A., ve ark 2006). İnsanda gelişen spinal kordda CD45 immüno lokalizasyonu zayıf işaretlenmiş olarak izlenirken, yetişkin dönemde varlığını devam ettirmediği belirtilmiş ancak motor nöron hastalığına sahip olanların spinal kordunda, CD45 pozitif olarak işaretlenmiştir (Rezaie P., ve ark 1999). Yaralanmış rat beyin dokusunda mikroglia hücrelerinde normal rat beyin dokusuna göre daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir (Karp H.L., ve ark 1994). CD45 immüno lokalizasyonunun patolojik kranial sinir sistemi hastalarında beyin dokusunda arttığı bildirilmiştir (Penninger J.M., ve ark 2001). Alzheimer hastalığında CD45'in mikroglial hücrelerin aktivasyonunun yavaşlamasıyla ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (Tan J., ve ark 2000). Yapılan bir çalışmada HIV'li hastaların T lenfositlerindeki CD45 yüzey reseptörünün azaldığı böylece T hücrelerinin aktivitesinin bozulduğu bildirilmiştir (Mabalingam M. ve ark 1996).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında üretilen yaklaşık 220-240 gram, 20 adet *Wistar albino*, doğum yapmamış dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar 20-24 °C sıcaklık, %50-70 nem ve 12 saat aydınlık karanlık döngünün sağlandığı standart şartlar altında, su ve yiyeceğe serbest erişim imkanı tanınarak barındırıldı. Sıçanlar, embriyoner dönem ve fetal dönem nöral tüp defekti araştırmaları için iki gruba ayrıldı. Embriyoner dönemde kullanılan hayvanlar, gebeliğin 5,5. gününde (Carnegie safha 5-6), intragastrik oral gavajla 40mg/kg retinoik asit verilmiş ve 10,5. gününde (Carnegie safha 9) embriyoları toplanmış olan deney grubu (D1) ve 5,5. gününde retinoik asit yerine aynı miktar zeytinyağı verilen, 10,5. gününde de embriyoları toplanan kontrol grubu (K1) olarak ayrıldı. Fetal dönemde kullanılan hayvanlar ise gebeliğin 10,5. gününde (Carnegie safha 9) intragastrik oral gavajla 40mg/kg retinoik asit verilmiş, 15,5. gününde (Carnegie safha 19) embriyoları toplanmış deney grubu (D2) ve gebeliğin 10,5. gününde aynı miktar zeytinyağı verilmiş, 15,5. gününde embriyoları toplanmış kontrol grubu (K2) olarak ayrıldı. Tüm gruplar çizelge 2’de gösterilmiştir. Çalışma için Cumhuriyet Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu’ndan 04/10/2012 tarih ve B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/104 sayılı onay belgesi alınmıştır (Onay belgesi EK 1’de verilmiştir.)

**Çizelge 2.** Grupların belirlenmesi.

Gruplar	E5,5 (Carnegie 5-6)	E10,5 (Carnegie 9)	E15,5 (Carnegie 19)
D1	40mg/kg RA	Embriyoların toplanması	-
K1	40mg/kg z.yağı	Embriyoların toplanması	-
D2	-	40mg/kg RA	Fetusların toplanması
K2	-	40mg/kg z.yağı	Fetusların toplanması

### **3. 1. Gebelik için siklusların belirlenmesi**

Sıçanların östrus siklusları vajinal sürüntü ile belirlendi (McLean A.C., ve ark 2012). Vajinal sürüntü için 200 µl'lik pipet kullanıldı. Steril olan pipet ucuyla, oda ısısında 100 µl steril distile su vajinal bölgeye verildi. Vajinal bölgeden toplanan vajinal salgı, lama yayılarak havada kurutuldu (Yener T., ve ark 2007). Daha sonra hızlı şekilde azalan alkol serilerinden geçirilerek Harri's hematoksilen boyasında 2 dk boyandı. Boyanan materyal ışık mikroskop altında incelenerek ratlarda östrus sikluslarına karar verildi. Vajinal sürüntü ile proöstrus döneminde olan hayvanlar bir gece çiftleşmeye bırakıldı. Ertesi gün sürüntülerde sperm görülen hayvanlar gebeliğin 0,5. günü olarak kabul edildi (Miller B.H. ve Takahashi J.S., 2014; McLean A.C., ve ark., 2012).

### **3.2. Retinoik asit'in hazırlanması**

Retinoik asit (AtRA: all trans retinoic acid, Santa Cruz) zeytinyağı içinde çözülerek 40mg/kg olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan retinoik asit ışık almaması için aliminyum folyo ile sarılarak buzdolabında bekletildi. Embriyoner dönem deney grubuna (D1) gebeliğin 5,5. gününde, fetal dönem deney grubuna (D2) ise 10,5. gününde gebe hayvanların ağırlıkları tek tek tartılarak, retinoik asit miktarı 40 mg/kg olacak şekilde intragastrik gavaj yolu ile verildi. Kontrol gruplarına ise aynı günlerde retinoik asitin çözdürüldüğü zeytinyağı, hayvanlar tartılarak yine 40 mg/kg olacak şekilde intragastrik gavaj yolu ile verildi. Bu aşamadan sonra gebelik takip edildi ve D1-K1 grupları 10,5. gününde, D2-K2 grupları 15,5. günde yüksek doz sodyum penta-barbital (200 mg/kg) intraperitoneal yolla enjekte edilerek sakrifiye edildi. Gebeliği sonlandırılan ratların embriyoları toplandı.

### **3.3. Stereomikroskop ve ışık mikroskopi**

Toplanan embriyolar Leica EZ40 stereomikroskop altında incelenerek fotoğraflandı. Toplanan embriyolar %10 tamponlanmış nötral formalinde 48 saat fikse edildi. Ardından rutin histolojik yöntemler uygulanarak bloklandı. Bloklanan dokulardan Leica RM 2125 RT mikrotom ile 3-5µm kesitler alındı. Kesitlere hematoksilen eozin boyama ve immünohistokimyasal boyamalar yapıldı. Doku kesitleri önce genel görüntüleri incelenmek amacıyla Nikon SMZ 1500 stereomikroskop ile görüntülendi. Daha sonra Olympus BX51 ışık mikroskop kullanılarak histolojik açıdan değerlendirildi.

### 3.4. İmmünohistokimya

Parafin bloklardan alınan kesitler poly-L-lysine kaplı adhezivli lamalar (Marienfeld) üzerine alındı. Bir gece 56 °C'lik etüvde tutularak parafini giderildi. Kesitler aşağıdaki serilerden geçirilerek saf suda bekletildi. Aşağıdaki işlemler sırayla uygulandı.

- %100 Alkol ... 2 dk
- %96 Alkol ... 2dk
- %96 Alkol ... 2 dk
- %80 Alkol ... 2 dk
- %70 Alkol ... 2 dk
- Distile su ..... 2 dk
- Endojen peroksidazı maskelemek için kesitler oda ısısında H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de (hidrojen peroksit) 5-10 dakika bekletildi.
- 2 defa PBS ile yıkandı.
- Antijenin geri dönüşümünü sağlamak için kesitler, içinde EDTA tamponu (pH=8.5) veya sitrat tamponu (pH=6) kullanıldı (Tablo 2). Lamlar, sitrat veya EDTA bulunan şalelere konarak mikrodalga fırında maksimum ayarda 5 dakika, orta ayarda 15 dakika periyotlarla kaynatıldı.
- Mikrodalga fırından çıkarılan kesitler oda sıcaklığında 20 dakika soğumaya bırakıldı.
- 2 defa PBS ile yıkandı.
- Kesitler 10-15 dakika Ultra V Block (Lab Vision UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP), oda sıcaklığında uygulandı.
- Kullandığımız antikorlar (Çizelge 3) 100µl eklenerek, +4 °C de bir gece bırakıldı (overnight).
- Ertesi gün çıkarılan örnekler 3-4 kere PBS ile yıkandı.
- 20 dakika Biotinlated Goat anti-Rabbit (LabVision UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) 37-40°C de sekonder antikor uygulandı.
- 2 kere PBS ile yıkandı.
- 20 dakika Streptavidin Peroxidase (LabVision UltraVision Large Volume Detection System Anti-rabbit, HRP) 37-40°C de uygulandı.
- 2 kere PBS ile yıkandı.
- 10-15 dakika kromojen (LabVision AEC Substrat System) dokulara uygulandı

- 4 kere PBS den geçirildi.
- 1,5 dakika Harri's Hematoksilen (Merck) ile zıt boyama yapıldı.
- Çeşme suyunda yıkandı.
- Preperatlar kurutulup, kapatıcı (Lab Vision marka Aqueous Mounting Medium) ile kapatıldı.

### **3.5. Kullanılan Cihazlar**

- Doku Takip Cihazı (Leica, Germany)
- Gömme fırını (MKN Taab, UK)
- Su banyosu (Leica, Germany)
- Mikrotom (Leica, Germany)
- pH Metre (Metle Toledo MP 2200, UK)
- Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart, UK)
- Floresan mikroskop (Olympus BX51, Japan)
- Hassas Tartı (Denver Instrument Company, USA)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik MD 554 İntellwave, Türkiye)
- Mikropipetler -10µl, 20µl, 200µl ve 1000µl- (Gilson, USA)

### **3.6. Kimyasal Maddeler**

- Antikorlar (Tablo2)
- Large Volume Vision Mount (125ml, Thermo Sci, USA)
- AEC (Invitrogen, USA)
- Ultra Vision Large Volume Determination System Anti-Polyvalent HRP (Thermo Sci, USA)
- Hidrogen peroxide (Thermo Sci, USA)
- Eozin-Y Solution 0.5% aqueus (Merck, Germany)
- Papanicolau' solution 1a-Harris' Hematoxylin (Merck, Germany)
- Phosphate Buffer Saline (PBS) (Sigma, USA)
- Antibody Diluent Reagent Solution (Invitrogen, USA)
- EDTA (Biooptica, Milano, Italy pH:8 )
- Sitrat (Biooptica, Milano, Italy pH:6)
- Retinoik asit (Sigma/USA)
- Formaldehit (37%, Merck, Germany)



- Ksilen (Merck, Germany)
- Entellan (Merck, Germany)
- Etil alkohol (Merk, Germany)

**Çizelge 3.** Çalışmada kullanılan antikolar, markaları ve antijen geri dönüşümünde kullanılan tamponlar.

<b>Antikorlar</b>	<b>Markalar</b>	<b>Antijen geri dönüşümünde kullanılan tamponlar</b>
CD105	ABBIOTEC(SanDiego/USA) 251222	Sitrat
Pab anti-CD73	Novus Biological (USA) NBP1-85740	EDTA
CD90 (THY-1)	Bioss (USA) bs-0778R	Sitrat
CD44	Bioss (USA) bs-0521R	Sitrat
CD271 (p75 NGF reseptör)	Bioss (USA) bs-0161R	Sitrat
CD56 (NCAM)	Bioss (USA) bs-0736R	Sitrat
CD34	Bioss (USA) bs-0736R	EDTA
CD14	ABBIOTEC (San Diego/USA) 251561	EDTA
CD45	Bioss (USA) bs-0522R	Sitrat

## 4. BULGULAR

### 4.1. Retinoik Asit Doz Bulguları

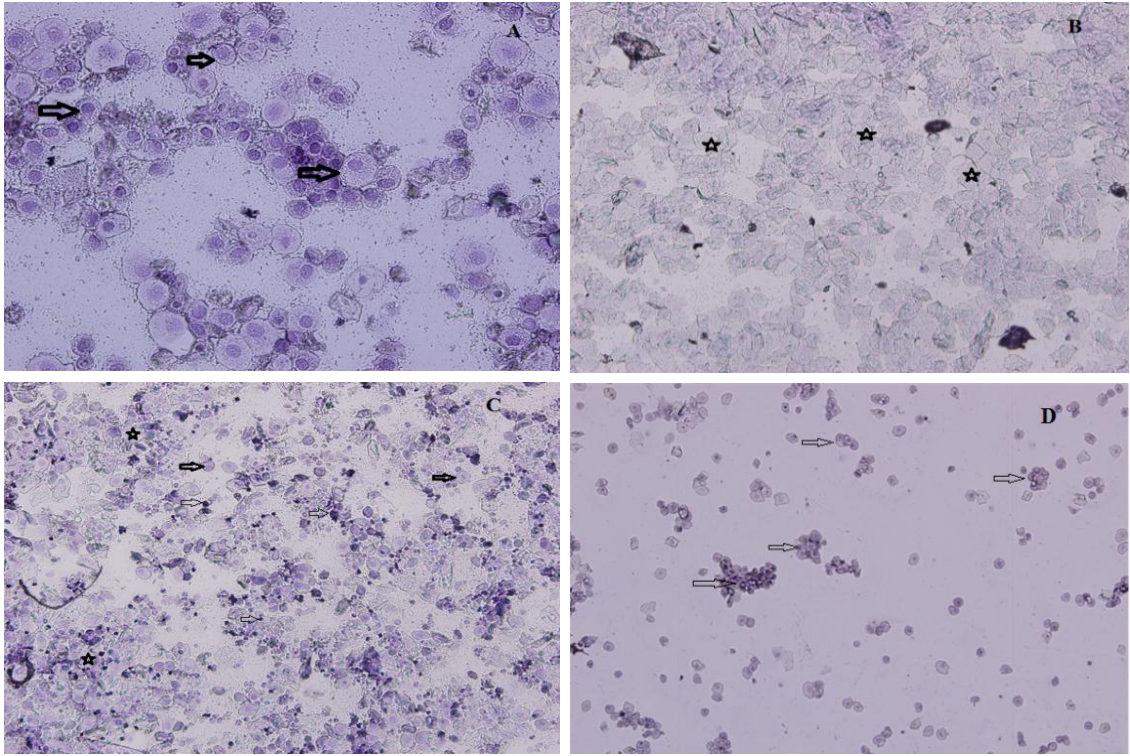
Deneyin başlangıcında nöral tüp defekti oluşturmak için ratlara 50-70 mg/kg retinoik asit oral gavaj yolu ile verilmiştir. Bu dozda embriyoların büyük kısmının rezorbe olması nedeniyle doz miktarı 40 mg/kg olarak belirlenmiştir. Doz ayarlama sırasında retinoik asitin uygulama günleri, gebeliğin kaçınıcı gününde verildiği, retinoik asitin dozu ve buna bağlı rezorbe olan embriyo miktarı Çizelge 4'te verilmiştir.

**Çizelge 4.** Verilen retinoik asitin, uygulandığı tarih, gebeliğin günü, denemede kullanılan miktarları ve bunlara bağlı rezorbe embriyo sayısı.

Uygulamalar	RA verilme günü	RA dozu mg/kg	Rezorbe embriyo sayısı
1	8,5	70	12/12
2	9,5	70	12/12
3	10,5	70	12/12
4	8,5	70	11/11
5	8,5	70	10/10
6	10	60	9/9
7	10	60	12/12
8	9	50	1/2
9	9	50	10/10
10	11,5	50	1/9
11	12,5	50	8/8
12	10,5	50	2/12
13	10,5	40	1/10
14	10,5	40	0/11
15	10,5	40	0/12
16	10,5	40	0/11
17	5,5	40	1/9
18	5,5	40	0/9

## 4.2. Vajinal Sürüntü Bulguları

Yapılan vajinal sürüntü ile alınan örnekler lam üzerine yayılıp boyanarak değerlendirildi. Bu değerlendirme sonucunda, proöstrus dönemde olan hayvanlarda ağırlıklı olarak nükleuslu epitelyal hücreler (Şekil 14 A) belirlendi. Östrus döneminde olan hayvanlarda, vajinal sürüntüde yoğun olarak nükleussuz kornifiye hücreler (Şekil 14 B) görüldü. Meteöstrus dönemindeki hayvanların vajinal sürüntüde, neredeyse birbirine yakın sayıda lökositler, kornifiye hücreler ve nükleuslu epitelyal hücreler (Şekil 14 C) izlenirken diöstrusta ise baskın şekilde lökositler izlendi (Şekil 14 D). Proöstrustan östrusa geçme aralığı 12 saat olduğu için proöstrusta olan hayvanlar belirlenerek çiftleşmeye bırakıldı ve ertesi gün vajinal sürüntüde sperm görülenler ayrılarak gebeliğin 0.5.günü olarak takibe alındı (Şekil 15).



**Şekil 14.** Vajinal sürüntü bulguları. A) Proöstrus siklusunda, yoğun şekilde nükleuslu epitelyal hücreler (⇨) izlenmektedir. B) Östrus siklusunda, kornifiye hücreler (★) yoğun şekilde izlenmektedir. C) Metöstrus siklusunda (★, lökositler, kornifiye hücreler (⇨) ve az sayıda nükleuslu epitel (⇨) hücreler izlenmektedir. D) Diöstrus siklusunda, çok sayıda lökosit (⇨) izlenmektedir.

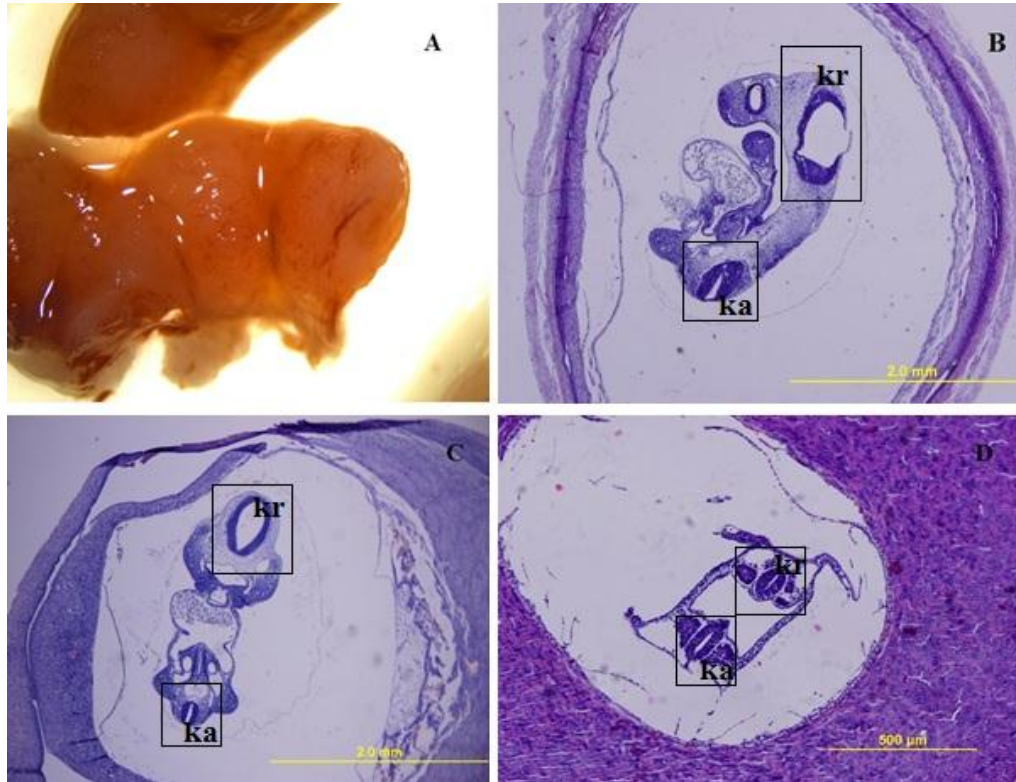


**Şekil 15.** Çiftleşme sonrası alınan vajinal sürüntüde çok sayıda sperm izlemektedir.

### 4.3. K1-D1 grupları bulguları

#### 4.3.1. K1 grubu stereomikroskop ve H&E boyama bulguları

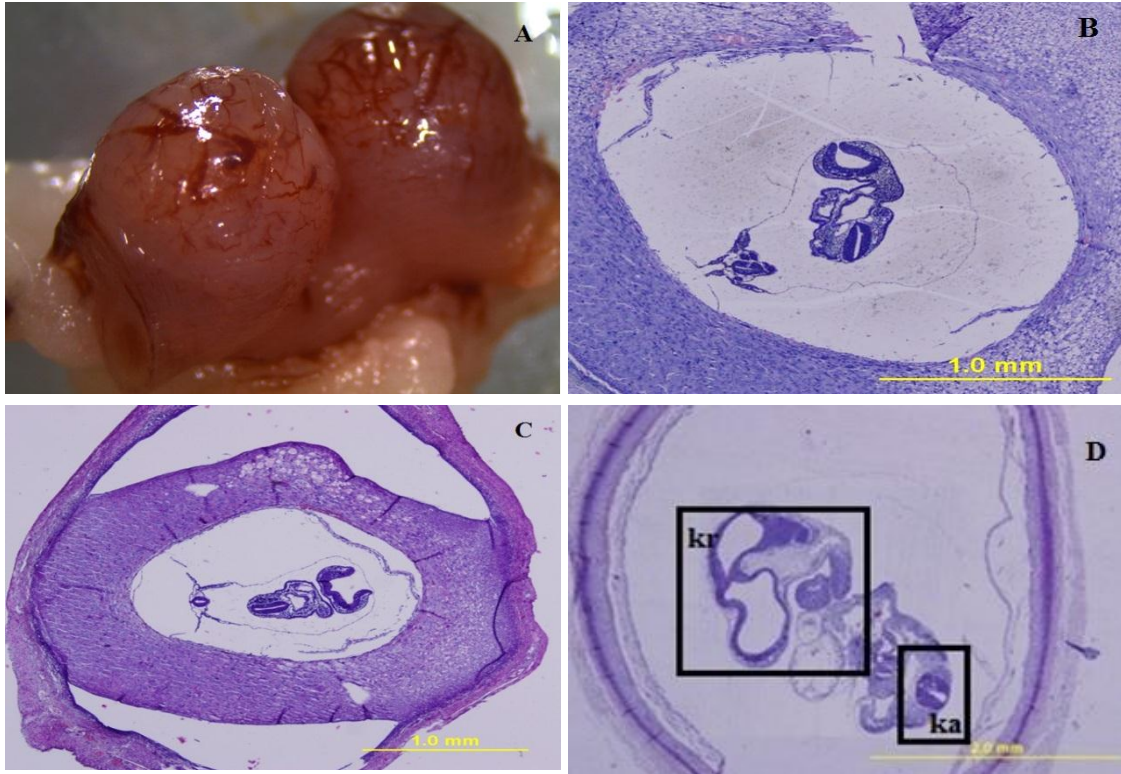
Kontrol grubu 1 (K1), gebeliğin 5,5. gününde 40 mg/kg zeytinyağı intragastrik oral gavaj yolu ile verilmiş ratlardan oluşmaktadır. Gebe ratlar, gebeliklerinin 10,5. gününde sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen ratların embriyoları hızla toplanmış ve stereo mikroskop altında değerlendirilmiştir. Buna göre kontrol grubu embriyolarında, plasenta normal boyutlarda izlenmiştir. Embriyoların dış yüzeyinde herhangi bir hemorajik alanla karşılaşılması (Şekil 16 A). Aynı embriyolardan alınan sagittal, frontal ve transvers seri kesitlere, H&E boyama yapılmış, embriyonun genel görüntüsünün normal olduğu belirlenmiştir. Kranial ve kaudal nöroporların normal bir nöroepitele sahip olduğu izlenmiştir (Şekil 16 B, C, D).



**Şekil 16.** K1 grubunda bulunan embriyoların; A) Stereomikroskop görüntüsü, B) Sagittal kesit (H&E 4X), C) Frontal kesit (H&E 4X), D) Transvers kesit (H&E 10X) görüntüleri izlenmektedir (kr: kranial nöropor, ka: kaudal nöropor).

#### 4.3.2. D1 grubu stereomikroskop ve H&E boyama bulguları

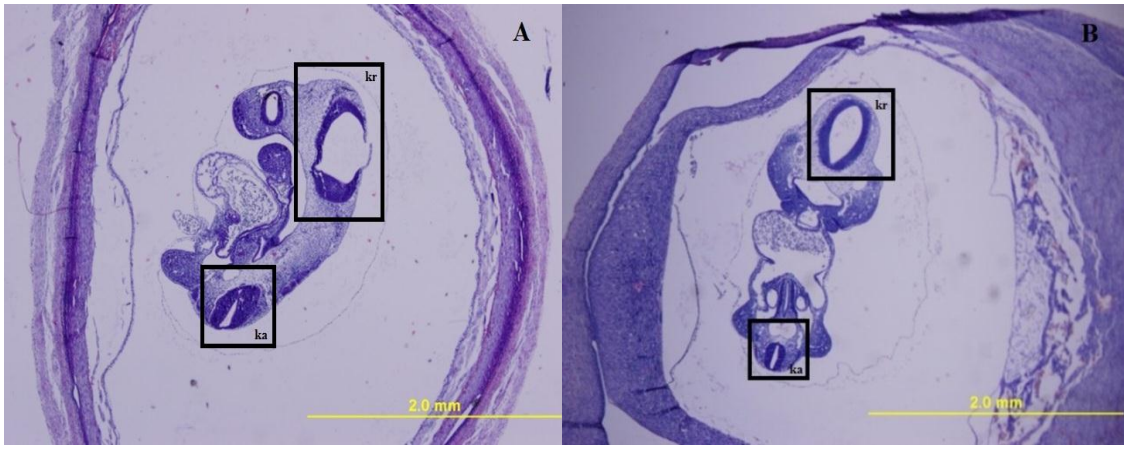
Deney grubu 1 (D1), gebeliğin 5,5. gününde, 40 mg/kg retinoik asit intragastrik oral gavajla verilmiş olan ratlardan oluşmaktadır. Gebeliğin 10,5. gününde sakrifiye edilerek hızla embriyoları toplanmış, stereomikroskop altında makroskobik olarak değerlendirilmiştir. D1 grubu embriyolarının normalden küçük olduğu belirlenmiştir. Embriyoların deri altında yoğun hemorajik alanlar izlenmiştir (Şekil 17 A). Aynı embriyoların sagittal ve transvers yönde alınan seri kesitlerine H&E boyama yapılmıştır. İncelenen kesitlerde embriyoların bazılarında kranialde açık nöral tüp izlendiği (Şekil 17 B) ve kranial bölümün boyun bölgesinden sonra düzgün şekilde devamlılık göstermediği (Şekil 17 C) ve anormal aksial rotasyon (neural tube twisting, kinking, abnormal axial turning) belirlenmiştir (Şekil 17 D).



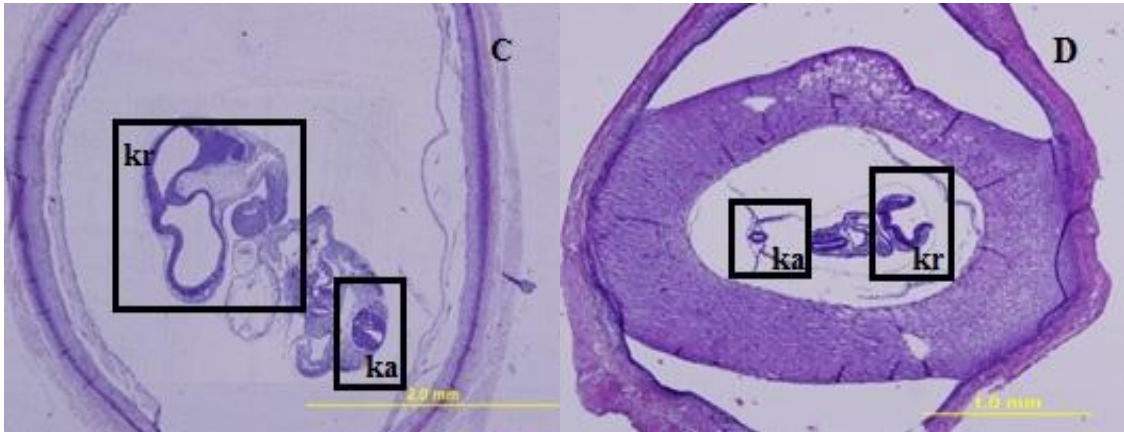
**Şekil 17.** D1 grubunda bulunan embriyolar; A) Stereomikroskopta yoğun hemorajik alanlar ( ⇨)(8X), B-C) Transvers kesitte açık nöral tüp ve anormal aksiyal rotasyon (H&E, 4X). D) Sagittal kesitte anormal aksiyal rotasyon görüntüleri izlenmektedir (H&E, 4X) (kr: kranial nöropor, ka:kaudal nöropor).

### 4.3.3. K1-D1 Grupları immünohistokimya bulguları

K1-D1 gruplarına yapılan mezenkimal kök hücre belirteçlerinden olan CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD271 ve hemopoetik kök hücre belirteçlerinden olan CD14 ile CD45 immünohistokimyasal boyamalar uygulanmıştır. Yapılan immünohistokimyasal boyamalar semi-kantitatif skorlama yöntemiyle değerlendirilerek sonuçlar Çizelge 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19’da verilmiştir. Bu grupta bulunan embriyoların sagittal ve transvers seri kesitlerine yapılan immünohistokimyasal boyamalar, tüm gruplarda aynı alanlara denk gelecek şekilde değerlendirilmiştir. Bu alanlar K1 grubu için; Şekil 18 A-B’de, D2 grubu için; Şekil 18 D-E’de gösterilmiştir.



**Şekil 18. A, B.** K1 grubu sagittal kesitte (A), transvers kesitte (B), kranial (kr) ve kaudal (ka) nöral tüp bölgeleri.

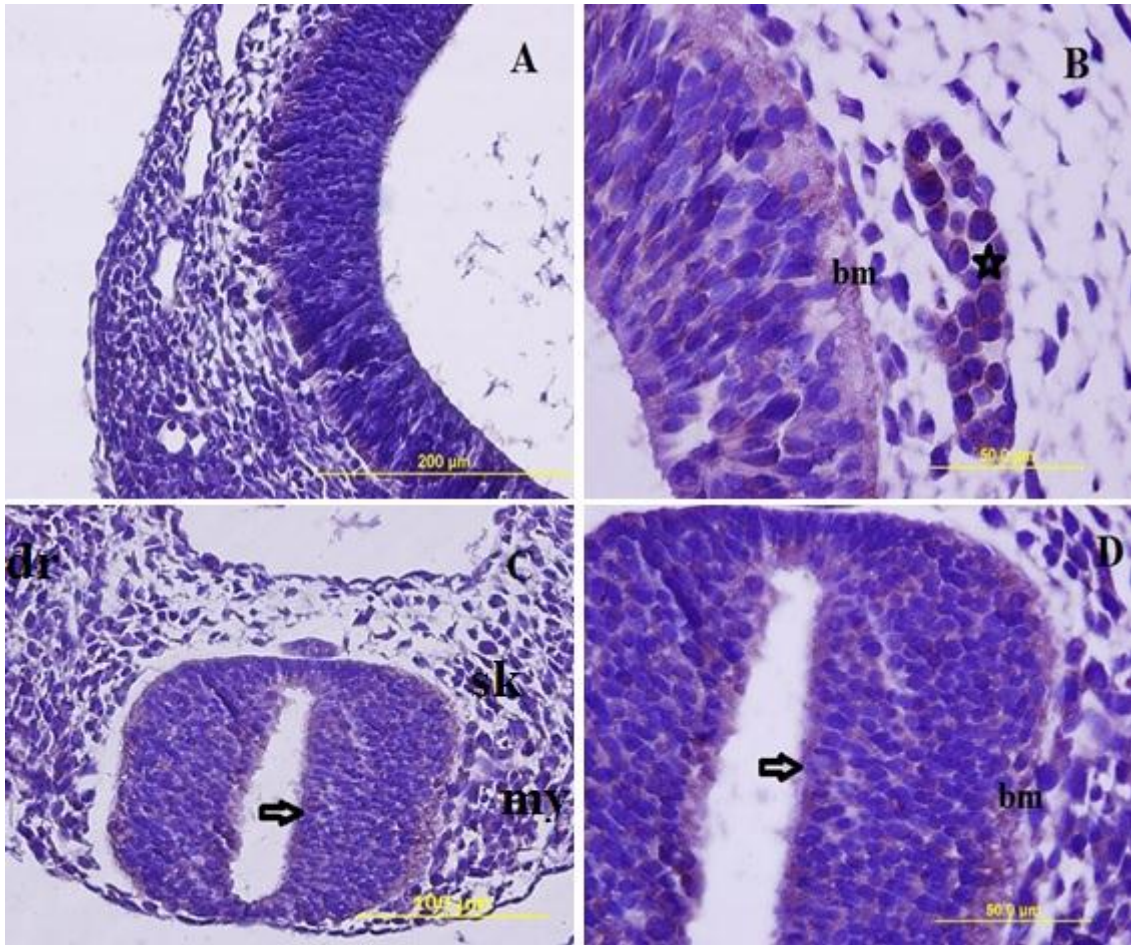


**Şekil 18 C, D.** D1 grubu sagittal kesitte (C), transvers kesitte (D), kranial (kr) ve kaudal (ka) nöral tüp bölgeleri.



#### 4.3.3.1. K1 grubu CD44 bulguları

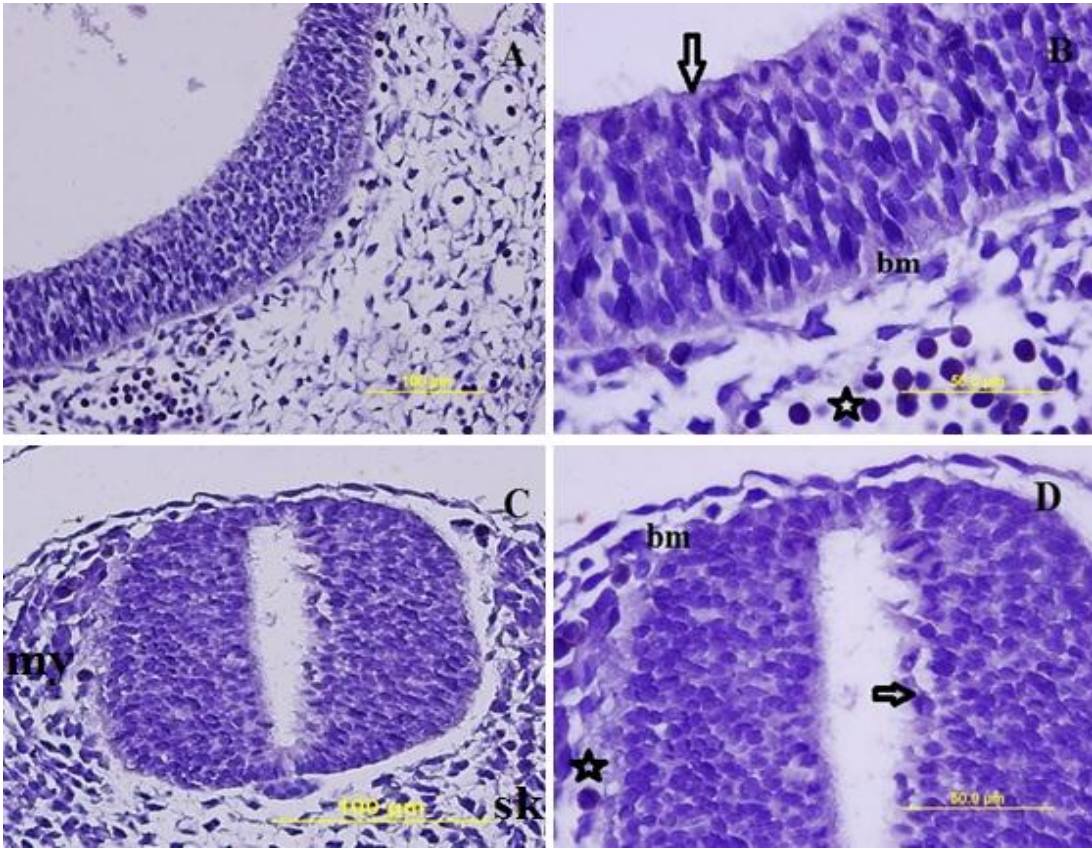
CD44 boyamayla mezenkimal kök hücrelerin belirlenmesi amaçlanmış ve genel olarak K1 grubunda orta şiddette ekspresyon görülmüştür. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında, primitif endodimal tabakada orta şiddette lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar izlenmiştir (Şekil 19 A-D). Nöroporların çevresindeki sklerotom, miyotom, dermatom bölgesinde bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde ve kan damarları içinde bulunan hücrelerin bazılarında da CD44 immünolokalizasyonunun orta şiddette olduğu görülmüştür (Şekil 19 B-D).



**Şekil 19.** K1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında (bm), primitif endodimal tabakada (⇨) kan damarları ve içinde bulunan hücrelerde (★), sklerotom (sk), miyotom (my) ve dermatomda (dr) CD44 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X

#### 4.3.3.2. K1 grubu CD56 bulguları

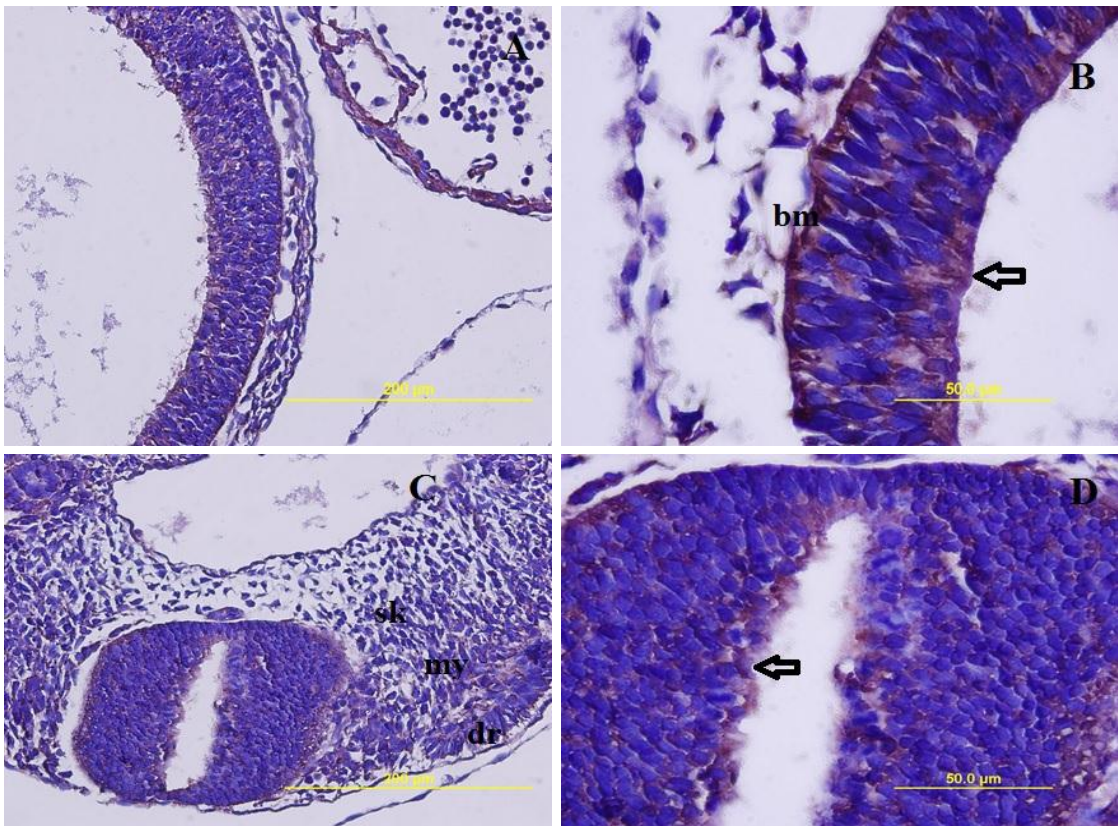
Yapılan CD56 boyamayla K1 grubunda mezenkimal kök hücrelerin işaretlenmesi amaçlanmıştır. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında, primitif endodermal tabakada zayıf şiddette lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar izlenmiştir (Şekil 20 A-D). Nöroporların çevresinde sklerotom, miyotom, dermatom bölgesinde bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde zayıf şiddette iken, kan damarları içinde bulunan hücrelerin bazılarında CD56 immüno lokalizasyonunun orta şiddette olduğu görülmüştür (Şekil 20 B, D).



**Şekil 20.** K1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında (bm), primitif endodermal tabakada (⇨), kan damarlarının bulunduğu alanlar (★), sklerotom (sk) ve miyotomda (my) CD56 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.3. K1 grubu CD73 bulguları

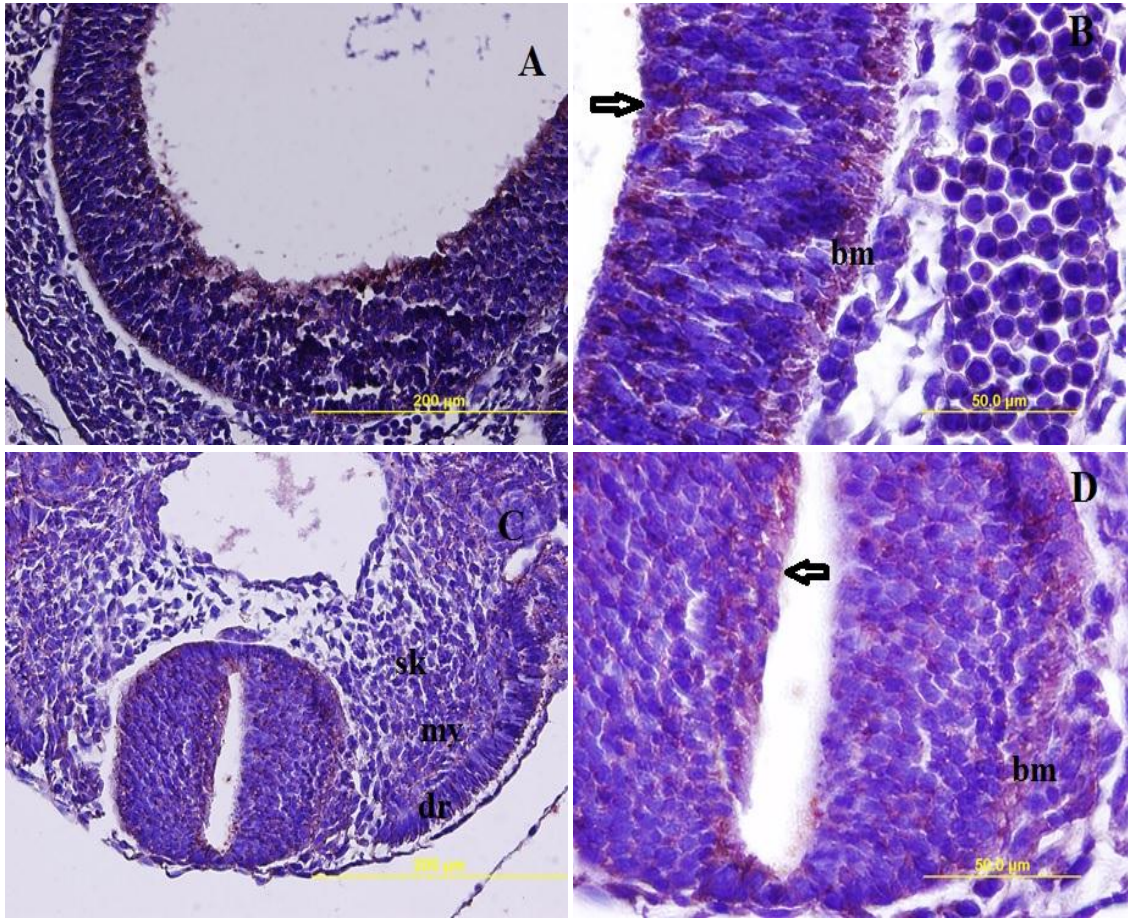
Çalışmada K1 grubunda CD73 boyamayla mezenkimal kök hücreler genel olarak, orta şiddette immüno lokalizasyon göstermiştir. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde orta şiddette lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar görülmüştür (Şekil 21 A-D). Nöroporların bazal membranında ve primitif endodermal tabakada yoğun boyanmalar belirlenmiştir (Şekil 21 B, D). Nöroporların çevresinde bulunan sklerotom, miyotom, dermatom alanlarında bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde ve kan damarları içinde bulunan hücrelerin bazılarında da CD73 immüno lokalizasyonunun orta şiddette olduğu görülmüştür (Şekil 21 A-C).



**Şekil 21.** K1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, bazal membranda (bm), primitif endodermal tabakada (⇨), nöroepitel çevresinde sklerotom (sk), miyotom (my), dermatomda (dr) CD73 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.4. K1 grubu CD90 bulguları

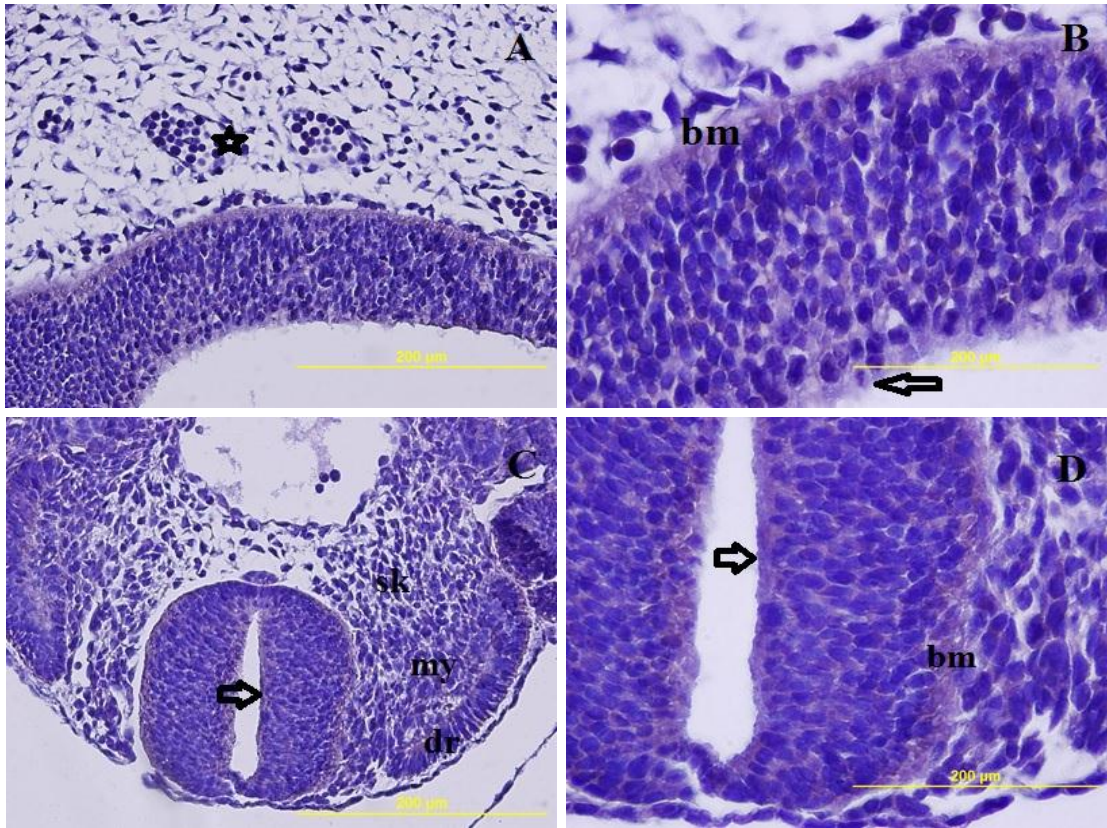
Çalışmanın devamında yapılan CD90 boyamayla mezenkimal kök hücreler işaretlenmiş, K1 grubunda orta şiddette lokalizasyon izlenmiştir. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında, primitif ependimal tabakada yoğun lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar görülmüştür (Şekil 22 A-D). Sklerotom, miyotom, dermatomda, kan damarları endotel hücrelerinde ve kan damarları içinde bulunan hücrelerin bazılarında da CD90 immüno lokalizasyonunun orta şiddette olduğu görülmüştür (Şekil 22 B, C).



**Şekil 22.** K1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında (bm), primitif ependimal tabakada (⇨), sklerotom (sk), miyotom (my), dermatomda (dr) CD90 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.5. K1 grubu CD105 bulguları

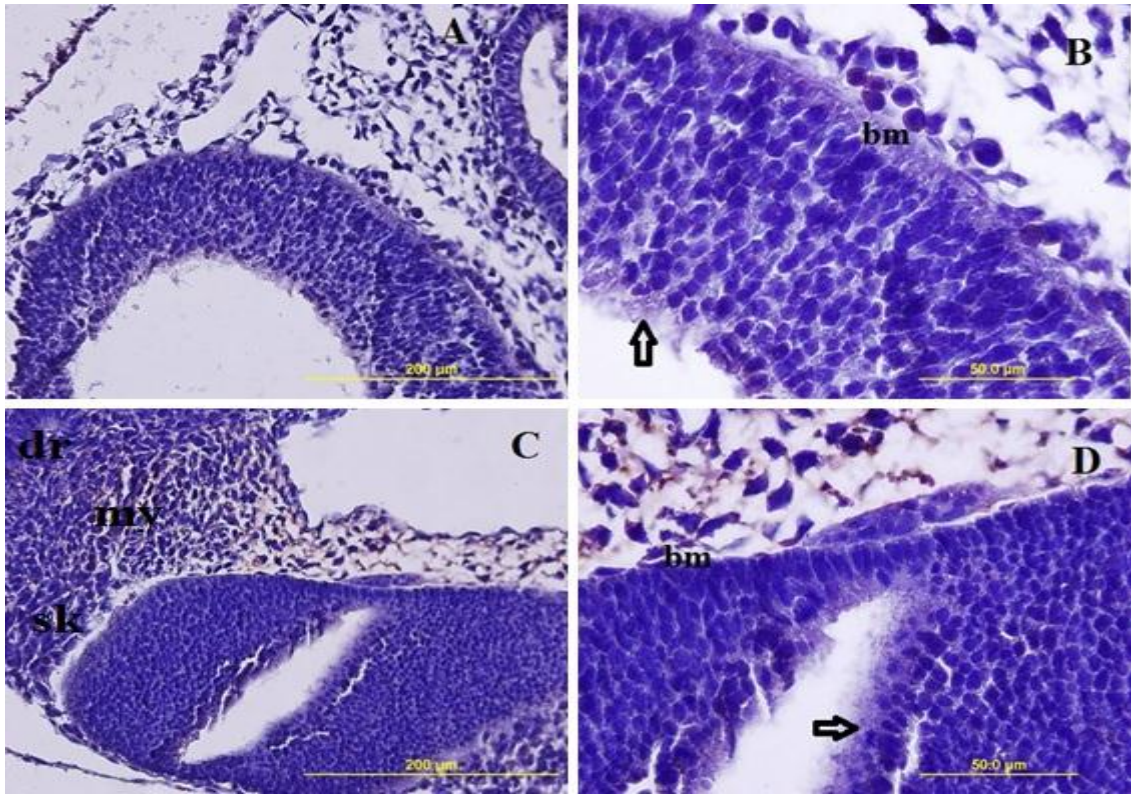
Yapılan CD105 (endoglin) boyamayla, mezenkimal kök hücrelerin işaretlenmesi amaçlanmış ve kontrol grubunda genel olarak zayıf şiddette lokalizasyon izlenmiştir. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde zayıf boyanan hücreler görülmüştür (Şekil 23 A-D). Primitif endimal tabakada bulunan hücrelerin sitoplazmalarında ve nöroepitelin bazal membranında orta şiddette boyanma izlenmiştir (Şekil 23 B-D). Nöroporların çevresinde, sklerotom, miyotom ve dermatomda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları içinde bulunan hücrelerde orta şiddette CD105 ekspresyonu belirlenmiştir (Şekil 23 A, C).



**Şekil 23.** K1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitel çevresinde sklerotom (sk), miyotom (my), dermatomda (dr), nöroepitelin bazal membranında (bm), ventriküler zonda bulunan ( ⇨ ) ve damar içinde bulunan hücrelerde ( ☆ ) CD105 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.6. K1 grubu CD271 bulguları

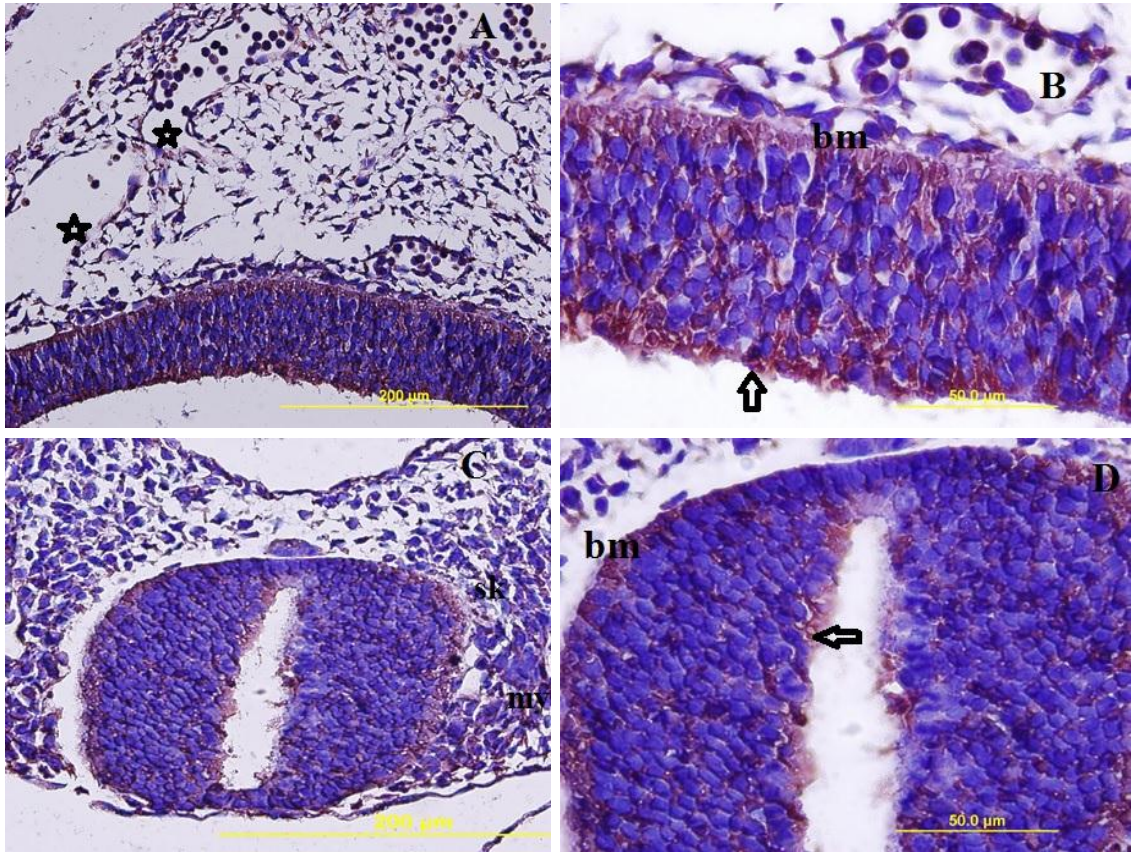
K1 grubu CD271 bulgularına bakıldığında genel olarak, zayıf şiddette immünolokalizasyon izlenmiştir. CD271 mezenkimal kök hücre işaretleyicisidir. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında, primitif ependimal tabakada zayıf şiddette lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar belirlenmiştir (Şekil 24 A-D). Nöroporların çevresinde sklerotom, myotom, dermatom bölgesinde bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde ve kan damarları içinde bulunan hücrelerin bazılarında CD271 immünolokalizasyonunun orta şiddette olduğu görülmüştür (Şekil 24 B, D).



**Şekil 24.** K1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroporun bazal membranında (bm), primitif ependimal tabakada (⇨), sklerotom (sk), myotom (my) ve dermatomda (dr) CD271 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.7. K1 grubu CD14 bulguları

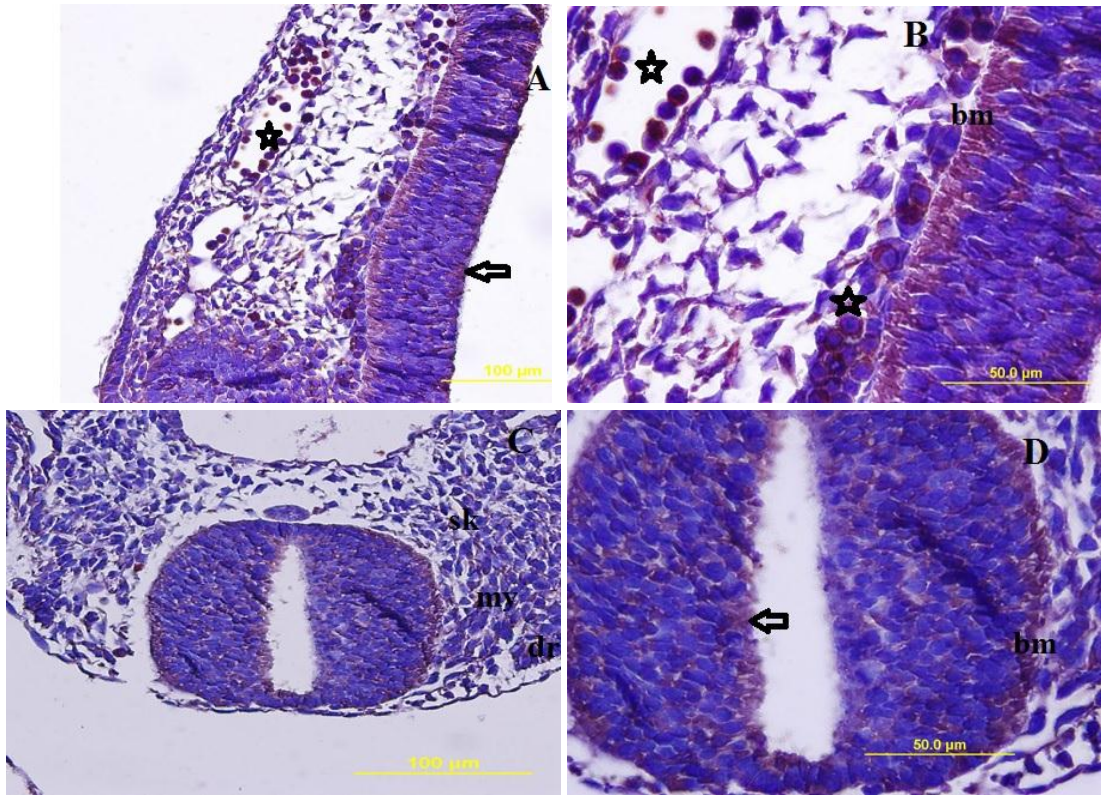
Yapılan CD14 boyamayla hemopoetik kök hücrelerin lokalizasyonu kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında, primitif endepimal tabakada yoğun şiddette lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar izlenmiştir (Şekil 25 A-D). Nöroporların çevresinde sklerotom ve myotom bölgesinde bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde, kan damarları içinde bulunan hücrelerin bazılarında da CD14 immünolokalizasyonunun çok yoğun şiddette olduğu görülmüştür (Şekil 25 A, C).



**Şekil 25.** K1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında (bm), primitif endepimal tabakadaki hücrelerin sitoplazmasında (⇨), sklerotom (sk) ve myotomda (my) CD14 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.8. K1 grubu CD45 bulguları

K1 grubunda CD45 antikoru hemopoetik kök hücreleri işaretlemek için kullanılmıştır. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında, primitif endepimal tabakada bulunan hücre sitoplazmalarında yoğun şiddette lokalizasyon gösteren alanlar izlenmiştir (Şekil 26 A-D). Nöroporların çevresindeki sklerotom, miyotom, dermatomda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde orta şiddette lokalizasyon görülürken, kan damarları içinde bulunan hücrelerin bazılarında CD45 immünolokalizasyonunun yoğun şiddette olduğu görülmüştür (Şekil 26 A, B).

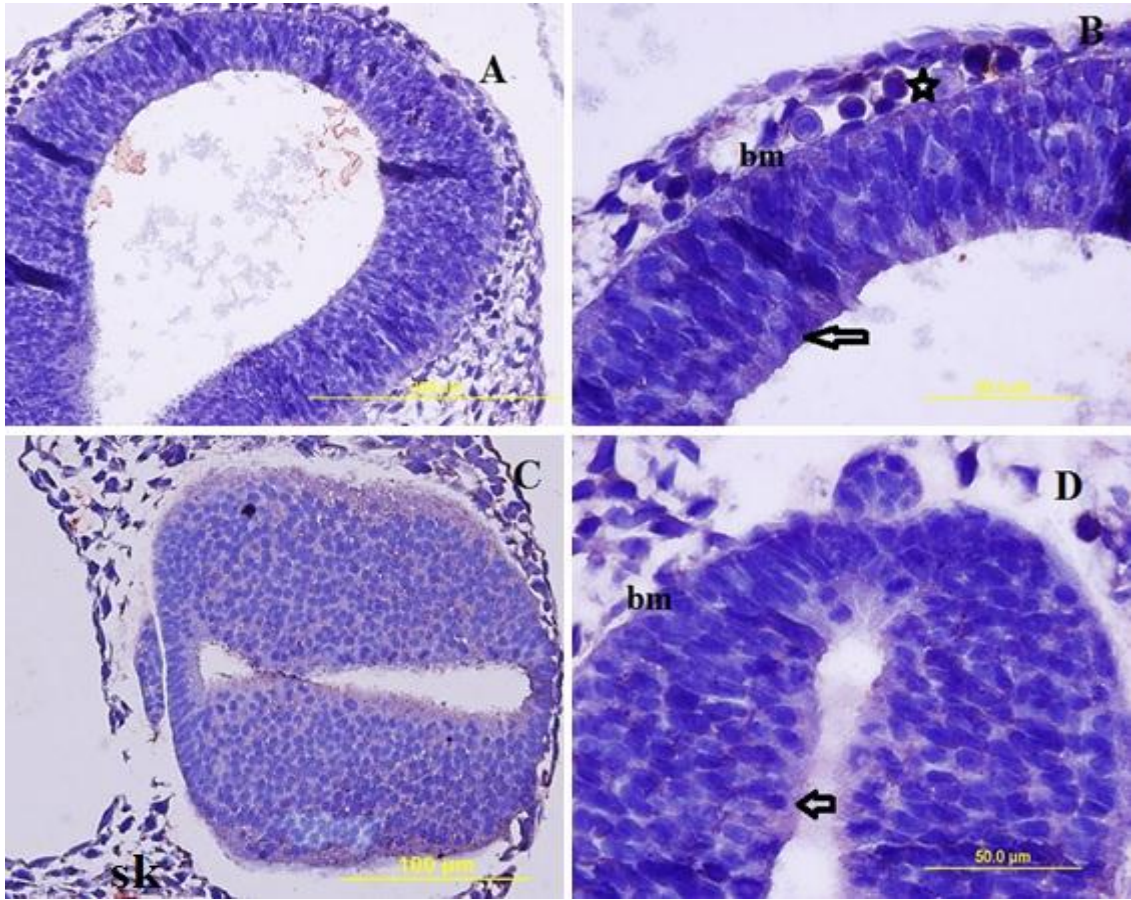


**Şekil 26.** K1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında (bm), primitif endepimal tabakada (⇨), nöroepitel çevresinde sklerotom (sk), miyotom (my), dermatomda (dr), kan damarları içinde bulunan hücre sitoplazmalarında (★) CD45 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.



#### 4.3.3.9. D1 grubu CD44 bulguları

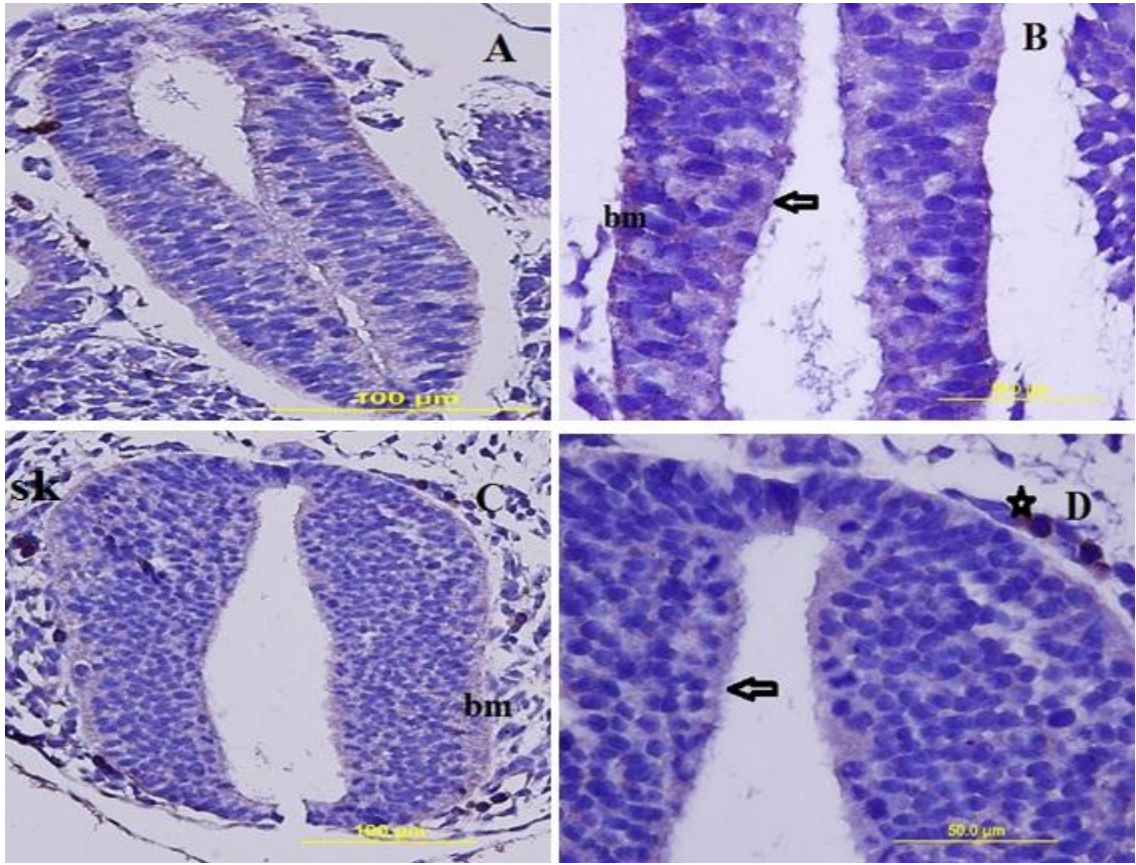
Bir mezenkimal kök hücre belirteci olan CD44 boyamayla genel olarak D1 grubunda, zayıf şiddette lokalizasyon belirlenmiştir. Kraniyal ve kaudal nöroporun nöroepitelinde zayıf şiddette lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar izlenmiştir (Şekil 27 A-D). Nöroporların çevresindeki sklerotom bölgesinde bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, nöroepitelin bazal membranında, primitif ependimal tabakada ve kan damarları içinde bulunan hücrelerde de CD44 immüno lokalizasyonunun zayıf olduğu görülmüştür (Şekil 27 B-C).



Şekil 27. D1 grubunda, kraniyal (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitel bazal membranında (bm), primitif ependimal tabakada ( ⇨ ), kan damarlarının içinde bulunan bazı hücrelerde ( ☆ ), sklerotomda (sk) CD44 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.10. D1 grubu CD56 bulguları

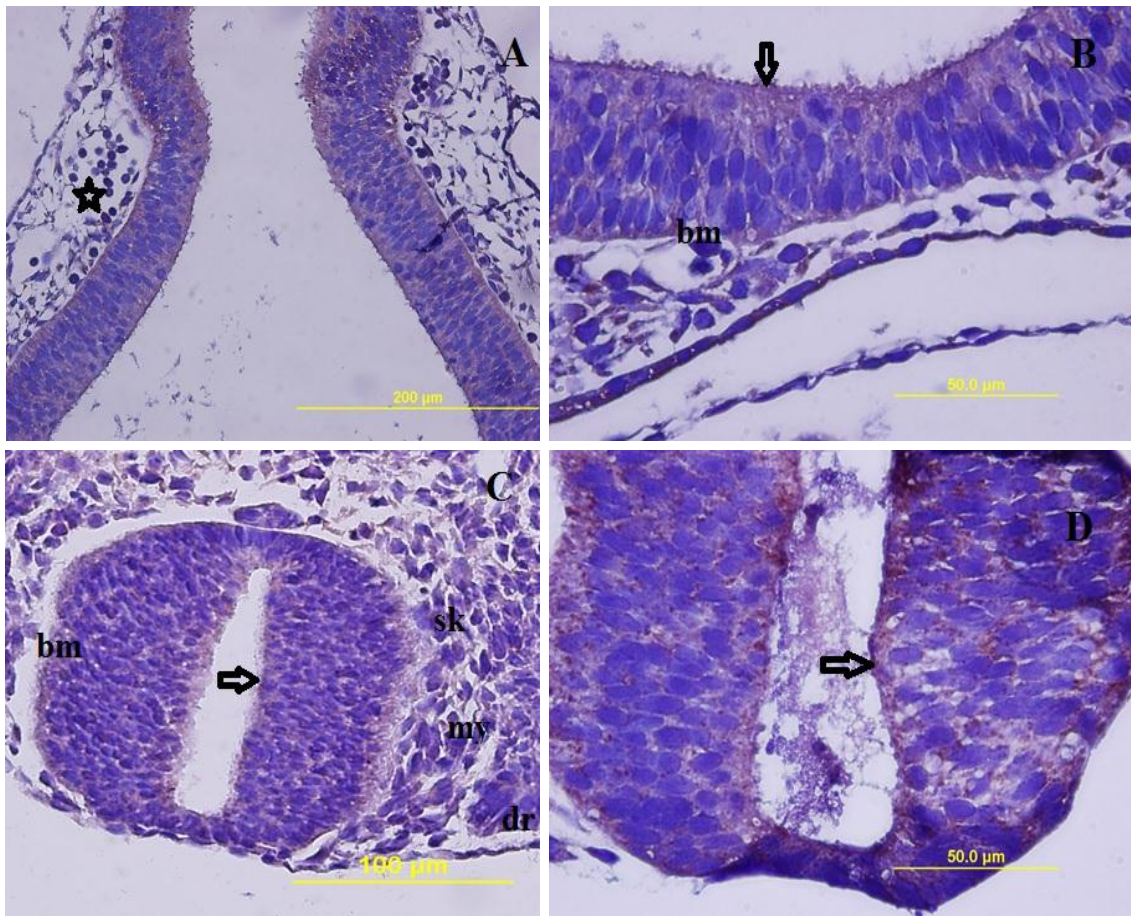
CD56 mezenkimal kök hücre işaretleyicisidir. CD56 boyamayla genel olarak, zayıf şiddette ekspresyon alanları belirlenmiştir. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde zayıf şiddette lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar izlenmiştir (Şekil 28 A-D). Nöroporların çevresinde sklerotomda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde, kan damarları içinde bulunan hücrelerde de CD56 immüno lokalizasyonunun genelde çok zayıf olduğu (Şekil 28 A-D) belirlenmiştir.



**Şekil 28.** D1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitel bazal membranında (bm), primitif endepimal tabakada (⇔), kan damarları endoteli ve içlerinde bulunan hücrelerde (☆), sklerotomda (sk) CD56 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.11. D1 grubu CD73 bulguları

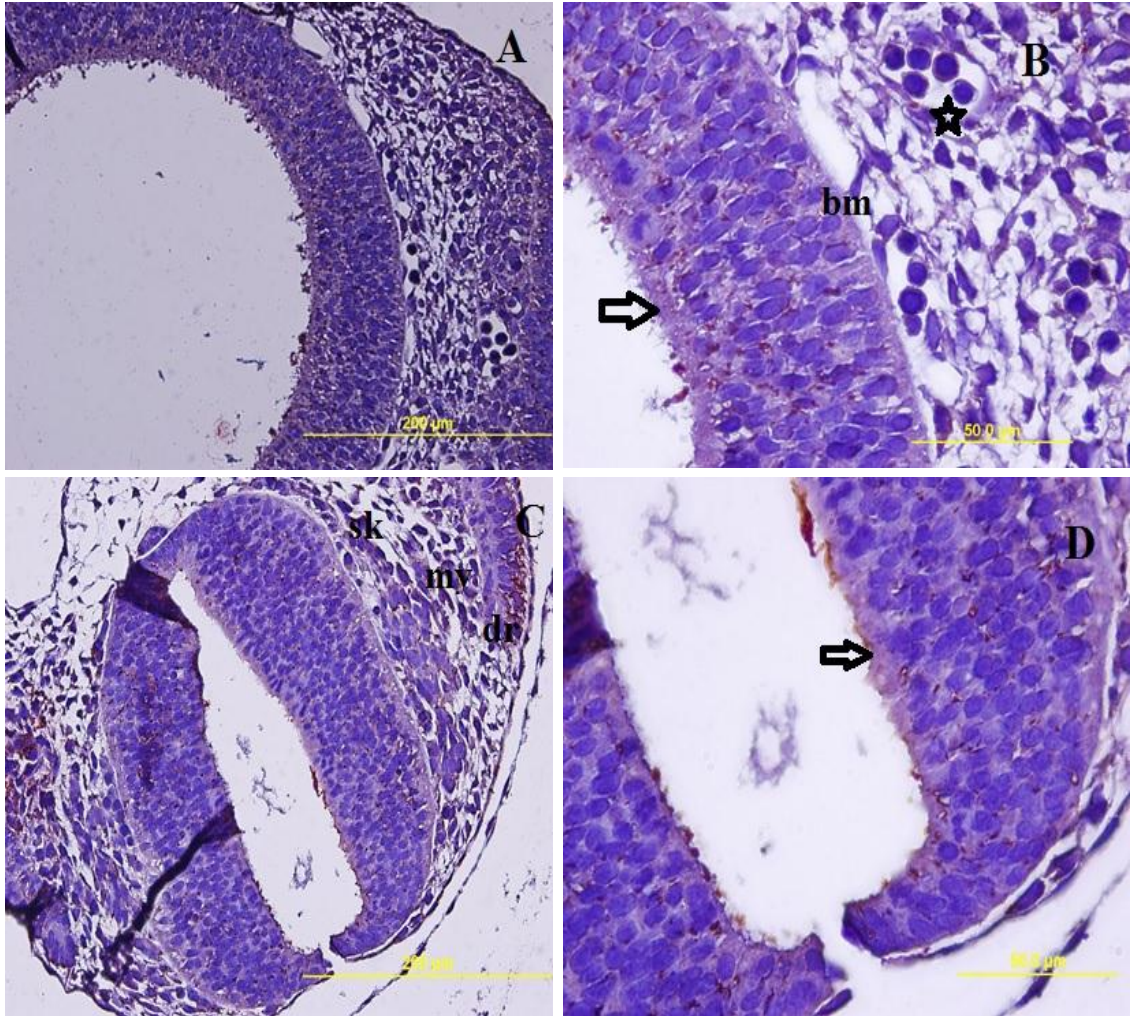
Çalışmanın devamında yapılan CD73 boyamayla genel olarak D1 grubunda mezenkimal hücreler zayıf şiddette lokalizasyon göstermiştir. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında, primitif endepimal tabaka hücrelerinin sitoplazmalarında orta şiddette lokalizasyon gösteren alanlar izlenmiştir (Şekil 29 A-D). Nöroporların çevresinde sklerotom, miyotom, dermatomda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde, kan damarları içinde bulunan hücrelerde CD73 immünolokalizasyonunun zayıf olduğu görülmüştür (Şekil 29 A, C).



**Şekil 29.** D1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında (bm), primitif endepimal tabakada (⇨), kan damarı bulunan alanlarda (☆), sklerotom (sk), miyotom (my) ve dermatomda (dr) CD73 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.12. D1 grubu CD90 bulguları

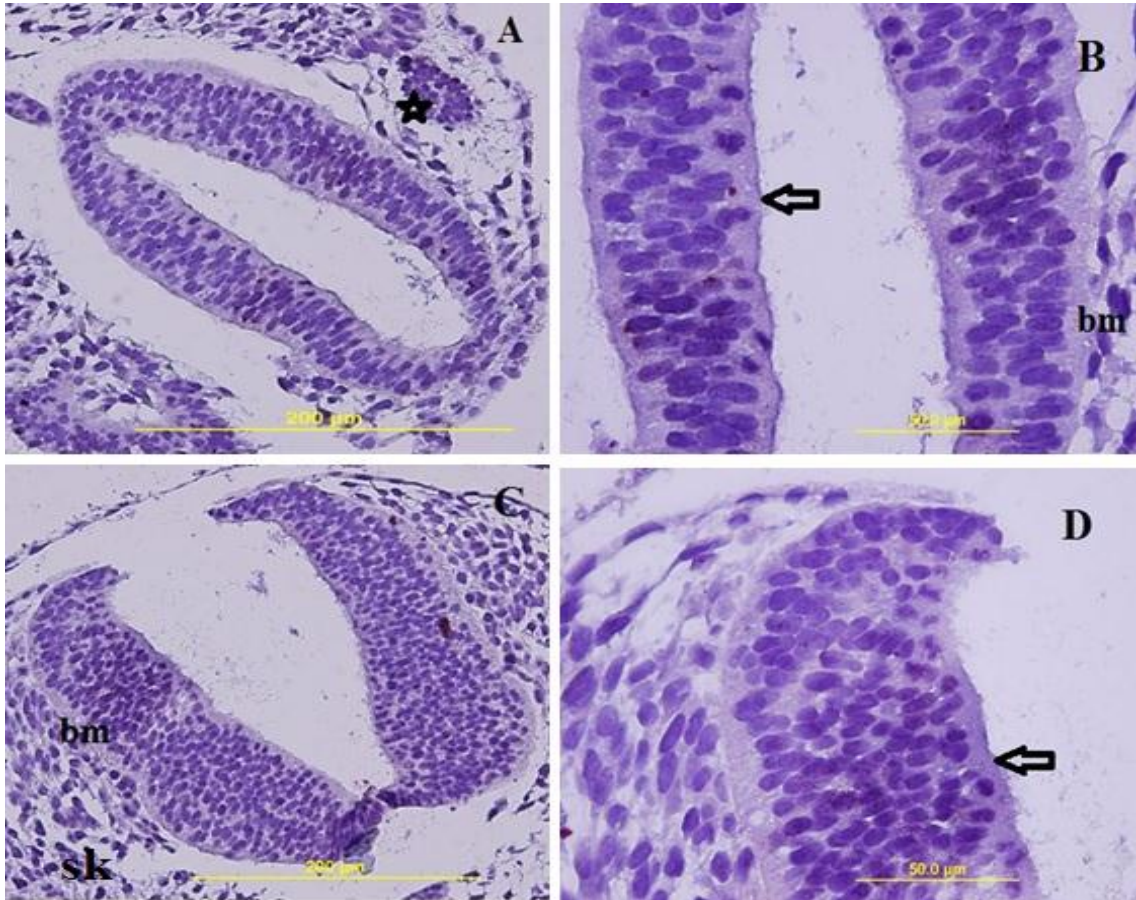
D1 grubu CD90 bulgularında zayıf şiddette lokalizasyon alanları görülmüştür. CD90 mezenkimal kök hücre belirleyicisidir. Kraniyal ve kaudal nöroporun nöroepitelinde orta şiddette lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar izlenmiştir (Şekil 30 A-D). Nöroepitelin bazal membranında, primitif endodermal tabakada, nöropor çevresinde sklerotom, miyotom, dermatom alanlarında bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde ve damar içi hücrelerde CD90 immüno lokalizasyonunun zayıf olduğu görülmüştür (Şekil 30 B-D).



**Şekil 30.** D1 grubunda, kraniyal (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitel bazal membranında (bm), primitif endodermal tabakada (⇨) ve kan damarlarının bulunduğu alanlarda (★), sklerotom (sk), miyotom (my) ve dermatomda (dr) CD90 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.13. D1 grubu CD105 bulguları

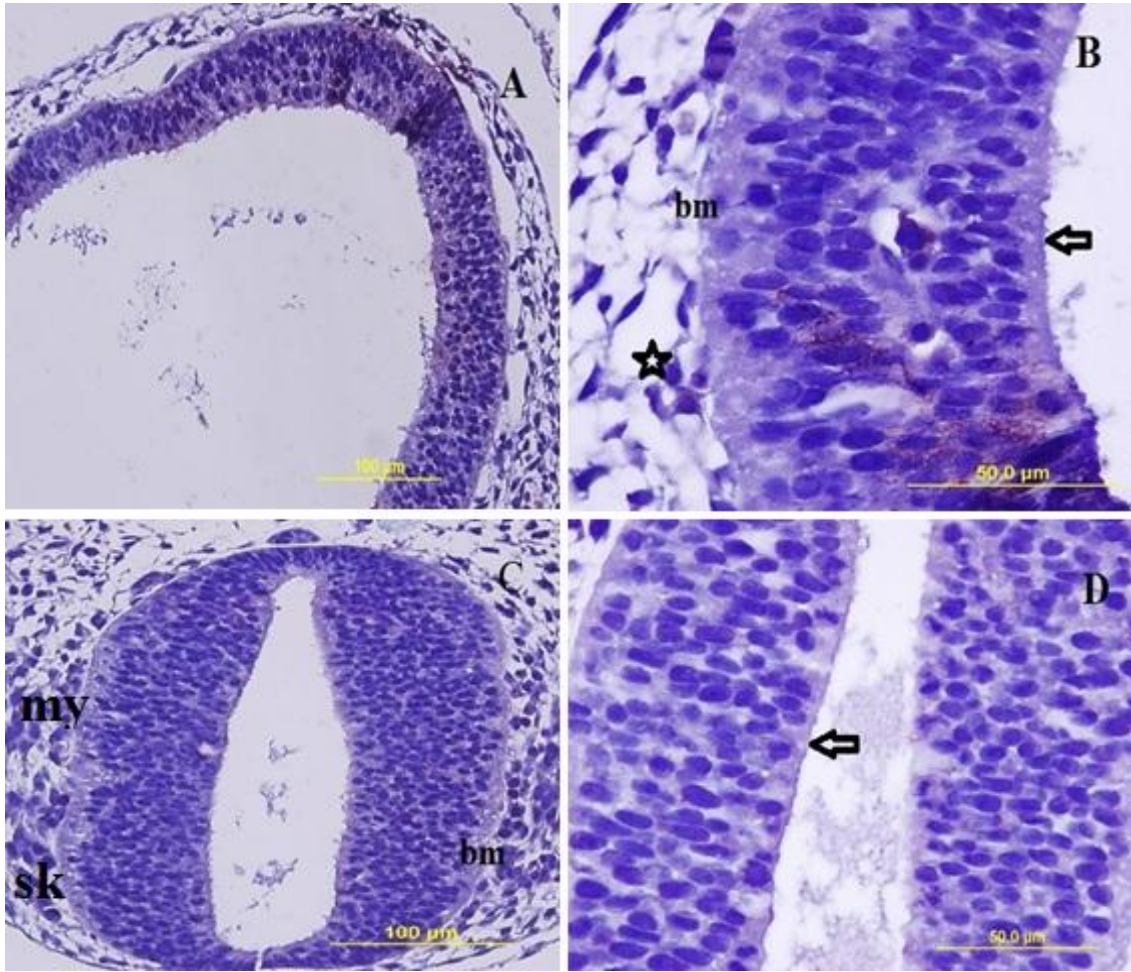
CD105 mezenkimal kök hücre işaretleyicisidir. Yapılan CD105 boyamayla genel olarak D1 grubunda, orta şiddette immünolokalizasyon izlenmiştir. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde orta şiddette lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar belirlenmiştir (Şekil 31 A-D). Nöroepitelin çevresinde sklerotomda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, bazal membranında, primitif ependimal tabakada, kan damarları endotel hücrelerinde ve damar içindeki hücrelerde CD105 immünolokalizasyonunun zayıf olduğu görülmüştür (Şekil 31 A,C).



Şekil 31. D1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C,D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında (bm), primitif ependimal tabakada (□), kan damarlarında (☆), sklerotomda (sk) CD105 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.14. D1 grubu CD271 bulguları

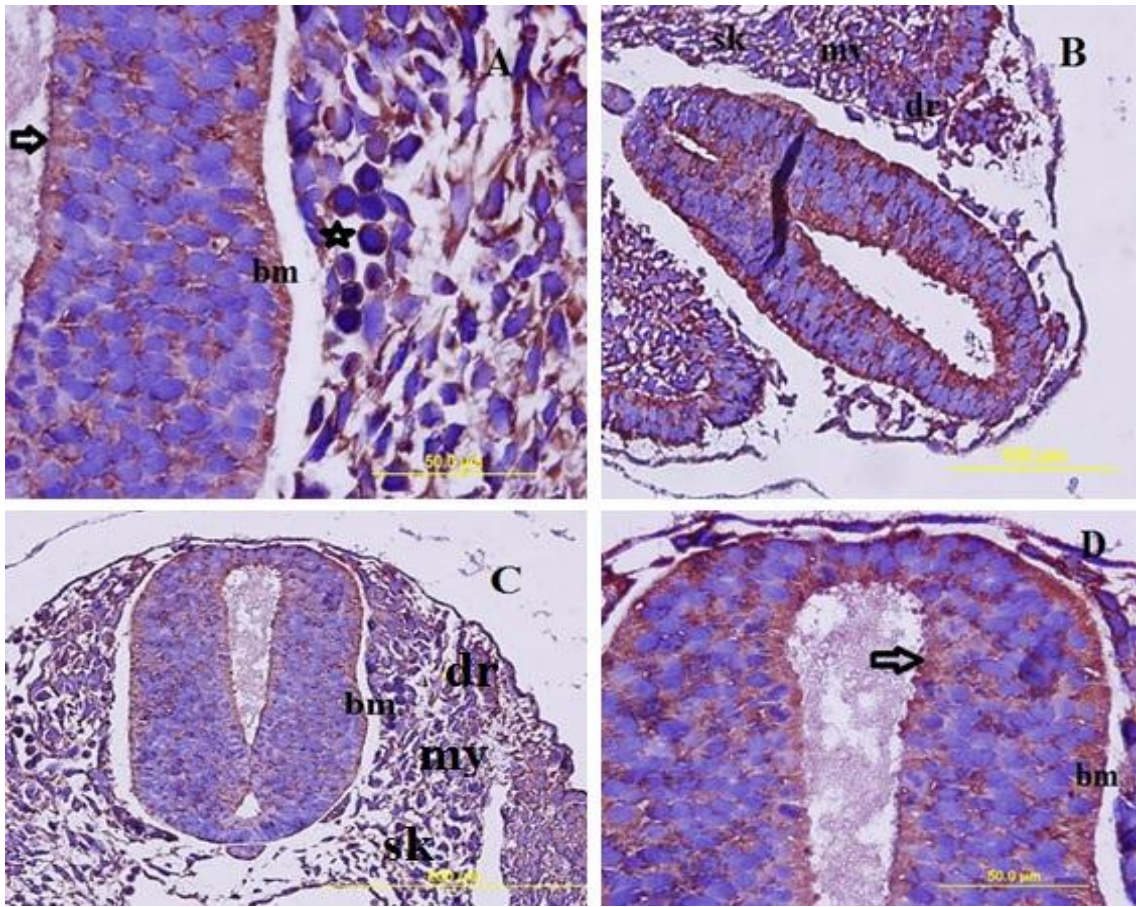
CD271 boyamayla genel olarak D1 grubunda mezenkimal kök hücreler zayıf şiddette immüno lokalizasyon göstermiştir. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde, nöroepitel bazal membranında, primitif endimal tabakada zayıf şiddette lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar belirlenmiştir (Şekil 32 A-D). Nöroporların çevresinde bulunan sklerotom ve myotomda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde, kan damarları içinde bulunan hücrelerde de CD271 immüno lokalizasyonunun çok zayıf olduğu görülmüştür (Şekil 32 B-D).



**Şekil 32.** D1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitel bazal membranında (bm), primitif endimal tabaka (⇔), kan damarları endotel hücrelerinde (☆), sklerotom (sk) ve myotomda (my) CD271 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.15. D1 grubu CD14 bulguları

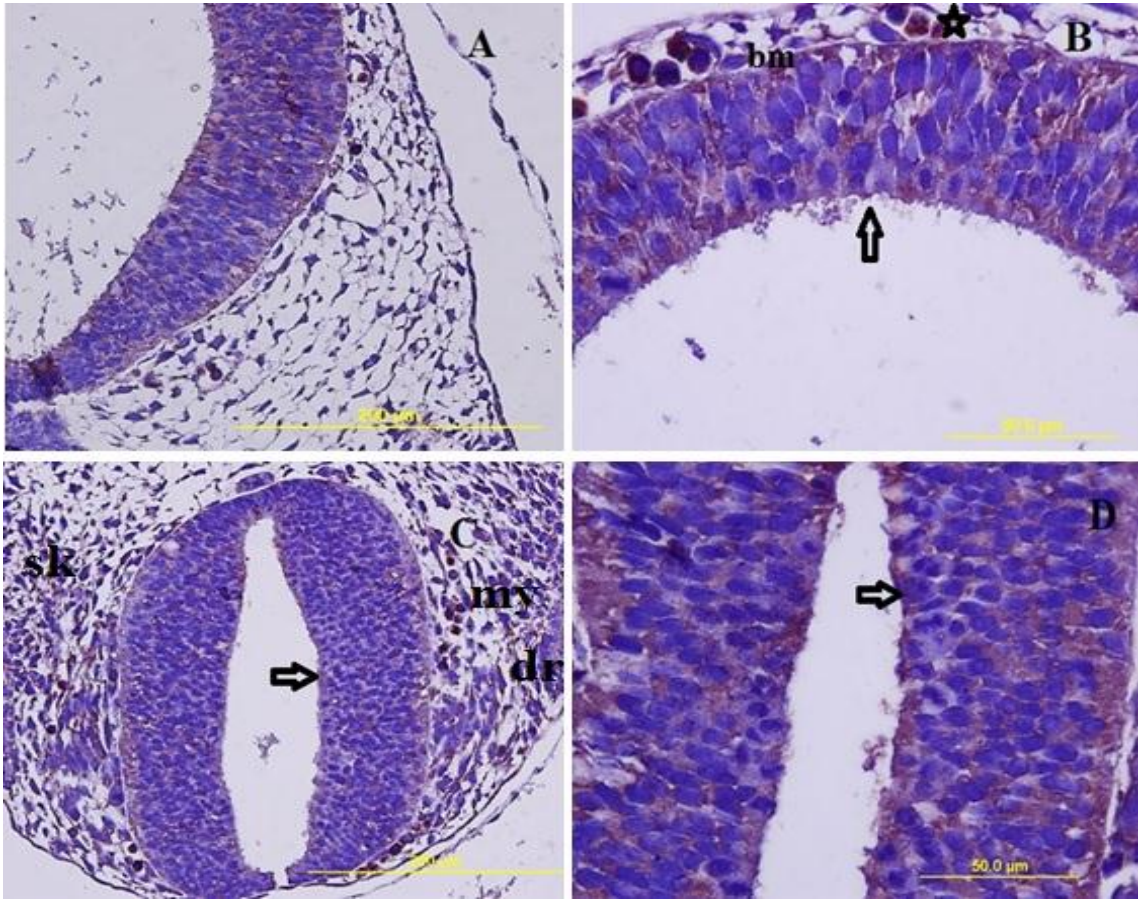
D1 grubunda yapılan CD14 boyamayla hemopoetik kök hücreler genel olarak çok yoğun lokalizasyon göstermiştir. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde, nöroepitelin bazal membranında, primitif endimal tabakada çok yoğun lokalizasyon gösteren sitoplazmik alanlar izlenmiştir (Şekil 33 A-D). Nöroporların çevresinde sklerotom, myotom, dermatomda bulunan hücrelerin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde, kan damarları içinde bulunan hücrelerde de CD14 immüno lokalizasyonunun çok yoğun olduğu görülmüştür (Şekil 33 A-C).



**Şekil 33.** D1 grubunda, kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, bazal membranda (bm), primitif endimal tabakada ( ⇨ ) ve kan damarlarında ( ☆ ), sklerotom (sk), myotom (my) ve dermatomda (dr) CD14 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 100X, B) 20X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.3.3.16. D1 grubu CD45 bulguları

Çalışmanın devamında yapılan CD45 boyamada ise genel olarak, hemopoetik kök hücrelerin orta şiddette lokalizasyon gösterdiği izlenmiştir. Kranial ve kaudal nöroporun nöroepitelinde bulunan hücre sitoplazmasında az miktarda lokalizasyon belirlenmiştir (Şekil 34 A-D). Nöroepitelin bazal membranında orta şiddette, primitif ependimal tabakada, nöroporların çevresindeki sklerotom, miyotom, dermatom hücrelerinin sitoplazmalarında, kan damarları endotel hücrelerinde yoğun şiddette CD45 immüno lokalizasyonunun yoğun olduğu görülmüştür (Şekil 34 A-C).



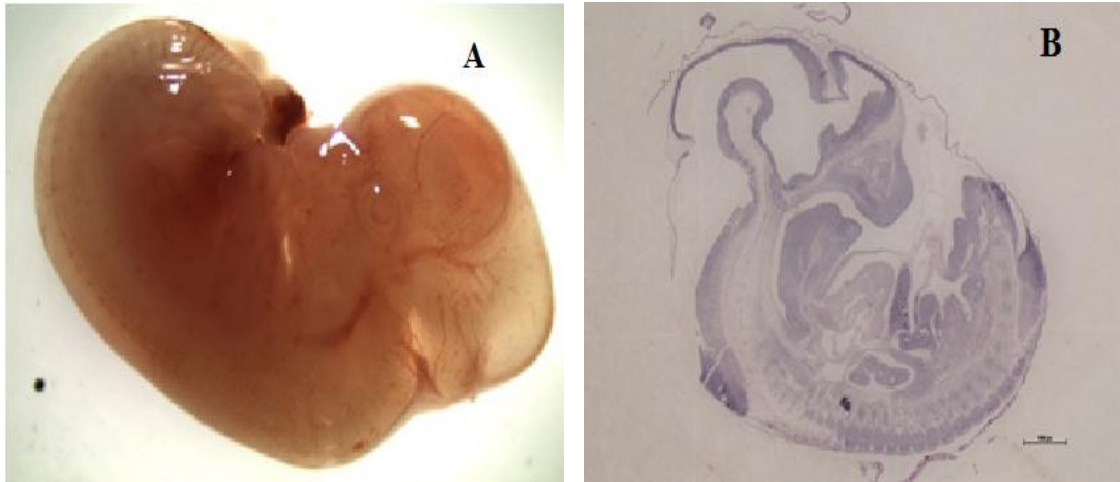
**Şekil 34.** D1 grubunda kranial (A, B) ve kaudal (C, D) nöropor nöroepitelinde, nöroepitel bazal membranında (bm), primitif ependimal tabakada (⇨) ve kan damarları endoteli ve içinde bulunan hücre sitoplazmalarında (☆), sklerotom (sk), miyotom(my) ve dermatomda (dr) CD45 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 40X, B) 100X, C) 40X, D) 100X.



#### 4.4. K2-D2 gruplarının bulguları

##### 4.4.1. K2 grubu stereomikroskop ve H&E boyama bulguları

Kontrol grubu 2 (K2), gebeliğin 10,5. gününde 40 mg/kg zeytinyağı intragastrik oral gavaj yolu ile verilmiş ratlardan oluşmaktadır. Gebe ratlar, gebeliklerinin 15,5. gününde sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen ratların embriyoları hızla toplanmış ve stereomikroskop altında makroskobik olarak değerlendirilmiştir (Şekil 35 A). Bu makroskobik değerlendirmelere bakıldığında K2 grubu embriyolarında plasenta normal boyutlarda izlenmiştir. Embriyonun deri altına bakıldığında herhangi bir hemorajik yapıyla karşılaşılmasıdır. Kranial ve kaudal bölümlerinin normal gelişim gösterdiği izlenmiştir. Aynı embriyodan alınan sagittal seri kesitlere H&E boyama yapılmış, beyin ventriküllerinin normal olduğu, medulla spinalisin ise embriyonun dorsali boyunca konumlandığı görülmüştür (Şekil 35 B).

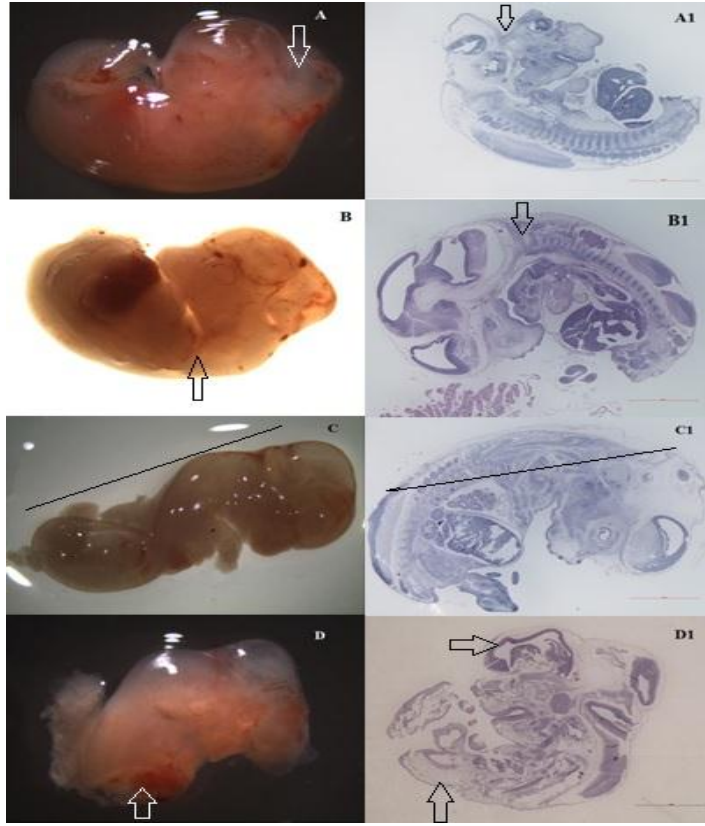


Şekil 35. K2 grubu embriyoları; A) Stereomikroskop görüntüsü (10X), B) Sagittal kesitte beyin ventrikülleri, düzenli medulla spinalis izlenmektedir (H&E, 2,5X).

##### 4.4.2. D2 grubu stereomikroskop ve H&E boyama bulguları

Deney grubu 2 (D2), gebeliğin 10,5. gününde 40 mg/kg all-trans retinoik asit intragastrik oral gavaj yolu ile verilmiş ratlardan oluşmaktadır. Gebe ratlar, gebeliklerinin 15,5. gününde sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen ratların embriyoları hızla toplanmış ve stereomikroskop altında değerlendirilmiştir (Şekil 36 A). Stereomikroskop bulgularına göre, deney grubu embriyolarının ve plasentalarının normalden küçük olduğu belirlenmiştir. Embriyoların deri altında yoğun hemorajik alanlar izlenmiştir (Şekil 36 A, B, C, D). Bunun yanında embriyoların bazılarında,

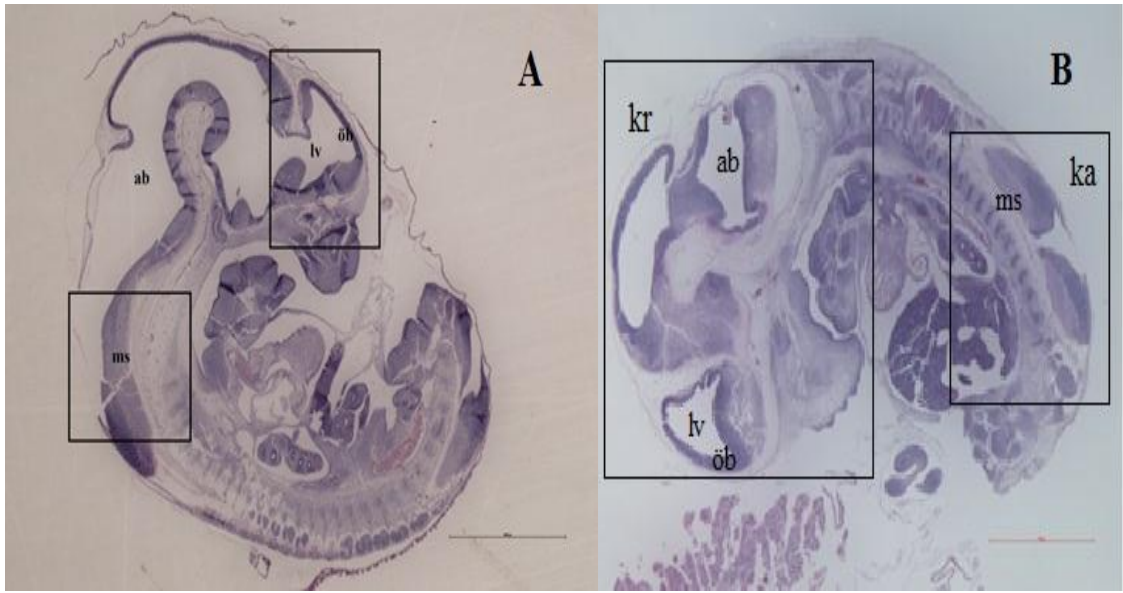
kraniyal bölgenin bir bölümünün bulunmadığı (Şekil 36 A), kraniyal bölümün boyun bölgesinden sonra düzgün şekilde devamlılık göstermediği (Şekil 36 B), anormal aksiyal rotasyon (Şekil 36 C) ve kaudal medulla spinalisin devamlılık göstermediği izlenmiştir (Şekil 36 D). Aynı embriyoların sagittal yönde gömülmüş bloklarından alınan seri kesitlerine H&E boyama yapılmıştır (Şekil 36 A1, B1, C1, D1). Buna göre anensefali (Şekil 36 A1), düzensiz, devamlı olmayan medulla spinalis varlığı (Şekil 36 B1), anormal aksiyal rotasyon ve düzensiz medulla spinalis (Şekil 36 C1), daha küçük ve şişkin lateral ventrikül yapısı, kısa, düzensiz medulla spinalis yapısı izlenmiştir (Şekil 36 D1).



**Şekil 36.** D2 grubu embriyoları sırayla stereomikroskop (8X) ve sagittal yönde alınmış kesitlere yapılan H&E boyama (2,5X) ile; A, A1) Anensefali (↓), B, B1) Boyun bölgesinden itibaren devamlı olmayan medulla spinalis (↑↓), C, C1) Anormal aksiyal rotasyon (↑↓), D, D1) Kaudal medulla spinaliste anomali (—), daha küçük ve şişkin lateral ventrikül yapısı (⇒) izlenmektedir.

#### 4.4.3. K2-D2 Gruplarının İmmünohistokimya Bulguları

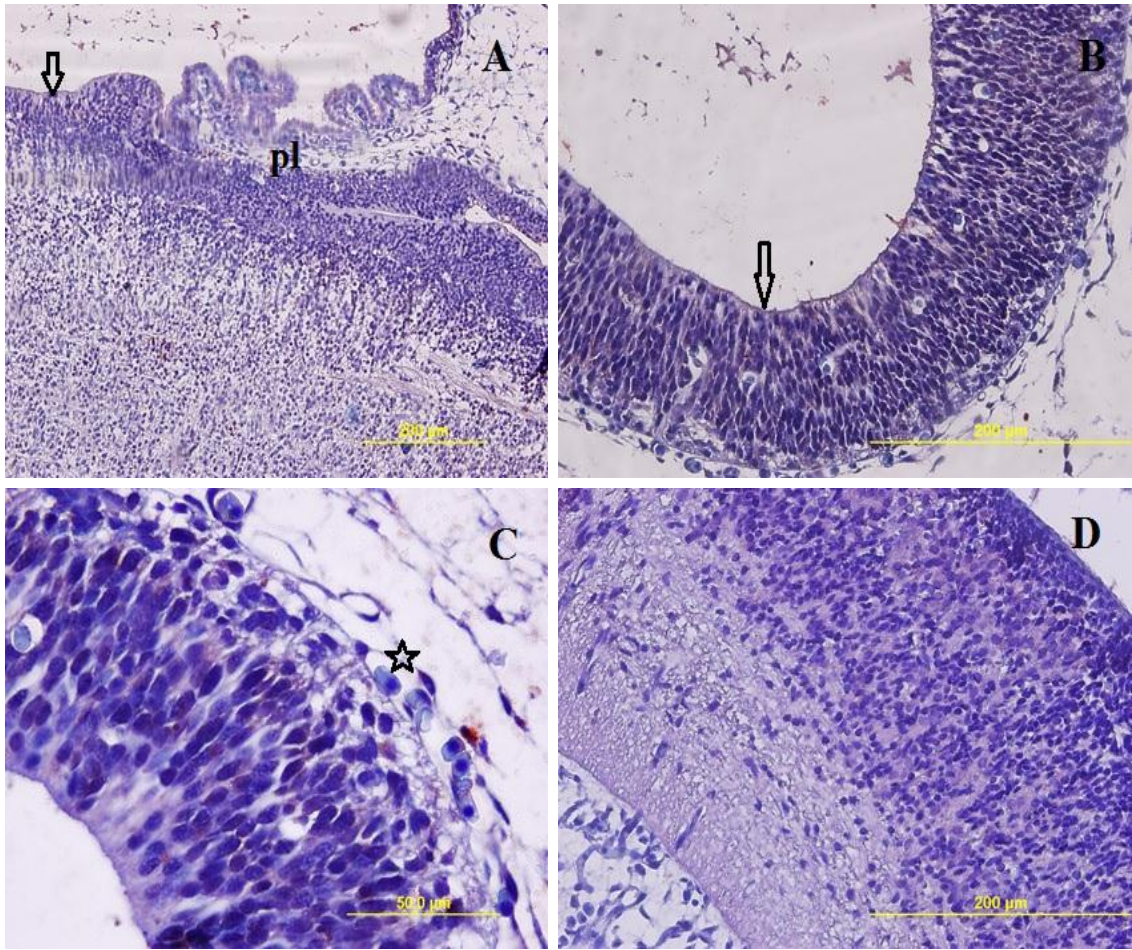
K2-D2 gruplarına mezenkimal kök hücreleri işaretlemek için CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD271 hemopoetik kök hücreleri belirlemek için ise CD14 ve CD45 boyamalar yapılmıştır. Yapılan bu immünohistokimyasal boyamalar semi-kantitatif skorlama yöntemiyle değerlendirilerek sonuçlar Çizelge 6,8,10,12,14,16,18,20’de verilmiştir. Bu grupta bulunan embriyoların sagittal seri kesitlerine yapılan immünohistokimyasal boyamalar, tüm gruplarda aynı alanlara denk gelecek şekilde değerlendirilmiştir. Bu alanlar Şekil 37 A ve B’de, ön beyin (öb), lateral ventrikül (lv), arka beyin (ab) ve medulla spinalis (ms) olarak gösterilmiştir.



**Şekil 37. A, B.** Kontrol grubu (A) ve deney grubu (B) sagittal kesitte ön beyin (öb), lateral ventrikül (lv), arka beyin (ab) ve medulla spinalis (ms) olarak değerlendirilen alanlar işaretlenmiştir.

#### 4.4.3.1. K2 grubu CD44 bulguları

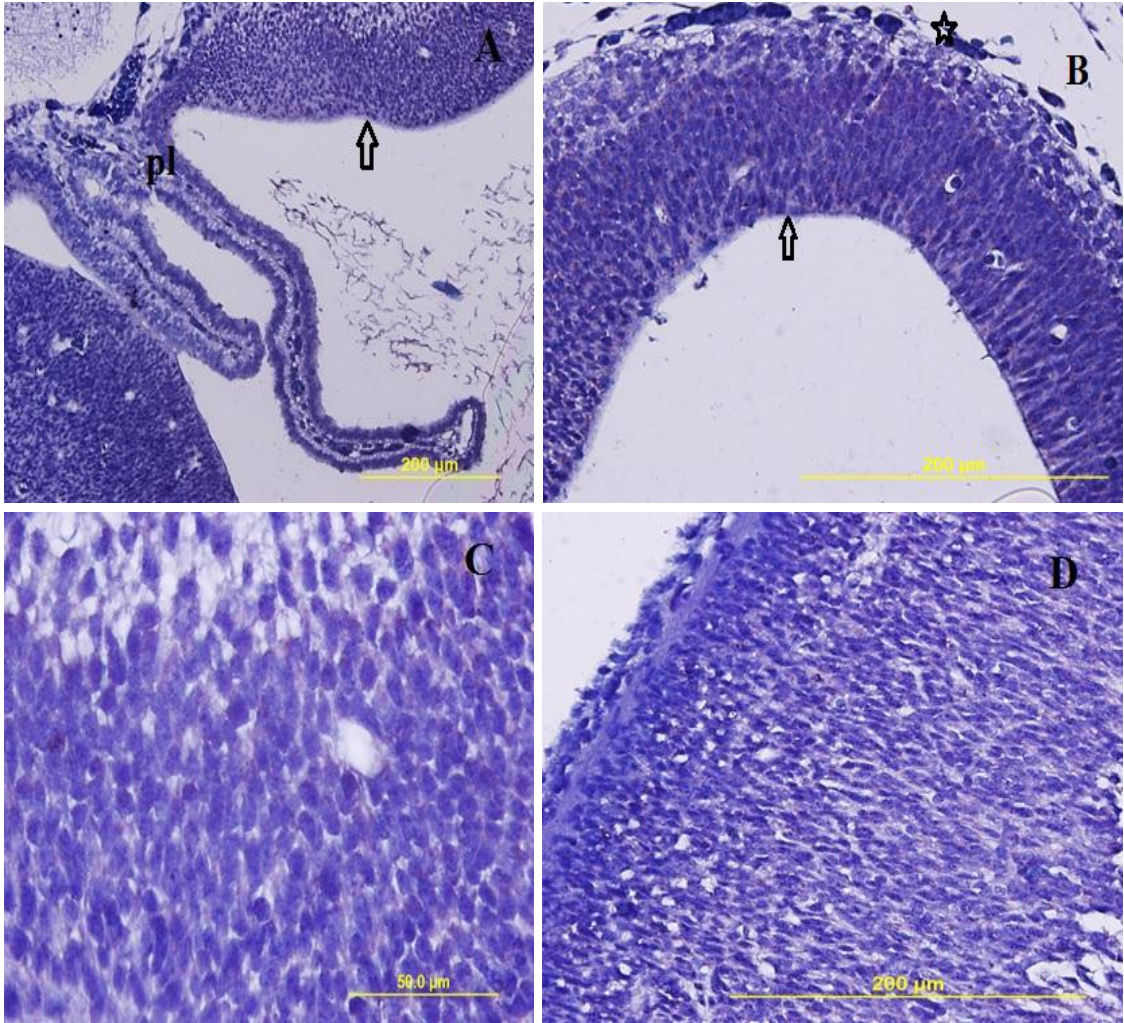
K2 grubunda yapılan CD44 boyama mezenkimal kök hücreleri belirlemek için kullanılmıştır. Lateral ventrikül çevresindeki nöroepiteli oluşturan hücrelerin sitoplazmalarında ve plexus koroideusunda (Şekil 38 A-C), medulla spinalis nöroepitel hücrelerinin sitoplazmalarında (Şekil 38 D) zayıf şiddette immüno lokalizasyon alanları izlenmektedir. CD44 ekspresyonu nöroepiteli saran bazal membranda görülmemiş ancak çevrede bulunan kemik-kas-deri alanlarında az miktarda görülmüştür. Nöroepitel çevresindeki kan damarları endotel hücrelerinde çok az şiddette ekspresyon alanları belirlenmiştir (Şekil 38 B, C).



**Şekil 38.** K2 grubunda, lateral ventrikül nöroepiteli (⇩) ve plexus koroideusunda (pl) (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde (⇩) (B), büyük büyütmede nöroepitelin dışında yer alan kan damarlarında (☆) (C), medulla sipinaliste (D), CD44 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.

#### 4.4.3.2. K2 grubu CD56 bulguları

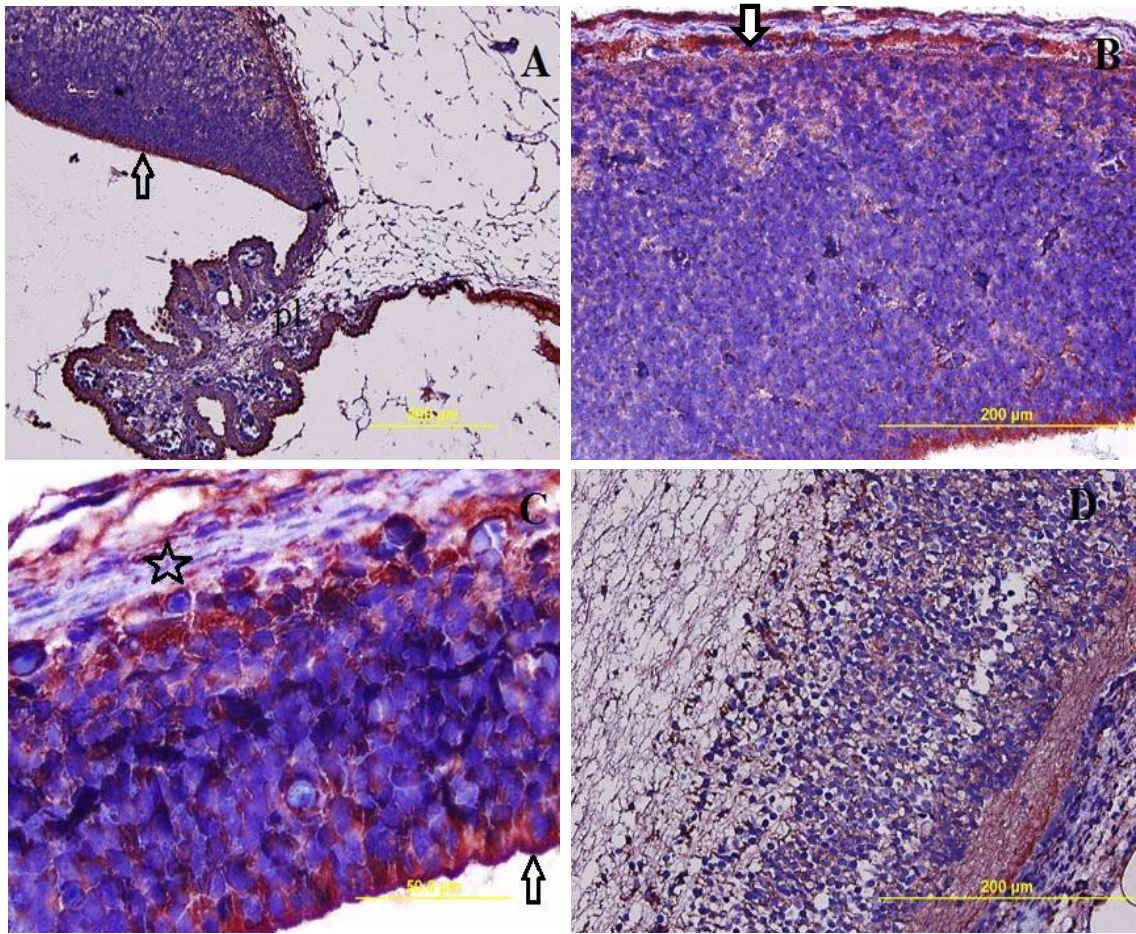
CD56 mezenkimal kök hücre işaretleyicisidir. CD56 boyamayla kontrol 2 grubunda lateral ventrikül pleksus koroideusunda (Şekil 39 A), ventrikülleri (Şekil 39 A, B, C) ve medulla spinalisi saran nöroepitel hücrelerinin sitoplazmalarında (Şekil 39 D) çok zayıf immüno lokalizasyon izlenmektedir. Nöroepitelin bazal membranında, nöroepitel çevresinde bulunan kan damarı endotel hücrelerinde, kemik-kas-deri alanlarında çok az ekspresyon alanları görülmektedir (Şekil 39 B).



**Şekil 39.** K2 grubunda, lateral ventrikül nöroepiteli (⇨) ve pleksus koroideusunda (pl) (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde (⇨), kan damarlarında (☆) (B), büyük büyütmede nöroepitelde (C) ve medulla spinaliste (D) CD56 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.

#### 4.4.3.3. K2 grubu CD73 bulguları

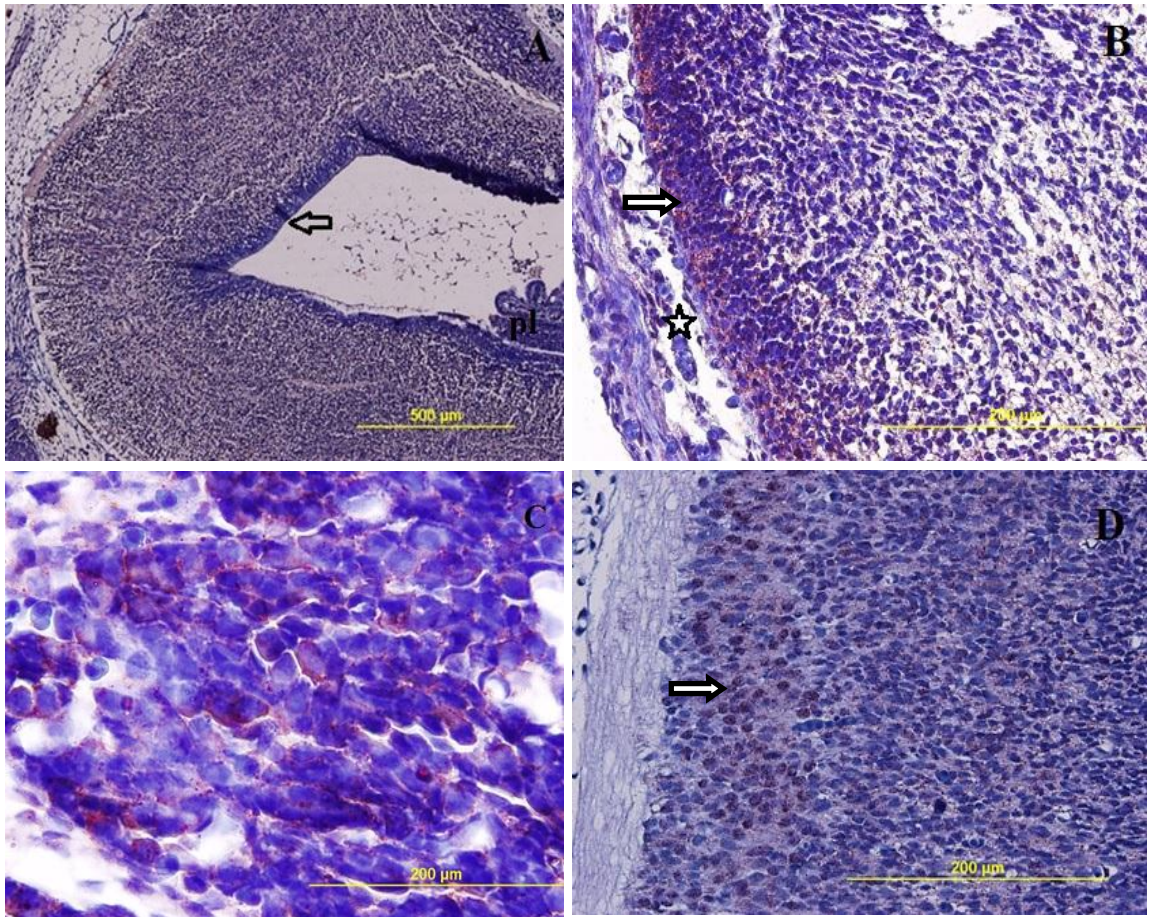
Mezenkimal kök hücre belirteci olan CD73 boyamayla genel olarak kontrol 2 grubunda yoğun lokalizasyon alanları izlenmiştir. Ventriküller çevresinde ve medulla spinalisteki nöroepitelde, pleksus koroideusta yoğun immüno lokalizasyon gösteren alanlar belirlenmiştir (Şekil 40 A-D). Nöroepitel çevresindeki bazal membran ve kemik-kas-deri alanlarında, kan damarları endotel hücrelerinde yoğun ekspresyon görülmüştür (Şekil 40 A-D). Nöroepitelin bazal membrana yakın hücrelerindeki sitoplazmalarında ve ventriküler boşluklara yakın nöroepitel hücrelerinin sitoplazmalarında çok yoğun lokalizasyon alanları izlenmiştir (Şekil 40 A-D).



**Şekil 40.** K2 grubunda, lateral ventrikül nöroepiteli ve pleksus koroideusunda (pl) (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde (⇨) (B), büyük büyütmede nöroepitel hücrelerin sitoplazmalarında (⇨), nöroepitelin dışında bulunan kan damarlarında (☆) (C), medulla spinaliste (D), CD73 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.

#### 4.4.3.4. K2 grubu CD90 bulguları

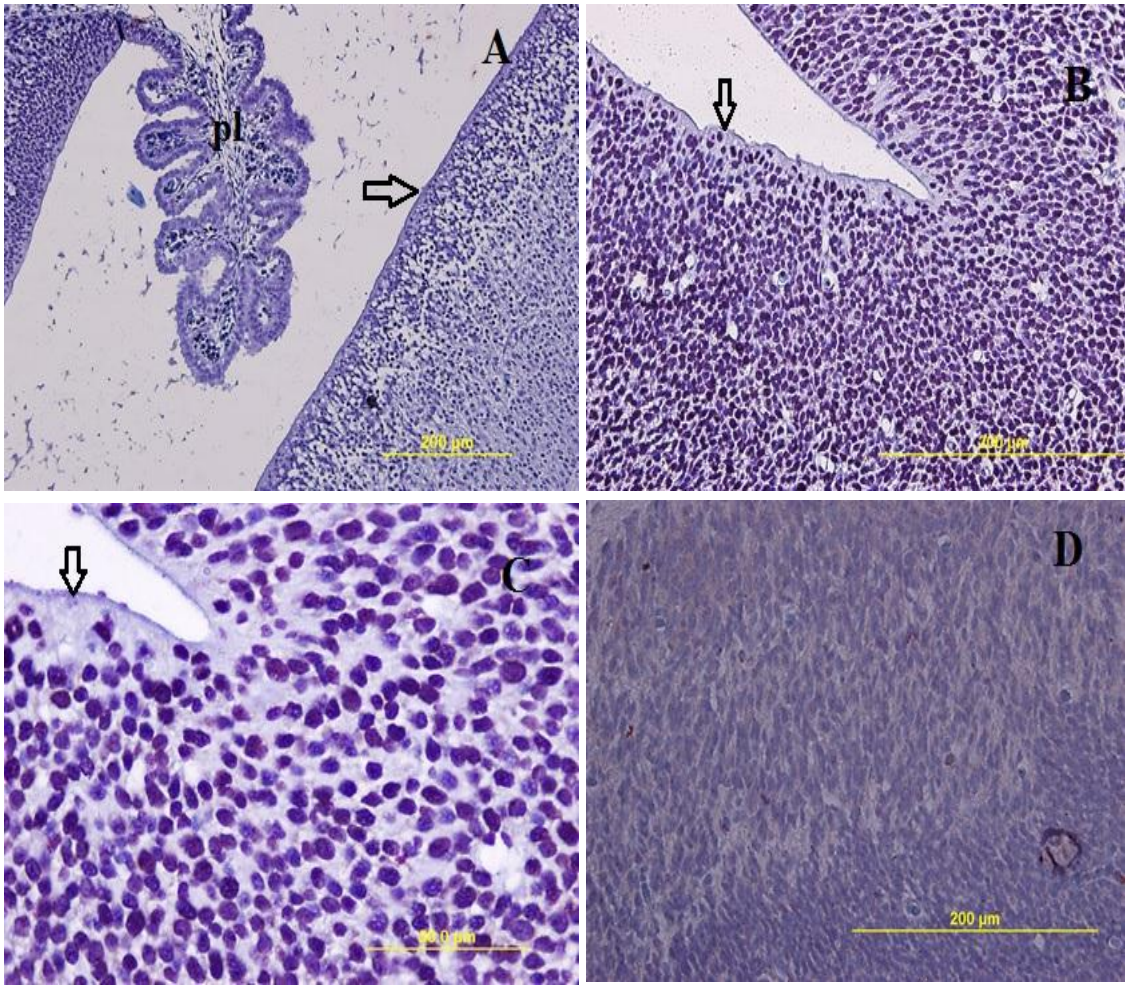
CD90 boyamayla K2 grubunda mezenkimal hücreler işaretlenmiştir. Ventrikülleri döşeyen endim hücrelerinin sitoplazmalarında orta şiddette lokalizasyon alanları izlenmektedir (Şekil 41 A-C). Lateral ventrikülün pleksus koroideusunda CD90 ekspresyonu görülmemektedir (Şekil 41 A). Nöroepitel çevresindeki bazal membranda CD90 immünolokalizasyonu izlenmezken, kemik-kas-deri alanlarında, kan damarlarının endotel hücrelerinde çok az boyanma izlenmiştir. Medulla spinalisin nöroepitelinde bulunan hücrelerin sitoplazmalarında orta şiddette boyanma alanları belirlenmiştir (Şekil 41 D).



**Şekil 41.** K2 grubunda, lateral ventrikül nöroepiteli, pleksus koroideusunda (pl) (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde, nöroepitel dışında bulunan kan damarlarında (☆) ve damarlara yakın nöroepitelde (⇒) (B), büyük büyütmede nöroepitelde bulunan hücrelerin sitoplazmalarında (⇒) (C), medulla spinaliste bulunan bazı hücrelerde (⇒) (D) CD90 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 10X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.

#### 4.4.3.5. K2 grubu CD105 bulguları

Çalışmada yapılan CD105 (endoglin) boyamayla kontrol grubunda mezenkimal kök hücreler işaretlenmiştir. Ventrikülleri dōşeyen ependim hücrelerde, nöroepitelin bazal membranında zayıf boyanan hücreler görölmüştür (Şekil 42 A-C). Lateral ventrikölün pleksus koroideusunda, ependimal hücrelerde, kan damarları endotel hücrelerinde ve çevrede bulunan kemik-kas-deri alanlarında ise CD105 ekspresyonu belirlenmemiştir (Şekil 42 A). Medulla spinalis nöroepitelinde bulunan hücrelerin sitoplazmasında ve bu hücrelerin etrafında bulunan kan damarları endotel hücrelerinde çok az eksprese olan alanlar belirlenmiştir (Şekil 42 D).

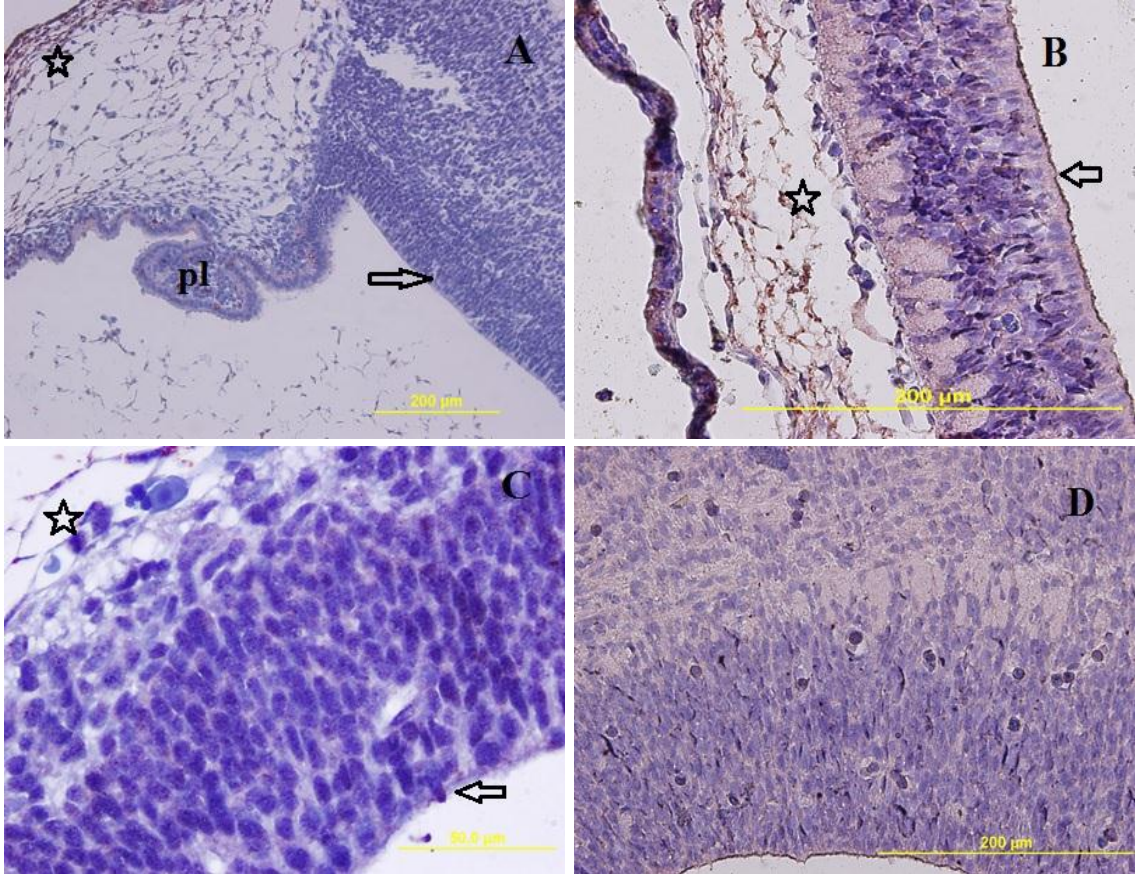


**Şekil 42.** K2 grubunda, lateral ventriköl nöroepiteli ve pleksus koroideusunda (pl) (A), dördüncü ventriköl nöroepitelinde (⇨)(B), büyük büyütmede ventriköl lümenindeki hücrelerde (⇨) (C), medulla spinaliste (D), CD105 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.



#### 4.4.3.6. K2 grubu CD271 (p75, NGFR) bulguları

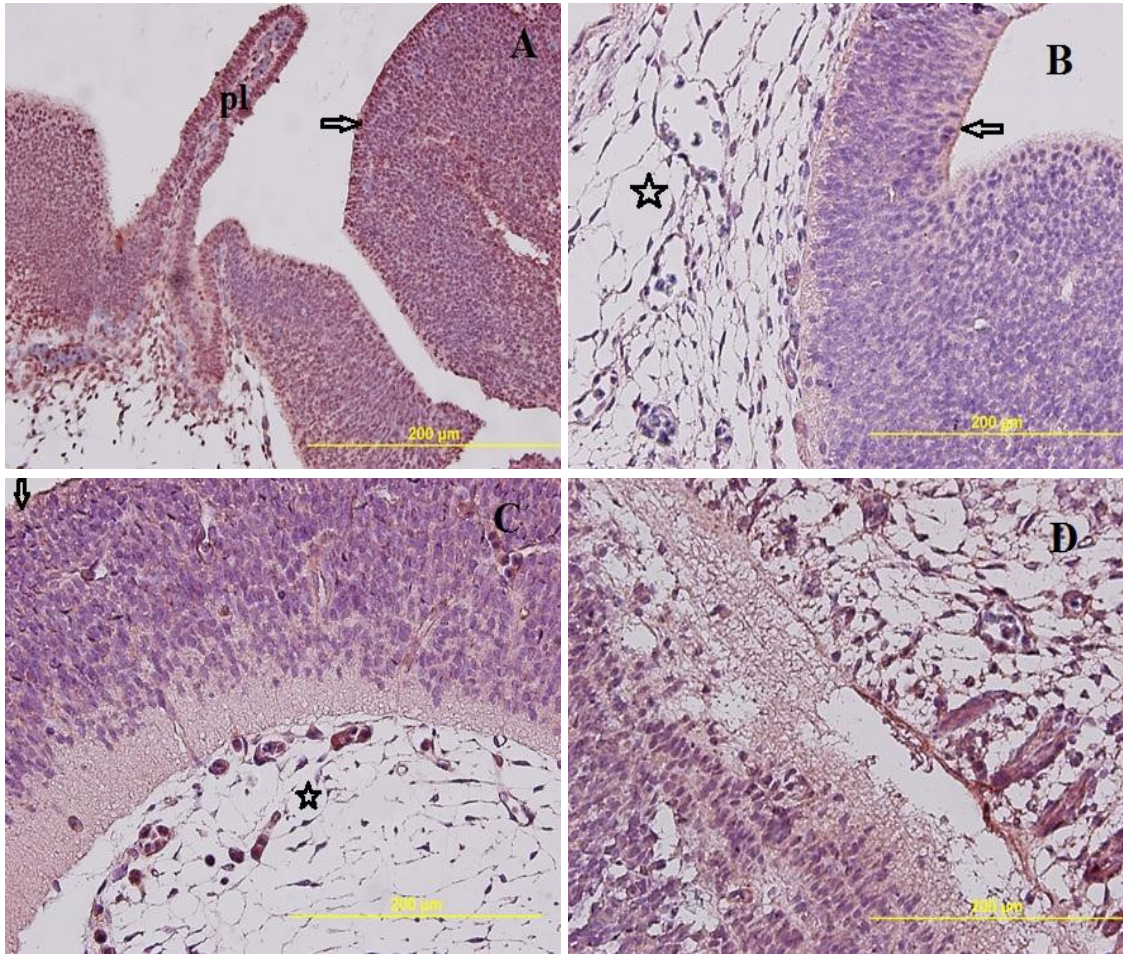
Çalışmada K2 grubuna yapılan CD271 boyamayla, mezenkimal kök hücrelerin immüno lokalizasyonu belirlenmiştir. Lateral ventrikül pleksus koroideusunda (Şekil 43 A) çok zayıf lokalizasyon görülmüştür. Ventrikülleri döşeyen ependim hücrelerinin sitoplazmalarında zayıf şiddette CD271 immüno lokalizasyon alanları görülmektedir (Şekil 43 A-C). Nöroepitel çevresinde bulunan kan damarlarının endotel hücrelerinde, nöroepitelin bazal membranında çok az, kemik-kas-deri alanlarında ise az miktarda CD271 immüno lokalizasyonu görülmektedir (Şekil 43 A, B). Medulla spinalis nöroepitel hücrelerinin sitoplazmalarında da çok az miktarda lokalizasyon izlenmektedir (Şekil 43 D).



**Şekil 43.** K2 grubunda lateral ventrikül nöroepiteli ( ⇨) ve pleksus koroideusunda (pl) (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde ( ⇨), kan damarlarında ( ☆) (B), büyük büyütmede ventrikül hücre sitoplazmaları ve ventrikül dışında yer alan kan damarlarında ( ☆) (C), medulla spinaliste (D), CD271 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.

#### 4.4.3.7. K2 CD14 bulguları

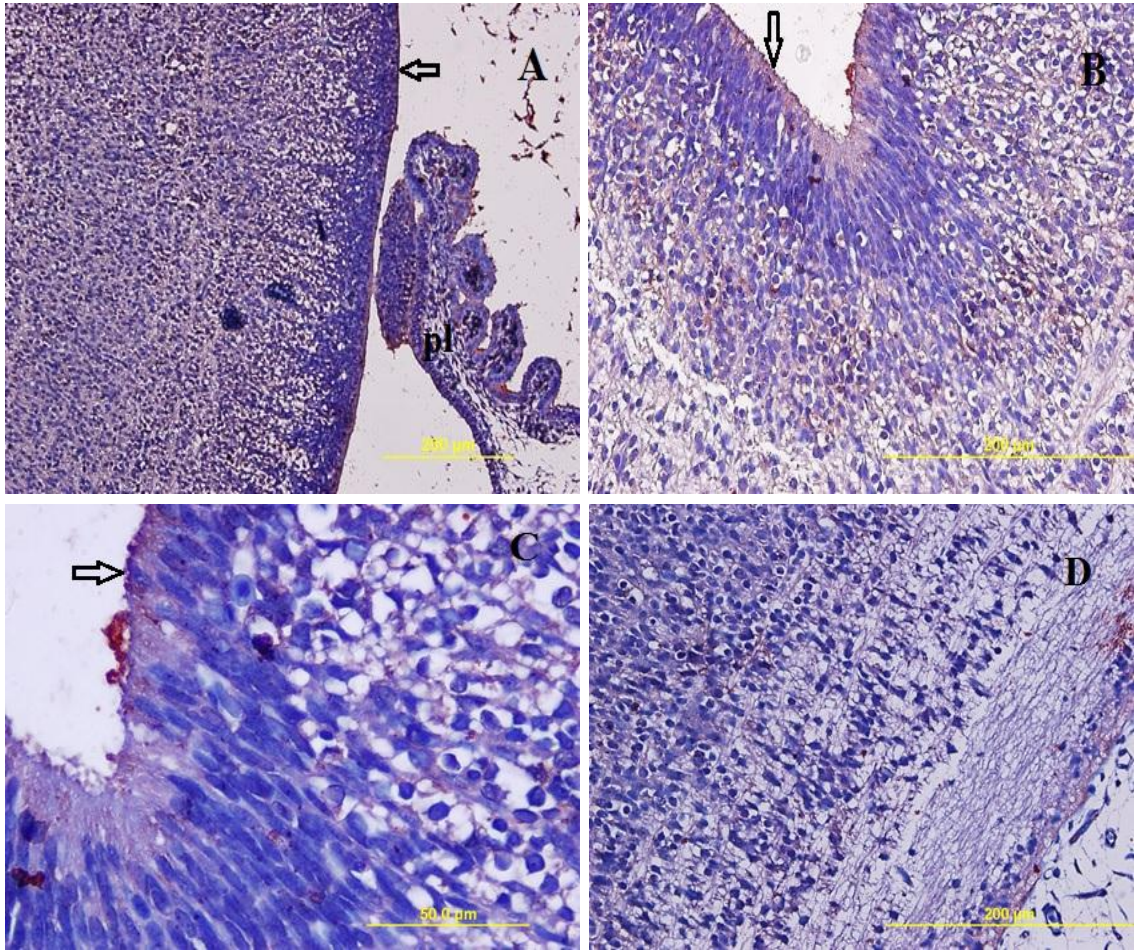
CD14 boyamayla işaretlenen hemopoetik kök hücreler K2 grubunda lateral ventrikül pleksus koroideusunda (Şekil 44 A), ventrikülleri (Şekil 44 A-C) ve medulla spinalisi saran nöroepitel hücrelerinin sitoplazmalarında (Şekil 44 D) çok yoğun immüno lokalizasyon izlenmektedir. Nöroepitelin bazal membranında az lokalizasyon görülürken, çevrede bulunan kemik-kas-deri alanlarında, kan damarları endotel hücrelerinde de yoğun CD14 ekspresyon alanları görülmektedir (Şekil 44 B, C).



**Şekil 44.** K2 grubunda, lateral ventrikül nöroepiteli ( ⇨ ) ve pleksus koroideusunda (pl) (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde ( ⇨ ), büyük bütmede nöroepitelde ( ⇨ ), kan damarları çevresinde ( ☆ ) (C), medulla spinaliste (D), çok yoğun miktarda CD14 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 20X, C) 40X, D) 40X.

#### 4.4.3.8. K2 grubu CD45 bulguları

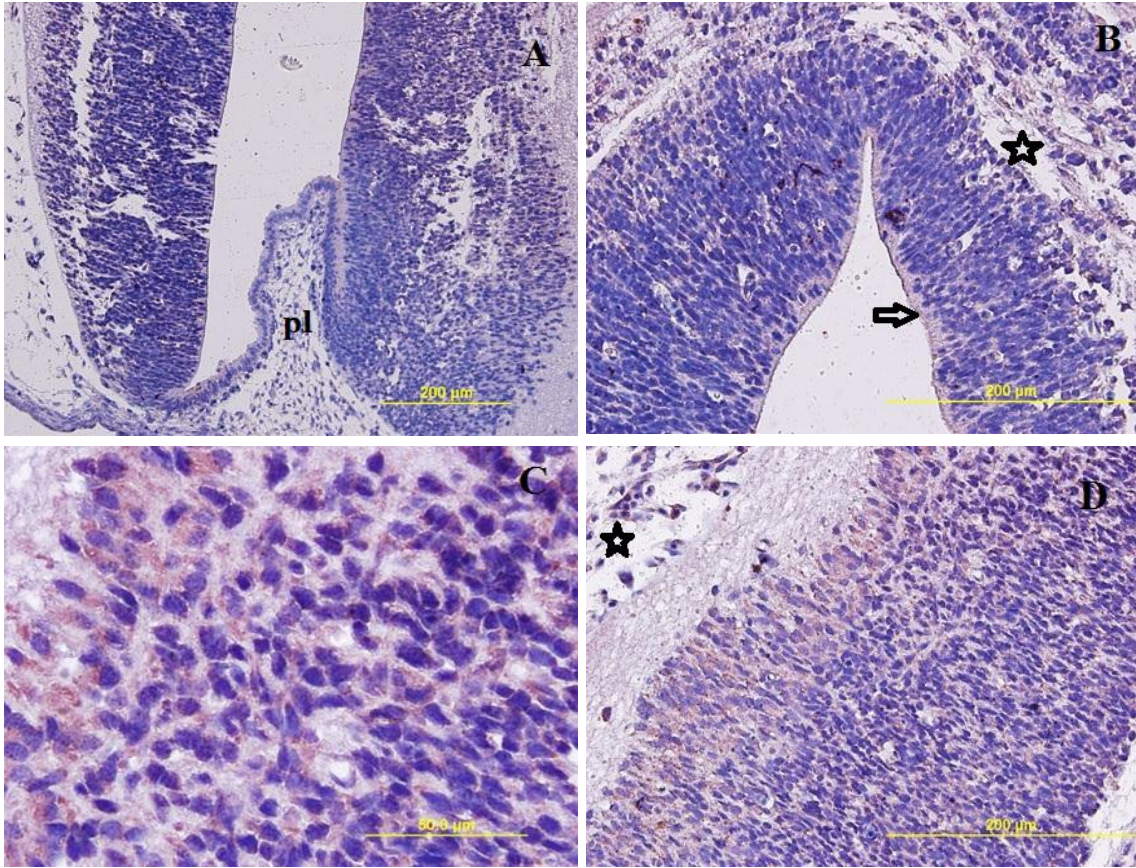
Yapılan CD45 boyamayla ise hemopoetik kök hücreler kontrol 2 grubunda genel olarak orta şiddette immünolokalizasyon göstermiştir. Lateral ventrikül pleksus koroideusunda ve lateral ventrikülün nöroepiteli ve medulla spinalisin nöroepitelinde hücrelerinin sitoplazmalarında, orta şiddette immünolokalizasyon alanları izlenmektedir (Şekil 45 A). Nöroepitelin bazal membranında, çevrede bulunan kemik-kas-deri bölgelerinde orta şiddette CD45 ekspresyon alanları görülmektedir (Şekil 45 B). Dördüncü ventrikülü döşeyen ependim hücrelerinde orta şiddette lokalizasyon gösteren alanlar belirlenmiştir (Şekil 45 C, D) .



**Şekil 45.** K2 grubunda, lateral ventrikül nöroepiteli (⇔) ve pleksus koroideusunda (pl) (A), ventrikül çevresini saran nöroepitel hücre sitoplazmalarında (⇔) (B), büyük büyütmede nöroepitel hücrelerinin sitoplazmalarında (⇔) (C), medulla spinaliste (D), CD45 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 40X, D) 100X.

#### 4.4.3.9. D2 grubu CD44 bulguları

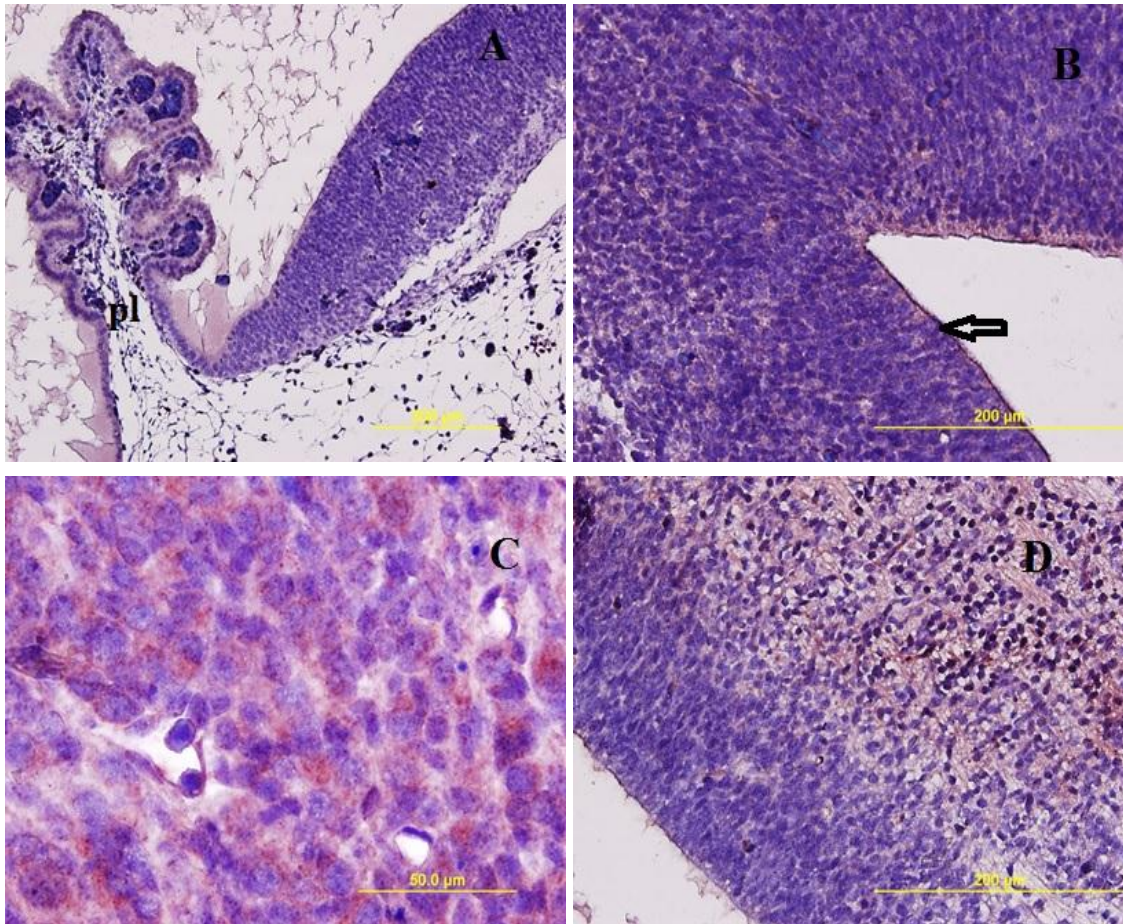
Çalışmada yapılan CD44 boyamayla D2 grubunda genel olarak orta şiddette lokalizasyon izlenmiştir. CD44 mezenkimal kök hücre belirteçidir. Ventrikülleri döşeyen ependimal hücrelerin sitoplazmalarında (Şekil 46 A-C), medulla spinalis nöroepitel hücrelerinin sitoplazmalarında (Şekil 46 D) orta şiddette lokalizasyon alanları izlenmektedir. Ventriküllerde ve medulla spinalis çevresindeki nöroepitelde bulunan bazı hücrelerin sitoplazmalarında orta şiddette lokalizasyon alanları belirlenmiştir (Şekil 46 C, D). Nöroepitelin bazal membranında, çevrede bulunan kemik-kas-deri alanlarında, kan damarları endotel hücrelerinde de çok az immünolokalizasyon alanları görülmektedir (Şekil 49 B).



**Şekil 46.** D2 grubunda, lateral ventrikül nöroepiteli ve pleksus koroideusunda (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde (⇨), kan damarlarında (★) (B), büyük büyütmede nöroepiteldeki hücrelerin sitoplazmalarında (C), medulla spinaliste (D) CD44 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.

#### 4.4.3.10. D2 grubu CD56 bulguları

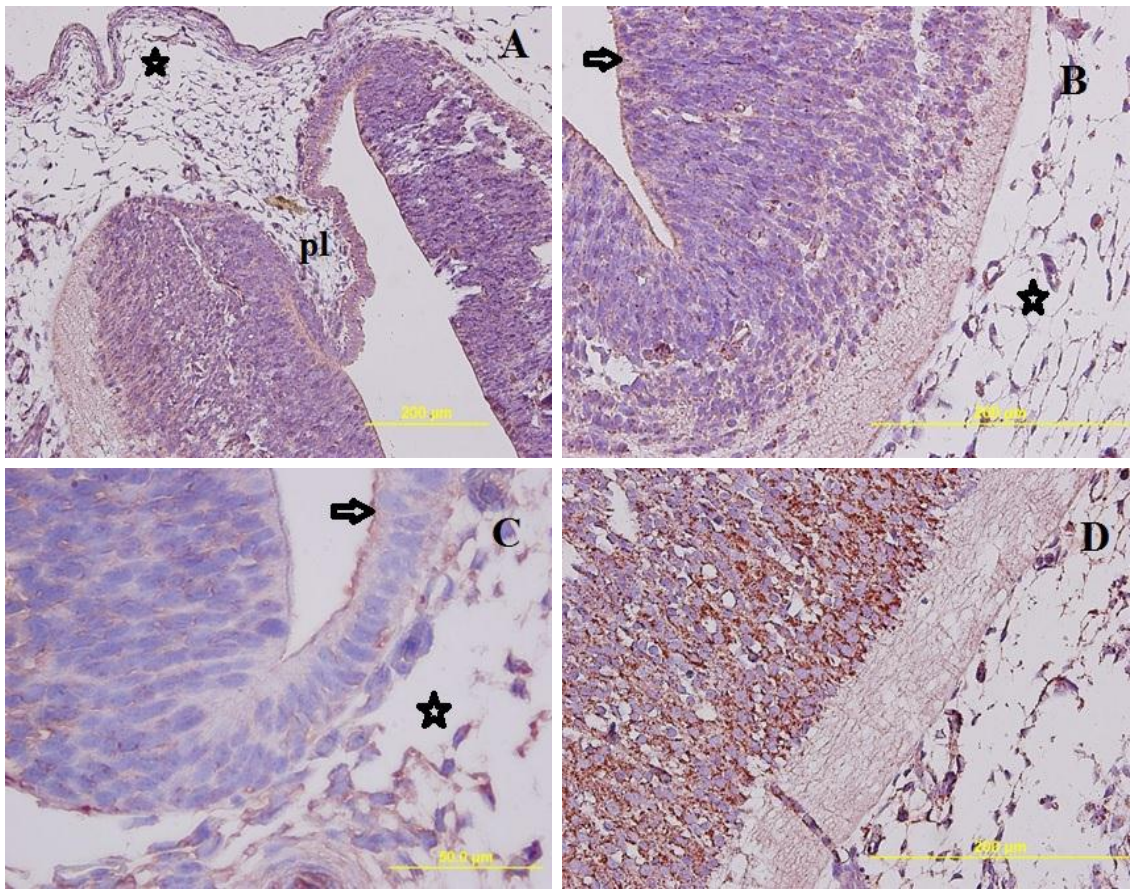
CD56 mezenkimal kök hücre işaretleyicisidir. CD56 boyamayla D2 grubunda genel olarak yoğun lokalizasyon izlenmiştir. Lateral ventrikül pleksus koroideusunda (Şekil 47 A) orta şiddette lokalizasyon gösteren bölgeler belirlenmiştir. Ventrikülü döşeyen ependimal hücrelerde (Şekil 47 B) orta şiddette, nöroepitel hücrelerin sitoplazmasında, kemik-kas-deri alanlarında yoğun şiddette (Şekil 47 C) CD56 lokalizasyonu görülmüştür. Nöroepitel bazal membranında, çevrede bulunan kan damarlarında az miktarda lokalizasyon izlenmiştir (Şekil 47 A, B). Medulla spinalisi saran nöroepitel hücrelerinin sitoplazmalarında (Şekil 47 D) yoğun CD56 ekspresyon alanları izlenmektedir.



**Şekil 47.** D2 grubunda lateral ventrikül nöroepiteli ve pleksus koroideusunda (pl) (A), ventrikülü döşeyen ependimal hücrelerde (  $\Rightarrow$ ) (B), büyük büyütmede nöroepitel sitoplazmalarında (C), medulla spinaliste (D), CD56 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.

#### 4.4.3.11. D2 grubu CD73 bulguları

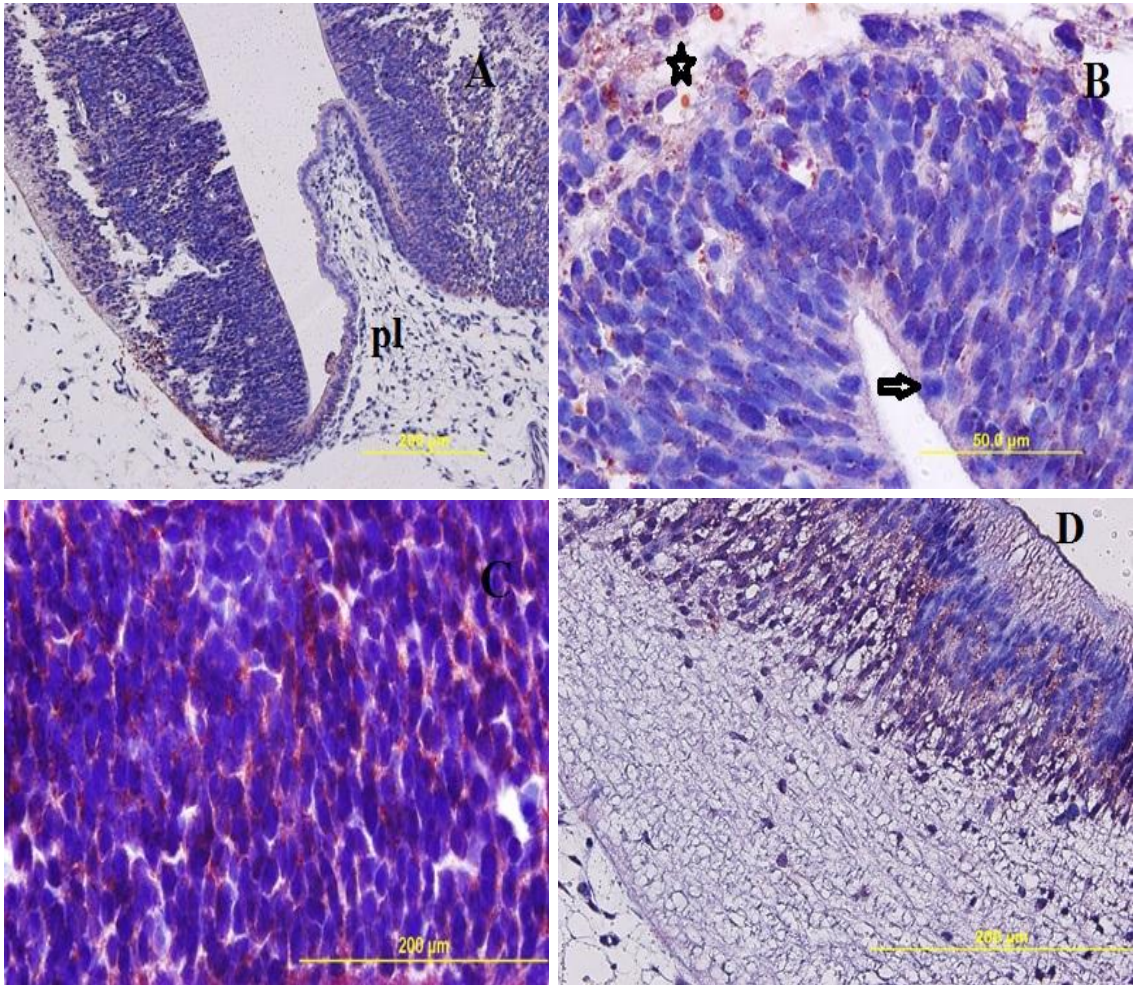
CD73 boyamayla mezenkimal kök hücreler işaretlenmiştir. Genel olarak D2 grubunda orta şiddette immüno lokalizasyon izlenmiştir. Ventriküller çevresindeki nöroepitelde ve pleksus koroideusta orta şiddette lokalizasyon alanları belirlenmiştir (Şekil 48 A). Nöroepitelin bazal membranında, çevrede bulunan kemik-kas-deri alanlarında, kan damarları endotel hücrelerinde orta şiddette ekspresyon alanları görülmüştür (Şekil 48 B). Ventrikülü döşeyen ependimal hücrelerin sitoplazmalarında (Şekil 48 C) orta şiddette CD73 immüno lokalizasyonu belirlenmiştir. Medulla spinalisi oluşturan nöroepitelde yoğun boyanan CD73 lokalizasyon alanları izlenmektedir (Şekil 48 D).



**Şekil 48.** D2 grubunda, lateral ventrikül nöroepiteli ve pleksus koroideusunda (pl) (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde (⇒), kan damarı çevresinde (☆) (B), büyük büyütmede ventriküle yakın nöroepitel hücre sitoplazmalarında (⇒) ve çevresinde bulunan kan damarlarında (☆) (C), medulla spinaliste (D) CD73 immüno lokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X

#### 4.4.3.12. D2 grubu CD90 bulguları

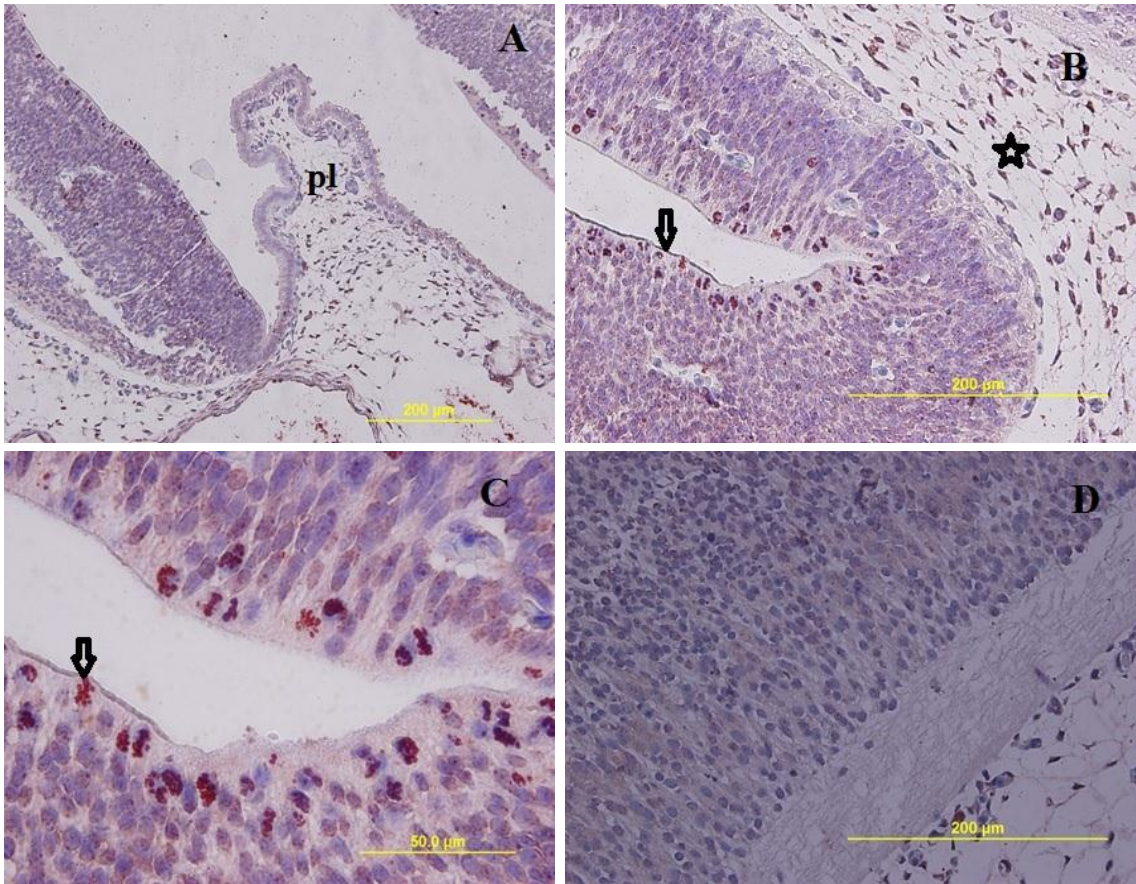
D2 grubuna yapılan CD90 boyamayla genel olarak mezenkimal kök hücrelerin orta şiddette ekspresyonu belirlenmiştir. Lateral ventrikülün pleksus koroideusunda CD90 ekspresyonu görülmemektedir (Şekil 49 A). Ventrikülleri döşeyen ependimal hücrelerde ve kan damarlarında (Şekil 49 B, C), medulla spinalisin nöroepitelini oluşturan hücrelerin sitoplazmalarında, kemik-kas-deri alanlarında bulunan hücrelerde orta şiddette lokalizasyon alanları izlenmektedir (Şekil 49 D). Nöroepitelin bazal membranında, çevrede bulunan kemik-kas-deri alanlarında orta şiddette lokalizasyon belirlenmiştir (Şekil 49 A, B).



**Şekil 49.** D2 grubunda, lateral ventrikül nöroepitelindeki hücrelerde ve pleksus koroideusunda (pl) (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde (⇨), kan damarlarında (☆) (B), büyük büyütmede nöroepitel hücre sitoplazmalarında (C), medulla spinaliste (D) CD90 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.

#### 4.4.3.13. D2 grubu CD105 bulguları

Deney 2 grubuna yapılan CD105 (endoglin) boyamayla mezenkimal kök hücreler işaretlenmiştir. Ventriküllerin ve medulla spinalisin nöroepitelinde bulunan bazı hücrelerin sitoplazmasında belirgin yoğun pozitif boyanan hücresel alanlar izlenmiştir (Şekil 50 A-C). Nöroepitelin bazal membranında, çevre bağ dokuda yer alan kemik-kas-deri hücrelerinde az miktarda lokalizasyon, lateral ventrikülün peksus koroideusunda, endepimal hücrelerde, kan damarları endotel hücrelerinde ise orta şiddette CD105 immünolokalizasyonu görülmektedir (Şekil 50 A-C). Medulla spinalis nöroepitelinde bulunan hücrelerin sitoplazmasında ve bu hücrelerin etrafında bulunan kan damarları endotel hücrelerinde çok az eksprese olan alanlar belirlenmiştir (Şekil 50 D).

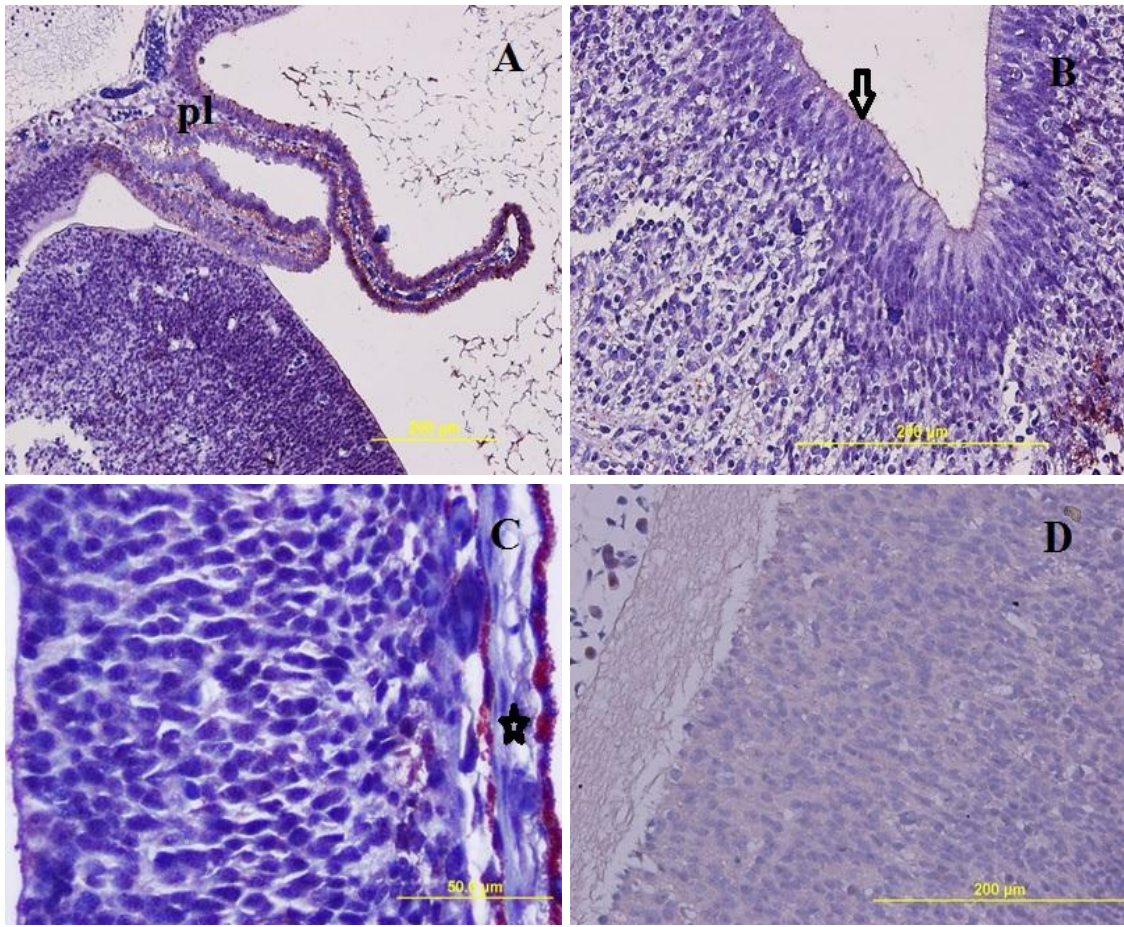


**Şekil 50.** D2 grubu, lateral ventrikül nöroepiteli ve pleksus koroideusunda (pl) (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde (⇨), nöroepitel dışında bulunan kan damarlarında (☆) (B), büyük büyütmede ventrikül etrafında bulunan hücrelerde (C), medulla spinaliste (D), CD105 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.



#### 4.4.3.14. D2 grubunda CD271 (p75, NGFR) bulguları

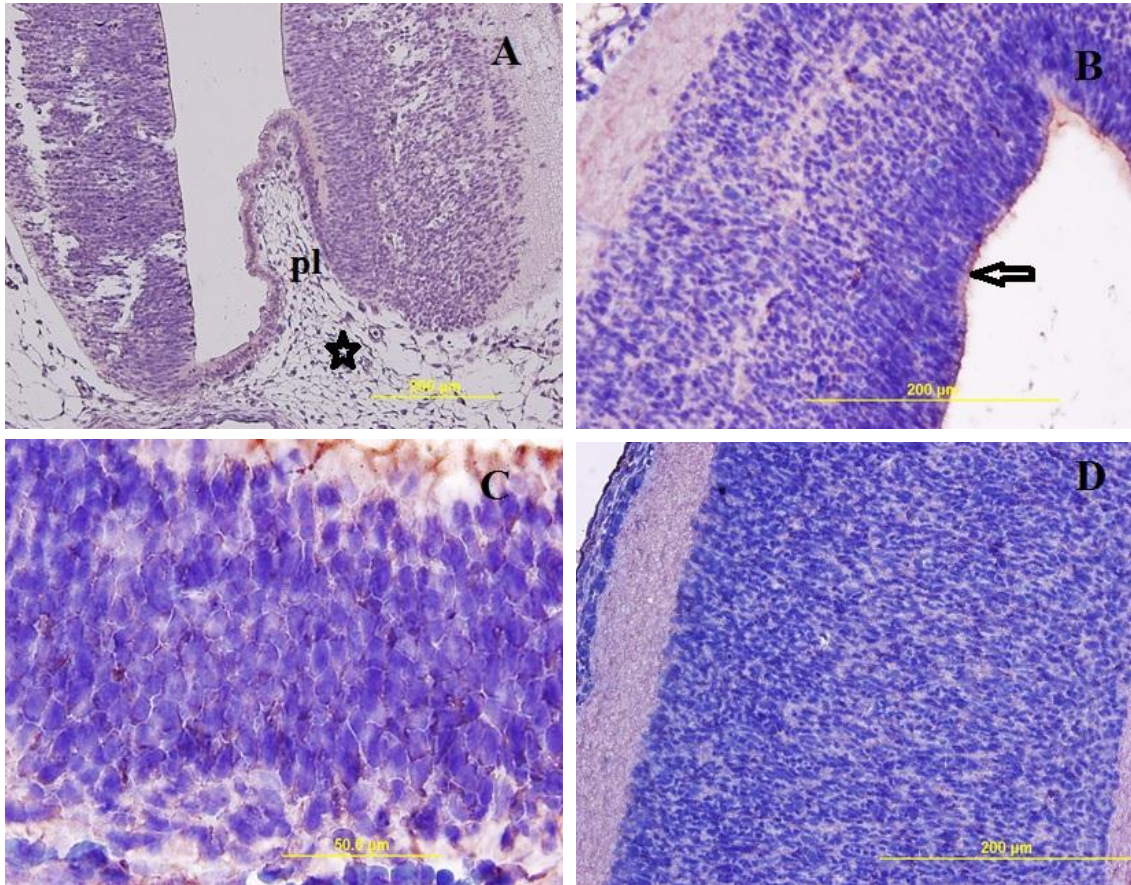
Bu çalışmada yapılan CD271 boyamayla ise mezenkimal kök hücreler işaretlenmiş ve deney 2 grubunda genel olarak orta şiddette immünolokalizasyon belirlenmiştir. Lateral ventrikül pleksus koroideusunda (Şekil 51 A) orta şiddette lokalizasyon alanları hem ependimal hücrelerin sitoplazmalarında hem de altta bulunan kan damarları endotel hücrelerinde izlenmektedir. Ventrikülleri döşeyen ependimal hücrelerde (Şekil 51 B) orta şiddette, nöroepitelin etrafında bulunan kan damarlarında yoğun lokalizasyon gösteren alanlar belirlenmiştir (Şekil 51 C). Medulla spinaliste bulunan nöroepitelde çok az CD271 immünolokalizasyonu belirlenmiştir (Şekil 51 D).



**Şekil 51.** D2 grubunda lateral ventrikül nöroepiteli ve pleksus koroideusunda (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde (⇨) (B), büyük büyütmede nöroepitel hücre sitoplazmaları ve etrafında bulunan kan damarlarında (☆) (C), medulla spinaliste (D) CD271 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X

#### 4.4.3.15. D2 grubu CD14 bulguları

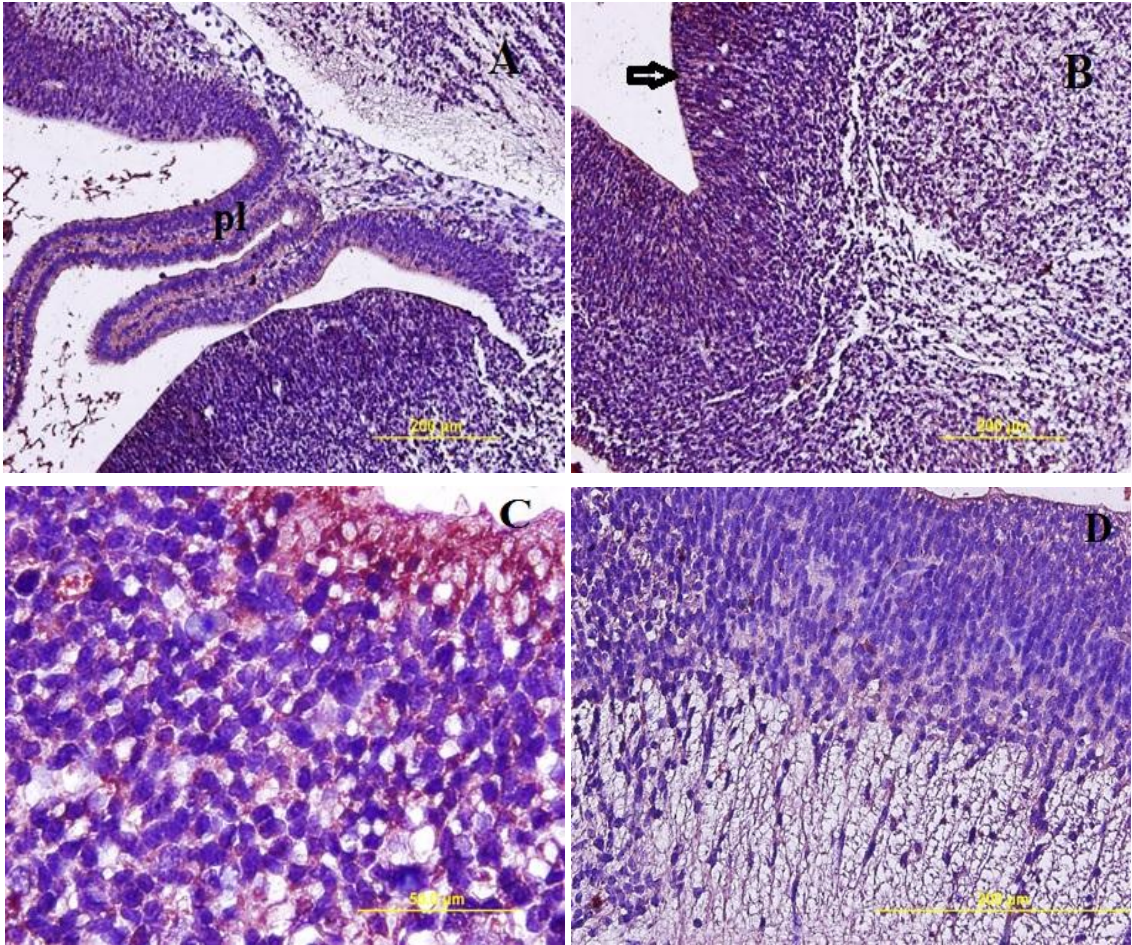
Çalışmada yapılan CD14 boyamayla, hemopoetik kök hücreler D2 grubunda genel olarak orta şiddette lokalizasyon göstermiştir. Lateral ventrikül pleksus koroideusunda (Şekil 52 A), ventrikülleri döşeyen ependimal hücrelerin sitoplazmalarında (Şekil 52 B,C), kemik-kas-deri alanlarında da orta şiddette lokalizasyon alanları görülmektedir. Medulla spinalisin nöroepitel hücrelerinde de zayıf CD14 immünolokalizasyonu belirlenmiştir (Şekil 52 D).



**Şekil 52.** D2 grubunda lateral ventrikül nöroepiteli, pleksus koroideusunda, kan damarlarında (☆) (A), dördüncü ventrikülü döşeyen ependimal hücrelerde (⇨) (B), büyük büyütmede nöroepitel hücrelerinin sitoplazmalarında (C), medulla spinaliste (D) CD14 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.

#### 4.4.3.16. D2 grubunda CD45 bulguları

CD45 hemopoetik kök hücre işaretleyicisidir. Yapılan CD45 boyamayla ise D2 grubunda genel olarak yoğun immünolokalizasyon gösterdiği belirlenmiştir. Lateral ventrikül pleksus koroideusunda (Şekil 53 A) ve ventrikülü döşeyen ependimal hücrelerde (Şekil 53 B) yoğun şiddette lokalizasyon alanları izlenmektedir. Medulla spinalisi saran nöroepitelde bulunan hücrelerde de yoğun lokalizasyon gösteren alanlar izlenmektedir (Şekil 53 D).



**Şekil 53.** D2 grubu lateral ventrikül nöroepiteli ve pleksus koroideusunda (pl) (A), dördüncü ventrikül nöroepitelinde (⇨) (B), büyük büyütmede nöroepitel hücre sitoplazmalarında (C), medulla spinaliste (D) CD45 immünolokalizasyonu izlenmektedir. A) 20X, B) 40X, C) 100X, D) 40X.

**Çizelge 5.** K1-D1 gruplarının, CD44 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( 0 çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD44</b>	<b>K1</b>	<b>D1</b>
Nöroepitel	++	+
Primitif endodimal tabaka	++	+
Bazal membran	++	+
Sklerotom-miyotom-dermatom	++	+

**Çizelge 6.** K2-D2 gruplarının, CD44 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( 0 çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD44</b>	<b>K2</b>	<b>D2</b>
Nöroepitel	+	++
Bazal membran	0	0
Kemik-Kas-Deri	+	+
Pleksus koroideus	+	0

**Çizelge 7.** K1-D1 gruplarının, CD56 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu ( 0 çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD56</b>	<b>K1</b>	<b>D1</b>
Nöroepitel	+	+
Primitif endodermal tabaka	+	0
Bazal membran	+	0
Sklerotom-miyotom-dermatom	+	0

**Çizelge 8.** K2-D2 gruplarının, CD56 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu ( 0 çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD56</b>	<b>K2</b>	<b>D2</b>
Nöroepitel	0	+++
Bazal membran	0	+
Kemik-Kas-Deri	+	+++
Pleksus koroideus	+	+++

**Çizelge 9.** K1-D1 gruplarının, CD73 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( O çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD73</b>	<b>K1</b>	<b>D1</b>
Nöroepitel	++	+
Primitif endodermal tabaka	+++	++
Bazal membran	+++	++
Sklerotom-miyotom-dermatom	++	+

**Çizelge 10.** K2-D2 gruplarının, CD73 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( O çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD73</b>	<b>K2</b>	<b>D2</b>
Nöroepitel	+++	++
Bazal membran	+++	++
Kemik-Kas-Deri	+++	++
Pleksus koroideus	+++	++

**Çizelge 11.** K1-D1 gruplarının, CD90 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( O çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD90</b>	<b>K1</b>	<b>D1</b>
Nöroepitel	++	+
Primitif endodermal tabaka	+++	+
Bazal membran	+++	+
Sklerotom-miyotom-dermatom	++	+

**Çizelge 12.** K2-D2 gruplarının, CD90 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( O çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD90</b>	<b>K2</b>	<b>D2</b>
Nöroepitel	++	++
Bazal membran	0	0
Kemik-Kas-Deri	+	++
Pleksus koroideus	0	0

**Çizelge 13.** K1-D1 gruplarının, CD105 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( 0 çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD105</b>	<b>K1</b>	<b>D1</b>
Nöroepitel	+	++
Primitif endodermal tabaka	++	+
Bazal membran	++	+
Sklerotom-miyotom-dermatom	++	+

**Çizelge 14.** K2-D2 gruplarının, CD105 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( 0 çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD105</b>	<b>K2</b>	<b>D2</b>
Nöroepitel	+	+++
Bazal membran	+	+
Kemik-Kas-Deri	0	+
Pleksus koroideus	0	++



**Çizelge 15.** K1-D1 gruplarının, CD271 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu ( O çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD271</b>	<b>K1</b>	<b>D1</b>
Nöroepitel	+	+
Primitif endodermal tabaka	+	+
Bazal membran	+	+
Sklerotom-miyotom-dermatom	++	0

**Çizelge 16.** K2-D2 gruplarının, CD271 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semi-kantitatif değerlendirme tablosu ( O çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD271</b>	<b>K2</b>	<b>D2</b>
Nöroepitel	+	++
Bazal membran	+	0
Kemik-Kas-Deri	+	+
Pleksus koroideus	0	++

**Çizelge 17.** K1-D1 gruplarının, CD14 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( O çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD14</b>	<b>K1</b>	<b>D1</b>
Nöroepitel	+++	++++
Primitif endodermal tabaka	+++	++++
Bazal membran	+++	++++
Sklerotom-miyotom-dermatom	++++	++++

**Çizelge 18.** K2-D2 gruplarının, CD14 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( O çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD14</b>	<b>K2</b>	<b>D2</b>
Nöroepitel	++++	++
Bazal membran	+++	+
Kemik-Kas-Deri	++++	++
Pleksus koroideus	++++	+++

**Çizelge 19.** K1-D1 gruplarının, CD45 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( O çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD45</b>	<b>K1</b>	<b>D1</b>
Nöroepitel	+	++
Primitif endodermal tabaka	+++	+++
Bazal membran	+++	++
Sklerotom-miyotom-dermatom	++	+++

**Çizelge 20.** K2-D2 gruplarının, CD45 immünohistokimyasal lokalizasyonlarının semikantitatif değerlendirme tablosu ( O çok zayıf, +zayıf, ++orta, +++yoğun, ++++çok yoğun).

<b>CD45</b>	<b>K2</b>	<b>D2</b>
Nöroepitel	++	+++
Bazal membran	++	+
Kemik-Kas-Deri	++	++
Pleksus koroideus	++	+++

## 5. TARTIŞMA

Nöral tüp, insanda fertilizasyonun 17. gününde gelişmeye başlar (Sadler T.W., 1998, Padmanabhan R., 2006; Au K.S., ve ark 2010). Notokordun ve prekordal mezodermin ortaya çıkmasıyla bu yapıların üzerini kaplayan ektoderm kalınlaşır ve böylece nöral plak oluşur. Nörülasyon gerçekleşirken, ekstraselüler matriks elemanları ve pek çok gen bölgesi önemli rol oynar. Retinoik asit bunlardan biridir. Kraniokaudal eksenin organizasyonunda ve segmentasyonunda önemlidir. Aynı zamanda çeşitli gen bölgelerinin ekspresyonunu düzenler (Copp A.J., ve ark 2003; Wallingford J.B., 2005; Au K.S., ve ark 2010). Nöroporların kapanmasıyla nörülasyon tamamlanmış olur. Merkezi sinir sistemi, beyin keseciklerinin bulunduğu geniş bir sefalik parça ve dar bir kaudal parça olan spinal korddan meydana gelir (Carlson B.M., 2009). Nöral tüp kapandıktan sonra ileri farklılaşma için ektoderm, endoderm ve mezodermin çeşitli yapılara dönüşmesi gerekmektedir. Başlangıçta düz ve yassı olan embriyonik disk, organ ve sistemlerin oluşumu ve merkezi sinir sisteminin hızla büyümesiyle sefalokaudal yönde hızla kıvrılır. Bu kıvrılma gerçekleşirken, embriyonun transvers yönde de (lateral katlantılar) katlanmasıyla embriyonun bedeni kabaca silindirik bir görünüm alır (Carlson B.M., 2009). İnsanda sinir sistemi bu şekilde gelişirken diğer türlerde gelişimsel embriyolojiyi kıyaslamak için bazı çalışmalar yapılmıştır. Carnegie aşamaları adı verilen ve 23 aşamayla standardize edilen kronolojik tablo bunlardan biridir. Buna göre nörülasyon farelerde 8. günde, ratlarda ise 8,5. günde gelişmeye başlar (O’Rahilly ve Müller F., 1987).

Nöral tüpün kapanmaması ile oluşan anomaliler, nöral tüp defektleri olarak ifade edilmektedir. Nöral tüp defekti oluşumu, nöral tüpün gelişmeye başladığı andan itibaren pek çok mekanizma ve gen bölgesinin işleyiş bozukluğuna bağlı olabilir. İki temel nöral tüp defekti izlenir. İlki, anensefalidir. Anensefalide nöral tüpün kraniyal bölgede kapanmaması durumunda beynin önemli bölümü oluşmaz. İkincisi ise spina bifidadır. Bu defektte tüpün kaudalinde bir yerde kapanmaması sonucunda meydana gelir (Au K.S., ve ark 2010).

Yapılan çalışmalar nöral tüp defektlerinin etyolojisini tam olarak belirleyememiştir. Ancak genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerin de etkili olduğu bilinmektedir (Au K.S., ve ark 2010). Nöral tüp defektlerinin epidemiyolojisinin değişik ülkelerde, farklı coğrafik bölgelerde ve farklı ırklarda değişiklik gösterdiği bildirilmiştir. Yu M. ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptıkları çalışmada, dünya

genelinde nöral tüp defektlerinin sıklığı %6,42 olarak bulunmuştur. Yapılan pek çok çalışmaya bakıldığında ise bu oranın %0,057-%1,38 arasında olduğu belirlenmiştir (Li Z., ve ark 2006; Au K.S., ve ark 2010). Ülkemizde nöral tüp defekti sıklığını araştıran çalışmalar sınırlıdır. Türkiye’de yapılan çalışmaların sonuçlarına göre nöral tüp defekti sıklığı %0,15-0,63 arasında değişmektedir (Yeşilipek M.A., ve ark 1989; Güvenc H., ve ark 1993; Tunçbilek E., 2004). Himmetoğlu ve arkadaşlarının 1995’te yaptığı insidans çalışmasında, Türk popülasyonunda nöral tüp defekti insidansı %0.27 olarak bulunmuştur. Bunlardan en sık spina bifidaya, 2. olarak anensefaliye rastlanmıştır. Ülkemizde, nöral tüp defekti sıklığının Kuzey ve Doğu Anadolu’da en yüksek Batı Anadolu’da en düşük olduğu saptanmıştır. Annenin eğitiminin olmadığı gruplarda %0,91 iken, yüksek okul mezunları arasında %0,13’e kadar düşmüştür. Bu durum sosyoekonomik düzeyle nöral tüp defekti ilişkisine bağlanmaktadır (Tunçbilek E., 2004). Nöral tüp defektlerinin dünyada ve ülkemizde meydana gelen sıklığı bu konudaki çalışmaların önemini göstermektedir. İnsan deneyleri etik nedenler ve çalışma zorlukları açısından azdır. Var olan insan deneyi çalışmalarının çoğu ise istatistik olarak bilgi sağlamak içindir. Kenneth J. ve arkadaşlarının 1995 yılında yaptıkları çalışmada gebeliğin ilk üç ayında annelerin aldığı yüksek doz retinoik asit ile 22,748 gebe kadından 339 tanesinde doğum defekti görülmüştür.

İnsanda nöral tüp defekti araştırmalarının etik açıdan mümkün olmaması nedeniyle, fare ve ratlar üzerinde yapılan deneyler oldukça önemlidir. Genellikle nöral tüp defekti, teratojen bir ajan verilerek oluşturulur ve gerekli bilgiler toplanır. Bilinen en iyi teratojenlerden biri de A vitamini ve türevleridir. A vitamini yağda çözünebilen berrak sarı bir kristaldir (Moise A.R., ve ark 2007). A vitamini ve türevleri (retinoidler), besinler içinde çeşitli şekillerde bulunurlar. Türevlerinden vücutta en yaygın olanı retinol’dür. Retinol veya A vitamini olarak bilinen all-trans retinol, bitkisel kaynaklarda karotenler, hayvansal kaynaklarda ise retinil esterler olarak bulunur. Retinol ya esterleşerek dokularda depo edilir ya da oksidatif metabolizma ile önce all-trans retinaldehite ardından ise retinoik asite okside olmuş halde yer alır. Burada oluşan ilk ürün retinolden retinoik asittir (Moise A.R., ve ark 2007; Clagett-Dame M., DeLuca, H.F., 2002). Retinoik asit; etkisini alt basamaklarındaki hedef genlerinin transkripsiyonunu aktive eden veya baskılayan çekirdek reseptör proteinlerine bağlanarak göstermektedir. Retinoik asit embriyonun gelişimi sırasında çok önemlidir. Fazlalığı veya azlığı ciddi defektlere neden olur (Maden M. ve ark 1996; Clagett-Dame

M. ve DeLuca H.F., 2002). Retinoik asit, sinir sistemi gelişimi ve nöral doku farklanmasında önemli bir yer tutar (Clagett-Dame M., ve ark 2006). Retinoik asit fonksiyonu ile ilgili bilinen en iyi çalışma arka beyin ve spinal kord gelişimi ile ilgilidir. Maden M. ve arkadaşlarının 1996'da yaptıkları çalışmada, A vitamini eksikliği oluşturulan ratlarda, 4. ve 7. rombomer bölgesinin oluşmadığı gözlemlenmiştir. Başka bir çalışmada, gebelik öncesi dönemde A vitamini eksikliği oluşturulan ratların, gebelik sonrasında embriyoları incelendiğinde, posterior bölgede rombomer eksikliği izlenmiş, buna ek olarak ektopik optik vezikül şekillenmiştir (White J.C. ve ark 2000). Retinoidler iyi bilinen teratojenlerdir (Collins M.D. ve Mao G.E., 1999). Fazla A vitamininin teratojenik etkisi ilk kez 1953 yılında Cohlan tarafından bildirilmiştir. Cohlan, 35,000 IU/gün verdikleri vitamin A'nın, embriyoner dönemin 2-16. günlerinde, eksensefali, yarı damak, yarı dudak, göz bozuklukları oluşturduğunu belirlemiştir. Bundan sonra da birçok çalışma A vitamini ve metabolitlerinin teratojenik etkisini onaylamıştır (Shenefelt R.E., 1972; Holson R.R., ve ark 1999). Benzer anomaliler aşırı retinoid verilen maymun, tavşan, sıçan, fare ve hamster gibi farklı hayvan türlerinde, vitamin A ve bunların metabolitleri ile de gösterilmiştir (Kistler A., 1981; Seegmiller R.E., ve ark 1997; Ross A.S., ve ark 2000).

Deneysel nöral tüp defekti oluşturulurken verilen retinoik asitin teratojen etkisinin, veriliş zamanına bağlı olduğu ifade edilir. Erken postimplantasyon denilen embriyoner dönemin 8-10. günlerinde verilen retinoik asitin tipik olarak kraniofasial ve merkezi sinir sistemi bozukluklarına yol açtığı, 12-14. günlerde ise ekstremit ve genitouriner defektlere yol açtığı görülmüştür (Kistler A., 1981). Verilen retinoik asitin dozu da teratojen etkisini değiştirmektedir (Seegmiller R.E., ve ark 1997). Bu bilgilerden hareketle çalışmamızda ilk gruba 5,5. günde, ikinci gruba ise 10,5. günde retinoik asit verilmiştir. Böylece sırasıyla, embriyoner ve fetal dönemde deneysel nöral tüp defekti oluşturmak amaçlanmıştır. Yapılan çalışmalarda organogenez süreci sırasında verilen retinoik asitin düşük doz olarak ifade edilen miktarının 10 mg/kg olduğu, yüksek doz olarak ifade edilenin ise 100 mg/kg ve daha fazlası olduğu belirlenmiştir (Ross A.S., ve ark 2000). Çalışmamızın başında 70 mg/kg olarak belirlenen all-trans retinoik asit miktarı embriyoların rezorbe olmasıyla beraber değiştirilerek 40 mg/kg oranında retinoik asit (atRA) uygulanmıştır. Yapılan bir çalışmada, dişi ratlara verilen retinoik asit oranı günlük 2 ile 12 mg/g arasında olduğunda, normal embriyonik gelişim izlenmiş, embriyoner dönemin 8,5. gününde

(geç gastrula/erken nörulasyon), bu oranın günlük 250 mg/g'a çıkarılmasıyla, rezorbe embriyolar gelişmiştir (See A.W., ve ark 2008). Yüksek dozda A vitamini; retinoid sinyal iletimi ile beraber retinoid reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna neden olmaktadır. Retinoidlerin embriyoner gelişimdeki etkileri, bir yapının veya sistemin aşırı bozulduğunun gözlemlendiği çalışmalardan anlaşılabilmiştir. Embriyoner dönemin 11. gününde fare embriyolarının aşırı retinoik asite maruz kalmaları sonucunda, retinoik asit reseptörünün (RAR) mRNA miktarının arttığı gösterilmiştir. Böylece retinoik asit reseptör kompleksinin (RAR veya RXR) mRNA miktarınının artışı anormal gelişimin nedeni olarak ifade edilmektedir (Harnish D.C., 1992; Soprano D.R., 1995). Rezorbe embriyo ve anomaliye neden olan retinoik asit fazlalığı durumunda reseptör artışı, reseptörlerin eksprese edildiği yollardaki gen bölgelerinin uyarılmasıyla olur. Başka bir çalışmada, retinoik asite maruz kalan embriyolarda Hox-B1 geni değişmiş, buna bağlı olarak RAR/RXR ekspresyonu artmış ve böylece retinoik asitin defektlere yol açtığı düşünülmüştür. (Marshall H., ve ark 1994). Sulik K.K. ve Dehart D.B. 1988'de yaptıkları çalışmayla, hem mezenkimal hücrelerin hem de ektodermal hücre çoğalmasının, göçünün ve hücre metabolizmasının, aşırı retinoik asit ile etkilendiğini bildirmişlerdir. Sulik K.K. ve Alles A.J. ise 1991 yılında, çeşitli hayvan modellerinde retinol ve metabolitlerinin aşırı verilmesiyle birlikte benzer bozukluklara neden olduğunu göstermişlerdir. Farklı bir çalışmada, all-trans retinoik asit ile fetal ratlarda oluşturulan spina bifidada, nörulasyon sürecinde nöroepitelde bulunan nöral projenitör hücrelerin çoğalması ve apoptozu araştırılmıştır. Embriyoner dönemin 11-13. gününde kontrolle kıyaslandığında, nöroepitelde aşırı miktarda apoptoz buna karşılık çok az nöral projenitör hücre çoğalması izlenmiş ve defektin nedeni yapılan bu çalışmayla ifade edilmiştir (Wei X., ve ark 2012). Aşırı retinoik asitin, fare pluripotent p19 hücre hatlarına etkisinin araştırıldığı çalışmada, retinoik asit metabolizmasındaki enzimlerin ekspresyonunu artırması ve Hox genlerinin aktif olarak çalıştırdığını bildirmiştir (Chen Y., ve ark 2013). Bizim çalışmamızda da 70 mg/kg olan başlangıç dozu ile rezorbe olan embriyoların, retinoik asitin metabolizması sırasında meydana gelen bozulmalardan ve gen ekspresyonu değişimlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. See A.W., ve arkadaşlarının 2008'de yaptıkları benzer bir çalışmada, hayvanlara verilen retinoik asit oranının 250 mg/kg'a çıkarılmasıyla rezorbe embriyolar görülmeye başlanmıştır. Rezorbe embriyo görülmesinin nedeni, yüksek dozda verilen retinoik asitin hücre içi

işleyiş mekanizmalarını yukarıda belirtildiği gibi bozmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Deneysel nöral tüp defekti oluşumu sırasında verilen yüksek doz retinoik asitin, yeni damar oluşumunu engelleyici ve yeni damar oluşumunu artırıcı etkileri de araştırılmıştır. Oikawa ve arkadaşları 1989 yılında, tavuk embriyolarına verilen farklı dozlarda retinoik asit ve türevlerinin, embriyoner dönemin 4,5. gününde koryoallantoik membranda damar oluşumunu arttığını belirlemişlerdir. Yapılan farklı bir çalışmada ise, fare embriyolarında oluşturulan retinoik asit eksikliğinin, embriyoner dönemin 8-8,5. günlerinde vasküler gelişimi engellediği ve çeşitli defektlere yol açtığı bildirilmiştir (Lai L., ve ark 2003). Gaetano C. ve arkadaşları 2001 yılında farklı retinoik asitler deneyerek yaptıkları çalışmada, all-trans retinoik asitin endotel hücrelerde proanjiojenik davranışları artırdığı, anjiogenezi hızlandırdığı belirtilmiştir. Çalışmamızda D1 ve D2 grubu embriyolarında yoğun damarlanma görülmüştür. Bu durum deneysel nöral tüp defekti oluşturulan embriyoların yüzeyinde damar oluşumunu artırdığını düşündürmektedir. Padmanabhan R. 1998 yılında yaptığı çalışmada, fare embriyolarına, embriyoner dönemin 8-12. günlerinde 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg retinoik asit uygulamıştır. Bu çalışmada, embriyolarda kaudal vertebral defektler, spina bifida okkulta/aperta, renal bozukluklar, gastroşizis gibi anomaliler izlenmiştir. Embriyolarda görülen bu defektlerin yanında, özellikle embriyoner dönemin 8. gününde, 100 mg/kg retinoik asit verilen grupta, embriyo yüzeyinde hemorajik alanlar belirlenmiştir. Vasküler akışta bozulma ve bunun sonucu olan hipoksi, ödem ve devamında besin maddelerinin alınamayışı çok iyi bilinen teratojen mekanizmasıdır. Bu durum vasküler bozulma ve devamında gözlenen hemoraji, bizim çalışmamızda da gözlendiği gibi, retinoik asit ile oluşan gelişimsel defektlerin muhtemel ikincil patojen mekanizması olabilir.

İskemi-reperfüzyon olayları sürecinde de damarların daralmasıyla birlikte serbest oksijen radikalleri doku hasarına yol açar. Yapılan bir çalışmada, fare ve ratlara kokain uygulamasıyla serbest radikallerin olduğu ve embriyolarında nöral tüp defekti olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada defektin yol açtığı kanama alanları için antioksidan uygulanmış, kokainle indüklenen hemoraji engellenmiş ancak embriyo defektleri engellenememiştir (Zimmerman E.F. ve ark 1994). Bizim de çalışmamızda deneysel nöral tüp defekti oluşturulan deney gruplarında, damarlarda işleyiş



bozukluğuna bağlı olarak gelişen kanama odakları (hemorajik alanlarla) dokuda serbest oksijen radikallerinin artmasıyla meydana gelmiş olabilir.

Normal şartlarda fare ve sıçanlarda, 5-15 somitlik evrede (yaklaşık 8-9. gün) düz bir eksen üzerinde, kraniyalden kaudale doğru, 180 derecelik bir dönme gerçekleşir. Bu normal dönme durumunun dışında meydana gelen dönüşe anormal aksial rotasyon (neural tube twisting, kinking, abnormal axial turning) ismi verilir. Roger M.L. ve ark 1985 yılında tripan blue'nın teratojen etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada, embriyoner dönemin 8. gününde 50 mg/kg tripan blue uygulanmış olan farelerde, anormal aksial rotasyon izlendiği belirlenmiştir. Miller P.N. ve ark ise 1989'da yaptıkları çalışmada ise folat yönünden eksik diyetle besledikleri embriyolarda benzer şekilde anormal aksiyal rotasyon izlenmiştir. Çalışmamızda kontrol grubu embriyoları vücut ekseninin düzgün şekilde konumlandığı, gelişen merkezi sinir sistemi bölümlerinin yerli yerinde bulunduğu, kraniyal ve kaudal nöroporların kapalı olduğu izlenmektedir. Buna karşılık, D1 grubunda kraniyal nöroporun açık olduğu, vücut ekseninin kraniyalden itibaren dönmüş olduğu grlmştir. Yasuda Y. ve arkadaşları 1989 yılında yaptıkları çalışmada, farelere embriyoner dönemin 8. gününde 40-60 mg/kg all-trans retinoik asit verilmiş ve 27-30 saat sonunda ışık ve elektron mikroskopik bulgular değerlendirilmiştir. Bu çalışmada da bizim çalışmamızla benzer şekilde E9 da kapanmamış nöral tüp varlığı dikkat çekicidir. Özellikle kraniyal nöroporun hücre organellerinde, elektron mikroskopik olarak yapılan incelemede, dejenere hücreler belirlenmiştir. Çalışmada nöroporun açık olmasının, belirtilen dejenere hücreler nedeniyle olduğu ifade edilmektedir. Langman J ve Welch G.W., 1967 yılında yaptıkları çalışmada da, aşırı retinoik asitin nöroepitel hücrelerine etki ettiğini böylece nöral tüp defektlerine yol açtığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada, fare embriyolarına 8. günde 60 mg/kg retinoik asitin nöroepitelde bulunan hücrelerin sitoiskeletlerine etki ettiği, hücrelerin apikal alanında aktin mikrofilamanının bulunmadığı, sitoplazmasında ise aşırı miktarda birikmiş tubulin varlığı izlenmiştir (Yasuda Y., ve ark 1987).

Çalışmamızda, embriyoların bazılarında kraniyal bölgede frontal beyin bölgesinin, kraniyal bölümün boyun bölgesinden sonra düzgün devam etmediği, anormal aksiyal dönüş gösterdiği için düzensiz vertebra yapısı ve medulla spinalisin devamlılık göstermediği belirlenmiştir. Yüksek dozda A vitamini; retinoid sinyal iletimi ile beraber retinoid reseptörlerinin aşırı aktivasyonuna neden olmaktadır. Böylece çeşitli nöral tüp defektlerinin oluşumuna yol açar. Embriyoner dönemin 11. gününde fare

embriyolarının aşırı retinoik asite maruz kalmaları sonucunda, retinoik asit reseptörlerinin mRNA miktarının arttığı gösterilmiştir. Böylece retinoik asit reseptör kompleksinin mRNA miktarındaki artışı anormal gelişimin nedeni olmuştur (Harnish D.C., 1992; Soprano D.R., 1995). Anomaliye neden olan retinoik asit fazlalığı durumunda reseptör artışı, reseptörlerin eksprese edildiği yolaklardaki gen bölgelerinin uyarılmasıyla olur. Yapılan bir çalışmada, retinoik asite maruz kalan embriyolarda Hox-B1 geni değişmiş, buna bağlı olarak RAR/RXR ekspresyonu artmış ve retinoik asitin defektlere yol açtığı böylece deneysel nöral tüp defektleri oluştuğu düşünülmüştür. (Marshall H., ve ark 1994). All-trans retinoik asit ile fetal ratlarda oluşturulan spina bifidada, nörolasyon sürecinde nöroepitelde aşırı apoptoz görülmesinin defekte yol açtığı belirtilmiştir (Wei X., ve ark 2012). Hem retinoit mekanizmasında yer alan önemli reseptörlerin işleyiş bozukluğu, hem de nöroepitel hücrelerde izlenen apoptoz, çalışmamızda görülen nöral tüp defektlerinin nedeni olabileceğini düşündürmektedir.

Erken embriyoner dönemde pluripotent veya multipotent kök hücrelerin ne zaman nöral kök hücrelere değiştiğini, nöral plağın hangi tip kök hücrelerden oluştuğunu konu alan araştırmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalar, erken embriyoner dönemde, embriyoner kök hücrelerin yaygın varlığını göstermiş, ilerleyen dönemde farklandığı bildirilmiştir. Ratlarda spinal nöral tüpte, embriyoner dönemin 8. gününde (E8), yaklaşık %50'nin üzerinde canlı kök hücre bulunduğu ve bu hücrelerin varlıklarını 24 saat boyunca devam ettirdikleri gösterilmiştir (Kalyani A., ve ark. 1997; Kalyani A., ve ark 1998). Embriyoner dönemin 10. gününde ise, fare beyninin telensefalon bölgesinde, kök hücre oranı %20'den %5'e düşmüştür (Qian X., ve ark. 2000). Embriyoner dönem ilerledikçe, kök hücre sayısı hızlı bir şekilde giderek azalır. Yapılan bir çalışmada, rat spinal kordunda, E12 de, %10 oranında görülen kök hücreler doğum sonrası 1. günde %1'e kadar düşmüştür. (Kalyani A., ve ark 1997; Kalyani A., ve ark., 1998). Yapılan başka bir çalışmada ise, özellikle kök hücrelerin embriyonun belli bölgelerinde sayıca az olduğu bildirilmiştir. Fare embriyolarında E8,5 da, anterior nöral plakta yalnızca %0.3 kök hücre işaretlenmiştir (Tropepe V., ve ark.,1999).

Yetişkin kök hücreler erken embriyo gelişimini tamamlamış bir organizmada bulunan kök hücreler olarak tanımlanır. Yetişkin organizmadaki çoğalan geçici hücrelerin öncüsü olan bu hücreler, hasarlanan dokuların yenilenmesinde de görev alır. Somatik kök hücreler olarak da bilinen bu hücreler dokuya özgü kök hücreler olarak isimlendirilir. Embriyoner kök hücreler kısmında belirtilen pluripotent embriyo kök

hücreleri, ilkel cinsiyet hücreleri, nöral krista kök hücrelerinin bir bölümü ve embriyo dışı mezoderm kaynaklı bazı kök hücreleri bir kenara bırakılırsa kalan tüm kök hücreler yetişkin kök hücre olarak ifade edilir. Günümüzde üzerinde çok çalışılan yetişkin kök hücre tipleri hemopoetik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler, nöral kök hücreler, bağırsak kök hücreler ve endotel kök hücreleridir (Can A., 2014; Temple S., 2001).

Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri 1970'lerin sonlarında, plastiğe yapışan, yüksek proliferatif hücreler olarak ifade edilmiş, devamında bu hücrelerin kemik, kırıkta ve fibroblast hücrelere dönüştüğü *in vivo* olarak gözlenmiştir. (Friedenstei A.J., 1976; Friedenstein R.K. ve ark., 1987). Arnold Caplan ise 1991 yılında bu hücre serilerinde 'mezenkimal kök hücre' ve buna benzeyen başka bir kök hücre hattı olan 'hemopoetik kök hücre' tanımını ortaya koyarak sınıflandırma yapmıştır.

Hücre yüzey molekülleri standart isimlendirmesi "cluster of differentiation" CD olarak adlandırılır. İlk mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri Pittenger ve arkadaşlarının 1999 yılında yapmış oldukları çalışmada, multipotent hücrelerden yağ, kırıkta, kemik hattına doğru hücreleri belirlemeye yönelik kullandıkları belirteçlerdir. Mezenkimal kök hücreleri, hücre popülasyonlarında tanımlayabilmek için çok çeşitli monoklonal antikolar bulunmaktadır. Bu hücreler genel olarak TGF üzerindeki epitop bölgesi olan CD105 ile özgün olarak bağlanan SH2 pozitif hücrelerdir. Bu özellik kullanılarak hücrelerin immünomanyetik ayırımı sağlanabilmektedir (Cheifetz S. ve ark., 1992). Aynı zamanda bu hücreler membrana bağlı ekto-5-nükleotidaz epitopuna (CD 73) özgün olarak bağlanan SH-3 ve SH-4 pozitif hücrelerdir (Barry F., ve ark 2001). Bu iki belirteç yanında CD90 da mezenkimal kök hücrelerin yüzeyinde bulunan ve uluslararası hücre tedavisi topluluğu (International Society of Cell Therapy, ISCT) tarafından mezenkimal kök hücre belirteci olarak tanımlananlar arasına katılmıştır (Dominici M. ve ark, 2006). Mezenkimal kök hücrelerin özgün yüzey belirteçleri CD13, CD29, CD44, CD49e, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, CD271, SSEA4, Stro-1, W8-B2/MSCA-1 olarak belirtilmektedir (Sally A. ve ark., 2012). Hemopoetik hücreleri *in vitro* olarak tanımlayabilmek için 'florasanla aktive hücre ayırma (FACS)' yöntemi kullanılmaktadır (Ploemacher R.E. 1997). Bu yöntemle, florasan boya ile işaretli monoklonal antikolarla tanımlanabilen hücre yüzey proteinlerinden yararlanılmaktadır. İnsan hemopoetik kök hücreler için tanımlanmış belirteçler ise CD31, CD34, CD45, CD117 (Sally A., Jones B., 2012) , CD11, CD14 ve HLA-DR'dir (Dominici M., ve ark 2006).

Kök hücre belirteçlerinden faydalanarak dokudaki yerleşimlerinin saptanması, kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşma mekanizmalarının tespit edilmesi beraberinde hastalık patogenezinin ortaya çıkarılmasında fayda sağlayacaktır. Bu amaç doğrultusunda, çalışmamızda mezenkimal kök hücrelerin belirlenmesi için CD44, CD56, CD73, CD90, CD105 ve CD271 belirteçleri kullanılmıştır. Hemopoetik kök hücreleri tespit etmek için de CD14 ve CD45 belirteçleri kullanılmıştır.

Mezenkimal kök hücrelerin belirlenmesinde kullanılan işaretleyicilerden olan CD44, ilk tanımlanan, yüksek polimorfik hücre membran glikoproteinidir. T lenfosit, granülosit ve beyin hücrelerinde belirlenmiştir. Rat mukozal damar duvarı endotel hücrelerinde damar adezyonu ile ilişkilendirilmiştir. CD44 ekstraselüler formu hyaluronik asite, intraselüler parçaları sitoskelete bağlanır. Beyin dokusunda CD44'ün hemopoetik formu beyaz cevherde izlenmiştir. Multiple skleroz, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda ekspresyonunun arttığı ifade edilmiştir (Akiyama H., ve ark 1993). Lökosit, damar endoteli, epitelyal keratinosit, sindirim yolları, endometriyumun hem epiteli hem stromasında izlenmiştir. İmplantasyon ve embriyogenezde CD44 ekspresyonunun özellikle implantasyonda ve erken dönem embriyoner gelişimde önemi bildirilmiştir (Campbell S., ve ark 1995). Yaptığımız çalışmada all-trans retinoik asit uygulanarak oluşturulan deneysel nöral tüp defektli gruplara (D1-D2) ve bunların kontrol gruplarında (K1-K2) CD44 immüno lokalizasyonuna bakılmıştır. Buna göre kontrol gruplarında, erken dönemde (E10,5), geç döneme (E15,5) oranla daha fazla CD44 immüno lokalizasyonu izlenmiştir. Fenderson B.A., ve arkadaşlarının 1993'te yaptığı çalışmada CD44'ün implantasyon sonrası blastosist döneminde desidual hücrelerde görülmeye başladığı bildirilmiştir. Gastrula evresinde mezodermal hücrelerin çevresinde yoğun hyaluronik asit bulunduğu belirtilmiştir. Ekstremiteler oluşmaya başladığında kranial mezoderimde yoğun şekilde, orta gestasyonel dönemde aksiyal iskelet kraniofasial mezenkim, endokardial yastıklar, gastrointestinal kanalın düz kas hücrelerinde, bağ dokusunda CD44 ekspresyonunun devam ettiği ifade edilmiştir. Yapılan bir çalışmada 8-20 somitlik dönemlerde tavuk embriyosunda CD44 lokalizasyonuna bakılmıştır. Bu çalışmada ilk olarak 5 somitlik evrede CD44 lokalizasyonu izlenmiş, nöral tüp kapandıktan hemen sonra da nöral krista hücrelerinin hyaluronik asitçe zengin bölgelere göç etmesi varsayımıyla beraber, CD44 pozitif alanların başta sefalik bölge sonrasında ise kuyruk tomurcuğu mezenkiminde bulunduğu belirtilmiştir. Böylece CD44'ün, nöral krista hücrelerinin göç yolunda

önemli olduğu ifade edilmiştir (Corbela C., ve ark 2000). Fagositoz yapan hücrelerin fagositozunu, ekstraselüler matrikse bağlanmasını, lenfosit hareketini kontrol eder. CD44'ün düşük konsantrasyonu lenfoit dokulardaki hücrelerde (makrofaj ve T hücreler gibi), yüksek konsantrasyonu ise tümör hücrelerinde ve keratinositlerde bulunmuştur (Kennel S.J., ve ark 1993). CD44'ün görevleri; morfogenez, organogenez, hemopoez, lenfositlerin homing mekanizmasını sağlama, hücrelerin göçü, lökosit aktivasyonu, hücreler için bir efektör görevi, hücre ölümünün düzenlenmesi olarak özetlenebilir. Yapısında, sinyal mekanizmasında meydana gelebilecek herhangi bir bozulma ile hematolojik malignansi, otoimmün hastalıklar ve tümör oluşumu gerçekleşir. Hemopoetik hücrelerden kaynaklanan tümörleşme sürecinde de CD44'ün önemli olduğu belirtilmektedir (Schmit R., ve ark 1997). Farelerde CD44 geninin kapatılmasıyla morfogenez ve organogenez sürecinde bozulmalar meydana gelmiştir (Marhaba R., ve ark 2004). Zoller'in 2011 yılında yaptığı çalışmada, CD44 molekülündeki yapısal bozulmalarla birlikte matriks yapısında değişim, apoptoz dengesinde bozulma ve homing mekanizmasında aksaklıklar meydana geldiği, böylece pek çok kanser çeşidinde belirteç olarak kullanılabilceği belirtilmiştir (Zoller M., ve ark 2011). Ayrıca yapılan bir çalışmada, CD44'ün hyalurana bağlanarak mezenkimal hücrelerin göçünde etkin rol oynadığını vurgulanmıştır (Zhu H., ve ark 2006). Wheatley S.C., ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptığı çalışmaya göre ve farelerde embriyoner dönemin 9,5-12,5. günlerinde kalp, somit, ekstremit mezenkimlerinde giderek artan bir CD44 ekspresyonu belirlenmiş, en yüksek ekspresyonun E12,5 da olduğu ifade edilmiştir. CD44 higroskopik glikozaminoglikanlardan olan hyaluronik asite bağlanarak etki eder. Hyaluronik asit hücre yüzeyinden sentezlenen moleküler ağırlığı fazla olan bir polisakkarittir (Morriss G.M., Solursh M., 1978). Hyaluronik asit embriyoner kök hücre davranışını birkaç yoldan düzenler. Birincisi hücrelerin çoğalması ve göçünü sitimüle eder. Düşük dirençli matriks, mezenkimal hücrelerin gelişimi için çevre oluşturur. Hücreler burada çoğalır ve göç edebilecekleri ortama sahip olurlar. İkincisi, hyaluronik asitten zengin matriks, büyüme faktörlerini bağlar. Bu büyüme faktörlerinin sinyalleriyle hücreler büyür ve farklılaşır. Üçüncüsü ise, hyaluronik asitin hücrelerin matrikse yapışma ve canlılığını devam ettirebilmeleri için bağlayıcı bir görev üstlenir (Fenderson B.A., ve ark 1993). Böylece hücrelerin yapışmasını, göçünü ve çoğalmasını sağlar. Bunun yanında hyaluronik asit erken embriyoner dönemde fazla miktarda eksprese olur (Morriss G.M. ve Solursh M., 1978). Bizim de çalışmamızda kontrol

gruplarında erken dönemde geç döneme oranla daha yüksek CD44 lokalizasyonu belirlenmiştir. Morris 1978 yaptığı çalışmada hyaluronik asitin en çok kranial alanda, E9 da kapanan nöral tüpte bulunduğunu belirtmiştir. Burada nöral tüpün bikonveks şekil almasındaki rolü vurgulanmıştır. Çalışmada kranial alanda glikozaminoglikanların ve özellikle hyaluronik asitin işaretlenmesinin oldukça zor olduğu, bu çalışmayla kranial alan mezenkiminde %80 oranında hyaluronik asit işaretlendiği belirtilmektedir. Kranial alanda nöroektoderm altındaki mezenkimde ve bikonveks nöral katlantılarda varlığı belirlenmiştir. Bizim de çalışmamızda K1 grubunda kranial nöroepitelde, primitif endodermal tabakada, bazal membranda ve nöroepitel çevresindeki sklerotom-miyotom-dermatom alanlarında orta yoğunlukta CD44 immüno lokalizasyonu belirlenmiştir. Nöroepiteldeki glikozaminoglikanlar özellikle nöral tüp oluşumu sırasında nöral tüpün bikonveks şekilden bikonkava dönüşümü sağlar. Nöroepitelin oturduğu bazal membran çevrede bulunan mezenkimal hücrelerin aktivitesini, hareketini ve iletişimini sağlar. Bu nedenle yüksek oranda hyaluronik asit barındırdığı belirtilmiştir (Hay E.D. ve Meier S. 1974). Nöral tüpün kapanması sırasında nöral katlantılar yükselir ve birbirine yaklaşır. Bu sırada çevresinde bulunan mezenkimal hücre sayısı artar. Burada artan mezenkimal hücrelerin ekstraselüler matriks bileşenleri hem de nöroektoderm hücrelerinin ekstraselüler matriks içeriği bikonveks şeklin oluşumunu sağlar. Yapılan başka çalışmalarda da hyaluronik asit ekspresyonunun E6,5-7,5. günlerinde başladığı, mezenkimal hücrelerin etrafında ve nöroepitelin etrafında zengin bir ekstraselüler matriks yapısı şekillendiği böylece mezenkimal hücrelerin göç etmeye başladığı bildirilmiştir. Devamında E11-13.günlerde TGF etkisi ile özellikle nöroepitelin çevresindeki bağ dokusunda bulunan hücrelerde işaretlenmiştir. Embriyoner dönemin sonlarına doğru azalmış ve doğum sonrasında beyin bölgesinde zayıf lokalizasyonda izlenmiştir (Oohira A., ve ark 1986; Ripellino J.A., 1988; Corbel C., ve ark 2000). Çalışmamızda retinoik asitle oluşturulan nöral tüp defektli deney gruplarında kontrol gruplarına oranla daha az CD44 immüno lokalizasyonu belirlenmiştir. CD44 mezenkimal hücrelerin ekstraselüler matrikse yapışmasını, göçünü ve farklanmasını kontrol eder (Fenderson B.A., ve ark 1993). Vitamin A ile indüklenmiş eksensefali çalışmasında nöral katlantıların yükselememesinin sebebinin çevreye yeterince mezenkimal hücrenin göç edememesi olduğu belirtilmiştir (Martn-Padilla M., 1966; Morris G.M., 1972). Çalışmamızda da D1 ve D2 gruplarında, K1 ve K2 gruplarına oranla daha az miktarda CD44 lokalizasyonu izlenmiştir. Burada aşırı

retinoik asitin nöroepitel hücrelerinin ve mezenkimal hücrelerin ekstraselüler matriks içeriklerini özellikle de hyaluronik asit yapısını bozduğunu böylece CD44 immüno lokalizasyonunu azalttığı düşünülmektedir. CD44 lokalizasyonunu nöral tüp defektinde azalması nöral katlantıların yükselememesi ve böylece nöral tüp defektlerini meydana getirmiş olduğunu düşündürmektedir. Başka bir hipervitamin A çalışmasında nöral katlantıların hücrelerinde ekstraselüler matriks bileşenlerinin yapısındaki bozulmanın, nöral katlantıların kubbe şeklini alamamasının nedeni olduğu vurgulanmıştır (Morris G.M., 1975).

Çalışmamızda kullandığımız bir diğer mezenkimal kök hücre belirteci CD56'dır (NCAM). CD56 (NCAM, neural cell adhesion molecule), nöral hücre adezyon molekülü olarak bilinen, yaklaşık 140 kDa ağırlığında bir hücre yüzey proteindir (Kusafuka K., ve ark 2011). Heparan sülfat ve kollajen gibi ekstraselüler matriks proteinleri arasında  $Ca^{+2}$  bağımlı heterofilik adezyonu düzenler. Erken embriyoner dönemden itibaren eksprese edilmeye başlar. Çeşitli büyüme faktörleri, cAMP, hormon ve transmitterler ile düzenlenir. Hem embriyoner hem de ileri dönemde sinir sisteminin gelişim ve organizasyonunda önemli olan bir belirteçtir. Mezenkimal dokuların gelişim sürecinde (kalp, düz ve çizgili kas, kıkırdak, böbrek epitel, deri) etkindir. Ayrıca CD56, sinir sistemi dışında gelişen gonadlar, endokrin hücreler, Leydig hücreler, mikrovasküler endotel hücreler, damar düz kas hücreler, böbrek epitel hücreler, hemopoetik hücreler, natural killer hücreler ve kondrositlerden de eksprese edilir. Gelişim döneminde CD56 ekspresyonu aşırı miktarda ve geniş alanlarda bulunur, erişkin bireylerde ise buna oranla daha azdır. Erişkinlerde özellikle sinir ve kas doku yenilenmesinde, doku bütünlüğünü sağlamada, yara iyileşmesinde önemlidir. Akciğer kansinimleri, nöroblastoma polimiyelosiz gibi bazı hastalıklarda aşırı eksprese olur. Ratlarda CD56'nın beyincik, medulla spinalis ve otonomik sinirlerde lokalizasyonuna bakılan bir çalışmada, beyincik Purkinje hücrelerinde çok zayıf, beyincik korteksinin moleküllere tabakasında orta seviyede, medulla spinaliste ependimal hücrelerin bulunduğu alanlar ile otonomik sinir sistemine ait yapılarda yüksek miktarda lokalize olduğu bildirilmiştir (Filiz S., ve ark 2002). Tüm bunlar yanında, CD56'nın naturel killer, nöron ve kas hücreleri için de özel bir belirteç olduğu da vurgulanmıştır (Zola H., ve ark 2007). Kemik iliğinden köken alan mezenkimal hücrelerin alt birimleri tarafından eksprese edildiği bulunmuş ve mezenkimal hücrelerin çoğalmasında önemli rolü olduğu ortaya konmuştur (Battula V.L., ve ark 2009). Yapılan bir çalışmada CD56

geni susturulmuş farelerde nöral tüpün açık kaldığı belirlenmiştir. Özellikle erken embriyoner dönemde nöroepitelde, bazal membranda, nöral tüpün birleşme bölgelerinde yüksek oranda lokalize olduğu ifade edilmiştir. Aynı çalışmada mutant farelerde benzer bölgelerde CD56 lokalizasyonu belirlenememiştir (Moase C., ve Tasler D.G, 1991). Bizim yaptığımız çalışmada deneysel nöral tüp defekti oluşturduğumuz embriyoner ve fetal dönem gruplarında (D1-D2) ve bunların kontrol gruplarında (K1-K2) CD56 immüno lokalizasyonuna bakılmıştır. Buna göre kontrol grununda erken dönemde az miktarda lokalizasyon belirlenirken geç dönemde belirlenememiştir.

CD56, karbonhidrat yapı içeren bir moleküldür ve polisialik asit içerir. CD56 embriyoner ve erişkin dönemde iki farklı yapıda bulunur. Embriyoner dönemde CD56 daha yüksek sialik asit içerir. Çalışmalarda tavuk embriyolarının blastoderminden eksprese edildiği ifade edilmiş, gastrulada azaldığı, nörolasyon sırasında ise arttığı belirlenmiştir. Devamındaki süreçte doğuma kadar az miktarda eksprese olduğu, doğumdan sonra ilk dönemler yüksek seviyede kaldığı ve erişkin dönemlerde ise yeniden azaldığı ifade edilmektedir (Crossin K.L., ve ark 1990, Goridis C. ve Brunet J.F., 1992). CD56 nörolasyon sırasında ve projenitor hücrelerin göçünde önemlidir. Fare embriyolarında E9-18. günlerde nöroepitelde ve bazal membranda CD56 lokalizasyonu belirlenmiştir. CD56, nörolasyon sırasında en çok neokortekste bulunur. Fare embriyolarında 9. günde, nöral tüp kapanır kapanmaz ekspresyonu başlar. Devam eden günlerde E9,10,11 de telensefalonda lokalizasyonu belirlenmiştir. Embriyoner dönemin 14. gününde ise nöroepitel ve ventriküller çevresinde ekspresyonu giderek artmıştır. Başlangıçta nöron spesifik belirteç olarak ifade edilse de ilerleyen dönemlerde oligodentrositlerde, Schwann hücrelerde de varlığı gösterilmiştir (Fushiki S., ve Schachner M., 1986). Bizim çalışmamızda, K1 grubunda zayıf olarak izlenen CD56 immüno lokalizasyonu, K2 grubunda çok zayıf olarak belirlenmiştir. Böylece erken embriyoner dönemde CD56 immüno lokalizasyonu zayıf da olsa izlenirken ilerleyen günlerde azalmıştır. Yapılan bir çalışmada Hekmat A., ve arkadaşlarının 1990 yılında fare embriyolarında, E14. günden, 14. aya kadar beyinciğin farklı bölgelerinde CD56 immüno lokalizasyonuna bakmışlardır. Çalışmaya göre Purkinje hücrelerden ancak E14 de CD56 immüno lokalizasyonu belirlenebilmiş, postnatal 11. güne kadar aynı seviyede kalmıştır. Prenatal dönemin sonları ve postnatal dönemin başlarında beyinciğin diğer tabakalarında ise yüksek miktarda CD56 ekspresyonu izlenmiştir. Burada embriyoner dönemin başında göç eden nöron ve glia hücre öncüllerinin hareket halinde olduğunu,



bu nedenle CD56 ekspresyonunun az miktarda görüldüğünü ancak embriyoner dönemin sonlarında yüksek seviyeye ulaştığı belirtilmiştir. Ancak farklı çalışmalarda CD56 immüno lokalizasyonu ile ilgili çok farklı bulgular elde edilmiştir. Pollerberg E.G ve arkadaşları 1985 yılında yaptıkları çalışmada fare embriyolarında beyin bölgesinde CD56 ekspresyon seviyesine bakmışlardır. Embriyoner dönemin 14. gününde en yüksek seviyede görülmüş, doğum sonu ilk haftadan sonra ise CD56 ekspresyonunun azaldığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda deneysel nöral tüp defekti oluşturulan D1 grubunda kontrole oranla CD56 ekspresyonunun çok az olduğu belirlenmiştir. Buna karşılık D2 grubunda K2 grubuna oranla çok fazla CD56 immüno lokalizasyonu görülmüştür. Aşırı retinoik asit verilerek oluşturulan nöral tüp defektinde, mezenkimal hücrelerde CD56 ekspresyonu erken dönemde artırmış geç dönemde azaltmış olabilir. Yapılan çalışmalarda Hox genlerinin CD56 ekspresyonunu aktive ettiği bildirilmiştir. Böylece vücut planının sağlanmasında önemli görevleri bulunmaktadır (Jones F.S., ve ark 1992). Yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, aşırı retinoik asit uygulanmış farelerde Hox genlerinin fazlaca aktive olduğu belirtilmiştir (Conlon R.A., ve Rossant J., 1992). Çalışmamızda D2 grubunda D1 grubundan daha fazla seviyede CD56 immüno lokalizasyonu belirlenmiştir. Retinoik asitin fazla olması Hox gen aktivitesini artırmasına böylece deney gruplarında CD56 ekspresyonununun, 15,5. günde 10,5. güne oranla artırmasına neden olmuş, böylece nöral tüp defekti gelişmesine neden olmuş olabilir.

Çalışmamızda kullandığımız mezenkimal kök hücre işaretleyicilerinden biri de CD73'dür (Ecto-5'-nucleotidaz) (Sally A. ve ark., 2012). CD73, yaklaşık olarak 70 kDa ağırlığında, glikosilfosfatidilinositol bağlı hücre membran glikoproteinidir. Yüzey bağımlı CD73 adenozin 5 trifosfat, monofosfat ve difosfat metabolizmasında görev alır. CD73, lenfositler ve alt tiplerinde, endotel hücrelerinde, epitel hücrelerinde eksprese edilir (Colgan S.P., ve ark 2006; Mills J.H., ve ark 2008). Epitelyal sıvı iyon transferi ve hücreler arası bariyer olma gibi pek çok fizyolojik olayı kontrol eder. İnflamasyon veya herhangi bir nedene bağlı hipoksi durumunda, ATP metabolizması ile hücrenin ve dokunun adaptasyonunu sağlar. CD73 geni eksik farelerle yapılan çalışmalarda, glomerular filtrasyonda azalma başta olma üzere böbrek fonksiyonlarında bozulmalar izlenmiştir. Bunun yanında artan hipoksi nedeniyle, damarlarda sızıntı ve kaçaklar görülmüştür. Aynı zamanda CD73, adenozin hedefli pek çok ilaç yapısına katılarak, tedavide kullanılmaya başlanmıştır. (Colgan S.P., ve ark 2006). CD73 kemik iliği

stromal etkileşimlerde (Barry F., ve ark 2001), mezenkimal hücrelerin göçünde ve mezenkimal hücrelerin adaptif bağışıklıktaki potansiyel modülasyonunda (Ode A., ve ark 2011) etkilidir. Tüm bu özellikleri yanında CD73, beyinde nöromodülasyon ve homeostazı sağlar. Ecto-5'-nucleotidase enzimi miyelin, astrosit ve aktive olmuş mikrogliya belirteci olarak da tanımlanmıştır (Langer D., ve ark 2008). Yüksek iyon transferi durumlarında, yoğun şekilde CD73 eksprese edilir. Erişkin bireylerde yüksek iyon transferinin en çok olduğu organlar sırasıyla kolonda, böbrek ve beyin, karaciğer, akciğer, kalp ve en az da kas dokularıdır. Dolayısıyla bu dokularda CD73 ekspresyonu fazladır. İnflamasyon ve göç durumlarında lökosit ve polimorfonükleer hücrelerin damar endotelinden geçerek gereken bölgelere göç etmesinde rol oynar. Artmış adenozin miktarı hipoksiye neden olur. CD73 ekspresyonu hipoksi ve iskemide koruyucudur ve adaptasyon sağlar. Hipoksi ve iskemide CD73 ekspresyonunun arttığı çalışmalarda gösterilmiştir (Colgan S.P., ve ark 2006). Çalışmamızda, fazla miktarda all-trans retinoik asit verilerek deneysel nöral tüp defekti oluşturulmuş, embriyoner dönem (D1) ve fetal dönem (D2) gruplarına ve bunların kontrol (K1-K2) grubu embriyolarına, CD73 antikoru uygulanmıştır. Dokularda ATP'nin işleyiş mekanizmasının bozulmasından kaynaklanan tümör oluşum sürecinde, özellikle agresif meme kanseri hücre hatlarında yoğun pozitif lokalizasyon gösterdiği belirtilmiştir (Supernat A ve ark., 2012). Bununla birlikte, CD73 pek çok malignant kanserde belirteç olarak da kullanılmaktadır. Ekstraselüler monofosfat nükleotidleri hidrolize edilirken, endotel hücrelerinden ekto-5'dehidrogenazların (CD73) aşırı eksprese olmasını sağlar. Çalışmamızda all-trans retinoik asit uygulanmış deney gruplarında kontrol gruplarına oranla CD73 immüno lokalizasyonunun daha az olduğu görülmektedir. Aşırı retinoik asit uygulaması sonrası ATP metabolizmasını bozmasıyla nöral tüp defekti meydana gelmiş olabilir. CD73'ün aynı zamanda T hücrelerinin aktivasyonu, çoğalma ve göçüne neden olduğu bildirilmiştir (Wang L., ve ark 2013). Maienschein ve Zimmerman'ın 1996 yılında yaptıkları çalışmada, sıçan beyincik korteks bölgesindeki, korteks granüler hücrelerde ve bunların uzantılarında CD73 immünohistokimyasal olarak pozitif işaretlenmiştir. Çalışmada neonatal dönemde rat beyin dokusunda CD73, özellikle nöroblastların göç etme sürecinde etkili olduğu, bu nedenle rat beyinde farklı dağılım gösterdiği belirtilmiştir. Postnatal dönemde izlenen granüler nöronların bu şekilde pozitif CD73 işaretlenmesinin, aslında neonatal dönemden kaynaklandığı belirtilmektedir (Maienschein V. ve Zimmermann H. 1996).

Nükleotidler son yıllarda ekstraselüler sinyal iletiminin çalışmasında gerekli moleküller olarak tanımlanmıştır. Nükleotid sinyallerinin de sinir sistemi gelişiminde çok önemli rol oynadığı belirlenmiştir. Bu sinyaller, nükleotitlerin hücre yüzeyinde bulunan özel reseptörlerine bağanarak ATP, ADP, AMP dönüşümü veya tam tersi gerçekleşen metabolik süreci kontrol ederler. Bu dönüşümün sağlanmasında çeşitli enzimler görev alır. Alkalın fosfatazlar (TNAP), ektonükleotid pirofosfatazlar (NPP), ekto-5'nükleotidazlar, ATP metabolizmasında görevli enzimlerden birkaçıdır. Alkalın monofosfatazlar (memelilerde 4 tipi bulunur) nükleositleri 5'trifosfat, difosfat ve monofosfata indirger. Bunlar da hücre yüzeyinde bulunan glikozil fosfatidil inositollere bağlar. Böylece insan ve fare embriyonik kök hücreleri tarafından alkalın fosfatazın (TNAP) doku nonspesifik formu olarak eksprese edilir. Histokimyasal enzim olarak homojen TNAP aktivitesi, fare nöroepitelinde E8,5 da belirlenebilmiştir (Narisawa S., ve ark 1994). E9,5 da TNAP pozitif hücreler belirgin şekilde beyin ve medulla spinaliste görülmeye devam eder. E10,5-12,5 da mezensefalon rhombensefalon arasında belirlenmiştir. TNAP ekspresyonu E14,5. günde belirgin şekilde beyin ve medulla spinaliste azalmıştır. Doğum sonrası dönemde artık beyincik korteksinde eksternal granüler hücrelerde görülmüştür (Yoshioka T. ve Tanaka O., 1989). Nükleotidlerin mekanizmasında rol oynayan bir diğer enzim de ektonükleotid pirofosfatazlarıdır (NPP). Bunların ekspresyonu ise erken dönem E9,5 da nöral tüpün taban plağında görülmeye başlamıştır. Devam eden günlerde ekspresyonu artmış ancak 16,5. güne gelindiğinde ekspresyon belirlenememiştir (Bächner D., ve ark 1999). Doğum sonrası dönemde ise özellikle miyelin yapısı oluşmasında görevli olduğu ifade edilmiştir (Fuss B., ve ark 1997). Yaptığımız çalışmada K1 grubunda orta şiddette K2 grubunda ise yoğun şiddette CD73 immünolokalizasyonu izlenmiştir. Çalışmalarda ATP metabolizmasında görevli olan enzimlerden TNAP ve NPP ekspresyonları, erken embriyoner dönemde (E8,5-9,5) nöroepitelde belirlenebilmiştir. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde (E14,5-16,5) beyin ve medulla spinalis bölgesinde ekspresyonları giderek artmıştır. Embriyoner dönemin sonu ve doğum sonrası dönemlerde ise giderek azalmış şekilde belirtilmiştir. CD73'ün gelişimin erken dönemlerinde nöroblastların yüzeyinde bulunduğu, postnatal dönemde ise rat beyinciğinde daha önce buraya göç eden nöroblastlarda az miktarda işaretlendiği belirlenmiştir (Schoen S.W., ve ark 1988). CD73 özellikle nöroblast prokürsörlerinin çoğalmasında, göçünde ve farklılaşmasında, dendrit ve akson gelişiminde önemlidir. Nöronlar arasında sinaps kurulumunda da çok önemli bir yere sahiptir (Fenoglio C., ve

ark 1995; Bailly Y., ve ark 1995). Zimmermann H., 1996 yılında yapmış olduğu çalışmada, CD73'ün özellikle nörogenezde önemini vurgulamıştır. Ekstraselüler matrikse bağlanarak hücreler arası ilişkileri kontrol ederler. Yapılan çalışmalarda WNT ve  $\beta$  kateninlerin CD73 aktivitesini artırdığı ifade edilmektedir (Spsychala J., ve ark 2004). Erken embriyoner dönemde sinir sistemi gelişirken, nöroblastların göçü, çoğalması ve farklılaşmasında WNT sinyalleri de önem taşır (Ille F., Sommer L., 2005). Bizim çalışmamızda da embriyoner dönemin 10,5. gününde (K1 grubu) fetal dönemin 15,5. gününe (K2 grubu) oranla daha az CD73 immüno lokalizasyonu belirlenmiştir. Deneysel nöral tüp defekti oluşturulan grupları (D1, D2) kontrolle (K1, K2) kıyasladığımızda daha az CD73 immüno lokalizasyonu belirlenmiştir. K1 grubunda orta şiddette CD73 lokalizasyonu izlenirken D1 grubunda zayıf ancak K2 grubunda yoğun, D2 grubunda orta yoğunlukta izlenmiştir. Yapılan çalışmalarda deneysel nöral tüp defekti oluşumu sırasında, CD73 aktivitesini arttırdığı ifade edilmektedir (Richter-Landsberg C., ve ark 1993; Kohring K., ve Zimmermann H., 1998).

Mezenkimal kök hücrelerin özgün yüzey belirteçlerinde bir diğeri CD90'dır (Thy-1). CD90, moleküler ağırlığı 17.500 olan, hücre yüzey membran glikoproteinidir. İlk olarak fare beyin ve timüs dokusunda tanımlanmıştır (Reif A.E., ve Allen J.M.V., 1964). Yetişkin rat beyin dokusunda nöronlarda gözlenmiş ancak glial hücrelerde görülmemiştir. Embriyoner dönemde CD90 ekspresyon zamanı henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılan çalışmaların çoğunda, CD90'ın embriyoner dönemin başlarında dokularda izlenemediği, ancak embriyoner dönemin sonlarına doğru ekspresyona başladığı, en fazla görülen dönemin doğumdan sonraki haftalar olduğu belirtilmiştir (Schachner M., 1982). Bununla birlikte Barnstable C.J., ve arkadaşları 1983'de yaptıkları çalışmada CD90 ekspresyonunun merkezi sinir sisteminde embriyoner dönemin 2. gününde başladığını ifade etmişlerdir. Çalışmamızda E10,5. gün K1 grubunda, E15,5. gün K2 grubuna göre nöroepitelde, primitif ependimal tabakada, bazal membranda, kemik-kas-deri alanlarında daha fazla CD90 lokalizasyonu izlenmiştir. Schachner M., 1982 yılında yapmış olduğu çalışmada CD90, E11-13. günlerde beyincik Purkinje hücrelerinde görülmeye başladığını ancak ekspresyonunun daha erken postnatal dönemde başladığını belirtmişlerdir. Aynı çalışmada fare ve ratlarda beyin dokusunda, CD90 miktarının doğumla birlikte hemen azaldığını, ancak doğum sonrası 3. hafta sonuna kadar da yeniden giderek arttığını belirtmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada ise, rat embriyoner gelişim döneminde ilk defa beyinciğin

beyaz cevherinde izlenmiştir. Postnatal dönemde, 0. günden itibaren doğuma kadar beyin dokusunda miktarının giderek arttığını ifade etmişlerdir (Barclay N.A., 1978). Xue ve Moms 1992'de yapmış oldukları çalışmada, CD90'ın mRNA miktarı beyin ve beyincik dokusunda ölçülmüştür. Buna göre embriyoner dönemin sonlarına doğru ekspresyonunun giderek arttığı ancak E17 de anlamlı bir fark görülmediği belirtilmiştir. Doğumdan sonra 0. gün ile 56. güne kadar CD90'ın mRNA miktarına bakıldığında belirgin şekilde arttığı ve özellikle beyincikte beyine oranla daha fazla miktarda bulunduğu belirlenmiştir (Bolin M., ve Rouse V., 1986; Gang-Ping Xue G.P. ve Moms R. 1992). CD90, neonatal dönemde beyincikte çok az eksprese edilir. Postnatal dönemde 3. haftadaki seviyesi neonatal dönemle kıyaslandığında yaklaşık %1'i kadar eksprese edildiği ifade edilmiştir (Schachner M. ve Hammerling U., 1974). CD90'ın erişkin nöral dokularda sinaptogenez ile ilişkili olduğu vurgulanmaktadır. Sinaps kurulumu sırasında önemli fonksiyonlar üstlenir. Schachner ve Hammerling'in 1974 yılında yaptıkları çalışmada farelerde postnatal dönemde 1. günden itibaren beyincik Purkinje hücrelerinde çok zayıf görülen CD90 ekspresyonu, ilerleyen günlerde giderek artmış, en yoğun lokalizasyon gösteren bölgelerin sinaptik bölgeler olduğu belirtilmiştir. Ayrıca miyelinleşme tamamlandığında miyelin kılıfta CD90 pozitif lokalizasyon gösterir. Postnatal dönemin devamında 5-9. günler arası CD90, Purkinje ve granüler nöronların sitoplazmasında izlenmiş ve 21. güne gelindiğinde tüm sinaptik bölgelerde izlenmiştir (Schachner M. ve Hammerling U., 1974). Neonatal dönemde CD90 ekspresyonunun postnatal döneme oranla çok az izlenmesinin nedeninin, sürekli göç halinde olan nöron öncülleri ve gelişen sinaptik yapıdan kaynaklandığını, dolayısıyla CD90'ın gelişmekte olan rat sinir sisteminde izlenemediği belirtilmiştir. (Schnitzer J. ve Schachner M. 1981; Morris R.I ve Barber P.C., 1983). Ratlarda CD90, retina dokusunda da gösterilmiştir. Çalışmada, CD90 baskın olarak retinanın ganglion hücre tabakasında E14'de yoğun immüno lokalizasyon göstermiştir. Burada embriyoner dönemin 14. gününe kadar CD90 ekspresyonu izlenmemiş, E14 de az miktarda, E15 de yoğun şekilde izlenmiş ve özellikle doğumdan sonra en yüksek seviyeye ulaştığı vurgulanmıştır (Liu C.J.J., ve ark 1996). CD90 aynı zamanda erişkin sıçan dokusunda kan damarları endotelinden eksprese edilmektedir. CD90 ekspresyonu rat erişkin ve embriyoner dönem dokularında karşılaştırılmış, embriyoner dönemde kan damarları çevresinde ekspresyonu belirlenmemiş ancak erişkin dönemde yüksek seviyede eksprese olduğu belirtilmiştir (Lee W.S., ve ark 1998). Çalışmamızda deneysel nöral tüp

defekti oluşturulmuş embriyoner dönem deney grubunda (D1) K1 grubundan daha az immüno lokalizasyon belirlenmiştir. D2 ve K2 gruplarında ise CD90 immüno lokalizasyonu açısından fark gözlenememiştir. Çalışmamızda oluşturulan nöral tüp defektinde kullanılan fazla miktarda retinoik asit erken dönemde CD90 immüno lokalizasyonunu kontrole oranla azaltmıştır, geç dönemde ise fark gözlenememiştir. Sulik ve Dehart yaptıkları çalışmada retinoik asitin mezenkimal hücrelerin çoğalması ve göçünü etkilediğini belirtmişlerdir (Sulik K.K. ve Dehart D.B. 1988). Bunun yanında, deneysel nöral tüp oluşumunda kullanılan yüksek doz retinoik asit retinoid reseptörlerinin aşırı aktive olmasına neden olmaktadır. Nöral tüp gelişimi sürecinde CD90'ın erken dönemde progenitör hücrelerin göçünde ve farklanmasında etkili olduğu daha sonra nöronların gelişip aksonların gelişmeye başladığı erişkin dönemde daha etkin olduğu vurgulanmaktadır (Xu G.P. ve ark 1991).

Kültüre edilen insan mezenkimal kök hücrelerin belirlenmesinde CD105 hızlı ve oldukça iyi bir belirteçtir (Sally A. ve ark., 2012, Mark P ve ark 2013). CD105, endoglin olarak da bilinen, TGF  $\beta$  reseptör kompleksine ait, yaklaşık olarak 95 kDa ağırlığında, disülfid bağlı monodimerik membran proteindir (Attila Dagdeviren A., ve ark 1998). Embriyoner dönemde özellikle kardiyovasküler sistem gelişimi için temel olaylardan biri olan anjiyogenezde, eritrositlerin göç yolunun düzenlenmesi, sitoskelet organizasyonu ve canlılığının korunmasında önemlidir (Mark P., ve ark 2013). Yapılan bir çalışmada, endoglin geni bloke edilen fare embriyolarında, 10,5. günde yoğun hemoraji, çeşitli embriyoner ve kardiyovasküler bozukluklar meydana geldiği izlenmiştir (Kitabayashi A.N., ve ark 2009). Benzer bir başka araştırmada, CD105 geni susturulmuş farelerde vasküler gelişim bozuklukları nedeniyle, gebeliğin 11. gününde tüm embriyoların öldüğü belirlenmiştir (Arthur H.M ve ark 2000). İnsanda çeşitli kanser dokularında, kanserli bölgede erken dönemde küçük kan damarları çevresinde, CD105'in pozitif immüno lokalizasyon gösterdiği bildirilmiştir (Fonsatti E., ve ark 2004). Pek çok çalışmada belirtildiği gibi CD105 kanser belirteçidir. Anjiyogenez ve vaskülogenezde endotel hücrelerini aktive eder ve böylece endotel hücrelerinin aşırı çoğalarak dokunun kanserleşmesine ve solit tümör oluşumuna neden olur. Kanser dokusu içinde ve çevresinde damar gelişimini de hızlandırmaktadır (Fonsanti E ve ark 2000; Fonsanti E., ve ark 2004). Li C. ve arkadaşları ise 2000 yılında yaptıkları çalışmada bu mekanizmayı açıklamaya çalışmışlardır. Buna göre TGF'nin CD105'e bağlanması, CD105'in fosforilasyonunu azaltır ve böylece CD105 ekspresyonunun

seviyesi TGF ile düzenlenir. TGF yokluğunda, CD105 antiapoptotik bir etki göstererek endotel hücrelerinde aşırı çoğalmayı sağlar (Luisa Diez-Marques L., ve ark 2002). Çalışmamızda deneysel nöral tüp defekti oluşturulan deney gruplarında kontrol grubuna oranla CD105 immüno lokalizasyonun daha fazla olduğu görülmektedir. Bununla birlikte dokuda bulunan damarlarda, kan akımının azalmasıyla meydana gelen hipoksik durumlarda, CD105 gen bölgesi TGF'nin uyarıcı etkisiyle artar ve yeni kan damarları oluşumu başlatılır. Endotel hücrelerinin kültürüyle, endoglin geni susturulmuş hücrelerin, hızla apoptoza gittiği, endoglin geni olan hücrelerde ise hipoksik durumun yeni damar oluşumunu hızlandırmasıyla endoglin ekspresyonunu artırdığı ve apoptoza engellediği belirlenmiştir (Li C., ve ark 2003). CD105 aynı zamanda ekstraselüler matriks bileşenlerinin (fibronektin, kollajen, lümikan gibi) ekspresyonunu düzenler. Böylece mezenkimal kök hücrelerin transmigasyonda da önemlidir (Luisa Diez-Marques L. ve ark 2002). Endoglinin, mezenkimal kök hücrelerin dışında hemopoetik kök hücreler ve nöral kök hücrelerden de eksprese edildiğine dair çalışmalar vardır (Chen C.Z., ve ark 2002; Rita C.R. ve ark 2007). Embriyoner dönemin 10,5. günü aort gonad mezonefroz bölgesinde hemopoezin gerçekleştiği alandır. Yapılan bir çalışmada, E10,5'da, fare dokularında, özellikle aort bölgesinde CD105 ekspresyonunun mRNA düzeyinde çok olduğu belirlenmiştir (Medvinsky A. ve Dzierzak E. 1996). Benzer bir başka çalışmada da, CD105'in endotelden ve intraaortik bölgedeki hemopoetik hücrelerden eksprese edildiği bildirilmiştir (Roques M., ve ark 2012).

Merkezi sinir sisteminin gelişiminde anjiyogenez çok önemlidir. Merkezi sinir sistemi gelişirken, endotel hücreleri beyin yüzeyinde gelişmekte olan kan damarlarından beyin mezenkimine doğru göç eder. Beyin gelişirken meydana gelen bu anjiyogenez süreci, pek çok büyüme faktörü ve ekstraselüler matriks proteinleri tarafından düzenlenir. Kan damarlarının beyin yüzeyinden (leptomeningeal alandan) beyin parenkimine geçmesiyle, endotel hücreleri ve nöral hücreler arasında karşılıklı etkileşim meydana gelir. Çalışmalarda merkezi sinir sistemi şekillenirken, VEGF, FGF, efrin ve anjiopoetinler gibi büyüme faktörlerinin anjiyogenezi düzenlediği bildirilmiştir. Endotel hücrelerin beyin parankimine göçünü ise ekstraselüler matriks proteinlerinden fibronektin ve laminin düzenlemektedir. Ekstraselüler matriks proteinleri endotel hücrelerinin canlılığını ve göçünü sağlar (Ogunshola O., ve ark 2000; Stupack D.G. 2003). Yaptığımız çalışmada, merkezi sinir sisteminin anjiyogenezi sırasında endotel hücrelerden eksprese olan CD105'in de önemli rolü olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda, fazla miktarda all-trans retinoik asit verilerek deneysel nöral tüp defekti oluşturulmuş, embriyoner dönem (D1) ve fetal dönem (D2) gruplarına ve bunların kontrol (K1-K2) grubu embriyolarına CD105 antikoru uygulanmıştır. Buna göre nöroepitelde, K1 grubunda zayıf şiddette, D1 grubunda orta şiddette, K2 grubunda zayıf ve D2 grubunda yoğun şiddette CD105 ekspresyonu belirlenmiştir. Endoglin embriyoner dönemin başlarında, eksprese olmaya başlar. Araştırmalarda CD105'in fare embriyolarında erken gastrula döneminde ekstraembriyonik mezodermden ve ektodermden eksprese edildiği, dolayısıyla çok erken dönemde bile potansiyel rolü olduğu ifade edilmektedir (Hirashima M., ve ark 2004; Ema M., ve ark 2006). Mezodermal hücrelerden köken alan endotel prokürsör hücreler, farklı olarak primer kapiller pleksusları şekillendirir. Bu şekillenme sırasında pek çok sinyal reseptörü yanında CD105 de eksprese edilir. Fare embriyolarında yapılan bir çalışmada CD105'in, E8,5-10,5'da, endotel hücrelerinde işaretlendiği bildirilmiştir (Hirashima M. ve ark 2004). Mancini ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada, endoglin, fare nöral krista kök hücrelerinde, E10,5 da lokalizasyon oranı yaklaşık %75-85 iken, doğuma doğru bu oranın hızla azaldığı belirtilmiştir. Bağlantılı olarak TGF  $\beta$ 'nın, E10,5 da ekspresyon oranı %88 iken erişkinlerde %12 olarak ifade edilmiştir. Kontrol 1. grupta nöroepitelin bazal membranında, sklerotom-miyotom-dermatom alanlarında, kan damarlarının bulunduğu alanlarda orta şiddette CD105 lokalizasyon alanları bulunurken, K2 grubunda az miktarda lokalize olduğu dikkat çekmektedir. Nöral tüp şekillenirken bazal membran önemli bir rol oynar. Bazal membran ekstraselüler matriks bileşenlerinden laminin, fibronektin, tip IV kollajen ve heparan sülfat gibi komponentler içerir. Mezenkimal hücreler ile nöroepitel arasında iletişimi sağlar. Böylece nöral tüpün doğru şekillenmesine katkıda bulunur. Bazal membran düzeninin bozulması da epitelyal mezenkimal ilişkiyi bozacağından, nöral tüp şekillenmesini etkileyerek nöral tüp defektlerine yol açacaktır (O'Shea K.S., 1987). Bizim çalışmamızda K1 grubunda nöral tüpün etrafında bulunan bazal membranda orta şiddette immünlokalizasyon görülmüştür. Burada bazal membran, nöroepitel hücreler ve bunu çevresinde bulunan mezenkimal hücreler arasında etkileşimi sağladığından CD105, erken dönemde (K1 grubunda E10,5) geç döneme oranla (K2 grubunda, E15,5) daha fazla lokalizasyon gösteriyor olabilir. Diğer taraftan, K1 grubunda zayıf şiddette izlenen CD105 lokalizasyonu D1 grubunda orta şiddette, K2 grubunda zayıf şiddette görülen lokalizasyon D2 grubunda yoğun miktarda izlenmiştir. Retinoik asitin damar



oluşumunu artıran etkileri üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Oikawa ve arkadaşları 1989'da yaptıkları çalışmada, tavuk embriyolarına farklı dozlarda retinoik asit vermişler, E4,5. günde koryoallantoik membranda damar oluşumunun arttığını bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada, embriyoner dönemin 8. gününde, 100 mg/kg retinoik asit verilen grupta, embriyo yüzeyinde yoğun kan damarı alanları belirlenmiştir. Vasküler akışta bozulma ve bunun sonucu olan hipoksi, ödem ve devamında besin maddelerinin alınamayışı bilinen bir teratojen mekanizmasıdır. CD105 immünolokalizasyonu açısından, D1 ve D2 grupları kontrolleriyle kıyaslandığında daha fazla immünolokalizasyon görülmüştür. Embriyo gelişimi sırasında deneysel nöral tüp defekti oluşturulurken anjiyogenez hızlanmış ve buna bağlı olarak da endotel hücrelerinin fazla miktarda CD105 eksprese etmesine neden olmuş olabilir. Bununla birlikte D2 grubunda D1'e oranla daha fazla CD105 ekspresyonu görülmesi, nöral tüp defekti oluşturmak için kullanılan all-trans retinoik asitin endotel hücrelerini fazla aktive ettiğini düşündürmektedir. Guetano ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları çalışmada fare embriyolarına uygulanan all-trans retinoik asitin endotel hücrelerinin anjiyogenez öncesi (proanjiyonik) davranışlarını artırdığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan diğer bir mezenkimal kök hücre işaretleyicisi CD271'dir. CD271; P75, sinir büyüme faktörü (NGF, p75NTR) olarak da ifade edilen, tümör nekroz faktör TNFR süperailisi üyesi bir transmembran hücre yüzeyi reseptörüdür (Rogers M.L., 2008). 1950'lerin başında Levi-Montalcini ve Cohen NGF'yi bularak 1986 yılında Nobel ödülü almışlardır. Daha sonra NGF ailesi olarak nörotrofinler vertebralılarda tanımlanmıştır (Bartkowska K., ve ark 2010). Yaklaşık 75 kDa moleküler ağırlığa sahip bir moleküldür (Johnson D., ve ark 1986). CD271 (p75) reseptörleri, tümör nekroz faktöre (TNF) bağlanarak aktive olur. Bu reseptörlerden bazıları p75NTR, BDNF (Brain derived neurotrofik faktör), Nörotrofin 3 (NT3) ve Nörotrofin 4 (NT4) dür (Barrett G.L., 2000). Embriyoner gelişim döneminde farklı türlerden farklı embriyoner aşamalarda farklı miktarda p75 (CD271) ve reseptörleri (nörotrofinler) eksprese edilir. Nörotrofinler, embriyoner dönemde nöron öncüllerinin proliferasyonu, farklılaşması, nöron canlılığının korunması, erken dönem nöron olgunlaşması ve nöronların apoptozunun düzenlenmesinde görevlidir (Davies A.M., 1994). CD271'in yetişkinlerde, çevresel sinir sistemi, olfaktör glialar ve beyincik Purkinje nöronlarından eksprese edildiği ifade edilmektedir. Ayrıca farklı dokularda da eksprese edildiği ortaya konmuştur. Miyoblast, kıl follikülleri, böbrek, akciğer, testis

dokuları bunlardan bazılarıdır (Wheeler E.F., 1992). CD271, nöronal doku yaralanmalarında, iyileşme bölgesinden fazlaca eksprese edilir. Bunun yanında, Alzheimer, lateral skleroz, nöral krista tümörleri, iskemi, beyincik Purkinje dejenerasyonu, şizofreni gibi çeşitli nörolojik hastalıklarda CD271 ekspresyonunun azaldığı ifade edilmektedir (Rogers M.L., ve ark 2008). Diğer bir görüş, nöral krista hücre belirteci olması yönündedir (Civenni G., ve ark 2011). İnsan için %100 mezenkimal kök hücre belirteci değildir, düşük düzeyde hemopoetik hücrelerde de görülebilir (Cuthbert R., ve ark 2012).

CD271; nöral büyüme faktörü veya P75, hücrede iki hücre yüzey reseptörüne bağlanır. Bunlardan TrkA tirokinaz ailesinin bir üyesidir. Diğeri ise p75NTR olarak bilinir. P75 sinir sistemi gelişiminde anahtar rol oynar. Hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak sinyal yollarını tetikler. TNF ailesinin bir üyesi olan p75 ölüm reseptörleri adı verilen özel bir aile içinde yer alır (Tomellini E., 2014). Bazen apoptozu artırıcı bazen ise engelleyici bir mekanizmada görev alır ki bu durum oldukça karmaşıktır (Schor F.N., 2005). Görevlerinden biri nöron öncüllerinin gelişimi ve çoğalmasını sağlamak, diğeri ise nöron uzantılarının gelişimini düzenlemektir. Miyelin yapının oluşmasında da önemli görevleri vardır. Gelişmekte olan sinir sisteminde nörotransmitter modülasyonunda etkindir (Dechant G. ve Barde Y.A. 2002; Hosomi S., 2003; Tomellini E., 2014). İlk olarak p75'in insan embriyosunda, blastosistin iç hücre kitlesinde eksprese olduğu ifade edilmiştir. Daha sonra fare embriyolarında mRNA düzeyinde E3,5 da gözlemlenmiştir (Moscatelli I., ve ark 2009). Devamında insan, sıçan, farede nörolasyon sırasında, nöral krista hücreleri, endoderm, ektoderm ve mezodermde bulunan mezenkimal hücrelerden eksprese edildiği belirlenmiştir (Tomellini E., 2014). Çalışmamızda CD271 lokalizasyonu açısından kontrol gruplarından E10,5-15,5 arasında önemli bir fark izlenmemiştir. Ancak K1 grubuna bakıldığında nöroepitel çevresindeki sklerotom-miyotom-dermatom bölgesinde K2 grubunun kemik-kas-deri alanlarına oranla daha fazla immüno lokalizasyon belirtilmiştir. Davies A.M. 1994 yılında nörotrofinlerin (p75, CD271) gelişimin erken dönemlerinde eksprese edildiğini, özellikle nöron öncüllerinde giderek ekspresyonun arttığını belirtmişlerdir. Bunun yanında nörotrofinlerin de farklı gelişim aşamalarında eksprese edildiği belirlenmiştir. Özellikle CD271 reseptörleri erken-orta gebelik döneminde mRNA düzeyinde belirlenebilir. Sıçan trigeminal sinirinde zayıf NGF, E12 de, insanda ise 23. haftada tespit edilmiştir (Arumäe U, ve ark 1993; Quartu M., ve ark

1997). Sıçan medulla spinalisinde mRNA düzeyinde E12-17,5. günlerde tespit edilebilmiştir (Elkabes S., ve ark 1994). Primat neokorteksinde E120 de görülmüş ve E165 e kadar yüksek seviyede kalmış, insan neokorteks bölgesinde ise 15-16. haftada belirlenebilmiştir (Bartkowska K., 2010). Trk A mRNA düzeyinde fare beyinde yaklaşık E8,5da belirlenebilmiştir. Sonraki çalışmalarda farklı tekniklerde mRNA düzeyinde E9,5 da tespit edilmiş E13,5 a kadar miktarca artmıştır. Ancak bu aşamadan doğuma kadar giderek azalmıştır (Elkabes S., ve ark 1994). Yapılan farklı bir çalışmada ise immünohistokimyasal olarak E13 te telensefalon duvarında izlenmiştir (Koh S., ve Loy R., 1989). Nöral tüp defekti oluşturduğumuz çalışmamızda, mezenkimal hücrelerin göç etmesi engellenerek çeşitli defektler oluşmuştur (Martn-Padilla M., 1966; Morris G.M., 1972). Çalışmamızda K1 ve K2 grubunda az yoğun, D1 grubunda az yoğun, D2 grubunda ise orta yoğunlukta CD271 immüno lokalizasyonu izlenmiştir. Burada D1 grubunda, mezenkimal hücrelerde K1 grubuna oranla daha az CD271 lokalizasyonu belirlenmiştir. Deneysel oluşturulmuş nöral tüp defektinde, erken dönemde CD271 pozitif mezenkimal hücrelerin hareket ve etki mekanizmasını etkileyerek D1 grubunda daha az lokalizasyon göstermesini sağlamış olabilir. Yapılan farklı çalışmalarda aşırı retinoik asitin nöral projenitör hücrelerin çoğalmasını engellemiş ve defektlere neden olmuştur (Sulık K.K. ve Alles A.J., 1991). Yaptığımız çalışmada deneysel nöral tüp defektli gruplarda verilen aşırı retinoik asitin erken dönemde nöroepitel çevresinde bulunan mezenkimal hücrelerin çoğalmasını engelleyerek CD271 immüno lokalizasyonunu azalttığı, geç dönemde ise artırdığını söyleyebiliriz.

Çalışmamızda hemopoetik kök hücre belirteci olarak kullandığımız CD14 ve CD45 antikorlarının nöral tüp defekti oluşumundaki etkisini, hemopoetik kök hücrelerin nöral dokulardaki etkisini araştıran çalışmalar bulunmamaktadır. Deneysel nöral tüp defektinde hemopoetik kök hücreleri işaretlediğimiz kök hücre belirteçlerinden biri olan CD14, 55 kDa ağırlığında glikoprotein yapıda hücre yüzey reseptörüdür. Hemopoetik kök hücrelerin temel moleküler belirteci olması yanında, monosit farklanma antijeni olarak ve T hücrelerinin proliferasyonundan sorumludur. Bir diğer görevi de hücre-hücre ilişkisini sağlamaktır. Çeşitli sitokinlerin etkisiyle monositlerin endotel hücrelere yapışmasını sağlar. Akut monositik lösemi ve akut miyelomonositik lösemi belirteci olarak kullanılır. Burada CD14 negatif olan durumlarda çoğalamayan ve artık olgunlaşmış hücre varlığından söz edilebilir (Ziegler-Heidbrock H.W.L., ve ark 1993; Sally A. ve Jones B., 2012). CD14'ün karaciğer, akciğer ve böbrek yaralanmalarında

önemi belirtilmiştir. Bu çalışmalarda karaciğer, akciğer ve böbrekte lipopolisakkaritlere karşı oluşturulan bir mekanizma ortaya çıktığı gözlenmiştir. Lipopolisakkaritler, tüm gram negatif bakterilerin dış membranında glikolipit yapıda bir moleküldür. Normalde bağırsak mukozasında yaşayan bu bakterilerin lipopolisakkaritleri, vücudun kendine ait koruyucu mekanizmaları ile tolere edilir. Ancak yaralanma veya patolojik bir durumda artan lipopolisakkaritler karaciğerde Kupffer hücrelerinin, alveolar makrofajların, böbrek glomerül hücrelerinin daha fazla aktive olmasını ve CD14'ün pozitif reaksiyon vermesini sağlar. Patolojik durumlarda monosit öncülü hücrelerin aktive olduğundan, CD14'ün pozitif reaksiyon verdiği düşünülmektedir (Tianxin Y., ve ark 1999; Maus U., ve ark 2001; Su G.L., ve ark 2002). Alzheimer hastalığı gibi kronik nöroinflamasyon hastalıklarında, beyin mikrogial hücrelerinde CD14 pozitifliğinin arttığı belirtilmiştir (Fassbender K., ve ark 2003). Yapılan başka bir çalışmada, HIV enfeksiyonlu insan beyin dokusunda, parenkimal mikrogial hücrelerde ve makrofajlarda CD14 ile CD45'in yoğun pozitiflik gösterdiği bildirilmiştir (Cosenza M.A., ve ark 2002). Bizim çalışmamızda da fazla miktarda verilen retinoik asitin oluşturduğu nöral tüp defektli deney gruplarında (D1-D2) ve bunların kontrollerinde (K1-K2) CD14 immüno lokalizasyonuna bakılmıştır. Kontrol gruplarında 10,5. günde yoğun lokalizasyon gösteren CD14 ün 15,5. günde çok yoğun olduğu belirlenmiştir. Fötal dönemde (K2 grubu) CD14 lokalizasyonunun fazla olması, bu dönemde hemopoetik hücrelerin sayıca artması ve daha fazla CD14 eksprese etmesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. CD14 ekspresyonu özellikle TNF ve interferonların aktive olmasıyla beraber doğru orantılı şekilde artar (Ziegler-Heitbrock H.W.L., ve Ulevitch R.J., 1993). Hemopoetik kök hücreler fare embriyolarında embriyoner dönemin 7. gününde görülmeye başlarlar (Miller A.M., ve ark 1994). CD14'ün embriyoner ve fötal dönemde ekspresyon miktarı ile ilgili çalışmalar çok azdır. Fare embriyolarında hemopoez, yaklaşık 7. günde vitellüs kesesinde başlamakta ve embriyoner dönemin 10. gününde aort-gonad-mezonefroz bölgesinde devam etmektedir (Stuart H. ve Orkin H.S., 1996). Devamında 11-12. günlerde karaciğerde, 14. günde dalakta ve 18. günde ise kemik iliğinde görülmeye devam eder (Boisset J.C., ve ark 2010). Yaptığımız çalışmada kontrol gruplarına (K1-K2) oranla deneysel nöral tüp defekti oluşturduğumuz gruplarda (D1-D2), CD14 ekspresyonu yüksek miktarda izlenmiştir. Yapılan bir çalışmada aşırı miktarda retinoik asit verilerek deneysel nöral tüp oluşumu sırasında interferon reseptörlerinin ekspresyonunun artmış olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, verilen

retinoik asitin interferon seviyesinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Matikainen S., ve ark 1996). Buna göre deneysel nöral tüp defekti oluşturmak için verilen aşırı retinoik asit etkisiyle deney gruplarında kontrol grubuna oranla daha fazla CD14 lokalizasyonu izlenmiş olabilir. Böylece çalışmamızda, nöral tüp defektinde CD14 pozitif hemopoetik kök hücrelerin lokalizasyonunun arttığı belirlenmiştir.

Hemopoetik kök hücrelerin yüzeylerinde bulunan diğer bir belirteç de CD45'dir. CD45; lökosit antijeni (Leucocyt common antigen, LCA) olarak bilinir. Yaklaşık 170-220 kDa ağırlığında, transmembran glikoproteinidir. Yetişkin bireylerde CD45, olgun T lenfositlerde bulunur. Bunun yanında, tüm hemopoetik kök hücrelerde (Sally A., Jones B., 2012), trombositler ve olgun eritrositlerin hüce yüzey belirteçidir. Ayrıca CD45'in RA, RB, RO olarak ifade edilen çeşitli alt birimleri bulunmaktadır (Craig W., ve ark 1994; Altın J.G., ve ark 1997). CD45 genellikle diğer hücre yüzey molekülleri ile ilişki kurarak hücreler arası ilişkileri düzenler. Hücreler arasında ilişkiyi sağlayan moleküller, hücre yüzey proteinleri ve karbonhidrat birimleridir. Çalışmamızda deneysel nöral tüp defekti oluşturulan deney grupları ve kontrol gruplarında CD45 immüno lokalizasyonuna bakılmıştır. Tavuk ve farelerde yapılan araştırmalarda, embriyoner ve erişkin dönemlerde CD45'in makrofaj/mikroglia özel belirteci olduğu belirtilmiştir (Cuadros M.A., ve ark 2006). İnsanda gelişen spinal korda CD45 immüno lokalizasyonu zayıf işaretlenmiş olarak izlenirken, yetişkin dönemde varlığını devam ettirmediği belirtilmiştir. Ancak motor nöron hastalıklarda medulla spinaliste CD45 pozitif işaretlenerek patolojik belirteç olarak kullanılmaktadır (Rezaie P., ve ark 1999). Çalışmamızda K1 grubunda K2 grubuna oranla biraz daha fazla oranda CD45 immüno lokalizasyonu belirlenmiştir. Hemopoetik kök hücreler fare embriyolarında embriyoner dönemin başında görülmeye başlar (E7) (Stuart H. ve Orkin H.S., 1996). Çalışmamızda kontrol grubu erken dönemde CD45 lokalizasyonunun geç döneme oranla biraz daha fazla olması hemopoezin erken dönemde başlamasından kaynaklanıyor olabilir. Bununla birlikte yaralanmış rat beyin dokusunda mikroglia hücrelerinde normal rat beyin dokusuna göre daha fazla CD45 eksprese olduğu gösterilmiştir (Karp H.L., ve ark 1994). Yaptığımız çalışmada nöral tüp defekti oluşturduğumuz deney gruplarında (D1-D2), kontrol gruplarına oranla (K1-K2) daha yüksek CD45 immüno lokalizasyonu belirlenmiştir. CD45 immüno lokalizasyonundaki artışın, deneysel nöral tüp defekti oluşturmak için verilen aşırı retinoik asitin, hemopoetik hücrelerin sinyal yollarında, gen bölgelerinde meydana getirdiği

bozulmalardan kaynaklandığını düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda, CD45 immüno lokalizasyonunun patolojik kranial sinir sistemi hastalarında beyin dokusunda arttığı bildirilmiştir (Penninger J.M. ve ark., 2001).

Bu çalışmada gebe hayvanlara fazla miktarda all-trans retinoik asit verilerek deneysel nöral tüp defektleri oluşturulmuştur. Çalışmamızda oluşturulan defektler beyinde ve medulla spinaliste olmak üzere anormal aksiyal rotasyonu da içeren çok çeşitli tiplerde gelişmiştir. Deneysel nöral tüp defekti oluşturulan grupların embriyoner ve fetal dönemde alınan embriyolarına mezenkimal ve hemopoetik kök hücreleri immünohistokimyasal olarak işaretlemeyi sağlayan belirteçler kullanılmıştır. Böylece nöral tüp gelişiminde ve nöral tüp defekti oluşumunda seçilen mezenkimal ve hemopoetik kök hücrelerin etkisi immünohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Nöral tüp defektlerinde pek çok gen bölgesinin çalışması bozularak, mezenkimal ve hemopoetik kök hücrelerin hücre içi işleyiş mekanizmaları etkilenmektedir. Bununla birlikte kök hücrelerin çoğalması, farklanması ve metabolizması değişmektedir. Nöroepitelde bulunan kök hücrelerin aktivitesinin bozulduğu böylece embriyoda pek çok defektin meydana geldiği görülmüştür. Böylece mezenkimal kök hücreleri işaretleyen CD44, CD56, CD73, CD90, CD105, CD271 antikoru ve hemopoetik kök hücreleri işaretleyen CD14, CD45 antikoru kontrol gruplarına oranla deneysel nöral tüp defekti oluşturduğumuz gruplarda farklı bölgelerde farklı dağılım göstermiştir. Bu çalışmayla ilerde nöral tüp defektlerinin oluşumunun anlaşılmasında ve yeni tedavi süreçlerinin belirlenmesinde özellikle kök hücrelerin etkilerinin araştırılmasında katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

## 6. SONUÇLAR

➤ CD44 mezenkimal kök hücre antikorlarından. Embriyoner dönemde morfogenez ve organogenez süreçlerinde etkindir. CD44 hyaluronik asite bağlanarak mezenkimal hücrelerin ECM'e yapışmasını, çoğalmasını ve göçünü kontrol eder. Aynı zamanda nöral tüpün kapanma sürecinde etkindir. Çalışmamızda kontrol gruplarında embriyoner dönemde fötal dönemden daha fazla CD44 immünolokalizasyonu belirlenmiştir. Embriyoner dönemde mezenkimal hücreler nöral tüp çevresinde birikerek nöral tüpün kapanmasında etkin rol oynar. Böylece çalışmamızda kontrol gruplarında embriyoner dönemde fazla CD44 lokalizasyonu görülmüş olabilir. Deney gruplarında ise kontrol gruplarından daha az CD44 immünolokalizasyonu belirlenmiştir. Nöral tüp defektlerinde mezenkimal kök hücrelerin ECM'e yapışması, çoğalma ve göç süreçlerinde meydana gelen aksaklıklar burada daha az CD44 lokalizasyonu belirlenmesine neden olmuş olabilir.

➤ CD56 hem embriyoner hem de erişkin dönemde sinir sistemi gelişimini sağlayan, mezenkimal kök hücre belirteçidir. Embriyoner dönemde ne zaman eksprese olmaya başladığıyla ilgili farklı görüşler mevcuttur. Çalışmamızda kontrol gruplarında embriyoner dönemde fötal dönemden biraz fazla CD56 immünolokalizasyonu belirlenmiştir. Bu durumun, CD56'nın embriyoner dönemde yüksek sialik asit içermesi erişkin dönemde ise daha az sialik asit içermesinden kaynaklı olabileceğini düşündürmektedir. Embriyoner dönem deneysel nöral tüp defektli gruplarda kontrol grubuna göre daha az, fötal dönem deney gruplarında ise kontrol gruplarına göre daha fazla CD56 immünolokalizasyonu belirlenmiştir. Deneysel nöral tüp defekti için kullanılan retinoik asit Hox genlerinin aktivitesini artırmaktadır. Çalışmamızda CD56'nın da Hox gen aktivitesine duyarlı olmasından kaynaklı olarak, fötal dönem deney gruplarında fazla lokalizasyon göstermiş olabileceği düşünülmektedir.

➤ Çalışmada kullanılan diğer mezenkimal kök hücre işaretleyicisi CD73'tür. CD73 ATP metabolizmasında etkili olan enzimlerdendir. Embriyoner dönemdeki lokalizasyonu açısından incelendiğinde ortaya konulan veriler direk CD73 ekspresyonu ile ilgili değil, aynı grupta yer alan diğer enzimlerle ilgilidir. Çalışmamızda fötal dönem kontrol gruplarında embriyoner dönem gruplarıyla karşılaştırıldığında daha fazla CD73 lokalizasyonu belirlenmiştir. Nöral tüp defektli deney gruplarında kontrol gruplarından daha az CD73 immünolokalizasyonu izlenmiştir. Bu durum nöral tüp defektlerinde ATP işleyiş mekanizmasının bozulduğunu düşündürmektedir. Aynı zamanda nöral tüp

defektlerinde WNT sinyal yolları bozulmaktadır. CD73, WNT sinyallerine duyarlıdır. Böylece çalışmamızda deney gruplarında CD73 immüno lokalizasyonu azalmış olabilir.

➤ Mezenkimal kök hücre belirteçlerinden olan CD90'ın embriyoner süreçte eksprese edildiği dönem tam olarak açıklanamamıştır. Daha çok erişkin dönemde kullanılan bir belirteçtir. Çalışmamızda kontrol gruplarında embriyoner dönemde fetal dönemden daha fazla CD90 immüno lokalizasyonu belirlenmiştir. Deneysel nöral tüp defekti oluşturulan gruplarda embriyoner dönemde kontrole göre daha az, fetal dönemde ise kontrole aynı miktarda CD90 lokalizasyonu belirlenmiştir. Bu durumun nöral tüp defektlerinde mezenkimal hücrelerin çoğalması ve aktivitesinin bozulmasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir.

➤ CD105, endoglin olarak da bilinen mezenkimal kök hücrelerin yüzey belirteçidir. CD105 normal dokularda erken dönemde eksprese olmaya başlar. Bizim çalışmamızda kontrol gruplarında embriyoner dönemde fetal dönemden daha fazla CD105 immüno lokalizasyonu belirlenmiştir. Deneysel nöral tüp defekti oluşturulan deney gruplarında kontrol gruplarına oranla CD105 lokalizasyonunun arttığı görülmüştür. Deneysel nöral tüp defektinde kullanılan madde, vasküler akışı bozmuş ve bunun sonucu olan hipoksi, ödem ve devamında besin maddelerinin alınamayışıyla beraber CD105 ekspresyonunu artırmıştır. Embriyo gelişimi sırasında deneysel nöral tüp defekti oluşturulurken anjiyogenez hızlanmış ve buna bağlı olarak da endotel hücrelerinin fazla miktarda CD105 eksprese etmesine neden olmuş olabilir.

➤ Mezenkimal kök hücreleri belirlemek için kullanılan antikorlardan diğeri de CD271'dir. CD271 çok sayıda reseptöre bağlanarak etkinlik göstermektedir. CD271'in embriyoner dönemin hangi aşamasında ne kadar eksprese edildiği ile ilgili çok az çalışma mevcuttur. Sinir sistemi öncül hücrelerinin farklanmasında etkin olduğu belirtilmektedir. Çalışmamızda kontrol gruplarında embriyoner ve fetal dönem arasında büyük bir fark gözlenmemiş, CD271'in az miktarda lokalize olduğu görülmüştür. Ancak somitlerde embriyoner dönemde fetal döneme kıyasla biraz daha fazla lokalizasyon belirlenmiştir. Somitlerin çevresi mezenkimal hücrelerin bulunduğu alanlardır, dolayısıyla kontrol gruplarında embriyoner dönemde fetal döneme oranla daha fazla CD271 lokalizasyonu belirlenmiştir. Deneysel nöral tüp defekti oluşturulan embriyoner dönem grubu ile kontrolü arasında belirgin fark gözlenmezken, fetal dönem grubunda kontrolden daha fazla CD271 lokalizasyonu belirlenmiştir. CD271, nöral tüp defektlerinde embriyoner dönemde etkisiz görünse de fetal dönemde lokalizasyonunun



arttığı izlenmektedir. Bu durumun nöral tüp defektlerinde mezenkimal kök hücrelerin CD271 ekspresyonunu artırmasından kaynaklanıyor olabilir.

➤ Çalışmamızda hemopoetik kök hücre belirteci olarak kullandığımız CD14 ve CD45 antikollarının nöral tüp defekti oluşumundaki etkisini, hemopoetik kök hücrelerin nöral dokulardaki etkisini araştıran çalışmalar bulunmamaktadır. Çalışmamızda kontrol grubunda fetal dönemde embriyoner dönemden daha fazla CD14 immünlokalizasyonu belirlenmiştir. Bu durumun hemopoezin erken dönemlerde başlamasıyla beraber hemopoetik hücrelerin sayıca artması böylece CD14 immünlokalizasyonunu artırmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Deneysel nöral tüp defektli gruplarda kontrole göre CD14 lokalizasyonunun arttığı belirlenmiştir. CD14 ekspresyonu interferon reseptörleri ile bağlantılıdır. Nöral tüp defekti oluşumu sırasında da interferonlar artmış böylece deney gruplarında CD14 lokalizasyonunu artırmış olabilir.

➤ Hemopoetik kök hücrelerin belirlenmesi için kullanılan antikollardan diğeri CD45'dir. Çalışmamızda kontrol grubu embriyoner dönemde fetal döneme oranla daha fazla CD45 lokalizasyonu belirlenmiştir. Deneysel nöral tüp defektli gruplarda ise kontrol gruplarına oranla daha fazla CD45 immünlokalizasyonu izlenmiştir. Bu durumun deneysel nöral tüp defekti oluşturmak için verilen aşırı miktarda retinoik asitle hemopoetik hücrelerin sinyal yollarında, gen bölgelerinde meydana getirdiği bozukluklardan kaynaklanmış olabilir. Defekt gelişiminde CD45 lokalizasyonunun hemopoetik hücrelerde arttığı böylece hücrelerin mekanizmasını bozarak nöral tüp defektlerine yol açtığı düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Akala O.O., Clarke M.F. (2006) Hematopoietic stem cell self-renewal. *Current Opinion in Genetics and Development*, 16: 496–501.
- Akiyama H., Tooyama I., Kawamata T., Ikeda K., McGeer P.L. (1993) Morphological diversities of CD44 positive astrocytes in the cerebral cortex of normal subjects and patients with Alzheimer's disease. *Brain Research*, 632: 249-259.
- Alexander D., Schafer F., Munz A. (2009) LNGFR induction during osteogenesis of human jaw periosteum-derived cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 24(3-4):283–290.
- Altın J.G., Sloan E.K. (1997) The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. *Immunology and Cell Biology*, 75: 430-445.
- Alun M. Davies A.M. (1994) The role of neurotrophins in the developing nervous system. *Journal of Neurobiology*, 25(11): 1334-1348.
- Anonim(2014) [http://phd.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Carnegie stage 9-10-11](http://phd.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Carnegie%20stage%209-10-11).
- Anonim(2014) <http://www.biomedsearch.com/attachments/00/23/00/78/23007862/jove-67-4389.pdf>
- Arthur H.M., Ure J., Smith A.J., Renforth G., Wilson D.I., Torsney E., Charlton R., Parums D.V., Jowett T., Marchuk D.A., Burn J., Diamond A.G, (2000). Endoglin, an ancillary TGF beta receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Dev. Biol.*, 217:42–53.
- Arumäe U., Pirvola U., Palgi J., Kiema T.R., Palm K., Moshnyakov M., Ylikoski J., Saarma M. (1993) Neurotrophins and their receptors in rat peripheral trigeminal system during maxillary nerve growth. *J Cell Biol.*, 122:1053–1065.
- Au K.S., Koch A.A., Northrup H. (2010) Epidemiologic and genetic aspects of spina bifida and other neural tube defects. *Developmental disabilities*, 16: 6-15.
- Bächner D, Ahrens M, Betat N, Schröder D, Gross G (1999) Developmental expression analysis of murine autotaxin (ATX). *Mech Dev.*, 84:121–125.
- Bailly Y., Schoen S.W., Delhaye-Bouchaud N., Kreutzberg G.W., Mariani J. (1995) 5'-Nucleotidase activity as a synaptic marker of parasagittal compartmentation in the mouse cerebellum. *J Neurocytol.*, 24:879–890.
- Barclay A.N. (1978) Localization of the Thy-1 antigen in the cerebellar cortex of rat brain by immunofluorescence during postnatal development. *Journal of Neurochemistry*, 32:1249-1257.
- Barnstable C.J., Akagawa K., Hofstein R., Horn J.P. (1983) Monoclonal antibodies that label discrete cell types in the mammalian central nervous system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, 48:873-876.
- Barrett G.L. (2000) The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis *Progress in Neurobiology*, 61:205-229.
- Barry F., Boynton R., Murphy M., Haynesworth S., Zaia J. (2001) The SH-3 and SH-4 antibodies recognize distinct epitopes on CD73 from human mesenchymal

- stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289:519–524.
- Bartkowska K., Turlejski K., Djavadian R.L. (2010) Neurotrophins and their receptors in early development of the mammalian nervous system. *Acta Neurobiol Exp.*,70:454–467.
- Battula V.L.,Tremel S., Bareiss P.M., Gieseke F., Roelofs H., Zwart P., Müller I., Schewe B., Skutella T., Fibbe W.E, Kanz L., Bühring H.J. (2009) Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271 and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*, 94(2): 173-185.
- Blomhoff R., Blomhoff H.K. (2006) Overview of retinoid metabolism and function. *J. Neurobiol.*, 66:606–630.
- Bohnsack B.L., Lai L., Dolle P., Hirschi K.K. (2004) Signaling hierarchy downstream of retinoic acid that independently regulates vascular remodeling and endothelial cell proliferation. *Genes Dev.*, 18:1345–1358.
- Boisset J.C., Van Cappellen W., Andrieu-Soler C., Galjart N., Dzierzak E., Robin C. (2010) In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. *Nature*, 464:116-120.
- Bolin L.M., Rouse R.V. (1986) Localization of Thy-1 expression during postnatal development of the mouse cerebellar cortex. *Journal of Neurocytology*, 15:29-36.
- Botto L.D., Moore A.C., Khory M.J., Erickson D.J. (1999) Neural-Tube Defects. *The New England Journal of Medicine*, 341(20):1509-1519.
- Boulet S.L., Gambrell D., Shin M., Honein M.A. (2009) Racial/ethnic differences in the birth prevalence of spina bifida—United States, 1995–2005. *MMWR* 57:1409–1413; *JAMA*, 301(21): 2203–2204.
- Bower C., Eades S., Payne J., D’Antoine H., Stanley F. (2004) Trends in neural tube defects in western australia in indigenous and non-indigenous populations. *Pediatric and Perinatal Epidemiology*, 8:277-280.
- Brender J.D., Suarez L. (1990) Paternal occupation and anencephaly. *Am J Epidemiol.*, 131: 517.
- Brivanlou A.H., Gage F.H., Jaenisch R., Jessell T., Melton D., Rossant J. (2003) Stem cells: setting standards for human embryonic stem cells. *Science*, 300:913–916.
- Brough L., Rees G.A., Crawford M.A., Dorman E.K. (2009) Social and ethnic differences in folic acid use preconception and during early pregnancy in the UK: effect on maternal folate status. *J Hum Nutr Diet.*, 22:100–107.
- Busby A., Abramsky L., Dolk H., Armstrong B. (2005) Preventing neural tube defect in Europe: population based study. *BMJ*, 330(12):574-575.
- Campbell S., Swann H.R., Aplin J.D., Seif M.W., Kimber S.J., Elstein M. (1995) CD44 is expressed throughout pre-implantation human embryo development. *Human Reproduction*, 10(2):425-430.
- Can A. (2014) Kök hücre biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları. *Akademisyen Tıp Kitabevi*, 687.

- Caplan A.I. (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5): 41–650.
- Carlson B.M. (2009) *Human embryology and developmental biology*, fourth edition. p103.
- Chambon P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10: 940-954.
- Cheifetz S., Bellon T., Cales C., Vera S. (1992) Endoglin is a component the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J.Biol. Chem.*, 267:19027-19030.
- Chen C.Z., Li M., de Graaf D., Monti S., Gottgens B., Sanchez M.J., Lander E.S., Golub T.R., Green A.R., Lodish H.F. (2002). Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99:15468–15473.
- Chen Y., David H. (2013) Reese A Screen for Disruptors of the Retinol (Vitamin A) Signaling Pathway Birth Defects Research (Part B), 98: 276–282.
- Cheng J., Baumhueter S., Cacalano G., Carver-Moore K., Thibo D.H., Thomas R., Broxmeyer H.E., Cooper S., Hague N., Moore M., Lasky L.A. (1996) Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood*, 87:479.
- Cherian A., Seena S., Bullock R.K., Cntony A.C.(2005) Incidence of neural tube defects in the least-developed area of India: a population-based study. *The Lancet*, 366: 930-931.
- Civenni G., Walter A., Kobert N. (2011) Human CD271- positive melanoma stem cells associated with metastasis establish tumor heterogeneity and long-term growth. *Cancer Research*, 71(8):3098–3109.
- Clagett-Dame M., DeLuca H.F. (2002) The Role of Vitamin A in Mammalian Reproduction and Embryonic Development. *Annu Rev Nutr.*, 22:347-381.
- Clagett-Dame M., McNeill E.M., Muley P.D. (2006) Role of all-trans retinoic acid in neurite outgrowth and axonal elongation. *J. Neurobiol.*, 66:739–756.
- Clagett-Dame M., Knutson D. (2011) Vitamin A in Reproduction and Development *Nutrients*, 3:385-428; doi:10.3390/nu3040385.
- Cochard L.R. (2002) *Netter's atlas of human embryology*. Icon learning system. New Jersey (USA)
- Cohlman S.Q. (1953) Excessive intakes of vitamin A as a cause of congenital anomalies in the rat. *Science*, 117:535–53.
- Colbert M.C., Linney E., LaMantia A.S. (1993) Local sources of retinoic acid coincide with retinoid-mediated transgene activity during embryonic development, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:6572-6576.
- Colgan S.P., Eltzschig H.K., Eckle T. (2006) Thompson L.F. Physiological roles for ecto-5-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signalling*, 2: 351–360.
- Collins M.D., Mao G.E. (1999) Teratology of retinoids, *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 39: 399-430.
- Conlon R.A., Rossant J. (1992) Exogenous retinoic acid rapidly induces anterior ectopic expression of murine Hox-2 genes in vivo. *Development*, 116:357-368.

- Copp A.J., Greene N.D.E., Murdoch J.N. (2003a) Dishevelled: linking convergent extension with neural tube closure. *Trends Neurosci.*, 26:453-455.
- Copp A.J., Greene N.D.E., Murdoch J.N. (2003b) The genetic basis of mammalian neurulation. *Nature Reviews/Genetics*, 4: 784-794.
- Copp A.J. (2005) Neurulation in the cranial region—normal and abnormal. *J. Anat.*, 207: 623– 635.
- Copp A.J., Greene N.D. (2013) Neural tube defects disorders of neurulation and related embryonic processes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.*, 2(2):213-27.
- Corbela C., Lehmann A., Davison F. (2000) Expression of CD44 during early development of the chick embryo. *Mechanisms of Development*, 96:111-114.
- Cosenza M.A., Zhao M.L., Si Q., Lee S.C (2002). Human Brain Parenchymal Microglia Express CD14 and CD45 and are Productively Infected by HIV-1 in HIV-1 Encephalitis. *Brain Pathology*, 12(4): 442-455.
- Coşar E., Köken G., Köken R., Şahin F.K. (2009) Gebelik ve nöral tüp defektleri. *Türk jinekoloji ve obstetri derneği dergisi*, 6(3): 193-196.
- Craig W., Poppema S., Little M.T., Dragowska W., Lansdorp P.M. (1994) CD45 isoforms expression on human haemopoietic cells et different stages of development. *British Journal of Haematolog*, 88:24-30.
- Crider K.S., Cleves M.A., Reefhuis J., Berry R.J., Hoobs C.A., Hu D.J. (2009) Antibacterial medication use during pregnancy and risk of birth defects: National Birth Defects Prevention Study. *Arch Pediatr Adolesc Med.*, 163: 978–985.
- Crossin K.L., Prieto A.L., Hoffman S., Jones F., Friedlander D.R. (1990) Expression of adhesion molecules and the establishment of boundaries during embryonic and neural development. *Exp Neurol.*, 109:6-18.
- Cuadros M.A., Santos A.M., Oliva D.M., Calvente R., Tassi M., Teva J.L.M., Navascues J. (2006) Specific immunolabelling of brain macrophages and microglial cells in the developing and mature chick central nervous system. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 54(6):727-738.
- Cuthbert R., Boxall S.A., Tan H.B., Giannoudis P.V., McGonagle D., Jones E. (2012) Single-platform quality control assay to quantify multipotential stromal cells in bone marrow aspirates prior to bulk manufacture or direct therapeutic use. *Cytotherapy*, 14(4):431–440.
- Dagdeviren A., Sevda F., Muftuoglu A., Cakar N., Ors U. (1998) Endoglin (CD 105) expression in human lymphoid. *Ann Anat.*, 180:461-469.
- Dancis J., Levitz M., Katz J., Wilson D., Blaner W.S. (1992) Transfer and metabolism of retinol by the perfused human placenta. *Pediatr Res.*, 32:195-199.
- Davies A.M. (1994) The role of neurotrophins in the developing nervous system. *Journal of Neurobiology*, 25(11):1334- 1348.
- Dechant G., Barde Y.A. (2002) The neurotrophin receptor p75(NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat. Neurosci.*, 5:1131– 1136.

- Diez-Marques L., Ortega-Velazquez R., Langa C., Rodriguez-Barbero A., Lopez-Novoa J.M., Lamas S., Bernabeu C. (2002) Expression of endoglin in human mesangial cells: modulation of extracellular matrix synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1587:36 – 44.
- Dominici M., Blanc K.L., Mueller I. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315–317.
- Dowling J.E., Wald G. (1960) The biological function of vitamin A acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 46: 587–608.
- Dupe V., Matt N., Garnier J.M., Chambon P., Mark M., Ghyselinck N.B.A. (2003) Newborn lethal defect due to inactivation of retinaldehyde dehydrogenase type 3 is prevented by maternal retinoic acid treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:14036–14041.
- Dzierzak E., Speck N.A. (2008) Of lineage and legacy: the development of mammalian hematopoietic stem cells. *Nat Immunol*, 9: 129-136.
- Elkabes S., Dreyfus C.F., Schaar D.G., Black I.B. (1994) Embryonic sensory development: local expression of neurotrophin-3 and target expression of nerve growth factor. *J Comp Neurol.*, 341:204–213.
- Ema M., Yokomizo T., Wakamatsu A., Terunuma T., Yamamoto M., Takahashi S. (2006) Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing V-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo. *Blood*, 108:4018-4024.
- Erdinçler P., Kaynar M.Y., Canbaz B., Kocer N., Kудay C., Cıplak N. (1998) Iniencephaly: neuroradiological and surgical features. Case report and review of the literature. *J Neurosurg.*, 89:317-320.
- Erickson C.A., Weston J.A. (1983) An SEM analysis of neural crest migration in the mouse. *J Embryol Exp Morph.*, 74:97–118.
- Farese R.V., Jr. Cases S., Ruland S.L., Kayden H.J., Wong J.S., Young S.G., Hamilton R.L. (1996) A novel function for apolipoprotein B: lipoprotein synthesis in the yolk sac is critical for maternal-fetal lipid transport in mice. *J. Lipid Res.*, 37: 347–360.
- Farley T.F., Hambidge S.J., Daley M.F. (2002) Association of low maternal education with neural tube defects in Colorado, 1989–1998. *Public Health*, 116:89–94.
- Fassbender K., Walter S., Ku S.H.L., Landmann R., Ishii K., Bertsch T., Stalder A.K., Muehlhauser F., Liu Y., Ulmer A.J., Rivest S., Lentschat A., Gulbins E., Jucker M., Staufenbiel M., Brechtel K., Walter J., Multhaup G., Penke B., Adachi Y., Hartmann T., Beyreuther K. (2003) The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *The FASEB Journal*, 18:203-206.
- Fenderson B.A., Stamenkovic I., Aruffo A. (1993) Localization of hyaluronan in mouse embryos during implantation, gastrulation and organogenesis. *Differentiation*. 54(2):85-98.

- Fenoglio C., Scherini E., Vaccarone R., Bernocchi G. (1995) A reevaluation of the ultrastructural localization of 5'-nucleotidase activity in the developing rat cerebellum, with a cerium-based method. *J Neurosci Methods*, 59:253–263.
- Filiz S., Dalcik H., Yardimoglu M., Gonca S., Ceylan S. (2002) Localization of neural cell adhesion molecule (N-CAM) immunoreactivity in adult rat tissues. *Biotechnic & Histochemistry*, 77(3): 127-135).
- Fonsatti E., Jekunen A.P., Kairemo K.J.A., Coral S., Snellman M., Nicotra M.R., Natali P.G., Altomonte M., Maio M. (2000). Endoglin is a suitable target for efficient imaging of solid tumors: In vivo evidence in a canine mammary carcinoma model. *Clinical Cancer Research*, 6:2037–2043.
- Fonsatti E., Maio M. (2004) Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *Journal of Translational Medicine*, 2(18):2-7.
- Frey L., Hauser W.A. (2003) Epidemiology of neural tube defects. *Epilepsia*, 44(3): 4-13.
- Friedenstei A.J. (1976) Precursor cells of mechanocytes, *International Review of Cytology*, 47:327–352.
- Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Gerasimov U.V. (1987) Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and Tissue Kinetics*, 20(3):263–272.
- Fushiki S., Schachner M. (1986) Immunocytological Localization of Cell Adhesion Molecules L1 and N-CAM and the shared carbohydrate epitope L2 during development of the mouse neocortex. *Developmental Brain Research*, 24:153-167.
- Fuss B., Baba H., Phan T., Tuohy V.K., Macklin W.B. (1997) Phosphodiesterase I, a novel adhesion molecule and/or cytokine involved in oligodendrocyte function. *J Neurosci.*, 17: 9095–9103.
- Gaetano C., Catalano A., Illi B., Felici A., Minucci S., Palumbo R., Facchiano F., Mangoni A., Mancarella S., Mühlhauser J., Capogrossi M.C. (2001) Retinoids induce fibroblast growth factor-2 production in endothelial cells via retinoic acid receptor activation and stimulate angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation Research*, 4-11.
- Geisel J. (2003) Folic acid and neural tube defects in pregnancy. *Journal Perinatal Neonatal Nursing*, 17(4): 268-279.
- Gerecht-Nir S., Itskovitz-Eldor J. (2004) Cell therapy using human embryonic stem cells. *Transplant Immunology*, 12:203-209.
- Golalipour M.J., Mobasheri E., Vakili M.A., Keshtkar A.A. (2007) Epidemiology of neural tube defects in northern Iran, 1998-2003. *Eastern Mediterranean Health Journal*, 13(3): 560-566.
- Goridis C., Brunet J.F.(1992) NCAM: structural diversity, function and regulation of expression. *Seminars in Cell Biology*, 3:189-197.
- Grabowski C.T. (1985) Studies on the mechanism of trypan blue teratogenicity in the rat developing *in vivo* and *in vitro*. *Teratology*, 31:389-399.

- Grewal J., Carmichael S., Song J., Shaw G.M. (2008) Neural tube defects: an analysis of neighbourhood-and individual-level socio-economic characteristics. *Paediatr Perinat Epidemiol.*, 23:116–124.
- Gurudutta U., Gangenahalli G.U., Singh V.K., Verma Y.K., Gupta P., Sharma R.K., Chandra R., Luthra P.M. (2006) Hematopoietic Stem Cell Antigen CD34: Role in Adhesion or Homing. *Stem Cells And Development*, 15: 305–313.
- Güvenc H., Uslu M.A., Güvenç M., Ozekici U., Kocabay K., Bektaş S. (1993) Changing trend of neural tube defects in eastern Turkey. *J Epidemiol Community Health*, 47(1):40-1.
- Haeryfar S.M.M, Hoskin D.W. (2004) Thy-1: more than a mouse pan-T cell marker. *Journal of Immunology*, 173(6):3581–3588.
- Hale F. (1935) Relation of maternal vitamin A deficiency to microphthalmia in pigs. *Texas State J Med.*, 33: 228–232.
- Harding B.N., Copp A.J. (2008) Malformations In: Love S., Louis D.N., Ellison D.W., eds. *Greenfield's Neuropathology*. London: Hodder Arnold, 335-479.
- Harnish D.C., Jang H., Soprano K.J., Kochhar D.M., Soprano D.R. (1992) Retinoic acid receptor b2 mRNA is elevated by retinoic acid in vivo in susceptible regions of mid-gestation mouse embryos. *Dev Dyn.*, 194:239–246.
- Harris B.S., Franz T., Ullrich S., Cook S., Bronson R.T., Davisson M.T. (1997) Forebrain overgrowth (fog): a new mutation in the Mouse affecting neural tube development. *Teratology*, 55: 231–240.
- Hay E.D. and Meier S. (1974). Glycosaminoglycan synthesis by embryonic inductors - neural tube, notochord and lens. *Cell Biol.*, 62:889-898.
- Hekmat A., Bitter-Suerma D., Schachner M. (1990) Immunocytological Localization of the highly polysialylated form of the neural cell adhesion molecule during development of the murine cerebellar cortex. *The Journal Of Comparative Neurology*, 29:457-467.
- Hernandez-Diaz S., Werler M.M., Walker A.M., Mitchell A.A. (2003) Neural tube defects in relation to use of folic acid antagonists during pregnancy. *Am J Epidemiol.*, 153:961-968.
- Himmetoglu O., Tiras M.B., Gursoy R., Karabacak O., Sahin I., Onan A. (1996) The incidence of congenital malformations in a Turkish population. *Int J Gynaecol Obstet.*, 55:117-21.
- Hirashima M., Bernstein A., Stanford W. L., Rossant J. (2004). Genetrap expression screening to identify endothelial-specific genes. *Blood* 104:711-718.
- Holson R.R., Adams J., Ferguson S.A. (1999) Gestational stage-specific effects of retinoic acid exposure in the rat, *Neurotoxicol Teratol.*, 21: 393-402.
- Hosomi S., Yamashita T., Aoki M., Tohyama M. (2003) The p75 receptor is required for BDNF-induced differentiation of neural precursor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 310:1011–1015.
- Ille F., Sommer L. (2005) Wnt signaling: multiple functions in neural development. *Cell Mol Life Sci* 62:1100–1108.



- Jacobsson C., Granström G. (1997) Effects of vitamin B6 on beta-aminopropionitrile-induced palatal cleft formation in the rat. *Cleft Palate-Craniofacial Journal*, 34(2): 95-100.
- Jang Y.K., Park J.J., Lee M.C., Yoon B.H., Yang Y.S., Yang S.E., Kim S.U. (2004) Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. *Journal of Neuroscience Research*, 75: 573–584.
- Johnson D., Lanahan A., Buck C.R., Sehgal A., Morgan C., Mercer E., Bothwell M., Chao M., (1986) Expression and structure of the human NGF receptor. *Cell*, 47: 545-554.
- Jones F.S., Prediger E.A., Bittner D.A., Robertis E.M., Edelman G.M. (1992) Cell adhesion molecules as targets for hox genes: neural cell adhesion molecule promoter activity is modulated by cotransfection with hox-2.5 and -2.4. *PNAS*, 89(6):2086-2090.
- Kalyani A., Hobson K., Rao M.S. (1997) Neuroepithelial stem cells from the embryonic spinal cord: isolation, characterization, and clonal analysis. *Dev. Biol.*, 186: 202–223.
- Kalyani A.J., Piper D., Mujtaba T., Lucero M.T., Rao M.S. (1998) Spinal cord neuronal precursors generate multiple neuronal phenotypes in culture. *J. Neurosci.*, 18: 7856–7868.
- Karp H.L., Tillotson M.L., Soria J., Reich C., Wood J.G. (1994) Mikroglial tyrosine phosphorylation systems in normal and degenerating brain. *Glia*, 11: 284-290.
- Kawaguchi R., Yu J., Honda J., Hu J., Whitelegge J., Ping P., Wiita P., Bok D., Sun H. (2007) A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A. *Science*, 315: 820–825.
- Kayaalp O. (2000) *Tıbbi Farmakoloji*, 9. Baskı Cilt 2, Hacettepe TAŞ, S:1541-1591.
- Kennel S.J., Lankford T.K., Foote L.J., Shinpock S.G., Stringer C. (1993) CD44 expression on murine tissues. *Journal of Cell Science*, 104:373-382.
- Kistler A. (1981) Teratogenesis of retinoic acid in rats: susceptible stages and suppression of retinoic acid-induced limb malformations by cycloheximide. *Teratology* 23:25–31.
- Kitabayashi A.N., Anderson G.A., Sleepa G., Mena J., Karabegovic A., Karamatha S., Letarte M., Puri M.C. (2009) Endoglin is dispensable for angiogenesis, but required for endocardial cushion formation in the midgestation mouse embryo. *Developmental Biology*, 335: 66–77.
- Knutson D.C., Clagett-Dame M. (2008) atRA Regulation of NEDD9, a gene involved in neurite outgrowth and cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.*, 477: 163–174.
- Kochhar D.M. (1977) Cellular basis of congenital limb deformity induced in mice by vitamin A. *Birth Defects. Original Articles Series*, 13: 111-154.
- Koh S., and Loy R. (1989) Localization and development of NGF-sensitive rat basal forebrain neurons and their afferent projections to hippocampus and cortex. *J. Neurosci.*, 9:2990-3018.

- Kohring K., Zimmermann H. (1998) Upregulation of ecto- 5'-nucleotidase in human neuroblastoma SH-SY5Y cells on differentiation by retinoic acid or phorbol ester. *Neurosci Lett.*, 258:127–130.
- Kusafuka K., Hirobe K., Wato M., Tanaka A., Nakajima T. (2011) CD56 expression is associated with neuroectodermal differentiation in ameloblastomas: an immunohistochemical evaluation in comparison with odontogenic cystic lesions. *Med Mol Morphol.*, 44: 79–85.
- Lai L., Bohnsack B.L., Niederreither K., Hirschi K.K. (2003) Retinoic acid regulates endothelial cell proliferation during vasculogenesis. *Development* 130(26) 6465-75..
- Langer D., Hammer K., Koszalka P., Schrader J., Robson S., Zimmermann H. (2008) Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited. *Cell Tissue Res.*, 334: 199–217.
- Langman J., Welch G.W. (1967) Excess Vitamin A and Development of the Cerebral Cortex. *Journal of Comparative Neurology.* 131(1) :15–25.
- Lardelli M., Williams R., Mitsiadis T., Lendahl U. (1996) Expression of the Notch 3 intracellular domain in mouse central nervous system progenitor cells is lethal and leads to disturbed neural tube development. *Mech Dev.*, 59:177–190.
- Lawson A., Schoenwolf G.C., England M.A., Addai F.K., Ahima R.S. (1999) Programmed cell death and the morphogenesis of the hindbrain roof plate in the chick embryo. *Anat Embryol.*, 200:509–519.
- Lekea V., Tzoumaka-Bakoula C., Golding J. (1988) Incidence of anencephalus and spina bifida in Greece. *Teratology*, 38(4): 347-9.
- Li C., Issa R., Kumar P., Hampson I.N., Lopez-Novoa J.M., Bernabeu C., Kumar S. (2003) CD105 prevents apoptosis in hypoxic endothelial cells. *J Cell Sci.*, 116: 2677-2685.
- Li Z., Ren A., Zhang L., Ye R., Li S., Zheng J., Hong S., Wang T. (2006) Extremely high prevalence of neural tube defects in a 4 country area in shanxi province, China. *Birth Defects Research*, 76(part a): 237-240.
- Li, C., Hampson, I. N., Hampson, L., Kumar, P., Bernabeu, C., Kumar, S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor  $\beta$ 1 on human vascular endothelial cells. *The FASEB Journal* 2000 14 no. 1 55-64.
- Lin G., Finger E., Gutierrez-Ramos J.C. (1995) Expression of CD34 in endothelial cells, hematopoietic progenitors and nervous cells in fetal and adult mouse tissues. *Eur. J. Immunol.*, 25: 1508-1516.
- Liu C.J., Chaturvedi N., Barnstable C.J., Drey E.B. (1996) Retinal Thy-1 expression during development. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37: 71469-1473.
- Logan C.V., Abdel-Hamed Z., Johnson C.A. (2010) Molecular genetics and pathogenic mechanisms for the severe ciliopathies: insights into neurodevelopment and pathogenesis of neural tube defects. *Mol Neurobiol.*, 43: 12-26.
- Mabalingam M., Pozniak A., McManus T.J., Senaldi G., Virgani D., Peakman M. (1996) Abnormalities of CD45 isoform expression in HIV infection. *Clin. Immunol Immunopathol.*, 81: 210-14.

- MacLean G., Li H., Metzger D., Chambon P., Petkovich M. (2007) Apoptotic extinction of germ cells in testes of Cyp26b1 knockout mice. *Endocrinology*, 148: 4560–4567.
- Maden M. (2006) Retinoids and spinal cord development. *J. Neurobiol.*, 66: 726–738.
- Maden M., Gale E., Kostetskii I., Zile M. (1996) Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects. *Curr. Biol.*, 6: 417–426.
- Maienschein V., Zimmermann H. (1996) Immunocytochemical localization of ecto-5'-nucleotidase in cultures of cerebellar granule cells. *Neuroscience*, 70(2):429-38.
- Marhaba R., Zoller M. (2004) CD44 in cancer progression: Adhesion, migration and growth regulation. *Journal of Molecular Histology*, 35: 211–231.
- Mark P., Kleinsorge M., Gaebel R., Lux C.A., Toelk A., Pittermann E., David R., Steinhoff G., Ma N. (2013) Human mesenchymal stem cells display reduced expression of CD105 after culture in serum free medium. *Stem Cells International*, 698076: 1-9.
- Marshall H., Studer M., Popperl H., Aparicio S., Kuroiwa A., Brenner S., Krumlauf R. (1994) A conserved retinoic acid response element required for early expression of the homeobox gene *hoxb-1*. *Nature*, 370: 567–571.
- Martn-Padilla M. (1966) Mesodermal alterations induced by hypervitaminosis A. *Embryol. exp. Morph.*, 15:251-269.
- Mata de Urquiza A., Solomin L., Perlmann T. (1999) Feedback-inducible nuclear-receptor-driven reporter gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci.*, 96: 13270- 13275.
- Matikainen S., Ronni T., Pine R. (1996) Retinoic acid activates interferon regulatory factor-1 gene expression in myeloid cells. *Blood*, 88(1):114-123.
- Matok I., Gorodischer R., Koren G., et al. (2009) Exposure to folic acid antagonists during the first trimester of pregnancy and the risk of major malformations. *Br J Clin Pharmacol.*, 68: 956–962.
- Maus U., Herold S., Muth H., Maus R., Ermert L., Ermert M., Weissmann N., Rosseau S., Werner S., Seeger S., Grimminger F., Lohmeyer J. (2001) Monocytes recruited into the alveolar air space of mice show a monocytic phenotype but upregulate CD14. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*, 280: 58-68.
- McLean A.C., Valenzuela N., Fai S., Steffany A.L., Bennett S.A.L. (2012) Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments*, 67: 1-6.
- Medvinsky A., Dzierzak E. (1996) Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. *Cell*, 86(6):897-906.
- Meyer R.E., Siega-Riz A.M. (2002) Sociodemographic patterns in spina bifida birth prevalence trends—North Carolina, 1995–1999. *MMWR Recomm Rep*, 51(RR-13):12-15.

- Mikami Y., Ishii Y., Watanabe N. (2011) CD271/p75NTR inhibits the differentiation of mesenchymal stem cells into osteogenic, adipogenic, chondrogenic, and myogenic lineages. *Stem Cells and Development*, 20(5):901– 913.
- Miller A.M., Medvinsky A., Stroubouliqt J., Grosveld F., Dzierzakt E. (1994) Development of hematopoietic stem cell activity in the Mouse. *Embryo Immunity*, 1:291-301.
- Miller B.H., Takahashi J.S. (2014) Central circadian control of female reproductive function. doi: 10.3389/fendo.2013.00195.
- Miller P.N., Pratten M.K., Beck F. (1989) Growth of 9.5-day rat embryos in folic acid-deficient serum. *Teratology*, 391:375-385
- Mills J.H., Thompson L.F., Mueller C., Waickman A.T., Jalkanen S., Niemela J., Airas L., Bynoe M.S. (2008) CD73 is required for efficient entry of lymphocytes into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *PNAS.*, 105(27):9325–9330.
- Minasi M.G., Riminucci M., Angeli L.D., Borello U., Berarducci B., Innocenzi A., Caprioli A., Sirabella D., Baiocchi M., Maria R.D., Boratto R., Jaffredo T., Broccoli V., Bianco P., Cossu G. (2002) The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*, 129: 2773-2783.
- Misra M., Shah V., Carpenter E., McCaffery P., Lance-Jones C. (2009) Restricted patterns of Hoxd10 and Hoxd11 set segmental differences in motoneuron subtype complement in the lumbosacral spinal cord. *Dev. Biol.*, 330: 54–72.
- Mitranond V., Sobhon P., Tosukhowong P., Chindaduangrat W. (1979) Cytological changes in the testes of vitamin-A-deficient rats. I. Quantitation of germinal cells in the seminiferous tubules. *Acta Anat. (Basel)*, 103: 159–168.
- Moase C.E., Trasler D.G. (1991) N-CAM alterations in splotch neural tube defect mouse embryos. *Development* 113: 1049-1058.
- Moase C.E., Trasler D.G. (1991) NCAM alterations in splotch neural tube defect mouse embryos. *Development*, 113:1049-1058.
- Moise A.R., Noy N., Palczewski K., Blaner W.S. (2007) Delivery of retinoid-based therapies to target tissues. *Biochemistry*, 46: 4449–4458.
- Moretti M.E., Bar-Oz B., Fried S., Koren G. (2005) Maternal hyperthermia and the risk for neural tube defects in offspring: systematic review and meta-analysis. *Epidemiology*, 16: 216–219.
- Morris R.I., Barber P.C. (1983) Fixation of Thy-1 in nervous tissue for immunocytochemistry, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 31:263-74.
- Morriss G. M. (1975) Abnormal cell migration as a possible factor in the genesis of vitamin A-induced craniofacial anomalies. In *New Approaches to the Evaluation of Abnormal Mammalian Embryonic Development* (ed. D. Neubert). Berlin: Geo. Thieme Verlag.
- Morriss G.M. (1972) Morphogenesis of the malformations induced in rat embryos by maternal hypervitaminosis A. *Anat.*, 113:241-250.

- Morriss G.M., Solursh M. (1978). Regional differences in mesenchymal cell morphology and glycosaminoglycans in early neuralfold stage rat embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.* 46:37-52.
- Morriss-Kay G., Tan S.S. (1987) Mapping cranial neural crest cell migration pathways in mammalian embryos. *Trends Genet.*, 3: 257–261.
- Morriss-Kay G.M., Crutch B. (1982) Culture of rat embryos with B-D-xyloside: Evidence for a role for proteoglycans in neurulation. *J Anat.*, 134: 491–506.
- Moscatelli I., Pierantozzi E., Camaioni A., Siracusa G., Campagnolo L. (2009) p75 neurotrophin receptor is involved in proliferation of undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Exp Cell Res.*, 315:3220–3232.
- Moss J.B., Xavier-Neto J., Shapiro M.D., Nayeem S.M., McCaffery P. (1998) Dynamic patterns of retinoic acid synthesis and response in the developing mammalian heart. *Dev Biol.*, 199: 55-71.
- Narisawa S, Hasegawa H, Watanabe K, Millán JL (1994) Stage-specific expression of alkaline phosphatase during neural development of the mouse. *Dev Dyn.*, 201:227– 235.
- Nikkila A., Rydhström H., Kallen B. (2006) The incidence of spina bifida in Sweden 1973-2003: The effect of prenatal diagnosis. *European Journal of Public Health*, 16(6): 660- 662.
- Nir G., Eldor I. (2004) Cell therapy using human embryonic stem cells. *Transplant Immunology*, 12: 203-209.
- Njamnshi A.K., Djientcheu V.P., Lekoubou A., Guemsa M., Obama M.T., Mbu R. (2008) Neural tube defects are rare among black Americans but not in sub-Saharan black Africans: the case of Yaounde- Cameroon. *J Neurol Sci.*, 270: 13–17.
- O’rahilly R., Müller F. (1986) Human growth during the embryonic period proper. *Human Growth*, 245-253.
- O’Rahilly R., Muller F. (2002) The two sites of fusion of the neural folds and the two neuropores in the human embryo. *Teratology*, 65: 162–170.
- Ode A., Kopf J., Kurtz A. (2011) CD73 and CD29 concurrently mediate the mechanically induced decrease of migratory capacity of mesenchymal stromal cells. *European Cells and Materials.*, 22: 26–42.
- Ogunshola O., Stewart W.B., Mihalcik V., Solli T., Madri J.A., Ment L.R. (2000) Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in post-natal developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.*, 119:119-153.
- Oikawa T., Hirofani K., Nakamura O., Shudod K., Hiragun A., Iwaguchi T. (1989) A highly potent antiangiogenic activity of retinoids. *Cancer Letters*, 48:157-162.
- Oohira A. Matsui F., Matsuda M., Shoji R (1986) Developmental change in the glycosaminoglycan composition of the rat brain. *J Neurochem.*, 47: 588-593.
- O’Shea K.S. (1987) Differential deposition of basement membrane components during formation of the caudal neural tube in the mouse embryo. *Development*, 99:509-519.

- Paccola C.C., Resende C.G., Stumpp T., Miraglia S.M., Cipriano I. (2013) *Anim. Reprod.*, 10(4):677-683.
- Padmanabhan R. (1988) Light microscopic studies on the pathogenesis of exencephaly induced in the rat after neural tube closure. *Teratology*, 37:29-36.
- Padmanabhan R. (2006) Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects. *Congenital Anomalies*, 46: 55-67.
- Pares X., Farres J., Kedishvili N., Duester G. (2008) Medium-and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families: Medium-chain and short-chain dehydrogenases/reductases in retinoid metabolism. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65: 3936–3949.
- Pennimpede T., Cameron D.A., Maclean G.A., Li H., Abu-Abed S., Petkovich M. (2010) The role of CYP26 enzymes in defining appropriate retinoic acid exposure during embryogenesis. *Birth Defects Res. A Clin. Mol. Teratol.*, 88: 883–894.
- Penninger J.M., Sasaki J.I., Sasaki T., Oliveira-dos Santos A.J. (2001) CD45: new jobs for an old acquaintance. *Nat Immunol.*, 2: 389-396.
- Perlingeiro R.C. (2007) Endoglin is required for hemangioblast and early hematopoietic development. *Development*, 134:b 3041-3048.
- Pierelli L., Bonanno G., Rutella S., Marone M., Scambia G., Leone G. (2001) CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. *Leuk Lymphoma*, 42(6):1195-206.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 284(5411): 143–147.
- Ploemacher RE. (1997) Stem cells: characterization and measurement. *Baillieres Clin Haematol.* 10 :429-444.
- Plum L.A., Parada L.F., Tsoulfas P., Clagett-Dame M. (2001) Retinoic acid combined with neurotrophin-3 enhances the survival and neurite outgrowth of embryonic sympathetic neurons. *Exp. Biol. Med.*, 226: 766–775.
- Pollerberg E.G., Sadoul R., Goridis C., Schachner M. (1985) Selective expression of the 180- kD component of the neural cell adhesion molecule (N-CAM) during development. *The Journal Of Cell Biology*, 101:1921-1929.
- Qian X., Shen Q., Goderie S.K., He W., Capela A., Davis A.A., Temple S. (2000) Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron*, 28: 69–80.
- Quadro L., Hamberger L., Gottesman M.E., Colantuoni V., Ramakrishnan R., Blaner W.S. (2004) Transplacental delivery of retinoid: the role of retinol-binding protein and lipoprotein retinyl ester. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 286: E844–E851.
- Quadro L., Hamberger L., Gottesman M.E., Wang F., Colantuoni V., Blaner W.S., Mendelsohn C.L. (2005) Pathways of vitamin A delivery to the embryo: insights from a new tunable model of embryonic vitamin A deficiency. *Endocrinology*, 146: 4479– 4490.

- Quartu M., Geic M., Del Fiacco M. (1997) Neurotrophin-like immunoreactivity in the human trigeminal ganglion. *Neuroreport*, 8: 3611–3617.
- Rasmussen S.A., Chu S.Y., Kim S.Y., Schmid C.H., Lau J. (2008) Maternal obesity and risk of neural tube defects: a metaanalysis *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 198(6): 611-619.
- Reif A.E., Allen J.M.V. (1964). The AKR thymic antigen and its distribution in leukemias and nervous tissue. *J. Exp. Med.*, 120: 413-433.
- Reynolds K., Mezey E., Zimmer A. (1991) Activity of the  $\beta$ -retinoic acid receptor promoter in transgenic mice. *Mech Dev.*, 36: 15-29.
- Rezaie P., Patel K., Male D.K. (1999) Microglia in the human fetal spinal cord patterns of distribution, morphology and phenotype. *Dev Brain Res.*, 115: 71-81.
- Ribes V., Le Roux I., Rhinn M., Schuhbaur B., Dolle P. (2009) Early mouse caudal development relies on crosstalk between retinoic acid, Shh and Fgf signalling pathways. *Development*, 136: 665–676.
- Richter-Landsberg C., Maronde E., Besser A. (1993) Ecto-5'- nucleotidase activity in PC 12 cells is synergistically modulated by nerve growth factor and 8-bromo-cAMP. *Neurosci Res Commun.*, 12:51–56.
- Ripellino J.A., Bailo M., Margolis R.U., Margolis R.K. (1988) Light and electron microscopic studies on the localization of hyaluronic acid in developing rat cerebellum. *J Cell Biol.*,106:845-855.
- Rogers J.M., Daston G.P., Ebron M.T., Carver B., Stefanadis J.G., Grabowski C.T. (1985) Studies on the mechanism of trypan blue teratogenicity in the rat developing *in vivo* and *in vitro*. *Teratology*, 31:389-399.
- Rogers M.L., Beare A., Zola H., Rush R.A. (2008) CD271 (P75 Neurotrophin Receptor). *Journal Of Biological Regulators & Homeostatic Agents*, 22(1): 1-6.
- Roques M., Durand C., Gautier R., Canto P.Y. (2012) Endoglin expression level discriminates long-term maemopoietic from short-term clonogenic progenitor cells in the aort. *Haematologica*, 97(7): 975-980.
- Ross A.S., Peter J., Mccaffery P.J., Drager U.C., Luca L.M. (2000) Retinoids in Embryonal Development *Physiological Reviews*, 80(3): 1021-1055.
- Rossant J., Zirngibl R., Cado D., Shago M., Giguere V. (1991) Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis, *Genes Dev.*, 5:1333-1344.
- Rothman KJ, Moore L.L., Singer M.R., Nguyen U.D.T., Mannino S., Milunsky A. (1995) Teratogenicity of high vitamin a intake. *The New England Journal Of Medicine*, 333(21):1369-74.
- Saalbach A., Haustein U.F., Anderegg U.A. (2000) Ligand of human Thy-1 is localized on polymorphonuclear leukocytes and monocytes and mediates the binding to activated Thy- 1-positive microvascular endothelial cells and fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology*. 115(5): 882-888.

- Sadler T.W. (1998) Mental retardation and developmental disabilities. *Research Reviews*, 4:247-253.
- Sadler T.W. (2006) *Langman's medical embryology*. 10th edition. Lippincott Williams&Wilkins sf 70.
- Sakai Y., Meno C., Fujii H., Nishino J., Shiratori H., Saijoh Y., Rossant J., Hamada H. (2001) The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo. *Genes Dev.*, 15: 213–225.
- Sally A., Jones B. (2012) Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. Hindawi Publishing Corporation *Stem Cells International*. doi:10.1155/2012/975871.
- Samson G.R. (2003) The incidence and demography of neural tube defects in Abu Dhabi, United Arab Emirates (1992-1999). *Journal of Tropical Pediatrics*, 49(4): 256-257.
- Sandell L.L., Lynn M.L., Inman K.E., McDowell W., Trainor P.A. (2012) RDH10 Oxidation of vitamin a is a critical control step in synthesis of retinoic acid during mouse embryogenesis. *PLoS ONE*, 7(2): 1-12.
- Sass J.O., Tzimas G., Elmazar M.M., Nau H. (1999) Metabolism of retinaldehyde isomers in pregnant rats: 13-cis- and all-trans-retinaldehyde, but not 9-cis-retinaldehyde, yield very similar patterns of retinoid metabolites. *Drug Metab Dispos.*, 27: 317 321.
- Schachner M. (1982) Cell type-specific surface antigens in the mammalian nervous system. *Journal of Neurochemistry*, 39(I):1-8.
- Schachner M., Hammerling U. (1974) The postnatal development of antigens on mouse brain cell surfaces. *Brain Research*, 73:362-71.
- Scheibe R.J., Kuehl H., Krautwald S., Meissner J.D., Mueller W.H. (2000) Ecto-alkaline phosphatase activity identified at physiological pH range on intact P19 and HL-60 cells is induced by retinoic acid. *J Cell Biochem.*, 76:420–436.
- Schmidt R.J., Romitti P.A., Burns T.L., Browne M.L., Druschel C.M., Olney R.S. (2009) Maternal caffeine consumption and risk of neural tube defects. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.*, 85: 879–889.
- Schmits R., Filmus J., Gerwin N., Senald G., Kiefer F., Kundig T., Wakeham A., Shahinian A., Catzavelos C., Rak J., Furlonger C., Zakarian A., Simard J.J.L., Ohashi P.S., Paige C.J., Gutierrez-Ramos J.C., Tak W. Mak T.W. (1997) CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution granuloma formation and tumorigenicity. *Blood*, 90(6):2217-2233.
- Schnitzer J., Schachner M. (1981) Expression of Thy-1, H-2 and NS-4 cell surface antigens and tetanus toxin receptors in early postnatal and adult mouse cerebellum. *Journal of Neuroimmunology*, 1:429-56.
- Schoen S.W., Graeber M.B., Tóth L., Kreutzberg G.W. (1988) 5'-Nucleotidase in postnatal ontogeny of rat cerebellum: a marker for migrating nerve cells? *Dev Brain Res.*, 39:125–136.



- Schofield R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1-2):7-25.
- Schor F.N. (2005) The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Progress in Neurobiology*, 77:201–214.
- Schultz A.W. (1999) Improving child and family health primary prevention of neural tube defects. *Pediatric Nursing*, 25(4): 419-422.
- See A.W., Kaiser M.E., White J.C., Clagett-Dame M.A. (2008) Nutritional model of late embryonic vitamin A deficiency produces defects in organogenesis at a high penetrance and reveals new roles for the vitamin in skeletal development. *Dev. Biol.*, 316: 171–190.
- Seegmiller RE, Ford WH, Carter MW, Mitala JJ, PowerS WJ. (1997) A developmental toxicity study of tretinoin administered topically and orally to pregnant Wistar rats. *J Am Acad Dermatol.*, 36: 60–66.
- Seller M.J. (1995) Sex, neural tube defects, and multisite closure of the human neural tube. *Am J Med Genet.*, 58: 332–336.
- Shaw G.M., Nelson V., Olshan A.F. (2002) Paternal occupational group and risk of offspring with neural tube defects. *Paediatr Perinat Epidemiol.*, 16: 328–333.
- Shenefelt R.E. (1972) Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology*, 5: 103-118.
- Sirbu I.O., Duester G. (2006) Retinoic-acid signalling in node ectoderm and posterior neural plate directs left-right patterning of somitic mesoderm. *Nat. Cell Biol.*, 8: 271–277.
- Smedley M.J., Stanisstreet M. (1986) Calcium and neurulation in mammalian embryos. II. Effects of cytoskeletal inhibitors and calcium antagonists on the neural folds of rat embryos. *J Embryol Exp Morph.*, 93: 167–178.
- Soprano D.R., Soprano K.J. (1995) Retinoids as teratogens. *Annu Rev Nutr.*, 15: 111–132.
- Soprano D.R., Soprano K.J., Goodman D.S. (1986) Retinol-binding protein and transthyretin mRNA levels in visceral yolk sac and liver during fetal development in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7330–7334.
- Spychala J, Kitajewski J. (2004) Wnt and beta-catenin signaling target the expression of ecto- 5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. *Exp Cell Res.*, 296:99–108.
- Stevenson R.E., Allen W.P., Pai G.S., Best R., Seaver L.H., Dean J., Thompson S. (2000) Decline in Prevalence of Neural Tube Defects in an High-Risk Region of the United States. *Pediatrics*, 106(4): 677-683.
- Streeter, G. L. (1942) Developmental horizons in human embryos. Description of age group XI, 13 to 20 somites, and age group XII, 21 to 29 somites. *Contrib. Embryol. Carnegie Inst.*, 30:211–245.
- Stuart H Orkin H.S. (1996) Development of the hematopoietic system. *Curr Opin Genet Dev.*, 6:597-602.
- Stupack D.G., Cheresch D.(2003) Apoptotic cues from the extracellular matrix:regulators of angiogenesis. *Oncogene*, 22:9022-9029.

- Su G.L.(2002) Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *AJP-Gastrointest Liver Physiol.*, 283: 256-266.
- Sulik K.K., Alles A.J. (1991) Teratogenicity of retinoids. In: SAUAT JH (ed.): *Retinoids: 10 years On.* Karger Basel, 282-295.
- Sulik K.K., Dehart D.B. (1988) Retinoic-acid-induced limb malformations resulting from apical ectodermal ridge cell death. *Teratology*, 37: 527-537.
- Supernat A., Markiewicz A., Welnicka-Jaśkiewicz M., Seroczyńska B., Skokowski J., Sejda A., Szade J., Czapiewski P., Biernat W., Żaczek A. (2012) CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 20(2):103–107.
- Sutherland D.R., Keating A. (1992). The CD34 Antigen: Structure, Biology and Potential Clinical Applications. *Journal Of Hematotherapy*, 1: 115-129.
- Taimi M., Helvig C., Wisniewski J., Ramshaw H., White J., Amad M., Korczak B., Petkovich M.A. (2004) Novel human cytochrome P450, CYP26C1, involved in metabolism of 9-cis and all-trans isomers of retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, 279: 77–85.
- Tan J., Town T., Mori T., Wu Y., Saxe M., Crawford F., Mullan M. (2000) CD45 opposes  $\beta$ -amyloid peptide-induced microglial activation via inhibition of p44/42 mitogen-activated protein kinase. *Journal of Neuroscience*. 20(20): 7587-7594.
- Temple S. (2001) The development of neural stem cells. *Nature*, 414: 112-118.
- Tianxin Y., Daqing S., Huang Y.G., Smart A., Briggs J.P., Schnermann J.B. (1999) Differential regulation of COX-2 expression in the kidney by lipopolysaccharide: role of CD14. *Am. J. Physiol.*, 276(45): F10–F16.
- Tomellini E., Lagadec C., Polakowska R., Bourhis X.L. (2014) Role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: more than just a marker. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71:2467–2481.
- Town T., Mori T., Wu Y., Saxe M., Crawford F., Mullan M. (2000) CD45 opposes beta amyloid peptide induced microglial activation via inhibition p44/42 mitogen activated protein kinase. *J Neurosci.*, 20: 7587-7594.
- Trinkle B.M.,Sterling B.S. (1997) Neural tube defects: a primary prevention role for nurses. *Journal of Obstetric, Gynecologic and neonatal nursing*, 26: 305-510.
- Tropepe V., Sibilina M., Ciruna B.G., Rossant J., Wagner E.F., Van Der Kooy D. (1999) Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev. Biol.*, 208: 166–188.
- Tunçbilek E. (2004) Türkiye'deki yüksek nöral tüp defekti sıklığını ve önlemek için yapılabilecekler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları*, 47: 79-84.
- Ulven S.M., Gundersen T.E., Weedon M.S., Landaas V.O., Sakhi A.K. (2000) Identification of endogenous retinoids, enzymes, binding proteins, and receptors during early post implantation development in mouse: important role of retinaldehydehydrogenase type 2 in synthesis of all-trans-retinoic acid. *Dev Biol.*, 220: 379-91.

- Unni E., Rao M.R., Ganguly J. (1983) Histological & ultrastructural studies on the effect of vitamin A depletion & subsequent repletion with vitamin A on germ cells & Sertoli cells in rat testis. *Indian J. Exp. Biol.*, 21: 180–192.
- Van Pelt A.M., de Rooij D.G. (1990) Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A-deficient mice. *Biol. Reprod.*, 43: 363–367.
- Van Straaten H.W.M., Copp A.J. (2001) Curly tail: a 50-year history of the mouse spina bifida model. *Anat Embryol.*, 201: 225-237.
- Vats A., Tolley N.S., Polank J.M., Buttery L.D.K. (2002) Stem cells: Sources and applications. *Clin. Otolaryngol.*, 27: 227-232.
- Vermot J., Fraulob V., Dolle P., Niederreither K. (2000) Expression of enzymes synthesizing (aldehyde dehydrogenase 1 and retinaldehyde dehydrogenase 2) and metabolizing (Cyp26) retinoic acid in the mouse female reproductive system. *Endocrinology*, 141: 3638–3645.
- Vieira A.R. (2003) Birth order and neural tube defects: a reappraisal. *J Neurol Sci.*, 217: 65–72.
- Vieira A.R., Taucher S.C. (2005) Maternal age and neural tube defects: evidence for a greater effect in spina bifida than in anencephaly. *Rev Med Chil.*, 133: 62–70.
- Wallingford J.B. (2005) Neural tube closure and neural tube defects: studies in animal models reveal known knowns and known unknowns. *American Journal Of Medical Genetics Part C (Semin. Med. Genet.)*, 135c: 59-68.
- Wang L., Tang S., Wang Y., Xu S., Yu J., Zhi X., Ou Z., Yang J., Zhou P., Shao Z. (2013) Ecto 5 nucleotidase promotes tumor angiogenesis. *Clinical & Experimental Metastasis*. 30(5):671-680.
- Warkany J, Schraffenberger E. (1944) Congenital malformations of the eyes induced in rats by maternal vitamin A deficiency. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 57: 49–52.
- Warkany J., Schraffenberger E. (1946) Congenital malformations induced in rats by maternal vitamin A deficiency. I. Defects of the eye. *Arch. Ophthalmol.*, 35: 150–169.
- Wei X., Hui Li H., Miao J., Zhou F., Liu B., Wu D., Li S., Wang L., Fan Y., Wang W. (2012) Disturbed apoptosis and cell proliferation in developing neuroepithelium of lumbo- sacral neural tubes in retinoic acid-induced spina bifida aperta in rat. *Int. J. Devl Neuroscience*, 30: 375–381.
- Weil M., Jacobson M.D., Raff M.C. (1997) Is programmed cell death required for neural tube closure. *Curr Biol.*, 7:281–284.
- Wheatley S.C., Isacke C.M., Crossley P.H. (1993) Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development*, 119:295-306.
- White J.C., Highland M., Kaiser M., Clagett-Dame M. (2000) Vitamin A deficiency results in the dose-dependent acquisition of anterior character and shortening of the caudal hindbrain of the rat embryo. *Dev. Biol.*, 220: 263–284.

- White R.J., Schilling T.F. (2008) How degrading: Cyp26s in hindbrain development. *Dev. Dyn.*, 237: 2775–2790.
- Wilson J.G., Roth C.B., Warkany J. (1953) An analysis of the syndrome of malformations induced by maternal vitamin A deficiency. Effects of restoration of vitamin A at various times during gestation. *Am. J. Anat.*, 92: 189–21.
- Wilson J.G., Warkany J. (1948) Malformations in the genito-urinary tract induced by maternal vitamin A deficiency in the rat. *Am. J. Anat.*, 83: 357–407.
- Wilson J.G., Warkany J. (1949) Aortic-arch and cardiac anomalies in the offspring of vitamin A deficient rats. *Am. J. Anat.*, 85: 113–155.
- Wolbach S.B., Howe P.R. (1925) Tissue changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *J. Exp. Med.*, 42: 753–777.
- Wood H.B., May G., Healy L., Enver T., Morriss-Kay G.M. (1997) CD34 Expression patterns during early mouse development are related to modes of blood vessel formation and reveal additional sites of hematopoiesis. *Blood*, 90: 2300-2311.
- Xue G.P., Moms R. (1992) Expression of the neuronal surface glycoprotein Thy- 1 does not follow appearance of its mRNA in developing mouse purkinje cells. *J. Netmchem.*, 58(2): 430-441.
- Yasuda, T., Konishi H., Tanimura T. (1987) Actin and tubulin distribution in the abnormal neuroepithelium induced by retinoic acid in mice. *Acta Anat. Jpn.*, 62:461.
- Yasuda Y., Konishi H., Matsuo T., Kihara T., Tanimura T. (1989) Aberrant differentiation of neuroepithelial cells in developing mouse brains subsequent to retinoic acid exposure in utero. *The American Journal Of Anatomy*, 186:271-284.
- Yener T., Tunc A.T., Aslan H., Aytan H., Caliskan A.C. (2007) Determination of oestrous cycle of the rats by direct examination: How Reliable?. *Anat. Histol. Embryol.*, 36:75–77.
- Yeşilipek M.A, Melikoğlu M., Anlar B., Balcı S. (1989) Samsun yöresinde konjenital anomali sıklığı:Yirmibeşbinaltıyüzelliyedi yenidoğan bebeğin değerlendirilmesi. *Çocuk sağlığı ve hastalıkları Dergisi*, 31: 253-263.
- Yoshioka T, Tanaka O. (1989) Histochemical localization of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-ATPase of the rat cerebellar cortex during postnatal development. *Int J Dev Neurosci.*, 7:181–193.
- Yu M., Ping Z., Zhang S., He Y., Dong R., Guo X. (2015) The survey of birth defects rate based on birth registration system. *Chinese Medical Journal*, 128(1): 7-14.
- Zhong W.M., Jiang M.M., Schonemann M.D. (2000) Mouse numb is an essential gene involved in cortical neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 6844–6849.
- Zhu H., Mitsuhashi N., Klein A. (2006) The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem Cells*,24: 928-935.
- Ziegler-Heidbrock H.W.L., Ulevitch R.J. (1993) CD14: Cell surface reseptor and differantiation marker. *Immunology Today*, 14(3):121-126.

- Zimmerman E.F., Raju P.B., Resnick E., Fisher K.E. (1994) Role of oxygen free radicals in cocaine-induced vascular disruption in mice. *Teratology*. 49:192-201.
- Zimmermann H (1996) Biochemistry, localization and functional roles of ectonucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.*, 49:589–618.
- Zimmermann H.(2006) Nucleotide signaling in nervous system development. *Pflugers Arch - Eur J Physiol.*, 452:573–588.
- Zola H., Swart B., Cholson I., Voss E. (2007) CD56. Leukocyte and Stromal Cell Molecules- The CD markers. New Jersey: Wiley-Liss., p.138-139
- Zoller M. (2011) CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?. *Nature Reviews Cancer*, 11(4): 254–267.

## EK 1

### ETİK KURUL KARARI

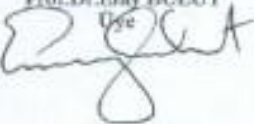
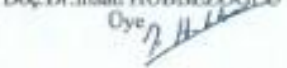

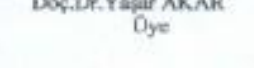

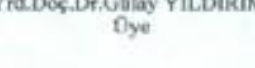
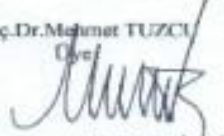
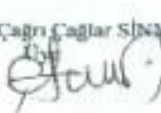
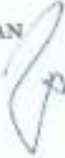



**T.C.**  
**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**

Sayı : B.30.2.CUM.0.01.00.00-50/104 04.10.2012  
Konu : Etik Kurul Kararı İht.

Sayın  
Doç.Dr.Serpil ÜNVER SRAVDIN  
Tıp Fakültesi Histoloji Embryoloji Anabilim Dalı

Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 04.10.2012 tarihinde Prof.Dr.Ömer POYRAZ başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararı almıştır.

Doç.Dr.Serpil ÜNVER SRAVDIN'ın yürütücülüğünü yapmış olduğu 03.10.2012 tarih ve 343 sayılı "Deneysel olarak oluşturulan nöral tüp defektinde mezenkimal ve hemopoetik kök hücrelerinin belirtenmesi" isimli Doktora Tezi Projesi Etik Kurulumuzca kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Emy BULUT Üye 	Doç.Dr.İhsan HUBBEZOĞLU Üye 	Doç.Dr.Zübeyde AKIN POLAT Üye 
Doç.Dr.Yaşar AKAR Üye 	Doç.Dr.Bülent SARAÇ Üye 	Yrd.Doç.Dr.Gülşay YILDIRIM Üye 
Yrd.Doç.Dr.Mahmet TUZCI Üye 	Yrd.Doç.Dr.Çağrı Çağlar SİNMEZ Üye 	Uz.Vet.Hek.Yücel YALMAN Üye - Başkanvekili 
Semih EKİNCİ Sivil Üye 	Prof.Dr.Ömer POYRAZ Başkan 	Turban DUYMUS Sivil Üye 

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Zeynep Deniz ŞAHİN İNAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas, 06/04/1980
Medeni Hali	Evli-iki kız çocuk annesi
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, 58140-Sivas
E-posta Adresi	<a href="mailto:zinan@cumhuriyet.edu.tr">zinan@cumhuriyet.edu.tr</a>

### Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Sivas Lisesi, 1998
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2005
Yüksek Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi, 2009

### İş Tecrübesi

Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma görevlisi, 2008

### Ödüller, Teşvikler ve Üyelikler

T354 ve T550, CÜBAP tarafından desteklenmiş projeler.