

Bromodeoksiuridin uygulamasını takiben erişkin sıçan beyinde lateral ve üçüncü ventriküllerin ventriküler ve subventriküler zonunda mitojenik aktivitenin incelenmesi

Sibel Köktürk¹, Faruk Alkan¹, Fatma Kaya Dağistanlı², Melek Sezgin², Mümin Uzunalan¹, Bülent Uruluer¹

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi ¹Histoloji ve Embriyoloji ve ²Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalları, İstanbul

Amaç: Çalışmamızın amacı erişkin sıçanların subventriküler zonunda (SVZ) veya ventriküler zonunda (VZ) bromodeoksiuridin (BrdU) işaretli yeni oluşan hücreleri saptamaktır. **Yöntem:** 13-14 haftalık erişkin Sprague Dawley cinsi (n=7) erkek sıçanlara BrdU enjekte edildi ve enjeksiyondan 24 saat sonra perfüzyon yapıldı. Mitojenik aktiviteyi saptamak için BrdU antikor immünohistokimyası kullanıldı ve BrdU işaretli hücreler mikroskopta sayıldı. **Bulgular:** Lateral ve üçüncü ventriküllerin VZ'undaki ependimal hücrelerde BrdU işaretli nükleus gözlenmedi. Lateral ve üçüncü ventriküllerin SVZ'da ise BrdU işaretli nükleuslar gözlemlendi. Lateral ventriküllerin SVZ'unda üçüncü ventriküllerin SVZ'una göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha fazla BrdU işaretli nükleus gözlemlendi (P<0.001). **Sonuç:** Lateral ve üçüncü ventriküllerin VZ'unda mitotik aktivite saptanmadı. Lateral ve üçüncü ventriküllerin SVZ'unda ise mitotik aktivite saptandı. Lateral ventrikülün SVZ'unun üçüncü ventrikülün SVZ'una göre mitotik olarak daha aktif bir bölge olduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: Subventriküler zon, ventriküler zon, mitojenik bölge, erişkin sıçan, beyin, BrdU

In the brain of the adult rat following application bromodeoxyuridine examine mitogenic activity in the ventricular and the subventricular zone of the lateral and the third ventricle

Objective: The aim of our study was to determine bromodeoxyuridine (BrdU) labeled newborn cells in the subventricular zone (SVZ) or ventricular zone (VZ) of adult rats. **Methods:** 13-14 weeks old Sprague Dawley (n=7) male rats were injected with BrdU and were perfused 24 hours after the injection. We used BrdU antibody immunohistochemistry to determine that mitogenic activity and BrdU labeled cells counted under microscope. **Results:** In the ependymal cells at VZ of lateral and 3rd ventricles were not seen BrdU labeled nucleus. In contrast, in the SVZ of lateral and 3rd ventricles were seen BrdU labeled nucleus. In the SVZ of lateral ventricles was seen BrdU labeled nucleus more significantly different than in the SVZ of 3rd ventricles with the statistical analysis (P<0.001). **Conclusion:** In the VZ of lateral and 3rd ventricle was not detected mitotic activity. In contrast, in the SVZ of lateral and 3rd ventricle was detected mitotic activity. In the SVZ of lateral ventricles was detected more mitotically active than in the SVZ of 3rd ventricles.

Key words: Subventricular zone, ventricular zone, mitogenic region, adult rat, brain, BrdU

Genel Tıp Derg 2007;17(2): 77-80

Erişkin memeli sinir sisteminde kök hücrelerinin bulunmadığına ve bu nedenle yaşlılık, hasar ve

hastalık nedeniyle yitirilen beyin hücrelerinin yerini yenilerinin alamayacağına inanılıyordu. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, erişkin memeli beyinin çeşitli bölgelerinde mitotik aktivite gösteren hücreler saptanmıştır. Embriyonik dönemde beyin ventriküler zonundaki (VZ) nöroepitel kök hücreler, nöron ve gliaların büyük çoğunluğunu meydana getirir. Erişkinde ise ependimal hücrelere dönüşen VZ nöroepitel kök hücrelerinin proliferasyonuna

Yazışma adresi: Dr. Sibel Köktürk, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Fatih-İstanbul

e-posta: skokturk@mynet.com

ileri sürülmüştür. Bunun tersine bazı araştırmalarda ise ependimal hücrelerin erişkinde de bölünmeye devam ettiği bildirilmiştir. Son yıllarda yapılan diğer çalışmalarda, erişkin memelilerde nöron gelişiminin, lateral ventriküllerin subventriküler zonu (SVZ) ve hipokampus olmak üzere başlıca iki bölgede meydana geldiği belirtilmiştir. Kök hücreler, mitozla kendi kendilerini çoğaltabilme ve multipotansiyellik olmak üzere iki temel özelliğe sahiptir. Çalışmada kullanılan bromodeoksiuridin maddesi, mitotik hücrelerin deoksiribonükleik asitine katılarak bölünen ve daha sonra bölünmeye devam eden hücreleri işaretlemek için kullanılmaktadır.

Bu çalışma, erişkin sıçan beyininde lateral ve üçüncü ventriküllerin VZ ve SVZ'unda BrdU immünohistokimya tekniği kullanılarak mitozla bölünen hücre olup olmadığını saptamak ve istatistiksel açıdan değerlendirmek için yapıldı.

Yöntem

Hayvanlar ve doku hazırlanması

Bu çalışmada Sprague Dawley cinsi 7 adet erkek sıçan (260-300 g) kullanıldı. Hayvanlar 13-14 haftalık erişkin sıçanlardan seçildi. Bölünen hücreleri işaretlemek amacıyla, sıçanlara intraperitoneal olarak tek doz BrdU (50 mg/kg, Sigma, St. Louis, United States) enjeksiyonu yapıldı. Hayvanlar BrdU enjeksiyonundan 24 saat sonra, sodyum pentobarbital (45 mg/kg, intraperitoneal) anestezisi altında, normal salini takiben % 4 formaldehit tespit solusyonuyla (5 ml/g) intrakardiyak yoldan perfüzyon yöntemiyle tespit edildi. Hayvanların beyinleri çıkartıldıktan sonra 24 saat % 4 paraformaldehit tespit solusyonunda tespit edildi. Beyinler daha sonra artan etanol serilerinden geçirilerek suyu alındı, ksilende şeffaflandırıldı ve parafinde sertleştirildikten sonra parafin kalıplara döküldü.

İmmünohistokimyasal boyama

Beynin ventral hipokampal seviyesinden geçen seri koronal kesitlerden, 10 kesit atlayarak 5 µm kalınlığında kesitler lamlara alındı. Kesitler 24 saat 45 °C'de etüvde bekletildi. Kesitler daha sonra ksilende bekletilerek parafini giderildi ve azalan etanol serisi ile distile sudan geçirildi. İmmünohistokimyasal boyamada ultravision detection sistem (anti-fare, HRP/DAB, Neomarkers, Fremont, Canada) kit kullanıldı. Kesitler fosfat

tamponlu salinde yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk hidrojen peroksit blok solusyonunda, 30 dk 4N hidroklorik asitte bekletildi. Kesitlere daha sonra etüvde 37 °C'de, 10 dk tripsin uygulandı. Kesitler oda sıcaklığında 5 dk ultra V blok solusyonunda bekletildikten sonra 30 dk BrdU Ab-2 (Clone BRD.2, NeoMarkers, Fremont, Canada) antikoruyla inkübe edildi. Kesitler daha sonra oda sıcaklığında 10 dk anti-tavşan biotinli keçi solusyonu ve streptavidin peroksidaz solusyonunda inkübe edildi. Kesitler diaminobenzidin (DAB) kromojeniyle muamele edildikten sonra hematoksilin ile zıt boyaması yapıp kapatma ortamıyla kapatıldı.

Boyama özgüllüğünün kontrolü

Pozitif kontrol: Hazır olarak temin edilen BrdU işaretli barsak doku kesiti (MS-1848-PCS, Neomarkers, Fremont, Canada) kullanıldı.

Negatif kontrol: Doku kesitinin üzerine BrdU antikorunun uygulandığı aşamada antikor yerine distile su damlatıldı.

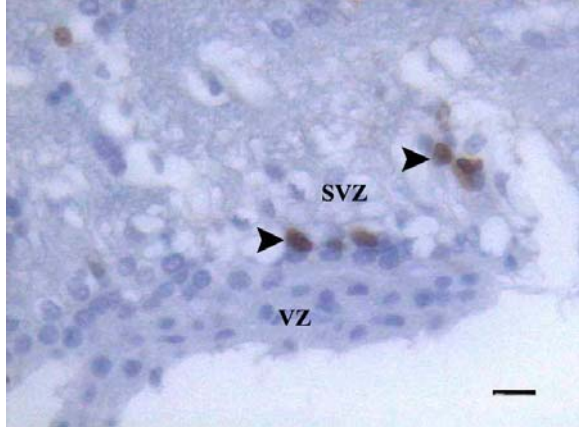
Hücre sayımı

Her hayvandan lateral ve üçüncü ventrikülü içeren aynı beyin bölgesinden geçen 7 ayrı kesitte, ışık mikroskopunun x40'lık büyütmesi kullanılarak BrdU işaretli hücrelerin sayısı saptandı. İstatistiksel değerlendirme için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc TUKEY testi kullanıldı. Boyanan kesitler olympus marka ışık mikroskopuna monte edilmiş video kamerada fotoğraflandı.

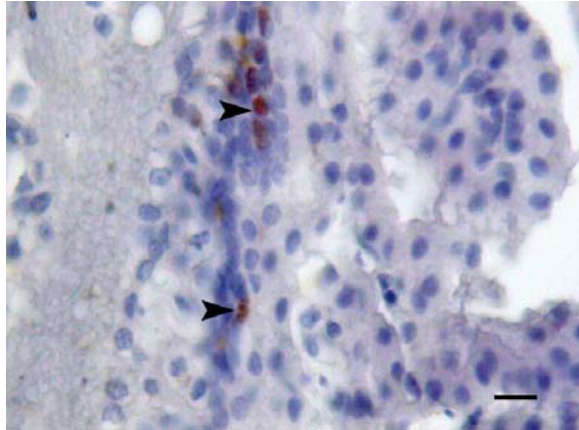
Bulgular

Lateral ventriküllerin VZ bölgesi, ependimal hücrelerin büyük yuvarlak nukleusları, multisilyaları ve açık sitoplazması sayesinde SVZ'dan ayırt edildi. Lateral ventriküllerin VZ'ünü oluşturan ependimal hücrelerde BrdU işaretli nukleus gözlenmedi (Şekil 1). Lateral ventrikülleri döşeyen tek tabakalı VZ'un hemen altında yer alan SVZ'da ise BrdU işaretli nukleuslar gözlendi (Şekil 2). Üçüncü ventriküllerin VZ'undaki ependimal hücrelerde de BrdU işaretli nukleus gözlenmedi. Üçüncü ventriküllerin SVZ'u da BrdU işaretli nukleuslar içeriyordu (Şekil 3). Lateral ve üçüncü ventriküle ait SVZ bölgelerindeki BrdU işaretli nukleus sayısı tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve post-hoc TUKEY testi ile değerlendirildiğinde, lateral ventriküllerin SVZ'u ile

üçüncü ventriküllerin SVZ'u arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($P<0.001$, Tablo 1).



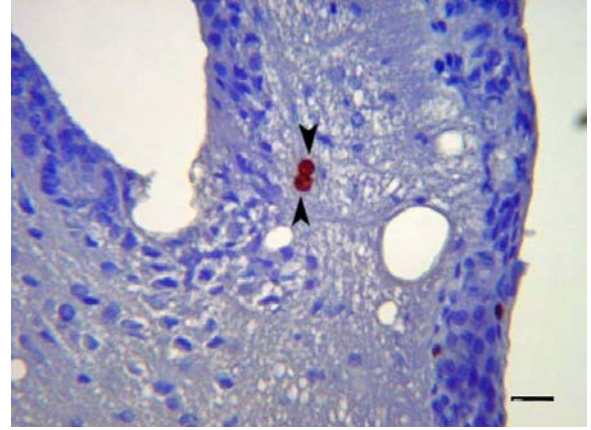
Şekil 1. Lateral ventrikülün VZ'unda BrdU işaretli nukleus gözlenmemektedir. SVZ'unda okbaşları BrdU işaretli nukleusları göstermektedir. Bar, 10 μ m



Şekil 2. Lateral ventrikülün SVZ'undaki BrdU işaretli nukleuslar görülmektedir (okbaşları). Bar 10 μ m.

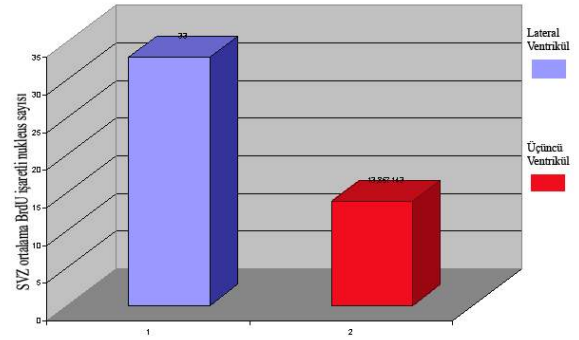
Tartışma ve sonuç

Son yıllarda erişkin memeli beyninin çeşitli bölgelerinde mitotik aktivite gösteren hücrelerin varlığıyla ilgili çalışmalar yapılmaktadır (1-3). Imamoto ve ark (4) genç sıçanlara 7 saat aralıkla uyguladıkları üç timidin [H^3] enjeksiyonundan sonra, lateral ventriküldeki ependimal hücrelerde işaretlenme olmadığını bildirmişlerdir (4). Kerns ve Hinsman (5) erişkin sıçanlara uyguladıkları iki timidin [H^3] enjeksiyonundan sonra, üçüncü ventriküldeki ve spinal kordun sentral kanalındaki ependimal hücrelerde işaretlenme tespit



Şekil 3. Üçüncü ventrikülün SVZ'undaki BrdU işaretli nukleuslar görülmektedir (okbaşları). Bar, 10 μ m

Tablo 1. Grafikte lateral ve üçüncü ventriküle ait SVZ bölgelerindeki BrdU işaretli nukleus sayılarının ortalamaları görülmektedir. Mavi sütun Lateral ventriküle ait ortalama BrdU işaretli nukleus sayısını, kırmızı sütun üçüncü ventriküle ait BrdU işaretli nukleus sayısını göstermektedir. Bölgeler arasındaki fark ANOVA ve post-hoc TUKEY testi ile değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($P<0.001$).



etmemişlerdir (5). Bu bulguların tersine, bazı çalışmalarda erişkin memelilerde ependimal hücrelerin bölünmeye devam ettiği bildirilmiştir. Kraus-Ruppert ve ark (6) 4 haftalık farelere 30 günlük bir periyotta timidin enjeksiyonu uyguladıktan sonra, önbeyindeki ependimal hücrelerin yaklaşık % 22 kadarında işaretlenme meydana geldiğini bildirmişlerdir. Korr (7) 15 günlük, 5-7 haftalık farelere timidin enjeksiyonu uyguladıktan sonra lateral ventrikülün ependimal hücrelerinde işaretlenme olduğunu bildirmiştir (7). Johanson ve ark (8) 2-6 hafta süreyle erişkin farelerin

içme suyuna BrdU eklediklerinde, lateral ventrikülün lateral duvarını döşeyen ependimal hücrelerde işaretlenme saptamışlardır. Ependimal hücrelerin yavaş proliferasyon yapan nöron kök hücreleri olabileceklerini ileri sürmüşlerdir (8). Bu çalışmada hem lateral hem de üçüncü ventrikülün ependimal hücrelerinde işaretlenme gözlenmemiştir.

Erişkin memelilerde SVZ'un mitotik olarak aktif tabaka olduğu bildirilmektedir (9-11). Yeni oluşan hücrelerin SVZ olarak adlandırılan bölgede meydana gelip daha sonra serebral korteksin nöronlara farklılıklarını özel kısımlarına doğru göç ettikleri ileri sürülmektedir (12-14). Erişkin beyinde yeni hücrelerin meydana geliyor olması Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, felç ve travma gibi beyin hasarı ve hastalıklarının tedavisinde yeni bir tedavi yöntemi olasılığını ortaya çıkarmıştır. Böylece dejenerasyon veya hasarla kaybedilen hücrelerin yerine yenisi konabilecektir (15,16). Bu çalışmada hem lateral hem de üçüncü ventrikülün SVZ hücrelerinde işaretlenme gözlenmiştir. Lateral ventriküllerin SVZ'unda üçüncü ventriküllerin SVZ'una göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha fazla BrdU işaretli nükleus gözlenmiştir.

Sonuç olarak, lateral ventriküllerin SVZ'unun üçüncü ventrikülün SVZ'una göre mitotik olarak daha aktif bir bölge olduğunu saptadık. Tek bir enjeksiyonla ve 24 saatlik sürede yeni hücrelerin SVZ'da oluştuğunu ve bu bölgenin mitotik olarak aktif bir bölge olduğu gözlemlendi, ancak daha uzun bir süre ve çoklu BrdU enjeksiyonu yapılarak SVZ'da da mitotik bir aktivite olup olmadığını araştırmak için daha fazla çalışma yapılması gerektiği düşünüldü.

Teşekkürler

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir (Araştırma proje no: 1708/15082001). Çalışmanın çeşitli aşamalarındaki yardımlarından dolayı Azize Hardal Gümüşyazıcı ve Mediha Özeren'e teşekkürler.

Kaynaklar

1. Faiz M, Acarin L, Castellano B, Gonzalez B. Proliferation dynamics of germinative zone cells in the intact and

excitotoxically lesioned postnatal rat brain. BMC Neurosci 2005; 12:6-26.

2. Maekawa M, Takashima, N, Arai Y, Nomura T, Inokuchi K, Yuasa S, et al. Pax6 is required for production and maintenance of progenitor cells in postnatal hippocampal neurogenesis. Genes to Cells 2005;10: 100.
3. Sim FJ, Lang JK, Waldau B, Roy NS, Schwartz TE, Pilcher WH, Chandross KL, et al. Complementary patterns of gene expression by human oligodendrocyte progenitors and their environment predict determinants of progenitor maintenance and differentiation. Ann Neurol 2006; 59:763-79.
4. Imamoto K, Paterson JA, Leblond CP. Radioautographic investigation of gliogenesis in the corpus callosum of young rats. I. Sequential changes in oligodendrocytes. J Comp Neurol 1978;180:115-28, 132-7.
5. Kerns JM, Hinsman EJ. Neuroglial response to sciatic neurectomy. I. Light microscopy and autoradiography. J Comp Neurol 1973;151:237-54.
6. Kraus-Ruppert R, Laissue J, Burki H, Odartchenko N. Kinetic studies on glial, Schwann and capsular cells labelled with [3H] thymidine in cerebrospinal tissue of young mice. J Neurol Sci 1975; 26:555-63.
7. Korr H. Combination of metallic impregnation and autoradiography of brain sections. A method for differentiation of proliferating glial cells in the brain of adult rats and mice. Histochemistry 1978; 59:111-6.
8. Johanson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 1999; 96:25-34.
9. Levison SW, Goldman JE. Both oligodendrocytes and astrocytes develop from progenitors in the subventricular zone of postnatal rat forebrain. Neuron 1993; 10:201-12.
10. Ming, G.L. and Song, H.L. Adult neurogenesis in the different from the complex and ordered environment of mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci. 2005;28:223-50.
11. Abrous DN, Koehl M, Le Moal M. Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. Physiol Rev 2005;85: 523-69.
12. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM and Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. J Neurosci. 1997;1:5046-61.
13. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cell 1999; 97:703-16.
14. Seri B, Garcia-verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. J Neurosci. 2001; 21:7153-60.
15. Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH. Neurogenesis in the adult brain: New strategies for central nervous system diseases. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2004; 44: 399-421.
16. Pfeifer K, Vroemen M, Caioni M, Aigner L, Bogdahn U, Weidner N. Autologous adult rodent neural progenitor cell transplantation represents a feasible strategy to promote structural repair in the chronically injured spinal cord. Regenerative med. 2006; 1: 255-66.