

T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PRENATAL DÖNEMDE TRANSFORMİNG GROWTH FAKTÖR
- BETA (TGF- β)'YA YÜKSEK DOZ A VİTAMİNİNİN
ETKİLERİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK
BELİRLENMESİ**

118 282
118282

DOKTORA TEZİ
Dok. Öğr. NERİMAN ÇOLAKOĞLU

F. Ü TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TC. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. AYSEL KÜKNER

ELAZIĞ – 2002

ONAY SAYFASI



Prof. Dr. Halis ÖCAL

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi Standartlarına uygun bulunmuştur.



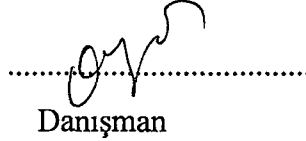
Prof. Dr. Aysel KÜKNER

Tıp Fakültesi

Histoloji – Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aysel KÜKNER



.....
Danışman

Doktora Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Ali OTLU (BAŞKAN)



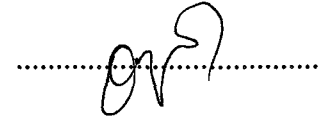
.....

Prof. Dr. Enver OZAN



.....

Prof. Dr. Aysel KÜKNER



.....

*Bugünlere gelmemde en büyük desteği sağlayan kıymetli **AILEM'e.***

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında bilgisinden görgüsünden faydalandığım, bilim arenasında ufkumu açan Danışman Hocam Prof. Dr. Aysel KÜKNER'e, yine yetişmemde emeği olan Temel Tıp Bilimleri Bölüm Başkanı Hocam Prof. Dr. Enver OZAN'a teşekkür etmeyi bir borç bilirim. Tez çalışmam sırasında yardımlarını gördüğüm mesai arkadaşlarım Öğretim Görevlisi Dr. Hakan ÖNER'e ve Araştırma Görevlisi Jale ÖNER'e teşekkür ederim. Yine doktora eğitimim sırasında destek olan Hocam Doç. Dr. Leyla CANPOLAT'a teşekkür ederim. Tez çalışmam sırasında yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım Yrd. Doç. Dr. Selim KUTLU, Öğretim Görevlisi Mete ÖZCAN ve Dr. Gülru ESEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu zorlu yolda da desteklerini her zaman arkamda hissettiğim aile fertlerime ayrı ayrı minnettarlığımı sunarım.

Tezime sağladığı maddi desteklerden dolayı Fırat Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu (FÜNAF)'na ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ	5
1.1 Beyin Anatomisi ve Histolojisi	5
1.2 Beyin Embriyolojisi	12
1.3 Kalp Anatomisi ve Histolojisi	20
1.4 Kalp Embriyolojisi	23
1.5 A Vitamini	27
1.6 Transforming Growth Faktor Beta (TGF- β)	32
2. MATERYAL METOT	36
2.1 Maternal All-Trans Retinoik Asit Uygulaması	37
2.2 İmmünohistokimya	38
2.3 İstatistiksel Analiz	38
3. BULGULAR	39
3.1 Yapısal Bozukluklar	39
3.2 Beyin ve Kalp dokusundaki TGF- β 2'nin İmmünohistokimyasal Olarak Boyanması	49
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	67
5. KAYNAKLAR	77
6. ÖZGEÇMİŞ	86

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 . Hazırlanan sıçan yeminin terkihi.

Tablo 2 . Yüksek doz A vitamininin ftal ağrlık üzerine olan etkileri.

Tablo 3 . Yüksek doz A vitamininin ftal tepe-kuyruk uzunluğu üzerine olan etkileri



ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1A** Gebeliğin 12. gününde normal gelişen embriyo.
- Şekil 1B** Prenatal 8. günde all-trans retinoik asite maruz kalan 12 günlük embriyo
- Şekil 2A** Gebeliğin 15. günündeki kontrol grubu fötüs.
- Şekil 2B** Gebeliğin 8. gününde all-trans retinoik asite maruz kalan 15 günlük fötüs.
- Şekil 2C** Prenatal 8. günde retinoik asite maruz kalan 15 günlük fötüs.
- Şekil 3A** Prenatal 18 günlük kontrol grubu fötüs.
- Şekil 3B** Prenatal 8. günde retinoik asite maruz kalan 18 günlük fötüs.
- Şekil 3C** Prenatal 8. günde retinoik asite maruz kalan 18 günlük fötüs.
- Şekil 4** Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 20 günlük fötüs.
- Şekil 5** Prenatal 8. günde retinoik asite maruz kalan yeni doğan.
- Şekil 6** Prenatal 15 günlük fötüsün ön ve orta beyin dokusundaki TGF- β 2 immünreaktivitesi.
- Şekil 7** Prenatal 15 günlük fötüsün orta beyindeki TGF- β 2 immün reaktivitesi.
- Şekil 8** Kontrol grubu 15 günlük fötüslerin arka beyin bölgelerindeki TGF- β 2 immün reaktivitesi.
- Şekil 9** Prenatal 15 günlük kontrol grubu fötüsün kranial gangliyonundaki TGF- β 2 immün reaksiyonu.
- Şekil 10** Gebeliğin 15. günündeki kontrol grubu fötüsün pleksus koroideusundaki TGF- β 2 immün reaksiyonu.
- Şekil 11** Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan 15 günlük fötüsün arka beyindeki TGF- β 2 immün reaksiyonu.
- Şekil 12** Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan 15 günlük fötüsün pleksus koroideusundaki TGF- β 2 immün reaksiyonu.
- Şekil 13** Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan 15 günlük fötüsün ön beyindeki mitotik aktivite ve nöronlar etrafındaki TGF- β 2 immün reaksiyon.
- Şekil 14** Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan fötüslerin kranial gangliyonlarındaki TGF- β 2 immün reaksiyonu.
- Şekil 15** Prenatal 18 günlük fötüsün ön beyin bölgesindeki TGF- β 2 immün reaksiyonu.
- Şekil 16** Prenatal 18 günlük fötüsün pleksus koroideusundaki immün reaksiyon.

Şekil 17 Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 18 günlük fötusun ön beyin bölgesindeki immün reaktivite.

Şekil 18 Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 18 günlük fötusun ön beyin bölgesinde başka bir alandaki immün reaksiyon.

Şekil 19 Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 18 günlük fötusun ön beyin bölgesinde pia mater ve nöronlardaki TGF- β 2 immün reaksiyonu.

Şekil 20 Prenatal 20 günlük kontrol grubu fötusun nöronlarındaki immün reaktivite.

Şekil 21 Prenatal 20 günlük kontrol grubu fötusun beyin dokusunun başka bir alanındaki immün reaktivite.

Şekil 22 Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan 20 günlük fötusun orta beyin bölgesindeki immün reaksiyon.

Şekil 23 Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 20 günlük fötusun nöronlarında görülen immün reaksiyon.

Şekil 24 Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan yeni doğan beynindeki TGF- β 2 (-) 'lik.

Şekil 25 Aynı kesitin daha büyük görünümü

Şekil 26 Kontrol grubu 15 günlük fetal kalpteki immün reaktivite.

Şekil 27 Kontrol grubu 18 günlük fötusun atrium bölgesi.

Şekil 28 Kontrol grubu 18 günlük fötusun ventrikül bölgesi ve perikardial tabakadaki immün reaktivite.

Şekil 29 Prenatal 18 günlük kontrol grubu fötusun endokardiyumundaki ve kan hücrelerindeki immün reaksiyon.

Şekil 30 Prenatal 20 günlük kontrol grubu fötusun miyokardial hücrelerindeki immün reaksiyon.

Şekil 31 Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 15 günlük fötusun kalbindeki TGF- β 2 (-) 'lik.

Şekil 32 Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan 15 günlük fötusun kalbindeki TGF- β 2 (-) 'lik.

Şekil 33 Prenatal 8. günde retinoik asite maruz kalan 18 günlük fötusun perikardiyumundaki TGF- β 2 immün reaksiyonu.

Şekil 34 Prenatal 12. günde retinoik asite maruz kalan fötusun endokard tabakasındaki immün reaksiyon.

Şekil 35 Prenatal 12. günde retinoik asite maruz kalan fötusun kalp dokusunun ventrikül tabakasındaki immün reaksiyon.

Şekil 36 Prenatal 12. günde retinoik asite maruz kalan 20 günlük fötusun perikardiyumundaki immün reaktivite.

Şekil 37 Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan fötusun miyokardial hücrelerindeki immün reaktivite.



ÖZET

Transforming growth faktör β (TGF- β) izoformları hücre sel büyüme ve farklılaşmayı, ekstraselüler matriksin sentezlenmesini ve immüniteyi düzenleyen polipeptidlerdir. Benzer şekilde, retinoidler proliferasyon, farklılaşma, görme, üreme ve embriyonik gelişim gibi bir çok fizyolojik olayda önemli rol oynamaktadırlar. Bu çalışmanın amacı farklı iki gelişim periyodunda yüksek doz retinoik asitin embriyonik gelişim üzerine ve beyin ve kalp dokularında TGF- β 2'nin immünohistokimyasal olarak işaretlenmesi üzerine etkilerinin araştırılmasıdır.

Çalışmada 52 adet Wistar cinsi dişi sıçan kullanıldı. Ratlara her sabah vajinal smear yapıldı. Proöstrusta olduğu belirlenen dişiler aynı günün akşamı erkek ratlar ile 1:1 eşlendi. Ertesi sabah yapılan vajinal smearde sperm (+) olan sıçanlar gebeliğin 0. gününde sayıldı. Deney grubu gebe sıçanlara gebeliklerinin 8. ve 12. günlerinde tek doz zeytin yağında eritilen 60 mg/kg dozda all-trans retinoic acid oral yoldan verildi. Kontrol grubu sıçanlara sadece zeytin yağı verildi. Kontrol grubu ve deney grubu sıçanlar gebeliklerinin belli günlerinde servikal dislokasyon ile öldürüldü. Uterusları açılan sıçanların implantasyon ve rezorpsiyon bölgeleri sayıldı. Fötüslerin ağırlıkları tartıldı, tepe-kuyruk uzunlukları ölçüldü. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. All-trans retinoik asitin etkisiyle oluşan yapısal bozukluklar incelendi. Embriyolar ışık mikroskopik takip serilerinden geçirilip parafin bloklar hazırlandı. Kalp ve beyin dokusundan alınan kesitlere avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile TGF- β 2 immünohistokimyasal boyama yapıldı.

Gebeliğin erken dönemlerinde uygulanan all-trans retinoik asitin ekzensefali, eksoftalmus, abdominal duvar defektleri ekstremitelerde kısalık gibi gelişim bozukluklarına yol açtığı görüldü.

Yapılan immünohistokimyasal çalışma sonucunda TGF- β 2 immün reaksiyonunun gebelik gününe ve prenatal 8. günde uygulanan all-trans retinoik asitin etkisine bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edildi. Gebeliğin 8. gününde uygulanan retinoik asitin 15. günde beyin dokusunda immün reaksiyonda azalmaya, 18. günde ise artışa yol açtığı görüldü. Gebeliğin 12. gününde

uygulanan retinoik asitin beyin dokusunda TGF- β 2 işaretlenmesinde belirgin bir değişiklik oluşturmadığı ve kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği tespit edildi.

Kalp dokusundaki immün reaktivite gebeliğin 20. günü dışındaki gruplarda endokardial ve perikardial tabakalarla sınırlı idi. Prenatal 20 günlük fetal kalplerde miyokardial hücrelerde de immün reaksiyon gözlemlendi. Fakat uygulanan yüksek doz retinoik asitin kalp dokusundaki TGF- β 2 işaretlenmesinde azalmaya yol açtığı görüldü.

Sonuç olarak, gebeliğin erken periyodlarında uygulanan all-trans retinoik asitin şiddetli malformasyonlara yol açtığı saptandı. TGF- β 2'nin beyin ve kalp dokularındaki işaretlenmesinin, gebelik gününe ve erken gelişim periyodunda uygulanan yüksek doz all-trans retinoik asitin etkisine bağlı olarak değişiklik gösterdiği gözlemlendi.



ABSTRACT

Type β transforming growth factors (TGF- β) are a family of polypeptides that regulate cell growth and differentiation, extracellular matrix formation and immun function. Similarly, retinoids are important for multiple physiological proceses such as cell proliferation and differentiation, vision, fertility and embryonic development. The aim of this study was to investigate teratojenic effect of high dose retinoic acid on two different gestational period and interaction between retinoic acid and TGF- β during embryonic development.

Fifty two adult Wistar female rats used in this study. For mating, female rats were controlled with vaginal smear every morning and was after determination of proeustrus cycle the females were paired 1:1 with male rats. At the next day morning, following the mating procedure was designated gestation day (GD) 0 if sperm was detected in the vaginal smear. Pregnant rats were gavage fed single dose 60 mg/kg body weighth of all-trans retinoic acid (atRA) suspended in olive oil on 8 day or 12 day of gestation. Control animals were given comparable volume of olive oil. Control pregnant rats and pregnant rats retinoic acid administered were killed with cervical dislocation during certain gestational days. Their uteri were removed and the number of implantation and resorption site were recorded. Conceptus were removed from the uterus and weighed and examined for external gross malformations. Then fixed with Bouin's solution and crown-rump length was measured. Data were statistically analysed. Embryos were embeded in paraffin wax and the distribution of TGF- β 2 protein in heart and brain tissue was evaluated by immunohistochemical staining using the avidin-biotin-peroxidase method.

Many malformations including exencephali, exophthalmus, abdominal wall defect, extremity reduction defect, were observed in this experimental study depend on exposed the all-trans retinoic acid at early development period.

Using immunohistochemical methods, we determined the expression of TGF- β 2 and the effects of retinoic acid on TGF- β 2 expression. It was observed that expression of TGF- β 2 varies depend on gestation day and effects of retinoic acid . It was observed in this study that fetal brain had immun reaction with TGF- β 2. Depend on all-trans retinoic acid, expression of TGF- β 2 reduced at gestation day 15, however expression of TGF- β 2 was remarkably increased at gestation day 18 by all-trans retinoic acid which was administred at gestation day 8. Retinoic acid, which was administred on gestation day 12, did not have any significant effect on TGF- β 2 expression. Fetal brain of these groups immun staining resembled with control groups.

TGF- β 2 staining in heart tissue particularly restricted with endocardial and pericardial layer except from on gestation day 20. In fetal heart tissue belong to prenatal 20-day fetus showed immune reaction in the miyocardial cells too. But excess retinoic acid lead to decreasing of immune reaction in the heart tissue.

As a result, all-trans retinoic acid lead to severe congenital malformtion at early gestational day. Immunohistochemical expression of TGF- β 2 was changed depending upon gestation day and effects of all-trans retinoic acid in brain and heart tissues.

1. GİRİŞ

1.1 BEYİN ANATOMİSİ ve HİSTOLOJİSİ

İnsan beyni 1400 gr olup tüm vücut ağırlığının %2'si kadardır. Beynin düşünebilme, hafıza, şuurulluk gibi önemli fonksiyonları vardır. Bunların yanısıra çevremizdeki ve vücudumuzdaki tüm uyarılar ilgili reseptörler tarafından alınarak, sinir impulsları şeklinde beyne iletilir. Beyin gelen bu bilgileri inceler, değerlendirir ve sonunda korteksinde duyu olarak anlamlandırılır (6).

ENCEPHALON (BEYİN)

I- Rhombencephalon (Arka Beyin)

1-Myelencephalon (bulbus = medulla oblongata)

2- Metencephalon (pons)

3- Cerebellum (beyincik)

II – Mesencephalon (Orta Beyin)

III- Proencephalon (Cerebrum , Ön Beyin)

1- Diencephalon

2- Telencephalon

Sinir sistemi dışarıdan gelen uyarılara cevap veren ve aktif olan diğer hücrelere uyarı ileten nöron adı verilen milyonlarca hücreden oluşmaktadır. Sinir sisteminde nöronların yanısıra nöroglia adı verilen destek hücreleri de yer almaktadır (22).

Sinir sistemini oluşturan sinir dokusunun iki işlevi vardır.

1 - Isı ve ışık gibi sensorik uyarıcıların ya da organizmanın iç ve dış ortamında meydana gelen mekanik ve kimyasal değişimlerin doğurduğu bilgileri almak, analiz etmek, kıymetlendirmek ve bunları sistemin bir kısmından diğer kısmına gönderen bir iletişim ağı oluşturmak.

2 – Organizmanın özellikle motorik visseral, endokrin ve zihinsel aktiviteler gibi birçok işlevlerini doğrudan ya da dolaylı olarak organize ve koordine etmektir (81).

Nöronlar fonksiyonlarına göre üç gruba ayrılırlar. Uyarımları merkezi sinir sisteminden ya da ganglionlardan periferdeki kas veya bezlere ileten nöronlara motor ya da efferent nöronlar denir. Vücudun organlarından, dokularından veya

çevreden aldığı uyarımları merkeze ileten nöronlara afferent veya duyu nöronları denir . Merkezi sinir sistemindeki diğer nöronlarla iletişim kuran nöronlara ise ara nöronlar denir (22, 37, 81).

Sinir hücreleri hücre gövdelerinden yayılan uzantıların sayılarına göre de multipolar nöronlar, bipolar nöronlar, unipolar (psödounipolar) nöronlar olmak üzere 3 gruba ayrılırlar.

Multipolar nöronlar, bir aksona, iki ya da daha çok dendrite sahiptirler. Motor nöronlar ve ara nöronlar multipolar nöronlardır. Multipolar nöronların dendritleri ve hücre gövdeleri hücrenin alıcı (reseptör) kısımlarıdır. Akson ise hücrenin iletili kısmıdır ve plazma membranı uyarımların iletilmesi için özelleşmiştir. Sinir hücresinin iletili kısmı olan aksonun son kısmı diğer hücreleri etkileyen çeşitli transmitter maddeler içerir.

Bipolar nöronlar, bir aksona ve bir dendrite sahiptirler. Retinada ve vestibulokohlear sinirin gangliyonunda bulunurlar. Nöroblastlar da çoğunlukla bipolar nöronlardır. Bipolar nöronlar tad, işitme ve denge gibi duyarları algılayan reseptör hücrelerle sinapslar yaparlar.

Unipolar (psödounipolar) nöronlarda akson iki parçaya ayrılmıştır. Sensorik nöronlar unipolardır. Sensorik nöronlar merkezi sinir sistemine yakın dorsal kök gangliyonu içinde yerleşmişlerdir. Aksonların bir kolu periferiye uzanırken diğeri merkezi sinir sistemine gider. Unipolar nöronlar gelişmeleri sırasında bipolar nöron halinde iken, gelişimlerini tamamladıktan sonra unipolar hale gelirler . Bu nedenle psödounipolar nöronlar da denir (81).

Nöronların sitoplazmasına nöroplazma, nöroplazmanın akson içinde kalan kısmına ise aksoplazma denir. Nöronlar protein salgılayan hücrelerin özelliklerine sahiptir. Hücre gövdesi genellikle iri, belirgin çekirdekçik ile ökromatik çekirdeği olan yapıdadır. Sinir hücresinin perikaryonu bazik boyalarla yoğun olarak boyanan thionine boyaları ile metakromazi gösteren inklüzyonlara sahiptir. Bu inklüzyonlara Nissl cisimcikleri denir. Nissl cisimcikleri granüllü endoplazma keselerinden ibarettir. Perikaryon ayrıca çok sayıda mitokondriyon, Golgi kompleksi, lizozom, mikrotubuluslar, nöroflamanlar, veziküller ve inklüzyonlara da sahiptirler. Nissl cisimcikleri ile serbest ribozomlar, Golgi kompleksleri, dendritler içine kadar yayılırlar fakat aksonlar içinde bulunmazlar. Nöronlar

memelilerde bölünüp çoğalamazlar. Yaşadıkları süre içinde DNA replikasyonu göstermeden aktivitelerini sürdürürler.

Elektron mikroskopik incelemede, Nissl cisimciklerinin granüllü endoplazma kesecikleri ile bağımsız ribozom ve polizomlardan oluştuğu görülmektedir. Ergastoplazmada hem yapısal proteinler hem de sinirsel uyarıcılar (nörotransmitterler) sentezlenir. Nörotransmitterler perikaryondan sinir sonlarına gönderilir. Bu işte nörotubulus ve muhtemelen nöroflamanlar rol oynamaktadır. Nöroflamanlar intermediyer tipte flamanlardır. Nörofibriller perikaryon içinde birbirini çaprazlayarak çeşitli yönlerde seyrederek hücreyi desteklemekle ve madde iletimi ile görevlidirler.

Dendritler, uyarımları diğer sinir hücrelerinden ya da çevreden alan nöronal uzantılardır. Genellikle hücre gövdesinin çevresinde yer alırlar. Aksonlardan daha kalın çaplıdır ve miyelinsizdirler. Gittikçe inceliyor ve yoğun bir şekilde dendritik dallanmalar şekillendirirler. Dendritik dallanmalar nöronun uyarımları alıcı yüzey alanını artırır.

Aksonlar, uyarımları diğer sinir hücrelerine ya da alıcı hücrelere iletirler. Bir nöronun sadece bir aksonu vardır. Akson hücre gövdesinin yakınında birden fazla sayıda yan kollar verebilir. Aksonun kollara ayrılması hedeflerinin çevresinde daha yoğundur. Miyelinli aksonlar uyarımları miyelinsizlerden daha hızlı iletirler. Aksonun rejenerasyon gücü vardır. Merkezi sinir sisteminde aksonların çoğunluğu, özellikle substansiya alba'da miyelin kılıfı denilen ve lipidlerden zengin bir tabaka ile sarılırlar. Miyelin %80 lipid, %20 oranında ise protein içerir. Sinir sisteminin miyelinizasyonu doğumdan sonra gerekli olduğu sürece devam eder (81).

Sinir dokusu, entegre bir iletişim ağı şeklinde vücuda dağılmıştır. Anatomik olarak sinir sistemi beyin ve omurilikten oluşan merkezi sinir sistemi ile sinir lifleri ve küçük sinir hücre kümeleri olan sinir gangliyonlarından oluşan periferik sinir sistemine ayrılır (37).

MERKEZİ SINIR SİSTEMİ

Merkezi sinir sistemi beyin, beyincik ve medulla spinalisten oluşur. Bu organlar ise beyaz ve gri maddeden oluşurlar. Beyaz madde çoğunlukla miyelinli

sinir lifleri , aralarda uzanan miyelinsiz lifler ve nöroglial hücreler yer almaktadır . Beyaz renk , aksonları çevreleyen miyelinin bol olmasından kaynaklanmaktadır . Gri maddede nöral hücre gövdeleri, dendritler, miyelinsiz aksonlar ve nöroglial hücreler yer almaktadır. Miyelinli aksonların bu bölümde yer almamasından dolayı bu bölge gri renkte görülür.

Beyin ve beyincikte gri madde periferde (korteks) yer alırken, beyaz madde derin kısımda yer alır. Medulla spinalis 'de ise beyaz madde periferde, gri madde iç kısımda yer almaktadır (24).

SEREBRAL KORTEKS

Serebral hemisferlerin periferindeki gri madde bir çok gyrus ve sulkus'a katlanarak serebral korteksi oluştururlar. Beynin bu kısmı öğrenme, hafıza, bilgi analizi, motor cevabın başlatılması ve duyuşal sinyallerin bütünleşmesinden sorumludur.

Serebral korteks, içerdığı nöronal hücrelerin morfolojisine göre 6 tabakaya ayrılır . En yüzeysel tabaka pia mater'in hemen altında uzanırken, en derin tabaka beyaz madde ile sınır teşkil eder. Bu tabakalar

- 1 – Moleküler tabaka:** Bu tabakada en çok beynin diğer bölgelerinden köken alan sinir sonları, horizontal hücreler ve nöroglia hücreleri yer alır.
- 2 – Eksternal granüler tabaka:** Granül (stellate) hücreler ve nöroglial hücreler yer alır.
- 3 – Eksternal piramidal tabaka:** Nöroglial hücreler ve büyük piramidal hücreler yer alır.
- 4 – İnternal granüler tabaka:** İnce bir tabakadır. Bu tabaka küçük granül hücreleri , piramidal hücreler ve nöroglia hücrelerinden oluşur . Bu tabaka serebral korteksin hücre yoğunluğunun en çok olduğu tabakadır .
- 5 – İnternal piramidal tabaka:** En büyük piramidal hücreleri ve nöroglia hücrelerini içerir . Bu tabaka hücre yoğunluğunun en az olduğu tabakadır .
- 6 – Multiform tabaka:** Bu tabakada Martinotti hücreleri adı verilen değişik multiform hücreleri ve nöroglia hücreleri yer alır (24).

NÖROGLİA

Nöroglial hücreler, nöronları mekanik ve metabolik olarak destekler ve korur. Sinir sisteminde nöronların 10 katı kadar nöroglia hücresi vardır. Nöroglial

hücreler birbiri ile gap junctionlar ile bağı olmalarına rağmen sinir impulslarını yaymaz ve onlarla reaksiyona girmezler. Merkezi sinir sistemi'nde bulunan nöroglial hücreler astrositler, oligodendrositler, mikroglia ve ependim hücreleridir. Periferik sinir sisteminde de nöroglial hücre olduğu düşünülen schwann hücreleri yer almaktadır (24).

ASTROSİTLER: Nöroglial hücrelerin en büyüğüdür ve protoplazmik ve fibröz astrositler olmak üzere iki farklı tipi vardır (24). Astrositler embriyonik gelişim sırasında gelişen sinir hücrelerine yol göstermekte ve nöronal elementlerin daha spesifik özellik kazanmalarında rol oynamaktadırlar (90). Protoplazmik astrositler, merkezi sinir sisteminin gri maddesinde yer alır. Fibröz astrositler ise çoğunlukla beyaz maddede yer alır (24).

Protoplazmik Astrositler : Protoplazmik astrositler bol sitoplazmaya , büyük bir çekirdeğe ve kısa uzantılara sahiptir . Bu uzantıların bir kısmı vasküler ayaklar şeklinde damarlarda sonlanır. Bazı küçük protoplazmik astrositler nöronal hücre gövdelerine bitişik bulunurlar.

Fibröz Astrositler : Fibröz astrositlerin ökromatik sitoplazmaları vardır. Birkaç serbest ribozom glikojen ve az sayıda organelleri vardır. Bu hücrelerin uzantıları genellikle dallanma yapmaz ve uzundur. Bu uzantılar pia mater ve kan damarları ile birlikte bulunur. Fakat bazal laminaları aracılığı ile bu yapılardan ayrılır.

Astrositler nöronal metabolizma sonucu oluşan artıkları ve K^+ iyonu gibi iyonları, glutamat ve α - aminobutirik asidi sindirir. Astrositler ayrıca norepinefrin ve vasoaktif intestinal peptid (VIP) gibi nörotransmitterlerle uyarıldıklarında kendi glikojen depolarından glikoz salarak serebral kortekste enerji metabolizmasına katılırlar. Astrositler merkezi sinir sisteminin hasarlı bölgelerinde skar dokusu oluştururlar ve hasarlı bölgenin iyileşmesine yardımcı olurlar (24).

OLİGODENDROSİTLER : Astrositlere benzemekle birlikte onlardan daha küçüktürler ve fazla dallanmayan daha az sayıda uzantıları vardır . Merkezi sinir sisteminin en koyu boyanan nöroglia hücreleridir ve hem gri hem de beyaz maddede yer alır. Oligodendrositlerin küçük bir nükleusu, sitoplazmalarında bol granüllü endoplazmik retikulum, çok sayıda serbest ribozom , mitokondri ve golgi

kompleksi vardır . Özellikle perinükleer zonda ve uzantılarda mikrotubuller de yer almaktadır (24).

MİKROGLİA HÜCRELERİ : Küçük koyu boyanan hücrelerdir. Sitoplazması azdır, ovalden üçgen şekline değişen nükleusu ve düzensiz kısa uzantıları vardır (24). Bu hücreler, normal MSS'de az sayıda bulunurken, MSS yaralanması ve hastalıklarında proliferasyon olarak aktif fagositik hale gelirler. Nöral tüpten köken alan diğer nöroglia hücrelerinin aksine mikroglia hücreleri kemik iliğinden köken alır ve mononükleer fagositik hücre popülasyonunun bir üyesidir ve MSS paransimine kandan geçmektedir. Mikroglialar MSS gelişimi sırasında ölen hücre artıklarını yok etmektedirler (80). Mikroglia hücreleri aktif hale geçtiklerinde antijen sunan hücreler olarak davranırlar ve bağışıklığı düzenleyici sitokin salgılayarak merkezi sinir sistemi lezyonlarının yolaçtığı hücre artıklarını uzaklaştırırlar (7).

EPENDİM HÜCRELERİ : Ependimal hücreler beyin ventriküllerini ve medulla spinalisin kanalis sentralisini döşeyen alçak prizmatikten kübiğe değişen epitel hücreleridir . Gelişen sinir sisteminin embriyonik nöroepitelyumundan köken alır . Sitoplazmalarında bol miktarda mitokondri ve ara filaman demetleri yer alır . Bazı bölgelerde silyalıdırlar ve bu sayede serebrospinal sıvının hareketini kolaylaştırırlar. Beyin ventriküllerindeki bazı ependimal hücreler modifiye olarak serebrospinal sıvı salgılayan koroid pleksus'un yapısına katılırlar (24).

SCHWANN HÜCRELERİ : Bu hücreler oligodendrositlerle aynı işleve sahip olmakla birlikte periferik sinir sistemindeki aksonların etrafında yer alırlar. Bir schwann hücresi ancak bir aksonun çevresinde miyelin kılıf oluştururken, oligodendrositler birden fazla nöron ve bunların uzantıları etrafında kılıf oluşturacak şekilde dal verebilmektedirler (7).

KOROİD PLEKSUS

Bol miktarda pencere kapiller içeren piamater ve tek katlı kübik ependim hücreleri birlikte beynin 3., 4. ve lateral ventrikülleri içine uzanarak koroid pleksusu oluştururlar. Koroid pleksus medulla spinalis'in kanalis sentralisini ve beyin ventriküllerini dolduran beyin – omurilik sıvısını (BOS) üretir. BOS beyin ventriküllerinde subaraknoid alanda, perivasküler alanda ve medulla spinalis'in

kanalis sentralisi içinde dolaşır. BOS düşük miktarda protein içerir fakat Na , K ve klorid iyonları bakımından zengindir (24).

MENİNKSLER

Beyin ve medulla spinalis meninks denilen 3 tabaka bağ dokusu ile çevrilidir.

1 – Dura Mater : Beyin bölgesinde yoğun kollagenöz bağ dokusu olan dura mater, periostal dura ve meningeal dura diye iki tabaka halindedir. Periostal dura, dış katmandır, osteoprogenitör hücrelerden, fibroblastlardan, kollagen fibril demetlerinden oluşmaktadır. Dura'nın iç tabakası olan meningeal dura ise sitoplazması koyu boyanan fibroblastlardan oluşmaktadır. Bu tabakada küçük kan damarları mevcuttur.

Spinal dura, vertebral kanalın duvarına yapışık değildir. Epidural alan dura ile vertebral kanal kemiği arasındaki alandır. Bu alan epidural yağ ve venöz pleksus ile doludur (24).

2 – ARAKNOİD : Meninkslerin bu tabakası damarsızdır . Fakat içinden damarlar geçmektedir. Bu tabaka fibroblast, kollagen ve birkaç elastik fibrilden oluşmaktadır. Fibroblastlar birbirine gap junction ve desmozomlarla bağlıdır. Araknoid tabakasında 2 bölüm ayırt edilmektedir. Bunlardan biri dura materle temas halindeki tabaka, diğeri ise piamaterle temas kuran trabeküler hücrelerden oluşan trabeküler tabakadır. Bu trabeküler hücreler farklılaşmış fibroblastlardır (24). Trabeküller arasındaki boşluklar beyin – omurilik sıvısı ile dolu olan ve subdural aralıktan tamamen ayrı olan subaraknoid aralığı yaparlar. Bu aralık merkezi sinir sistemini travmadan koruyan hidrolik bir yastık oluşturur. Subaraknoid aralık beynin ventrikülleri ile iletişim kurar.

Bazı bölümlerde araknoid duramater içindeki venöz sinüslerde sonlanan kıvrımlanmalar oluşturacak şekilde duramater'i delerek geçer. Bu kıvrımlanmalar venlerin endotel hücreleri ile örtülüdür ve bunlara araknoid villuslar denir. Bu villuslar BOS'u venöz sinüslerde bulunan kana geri çekmektedirler (7).

3 – PIA MATER : Pia mater meninkslerin en içte olanıdır. İnce bir tabaka halindedir ve araknoid trabekül hücrelerine benzeyen modifiye fibroblast hücrelerinden oluşmaktadır. Bu tabakada pial hücreler tarafından kuşatılan

bolmiktarda kan damarı bulunmaktadır. Bunlara ilaveten makrofajlar, mast hücreleri ve lenfositler de yer almaktadır.

Pia ile nöral doku arasında çok iyi kolagenöz ve elastik ipliklerin uzandığı bir bölüm yer alır. Pia nöral dokudan, nöroglial hücreler aracılığı ile ayrılır. Pia ile çevrili olan kan damarları nöral dokuya penetre olur ve daha sonra merkezi sinir sisteminin karakteristik damarları olan devamlı kapillerler şekillenir. Nöral doku içinde astrositlerin uzantıları pia'dan daha çok kapillerler ile çevrilidir (24).

1. 2. BEYİN EMBRİYOLOJİSİ

Embriyonun ilkel eksenini belirleyen ona diklik veren notokordun tavanı embriyonik ektoderme, tabanı ise embriyonik endoderme sıkıca yapışıktır. Üçüncü haftanın sonunda notokord orofarengeal membrandan, pirimitif çizgiye kadar uzanan, gelişmesi tamamen bitmiş bir yapı olarak dikkati çeker. Notokord ve paraksiyal mezoderm üstündeki embriyonik ektodermi indükler ve ektoderimde **nöral plak** adı verilen terlik biçimli kalınlaşma meydana gelir (54, 93). Üçüncü haftanın sonunda , nöral plağın lateral kenarları, plağın orta kısmında nöral yarık oluşmasıyla nöral katlantıları yaparlar . Nöral katlantılar, embriyonun gelecekteki boyun bölgesinden başlayarak , sefalo – kaudal yönde , orta çizgide birbirlerine yaklaşırlar ve birleşirler. Birleşme sonunda, nöral tüp oluşur. Nöral tüp anterior nöropor ve posterior nöropor yolu ile geçici olarak amnion boşluğu ile ilişkidir. Anterior nöropor yaklaşık 25. günde posterior nöropor ise 27. günde kapanmaktadır. Merkezi sinir sistemi başlangıçta iki tarafı kapalı bir tüp biçimindedir. Kaudal kısmı dardır ve omurilik adımı alır. Beyin veziküllerini içeren sefalik kısmı ise daha geniştir (9, 93) .

Nöral katlantılar nöral tüpü oluştururken, herbir nöral katlantı boyunca yer alan nöroektodermal hücreler epitel özelliklerini kaybederler ve karşı katlantıdaki komşu hücrelerle birleşirler. Nöral tüp, yüzey ektoderminden ayrılırken, bu nöroektoderm hücreleri, nöral krista hücreleri olarak dorso-lateral yönde, nöral tüpün her iki tarafına göç ederler. Kısa süre sonra nöral tüp ile yüzey ektodermi arasında , yassılmış ve düzensiz bir kitle, nöral kristayı meydana getirirler. Nöral krista, daha sonra kranial ve spinal duyu ganglionlarını meydana getirdiği, nöral tüpün dorso – lateral bölgelerine göç eden, sağ ve sol iki kısma ayrılır. Buradan

köken alan nöral krista hücreleri, lateral ve ventral yönlerde göç ederek, mezenşim içine dağılırlar (54).

BEYİN VEZİKÜLLERİ

Kranial bölgede, nöral katlantıların birleşmesi ve anterior nöroporun kapanmasıyla 4. haftada beynin gelişeceği ön beyin (prosencephalon), ara beyin (mesencephalon) ve arka beyin (rombencephalon) adı verilen üç ilkel beyin vezikülü oluşmaktadır. Gelişimin 5. haftasında ön beyin **telensefalon** ve **diensefalon'a** ve arka beyin de **metensefalon** ve **miyelensefalon'a** bölünürler. Böylece 5 sekonder beyin vezikülü meydana gelmiş olur .

Dördüncü haftada, embriyonik beyin hızla büyür ve beynin kıvrılması ile ventrale eğilir. Embriyonun kıvrılması ile birlikte orta beyin bölgesinde, orta beyin fleksürü, omurilik ve arka beyinin birleşme yerinde ise servikal fleksür oluşmaktadır. Daha sonra da arka beyindeki bu fleksürler arasında beynin eşit olmayan büyümesi ile pontin fleksürü oluşur.

I - ARKA BEYİN (Rombencephalon)

Pontin fleksürünün gelişmesiyle birlikte arka beyin, kaudalde **miyelensefalon** ve rostralde **metensefalon** kısımlarına ayrılır. Miyelensefalon **medulla oblongata'yı**, metensefalon ise **pons ve serebellum'u** meydana getirirler . Arka beyin boşluğu, 4. ventrikül ve medullanın kaudal kısmı ise santral kanalı oluşturur .

Miyelensefalon'un kaudal kısmı medulla spinalis'e benzer. Nöral tüp lümeni, küçük bir santral kanal oluşturur. M. spinalistekilerden farklı olarak miyelensefalonadaki alar plaklardan köken alan nöroblastlar marginal zona göç ederler ve medial olarak gracile çekirdekler denilen, ayrı gri cevher bölgelerini ve lateral olarak da cuneate çekirdekleri oluştururlar. Bu çekirdekler, medulla spinalisten medullaya giren traktuslar karşıtı yapılarla ilişkilidirler. Medullanın ventral bölgesi, gelişmekte olan serebral korteksten inen kortikospinal liflerden ibaret olan ve piramidler diye adlandırılan, bir çift lif demetlerini içerir.

Miyelensefalonun rostral kısmı geniş olup , özellikle pontin fleksür karşıtı oldukça yassıdır. Pontin fleksür , medullanın duvarlarını laterale hareket ettirmeye neden olur. Medulla duvarları laterale hareket ederken, alar plaklar, basal

plakların lateralinde yer alırlar. Plakların konumları değişirken , genellikle, motor çekirdekler duyu çekirdekleri medialinde gelişirler. Medullanın basal plaklarındaki nöroblastlar, omurilikdeki gibi, motor nöronlara farklı olarak, çekirdekleri yaparlar .

Metensefalon duvarları, **pons** ve **serebellumu** yapar ve boşluğu, 4. ventrikülün superior parçasını meydana getirir. Miyelensefalonda olduğu gibi, her basal plaktaki nöroblastlar, motor çekirdeklere farklıdır. Metensefalon basal plağının marginal bölgesi, genişleyerek, serebrum ve serebellum korteksi ile medulla spinalis arasında bağlantı sağlayan liflere bir köprü işlevi görmesinden dolayı, metensefalonun bu parçasına **pons** adı verilir. Ponsda sinir lifleri dışında metensefalon ve miyelensefalonun alar plaklarından kaynaklanan, ponti çekirdekler de bulunur .

Serebellum ise 6. haftanın sonunda metensefalonun rombik dudaklarından gelişmeye başlar. Rombik dudaklar bir çift serebellum plağı oluşturmak için kalımlaşır. İkinci ayda, büyüyen rombik dudağın kranial parçası, orta çizgide karşı karşıya gelerek birleşirler ve 4 . ventrikülü örten tek bir taslak oluştururlar. Serebellum iki tür gri cevhere sahiptir; internal derin serebellum çekirdekleri grubu ve eksternal serebellum korteksidir. Serebellum derin çekirdek ve korteksi , karmaşık bir yapılanma ile üretilirler. Nöral tüp her yerde olduğu gibi, metensefalik rombik dudakların nöroepiteli, ventriküler manto ve marginal tabakaları yapmak için , çoğalmaya uğrar. Üçüncü ayda ikinci bir hücre tabakası marginal bölgenin en üst tabakasında dikkati çeker. Çoğalan ventriküler tabaka, iç germinal tabaka ve çoğalan ikinci tabaka ise dış germinal tabaka ya da dış granüler tabaka olarak adlandırılırlar. Dördüncü haftadan başlayarak, iç ve dış germinal tabakalar farklı serebellum nöroblast popülasyonlarını üreten hücre bölmelerine uğrar. İç germinal tabaka , serebellum çekirdeklerini yapmak için göç eden ilkel çekirdek nöroblastları meydana getirir . Ayrıca bu tabaka , kortekse göç eden iki tür nöroblast üretir : Purkinje hücrelerini yapmak için, ilkel purkinje nöroblastları ve golgi hücrelerini yapmak için de Golgi nöroblastları farklıdır. Her ilkel Purkinje nöroblast, kortekse doğru göç ederken, serebellum çekirdeklerindeki nöroblastlarla sinaptik teması devam ettiren bir akson çıkartır. Purkinje hücreleri, tam dış germinal tabaka altında, belirgin bir

Purkinje hücre tabakası yaparlar. Dış germinal tabaka, serebellum korteksinin, basket nöroblastlarını, granül nöroblastlarını ve satellit nöroblastlarını üretmektedir. Granül nöroblastlar, bazı basket nöroblastlar ve satellit nöroblastlar, ergin korteksin granüler tabakasını yaptıkları yer olan Purkinje hücrelerinin altında yer alırlar. Basket ve satellit hücrelerin yüzeyde ya da Purkinje hücreleriyle yakın ilişkide kalması, tamamlanmış korteksin, moleküler tabakalarını yapar. Bu arada, germinal tabakalar astrositlere farklanan serebellum glioblastlarını ve oligodendrositlerini üretirler .

Serebrum ve serebellum kortekslerini , omurilik ile birleştiren sinir lifleri metensefalonun ventral bölgesi marjinal tabakasını boydan boya geçer. Beyin sapının bu bölgesi, sinir lifleri bandının orta çizgiyi çaprazlaması ve onun anterior ve lateral yüzlerinde iri bir kabartı yapması nedeniyle **Pons** diye adlandırılır.

KOROİD PLEKSÜSLER

Dördüncü ventrikülün epandim tavanı, arka beyinle ilişkili mezenşim kökenli vasküler piamater ile birlikte **tela koroidea**'yı yapar. Piamater'in aktif proliferasyonu sonucu tela koroidea, koroid pleksüs'e farklanır ve 4. ventriküle invagine olur. Benzer koroid pleksüsler 3. ventrikül tavanında ve lateral ventriküllerin medial duvarlarında da gelişirler.

Koroid pleksüsler, ventrikül sıvı salınımından sorumlu olup, beyin, omurilik ve meningeslerin **pia – araknoid** yüzeylerinden sıvı ilaveleri olduğunda, serebrospinal sıvı meydana gelir . Venöz sistem içine serebrospinal sıvı absorpsiyonu araknoid uzantıları olan araknoid villusları ile olur. Bu villuslar, araknoid epitellerinden ve sinus endotelinden köken alan ince hücresel bir tabakadan oluşur (93). Emriyonik 5. haftada serebrospinal sıvı şekillenmeye başlar (21).

II – ARA BEYİN (Mesencephalon)

Mesensefalon morfolojik açıdan, beyin veziküllerinin en ilkelidir. Her basal plak, iki grup motor çekirdek içerir. a) Göz kaslarını innerve eden okulomotor ve troklear sinirleri temsil eden, medial somatik efferent grup b)

Pupillanın sfinkter kaslarını innerve eden ve Edinger – Westphal çekirdekleri ile temsil edilen, küçük genel viseral efferent grup.

Her basal plağın marginal tabakası genişleyerek, **krus serebrileri** oluşturur. Kruşlar , serebral korteksten, pons ve medulla spinalisteki daha aşağı merkezlere inen sinir tellerinin , geçiş yolu olarak işlev görürler. Erginde bu teller kortikospinal, kortikobulbar ve kortikopontin traktlar olarak bilinmektedirler.

Basal plaklardan köken alan nöroblastlar, tegmentum'daki nöron gruplarını oluştururlar. Substansiya nigra , serebral pedinkül'e komşu gri cevherin kalın bir tabakası olup , yine basal plaktan farklıdır .

Mesensefalon'un alar plakları, başlangıçta, bir orta çizgi çöküntüsü ile ayrılmış, iki kabartı şeklinde görülürler. Gelişmenin ilerlemesiyle her bir kabartıyı, bir enine yarık anterior ve posterior kollikuluslara ayırır. Posterior kollikuluslar, işitme refleksi için snaps nakleden istasyonlar olarak işlev görürken, anterior kollikuluslar, vizüel impulslar için refleks ve uyum merkezleri olarak görev yaparlar. Kollikuluslar, nöroepitel hücreleri tarafından üretilen nöroblastların, üstteki marginal yüzeye göç etmesiyle şekillenir (93).

III – ÖN BEYİN (Proencephalon)

Anterior nöroporun kapanmasıyla ön beyin kenarlarında iki lateral **optik vezikül** meydana gelir. Optik sinirler ve retina bu veziküllerden köken alırlar. Daha dorsalde ve ön kısımda da **serebral veziküller** veya **telensefalik veziküller** adı verilen ve serebral hemisferlerin kökenini oluşturan yapılar gelişmektedir. Bu yapılar lateral ventriküllerde yer almaktadırlar. Ön beyin anterior bölümünden **telensefalon**, posterior bölümünden ise **diensefalon** gelişmektedir. Telensefalon ve diensefalon boşlukları 3. ventrikülün oluşumuna iştirak ederler.

1 – Diensefalon : Üçüncü ventrikülün lateral duvarlarında epitalamus, talamus ve hipotalamus gelişir. Talamus epitalamik sulkus ile epitalamustan, hipotalamik sulkus ile hipotalamustan ayrılır. Talamus üçüncü ventrikülde hızlıca gelişir ve beyin yaklaşık % 70'ini üçüncü ventriküllerin gri maddeleri arasında köprü kurarak birleştirir.

Hipotalamus diensefalik duvarın ara zonundaki nöroblastların proliferasyonu ile şekillenir. Daha sonra endokrin ve homeostasis ile ilgili

aktiviteleri olan çok sayıda çekirdek gelişir. Bu arada hipotalamusun ventral yüzünde mamiller cisim adı verilen bezelye büyüklüğünde bir çift çekirdek şekillenir.

Diensefalonun lateral duvarının dorsalinden epitalamus gelişir . Epitalamik kabartı başlangıçta büyük olmakla birlikte daha sonra küçülmektedir. **Pineal cisim** diensefalonun tavanının kaudal kısmının median divertikulumu olarak gelişir . Duvarındaki hücrelerin çoğalmasıyla solid koni şekilli beze dönüşür.

Hipofiz : Hipofiz bezi, oral ektoderm tavanının yukarı doğru büyümesinden ve diensefalon nöroektoderminin aşağı doğru büyümesinden gelişir. Bez farklı iki yerden geliştiği için tamamen iki farklı doku yapısındadır. Adeno hipofiz bölümü ağız ektoderminden gelişirken , nörohipofiz nöroektodermden köken almaktadır. Hipofiz bezi 4. hafta ortalarında Ratke kesesi denilen bir divertikül, ağız tavanından dorsal çıkıntı yapar ve beyine doğru büyür. Ağız ektoderminden gelişen hipofiz bölümleri, pars anterior, pars intermedia ve pars tüberalis adeno hipofiz olarak adlandırılır.

Beyin nöroektoderminden köken alan hipofiz bezi parçası, nörohipofiz olarak bilinir. **Infindubulum**, median eminence, infindubulum sapı ve pars nervosa'yı oluşturur . Başlangıçta duvarları ince olan infindubulumun distal sonu, kısa sürede, nöroepitel hücrelerinin çoğalmasıyla solid olur. Bu hücreler daha sonra nöroglia hücrelerine benzeyen pituisitlere farklılaşırlar (54) .

2 – Telensefalon : Telensefalon, serebral vezikül denilen iki lateral divertikülden ve bir median parçadan oluşmaktadır. Serebral hemisferler bu divertiküllerden köken almaktadır. Telensefalonun orta parça boşluğu, 3. ventrikülün anterior uç parçasını oluşturur. Hemisfer boşlukları, başlangıçta foramen monro yolu ile diensefalon boşluğu ile geniş ölçüde ilişkiindedir .

Serebral hemisferler, 5. hafta başında, proensefalonun lateral duvarının iki taraflı dışa çıkıntısı şeklinde ortaya çıkar. İkinci ayın ortalarında, hemisferlerin bazal kısmındaki manto tabakasında artma başlar. Daha sonra bu bölge foramen monro tabanına ve lateral ventrikülün lumenine doğru çıkıntı yapar. Hızla büyüyen bu bölge enine kesitlerde, çizgili bir görünüme sahip olduğundan **korpus striatum** olarak adlandırılır. Hemisfer duvarın geri kalan kısmı geçici olarak oldukça ince kalır ve serebral korteksin taslağı, **pallium** olarak adlandırılır.

Hemisfer duvarının diensefalon tavanına yapıştığı bölgede, nöroblastlar gelişmez ve burası ince kalır. Burada, hemisfer duvarı, vasküler mezenşim ile örtülü tek katlı endoderm hücre tabakasından ibarettir ve birlikte koroid pleksüs'ü yaparlar. Hemisfer duvarı koroid fissür denilen çizgi üzerinde kalınlaşarak hipokampus'u yapar. Olfaktor işlevi olan bu yapı, lateral ventriküle doğru çıkıntı yapar. Hemisferler giderek büyüyerek, diensefalon, ara beyin ve arka beyini kaplar. (54) Sonunda hemisferler orta hatta birbiriyle birleşirler. Serebral hemisferlerin anterior, dorsal ve inferior yönlerde büyümeye devam etmesi sonucu, frontal, temporal ve oksipital lobların şekillenmesi olaylanır. Fötal hayatın sonlarında, serebral hemisferlerin yüzeyi o denli hızlı büyür ki, hemisferler yüzeyinde fissürlerle ve sulkuslarla ayrılan çok sayıda giruslar, görülür .

SEREBRAL KORTEKS GELİŞMESİ

Serebral hemisfer nöroepiteli, başlangıçta nöral tüpün diğer bölümlerine benzer şekilde çoğalma, göç etme ve farklılaşma ile ergin korteksi oluşturur . Bu gelişme kortekste bölgeden bölgeye değişiklik gösterir.

Ventriküler tabakanın çoğalan hücreleri, düzenli bölünme serilerine uğrayarak, nöroblast dalgaları oluştururlar. Bu nöroblast dalgaları, perifere göç ederler ve korteks tabakalarını yaparlar. Genelde kortikal tabakalar, derinden yüzeye doğru bir düzende yer alırlar. Nöroblast üretimi azalınca, ventriküler tabaka , farklı glioblastları ve sonra da endodermi oluşturur.

Ventriküler tabakadan üretilen ilk nöroblastlar, nöron fibrillerini yaparlar. Bu fibriller, ventriküler tabakalardan yukarıya uzanarak, yüzeysel ince marginal tabakayı oluştururlar. Bu ince fibril tabakası, gelişen piyanın hemen altında yer alır ve korteksin en yüzeysel tabakası olur. Bu nöroblastların pek çoğu, daha sonra dışa doğru göç ederek, bir ara bölge meydana getirirler. Bu bölge, ventriküler ve marginal bölge arasında bulunur. Ara bölgeden bazı hücreler, ventriküler tabakadan üretilen yeni nöroblastlar, daha sonra dışa doğru göç ederek, geçici bir tabaka olan **kortikal plâğı** yaparlar. Kortikal plak, ara ve marginal bölgeler arasında oluşur.

SEREBRAL KOMMISSURLER

Erginde, sağ ve sol hemisferleri kommissurlar denilen bir çok sinir lif demetleri birbirine bağlar. İlk ortaya çıkan demet, anterior kommissurdur. Bu kommissur olfaktor bulbustur ve bir hemisferin koku ile ilgili bölümlerini karşı hemisferdekilere bağlama işlevini yürütür. İkinci olarak ortaya çıkan kommissür, hipokampal kommissürdür. Lifleri hipokampustan kaynaklanır ve diensefalonun tavan plağı yakınlarında, lamina terminalis'e katılır. Burdan da hipotalamus ve mamiller cisme uzanır.

Gelişimin 10. ayında ortaya çıkan bir kommissür olan korpus kallosum en önemli kommissürdür. Korpus kallosum sağ ve sol serebral korteksin koku ile ilgili olmayan bölgelerini birbirine bağlar.

Bu kommissürlerin dışında, pineal bez sapının tam altında ve rostralinde **posterior** ve **habenular** kommissürler ve optik kiazma denilen retinanın medial yarımından gelen lifleri içeren kommissür ortaya çıkmaktadır .

Ventriküller ve ara tabakalar arasında bulunan subventriküler bölgedeki nöroblastlar, ara bölgeyi geçerek periferiye göç ederler ve kortikal plak dibindeki **subplak** tabakasını yaparlar. Kortikal plak ve subplak birlikte, serebral korteksi meydana getirirler. Serebral korteks farklı hücre tabakalarından oluşmuştur. Ara tabaka, nöroblast hücre bedenlerinden kısmen yoksundur ve serebral hemisferlerin beyaz cevherine farklanır (93).

MENİNKSLER

Nöral tüpü çevreleyen mezoderm yoğunlaşır ve primitif meninksleri oluşturur. Primitif meninkslerin dış yaprağından **dura mater**, nöral krest hücrelerinin de iştirak ettiği iç yaprağından **pia-araknoid** meydana gelir. Bu tabakalar leptomeninksler diye isimlendirilir (21).

1. 3. KALP ANATOMİSİ ve HİSTOLOJİSİ

Kalp kastan yapılmış içi boş koni şeklinde bir organdır. Ağırlığı erkeklerde yaklaşık 280 ila 340 gr, kadınlarda ise 230 ila 280 gr arasında değişir. Perikardium denilen özel bir zar torba içinde bulunan kalp, göğüs boşluğunda mediastium medius'da, iki akciğer'in ön-alt kısımları arasında ve diafragma'nın üzerinde bulunur.

KALBİN DIŞ YÜZÜ : Kalp atrium dextrum, atrium sinistrum, ventriculus dexter ve ventriculus sinister olmak üzere dört boşluktan oluşur. Bu boşlukları birbirinden ayıran bölmelerin , dış duvara tutunduğu yerlerde oluklar bulunur. Bu oluklardan atriumla ventrikülleri birbirinden ayırana **sulcus coronarius** denilir. Ventrikülleri ayıran **sulcus interventricularis anterior**, facies sternocostalis (anterior) 'da bulunur ve kalbin sol kenarına daha yakındır. **Sulcus interventricularis posterior** ise, facies diafragmatica (inferior)'da bulunur ve kalbin sağ kenarına daha yakındır.

Koni şeklinde olan kalbin, taban kısmına **basis kordis**, kalbin ön-sol tarafa doğru yönelmiş olan tepe kısmına **apex cordis** denir.

KALBİN İÇ YÜZÜ : Kalb'i septum interatriale, septum interventriculare ve septum atrioventriculare, 4 boşluğa ayırır. Bu boşluklara atrium dextrum (sağ atriyum), atrium sinistrum (sol atriyum), ventriculus dexter (sağ ventrikül) ve ventriculus sinister (sol ventrikül) denilir. Kalbin iç yüzünde kenar şeklinde kas liflerinden oluşan kabartılar bulunur. Bunlardan atriumlardakilere **mm. pectinati**, daha kabarık olan ventriküllerdekine ise **trabecula carnea** denir (6) .

Kalp kardiovasküler sistemin pompasıdır. Kassel duvarı (miyokardiyum) kardiyak kaslardan oluşur. Süperior ve inferior vena kava sistemik kanı sağ atriyuma verir, kan burdan sağ atrioventriküler kapak (triküspit) aracılığı ile sağ ventriküle gelir. Kan burdan turunkus pulmonalis'e pompalanır. Kan, sağ ve sol pulmoner arterlere ayrılan turunkus pulmonaris'ten gaz değişimi için akciğerlere gönderilir. Akciğerlerden pulmoner venler vasıtasıyla sol atriyuma boşalan oksijenden zengin kan, sol atrioventriküler kapak (biküspit veya mitral) aracılığı ile sol ventriküle gelir. Sol ventriküldeki kan aort aracılığı ile bütün vücuda dağılır.

KALP DUVARININ KATMANLARI

Kalp duvarı endokardiyum, miyokardiyum ve epikardiyum olmak üzere üç katmandan meydana gelmiştir.

ENDOKARDİYUM : Endokardiyum, basit squamöz epitelin döşediği endotelyumdan oluşmaktadır. Endotelyumun altında kollagenöz ve elastik iplikler ve fibroblast kümeleri yer almaktadır. Daha derinde ise düz kas hücreleri ve elastik ipliklerin bulunduğu yoğun bağ dokusu bulunur. Endokardiyumun altında küçük kan damarları, sinir ve Purkinje hücrelerinin olduğu gevşek bağ doku tabiatında olan subendokardiyal tabaka yer almaktadır.

MİYOKARDİYUM : Kalbin ortada yer alan ve en kalın katmanıdır. Kardiyak kas hücrelerini içerir. Kas hücreleri kalp boşluklarını karmaşık spiral bir şekilde sarar. Bu hücrelerin bir kısmı fibröz kardiyak iskelete gömülürken, bir kısmı endokrin salgılama için, bir kısımda impuls meydana getirme ve iletmek için özelleşmiştir (24).

Kalp kasını oluşturan kas telleri bazı yönleri ile iskelet kası tellerine, bazı yönleri ile de düz kas tellerine benzerler. Miyofibrillerin enine çizgili olmasından ötürü, kalp kası telleri, iskelet kası tellerine benzerler. Kas tellerinin tek çekirdek içermeleri ve bu çekirdeklerin tellerin merkezine yerleşmeleri bakımlarından da kalp kası, düz kaslara benzer. Kalp kasını diğer kalp kası tellerinden ayıran özellikleri vardır. bu özelliklerden biri, kas tellerinin yan kollarla (kollaterallerle) birbirlerine bağlanmalarıdır. Böylece kalp kası, 3 boyutlu bir ağ sistemi meydana getirir. Kalp kası tellerinin birbirlerine bağlandıkları yerler, ışık mikroskobunda, Z bandlarından daha kalın diskler halinde görünürler. Bu diskler interkalat diskler olarak isimlendirilirler. Bu bağlantı yerleri aynı zamanda uyarıların hücreden hücreye geçmesini sağlarlar. Bağlantı yerlerine en belirgin olarak m. papillarisler'de rastlanır. İnterkalat diskler, komşu hücrelere ait Z disklerinin hizalarında bulunurlar (81). Disklerde başlıca 3 bağlantı kompleksi vardır. **Fasya adherens**, diskin transvers bölümlerinde özelleşmiş membran çıkıntılarıdır, terminal sarkomerlerde aktin filamanları için kanca işlevi görürler. **Makula adherensler**, sabit kasılma durumunda birbirlerinden tamamen uzaklaşmamaları için kalp kası hücrelerini bağlarlar. Diskin lateral bölümünde **gap junctionlar** komşu hücreler arasında iyonik süreklilik sağlarlar (7).

Kalp kası telleri, sarkoplazma retikulumu yönünden pek zengin değildirler; buna karşılık iskelet kaslarından çok daha fazla mitokondriyon içerirler .

Kalp kası telleri büyük çoğunlukla tek çekirdekli iseler de, iki çekirdekli olan teller de vardır. Kalp kası tellerinde çekirdek merkezde lokalize olmuştur (81).

Kalp atımı, süperior vena kava ve sağ atriyumun birleşme noktasındaki sinoatrial düğüm (pacemaker) tarafından kontrol edilir. Bu özel nodal kardiyak kas hücreleri dakikada 70 kez depolarize olur, impuls oluşturur ve bu impuls internodal yolla atriyum duvarı üzerinde yayılır, triküspit kapağın hemen üzerinde bulunan septal duvardaki atrioventriküler düğüme gelir (24). Özelleşmiş kas hücrelerinden oluşan atroventriküler düğüm sağ atriyum endokardiyumunun hemen altından uzanır. Purkinje hücrelerinin oluşturduğu atrioventriküler His demeti fibröz iskelete penetre olur ve sağ ve sol dal demetlerini oluşturmak üzere bölünür. Sol dal tekrar ikiye bölünerek iki fasikül oluşturur. Bu Purkinje hücre demetleri subendokardiyal tabakada kalbin apeksine kadar gidip ters istikamete yönelip kalp hücrelerine gap junctionlarla bağlanırlar. Bu düzenlenim, ventriküler kontraksiyon uyarısını, ilk önce kasılarak, kanı ventriküllerden dışarıya atmak zorunda olan kalbin apeksine doğru iletilmesini sağlar. Kontraksiyon dalgası sonra kalbin tabanına yönelir (pulmoner ve aort kapakları).

Otonom sistemin hem sempatik hem de parasempatik bölümleri kalbi innerve ederler ve kalbin tabanında geniş bir pleksus yaparlar. Sinoatriyal ve atrioventriküler düğümlere yakın yerleşimli ganglionik sinir hücreleri ve sinir lifleri bulunur. Bunlar sinoatrial düğümün görevi olan kalp atım uyarısını etkilememelerine karşın kalp ritmini etkilerler. Parasempatik uyarılar kalp vuruşunu yavaşlatırken, sempatik sinirler uyarı odağının ritmini hızlandırır (7).

EPIKARDİYUM : Perikardın visseral kısmını oluşturan epikardiyum içte fibröz ve dışta seröz tabakadan oluşmaktadır. Basit squamöz epitel ile döşelidir ve mezotelyum olarak bilinir. Koroner damarları, sinirleri ve gangliyonları içeren subepikardiyal tabaka gevşek bağ dokusu tabiatındadır. Kalbin yağ depolayan tabakasıdır.

Perikardiyal boşluk, perikardın seröz tabakasını ve visseral tabakasını kayganlaştırmak için az miktarda seröz sıvı içerir (24).

KARDİYAK İSKELET

Kardiyak iskelet üç temel komponent içeren yoğun bağ dokusundan oluşmaktadır. **Anuli fibrosi**, atrioventriküler delikler, pulmoner arter ve aortanın tabanı çevresindedir. **Trigona fibrosa**, özellikle küspal ve aortik kapakların civarında şekillenir. **Septum membranaceum**, interventriküler septumun üst kısmını oluşturur (24).

1. 4. KALP EMBRİYOLOJİSİ

Gelişmenin 19. gününde, embriyon diskinde nöral plağın kranial ve lateralinde endokard tüp'leri denilen bir çift vasküler yapı splanknik mezodermin kardiogenik bölgesinde gelişmeye başlar. Bu vasküler yapılar, vezikül oluşması ya da vaskülogenezis denilen bir olayla iki adet ince duvarlı endotel ya da endokard kalp tüplerini oluştururlar. Üçüncü hafta sonunda, embriyonun baş ve yanlardan kıvrılmasıyla, bu iki lateral endotel kalp tüpleri, torasik bölgede, orta çizgi boyunca bir araya gelerek birleşip tek bir primer endokard kalp tüpünü yaparlar.

Yirmi birinci günde uzayan kalp tüpünde; trunkus arteriosus, bulbus kordis, ventrikül, atrium ve sinus venozus yapıları ayırt edilmektedir. Trunkus arteriosus, kranial olarak, aorta arkuslarının çıktığı **aortik kese** ile devam eder. Geniş sinus venozus, sırasıyla koryon, vitellüs kesesi ve embriyodan umbilikal, vitellin ve kardinal venleri alır.

Primer kalp tüpü başlangıçta endotelle döşelidir ve 22. günde kalın bir splanknoplörük mezoderm kitlesi ile sarılır ve burdan iki yeni tabaka farklanır. Bunlar miyokardiyum ve gelişen miyokardiyum tarafından salgılanan hücreden yoksun matriks tabakası (kardiak jel) dir. Splanknoplörük mezoderm'in bu örtü tabakası miyoepikard veya epimiyokard örtüsü olarak adlandırılır. Bu tabaka yalnızca miyokard'ı meydana getirmez, aynı zamanda kalp duvarının dış tabakası olan **seröz epikard'ı** (visceral perikardium) da yapar. Epikardium, splanknoplörük mezoderminden bağımsız olarak meydana gelen ve sinus venozus ya da septum transversum bölgesinden kalbin yüzeyine göç eden mezotel hücreleri tarafından oluşturulur. Kalp tüpünün iç yüzünü döşeyen endotel örtüsü, endokardiumu yapar.

Gelişimin 23. gününde bulbus kordis ve ventrikül diğer bölgelerden daha hızlı büyüdüğü için, kalp tüpü kendi üzerine eğim yaparak U şeklinde bir **bulboventriküler** halka oluşturur. İlkel kalp eğim yaparken, atrium ve sinüs venozus, trunkus arteriosus, bulbus kordis ve ventrikülün dorsalinde yer alır. Bu evrede, sinus venozusta sağ ve sol iki boynuz gelişir. Eğilme 28. günde tamamlanır. Kimi araştırmacılar eğilmeyi kardiak jelin hidrasyonu veya hemodinamik güçlerin kontrol ettiğini belirtmektedirler . Yine kalbin eğilmesinde dönüşümlü olarak, aktif göç ya da miyositlerin yeniden yapılanması ve kontrollü bölgesel çoğalmasının etkili olduğu belirtilmektedir.

Eğilmenin sonunda, ileride gelişecek olan 4 kalp boşluğunun birbiriyle ilişkileri sağlanır. Daha sonraki gelişim sürecinde, bu boşluklar yeniden yapılanırlar ve aralarında uygun septum ve kapaklar oluşur. Kalp uzayıp eğim yaparken, giderek perikard boşluğuna invagine olur.

İLKEL KALBİN BÖLMELENMESİ

Atrioventriküler kanalın, ilkel atrium ve ventrikülün bölmelenmesi, 4. hafta ortalarında başlar ve temel olarak bitmesi 5. haftada gerçekleşir. Dördüncü haftada, endokard yastıkları, denilen şişkinlikler atrioventriküler kanalın dorsal ve ventral duvarında oluşurlar. Beşinci haftada, atrioventriküler endokard yastıkları birbirlerine yaklaşır, birleşirler ve atrioventriküler kanalı, sağ ve sol atrioventriküler kanallara bölerler.

İLKEL ATRİUMUN BÖLMELENMESİ

İlkel atrium, septum primum ve septum sekundum denilen iki septanın oluşması ve daha sonra modifikasyona uğrayıp, bu iki septumun birleşmesiyle sağ ve sol atriumlara ayrılır. Septum primum ayrıca endokard yastıkları ile de birleşir .

Gelişimin 28. gününde septum primum, birleşen endokard yastıklarına doğru büyür. Septum primum büyürken, endokard yastıkları ile arasında foramen primum oluşur. Septum primum endokard yastıkları ile birleştiğinde foramen primum kaybolur. Foramen primum kaybolmadan önce septum primum merkezinde programlanmış hücre ölümü ile oluşan delikler birleşerek foramen sekundumu oluşturur.

Septum sekundum, atriumun ventrokranial duvarından, septum primumun sağına doğru büyür. Bu septum 5. ve 6. haftalarda büyürken, giderek septum primumdaki foramen sekundum üzerine kayar. Septum sekundum atriumlar arasında foramen ovale'yi oluşturur. Doğumdan sonra foramen ovale kapanır ve septum primum ile septum sekundum birleşip atriumlar arasında tam bir bölme oluşturur.

İLKEİ VENTRİKÜLÜN BÖLMELENMESİ

İlkel ventrikül'ün sağ ve sol ventriküllere bölünmesi, ventrikülün tabanında, apekse yakın, median müsküler bir kabartı ile ilk kez dikkat çeker. Daha sonra, miyoblastlar çoğalarak, ventriküller arası septumun kalın müsküler kısmını oluşturur. Yedinci haftaya kadar, ventriküllerarası septumla, endokard yastıkları arasında ventriküllerarası delik bulunur. Bu delik, endokard yastıklarının, sağ ve sol bulbar çıkıntılarının birleşmesi ile 7. hafta sonunda kapanır.

Ventriküller arası septumun membranöz kısmı, birleşmiş endokard yastıklarının sağ tarafından çıkan bir doku uzantısından meydana gelir. Bu doku, aortikopulmoner septum ve ventriküllerarası septumun kalın müsküler kısmı ile birleşir. Ventriküllerarası deliğin kapanmasından sonra pulmonar trunkus sağ ventrikülle ve aorta sol ventrikülle iştirakte olur.

BULBUS KORDİS VE TRUNKUS ARTERİOZUS'UN BÖLMELENMESİ

Beşinci haftada , bulbus kordis duvarlarındaki mezenşim hücrelerinin aktif çoğalması **bulbar çıkıntılarının** oluşmasına neden olur. Benzer çıkıntılar, bulbar çıkıntılarla devam eden trunkus arteriozusta da oluşur. Bulbar ve trunkal çıkıntılarının spiral orientasyonu olasılıkla kanın ventriküllerden akımına neden olarak, bulbar ve trunkal çıkıntılar birleştiğinde spiral bir **aortikopulmoner septumun** oluşmasına neden olur. Bu septum bulbus kordis ve trunkus arteriozusu, aorta ve pulmoner trunkus gibi iki arteriyel kanala böler. Bulbus kordis, ventriküllerin duvarlarına katılır; ve ergin sağ ventrikülde, pulmoner trunkusun orjinini yapan konus arteriozus ya da infundibulum ile temsil edilir. Sol ventrikülde, bulbus kordis, aortik kapağın tam inferiorunde, ventrikül boşluğunun parçası olan aortik vestibülün duvarlarını yapar.

VENTRİKÜL DUVARLARININ GELİŞMESİ

Ventrikül duvarlarının oyulması kas demetlerinden oluşan bir ağ meydana getirir. Bunların bir kısmı **trabeküle karnealar** olarak kalıcı olurken, diğerleri **papiller kaslar** ve korda tendineaları yaparlar. Bu korda tendinealar papilla kaslarından, atrioventriküler kapaklara uzanırlar.

KALP KAPAKLARININ GELİŞMESİ

Kalp kapakları, subendokardial bağ dokusu çoğalmasının bir sonucu olarak şekillenir. Semilunar kapaklar aorta ve pulmoner turunk delikleri etrafındaki subendokard dokunun 3 adet kapak şişliklerinden gelişirler. Semilunar kapakların gelişmesi 9 . haftada tamamlanır.

Mitral ve triküspid kapaklar, atrioventriküler kanallar etrafındaki yerel mezenşim dokunun çoğalmasıyla gelişirler. Mitral kapak (biküspid), sol atrium ve sol ventrikül arasında yer alır. Triküspid kapak, sağ atrium ile sağ ventrikül arasında yer alır. Bu kapaklar ventrikül duvarındaki papiller kaslara, korda tendinealar aracılığı ile yapışırlar (93).

1.5 A VİTAMİNİ

Genel anlamda retinoidler olarak adlandırılan Avitamini ve A vitamini metabolitleri fizyolojik konsantrasyonlarda büyüme, hücrel farklılaşma, üreme (61, 62, 63, 68, 94), görme (61, 68, 94), immun cevabın oluşturulması (63) gibi organizmanın normal fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol oynamaktadırlar . Retinoidler aynı zamanda bir çok dermatolojik ve neoplastik hastalığın tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmaktadırlar (61, 94). Yemekle alınan A vitaminin oksidasyonu sonucu intra selüler olarak all-trans retinoik asit oluşur (61). Aktif A vitamini metaboliti olan all-trans retinoik asit omurgalıların embriyonik gelişimi sırasında hücrel farklılaşmada, merkezi sinir sistemi farklılaşmasında bir morfogjen olarak hareket etmektedir (95). All-trans retinoik asit farklılaşma ve morfogenezisin kontrolünde retinolden çok daha aktiftir (61). A vitamini mukopolisakkarit sentezi, glukoneogenezis, adrenal korteksin normal fonksiyon görmesi, steroid hormon sentezi ve lizozom stabilitesi gibi birçok fizyolojik olayda etkilidir (46). A vitamini ve onun prekürsörlerinden biri olan β -karotenin belli kanserlerin gelişmesini inhibe ettiği de bildirilmektedir (8, 73).

A vitamini eksikliğinde solunum sistemi epitelinde keratinizasyon, solunum yolu enfeksiyonu, üreme sistemi bozuklukları, yeni doğanda gelişme geriliği, kas iskelet anomalileri, embriyonik ölümler (73); gözde kornea hücrelerinde değişiklikler ile kuruma (8, 73), kseroftalmi, korneada bulanıklık, keratomalasi ve gece körlüğü meydana gelmektedir (8).

A vitamini günlük olarak metabolik ihtiyaçtan 50-500 kat kadar daha fazla alınırsa toksik etki göstermeye başlar. İnsanlarda tek doz 500 000 - 1 000 000 İÜ A vitamini alınından sonra ölümün meydana geldiği rapor edilmiştir. Kronik olaylarda anoreksi, kilo kaybı, ciltte kalınlaşma, dermatit, saç dökülmesi, hemoraji, spontan kemik kırıkları ve ölüm olayları görülmüştür. A vitaminin toksik etkilerine bağlı olarak fazla miktarda mukus salgılanır ve normal keratinizasyon inhibe olur (73). Vitamin A türevlerinin vücuttan eliminasyonu yavaştır (41).

Bir çok omurgalı türünde gelişimde tamamlayıcı rol oynayan retinoik asit, gebelik sırasında veriliş dönemi ve dozuna bağlı olarak teratojenik etki

göstermektedir (15). A vitamini ve analoglarının teratojenik etkileri, maternal plazmadaki miktarlarına ve plasental geçişlerindeki farklılıklara bağlı olarak da değişmektedir. Retinoidlerden all-trans retinoik asit maternal plazmada en yüksek değere ulaşmaktadır, onu 4-oxo-all-trans retinoik asit, 4-oxo-13-cis retinoik asit ve 13-cis retinoik asit izlemektedir. Embriyoda da yine en yüksek miktarda all-trans retinoik asit tespit edilmiştir (45).

Trans izomerler embriyoda, maternal plazmadaki konsantrasyonlarının %80'i kadar ve cis izomerlerden 30 kat daha fazla miktarda bulunmaktadırlar. Cis izomerlerin embriyodaki miktarı, maternal plazmadaki miktarlarından çok düşük düzeydedir (45, 60). Trans izomerlerin hem plasentada, hem yolk kesesinde ve hem de embriyoda cis izomerlerden daha yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu görülmüştür . Bu da trans izomerlerin bir yada daha fazla proteine bağlanarak kolaylaştırılmış şekilde taşındığı yönünde yorumlanmaktadır. All-trans retinoik asitin hem retinol bağlayan proteinlere (RBP) hem de hücrel retinoik asit bağlayan proteinlere (CRABP) yüksek oranda affinitesinin olduğu gözlenmiştir. 13-cis retinoik asitin ise CRABP'ye olan affinitesi oldukça düşük düzeydedir . RBP ise retinol ve all-trans retinoik asiti aynı oranda bağlarken 13-cis-retinoik asiti bağlamamaktadır. Bu durum cis ve trans izomerleri arasındaki plasental geçiş farklarını açıklamaktadır (45). Embriyo morfogenezisinde rol oynayan A vitamininin en aktif formu olan retinoik asitin (48) hücrel seviyesinin düzenlenmesinde, depolanmasında hücrel retinoik asit bağlayan proteinlerin rolü büyüktür (95). A vitaminini bağlayarak etkili olmasını sağlayan CRABP (hücrel retinoik asit bağlayan protein) ve CRBP (hücrel retinol bağlayan protein); embriyoların beyin, spinal kord, ekstremite tomurcuğu (48, 95), nöral krest hücreleri, kalp, nöral tüpün manto tabakasındaki nöroblastlar ve kommissural sistemin hücre gövde ve aksonlarında işaretlenmiştir. Buna paralel olarak A vitamini bu yapıların gelişmesinde ve farklılaşmasında etkili olmaktadır (48).

Retinoidlerin teratojenik gücü üzerinde birçok mekanizmanın etkili olduğu bildirilmektedir. Bunlar arasında hücre proliferasyonu, hücre ölümü ve hücre membran stabilitesi üzerinde spesifik etkiye sahip olması yer almaktadır. Retinoik asit programlanmış hücre ölümünü güçlendirerek teratojenik etkisini

göstermektedir. Hücre ölümündeki artışa bağlı olarak ekstremitelere mezomelik malformasyonlar, kraniofasial anomaliler meydana gelmektedir. Retinoik asit apoptozisi, genetik bilgiyi değiştirerek veya proteinlerin glikolizasyonuna yol açarak ya da lizozomal membranları labil hale getirip enzimlerin membranlardan sızıp hücrenin kendisini sindirmesine yol açarak artırmaktadır. Gebeliğin 11. gününde all – trans retinoik aside maruz kalan fötusların ekstremitelere kısılmalar, kemikleşme bozuklukları tespit edilmiştir . Birkısım araştırmacıya göre retinoik asit ekstremitte tomurcuğunda spesifik kartilaj proteoglikanlarının üretimini ve kondrogenezisi inhibe etmektedir. Ayrıca hücre proliferasyon oranını değiştirerek, nekroza yol açarak ve hyoluronik asit metabolizmasını etkileyerek kıkırdaklaşma üzerine sitotoksik etki göstermektedir (4).

Fötal gelişimin erken dönemlerinde (organogenezis) beyin ve nöroepitelyumda retinoik asit birikmesi meydana gelirken, gelişimin geç dönemlerinde bu birikim tespit edilmemiştir (18, 45). Nöroepitelyum ve kranial nöral krest hücreleri yüksek oranda retinoik asit bağlama kapasitesine sahiptirler. Buna bağlı olarak retinoik asit yoğunluğunda bu yapılarda retinoik asit birikimi ve bu birikim sonucunda da kraniofasial anomaliler şekillenmektedir. Retinoik asit bağlayan proteinlere bağlanımın yüksek veya normalden düşük düzeyde olması bu hücrelerin metabolizmasını, proliferasyonunu ve migrasyonunu değiştirmekte ve birçok MSS ve kraniofasial malformasyonlara yol açmaktadır (18).

A vitamini analogları glikoproteinlerin ve glikozaminoglikanların sentezlenmesini de etkilemektedirler (29). Normal fizyolojik şartlarda nöral krest hücreleri, glikoprotein ve glikozaminoglikan sentezi yapmaktadırlar. Sentezlenen bu maddelerin nöral krest hücrelerinin migrasyonunda etkili oldukları bildirilmektedir. Bu bağlamda retinoidler, nöral krest hücrelerine direkt ya da matriks üretimini engellemek suretiyle indirekt yolla etkiyerek (18, 29), teratojenik sonuçlar doğurmaktadır. Özellikle embriyogenezisin erken dönemlerinde glikoprotein ve glikozaminoglikan sentezi üzerine olan ters etki sonucu nöral krest hücreleri hasar görmekte ve migrasyonları bozulmaktadır (18). Yüksek doz A vitamininin, nöral krest hücrelerinin göçünü inhibe etmesi, bu hücrelerin yapısına katıldığı dokularda gelişme bozukluğu meydana getirmektedir (49). Nöral krest hücreleri spinal, kranial ve otonom gangliyonlarını, periferik

sinir sistemi Schwan hücrelerini, dermisin pigment hücrelerini, brankial arkusun kas, bağ ve kemik dokularını, böbreküstü bezi medullasını, beyin ve omurilik örtülerini oluştururlar (93). Nöral krest hücreleri kalpte; kardiak ganglia, aortikopulmoner septum ve aortun tunika mediasının yapısına da katılmaktadır . Buna bağlı olarak da A vitamini yetersizliği veya fazlalığında aortik ark defektleri ve kalbin septasyonunda bozukluklar meydana gelmektedir (49). Retinoik asit, memeli kalbinin bulboventriküler bölümlerinde ve endokardial yastıkcıklarındaki mezenşimal hücrelerde sitopatik değişikliklere, hücre ölümlerine ve endotelyumda değişikliklere yol açmaktadır. Kalp morfogenezisi esnasında ektomezenşimal hücrelerin sayıca azalması (29) özellikle kalbin septasyonunda bozukluklara (29, 49) ve aortik ark defektlerine yol açmaktadır (26, 29, 49).

Gebeliğin 1 . trimesterinde 13 – cis retinoik asit ile yapılan maternal tedavi sonucu ; spontan abortlarda (26, 29), kongenital malformasyonlarda ve ölüm oranında artış meydana gelmektedir (29). Meydana gelen malformasyonlar arasında ; kulak anomalileri , yarık damak (16, 26, 29, 87), mikrognathia (29), timik defektler ve merkezi sinir sistemi (MSS) anomalileri (16, 29, 87) yer almaktadır. MSS dışında, A vitamininden etkilenen dokular çoğunlukla mezenşimal dokunun bir bölümü olan kranial nöral krest hücrelerinden köken alan dokulardır (29, 87). Yapılan çalışmalarda, A vitamininin kranial nöral krest hücre gelişimini inhibe ettiği (95) ve bu hücrelerin migrasyonu üzerine ters etki gösterdiği saptanmıştır (26, 29, 95).

Gebeliğin erken dönemlerinde (4 - 10. haftalarda) alınan A vitamininin teratojenik etkilerine bağlı olarak hidrosefalus (26, 49), mikrosefali , serebellar mikro/makro dysgenesis (26), konotrunkal kalp defektleri (29), ventriküler septal defekt (26, 29), atrial septal defekt ve Fallot teratolojisini içine alan kardiak defektler (26, 95) ve hipoplastik adrenal korteks (26), göz defektleri, spina bifida (49) gibi gelişim bozuklukları görülmektedir. Geç blastula veya erken nörula evresinde embriyoların retinoik asite maruz kalması sonucunda anterior nöral yapılarda (ön beyin, ara beyin, gözler) gelişme geriliği meydana gelmektedir (49).

İmplantasyon öncesi periyotta yüksek dozda A vitaminine maruz kalan deneklerin blastosist evresinde incelenmesi sonucunda deney ve kontrol gruplarının hücre sayısında, mitotik indekslerinde ve kromozom yapılarında

önemli bir fark saptanmamıştır. Blastosistlerde herhangi bir etkilenmenin gözlenmemesi A vitamininin yarılanma ömrünün uzun olmasından kaynaklanmaktadır. Fakat gelişimin daha sonraki dönemlerinde, A vitamininin annedeki mevcudiyetini sürdürmesi nedeniyle organogenezis sırasında toksik etki gösterip, gelişim bozukluklarına yol açmaktadır (72).

1.6 TRANSFORMİNG GROWTH FACTOR BETA (TGF - β)

Transforming growth factor (TGF)'lerin alfa ve beta olmak üzere iki tipi mevcuttur . TGF – alfa, yapısal ve biyolojik etkileri bakımından Epidermal Growth Factor (EGF) ile benzerlik göstermekte ve EGF reseptörlerine bağlanabilmektedir . TGF- β ise moleküler yapı ve biyolojik aktivite açısından ve sahip olduğu kendine spesifik reseptörleri ile TGF – alfa'dan farklıdır (35, 55). TGF- β ailesine ait 40'in üzerinde üye izole edilmiştir (40). Memelilerde TGF- β 1 , 2 , 3 izomerleri bulunmakta (2, 51), ailenin ilk üyesi olan TGF- β 1, 1985 yılında TGF- β 2 ve TGF- β 3 ise 1988 yılında klonlanmıştır (25). Diğer growth faktörlerin tersine TGF- β normal ve transforme olan birçok dokunun hücreleri tarafından sentezlenmekte (35, 86) ve en yüksek düzeyde insan kan pulçuklarının α granüllerinden ve plasentadan (35, 89) ayrıca inek böbreğinden (89) izole edilmektedir (35).

Memelilerin embriyonik ve ergin dokularında , TGF- β 'ların 3 tipi için etkilerini göstermelerini sağlayan tip I, tip II ve tip III adı verilen değişik reseptörleri vardır (35, 51, 52). TGF- β 1, - β 2 ve - β 3 üç reseptör tipine de bağlanabilmekle beraber etkilerini genelde tip I ve tip II reseptörleri aracılığı ile yapmaktadırlar. Tip III reseptörlerinin ise sinyal iletimi yapmadığı, bu reseptörlerin, ekstraselüler matriks bileşiminde bulunan elemanlarla TGF- β izomerleri arasında etkileşimi sağladığı bildirilmektedir. Tip I ve tip II reseptörleri organizmada çok yaygın bulunmasına rağmen tip III reseptörleri mezenşimal hücrelerin bulunduğu yerlerde yoğunlaşmıştır (51). Her üç reseptör tipi de organizmada geniş çapta bulunmakla birlikte farklı hücre tiplerinde farklı düzeyde işaretlenmektedir. Reseptörlerin yaygın olarak bulunmasına paralel olarak TGF- β izoformları da organizmada yaygın olarak bulunmaktadırlar (35).

TGF- β 'nın etkileri hücre tipine spesifiktir ve diğer growth faktörlerle sinerjist veya antagonist etkileşim içindedir (3, 65). TGF- β 'lar, nöroektodermal, epitelyal ve mezenşimal hücre tiplerinde; hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve ekstraselüler matriks (ECM) üretimini düzenlemektedirler (51, 69). Bu growth faktörler hücre tipine spesifik, hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu hem inhibe hem de aktive edebilecek özelliklere sahiptirler (52, 86). TGF- β 'lar,

proteinazların üretimini azaltarak ve ECM'i meydana getiren proteinlerin ve mRNA'ların sentezini sitümüle ederek ECM üretimini artırmaktadırlar. TGF- β 1 tip I kollagen , fibronektin, proteoglikan ve tenascin sentezini sitümüle ederken, kollagenaz, transin ve katepsin D gibi proteinazların sentezini azaltmaktadır (51). Bunlara ilaveten TGF- β 'ların kemotaktik özelliklerinin olduğu bildirilmektedir (51, 69). TGF- β 1 insan fibroblastları, monositler ve nötrofiller için kemotaktik özellik göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı TGF- β izoformları yara iyleşmesinde rol oynamaktadırlar (51).

Polipeptidlerin TGF- β ailesi embriyonik gelişim sırasında hücre bölünmesinin, farklılaşmasının ve morfogenezinin koordinasyonunda ve kontrolünde anahtar rol oynamaktadır. TGF- β 1, osteogenezis (52) hematopoezis, anjiogenezis (1, 52), ve epitelyal – mezenşimal etkileşimde rol oynarken (1, 52, 86); TGF- β 2, epitelyal – mezenşimal etkileşimde (1, 52) nöral dokunun farklılaşmasında ve kırırdağın kemikleşmesinde etkilidirler. TGF- β 3 'ün ise daha az spesifik etkileri saptanmıştır. TGF- β 'nın bu izoformu kardiovasküler sistem ve iskelet gelişimi gibi birçok değişik morfogenetik olay esnasında TGF- β 1 ve TGF- β 2 ile etkileşmektedir (52). TGF-beta m-RNA'ları invivo şartlarda hücrenel farklılaşma ve mitotik aktivitenin olduğu alanlarda tespit edilmiştir (35).

Yapılan çalışmalar TGF- β 'nın hemen hemen bütün hücreler tarafından inaktif formda salgılandığını göstermektedir (57, 86, 89). Biyolojik latentlik TGF- β reseptörlerine bağlanamamaktan dolayı meydana gelmektedir (57, 89). Latent kompleks invio şartlarda, asidik bir ortama maruz kalma ile aktive olmaktadır (57, 86, 89). İnvitro şartlarda plazmin (35, 57, 89) ve cathepsin D (51, 57, 89), endoglikozidaz ve sialidaz (51) latent bağlantı peptidlerini ayırıp, TGF- β 'yı aktive edebilmektedirler. Plazmin ve TGF- β negatif feedback mekanizmasıyla aktif TGF- β miktarını kontrol etmektedirler . Yine TGF- β 'yı bağlayıcı faktör olan α_2 – macroglobulin , TGF- β 'ya bağlanarak yoğun TGF- β aktivitesini azaltmaktadır (35).

Sitokinlerin TGF- β ailesi organizmada yaygın olarak bulunur ve yaşamın sürdürülmesi için gereklidir. Bu ailenin üyeleri büyüme ve gelişmede, yangı ve iyleşmesinde (13) ve immünitede (13, 17, 35) önemli rol oynamaktadırlar. TGF-

β 'nin otokrin ve parakrin etkileri ekstraselüler matriks, komşu hücreler ve diğer sitokinler tarafından değiştirilebilmektedir (13). Büyüme ve farklılaşma faktörü olan TGF- β ailesi üyeleri çok hücreli organizmalarda değişik hücre tiplerinin büyüme ve farklılaşmasının düzenlenmesinde (2, 17, 31, 40, 51, 97), doku indüksiyonu ve morfogenezisi kapsayan bir çok gelişim olayında (2), hücrel migrasyon (69, 77) ve proliferasyonun (1, 77) ve ekstraselüler matriks sentezinin kontrolünde etkilidirler (1, 51, 77, 86, 97). TGF- β fibroblastlarda büyümeyi uyarırken, epitelyal hücrelerin proliferasyonunu (55, 56, 65, 88), ve lenfoid hücrelerin büyümesini (42) inhibe etmektedir. TGF- β miyojenik farklılaşmanın güçlü bir düzenleyicisidir (65). Terapotik müdahalelerde TGF- β 'nın bağ doku oluşumunu artırdığı tespit edilmiştir. Travma, cerrahi uygulama ve yangıdan kaynaklanan doku yaralanmalarının iyileşmesi esnasında makrofaj, kan pulçukları ve lenfositlerin aktivasyonunda artış görülmektedir. Aktive olan bu hücrelerden büyük miktarda TGF- β salgılandığı tespit edilmiştir (88).

Genel anlamda bu growth faktörün izomerleri, invitro ve invivo şartlarda hücrelerin farklılaşmasında çift etkilidirler (82). TGF- β 'lar birçok hücre tipinin siklusunu G1 fazında durdurarak proliferasyonu inhibe (42) ve hücrel büyüme ve transformasyonu inhibe etmektedirler (35).

TGF- β , ekstraselüler matriks (ECM) komponentlerinin sentez ve yıkımını düzenlemekte, hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile ekstraselüler matriks ve hücreler arasındaki etkileşimde belirleyici rol oynamaktadır (70, 76). Hücre-matriks etkileşimi sayesinde TGF- β , normal morfogenezis ve yara iyileşmesi sırasında hücrelerin; migrasyonu, farklılaşması ve büyümesinde etkili olmaktadır (70). TGF- β ECM proteinlerinin sentezini hızlandırarak veya ECM proteinleri üzerinde etkili olan proteazlar üzerine olan inhibitör etkisiyle proteinlerin proteolizisini azaltarak etkisini göstermektedir. TGF- β sadece ECM içeriğini düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda hücrenin ECM'nin farklı komponentlerine bağlanmasını sağlayarak hücre migrasyonunda, farklılaşmasında etkili rol oynamaktadır (76).

Invitro çalışmalarda TGF- β 'ların kemik, kırık ve bağ doku fibroblastları için mitojenik etkiye sahip olduğunu, fakat epitel hücre proliferasyonunu da inhibe ettiği saptanmıştır (52).

TGF- β izoformları, erken embriyogenezde önemli rol oynamaktadırlar . TGF- β 1 mRNA'ları dörtlü ve sekizli hücre evrelerinde ve blastosist evresinde tespit edilmiştir. TGF- β 1 proteinleri de blastosist safhasında salgılanmaktadır. İmplantasyon sonrası, TGF- β 1 mRNA ve proteinleri ; kemik ve bağ doku gibi mezenşimal dokularda işaretlenmiştir. TGF- β 2, blastosist'in trofoektodermde yüksek oranda boyanırken, iç hücre kitlesinde boyanma gözlenmemiştir. İmplantasyon sonrası primitif ve embriyonik ektodermde tayin edilebilecek düzeyde işaretlenme gözlenirken, visseral endodermde belirgin bir boyanma tespit edilmiştir. Ayrıca pariyetal endoderm hücrelerinde de pozitif boyanma tespit edilmiştir. TGF- β 2, memelilerde özellikle mezodermin şekillenmesinde etkilidir. TGF- β 3 mRNA'ları ise 10.5 – 17.5 günlük fare embriyolarında işaretlenmiştir (86).

Bir çok growth faktör (FGF, PDGF, insulin like growth factor, TGF- α) sinir sistemi gelişiminde ve sinir sistemi travmalarına karşı cevap vermede rol oynamaktadırlar. TGF- β izoformları birçok sistemde diğer growth faktörlerin etkisini artırır veya antagonize eder. Sinir sistemi gelişiminde etkili olan TGF- β izoformları Schwann hücreleri için mitojenik etki gösterirken, astroglial hücrelerde DNA sentezinin pik yapmasını geciktirir (23).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, TGF- β 'nın embriyonel gelişimin kontrolü, hücrel farklılaşma, ve hormon salgılanması gibi önemli işlevlerinin olduğunu göstermektedir. TGF- β 'nın çok yönlü fonksiyonları, diğer ekstraselüler faktörlerle olan etkileşimi ile de bağlantılıdır (35).

Bu çalışmada prenatal gelişimin farklı dönemlerinde uygulanan yüksek doz A vitamininin, gelişim üzerine olan etkilerinin ve sinir ve kalp dokularında TGF- β 2 ekspresyonu üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL METOD

Araştırma, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyomedikal Araştırmalar Ünitesinden temin edilen 250-270 gr olan 52 adet Wistar-Albino cinsi ergin (3 aylık) dişi sıçanlar üzerinde gerçekleştirildi. 22 ± 2 °C oda ısısında 12 saat ışık (7:00-19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00-7:00) tutulan sıçanlar, özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda (normal çeşme suyu) verildi. Hayvan yemleri Yem Sanayii T.A.Ş. Elazığ Yem Fabrikasında hazırlandı. Yemlerin terkibi Tablo 1 gösterilmektedir

Tablo 1: Hazırlanan Rat Yeminin Terkibi

Kuru Madde (%)	93.69
Ham Protein (%)	34.15
Ham Yağ (%)	3.00
Metabolik Enerji (Kcal/kg)	2095
Kalsiyum (%)	3.36
Sodyum (%)	1.09
Magnezyum (%)	0.50
Çinko (mg/kg)	286.80
Demir (mg/kg)	920.00
Bakır (mg/kg)	29.33
Ham Maddeler	Balık unu, mısır, buğday, ayçiçeği küspesi, çavdar, mineral maddeler

2.1 Maternal All-trans Retinoik Asit Uygulanması

Çalışmada kullanılan sıçanlara her gün 8.00 - 9.30 saatleri arasında vajinal smear yapıldı. Proöstrüs evresinde olduğu tespit edilen sıçanlar, aynı günün akşamı erkek sıçanlarla 1:1 şekilde eşlenip aynı kafese konuldu. Ertesi gün sabah saat 7.00'da erkek ve dişi sıçanlar ayrıldı. Yapılan vajinal smear sonrası sperm (+) olarak tespit edilen sıçanların gebeliğin 0. gününde oldukları kabul edildi. Gebe sıçanlar 3 ana gruba ayrıldı.

I. Grup: Gebeliğin 9., 10., 12., 13., 15., 18. ve 20. günlerinde (GD 9, 10, 12, 13, 15, 18, 20.) servikal dislokasyon ile fötusleri alınan sıçanlardan oluşan kontrol grubu (n: 21). Bu grup fötuslar K9, K10, K12, K13, K15, K18 ve K20 olarak isimlendirildi.

II. Grup: Gebeliğin 8. gününde (GD 8) zeytin yağında eritilen 60 mg/kg dozda (99) oral yoldan all-trans retinoik asit verilen ve gebeliğin 9., 10., 12., 13., 15., 18., 20. günlerinde servikal dislokasyon ile fötusleri alınan sıçanlar. Bu grup fötuslar ise RA(8) 9, RA(8) 10, RA(8) 12, RA(8) 13, RA(8) 15, RA(8) 18 ve RA(8) 20 olarak isimlendirildi. Bu grupta deneklerden 1'nin doğum yapması beklendi (n: 22).

III. Grup : Gebeliğin 12. gününde (GD 12) oral yoldan 60 mg/kg dozda all-trans retinoik asit verilen ve gebeliğin 15., 18. ve 20. günlerinde servikal dislokasyon ile fötusleri alınan sıçanlar (n: 9). Bu gruptaki fötuslar ise RA(12) 15, RA(12) 18 ve RA(12) 20 olarak isimlendirildi.

Uterusu açılan gebe sıçanlarda implantasyon ve rezorpsiyon alanları sayıldı. Alınan fötuslar tartılıp, Boins tespit solüsyonuna atıldı. Deney grubu fötuslar anomaliler açısından incelendi, tepe-kuyruk uzunlukları ölçülüp kendi aralarında karşılaştırıldı. Anomalili fötuslar fotoğraflandı. Boins solüsyonunda 24 saatlik tespitten sonra dereceli alkollerle (50, 60, 70, 80, 90, 96, 100°) yıkandı. Xylol serilerinden geçirildi. Isısı 54°C olan etüvde xylol-parafin, yumuşak parafin ve sert parafin ile muamele edilip bloklar hazırlandı. Polilizinli lamlara 5µm'lik kesitler alındı. Kesitler %5'lik sodyum tiyosülfat solüsyonundan geçirilip pikrik asit uzaklaştırıldıktan sonra 54°C'lik etüvde 1saat bekletildi.

2.2 İmmünohistokimya

Kesitler xylol ile deparafinize edildi. Alkol serilerinden geçirildikten sonra distile su ile yıkandı. Oda ısısında %0.1-1 H₂O₂ ile inkübasyon sonrası PBS ile yıkandı ve Avidin Biotin boyama yöntemine geçildi. Kesitler %10'luk normal keçi serumu ile muamele edildi. Daha sonra TGF- β_2 primer antikoru , PBS ile %1.5 olarak hazırlanan normal keçi serumu ile 1:400 oranında dilue edildi. Kesitler +4 °C'de bir gece boyunca TGF- β_2 ile inkübe edildi. Negatif kontrol kesitlerine sadece PBS damlatıldı. Ertesi gün kesitler PBS ile yıkayıp, sekonder antikor, takiben HRP(Horse Radish Peroksidaz) ile inkübe edildi. PBS ile yıkandıktan sonra DAB kromojeni uygulandı. Distile su ile yıkanan kesitlere hematoksilen ile zıt boyama yapıldı. Çeşme suyunda mavilik gidinceye kadar yıkanan kesitler distile su ile yıkayıp alkol ve xylol serilerinden geçirildikten sonra kapatıldı. Işık mikroskop altında kalp ve beyin dokuları incelendi. Preperatlar immün reaksiyon az (+), orta (++) ve yoğun (+++) şiddette şeklinde değerlendirildi.

2.3 İstatistiksel Analiz :

Yapılan bu çalışmada yüksek doz retinoik asidin fetal vücut ağırlığı ve tepe-kuyruk uzunluğu üzerine olan etkileri istatistiksel olarak değerlendirildi. Fetal vücut ağırlığı ve tepe - kuyruk uzunlukları Ortalama \pm Standart sapma olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırma Student's t testi ile yapıldı. İstatistiksel önemlilik derecesi $p < 0.05$ değerleri seçilerek yapıldı.

3. BULGULAR

3.1 Yapısal Bozukluklar

Deney sonunda fötuslar farklı gelişim aşamalarında morfolojik bozukluklar, fetal ağırlık kaybı (Tablo 2), tepe – kuyruk uzunluğundaki kısalmalar (Tablo 3) açısından muayene edildi.

Yapılan bu çalışmada gebeliğin 8. gününde verilen all-trans retinoik asidin etkilerinin , gebeliğin 12. gününde verilen all-trans retinoik asitten daha şiddetli olduğu saptandı. Yüksek doz retinoik aside bağlı fetal ağırlık kaybı kendi aralarında karşılaştırılan RA (8) 10 – K 10 ve RA (8) 20 – RA (12) 20 grupları dışındaki gruplarda istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Bununla birlikte RA (8) 15 – K 15 , RA (8) 15 – RA (12) 15, K 18 – RA (8) 18, K 18 – RA (12) 18, K 20 – RA (8) 20 ve K 20 – RA (12) 20 grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında fetal ağırlık kaybı istatistiksel olarak oldukça yüksek anlamlılık ($p < 0.001$) taşımaktaydı (Tablo 2) . Benzer şekilde tepe – kuyruk uzunluklarının da K 9 – RA (8) 9 ve K 10 – RA (8) 10 gruplarının dışında yüksek doz retinoik asitten etkilendiği görüldü (Tablo 3).

Gebeliğin erken dönemlerinde all-trans retinoik aside maruz kalınmasının fötuslarda çok ciddi gelişim bozuklukları meydana getirdiği saptandı . Gebeliğin 8. gününde 60 mg / kg all – trans retinoik aside maruz kalan fötuslar GD 9, GD 10, GD 12, GD 13, GD 15, GD 18 ve GD 20. günlerinde incelendiler.

GD 9 – GD 10

Gebeliklerinin bu günlerinde embriyolarda herhangi bir malformasyona rastlanmadı. Tepe - kuyruk uzunlukları ve vücut ağırlıkları RA (8) 9 grubu embriyoların vücut ağırlıkları dışında kontrol grubu embriyolarla benzerlik göstermekteydi. RA(8) 9 grubu embriyoların vücut ağırlıkları K 9 grubu embriyolarının vücut ağırlıklarından biraz daha düşük olarak saptandı (Tablo 2, 3).

GD 12

Gebeliğin bu periyodunda yüksek doz retinoik asitin özellikle sinir sistemini etkilediği gözlemlendi . Retinoik aside bağlı olarak beynin fleksiyonunda yetersizlik ve ön beyinde hipoplazi saptandı (Şekil 1 A – B). Yaşayan fötusların

sayısında azalma gözlenirken , rezorpsiyon oranında önemli derecede artış (% 60) olduğu saptandı . Bu deney grubunda hem fetal vücut ağırlığındaki azalma hem de tepe – kuyruk uzunluğundaki kısalma istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Tablo 2, 3).

GD 13

Bu deney grubunda implantların tamamının rezorbe (% 100) olduğu görüldü.

GD 15

Maternal yüksek doz retinoik asidin intrauterin gelişimlerinin 15. gününde ekzensefali , omfalosel (Şekil 2 A – C) gibi gelişim bozukluklarına yol açtığı görüldü. Bu defektlere ilaveten fetal vücut ağırlıklarında ve tepe – kuyruk uzunluklarında azalma (Tablo 2, 3) ve % 56 oranında rezorpsiyon tespit edildi .

GD 18

Gelişimlerinin bu günlerinde fetuslarda intrauterin 8. günde maruz kaldıkları retinoik asidin çok şiddetli gelişim bozukluklarına yol açtığı görüldü. Malforme ve rezorbe implantların sayısında büyük oranda artış saptandı . Bu grup implantlarda % 72 oranında rezorpsiyon gözlemlendi. Yüksek doz retinoik aside bağlı olarak ekstremitelerde kısalma , gastroşizis , ossifikasyon bozuklukları ve deri gelişiminde bozukluk saptandı (Şekil 3 A - C). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fetal ağırlık ve tepe – kuyruk uzunluklarının önemli derecede azaldığı tespit edildi (Tablo 2 , 3).

GD 20

Önceki deney grupları ile benzer bulgular bu gruba ait fetuslarda da gözlemlendi . Gebeliğin erken döneminde uygulanan retinoik asidin fetal ağırlık ve tepe – kuyruk uzunluğunda azalmaya (Tablo 2 , 3) ve %58 oranında rezorpsiyona yol açtığı saptandı. Bu grup fetuslarda retinoik aside bağlı olarak kranioşizis, omfalosel, çıkık dil ve ekstremitelerde kısalma gözlemlendi. Bu grupta yer alan fetuslarda normal gelişim gösterenler de yer almaktaydı (Şekil 4).

Gebeliğinin 8. gününde 60 mg / kg tek doz all – trans retinoik asit verilen ve doğum yapması beklenen sıçanın , doğumunda yaklaşık 3.5 – 4 gün gecikme olduğu yeni doğanların hepsinin ölü ve malforme olduğu tespit edildi.

Malformasyonlar arasında eksoftalmus , ekzensefali , deri defektleri , fasiyal bozukluk, maksiler – mandibular hipoplazi gözlendi (Şekil 5).

Gebeliğin 12. gününde uygulanan aynı dozdaki all – trans retinoik asidin fötuslar için daha az letal olduğu saptandı . On ikinci gündeki retinoik asit uygulamasını takiben GD 15, GD 18 ve GD 20 günlerinde muayene edilen fötuslarda sadece omfalosel , tepe – kuyruk uzunluklarında ve fötal ağırlıkta azalma tespit edildi. Bu dönemde uygulanan retinoik asidin % 23 – 25 oranında rezorpsiyona yol açtığı görüldü.



Tablo 2 : Yüksek doz A vitaminiin fetal ağırlık üzerine olan etkilerinin gruplar arası karşılaştırılması

Kontrol				RA (8)				RA (12)				RA (8)				RA (12)			
Gün	n	Ort ± SS	p	Gün	n	Ort ± SS	p	Gün	n	Ort ± SS	p	Gün	n	Ort ± SS	p	Gün	n	Ort ± SS	p
9	12	0.025 ± 0.01	18	0.02 ± 0.1***	0.049	15	13	0.29 ± 0.02	14	0.25 ± 0.01**	0.005	15	10	0.20 ± 0.02*	14	0.25 ± 0.01	0.0008		
10	12	0.039 ± 0.01	18	0.04 ± 0.01	0.087	18	18	1.38 ± 0.08	13	0.72 ± 0.09*	0.00005	18	7	0.66 ± 0.13	13	0.72 ± 0.09	0.265		
12	12	0.072 ± 0.01	10	0.06 ± 0.01**	0.007	20	19	3.86 ± 0.2	13	3.35 ± 0.38*	0.00006	20	10	3.28 ± 0.21	13	3.35 ± 0.38	0.215		
15	13	0.29 ± 0.02	10	0.20 ± 0.02*	0.0006														
18	18	1.38 ± 0.08	7	0.66 ± 0.13*	0.00004														
20	19	3.86 ± 0.21	10	3.28 ± 0.21*	0.00005														

Tablo 3 : Yüksek doz A vitamininin fetal tepe – kuyruk uzunluğu üzerine olan etkilerinin gruplar arası karşılaştırılması

Gün	Kontrol			RA (8)			RA (12)			RA (8)			RA (12)		
	n	Ort±SS	p	Gün	n	Ort±SS	p	Gün	n	Ort±SS	p	Gün	n	Ort±SS	p
9	12	0.56±0.07	0.141	15	13	2.63±0.1	0.0005	15	10	1.65±0.1*	0.0006	14	2.2±0.2	0.0006	
10	12	0.65±0.07	0.626	18	18	3.73±0.2	0.0005	18	7	2.34±0.2*	0.0006	13	2.98±0.2	0.0006	
12	12	1.55±0.1	0.0004	20	19	5.11±0.2	0.0007	20	10	3.87±0.1*	0.0006	13	4.17±0.1	0.0006	
15	13	2.63±0.1	0.0004												
18	18	3.73±0.2	0.0003												
20	19	5.11±0.2	0.0003												

RA(8) : Gebeliğin 8. gününde all-trans RA'e maruz kalan fütüsler. Bu fütüsler gebeliğin 9, 10, 12., 15, 18. ve 20. günlerinde alınıp vücut ağırlıkları ve tepe kuyruk uzunlukları saptandı.

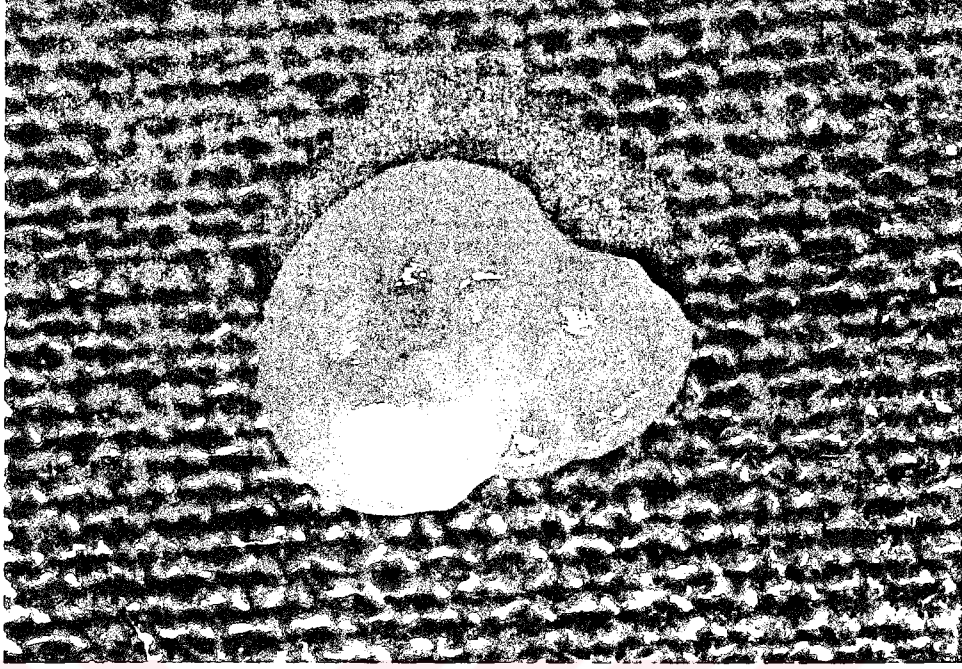
RA(12) : Gebeliğin 12. gününde all-trans RA'e maruz kalan fütüsler . Bu fütüsler gebeliğin 15., 18. ve 20. günlerinde alınıp vücut ağırlıkları ve tepe – kuyruk uzunlukları saptandı.

n : Her bir gruptaki fütüs sayısı

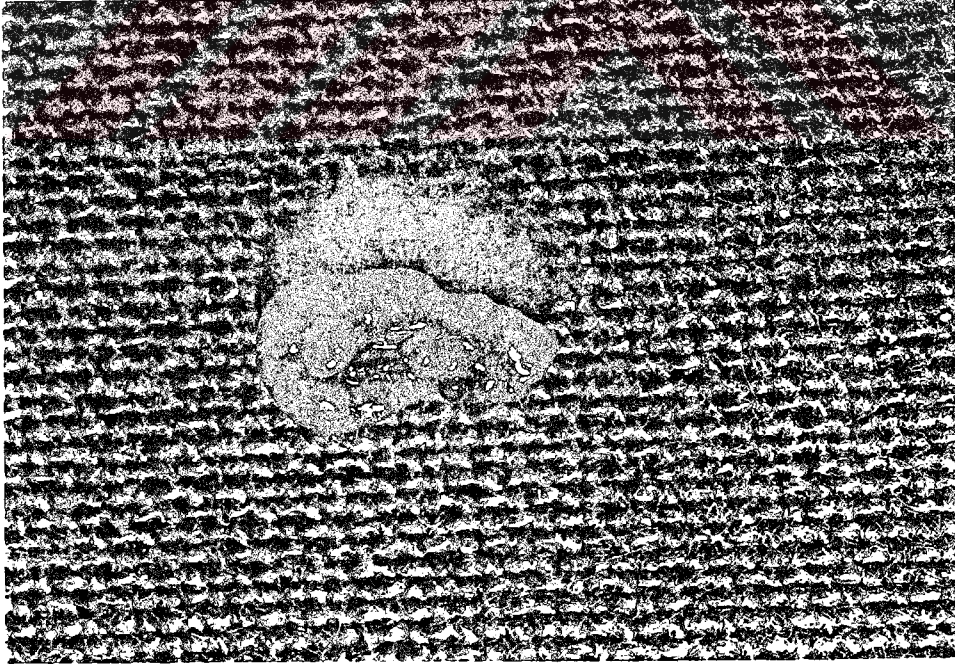
* : p<0.001

** : p<0.01

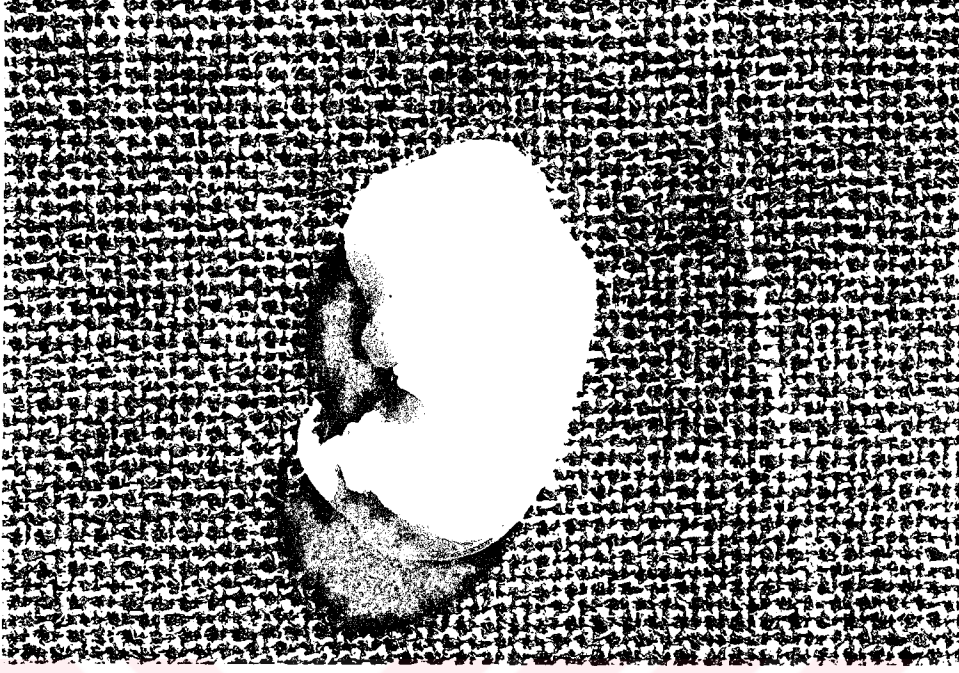
*** : p<0.05



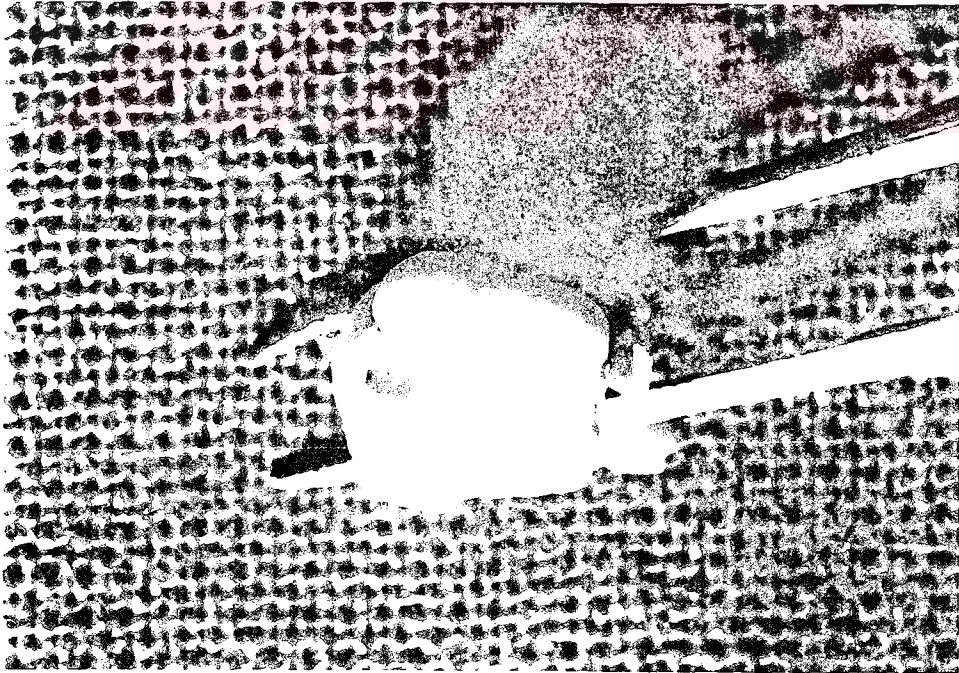
Şekil 1 A : Gebeliğin 12. gününde kontrol grubu normal yapıdaki fötüs görülmekte



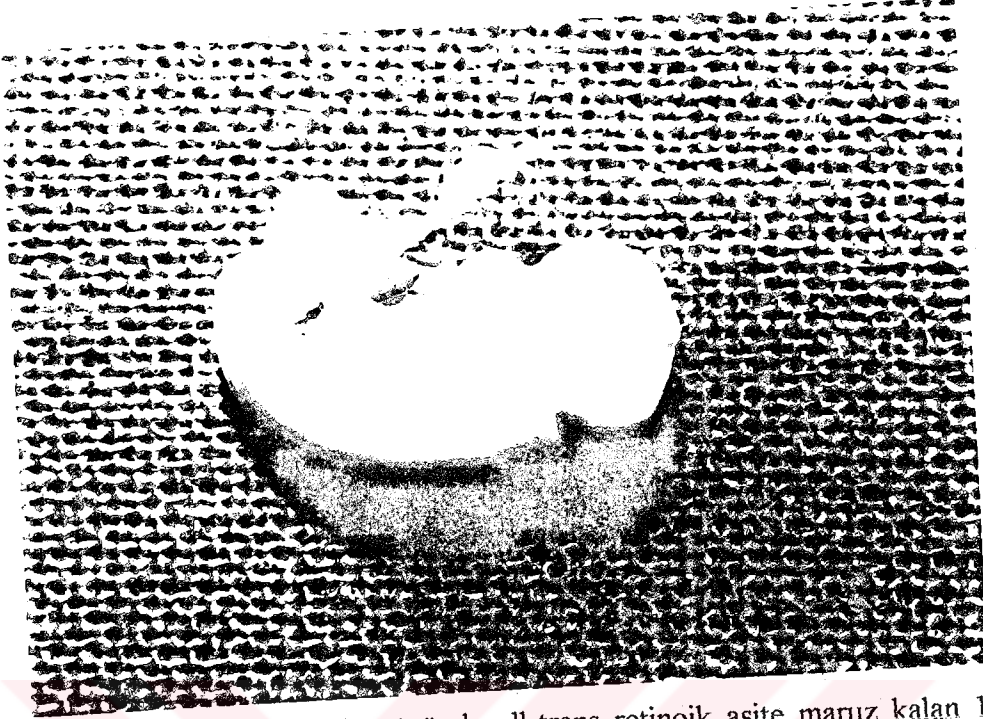
Şekil 1B : Prenatal 8. günde all-trans retinoik aside maruz kalan 12 günlük fötusun yandan görünümü. Beyin fleksiyonundaki yetersizlik ve mikrosefali ayırt edilmekte.



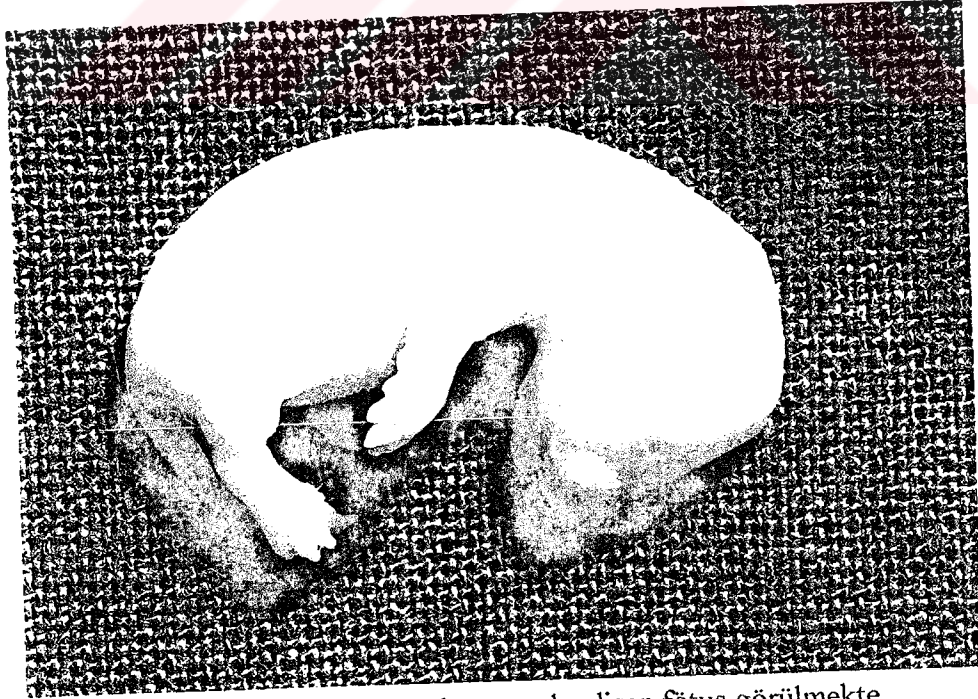
Şekil 2 A : Gebeliğin 15. gününde normal gelişen kontrol grubu fötüs görülmekte.



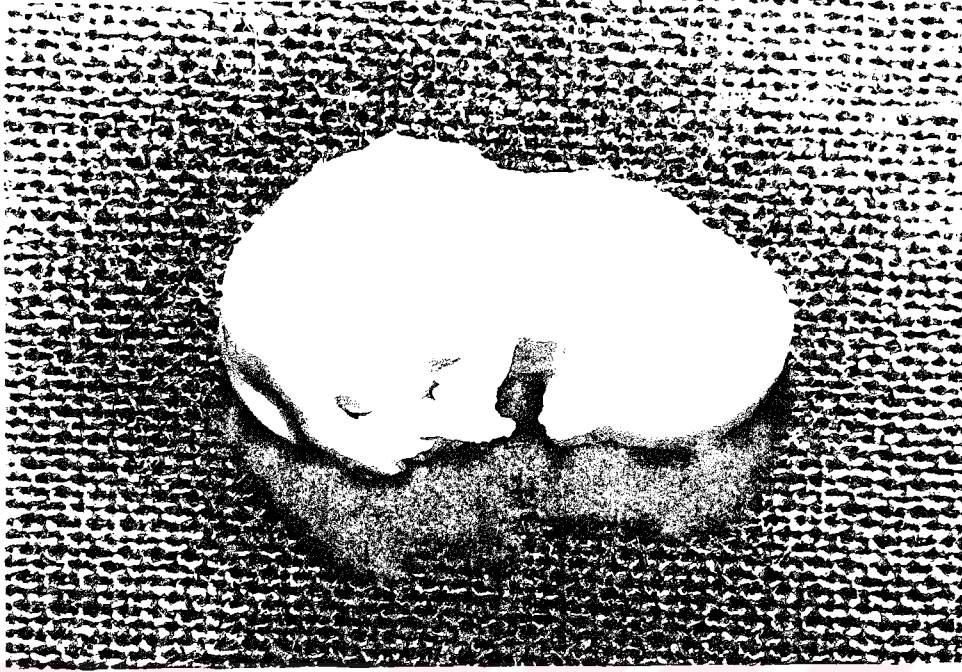
Şekil 2 B : Gebeliğin 8. gününde all-trans retinoik aside maruz kalan fötüsün 15. günde üstten görünüşü . Retinoik aside bağlı gelişen ekzensefali görülmekte.



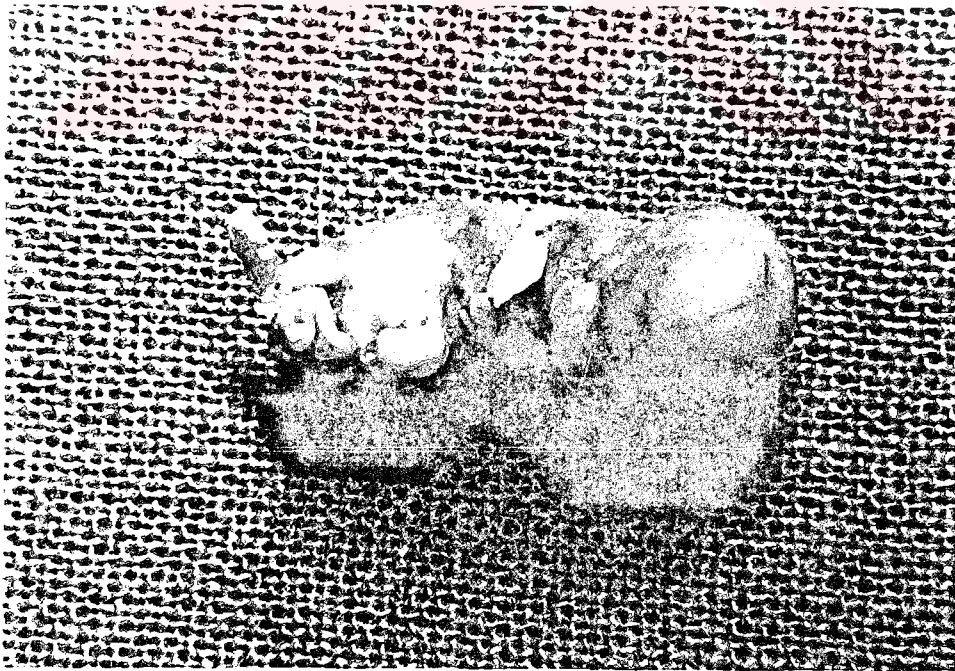
Şekil 2 C : Gebeliğin 8. gününde all-trans retinoik asite maruz kalan 15 günlük fötusun yandan görünüşü. Kraniofasiyal bozukluk, gastroşizis açık olarak ayırt edilmekte.



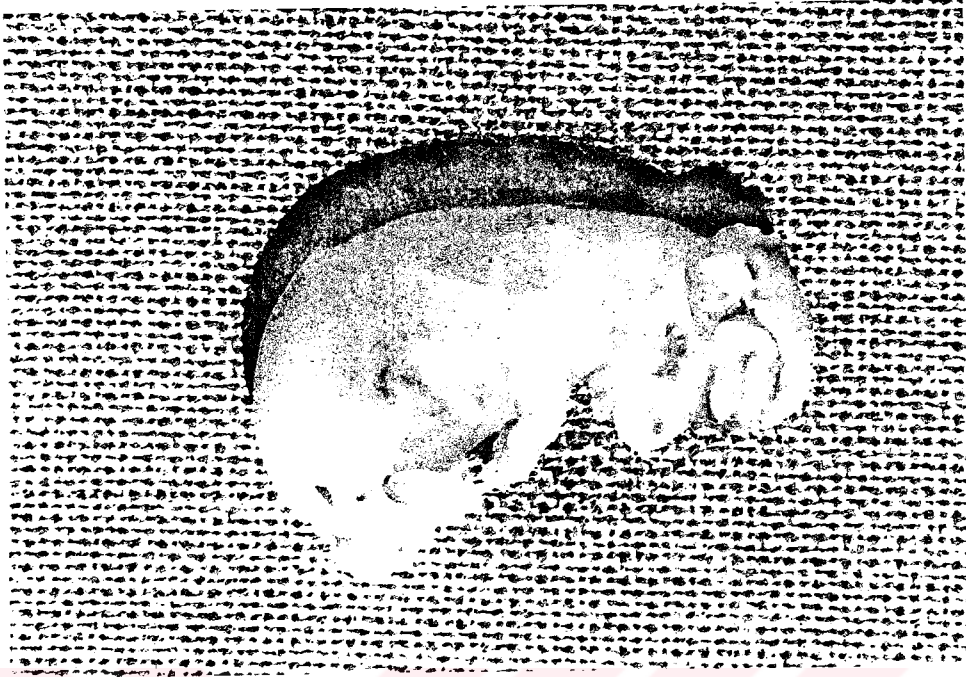
Şekil 3 A : Gebeliğin 18. gününde normal gelişen fötus görülmekte.



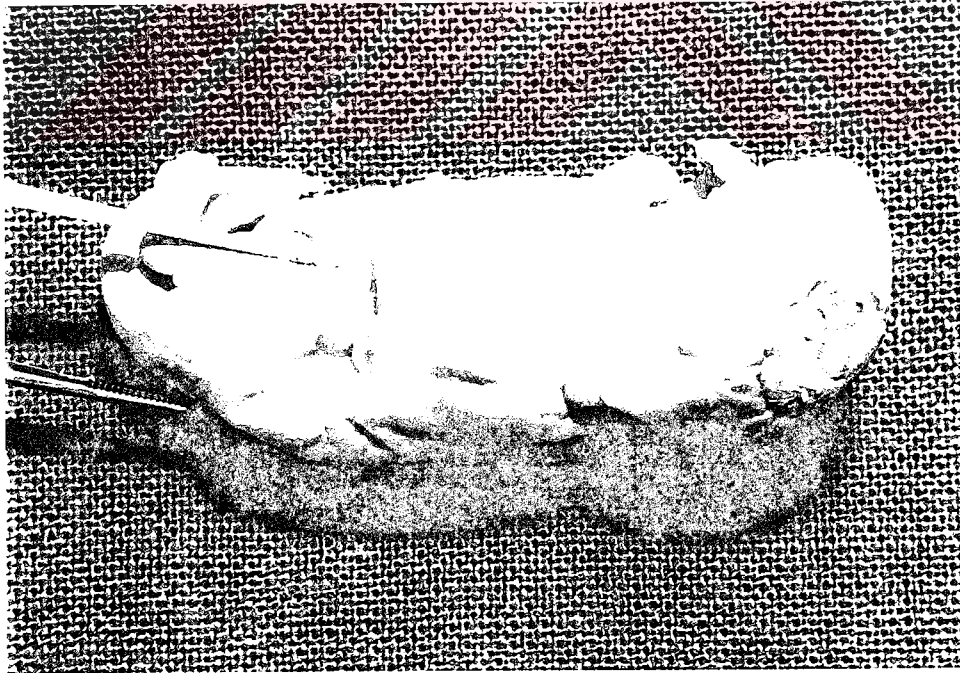
Şekil 3 B : Prenatal 8. günde all-trans retinoik aside maruz kalan 18 günlük fötüs. Ekstremiteler ve tepe-kuyruk uzunluğundaki kısalma , fasiyal bozukluk ve derideki gelişim bozukluğu dikkat çekmekte.



Şekil 3 C : Prenatal 8. günde all-trans retinoik aside maruz kalan diğer 18 günlük fötüs. Gastroşizis, tepe-kuyruk uzunluğundaki ve ekstremiteler boyundaki kısalık ayırt edilmekte.



Şekil 4 : Gebeliğin 8. gününde all-trans retinoik aside maruz kalan 20 günlük fötüs. Retinoik asidin teratojenik etkisine bağlı ekzensefali, fasiyal yarık, çıkık dil, omfalosel ve ekstremitte kısalığı görülmekte.



Şekil 5 : Prenatal 8. günde all-trans retinoik aside maruz kalan yeni doğan . Ekzoftalmus, ekzensefali, fasiyal bozukluk, mandibular-maxillar hipoplazi, deride gelişim bozukluğu ayırt edilmekte.

3.2 BEYİN ve KALP DOKULARINDA TGF- β 2'nin İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İŞARETLENMESİ

BEYİN DOKUSU

Prenatal 15 günlük kontrol fötüslerinin ön, orta ve arka beyin bölgelerindeki nöronlarda (Şekil 6, 7, 8) ve kranial sinir gangliyonlarında (Şekil 9) TGF β 2 immün boyanması (+++) pozitif olarak izlendi. Boyanma pleksus koroideusun ependim hücrelerinde (Şekil 10) (+) pozitif olarak gözlemlendi. Nöral tübün ventral zonundaki hücrelerde mitotik aktivitenin oldukça yoğun olduğu dikkat çekiyordu. Gebeliğin 12. gününde all-trans retinoik asit verilen ve 15. günde incelenen fötüs arka beyin hücrelerinde (Şekil 11), kranial gangliyon hücrelerinde, pia mater ve pleksus koroideus hücrelerindeki (Şekil 12) TGF β 2 immün boyama ve mitotik aktivite (Şekil 13) kontrol grubu ile benzerlik gösteriyordu. Gebeliğin 8. gününde retinoik asit verilip 15. günde incelenen fötüslerde ise TGF β 2 immün boyanmasının diğer gruplara göre az olduğu ve bu boyanmanın sadece arka beyin, kranial gangliyon hücreleri (Şekil 14), pleksus koroideus ve pia mater ile sınırlı olduğu, ön ve orta beyinde immün reaksiyonun olmadığı tespit edildi. Arka beyin bölgesinde yer alan bazı nöronlar TGF β 2 (++) pozitiflik gösteriyordu. Bu gruptaki fetal beyin dokusundaki mitotik aktivitenin çok az olduğu gözlemlendi.

Prenatal 18 günlük kontrol fötüslerin ön beyin nöronlarında (Şekil 15) TGF β 2 boyanma (++) pozitiflik gösterirken, pleksus koroideusun ependim hücrelerinde (Şekil 16) TGF β 2 (+++) şiddetindeydi. Gebeliğin 12. gününde retinoik asit verilen ve 18. günde incelenen fötüs beyin dokusunun immün boyanma özellikleri kontrol grubuna benzemekteydi. Gebeliğin 8. gününde retinoik asit verilen ve 18. günde incelenen fötüslerde gelişim bozuklukları oldukça belirgin şekilde saptandı. TGF β 2 immün boyanmasının artış gösterdiği özellikle ön beyin bölgesindeki nöronlarda (+++) pozitiflik boyanmanın olduğu tespit edildi (Şekil 17, 18, 19).

Prenatal 20 günlük kontrol grubu fötüs beyin dokusundaki TGF β 2 immün boyanması (Şekil 20, 21) (+++) olarak tespit edildi. Gebeliğin 12. gününde retinoik

asit verilip 20. günde incelenen fetal orta beyin dokusundaki nöronlarda TGF β 2 (++) pozitif immün boyama saptandı (Şekil 22). Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 20 günlük fetus beyinde ise TGF β 2 immün reaktivitesinde diğer deney grubuna göre artış (+++) gözlemlendi (Şekil 23).

Gebeliğin 8. gününde retinoik asit uygulanan gebe sıçanlardan bir tanesi doğum yapıncaya kadar beklenildi . Doğan tüm yavruların malforme ve ölü doğduğu tespit edildi . Beyin dokularından hazırlanan kesitlerde TGF β 2 immün boyanması izlenmedi (Şekil 24, 25).

KALP DOKUSU

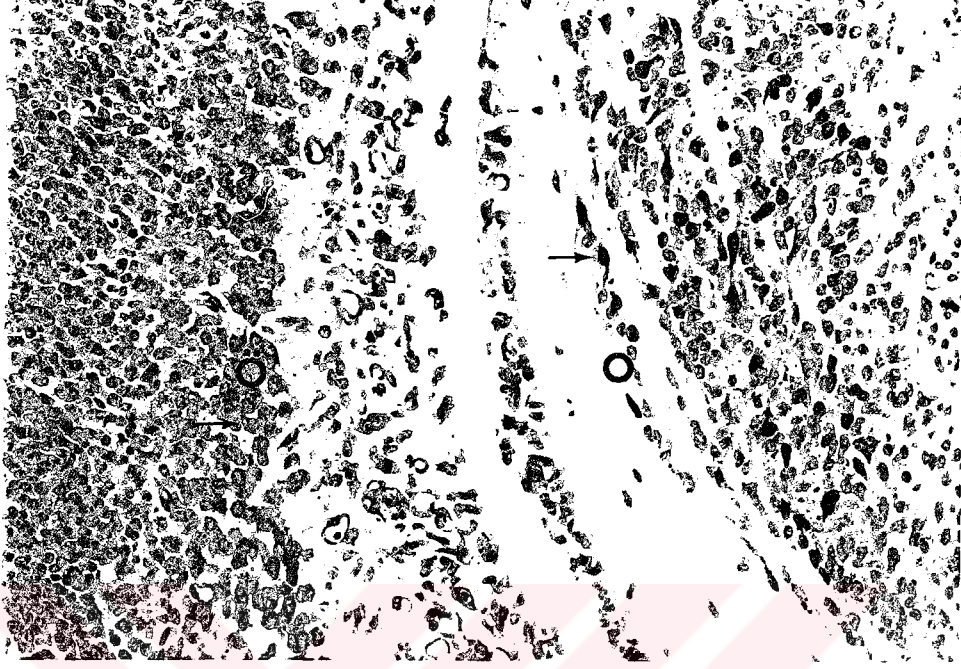
15, 18 ve 20 günlük kontrol fetuslerinin kalbinde perikard ve endokard hücrelerinde immün boyama izlendi. Prenatal 15 ve 18 günlük fetal kalpte immün reaktivite (+++) pozitif (Şekil 26, 27, 28, 29) şeklinde gözlemlendi. 20 günlük fetuslerde ayrıca miyokardial hücrelerde (Şekil 30) immün boyanma (+++) pozitif olarak tespit edildi. Aynı zamanda kalp boşluklarında bulunan kan hücreleri de TGF β 2 (+++) pozitif olarak saptandı.

Gebeliğin 8. ve 12. günlerinde tek doz retinoik asite maruz kalan 15 günlük fetal kalp dokularında TGF β 2 immün reaktivitesi görülmedi (Şekil 31, 32).

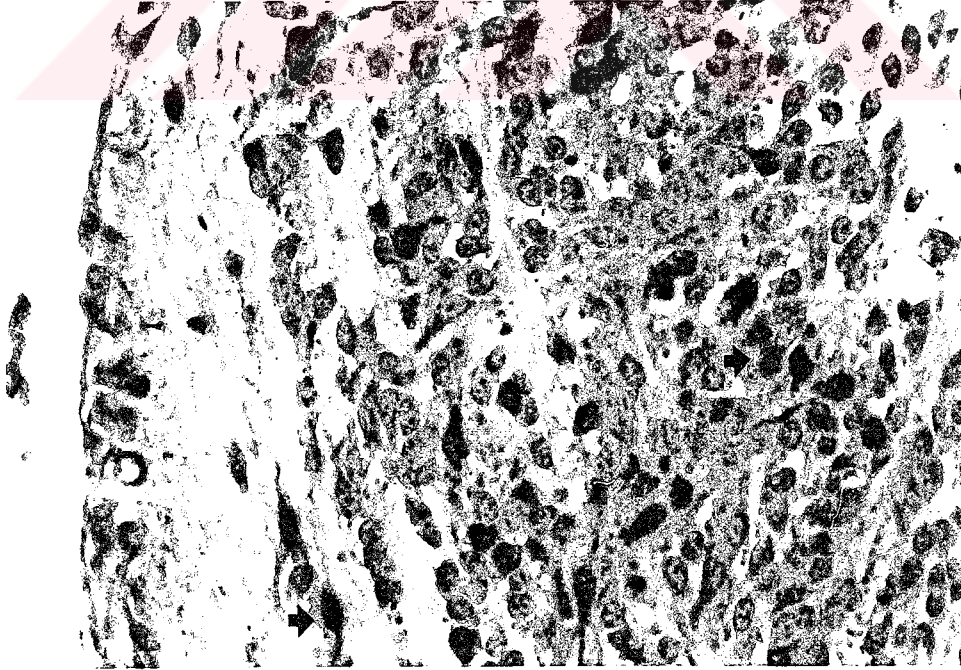
Gebeliğin 8. gününde retinoik asit verilip 18. günde incelenen fetus kalplerinin perikard hücrelerinde TGF β 2 (+) (Şekil 33) ve 12. günde retinoik asit verilip 18. günde incelenen fetusların endokard hücrelerinde (Şekil 34) (+++) TGF β 2 boyanması diğer bir fetusun endokardında ise (+) olarak gözlemlendi (Şekil 35). Aynı şekilde 12. günde retinoik asit verilen ve 20. günde incelenen fetus perikardiyumlarında da (Şekil 36) TGF β 2 immün boyanma (+++) olarak izlendi .

Gebeliğin 8. gününde retinoik asit verilen ve 20. günde incelenen fetus miyokard hücrelerindeki (Şekil 37) immün boyanma şiddeti kontrol grubuna göre daha azalmıştı ve (++) şiddetinde idi.

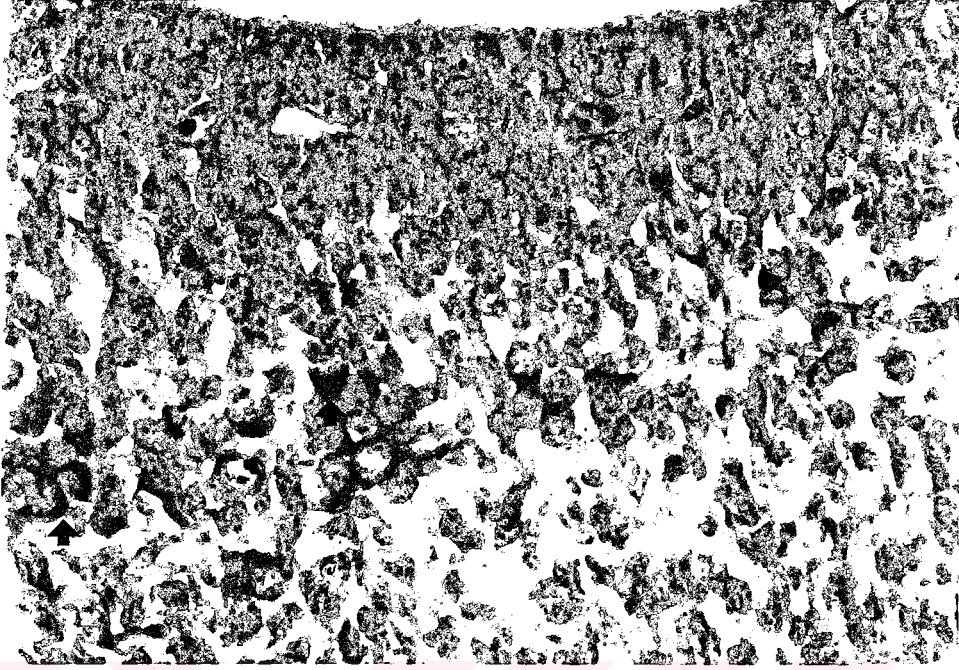
Ölü doğan yavruların kalp dokuları ise nekroze şekilde gözlemlendi . Bu dokulardan kesit alınamadı .



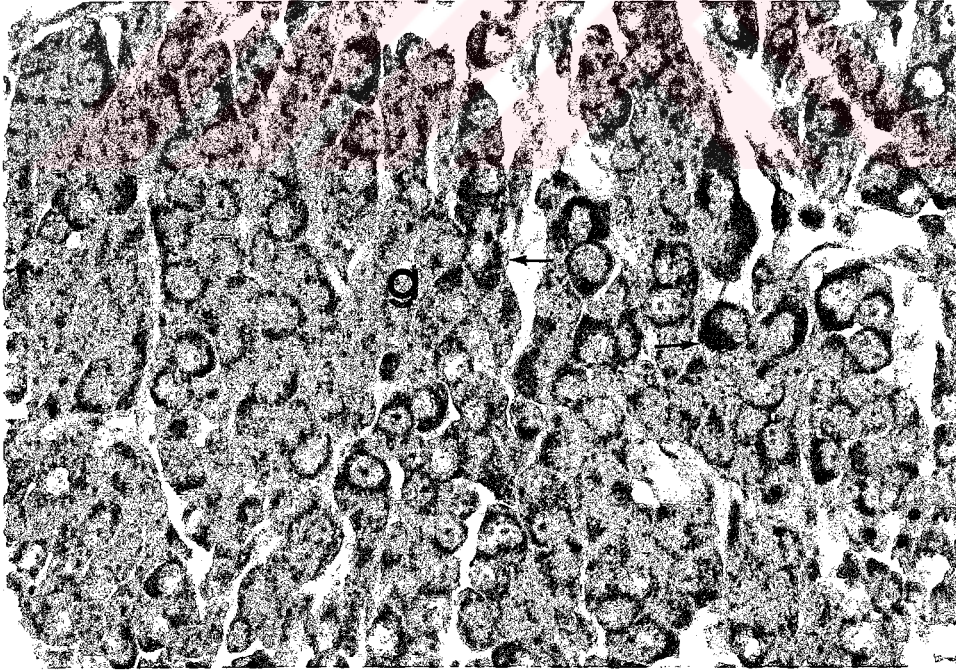
Şekil 6 : Prenatal 15 günlük kontrol grubu fütal ön (ö) ve orta (o) beyindeki immün reaktivite (ok) görölmekte x 20



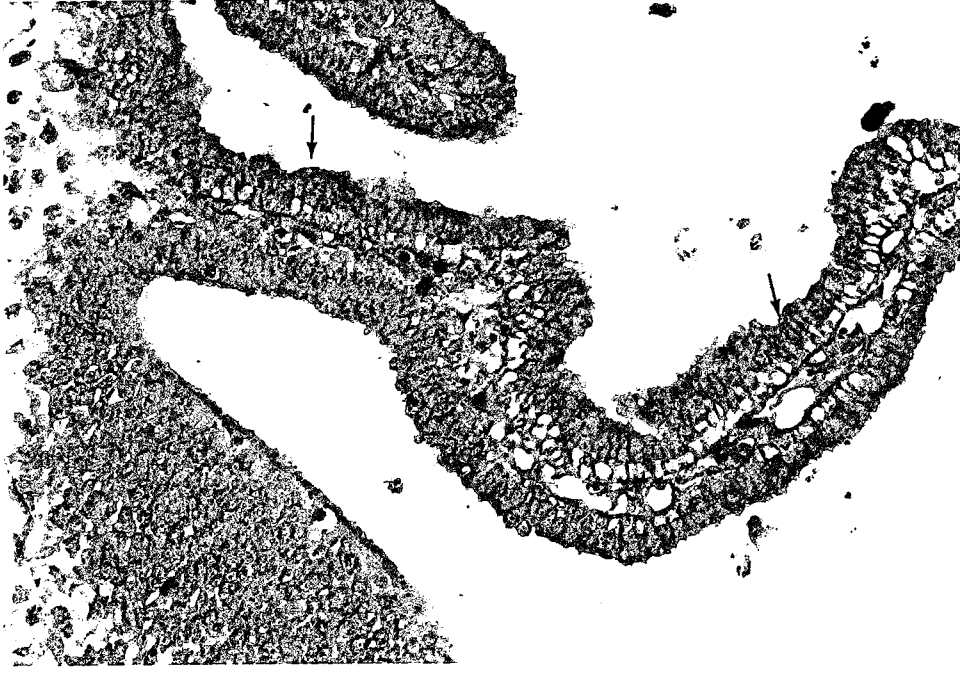
Şekil 7 : Kontrol grubuna ait olan aynı kesitin orta beyin bölgesindeki nöronlarının daha büyük görünümü. Nöronlarda tespit edilen TGF β 2 (+++) pozitiflik açık olarak ayırt edilmekte (ok) x 40



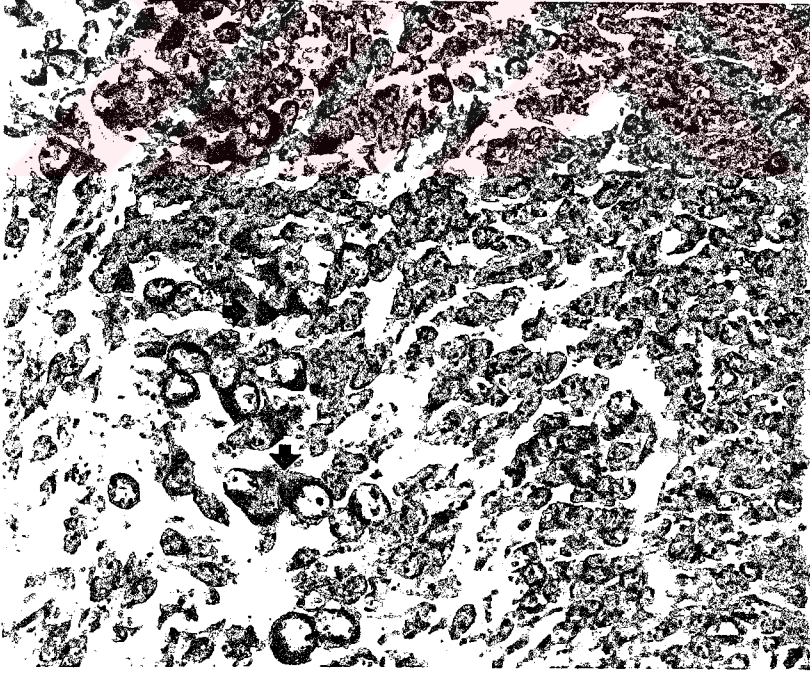
Şekil 8 : Kontrol grubu 15 günlük fötusun arka beyin bölgesinde bulunan nöronlardaki TGF β 2 (+++) (ok) pozitif boyanma seçilmekte x 40



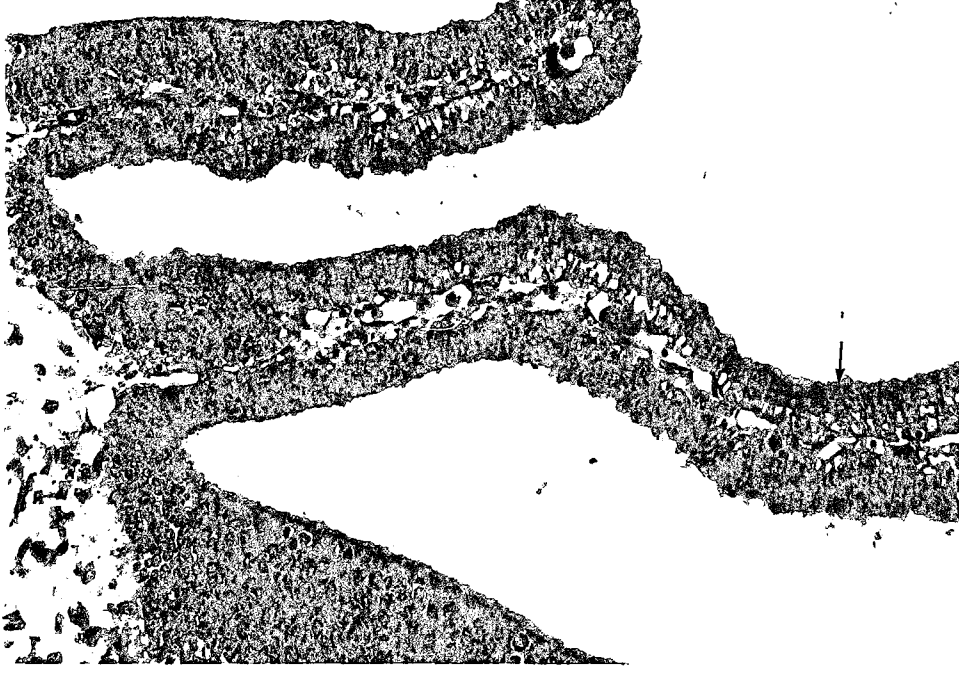
Şekil 9 : Prenatal 15 günlük kontrol grubunda kranial ganglionlarda (g) açığa çıkan TGF β 2 (+++) pozitif immün reaktivite (ok) ayırt edilmekte x 40.



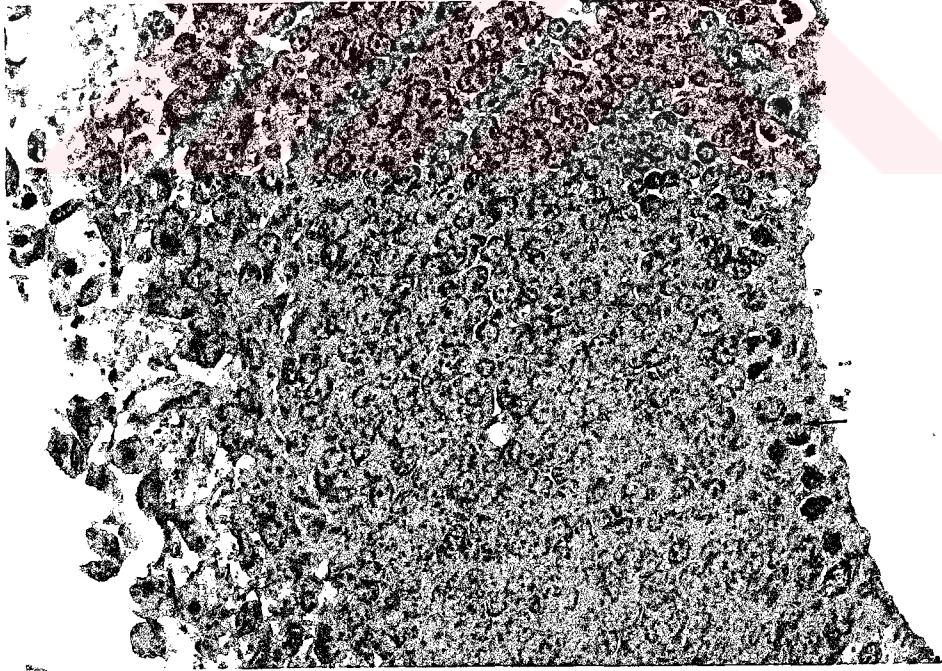
Şekil 10 : 15 günlük kontrol grubu fütusların pleksus koroideusunun ependim hücrelerindeki TGF β 2 (+) pozitiflik (ok) gözlenmekte x 20.



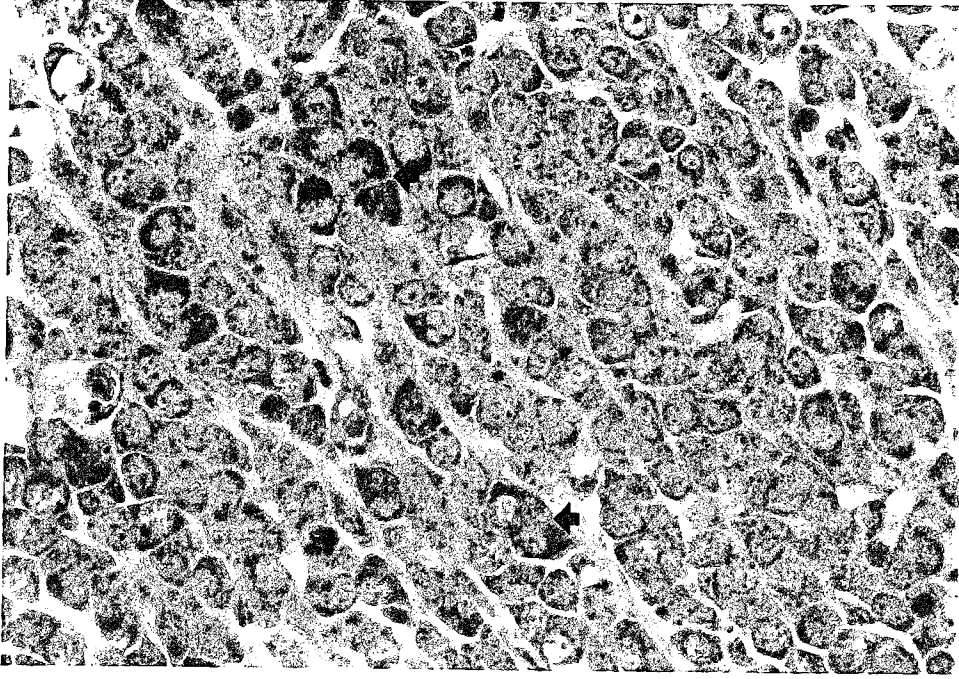
Şekil 11 : Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan 15 günlük fütal arka beyinde yer alan nöronlardaki TGF β 2 (+++) pozitiflik izlenmekte (ok) x 40.



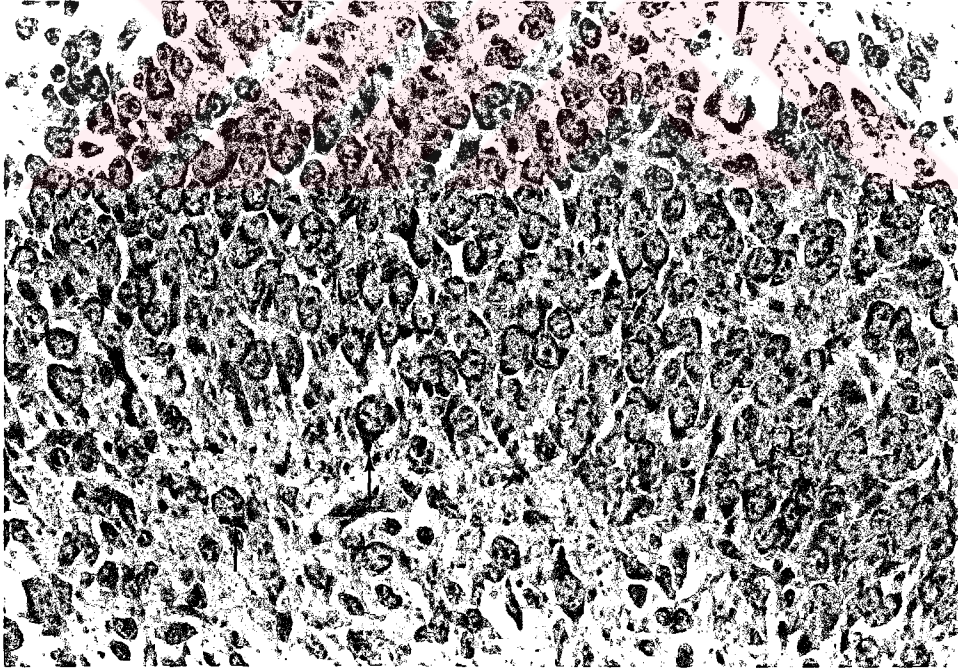
Şekil 12 : Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan fötusun lateral ventrikülünde yer alan pleksus koroideus hücrelerindeki TGF β 2 (+) pozitiflik (ok) seçilmekte x 20.



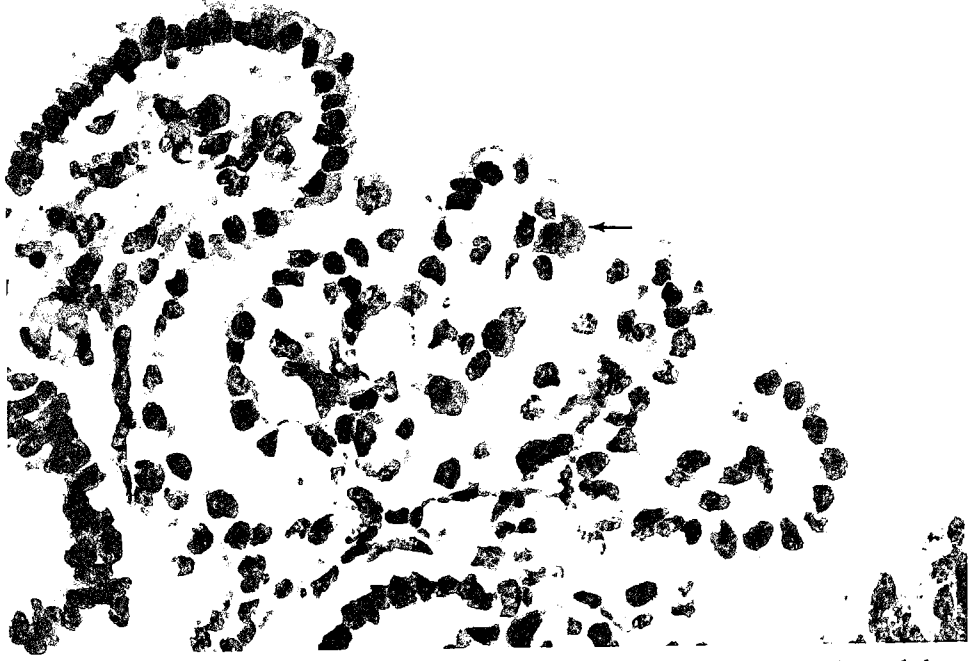
Şekil 13 : Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan 15 günlük fötusların ön beyindeki mitotik aktivite (ok) ve nöronlar etrafındaki TGF β 2 (+++) pozitiflik (*) seçilmekte x 40.



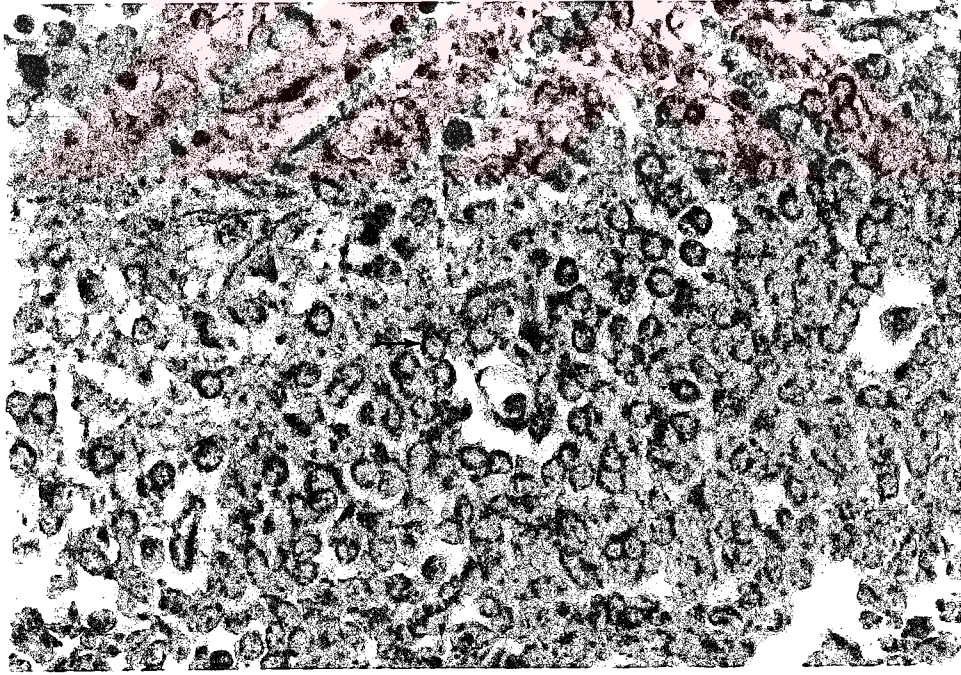
Şekil 14 : Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan fütusların kranial gangliyonlardaki TGF β 2 (+++) pozitifliğin (ok) görüldüğü alan kontrol ve diğer deney grubuna göre azaldığı görülmekte x 40.



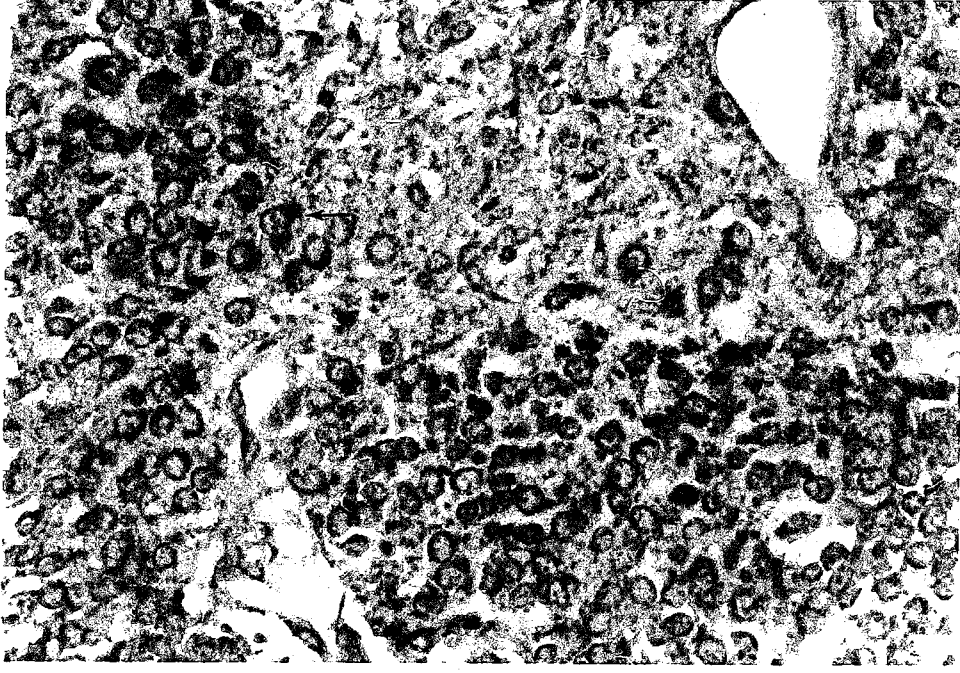
Şekil 15 : Prenatal 18 günlük fütusların ön beyin bölgesinde yer alan nöronlardaki TGF β 2 (++) pozitiflik görülmekte (ok) x 40.



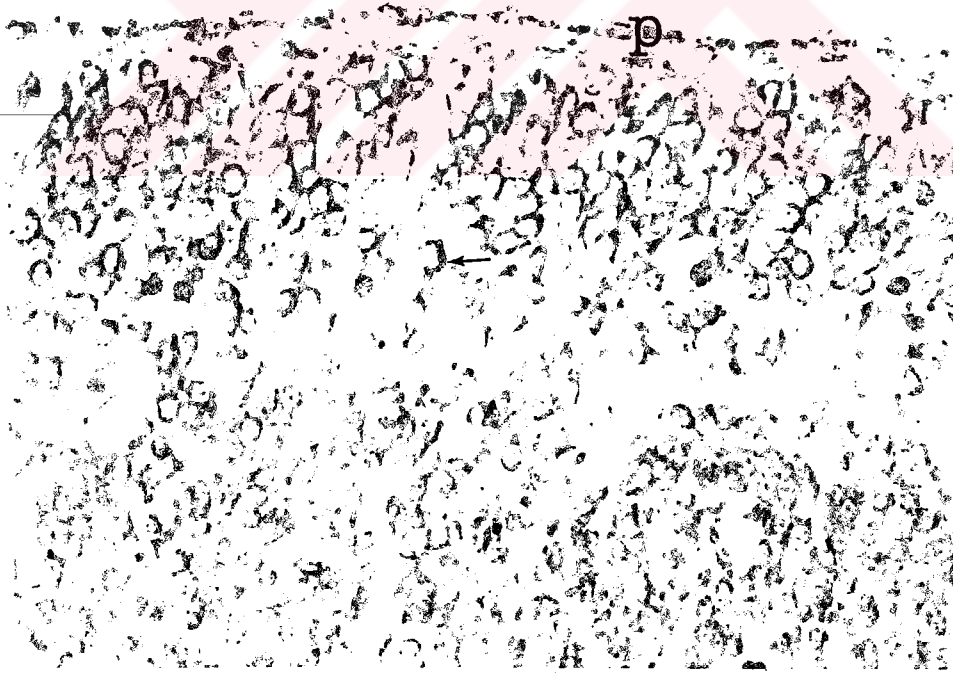
Şekil 16 : Prenatal 18 günlük fôtusun lateral ventrikülünde yer alan pleksus koroideusun ependim hücrelerindeki TGF β 2 (+++) pozitiflik (ok) seçilmekte x 40.



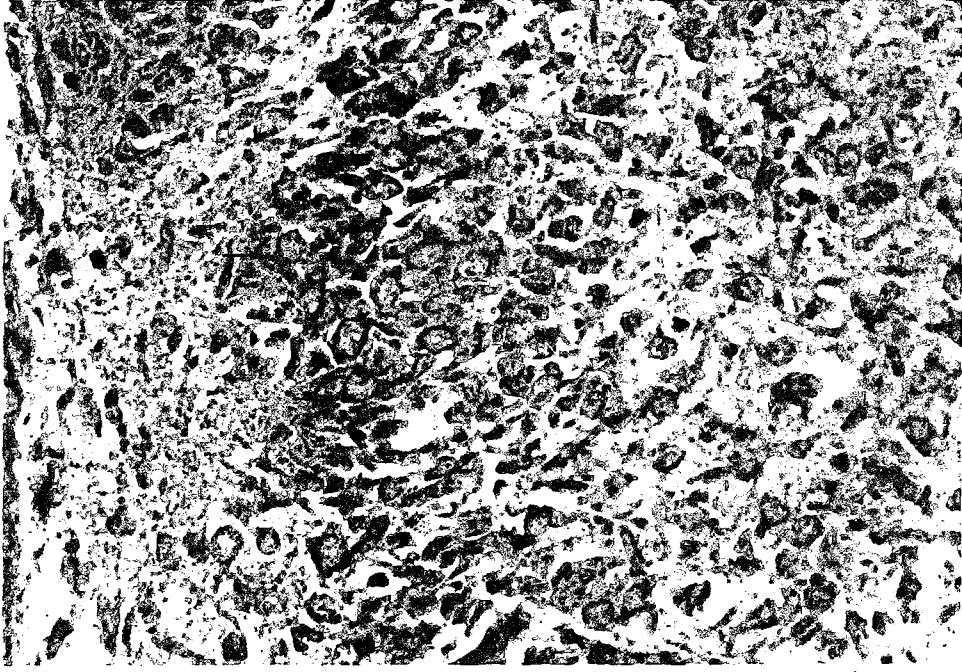
Şekil 17 : Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 18 günlük fôtusların ön beyin bölgesinde yer alan nöronların TGF β 2 (+++) pozitifliği (ok) gözlenmekte x 40.



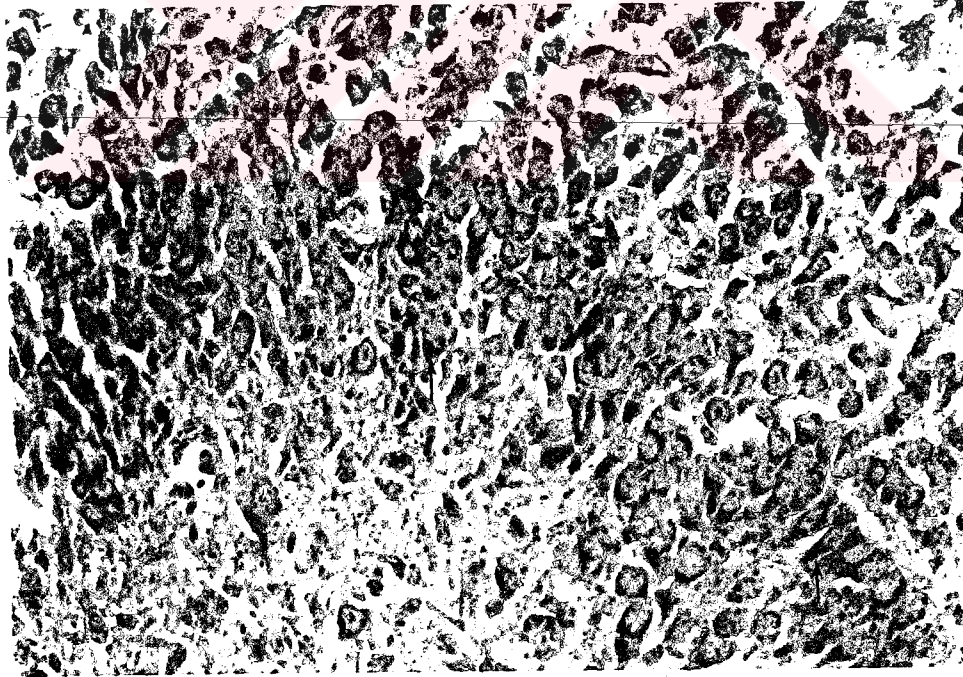
Şekil 18 : Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan fôtusların ön beyin bölgesindeki başka bir alanda görülen TGF β 2 (+++) pozitiflik (ok) izlenmekte x 40.



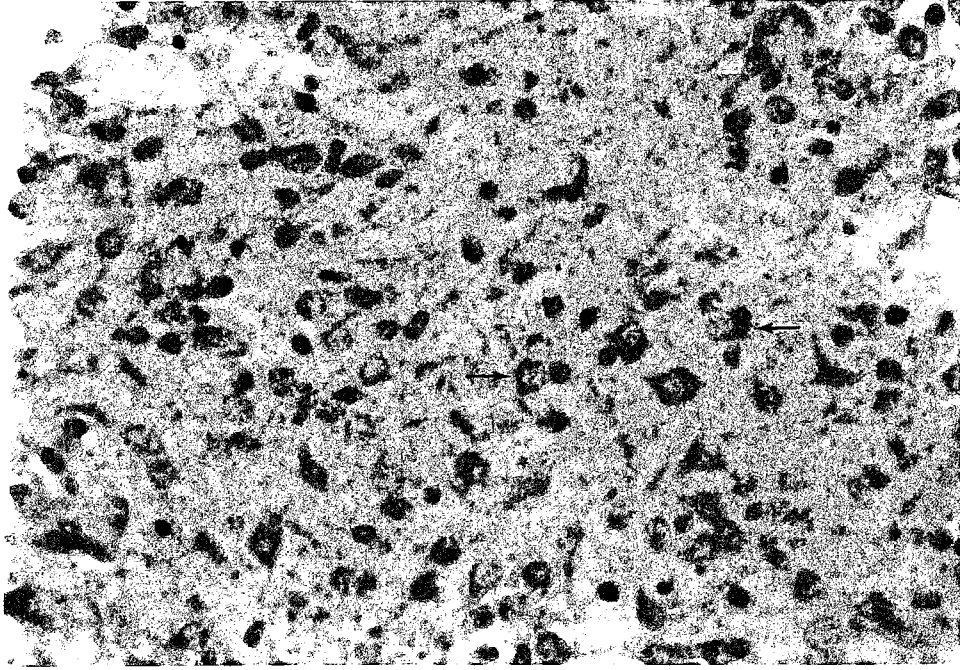
Şekil 19 : Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan fôtusun ön beyin yapısında pia mater (p) ve nöronlardaki TGF β 2 (+++) pozitiflik (ok) ayırt edilmekte x 40.



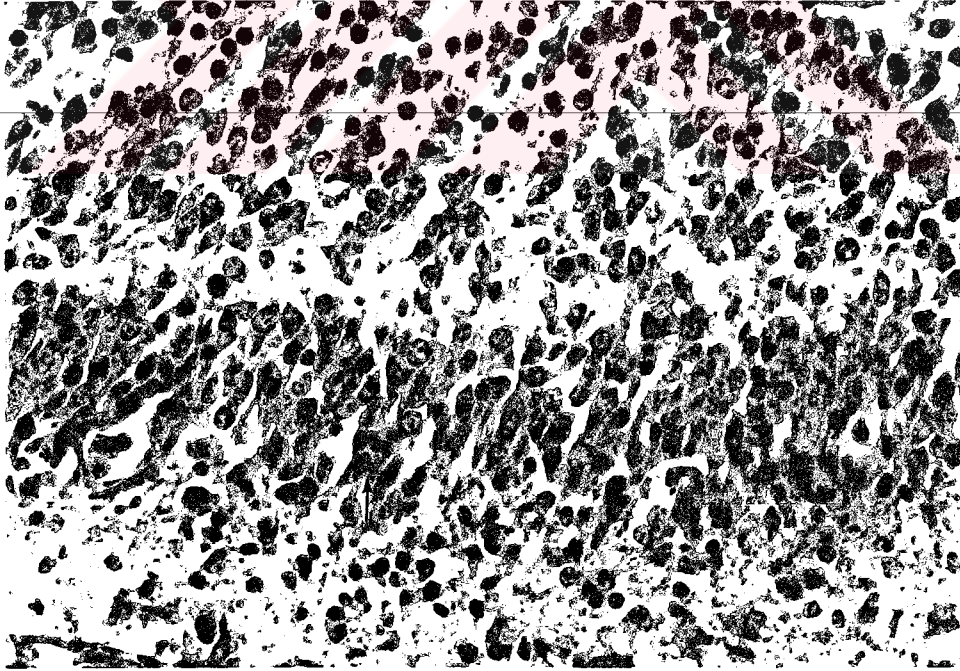
Şekil 20 : Prenatal 20 günlük kontrol grubu fütusların nöronlarında gözlenen TGF β 2 (+++) pozitif immün reaktivite (ok) gözlenmekte x 40.



Şekil 21 : Prenatal 20 günlük beyin dokusunun başka bir alanından alınan kesitteki nöronlarda görülen TGF β 2 (+++) pozitiflik (ok) immün reaksiyon x 40.



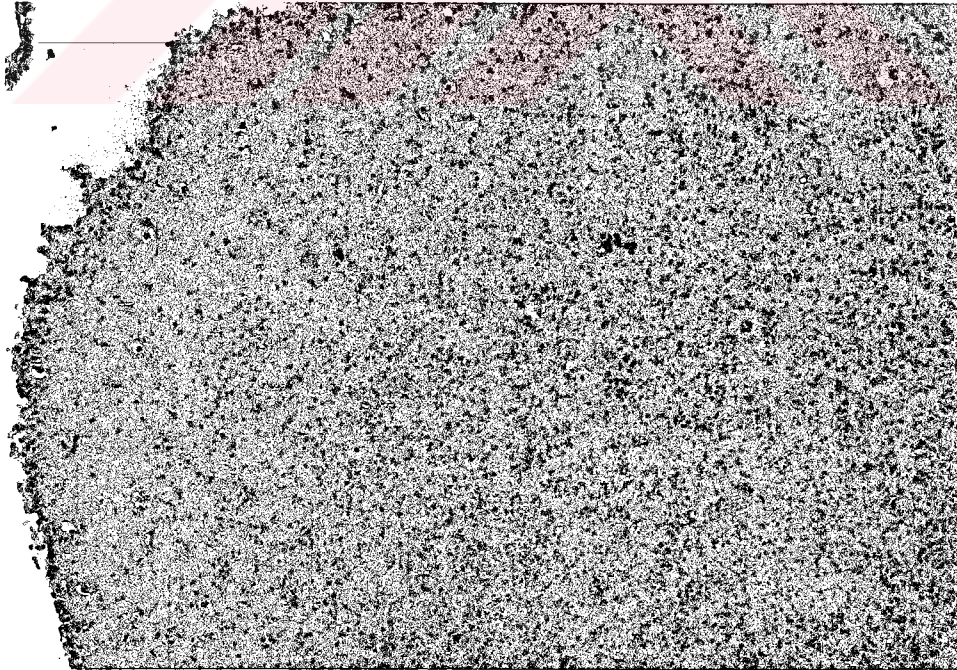
Şekil 22 : Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan 20 günlük fütusların orta beyin bölgesindeki nöronlarda görülen TGF β 2 (++) pozitif immün reaksiyon (ok) x 40.



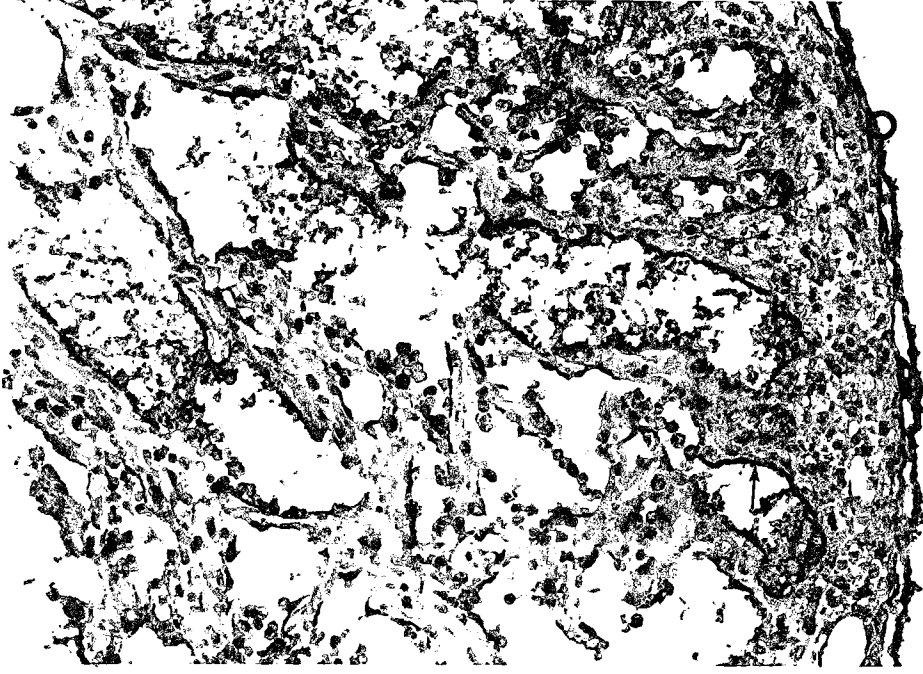
Şekil 23 : Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 20 günlük fütal beyindeki nöronlarda görülen TGF β 2 (+++) pozitif immün reaktivite (ok) seçilmekte x 40.



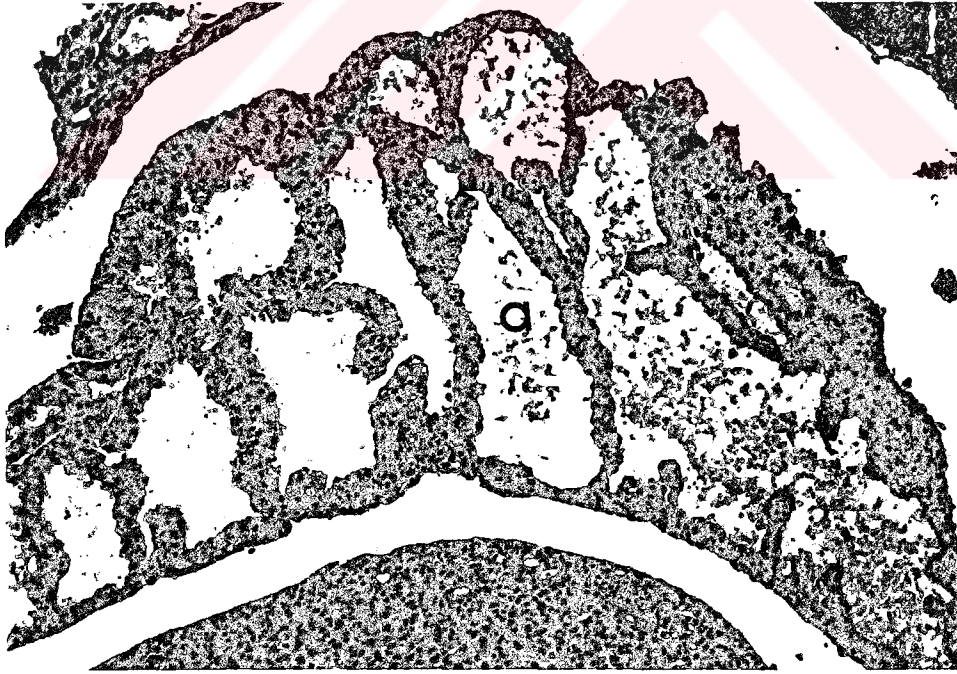
Şekil 24 : Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan yeni doğan beynindeki gelişme geriliği ve TGF β 2 (-) lik görülmekte x 4.



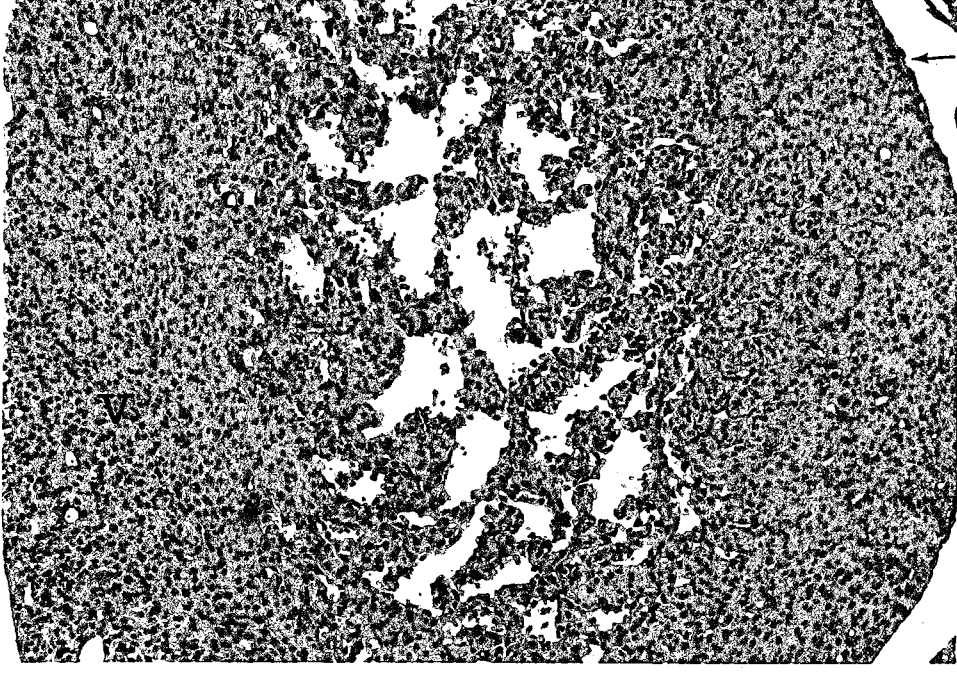
Şekil 25 : Aynı kesitin daha büyük görünümü x 10.



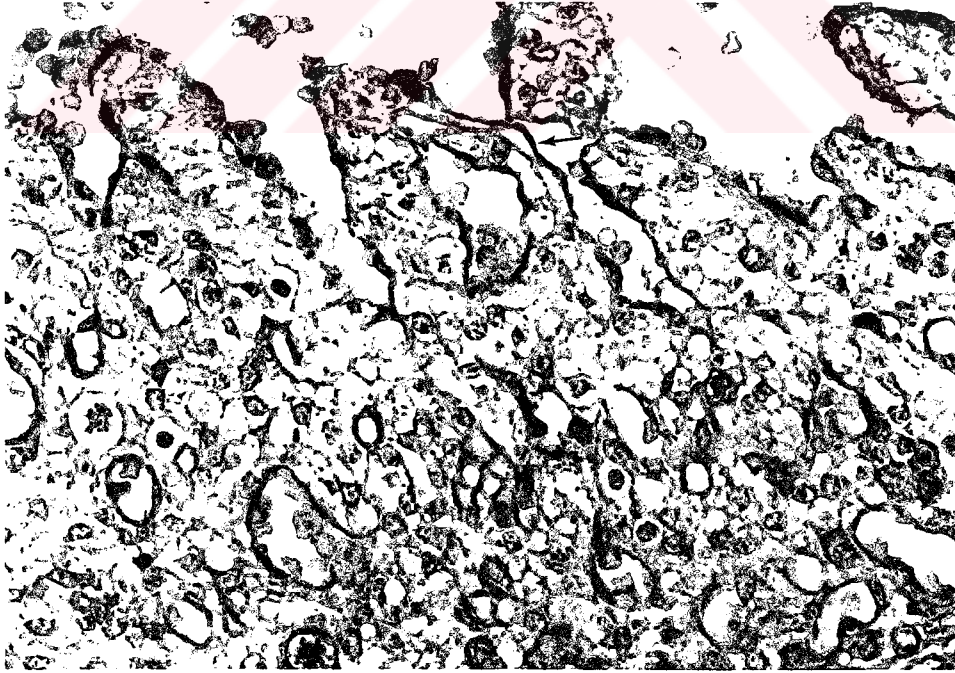
Şekil 26 : Kontrol grubu 15 günlük fetal kalbin ventrikül bölgesindeki endokard (ok) ve perikard tabakalarındaki (p) ve kan hücrelerindeki (*)TGF β 2 (+++) pozitiflik izlenmekte x 20.



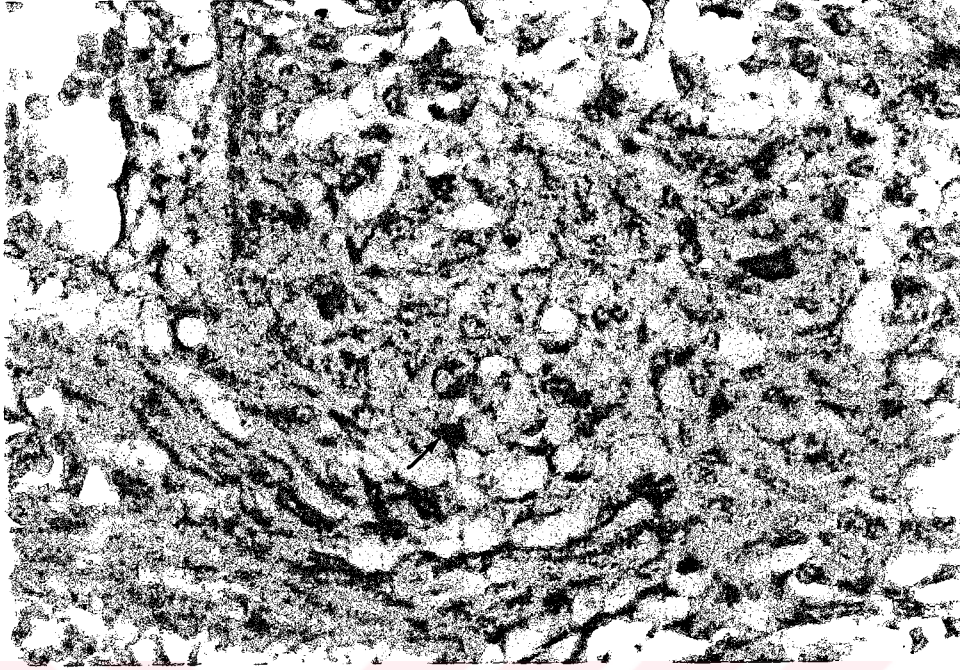
Şekil 27 : Kontrol grubu 18 günlük fetus kalbinin atrium bölgesi (a) görülmekte x 4.



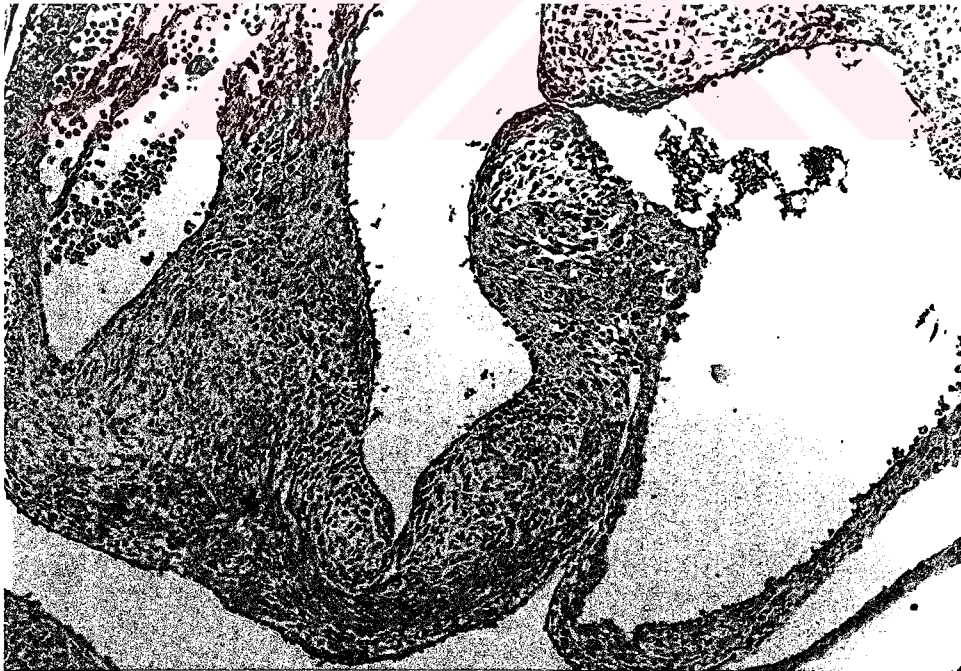
Şekil 28 : Aynı grup ftal kalbinin ventrikül bölgesi (v). Perikardial tabakadaki TGF β 2 (+++) pozitiflik (ok) dikkat çekmekte x 4.



Şekil 29 : Aynı grup ftal kalbinin endokardial tabakasındaki (ok) ve kan hücrelerindeki (+++) pozitiflik immün reaktivite seçilmekte x 40.



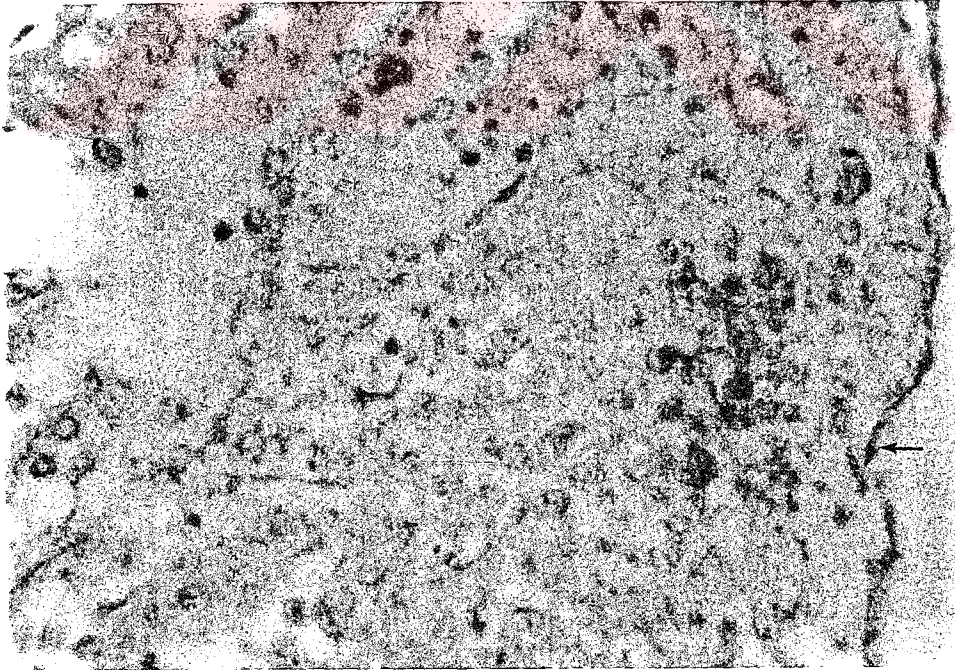
Şekil 30 : Prenatal 20 günlük kontrol grubu fötusun miyokardial hücrelerindeki (+++) pozitiflik (ok) ayırt edilmekte x 40.



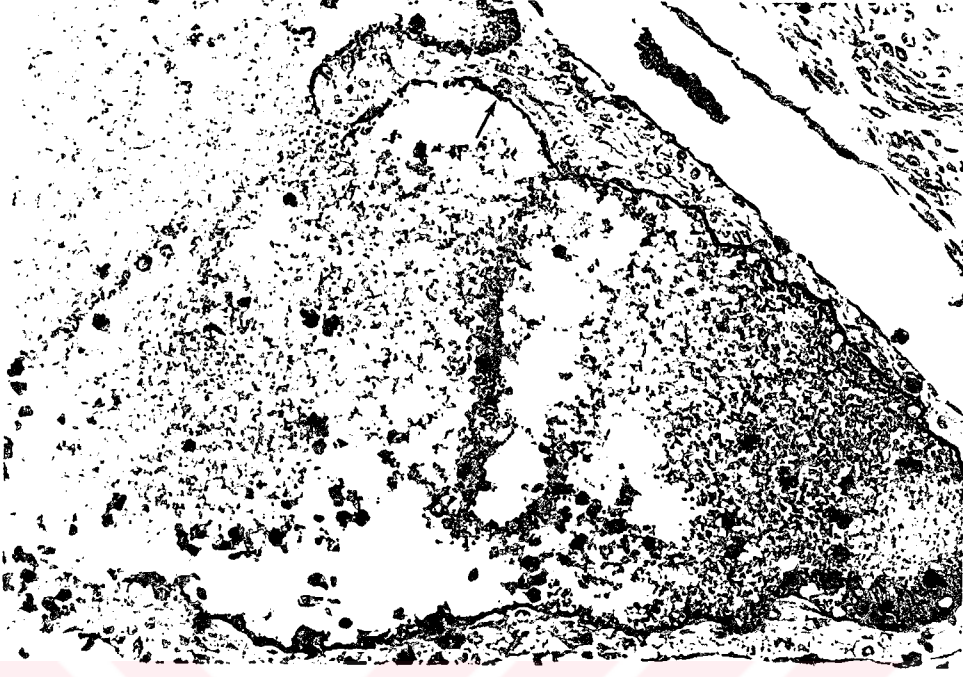
Şekil 31 : Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 15 günlük fötus kalbindeki TGF β 2 (-) immün boyama ve kalbin ventrikülünün bir duvarındaki kas yapısının trabekülasyon göstermediği (*) ayırt edilmekte x 10.



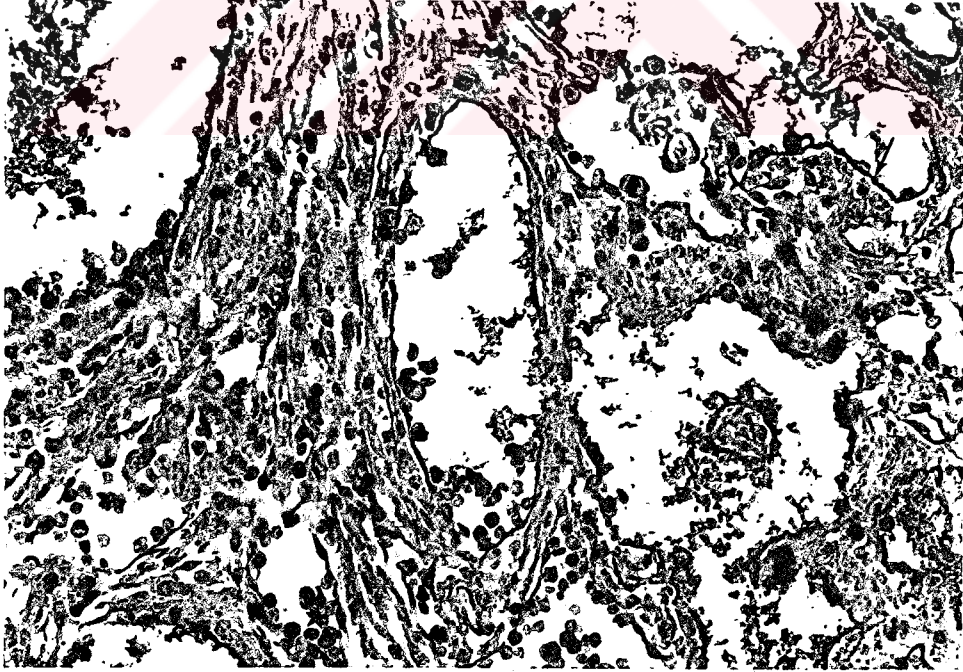
Şekil 32 : Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan 15 günlük fötüs kalbinin ventrikül bölgesindeki endokard ve perikard tabakalarındaki TGF β 2 (-) immün boyama seçilmekte x 10.



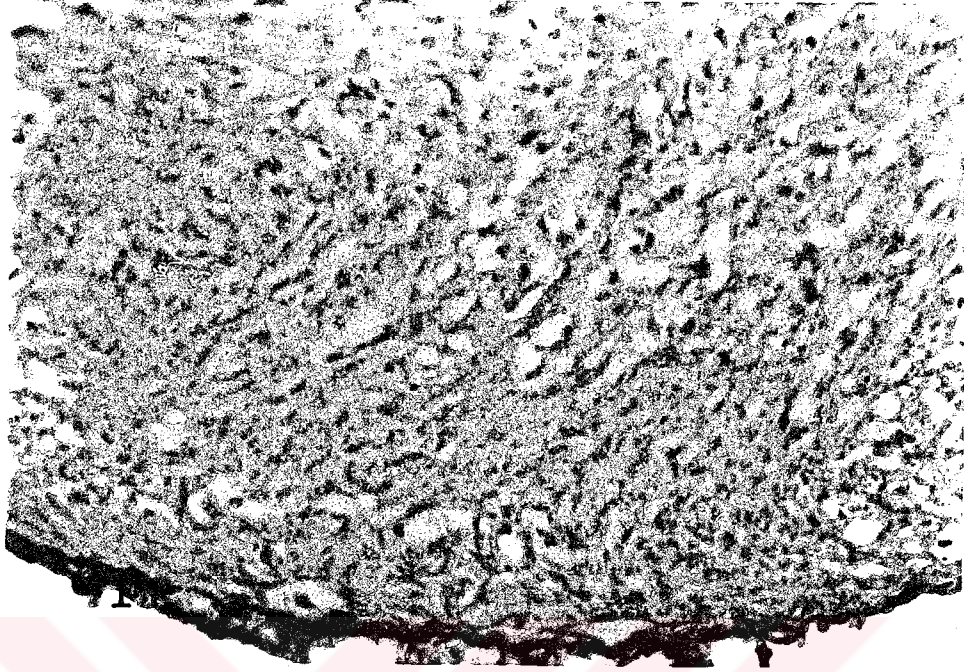
Şekil 33 : Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 18 günlük fötüs kalbinin perikardiyumundaki (+) pozitiflik (ok) ayırt edilmekte x 40.



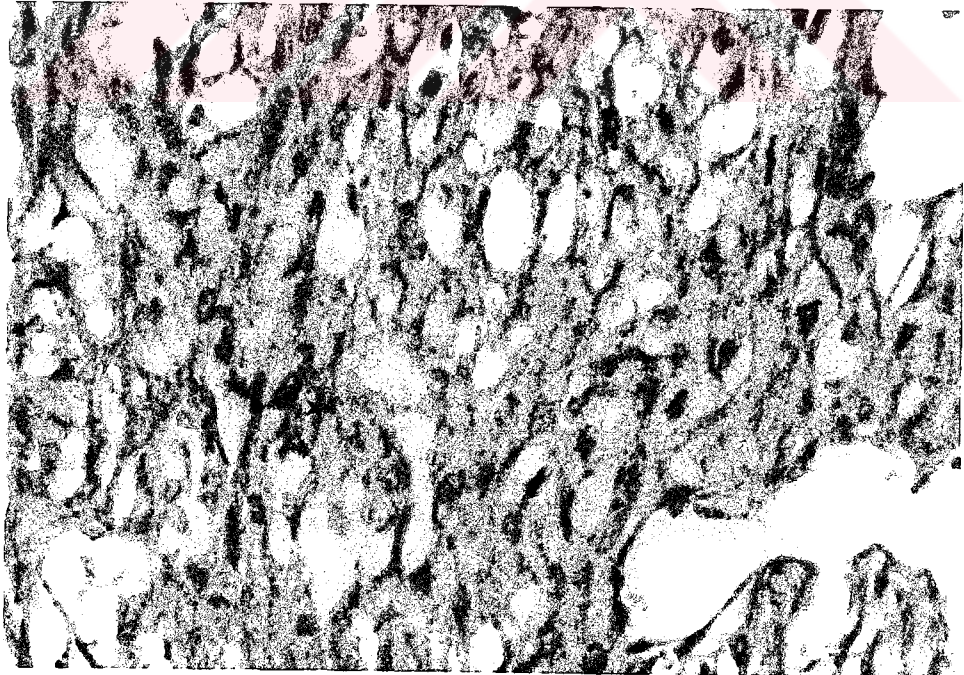
Şekil 34 : Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan 18 günlük fötüs kalbinin endokard tabakasındaki TGF β 2 (+++) pozitiflik (ok) seçilmekte x 20.



Şekil 35 : Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan fötüsün kalp dokusunun ventrikül bölgesinden alınan bir kesit. Endokardiyumdaki TGF β 2 (+) (ok) ve kan hücrelerindeki (*) TGF β 2 (+++) pozitiflik izlenmekte x 20



Şekil 36 : Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan 20 günlük fetal kalp dokusundaki perikardiyum tabakasının TGF β 2 (+++) pozitif (p) immün reaktivitesi görülmekte x 10.



Şekil 37 : Gebeliğin 8. gününde retinoik asite maruz kalan 20 günlük fetal kalpteki miyokardial hücrelerin TGF β 2 (++) pozitifliği (*) seçilmekte x 20.

4.TARTIŞMA ve SONUÇ

Retinol ve metabolitlerinin, büyüme, görme, üreme, embriyonik gelişim ve hücre farklılaşması gibi bir çok temel hayatsal olayda etkili olduğu bilinmektedir (94). All-trans retinoik asit, A vitamini yetersizliği olan deneklerde fertilitenin ve gebeliğin devamı ve organogenezis için önemli bir metabolittir (18). Fakat retinoidlerin, embriyo-toksik etkilerinden dolayı gebelik esnasındaki kullanımları sınırlıdır (94). Gebelik esnasında kullanılan A vitamini ve analoglarının 1953 yılından beri hayvanlarda, 1983 yılından beri de insanlarda teratojen olduğu bilinmektedir (79).

Embriyonik gelişim sırasında retinoik asidin fazlalığının veya eksikliğinin benzer gelişim bozukluklarına yol açtığı bildirilmektedir. Retinoik asit etkisini ya nöral krest hücrelerinin farklılaşmasını etkileyerek veya bu hücrelerin farengial bölgeden göçünü inhibe ederek ya da ekstraselüler matriks proteinlerinin ekspresyonunu bozarak gelişimsel defektlere yol açmaktadır (85).

A vitamininin toksik etkisi veriliş yoluna ve verildiği gebelik periyoduna bağlı olarak değişmektedir. Tzimas G ve arkadaşları (94) ratlara gebeliğin 9. gününde oral yoldan 5 mg/kg dozda all-trans retinoik asit verilmesi sonucunda embriyo-toksik etki saptamazken, 1, 3 ve 5mg'lık dozların deri altı uygulanması sonucu yüksek oranda letal etki ve iskelet anomalileri saptamışlardır. Doz artışına bağlı olarak rezorpsiyon oranında, fetal ölüm oranında ve iskelet anomalilerinde artış olduğu bildirilmektedir.

A vitaminini bağlayan protein olan CRABP (cellular retinoic acid binding protein)'nin kraniofasial mezenşimde ve merkezi sinir sistemi (MSS)'nde yüksek düzeyde bulunduğu saptanmıştır. Ayrıca gelişen ekstremitelerde, nöroektodermal ve nöral krest orjinli yapılarda da bulunduğu bildirilmektedir. Buna bağlı olarak da yüksek doz A vitamini bu yapılarda gelişim bozukluklarına yol açmaktadır (95). Erken embriyonik dönemde retinoik asit nöroepitelyum ve gelişen MSS'de bölgesel olarak birikmesi sonucunda da MSS, göz kulak ve fasiyal gelişim bozuklukları meydana gelmektedir (18). A vitamini nöral krest hücrelerinin fasiyal bölgeye göçünü etkileyip bölgede mezenşimal yetersizliğe yol açarak yüz, beyin ve gözde gelişim bozukluklarına sebep olmaktadır. Maternal yüksek doz A

vitamini mikroftalmi, anoftalmi, katarakt ve lens fibrillerinde nekroz, retina ve optik sinirde dejeneratif değişiklikler oluşturmaktadır (67). Yüksek doz retinoik asitin etkisine bağlı olarak genel büyüme geriliği (18), ileride maxillaya, mandibulaya ve kulağa farklanacak olan 1. ve 2. brankial arklarda kısıalık meydana gelmektedir (18, 68).

Alles AJ ve arkadaşları (4) retinoik asidin, apoptozisin olduğu zonda hücre ölümünü artırarak malformasyonlara yol açtığını bildirmektedirler. Retinoik asite bağlı yoğun hücre ölümü özellikle ekstremite ve kranio-fasiyal bölgelerde meydana gelmektedir. Gebeliğin 11. gününde 100 mg/kg all-trans retinoik asitin fare ftuslarının ekstremitelerinde mezomelik malformasyonlara yol açtığı saptanmıştır.

Holson RR ve arkadaşları (34) ratların gebeliklerinin 11. – 13. günleri arasında retinoik asite oldukça duyarlı olduklarını bildirmektedirler. Bu dönemde uygulanan all-trans retinoik asitin l doğumlara, canlı olarak doğan yavruların sayısında azalmalara yol açtığı gözlenmiştir.

Gebeliğin erken dönemlerinde retinoik asite maruz kalan ftuslarda mikrosefali (10, 20, 43, 91, 99), kraniofasiyal anomaliler (27, 78, 99), kalp – damar defektleri (10, 99), n beyin ve orta beyin yapılarında gelişme geriliği (33, 50), ekzoftalmus, ekzensefali (67), omfalosel, hipoplastik mandibula (84) gibi gelişim defektlerinin meydana geldiği bildirilmektedir.

Yapılan bu çalışmada da gebeliğin erken dönemlerinde uygulanan retinoik asitin, intrauterin gelişimi ciddi şekilde etkilediği ve birçok dokunun gelişimini bozduğu tespit edildi. Yüksek doz all-trans retinoik asite bağlı olarak ftuslarda nöral tüp defektleri, mikroftalmi ve ekzoftalmus gibi göz gelişim defektleri, gastroşizis, fasiyal yarık, omfalosel, maxillar – mandibular hipoplazi gibi gross olarak gözlenebilen gelişim bozuklukları saptandı.

Cunningham ve arkadaşları (15) gelişimin erken dönemlerinde rat embriyolarının retinoik asite oldukça duyarlı olduğunu, gebeliğin ilerleyen dönemlerinde bu duyarlılığın azaldığını bildirmektedirler. Yapılan bu çalışmada da gebeliğin 8. gününde uygulanan retinoik asitin şiddetli teratojenik etki

doğurduğu, fakat 12. günde uygulanan aynı dozdaki retinoik asitin fetal gelişim üzerinde çok fazla yan etki oluşturmadığı görüldü.

Pauken CM ve arkadaşları (68) gastrulasyon veya implantasyon sırasında uygulanan retinoik asitin nöral tüp ve karın duvarı defektlerine yol açtığını bildirmektedirler. Nöral tüp üzerine olan etki sonucunda beyin fleksiyonunun az olması veya hiç olmaması ve ön beyin hipoplazisinin geliştiği bildirilmektedir. Bu çalışmada da gebeliğin 8. gününde uygulanan retinoik asitin beyinin yetersiz fleksiyonuna sebep olduğu ve karın duvarı defektlerine yol açtığı görüldü.

Retinoidlerin hücre farklılaşması üzerine olan inhibitör etkisiyle kondrogenezisi aksattığı ve bu aksaklığın ekstremitte defektlerine yol açtığı bildirilmektedir (18, 38, 44, 45, 83, 84). İntrauterin gelişimin erken dönemlerinde uygulanan 13-cis retinoik asit ekstremitte tomurcuğunun apikal ektodermal çıkıntısında yoğun hücre ölümü meydana getirmekte ve bunun sonucunda da kısa ekstremitte defektleri meydana gelmektedir (92). Gebeliğin 11.5 veya 12. günlerinde tek doz uygulanan 100 mg/kg all-trans retinoik asitin fare fötüslerinin %90'unda ekstremitte kemiklerinde kısalmalara yol açtığı bildirilmektedir (44). Yapılan bu çalışmada da yüksek doz retinoik asitin ekstremitelerde kısalmalara yol açtığı görüldü. Gebeliğin 8. gününde all-trans retinoik asite maruz kalan ve 18. günde incelenen fötüslerin birinde ekstremitte kısalığı dışında kemikleşmede de bozukluk olduğu fötüsün adeta bir et yığını gibi olduğu, tespit edildi. Bu veri ışığında yüksek doz retinoik asitin kondrogenezisi bozan bir etkiye sahip olduğu sonucuna varıldı. Gebeliğin 12. gününde uygulanan aynı doz retinoik asitin de ekstremitelerde kısalığa yol açtığı fakat retinoik asitin etkisinin 8. gündeki kadar ciddi olmadığı tespit edildi .

Yine erken embriyonik dönemde uygulanan yüksek doz A vitamininin yüksek oranda embriyo ölümüne ve rezorpsiyona yol açtığı bildirilmektedir (14, 32, 38, 43, 68, 83, 92). Yapılan bu çalışma da retinoik asitin teratojenik etkisiyle, özellikle gebeliğin erken dönemindeki uygulama sonucunda (8. gün), %56 - %100 oranında rezorpsiyon olduğu, gebeliğin 12. günündeki uygulamada ise retinoik asitin sebep olduğu rezorpsiyon oranında düşüşün olduğu (% 23 - 25)

tespit edildi. Retinoik asitin etkisiyle rezorpsiyonun dışında yüksek oranda intrauterin ölümün de meydana geldiği görüldü.

Chescheir NC ve arkadaşları (12) ikiz fötuslardan birinin ölümü sonucunda doğum olayının geciktiğini bildirmektedirler. Yapılan bu çalışmada da gebeliğin 8. gününde retinoik asit uygulanıp doğum yapması beklenen ratın doğumunun yaklaşık 3.5 – 4 gün geciktiği ve doğan bütün yavruların ölü, malforme oldukları deri renklerinin ise siyanotik bir hal aldığı görüldü. Doğumun gecikmesine de ölü fötusların yol açtığı düşünülmektedir.

Prenatal gelişimin erken dönemlerinde retinoik asite maruz kalınması fötal ağırlık ve tepe – kuyruk uzunluğunu da etkilemektedir. Gebeliğin 10. gününde yapılan kültür çalışması ile retinoik asit uygulananın tepe – kuyruk uzunluğunda % 10.5 oranında kısalmaya neden olduğu bildirilmektedir (15). Pıllans PI ve arkadaşları (72) gebeliğin 3. gününde 5 000 İÜ ve 10 000 İÜ A vitamini uyguladıkları fare fötüslerinin vücut ağırlıklarının kontrol grubu fötuslarla aynı olduğu fakat 15 000 İÜ ve 30 000 İÜ A vitamini uygulanan deneklerin fötüslerinin vücut ağırlıklarında anlamlı şekilde azalma olduğunu bildirmektedirler. Prenatal 11.5 . günde 100 veya 200 mg/kg dozda all-trans retinoik asite maruz kalan fare fötüslerinin 18. günde incelenmesi sonucunda vücut ağırlıklarında anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir (44). Bu çalışmada ise prenatal 8. veya 12. günde tek doz uygulanan all-trans retinoik asitin hem fötal vücut ağırlığını hem de fötal tepe – kuyruk uzunluğunu etkilediği görüldü. Retinoik asitin kilo ve tepe – kuyruk uzunluğu üzerine olan etkisi 8. günde retinoik asit uygulanan gruplarda daha ciddi boyutta idi.

Retinoik asit normal kalp gelişiminde etkili olan güçlü bir morfogendir, yoğunluğunun veya eksikliğinin değişik kalp defektlerine yol açtığı bildirmektedir (5, 98). Retinoik asit miyokardiyumdan ekstraselüler matriks salgılanmasını etkileyerek kardiyak mezenşim formasyonunu baskılamakta ve endokardial yastıkcıklarda değişiklikler oluşturarak kalp defektlerine yol açmaktadır. Yapılan çalışmalar retinoik asidin endotelial/mezenşimal transformasyonu etkilediğini göstermektedir. Yüksek doz A vitamini; kardiyak bifida, ventriküler septal defekt, sağ ventrikülden iki çıkış noktası, büyük damarların transpozisyonu gibi gelişim

anomalilerine sebep olmaktadır. Retinoik asit kalp gelişimini ya kranial nöral krest hücrelerinin migrasyonunu bozarak ya da direk kardiyak hücreler üzerine toksik etki göstererek etkilemektedir. Maternal retinoik asit uygulaması, miyokardial hücrelerin apoptozisinde artış meydana getirmekte, yastıkcıkların mezenşim formasyonunu baskılamaktadır. Retinoik asidin toksik etkisi miyokard için spesifiktir, endotelyumda etkilenme belirtilmemektedir. Isotretinoin kardiyak miyosit proliferasyonunu, kardiyak kontraksiyonların gelişimini ve α -aktinin oranını inhibe etmektedir (98).

Osmond M ve arkadaşları (66) embriyo kültürüne ilave edilen retinoik asidin prekardiyak mezodermin kranio-medial göçünü inhibe ettiği ve kalp tüpünün kranialinde gelişme geriliğine yol açtığını tüpün kaudal kısmında ise genişlemenin veya normal gelişimin söz konusu olduğunu bildirmektedirler. Retinoik asidin kalbin geliştiği alana direk uygulanması sonucu kardiyogenik oluşumda bozulma, orta hatta tek bir kalp tüpünün oluşumu ve kardiyak bifida gibi bozukluklar oluşmaktadır. Bizim çalışmamızda da prenatal 8. günde uygulanan yüksek doz retinoik asidin miyokardial tabakayı etkilediği görüldü.

A vitamini ve analogları insanlarda genellikle dermatolojik ve neoplastik rahatsızlıklarda kullanılmaktadırlar (94). Gebeliğin ilk dönemlerinde kullanılan retinoik asidin prenatal gelişim üzerine ters etki yaptığı bildirilmektedir. Bu durumda nöral krest hücrelerinin göçünün ve farklılaşmasının ilk 1-2 ay içerisinde olaylanmasından kaynaklandığı bildirilmektedir (96). Gebeliklerinin ilk trimesterinde retinoik asit kullanan kadınların yeni doğan çocuklarında yüksek oranda yarı damak, perdeli boyun, mikroftalmi ventriküler ve atrial septal defekt, patent duktus arteriozis (28), küçük çene, fasiyal bozukluk, Dandy-Walker sendromu, mental gerilik (75), retinal ve optik sinir anomalileri (47) gibi gelişim defektlerinin saptandığı rapor edilmektedir.

Sulik KK ve arkadaşları (92) retinoik asidin mitozdaki hücrelerin ölümüne yol açtığını ve mitotik aktiviteyi bloke ettiğini bunun sonucunda da anomalilerin meydana geldiğini bildirmektedir. Yaptığımız bu çalışmada da özellikle gebeliğin 8. gününde retinoik aside maruz kalan fötusların beyin dokusu kontrol grubu

dokularla karşılaştırıldığında mitotik aktivitenin yok denecek kadar az olduğu oysa kontrol grubu fötuslarda yoğun bir mitotik aktivitenin olduğu tespit edildi.

Peptid growth faktörlerden biri olan Transforming Growth Factor β (TGF- β) da retinoidler gibi hücre sel büyüme ve farklılaşmayı kontrol eden düzenleyici moleküllerdendir (52, 42). Retinoidler ve TGF- β arasındaki etkileşim ve bu iki bileşik arasında dengenin oluşması hücre sel proliferasyonda ve farklılaşmada önemli rol oynamaktadır (52).

Transforming growth faktör β (TGF- β) ailesi doku hemostazisinde ve gelişimde rol oynayan hücreler arası sinyal proteinleridir (71). TGF- β 'nın özel hedef hücreler üzerine olan etkisi hücre tipine, hücrenin farklılaşma durumuna ve hücrede diğer polipeptid growth faktörlerin bulunup bulunmayışına göre değişmektedir (36).

Embriyogenez esnasında TGF- β yetersizliği veya yokluğunda epitelyal mezenşimal etkileşim hücre büyümesi, ekstraselüler matriks üretimi ve doku şekillenmesinde bozukluklar meydana gelmektedir . Buna bağlı olarak göz, kulak, mezenşim doku ve ürogenital sistem anomalilerini kapsayan gelişim defektleri (82) ve intrauterin veya postnatal hayatın erken dönemlerinde ölüm meydana gelmektedir (71).

TGF- β 'lar nöroektodermal , mezenşimal ve epitelyal hücre tiplerinde hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve ekstraselüler matriks üretimini düzenlemektedirler. Buna bağlı olarak da merkezi sinir sistemi nöroepitelyumunu ve mezodermi module ettikleri düşünülmektedir (30, 51). Merkezi sinir sisteminde (MSS) nörotrofik faktörler olarak bilinen bu polipeptidlerin hipokampusun oluşumunda etkili oldukları bildirilmektedir (39).

Flanders KC ve arkadaşları (23) TGF- β 2 ve TGF- β 3 işaretlenmesinin embriyonik gelişim süresince değişiklik gösterdiğini, bu izoformların en yoğun olarak nöronal farklılaşmanın başladığı marjinal zonda, en az olarak ise aktif proliferasyonun olduğu ventriküler zonda saptandığını bildirmektedirler. Yapılan bu çalışmada da TGF- β 2 immün reaktivitesinin gelişim gününe ve yüksek dozda uygulanan A vitamininin etkilerine göre değiştiği saptandı . Kontrol grubu 15 günlük fötuslarda ön beyin , orta beyin , arka beyin ve gangliyonlarda bariz şekilde işaretlenen TGF- β 2, prenatal 8. günde A vitaminine maruz kalan 15

günlük fütuslarda sadece arka beyin ve gangliyonlarla sınırlı olarak tespit edildi. Fakat yine prenatal 8. günde A vitaminine maruz kalan ve 18. günde incelenen fütal beyin dokusunda ise TGF- β 2 işaretlenmesinde 18 günlük kontrol grubuna kıyasla ciddi bir artış saptandı.

Pelton RW ve arkadaşları (69) MSS'de TGF- β ailesinden en fazla miktarda TGF- β 2 ve TGF- β 3 izoformlarının bulunduğunu bildirmektedirler. Gelişimin 12.5. gününde TGF- β 2'nin beyni çevreleyen meninkslerde güçlü şekilde işaretlendiğini ve bu işaretlenmenin 17.5 . güne kadar bariz bir şekilde devam ettiği tespit edilmiştir . Prenatal 17.5 . günde TGF- β 2 immün reaksiyonu beyinde nöronları çevreleyen glia hücrelerinde ve spinal kord astrositlerinde saptanmıştır. Koroid pleksus ve medulla spinaliste ise güçlü bir şekilde TGF- β 3 işaretlenmesinin olduğu bildirilmektedir. Yapılan bu çalışmada da gelişimin 18. gününe kadar pia mater'de ve gebelik süresince koroid pleksusta TGF- β 2 immün reaksiyonu tespit edildi .

Sıçanlarda TGF- β 2 ve TGF- β 3 immün reaktivitesi gebeliğin 12. günü dolaylarında talamus, mezensefalon, rombensefalon, ventral marjinal ve manto zonlarında farklılaşmakta olan nöronlarda, kranial sinir fibrilleri ve kranial ve dorsal root gangliyonlarında tespit edilmiştir. Gebeliğin 15. günü dolaylarında rombensefalik ve spinal kord motor nöronlarının perikaryonlarında işaretlenmiştir. Bu proteinlerin MSS'nin hücrel organizasyonu süresince radial glia ve göç eden nöroblastlar arasındaki etkileşime katıldıkları bildirilmektedir (51). Nöronal migrasyon esnasında TGF- β 2 ve TGF- β 3 immün reaksiyonu, bu polipeptidlerin nöronal hareketi ve farklılaşmayı düzenlediğini düşündürmektedir (51, 70).

Farelerde gelişimin 15. gününde spinal kord ve rombensefalik motor nöronlarının perikaryonlarında, 16. gününde serebral kortekse farklılaşacak olan telensefalik kortekste TGF- β 2 işaretlenmesi tespit edilmiştir (23). Yapılan bu çalışmada da TGF- β 2'nin gelişim periyoduna göre değişmekle birlikte ön, orta ve arka beyinde, kranial gangliyonlarda, meninkslerde bariz bir şekilde işaretlendiği tespit edildi. Elde edilen bilgiler ışığında TGF- β 'nin nöronal migrasyon ve farklılaşmada rol aldığı düşünülmektedir.

TGF- β izoformlarının iskelet ve kalp miyogenezisini indüklediği rapor edilmektedir (19). Ergin kalbinin septum ve kapakçıklarının ilkel hali olan

endokardial yastıkçıkların oluşumunda en kritik olayın endotelial mezenşimal transformasyon olduğu (59, 74) , bu olaydaki bir aksaklığın bir çok kongenital kalp defektine yol açtığı bildirilmektedir (59). Endokardial yastıkçıkların oluşumuna basamak teşkil eden epitelyal – mezenşimal farklılaşmada TGF- β izoformlarının etkili olduğu belirtilmektedir (11, 19, 30, 53, 58, 74).

Potts JD ve arkadaşları (74) atrioventriküler kanal ve konus kordisteki mezenşimal hücre formasyonunda TGF- β 'nin etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Dickson MC ve arkadaşları (19) fare embriolarında gebeliğin 8.5 – 9.5. günlerinde farklılaşan ventriküler miyokardiyumda, konus kordiste TGF- β 2 işaretlenmesini saptamışlardır. Bu araştırmacılar TGF- β 2'nin kalp gelişiminin erken dönemlerinde indükleyici etkiye ve kardiomyogenezisi destekleyici role sahip olduğunu bildirmektedirler. Pelton RW ve arkadaşları (69) embriyonik kalpte TGF- β 3'ün bariz şekilde işaretlendiğini fakat TGF- β 1 ve TGF- β 2 proteinlerinin zayıf immün reaktivite gösterdiğini bildirmektedirler. Yapılan bu çalışmada da kalp dokusunda TGF- β 2'nin işaretlenmesinin çok yoğun olmadığı, immün reaktivitenin genellikle endokardiyum ve perikardiyum tabakalarında olduğu tespit edildi .

Kim SJ ve arkadaşları (42) steroid ve retinoidlerin büyümeyi inhibe etmeleri nedeniyle TGF- β 'lar ile etkileşim içinde olduklarını bildirmektedirler. Fötal fibroblastların tamoksifen tarafından, insan meme kanser hücrelerinin sentetik progestinler tarafından büyümelerinin inhibisyonu bu hücrelerden TGF- β 1 salgılanmasıyla, keratinositlerin büyümesinin de retinoik asit tarafından inhibisyonu keratinositlerden TGF- β 2 salgılanmasıyla meydana gelmektedir. Son çalışmalarda retinoidlerin, invivo şartlarda epitelyal dokuda TGF- β ekspresyonu üzerine oldukça etkili olduğu saptanmıştır. Nugent P ve arkadaşları (64) retinoik asit uygulamasının damak epitelyal hücrelerinde TGF- β 1 ekspresyonunu inhibe ederken, TGF- β 2 mRNA ekspresyonunu bariz şekilde artırdığını bildirmektedirler. Jakowlew SB ve arkadaşları (36) retinoik asidin TGF- β üzerine olan etkisinin konsantrasyon ve hücre tipine göre değiştiğini bildirmektedirler. Retinoik asit miyositlerde TGF- β 2 sekresyonunu azaltırken, kondrositlerde artırmaktadır.

Gebeliğin 8.5 – 9. günlerinde TGF- β 2, baş ve göğüs mezenşiminde ve kalbin bütün bölümlerinde geniş çapta boyanmışken, nöral tüp epitelinde az bir boyanma tespit edilmiştir. Gebeliğin 73/4. gününde 12mg/kg all-trans retinoik asit uygulanan gruplarda ise bütün yapılarda TGF- β 2 protein ekspresyonunda azalma saptanmış. Gebeliğin 9.5. gününde normal embriyolarda mezenşimal ve epitelyal dokular TGF- β 2 ile boyanırken, nöral tüpün bazal plağı TGF- β 2 ile pozitif alar plağının ise kısmi bir boyanma gösterdiği belirtilmektedir. Bu dönemde kalbin bütün kısımları, dorsal aortanın epitelyal hücreleri, paraksiyal mezoderm, ara mezoderm ve splanknik mezodermin TGF- β 2 açısından pozitif olarak boyandığı tespit edilmiştir. Retinoik asit uygulanan gruplarda mezenşimal dokularda TGF- β 2 işaretlenmesi bariz şekilde azalırken, epitelyal boyanmadaki azalma çok şiddetli düzeyde olduğu bildirilmektedir. Gelişimin 10.5. gününde kontrol grubu embriyolarda nöral tüp TGF- β 2 ile açık bir şekilde işaretlenmiş. Retinoik asit uygulamasından sonra ise göğüs bölgesinin gelişen organlarındaki immun reaksiyonda azalma saptanırken, nöroepitelyumdaki immun reaksiyonda bir değişiklik gözlenmemiş. Mahmood R ve arkadaşlarına (52) göre maternal retinoik asit uygulaması intraselüler TGF- β 1 ve TGF- β 2 protein üretiminde ciddi azalmaya neden olmakta ve bu azalış maternal uygulamadan sonra 2 gün devam etmektedir. Retinoik asit uygulaması sonucu TGF- β 1 proteininin azalması dokuya bağlı olarak değişkenlik gösterirken, TGF- β 2 azalması bütün embriyonel dokularda tespit edilmiştir. Danielpour D ve arkadaşları (17) Epidermal Growth Factor'ün TGF- β 1 salgılanmasını indüklediğini fakat TGF- β 2 salgılanmasını azalttığını, retinoik asitin ise normal sıçan böbrek fibroblastlarından TGF- β 2 salgılanmasını artırdığını, TGF- β 1 salgılanmasını azalttığını bildirmektedirler.

Sonuç olarak, yapılan bu deneysel çalışmada all-trans retinoik asitin yapısal bozukluklara sebep olması için gebelik gününün önemli olduğu gözlenmiştir. Gebeliğin 8. gününde uygulanan retinoik asitin genel anlamda çok şiddetli anomalilere sebep olduğu fakat 20. günde incelenen bir grupta anomalili fötusların yanısıra normal gelişimli fötusların da olduğu gözlendi. Bu durum teratojenlerin etkisine karşı genetik yapının da etkili olabileceğini düşündürdü. Gebeliğin 12. gününde retinoik asite maruz kalan fötuslarda gözlenen yapısal bozukluklar 8. günde retinoik asite maruz kalanlara göre daha düşük oranda

izlendi. Bu gruba ait olan ftuslarda normal gelişen ftusların yanı sıra, omfalosel gibi yapısal bozukluk gösteren fötuslar da tespit edildi. Çalışma sonucunda retinoik asitin her u germ yaprağından köken alan dokuların gelişimini etkilediği saptandı.

Embriyolojik gelişimde etkili olan growth faktörlerden, TGF-β2'nin immünohistokimyasal işaretlenmesinin gebelik gününe ve gebeliğin 8. gününde uygulanan yüksek doz A vitaminin etkisine bağlı olarak değişiklik gösterdiği tespit edildi. Yüksek dozdaki A vitamini gebeliğin 15. gününde beyin dokusundaki TGF-β2 işaretlenmesinde azalmaya yol açarken 18. günde ciddi anlamda artışa sebep olduğu görüldü. Bu durum literatür bilgilerinde belirtilen TGF-β2'nin hemen hemen bütün hücrelerden latent olarak salgılandığı, dokuda ortaya çıkan biyokimyasal değişikliklere bağlı olarak (asit ortam, cathepsin D, endoglikozidaz, sialidaz bulunması) aktive olacağı görüşüyle paralellik gstemekteydi. Gebeliğin 12. gününde retinoik asit uygulanan grupların ftal beyinlerindeki immün reaksiyonun kontrol grubu ile benzer olduğu tespit edildi. Kalp dokusundaki immün reaksiyonun genel anlamda endokard ve perikard ile sınırlı olduğu sadece 20. günde miyokardial hücrelerde de immün reaktivitenin mevcut olduğu ve prenatal 8. günde uygulanan retinoik asitin etkisiyle TGF-β2 işaretlenmesinde azalmanın meydana geldiği saptandı. Gebeliğin 12. gününde uygulanan yüksek doz A vitamini ise TGF-β2 işaretlenmesinde belirgin bir değişiklik oluşturmadı. Bu grup ftusların kalp ve beyin dokularındaki TGF-β2 işaretlenmesi genel anlamda kontrol gruplarıyla benzerlik göstermekteydi.

5. KAYNAKLAR

1. Abbott BD, Birnbaum LS.1990. Retinoic acid – induced alterations in the expression of growth factors in embryonic mouse palatal shelves. *Teratology* 42, 597 – 610
2. Akhurst RJ, FitzPatrick DR, Gatherer D, Lehnert SA, Millan FA.1990. Transforming growth factor betas in mammalian embryogenesis. *Prog Growth Factor Res* 2 (3) ,153- 68
3. Akhurst RJ, Lehnert SA, Faissner A, Duffie E.1990. TGF β in murine morphogenetic process: The early embryo and cardiogenesis. *Development* 108, 645 – 656
4. Alles AJ, Sulik KK.1989. Retinoic acid induced limb reduction defects: Perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic mechanism. *Teratology* 40, 163 -171
5. Aranega AE, Velez C, Prados J, Melguizo C, Marchal JA, Arena N, Alvarez L. 1999. Modulation of alpha-actin and alpha-actin proteins in cardiomyocytes by retinoic acid during development. *Cell Tissues Organs* 164, 82 - 89
6. Arıncı K ve Elhan A .1995. *Anatomi*. Güneş Kitabevi Ltd. Şti. , Ankara
7. Aytekin Yener. *Temel Histoloji*. 8. Baskı . Barış Kitabevi , İstanbul
8. Barnes LA. 1997. *Potter's Pathology of The Fetus and Infant Vol 1. Nutritional Disease* . Mosby St Louis, Missouri
9. Başaklar Can. 1993. *Medikal Embriyoloji*. Palme Yayın Ltd . Şti. Ankara
10. Benke PJ. 1984. The isotretinoin teratogen syndrome. *JAMA* 251 (24), 3267 – 3269
11. Boyer AS, Ayerinkas I, Vincent EB, McKinney LA, Weeks DL, Runyan RB. 1999. TGF β 2 and TGF β 3 have separate and sequential activities during epithelial – mesenchymal cell transformation in the embryonic heart. *Dev Biol* 208, 530 – 545
12. Chescheir NC, Seeds JW. 1988 . Spontaneous resolution of hypofibrinogenemia associated with death of a twin in utero. *Am J Obstet Gynecol* 159 (5) , 1183 - 4
13. Clarck DA, Coker R . 1998 . Transforming growth factor beta . *Int J Biochem Cell Biol* 30 (3), 293 - 8

14. Collins MD, Tzimas G, Hummler H, Bürgin H, Nau H. 1994. Comparative teratology and transplacental pharmacokinetics of all-trans retinoic acid, 13-cis retinoic acid and retinyl palmitate following daily administrations in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 127, 132 - 144
15. Cunningham ML, Auley AM, Mirkes PE. 1994 . From gastrulation to neurulation: Transition in retinoic acid sensitivity identifies distinct stage of neural patterning in the rat. *Dev Dyn* 200, 227 - 241
16. Cunningham FG, MacDonald PC, Gant NF, Leveno KJ, Gilstrap LC, Hankins GDV, Clark SL. 1997 . *Williams Obstetrics* . 20 th edition . Appleton and Lange , Connecticut
17. Danielpour D, Kim KY, Winokur TS, Sporn MB. 1991. Differential regulation of expression of transforming growth factor – β s 1 and 2 by retinoic acid, epidermal growth factor and dexamethasone in NRK – 49F and A549 cells . *J Cell Physiol* 148, 235 -244
18. Dencker L, d'Argy R, Danielsson BRG, Ghantous H, Sperber GO . 1987 . Saturable accumulation of retinoic acid in neural and neural crest derived cells in early embryonic development . *Dev Pharmacol Ther* 10, 212 - 223
19. Dickson MC, Slager HG, Duffie E, Mummery CL, Akhurst RJ . 1993 . RNA and protein localizations of TGF β 2 in the early mouse embryo suggest an involvement in cardiac development. *Development* 117, 625 – 639
20. Druston AJ, Timmermans JPM, Hage WJ, Hendriks HFJ, de Viries NJ . 1989 . Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* 338 (340), 140 - 144
21. England MA . 1996 . *Life Before* . Second Edition . Mosby – Wolfe, Times Mirror International Publishers Limited , UK
22. Fawcett D.W. 1986 . *A Textbook of Histology* . W.B Saunders Co. , Philadelphia .
23. Flanders KC, Lüdecke G, Engels S, Cissel DS, Robets AB, Kondaiiah P, Lafyatis R Sporn MB, Unsicker K. 1991 . Localization and actions of transforming growth factor – β s in the embryonic nervous system. *Development* 113 , 183 – 191

24. Gartner LP, Hiatt JL . 1997 . Color Text Book Of Histology . WB Saunders , Philadelphia
25. Gatherer D, Dijke PT, Baird DT, Akhurst RJ. 1990 . Expression of TGF β isoforms during first trimester human embryogenesis. *Development* 110 , 445 – 460
26. Gilbert E, Van Allen MI . 1997 . Potter's Pathology Of The Fetus And Infant Vol 1. Disruptions . Mosby St Louis , Missouri
27. Gudas LJ . 1994 . Retinoids and vertebrate development . *J Biol Chem* 269, 15399-15402
28. Hansen LA , Pearl GS . 1985 . Isotretinoin teratogenicity . *Acta Neuropathol* 65, 335 - 337
29. Hart RC, McCue PA, Ragland WL, Winn KJ, Unger ER . 1990 . Avian model for 13-cis retinoic acid embryopathy : Demonstration of neural crest related defects . *Teratology* 41, 463 – 472
30. Heine UI, Munoz EF, Flanders KC, Ellingsworth LR, Lam H-Y P, Thompson NL, Roberts AB, Sporn MB . 1987 . Role of TGF- β in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 105 (6), 2861- 2876
31. Heldin CH, Miyazono K. 1995 . Transforming growth factor – beta . An interesting candidate for clinical use . *Lakartidningen* 92 (15), 1569 - 72
32. Hendrickx AG, Hummler H. 1992 . Teratogenicity of all-trans retinoic acid during early embryonic development in the cynomolgus monkey . *Teratology* 45, 65 – 74
33. Holder N, Hill J . 1991 . Retinoic acid modifies development of the midbrain – hindbrain border and affects cranial ganglion formation in zebrafish embryos . *Development* 113, 1159 - 1170
34. Holson RR, Gazzara RA, Ferguson SA, Adams J . 1997 . A behavioral and neuroanatomical investigation of the lethality caused by gestational day 11 – 13 retinoic acid exposure . *Neurotoxicol Teratol* 19 (5) , 347 – 353
35. Hsuan JJ . 1989 . Transforming growth factors β . *Br Med Bull* 45 (2) , 425 - 437
36. Jakowlew SB, Cubert J, Danielpour D, Sporn MB, Roberts AB . 1992 . Differential regulation of the expression of TGF – β mRNAs by growth

- factors and retinoic acid in chicken embryo condrocytes , myocytes and fibroblasts . J Cell Physiol 150 , 377 – 385
37. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO . 1989 . Basic Histology . Sixth Edition . Appleton & Lange USA
38. Kalter H, Warkany J. 1961 . Experimental production of congenital malformations in strains of inbred mice by maternal treatment with hypervitaminosis A . Am J Pathol 38 , 1 - 21
39. Kane CJM, Brown GJ, Phelan KD . 1996 . Transforming growth factor- β 2 both stimulates and inhibits neurogenesis of rat cerebellar granule cells in culture . Dev Brain Res 23 (96) , 46 – 51
40. Kawabata M, Miyazono K. 1999 . Signal transduction of the TGF – β superfamily by SMAD proteins . J Biochem 125 , 9 – 16
41. Kayaalp SO . 1998 . Tıbbi Farmakoloji . Hacettepe – Taş Kitapçılık Ltd . Şti .
42. Kim SJ, Romeo D, Yoo YD, Park K . 1994 . Transforming growth factor- β : Expression in normal and pathological conditions . Horm Res 42, 5 – 8
43. Kochhar DM. 1967. Teratogenic activity of retinoic acid. Acta Pathol Microbiol 70 , 398 – 404
44. Kochhar DM, Penner JD, Tellone CI . 1984 . Comparative teratogenic activities of two retinoids: Effects on palate and limb development . Teratog Carcinog Mutagen 4 , 377 -387
45. Kraft JC, Löfberg B, Chahoud I, Bochert G, Nau H . 1989 . Teratogenicity and placental transfer of all-trans , 13-cis trans , 4-oxo-all-trans and 4-oxo-13-cis-retinoic acid after administration of a low oral dose during organogenesis in mice . Toxicol Appl Pharmacol 100 , 162 – 176
46. Kutsky RJ . Handbook of vitamins , minerals and hormones. Second edition.
47. Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM , Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ , Fernhoff PM . 1985 . Retinoic acid embryopathy . New Eng J Med 313 , 837 - 841
48. Maden M, Ong DE, Chytil F . 1990 . Retinoid binding protein distribution in the developing mammalian nervous system . Development 109 (1) , 75 – 80

49. Maden M, Holder N. 1991. The involvement of retinoic acid in the development of vertebrate central nervous system . *Development Suppl* 2 , 87 – 94
50. Maden M . 1994 . Vitamin A in embryonic development . *Nutr Rev* 52 (2) , S3 – S1
51. Mahlon D, Jennings MT, Gold LI. 1993. Transforming Growth Factor- β in neural embryogenesis and neoplasia. *Human Pathology* 24, 457- 462
52. Mahmood R, Flanders KC, Morris – Kay GM . 1992 . Interactions between retinoids and TGF β s in mouse morphogenesis . *Development* 115 , 67 - 74
53. Millan FA, Denhez F, Kondaiah P, Akhurst RJ. 1991 . Embryonic gene expression patterns of TGF β 1 , β 2 and β 3 suggest different developmental functions in vivo . *Development* 111, 131 – 144
54. Moore KL, Persaud TVN . 1998 . The Developing Human . 6 th Edition , W.B Saunders Co. , Philadelphia
55. Moses HL, Coffey RJ, Leof EB, Lyons RM, Keski-Oja J. 1987 . Transforming growth factor beta regulation of cell proliferation . *J Cell Physiol Suppl* 5, 1-7
56. Mosses HL, Yang EY, Pietenpol JA . 1990 . TGF – β stimulation and inhibition of cell proliferation : New mechanistic insights . *Cell* 63 , 245 – 247
57. Mummery CL, Slager H, Krujer W, Feijen A, Freund E . 1990 . Expression of Transforming growth factor β 2 during the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells . *Dev Biol* 137, 161 – 170
58. Nakajima Y, Yamagishi T, Nakamura H, Markwald RR, Krug EL . 1998 . An autocrine function for transforming growth factor (TGF)- β 3 in the transformation of atrioventricular canal endocardium in to mesenchyme during chick heart development. *Dev Biol* 194 , 99 – 113
59. Nakajima Y, Yamagushi T, Hokari S, Nakamura H. 2000. Mechanisms involved in valvuloseptal endocardial cushion formation in early cardiogenesis: Roles of TGF β and bone morphogenetic protein. *Anat Rec* 258, 119-127
60. Nau H . 1990 . Correlation of transplacental and maternal pharmacokinetics of retinoids during organogenesis with teratogenicity . *Methods Enzymol* . 190, 437 – 448

61. Nau H. 1993. Retinoid teratogenesis: Toxicokinetics and structure–specificity. *Arc Toxicol* 16 , 118 – 127
62. Nau H. 1995 . Chemical structure teratogenicity relationship toxicokinetics and metabolism in risk assesment of retinoids . *Toxicology Letters* 82/83, 975 - 979
63. Noy N . 2000 . Retinoid binding proteins: Mediators of retinoid action . *Biochem J* 348 , 481- 495
64. Nugent P, MA L, Grene RM. 1998 . Differential expression and biological activity of retinoic acid-induced TGF- β isoforms in embryonic palate mesenchymal cells. *J Cell Physiol* 177, 36 – 46
65. Olson EN, Sternberg E, Hu JS, Spizz G, Wilcox C. 1986. Regulation of myogenic differentiation by type β transforming growth factor. *J Cell Biol* 103, 1799 – 1805
66. Osmond MK, Butler AJ, Voon FCT, Bellairs R . 1991 . The effects of retinoic acid on heart formation in early chick embryo . *Development* 113 , 1405 – 1417
67. Padmanabhan R, Singh G, Singh S . 1981 . Malformation of the eye resulting from maternal hypervitaminosis A during gestation in the rat . *Acta Anat* 110 , 291 - 298
68. Pauken CM, LaBorde JB, Bolon B 1999 . Retinoic acid acts during peri-implantational development to alter axial and brain formation . *Anat Embryo* 200 , 645 - 655
69. Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI. 1991. Immunohistochemical localization of TGF β 1, TGF β 2 and TGF β 3 in the mouse embryo: Expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol* 115 (4), 1091 – 105
70. Pena JDO, Taylor AW, Ricard CS, Vidal I, Hernandez MR. 1999. Transforming growth factor β isoforms in human optic nerve heads *Br J Ophthalmol* 83, 209 – 218
71. Piek E, Heldin CH, Dijke PT. 1999 . Specificity, diversity and regulation in TGF – β superfamily signaling. *FASEB J* 13 (15), 2105 – 2124

72. Pillans PI, Folb PI, Ponzi SF . 1988 . The effects of invivo administration of teratogenic doses of vitamin A during the preimplantation period in the mouse. *Teratology* 37, 7 - 11
73. Pond WG, Church DC, Pond KR . 1995 . Basic animal nutrition and feeding . 4th edition. New York Willey.
74. Potts JD, Runyan RB . 1989 . Epithelial – mesenchymal cell transformation in the embryonic heart can be mediated, in part, by transforming growth factor β . *Dev Biol* 134, 392 – 401
75. Rappaport EB, Knapp M . 1989 . Isotretionin embryopathy – A continuing problem . *J Clin Pharmacol* 29, 463 – 465
76. Roberts AB, Heine UI, Flanders KC, Sporn MB . 1990 . Transforming growth factor – β . Major role in regulation of extracellular matrix . *Ann N Y Acad Sci.* 580, 225 - 232
77. Roberts AB, Sporn MB . 1992 . Differential expression of the TGF – beta isoforms in embryogenesis suggests specific roles in developing and adult tissues. *Mol Reprod Dev* 32 (2), 91 – 8
78. Rohwedel J, Guan K, Wobus AM . 1999 . Induction of cellular differetiation by retinoic acid . *Cells Tissues Organs* 165 (3-4), 190 – 202
79. Rosa FW, Wilk AL, Kelsey FO. 1986 . Teratogen update: Vitamin A congeners. *Teratology* 33, 355 – 364
80. Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. 1995 . *Histology ; A Text and Atlas* . 3 th ed., Williams & Wilkins, USA.
81. Sağlam M, Aştı RN, Özer A . 1997 . Genel Histoloji . Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd. Şti. Ankara
82. Sanford LP, Ormsby I, Groot AC, Sariola H, Friedman R, Boivin GP. 1997 . TGF β 2 knockout mice have multiple developmental defects that are non – overlapping with other TGF β knockout phenotypes. *Development* 124, 2659 – 2670
83. Satre MA, Penner JD, Kochhar DM . 1989 . Pharmacokinetic assesment of teratologically effective concentrations of an endogenous retinoic acid metabolite *Teratology* 39, 341 -348

84. Shenefelt RE . 1972 . Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid : Relation to dose and stage at treatment . *Teratology* 5, 103 - 118
85. Sinning AR . 1998 . Role of Vitamin A in the formation of congenital heart defects. *Anat Rec* 253, 147 – 153 .
86. Slager HG, Lawson KA, Van Den Eijnden – Van Raaij AJM, De Laat SW, Mummery CL. 1991 . Differential localization of TGF- β 2 in mouse preimplantation and early postimplantation development . *Dev Biol* 145, 205 – 218
87. Smith – Thomas L, Lott I, Bronner – Fraser M. 1987 . Effects of isotretinoin on the behavior of neural crest cells in vitro . *Dev Biol* 123 , 276 - 281
88. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK . 1986 . Transforming growth factor- β : Biological function and chemical structure. *Science* 233, 532 – 534
89. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Crombrughe B . 1987 . Some recent advance in the chemistry and biology of transforming growth factor – beta . *J Cell Biol* 105, 1039 – 1045
90. Stevens A and Lowe J . 1997 . *Human Histology . Second Edition . Mosby , Times Mirror International Publishers Limited London*
91. Strömmland K, Miller M, Cook C . 1991 . Ocular teratology . *Surv Ophthalmol* 35 (6), 429 - 46
92. Sulik KK, Cook CS, Webster WS. 1988 . Teratogens and craniofacial malformation : relationships to cell death . *Development* 103, 213 - 232
93. Şeftalioğlu Aysel . 1998 . Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi . 3. Baskı . Tıp ve Teknik Yayıncılık Ltd. Şti., Ankara
94. Tzimas G, Thiel R, Chaud I, Nau H . 1997 . The area under the concentration-time curve of all-trans retinoic acid is the most suitable pharmacokinetic correlate to the embryotoxicity of this retinoid in the rat *Toxicol Appl Pharmacol* 143, 436 - 444
95. Vaessen M-J, Meijers JHC, Bootsma D, Van Kessel ADG. 1990. The cellular retinoic- acid-binding protein is expressed in tissues associated with retinoic-acid-induced malformations . *Development* 110 , 371 – 378

96. Werler MM, Lammer EJ, Rosenberg L, Mitchell AA. 1990 . Maternal vitamin A supplementation in relation to selected birth defects . *Teratology* 42, 497 - 503
97. Yamanaka Y, Friess H, B uchler M, Beger HG, Gold LI, Korc M. 1993. Synthesis and expression of transforming growth factor β -1, β -2 and β -3 in the endocrine and exocrine pancreas . *Diabetes* 42 , 746 – 756
98. Yan M, Nick TG, Sinning A. 2000 . Retinoic acid inhibition of cardiac mesenchyme formation in vitro correlates with changes in the secretion of particulate matrix from the myocardium . *Anat Rec* 258 , 186 – 197
99. Yasuda Y, Konishi H, Kihara T, Tanimura T. 1987 . Developmental anomalies induced by all-trans retinoic acid in fetal mice: II. Induction of abnormal neuroepithelium . *Teratology* 35, 355 - 366

ÖZGEÇMİŞ

25.09.1973 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise tahsilimi Elazığ'da tamamladım. 1990 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesine girdim ve 1995 yılında mezun oldum. 1996 Şubat ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalında doktora başladım. 31.12.1996 yılında aynı bölümde Araştırma Görevliliğine atandım. Halen aynı görevi yürütmekteyim.

