

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

118 271

İNSAN FETUSU SEREBRAL
KORTEKSİNDE BAZI ADEZYON
MOLEKÜLLERİNİN DAĞILIMI

118271

Gamze TANRIÖVER (ERGÜLER)

Yüksek Lisans Tezi

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Antalya, 2002

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

İNSAN FETUSU SEREBRAL KORTEKSİNDE BAZI ADEZYON MOLEKÜLLERİNİN DAĞILIMI

Gamze TANRIÖVER (ERGÜLER)

#18271

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Yrd. Doç Dr. Necdet DEMİR

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 20.01.0122.05)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2002

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışmamız jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 20 /11/ 2002

Tez Danışmanı: Yrd. Doç Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Sevin BALKAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nöroloji Anabilim Dalı



Üye: Prof. Dr. Mevlüt ASAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



Üye: Doç. Dr. İsmail ÜSTÜNEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 21 /11/2002 tarih ve 16 /12/ sayılı kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Ramazan DEMİR
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yaşamın devamlılığını sağlayan temel koşullardan birisi hücreler arasındaki uyumdur. Bu uyum hücre içi ve hücre dışı faktörler sayesinde gerçekleşmektedir. Bu faktörlerden birisi de adezyon molekülleri olarak bilinmektedir. Adezyon molekülleri ailesinden NCAM (nöral hücre adezyon molekülü) ve N-kaderin (nöral kaderin); gelişim sırasında nöral tüpten temel yapıların gelişiminde rol oynarken; L1CAM (L1 hücre adezyon molekülü) da merkezi sinir sisteminde birçok mekanizmanın işlemesinde görevlidir.

Çalışma; bu üç adezyon molekülünün fetal insan serebral korteksindeki dağılımlarını immunohistokimyasal olarak göstermek amacıyla gerçekleştirildi. 1, 2 ve 3. trimestere ait abortus materyallerinden alınan serebral korteks doku örnekleri immunohistokimyasal tekniklerle boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

NCAM immureaktivitesi, serebral korteksin tüm katmanlarında hücreler arası uzantılarda ve özellikle de aksonlarda gözlemlendi. Bu immunreaksiyon liflerin yoğun olduğu VI. tabakada daha belirgindi. L1CAM immureaktivitesi de NCAM'a benzerdi ancak, serebral korteksin üst tabakalarında belirgin bir immunreaksiyon yoktur. N-kaderin immureaktivitesi de tüm tabakalarda hücre arası uzantılarda ve bazı çekirdeklerde görüldü. Ayrıca, damar endotelinde de N-kaderin boyanmalarına rastlanıldı.

Sonuç olarak bu çalışmadan NCAM, L1CAM ve N-kaderinin gelişmekte olan insan serebral korteksinde hücre migrasyonu ve akson gelişiminin düzenlenmesinde rol aldığı, hücre katmanlarının oluşumu, akson demetlerinin organizasyonu ve astrosit endotel kontaklarının kurulmasında etkili olan faktörlerden birisi olabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Kelimeler: İnsan, fetus, serebral korteks, NCAM, L1CAM, N-kaderin, immunohistokimya.

ABSTRACT

The harmony between cells is one of the basic condition which obtain life continuity. This harmony occurs via this intrinsic and extrinsic factors. One of the factors is known to be the adhesion molecules. While NCAM (Neural cell adhesion molecule) and N-cadherin (neural cadherin), which is being adhesion molecules family, were playing role development of basic units by neural tube during development, but L1CAM (L1 cell adhesion molecule) be responsible for doing well several mechanisms in central nervous system.

In the present study, we aimed to show the distribution of these three adhesion molecules in the human fetal cerebral cortex. Tissue samples of cerebral cortex at three trimesters were obtained from abortus material and were stained by immunohistochemical techniques and examined under a light microscope.

NCAM immunoreactivity was observed at cerebral cortex layers between cell processes and particularly on the axons. This immunreaction was more evident at the sixth layer where the fibers are concentrated. L1CAM immunoreactivity is similar to that of NCAM but there is no noticable immunoreaction at the upper layer of the cerebral cortex. Also, the immunoreactivity for N cadherin was seen in processes between cells and in some nuclei in all of the layers. Moreover N cadherin was observed in vessel endothelium.

In conclusion; according to the results of this study NCAM, L1CAM and N-cadherin may play a role as a regulator of cell migration and axon development in human cerebral cortex; and axon fasciculation may be an important factor affecting cell layer formation, axon fiber organization and the establishment of astrocyte-endothelium contacts.

Keywords: Human, fetus, cerebral cortex, NCAM, L1CAM, N-cadherin, immunohistochemistry.

TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın planlanması, projelendirilmesi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde değerli yardımlarını esirgemeyen Proje Yürütücüsü ve Akademik Danışmanım Yrd. Doç. Dr. Necdet DEMİR'e, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ramazan DEMİR'e, mensubu olmakla gurur duyduğum Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalının tüm akademisyenlerine ve teknik-yardımcı teknik elemanlarına, Tıp Fakültesi fotofilm merkezi çalışanlarına ayrıca, bu araştırmayı proje olarak destekleyen (proje no: 20.01.0122.05) Akdeniz Üniversitesi Araştırma Fonu Yönetim Kurulu'na teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans Öğrencisi
Gamze TANRIÖVER (ERGÜLER)



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Ak cevher
ALCAM	: Aktive Olmuş Lökosit Hücre Adezyon Molekülü
HAM	: Hücre Adezyon Molekülleri
CD44	: Adezyon Proteini
COOH	: Karboksil Uç
CDP	: Komplement Düzenleyici Protein
EC	: Ekstraselüler komplement (Extracellular complement)
E-Kaderin	: Epitelyal Kaderin
ENCAM	: Embriyonik NCAM
E-Selektin	: Endotelyal Selektin
ESM	: Ekstraselüler Matriks
FBF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
GTP'az	: Guanozin trifosfataz
I	: Intermediate Tabaka
ICAM	:İnterselüler Hücre Adezyon Molekülü (Intercellular cell adhesion molecule)
IFNγ	: İnterferon γ
IL	: İnterlökin
K	: Kortikal Tabaka
L1CAM	: L1 Hücre Adezyon Molekülü (L1 cell adhesion molecule)
LAD-1	: Lökosit Adezyonunun Eksikliği (Leukocyte adhesion defiiency)

LCAM	:Karaciğer hücre adezyon molekülü (Liver cell adhesion molecule)
LFA	: Lenfosit fonksiyon-iliskili antijen (Lymphocyte function-associated antigen)
L-Selektin	: Lektin Adezyon Molekülü
M- Kaderin	: Kasla ilişkili kaderin
M	: Moleküler Tabaka
Mac-1	: Makrofaj yüzey antijeni (Macrophage surface antigen)
MadCAM	:Mukozal hücre adezyon molekülü (Mucosal addressin cell adhesion molecule)
MAG	: Miyelin ilişkili Protein
MASA	: Mental retardasyon, spastik parafili, afazi.
MHC	: Major Histocompatibility Complex
MMB	: Mesensefalik metensefalik sınır
N- Kaderin	: Nöral Kaderin
NCAM	:Nöral Hücre Adezyon Molekülü (Neural cell adhesion molecule)
NH₂	: Amino Uç
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler (Natural killer)
NrCAM	: Ng-bağlı Hücre Adezyon Molekülü
OBCAM	: Asidik Lipitler
P	: Prosomer
PAF	: Pıhtı aktifleyici faktör (Platelet activated factor)
PBS	: Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tampon Tuzu)

PECAM	: Pıhtılaşma Hücre Adezyon Molekülü
PMP-22	: Perinöral Miyelin Protein
PSA	: Polisialik Asit
R- Kaderin	: Retinal Kaderin
R	: Rombomer
S	: Subkortikal Tabaka
Shh	: Sonic hedgehog
SleA / SleX	: Sialyl Lewis A ve X Sialize Glikanlar
TNFα	: Tümör Nekroz Faktör
V	: Ventriküler Tabaka
Vb	: Ventrikül Boşluğu
VCAM	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü (Vascular cell adhesion molecule)
VLA	: Very Late Antigen (Çok Geç Antijen)

ŞEKİLLER DİZİNİ

- Şekil 2.1.** Üç beyin keseciği ve keseciklerden gelişim sırasında köken alacak yapılar.
- Şekil 2.2.** Merkezi sinir sisteminin gelişimi sırasında görülen sinyal alanları.
- Şekil 2.3.** Nöral tüpün oluşumundan itibaren merkezi sinir sisteminin meydana gelişi.
- Şekil 2.4.** Nöral epitel ve matriks bölgesini gösteren şematize çizim.
- Şekil 2.5.** Kortikal plak gelişimini gösteren şematize çizim.
- Şekil 2.6.** İçten dışa doğru korteksdeki hücre tabakalarını gösteren tabakalaşmanın düzeni.
- Şekil 2.7.** L1CAM molekülünün yapısının gösteren şematize çizim.
- Şekil 2.8.** NCAM'ın üç farklı formunun şeması.
- Şekil 2.9.** ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3'ün moleküler yapılarının şematize edilmiş görüntüleri.
- Şekil 2.10.** VCAM'ın yapısını gösteren şematik çizim.
- Şekil 2.11.** PECAM'ın yapısını gösteren şematik çizim.
- Şekil 2.12.** Kaderinlerin genel olarak yapısal görüntüsü.
- Şekil 2.13.** Klasik kaderin molekülleri ve birbirleriyle ilişkileri.
- Şekil 2.14.** Nörulasyon sırasında kaderin ekspresyonunun değişimi.
- Şekil 2.15.** İntegrinlerin genel olarak görüntüsü.
- Şekil 2.16.** E-Selektinin yapısını gösteren şematize çizim.
- Şekil 2.17.** L-Selektinin yapısını gösteren şematize çizim.

Şekil 2.18.	P-Selektinin yapısını gösteren şematize çizim.
Şekil 4.1.1.a,b.	Gelişen fetal insan serebral korteksindeki tüm tabakalarda 1. trimestere ait NCAM immunoreaktivitesi
Şekil 4.1.1.2a,b,c.	Gelişmekte olan fetal korteks boyunca NCAM boyanmaları. Moleküler tabakadan itibaren ventriküle kadar olan seri kesitler
Şekil 4.1.1.3a,b.	NCAM boyanmalarının spesifitesini belirlemek açısından yapılmış izotip kontrolleri
Şekil 4.1.1.4a,b.	NCAM boyanmalarını daha net görebilmek için hematoksiyle ile zıt boyama yapmadan alınmış immunohistokimya kesitleri.
Şekil 4.1.2.1a,b.	Birinci trimestere ait fetal beyin korteksinde L1CAM immunoreaktivitesinin (a) yüzeyden (b) derine doğru artışı.
Şekil 4.1.2.2a,b,c.	Birinci trimesterdeki L1Cam immunoreaktivitesinin daha büyük görüntüsü.
Şekil 4.1.2.3a,b.	L1CAM'a ait kontrol boyanmaları.
Şekil 4.1.2.4a,b.	Zıt boyamasız preperasyonda 1. trimester ait olan örneğin L1CAM immunoreaktivitesi
Şekil 4.1.3.1a,b.	Gelişen serebral korteksde 1. trimestere ait olan örneğin N-kaderin reaksiyonunun tüm katmanlardaki dağılımı
Şekil 4.1.3.2a,b.	N-Kaderin immunoreaktivitesi hücre arası uzantılarda ve bazı nukleuslarda görülmektedir.
Şekil 4.1.3.3a,b.	1. trimestere ait olan örnekte N-kaderin için kontrol boyanmaları
Şekil 4.1.3.4a,b.	Hematoksilen ile zıt boyama yapılmadan elde edilmiş preperatlarda N-Kaderin immunoreaktivitesi.
Şekil 4.2.1.1a,b,c,d.	16 haftalık embriyodan alınmış örneğin fetal korteksinin NCAM immunoreaksiyonu

Şekil 4.2.1.2a,b,c,d,e.	2. trimester ait olan örneğin daha büyük büyütmedeki NCAM immunoreaksiyonu.
Şekil 4.2.1.3a,b,c,d.	16 haftalık fetal serebral korteksin farklı derinliklerinde NCAM'a ait kontrol boyanmaları
Şekil 4.2.1.4a,b,c.	2. trimestere ait zıt boyama yapılmamış fetal kortekste NCAM'ın farklı derinliklerdeki görünümü
Şekil 4.2.2.1a,b,c.	Fetal insan serebral korteksinin farklı derinliklerinde L1CAM immunreaksiyonu
Şekil 4.2.2.2a,b,c,d,e.	2. trimestere ait fetal insan serebral korteksinde farklı derinliklerde L1CAM boyanmasının büyük büyütmedeki görünümü. (oklar aksonal demetleri göstermektedir)
Şekil 4.2.2.3a,b,c.	16 haftalık fetal insan serebral korteksinde L1CAM için negatif kontroller.
Şekil 4.2.2.4a,b,c,d.	16 haftalık embriyonun fetal serebral korteksinde farklı derinliklerde, zıt boyama yapılmadan L1CAM reaksiyonu
Şekil 4.2.3.1a,b,c.	2. trimestere ait insan serebral korteksin farklı katmanlarında N-kaderinin immunoreaksiyonu
Şekil 4.2.3.2a,b,c,d.	2. trimestere ait fetal insan serebral korteksinde tüm tabakalarının ventrikül boşluğuna kadar olan görüntüsü. Her bir tabakada N-kaderin ekspresyonu yoğun olarak dikkati çekmekteydi.
Şekil 4.2.3.4a,b,c.	2. trimestere ait örneğin negatif kontrollerinde herhangi bir reaksiyona rastlanılmadı
Şekil 4.2.3.5a,b,c.	Zıt boyama yapılmamış peperatlarda çekirdeklerdeki N-kaderin boyanması net olarak izlenmektedir.
Şekil 4.3.1.1a,b.	32 haftalık fetal insan serebral korteksinde NCAM immunoreaktivitesi
Şekil 4.3.1.2a,b,c.	Korteks tabakalarında NCAM immunoreaktivitesinin daha büyük büyütmedeki görünümü.

Şekil 4.3.1.3a,b.	NCAM'ın kontrol kesitlerinde herhangi bir immunoreaktivite görülmemektedir
Şekil 4.3.1.4a,b.	Zıt boyama yapılmamış reparatlarda NCAM immunoreaksiyonu.
Şekil 4.3.2.1a,b,c.	3. trimestere ait fetal insan serebral korteksi L1CAM immunoreaksiyonu
Şekil 4.3.2.2a,b,c.	Daha büyük büyütmede 3. trimestere ait fetal insan serebral korteksinde L1CAM immunoreaksiyonu
Şekil 4.3.2.4a,b.	3. trimestere ait serebral korteksin L1CAM immunoreaksiyonunun negatif kontrolü.
Şekil 4.3.2.5a,b.	3. trimestere ait fetal insan serebral korteksinin zıt boyama yapılmamış örnekleri.
Şekil 4.3.3.1a,b.	3. trimestere ait korteksde N-kaderin reaksiyonu
Şekil 4.3.3.2a,b,c,d.	3. trimestere ait örneğin N-kaderin reaksiyonunun daha büyük büyütmedeki görüntüsü.
Şekil 4.3.3.3a,b.	N-kaderin negatif kontrol görüntüsü.
Şekil 4.3.3.4a,b,c.	Zıt boyama uygulanmamış N-kaderin immunoreaksiyonu. (beyaz oklar; çekirdeklerdeki N-kaderin reaksiyonunu, ok başı da kapiller boyanmasını göstermektedir.

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Hücre adezyon moleküllerinden Ig süperaillesinin sistemik olarak gruplara ayrılması.

Tablo 2: 3 adezyon molekülünün, 3 trimestere ait örneklerde reaksiyon düzeylerini göstermektedir.



GİRİŞ VE AMAÇ

Bütün canlı organizmalar, iç ve dış dünyadan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılara karşı yanıt verebilme yeteneğine sahiptirler. Bu yanıtlar canlının gelişmişlik düzeyine göre farklılıklar göstermekle birlikte temel mekanizmalar düzeyinde benzerdir.

İlkel organizmalarda uyarı-yanıt görevi, duyu hücreleri tarafından gerçekleştirildiği halde, farklılaşmış organizmalarda duyu hücresi ile ilişkide olduğu yapı (kas hücresi, bez vs.) arasına bir de sinir hücresi ilave olmuştur. Gelişmiş organizmalarda değişik uyarıları alan algılayıcı (reseptör) yapılar ile ilgili organlar arasında çok iyi organize olmuş bir sinir sistemi ortaya çıkmıştır. Sinir sistemi, organizmanın tüm sistemlerini göreve uyumlu bir biçimde bütünleştirerek canlının tek bir varlık halinde organize olmasını sağlar. Uyarı iletimi yanında, bu uyarıya uygun yanıtı kaydeden-öğrenen, buna dayanarak ileri sonuçlar çıkarabilen bir merkez; merkezi sinir sistemi ve bunun periferde uygulanmasını sağlayan çevresel bağlantıların kurulduğu; periferik sinir sisteminden oluşmaktadır (1).

Sistemin görev yapmasında temel yapılanma, hücreler arasında iletişimi sağlayan kontaklardır. Kontakların uygun faz ve düzeyde yapılanması sistemin iyi çalışması için olmazsa olmazlardandır. Bu yapılanma embriyonal dönemden başlayarak tüm prenatal hayat ve erken postnatal dönemi kapsayan bir süreçte gerçekleşir. Organizmanın gelişim sürecinde bu erginlik döneminde, sinir sisteminin oluşumu ve sürekliliğini sağlayan moleküler mekanizmalar etkindir. Bu moleküler mekanizmaların önemli bir bölümünü, hücre-hücre, hücre-ekstraselüler matriks ilişkisini sağlayan "adezyon molekülleri" oluşturmaktadır (2).

Adezyon molekülleri ailesi içinde yer alan farklı tipteki moleküller, erken gelişim basamakları sırasında farklı alanlarda, farklı düzeylerde izlenirler. Embriyonun oluşumu sırasında (pregastrulasyon safhasında) hem epiblastlar hem de hipoblastlar hücre adezyon moleküllerini (HAM; cell adhesion molecules; CAM) yüzeylerinde taşımaktadırlar. Bu dönemde önemli derecede üretilen adezyon molekülleri, NCAM (nöral hücre adezyon molekülü) ve LCAM (diğer bir adıyla E-Kaderin) 'dir. Epiblast hücreleri başlangıçta LCAM'ı yüksek oranda üretirlerken; primitif çizgi boyunca göç eden hücrelerde üretim düzeyleri düşmeye başlar (2). Gastrulasyon süresince bu düşüşe paralel olarak hiyaluronik asit ve fibronektin gibi hücre dışı matriks moleküllerinin de etkisiyle mezeneşimal hücrelerin göçü kolaylaşır (3). Daha sonra; ektodermal hücre yüzeyinde orta hat boyunca içeriye doğru katlanmasıyla oluşan nöral olukda bu kez LCAM üretimi azalırken, N-kaderin üretiminin arttığı belirlenmiştir (2).

Mezodermal hücrelerde, N kaderin üretiminin somitlerin merkezine doğru yoğunlaştığı görülmüş ve bu şekilde adezyon moleküllerinin üretimindeki değişikliklerle nörolasyonun tamamlandığı açıklanmıştır (1).

Adezyon molekülleri sadece nöral tüp hücrelerinde değil nöral krista hücrelerinde de farklı dönemlerde farklı dağılım göstermektedirler (4). Nörolasyon tamamlandıktan sonra nöral tüpte N-kaderinin üretim düzeyinin yüksek olduğu, aynı zamanda notokorda da hem N-kaderin hem de P kaderinin yüksek düzeyde bulunduğu tespit edilmiştir (1).

Adezyon moleküllerinin sinir sisteminin erken gelişim döneminde gösterdiği dinamizm, insan serebral korteksinde izokortikal yapılanma esnasındaki değişiklikler ve bu değişikliklerin görevsel anlamı halen tartışma konusudur.

Bu çalışmada 1,2,3. trimesterlere ait insan serebral korteksinde adezyon moleküllerinden NCAM, L1CAM ve N-kaderinin üretim alanları ve bu moleküllerin fetal gelişim sürecinde gösterdiği dağılımları araştırıldı.

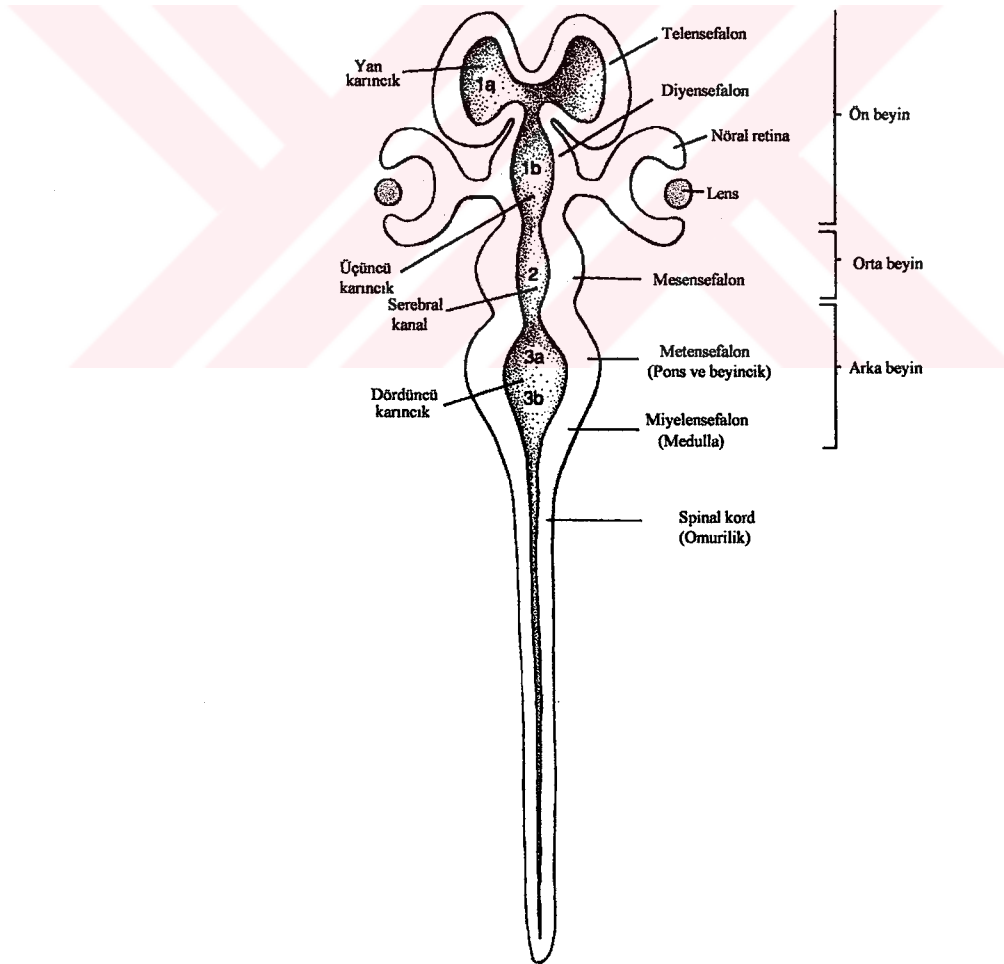


GENEL BİLGİLER

2.1. Serebral Korteks Gelişimi ve Yapısı

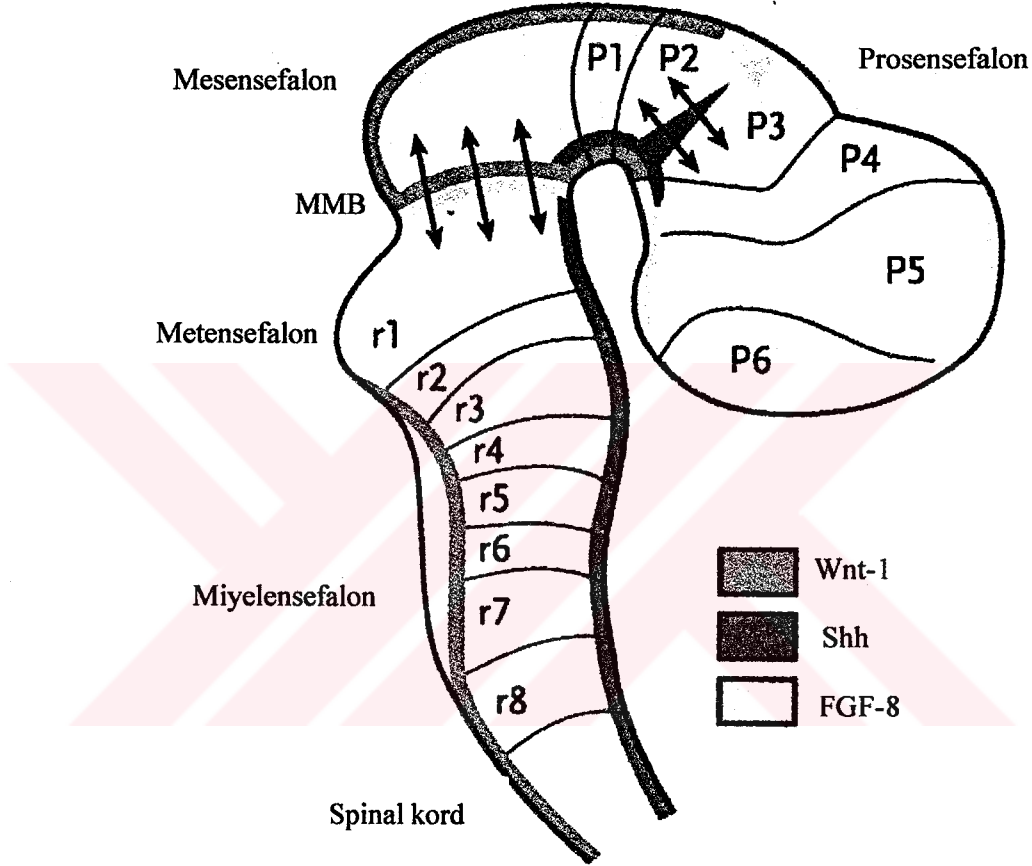
İndüksiyondan kısa bir süre sonra kalınlaşan nöral plak ve oluşmaya başlayan nöral tüp; yalancı çok katlı epitel şeklinde organize olmaya başlar. Bu epitelyum tipinde nukleuslar, uzamış nöroepitelyal hücreler içinde farklı düzeylerde yer aldıkları için çok tabakalı bir yapı şeklinde görülmektedir. Nöroepitelyal hücreler; yüksek derecede mitotik aktiviteye sahiptirler (4).

3. haftanın başlarında merkezi sinir sistemi yapıları oluşmaya başlamıştır. Nöral tüpün ön ucu 25. günde kapandıktan sonra 4. hafta içinde tüpün ön bölümünün genişlemesi ile 3 temel beyin keseciği (vesiculae encephalicae) oluşur (5,6). Bunlar; ön beyin keseciği (prosensefalon), orta beyin keseciği (mesensefalon) ve arka beyin keseciğidir. (rhombensefalon) (5,6,7) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: 3 beyin keseciği ve bu alanlardan gelişecek yeni bölgeler (8).

Gelişme sürecinde telensefalonu oluşturacak bölgede, başlangıçta büyük bir bölümleşme görülmez. Bir dönüşüm faktörü olan sonic hedgehog (Shh); P2 ve P3 prosomer arasındaki dar aralıkta, dorsal ve ventral talamus arasındaki sınırdaki (çift okla işaret edilen mor alan) üretildiği tespit edilerek, ön beyin gelişimi için sinyal merkezi olarak kabul edilmiştir. Shh embriyonik ön beyinde diyensefalon ve ventral telensefalon boyunca kraniyo-kaudal şeritte sentezlenerek gelişimi teşvik eder (9, 10) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Beyinde görülen sinyal alanları. Ön-orta ve arka beyin bölgelerinin oluşumu: orta ve arka beyin sinyal bölgesi: 1. rhombomer, (MMB: Mesensefalon metensefalon sınırı) Ön ve orta beyin arasındaki sinyal bölgesi: 2. ve 3. prosomer arasındadır (9).

Diğer dönüşüm faktörlerinin de etkisiyle merkezi sinir sisteminin gelişim süreci içerisinde bölümlere ayrılması gerçekleştirilmektedir.

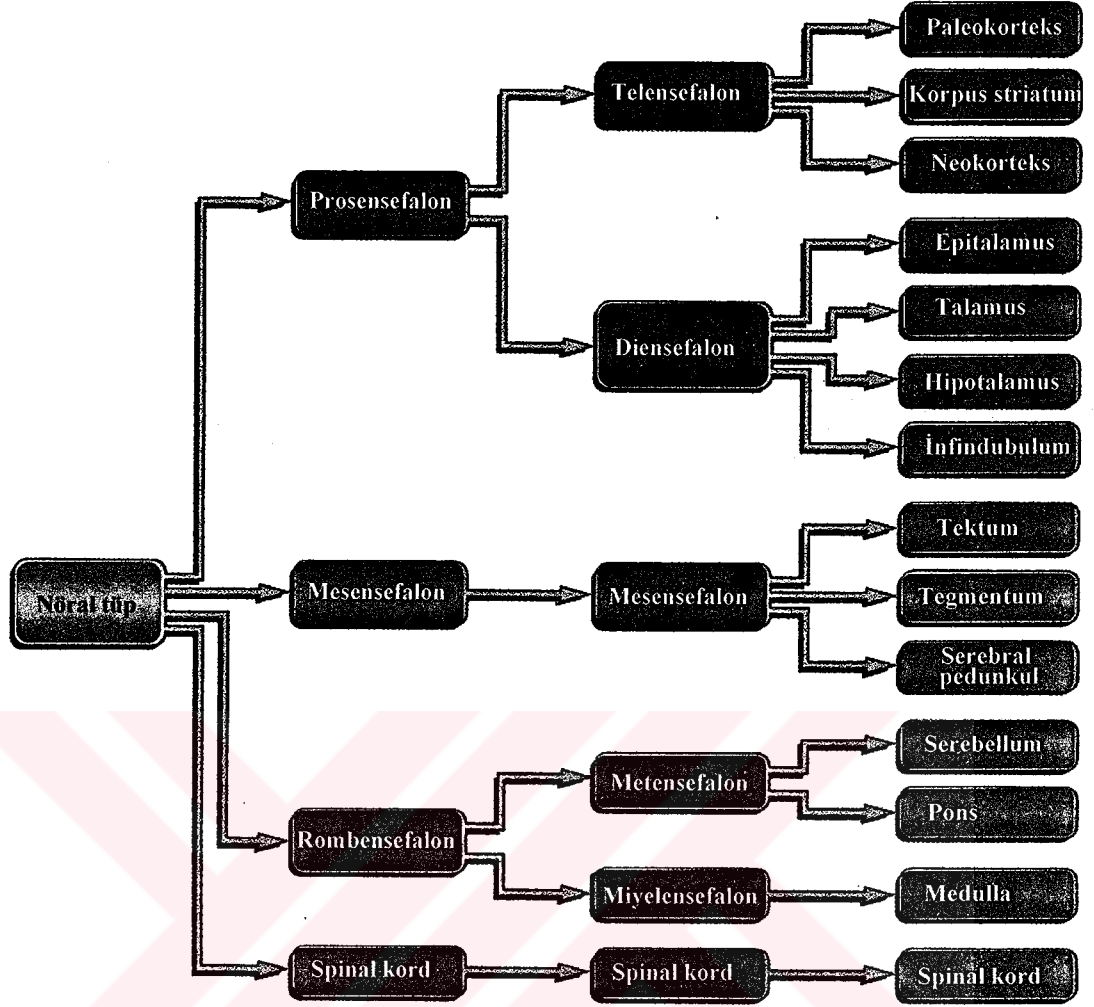
Merkezi sinir sisteminin gelişim basamakları sırasında ilk basamakta nöral tüpün oluşumu ve gelişmesi yer alır. Nöral tüp yapıları oluşuktan sonra, haftalar ilerledikçe merkezi sinir sistemi de kendini yapısal olarak tamamlamaya başlar. 6. haftanın sonunda da tüm merkezi sinir sistemi yapıları belirir. Bu yapılanma kısaca (Şekil 2.3) de özetlenmiştir (11).

3. hafta

4. hafta

5.hafta

6.hafta

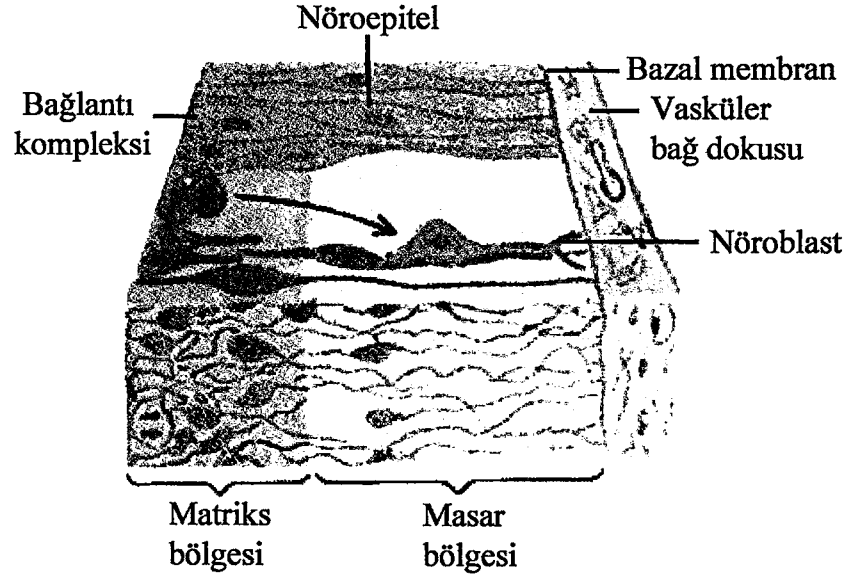


Şekil 2.3: Nöral tüpün oluşumundan itibaren tüm merkezi sinir sisteminin gelişim sırası (11).

Serebral korteks, telensefalon vezikülü tavanından gelişir ve sonunda telensefalik vezikülün bazal bölümünden oluşan bazal gangliyonlar da dahil olmak üzere tüm beyin sapını örter.

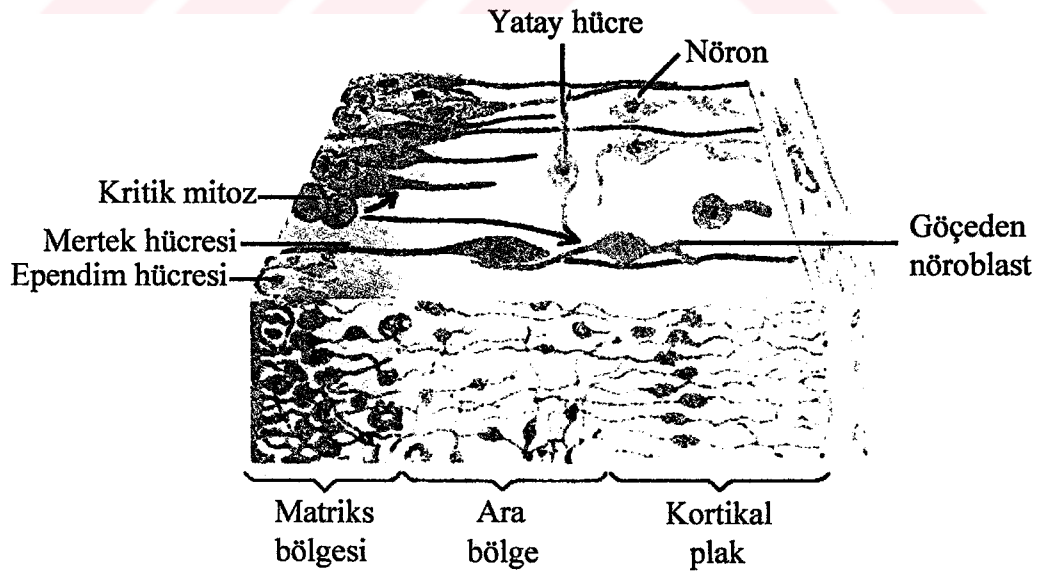
2.2. Nöroepitel ve matriks bölgesi

Serebral vezikülün duvarını hücrelerin tepe bölümü ventrikül boşluğuna yönelik durumda olan yalancı çok katlı epitel ve onun dışında yer alan bir bazal membran oluşturur. Hücre bölünmesi sırasında nöroepitelyal hücrelerin şekli yuvarlaklaşır ve apikale doğru göç ederler. Dolayısıyla mitoz, ventrikül lümenine bakan nöroepitel tarafında gerçekleşmektedir. Çoğalan nöroepitelyal hücreler nöroblastların ve glial hücrelerin ortaya çıktığı bir çoğalma kuşağı (matriks bölgesi) oluştururlar. Mitoz sonrası dönemdeki bazı nöroblastlar, başlangıçta ara bölgede yer alırken marjinal bölgede hücre çekirdeği bulunmaz. Beyin veziküllerini saran damarlı bağ dokusu pia materi oluşturur (12) (Şekil 2.4).



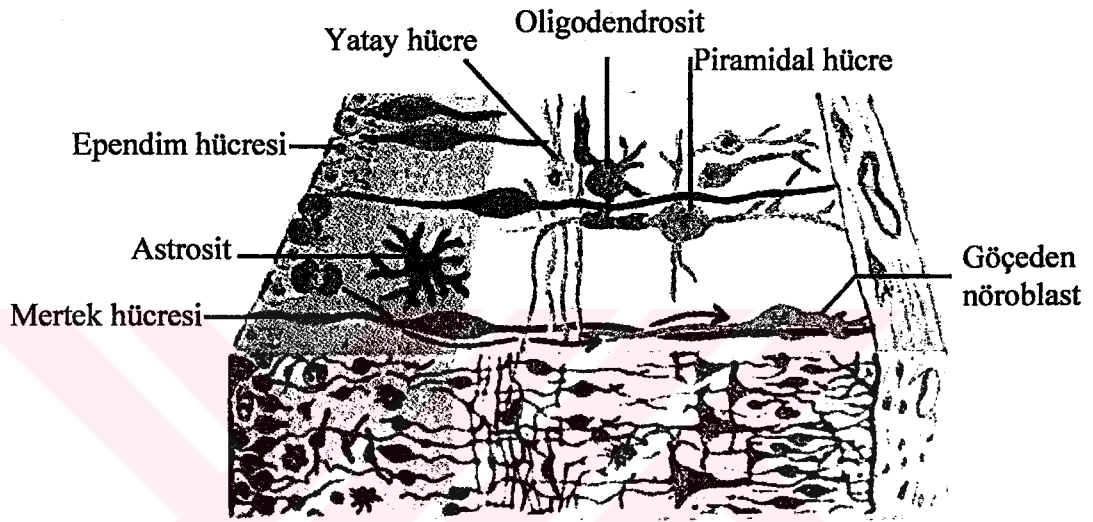
Şekil 2. 4: Nöral epitel ve matriks bölgesini gösteren şematize çizim (12).

Embriyonal dönemin sonunda hücre popülasyonuna en son eklenen postmitotik nöroblastlar, ara bölge ile marjinal bölge arasında toplanarak kortikal plak adı verilen kalın bir hücre tabakası oluştururlar. Bu plak ilk olarak insula bölgesinde ortaya çıkar ve buradan hemisferin iç alanına yayılır. Gebeliğin 12. ve 13. haftalarında ilk sinir lifleri (talamokortikal lifler) talamustan kortikal plağa doğru çıkar ve en ileri derecede farklılaşmış (olgun) nöroblastlarla bağlantı kurarlar (12) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Kortikal plağın gelişimini gösteren şematize çizim (12).

Gebeliğin 13. ila 15. haftaları arasında ilk piramidal hücreler kortikal plağın alt tarafında farklılaşmaktadırlar. Ek olarak nöroblastların göçü ve lif tabakalarının büyümesiyle kortikal plaktan 6 tabakalı beyin korteksi ortaya çıkar. En son eklenen tabakalardaki nöroblastlar matriks bölgesinden farklılaşmış nöronların bulunduğu tabakalar boyunca göç ederek kortikal plağın dış bölgesinde birikirler (içten dışa tabakalanma). Bundan ötürü beyin korteksinin içteki tabakaları, dıştakilerden daha fazla farklılaşmıştır. Gebeliğin 28. haftasında neokorteksde 6 tabaka ayırt edilmektedir (Şekil 2.6).



Şekil2.6: İçten dışa doğru korteksdeki hücre tabakalaşmasının düzeni (12).

Postmitotik nöroblastlar matriks bölgesinden kortikal plağın dış tabakalarına geçerken rehber yapı olarak gelişen medullar tabakanın lif kitlesi arasında gerilmiş durumda bulunan "mertek" hücrelerini ya da ışınal (radiyal) lifleri kullanırlar. Gebeliğin 15. haftasından itibaren yeni bir çoğalma dalgası gerçekleşir. Çoğalma merkezi bu aşamada matriks bölgesinin genişlemesiyle ortaya çıkan subventriküler bölgede yer almaktadır. Matriks bölgesi tükendiğinde artık yeni sinir hücreleri oluşamaz, geriye tek bir tabaka halinde ependim hücreleri kalır ve bu tabaka ventrikülü döşer (12).

Hemisferlerin yüzeye yakın 1.3-4.5 mm kalınlıktaki gri doku (substantia grisea) kitlesi olan korteks serebri, duyu analizi ve sentezin en yüksek merkezi olup, birçok motor, duyu ve psikiyatrik merkezleri içermektedir. Filogenetik olarak, serebral korteksin eski ve yeni bölümleri vardır. Eski bölümleri için arkikorteks (archicortex), paleokorteks (paleocortex); yeni bölümleri için neokorteks (neocortex) terimleri kullanılmaktadır (13).

Eski korteks (allokorteks); olfaktorik lop ve hipokampus kıvrımında bulunur. Geri kalan korteks kısımları telensefalondan daha sonra gelişen neokortekstir (izokorteks) (14). Korteks serebri, nöron gövdelerini,

dendritlerini, aksonların tümü ya da başlangıç kısımlarını, başka bölgelerden gelen sinir liflerini, nörogliya ve kan damarlarını içermektedir. İzokorteks de 60'ın üzerinde nöron tipi tanımlanmakla birlikte temel olarak 3 tip nöron yer almaktadır (15). Bunlar piramidal nöronlar, yıldız hücreleri (granüler hücreler) ve horizontal hücrelerdir (13,16,17). İzokorteks loplara bağlı olarak farklılık göstermekle birlikte Brodmann (13) tarafından tanımlanmış 6 ana tabaka göstermektedir. Bunlar dıştan içe doğru;

- I. Moleküler tabaka (Lamina zonalis)
- II. Dış granüler tabaka (Lamina granularis eksterna)
- III. Piramidal tabaka (Lamina pyramidalis)
- IV. İç granüler tabaka (Lamina granularis interna)
- V. İç piramidal tabaka (Lamina pyramidalis interna)
- VI. Çok yönlü tabaka (Lamina multiformis) olarak adlandırılırlar (13,17,18).

Kortikal (kabuk) nöronların hücre şekilleri çok çeşitlilik göstermektedir. Beyin kabuğunun (korteks) tüm alanlarındaki hücreler genellikle piramit şekilli ve piramide benzemeyen nöronlar olarak 2 ana tipe ayrılmaktadır (13). Tabakaların hücresel mimarisini bu hücrelerin değişik tiplerinin farklı miktarlarda yerleşimi oluşturur. Bu mimari o bölgenin göreviyle sıkı sıkıya ilişkilidir.

2.3. Adezyon Molekülleri

Yaşamsal işlevlerin farklı hücrelerce paylaşılması, uyumlu ve amaca yönelik olarak yerine getirilmesi, çok hücreli bir organizmada bütünlüğün korunmasıyla mümkündür. Bu bütünlük, moleküler düzeyden başlanarak makro düzeyde, gelişmiş bir organizmaya ulaşan mükemmel bir organizasyon olarak karşımıza çıkmaktadır.

Biyolojik objelerde birlikteliği sağlayan moleküler yapıştırıcılar "adezyon molekülleri" olarak adlandırılmaktadır. Son yıllarda çeşitli organizmalarda yapılan araştırmalarla yapısal özellikleri, tipleri ve görevleri belirlenmiştir.

Adezyon molekülleri; hücre yüzeyinde yapısal olarak varolan, bazı sinyallerle hücre yüzeyinde beliren, hücre-hücre ve hücre matriks etkileşmesinde rol alan moleküllerdir (19). Hücre adezyon molekülleri farklı miktar ve tiplerde sinir hücrelerinin yüzeyinde de görülürler. Hücre-hücre etkileşimi, iki hücrenin birbirine yapışmasıyla gerçekleşir; bu bağlamda en iyi yapışma, iki hücre arasındaki bağlantı bölgelerinde "kilit" şeklinde gözlenir. Buna en iyi örnek desmozomlardır. Hücre-hücre yapışması; aynı türde iki hücre arasında, "homofilik" veya iki farklı tip hücre arasında; "heterofilik" bağlanmalarla, hücre dışı bağlayıcı bir molekül aracılığıyla olur. Hücre-matriks yapışmasıdaysa; adezyon molekülleri, hücre ve ekstraselüler matriks (ESM) arasında "bölgesel adezyonlar" oluştururlar (20).

Hücrelerin çoğalması ve göçü gibi önemli hareketlerinin başlatılması endotel ve epitel hücrelerinin seçici bir bariyer oluşturması, hücrelerin birbirlerine ve matrikse bağlanması, adezyon molekülleri aracılığıyla gerçekleştirilmektedir (21,22). Ayrıca bu moleküller, hücre içi ya da hücreler arası sinyal iletiminin düzenlenmesinde de etkin roller üstlenmektedirler. Akson büyümesinde, demetlenmesinde ve aksonların yönelmesinde de önemli roller oynarlar (23). Tüm bunlara ek olarak, hücre iskeleti aracılığıyla hücre hareketinin organizasyonunda önemli görevleri vardır. Hücre adezyon molekülleri ve onların ligandları, gelişim, farklılaşma, göç, tümör oluşumu ve metastazı gibi olayların gelişmesinde etkili, çeşitli kontrol mekanizmalarında rol oynar (24). Adezyon molekülleri ve ekstraselüler matriks arasındaki ilişkilerin; bunlara ilave olarak apoptozda da önemli olduğu gösterilmiştir (25). Integrinler de; invazif ve metastatik tümör hücrelerinde VLA (very late antigen) yüzey ekspresyonu aracılığıyla yayılma basamaklarını engellemektedirler (26,27). Adezyon moleküllerinin immun ve inflamatuvar yanıtın ortaya çıkmasında da önemli görevleri olduğu bilinmektedir. Lökositler bulundukları bölgeyi; bakteri, virus, tümör hücreleri gibi yabancı hücrelerden korumak için, damar dışına çıkıp, ara dokuya geçme ve hedef hücreye yapışıp sitotoksik etkiyle bu hücreyi parçalama işini adezyon molekülleri sayesinde gerçekleştirmektedir (21,22). Bütün bu savunma ve yenilenmeye yönelik mekanizmalarda oynadıkları önemli rollerin yanı sıra, birçok adezyon molekülü merkezi sinir sisteminde, nöral döngünün kurulmasına ve sürdürülmesine de önemli katkılarda bulunmaktadır (28).

2.4. Adezyon Moleküllerinin Sınıflandırılması

Adezyon molekülleri yapısal ve fonksiyonel özellikleri göz önünde tutularak 6 grup altında toplanmaktadır. Gruplar;

- 1- Reseptör protein tirozin fosfatazlar,
- 2- Ig süperaillesi,
- 3- Kaderinler,
- 4- Integrinler,
- 5- Hiyalürinat reseptörleri,
- 6- Selektinler olarak ayrılmaktadır.

Bu gruplandırmaya rağmen grup üyeleri yapı ve görev bakımından benzerlikler gösterirler. Bu ailelerden ilk dört tanesi protein-protein arasındaki etkileşime dayanırken, daha sonrakiler protein-karbonhidrat arasındaki etkileşime sahiptir. Hücre adezyon molekülleri (HAM) bulundukları hücrenin tipine göre de isimlendirilebilmektedirler.

1) Reseptör protein tirozin fosfatazlar: Hücre-matriks kontak alanlarında lokalize olmuş bu moleküller, hücre-hücre yapışmasında etkin reseptörler olarak tanımlanmaktadır (31,32). Reseptör protein tirozin fosfatazlar; katalitik aktiviteye sahiptirler. Hücre bağlayıcı rollerine rağmen, çalışma mekanizması ve fizyolojik özellikleri henüz tam olarak açıklanamamıştır (30).

2) Ig süperailesi: Yapısal olarak Ig'lere benzediği için bu adı almışlardır. Bu aile molekül çeşitliliği bakımından oldukça zengindir. Yapısal olarak bir transmembran kısım ile sitoplazmik kuyruktan meydana gelir. Bağlanabildikleri ligandları çoğunlukla integrinlerdir. Bu ailenin üyelerinin lökosit adezyonunda, nörit büyümesi ve miyelinizasyonunda önemli görevler üstlendiği bildirilmiştir (31). Ig süperailesi; nöral spesifik ve sistemik olmak üzere 2 grup altında toplanmaktadır (32) (Tablo 1).

Ig süperailesi

<u>Nöral Spesifik IgCAM</u>	<u>Sistemik IgCAM</u>
L1CAM (L1 Cell Adhesion Molecule)	ICAM-I,II,III (Intercellular Cell Adhesion Molecule)
NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule)	PECAM (Platelet Cell Adhesion Molecule)
MAG (Myelin Associated Protein)	VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule)
NrCAM (Ng-Related Cell Adhesion Molecule)	BLCAM (CD22, Adhesion Protein)
OBCAM (Acidic lipids)	ALCAM(Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule)
P0 protein	CD44 (Adhesion Protein)
PMP-22 (Peripheral Myelin Protein-22)	MHC (Major Histocompatibility Complex)
	T Hücre Reseptörü

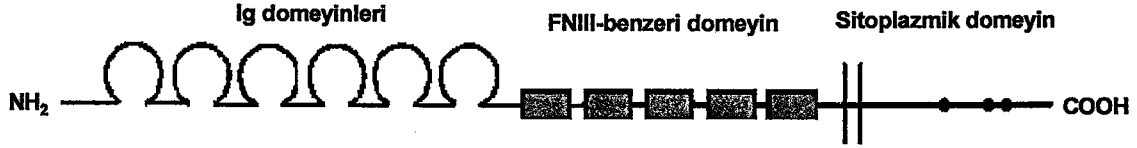
Tablo1: Hücre adezyon moleküllerinden Ig süperailesinin sistemik olarak gruplara ayrılması (31).

L1CAM

Adezyon moleküllerinden L1 ailesi, birçok hayvanın sinir sisteminin gelişim sürecinde gözlemlenmiştir. L1 adezyon molekülü, Ig süperailesinin 200-220kDa ağırlığındaki membran glikoproteinidir (33). L1'in hem ligand hem de bir reseptör gibi davrandığı tespit edilmiştir (34). Nöronal hücre göçü, akson büyümesi, öğrenme ve hafızanın oluşumuyla ilgili nöral işlemlerde önemli roller oynadığı ileri sürülmüştür (35). Balaian ve Moehler (2000) bu molekülün normal nörolojik gelişim için oldukça önemli olduğunu bildirmiştir (36). L1; büyüme konilerinde postmitotik nöronların gelişen uzantılarında belirlenmiş ve bu bölgelerde hücre adezyonu, nörit büyümesi ve akson kümelenmesini yönlendirdiği ifade edilmiştir (37,38,39,40). L1 gelişen sinir sisteminde, aksonal büyüme ve demetlerin oluşumunda gösterilmiştir. Fetal sıçanların serebral neokorteksinde L1'in immunoreaksiyonu talamik afferent aksonlarda lokalizedir (41,42,43).

Nöral adezyon molekülü L1, ilk olarak fare beyinde integral membran proteini olarak belirlenmiş ve 6IgC2 tip domeyini tekrarı, takiben 5 fibronektin tip III domeyini tekrarı, tek transmembran bölgesi ve sitoplazmik domeyinden oluştuğu saptanmıştır (44). Bu ailenin tüm üyeleri benzer yapı planıyla ayrılmaktadırlar. N-terminalinde 6 ekstraselüler Ig domeyini içeren bu

moleküllerin insanda asıl “homofilik” (L1-L1) bağılılık yerinin 2. Ig domeyinde olduğu kaydedilmiştir (23) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: L1CAM molekülünün yapısını gösteren şematize çizim (45).

L1 molekülü farklı laboratuvarlarda keşfedildiği için farklı isimler altında toplanmıştır. Değişik laboratuvarların bulguları toplanmış ve molekülün değişik isimlendirmeleri birarada sunulmuştur. Bu ayırım da (/) işareti farklı isimlendirmeyi, (;) işareti de farklı formlarını ifade etmektedir (45).

Örneğin;

Drosophila: Nöroglial
Çekirge (Schistocerca): Nöroglial
Güve (Manduca): Nöroglial / 3B11
Zebrafish: L1CAM; L2CAM
Tavuk: NgCAM / G4 / 8D9 ; Neurofascin; NrCAM / BRAVO
Fare: Neurofascin ; L1CAM ; NrCAM
Sıçan: Neurofascin / ABGP ; NILE ; NrCAM
İnsan: L1CAM ; Neurofascin ; NrCAM

L1CAM; barsak ve ürogenital bölgedeki epitel hücrelerinde, lökositler, melanosit ve böbrek epitelyal hücrelerinde de (46) görülmesine rağmen en çok gelişmekte olan (47) merkezi sinir sistemi ve periferik sinir sisteminde bulunmuştur (48). L1 immunoreaksiyonu gelişen kortikospinal yollarda gösterilmiştir (49). Bu nedenle kortikospinal yolların oluşumunda L1'in önemli bir rol oynadığı düşünülmüştür (23). Sinir sisteminde oluşan malformasyonların bir çoğunda da L1'in etkisi belirlenmiştir (50,51).

L1'i kodlayan gen Xq28 de X kromozomunun uzun kolunun telomerinin yakınında lokalize olur. İnsanlarda ve farelerde L1 mutasyonları sonucunda kortikospinal yollarda ve korpus kallosumda önemli defektlerin olduğu rapor edilmiştir (34,52,53). MASA sendromu (Mental retardasyon, spastik parafleji, afazi), korpus kallosumda agenez ve disgenez olarak özetlenebilir (54,55,56,57).

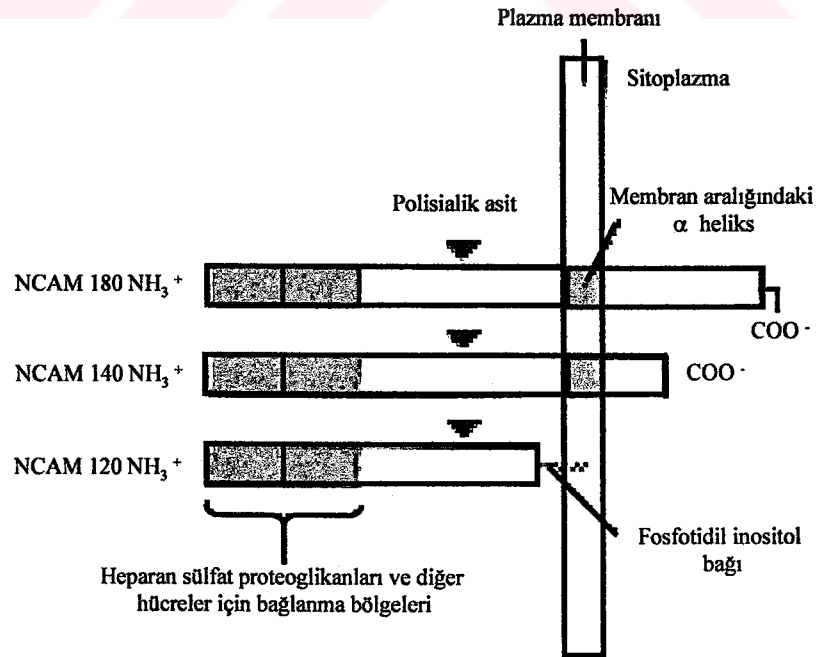
NrCAM; hücre yüzeyindeki tanıma moleküllerinin L1 alt grubu üyelerindendir. Sinir sisteminin gelişimi ve görevini sürdürmesinde rol oynadığı bilinir (58). NrCAM'ın sıçan beyinde yapılan araştırmalarda

gelişimsel düzenlenmede tirozin fosforilasyonunu gerçekleştirdiği belirlenmiştir (59). NrCAM, nörit büyümesini desteklemek için nöronal reseptör olarak görev yapmakta, ayrıca, nöronal reseptörlere bağlanmayla aksonal rehberliği düzenleyebilmektedir (60).

NrCAM molekülü miyelinli aksonların ranvier boğumlarındaki aksonal membranlarda yerleşiktir (61).

NCAM

Membran glikoproteinleri olarak tanımlanmıştır (62). Hücrelerin yapışmasında hem homofilik hem de heterofilik etki göstermektedirler (63,64). NCAM geni insanda 11. kromozom üzerinde yerleşiktir (64). Bu adezyon molekülü de sinir sisteminde sentezlenir ve nöronal gelişim ve yenilenmede etkili olduğu ileri sürülmektedir (65). Nöronal toplanmaya da aracılık eden NCAM, membrana tutunurken glikosil fosfatidil inositolun yardımına ihtiyaç duyar (63,66). 5 Ig benzeri domeyin ve 3 fibronektin tip III tekrarlarına sahip bir yapıdadır. Ca^{2+} dan bağımsız bir hücre adezyon molekülü olup (67) üç farklı formu tanımlanmıştır (NCAM-140, NCAM-180, NCAM-120) (42) (Şekil 2.8). NCAM-180 ve NCAM-140; tek hidrofobik α heliks tarafından membrana bağlanırken NCAM-120; fosfolipid içeren inositol fosfat kompleksi yoluyla tutunduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bunların sitoplazmik domeyinlerinin uzunluklarının da farklılık gösterdiği belirlenmiştir (66). NCAM 180 diğer 2 komponentten daha kolay ayrılır. (NCAM120-NCAM140) NCAM-180; nörit büyümesinde substrat olarak NCAM 140'dan daha az hareket etme yeteneğinde olup (68,69,70), NCAM 180 ve NCAM 140 uzun bir sitoplazmik domeyine sahiptir (71).



Şekil 2.8: NCAM'ın 3 farklı formunun şeması (1).

NCAM'ın; farklı nöron tipleri arasında geniş bir biçimde yayılım gösterdiği ve (72,73,74) nöron-nöron, nöron-astrozit ve astrozit-astrozit adezyonunda (70) aracı olduğu ileri sürülmüştür (55,63,74,75).

Ig süperailesinin bir üyesi olan NCAM, homofilik ilişkiler aracılığıyla adezyon ve hücre-hücre tanınmasında aracıdır (13). Sinir sisteminin gelişiminde, yenilenmesinde, hafıza ve öğrenmeyle ilgili sinaptik değişkenlikte anahtar rol oynadığı düşünülmektedir (42,76). Miktarı ve yayılım özellikleri; hücre göçü, sinaps oluşumu ve hafıza ile ilgili bazı oluşumlarda meydana gelebilecek aksaklıklarla ilişkilendirilmektedir (77). NCAM hücre adezyonu ve sinyal taşınmasına yardımcı olarak gelişen sinir sisteminde nörit büyümesi, demetlenme ve hedefin tanınmasında önemli roller oynamaktadır (78). Merkezi sinir sistemi gelişirken, elektriksel aktiviteler ve miyelinizasyonun düzenlenmesinde adezyon molekülleri önemli rol oynamaktadırlar. NCAM gelişen merkezi sinir sisteminde, büyüyen tüm lif yollarında yaygın olarak bulunmuştur (79). Bu anlamda NCAM akson-gliya hücre ilişkilerini düzenleyen önemli bir molekül olarak tanımlanabilir. NCAM'ın sadece göç, aksonal büyüme gibi yapısal değişiklikleri gerçekleştirmekle kalmaz ayrıca, ortaya çıkan değişiklikleri de yönlendirdiği ileri sürülmektedir (80). NCAM; nöral olmayan birçok dokuda da gelişim sırasında rol oynayan basamaklarda geçici olarak üretilmektedir (67).

"Siyalik asit" tarafından NCAM'lar uzun zincirler halinde düzenlenir ve böylece negatif olarak şeker yüklenirler (81). Yetişkin dokularda sadece %13 kadarken embriyonik dokularda "polisialik asit", total NCAM 'ın %25'inden daha fazlasını oluşturduğu tespit edilmiştir (42,82,83,84). NCAM'ın bu polisialize formu, nörit büyümesi için de önemlidir (79).

Güçlü hücre-hücre adezyonlarının NCAM'ın glikolizasyonu yoluyla sağlandığı ayrıca, N terminali yakınındaki heparan sülfat proteoglikanlarını bağlayarak hücre-hücre adezyonunu gerçekleştirdikleri saptanmıştır (66). Ayrıca; yetişkin formundan daha az adeziv özellik gösterdiği belirlenmiştir (75).

ICAM

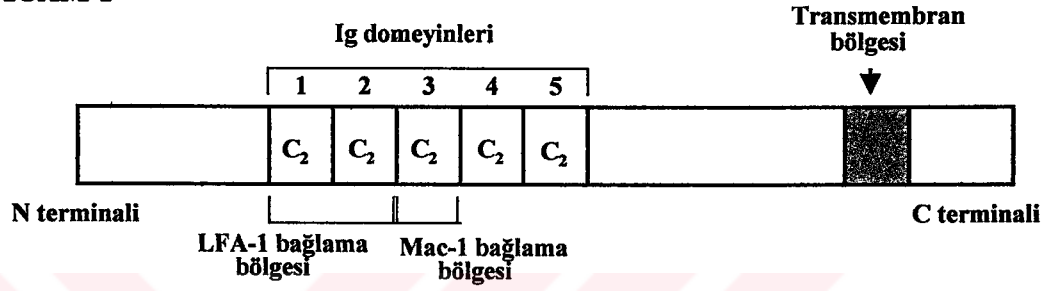
ICAM-1damar endotelyal hücreleri ve lökositler tarafından üretilen Ig süper ailesinin bir üyesidir. ICAM-1'in fonksiyonu; antijen sunan hücreler ve T hücreleri arasındaki ilişkilerde önemli bir sinyal mekanizmasını oluşturmaktadır. Bu nedenle ICAM-1'in karşıt ligandı LFA-1 ile ilişkisi allerjik astım, arthritıs, nefritis ve pnömoni gibi çok sayıda inflamatuvar hastalıklarda önemlidir (85,86).

ICAM-2 ve ICAM-1'in LFA-1 bağlanma bölgesi ortaktır. Ig domeyinlerinin sayısı farklılık göstermektedir (87).

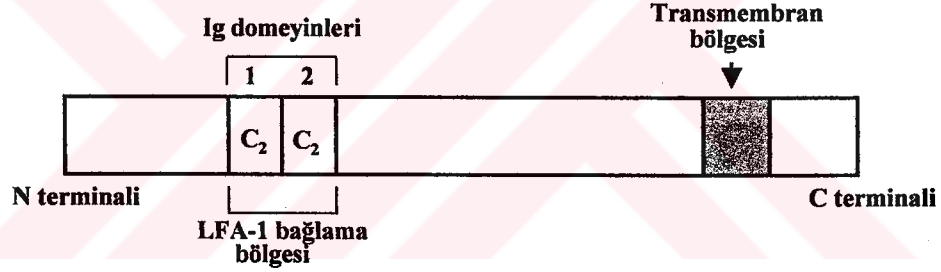
ICAM-III'e CD50 de denilmektedir. 120 kDa ağırlığındaki molekülün (87) ergin formu 518 aminoasit uzunlukta olup bunun 456 aminoasitlik kısmı ekstraselüler segmentte, 25 aminoasitlik kısmı transmembran bölgesinde, 37 aminoasitlik kısmı ise sitoplazmik kısımda bulunur. İntrinsik tirozin kinaz aktivitesi olmamasına rağmen, sitoplazmik tirozin kinazlarla bağlantı kurabilme yeteneğine sahiptirler (88) (Şekil 2. 9).

İnsan ICAM-1, ICAM-2 ve ICAM-3 Yapıları

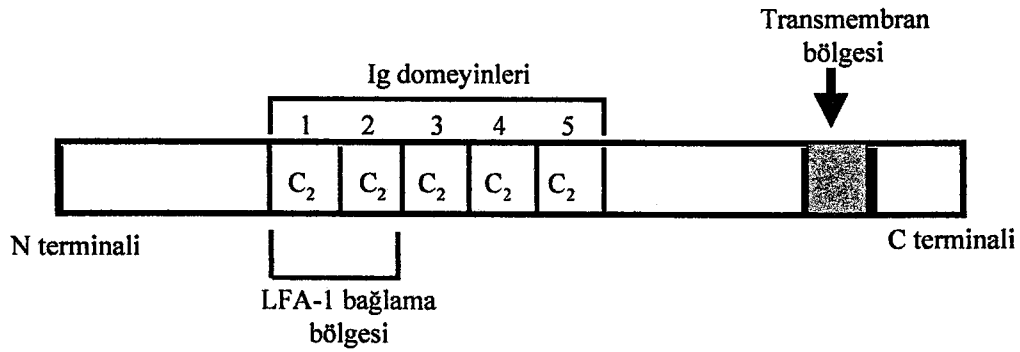
A) ICAM-1



B) ICAM-2



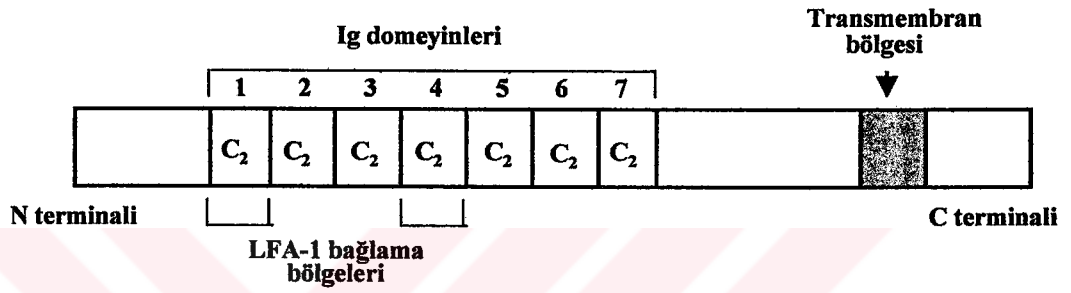
C) ICAM-3



Şekil 2.9: ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3'ün moleküler yapıları. ICAM-1; 5 Ig domeyininin meydana gelmektedir. (89).

Ig süperailesinin diğfer ferdi VCAM molekülüdür ve endotel hücrelerinde gözlenir. Uyarılmamış endotelde yapısal olarak bulunmamasına karşın IL-1, IL-4 ve TNF α gibi sitokinlerin uyarısıyla 2-4 saat sonra hücre yüzeyinde belirir (90). VCAM molekülüleri, damar endoteliyal duvarında lökositlerin göçü ve adezyonunu sağlarlar (91). ICAM-1 ve VCAM-1'in her ikisi de immün yanıt ve iltihap durumlarında hayati rol oynarlar (90). Yapı olarak iki farklı domeyin formu bulunur. 7 domeyimli formunda 1 ve 4. domeyinler ligand bağlama bölgesini gösterir (Şekil 2.10).

İnsan VCAM-1 Yapısı (7 domeyin formu)

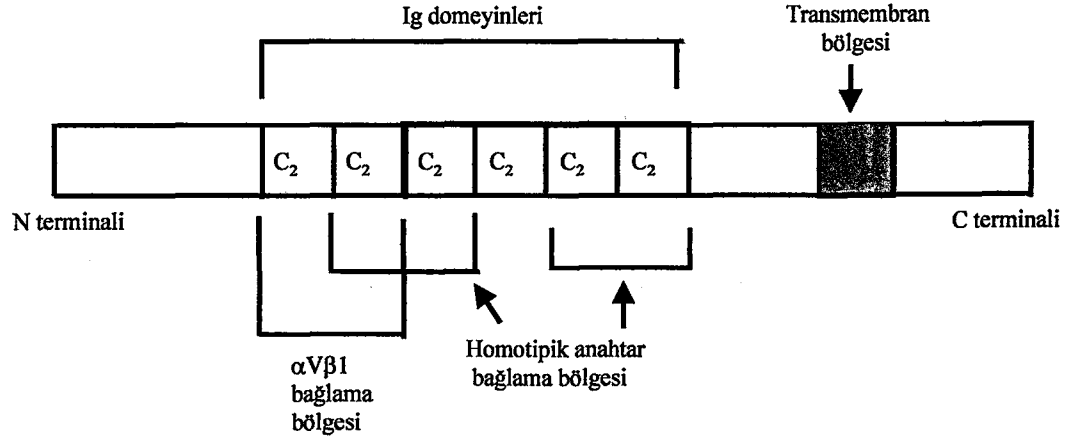


Şekil 2.10: VCAM'ın moleküler yapısını gösteren şematik çizim (89).

PECAM

PECAM molekülü endoCAM olarak da adlandırılmasının yanısıra insan CD31'i olarak da isimlendirilmektedir. 130kDa ağırlığındaki (92) molekül 711 aminoasit uzunluğunda olup, 574 aminoasitlik kısmı ekstraselüler bölgeyi, 19 aminoasitlik kısmı transmembran segmentini ve 118 aminoasitlik kısmı da sitoplazmik bölgeyi oluşturmaktadır. Ekstraselüler bölgenin en çarpıcı özelliği, Ig süperailesinin C2 bölgelerine benzerlik gösteren 6 adet Ig homoloğu üniti bulunmasıdır (74,93) (Şekil 2.11).

İnsan PECAM Yapısı



Şekil 2.11: Ig domeyninin ilk iki domeynini αVβ1 için bağlanma bölgesini oluştururken 2,3 ve 5,6. domeynleri de homotipik bağlanma bölgesini oluşturmaktadır (89).

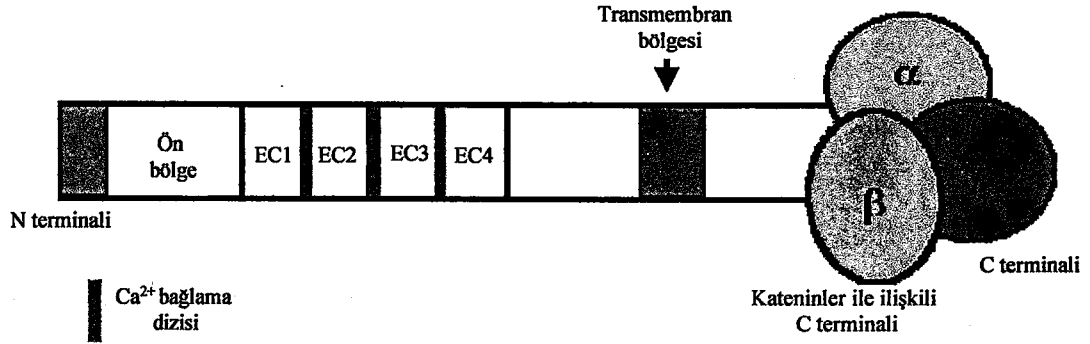
Endotelial hücrelerde ve interselüler bağlantılarda bulunması nedeniyle tip-1 transmembran glikoproteini olarak bilinirler ve lökositlerin endotel içinden göçünde rol oynarlar (94). Ayrıca, hematopoiez ve damar gelişiminde de önemli rolleri belirlenmiştir (95).

3- Kaderinler

Adezyon moleküllerinin diğer ailesi kaderinler; yapılarında bulundurdıkları Ca^{+2} dan dolayı bu adı alırlar (63,82). Hem adezyon hem de Ca^{+2} bağlayıcı bölge içerirler (96,97). Birçok organ ve dokuların morfogenezinin düzenlenmesinde bilinen hücre yüzey glikoproteinleridir.

Kaderinler; kateninlerle ilişkili olan sitoplazmik kuyruk ve 5 tane tekrar eden kaderini içeren ekstraselüler domeyinden oluşmaktadırlar (98). Bu ekstraselüler domeyin; 110 aminoasitlik kaderin tekrarlarını içeren kalsiyum bağlayıcı domeyindir (99). Kateninler aracılığıyla aktin sitoskeletine bağlanırlar. α-katenin ile ilişkili olan plakoglobun ya da β-katenin bağlayan kaderinin 70 aa'lık C terminalleri oldukça iyi korunur. Bu nedenle de aktin sitoskeletine sıkıca bağlanabilirler (82,98) (Şekil 2.12).

İnsan Kaderin Yapısı

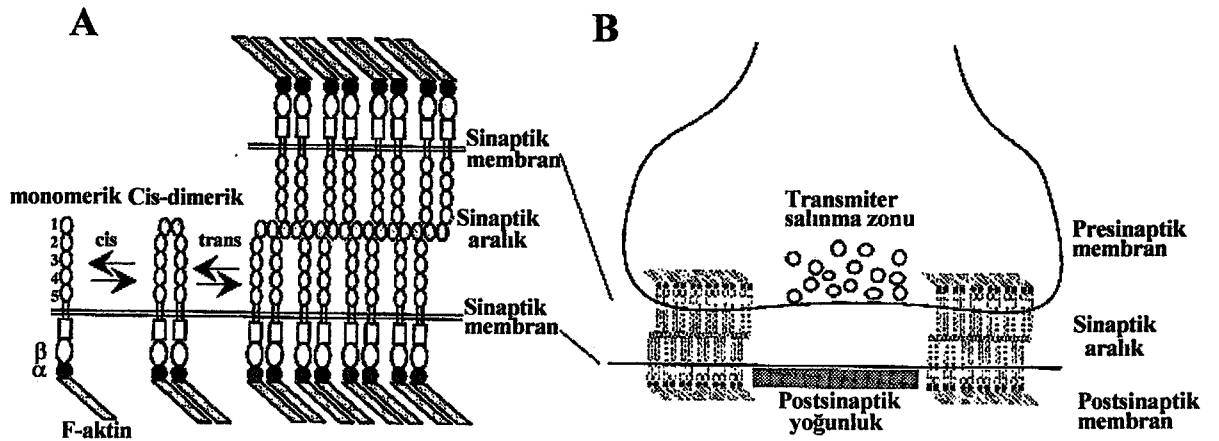


Şekil 2.12: Kaderinlerde 4 bölge bulunur ve bunların arasında da Ca^{2+} için bağlanma alanları yer almaktadır. Transmembran bölgesinin sonunda 3 farklı yapı yer alır. Bunlar kateninlerin bağlantı kurduğu alt birimlerdir (89).

Omurgalıların beyinde 10'dan fazla kaderin tipinin varlığı tespit edilmiştir. Moleküler yapıya bağlı olarak kaderinler; klasik kaderinler (tip I ve tip II), protokaderinler ve kaderinlerin diğer tipleri olarak gruplandırılırlar (98,100). Kaderinler, sitoplazmik membranda monomerik ve dimerik formlarda bulunabilirler. Kaderinlerin 2 çeşit konfigürasyonu bulunmaktadır.

- Cis konfigürasyonu,
- Trans konfigürasyonu.

Cis konfigürasyonunda; moleküller lateral olarak birbirleriyle ilişkidedirler. Trans konfigürasyonunda ise; cis dimerleri bir diğer hücrenin membranındaki dimerlerle bağlanmasıyla bir fermuar gibi kapanarak 2 molekülün adezyonu gerçekleştirilir (101,102,103,104) (Şekil 2.13).



Şekil 2.13: A) Klasik kaderin molekülleri ve onların ilişkilerini gösteren şekil. B) Sinaptik aralıkta pre ve postsinaptik membranlar arasında kaderin moleküllerinin tutunmasıyla ilk

bağlantı bölgesi kurulmuş olur. Transmitter salınma zonunu çevreleyerek iki nöronun birbirine tutunması gerçekleşmiş olur (99).

Kaderinlerin sitoplazmik domeyinleri katenin denen protein grubuyla ilişkidir. Kateninler de, sitoiskelet ile bağlantıların kurulmasında ve sinyal transdüksiyonunda rol oynarlar (105). Sitoplazmada kaderinler direk olarak β -katenine bağlanırlar. β -katenin de α -katenin ile ilişkidir ve bu kompleks de aktin sitoiskeletine bağlanmaktadır. Bu şekilde sıkı bir adezyon gerçekleşmektedir. Membranın proksimali başka bir kateninle ilişkide olup, P120^{ctn}; kaderinlerin lateral olarak bağlanmasını sağlamaktadır (98).

Doku farklılaşmasında, özellikle de embriyonun preimplantasyonunda önemli rolleri olduğu ileri sürülmektedir. Kaderinler göç, ölüm, hücre çoğalması gibi temel hücresel işlemlerde ve sinir sisteminde de özellikle nörit büyümesinde önemli rolleri vardır. Birçok beyin bölgesinde özellikle de gri madde alanlarında farklı kaderinlerin ekspresyonları tesbit edilmiştir (106). Embriyo henüz morulla safhasındayken, blastomerler arasında bağlantının kurulması ve hücresel bütünlük, kaderinler sayesinde gerçekleşir. Bu olayda özellikle E kaderin etkindir. Beyin gelişiminin erken basamaklarında bölümlere ayrılmaya başladığında kaderinleri de üretmeye başlar. Merkezi sinir sisteminde birçok farklı noktada kaderin üretimi gösterilmiş olup; rombomerlerin gelişimi sırasında bazı dönüşüm faktörlerinin de etkisiyle kaderinlerin üretimi görülmeye başlar (107). Kaderinlerin sınırlanmış ve farklılaşmış olarak ilk bulundukları yerler lif yolları olarak görülmüştür. Daha sonrada nöral dolaşım, beyin çekirdekleri ve sinapslarda bulunmuşlardır (99,108). Kaderinler sadece merkezi sinir sisteminin bölümlere ayrılmasında değil aynı zamanda nöral krista hücrelerinin göçünde de rol oynamaktadırlar (100).

Bulundukları bölgelere göre kaderinler 5 farklı gruba ayrılmaktadırlar.

- 1- E-kaderin,
- 2- N-kaderin,
- 3- P-kaderin,
- 4- R-kaderin,
- 5- M-kaderin.

1-E kaderin (epitelyal); Uvomorulin de denilen E kaderin; embriyonun preimplantasyonu döneminde morulla ve blastosist, hücre-hücre bağlanma bölgelerinde yoğun olarak izlenmiş ve blastosistin kompaksiyonunu sağladığı belirtilmiştir (63). Epitel bütünlüğünü sağlayan interselüler bir yapıştırıcı olarak işlev gördüğü, zonula aderenslerde yoğun olarak bulunduğu ve kateninlerin bağlandığı sitoplazmik bölgeleriyle aktin filamentlerine yapıştığı ve immunoelektron mikroskopik analizlerle E kaderinin; birbirleriyle kontağı bulunan her bir demet içindeki nöritlerin yüzeyinde ve demetlenmiş duysal nöronların belli popülasyonları arasındaki kontak alanlarında lokalize olduğu tespit edilmiştir (109).

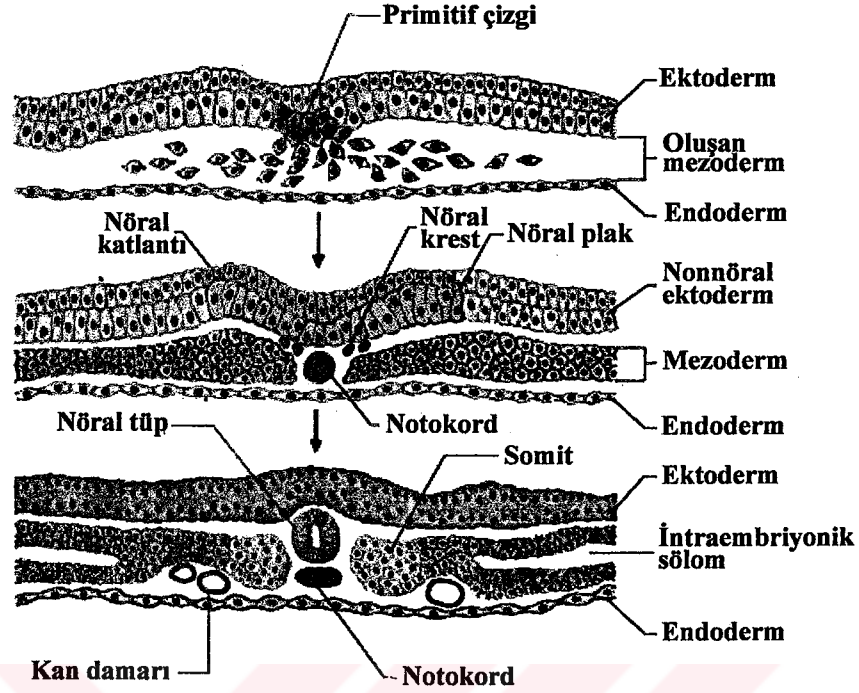
2-N kaderin (nöral); Sinir sistemi, kalp, akciğer, lens, embriyonik mezoderm ve nöral ektoderimde bulunur (63). Sağ-sol asimetrisinin kurulmasında somitlerin morfogenezinde önemli olduğu bildirilmiştir (110,111). N-kaderin stabil hücre adezyonunu destekleyebilen ve aksonal büyüme ve hücre göçü gibi aktivasyonları stimüle edebilen bir molekül olarak tanımlanmaktadır. Kaderin hücreye aktin sitoiskeleti aracılığıyla tutunmaktadır. Aracı moleküller ise katenin ailesine aittir. P 120^{cas}, α -katenin ve β -katenini içeren kompleks moleküller intraselüler domeyinin bağlanmasıyla ilişkilidirler. Letorneau (1990) ve Shibuya (1995) tarafından N kaderinin büyüme konilerinde bulunduğu gösterilmiştir. N kaderin, tavukta, yenilenen periferik sinirin akson-akson kontak alanlarında ve eksitator, inhibitör sinaptik alanlarda toplandıkları tespit edilmiştir (112). Farklılaşmadan sonra hem nöronlar hem de gliyal hücreler tarafından korunmaktadır ve nöral indüksiyon sırasında sinir sisteminde yoğun olarak bulunur (82).

3- P kaderin (plasental); Plazenta, epidermis, trofoblast, kalp, akciğer, sindirim kanalı hücrelerinde bulunur .

4-R kaderin (retinal); Retinal nöronlarda ve gliya hücrelerinde bulunur.

5-M kaderin (kas); Miyoblast ve iskelet kası hücrelerinde bulunur.

Nöral tüpün oluşumu ve nöralizasyon sırasında adezyon moleküllerinden kaderinlerin önemli roller üstlendikleri biliniyor. Bunların değişen üretim düzeyleri sayesinde nöralizasyon tamamlanmaktadır. Embriyonun ektoderm ve endoderm tabakaları başlangıçta E kaderin içerirken, orta bölgede E kaderini kaybeden hücrelerin mezoderme göç etmeye başladıkları ileri sürülmüştür (113). Nöroektodermal hücrelerde E kaderin üretimi azalır ve bu hücreler N kaderin sentezlemeye başlarlar. Ektodermal hücreler de E ve P kaderini sentezlerler. Notokord yapısında ise, hem P hem de N kaderin sentezlenir. Mezodermal hücrelerde, N kaderin üretimi somitlerin merkezine doğru yoğunlaşır. Kaderinlerin bu şekildeki üretimlerinin değişimiyle nöralizasyonun tamamlandığı bildirilmiştir (66) (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: Nörolasyon sırasında kaderin varlığının değişimi. Gri: E kaderin üretimi (+), Gri: Kaderin üretimi yok, Mavi: E-kaderin üretimi düşerken yerine N kaderin üretimi görülmeye başlar, Turuncu: hem E hemde P kaderin üretimi var, Mor: P ve N kaderin üretimi var, Mavi: somit içerisinde de N kaderin üretimi görülmektedir (1).

İki nöronun birbiriyle bağlantı kurduğu ve uyarının bir nörondan diğerine geçirildiği ya da inhibe edildiği yerler olan sinapslarda adezyon molekülleri ailesinden kaderinleri görmekteyiz. Sinaptogenez basamakları adezyon molekülleri sayesinde ilerlemektedir. Sinaptogenez esnasında ortaya çıkacak olası fonksiyonlar 3 farklı adezyon sistemiyle belirlenmiştir.

- Kaderin/katenin sistemi (N-Kaderin, α N-katenin, β -katenin)
- CNR sistemi (Kaderin related neuronal receptors system)
- β -Nöroksin / Nöroligin sistemi (114).

İki nöronun birbiriyle bağlantı kurduğu yerde ilk bağlantıyı sağlayan yapılar, ortamda bulunan kaderin molekülleridirler. Kaderin moleküllerinin birbirleriyle olan trans pozisyonları sayesinde nörotransmitterin salınacağı aktif zon bölgesinin sınırları çizilir (99). Kaderinler bir başka kaderinle N terminallerindeki birinci ekstraselüler domeyinleri aracılığıyla homofilik bağlatılar kurarlar. Hücre içinde katenin moleküllerine ve kateninlerin de aktin sitoiskeletine bağlanmasıyla oluşan kompleks yapı, iki nöron arasındaki ayrılmaz bir bütünlüğü meydana getirmektedir. Bunun sayesinde iki nöron arasında salınan nörotransmitterin aktif zonda salınması ve buradaki moleküler mekanizmaları başlatması sağlanır. İkinci sistem olan CNR sistemi de; aktif zon bölgesinde uyarının salındığı alanda bazı moleküler mekanizmaların başlatılmasında önemlidir (115). 3. sistem olan β -Nöroksin /

Nöroligin sisteminde pre ve postsinaptik nöronlar arasında bağlantı kurulur. Nörotransmitterin salınacağı zon olan aktif zon bölgesinde, moleküler bazı basamakların işlemesine yardımcı olurlar. Bunlar aracılığıyla uyarının bir nörondan diğerine geçişi rahatlıkla gerçekleşmektedir (115).

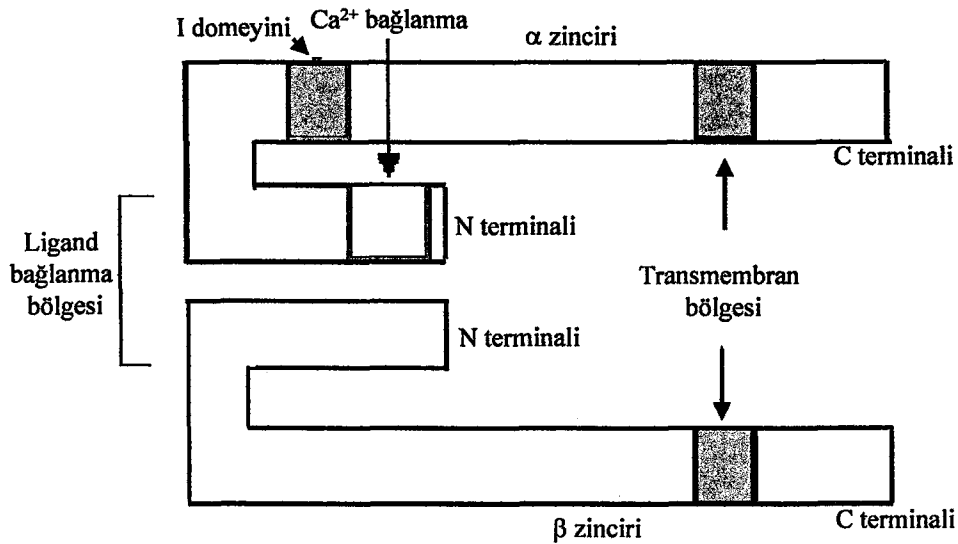
Bütün bu bilgilerden, merkezi sinir sisteminde kaderinlerin akson büyümesinde, demetlenmesinde, hedef hücrenin tanınmasında, sinaptik hücre adezyonunda, sinaptogenez basamakları sırasında önemli roller oynadıkları görülmektedir.

4- İntegrinler

İntegrinler transmembran adezyon molekülleri olup α ve β olmak üzere 2 alt birimi vardır. 14 α ve 8 β alt birimi tanımlanmış olup toplam 22 "heterodimerik" birimden oluşurlar (116,26) (Şekil 2.15). Bu iki alt birim birbirlerine "non kovalent" bağlarla bağlıdır. İntegrin-ligand bağlanmasında, Ca^{+2} ve Mg^{+2} 'a ihtiyaç duyulmaktadır (26).

Bir integrin heterodimerinin COOH uçları hücre iskelet proteinlerinden tallin ve α aktininle bağlanırken, NH_2 uçları da ekstraselüler matriks (ESM) proteinlerine ve hücrelere bağlanırlar. Bağlanmanın olabilmesi için, minimal sayıda düşük afiniteli integrinin belli bir yerde, yeterli afiniteyi oluşturabilecek şekilde kümelenmiş olması gerekmektedir. Bölgesel adezyon başta integrinler olmak üzere protein kinaz, tensin, α aktinin, vinkulin, tallin ve sitoplazmik plak proteinleriyle ilişkilidir. Bu proteinler de kontak yüzeyine aktin filamentlerinin yapışmasını sağlarlar (66).

İnsan Temel İntegrin Yapısı



Şekil 2.15: İntegrinler iki farklı C ve N terminaline sahiptirler. Bu iki yapının birbiriyle bağlanmasından oluşmuşlardır. Buna bağlı olarak da 2 transmembran bölgesi bulunur iki farklı ligand bağlama alanına da sahiptirler (89).

İntegrinler; interselüler ligantlar (tallin, α aktinin) yanında laminin, fibronektin, kollajen tip I, II gibi ortak ligandlarla ve spesifik Ig süperailleleriyle bağlantı kurabilirler. Adezyon moleküllerinin, bazı otoimmün hastalıklar ve önemli infeksiyonlarda rol oynadıkları gösterilmiştir. Özellikle; hücrel göç sırasında $\beta 2$ integrinlerin rolü, insanlarda LAD-1 (Leukocyte adhesion deficiency) sendromu tarafından gösterilmiştir. $\beta 2$ integrinler; tüm lenfositlerde ekspresese edilirler. Destek hücrelerinin de endotelial hücrelere daha sıkı bağlanmasını sağlarlar. Bu nedenle de; hücrel göç de önemli rollere sahiptirler (117).

5- Hiyalürinat reseptörleri

Ekstraselüler matrikste bulunan bir sakkarit komponentidir. Tümör gelişimi ve iltihaplı durumlar gibi çeşitli patolojilerde önemli roller oynadığına inanılmaktadır. Kıkırdak, sinoviyal sıvılar gibi karakteristik olarak az hücreli jeller içinde izlenirler. Embriyogenez ve hücre büyümesinde etkin rol oynadıkları bildirilmiştir (31).

6- Selektinler

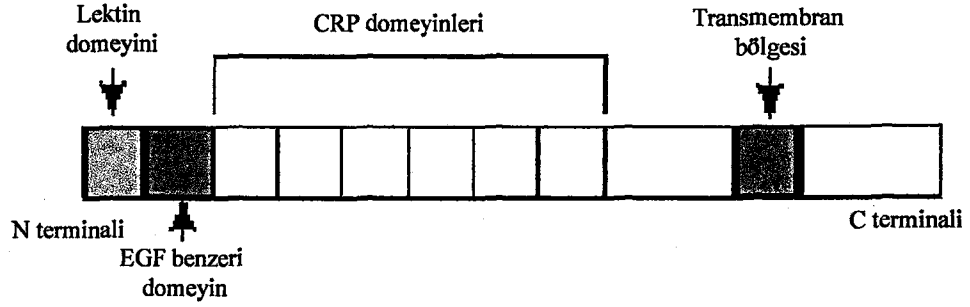
Molekülün N terminalinde " lektin" benzeri bir yapı vardır. Bu yüzden bu gruba selektinler denilmektedir. Endotel hücresi ve lökositlerin yüzeyinde bulunur ve heterofilik etkileşimler gösterirler. Bağlanmayı gerçekleştirdikleri ligandları, sialyl Lewis-X ve SleA gibi sialize glikanlardır (118). Lökositlerin endotel hücrelerine adezyonunu ilk başlatan moleküller selektinlerdir. Bunu takiben damar duvarına gerçek yapışma basamağını sağlayanlar ise integrinlerle Ig süper ailesinin üyelerinden olan ICAM'ın etkileşmesidir.

Selektinler, inflamasyon bölgesinde lökositlerin damar endoteline yapışmasında ve lökositlerin geçişinden önce yavaşlayıp yuvarlanma hareketi yapmalarında görevli moleküllerdir. Yuvarlanmadan sonra ortamda sitokin ve lipid moleküllerinin artması sonucu, aktive olan inflamatuvar hücrenin üzerindeki L selektinler, bu aktivasyonu takiben dökülür ve bunların yerine daha kuvveli bağlanmayı sağlayan integrin grubu adezyon molekülleri ortaya çıkar. Böylece lökositler inflamatuvar hücreye tutunup onu etkisizleştirirler (119).

Selektinlerin 3 alt grubu tanımlanmıştır.

1-E selektin (Endotel lökosit adezyon molekülü); Endotelyumda bulunur, iltihap reaksiyonlarında mediyatörler tarafından upregüle edilebilirler. Bakteri endotoksini ve IL-1, $TNF\alpha$ gibi sitokinlerin uyarısıyla endotel hücresinde 30 dakika içinde belirmeye başlar ve 2-4 saatte zirveye ulaşırlar. 6 tane CRP (complement regulatory proteins) domeyini bulunur. İlk domeyin lektin domeyini iken ikincisi EGF benzeri domeyindir (Şekil 2.16).

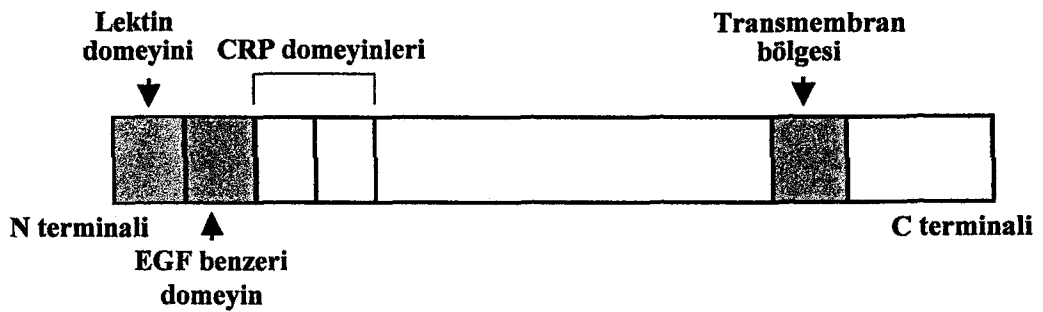
İnsan E-Selektin Yapısı



Şekil 2.16: E selektin yapısını gösteren şematik çizim (89).

2- L selektin (Lektin adezyon molekülü); Eozinofil, nötrofil ve lenfosit üzerinde bulunur. İnflamasyon alanlarında nötrofillerin toplanmasında önemli bir role sahiptirler (120). L Selektin (LAM-1, LECAM-1, LECCAM-1, mLHR (fare), gp⁹⁰MEL (fare), gp¹⁰⁰MEL (fare), gp¹¹⁰MEL (fare), CD62L, ..) isimleriyle de refere edilmektedir. L selektin; NH₂-terminal lektin tip C domeyini, EGF benzeri domeyin, 2 komplement kontrol domeyini, 15 aminoasitlik kalıntı alan, transmembran sırası ve kısa sitoplazmik bölge içerir (29,94) (Şekil 2.17). İnsan ve murine L selektinlerinin yapısı, %77 aynı aminoasit düzeyi ve %79 aynı nükleotid düzeyi gösterirler (94).

İnsan L- Selektin Yapısı



Şekil 2.17: L selektinin yapısını gösteren şematik çizim (89).

Endotelial hücreler üzerinde L selektinin 3 ligand formu belirlenmiştir.

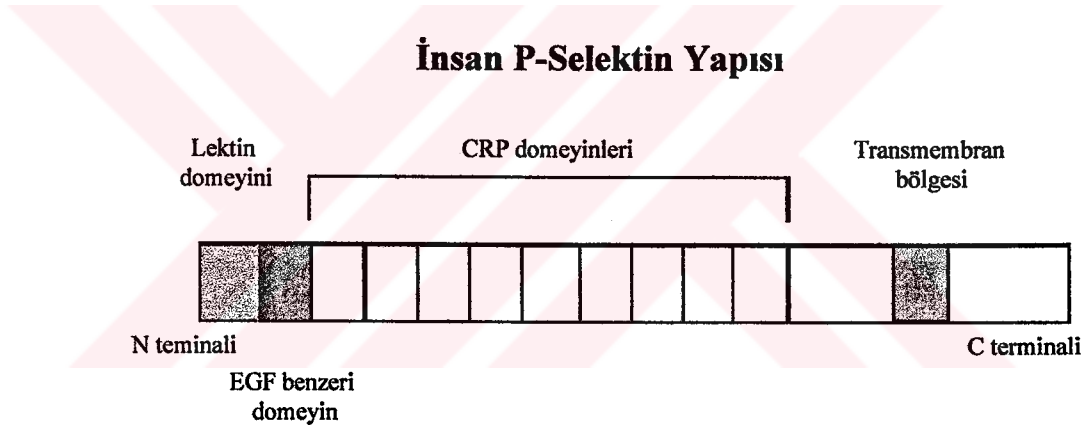
- a) GlyCAM: Yüksek endotelial venüllerin mezenterik lenf düğümü ve

diğer birçok yerde tanımlanır (121).

b) sgp90: Bu ligand CD34 olarak da tanımlanmaktadır. Bu sialomusin benzeri glikoprotein, sıklıkla çok potansiyelli kök hücrelerden arındırmak için yüzey belirleyicisi olarak kullanılmaktadır. Lenfoid olmayan dokularda da geniş bir yayılım göstermektedirler (122).

c) MadCAM-1; Yüksek endotelial epitelde mukozal lenfatik düğüm içinde bulunur.

3- P selektin; GMP-140, LECAM-3, PADGEM, CD62, CD62P olarak da adlandırılırlar. Bir yüzey glikoproteinidir ve doku içinde lenfositlerin göçünde kritik rol oynamaktadırlar. Uyarılmamış endotel içerisinde, Weibel Palade cisimcikleri denen granüllerde bulunurlar. Histamin, PAF gibi inflamatuvar mediyatörlerle endotel hücresinin uyarılmasını takiben hücre yüzeyinde birkaç dakika içinde belirirler (123). P selektin de diğer selektinlerden farklı olarak 9 CRP domeyini yer almaktadır (Şekil 2.18).



Şekil 2.18: P selektinde 9 CRP domeyini bulunur. Diğer selektin tipleriyle benzer moleküler yapıya sahiptir (89).

P ve L selektin ilk etkileşimde zayıf bir bağlantı oluştururlar. Güçlü bağlantılar ise E selektin'i içerir ve iltihaplı bölgede, lenfoid doku içinde kan damarları boyunca lökosit rehberlik eder (123). P selektin, plazma içinde normal şartlar da ng/ml konsantrasyonlarında bulunur. Dolaşan P selektin, doğal P selektinden biraz daha küçük görülür.

Hücre adezyonu; invazyon, metastaz ve karsinogenezin basamaklarının yanı sıra artan proliferasyonun erken basamaklarında da rol oynar (26).

MATERYAL VE METOD

3.1. Deneyin Hazırlanışı

Deney için 3 trimestere ait düşük materyalleri toplandı. Bu materyaller numaralandırılarak deney grupları oluşturuldu. Her bir deney grubunda, alınan düşük materyallerine ait bilgiler değerlendirildi. Annenin son menstruasyon tarihi dikkate alınarak fetusun yaşı belirlendi. Bu arada bebekte herhangi bir merkezi sinir sistemi defekti olup olmadığı da dikkate alındı.

Düşük sonrası, abortus hemen %10'luk formalin içeren kavanozlara konuldu. Vakit kaybetmeden bu kavanozlarda getirilen abortus materyali için hemen işlemlere başlandı. Henüz gelişim periyodunda olduğu için fetusun beyni müdahale edilemeyecek kadar yumuşaktı. Morfolojisine zarar vermeden serebral korteksi çıkartabilmek için, ilk olarak frontalden bir kesit ve bunu dik olarak kesen ve fissura longitudinalis'ten ilerleyen 2. bir kesit düzlemi daha oluşturuldu. Bu şekilde hemisferlere zarar vermeden kafatasının bu erken dönemdeki kıkırdak yapısı kaldırıldı. Kıkırdak kafatası yapısının kaldırılmasıyla; beynin büyük bir bölümü ortaya çıkarılmış oldu. Açılan bu aralıktan sıvı nitrojen dökülerek, beynin hemen donması sağlandı. Bu aşamadan sonra hızla hareket ederek dorsosentral bölgeden örnekler alındı. Alınan örnekler, nötral formaline konuldu; yaklaşık 1 gün süreyle fiksasyon için bekletildikten sonra, akar suda yıkandı ve alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyonu sağlandı. En son olarak ksilol ile şeffaflaştırıldı ve 58-60°C'lik sert parafine gömüldü. Bloklardan 5-7µm kalınlıkta kesitler alındı ve immunohistokimyasal protokolu uygulandı.

Elde ettiğimiz abortus materyalleri;
1 trimester: 3 örnek: Üçü de 12 haftalıktı.
2 trimester: 14 örnek: 16, 18, 20, 22, 23 haftalıktı.
3. trimester: 4 örnek: 28 ve 32 haftalıktı.

3.2. Immunohistokimya Tekniği

- 1- Kesitler Poly-L-Lysine (SIGMA, Katolog No: P:8920) ile kaplanmış lamlara alındı.
- 2- Kesitler 2-16 saat oda sıcaklığında kurutuldu,
- 3- Kesitler 1 gece öncesinden 45°C'de bekletildi.
- 4- Çalışmaya başlamadan 1 saat önce kesitler 60°C'lik etüvde 1 saat bekletildi.
- 5- Ksilollerde (2x10 dakika)
- 6- Alkol serilerinde de 5'er dakika bekletildi. (%100,%95, %80, %70)
- 7- Distile suda 5 dakika bekletildi.
- 8- Sitrik asit içine alınıp mikrodalgada 5 dakika kaynatıldı.
- 9- -16°C'de 20 dakika soğumaya bırakıldı.
- 10- Tekrar mikrodalgada 5 dakika kaynatıldı.
- 11- Oda ısısında 20 dakika kadar soğumaya bırakıldı.
- 12- Sonraki basamaklarda kullanılan solusyonların akması ve bir

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers)**; 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers)**; 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers)**; 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers)**; 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers)**; 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz özeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lük H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin üzerine eklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretli bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu süre değıştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers)**; 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz özeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lük H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin üzerine eklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretli bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu süre değıştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz özeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lük H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin üzerine eklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretli bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu süre değıştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz özeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lük H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin üzerine eklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretli bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu süre değıştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz özeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lük H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin üzerine eklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretli bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu süre değıştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz özeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lük H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin üzerine eklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretli bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu süre değıştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers)**; 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz özeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lük H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin üzerine eklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretli bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu süre değıştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers**); 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers)**; 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

emberde kalması için Pap Pen ile kesitlerin etrafı çizildi. (Biogenex Pap-Pen Catalog No: XT001-PP)

13- Fosfat tamponlu tuz zeltisi (PBS) (Sıgnet, Phosphate buffered Saline, katalog no: P1049; Sıgma, PBS tablets, Katalog no: P4417) (pH 7.4 ile 5 dakika 3 defa banyo edildi.

14- Fazla PBS kurulandıktan sonra; %3'lk H₂O₂ damlatıldı. Solusyonun herhangi bir endojen peroksidaz aktivitesini baskılamak için kesitleri örtmesine dikkat edildi ve sürekli kontrol edilerek 15 dakika nemli ortamda bekletildi.

15-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

16-Fazla PBS alındıktan sonra; özgül olmayan Ig bağlanmalarını baskılamak için bloklama serumu ile 5 dakika inkübe edildi. (**Ultra V Block TA-060-UB (60ml) Ultrvision**).

17-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

18-Fazla PBS alındıktan sonra deney grubu örneklerine primer antikor ve kontrol grubu örneklerine de PBS damlatıldı ve 1 saat nemli ortamda inkübe edildi.

19-Primer antikorlar; L1CAM (**L1 Cell Adhesion Molecule Ab-1 (Clone UJ127 Mouse Monoclonal Antibody Neomarkers)**; 1/200, NCAM(**CD56/ Neural Cell Adhesion Molecule-1 (NCAM-1)Ab-2 (123C3.D5) Mouse monoclonal antibody Neomarkers)**; 1/200 ve N-kaderin (**Polclonal Antibody to Human N-cadherin, Rabbit. M142 Takara**); 1/100 dilüsyon oranlarında dilue edildi. L1CAM ve NCAM için dilüe solusyon olarak PBS kullanılırken, N-kaderin için **Large Volume UltraAb Diluent TA-125-UD 125ml.** kullanıldı.

20-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

21-Fazla PBS alındı ve ikinci bağ kurucu antikor kesitlerin zerineeklendi. 15 dakika nemli ortamda bekletildi. Sekonder antikor; primer antikora karşı geliştirilmiştir, yani bunu antijen olarak kabul etmektedir. Sekonder antikor olarak da; **Biotinylated Goat Anti Polyvalent (Ready to use) TP-060-BN 60ml. (Neomarkers)** kullanıldı.

22-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

23-Streptaavidin ile 10 dakika muamele edildi. (**Streptavidin Peroxidase (Ready-to-use) TS-060-HR 60ml.**) Streptavidin sekonder antikor üzerindeki biyotine çok daha güçlü bağlanma özelliğindedir.

24-PBS ile 3x5 dakika yıkandı.

25-Fazla PBS alındıktan sonra renk oluşturmak için kullandığımız DAB (3, 3' Diaminobenzidine Liquid DAB Substraate-Chromogen System, DAKO Code No: K3466) streptavidin işaretili bölgeye tutunarak görünür hale getirir ve inkübasyon başlatılır. Bu süre mikroskop altında boyanmaların gözlenmesine göre ayarlanmıştır. Buna dayanarak DAB ile 3 dakika muamele edildi. Tüm kesitlerde bu sure değiştirilmeden çalışıldı.

26-Distile su ile yıkandı.

27-Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

28-Akar su ile yıkandıktan sonra glycerol gelatin (SIGMA GG1) kapatma solusyonu yardımıyla kesitlerin üstü lamelle kapatıldı.

Elde edilen preparatlar Nikon optiphot ve Zeiss-Axioplan ışık mikroskoplarında incelenerek fotoğraflandırıldı.

TARTIŞMA

Organizmanın en dinamik yaşam evreleri gelişme sürecindeki evreleridir. Ergin bir bireyde bulunan yapıların gelişimi tek bir hamlede gerçekleşemez; birçok basamağın başarıyla tamamlanması gerekir. Bu basamakların amaca uygun bir bütünlük içinde gerçekleşmesinde önemli faktörlerden birisini adezyon molekülleri oluşturmaktadır.

NCAM belirlenen ilk hücre adezyon molekülü olarak sadece; nöron-nöron, nöron-astrosit, astrosit-astrosit adezyonunu sağlayan (70,74) bir molekül değil, bunun sağlanmasında anahtar rol oynayan sinyal mekanizmasının harekete geçmesinde de önemli bir faktördür. NCAM hücre çoğalması, göçü, farklılaşması (71,124,125) ve onarım olaylarını yönlendirdiğinden, büyümenin destekleyicisi (42,71,126) ve dengeleyicisi (127) olarak tanımlanabilmektedir. Sunulan çalışmada, gelişmekte olan insan fetal serebral korteksinin tüm tabakalarında NCAM immunreaktivitesinin gözlenmesi, yukarıda ileri sürülen fonksiyonlara bağlı olabilir. Gelişme dinamiğini harekete geçiren ve yönlendiren bir faktörün, serebral korteks gelişiminin en aktif döneminde bütün tabakalarda izlenmesi beklenen bir bulgudur.

Yapılan hayvan deneylerinde NCAM'ın nöronların uzantılarında seçici davrandığı, piramidal nöronların apikal dendritlerinin yüzey membranlarında izlenirken, dendritlerin sitoplazmasında hiç NCAM immunoreaktivitesi göstermediği belirlenmiştir (128). Bulgularımızda, her üç trimesterde de NCAM tüm kortikal katmanlarda belirlenmiştir. Özellikle işınsal hücre kolonları arasında yer alan demetlerde belirlenmesi, akson demetlenmesiyle ilgili olabileceği hipotezini (77,78) destekleyici niteliktedir.

NCAM'ın insan fetal serebral korteksinde üç trimesterde de farklı şiddetlerde olmakla birlikte bütün katmanlarda reaksiyon vermesi serebral korteksin prenatal gelişiminin hücre çoğalması, göçü ve farklılaşması anlamında oldukça dinamik bir gelişim sürecini içerdiğini göstermektedir. Özellikle 2. trimesterde de ventriküler katmanda, yüzeyel katmanlarda izlenen benzer şiddetteki reaksiyon; hücre üretimi ve göçünün bu dönemde bu bölgelerde benzer şekilde devam ettiğini göstermektedir.

NCAM'ın farklı formlarının gelişmekte olan beyin yapısı içinde farklı lokalizasyonları sözkonusudur (70,74). 180kDa'luk isoformu nöronlar arasındaki adezyondan sorumluyken, 140 ve 120kDa'luk isoformları ise oligodendrositler, astrositler gibi nöron gliya etkileşiminden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir (75). NCAM farelerde E14 ve E16. günlerde üst ara

(intermediyet) alanda ve subplağın liflerinde yoğun olarak görülürken, yetişkin korteksinde NCAM varlığı ise tüm kortikal tabakalarda yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir (129). Thommaidou ve arkadaşları aynı çalışmalarında NCAM'ın gliyal hücrelerde de bulunduğunu belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada, insan fetal serebral korteksinde, ikinci ve üçüncü trimester bulguları Thommaidou ve arkadaşlarının farelerdeki bulgularıyla (129) uyum göstermektedir. Ancak bizim bulgularımızda gliyal hücrelerde herhangi bir immunreaksiyona rastanılmamıştır.

Terkelsen ve arkadaşları (131) NCAM immunoreaktivitesini erken dönemde kortikal tabakada ve primordiyal pleksiform tabakada, daha geç safhalarda ise gelişen subplak, kortikal plak ve marjinal zonda belirlemişler ve NCAM'ı gelişen sinir sisteminde postmigratör immatür nöronların işaretleyicisi olarak tanımlamışlardır (130,131). Bulgularımızda, ventriküler tabaka dışında tüm alanlarda NCAM reaksiyonunun belirlenmesi, Terkelsen ve arkadaşlarını (1992) teyit edici bir bulgu olarak değerlendirilebilir. Bu tabakada mitozla oluşan ve bir üst tabakaya veya daha yukarılara göç eden postmigratif hücreler, bölündükleri andan itibaren NCAM immunreaksiyonu göstermektedirler. İşinsal hatlar halinde demetlenmiş liflerin yoğun NCAM reaksiyonu göstermesi, yenice gelişmekte olan hücre uzantıları, dendrit ve henüz miyelinsiz olan aksonlar ve bunların etrafında yer alan astrosit ve oligodendrositlerden kaynaklanmakta olduğu söylenebilir. Serebral korteksi oluşturan nöronların uzantılarının yönlendirilmesi ve miyelinizasyonundan sorumlu nöroglial elemanların NCAM reaksiyonu verdiği bilinmektedir (75). Korteksin derinliğinde, subkortikal tabakada gelişimini sürdüren ak madde içinde, demetler halinde organize olan liflerin şiddetli NCAM immunreaksiyonu, NCAM'ın aksonların demetlenmesinde de işlevsel olduğunu düşündürmektedir.

L1'in insan serebral korteksinde dağılımını incelediğimizde; birinci trimesterde korteksin üst katmanlarında (moleküler, I. II. tabakalar) gözlenen zayıf immunreaktivitenin, 2. ve 3. trimesterde iyice gerilediği, derin katmanlarda ise reaksiyonun arttığı; özellikle de aksonların yoğun olarak yer aldığı katmanlarda (V. ve VI. tabaka ve ak cevherde) liflerde güçlü bir immunreaksiyonun olduğu göze çarpmaktadır (Tablo 2). Tsuru ve arkadaşları (1996) insan serebral korteksinin moleküler tabakasında immunreaksiyona rastlamışlar, bunları da Cajal–Retzius hücreleri olarak tanımlamışlardır (44). Farelerde yapılan L1 ile ilgili çalışmalarda, merkezi sinir sisteminde aksonların erken dönem şekillenmesinde etkin olduğu, akson-akson kontaklarının kurulmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür (143). Bu araştırmalarda L1'in nöron-nöron adezyonunu desteklerken nöron-astrosit ve astrosit- astrosit adezyonuna karışmadığı (44), L1 eksikliğinde, farelerde serebral kortekste herhangi bir hücresel bozulmanın olmadığı (44,143) ancak aksonal yolların gelişiminin normal olarak gerçekleşemediği belirlenmiştir (144,145). Wong ve arkadaşları da L1 eksikliğinde serebral korteksin piramidal hücrelerinin dendritlerinde, anormal yapılanmalar, primer,

sekonder, motor korteks, somatosensoryel korteks ve görüntü korteksinin genişliklerinde yetersizlikler olduğunu rapor etmişlerdir (146).

Demyanenko ve arkadaşlarına göre (143), gelişmekte olan sinir sisteminde, korteksdeki nöroblastlar kortikal plağa ulaşana kadar güçlü bir L1 boyanması göstermezler. Korteksdeki en yoğun L1 boyanması; henüz gelişmiş lif yollarında görülmektedir. Miyelinli olan aksonlarda ekspresyonuna rastlanılmaması (143), L1'in gelişmekte olan aksonal yolların oluşumunda, akson büyümesindeki rolünün (44) bir göstergesi olarak kabul edilebilir.

Bulgularımızda 1. trimesterde izlenip daha sonraki süreçte kaybolan reaksiyon, aksonların erken gelişme dönemiyle ilgili görülebilir. Bu liflerin miyelinlenmesi sonucu reaksiyonun kaybolduğu düşünülebilir. Daha derin bölgelerde reaksiyon şiddetinin artarak devam etmesi bu alanda tüm prenatal hayat boyunca yeni liflerin yoğun olarak katıldığının göstergesi olarak kabul edilebilir (Tablo 2). Chung ve arkadaşları; 13. haftadan itibaren 40. haftaya kadar genel bir değerlendirme yaptıklarında, moleküler tabakanın dışında L1 boyanmasının çok hafif olduğunu, 3 ve 4. tabakalarda da az bir immunreaktivite görüldüğünü, subkortikal tabaka ve daha derinlerindeki alanlarda yoğun bir immunreaktivitenin ortaya çıktığını belirtmişlerdir (130). Bunun aksine bulgular da rapor edilmiştir. Örneğin; Kamiguchi ve arkadaşları fetal insan beyninde L1 immunreaktivitesini incelediklerinde; marjinal tabakanın dış yarısında (moleküler tabaka), subplak ve intermediate tabakanın dış kısmında L1 immunreaktivitesine rastlamışlar. 17. haftada moleküler tabakanın dışında oldukça güçlü bir ekspresyon belirlediklerini, ancak bu ekspresyon düzeyinin 19. haftada çok azaldığını bildirmektedirler (147).

Biz benzer bulguları korteksin üst katmanlarında, süreç içinde gittikçe zayıflayan bir immunreaktivite olarak gözlemledik. Paralel olarak korteksin derin katmanlarında şiddetli L1CAM reaksiyonu tesbit ettik. Bu gözlemlerimiz daha çok Chung ve arkadaşlarının (130) bulgularıyla örtüşmekteydi (Tablo 2).

Bütün bu bulgu ve gözlemler sonucunda, L1CAM'ın insan beyninin gelişimi sırasında, nöronal göç, sinir liflerinin demetlenmesi, aksonal büyüme gibi gelişim basamaklarında fonksiyonel olabileceği kanısına ulaşıldı. Bu kanı daha önce yapılan araştırmaların (23,143,147,148) sonuçlarıyla da uyum göstermektedir.

Kaderinler hücrelerin çoğalmasında, kutuplaşmasında, farklılaşmasında ve ölümünde etkili moleküller olarak tanımlanmaktadırlar. Gelişen embriyoda, organlar ve dokuların oluşum basamaklarında, bulunma düzeyleri zaman zaman değişerek, doku oluşumu ve sinyal iletimini yönlendirirler (131). Aksonal ve dendritik büyümenin düzenlenmesi ve desteklenmesinde önemli rol oynayan kaderinler (132,133,134,135,136,137,138) gelişme periyodunda

meydana gelen sinaptogenezin erken basamaklarında görüldüğü gibi, erginlik döneminde ortaya çıkan sinaps oluşumunda da izlenmektedir (98,139). N-kaderinin varlığı, sinaptik aralıkta hem pre hem de postsinaptik kısımda izlenir (140,141). Sunulan çalışmada fetal insan serebral korteksinde her üç trimesterde de bütün katmanlarda yoğun N-kaderin varlığı belirlendi. N-kaderin düzeyi her alanda farklı miktarda olmakla birlikte hücre çekirdeklerinde de görüldü. Hücre çekirdeklerinde belirlenen reaksiyon bu molekülün hücrenin yönelimlerinin belirlenmesinde oldukça önemli bir faktör olabileceğini düşündürmektedir. Kortikal tabakalarda nöropile ait alanlarda gözlenen N-kaderin immunreaksiyonu bu alanda gerçekleşen sinaptik kontakların işaretleri olarak değerlendirilebilir. Böylece tüm kortikal katmanlarda birinci trimesterden itibaren yoğun olarak sinaps oluşumunun gerçekleştiği düşünülebilir (Tablo 2).

Miyelinizasyon basamaklarını destekleyen hem merkezi gliya hem de periferik gliya üzerinde N-kaderinin önemli rol oynadığı yönünde raporlar bulunmaktadır (132,112,136,142). Bulgularımızda izlenen çekirdek boyanmaları gliya hücreleri üzerinde N-kaderin immunreaktivitesinin bir göstergesi olarak da değerlendirildi.

Birçok durumda kaderinler gri madde yapılarının gelişimini gösteren moleküler belirleyiciler olarak tanımlanmaktadır (34). Fetal insan serebral korteksinde ventriküler tabakanın yoğun N-kaderin immunreaksiyonu, korteksi oluşturan hücrelerin düzenlenmesinde ilk andan itibaren N-kaderinin rol oynadığını göstermesi bakımından önemli olabilir. Moleküler tabakada birinci trimesterden itibaren izlenen reaksiyon ise bu tabakaya ulaşan piramidal nöronların dendritleri ve bunların kurdukları sinapsların bir göstergesi olarak düşünülebilir.

Ayrıca, prenatal dönem boyunca hızlı bir büyüme gösteren beyin korteksinde damarlanma açısından önemli etkisi olduğunu düşündüren bulgular elde edildi. Damar endotelinde yerleşmiş N-kaderin reaksiyonu endotel görevleriyle ilgili olabileceği gibi, anjiyogenik bir etkiyi de akla getirmektedir. Burada N-kaderinin astrosit-kapiller endoteli ilişkisinin kurulmasında görevli olabileceği de düşünülmektedir. Böylece kan beyin bariyeri fonksiyonlarını etkileyerek, direk olarak madde geçirgenliği üzerinden beyin gelişiminin düzenlenmesiyle ilişkilendirilebilir.

Serebral korteksin gelişim basamaklarında NCAM, L1CAM ve N-kaderinin, nöronların oluşmasında ve fonksiyonel yapısal özelliklerini kazanmasında; hücrenin çoğalma, göç, farklılaşma ve büyüme gibi basamakların gerçekleşmesinde önemli roller üslendiği, böylece; serebral korteksin fonksiyonel mimarisi için gerekli moleküller olduğu, eksiklikleri durumunda ortaya çıkabilecek yapısal bozukluklardan yola çıkarak bazı hastalıkların moleküler temellerinde bu moleküllerin de yer alabileceği kanısına varıldı.

	NCAM				L1CAM				N-Kaderin			
	Moleküler tbk (M)	Kortikal tbk (K)	İnterm. tbk (I)	Ak cevher (A)	Moleküler tbk (M)	Kortikal tbk (K)	İnterm. tbk (I)	Ak cevher (A)	Moleküler tbk (M)	Kortikal tbk (K)	İnterm. tbk (I)	Ak cevher (A)
I. trim	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
II. trim	++	++	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
III. trim	+	+	+++	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++

Tablo 2: 3 trimestere göre 3 adezyon molekülünün bulunma düzeylerini göstermektedir.

KAYNAKLAR:

- 1- **Darnell J, Lodish H, Baltimore D;** Molecular Cell Biology Second Edition, Scientific American Books, **pp:928;** (1990).
- 2- **Darnell J, Lodish H, Baltimore D;** Molecular Cell Biology Second Edition, Scientific American Books, **pp:791;** (1990).
- 3- **Carlson B.M;** Human Embriyology and Developmental Biology, Second Edition, 1999 by Mosby, Inc. **pp:63.**
- 4- **Carlson B.M;** Human Embriyology and Developmental Biology, Second Edition, 1999 by Mosby, Inc. **pp:249**
- 5- **Yıldırım M;** Temel Nöroanatomi; Nobel Tıp kitabevleri, s:15 (2000).
- 6- **Moore K.L, Persaud T.V.N.** The Developing Human, Sixth Edition WB. Saunders Comp. **pp:465** (1998).
- 7- **Warwick R, Williams P.L,** Gray's Anatomy. Guy's Hospital Mediacal School University of London 35th Edition (1973).
- 8- **Kandel E.R, Schwartz J.H, Jessel T.M.** Principles of Neural Science Third Edition, Prentice-Hall International Inc, Chapter 20. **pp: 298** (1991).
- 9- **Carlson B.M;** Human Embriyology and Developmental Biology, Second Edition, 1999 by Mosby, Inc. **pp:218**
- 10-**Agarwala S, Sanders T, Rangsdale CW.;** Sonic hedgehog control of size and shape in midbrain pattern formation. Science. 2001;16;291(5511):2147-50.
- 11-**Carlson B.M;** Human Embriyology and Developmental Biology, Second Edition, 1999 by Mosby, Inc. **pp:210**
- 12-**Drews U.** :Renkli Embriyoloji Atlası, Nobel Tıp Kitabevleri s: 240 (2000).
- 13-**Kandel E.R, Schwartz J.H, Jessel T.M.** Principles of Neural Science Third Edition, Prentice-Hall International Inc, Chapter 20. **pp: 292** (1991).

- 14-**Yıldırım M**; Temel Nöroanatomi; Nobel Tıp kitabevleri, s: 61 (2000).
- 15-**Dere F.** : Nöroanatomi ve Fonksiyonel Nöroloji, s: 249 (1996).
- 16-**Truex R.C, Carpenter M.B**, Human Neuroanatomy, 6th Edition Wavely Pres, Inc. (1969).
- 17-**Noback C R, Demarest R.J.** :The Human Nervous system Basic Principles of Neurobiology 3th edition McGraw-hill International book Comp. P487 (1984).
- 18- **Kandel E.R, Schwartz J.H, Jessel T.M.** Principles of Neural Science Third Edition, Prentice-Hall International Inc. Chapter 20. **pp: 293**, (1991).
- 19-**Fields R.D, Itoh K.** Neural cell adhesion molecules in activity-dependent development and synaptic plasticity. Trends. Neurosci. 19,473-480 (1996).
- 20-**Cooper, G.M.:** The Cell, Oxford University Press N.Y Chapter 12, **pp:510** (1997).
- 21-**Mackay, C.R., Imhof, B.A.:** Cell adhesion in the immune system. Immunol Today;14(3):99-102 (1993).
- 22-**Peach, R.J, Hollenbaugh D, Stamenkovic I, Aruffo A.:** Identification of hyaluronic acid binding sites in the extracellular domain of CD44. J Cell Biol.;122(1):257-64 (1993).
- 23-**Fujimori K.E, Takeuchi K, Yazaki T, Uyemura K, Nojyo Y, Tamamki N.** Expression of L1 and TAG-1 in the cortikospinal, callosal and hippocampal commissural neurons in the developing rat telencephalon as revealed by retrograde and in situ hybridization double labeling. The Journal of Comp. Neurology 417:275-288 (2000).
- 24-**Shimuzu Y, Van Seventer G.A, Horgan K.J, Shaw S.** Co-stimulation of proliferative responses of resting CD4+ T cells by the interaction of VLA-4 and VLA-5 with fibronectin or VLA-6 with laminin . J.Immunol. 145:59-67 (1990a).
- 25-**Carracedo J; Ramirez R, Martin-Malo A, Rodriguez M, Madueno J. A, Aljama P.** :Role of adhesion molecules in mononuclear cell apoptosis induced by cuprophane hemodialysis membranes. Nephron. 89(2):186-93 (2001).
- 26-**Hynes R.O** Integrins: versality, modulation and signaling in cell adhesion. Cell 69: 11-25, (1992).

- 27-Ruoslahti E:** Integrins. *J. Clin. Invest* 87: 1-5 (1991).
- 28-Funatsu N, Miyata S, Kumanogoh H, Shigeta M, Hamada K, Endo Y, Sokawa Y, Maekawa S.:** Characterization of a novel rat brain glycosylphosphatidylinositol- anchored protein (Kilon), a member of the IgLON cell adhesion molecule family. *J Biol Chem* 274 (12): 8224-30 (1999).
- 29-Baumhueter S, Zeigler F.C, Bennett B.D, Jordan C.T, Spencer S.D, Carroll K.J, Hooley J, Bauer K, Matthews W.:** Cellular and molecular characterization of the role of the flk-2/flt-3 receptor tyrosine kinase in hematopoietic stem cells. *Blood*; 15;84(8):2422-30 (1994).
- 30-Bevilacqua M.P.:** Endothelial leukocyte adhesion molecules. *Annu. Res. Immunol* 11:767-804 (1993).
- 31-Yang B, Zahang L, Turley E.A.:** Identification of two hyaluronan binding domains in the hyluronon reseoptor RHAMM. *J. Biol. Chem*; 268: 8617-23 (1993)
- 32-Freemont A.J.:** The significance of adhesion molecules in diagnostic histopathology. *Current Diagn. Path.* 2:101-10 (1995).
- 33-Itoh K, Kawamura H, Asou H. :**A novel monoclonal antibody against carbohydrates of L1 cell adhesion molecule cause an influx of calcium in cultured cortical neurons. *Brain Res.* 580(1-2): 233- 40 (1992).
- 34-Kamiguchi H, Lemmon V.;** Rcycling of the cell adhesion molecule L1 in axonal growth cones. *The Journal of Neuroscience*20(10):3676-3686 (2000).
- 35-Oleszewski M, Gutwein P.** Characterization of the L1-neurocan binding site. Implications for L1-L1 homophilic binding. *J. Biol Chem* 275(44): 34478-85 (2000).
- 36-Balaian L.B, Moehler T.:** The human neural cell adhesion molecule L1 functions as a costimulatory molecule in T cell activation. *Eur. J. Immunol.* 30(3): 938-43 (2000).
- 37-Atashi J.R, Klinz S.G, Ingraham C.A, Matten W.T, Schachner M, Maness P.F.** Neural cell adhesion molecules modulate tyrosine phosphorylation of tubulin in nerve growth cone membranes. *Neuron* 8:831-842 (1992)
- 38-Ignelzi Jr M.A, Miller D.R, Soriano P, Maness P.F.** Impaired neuron outgrowth of src-minus cerebellar neurons on the cell adhesion molecule L1. *Neuron* 12: 873-884 (1994).

- 39-Klinz S.G, Schachner M, Maness P.F. L1 and NCAM anribodies trigger protein phosphatase activity in growth cone-enriched membranes. *J. Neurochem* 65:84-95 (1995).
- 40-Saffell J.L, Williams E.J, Mason I.J, Walsh F.S, Doherty P. Expression of a dominant negative FGF receptor inhibits axonal growth and FGF receptor phosphorylation stimulated by CAMs. *Neuron* 18:231-42 (1997).
- 41-Kawano H, Fukuda T, Takeuchi K, Kawamura K.:Molecular mechanisms of the pathway formation in the fetal rat cerebral neocortex. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi* 19(2): 79-84(1999).
- 42-Crossin K.L, Krushel L.A. Cellular signaling by neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Developmental Dynamics* 218:260-279 (2000).
- 43-Brummendorf T, Kenwrick S, Rathjen F.G. Neural cell recognition molecule L1 from cell biology to human hereditary brain malformations. *Curr opin Neurobiol* 8:87-97 (1998).
- 44-Tsuru A, Mizuguchi M, Uyemura K, Takashima S.: Immunohistochemical expression of cell adhesion molecule L1 during development of the human brain. *Early Human Development* 45;93-101 (1996).
- 45-Hortsch M.: The L1 family of neural cell adhesion molecules: old proteins performing new tricks. *Neuron*. Oct;17(4):587-93. 1996.
- 46-Joosten E, Bar D.: Axon guidance of outgrowing corticospinal fibres in the rat. *J. Anat.* 194:15-32 (1999).
- 47-Hortsch M, O'Shea, K.S, Zhao G, Kim F, Vallejo Y, Dubreuil R.R. :A conserved role for L1 as a transmembrane link between neuronal adhesion and membrane cytoskeleton assembly. *Cell Adhes Commun* 5(1): 61-73 (1998).
- 48-Fukuda T, Kawano H, Ohyama K, Li H-P, Takeda Y, Oohira A, Kawamura K.: Immunohistochemical localisation of neurocan and L1 in the formation of thalamocortical pathway of developing rats.; *J. Comp. Neurol.* 382:141-152 (1997).
- 49-Joosten E.A.J.: An ultrastructural double-labeling method: immunohistochemical localisation of cell adhesion molecule L1 on HRP-labeled developing corticospinal tract axons in the rat. *Histochemistry* 94:645-651 (1990).

- 50-Corhen N.R, Taylor J.S.T, Scott L.B, Guillery R.W, Soriano P, Furley A.J.W. Errors in corticospinal axon guidance in mice lacking the neural cell adhesion molecule L1. *Curr Biol* 8:26-33 (1997).
- 51-Dahme M, Bartsch U, Martini R, Anliker B, Schachner M, Mantei N.: Disruption of mouse L1 gene leads to malformation of the nervous system. *Nat. Genet.* 17: 346-352 (1997).
- 52-Fransen E, Lemmon V, Van Camp G, Vits L, Coucke P, Willems P.J.:CRASH syndrome: clinical spectrum of corpus callosum hypoplasia, retardation, adducted thumbs, spastic paraparesis and hydrocephalus due to mutations in one single gene, L1. *Eur J Hum Genet* 3(5): 273-84 (1995).
- 53-Moulding H.D, Martuza R.L. : Clinical mutations in the L1 neural cell adhesion molecule affect cell-surface expression. *J Neurosci* 20(15): 5696-702 (2000).
- 54-Willems P.J, Brouwer O.F, Dijkstra I, Wilmink J.: X- linked hydrocephalus. *Am. J. Med.Genet*; 27(4):921-8 (1987).
- 55-Graf W.D, Born D.E.:The pachygyria polymicrogyria spectrum of cortical dysplasia in X- linked hydrocephalus. *Eur. J. Pediatr. Surg.* 8 Suppl 1: 10-4. (1998).
- 56-Alvarez-Dolado M, Cuadrado A, Navarro-Yubero C, Sonderegger P, Furley A.J, Bernal J, Munoz A.: Regulation of the L1 cell adhesion molecule by thyroid hormone in the developing brain. *Molecular and Neuroscience* 16, 499-514 (2000).
- 57-Yamasaki M, Thompson P, Lemmon V.:CRASH syndrome: mutations in L1CAM correlate with severity of the disease. *Neuropediatrics* 28(3): 175-8 (1997).
- 58-Dry K, Kenwrick S, Rosenthal A, Platzer M.: The complete sequence of the human locus for Ng-CAM-related cell adhesion molecule reveals a novel exon in chick and man and conserved genomic organisation for the L1 subfamily.*Gene* 273(1):115-22(2001).
- 59-Garver T.D, Ren Q, Tuvia S, Bennett V.: Tyrosine phosphorylation at a site highly conserved in the L1 family of cell adhesion molecules abolishes ankyrin binding and increases lateral mobility of neurofascin. *J.cell Biol.* 137(3): 703-14(1997).
- 60-Grumet M.: Nr-CAM: a cell adhesion molecule with ligand and receptor functions. *Cell Tissue Res* 290(2): 423-8 (1997).

- 61-Davis J.Q, Lambert S, Bennett V.: Molecular composition of the node of ranvier : identification of ankyrin-binding cell adhesion molecules neurofascin (mucin +/-third FNIII-) and NrCAM at nodal akson segmentsJ.cell Biol. 135 (5): 1355-67 (1996).
- 62-Wiley J. and Sons, Inc. Cell and Molecular Biology / Gerald Corp Canada (1996).
- 63-Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.D. Molecular Biology of The Cell Second Edition Garland Publishing Inc. NewYork &London pp: 830-831 (1989).
- 64-Lipinski M, Hirsch M.R, Deagostini Bazin H, Yamada O, Tursz T, Goridis C.: Characterization of neural cell adhesion molecules (NCAM) expressed by Ewing and neuroblastoma cell lines. Int J Cancer 40(1): 81-6 (1987).
- 65-Luthi A, Laurent J.P, Figueroa A, Muller D.: Hippocampal long-term potentiation and neural cell adhesion molecules L1 and NCAM . Nature 373:777-779 (1994).
- 66-Darnell J, Lodish H, Baltimore D.: Molecular Cell Biology, Second Edition ; Scientific American Books, Chapter 23. pp:924-929 (1990).
- 67-Atkins A.R, Osborne M.J, Lashuel H.A, Edelman G.M, Wright P.E.: Cunningham B.A, Dyson H.J. Association between the first two immunoglobulin-like domains of the neural cell adhesion molecule N-CAM. FEBS Letters 451: 162-168 (1999).
- 68-Doherty P, Rimon G, Mann D.A, Walsh F.S.: Alternative splicing of the cytoplasmic domeyin of neural cell adhesion molecule alters its ability to act as a substrate for neurite outgrowth. J Neurochem 58(6): 2338-41 (1992).
- 69-Becker J, Erickson H, Hoffman S, Cunningham B, Edelman G.M. Topology of cell adhesion molecules. Proc Natn. Acad. Sci. U.S.A. 86, 1088-1092 (1989).
- 70-Rutishauser U, Jessel T.M.: Cell adhesion molecules in vertebrate neuraldevelopment. Physiol Rev. 68, 819-857 (1988)
- 71-Persohn E, Schachner M.: Immunoelectron microscopic lokalization of the neural cell adhesion molecules L1 and N-CAM during postnatal Development of the mouse cerebellum. The Journal of Cell Biology, Volume 105;569-576 (1987).
- 72-Bixby J.L, Harris W.A. : Molecular mechanisms of axon growth and guidance A. Rev. Cell. Biol. 7, 117-159 (1991).

- 73-Doherty P, Fruns M, Seaton P, Dickson G, Barton C.H, Searas T.A, Walsh F.S.: A threshold effect of the major isoforms of NCAM on neurite outgrowth. *Nature* 343, 464-466; (1990).
- 74-Williams A.F, Barclay A.N. :The immunoglobulin superfamily: Domains for cell surface recognition. *A. Rev. Immunol* 6, 381-405 (1988).
- 75-Krivko I.M, Rusokov D.A. Savina S.V. Skibo G.G. Berezin V.A; Lateral patterns of the NCAM on the surface of hippocampal cells developing in vitro: *Neuroscience* vol 55 no.2pp; 491-498 (1993).
- 76-Kasper C, Rasmussen H.: Structural basis of cell-cell adhesion by NCAM. *Nat. Struct Biol* 7(5): 389-93 (2000).
- 77-Hoffman K.B, Murray B.A, Lynch G, Munirathinam S, Bahr B.A.: Delayed and isoform spesific effect of NMDA exposure on neural cell adhesion molecules in hippocampus. *Neuroscience. Res.* 39(2):167-73 (2001).
- 78-Ronn L.C, Berezin V.: The neural cell adhesion molecule in synaptic plasticity and ageing. *Int J Dev Neurosci* 18(2-3): 193-9 (2000).
- 79-Lubetzki C, Charles P.: Pivotal role of axonal adhesion molecules in central nervous system myelination. *Neurol Neurochir Pol* 34(3 Suppl): 41-4 (2000).
- 80-Cremer H, Chazal G.: PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity. *Int. J. Dev. Neurosci.* 18(2-3): 213-20 (2000).
- 81-Ong E, Nakayama J.: Developmental regulation of polysialic acid synthesis in mouse directed by two polysialyltransferases, PST and STX. *Glycobiology* 8(4): 415-24: (1998).
- 82-Kandel ER, Schwartz J.H, Jessel T.M.: *Principles of Neural Science* Third Edition, Prentice-Hall International Inc pp:927, (1991)
- 83-Hayashi T, Seki T.: Expression of polysialylated neural cell adhesion molecule in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res* 907(1-2): 130-3.(2001).
- 84-Husmann M, Pietsch, T.: Embryonic neural cell adhesion molecules on human natural killer cells. *Eur J Immunol* 19(9): 1761-3 (1989).
- 85-Tanaka S, Sakata Y, Morimoto K, Tambe Y, Watanabe Y, Honda G, Tabata M, Oshima T, Masuda T, Umezawa T, Shimada M, Nagakura N, Kamisako W, Kashiwadw Y, Ikeshiro Y.: Influence of

naturel and synthetic compounds on cell surface expression of cell adhesion molecules, ICAM-1 and VCAM-1: *Planta Med* 67 (2001).

- 86-**Crockard A.D, Boylan M.T.:** Corticosteroids Effects on Neutrophil Adhesion Molecules. *Int. J. Clin. Laboratuvar. Res* 28:110-5 (1998).
- 87-**Fawcett J, Holness C.L, Needham L.A, Turley H, Gatter KcMason D.Y, Simmons D.L.:** Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* 3; 360(6403): 481-4 (1992).
- 88-**Skubitz K.M, Ahmed K, Campbell K.D, Skubitz A.P.:** CD50 (ICAM-3) is phosphorylated on tyrosine and is associated with tyrosine kinase activity in human neutrophils. *J Immunol.* 15;154(6):2888-95 (1995).
- 89-**Wilson G.A.:** Cell adhesion molecules. Fundamental facts. R&D systems1996.
- 90-**Foster C.A.:** VCAM-1 / Alfa 4 integrin adhesion pathway; therapeutic target for allergic inflammatory disorders. *J. Allergy Clin Immunol* 98(6Pt2):5270-7 (1996).
- 91-**Blankenberg S, Rupprecht H.J, Bickel C, Peetz D, Hafner G, Tired L, Meyer J.:** Circulating cell adhesion molecules and death in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 18; 104 (12):1336-42 (2001).
- 92-**Newman P.J, Berndt M.C, Gorski J, White G.C, Lyman S, Paddock C, Muller W.A.:** PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science* 9;247(4947):1219-22 (1990).
- 93-**Stockinger H, Gadd S.J, Eher R, Majdic O, Schreiber W, Kasinrerck W, Strass B, Schnabl E, Knapp W.:** Molecular characterisation and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J. Immunol.* 1;145(11):3889-97 (1990).
- 94-**Szekanecz Z, Haines GK, Harlow L.A, Shah M.R, Fong T.W, Fu R, Lin S.J, Koch A.E.:** Increased synovial expression of the adhesion molecules CD66a, CD66b, and CD31 in rheumatoid and osteoarthritis. *Clin Immunol Immunopathol*;76(2):180-6 (1995).
- 95-**Siemiatkowski A, Kosel J.:** Adhesion molecules and their role in organ response after trauma. *Pol Merkuriusz. Lek.* 10(60):465-8 (2001).
- 96-**Takeichi M.:** Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Ann. Rev. Biochem.* 59:237-52 (1990).

- 97-**Ranscht B.:** Cadherins: Molecular codes for axon guidance and synapse formation: *Internal J. Devl. Neuroscience* 18:643-651 (2000).
- 98-**Vleminckx K, Kemler R.:** Cadherins and tissue formation: integrating adhesion and signaling *BioEssays* 21:211-220, (1999).
- 99-**Redies C.:** Cadherins in the central nervous system. *Progress in Neurobiology* 61:611-648 (2000).
- 100-**Redies C, Takeichi M.:** Cadherins in the developing central nervous system: an adhesive code for segmental and functional subdivisions. *Developmental Biology* 180, 413-423 (1996).
- 101-**Tamura K, Shan W-S, Hendrickson W.A, Colman D.R, Shapiro L.:** Structure function analysis of cell adhesion by neural (N-) cadherin. *Neuron* 20:1153-63 (1998).
- 102-**Yap A.S, Brieher W.M, Pruschy M, Gumbiner B.M.:** Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Current. Biol.* 7:308-315 (1997).
- 103-**Brieher W.M, Yap A.S, Gumbiner B.M.:** Lateral dimerization is required for the homophilic binding activity of C-cadherin. *J. Cell Biol.* 135:487-496 (1996).
- 104-**Shapiro L, Fannon A.M, Kwong P.D, Thompson A, Lehmann M.S, Gröbel G, Legrand J-F, Als-Nielsen J, Colman D.R, Hendrickson W.A.:** Structural basis of cell-cell adhesion by cadherins *Nature* 374:327-337 (1995).
- 105-**Huber O, Bierkamp C, Kemler R.:** Cadherins and catenins in development. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 685-691 (1990a).
- 106-**Wöhrn J-C.P, Puelles L, Nakagawa S, Takeichi M, Redies C.:** Cadherin expression in the retina and retinofugal pathways of the chicken embryo. *J. Comp. Neurol.* 396:20-38 (1998).
- 107-**Inoue A, Sanes J.R.:** Lamina specific connectivity in the brain: regulation by N-cadherin, neurotrophins, and glycoconjugates. *Science.* 276: 1428-1431 (1997).
- 108-**Yoon M-S, Puelles L, Redies C.:** Formation of cadherin expressing brain nuclei in diencephalic alar plate subdivisions. *J. Comp. Neurol.* 421:461-480 (2000).
- 109-**Nathke I.S, Hinck L, Swedlow J.R, Rapkoff J, Nelson W.J.:** Defining interactions and distributions of cadherin and catenin complexes in polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.*;125(6):1341-52 (1994).

110-Van der Vieren M, Le Trong H, Wood C.L, Moore P.F, St John T, Staunton D.E, Gallatin W.M.: A novel leukointegrin, alpha d beta 2, binds preferentially to ICAM-3. *Immunity*;3(6):683-90 (1995).

111-Oberlender S.A, Tuan R.S.: Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development* 120; 177-187 (1994).

112-Benson D.L, Tanaka H.: N cadherin redistribution during synaptogenesis in hippocampal neurons. *Journal of Neurosci.* Sep 1;18(17) 6892-6904 (1998).

113-Redies C, Ast M, Nakagawa S, Takeichi M, Martinez-De-La-Torre M, Puelles L.: Morfologic fate of diencephalic prosomers and their subdivisions revealed by mapping cadherin expression. *The Jour. Comp. Neuro.* 421:481-514 (2000).

114-Brose N. : Synaptic cell adhesion proteins and synaptyogenesis in the mamalian central nervous system. *Naturwissenschaften* 86: 516-524 (1999).

115-Yagi T, Takeichi M.: Cadherins superfamily genes: functions, genomic organization and neurologic diversity. *Genes and Development* 14: 1169-1180 (2000).

116-Lazarovits A I, Karsh J.: Differential expression in rheumatoid synovium and synovial fluid of alpha4beta7 integrin. A novel receptor for fibronectin and vascular adhesion molecule-1. *J.immunol* 151:6482-6489 (1993).

117-Bauer E.M, Perks P, Lightman S.L, Shanks N.: Are adhesion molecules involved in stress-induced changes in lymphocyte distribution? *Life Sciences* 69: 1167-1179 (2001).

118-Xie Y, Muller W.A.: Molecular cloning and adhesive properties of murine platelet/endothelial cell adhesion molecule 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 15;90(12):5569-73 (1993).

119-Murohara T, Delyani J.A, Albelda S.M, Lefer A.M.: Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 protects against myocardial ischemia and reperfusion injury in cats. *J Immunol.* 1996 May 1;156(9):3550-7. (1996).

120-Humbria A, Siaz-Gonzalez F, Campanero M.R.: Expression of L-selectin, CD43 and CD44 in synovial fluidneutrophils from patients with inflammatory joint diseases. Evidence for a soluble form of L-selectinin synovial fluid. *Arthritis Rheum.* 37:342-348 (1994)

121-Lasky L.A. Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*. 6;258(5084):964-9. (1992).

122-Beckman G, Bork P.: An adhesive domain detected in functionally diverse receptors. *Trends Biochem Sci*; 18:40-1 (1993).

123-Tedder T.F, Steeber D.A, Chen A, Enge I.P.: The selectins: vascular adhesion molecules. *FASEB J*.;9(10):866-73 (1995).

124-Brooksbank B.W.L, Walker D, Balazs R, Jorgensen O.S.: Neuronal maturation in fetal brain in Down's syndrome. *Early Human Dev*. 18: 237-246 (1989).

125-Krushel L.A, Tai M-H, Cunningham B.A, Edelman G.M, Crossin K.L.: Neural cell adhesion molecule (N-CAM) domains and intracellular signalling pathways invoved in the inhibition of astrocyte proliferation *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:2592-2596 (1998).

126-Kiss J.Z, Troncoso E, Djebbara Z, Vutskits L, Muller D.: The role of neural cell adhesion molecules in plasticity and repair. *Brain Research. Review* 36:175-184 (2001).

127-Amoureux M-C, Cunningham B.A, Edelman G.M, Crossin K.L.: NCAM binding inhibits the proliferation of hippocampal progenitor cells and promotes their differentiation to a neuronal phenotype. *J. Neurosci*. 20(10):3631-3640 (2000).

128-Schuster T, Krug M, Stalder M, Hackel N, Gerardy-Schanhn R, Schachner M.: Immunoelectron microscopic localization of the neural recognition molecules L1, NCAM and its isoform NCAM 180, the NCAM-associated polysialic acid, beta 1 integrin and the extracellular matrix molecule tenascin-R in synapses of the adult rat hippocampus. *J. Neurobiol*. 49:142-158 (2001).

129-Thomaidou D, Coquillat D, Meintanis S, Noda M, Rougon G, Matsas R.: Soluble forms of NCAM and F3 neuronal cell adhesion molecules promote Schwann cell migration: identification of protein tyrosine phosphatases zeta/beta as the putative F3 receptors on Schwann cells. *J. Neurochem*. 78:767-778 (2001).

130-Chung W-W, Leganaur CF, Yan Y, Lund J.S.: Developmental expression of neural cell adhesion molecules in the mouse neocortex and olfactory bulb. *J. Comp. Neurol*. 314:290-305 (1991).

131-Terkelsen O.B.F, Janas M.S, Bock E, Mollgard K.: NCAM as a differential marker of postmigratory immature neurons in the developing human nervous system. *Int. J. Neurosci*. 10(6): 505-516 (1992).

- 132-**Beesley P.W, Mumery R, Tibaldi J, Chapman A.P, Smith S.J.:** The postsynaptic density-putative involvement in synapse stabilization via cadherins and covalent modification by ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* 23:59-64 (1995).
- 133-**Bixby J.L, Zhang R.:** Purified N-cadherin is a potent substrate for the rapid induction of neurite outgrowth. *J. Cell Biol.* 110:1253-1260 (1990).
- 134-**Uchida N, Honjo Y, Johnson K.R, Whelock M.J, Takeichi M.:** The catenin/cadherin adhesion system is localized in synaptic junctions bordering transmitter release zones. *J. Cell Biol.* 135: 767-779 (1996).
- 135-**Fannon A.M, Colman D.R.:** A model for central synaptic junctional complex formation based on the differential adhesive specificities of the cadherins. *Neuron.* 17: 423-434 (1996).
- 136-**Letaurneau P.C, Shattuck T.A, Roche F.K, Takeichi M, Lemmon V.:** Nerve growth cone migration onto Schwann cells involves the calcium-dependent adhesion molecule, N-cadherin. *Developmental Biol.* 138:430-442 (1990).
- 137-**Shimamura K, Takahashi T, Takeichi M.:** E-Cadherin expression in a particular subset of sensory neurons. *Dev. Biol.* 152: 242-254(1992).
- 138-**Redies C.:** Cadherins and the formation of neural circuitry in the vertebrate CNS. *Cell Tissue Res.* 290: 405-413 (1997).
- 139-**Obst-Pernberg K, Medina L, Redies C.:** Expression of R-cadherin and N-cadherin by cell groups and fiber tracts in the developing mouse forebrain: relation to the formation of functional circuits. *Neurosci.* 106(3): 505-533 (2001).
- 140-**Shapiro L, Colman D.R.:** The diversity of cadherins and implications for a synaptic adhesive code in the CNS. *Neuron* 23: 427-430 (1990).
- 141-**Colman D.R.:** Neurites, synapses, and cadherins reconciled. *Mol. Cell Neurosci.* 10: 1-6 (1997).
- 142-**Payne H.R, Lemmon V.:** Glial cells of the o-2A lineage bind preferentially to N-cadherin and develop distinct morphologies. *Dev. Biol.* 159: 595-607 (1993).
- 143-**Demyanenko G.P, Tsai A.Y, Maness P.F.:** Abnormalities in neuronal process extension, hippocampal development and the ventricular system of L1 knockout mice. *J. Neurosci.* 19(12):4907-4920 (1999).

144-**Keilhauer G, Faissner A, Schachner M.**: Differential inhibition of neurone-neurone, neurone-astrocyte and astrocyte-astrocyte adhesion by L1, L2 and NCAM antibodies. *Nature* 316; 728-730 (1985).

145-**Fransen E, D'Hooge R, Van Camp H, Verhoye M, Sijbers J, Reyniers E, Soriano P, Kamiguchi H, Willemsen R, Kockkock S.K.E, De Zeeuw CI, De Deyn P.P, Van der Linden A, Lemmon V, Kooy R.F, Willems P.J.**: L1 knockout mice show dilated ventricles, vermis hypoplasia and impaired exploration patterns. *Hum. Mol. Genet.* 7:999-1009 (1998a).

146-**Wong E.W, Kenwrick S, Willems P, Lemmon V.**: Mutations in the cell adhesion molecule L1 cause mental retardation. *Trends Neurosci.* 18:168-172 (1995b).

147-**Kamiguchi H, Hlavín M.L, Yamasaki M, Lemmon V.**: Adhesion molecules and inherited diseases of the human nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 21: 97-125 (1998).

148-**Haney C.A, Sahenk Z, Lemmon V, Roder J, Trapp BD.**: Heterophilic binding of L1 on unmyelinated sensory axons mediates Schwann cell adhesion and is required for axonal survival. *J. Cell Biol.* 146:1173-1183 (1999).

ÖZGEÇMİŞ

17 Şubat 1976 yılında İzmir'de doğdu. İlk okulu Dumlupınar İlkokulu'nda, orta okulu Atatürk Ortaokulu'nda ve liseyi de Antalya Lisesi'nde bitirdi. 1994 yılında üniversiteye Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde başladı. 1998 yılında buradan mezun oldu. 1999 yılında Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya laboratuvarında biyolog olarak çalışmaya başladı. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalının sınavını kazanarak burada yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimi devam etmektedir. İngilizce bilmektedir. Evlidir.

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**