

T.C. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BACILLUS ANTHRACIS LETAL FAKTÖRÜNÜN FETÜS,
YENİDOĞAN VE ERİŞKİN SIÇANLARDA KARACİĞER,
AKCİĞER VE KALP ÜZERİNE ETKİLERİNİN IŞIK VE ELEKTRON
MİKROSKOBİK DÜZEYLERDE VE MORFOMETRİK
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Bil. Uz. Berrin Zuhul BULUCU ALTUNKAYNAK

**Tez Yöneticisi
Doç.Dr. Elvan ÖZBEK**

**Doktora Tezi
Erzurum 2009**

T.C. ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***BACILLUS ANTHRACIS* LETAL FAKTÖRÜNÜN FETÜS,
YENİDOĞAN VE ERİŞKİN SIÇANLARDA KARACİĞER,
AKCİĞER VE KALP ÜZERİNE ETKİLERİNİN IŞIK VE ELEKTRON
MİKROSKOPİK DÜZEYLERDE VE MORFOMETRİK
YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Bil. Uz. Berrin Zuhul BULUCU ALTUNKAYNAK

**Tez Yöneticisi
Doç.Dr. Elvan ÖZBEK**

**Doktora Tezi
Erzurum 2009**

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇİNDEKİLER	3
TEŞEKKÜR	4
ÖZET	5
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2. GENEL BİLGİLER	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
4. BULGULAR	45
5. TARTIŞMA	140
6. KAYNAKLAR	155

TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında yol gösteren ve büyük emeği geçen Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım olan hocam Doç.Dr. Elvan ÖZBEK'e, morfometrik yöntemlere katkılarından dolayı hocam Doç.Dr. Bünyami ÜNAL'a, mikrobiyolojik genel bilgi ve tartışma alanındaki katkılarından dolayı hocalarım Yrd.Doç.Dr. Ahmet ÖZBEK'e ve Prof.Dr. Osman AKTAŞ'a, histolojik preparat ve resimlerin hazırlık aşamasındaki yardımlarından dolayı Uz.Özgen VURALER ve Arş.Gör.Dr. Deniz ÜNAL'a, Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinin sayın idarecileri ve personeline ve desteğini hep yanımda hissettiğim anneme, babama, eşim Dr. Eyüp ALTUNKAYNAK'a ve kızıma teşekkür ederim.

Berrin Zuhul BULUCU ALTUNKAYNAK

ÖZET

***Bacillus anthracis* LETAL FAKTÖRÜNÜN FETÜS, YENİDOĞAN VE ERİŞKİN SİÇANLARDA KARACİĞER, AKCİĞER VE KALP ÜZERİNE ETKİLERİNİN IŞIK VE ELEKTRON MİKROSKOBİK DÜZEYLERDE VE MORFOMETRİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

Şarbon hastalığının etkeni olan *B.anthraxis* etkili bir biyolojik silah olması yönüyle bilimsel gündemdeki yerini korumaktadır. Biyolojik silahlar konusunda günümüzde geline nokta ise artık; ajanların kendileri değil; toksik ürünleri öldürmek ya da zarar vermek üzere kullanılmaktadır. Letal faktör ile protektif antijenin birleşmesiyle oluşan letal toksin *B.anthraxis*'in öldürücü etkisinden sorumludur. Bu çalışmada letal faktörün protektif antijenle birleşmeden, tek başına da dokular üzerinde etkili olup olamayacağı araştırıldı.

Bu amaçla deneklere LF ya da bi-distile suyun intra-peritoneal olarak uygulanmasından 24 saat sonra, post-natal dönemdeki yavru ve erişkin sıçanlardan ve ayrıca pre-natal dönemdeki sıçan embriyo ve fetüslerinden elde edilen karaciğer, akciğer ve kalp örnekleri ışık ve elektron mikroskobu altında incelendi. Ayrıca ilgili organlarda, embriyolarda ve fetüslerde (embriyo ve fetüslerin toplam hacimleri) Cavalieri prensibi kullanılarak stereolojik hacim değerlendirmesi yapıldı.

LF uygulamasını takiben karaciğer, akciğer ve kalpte yaygın vasküler hasar ve bu vasküler hasarın yol açtığı hipoksiden kaynaklanan patolojik değişimlerin ortaya çıktığı görüldü. Ayrıca morfometrik değerlendirmenin sonuçlarına göre LF uygulamasından sonra hem organların hem de embriyo ve fetüslerin hacmi değişmişti.

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre LF tek başına da LT için bildirilen toksik etkiyi gösterebilmekte ve patolojik değişimlere neden olabilmektedir. Böylece çalışmadan elde ettiğimiz birçoğu ilk defa dile getirilen bulgularımızın literatüre önemli katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Şarbon, Letal toksin, Letal Faktör, Histopatoloji, Stereoloji

ABSTRACT

**EFFECTS of *Bacillus anthracis* LETHAL FACTOR on LIVER, LUNG and
HEART of FOETUS, NEWBORN and ADULT RATS: LIGHT and ELECTRON
MICROSCOPICAL, and STEREOLOGICAL STUDY**

B.anthraxis that is causative agent of anthrax, occupied scientific topics due to their role in bioterrorism. Today in this point; no longer, toxic components were used as biological weapon instead itself. Lethal toxin consists of lethal factor (LF) and protective antigen and it is responsible for lethality of *B.anthraxis*. In this study, we investigated that lethal factor is efficient or not on biological tissues without protective antigen or not.

For this aim, LF or bi-distilled water intraperitoneally injected to rats. After 24 hours, liver, lung and heart samples were removed from adult, litter, embryos and foetuses of rats. All samples were examined under light and electron microscope. Also volumetric values of interesting organs, embryos and foetuses (total volume of embryos or foetuses) were estimated with Cavalieri principle.

Following LF application, common vascular injuries were found in liver, lung and heart of rats belong to experimental group. These vascular injuries caused to hypoxia and pathological changes. Also, according to our morphometrical results; both volumes of organs and volumes of embryo and foetuses were changed.

Finally, our results suggested that LF is effective even if it is alone; and it leads to pathological changes in this situation. So, we believe that our findings provide important contributions to literature.

Key Words: Anthrax, Lethal Toxin, Lethal Factor, Histopathology, Stereology

GİRİŞ:

Şarbon (antraks), *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*)'in sebep olduğu bir enfeksiyon hastalığıdır. Geyik, sığır, koyun gibi otoburlar etkene en fazla duyarlı iken, et oburlar antrax basiline duyarlı değildirler. İnsanlar duyarlılıkta et oburlar ile ot oburlar arasında yer alır. Şarbon basili, insanlara derideki açık bir yaradan, solunum ya da sindirim yolundan bulaşarak enfeksiyona yol açabilen sporlar oluşturabilmektedir. Şarbon, en eski çağlardan beri bilinen bir enfeksiyon hastalığı olmasına karşın; hastalığın özellikle ilerlemiş olduğu durumlarda tedavi edilemeyişi ve dolayısıyla ölümcül olmasının yanı sıra çağımızda biyolojik silah olarak kullanılabilme olasılığının bulunması da bu konudaki çalışmaları hala güncel kılmaktadır.

Şarbon etkeni olan *Bacillus anthracis* toksin sentezini kodlayan 110 kilodaltonluk POX1 ile, kapsül oluşumunu kodlayan 60 kilodaltonluk POX2 olarak adlandırılan iki plazmide sahiptir. Bunlar bakterinin virulansını göstermektedir. Bakteri plazmidlerini kaybettiği zaman patojenitesini de kaybetmektedir. Bakterinin toksinleri protein yapısında olup üç bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler koruyucu antijen, letal faktör ve ödem faktörüdür. Bu faktörlerin ikili ya da üçlü kombinasyonlar halinde patolojik etki gösterdiği bilinmektedir.

Sunulan çalışmada literatür bilgisinden farklı olarak, şarbon (anthrax) basiliinin ürettiği toksik komponentlerden biri olan letal faktörün diğer komponentlerden bağımsız olarak tek başına patolojik etki gösterip gösteremeyeceği araştırıldı. Bu doğrultuda çalışmanın amacı, *B. anthracis* letal toksininin sıçan fetüs, yenidoğan ve erişkin dokuları üzerine olası etkilerinin ışık ve elektron mikroskopik seviyede belirlenmesidir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Şarbon Nedir?

Şarbon; çomak biçimli, spor oluşturabilen ve gram-pozitif bir bakteri olan *Bacillus anthracis*'in neden olduğu akut bir enfeksiyondur. Şarbon kelimesi Türkçeye Fransızca kökenli charbon (kömür) kelimesinden geçmiştir. Bunun nedeni ise şarbon hastalığına neden olan mikrobun temasla geçen türünde deride kara lekeler meydana gelmesidir¹.

2.2. Şarbonun Tarihçesi:

Şarbon; insanlık tarihi boyunca bilinen en eski hastalıklardan biridir. Eski Mısırlılardan kalma yazıtlarda ve milattan önce 27-28. Yüzyıllarda yaşamış olan Romalılara ait olduğu bilinen belgelerde bu hastalığın adına rastlanmıştır². Ondokuzuncu yüzyıla gelindiğinde Robert Koch and Louis Pasteur'ün yaptıkları şarbon hastalığına ilişkin sistematik çalışmalar günümüzdeki bilgilerın açığa çıkmasına ışık tutmuştur³. Koch yaptığı çalışmalarla, hastalık etkeni olan *B. anthracis*'i in vitro ortamlarda üretmeyi başarmış ve etkenin spor oluşturan bir bakteri olduğunu tespit etmiştir⁴. Pasteur ise şarbon hastalığında bakterinin rolünü ispatlamış ve 'Hastalıklarda Germeler Teoris'i'ni hazırlamıştır. Pasteur'ün 1881 yılında ünlü Pouilly Le-Fort deneyi ile şarbonla ilgili çalışmaları, aşı devrinin başlangıcı olarak kabul edilmektedir⁵. Yirminci asrın ortalarında *B. anthracis* ile ilgili iki önemli gelişme gerçekleştirilmiştir. Bunlardan birisi *B. anthracis*'in virulans faktörlerinin keşfi, diğeri ise Sterne aşı suşunun tespitidir. Max Sterne 1934 yılında, avirulent, stabil ve kapsülsüz bir suş izole etmiştir. Kendi ismini taşıyan ve halen günümüzde de kullanılan bu suş ile yapılan aşılamlarda iyi bir bağışıklık oluşmakta ve bu aşının yan etkileri de Pasteur aşısından daha az olmaktadır⁵. Ascoli ise antraksın tanısında çok fazla değeri olan ve kendi adıyla bilinen serolojik bir yöntemi yani presipitasyon reaksiyonunu pratiğe koymuştur⁶. Yirmibirinci yüzyılın ikinci yarısında da *B. anthracis* ile ilgili birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen bu çalışmalar henüz son noktaya ulaşabilmiş değildir ve halen güncelliğini korumaktadır.

2.3. Hastalık Kaynağı ve Bulaşma Yolları:

Şarbon hastalığı meralarda otçul olarak beslenen hayvanlarda (koyun, keçi, sığır gibi) görülmektedir. Hayvanlar şarbon sporlarının bulaştığı toprakta otlarken hastalık etkeni ile karşılaşmaktadırlar⁷. Mikrop yenilen otlarla birlikte hayvanın sindirim sistemine oradan da kana geçer ve hayvanın tüm organlarında patolojiye sebep olur.

Şarbon mikrobunun en önemli özelliği “spor” denilen ve dış ortama son derece dayanıklı yapılar oluşturmalarıdır. Çevre koşullarına çok dirençli olan sporlar, doğada toprakta yaygın olarak bulunurlar ve yıllarca yaşayabilirler. Hastalık insanlara hasta hayvanlardan direk veya indirek yolla bulaşır⁸. Bulaşma kaynaklarına göre hastalık; endüstriyel, tarımsal ve laboratuvar kaynaklı olabilir. Endüstriyel kökenli şarbon, B.antracis sporları ile kontamine olmuş hayvansal ürünlerin; keçi kılı, yün deri, post ve kemik vs. sanayide işlenmesi esnasında oluşur. Söz konusu bu ürünler üzerinde çalışan kişilerde sporların deriye bulaşması ile deri şarbonu veya sporların solunması ile akciğer şarbonu oluşabilir. Tarımsal kökenli şarbon, ölen hastalıklı hayvanların kesilmesi, derisinin yüzülmesi, etinin kıyılması sonucu; bu hayvanlara temas eden kişilerin derideki çizik ve yaralardan bulaşan deri şarbonu veya etlerin yenilmesi ile bulaşan sindirim sistemi şarbonu şeklindedir. Hayvancılıkla uğraşanlar, kasap ve veteriner hekimler tarımsal kökenli şarbon yönünden önemli bir risk grubunu oluşturmaktadırlar^{9,10}. Enfeksiyon sineklerle de mekanik olarak bulaşabilir. Zimbabwe’de 1979-1980 yıllarında çıkan büyük salgında ahır ve at sineklerinin de önemli rol oynadığı belirtilmektedir^{11,12}. Şarbon hastalığının insandan insana bulaşması çok nadirdir. Enfekte yara ve akıntı ile temas sonucu enfeksiyonun bulaşma riski vardır. Laboratuvarlarda bulaş da nadirdir; dikkatsizlik sonucu gelişebilir ve oldukça tehlikelidir.

2.4. Hastalığın Tanısı: Kuşkulu deri lezyonundan alınan örneklerde (akciğer şarbonu kuşkusunda kan ya da balgam yaymalarında, gastrointestinal şarbon kuşkusunda ise dışkı, kusmuk ya da periton sıvısının incelenmesi ile) gram pozitif, büyük, ucuca dizilmiş basillerin görülmesi tanıda önemlidir. Şarbon tanısında en kullanışlı mikrobiyolojik test 16-24 saat içinde bakteri üremesinin gözlenebildiği standart kan kültürleridir. Koloni morfolojisi ve biyokimyasal testlerle tanı desteklenmelidir. ELISA ve PCR gibi hızlı tanı yöntemlerinin ulaşılabilirliği sınırlıdır ve daha çok tanının kesinleştirilmesi, invitro antibiyotik duyarlılığının saptanması ya da kuşkulu materyalin araştırılmasında kullanılır. Hastada akut dönemde ve iyileşme döneminde alınan serum örneklerinde antikor titre artışlarının gösterilmesi tanı koydurucudur. ELISA’da tek serum örneğinde görülen 1/32 titrede pozitiflik de tanıyı destekler^{13,14}.

2.5. Şarbon Hastalığının Patogenezi: Şarbon hastalığı insanlarda üç şekilde ortaya çıkmaktadır; bunlar kütanöz şarbon inhalasyon şarbonu ve gastrointestinal şarbon olarak adlandırılır:

a. Deri Şarbonu: Hastalık ile enfekte olmuş hayvan ürünleriyle temas eden derideki bir çizik ya da yaradan kişiye bakteri bulaşı sonucu gelişir. Deri öncelikle kızarır ve şişer. Bu haliyle, enfeksiyon alanında böcek ısırmasını anımsatan bir tablo izlenir. Daha sonra bu alanda ağrısız, koyu renkli ve kabuklu bir lezyon gelişir. Bu lezyon tedavi edilmezse tüm vücuda yayılabilir. Deri şarbonu şarbon hastalığının en yaygın ve en iyi prognozlu türüdür. Antibiyotiklere iyi cevap verir. Gelişen lezyon invaziv hale gelmeden önce tedavi edilirse ölüme neden olmaz¹⁵.

b. Gastrointestinal Şarbon: Hastalık ile enfekte olmuş hayvan etlerinin yenmesi sonucu gelişir. Enfeksiyon sıklıkla ateşe eşlik eden kusma karın ağrısı ve ishal gibi problemler ile kendini belli eder. Bunun yanında bazı vakalarda lezyonlar alt sindirim yolları yerine burun ve boğazda gelişebilir. Her iki şekilde de gastrointestinal şarbon hemen tedavi edilmezse ölüme yol açabilir^{16,17}.

c. Solunum Şarbonu: Şarbon hastalığının bu şekli bazen akciğer şarbonu şeklinde de adlandırılabilir. Bakteri sporlarının solunmasıyla ortaya çıkar. Hastalığın ilk belirtileri soğuk algınlığını çağrıştırır. Sporlar akciğer üzerinden komşu lenf nodlarına geçerek oradaki makrofajların içerisine girer ve toksinlerini üretilmeye başlar. Bu durum nefes alma problemleri ve şoka neden olur. Hastalık bu aşamaya ulaştıktan sonra tedavisi zordur ve genellikle ölüme neden olur^{18,19}.

Ölüm, oksijen yetersizliğine bağlı olarak, şok ve vasküler permeabilitede artış, solunum yetmezliği ve kalp yetmezliğinden oluştuğundan, hayvan ve insanlardaki sistemik şarbon vakalarında genellikle aniden şekillenir. Dolaşımdaki toksin miktarı, ölüm hızını etkiler^{18,19}.

2.6. Tedavi Yöntemleri:

a. Antibiyotikler: Şarbon hastalığını bazı antibiyotiklerle tedavi etmek mümkündür. Fakat bunun için hastalığın erken teşhis edilmiş olması gerekir ki bu her zaman mümkün olmaz²⁰. Çünkü sıklıkla hastalar ilk bulguları genellikle diğer yaygın enfeksiyonlarla karıştırırlar. Böylece antibiyotikten etkilenmeyen *B. anthracis* toksinleri salınır ve daha ciddi bulgular ortaya çıkar. Bu durumda hastalık artık tedavi edilemez boyuta ulaşmıştır⁷.

b. Aşı: Şarbon hastalığı için geliştirilmiş bir aşı bulunmasına rağmen bu aşının kullanımı sınırlıdır. Günümüzde bu aşı sadece *B. anthracis* ile temas etme ihtimali yüksek tarım işçileri ve veteriner gibi kişileri bakteriyel temastan korumaktadır. Aşı içerisinde zayıflatılmış *B. anthracis* türlerinden elde edilen proteinler ve protektif antijen (PA) bulunur²¹. Gerek şarbon hastalığının nadir olarak gözlenmesi gerekse bu aşının sahip olabileceği yan etkiler nedeniyle uzmanlar bu aşının halk tarafından genel olarak kullanımını önermemektedir. Ayrıca bu aşı kullanılsa bile önerilen bağışıklanma dozu için 18 ayda bir kez olmak üzere toplam 6 kez aşılama yapılmalıdır. Tüm bu nedenlerden dolayı şarbon için yani bir aşının geliştirilmesine şiddetle ihtiyaç duyulmaktadır⁸.

2.7. Türkiye ve Dünyada Durum:

Şarbon dünyada gittikçe azalan enfeksiyon hastalıklarından biridir. Henüz tamamen eradike edilememiştir. Dünyada halen yılda 20.000-100.000 arasında insan şarbonu görüldüğü tahmin edilmektedir. Batıda son 20 yıl içinde insan şarbonu oldukça azalmıştır. Avrupa'da 1971-1980 yılları arasında toplam 10793 insan şarbonu bildirilmiştir²². Ayrıca şarbon; bazı Latin Amerika, Afrika ve Asya ülkelerinde de halen görülmektedir^{23,24}.

Bu yüzyılın en son şarbon salgını 1978-1980 yılları arasında Zimbabwe'de yaşanmıştır. Bu salgında 9711 insan şarbonundan ve 151'i ölümle sonuçlanmıştır²⁴. Nisan 1979'da, Sverdlovsk (Rusya) şehrinde çıkan 64 kişinin ölümü ile sonuçlanan, 96 kişiyi kapsayan şarbon salgınının, şarbon bakterisinin biyolojik silah etkeni olarak çalışıldığı bir laboratuvar da kaza sonucu ortaya çıktığı tahmin edilmektedir^{25,26}. En son şarbon paniği Amerika'da yaşanmıştır. Florida'da 5 Ekim 2001 tarihinde akciğer şarbonundan bir ölüm bildirildi. On altı Ekim 2001 tarihine kadar Florida'da iki şarbon vakası ve bir eksojor; New York'ta ise iki şarbon vakası ve üç eksojor bildirildi²⁷. Yirminci yüz yılda Amerika'da toplam 18 akciğer veya inhalasyon şarbonu bildirilmiştir. En son vakanın da 25 yıl önce görüldüğü belirtilmektedir²⁸. Buna rağmen Amerika'da halen şarbon paniği devam etmektedir. Bu olayın biyoterörizm ile ilişkili olduğu konusunda genel bir fikir birliği vardır.

Şarbon ülkemizde de görülen bir hastalıktır. Görülme sıklığı gittikçe azalmaktadır. Türkiye'de 1960-1969 yılları arasında 10724 insan şarbonu, 1970-1979 yılları arasında 5377, 1980-1989 yılları arasında 4423 insan şarbonu bildirilmiştir²⁹⁻³¹.

1990'lı yıllarda her yıl bildirilen vaka sayısı 300 insan şarbonunun altına düşmüştür. İki binli yıllara geldiğimizde 100-150 insan şarbonu görüldüğü tahmin edilmektedir. Bu şarbon olguları genellikle tarımsal kökenlidir; endüstriyel orijinli şarbon olgusu seyrek olarak ancak deri sanayinde görülmüştür. Günümüzde ülkemizde yılda yaklaşık 100 civarında deri şarbonu olgusuna rastlanmaktadır³⁰⁻³². Şarbon etkeni olan bakterinin sporlarının çevresel şartlara çok dayanıklı oluşundan dolayı hastalık her mevsimde görülebilir. Ülkemizde, yaz ve sonbaharda ve ayrıca kurban bayramlarında hasta sayısı artmaktadır^{33,34}.

2.8. Antraks ve Biyoterörizm:

Bilinen geleneksel silahlar dışındaki savaş araçları genel olarak "nükleer, biyolojik ve kimyasal savaş" (NBC) grubunda değerlendirilmektedir. Kimyasal silahlardan çok daha tehlikeli olduğu düşünülen biyolojik silahların oluşturduğu etkinin boyutu nükleer silahlara denk kabul edilmektedir³⁵. Biyolojik savaşlarda amaç insan, evcil hayvan ve faydalanılan bitkilerde ölüm veya zarar meydana getirmek ve bunun sonucunda da salgın hastalıklar meydana getirmektir. Bu amaçla kullanılan mikroorganizmalar ya da mikroorganizmalara ait toksinlere biyolojik ajan adı verilir³⁶. Böylece askeri hedeflere karşı yapılan saldırılar "biyolojik savaş", sivil halkı tehdit eden saldırılar ise "biyoterörizm" olarak tanımlanır³⁷.

Geçmişte eski çağlara dayansa da bu yöntemlerin kullanılma riskinin özellikle son zamanlarda artması nedeniyle NBC konusu dünya kamuoyunu meşgul eder duruma gelmiştir. Birçok ülke giderek artan biyolojik savaş riskine karşı strateji geliştirme ve mücadele ve destek ekiplerinin oluşturulması üzerine çalışmaktadır.

Biyolojik silahların sahip olmaları gereken önemli özellikleri arasında, (i) şiddetli hastalık ve ölümlere neden olmaları, (ii) kısmen düşük maliyetli olmaları, (iii) kolay ve büyük miktarlarda üretilibilmeleri ve (iv) bireyler arasında yayılma özelliğine sahip olmaları şeklinde sıralanabilir^{38, 39}.

Biyolojik savaşın bilinen en eski örnekleri düşmanların içme suyu elde etmek için kullandıkları kaynakların insan ve hayvan ölümleri ile "kirletilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, geçmişte Güney Amerikada yaşayan yerlilerin deniz canlılarından elde edilen toksinleri ok başlarına sürerek düşmanlarına atmaları da bu örnekler arasında sayılabilir. Ondördüncü yüzyılda bugün Ukrayna sınırları içerisinde kalan Kaffa'yı kuşatan Tatarlar, vebadan ölmüş insan cesetlerini mancınıkla şehrin surlarından içeri doğru atarak salgın oluşturmaya çalışmışlardı^{40,41}. Sonraları birçok savaşta düşmanın kayıp vermesini sağlamak amacıyla çeşitli mikroorganizmalarla

kontamine edilmiş mendil, battaniye vb. ürünler kullanılmıştır⁴²⁻⁴⁴. Yirminci yüzyıla gelindiğinde geniş kitleleri hedef alan biyolojik bombaların geliştirilmesi üzerine 1972 yılında 100'den fazla ülkenin katılımı ile imzalanan "Bakteriyolojik ve Toksin Silahlarının Geliştirilmesi, Üretimi ve Depolanması ve İmhası"na dair anlaşma yürürlüğe girdi. Buna rağmen günümüzde halen birçok ülkenin biyolojik silahlara sahip olduğu ve zaman zaman bu silahları denediği bilinmektedir^{45,46}. Bu silah grubu birçok bakteri, virüs, mantar, protozoon ve toksini kapsamaktadır. Yine bu grup içerisinde yer alan şarbon bakterisi ise iyi bir biyolojik silahın sahip olması gereken hemen hemen tüm özelliklere sahiptir. Örneğin kolay elde edilebilmektedir ve yüksek mortalite oranına sahiptir. *B. anthracis* geometrik olarak çoğalan bir bakteri olduğundan üretimi hızlı ve kolaydır. Bakterinin spor formunun ya da toksinlerinin aeresol şeklinde stoklanabilmesi ve dağıtılması hastalık etkeninin kolaylıkla geniş kitlelere ulaşabilmesini sağlamaktadır^{47,48}. Bu nedenle Antraks ABD ve eski SSCB gibi birçok ülkenin biyolojik silahlanma programında ilk sıralarda yer almaktadır^{37,49}. Ayrıca yine bu nedenle *B. anthracis*, ABD'deki Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC)'nin potansiyel biyolojik savaş ajanları listesinde A kategorisinde yani en riskli grupta yer almaktadır⁵⁰. Şarbon bakterisi kullanılarak birçok biyolojik deneme yapılmıştır. Örneğin yirminci yüzyılın ilk yarısında İngilizler İskoçya açıklarındaki Gruinard adasında şarbonla çok sayıda deneme yapmışlar ve ada topraklarının bu denemeleri takip eden 36 yıl boyunca şarbon sporları ile kontamine kalmasına neden olmuşlardı. Adanın dekontamine edilmesine 1979 yılında başlanmış ve 280 ton formaldehit kullanıldıktan sonra ancak 1987 yılında tam anlamıyla temizlenebilmişti⁵¹. 1970 yılında Dünya Sağlık Örgütü'nün bir uzmanlar kurulunun yaptığı tahmine göre, 5 milyon nüfusa sahip bir şehir üzerine uçakla 50 kg şarbon basili aerosol halinde atıldığı takdirde 250.000 kişide şarbon görüleceği ve bunlardan 100.000 kişinin tedavisiz bırakıldığı takdirde öleceği hesaplandı⁵¹. CDC'nin tahminine göre etkenle temas eden 100.000 kişi için toplam maliyet 26.2 milyar USD olacaktı⁵².

Son yıllarda özellikle belli ülkelerde yaşanan antraks saldırıları biyolojik silahlarla ilgili uluslararası duyarlılığı artırmış ve mevcut durum yeniden değerlendirmeye alınmıştır. Böylece biyolojik savaş tehditlerinin boyutunun ve etki mekanizmasının aydınlatılabilmesi onlarla mücadele edebilmeyi ve savaşmayı kolaylaştırabilir. Bu çalışmada sıçan karaciğer, akciğer ve kalp dokuları model alınarak, antraks basilinin etki mekanizmasında etkili bileşenlerden biri olan LF'nin olası histopatolojik etkileri detaylı olarak araştırılmış ve söz edilen bakterinin patogenezi ile ilgili bilinmeyen bir yön aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2.9. Şarbon Hastalığının Etkeni olan *B. anthracis*:

Şarbonun ingilizcedeki karşılığı olan anthrax kelimesi, bakterinin bilimsel ismi olan *Bacillus anthracis*'e dayanmaktadır. *Bacillus anthracis* bakteri kalsifikasyonunda "endospor oluşturan Gram pozitif çomaklar ve koklar" grubunda bulunmaktadır. Bu grup içindeki bacillus cinsine bağlı türlerden biridir. *B. anthracis* Gram pozitif, aerobik ve spor oluşturan bir mikroorganizmadır. Hareketsiz olan etken 1-1.2 µm çapında, 3-5 µm uzunluğunda ve çomak şeklindedir. Basilin yan kenarları birbirine paralel ve uçları köşelidir⁵³.

Şarbon hastalığı nedeniyle ölen hayvanlardan hazırlanan preparatlarda, tek tek veya 2-5 çomaktan oluşan kısa zincirler şeklinde ve kapsüllü olarak gözlenir. Laboratuvarı üreyen basiller ise oldukça uzun filamentler oluşturur ve bazılarında spora da rastlanabilir. Bu spor oluşumu oksijenli ortamlarda ve 12°C'nin üzerindeki ısıda gerçekleşmektedir⁵⁴. Spor genellikle bakterinin ortasında, bazen de subterminal yerleşir ve spor bakteriyi şişirmez. Bakterinin spor formları, vejetatif formun aksine, ısı, soğuk, ultraviyole, kuruluk, yüksek ve düşük pH, kimyasal dezenfektanlar ve diğer bakterilerin metabolik ürünlerine son derece dayanıklıdır¹⁴. Bu sporlar hayvan veya insan vücudunda vejetatif hale geçer. *B. anthracis* sporları 140 °C'de 30 dakikada, 180 °C'de 2 dakikada inaktive olur. Pratikte kullanılan dezenfektanlara dirençlidir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda formaldehid (%5-10), gluteraldehit (% 2-4), hidrojen peroksit ve perasetik asit etkilidir^{55,56}.

B. anthracis kanlı agarda aerobik koşullarda 24 saatte 2-3 mm çapında kenarları düzgün olmayan üzeri granüle kırıxık gri genellikle R formu koloniler yapan, tüpte jelatin besisi yerinde batırma kültüründe tersine çam ağacı görünümünde ürer^{15,39}.

2.10. *B. anthracis*'in Virulans Faktörleri:

Şarbon bakterisinin, hastalık oluşturmada rol oynayan kapsülü ve protein yapısında toksini vardır. Kapsül ve toksinini kaybeden bakteri hastalık oluşturma özelliğini kaybeder. Kapsül ve toksinlerin detaylı yapısı aşağıda özetlenmiştir:

a. Kapsül: Antraksdan ölen hayvanların vücudunda spor oluşmaz ancak hayvana otopsi yapılırsa veya ölümden sonra tabii deliklerden (ağız, burun, anüs, vulva) gelen kanın hava ile temasında basiller, spor verirler. Basilin vejetatif formunun etrafında bulunan kapsül genellikle vücut içinde (in vivo) ve özel koşullar altında (% 10 - 30 CO₂ 'li ve serumlu ortamlarda) in vitro olarak meydana gelir⁵⁷.

Bakterilerde, hücre içinde sentezlenen kapsül yüksek vizkosite özelliğinden dolayı genellikle polisakkarid yapıdadır. Ancak *B.anthraxis*'in de içinde bulunduğu bazı bakterilerin kapsülü protein (D-glutamik asit) özelliğindedir^{58,59}. Diğer kapsüllü mikropların aksine *B. anthracis*'in protein karakterinde (poly-8-D-glutamik asit) olan kapsülü toksijenik ve immunojenik yeteneği düşük ve zayıftır. Ancak, basilin virulensini arttırmada, basili fagositozdan ve vücutta oluşan antrasidal madelerden korumada önemli görevi vardır. Bazı suşlarda kapsül yoktur. Bugün tam olarak belirli bir kapsül toksini saptanılmaması nedeni ile toksine karşı antitoksik bir serum elde edilmemiştir ve bu konudaki çalışmalar sürmektedir^{60,61}.

Kapsülün sentezini kodlayan genler 60 mega dalton ağırlığındaki PXO2 (60 MDal) plazmidi üzerindedir ve bu plazmidi taşımayan antraks suşları avirülettir^{62,63}. Kodlama işemi plazmid üzerindeki *cap* bölgesinde olmaktadır. Bu bölge *capB*, *capC* ve *capA* olmak üzere üç sistrondan oluşmaktadır. *Cap* bölgesi inaktive edilen suşlar immün hücreler tarafından kolaylıkla fagosite edilebilmektedir. Bu durum, etkenin fagositozdan korunmada kapsülün ne derece önemli olduğunu göstermektedir. Plasmidin kapsülsüz suşlara transferi ile böyle suşlarda kapsül oluşturmak mümkün olabilmektedir^{63,64}.

Virulan suşların kapsül oluşturabilmeleri normal olarak in vivo ortamlarda mümkündür. *B. anthracis* in vitro ortamlarda üretilirken gerek kapsül, gerekse toksinin sentezi bakımından üretildiği kültürün bileşimi önemlidir. Besiyerinin (agar) bikarbonat içermesi ve CO₂'li ortamda inkube edilmesi toksin ve kapsül sentezini kolaylaştırmaktadır. Etkenin CO₂li ortamlarda uzun süre inkube edilmesi halinde rough koloniler oluşur. Böyle koloniler kapsülsüz ve avirulenttir⁶⁴. Bu özellikteki kolonilerin tekrar kapsüllü, virulan özellik göstermeleri saptanamamıştır. Ancak antraksa karşı aşı olarak kullanılan Sterne suşu kapsülsüzdür ve bağışıklık da oluşturabilmektedir. Bu durumun genetik mekanizması tam olarak açıklanamamıştır⁶⁴. *B. anthracis*'in kapsüllü ve kapsülsüz suşlarının ayrımında Wa faji kullanılmaktadır. Wa faji kapsülsüz suşları lize ederken kapsüllü suşları herhangi bir şekilde sindirememektedir⁴.

b. Ekzotoksin: *B. anthracis* toksinlerinin gerek kimyasal yapıları gerekse hastalığın patogeneziindeki rolleri, bu bakteri ile ilgili çalışmaların erken dönemlerinden itibaren üzerinde durulan konular olmuştur. Çoğu araştırmacılar infekte hücrelerdeki toksinin etkisini inceleyerek, toksinin virulenste önemli bir faktör olduğu kanısına varmışlardır⁶⁵. Bununla birlikte bu toksinlere karşı geliştirilebilecek olası antitoksinlerin şarbon tedavisi üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir⁶⁶.

Şarbon toksini üretimi, ısıya duyarlı bir plazmid olan pX01 (110 dalton) tarafından sentezlettilir. PXO₁ plazmidi üzerinde bulunan *pag*, *cya* ve *lef* genleri sıra ile PA, EF ve LF'ü kodlamaktadır. Ayrıca bu proteinleri oluşturan aminoasitler arasında sisteinin bulunmaması da dikkat çekicidir⁶⁷. Bu toksin 3 farklı antijenik komponentten [Faktör I ödem faktörü (edema factor, EF), Faktör II koruyucu antijen (protective antigen, PA) ve Faktör III öldürücü faktör (lethal factor, LF)] oluşur⁶⁸. *B anthracis* toksin bileşenleri ile ilgili detaylı bilgi aşağıda sunulmuştur:

i. Ödem Faktörü (Edema Factor; EF): Ödem faktörü 89 kilo-dalton ağırlığında 767 aminoasitten oluşan bir proteindir. 1982 yılında keşfedilmiştir ve antraks ekzotoksininin bileşenlerinden ilk karakterize edilendir. Ödem faktörü, ökaryotik bir protein olan kalmoduline bağlı olarak intra-sellüler ATP'yi cAMP'a dönüştüren bir adenilat siklaz dönüştürücüdür⁶⁹. Duyarlı hücrelerin ödem toksini (EF + PA) ile muamele edilmesi sonucu cAMP seviyesi şiddetle yükselmektedir. Ödem faktörünün kalmodulin ile bağlanan kısmı henüz çok iyi tanımlanamamıştır. Bununla birlikte bu kısmın proteinin C ucunda 499 ve 532 nolu aminoasitler arasında olduğu ve 150 rezidü içerdiği düşünülmektedir⁷⁰. Ödem faktörü sadece pH 6'nın üzerindeki nötr pH larda çift katlı lipid tabakasını geçerek PA ile bağlantı kurmaktadır. Eğer pH asidik olursa bağlantı geri dönüşsüz olur ve EF, PA'dan ayrılamaz⁷¹. İlk 300 aminoasit ise PA ile bağlantı kuran kısmı içermektedir. Bu aminoterminal ucuna CYA30 denir ve stabil bir polipeptid olarak sentezlenir⁷². Ayrıca CYA30 bölgesinin letal faktörün aminoterminal ucuyla bağlanabilen 4 homolog bölgesi vardır⁷³.

ii. Koruyucu Antijen (Protective Antigen; PA): Koruyucu antijen 83 kilo-dalton ağırlığında ve 735 aminoasitten oluşan kristal yapıda bir proteindir. Bu protein her biri toksik hasar oluşturmada etkili olan 4 farklı parçadan (domain) oluşmaktadır⁷⁴. Koruyucu antijenin görevi diğer toksin bileşenlerinden farklı olarak organizmadaki hücrelere zarar vermek değil toksini hücre yüzeylerinde bulunan ve birbiri ile ilişkili integral membran proteinleri olan Antrax toksin reseptörü 1 (ANTXR1/ATR/TEM8) ve Antrax toksin reseptörü 2 (ANTXR2/CMG2) reseptörlerinden birine bağlamaktır⁷⁵. Bağlanmanın gerçekleşmesini takiben konak hücreye ait furin adlı proteazlarla temas eden PA öncelikle şekil değiştirerek oligomer yapıdan tetramer yapıya dönüşür. Daha sonra 20 kD ve 63 kD ağırlığında iki parçaya ayrılır. LF ve EF'nin bu parçalara yüksek afinitesi vardır ve hücre yüzeyinde bu iki faktör ile protektif antijenin büyük parçasının

oluşturduğu kompleks hücre içine alınarak adenilat siklaz enzimini aktive eder. Bunun sonucunda sitoplâzmada cAMP düzeyi artar ve toksik etkiler ortaya çıkar⁷⁶.

iii. Letal Faktör (LF): 776 aminoasit içeren 85 kilo-dalton ağırlığında bir proteindir. Molekülün üç bölgesi vardır. Bu bölgelerden aminoterminal kısmı (LF 254) PA ya bağlanabilen kısımdır. Molekülün sentral kısmı (307-383) stabil olmayan ve inaktif yapıda olup glutamat ve delesyonlardan zengin tekrarlar içermektedir.

Bu bölgeye repeat region adı verilir ve ne gibi bir fonksiyon üstlendiği henüz tespit edilememiştir⁷⁷. Quinn ve arkadaşları⁷⁸ in vitro ortamlarda LF'ün 17 bölgesinde özel mutasyonların olduğunu saptamışlardır. Ancak bu bölgelerin in vivo ortamlarda tespiti yapılamamıştır. Proteinin C terminalinde ise katalitik bölge (domain) bulunur. LF'ün katalitik aktivitesi 688-690 arasındaki rezidülerde yer alan çinko-metalloproteaz enziminden kaynaklanmaktadır⁷⁹. Mitojen-aktivatör protein kinazların (MAPKKs) tanıma bölgelerine (recognition site) bağlanarak onları aktive eden LF, aktivasyon işlemi bitince buradan ayrılır⁸⁰. Bakteri kültürlerinden salting out ve hidroksiapatit kromatografi ile ayrılabilen LF, bazı hücrelerde beklenen etkiyi oluşturamamaktadır. Bu durum bazen söz konusu hücrelerin farklı bir içyapı özelliği göstermesinden, bazen de LF'ün kendisinden kaynaklanmaktadır⁸¹. Böyle bir durumda LF'nin bir hücresel substrat olduğu söylenebilir. Ek olarak bu ayrılmadan sonra gerçekleşen olaylar serisinin şarbonun patogeneğinde çok önemli olduğu açıktır fakat henüz açıklığa kavuşmamıştır⁸².

LF ve EF'nin deneme hayvanlarında tek başlarına toksik etki oluşturamadığı gözlenmiştir. PA için de aynı durum söz konusudur. Deneme hayvanlarında tek başlarına herhangi bir toksik etki oluşturamayan 3 komponent, beklenen etkilerini gerçekleştirebilmeleri bakımından birbirlerine ihtiyaç duymaktadırlar. Konuyla ilgili yapılan çalışmalar sonucunda her üç komponentin ölüm ve ödem oluşturmada sinerjik etkili oldukları, LF'ün PA ile birleşerek oluşturduğu letal toksinin *B. anthracis*'in esas virulens faktörü olduğu, adenilat siklaz aktivitesi gösteren EF'ün ise enfeksiyonlarda önemli roller üstlendiği gösterilmiştir⁸³.

2.11. *B. anthracis* Toksinlerinin Neden Olduğu Patolojiler ve Literatür Özeti:

Şarbon hastalığı, insanlarda ve hayvanlarda bilinen en eski hastalıklardan biri olmasına karşın hala güncelliğini korumaktadır. Yapılan çalışmalarda gerek *B. anthracis* sporları kullanılmış gerekse toksin komponentlerinin deneysel uygulamalarının oluşturabileceği olası etkiler değerlendirilerek hastalığın mekanizmasının çözülmesi hedeflenmiştir. Bu bölümde çalışmamızın içeriği de göz

önüne alınarak şarbon bakterisinin toksinleri üzerine yapılan histopatolojik çalışmaların özetlenmesi amaçlandı.

B. anthracis toksinleri ile ilgili olarak ilk deneysel çalışmalar geçtiğimiz yüzyılın son yarısında yapılmıştır. Bu yıllardaki çalışmalarda söz konusu toksinlerin akciğerlerde ve kan damarlarında yetmezliğe neden olduğu gösterildi⁸⁴. Yine bu çalışmalarda makrofajların ve merkezi sinir sisteminin de bu toksinlerden olumsuz yönde etkilendiği bildirilmiştir⁸⁵.

Sonraları 2000'li yıllara kadar *B. anthracis* toksinleri üzerine yapılan çalışmalara ara verilmiş ve 2001 de ABD'de yaşanan şarbon paniğinden sonra tekrar çalışmalara başlanmıştır. Bu dönemde yapılan çalışmalardan birinde ödem toksininin fareler üzerine uygulanması sonucunda dalakta hipoksiye bağlı olduğu düşünülen doku nekrozu, pleural effüzyonla birlikte; adrena bez, lenfoid organlar, kemik-kemik iliği, gastrointestinal mukoza, üreme organları ve böbrekte çeşitli histopatolojik dejenerasyonlara neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ödem toksininin kalp üzerinde miyofibrillerde ayrılma, interstisiyel boşluklarda ödem birikimi ve kardiyak myosit nekrozu yaptığı bulunmuştur⁸⁶.

Yapılan çalışmalar letal toksinin deney hayvanlarının akciğerinde ve barsaklarında hemorajiye, kalp kasında da patolojik hasara neden olduğunu göstermiştir. Bu çalışmadan elde edilen diğer bulgulara göre letal toksin karaciğerde granülom oluşumuna da neden olmaktadır⁸⁷. Yapılan çalışmalarda letal toksinin endotelial bariyerlerde fonksiyon kaybına ve endotel hücre apoptozuna neden olduğu gösterilmiştir⁸⁸. Toksin reseptörlerine ilişkin yapılan çalışmalar bu reseptörlerin en çok akciğer, deri ve barsaklarda sentezlendiğini göstermiştir⁸⁹. Şarbon toksinlerinin dalak üzerine etkileri ise beyaz ve kırmızı pulpada myelogenik hücrelerin apoptozu, hemoraj ve nekroz olarak bildirilmiştir. Antrax letal faktörü uygulanmasından sonra ise apoptoz, nekroz, hipoksi gibi değişiklikler gözlenmiştir⁹⁰. Karaciğer üzerinde de şarbon toksinlerinin toksik etkisine bağlı olarak hemoraji, sentrilobüler nekroz, vasküler dilatasyon bulguları rapor edilmiştir. Timus ve kalp üzerine yapılan çalışmalarda da timus korteks ve medullasında lenfoid hücre ölümü, T lenfositlerinin ölümü, kalpte ise miyokardiyal kardiyak dilatasyon ve koagülatif nekroz belirlenmiştir⁹⁰. Yapılan benzer çalışmalarda letal toksinin böbrek üzerinde toksik etkiler oluşturduğu bulunmuştur.

2.12. Çalışmada Kullanılan Organlara Detaylı Histolojik ve Embriyolojik Yaklaşım:

A. Karaciğerin Histolojik Yapısı ve Gelişimi

I. Karaciğerin Histolojisi:

Karaciğerin başlıca yapısal elemanları şunlardır:

1. Hücre kordonları şeklinde düzenlenmiş hepatositler
2. Bağ dokusundan oluşan stroma
3. Stroma içerisinde ilerleyen kan damarları, sinirler, lenf damarları ve safra kanalları
4. Hepatosit kordonları arasında yerleşmiş olan sinüzoidler
5. Karaciğerin bu şekildeki yapısal organizasyonunu ve bu yapı elemanlarının birbirleriyle olan fonksiyonel ilişkilerini açıklamak için 3 farklı karaciğer birimi (karaciğer lobülü) tanımlanmıştır. Bu birimler aşağıda sırasıyla özetlenmiştir⁹¹:

a. Klasik Karaciğer Lobülü: Silindirik ya da prizmatik biçimlidir. Tam kapsül altındakiler dışında kalan lobüllerin çoğunun apeksi hilusa yöneliktir. Lobüllerin sayısı yaklaşık 1 milyon olup 2 mm boyunda ve 700 mikron çapındadırlar⁹². Enine kesitlerde lobül altıgen şeklinde seçilir. Her köşesinde portal alan (portal triad) ve ortasında sinüzoidlerden gelen kanın toplandığı bir damar olan Vena sentralis (terminal hepatik venül) bulunur. Vena sentralisden periferine doğru ışınal tarzda uzanan ve birbirleriyle anastomozlaşan karaciğer hücre kordonları (hepatosit plakları veya Remark Kordonları) bir epitelyal ağ oluştururlar. Bu hepatosit kordonları arasında ise sinüzoidler yer alır. Sinüzoid duvarında endotel hücrelerinin yanısıra Kupffer hücreleri de bulunur. Klasik lobülün en dışında yer alan ve sınırlayıcı hücre plaklarını oluşturan hepatositler ile interlobüler bağ dokusu arasında Mall aralığı adı verilen ve elektron mikroskopik düzeyde görülebilen bir alan yer alır⁹².

Klasik lobül içi zon ayırımı da bu esasa dayanarak yapılır. Buna göre her hepatik asinüsdeki hepatositler kısa bir eksen etrafında yerleşmiş konsantrik eliptik zonlar halinde tanımlanır. Böylece,

- Zon 1 (santral zon= hepatik zon): Bu, ortadaki eksene en yakın ve oksijen açısından en zengin bölgedir.
- Zon 3 (portal zon): Bu, eksenden en uzak ve santral vene en yakın kısımdır, yani asinüsün merkezidir. Aynı zamanda oksijen açısından en fakir zondur.
- Zon 2 (intermediate zon) ise keskin sınırlarla ayrılmamakla birlikte zon 3 ve zon 1 arasında yerleşmiştir.

Zon 1 hücreleri karaciğere gelen kanda bulunan besin ve toksinlerle ilk olarak karşılaşan, safra kanalı tıkanmalarını takiben ortaya çıkan değişikliklerin ilk olarak

gözlendiği hücrelerdir. Kan dolaşımı bozulduğunda bu hücreler en son ölür, aynı zamanda ilk olarak bu hücreler yenilenir. Zon 3 te yerleşen hücreler ise sentrilobüler iskemik nekrozdan ilk olarak etkilenen hücrelerdir. İlk yağ birikiminin bu hücrelerde gözlendiği ve toksik maddelere cevabın en son bu zonda geliştiği bildirilmektedir. Zon 2 hücrelerinin fonksiyonel ve morfolojik özellikleri zon 1 ve zon 3 hücreleri arasında bulunmaktadır⁹².

Karaciğerin başlıca yapı elemanları aşağıda özetlenmiştir.

a. Hepatositler: Karaciğer parankim hücresi olan hepatositlerin yapısal özellikleri fonksiyonel çeşitliliğine yönelik çok farklı özellikler gösterir⁹³. Organellerin sitoplazmadaki dağılımı da hücrenin lobül içindeki yerine ve işlevine bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Hepatositler çapları 20-30 mikron olan geniş poligonal hücrelerdir. Karaciğerdeki hücrelerin yaklaşık %80 ini oluştururlar. Hücrelerin merkezinde 1 ya da 2 adet oval, ökromatik ve çoğunlukla poliploid kromatin içeren nükleus bulunur⁹³. Nükleuslar içerisinde iki ya da daha fazla nükleolus belirgin olarak gözlenebilir. Düz ve granüllü endoplazmik retikulumların vezikül ve tübüleri Golgi kompleksi ile devamlılık gösterir. Sitozolde bol miktarda serbest ribozom bulunur. Glikojen içeriği sıklıkla düz yüzlü endoplazmik retikuluma ve Golgi kompleksi'ne bağlı olarak bulunur⁹³. Lizozomlar çeşitli boyutlarda ve bol miktarda bulunur, bunlardan bazıları lipofuksin ve lamelli proteinler içerir, genellikle kanaliküler yüze yakın bulunurlar. Her bir hepatosit temel işlevi toksik H_2O_2 'nin yıkımı olan 200-300 adet peroksizom içerir. Mitokondriler her hücrede ortalama 100 adet ve sitoplazma içinde dağınık halde bulunur. Hepatositlerin içerdiği mitokondri sayısı bazen 2000'e kadar çıkabilir. Mitokondriler HE kesitlerde eozinofil boyanan alanlar şeklinde gözlenir⁹³.

Hepatositler üç önemli yüze sahiptir. Bunlar, sinüzoidal, kanaliküler ve intersellüler yüzlerdir:

i. Sinüzoidal Yüz: Disse aralığıyla hepatositlerin sinüzoidlerden ayrıldığı yüzüdür, hepatositlerin bu aralığa bakan kısımları kısa ve düzensiz mikrovilluslar içerir ve böylece hepatositlerin bu yüzleri 6 kat genişletilerek, sekresyon ve absorpsiyon için geniş bir yüzey alanı oluşmuş olur. Bu yüz bir hepatositin toplam yüzünün % 70'ini oluşturur ve bu yüz ile sinüzoidler ve hepatositler arasındaki madde alış veriş gerçekleşir⁹⁴.

ii. Kanaliküler Yüz: Bu yüz vasıtasıyla hepatositlerde yapılan safra kanaliküllere boşaltılır, bu yüz toplam hepatosit yüzünün % 15'ini oluşturur, hepatosit sitoplazmasının bu yüze yakın sitoplazma kısımları aktin filamantlerinden zengindir. Bu filamentler muhtemelen kanalikülün çapını artırıp safra akış hızını artırmaktadır.

Kanaliküler lümenin etrafındaki hücre zarı ise alkalın fosfataz, adenoziin trifosfataz enzimlerinden zengindir⁹⁴.

iii.İntersellüler Yüz: Bu yüz iki komşu hepatositiin birbirine bakan yüzleridir. Hepatositlerin sitoplazması genelde asidofil olmakla birlikte; hematoksilen–eozinle boyanan parafin kesitlerde, sitoplazmada granüllü endoplazmik retikulum ve serbest ribozomlardan kaynaklanan bazofil boyanan alanlar gözlenir. Bu alanlar ergasitoplazma olarak adlandırılır. Düz yüzlü endoplazmik retikulum özellikle periportal hepatositlerde bol miktarda bulunur. Bu organelin sisternalarında detoksifikasyon işlemin gerçekleşir. Bazı ilaç ve toksinlere maruz kalma, hepatositlerin düz yüzlü endoplazmik retikulum içeriğinin artmasına neden olur. Ayrıca hepatositler glikojen içeriğii bakımından zengindir ve bu içerik elektron mikroskobuyla rozetler şeklinde gözlenir⁹⁵.

b. Sinüzoidler: Hepatosit kordonları arasında yerleşmiş olan hepatik sinüzoidler, ince ve kesintili bir endotel ile örtülüdür. Bu kesintili sinüzoidal endotelin altında yer alan bazal membran da kesintilidir. Hepatik sinüzoidlerin duvarında bir çeşit makrofaj olan Kupffer hücreleri bulunur. Sinüzoidler, portal ven ve hepatik arterin terminal dallarından kanlanırlar. Kan içeriğii hepatositlerde modifiye edildikten sonra bu kanı terminal hepatik venüllere boşaltırlar. Sinüzoidler kapillerlerden daha geniştir ve daha düzensiz bir yapıya sahiptir⁹⁴. Sinüzoidlerde yer alan hücreler aşağıda özetlenmiştir:

i. Endotelyal Hücreler: Sinüzoid duvarını döşeyen yassı epitel (endotel) hücreleridir. Pinositoz aktivitelerinden dolayı vital boyalarla boyanabilirler.

Bu aktiviteden dolayı elektron mikroskobunda hem adluminal hem de abluminal yüzeylerde pinositotik veziküller gözlenir.

Hücreler arasında sitoplazmik açıklıklar bulunmakla birlikte elektron mikroskobik olarak bazal lamina içeriğinin miktar açısından farklılık gösterdiğii saptanmıştır. Örneğii bazı hücrelerde kesintili sinüzoidal epitel hiç bazal lamina içermez. Özetle bazı hücreler tamamen birbirinden ayrı bulunabildiğii gibi bazı hücreler de sitoplazmik delikler yardımıyla başka endotel hücrelerine tutunmuş halde bulunabilir⁹⁶.

ii. Kupffer Hücreleri: Bu hücreler Kupffer tarafından 1898’de altın impregnasyon metoduyla boyanarak tanımlanmıştır. Mononükleer fagositik sistemin bir üyesi olan Kupffer hücreleri hepatik sinüzoidlerin duvarına tutunmuş ve lümene doğru sarkmış şekilde bulunurlar. Bu hücreler sıklıkla yıkılmış eritrositleri içerirler ve demir pigmentlerini depolarlar. Fagositte ettikleri materyali ise kana verirler. Lityum Karmin ya da Tripa Blue gibi vital boyalarla iyi boyanırlar. Aynı zamanda karbon ve toryumdioksit partiküllerini de fagositte ettikleri için bu maddelerle de gösterilebilirler. Sinüzoid endoteline bağlanmak için herhangi bir bağlantı kompleksi oluşturmazlar.

Düzensiz hücre yüzeyleri ile sinüzoid lümeninde bulunan kan ile temas halindedirler. İnce bir glikokaliks sahip oldukları belirlenmiştir. Hücre membranları sitoplazmik invaginasyonlar gösterir⁹⁴. Sitoplazmaları organel açısından zengin olup endotel hücrelerine göre daha heterojen yapıdadır. Çeşitli boyut ve yoğunlukta bol miktarda lizozom içerirler. Jukstanükleer bir sentrozom ve Golgi kompleksine sahiptirler. Kısa sisternalı granüler endoplazmik retikulum sitoplazma içerisinde dağınık halde bulunur. Peroksidaz enzimi bu GER'ların perinükleer sisternalarının lümenlerinde bulunur. Kupffer hücreleri mitozla çoğalabilirler⁹².

c. Perisinüzoidal Aralık (Disse Aralığı): Karaciğerde tanımlanan yapılardan bir diğeri de perisinüzoidal aralıktır (Disse aralığı). Bu yapı ancak elektron mikroskopik olarak gözlenebilir ve sinüzoidlerdeki kan ile karaciğer hücreleri arasında materyal değişim yeridir. Bu değişimin etkinliği önemli ölçüde hepatositlerin bu aralığa bakan yüzlerinde bulunan mikrovilluslara bağlıdır. Bu bölgede miyelinsiz aksonlar bulunur. Ayrıca yine bu bölgede kollagen ve retiküler fibrillerin olduğu bildirilmiştir. Bu boşluk ayrıca lenf dolaşımı açısından da önemlidir. Perisinüzoidal boşlukta kalan plazma, periportal bağ dokusu ile klasik lobülü en dıştan çevreleyen hepatosit dizisi arasında kalan ve ancak elektron mikroskopuyla görülebilen Mall aralığına boşalır⁹⁷. Perisinüzoidal aralıkta yer alan hücreler aşağıda özetlenmiştir:

i. Ito Hücreleri (Stellate hücreler, Liposit, İnterstisiyel hücre, Miyofibroblast benzeri hücre): Bu hücreler de Kupffer hücreleri gibi gold klorid tekniği ile gösterilebilirler. Fagositik aktiviteleri yoktur. Bazı sitolojik özellikleri fibroblastlara benzer. Periferik ve ara zonda santral zondan daha fazla miktarlarda bulunurlar.

Bu hücrelerin orijinleri ve fonksiyonel önemi tam olarak anlaşılamamıştır. Yağ depolanması ve A vitamini metabolizmasında rol oynadıkları bilinmektedir. Ayrıca toksin artışına cevap olarak gelişen perisinüzoidal stromanın arttığı durumlarda bu hücreler kollagen sentezleyerek fibrozise neden olabilir. Bu özellikleri dolayısıyla miyofibroblastlar olarak adlandırılabilirler⁹⁸.

ii. Pit Hücreleri: Perisinüzoidal aralıkta bulunan bu hücreler bu bölgedeki endotel hücrelerine tutunurlar. Kısa psödopodlar ve sitoplazmik granüller taşıyan bu hücrelerin natural killer hücreleri olabilecekleri düşünülmektedir. Taşıdıkları bu sitoplazmik granüller açısından gastrointestinal epitelin enteroendokrin hücrelerine benzemektedirler. Fare ve sıçanlarda tanımlanan bu hücrelerin insan karaciğerinde bulunup bulunmadığı da henüz bilinmemektedir⁹⁹.

d. Safra Yolları: Safra yollarının en küçük dalı hepatositlerin özelleşmiş yan yüzleri arasında kalan ve safra salgısını içine boşalttıkları safra kanalikülüdür.

Kanalikül duvarını hepatositler oluşturur ve kanalikül içine hepatositlerden düzensiz mikrovilluslar uzanır. Bu kanalcıklarla safra, lobülün periferindeki küçük, terminal safra kanallarına (Hering kanalı) akar ve bu kanallar da portal alanda bulunan interlobüler safra kanallarına boşalır. Portal alanlardaki safra kanalları sağ ve sol lob içinde lobar safra kanallarını oluştururlar, bu lobar kanallar da hilusta birleşerek *ductus hepaticus communis*'i oluşturur. *Ductus hepaticus communis* ve *ductus cysticus* birleşerek *ductus choledocus*'u oluştururlar. *Ductus choledocus* da safrayı duodenuma götürür. Bu kanal duodenumun ampulla bölgesine açılır. Bu bölgede duodenumun muskularis ekstemasının kalınlaşarak oluşturduğu bir yapı olan Oddi sfinkteri bulunur ve bu yapı *Ductus choledocus* ve pankreatik kanalı çevreleyerek safranın ve pankreatik sıvının duodenuma akmasında iş görür¹⁰⁰.

e. Lenf Boşlukları: Karaciğer vücutta üretilen total lenf miktarının yaklaşık 1/4'ünü üretir. Hepatik lenf, içerdiği yüksek orandaki albumin ve globulin gibi plazma proteinleri açısından vücuttaki diğer lenf sıvılarından farklıdır. Lenf damarları histolojik olarak gözlenmez. Lenf sıvısının Disse aralığından lobülün periferine iletiliği düşünülmektedir¹⁰¹.

II. Karaciğerin Embriyolojik Gelişimi:

Karaciğer, safra kesesi ve safra kanalları 4. haftanın başında, ön barsağın kaudal parçasından öne doğru bir çıkıntı şeklinde belirirler. Bu çıkıntı karaciğer tomurcuğu ya da hepatik divertikül olarak adlandırılır. Karaciğer tomurcuğu septum transversuma doğru uzanır. Septum transversum kalp taslağı ile orta barsak arasında uzanan splanknik mezodermal bir kitledir. Septum transversum bu kısımda diafragmanın sentrum tendineumunu ile bu bölgedeki ventral mezenteri oluşturur. Karaciğer tomurcuğu ventral mezenterin iki yaprağı arasında hızla büyüyerek ikiye ayrılır. Karaciğer tomurcuğunun daha büyük olan kraniyal parçası primordium hepatikum (ilkel karaciğer) adını alır. Çoğalan endodermal hücreler hepatik hücre kordonlarını ve intrahepatik safra kanallarını döşeyen epiteli oluştururlar. Bu hepatik hücre kordonları, endotel döşeli boşlukların çevresinde ağ oluşturarak karaciğer sinüzoidlerinin taslaklarını meydana getirirler. Karaciğerin fibröz dokusu, hemopoetik dokusu ve Kupffer hücreleri septum transversumdaki mezenkimden gelişir.

Karaciğer 5.-10. haftalar arasında hızla gelişir ve karın boşluğunun büyük kısmını kaplar. Umbilikal venden karaciğere akan oksijenli kanın miktarı, karaciğerin gelişimini ve fonksiyonel segmentasyonunu belirler. Başlangıçta sağ ve sol lobların büyüklüğü aynı iken, kısa bir süre sonra sağ lob daha fazla büyür. Altıncı haftada başlayan hemopoezis karaciğere parlak, kırmızı bir renk verir. Karaciğerin 7. ve 9.

haftalar arasındaki büyüklüğü bu hemopoetik aktiviteden dolayıdır. 9. haftaya kadar fetusun total ağırlığının % 10'unu karaciğer oluşturur. 12. haftada karaciğer hücreleri safra yapımına başlar. Karaciğer tomurcuğunun daha küçük olan kaudal parçası safra kesesini, tomurcuğun sapı da duktus sistikus oluşturur. Başlangıçta ekstrahepatik safra yolları epitel hücreleri ile tıkalı iken, bu hücrelerin dejenerasyonu ile vakuolizasyon oluşur ve kanallar açılır. Duktus hepaticus ve duktus sistikus duodenuma bağlayan kordon, duktus koledokusa dönüşür. Başlangıçta duodenum kavsinin ön yüzüne bağlı olan duktus koledokus, duodenumun büyümesi ve rotasyonu ile duodenumun arka yüzüne taşınır. 13. haftadan sonra duktus koledokustan geçerek duodenuma giren safra, mekonyuma koyu yeşil rengini verir¹⁰².

B. Akciğerin Histolojik Yapısı ve Gelişimi:

I. Akciğerin Histolojik Yapısı:

Akciğerler bronş ağacı ve onu çevreleyen parankimal dokudan oluşur.

a. Bronş Ağacı: Trakeanın ikiye ayrılmasıyla sağ ve sol primer bronşlar oluşur (ekstrapulmoner bronşlar). Akciğere giren bronşlar intrapulmoner bronşlar olarak adlandırılır ve sekonder bronşları (lobar bronş) oluşturmak için dallanırlar. Lobar bronşların dallanmasıyla tersiyer (segmental bronşlar) meydana gelir. Her segmentin kendi kan ve bağ dokusu desteği vardır. Bu özellik her bir segmentin kolaylıkla çıkartılabilmesini sağlar. Tersiyer bronşlar; bronşiyoller, terminal bronşiyoller, respiratuvar bronşiyoller, alveolar kanallar, alveolar keseler şeklinde devam eder¹⁰³. Bronşlar lümeni çevreleyen 5 tabakadan oluşur:

i. Mukoza: Yalancı çok katlı kinosilyalı epitel ve onun altında yer alan lamina propriadan oluşur. Bronşların çapı azaldıkça, hücrelerin yüksekliği, bazal membran kalınlığı ve lamina propria miktarı azalır.

ii. Kas Tabakası: Bu düz kas demetlerinin kasılması bronşun lümenini daraltır. Parasempatik sinir sisteminin (vagus siniri) uyarımı düz kasların kontraksiyonunu doğurur. Sempatik sinir sisteminin uyarılması düz kasların kontraksiyonunu baskılar.

iii. Submukoza: Gevşek bağ dokusundan oluşur. Büyük bronşlarda bu bölgede serömüköz bezler bulunur.

iv. Kıkırdak Tabakası: Devamlılığı olmayan hyalin kıkırdak yapısındaki plakalardan oluşur.

v. Adventisya: Komşu yapılarla devamlılığı sağlayan tabaka olup gevşek bağ dokusu yapısındadır.

Bronşların çapları azaldığında kıkırdak plakalar gittikçe küçülür ve bronşiollerde gözden kaybolur. İntrapulmoner bronşların duvarındaki düz kaslar, duvarı tamamen çevreleyen bir tabaka oluşturur ve kıkırdak azaldıkça düz kaslar artar. Başlangıçta düz kaslar devamlı tabakalar şeklinde olmakla birlikte bronşlar küçüldüğünde düz kaslar da devamlılığını kaybeder⁹².

b. Bronşiyoller: Bir milimetreden daha küçük çapta hava iletim kanallarıdır. Etraflarında kıkırdak plakaları ve subepitelyal bezler bulunmaz. Büyük çaplı bronşiyoller başlangıçta yalancı çok katlı silli prizmatik epitelle döşelidirler. Kanal çapları küçüldükçe tek katlı silli prizmatik epitele dönüşürler. Goblet hücreleri büyük bronşiyollerde bulunur ve normal şartlarda terminal bronşiyollerde goblet hücresi bulunmaz. Ancak sigara içenlerde ve diğer iritan maddelere maruz kalanlarda görülür. Bronşiyollerden daha alt kısımlarda solunum epiteli görülmez.

Küçük bronşiyoller aralarında "Clara" hücreleri bulunan basit silli kübik epitelle döşelidir. Bronşiyolün uzunluğu azaldıkça silli hücre sayısı düşer, Clara hücre sayısı artar.

Ayrıca fırçamsı hücre denen bir başka hücre tipi ile merkezi yoğun granüllere sahip diffüz nöroendokrin sistem (DNES) hücreleri de görülebilir. Epitelin altında bir miktar bağ dokusu ve bağ dokusunun altında düz kas tabakası görülebilir. Respiratuvar bronşiyoller; dar çapa sahip olup kübik epitelle döşelidir. Başlangıç kısımlarındaki epitel, silli ve Clara hücrelerini içerir, distalde Clara hücresi daha fazladır. Sıklıkla fırçamsı hücreler ve DNES hücreleri görülebilir. Alveoller respiratuvar bronşiyol lümeninin ince duvarından cepleşmeler şeklinde ayrılarak dağılır. Bu bölgeler hava-gaz değişimine izin verirler. Bu kısım bronşiyal ağaçta gaz değişiminin ilk görüldüğü kısımdır¹⁰⁴.

c. Alveoller: Solunum sisteminin kan ve hava arasındaki gaz değişiminin görüldüğü esas bölgeleri. Her bir Akciğerde 100 milyon alveol bulunur. 0,2 mm çapında olup respiratuvar bronşiyoller, alveolar kanallar ve alveolar keselerin cepleşmeleri sonucu meydana gelir. Çoğunlukla alveoler kanallar ve alveoler keseler aracılığı ile respiratuvar bronşiyolle ilişkilidir. Alveoler kanallar duvarsız hava yolları olup alveoller tarafından sınırlandırılırlar. Alveoller, içerisinde çok sayıda kan kapillerleri bulunan ince bağ dokusu septum (interalveolar septum) ile birbirinden ayrılır¹⁰⁵.

d. Akciğer Parankiminde Yer Alan Hücreler:

i. Endotel hücreleri: Kapillerleri kesintisiz olarak döşeyen (pencereli değil) çok ince hücrelerdir. Tip I alveol hücrelerinden daha açık boyanması, çekirdeğinin biraz daha küçük ve daha ince uzun olmasıyla ayırt edilir. Çekirdek ve diğer organeller bir araya

toplanmış böylece geri kalan sitoplazmanın son derece incilmesi sağlanmıştır. İncelmiş sitoplazma bölümünde pinositotik veziküller dikkati çeker. Akciğer kapillerleri gaz alış verişinden başka anjiyotensin ve prostaglandin gibi vazoaaktif maddelerin metabolizmasında da rol oynar (anjiyotensin, endotel hücrelerindeki peptidaz ile aktive olmaktadır¹⁰⁵).

ii. Tip I alveol hücresi (Tip I pnömosit, küçük alveol hücresi, yassı alveol hücresi):

Alveol yüzeyini döşeyen ileri derecede yassılmış hücrelerdir. Çekirdek alveol lümenine doğru biraz kabarıklık yapar. Organeller çekirdek etrafında toplanmıştır. Böylece geri kalan kısım ileri derecede incelmıştır, incelmış sitoplazmada pinositotik veziküller bulunur. Bu veziküller sürfaktan siklusunda ve yüzeyin küçük partiküllerden temizlenmesinde rol oynar.

Sitolojik olarak, yassı alveol hücreleri ve endotel hücreleri birbirlerinin aynadaki görüntüsü (simetriği) gibidirler. Birbirlerine desmosomlarla sıkıca bağlanmışlardır. Ayrıca oluşturdıkları zonula okludensler ile doku sıvısının alveol boşluğuna sızması önlenmiştir.

Tip I hücreleri yassı olduklarından alveol yüzeyinin büyük kısmını (%95'ini) örterler. Tip II hücreleri ise oldukça fazla sayıda olmalarına rağmen şekillerinden dolayı alveol yüzeyinin ancak %5'ini örter. Tip I hücrelerinin ömürleri 3 hafta kadardır⁹².

iii. Tip II alveol hücresi (büyük alveol hücresi, septal hücre): Tip I hücrelerine desmozom ve zonula okludenslerle bağlanmış, yuvarlağımsı kübik hücrelerdir. Boyları Tip I hücrelerinden daha yüksektir. Nükleusları da oldukça büyük ve yuvarlaktır. Özellikle alveollerin birleştikleri ve birbirleriyle açılar oluşturdıkları yerlerde küçük gruplar yaparlar. Bu hücre gruplarının tepesi lümene doğru üçgenimsi çıkıntı yapar. Diğer yerlerde Tip I'lerin arasına tek tek dağılmışlardır.

Tip II hücreleri salgı hücrelerine benzer özellikler taşırlar. Organellerce zengindirler. Mitokondriler, GER, iyi gelişmiş bir Golgi aparatı ve apikalde mikrovillusları vardır. Histolojik kesitlerde vezikül olarak seçilen salgı maddelerinin elektron mikroskopta birbirine paralel lamellerden oluştuğu (*lameller cisimcik*) gözlenir. Ünit membranla sarılı bu paralel cisimcikler fosfolipidler, glikozaminoglikanlar ve proteinler içerir. Lameller cisimcikler sürekli sentezlenip apikal yüzden salgılanırlar ve alveol yüzeye yayılıp ekstrasellüler bir alveol örtüsü oluşturan ve yüzey gerilimini düşüren *pulmoner sürfaktanı* oluştururlar. Yüzey gerilimi azalınca alveollerin havayla dolması için daha az solunum gücü harcanır. Ayrıca sürfaktan ekspirasyon sırasında alveollerin kapanmasını (kollabe olmasını) da önler. Son yıllarda sürfaktanın bakterisidal bir etkisi olduğu da ileri sürülmektedir.

Normalde 24 haftalık insan fetüsünde Tip II hücreleri tam olarak olgunlaşmıştır ve sürfaktan maddesini salgırlar. Yetersiz sürfaktan üretimi (özellikle prematürelde) *respiratuvar distress sendromuna* yol açar. Böyle bebeklerde alveollerin genişlemesi güçleştüğinden ve ekspirasyonda alveollerin kollabe olmasından dolayı solunum güçlüğü vardır.

Sürfaktan tabakası durağan değildir. Sürekli olarak yenilenir. Tip I hücrelerinin pinositotik vezikülleri, makrofajlar ve Tip II alveol hücreleri tarafından sürekli yüzeyden yavaş yavaş alınır. Böylece sürekli bir salgınım ve emilim döngüsü vardır¹⁰³.

iv. Alveolar makrofajlar (toz hücreleri): Kemik iliği kökenli monositlerden kaynaklanırlar. Fonksiyonlarını hem septumun bağ dokusunda hem de alveolün hava aralığında gösterirler. Hava ile alveollere kadar gelebilen toz, polen gibi partikülleri fagosite ederler. Bronş ağacından mukus içinde farinkse doğru çıkıp, öksürükle dışarı atılır ya da yutulurlar. Diğer bir kısım makrofajlar ise septum bağ dokusuna girer ve orada yerleşir. Burada fagosite materyalle dolu makrofajlar hayat boyu kalabilirler (alveol içine geçenler ise ortalama 4 gün yaşayabilir). Böylece otopsilerde sigara içenlerin akciğerlerinde karbon partikülleriyle dolu alveolar ve septal makrofajlar bulunur. Kalp yetmezliğinde akciğerlerden kalbe kan dönüşü yeterli olmadığından akciğer damarlarında fazla kan birikir ve bazı eritrositler damar dışına çıkar. Eritrositleri fagosite eden makrofajlar demirli pigmentle yüklü hale gelir. Böyle makrofajlara *kalp hatası hücreleri* ya da *siderofaj* denir¹⁰³.

v. Clara Hücreleri: Prizmatik, silsiz, kısa ve küt mikrovilluslara sahip, apikal yüzeyleri kubbe şekilli hücrelerdir. Apikal sitoplazmalarında glikoprotein içeren çok sayıda salgı granülleri bulunur. Bu hücrelerin, bronşiyol epitelini salgı ürünleri ile kaplayarak koruduklarına inanılır. AGER'lerindeki sitokrom P-450 enzimleri ile havadaki toksinleri etkisiz hale getirirler. Bronşiyol yüzey gerilimini azaltan, Sürfaktan benzeri (lipoprotein yapıda) madde üretirler. Bronşiyol epitelini yenilemek için bölünürler^{106,107}.

e. İnteralveolar Septum: Hava-kan bariyerinin de bulunduğu bölgedir. İki komşu alveol arasında bulunur, her iki tarafı da alveoler epitel ile döşenmiştir. Septum, ince bölgelerde yalnızca devamlı bir kapiller ve onun bazal laminasından oluşabilir. Kalın bölgelerde interalveolar septumu oluşturan yapılar şunlardır:

- i. Alveol epitel hücreleri
- ii. Alveol epitelinin bazal laminası
- iii. Kapiller endotelin bazal laminası
- iv. Zengin devamlı kapiller ağın endotel hücreleri

v. Diğer bağ doku elemanları (fibroblast, makrofajlar, mast hücreleri, lenfoid elemanlar, kollagen lifler ve elastik lifler)

f. Kan-Gaz (kan-hava) Bariyeri: Gazların değiş-tokuş yapıldığı interalveolar septumun en ince yeridir. Şu yapılardan oluşur:

i. Sürfaktanın monomoleküler tabakası

ii. Tip I pnömositler

iii. Devamlı kapillerlerin endotel hücreleri

iv. Tip I pnömositlerin ve kapiller endotelinin ortak, kaynaşmış bazal laminası

Alveolar septumun ince kısmında gaz değişimi gerçekleşirken, kalın kısmında ise doku sıvısının toplandığına inanılır. Terminal bronşiyollerin bağ dokusundaki lenfatik damarlar kalın kısımdaki sıvıyı direne eder¹⁰⁴.

g. Stromal Hücreler: Fibroblastlar, kollajen, elastik lifler ve ara maddeyi (glikozaminoglikanları) sentezler. Kollajen parankimal kitlenin %15-20'sini oluşturur. Kollajen başlıca tip I ve tip III kollajendir. Akciğerde birçok hastalıkta kollajen sentezi artmaktadır. Solunum güçlüğüne yol açan 100'den fazla hastalık akciğer fibrozisi ile birliktedir. Mast hücreleri, bağ dokusunun olduğu her yerde görüldüğünden burada da görülür. Kontraktil hücreler alveol epitelinin bazal yüzüne bağlanırlar (endotele değil). Kasıldıklarında alveol lümeni daralır, invitro olarak, histamin ve epinefrin gibi farmakolojik ajanların akciğer parankim dokusunda kontraksiyona sebep olduğu gösterilmiştir¹⁰³.

II. Akciğerin Embriyolojik Gelişimi:

3. haftanın sonunda ön bağırsaktan ayrılma sırasında trakeadan akciğer tomurcuğu ve bronşiyal tomurcuk denen iki lateral çıkıntı şekillenir. 5.ci haftanın başında bu tomurcuklardan her biri sağ ve sol ana bronşları oluşturmak için büyürler. Daha sonra sağda üç, solda iki sekonder bronşa ayrılarak, sağ akciğerde üç, sol akciğerde iki lobun gelişeceği belirlenmiş olur.

Akciğer tomurcukları kaudal ve lateral yönde büyümeye devam ederek vücut boşluğunun içine doğru genişlerler. Bu şekildeki büyüme ile akciğerlerin genişleyeceği perikardiyo-peritoneal aralıklar daralır. Bu aralıklar ön barsağın her iki yanında bulunur ve kademeli olarak genişleyen akciğer tomurcukları ile dolar. Sonuçta plevraperitoneal ve plevraperikardial katlantılar, perikardioperitoneal kanalları periton ve perikard boşluklarından ayırırlar. Bunları takiben geriye kalan aralık primitif plevral kavileri oluşturur. Akciğerlerin dışını örten mezoderm visseral plevrayı oluşturur. Vücut duvarının iç kısmını çevreleyen somatik mezoderm tabakası ise pariyetal plevraya

dönüşür ve üzerleri periton zarı ile örtülür. Pariyetal ve visseral yapraklar arasında kalan boşluğa da plevral boşluk denir.

Gelişmenin daha ileri evrelerinde sekonder bronşlar tekrar tekrar dikotamöz şekilde (dichotomous bölünme: daima ikili bölünme) bölünür ve sağ akciğerde 10, sol akciğerde 8 adet tersiyer (segmental) bronş oluşturarak akciğerdeki bronkopulmoner segmentleri meydana getirmiş olur. 6. ayın sonunda yaklaşık 17 yeni bronş jenerasyonu oluşmuş olur. Bronşiyol ağaç son şeklini almadan postnatal yaşam süresince 6 ek bölünme daha olacaktır. Dallanma akciğer tomurcuğu endodermi ve tomurcuğu çevreleyen splanknik mezoderm arasındaki epitel-mezenşim etkileşimi ile kontrol edilir. Mezodermden gönderilen dallanma sinyalleri fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor) ailesinin üyeleridir. Bu yeni bölünmeler oluşurken ve bronş ağacı gelişirken akciğerler daha kaudal bir pozisyon kazanır ve doğumda trakeal bifurkasyon 4.üncü torasik vertebranın karşısına gelmiş olur^{102, 108}.

III. Akciğerlerin Olgunlaşması:

7.nci prenatal aya kadar bronşiyoller sürekli olarak daha fazla ve daha küçük kanallara bölünür (kanaliküler dönem). Kanaliküler evre adı verilen bu süre içinde damar desteği de düzenli olarak artar. Solunum ancak kübik epitelle döşeli respiratuvar bronşiyollerin bir kısmının epitellerinin ince yassı epitele dönüşmesi ile mümkün hale gelir. Bu hücreler çok sayıda kan damarları ve lenf kapillerleri ile yakın ilişkidir ve çevreledikleri alan terminal kese veya primitif alveol olarak bilinir. 7.nci ayda gaz değişimi sağlayabilecek kadar yeterli kapiller damar ağı mevcuttur ve prematüre bebek yaşayabilecek durumdadır.

Prenatal hayatın son iki ayında ve postnatal hayatın ilk birkaç yılı boyunca terminal keselerin sayısı düzenli olarak artmaya devam eder. Ayrıca keseleri döşeyen ve Tip I alveolar epitel hücresi olarak bilinen hücreler incilir. Epitelin incilmesi kapiller damarların alveol keseleri içine doğru çıkıntı yapmasını kolaylaştırır. Bu alveol epiteli ve kapiller endoteli arasında ilişki ile kan-hava bariyeri oluşur. Olgun alveol, doğumdan önce mevcut değildir. 6.ncı ayın sonunda endotel hücrelerine ve düzleşmiş alveolar epitel hücrelerine ek olarak yeni bir hücre tipi de gelişir. Bu hücreler Tip II alveolar epitel hücreleridir ve sürfaktan üretirler. Sürfaktan, hava (alveol) boşluğundaki yüzey gerilimini düşürebilme özelliğinde olan fosfolipidden zengin bir maddedir.

Doğumdan önce akciğerler klordan zengin, çok az protein, bronşiyol bezlerinden salınan biraz mukus ve Tip II alveolar epitel hücrelerinden salınan sürfaktan içeren sıvı ile doludur. Sıvı içerisindeki sürfaktan miktarı doğumdan önceki son iki haftada artar.

Doğumdan önce fetal solunum hareketleri başlar ve amnion sıvısının aspire edilmesine yol açar. Bu hareketler akciğerlerin gelişimi ve solunum kaslarının gelişimi için önemlidir. Doğumda solunum başladığında akciğerlerdeki sıvının büyük kısmı kan ve lenf kapillerleri tarafından süratle rezorbe edilirken küçük bir kısmı da doğumda bronş ve trakea yolu ile atılmaktadır. Alveolar keselerden sıvı rezorbe edildiğinde; sürfaktan, alveolar hücre membranlarını kaplayan ince bir fosfolipid tabakası olarak kalır. İlk solunum sırasında alveollere hava girdiğinde sürfaktan tabakası yüksek yüzey gerilimi ile hava-su (kan) aralığının genişlemesini önler. Yağdan zengin sürfaktan tabakası olmadığında, ekspirasyon sırasında alveoller kollabe olur (atelektazi).

Doğumdan sonraki solunum hareketleri havanın akciğerlere girmesini sağlar ve bu sayede akciğerler genişleyerek plevra boşluğunu doldurur. Alveollerin büyüklüklerinde artış olmasına rağmen, akciğerlerin doğumdan sonraki büyümesi esas olarak respiratuvar bronşiyollerde ve alveollerdeki sayıca artışa bağlıdır. Alveol sayısı doğumda yetişkindekinin altıda biri kadardır. Geriye kalan alveollerin gelişmesi doğumdan sonraki ilk 10 yıl içinde yeni primitif alveollerin şekillenmesi ile devam etmektedir^{109,110}.

C. Kalbin Histolojik Yapısı ve Gelişimi:

Kalp, düzenli bir pompa olarak çalışmak üzere katlanmış, duvarı kalınlaşmış bir endotel tüpüdür. Kalp, sistemik kan basıncının esas elemanıdır.

Kalp duvarı üç ana tabakadan (katman) meydana gelir:

- a. Endokardiyum, endotel örtüsü ve subendotel bağ dokusundan oluşur.
- b. Miyokardiyum, çizgili kalp kası liflerinin işlevsel bir sinsisyumu olup, atriyum kası, ventrikül kasi ve özelleşmiş (uyarıcı ve iletici) kas liflerini oluşturur.
- c. Epikardiyum, düşük sürtünme yüzeyine sahip olan ve seroza adı verilen perikardiyal aralıkla bağlantılı mezotel ile döşelidir¹¹¹.

a. Endokardium: Kalbin içini döşeyen parlak ince bir zardır. Atriumlarda kalın ventriküllerde daha incedir. Kan damarlarının kalbe girip çıktığı yerlerde damarın intima tabakası ile devam eder. Endokardium üç laminadan oluşur.

i.Endotel: Tek katlı yassı epiteldir.

ii.Subendotel: Gevşek bağ dokusudur

iii.Subendokardiyal tabaka: Gevşek bağ dokusudur sinirler damarlar ve purkinje lifleri bulunur. Purkinje hücreleri modifiye olmuş kas fibrilleri olup ventriküllerin subendokardium tabakasında yerleşiktirler. Bu fibriller özelleşmiş uyarı iletim sistemi görevi üstlenmişlerdir. Kalp kası hücrelerinden ayırt edilmeleri zordur. Sözü edilen bu iki hücreyi birbirinden ayırt ederken, Purkinje liflerinin kalp kası liflerine oranla daha az

myofibril içermeleri ve yine Purkinje liflerinin kas liflerinden daha fazla sitoplazma içermesi dikkate alınmalıdır¹¹².

b. Myokardium: Kalp kası denilen modifiye çizgili kastır. Kalp kası hücreleri iki tiptir.

i. Kontraktil hücreler,

ii. İmpuls üreten ve ileten hücreler

Kalp kası atriumlarda ince ventriküllerde kalındır. Atriumun dış bölümünde kaslar transvers ve oblik seyirlidir. Atriumun iç bölümündeki kaslar her iki atriumda birbirinden bağımsız olarak dış tabaka kaslarına dik açı yaparak düzenlenirler. En içteki kaslar atriumun airukula bölümünde bir kabartı yapar (m.pektinatum). Ventrikül kasları değişik yönlerde seyrederek birçok tabakalar yaparlar erişkinde kompakt bir kitle oluşturan kas lifleri embriyoda süngersi bir ağ şeklindedir. En içteki kalp kasları kalbin fibröz iskeletine tutunmaktadır¹¹¹.

Kalp kasını oluşturan kas lifleri bazı yönleri ile iskelet kası liflerine, diğer bazı yönleri ile de düz kas liflerine benzerler. Miyofibrillerinin enine çizgili olmasından -bantlaşma göstermesinden- ötürü, kalp kası lifleri, iskelet kasına benzerler. Kalp kasının, diğer kas liflerinde bulunmayan özellikleri de vardır. Kas lifinin tek çekirdek içermesi ve bu çekirdeğin de lifin merkezinde yerleşmiş olmasından dolayı kalp kası, düz kasa benzer. Bu özelliklerinden biri, kas liflerinin yan dallar (kollateraller) ile birbirlerine bağlanmaları, diğeri ise kalp kası hücrelerinin özel bir biçimde peş peşe bağlanmalarıdır. Böylece kalp kası 3 boyutlu bir ağ sistemi meydana getirir. Kollateraller ile birbirine bağlanan bir miktar kas lifi bir demet oluşturur. Kalp kasını meydana getirmek üzere bu demetler değişik yönlerde seyrederler. Bu durumdan ötürü preparatlarda enine, boyuna ve verev (oblik) kesilmiş demetlerle karşılaşılır. Demetlerdeki kas liflerinin aralarında, iskelet kasında olduğundan daha bol miktarda kan damarı bulunur. Kalp kası liflerinin boyları 100 mikron, kalınlıkları ise 15 mikron kadardır. Peş peşe eklenen kalp kası liflerinin arasındaki bağlantı bölgeleri, her zaman Z çizgisi hizasındadır ve ışık mikroskobunda Z çizgisinden daha kalın bantlar halinde görünürler. Bu bağlantı alanları interkalar disk (diskus interkalaris) olarak isimlendirilir. Bu bağlantı alanları interkalar disk (diskus interkalaris) olarak isimlendirilir. Uçuca gelen kas lifleri nadiren düz bir interkalar disk ile birbirlerine bağlanırlar. Bağlantı yerleri çoğunlukla, merdiven basamakları görünümünde olan birkaç disk içerir. Bu bağlantı yerleri aynı zamanda, uyarımların hücreden hücreye iletilmesini sağlarlar. En belirgin bağlantı yerlerine musculus papillaris’lerde rastlanır. Kalp kası liflerinde bulunan miyofibriller, iskelet kası liflerindeki miyofibrillerden biraz daha kalındır, fakat onlarla aynı yapıya sahiptir.

Kalp kası liflerinde ayrıca (özellikle atrial kaslarda), atrial natriüretik faktör (ANF) ve beyin natriüretik faktör (BNF) adı verilen hormonları içeren sarkoplazmik granüller bulunur. Bu hormonlar diüretiktir; böbrekten renin sekresyonunu ve adrenal bezden aldosteron sekresyonunu inhibe ederler ve ayrıca vasküler düz kas gevşemesini stimüle ederler. Bazı özel kalp kası hücreleri peptid sentezlerler. Bunlar; atrial natriüretik polipeptid, kardiyodilatin, kardiyonatrin ve atriopetindir¹⁰⁵.

d. Kalbin Fibröz İskeleti: Kalp yapılarını destekleyen, kalp kası ve kalp kapakçıklarının bağlandığı fibröz bağ dokusudur. Septum membranozum, trigonum fibroza ve annuli fibrozum (fibröz halka)'dan oluşmuştur.

i. Septum membranozum: Ventriküler septumun fibröz bölümüdür. Aponevroza benzer.

ii. Annuli fibrozum: Aorta, pulmoner arter ve atrioventriküler kanal çevresindeki fibröz dokudur.

iii. Trigonum fibroza: Annuli fibrozum ile ostium atrioventrikularis arasındaki üçgen biçimi fibröz dokudur¹¹¹.

II. Kardiyovasküler Sistemin Gelişimi:

Vasküler sistem insan embriyolarında 3. haftanın ortalarında artık embriyo besinlerini sadece diffüzyonla karşılayamadığında ortaya çıkar. Bu evrede, geç presomit embriyonun splanik mezoderm tabakasındaki mezenşimal hücreleri çoğalırlar ve anjiyogenik demetler (kan adacıkları) olarak adlandırılan izole hücre kümelerini oluştururlar (Hücreleri angioblastlar).

Başlangıçta kümeler embriyonun yan taraflarında yerleşirken, sonradan baş bölgesine yönünde hızla yayılırlar. Zamanla bir lümene sahip olurlar ve at nalı biçimli küçük kan damarları ağını oluştururlar. Bu ağın anterior merkezi bölgesi kardiyogenik alan olarak adlandırılır ve bu bölgenin üzerindeki intraembriyonik sölomik kavite daha sonra perikardiyal kavite içine doğru gelişir. At nalı biçimli pleksusa ek olarak, diğer anjiyogenik kümeleri bilateral olarak paralel olarak ortaya çıkar ve embriyonik bölgenin orta hattına yaklaşırlar. Bu demetler de bir lümen edinirler ve dorsal aorta olarak adlandırılan bir çift uzun damarı oluştururlar. Daha sonraki evrelerde bu damarlar kalp tüpünü oluşturacak at nalı biçimli pleksusla bağlantı kurarlar¹¹⁰. Sözü edilen evreler aşağıda özetlenmiştir:

a. Kalp Tüpünün Oluşumu ve Pozisyonu: Başlangıç olarak, kardiyogenik alanın merkezi kısmı prokordal plağın ve nöral plağın anteriorunda yerleşiktir. Nöral tüpün kapanması ve beyin veziküllerinin oluşumundan sonra MSS, baş bölgesine doğru merkezi kardiyogenik alan ve gelecekteki perikardiyal boşluk üstüne doğru hızla büyür.

Sonuç olarak, prokordal plak (gelecekteki buccopharyngeal membran) ve kardiyojenik plağın merkezi kısmı ileri doğru çekilir. Daha sonra transvers aksisi boyunca 180° döner. Sonuçta kardiyojenik plağın merkezi kısmı ve perikardiyal boşluk, buccofaringeal membrana sırasıyla ventral ve kaudal olarak yerleşir.

Sefalokaudal fleksiyonla eş zamanlı olarak, orijinal olarak yassı embriyonik alan transvers yönde kıvrılır. Sonuçta 2 lateral endokardiyal tüp birbirine yaklaşır ve kaynaşır. Kaynaşma sefalik uçtan başlar ve kaudal uca doğru ilerler ve tek bir endokardiyal tüp şekillenir.

Gelişen ilkel kalp tüpü, perikardiyal kaviteye doğru giderek büyür. Başlangıçta, tüp, perikardiyal boşluğun dorsal kenarına dorsal mesokardium olarak adlandırılan bir mezodermal doku kıvrımı ile asılı kalır. Ventral mesokardiyum hiç oluşmaz. Gelişim ilerledikçe dorsal mesokardium da ortadan kalkar.

Bu olaylar gerçekleşirken, endokardiyal tüplere komşu olan mezoderm giderek kalınlaşır ve epimiyokardiyal mantoyu oluşturur. Bu tabaka endotelial tüpten önceleri kardiyak jöle olarak adlandırılan bir madde ile ayrılır. Daha sonra bu madde endotelden kaynaklanan hücrelerle istila edilir. Sonuçta, kalp tüpünün duvarı 3 tabakadan oluşur:

- i-Kalbin iç endotel döşemesini oluşturan endokardium,
- ii-Muskuler duvarı oluşturan miyokardiyum,
- iii-Tüpün dışını örten epikardiyum ya da visseral perikardiyum¹⁰².

b. Sinus Venosus'un Gelişimi: Sinus venosus çift yapısını kalp tüpünün diğer yapılarından daha uzun süre devam ettirir. 4.haftanın ortasında küçük transvers parça ile sağ ve sol sinüs boynuzlarından oluşur. Her boynuz kanı 3 önemli venden alır.

i. Vitellin ven: Vitellus kesesinden kanı embriyoya getirir.

ii.Umblikal ven: Plasentanın embriyonik kısmı olan choriondan oksijenden zengin kanı embriyoya getirir.

iii. Kardinal ven: Embriyo gövdesinden kanı getirir.

Başlangıçta sinus ve atrium arasındaki birleşim geniştir. Daha sonra sinüsün girişi sağa doğru değişir. Bu değişim esas olarak gelişimin 4. ve 5. haftası sırasında venöz sistemde ortaya çıkan kanın soldan sağa şanti nedeniyle olur.

c. Kalp Septumlarının Oluşumu: Kalbin büyük septumlarının oluşumu gelişimin 27. ve 37. haftaları arasında şekillenir. Embriyo bu dönemde 5 mm den 16-17 mm ye kadar büyür. İki aktif olarak büyüyen doku kütlesi kaynaşmaya kadar birbirlerine doğru büyürler ve lümeni, 2 ayrı kanala ayırırlar. Atrioventriküler kanallar, aortik ve pulmoner kanalların oluşumuna yardımcı olurlar.

Genişleyen kısımların büyümesi dar parçanın her kenarında devam ettiğinde, 2 duvar birbirine yaklaşır ve hatta kaynaşırlar ve bir septum oluşur. Böyle bir septum, orijinal lümeni asla tamamen bölemez ancak iki genişleyen bölge arasında bağlayıcı dar bir kanal geride bırakır. Genellikle komşu alanlarda çoğalan hücrelerin oluşturduğu bir doku ile ikincil olarak kapanır. Böyle bir septum, atriumları ve ventrikülleri bölmek için şekillenir¹⁰².

d. Atriumun Bölmelenmesi: Dördüncü hafta sonunda orak biçimli membranöz bir yapı, atriumun tavanından lümene doğru büyümeye başlar. Bu yapı septum primumun ilk parçasıdır. septumun 2 kolu atrioventriküler kanaldaki endokardiyal yastıkçıklara doğru büyür. Septum primumun alt ağzı ile endokardiyal yastıkçıklar arasındaki açıklık ostium primumdur. Gelişimin ilerlemesi ile, superior ve inferior endokardiyal yastıkçıklar genişlemeleri septum primum kenarları boyunca büyürler ve yavaş yavaş ostium primumu kapatırlar. Kapanma tamamlanmadan önce septum primumda perforasyonlar görülür. Bu perforasyonlar birleştiğinde, ostium secundum şekillenerek sağ atriumdan sol primitif atriuma kanın serbestçe akmasını sağlar.

İki atrial kavite arasındaki geçiş, oblik olarak uzamış bir yarıktır ve sağ atriumdan kan, sol atriuma bu açıklık içinden akar. Doğumdan sonra akciğer dolaşımı başladığında sol atriumdaki basınç artar ve foramen ovale septum secunduma doğru itilerek açıklık fizyolojik olarak kapanır, atrium sağ ve sol olarak ayrılır¹⁰⁸.

i. Semilunar Kapaklar: Truncus bölmelenmesi hemen hemen tamamlandığında, semilunar kapak öncülleri küçük tüberküller olarak görülmeye başlar. Bu tüberküller esas truncus şişkinlikleri üstündedir ve her biri sırasıyla pulmoner ve aortik kanalları oluşturacaktır. Kaynaşmış truncus şişkinliklerinin karşısında 3. tüberkül her iki kanalda ortaya çıkar. Giderek tüberküller üst yüzeylerinden çökerek semilunar kapakları oluştururlar. Bu süreç, 16 mm lik evrede iyi gelişmiştir ve 40 mm lik embriyoda tamamlanmıştır¹⁰².

Özetle; günümüze değin *B. anthracis*'in toxinleri ile ilgili birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen bu toksin bileşenlerinin tek başına patolojik değişikliğe neden olup olamayacağı konusunda herhangi bir bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca bu toksinlerin embriyolojik dönemdeki etkilerine ya da yol açabilecekleri olası ultra-strüktürel veya morfolometrik değişikliklere ilişkin herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Bu çalışmanın amacı *B. anthracis* tarafından üretilen öldürücü faktör'ün (LF) erişkin, yavru ve gebe sıçanlar üzerinde kullanılması ile sıçan embriyo ve fetüslerinin çeşitli dokularında ortaya çıkabilecek olası etkilerin belirlenmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Atatürk Üniversitesi Rektörlüğünün BAP-2007/13 protokol no'lu proje destek fonu ile desteklenen bu çalışma, Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin ve Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün Etik Kurulları tarafından onaylandı.

3.1. Hayvanlar:

Çalışmada, Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden sağlanan toplam 32 adet *Sprague Dawley* cinsi sıçan kullanıldı. Tüm hayvanlar steril, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda, oda sıcaklığında (22-24⁰ C) tutuldu. Tüm gruplardaki hayvanlara sınırsız yem ve musluk suyu tüketme olanağı sağlandı.

3.2. Deneysel Prosedür:

Bu çalışmada kullanılan hayvanların yaşları, fizyolojik dağılımları ve oluşturulan gruplar aşağıda sıralanan şekildeydi;

Embriyo ve fetüslerin elde edilebilmesi için sıçanlarda gebeliğin oluşturulması:

1. 12 adet 10 haftalık erişkin dişi sıçan, her bir kafeste 2 denek olacak şekilde 6 kafese yerleştirildi. Gebeliğin oluşabilmesi için her kafese, 1 gece boyunca kalmak üzere birer erkek sıçan bırakıldı (erkek-dişi oranı 1/2 olacak şekilde) ve ertesi gün erkek sıçanlar kafeslerden çıkarıldı. Gebelik ölçütü olarak, vajinal tıkaç oluşumu değerlendirildi. Vajinal tıkaç varlığı gözlenen sıçanların gebeliğin 0. gününde oldukları kabul edilip işlemlere devam edildi.

Grup I. 12 günlük embriyo grubu

Kontrol (Grup Ia) ve deney grubu (Grup Ib) embriyoların elde edilmesi:

a. 6 adet dişi sıçan gebeliğinin 11. gününe geldiğine intraabdominal enjeksiyon işlemine tabi tutuldu. Bu gebe sıçanlardan 3'üne (kontrol embriyoların elde edileceği gebeler) bidistile su (1 ml) enjekte edilirken, diğer 3 gebe sıçana (deney grubu embriyoların elde edileceği gebeler) bidistile su içerisinde çözünmüş *B. anthracis* letal faktörü (Anthrax Lethal Factor, Recombinant, *Bacillus anthracis*, Calbiochem, Merck, Germany, Catolog no: 176900) 100 µg/kg dozunda intraabdominal yoldan enjekte edildi. Bu işlemten sonraki 24. saatte, gestasyonun 12. günündeki sıçanlar intramusküler uygulanan ketamin (Ketalar®, Pfizer; İstanbul) ve ksilazin (Rompun®, Bayer; İstanbul) anestezisi altında öldürülerek abdominal boşlukları açıldı ve embriyoları çıkarıldı. 12 günlük embriyolar, ışık ve elektron mikroskopik takip işlemlerine alındı ve ayrıca stereolojik yöntemle de değerlendirildi.

Grup II. 16 günlük fetüs grubu

Kontrol (Grup IIa) ve deney grubu (Grup IIb) fetüslerin elde edilmesi: Gebe sıçanlardan diğer 6 tanesi, gebeliğin 15. gününe geldiğine yukarıdaki işlemler aynen tekrarlandı. Kontrol fetüslerin elde edileceği 3 adet gebeye intraabdominal bidistile su (1 ml) enjekte edilirken, son 3 gebe sıçana (deney grubu fetüslerin elde edileceği gebeler) bidistile su içerisinde çözünmüş *B. anthracis* letal faktörü (Anthrax Lethal Factor, Recombinant, *Bacillus anthracis*, Calbiochem, Merck, Germany, Catalog no: 176900) 100 µg/kg dozunda intraabdominal yoldan verildi. Bu işlemi takiben 24. saatte, gestasyonun 16. günündeki sıçanlar intra-musküler uygulanan ketamin (Ketalar®, Pfizer; İstanbul) ve ksilazin (Rompun®, Bayer; İstanbul) anestezisi altında öldürülerek fetüsleri çıkarıldı. 16 günlük fetüsler açılıp organ yerleşimleri tespit edildikten sonra doku örneklerinin alınmasına geçildi. 16 günlük fetüs karaciğer, akciğer ve kalp örnekleri ışık ve elektron mikroskopik takip işlemlerine alındı ve ayrıca stereolojik yöntemle de değerlendirildi.

Grup III. 10 günlük kontrol ve deney grubu yavru sıçanlar:

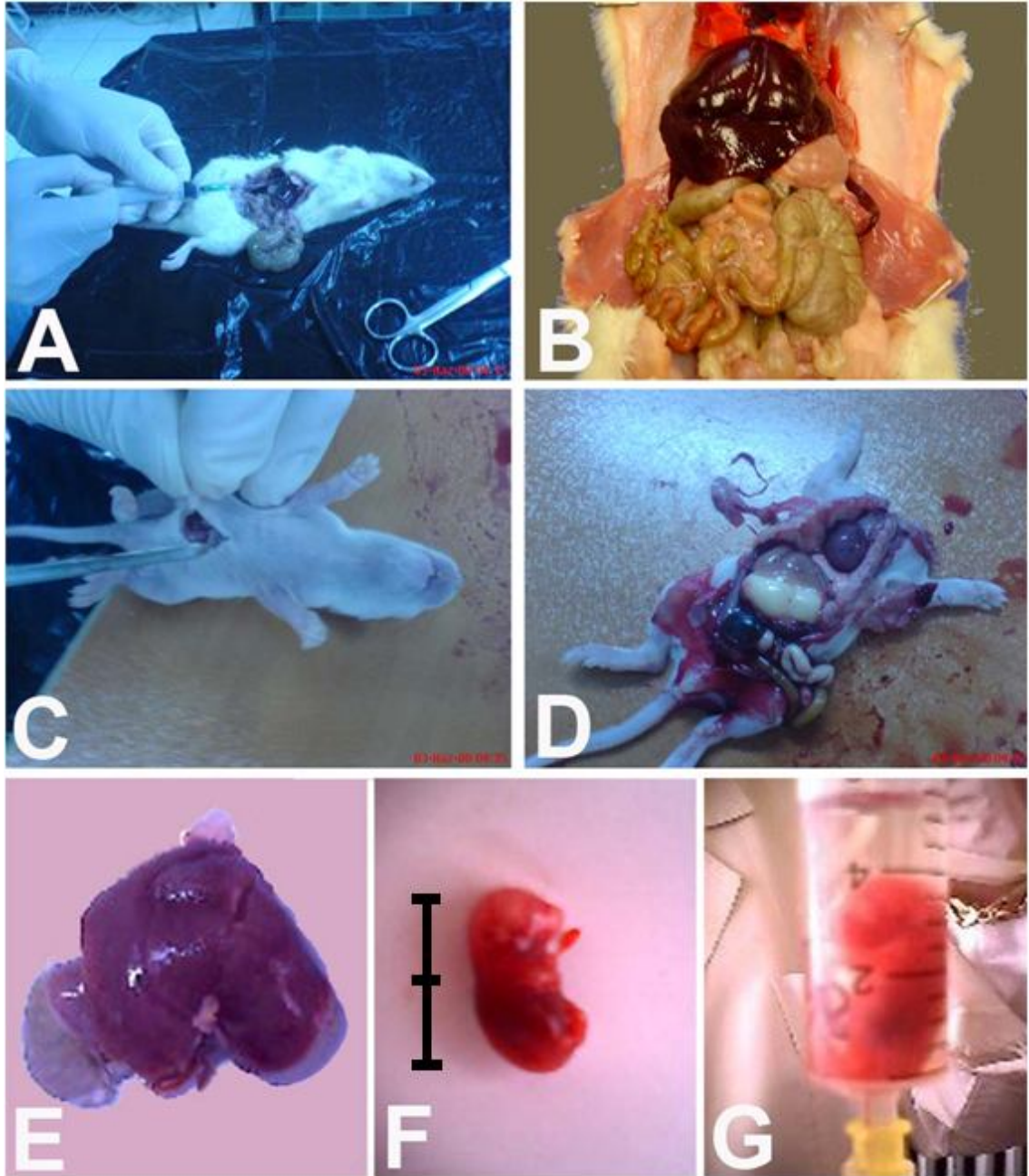
Bu grupların oluşturulması için 10 adet 9 günlük yavru sıçana intra-abdominal enjeksiyon uygulandı. Bunlardan 5 tanesine (kontrol yavrular, Grup IIIa) sadece 1 ml bidistile su, diğer 5 tanesine ise (deney grubu yavrular, Grup IIIb) bidistile su içerisinde çözünmüş *B. anthracis* letal faktörü (100 µg/kg) (Anthrax Lethal Factor, Recombinant, *Bacillus anthracis*, Calbiochem, Merck, Germany, Catalog no: 176900) enjekte edildi. Bu işlemi takiben 24. saatte, yavru sıçanlar 10 günlük olduklarında intra-musküler uygulanan ketamin (Ketalar®, Pfizer; İstanbul) ve ksilazin (Rompun®, Bayer; İstanbul) anestezisi altında öldürülerek organ örneklerinin alınmasına geçildi. Yavrulardan elde edilen karaciğer, kalp ve akciğerler ışık ve elektron mikroskopik yöntemlerin yanı sıra stereolojik yöntemle de değerlendirildi.

Grup IV. Erişkin kontrol ve deney grubu dişi sıçanlar:

10 adet 10 haftalık erişkin dişi sıçan kullanıldı. Bu sıçanlardan 5 tanesine (kontrol erişkinler, Grup IVa) sadece 1 ml bidistile su, diğer 5'ine (deney grubu erişkinler, Grup IVb) 1 ml bidistile su içerisinde çözünmüş *B. anthracis* letal faktörü (100 µg/kg) (Anthrax Lethal Factor, Recombinant, *Bacillus anthracis*, Calbiochem, Merck, Germany, Catalog no: 176900) intra-abdominal yoldan enjekte edildi. Bu işlemi takiben 24. saatte, intra-musküler uygulanan ketamin (Ketalar®, Pfizer; İstanbul) ve ksilazin (Rompun®, Bayer; İstanbul) anestezisi altında denekler feda edildi. Erişkin dişilerden elde edilen karaciğer, kalp ve akciğerler ışık ve elektron mikroskopik yöntemlerin yanı sıra stereolojik yöntemle de değerlendirildi.

Ayrıca vücudu ağırlıklı olarak su içeren fetüslerin toplam hacimleri Cavalieri prensibinin yanı sıra suya daldırma metodu ile de ölçüldü.

Sırasıyla erişkin, yavru ve fetüs gruplarında uygulanan diseksiyon işlemleri ve fetüs hacimlerinin suya daldırma metodu ile ölçülmesi Şekil 1’de gösterilmiştir:



Şekil 1: A, B, C ve D’ de sırasıyla erişkin (A, B) ve yavru (C, D) sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen diseksiyon işlemleri gösterilmiştir. E, F ve G de sırasıyla disekte edilmiş bir sıçan karaciğeri (E), 16 günlük bir sıçan fetüsü (F) ve bu fetüsün taze hacminin suya daldırma metodu ile ölçülmesi görülmektedir (G). **Bar:** 2 cm.

3.3. Histolojik İşlemler

3.3.1 Doku Hazırlama Prosedürleri

3.3.1. a. Işık Mikroskopik Takip İşlemi:

Bu çalışmada mikroskopik takip işlemleri için kullanılan kimyasallar Merck® marka idi (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Işık mikroskopik düzeyde histolojik ve stereolojik takip işlemleri için genel anestezi uygulanan embriyo, fetüs, yavru ve erişkin sıçanlardan alınan doku örnekleri kod numaraları verilerek içinde %10'luk formaldehit bulunan küçük kavanozlara alındı. Ardından doku takip işlemlerine geçildi.

Bu amaçla dokular sırasıyla;

4 saat boyunca akarsuda yıkanma işlemini takiben dehidratasyon için;

% 70'lik etil alkol	4 saat
% 80'lik etil alkol	1 gece
% 90'lik etil alkol	60 dakika
Absolü alkolde	120 dakika bekletildi.

Dokuları şeffaflaştırmak için; % 96'lık alkol ve ksilen ile 1/1 oranında hazırlanan solüsyonda dokular 15 dakika, saf ksilende 30 dakika bekletilerek, parafin serilerinden geçirildi. Parafin immersiyonu işlemi için dokular, 1/3 oranında ksilen ve erimiş boncuk parafin karışımında 60°C'lik etüvde 1 saat bırakıldıktan sonra, saf sıvı parafinde 60°C'lik etüvde 120 dakika bekletildi. Son işlem olarak, saf sıvı parafin içerisinde bir gece boyunca oda sıcaklığında bekletilen dokular parafin bloklara gömüldü (Şekil 2). Bu aşamada, embriyo ve fetüsler bloklara gömülürken sol yanları üzerine yatırıldı.

Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2125RT, Japan) ile kesilen 5-6 µm kalınlığındaki kesitler cam lamalar üzerine alındıktan sonra Hematoksilen-eozin (H-E) ile boyandı ve histolojik yapıyı değerlendirmek amacıyla kamera (Nikon DS-Fi1, Japan) ataçmanlı ışık mikroskopunda (Nikon Eclipse E600, Japan) incelenerek fotoğrafları çekildi.

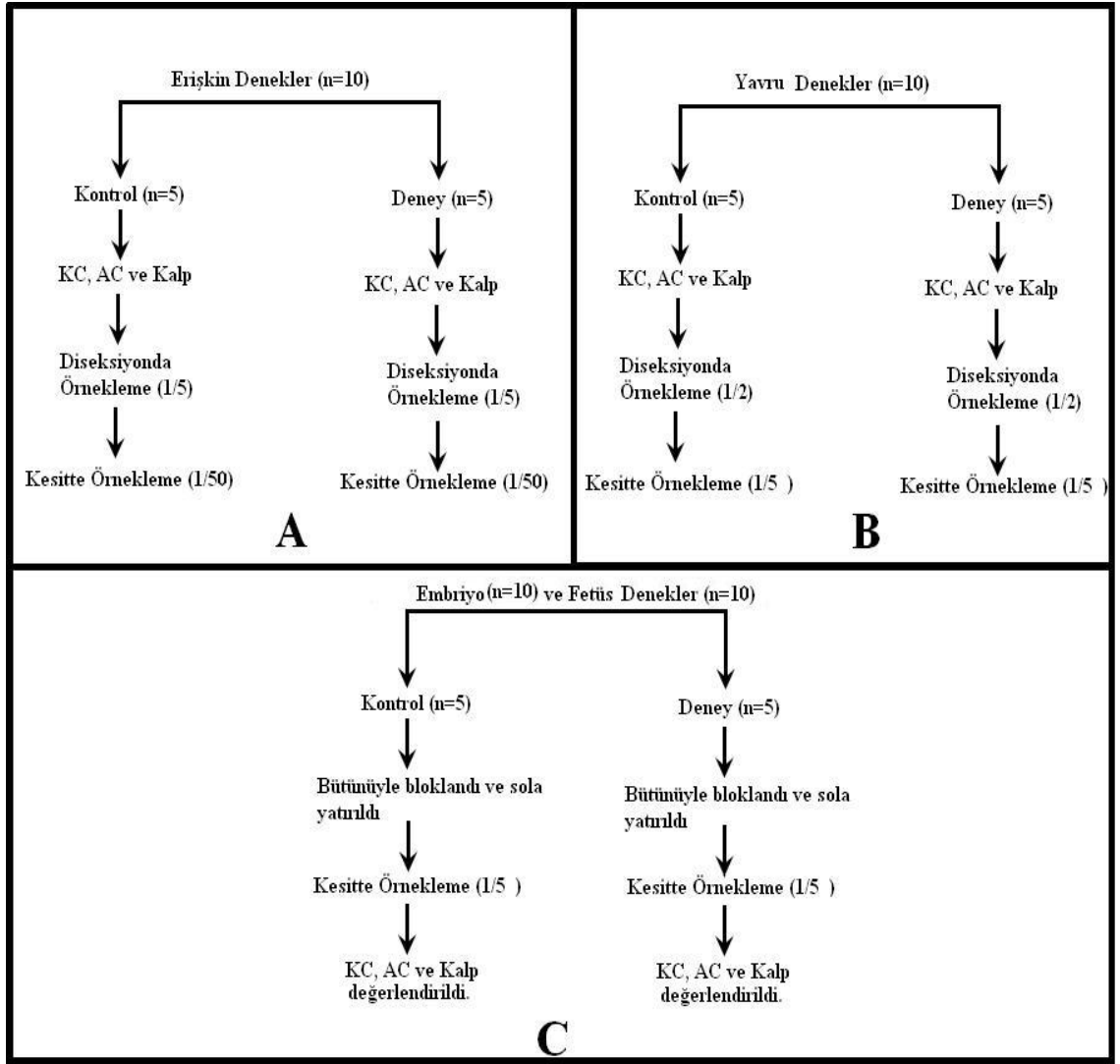
3.4. Alınan Kesitlerin Stereolojik Metotla Değerlendirilmesi:

Stereolojik ölçümlerimiz Cavalieri hacim ölçüm metoduna dayanmaktadır. Bu metodun ilk önemli kuralına göre, ilgilenilen objenin hacmini hatasız olarak hesaplamak için eşit uzaklıkta, paralel ve seri kesitler kullanıldı¹¹³. Söz konusu seri kesitlerin eldesi için öncelikle çalışılan organlar sistematik rasgele olarak örneklendi (Şekil 2A). Örnekleme sonucunda elde edilen doku parçaları yukarıda anlatılan şekliyle rutin takip işleminden geçirildi ve taze parafin içerisinde bloklandı.

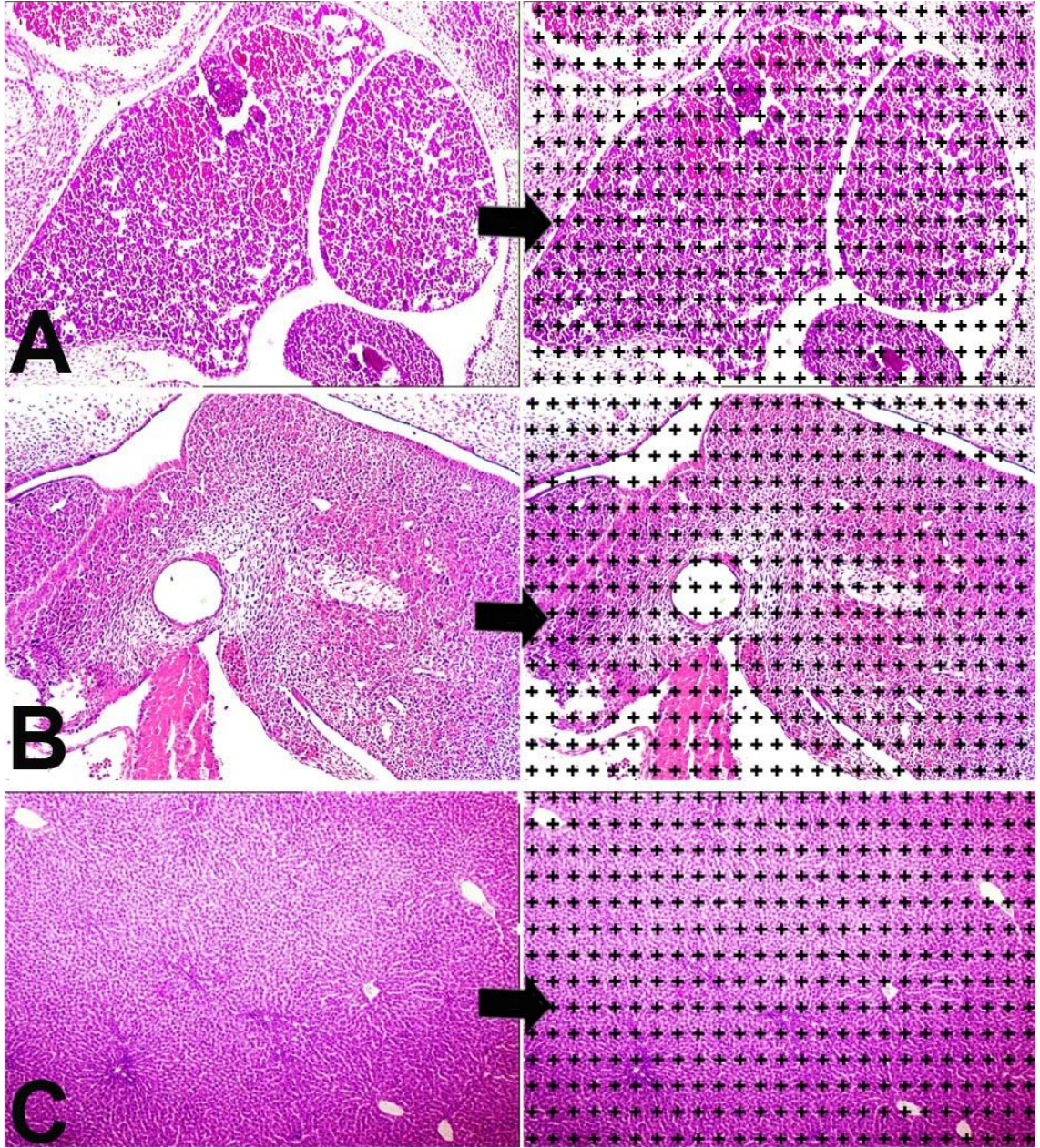
Bu bloklardan her bir organı temsil eden herhangi birisi seçilerek yapılan bir ön çalışmayla, ilgili organlardan alınacak kesit kalınlığı marjı belirlendi. Bu işlem yine stereolojinin temel prensiplerinden “hata katsayısı” göz önünde bulundurularak gerçekleştirildi¹²¹¹¹⁴. Bu aralık belirlendikten sonra yine kurallar dahilinde olan sistematik rasgelelik dikkate alınarak ilgili organdan geçen tüm görüntüler elde edilerek değerlendirildi¹¹⁷. Alınan seri kesitlerden Olympus BX51 marka kamera ataçmanlı mikroskop vasıtasıyla x4 lük objektif ile elde edilen resimler (Şekil 2) adobe photoshop® programı ile ilgili alan üzerine yine şekil 2 de ve 2. sütunda görülen noktalı ölçüm cetveli düşürülerek değerlendirildi (Şekil 2). Kesit profilinin hesaplandığı alana göre hazırlanmış noktalı ölçüm cetvelinin boyutu k=2,5 mm şeklindeydi.

Noktalı ölçüm cetvelinin nokta yoğunluğu uygun **HK** (Hata katsayısı= coefficient of error)’a göre belirlenmiş seri ışık mikroskopik görüntü sayısı göz önüne alınarak belirlendi¹¹⁵⁻¹¹⁷. HK, Gundersen and Jensen’in 1987’de geliştirdikleri formüle göre hesaplandı¹¹⁸. Kabul edilebilir HK (hata katsayısı) elde edebilmek için yaklaşık 13-15 kesitin yeterli olduğu tesbit edilerek çalışma buna göre yapıldı.

Kesitler üzerinde hesaplar yapılırken seri kesit görüntülerindeki ilgili alanlar üzerine noktalı ölçüm cetveli rastgele olarak yerleştirildi ve ilgilenilen obje üzerine düşen tüm noktalar sabit kurala göre sayıldı (Şekil 2B).



Şekil 2A:



Şekil 2B: Noktalı alan ölçüm cetvelinin seri olarak alınmış histolojik kesitler üzerine uyarlanması. A ve B de sırası ile fetüs karaciğeri ve akciğerinden, C' de ise erişkin karaciğerinden elde edilen ışık mikroskopik görüntüler izlenmektedir.

Her Test noktasının temsil ettiği alan ($a \text{ cm}^2$) ve her iki Test noktası arasındaki mesafe $k \text{ cm}$ 'dir ($a \text{ cm}^2 = k \times k \text{ cm}^2$). Bu işlemi takiben mikroskop ve monitörün büyütme değerleri hesaplanan alan ile çarpıldı (cm^2).

$$\text{Volume} = t \text{ (cm)} \times a/p \text{ (cm} \times \text{cm)} \times (\Sigma P) \text{ cm}^3$$

Volume: karaciğer hacmi

t: kesit kalınlığı

a/p: iki nokta arasındaki alan

ΣP : kesit üzerine düşen toplam nokta sayısı

V kesit planındaki ilgilenilen objenin (karaciğer) hacmidir, t kesit kalınlığı, a/p noktalar arası alan ve ΣP ise kesitteki karaciğer üzerine düşen toplam nokta sayısını göstermektedir. Her kesitte ayrı ayrı yukarıdaki formül kullanılarak hacim değerleri hesaplandıktan sonra aşağıdaki formülle toplam karaciğer hacmine ulaşıldı.

$$\text{Total Volume} = V_1 + V_2 + \dots + V_n$$

Total Volume: toplam hacim

V_1 : 1. kesitin hacmi

V_2 : 2. kesitin hacmi

V_n : n. kesitin hacmi

Hata katsayısı olarak adlandırılan Cavalieri metodunun kullanım şekline kaynaklanan hatayı mikroskobik görüntüler üzerinde hesaplamak için Gundersen HJ ve Jensen EB (1987) tarafından geliştirilen aşağıdaki formül kullanıldı¹¹⁸.

$$\text{Noise} = 0.0724 \times (b / \sqrt{a}) \times \sqrt{n \times \Sigma P}$$

Noise: kesit yüz alanının kompleksliği

$b / \sqrt{a}$: ortalama profil sınır uzunluğu/ aynı profilin ortalama alanının kökü

n: incelenen kesit sayısı

ΣP : kesit üzerine düşen toplam nokta sayısı

Noise, örneğin kesit yüz alanının kompleksliği hakkında bilgi veren bir değerdir, $b / \sqrt{a}$ ortalama profil sınır (boundary) uzunluğunun aynı profillerin ortalama alanının kareköküne bölümüne eşittir, n incelenen kesit sayısıdır ve ΣP bütün kesite değen toplam nokta sayıdır.

$$\text{Var}_{SRS} \left(\sum_{i=1}^n a \right) = (3 \cdot (A - \text{Noise}) - 4 \cdot B + C) / 12$$

$$\text{Var}_{SRS} \left(\sum_{i=1}^n a \right) : \text{toplam alanın varyansı}$$

A: $P_i \times P_i$; **B:** $P_i \times P_{i+1}$; **C:** $P_i \times P_{i+2}$

Rasgele sistematik örneklemede (SRS) $Var_{SRS}(\sum_{i=1}^n a)$ toplam alanın varyansını göstermektedir. Bu bilgi kesit örneklerinde uygun çeşitliliği sağlamak için gerekli olan yeterli kesit sayısı hakkında fikir verir. A, B, ve C tablo 1'in sütunlarında belirtilmiş verinin rakamsal değerlerini göstermektedir.

$$TotalVar = Noise + Var_{SRS}$$

TotalVar: Toplam varyans

Noise: kesit yüz alanının kompleksliği

Var_{SRS}: toplam alanın varyansı

$$CE(\sum P) = \frac{\sqrt{TotalVar}}{\sum P}$$

CE: hata katsayısı

TotalVar: Toplam varyans

$\sum P$: kesit üzerine düşen toplam nokta sayısı

HK son hesaplanan değerdir. Genellikle HK'nin en yüksek sınırı %5 olarak kabul edilir¹¹⁸.

Tablo 1: Hata katsayısının hesaplandığı tablo

Kesit No	P_i	A	B	C
		$P_i \times P_i$	$P_i \times P_{i+1}$	$P_i \times P_{i+2}$
1	30	900	840	960
2	28	784	896	1008
3	32	1024	1152	1056
4	36	1296	1188	1260
5	33	1089	1155	1254
6	35	1225	1330	945
7	38	1444	1026	988
8	27	729	702	621
9	26	676	598	-----
10	23	529	-----	-----
	308	9726	8887	8092

$$Noise = 0.0724 \times (b / \sqrt{a}) \times \sqrt{n \times \sum P} = 0,0724 \times 5 \times 55,50 = 20,91$$

$$Var_{SRS}(\sum_{i=1}^n a) = (3 \cdot (A - Noise) - 4 \cdot B + C) / 12 = 3 \times (9726 - 20,91) - 4 \times 8887 + 8092 / 12 = 138,27$$

$$TotalVar = Noise + Var_{SRS} = 159,18$$

$$CE(\sum P) = \frac{\sqrt{TotalVar}}{\sum P} = 0,0401$$

$$Volume = t \text{ (cm)} \times a/p \text{ (cm} \times \text{cm)} \times ((\sum P) \text{ cm}^3 = 9,609 \text{ cm}^3$$

3.5. İstatistik:

Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 13.0 programı ile yapıldı. Grupların karşılaştırmalarında Independent Samples *t*-Test (bağımsız örnekler *t*-Testi) kullanıldı. Kıyaslamalarda her grup için 5 denekten elde edilen bulgular kullanıldı.

3.6. Elektron Mikroskopik Takip İşlemi:

Çalışmamızın bu bölümünde 12 günlük embriyolardan oluşan 1. grup hariç diğer grupların tümünden elde edilen karaciğer, akciğer ve kalp örnekleri elektron mikroskopik olarak değerlendirildi.

Bu değerlendirme için deneklerden alınan 1 mm çapındaki doku örnekleri %2.5'lik gluteraldehit ile ön fiksasyon ve %1'lik fosfat tamponlu osmium tetroksit ile post fiksasyon işlemine tabi tutuldu. Fikse edilen dokular daha sonra dereceli aseton ve propilen oksit serilerinden geçirilerek araldit CY 212 içerisinde bloklandı. Daha sonra LKB Nova Bromma ultratom ile elde edilen 70-80 nm kalınlığındaki ince kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat kullanılarak kontrastlandı ve Jeol 100 SX marka geçirimli elektron mikroskobu altında ultrastrüktürel açıdan incelendi.

BULGULAR

4.1. Stereolojik Bulgular:

Bu çalışmada bi-distile su veya tek doz LF uygulamasından 24 saat sonra sırasıyla kontrol ve deney gruplarından; erişkin, yavru ve prenatal dönemlerde elde edilen sıçan dokuları stereolojik açıdan değerlendirildi. Bu çalışmanın kapsamı şöyleydi:

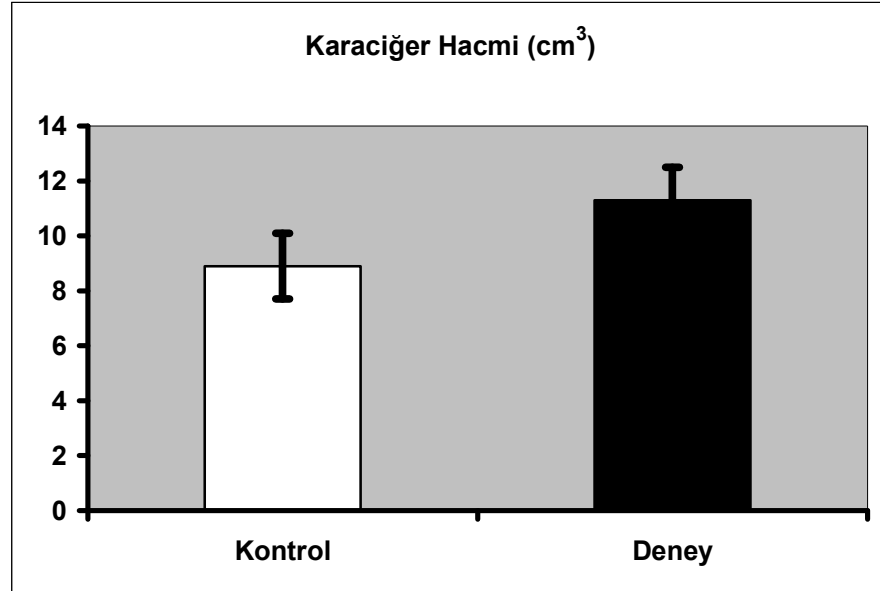
1. Erişkin ve yavru sıçanlardan elde edilen kalp, akciğer ve karaciğerlerin ışık mikroskopik seri kesitlerinden yola çıkılarak; bu organların hacimleri Cavalieri yöntemi ile stereolojik olarak değerlendirildi.
2. Erişkinler için kullanılan yöntemle 12 ve 16 günlük gebe sıçanlardan elde edilen embriyo ve fetüslerin genel hacimleri ve ayrıca bu deneklerin kalp, akciğer ve karaciğer hacimleri de stereolojik olarak değerlendirildi.

Bu değerlendirmeler sonucunda ulaşılan bulgular aşağıda sunulmuştur:

4.1.A. Erişkin Sıçan Dokularına Ait Bulgular:

a. Erişkin Sıçan Karaciğerine Ait Bulgular:

Kontrol ve deney gruplarına ait erişkin sıçan karaciğerlerinde yapılan hacim değerlendirmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 3):

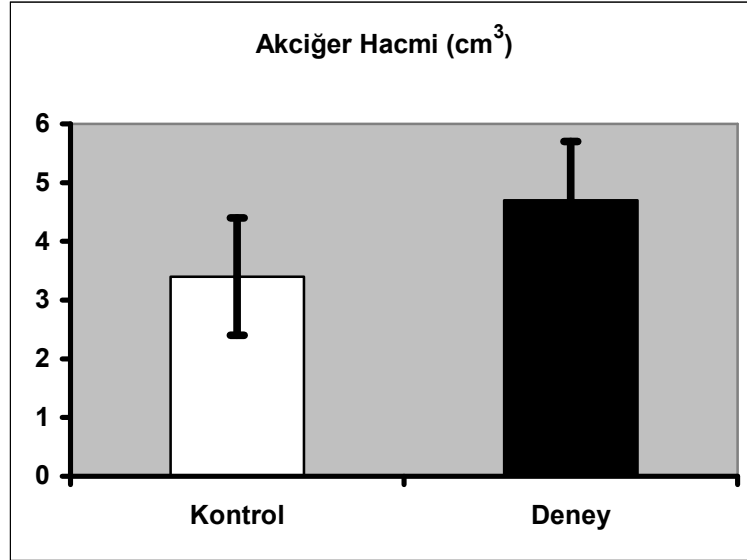


Şekil 3: Kontrol ve deney grubundaki erişkin sıçanlara ait ortalama karaciğer hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki erişkin sıçan karaciğerlerinden elde edilen ışık mikroskopik seri kesitler stereolojik olarak değerlendirildiğinde LF uygulanan sıçanların karaciğer hacimlerinin kontrol grubundaki sıçanlarınkine kıyasla anlamlı ölçüde arttığı görüldü ($p < 0.05$ Independent Samples t -Test).

b. Erişkin Sıçan Akciğerine Ait Bulgular:

Kontrol ve deney gruplarına ait erişkin sıçan akciğerlerinde yapılan hacim değerlendirmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 4):

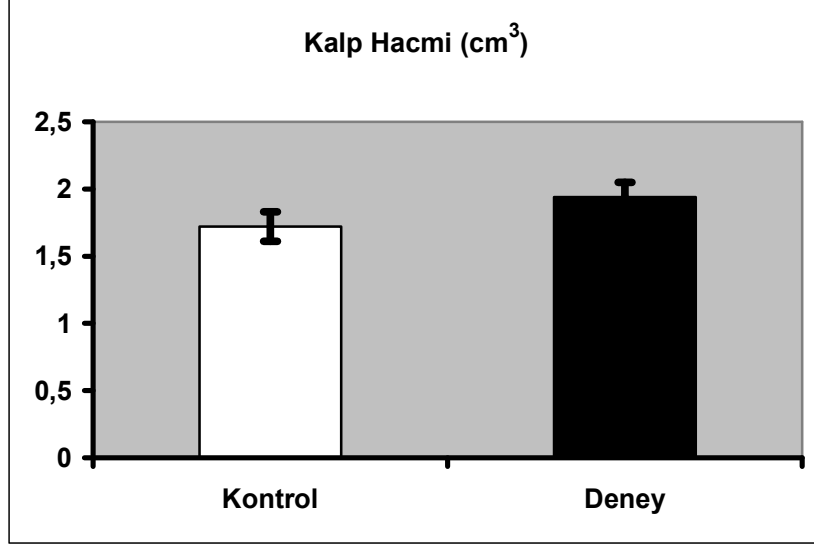


Şekil 4: Kontrol ve deney grubundaki erişkin sıçanlara ait ortalama akciğer hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; $n=5$).

Kontrol ve deney grubundaki erişkin sıçan akciğerlerinin hacim değerleri sırasıyla 3.4 cm^3 ve 4.7 cm^3 olarak tespit edildi. Bu sonuçlar arasında istatistiksel bir değerlendirme yapıldığında deney grubundaki akciğer hacimlerinin kontrol grubundakine göre anlamlı ölçüde arttığı sonucuna varıldı ($p < 0.01$, Independent Samples t -Test).

c. Erişkin Sıçan Kalbine Ait Bulgular:

Kontrol ve deney gruplarına ait erişkin sıçan kalplerinde yapılan hacim değerlendirilmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 5):



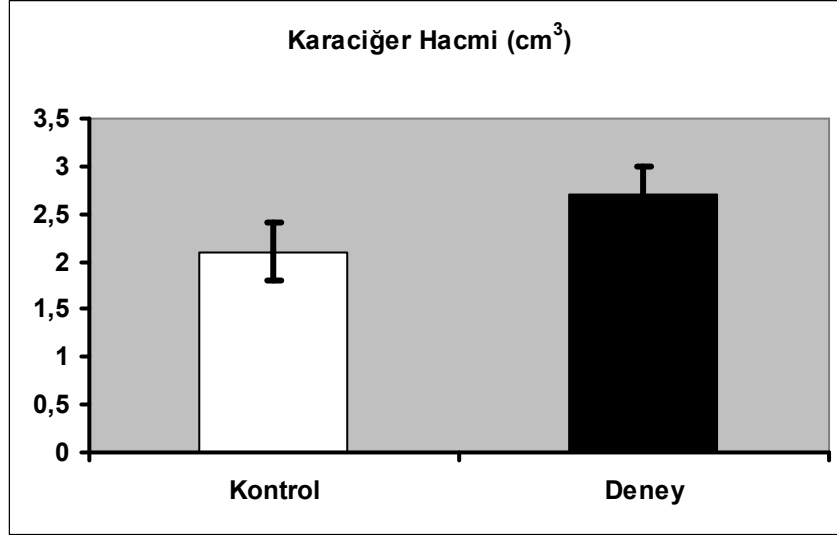
Şekil 5: Kontrol ve deney grubundaki erişkin sıçanlara ait ortalama kalp hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki erişkin sıçan kalplerinin hacim değerleri sırasıyla 1.72 cm^3 ve 1.93 cm^3 olarak hesaplandı. Bu sonuçlar arasında istatistiksel bir değerlendirme yapıldığında deney grubundaki kalp hacimlerinin kontrol grubundakine göre arttığı fakat bu artışın anlamlı olmadığı görüldü ($p > 0.05$, Independent Samples t -Test).

4.I.B. Yavru Sıçan Dokularına Ait Bulgular:

a. Yavru Sıçan Karaciğerine Ait Bulgular:

Kontrol ve deney gruplarında yer alan yavru sıçan karaciğerleri üzerinde uygulanan hacim değerlendirmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 6):

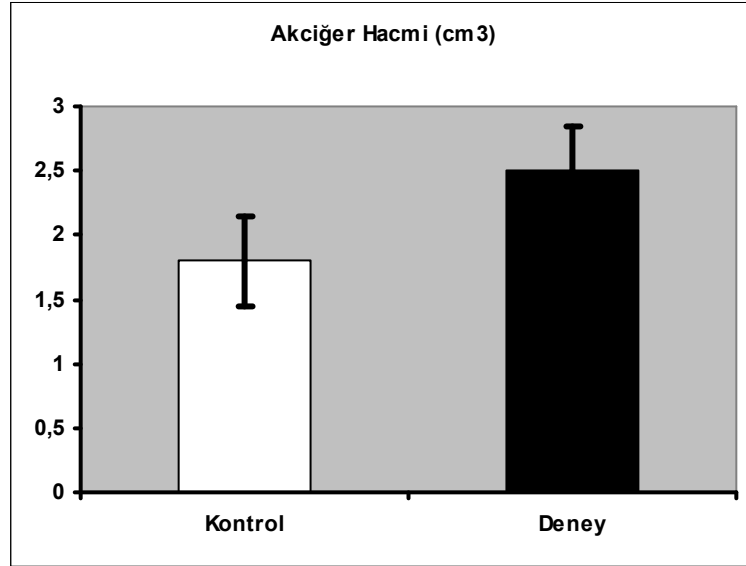


Şekil 6: Kontrol ve deney grubundaki yavru sıçanlara ait ortalama karaciğer hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki yavru sıçan karaciğerlerinden elde edilen ışık mikroskopik seri kesitlerden yola çıkılarak stereolojik olarak yapılan hacim değerlendirmesinde LF uygulanan sıçan yavrularının karaciğer hacimlerinin kontrol grubundaki yavru sıçanlarınkine kıyasla anlamlı ölçüde arttığı görüldü ($p < 0.05$ Independent Samples *t*-Test).

b. Yavru Sıçan Akciğerine Ait Bulgular:

Kontrol ve deney gruplarına ait yavru sıçan akciğerlerinde yapılan hacim değerlendirmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 7):

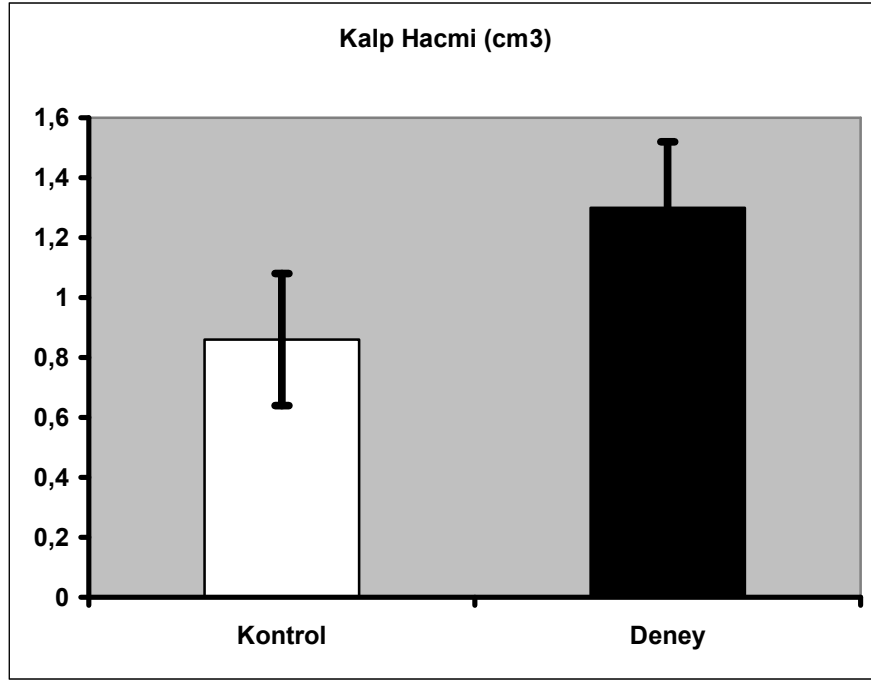


Şekil 7: Kontrol ve deney grubundaki yavru sıçanlara ait ortalama akciğer hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki yavru sıçan akciğerlerinin hacim değerleri sırasıyla 1.8 cm^3 ve 2.5 cm^3 olarak tespit edildi. Bu sonuçlar arasında istatistiksel bir değerlendirme yapıldığında deney grubundaki akciğer hacimlerinin kontrol grubundakine göre çok anlamlı ölçüde arttığı sonucuna varıldı ($p < 0.001$, Independent Samples *t*-Test).

c. Yavru Sıçan Kalbine Ait Bulgular:

Kontrol ve deney gruplarında yer alan yavru sıçan kalpleri üzerinde uygulanan hacim değerlendirmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 8):



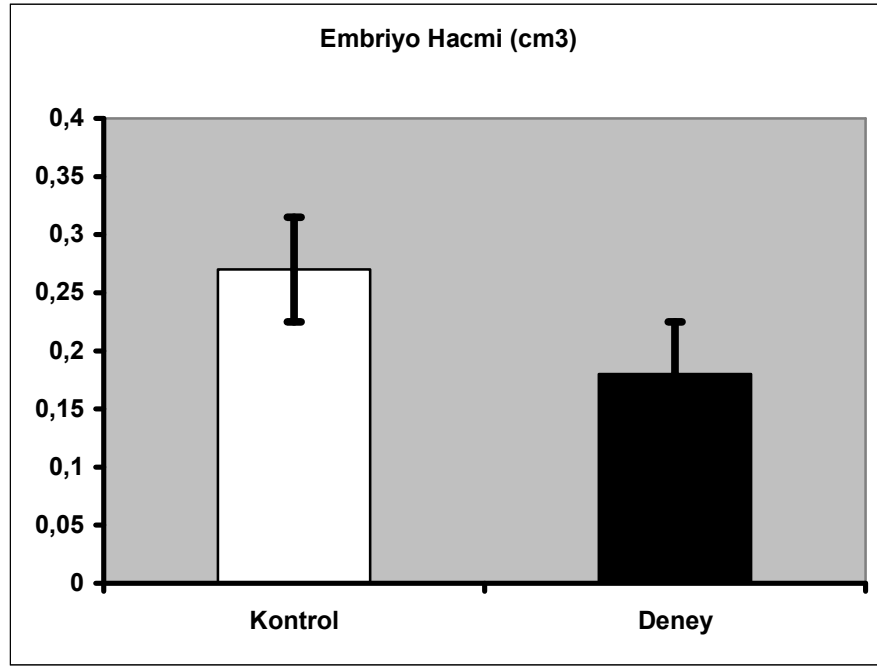
Şekil 8: Kontrol ve deney grubundaki yavru sıçanlara ait ortalama kalp hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki yavru sıçan kalplerinin hacimleri stereolojik olarak değerlendirildiğinde LF uygulanan sıçanların karaciğer hacimlerinin kontrol grubundaki sıçanlarınkine kıyasla anlamlı ölçüde arttığı görüldü ($p < 0.05$ Independent Samples *t*-Test).

4.I.C. Oniki Günlük Embriyo Dokularına Ait Bulgular:

a. Total Embriyo Hacmi Bulguları:

Kontrol ve deney gruplarında yer alan 12 günlük sıçan embriyolarının toplam hacimlerinin stereolojik olarak değerlendirmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 9):

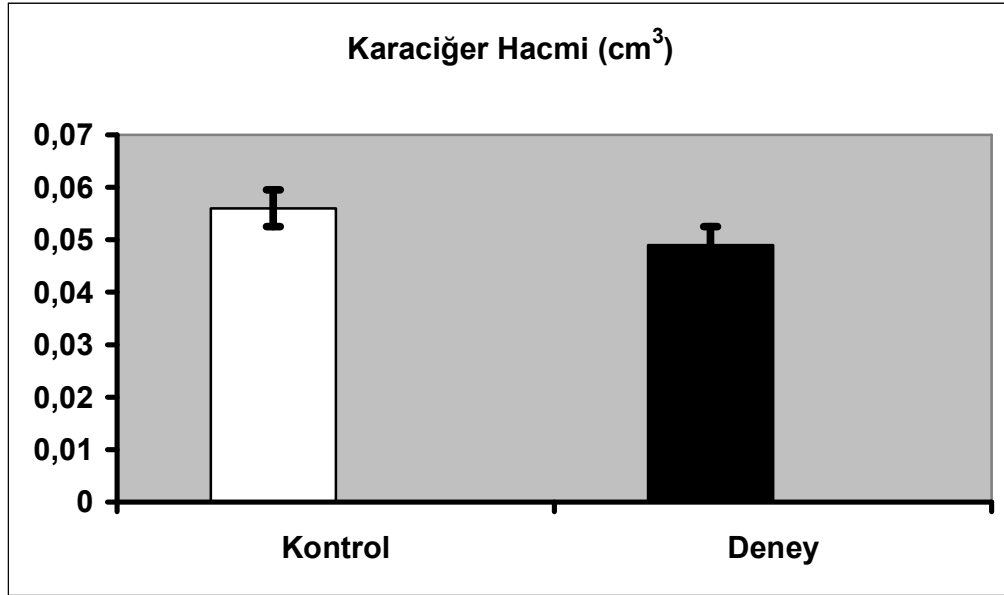


Şekil 9: Kontrol ve deney grubundaki 12 günlük embriyoların ortalama total hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki 12 günlük embriyoların ortalama hacim değerleri sırasıyla 0.27 cm³ ve 0.18 cm³ olarak tespit edildi. Bu sonuçlar arasında istatistiksel bir değerlendirme yapıldığında deney grubundaki 12 günlük embriyoların hacimlerinin kontrol grubundakinden anlamlı ölçüde daha düşük olduğu sonucuna varıldı ($p < 0.05$, Independent Samples *t*-Test).

b. Oniki Günlük Embriyoların Karaciğerlerine Ait Hacim Bulguları:

Kontrol ve deney gruplarında yer alan 12 günlük embriyoların ortalama karaciğer hacimlerinin stereolojik olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 10):

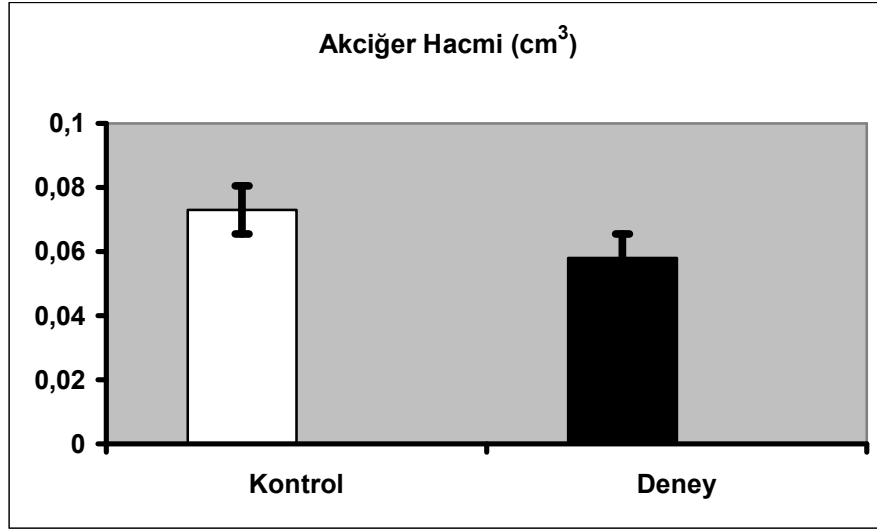


Şekil 10: Kontrol ve deney grubundaki 12 günlük embriyoların ortalama karaciğer hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki 12 günlük embriyoların karaciğer hacimleri stereolojik olarak değerlendirildiğinde LF uygulanan 12 günlük embriyoların karaciğer hacimlerinin kontrol grubundaki sıçanlarınkine kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ($p < 0.05$ Independent Samples t -Test).

c. Oniki Günlük Embriyoların Akciğerlerine Ait Hacim Bulguları:

Kontrol ve deney gruplarında yer alan 12 günlük embriyoların ortalama akciğer hacimlerinin stereolojik olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 11):

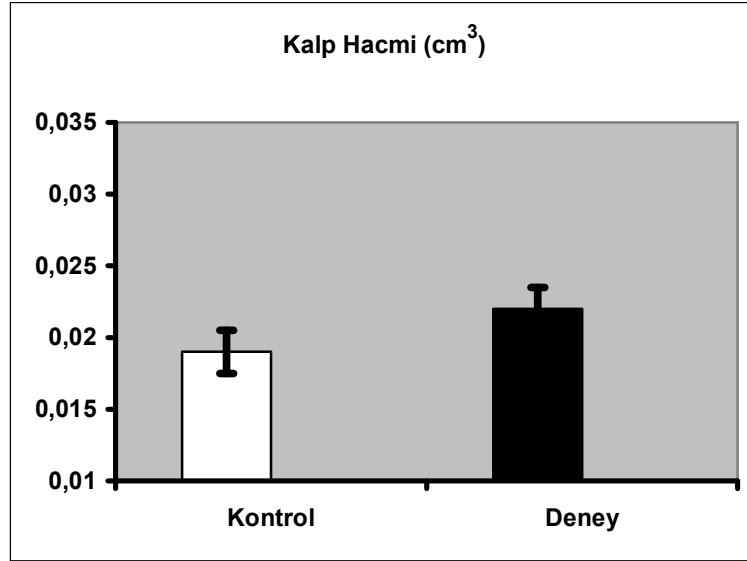


Şekil 11: Kontrol ve deney grubundaki 12 günlük embriyoların ortalama akciğer hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki 12 günlük embriyoların akciğer hacimleri stereolojik olarak değerlendirildiğinde LF uygulanan 12 günlük embriyoların akciğer hacimlerinin kontrol grubundakilere kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ($p < 0.05$ Independent Samples *t*-Test).

d. Oniki Günlük Embriyoların Kalplerine Ait Hacim Bulguları:

Kontrol ve deney gruplarında yer alan 12 günlük embriyoların ortalama kalp hacimlerinin stereolojik olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 12):



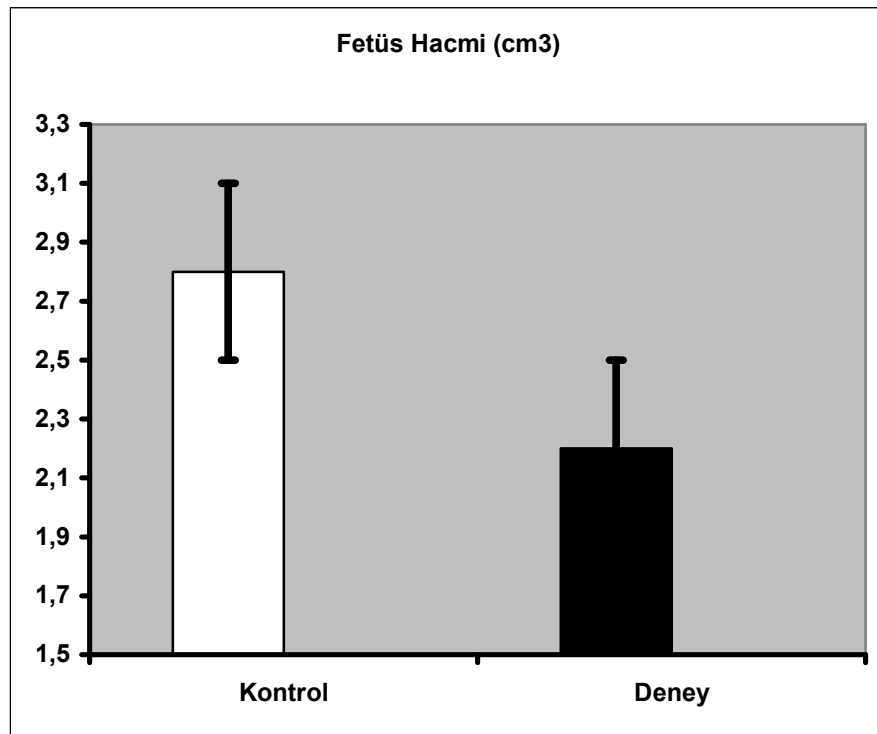
Şekil 12: Kontrol ve deney grubundaki 12 günlük embriyoların ortalama kalp hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki 12 günlük embriyoların kalp hacimleri stereolojik olarak değerlendirildiğinde LF uygulanan 12 günlük embriyoların kalp hacimlerinin kontrol grubundakine göre arttığı fakat bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p > 0.05$ Independent Samples *t*-Test).

4.I.D. Onaltı Günlük Sıçan Fetüslerine Ait Bulgular:

a. Total Fetüs Hacmi Bulguları:

Kontrol ve deney gruplarında yer alan sıçan fetüslerinin ortalama hacimlerinin stereolojik olarak değerlendirmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 13):

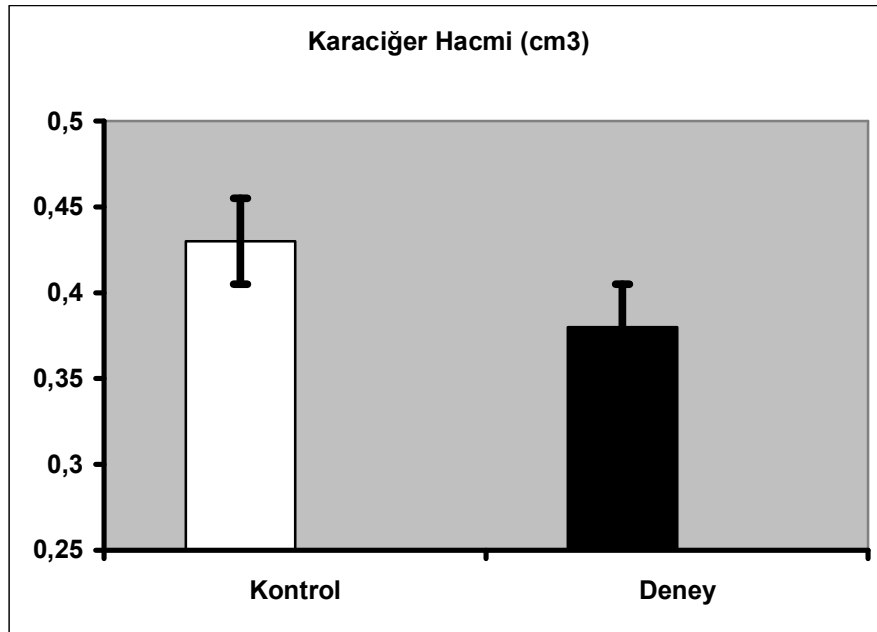


Şekil 13: Kontrol ve deney grubundaki fetüslerin ortalama total hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki fetüslerin ortalama hacim değerleri sırasıyla 2.8 cm³ ve 2.2 cm³ olarak tespit edildi. Bu sonuçlar arasında istatistiksel bir değerlendirme yapıldığında deney grubundaki fetüs hacimlerinin kontrol grubundakinden anlamlı ölçüde daha düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$, Independent Samples *t*-Test).

b.Fetüs Karaciğerlerine Ait Hacim Bulguları:

Kontrol ve deney gruplarında yer alan sıçan fetüslerinin ortalama karaciğer hacimlerinin stereolojik olarak değerlendirmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 14):

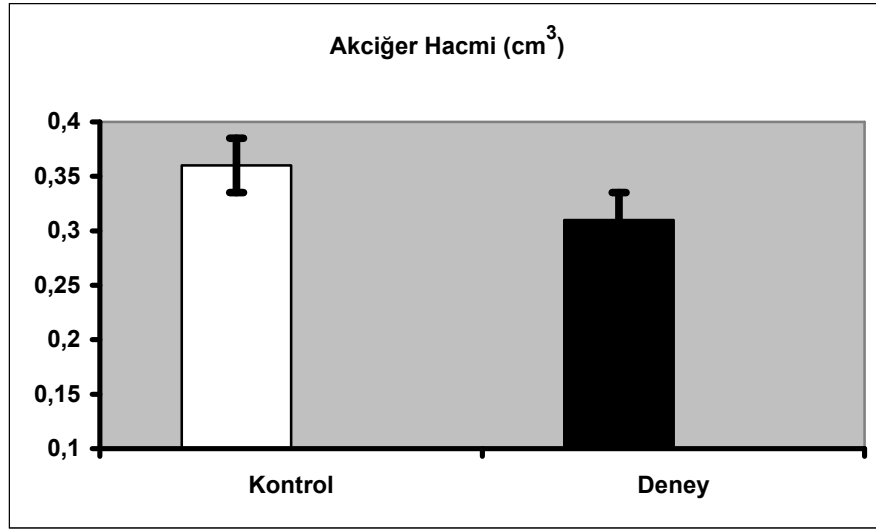


Şekil 14: Kontrol ve deney grubundaki fetüslerin ortalama karaciğer hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki sıçan fetüslerinin karaciğer hacimleri stereolojik olarak değerlendirildiğinde LF uygulanan sıçan fetüslerinin karaciğer hacimlerinin kontrol grubundaki sıçanlarınkine kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ($p < 0.05$ Independent Samples *t*-Test).

c. Fetüs Akciğerlerine Ait Hacim Bulguları:

Kontrol ve deney gruplarında yer alan sıçan fetüslerinin ortalama akciğer hacimlerinin stereolojik olarak değerlendirilmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 15):

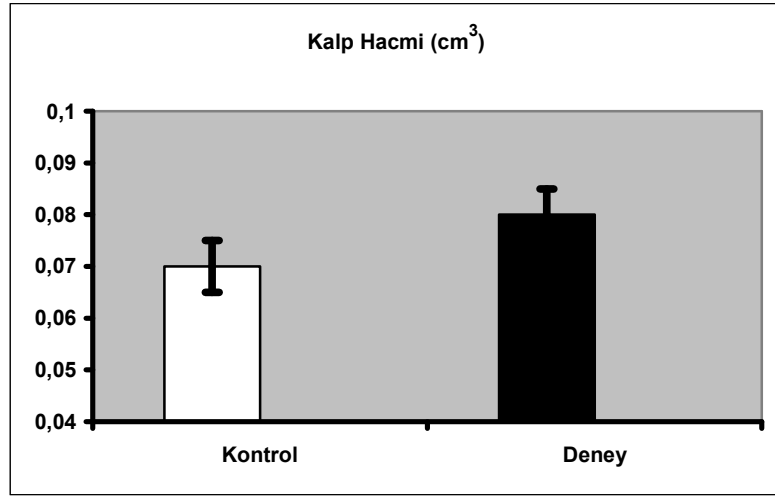


Şekil 15: Kontrol ve deney grubundaki fetüslerin ortalama akciğer hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki sıçan fetüslerinin akciğer hacimleri stereolojik olarak değerlendirildiğinde LF uygulanan sıçan fetüslerinin akciğer hacimlerinin kontrol grubundakilere kıyasla anlamlı ölçüde arttığı görüldü ($p < 0.05$ Independent Samples t -Test).

d. Fetüs Kalplerine Ait Hacim Bulguları:

Kontrol ve deney gruplarında yer alan sıçan fetüslerinin ortalama kalp hacimlerinin stereolojik olarak değerlendirmesi sonucu elde edilen bulgular aşağıdaki şekilde özetlenmiştir (Şekil 16):



Şekil 16: Kontrol ve deney grubundaki fetüslerin ortalama kalp hacimleri görülmektedir $\pm$ SEM; (Kontrol ve deney grubu için; n=5).

Kontrol ve deney grubundaki sıçan fetüslerinin kalp hacimleri stereolojik olarak değerlendirildiğinde LF uygulanan sıçan fetüslerinin kalp hacimlerindeki kontrol grubundakine göre anlamlı ölçüde olmadığı görüldü ($p > 0.05$ Independent Samples t -Test).

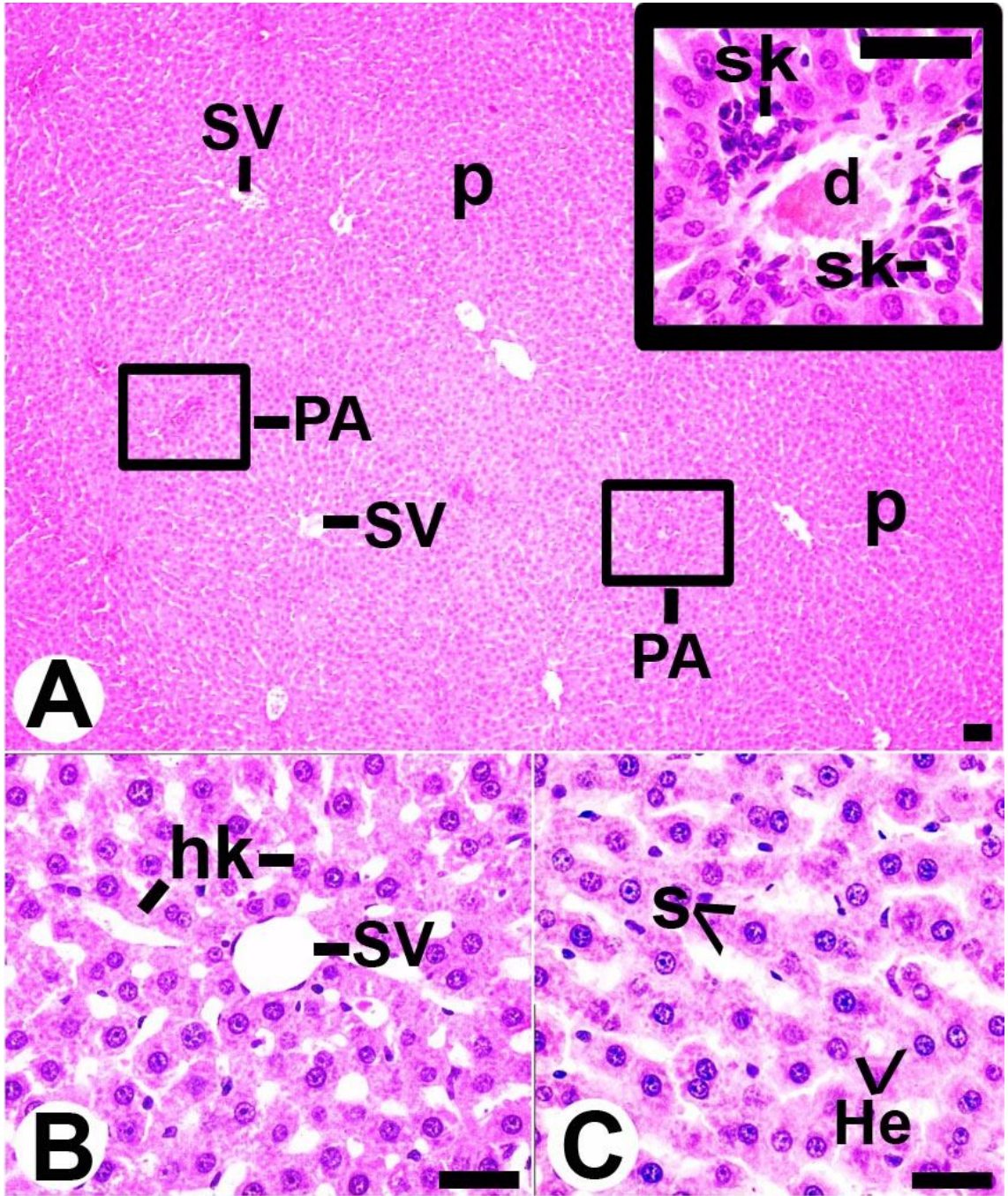
4.II. Işık Mikroskopik Bulgular:

Bu çalışmada tek doz LF uygulanan erişkin, yavru ve fetüs sıçanlardan elde edilen karaciğer, akciğer ve kalp örnekleri ışık ve elektron mikroskopik yöntemlerle takip edilerek histolojik açıdan değerlendirildi. Bu değerlendirmenin sonucunda elde edilen bulgular aşağıdaki gibiydi:

4.II.1. Erişkin Sıçan Grubuna Ait Işık Mikroskopik Bulgular:

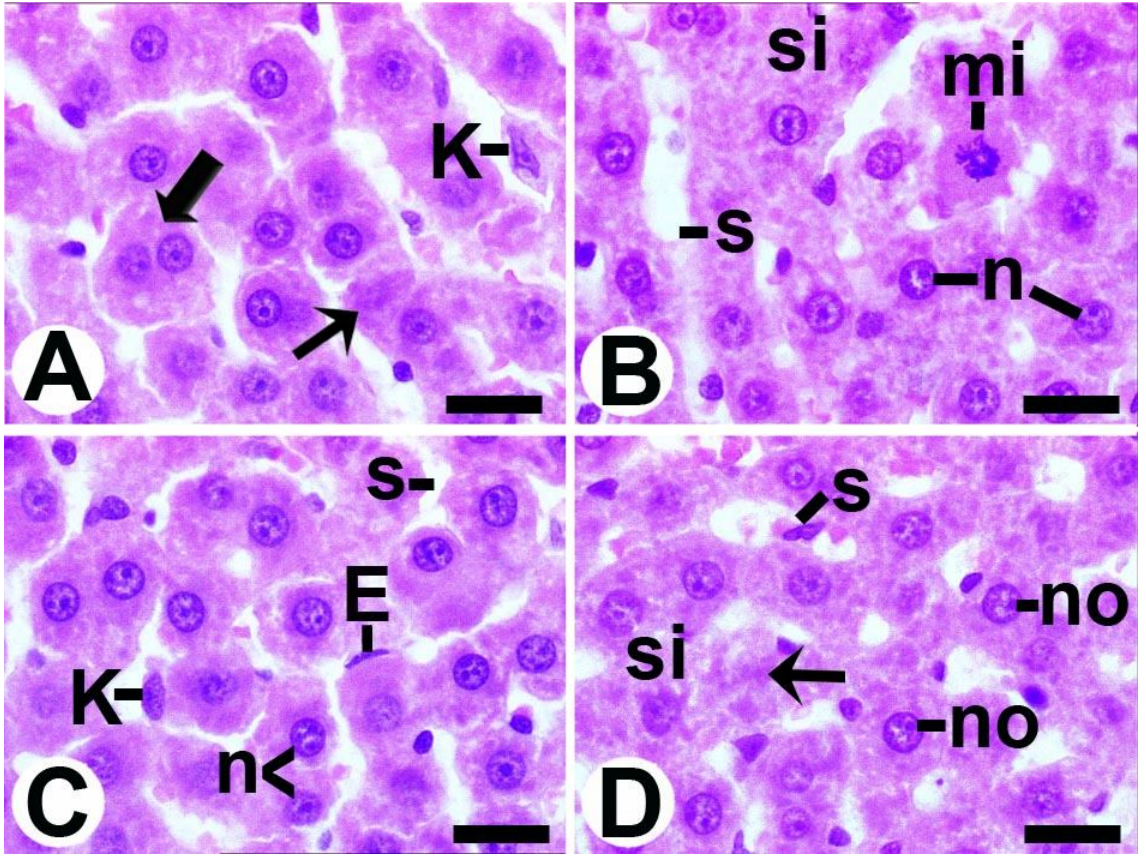
4.II.1.A. Erişkin Karaciğerlerine Ait Histolojik Bulgular:

Kontrol grubuna ait karaciğer kesitleri histolojik olarak incelendiğinde, parankimayı oluşturan hücreler (hepatositler) santral ven etrafından başlayıp lobülün periferine ve portal alanlara doğru ışınsal tarzda uzanan kordonlar oluşturmaktaydı (Remark kordonları). Bir ya da iki hücre genişliğindeki bu hücre kordonları arasında hepatik sinüzoidler olarak bilinen kan damarları bulunuyordu ve bu sinüzoidlerin kenarlarında mononükleer fagositik sistemin üyesi olan Kupffer hücrelerine rastlanmaktaydı (Şekil 17).



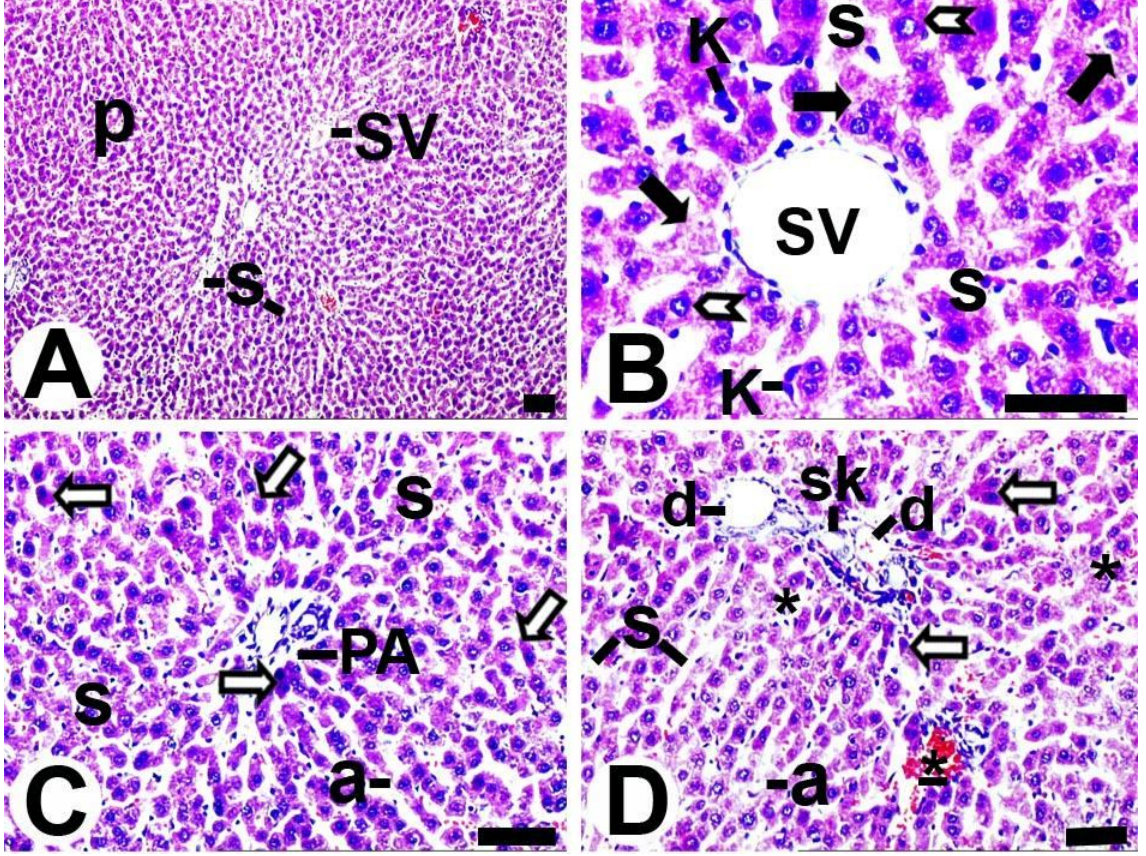
Şekil 17: Kontrol grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **SV**, santral ven; **PA**, portal alan; **p**, parankima; **hk**, hepatosit kordonu; **s**, sinuzoid; **He**, hepatosit; **sk**, safra kanalı; **d**, V.porta'nın dalı. Çerçevesi alanlar ve küçük resim portal alanları göstermektedir. **Boya:** HE. **Bar=** 80 µm.

Hepatositler, poligonal biçimli iri hücrelerdi; genellikle yuvarlak ya da oval şekilli bir nükleus içermektedir. Hücreler birbirleriyle ve sinüzoidlerle komşuluk ediyordu ve sınırları belirgindi. Sitoplazmaları genellikle asidofil boyanmasına karşın içlerinde bazofil boyanmış ergastoplazmik alanlar seçilmekteydi. Genellikle 1-2 nükleoluslu tek nükleus içeren bu hücrelerin yanında yer yer çift nükleuslu hepatositlere de rastlanmaktaydı. Lobüllerarası bağ dokusu, altıgen şekilli her bir klasik lobülün köşelerinde portal alanı oluşturmaktaydı. Bu alanda seyreden portal ven ve hepatik arterin dallarıyla birlikte safra kanalları da gözlenmekteydi (Şekil 18).



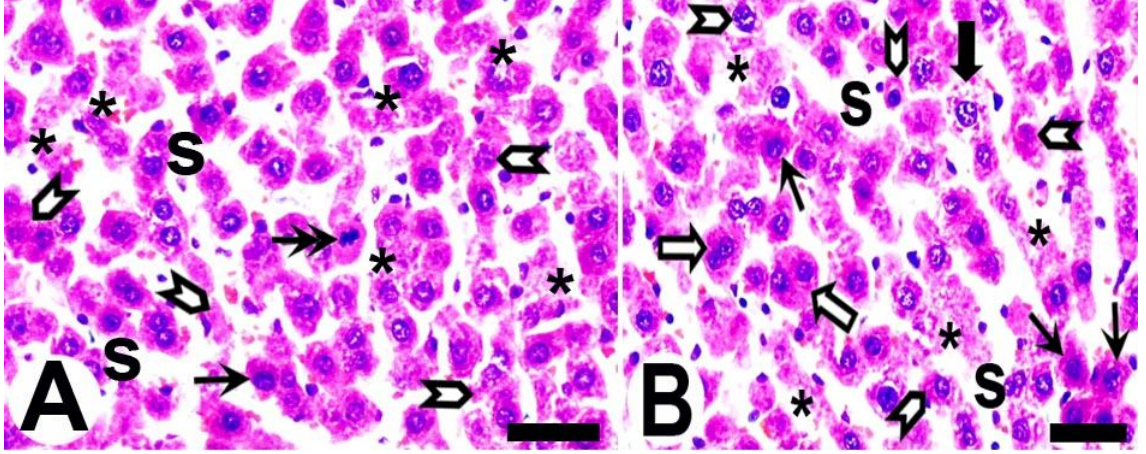
Şekil 18: Kontrol grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **n**, hepatosit nükleusu; **no**, nükleolus; **si**, sitoplazma; **E**, endotel hücresi; **s**, sinüzoid; **K**, Kupffer hücresi; **mi**, mitoz; **ince ok**, ergastoplazma; **kalin ok**, çift çekirdekli hepatositleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 40 µm.

Tek doz LF uygulanan erişkin deneklerden elde edilen karaciğer kesitleri histolojik olarak değerlendirildiğinde; karaciğerlerde gerek büyük damarların gerekse sinüzoidlerin kontrol grubundakilere nazaran dilate oldukları gözlemlendi (Şekil 19).



Şekil 19: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesitleri. **SV**, sentral ven; **PA**, portal alan; **p**, parankima; **s**, sinüzoid; **sk**, safra kanalı; **K**, Kupffer hücresi; **a**, hepatosit kordonlarında görülen ayrılma; **d**, V.porta'nın ya da A. hepatica'nın dalı; **kalin ok**, sitoplazması soluk boyanan şişmiş hepatositler; **beyaz dolgulu oklar**, koyu eozinofil sitoplazmalı ve piknotik nükleuslu hepatositler; **beyaz dolgulu ok başı**, çekirdeği boya almamış alanlar içeren hücreler; **yıldız**, hücresel yıkım alanları; **altı çizili yıldız**, eritrosit ve lenfoid hücre birikimi içeren alanları göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**=120 µm.

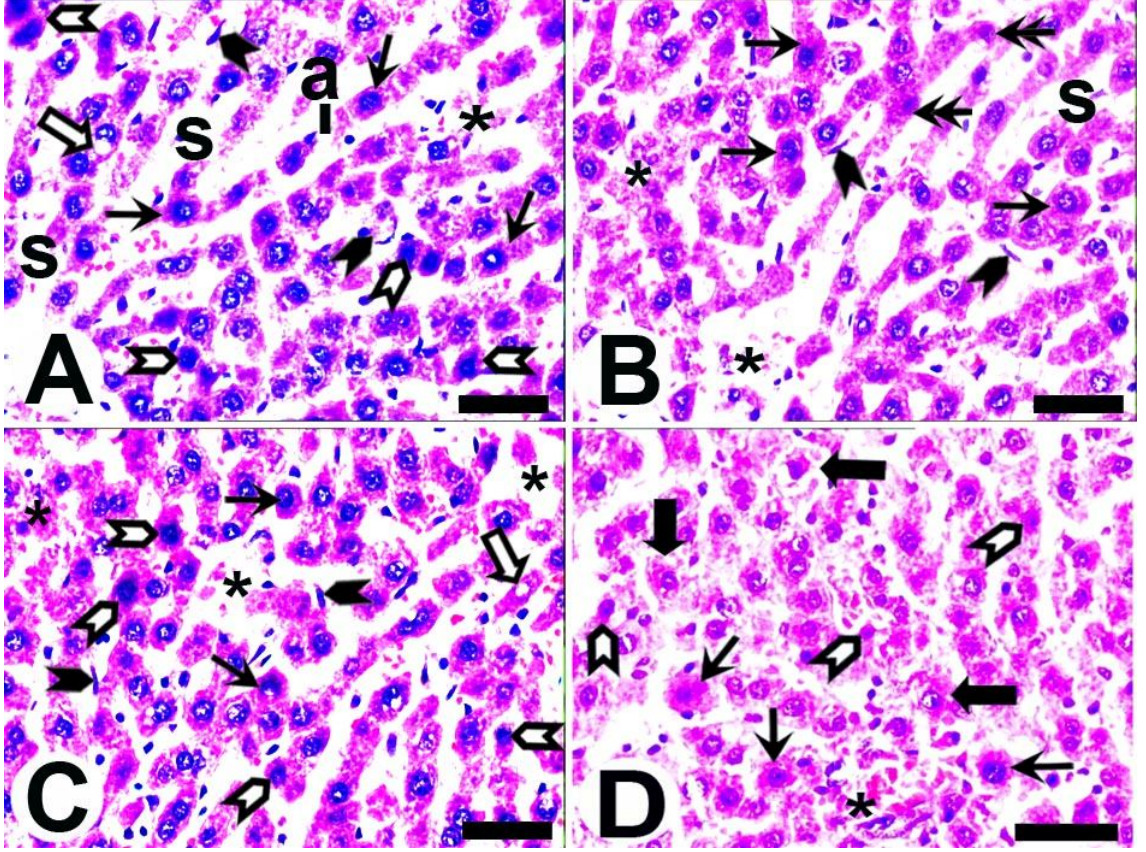
Hepatosit kordonları düzensizdi ve hepatositler arasındaki bağlantı kaybı dikkat çekmekteydi. Tek çekirdekli hepatositler arasında, çift çekirdek içeren ve normalden daha büyük olan çok sayıda hepatosite rastlandı (Şekil 20).



Şekil 20: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **s**, sinüzoid; **kalin ok**, sitoplazması soluk boyanan şişmiş hepatositler; **beyaz dolgulu oklar**, çift çekirdekli ve etraflarındakilere göre daha büyük çaplı oldukları görülen hücreler; **ince ok**, eozinofil sitoplazmalı hücreler; **beyaz dolgulu ok başı**, parçalanmış veya sitoplazmik içeriğini kaybetmiş hücreler; **çift başlı ok**, koyu heterokromatik çekirdekli hücreler; **yıldız**, hepatosit sınırlarının seçilemediği bölgeleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 60 µm.

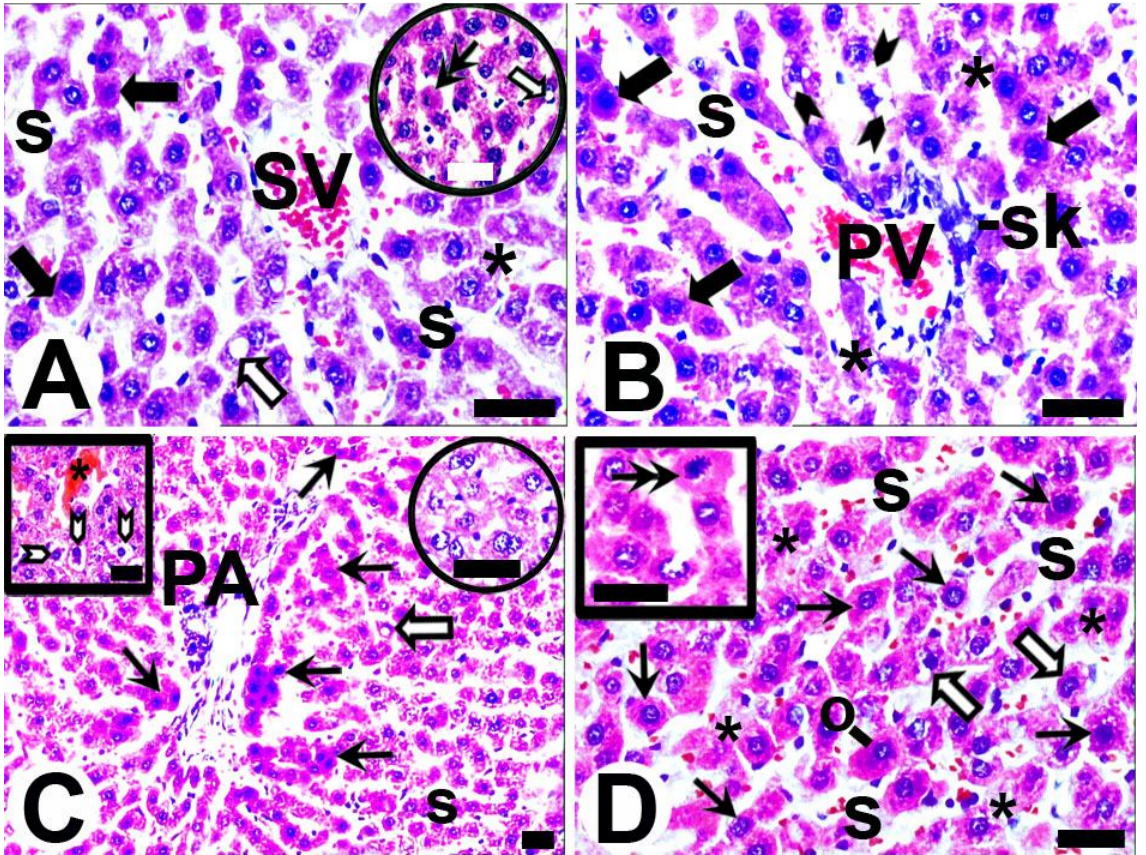
Hepatosit kordonları düzensizdi ve hepatositler arasındaki bağlantı kaybı dikkat çekmekteydi. Hepatositler ile endotel hücrelerinin döşediği sinüzoidler arasında Disse mesafesine denk gelen alanlarda genişleme de önemli bir bulgu olarak değerlendirildi (Şekil 20, 21).

Deney grubu kesitlerinde hepatosit kordonlarının inceldiği ve sürekliliğini kaybettiği görüldü. Bu kordonları oluşturan hücrelerden bazıları düzenli sınırlara sahip değildi ve parçalanmış görünümdeydi; hücrelerin bir kısmı ise vakuollerle doluydu. Vakuollerin yerleşimi ise çeşitlilik göstermekteydi. Kimi hepatositlerde vakuoller perinükleer yerleşimliken kimi hepatositlerde de vakuoller tüm hücreyi kaplamıştı (Şekil 21).



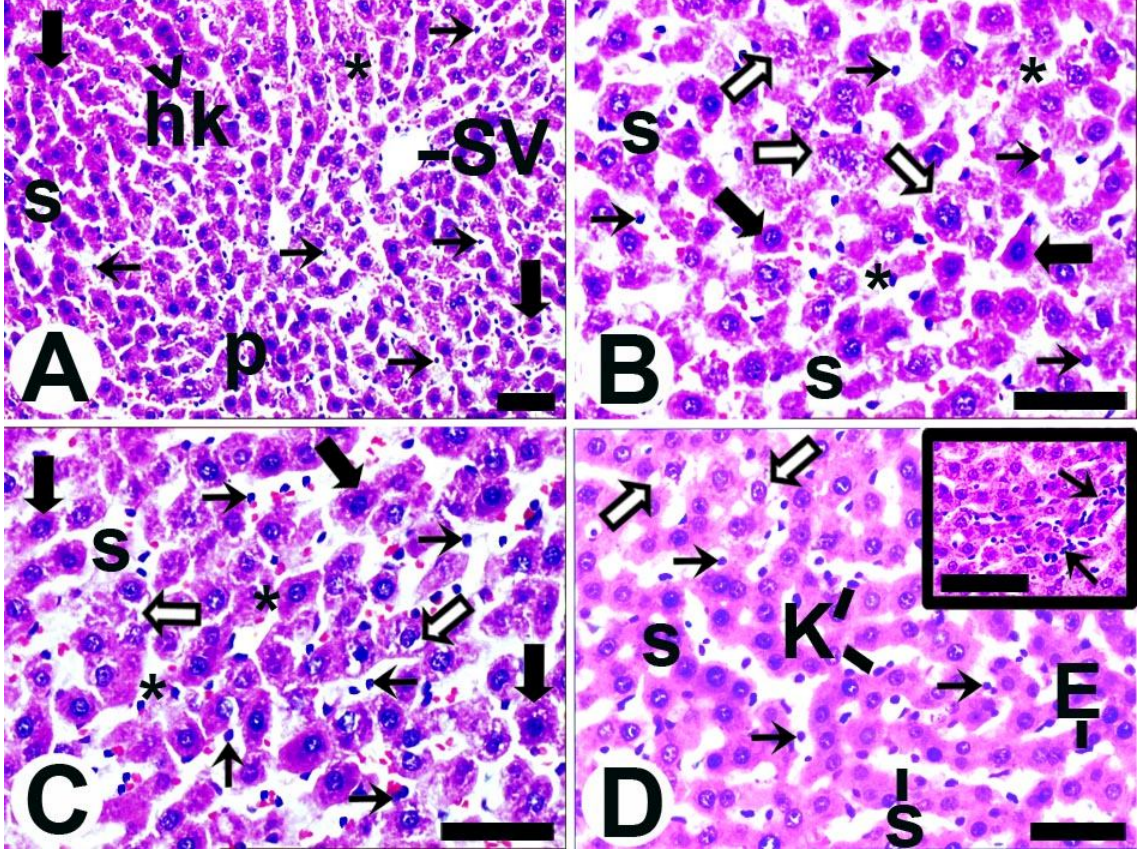
Şekil 21: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **s**, sinüzoid; **beyaz dolgulu oklar**, vakuollü hücreler; **ince ok**, eozinofil sitoplazmalı ve heterokromatik çekirdekli hücreler; **beyaz dolgulu ok başı**, çekirdek ve hücre morfolojisi bozulmuş hepatositler; **siyah okbaşı**, hepatosit kordonlarından ayrılmış görülen endotel hattı; **çift başlı ok**, çekirdeği kenara itilmiş hücreler; **yıldız**, hepatosit sınırlarının seçilemediği bölgeler; **a**, hepatosit kordonlarında görülen ayrılımları göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 60 µm.

Birçok alanda hepatositler kontrol grubundaki düzgün sınırlı yapısını kaybetmişti ve girintili-çıkıntılı düzensiz bir dış yüzeye sahipti. Bu hepatositler koyu bir nükleus ve koyu eozinofil boyanmış sitoplazma içeriyordu (Şekil 22). Böyle hepatositlerin arasında, sitoplazmasında çok sayıda irili-ufaklı vakuoller içeren ve nükleus kromatini çözülmüş gibi görünen daha soluk boyanmış hepatositler de izlendi. Bu hücreler arasında tamamen dejerasyona uğramış ve parçalanmış hücre artıklarını içeren debris alanları gözlemlendi. (Şekil 21, 22).



Şekil 22: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **PV**, portal ven; **sk**, safra kanalı; **s**, sinüzoid; **kalin ok**, düzenli sınırlarını kaybetmiş hepatositler; **beyaz dolgulu oklar**, intra-sitoplazmik vakuol içeren küreler; **beyaz dolgulu ok başı**, hidropik dejenerasyonu olan hücreler; **ince ok**, sitoplazma kaybı olan ve heterokromatik çekirdekli hücreler; **siyah okbaşı**, hepatositler içerisindeki sitoplazmik vakuoller; **çift başlı ok**, nükleusu heterokromatik ve sitoplazması yoğun eozinofil görünümlü hepatositler; **yıldız**, hepatosit sınırlarının seçilemediği bölgeleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 60 µm.

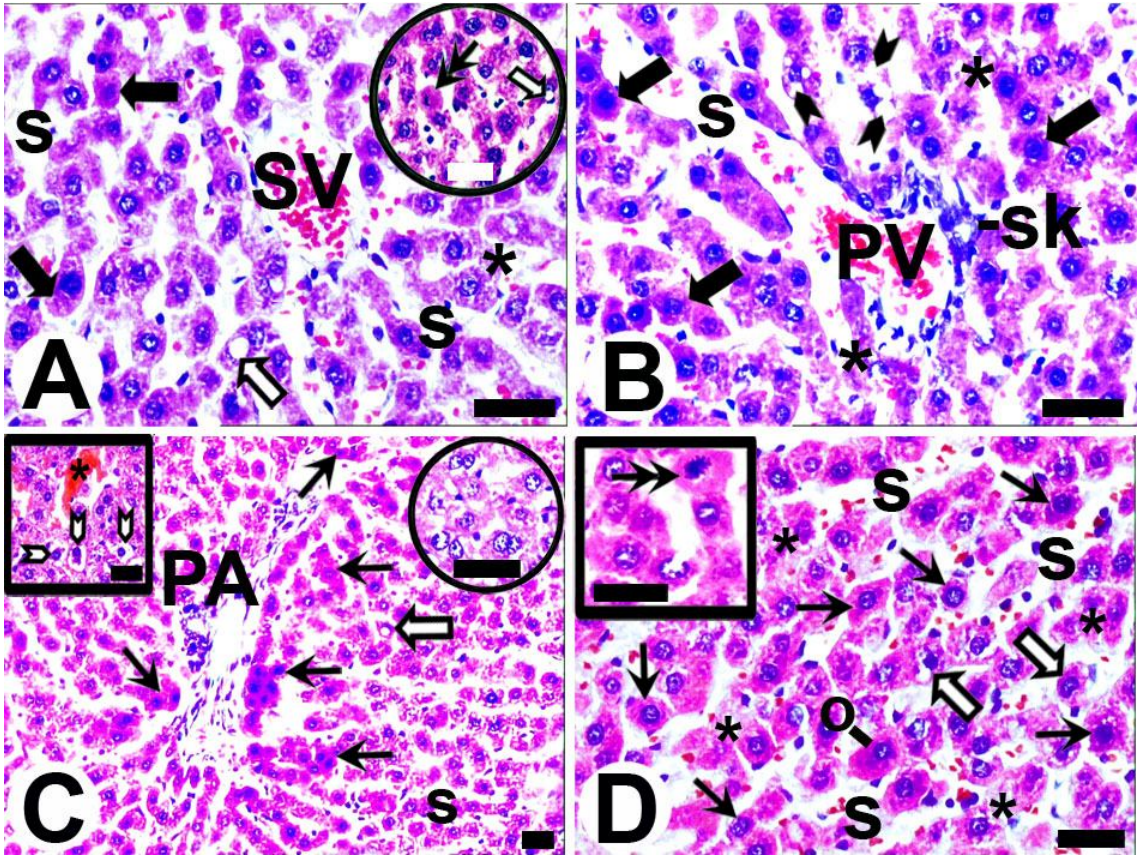
Bu infiltrasyon sahasında eozinofil sitoplâzmalı hücrelerin yanı sıra mononükleer hücreler ve eritrositler de bulunmaktaydı (Şekil 23).



Şekil 23: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **SV**, sentral ven; **hk**, hepatosit kordonu; **s**, sinüzoid; **p**, parankima; **E**, endotel hücresi; **kalin ok**, düzenli sınırlarını kaybetmiş ve yer yer küçülmüş hepatositler; **beyaz dolgulu oklar**, sitoplâzma kaybı olan ve heterokromatik çekirdekli hücreler; **ince ok**, sinüzoidler içerisindeki lenfoid hücreler; **yıldız**, hepatosit sınırlarının seçilemediği bölgeleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**=100 µm.

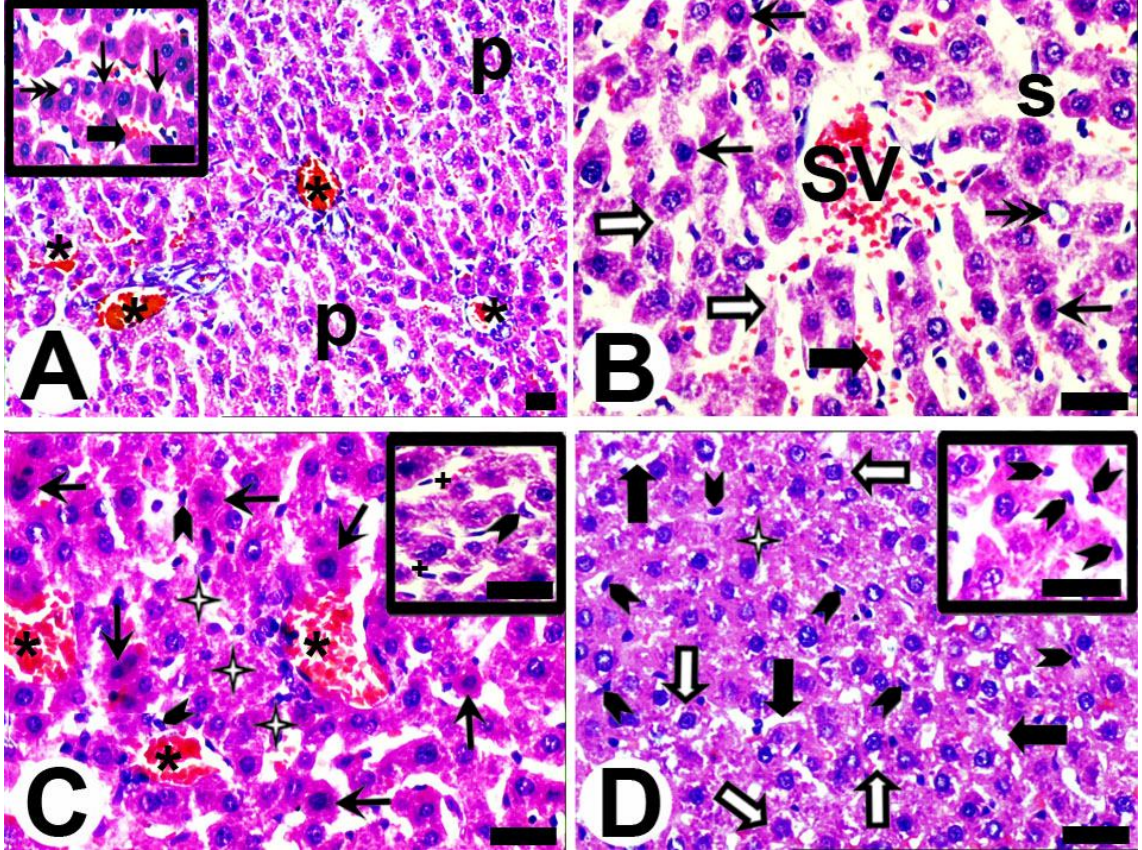
Tek doz letal faktör uygulanan sıçan karaciğerlerinde, hepatosit çekirdeklerinin de kontrol grubundaki hepatositlerin sağlıklı çekirdeklerinden farklı morfolojik görünüme sahip oldukları gözlemlendi. Şöyle ki; bu çekirdekler yuvarlak görünümlerini kaybetmişti. Bazı çekirdekler ovalimsi ya da üçgen şekil kazanmıştı ek olarak çekirdekleri boğumlanarak fasülye şeklini almış hücreler bulunmaktaydı. Bir kısım hepatositlerin çekirdekleri ise koyu boyanarak düzgün sınırlarını yitirmişti. Farklı alanlarda yapılan incelemede, içerisinde bulunan vakuollerden ötürü sahip oldukları kromatinin perifere doğru itildiği çekirdekler gözlemlendi. Portal alanlara bakıldığında; portal alan çevresindeki hepatositlerin sitoplâzmalarının koyu eozinofil boyandığı tespit edildi. Bu bölgelerdeki kimi hepatositler etraflarındakilere kıyasla daha küçüktü.

Hepatosit kordonlarını değerlendirirken komşu hepatosiler arasında bulunan dilate boşluklar dikkat çekiciydi. Deney grubuna ait karaciğerler yüksek büyütmede incelenirken çekirdekleri koyu kromatinli veya kromatini boya almamış hepatositler tespit edildi (Şekil 22 kalın ok, Şekil 21 beyaz dolgulu okbaşı, Şekil 24 ince ok). Bu hepatosit çekirdeklerinden bazıları bütünlüğünü kaybetmişti. Çekirdeği dağılmış, kromatini kenara itilerek yassı şekil almış ya da boyutu etraflarındaki hücrelere göre farklı görünen hepatositlerden bir kısmının sitoplazması da koyu eozinofil boyanmıştı (Şekil 24).



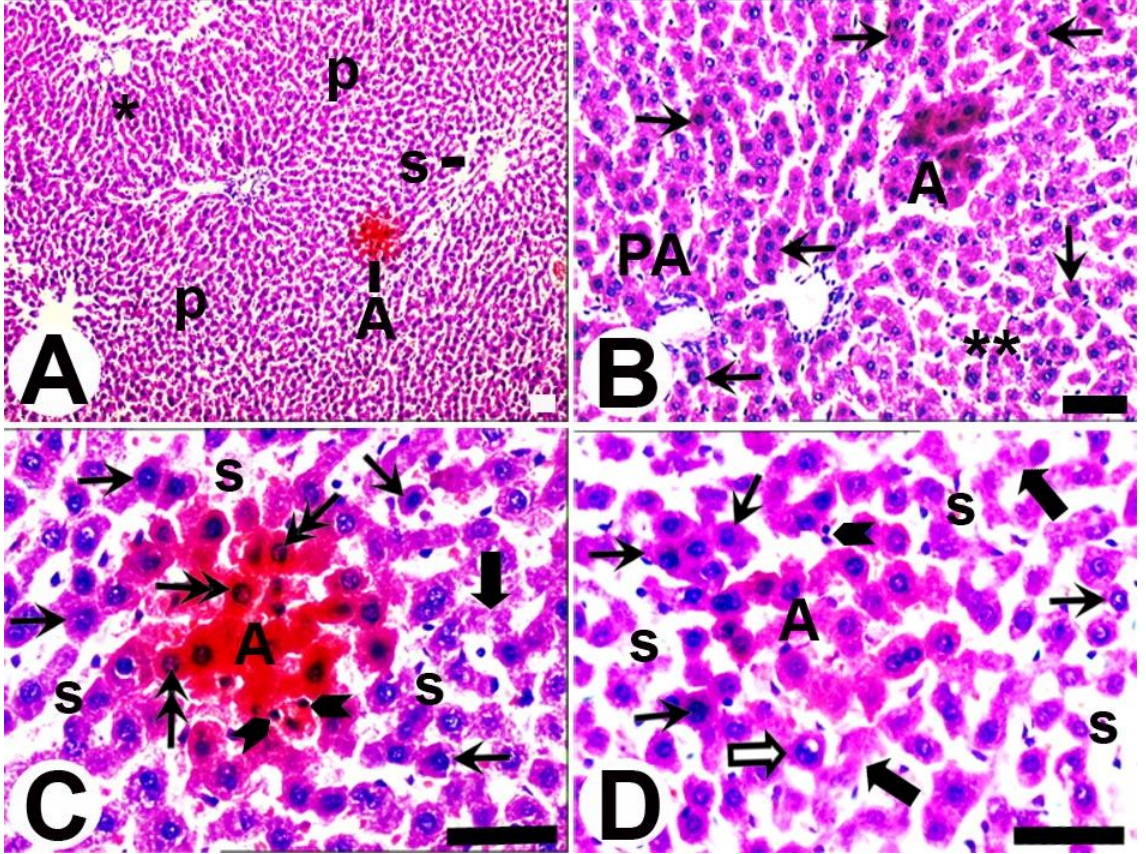
Şekil 24: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **PA**, portal alan; **s**, sinüzoid; **kalın ok**, bazıları oval (A) bazıları da küçükmüş çekirdekler içeren hepatositler (D); **beyaz dolgulu oklar**, çekirdekleri fasülye şeklini almış ya da kromatini kenara itilmek suretiyle yassılaştırmış hepatositler; **ince ok**, eozinofil sitoplazmalı ve küçülmüş hücreler; **çift başlı ok**, çekirdekleri düzgün sınırlarını kaybetmiş olan hepatositler; **siyah okbaşı**, sinüzoid duvarındaki aktif görünümlü Kupffer hücreleri; **beyaz dolgulu okbaşı**, komşu hepatositler arasında saptanan boşluklar; **yıldız**, hepatosit sınırlarının seçilemediği bölgeler; C ve D’deki küçük resimlerde çekirdek kromatini boya almamış hepatositler izlenmektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 40 µm.

Bu karaciğer kesitlerinde bulunan damar dalları ve sinüzoidler içerisinde pıhtı oluşumu eritrosit birikimine rastlandı (Şekil 25). Karaciğer parankimi içerisinde sınırları kaynaşmış olarak görülen hepatositlerin bir araya gelmesiyle oluşan alanlara rastlandı. Bu alanlarda sinüzoid sınırları düzensizdi ve eozinofil sitoplazmalı Kupffer hücreleri bulunmaktaydı (Şekil 25).



Şekil 25: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **PA**, portal alan; **SV**, sentral ven; **s**, sinüzoid; **kalın ok**, sinüzoidler içerisinde gözlenen eritrositler; **p**, parankima; **beyaz dolgulu oklar**, devamlılığını kaybetmiş ya da ayrılmış hepatosit kordonları; **ince ok**, sitoplazma ya da çekirdek morfolojisi bozuk görülen eozinofil sitoplazmalı ve küçülmüş hücreler; **çift başlı ok**, intra sitoplazmik ya da intranükleer vakuoller içeren hepatositler; **siyah okbaşı**, Kupffer hücreleri **beyaz dolgulu okbaşı**, sitoplazmik içeriği tamamen boşalmış gibi görünen hepatositler; **yıldız**, damar dalları ya da sinüzoidler içerisinde izlenen pıhtı oluşumu; **beyaz dolgulu yıldız**, ölü hücrelerden arta kalan yıkıntı alanları; **+**, hepatosit kordonları ile endotel hücreleri arasındaki ayrılmış hat; **altı çizili yıldız**, hepatosit sınırlarının seçilemediği bölgeleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 50 µm.

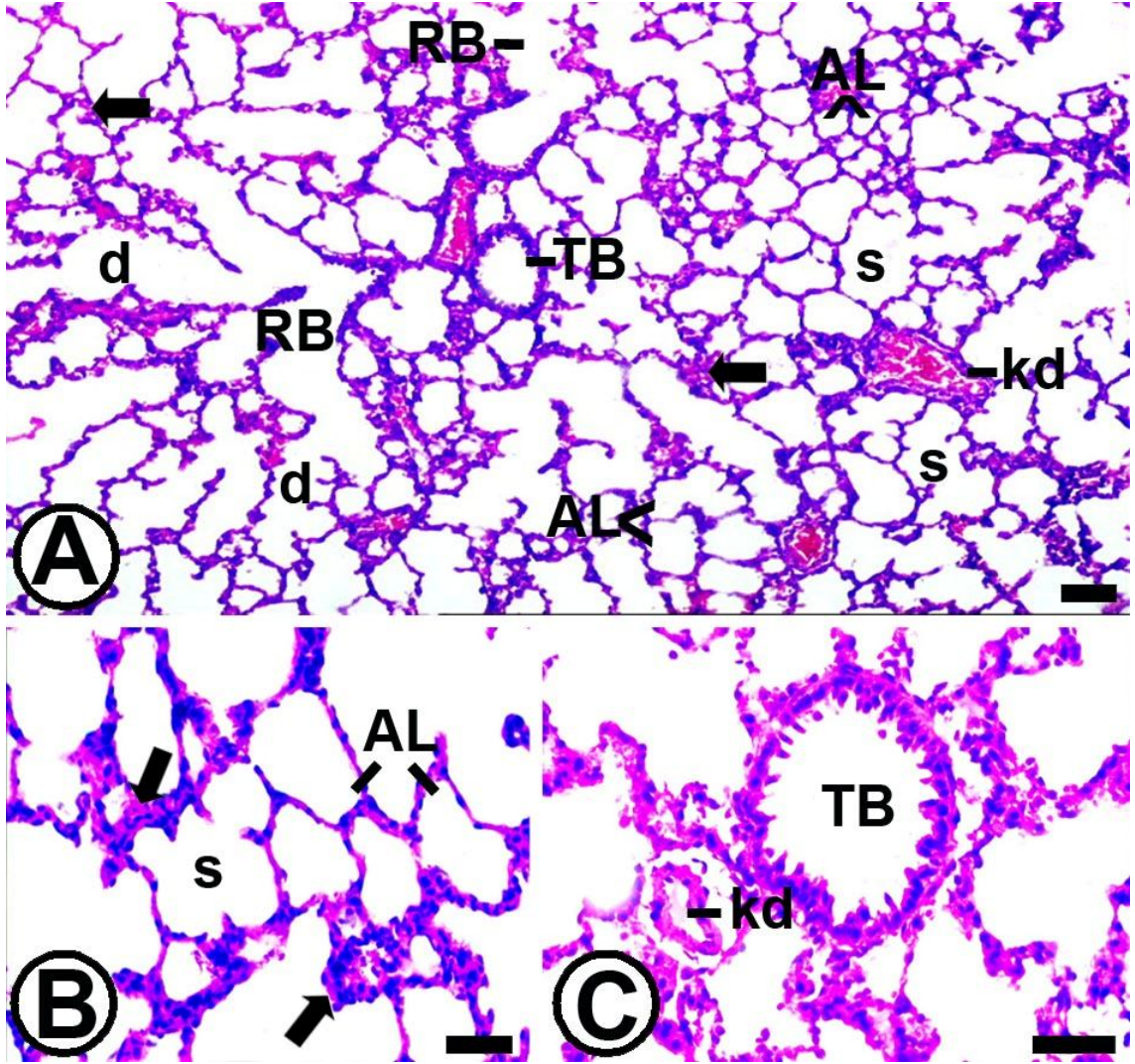
Deney grubundaki erişkin sıçanların karaciğer kesitlerinde, organ parankimini oluşturan hepatositlerden koyu eozinofil sitoplâzmalı olanlarının bir araya gelmesiyle oluşan alanlar saptandı. Bu alanlardaki hepatositlerin nükleus kromatini yarımay şeklinde kenara itilmişti (Şekil 26C, çift başlı ok); bu alanlar lenfoid hücre birikimi içermediği için apoptotik hücre kümeleri olarak değerlendirildi. Böyle hücreler arasında ayrıca apoptotik cisim olası yapılar da gözlemlendi (Şekil 26C ve D, siyah okbaşı).



Şekil 26: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **PA**, portal alan; **s**, sinüzoid; **p**, parankima; **A**, apoptotik hücre kümesi; **kalin ok**, sitoplâzma sınırları seçilemeyen hepatositler; **ince ok**, sitoplâzma ya da çekirdek morfolojisi bozuk görülen eozinofil sitoplâzmalı ve küçülmüş hücreler; **beyaz dolgulu ok**, iri vakuol nedeniyle nükleusu kenara itilmiş hepatosit; **çift başlı ok**, nükleus kromatini kenara itilmiş apoptotik hücre; **siyah ok başı**, apoptotik cisimler; **çift yıldız**, hepatosit sınırlarının seçilemediği bölgeleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 90 µm.

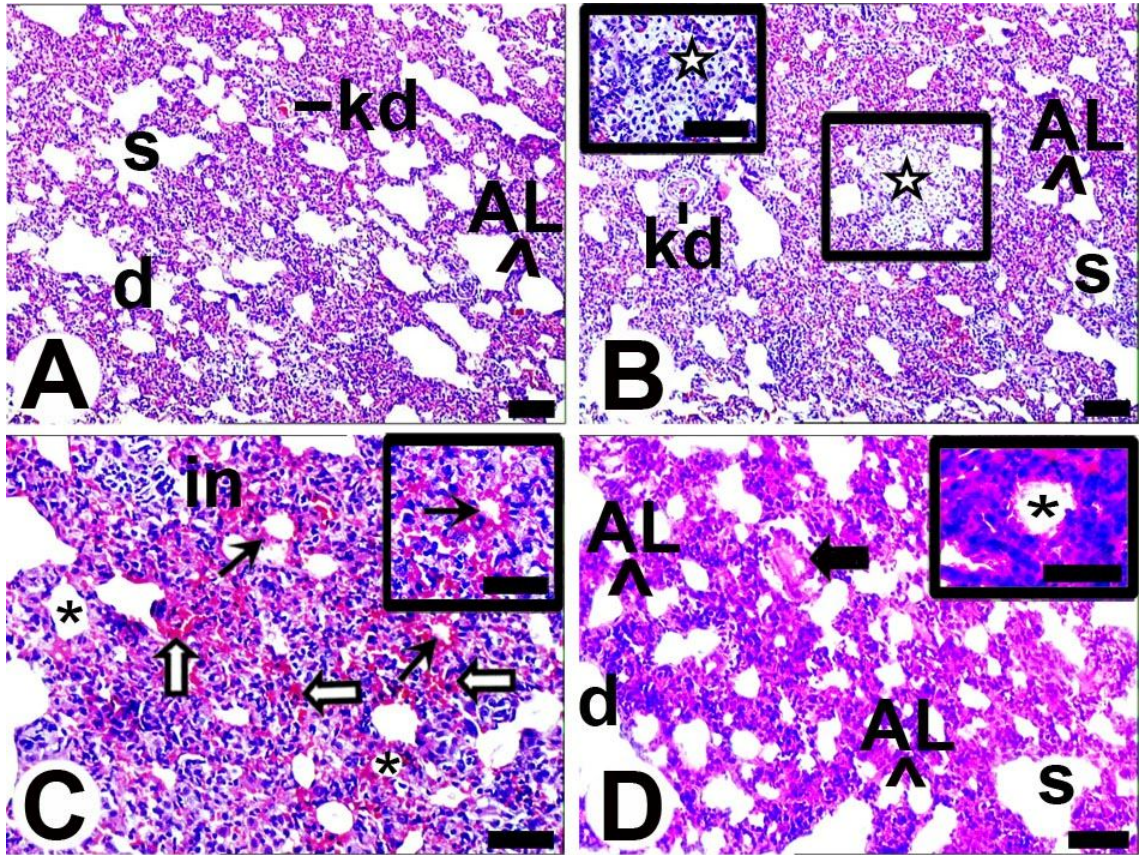
4.II.1. B. Erişkin Akciğerine Ait Histolojik Bulgular:

Kontrol grubuna ait preparatlar histolojik açıdan değerlendirildiğinde normal akciğer yapısıyla uyumlu olduğu gözlemlendi. Buna göre bronşların goblet hücreli, kinosilyalı yalancı çok katlı epiteli, lamina propriası ve altındaki ince kesintili kas tabakası düzenli bulundu. Submukozada az miktarda serömüköz beze rastlandı. Kıkırdak dokusu, yassı kıkırdak parçaları şeklindeydi. Bronşiyol duvarında kıkırdak plakalar ortadan kalkmıştı. Bronşiyollerde başlangıçta seyrek goblet hücresi içeren yalancı çok katlı kinosilyalı epitel gözlenirken, bronşiyolün çapı daraldıkça epitelin goblet hücrelerinden yoksun tek katlı prizmatik epitele dönüştüğü izlendi. Epitelin altında elastik liflerden zengin ince lamina propriya ve onun altında sirküler seyreden düz kas tabakasının da olağan seyrinde olduğu farkedildi. Gözlemlerimizde terminal bronşiyoller tek katlı alçak prizmatik veya kübik epitel ile döşeliydi, respiratuar bronşiyoller ise tek katlı kübik epitel ile döşeli ve buraya açılan alveoller nedeniyle kesintiye uğramıştı. Hem terminal hem de respiratuar bronşiyollerde apikal sitoplâzmaları bronşiyol lümenine çıkıntı yapan Clara hücrelerine rastlandı. Tek katlı yassı epitel ile döşeli ince duvarlı uzun kanallar olan alveolar duktuslar olağan görünüşleri içindeydi. Epitelin altında ince fibroelastik doku yer alıyordu ve bu kanala çok sayıda alveol ve alveol kesesi açılıyordu. Akciğerin süngerimsi yapısını sağlayan alveoller, tek katlı yassı epitel ile döşeli kese şeklindeki yapılarını sergiliyordu. Bu yassı epitel hücrelerinin komşuluğunda kübik epitel hücrelerinin (Tip 2 pnömosit) varlığı da dikkat çekmekteydi. İnteralveolar septum normal kalınlıkta görülüyordu (Şekil 27).



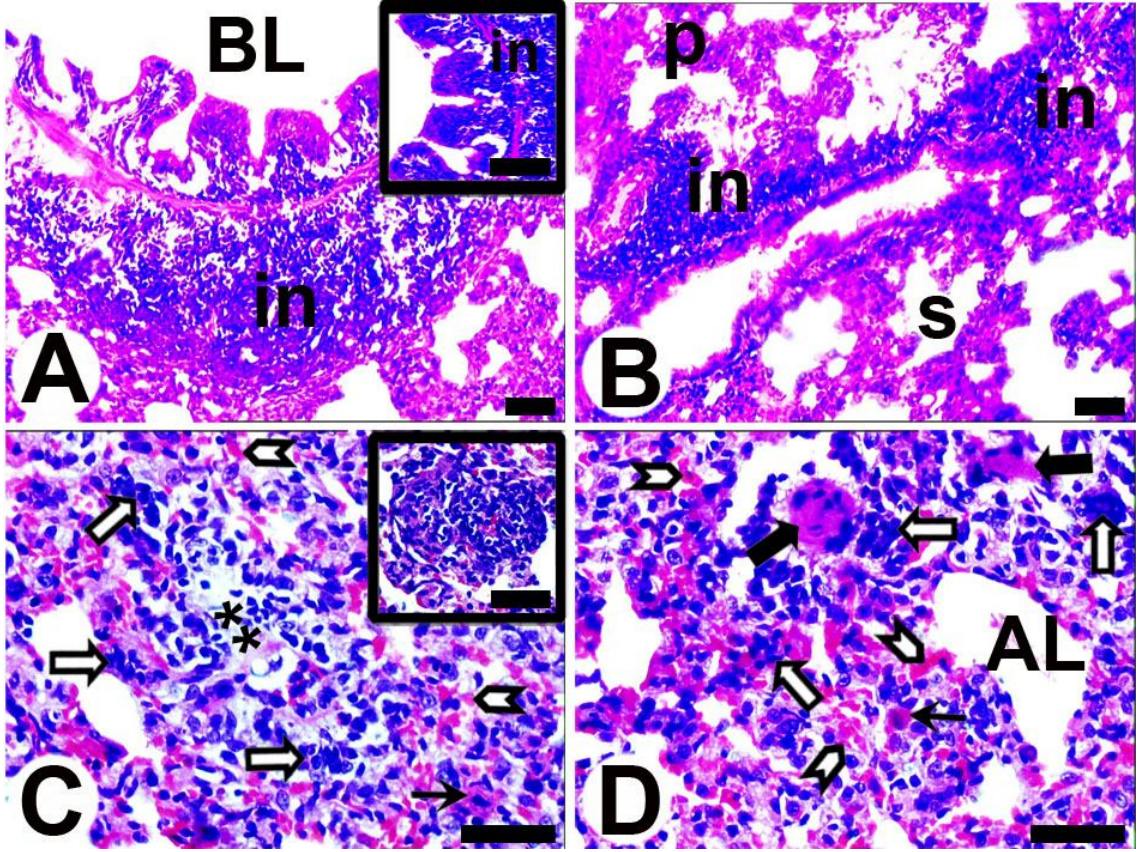
Şekil 27: Kontrol grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **TB**, terminal bronşiol; **RB**, respiratuar bronşiol; **AL**, alveol; **kd**, kan damarı; **s**, sacculus alveolaris; **d**, ductus alveolaris; **kalin ok**, bağ dokusu septumlarını göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 50 µm.

Deney grubundan elde edilen histolojik kesitlerde ilk göze çarpan bulgu bu akciğerlerde çok sayıda kollabe olmuş alveollerin bulunmasıydı. Yine deney grubu kesitlerinde, interalveolar septumda bağ dokusu artışı ve alveolar duvar kalınlaşması mevcuttu. Bu bağ dokusu alanlar içerisinde seyreden küçük damarlar belirgindi. Deney grubu kesitlerinde göze çarpan diğer bir bulgu da parankim içerisinde izlenen soluk sitoplazmalı hücrelerden oluşan alanların gözlenmesiydi. Bu alanlarda yer alan alveollerden bazılarının duvarlarında hyalinleşme gözlemlendi (Şekil 28).



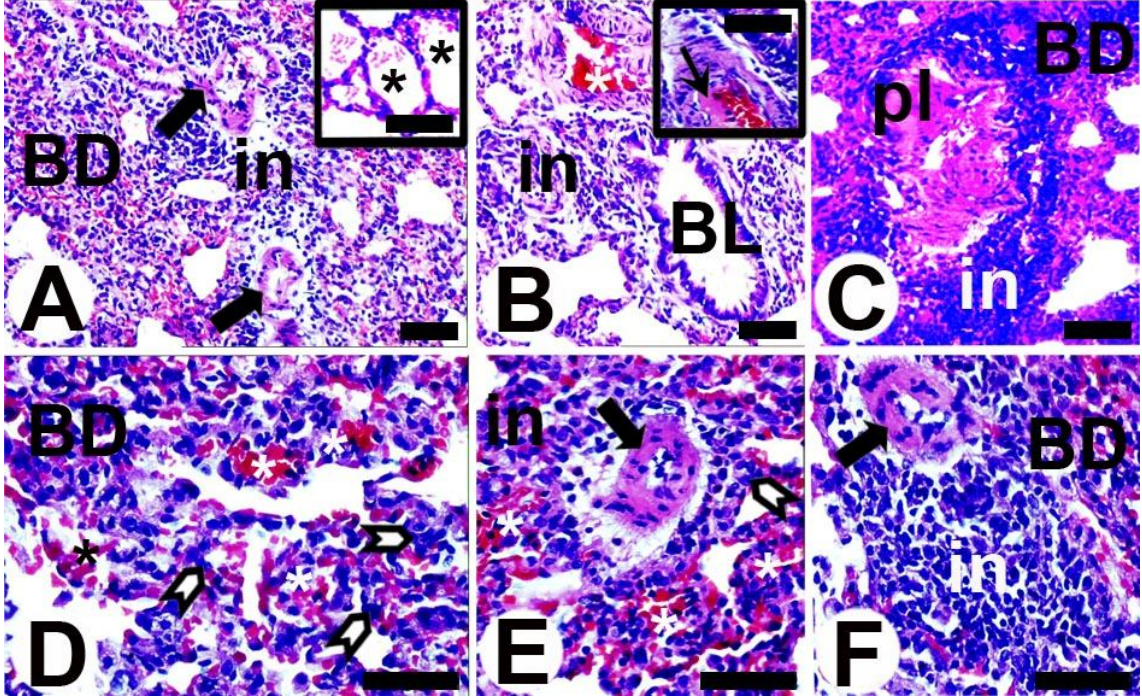
Şekil 28: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **BD**, bağ dokusu septumu; **AL**, alveol; **kd**, kan damarı; **s**, sacculus alveolaris; **d**, ductus alveolaris; **kalin ok**, bağ dokusu septumlarında yerleşen duvarı eozinofil boyanmış damar; **beyaz dolgulu ok**, bağ dokusu içerisinde gözlenen eozinofil sitoplazmalı hücreler; **ince ok**, duvarları eozinofil boyanmış alveoller; **beyaz dolgulu yıldız**, alveoller arasında gözlenen soluk sitoplazmalı hücreler; **yıldız**, duvar hattı seçilemeyen alveollerini göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 60 µm.

Tek doz LF uygulanan dişilerin akciğerlerinden elde edilen görüntülerdeki diğer bir bulgu da sadece iletili kısımların duvarında kalmayıp respiratuar bölümde parankim içerisine de yayılan hem nodüler hem de diffüz formdaki hücre infiltrasyonunun varlığıydı. Bu infiltrasyonu oluşturan hücrelerin genellikle plazmosit, lenfosit ve monosit gibi mononükleer hücrelerden oluştuğu ve kimi yerlerde bronşiyol epiteli ve damar duvarlarına da nüfuz ettiği görüldü. Akciğer parankimi incelendiğinde kontrol grubunda gözlenmeyen periferinde uzantılar taşıyan çok çekirdekli yabancı cisim dev hücrelerinin varlığı da çarpıcıydı. Ayrıca pulmoner intersitisyumda ödem ve kanama alanları da bulunmaktaydı (Şekil 29).



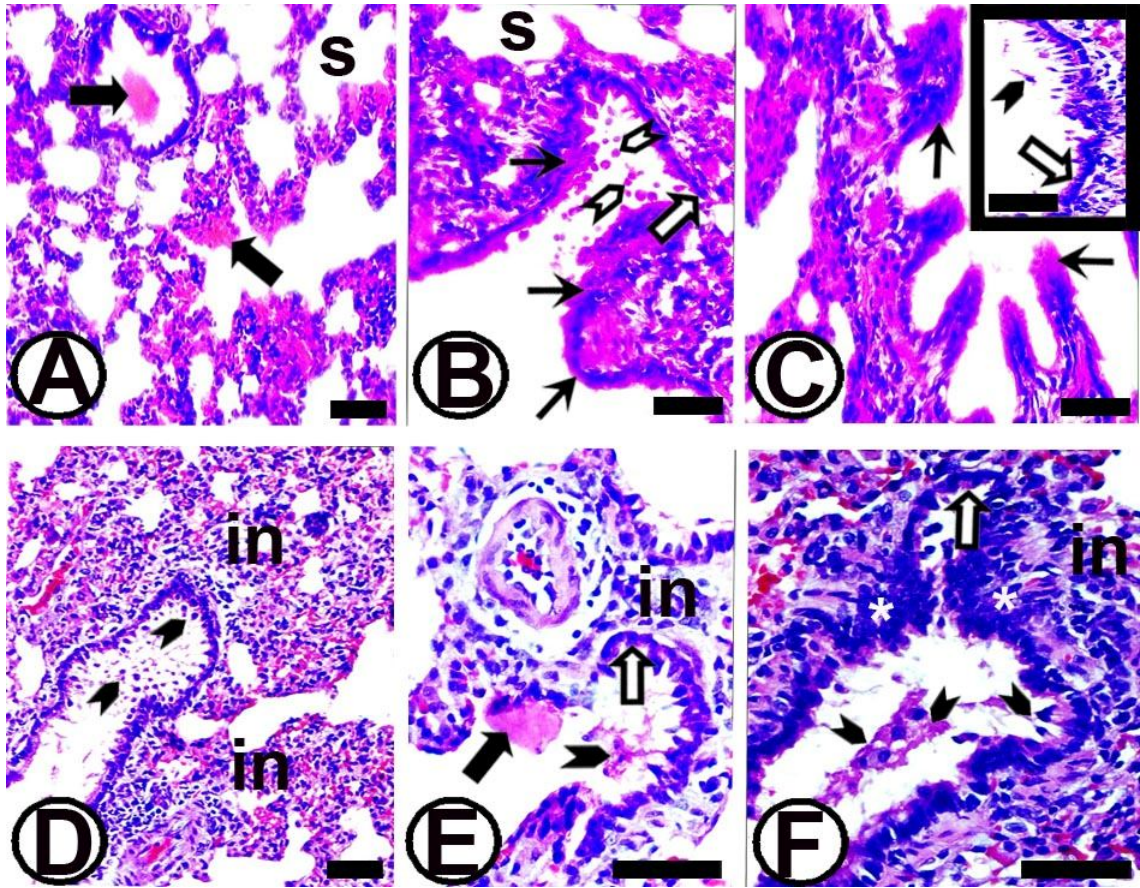
Şekil 29: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **BL**, bronşiyol lümeni; **AL**, alveol; **s**, sacculus alveolaris; **in**, lenfoid hücre infiltrasyonu; **p**, parankim; **kalin ok**, çok çekirdekli ve eozinofil sitoplazmalı dev hücre; **beyaz dolgulu ok ve küçük resim**, mononükleer hücre infiltrasyonları; **beyaz dolgulu okbaşı**, bağ dokusu septumlarında ve alveol duvarlarında görülen pıhtı oluşumu; **ince ok**, bağ dokusu içindeki eozinofil sitoplazmalı hücreler; **çift yıldız**; bağ dokusu içerisinde gözlenen ödematöz şişme alanını göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**=50 µm.

Akciğer interstisyumu içerisinde bulunan damarlar ve alveoller içerisinde pıhtı oluşumu, eritrosit ve fibrin birikimi gerçekleşmişti. Ayrıca bu damarlardaki, etraflarında yoğun mononükleer hücre birimi ile belirginleşmiş vaskülit görünümü mevcuttu. Bunların yanı sıra, eozinofil boyanmış pleksiform lezyonlar şeklinde fibrinoid nekroz odaklarına rastlandı (Şekil 30).



Şekil 30: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **BL**, bronşiyol lümeni; **BD**, bağ dokusu septumu; **in**, lenfoid hücre infiltrasyonu; **pl**, pleksiform lezyon; **kalin ok**, etrafında mononükleer hücre birikimi ile belirgin vaskülit gelişmiş damarlar; **ince ok**, damar içerisindeki fibrin birikimi; **beyaz dolgulu okbaşı**, mononükleer lenfoid hücrelerin biriktiği alanlar; **yıldız**, alveoller içerisinde gözlenen pıhtı ve eritrosit birikimini göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 50 µm.

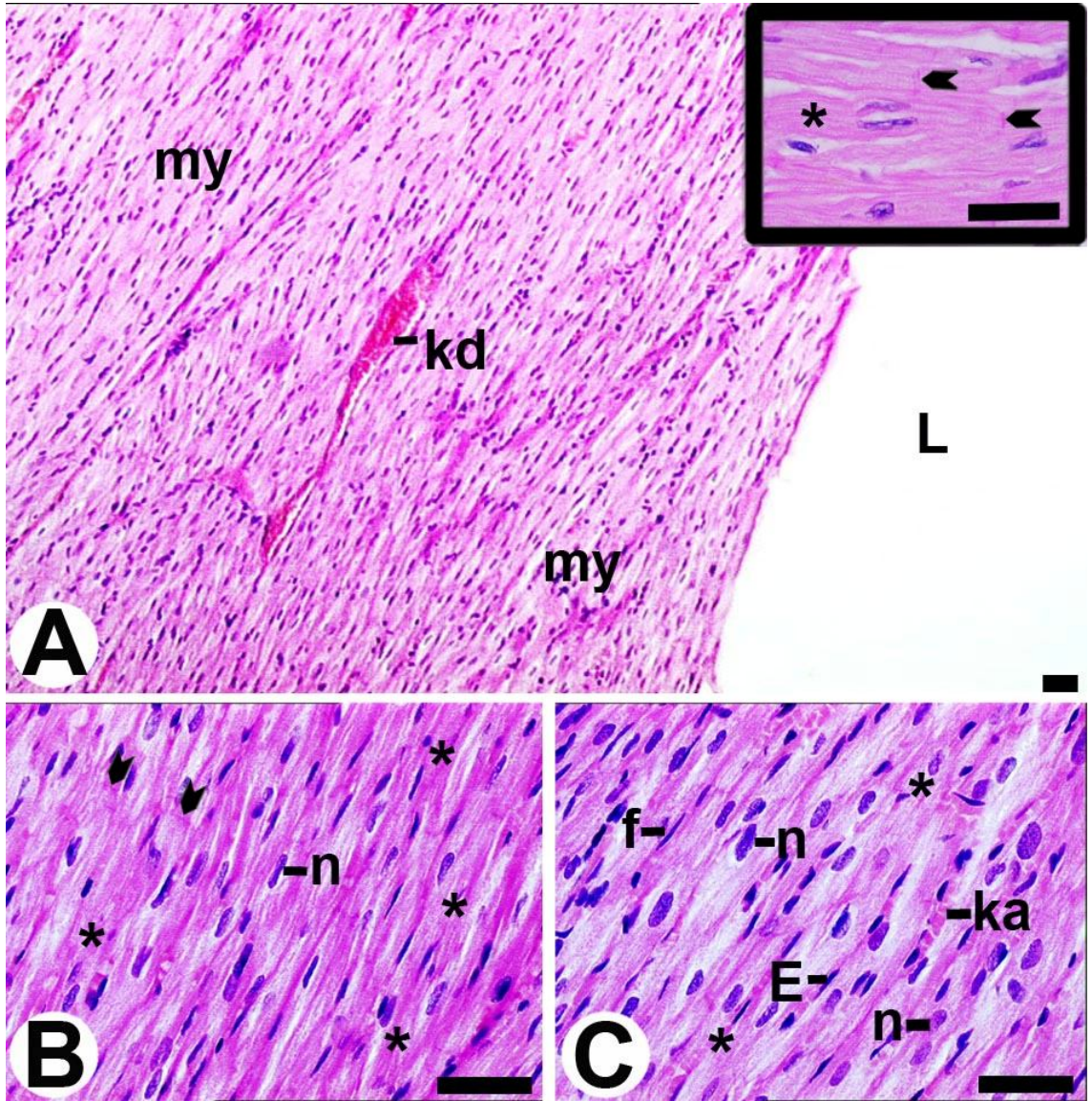
Bronşiyollerin içerisinde eozinofil boyanmış fibrin benzeri madde birikimi de önemli bir bulgu olarak değerlendirildi. Ayrıca bronşiyol duvarındaki epitel hücrelerinde eozinofil madde birikimi saptandı ve yer yer bu bronşiyollerin lümeninde, bu hücrelerden salgılanması olası eozinofil salgı maddesi birikimi gözlemlendi. Bunların yanı sıra bronşiyol epitelinde yer yer odaksal tarzda, lümene doğru çıkıntı yapmış hiperplazik alanlar mevcuttu. Ayrıca bronşiyollerin lümeninde, bronşiyol yüzeyinden dökülmüş olabileceği düşünülen hücreler bulunmaktaydı. Bu bronşiyollerin komşuluğunda seyreden damarlar içerisindeki nötrofil yoğunluğu da dikkat çekiciydi (Şekil 31).



Şekil 31: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **s**, sacculus alveolaris; **in**, lenfoid hücre infiltrasyonu; **kalin ok**, bronşiyollerin içerisindeki fibrin birikimi; **ince ok**, bronşiyol epitel hücrelerinde eozinofil madde birikimi; **beyaz dolgulu ok**, etraflarındakilere göre daha alçak boylu bronşiyol epitel hücreleri; **beyaz dolgulu okbaşı**, bronşiyol lümeninde salgı maddesi birikimi; **siyah okbaşı**, bronşiyol lümenine dökülmüş hücreler; **yıldız**, bronşiyol duvarındaki hiperplazik alanları göstermektedir. Ayrıca E'deki büyük damarın lümeninde çok sayıda nötrofil varlığı dikkat çekmektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 60 µm.

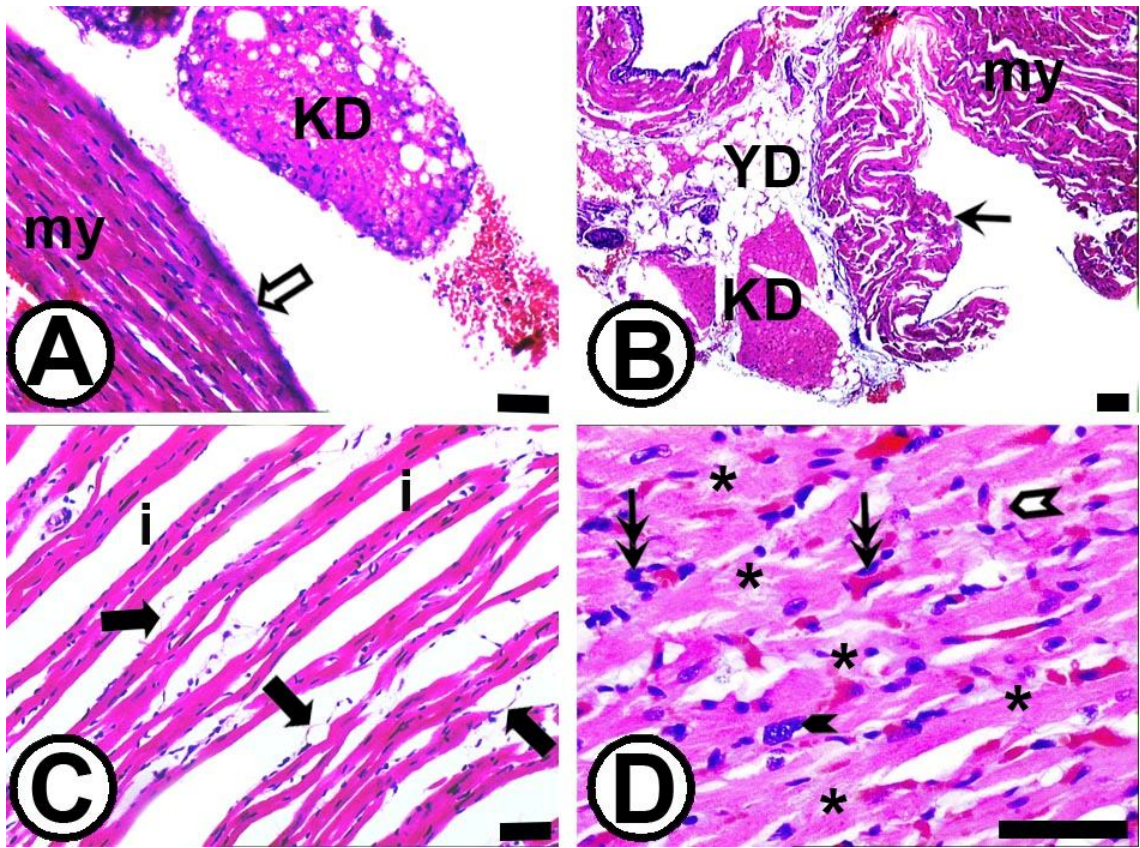
4.II.1.C. Erişkin Kalbine ait Histolojik Bulgular:

Erişkin kontrol grubuna ait kalp kasının histolojik kesitlerinde inceleme yapıldığında; kalp kası hücrelerinin peş peşe birbirine eklenmesiyle oluşmuş kas liflerini ve bunların arasını dolduran az miktardaki bağ dokusunu içeren normal kalp dokusunun mikroskopik görünümü saptandı. Lifler arasındaki bağ dokusu bölümler oldukça inceydi ve bağ dokusunun fibrositleri ince uzun koyu nukleusları ile belirgin olarak izleniyordu. Kalp kası lifleri arasında yerleşik olan damarların duvarları da düzgün ve normal histolojik görünümdeydi. Kas liflerini oluşturan hücreler bol sarkoplazma içerdiğinden enine çizgilenme çok belirgin değildi. Lifler, yer yer yan dallanmalarla birbirine bağlanmış durumda bulunmaktaydı. Her bir kalp kası hücresi, fibrositlere ait olanlardan daha iri olan ve soluk boyanan, merkezde yerleşik oval şekilli bir adet nukleus içermekteydi (Şekil 32).



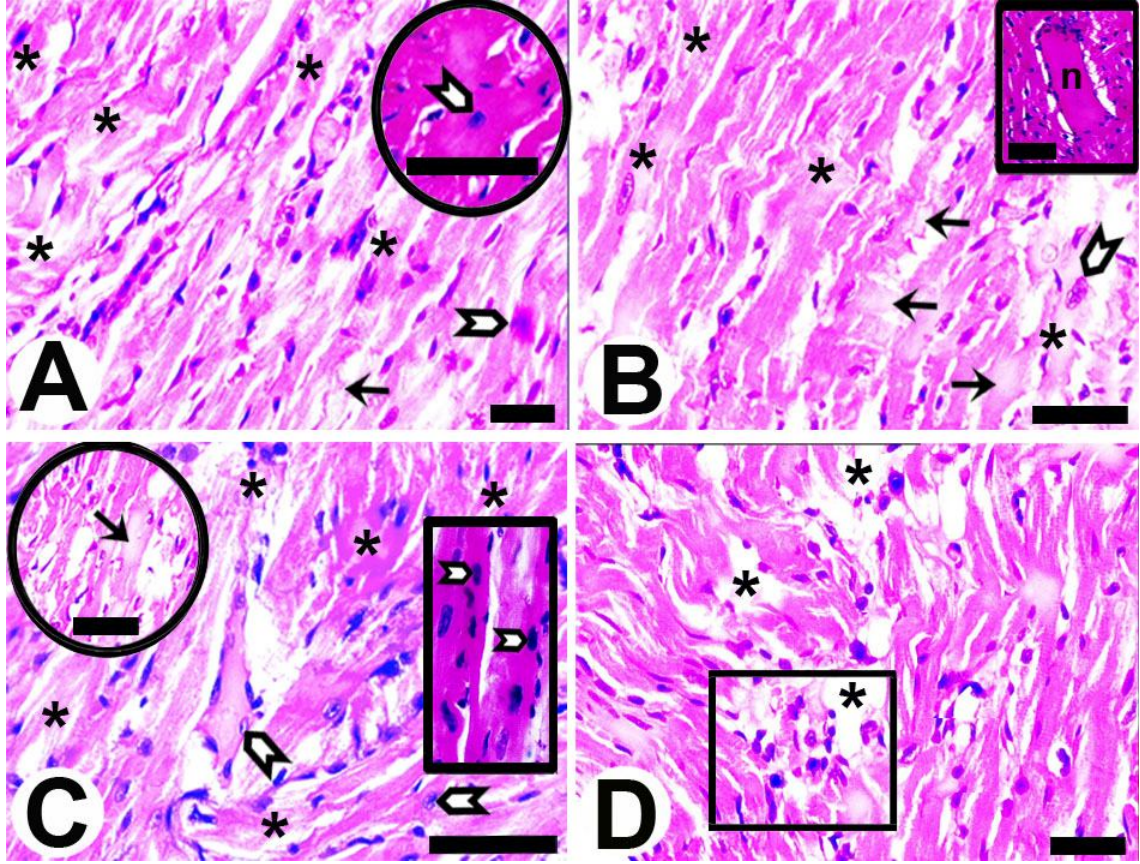
Şekil 32: Kontrol grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **L**, lümen; **kd**, kan damarı; **my**, myokard; **E**, endotel hücresi; **f**, fibrosit; **n**, kas hücresi nükleusu; **ka**, kapiller; **siyah okbaşı**, diskus interkalaris; **yıldız**, kardiyak myositlerin sarkoplazmasını göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 20 µm.

Tek doz LF uygulaması yapılan erişkin dişilerin kalp kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde ilk göze çarpan bulgu hem perikardiyum komşuluğunda hem de atriyum aort kavşağında kahverengi yağ dokusu odaklarına rastlanmasıydı. Kalp kası liflerinin dizilimi, kontrolle kıyaslandığında oldukça düzensizdi ve aralarındaki bağ dokusu alanlarda, kontrol grubunda gözlenmeyen oldukça geniş boşluklar vardı. Yer yer kas lifleri ile onlara eşlik eden kan damarlarının duvarı ya da bağ dokusu lifleri arasında ödematöz şişkinlikler görüldü. Ayrıca bazı liflerde dev çekirdeklerin bulunduğu görüldü (Şekil 33).



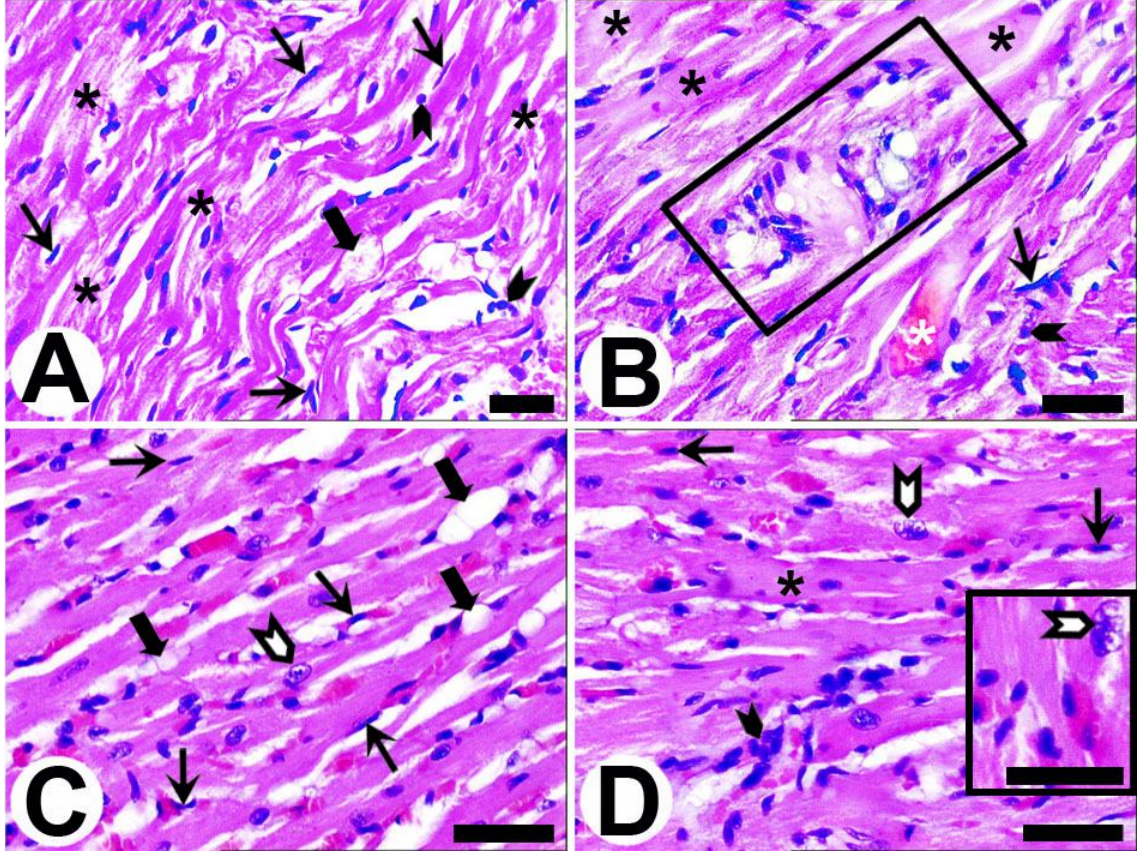
Şekil 34: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **i**, interstitiyum; **KD**, kahverengi yağ dokusu; **YD**, beyaz yağ dokusu; **KM**, kardiyak myosit; **E**, endotel hücresi; **my**, myokard; **ka**, kapiller; **Kalın ok**, myositler ile bağ dokusu lifi arasındaki ödematöz şişkinlikler; **ince ok**, endokard; **beyaz dolgulu ok**, epikard; **çift başlı ok**, kontrol grubundakilere kıyasla daha yüksek boylu ve iri çekirdekli görülen endotel hücreleri; **siyah okbaşı**, dev nükleus; **beyaz dolgulu okbaşı**, incelmış ya da bütünlüğünü kaybetmiş myositler; **yıldız**, sitoplazmik dejenerasyonu olan myositleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 30 µm.

Ek olarak bu liflerin sınırları da düzgün değildi. Kalp kası liflerinin bazıları nekrotik değişikliklere uğramıştı (Şekil 35). Ayrıca bu nekrotik kas lifleri kimi alanlarda enflamatuvar hücrelerle çevrelenmişti. (Şekil 35D, çerçeveli alan).



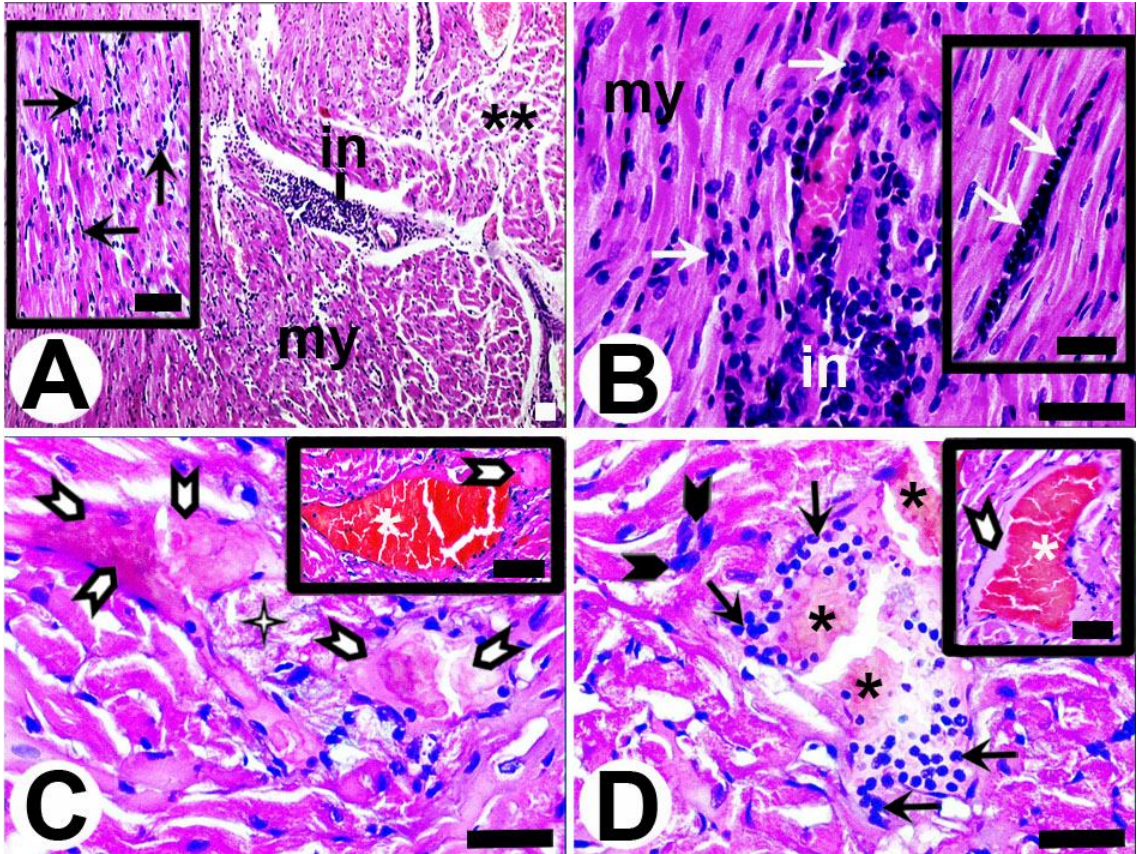
Şekil 35: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **İnce ok**, dejenere olmuş ya da nekroza uğramış (B küçük resim) kalp kası lifleri; **beyaz dolgulu okbaşı**, küçülmüş normalden iri, dejenere olmuş ya da vakuollü myosit çekirdekleri; **yıldız**, sarkoplazma kaybı olan ya da normalden daha eozinofil boyanmış sarkoplazma içeren alanları göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 25 µm.

Hücrelerin hem sitoplâzma hem de çekirdeklerinde vakuol oluşumu gözlenmekteydi (Şekil 36).



Şekil 36: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **Kalın ok**, myositler ile endotel hattı arasında peri-sitoplazmik olarak yerleşen vakuoller; **ince ok**, bağ dokusu alanlarda gözlenen eozinofil sitoplazmalı fibroblastlar; **beyaz dolgulu okbaşı**, vakuollü myosit çekirdekleri; **siyah okbaşı**, bağ dokusu alanlarda görülen lenfoid hücreler; **yıldız**, sarkoplazma kaybı olan ya da normalden daha farklı boyanmış, çizgilenme göstermeyen sarkoplazma içeren alanları göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 25 µm.

Gerek dejenere lifler etrafında gerekse liflerin arasındaki bağ dokusu içerisine yerleşmiş immün hücreler ve eozinofil sitoplazmalı fibroblastlar bulunmaktaydı (Şekil 36-37). Sağlıklı lifler arasında parçalanmış, atrofiye uğramış lifler rahatlıkla seçilebilmekteydi. Myokard içerisinde ödem içeren alanların saptanması da önemli bulgularımızdan birisiydi (Şekil 37). LF grubuna ait myokard içerisindeki damarlar histolojik açıdan incelendiğinde bu damarların duvarlarının kalınlaştığı ve bütünlüğünün bozulduğu, hemoziderin ya da fibrin biriktirdiği, yer yer enflamasyona maruz kaldığı ve fibrinoid nekroza uğradığı görüldü. Bu damarların bulunduğu bağ dokusu içerisinde yoğun fibröz içerikli alanlar saptandı. LF grubuna ait sıçanların kalplerinden elde edilen kesitlerde sadece perivasküler alanlarda kalmayıp aynı zamanda diffüz olarak ta seyreden hücre infiltrasyonu izlendi (Şekil 37).

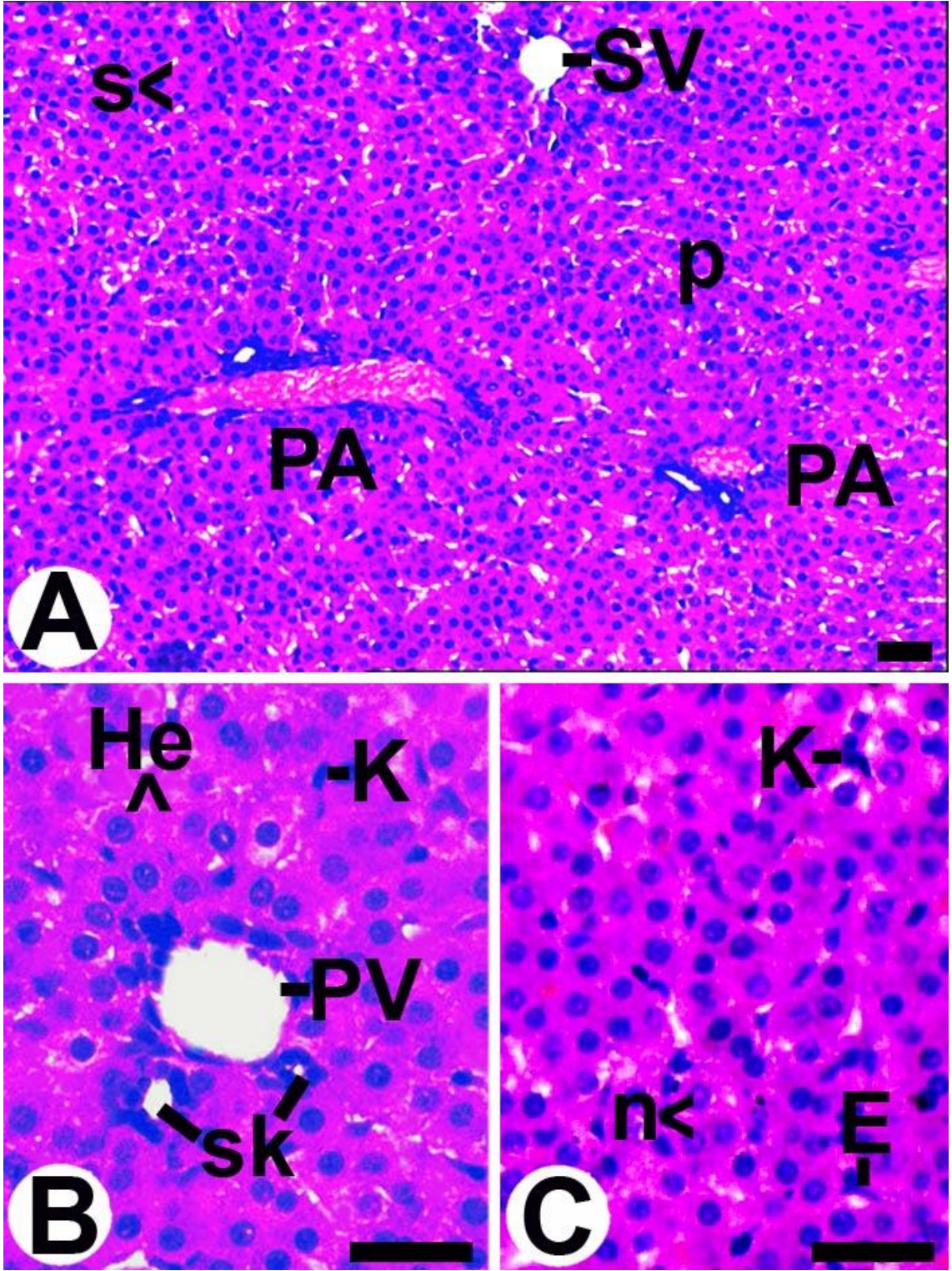


Şekil 37: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **my**, myokard; **in**, lenfoid hücre infiltrasyonu; **ince ok (siyah ve beyaz)**, myositler arasında ve damar duvarında görülen lenfoid hücreler; **beyaz dolgulu okbaşı**, damar duvarında izlenen fibrinoid nekroz; **siyah okbaşı**, bağ dokusu alanlarda görülen lenfoid hücreler; **siyah yıldız**, damar içerisinde gözlenen hemoziderin birikimi; **beyaz yıldız**, damar içerisinde gözlenen pıhtı oluşumu; **çift yıldız**, aralarında geniş boşluklar bulunan atrofik kas lifleri; **beyaz dolgulu yıldız**, dejenere hücrelerden arta kalan yıkıntı alanlarını göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 20 µm.

4.II.2. Yavru Grubuna Ait Bulgular:**4.II.2.A. Yavru Karaciğerine Ait Bulgular:**

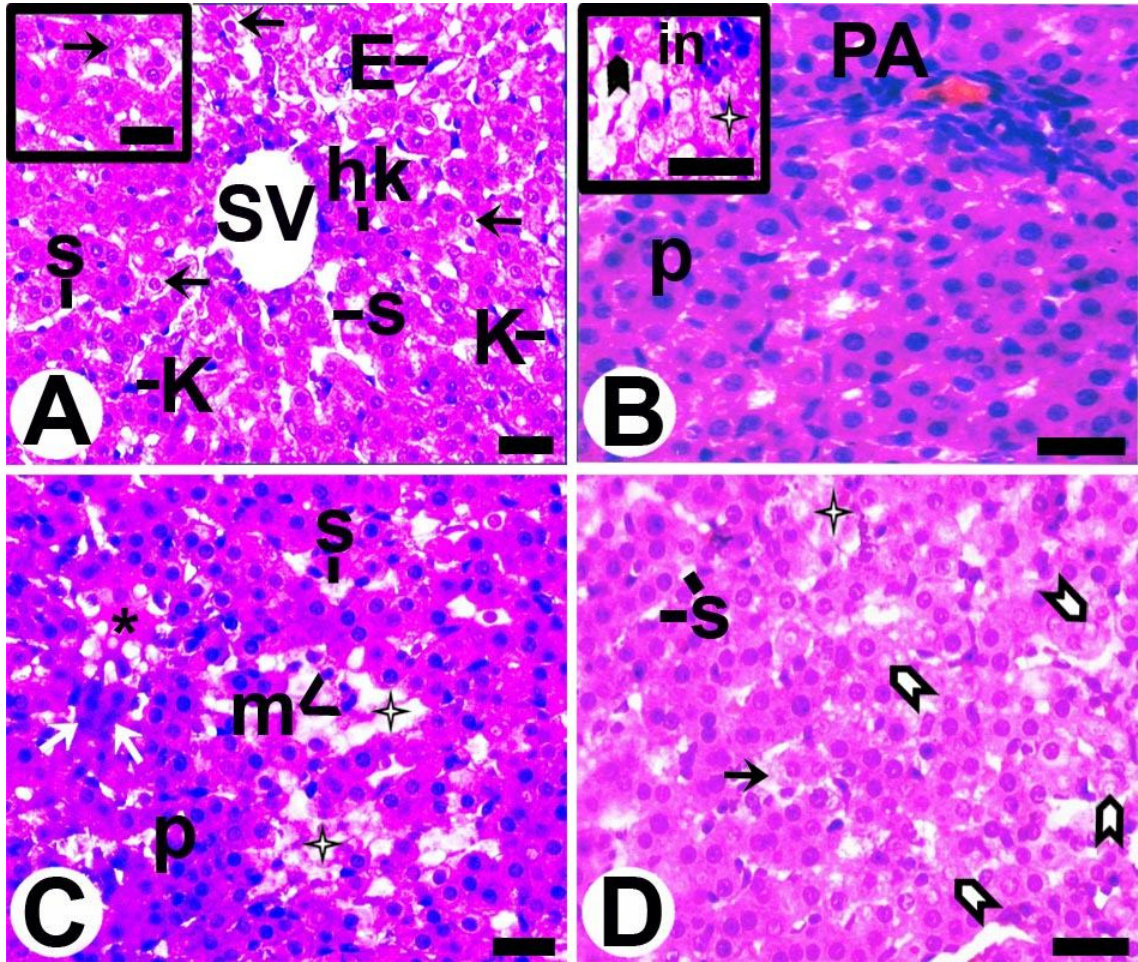
Yavru sıçanların kontrol grubundan elde edilen karaciğer kesitlerinde karaciğerin ince bir bağ dokusu kapsülü (Glisson kapsülü) ile örtülü olduğu görüldü. Organ parankiması klasik karaciğer lobüllerinden oluşuyordu. Lobüllerin merkezindeki santral venden etrafa ışınsal tarzda uzanan hepatosit kordonları lobülün periferinde bağ dokusu ile çevriliydi. Portal alanlardaki geniş bağ dokusu içinde safra kanalları, arter ve venler yer alıyordu.

Parankimayı oluşturan hepatositler poligonal şekilli olup, tek veya çift çekirdekliydi. Bu gruptaki hepatosit kordonları erişkin kontrollerdekine kıyasla daha sıkı paketlenmişti ve kordonlar arasındaki sinüzoidlerin lümeni daha dardı. Sinüzoid duvarında endotel ve Kupffer hücreleri izlendi (Şekil 38).



Şekil 38: Kontrol yavru sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **SV**, santral ven; **p**, parankima; **s**, sinuzoid; **He**, hepatosit; **sk**, safra kanalı; **PA**, portal alan; **PV**, portal ven dalı; **n**, hepatosit nükleusu; **K**, Kupffer hücresini göstermektedir. Boya: HE. Bar= 80 µm.

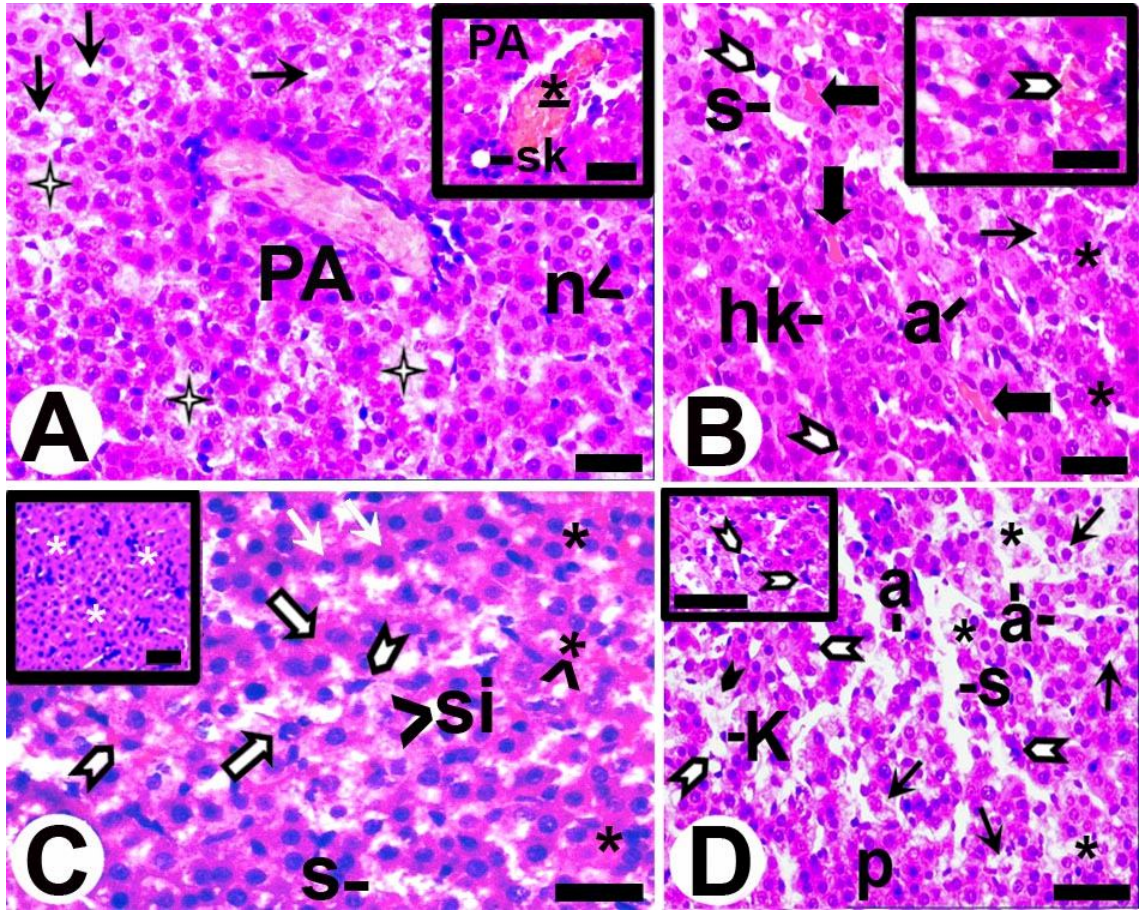
LF uygulanan yavruların karaciğerleri histolojik olarak değerlendirildiğinde; hepatosit kordonlarının yerleşiminin düzensiz olduğu görüldü. Düzensiz kordonlar arasında, nekrotik hücrelerden arta kalmış olması muhtemel soluk boyanmış debris (yıkıntı) alanları gözlemlendi. Bu bölgelerdeki hepatositlerden bazılarının küçülmüş ve yoğunlaşmış olduğu ve koyu eozinofil boyanan sitoplazma içerdiği saptandı. Bu gruba ait hepatositlerden bazılarında sitoplazmik içerik kaybı ya da sitoplazmik şişme dikkat çekiciydi. Farklı alanlarda, çekirdek kromatini boya almamış hepatositler de görüldü. Bazı hepatositler hipertrofiye uğramıştı. Parankim içerisinde hepatositler arasında yerleşmiş hyalin birikimleri ile eozinofil sitoplazmalı ve girintili-çukuntılı yüzeye sahip makrofaj olası hücrelere rastlandı (Şekil 39).



Şekil 39: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **SV**, santral ven; **p**, parankima; **s**, sinuzoid; **PA**, portal alan; **K**, Kupffer hücresi; **E**, endotel hücresi; **m**, makrofaj olası hücreler; **in**, lenfoid hücre infiltrasyonu; **ince ok**, sitoplazmik içerik kaybı olan hepatositler; **çift başlı ok**, çekirdek kromatini boya almamış hücre; **beyaz dolgulu okbaşı**, hepatositler içerisindeki soluk nükleus; **beyaz dolgulu yıldız**, ölü hücrelerden arta kalan yıkıntı alanları; **siyah okbaşı**, koyu nükleusa ve sitoplazmaya sahip küçülmüş hepatosit (B küçük resim); **yıldız**, hepatosit kordonları arasında izlenen hyalin birikimini göstermektedir. **Boya:** HE. **Bar**= 50 µm.

Deney grubu yavru karaciğerlerinde yapılan detaylı histopatolojik incelemede hepatositlerde, parçalanma, hücre sınırlarında düzensizlik ve hidropik dejenerasyon bulguları da saptandı. Sınırları seçilemeyen hepatositlerin bir kısmı kaynaşmış gibi görülürken ileri derecede sitoplazma kaybı olan hepatositlerin sadece çekirdekleri mevcuttu ve bu çekirdekler kümeler halinde idi. Hepatositler arasında küçük kanama alanları görülmektedir. Bazı hepatositlerin çekirdekleri kesit alanında görülen diğer çekirdeklere kıyasla daha bazofil boyanmıştı. Sitoplazması boyanma özelliği bakımından heterojenlik gösteren bazı hepatositler ise sindirilmiş izlenimi vermektedir. Portal ven dallarının lümeninde ve santral ven içinde hemoziderin birikimi görüldü. Kupffer hücreleri içerisinde de fagosite edilmiş hemoziderin partikülleri göze çarpıyordu (Şekil 40). Hepatosit kordonları arasında ise nodüler tarzda yerleşmiş mononükleer hücre infiltrasyonları vardı.

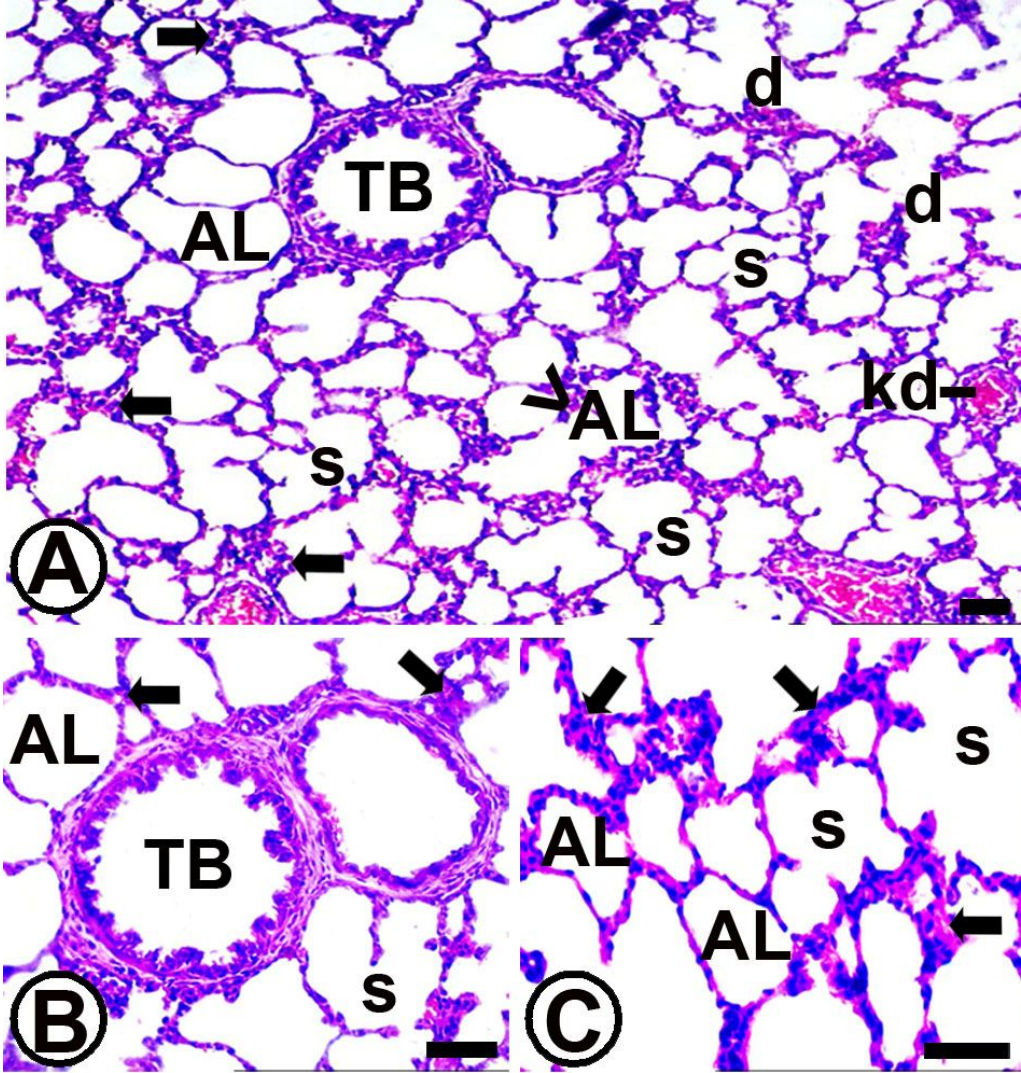
Deney grubuna ait karaciğerlerin sinuzoidlerine bakıldığında kontrol grubunununkilere kıyasla dilate olduğu görüldü. Sinuzoid duvarını oluşturan hücrelerin sınırlarındaki düzensizlikten dolayı sinuzoid lümenleri de düzgün değildi. Bu alanlardaki endotel hücrelerinde hidropik şişme ve Kupffer hücrelerinde de aktivite artışını gösterir tarzda sitoplazmada eozinofillik özelliğin arttığı ve hipertrofi gerçekleştiği gözlenmekteydi (Şekil 40).



Şekil 40: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **s**, sınırları düzensizleşen ve dilate olmuş sinüzoidler; **PA**, portal alan; **sk**, safra kanalı; **a**, bütünlüğünü kaybetmiş hepatosit kordonlarındaki kordon parçalarının birbirinden ayrılma noktaları; **si**, sitoplazması parçalı görülen hepatositler; **kalin ok**, hepatosit kordonları arasındaki sinüzoidal staz; **ince ok**, hidropik dejenerasyona uğramış hücreler; **beyaz ok**, parçalanmış hepatositler; **beyaz dolgulu ok**, düzensiz sınırları ile yıldızimsı görünüm kazanmış hücreler; **beyaz dolgulu ok başı**, hemosiderin yüklü veya sinüzoid lümenine doğru çıkıntı yapmış makrofaj; **siyah okbaşı**, hepatosit kordonları ile endotel hücreleri arasında görülen genişleme; **beyaz yıldız**, hepatosit kordonları arasında izlenen mononükleer hücre infiltrasyonları; **beyaz dolgulu yıldız**, ölü hücrelerden arta kalan boşluklar; **siyah yıldız**, sitoplazma sınırları belirlenemeyen (kaynaşmış gibi görünen) hepatositler; **altı çizili yıldız**, portal ven dalı içerisinde hemosiderin birikimini göstermektedir. **Boya:** HE. **Bar=** 60 µm.

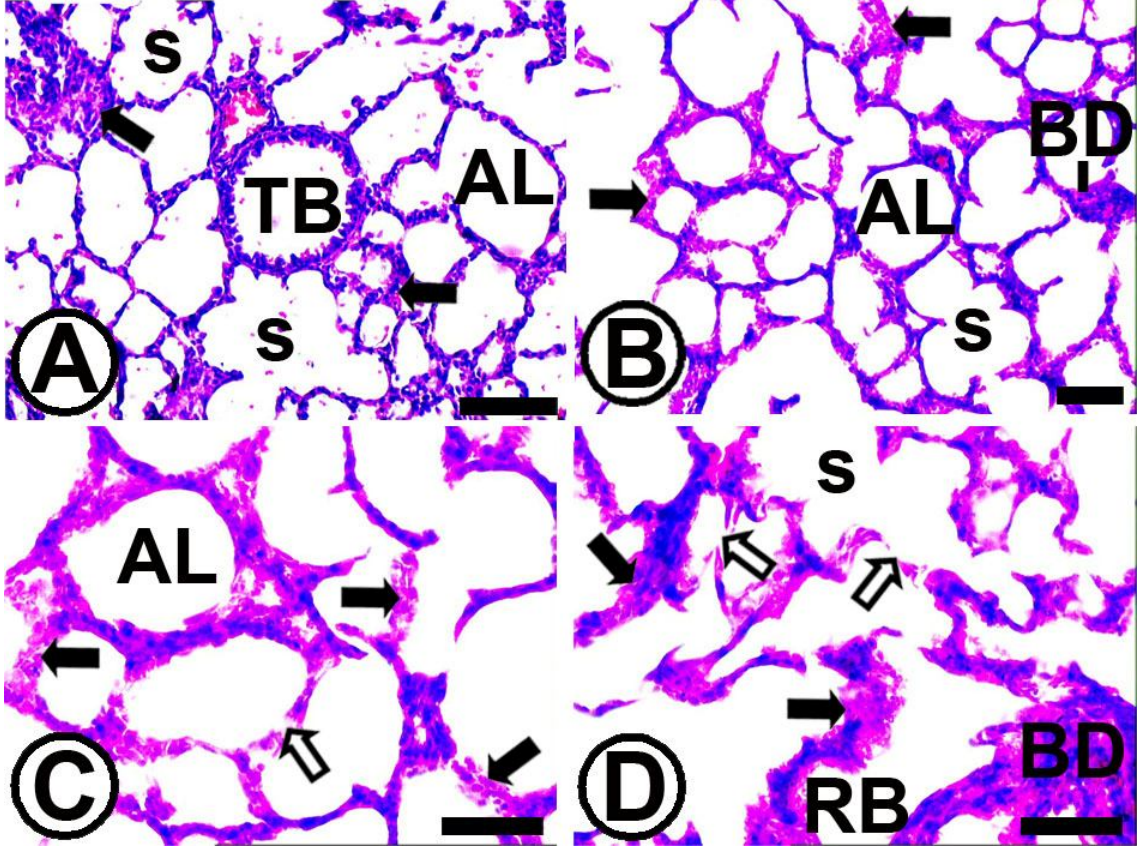
4.II.2.B. Yavru Akciğerine Ait Bulgular:

Kontrol grubunu oluşturan yavru sıçanlardan elde edilen akciğer kesitleri normal histolojik görünümüne sahipti. Akciğer parankimi ince duvarlı alveollerden ve iletili yapılardan oluşmaktaydı. Bu alveollerin duvarları tek katlı yassı epitelle döşeliydi. Alveoller arasında ince bağ dokusu septumları bulunmaktaydı ve bu septumların alveol komşuluklarında kübik septal hücreler yerleşmişti. Ayrıca yine bu septumların alveollere bakan kısımlarında küçük kapillerler de bulunuyordu. Kesitler incelendiğinde çeşitli çaplarda bronşioler bulunmaktaydı. Bronşioler kimi yerlerde sil taşıyan; silindirik veya kübik epitel ile döşeliydi. Bu grupta bronşiolere eşlik eden arter ve ven dalları da normal damar histolojisiyle uyumluydu (Şekil 41).



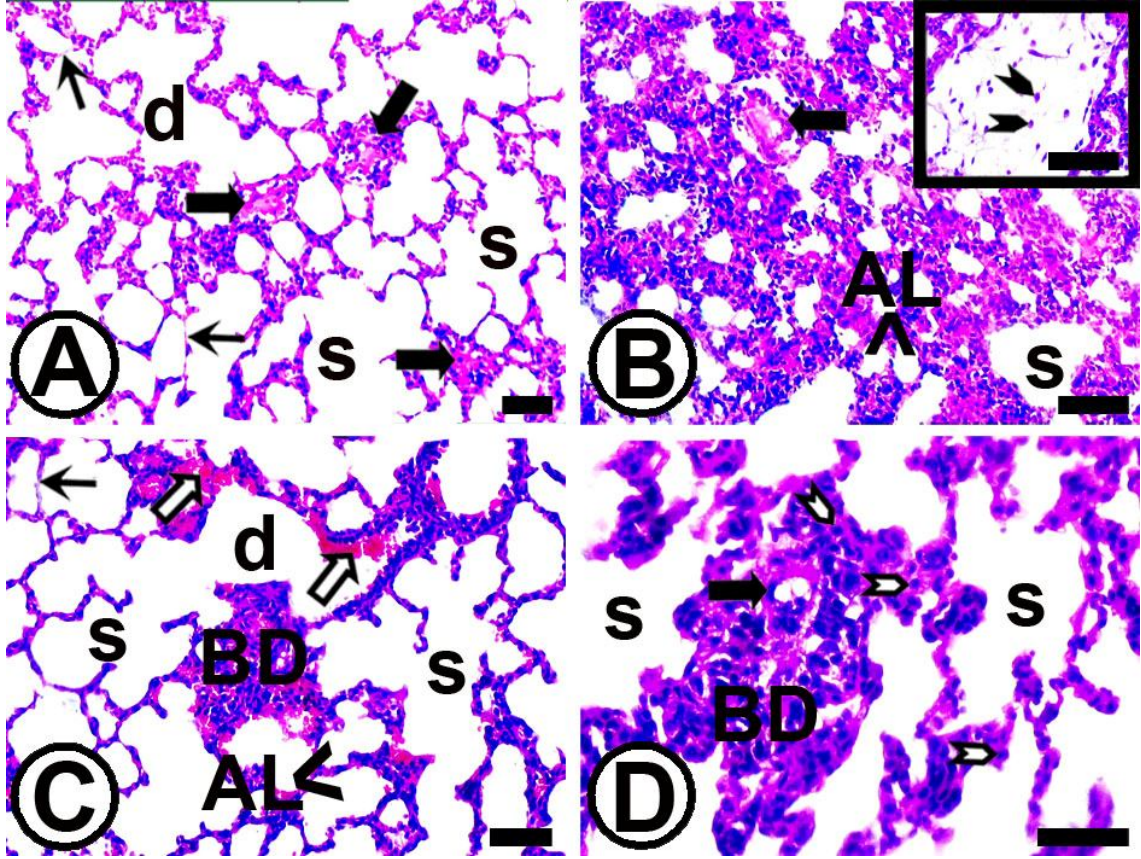
Şekil 41: Kontrol grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. TB, terminal bronşiyol; AL, alveol; s, sacculus alveolaris; d, ductus alveolaris; **kalin ok**, bağ dokusu septumlarını göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 70 µm.

Tek doz LF uygulanan yavru sıçanların akciğerleri histolojik açıdan incelendiğinde alveol yapısının bozulduğu gözlemlendi. Mevcut alveollerin birçoğu kontrol grubundakilere kıyasla genişlemiş halde gözlenirken bazı alveollerin de bütünlüğünü kaybetmiş olduğu tespit edildi (Şekil 41). Alveollerin duvarı kontroldekilere kıyasla daha kalındı ve koyu eozinofil boyanmıştı. Yer yer alveollerin duvar bütünlüğünün bozulduğu görüldü. Ayrıca alveollerin lümeninde eozinofil salgı birikimi saptandı (Şekil 41).



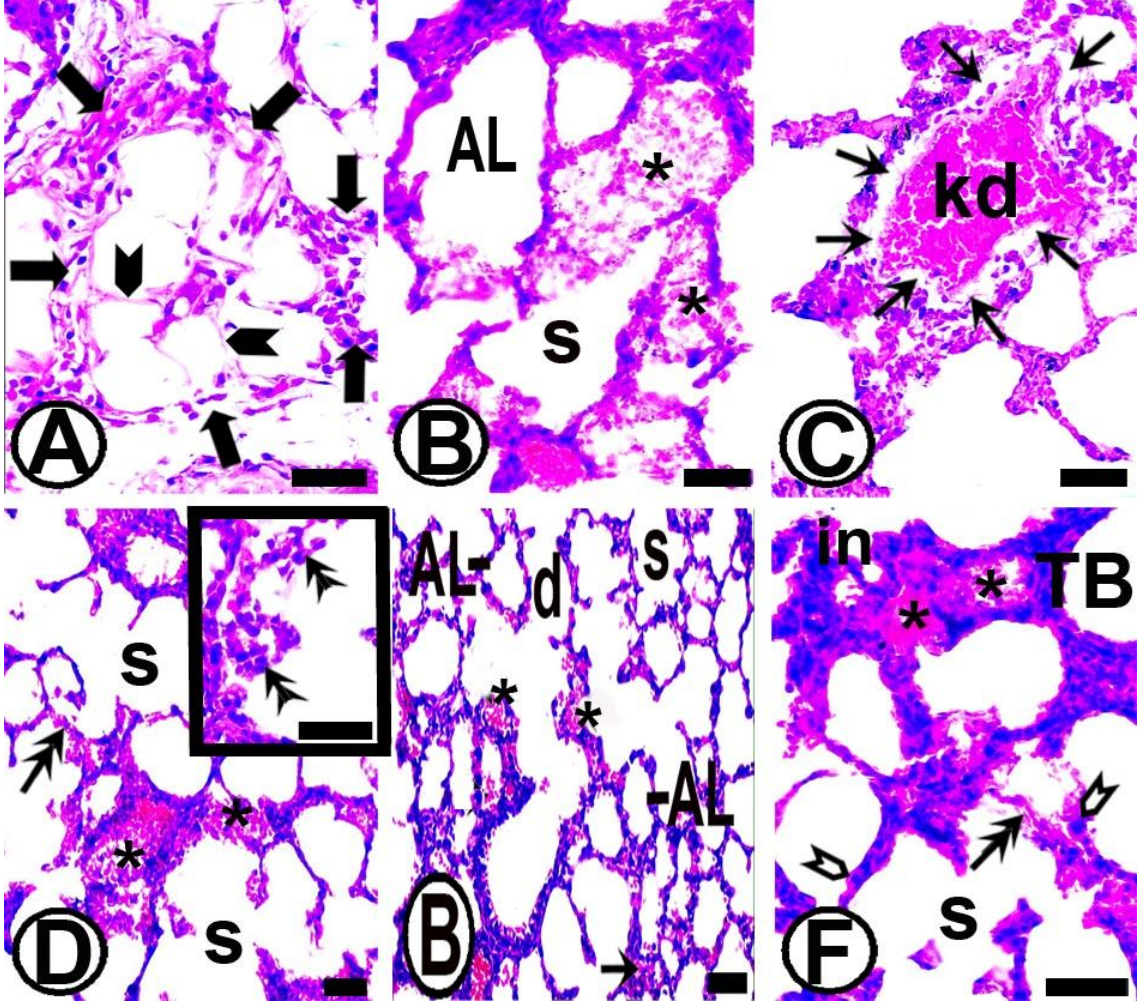
Şekil 41: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **TB**, terminal bronşiol; **RB**, respiratuar bronşiyol; **BD**, bağ dokusu septumu; **AL**, alveol; **s**, sacculus alveolaris; **d**, ductus alveolaris; **kalin ok**, eozinofil boyanmış ve kalınlaşmış duvarlı alveoller; **beyaz dolgulu ok**, duvar bütünlüğü bozulmuş alveolleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 70 µm.

İnteralveollar septumlarda kalınlaşma ve genel anlamda stromada artış gözlemlendi. Ayrıca bu bağ dokusu septumları içerisinde duvarları kontrol grubundakilere kıyasla daha eozinofil boyanmış damarlara rastlandı (Şekil 42).



Şekil 42: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **AL**, alveol; **BD**, bağ dokusu septumu; **s**, sacculus alveolaris; **d**, ductus alveolaris; **kalin ok**, eozinofil boyanmış ve kalınlaşmış duvarlı damarlar; **beyaz dolgulu ok**, alveoller içerisinde ve bronşiyol duvarlarında biriken kan pıhtısı; **ince ok**, incelmış alveol duvarları; **siyah okbaşı**, genişlemiş bağ dokusu septumlar içerisinde gözlenen plazma hücreleri; **beyaz dolgulu okbaşı**, Tip II pnömositleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 70 µm.

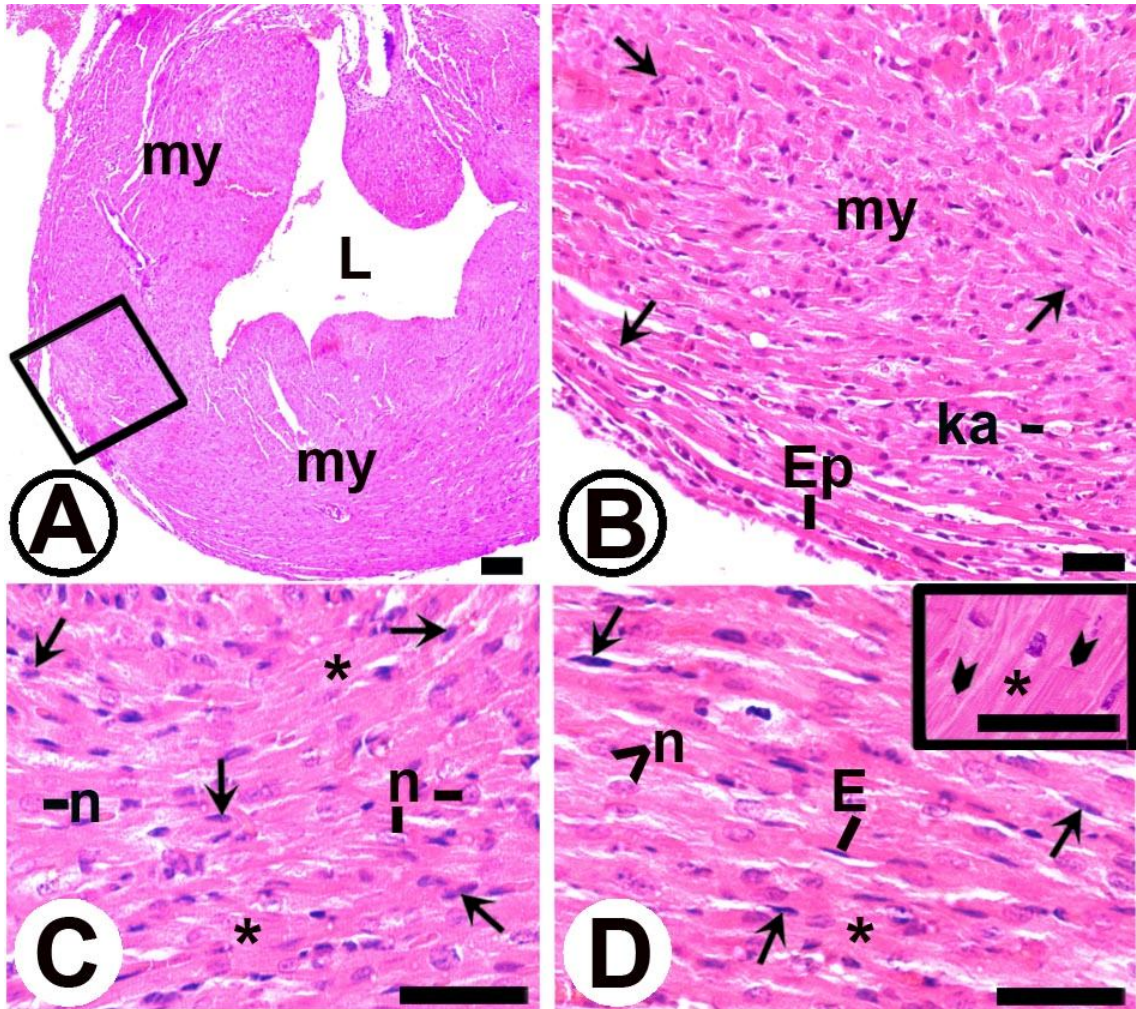
Gerek bu eozinofil duvarlı damarlar içerisinde gerekse bronşiyol ve alveoller içerisinde kan pıhtısı ya da kan hücreleri olduğu düşünülen eozinofil birikimler gözlenmekteydi. Alveollerin duvarları incelmışti ve böyle duvarı incelmış bir grup alveol bağ dokusundan bir kapsül ile çevrenmişti. Yine bağ dokusu septumlarda bulunan damar duvarları da skleroza uğramıştı (Şekil 43).



Şekil 43: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **TB**, terminal bronşiyol; **AL**, alveol; **s**, sacculus alveolaris; **d**, ductus alveolaris; **kd**, kan damarı; **in**, lenfoid hücre infiltrasyonu; **kalin ok**, duvarı incelerek dejenere olmuş alveolleri kuşatan bağ dokusu kapsül; **ince ok**, sklerotik damar duvarı; **siyah okbaşı**, incelmış alveol duvarları; **beyaz dolgulu okbaşı**, eozinofil sitoplazmalı tip II pünömositler; **çift başlı ok**, eozinofil boyanmış ve hücreleri seçilemeyen alveol duvarları; **çift başlı okbaşı**, alveoller içerisinde yer alan makrofajlar; **yıldız**, alveol ve bronşiyoller içerisinde yer alan kan hücreleri ve pıttıdan oluşan eozinofil birikimleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 70 µm.

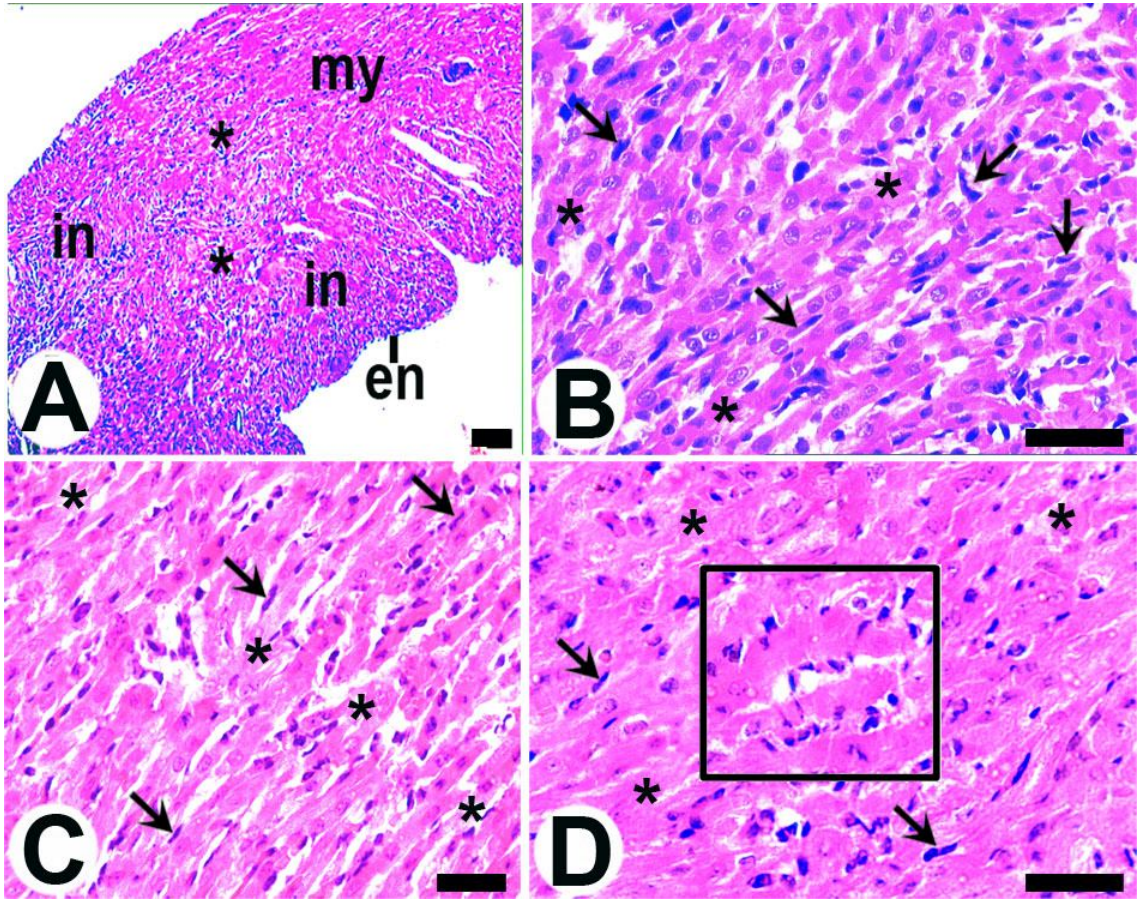
4.II.2.C. Yavru Kalbine Ait Bulgular:

On günlük sıçan yavrularına ait kalp örneklerinden elde edilen kesitler hematoksilin-eozin ile boyandı. Kontrol grubu örneklerinden hazırlanan kesitler ışık mikroskopunda incelendiğinde, kalp kasının yer yer dallanmalar yapan fakat genellikle paralel yerleşimli liflerden oluşan bir düzen içinde olduğu görüldü. Kas lifleri eozin ile soluk pembe renginde boyanmış sitoplazmaya sahipti. Peşpeşe dizilerek lifleri oluşturan her hücre ortada yerleşmiş oval ya da yuvarlak şekilli bir çekirdek içeriyordu. Bazı lifler yan dallarla birbirine bağlanmıştı. Hücreler arasındaki bağlantıyı sağlayan diskus interkalaris adlı bağlantı bölgeleri seyrek olarak göze çarpyordu. Kas lifleri arasında damardan zengin ince bağ dokusu alanlar izlenmekteydi (Şekil 44).



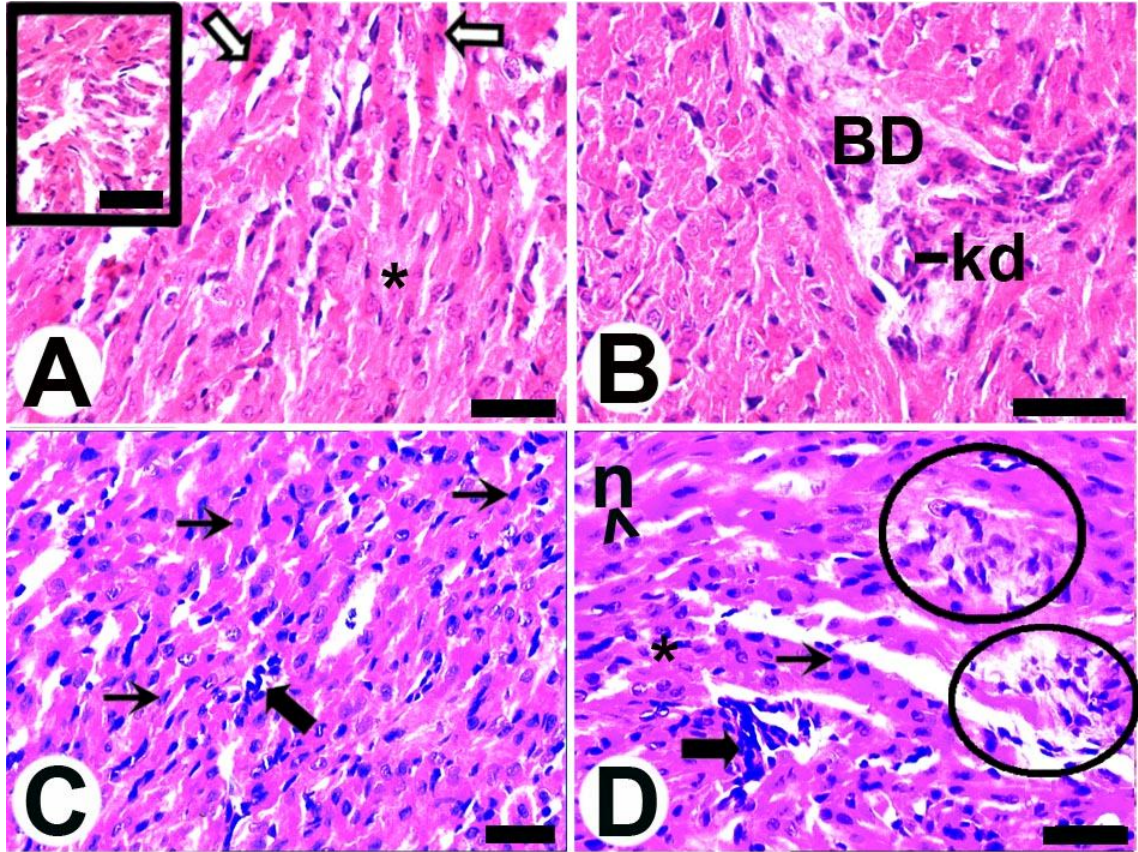
Şekil 44: Kontrol grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **my**, Myokard; **L**, lümen **Ep**, epikard; **E**, endotel hücresi; **ka**, kapiller; **n**, kas hücresi nükleusu; **ince ok**, myositler arasında görülen bağ dokusu hücreleri; **siyah okbaşı**, diskus interkalaris; **yıldız**, myosit sarkoplazmasını göstermektedir. B'de A'daki çerçeveli alan daha büyük büyütmede görüntülenmiştir. **Boya:** HE, **Bar=** 30 µm.

Deney grubundaki sıçan yavrularından elde edilen ışık mikroskopik görüntüler incelendiğinde kas liflerinin kontrol grubuna kıyasla bozuk şekilli olduğu görüldü. Bazı liflerin dış hatları etraflarındakilere kıyasla düzensizdi ve sitoplazmaları da daha eozinofildi. Bu eozinofil sitoplazmalı liflerin bir kısmı nekrotik değişiklikler sergilemekteydi ve etrafında dizilmiş lenfoid hücreler ile oldukça dikkat çekiciydi (Şekil 45). Lifler arasında seyreden bağ dokusu alanların genişlemiş olduğu görüldü. Bu genişlemiş bağ dokusu içerisinde duvarları dejenere olmuş damarların ve lenfoid hücrelerin yanı sıra iri çekirdekleri ve eozinofil sitoplazmaları ile belirgin fibroblastlara ve yine iri koyu yassı çekirdekli makrofaj olası hücrelere rastlandı (Şekil 45).



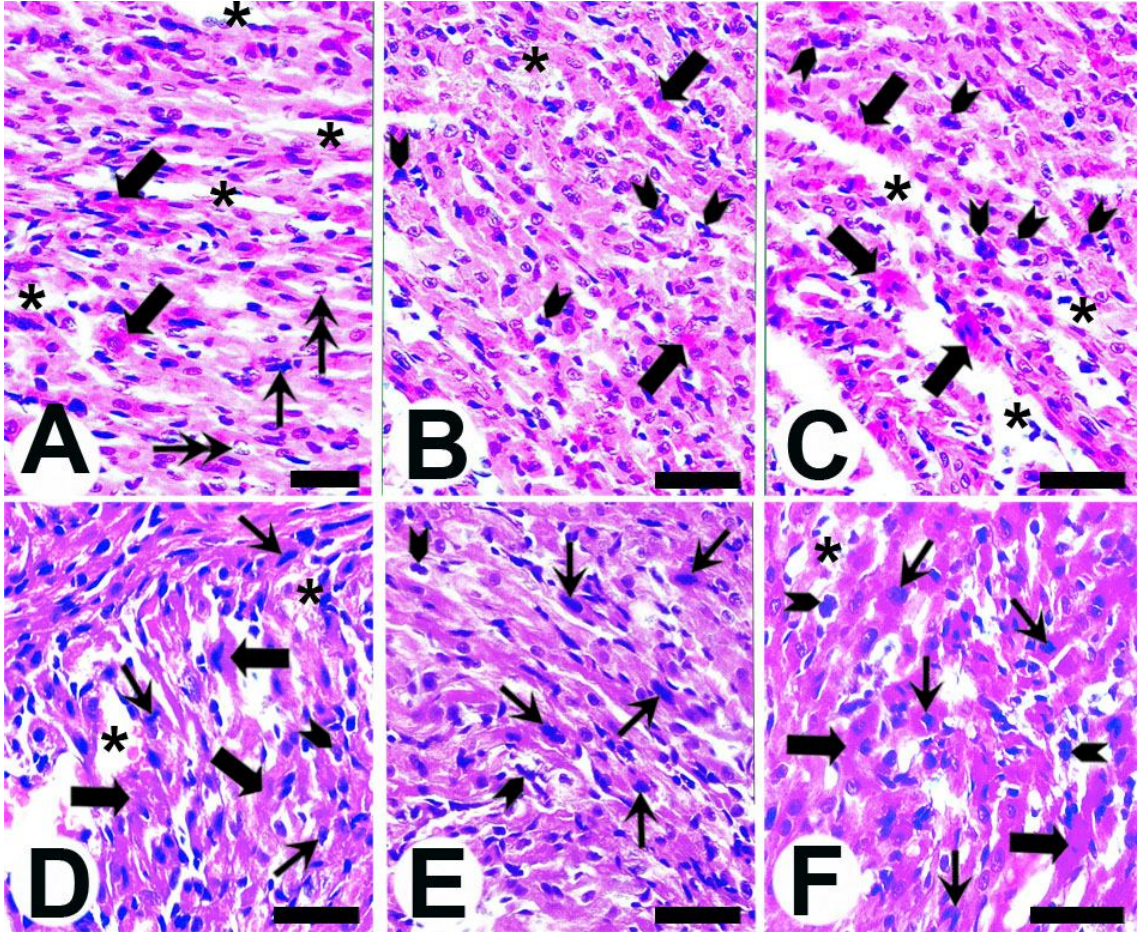
Şekil 45: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **my**, myokard; **en**, endokard; **in**, lenfoid hücre infiltrasyonu; **ince ok**, myositler arasında görülen bağ dokusu hücreleri; **yıldız**, sağlıklı görünümünü yitirmiş sarkoplazma alanları; **D'deki çerçeveli alan**, düzgün sınırlı yapısını kaybetmiş eozinofil sarkoplazmalı kas liflerini göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 30 µm.

Tek doz LF uygulanan sıçan yavrularının kalp dokular ışık mikroskobu altında incelendiğinde organ parankimi içerisinde atrofiye uğramış olduğu düşünülen kas lifleri bulunmaktaydı (Şekil 46). Kalp kası lifleri arasında diffüz tarzda lenfoid hücre infiltrasyonları da dikkat çekmekteydi (Şekil 46).



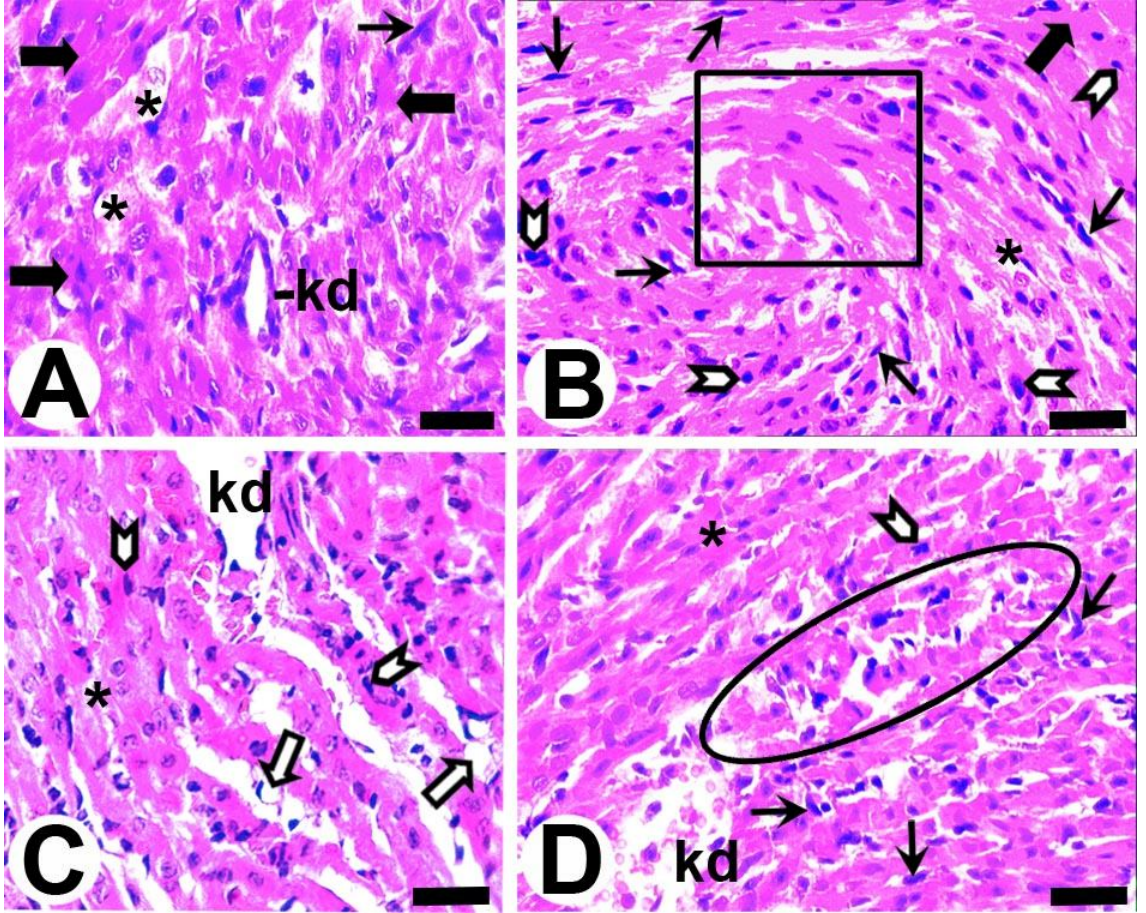
Şekil 46: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **BD**, bağ dokusu; **kd**, kan damarı; **kalin ok**, lenfoid hücre infiltrasyonu; **ince ok**, dejenere olmuş miyositlerin nükleusları;; **Beyaz dolgulu ok**, düzenli sınırlarını yitirmiş eozinofil sarkoplazmalı miyositler; **yıldız**, sağlıklı görünümünü yitirmiş sarkoplazma alanlarını göstermektedir. **D'deki çerçevelenmiş alanlarda ve A'daki Küçük resimde** dejenere olan miyositlerin oluşturduğu bir alan görülmektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 50 µm.

Parankim içerisinde parçalanmış myositlerin oluşturduğu geniş sahalar mevcuttu. Bu ölü alanların etrafında da polimorf çekirdekli lökositler makrofajlar ve histolojik görünümü ile aktif oldukları anlaşılan fibroblastlar bulunmaktaydı (Şekil 47). Kas liflerinde periferik yerleşimli vakuolizasyonlar vardı ve yine bu hücrelerde enzimatik sindirimi düşündüren hücre erimesi tespit edildi (Şekil 47). Myosit çekirdekleri yer yer küçülmüş ve düzenli sınırlarını kaybetmişti. Bazı çekirdekler koyu bazofil boyanmıştı ve bu çekirdeklerin morfolojik yapısı kontrol grubundakinden farklı görünüm kazanmıştı. Liflerin kesintiye uğradığının saptanması ise hücreler arası bağlantıların dejenere olduğunu düşündürmekteydi (Şekil 47).



Şekil 47: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **kalın ok**, atrofiye uğrayarak küçülmüş eozinofil sarkoplazmalı myositler; **ince ok**, myositlerin koyu bazofil çekirdekleri; **çift başlı ok**; vakuol içerikli ve parçalanmış myosit çekirdekleri; **Beyaz dolgulu okbaşı**, myositler arasında görülen fibroblastlar; **siyah okbaşı**, myositler arasında bulunan lenfoid hücreler; **yıldız**, sağlıklı görünümünü yitirmiş myositler arasındaki geniş boşluklar; beyaz dolgulu okbaşı; sarkoplazma sınırı seçilemeyen myositleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 30 µm.

Kas liflerinin arasında seyreden damarların duvarları kalınlaşmakla birlikte bazı damarlarda endotel hatları da seçilememektedir. Bazı küçük çaplı damarlarda ise dilatasyonla birlikte lümen içerisindeki pıhtı oluşumu dikkat çekmekteydi. Bu hasarlanmış damarların etrafında eozinofil sarkoplazmalı ve hücre sınırları düzgün yapısını kaybetmiş olan çok sayıda myosit bulunmaktaydı. Myositler arasındaki genişlemiş bağ dokusu alanlarda duvar bütünlüğü bozulmuş damarların bulunması da dikkati çeken başka bir bulguydu (Şekil 48).

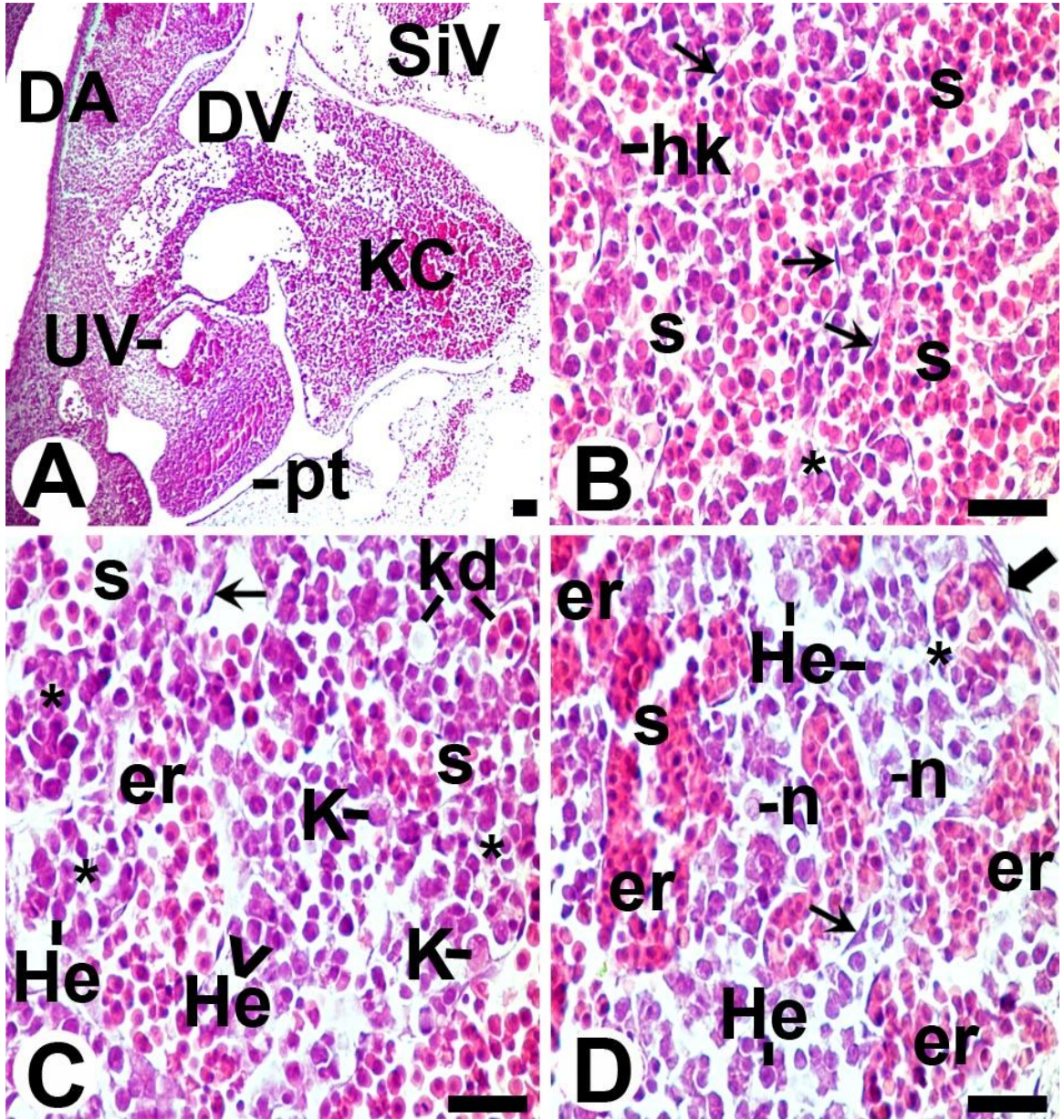


Şekil 48: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **kd**, kalın duvarlı (A) ve duvarı bütünlüğü bozulmuş (C, D) kan damarı; **kalın ok**, eozinofil sarkoplazmalı myositler; **ince ok**, myositler arasında bulunan fibroblastlar; **beyaz dolgulu ok**, myositlerin periferinde yer alan vakuolizasyonlar; **beyaz dolgulu okbaşı**, dejenere myositlere ait koyu bazofil çekirdekler; **yıldız**, sağlıklı görünümünü yitirmiş myositler arasındaki geniş boşluklar; **B'deki çerçeve**, kan pıhtısı içeren ve etrafında eozinofil sarkoplazmalı dejenere myositler bulunan alan; **D'deki çerçeve**, dejenere olarak bütünlüğünü yitirmiş myositlerden oluşan alanı göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 30 µm.

4.II.3. Prenatal Gruplara Ait Bulgular:

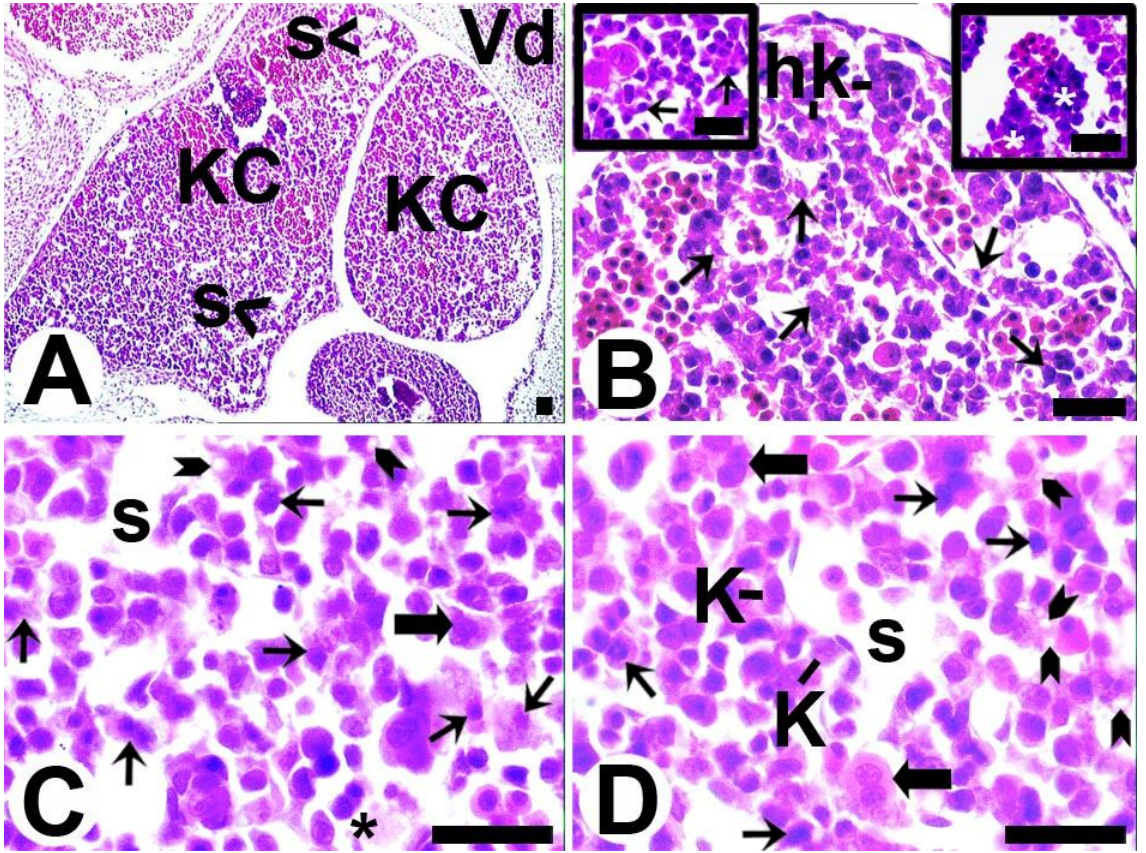
4.II.3.A. Oniki Günlük Embriyo Karaciğerine Ait Bulgular:

12 günlük sıçan embriyolarına ait kesitler histolojik açıdan değerlendirildiğinde karaciğerin anatomik olarak kalbin hemen altında yer aldığı görüldü. Organın içerisinden fetal dolaşım sisteminin bir parçası olan duktus venozus geçmekteydi. Oniki günlük embriyo karaciğerleri erişkin karaciğerine kıyasla bazı farklılıklar göstermekteydi. Karaciğer bu dönemde hematopoetik bir organ görünümündeydi. Sinüzoidler içerisinde çok sayıda, gelişimin çeşitli aşamalarında bulunan kan hücreleri izleniyordu. Hepatositler erişkin karaciğer parankimini oluşturan olgun hepatositlere kıyasla daha küçük olmakla birlikte sitoplazma/çekirdek oranı da daha düşüktü ve sinüzoidler arasında adacıklar oluşturmaktaydı. Sinüzoid duvarlarında endotel hücreleri arasında yerleşik Kupffer hücreleri göze çarpılmaktaydı (Şekil 49).



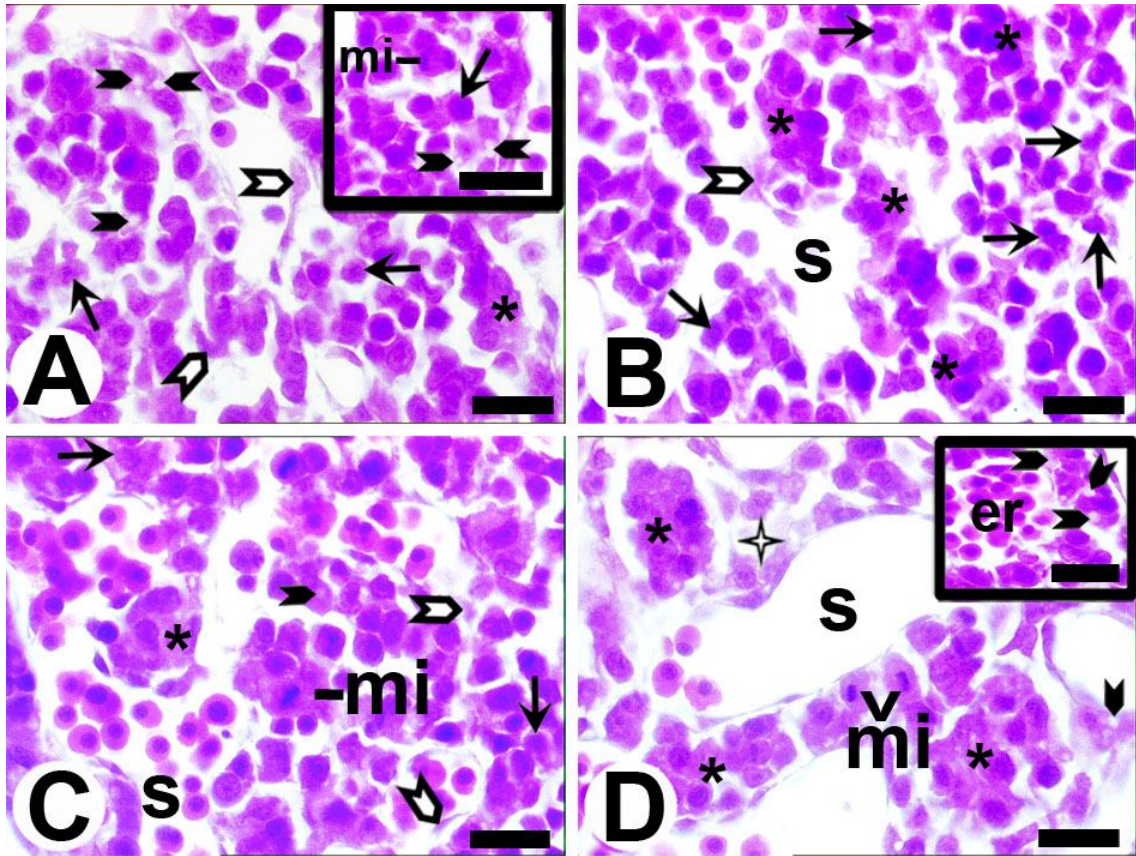
Şekil 49: Kontrol grubundaki 12 günlük siçan embriolarından elde edilen karaciğer kesiti. **DA**, dorsal aorta; **SiV**, sinüs venosus; **DV**, ductus venosus; **VI**, vena cava inferior; **UV**, umbilical ven; **KC**, karaciğer; **pt**, periton boşluğu; **hk**, hepatosit kordonu; **s**, sinüzoid; **kd**, kan damarı; **er**, eritrosit öncülü olan hücreler; **K**, Kupffer hücresi; **He**, hepatosit; **n**, nükleus; **kalin ok**, kapsül; **ince ok**, sinüzoid duvarlarındaki endotel hücreleri; **yıldız**, hepatosit adacıklarını göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 50 µm.

Tek doz LF uygulanan gebe sıçanlardan elde edilen 12 günlük embriyolar histolojik açıdan değerlendirildiğinde karaciğerler içerisindeki sinüzoidlerin kontrol grubundakilere kıyasla genişlediği görüldü. Hepatosit adacıklarında kontrol grubundakilere kıyasla daha eozinofil sitoplazmalı hücreler bulunmaktaydı. Parankim içerisinde etraflarındaki hepatositlerden daha iri olanlara rastlandı. Bu hepatositlerden bazıları çift çekirdekliydi. Bir kısım hepatositler ise küçülmüştü ve bu küçülmüş hepatositler bir araya gelerek kümeler oluşturmaktaydı (Şekil 50).



Şekil 50: Deney grubundaki 12 günlük sıçan embriyolarından elde edilen karaciğer kesiti. **VD**, vücut duvarı; **KC**, karaciğer; **hk**, hepatosit kümesi; **s**, sinüzoid; **K**, Kupffer hücresi; **kalin ok**, etraflarındakilere göre daha iri ve çift çekirdekli olan hepatositler; **ince ok**, sitoplazma ve çekirdeği dejenere olan hücreler; **siyah okbaşı**, parankim içerisindeki vakuol içeren hücreler; **siyah yıldız**, içerisinde eozinofil birikim bulunan sinüzoid; **beyaz yıldız**, küçülerek kümelenme gösteren hepatositleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 50 µm.

Sinüzoid sınırları tam olarak ayırd edilemiyordu ve hücre sınırları düzensizdi. Gerek hepatositlerde gerekse kan hücrelerinde sitoplazma kenarları çıkıntılıydı ve bazı alanlarda hücre sitoplazmaları kaynaşmış görünüyordu. Ayrıca parankimal hücreler içinde vakuoler oluşumlar da mevcuttu. Sinüzoidler incelendiğinde ölü hücre artığı olası eozinofil yapılar içerdiği tespit edildi (Şekil 51). Sinüzoidleri çevreleyen hepatosit adacıklarında yer yer mitotik figürler göze çarpmaktaydı (Şekil 51).

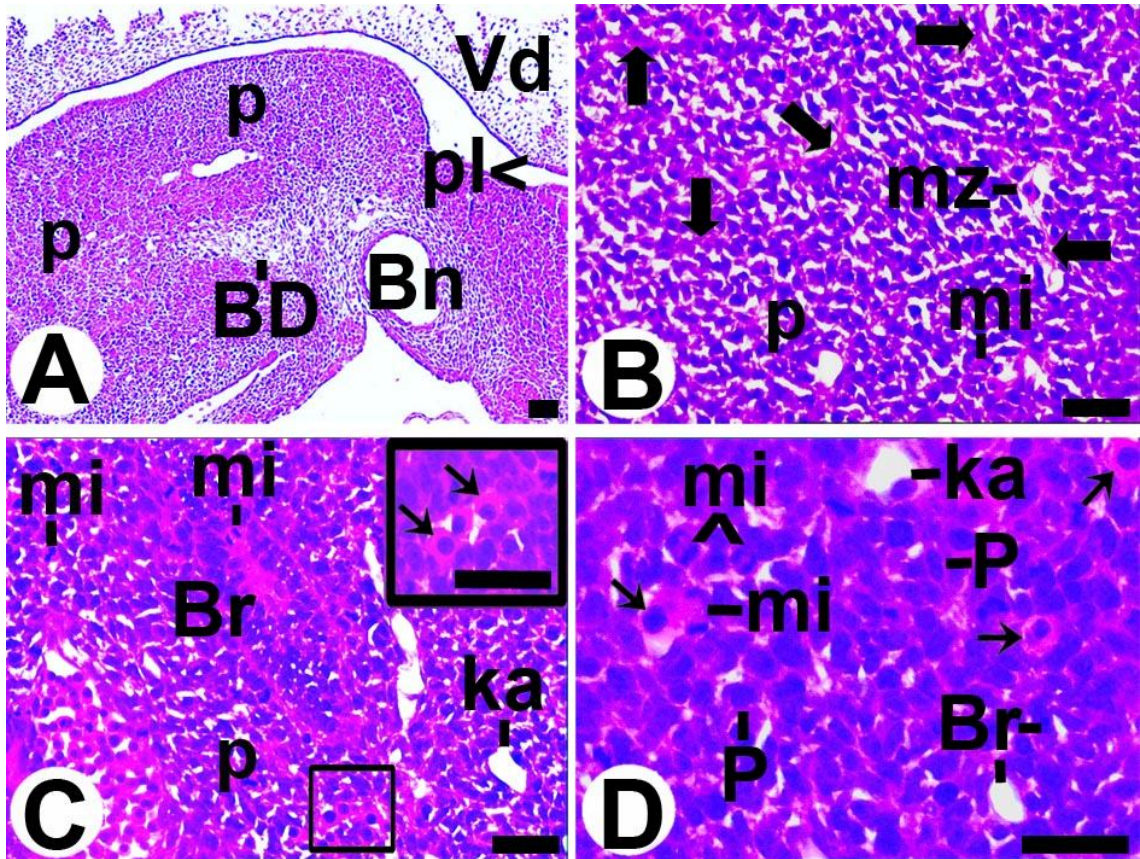


Şekil 51: Deney grubundaki 12 günlük sıçan embriyolarından elde edilen karaciğer kesiti. **s**, sinüzoid; **mi**, mitotik figür; **er**, eritrosit öncülü olan hücreler; **ince ok**, sitoplazma ve çekirdeği dejenere olarak küçülen hepatositler; **Beyaz dolgulu okbaşı**, sinüzoid duvarında dejenere olan yada normalden daha iri görülen endotel hücreleri; **siyah okbaşı**, parankim içerisindeki vakuol içeren hücreler; **yıldız**, sitoplazmaları ayırd edilemeyen ve kaynaşmış görülen hepatositler; **beyaz dolgulu yıldız**, hepatosit adacıkları içerisinde görülen boşlukları göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 40 µm.

4.II.3.B. Oniki Günlük Embriyo Akciğerine Ait Bulgular:

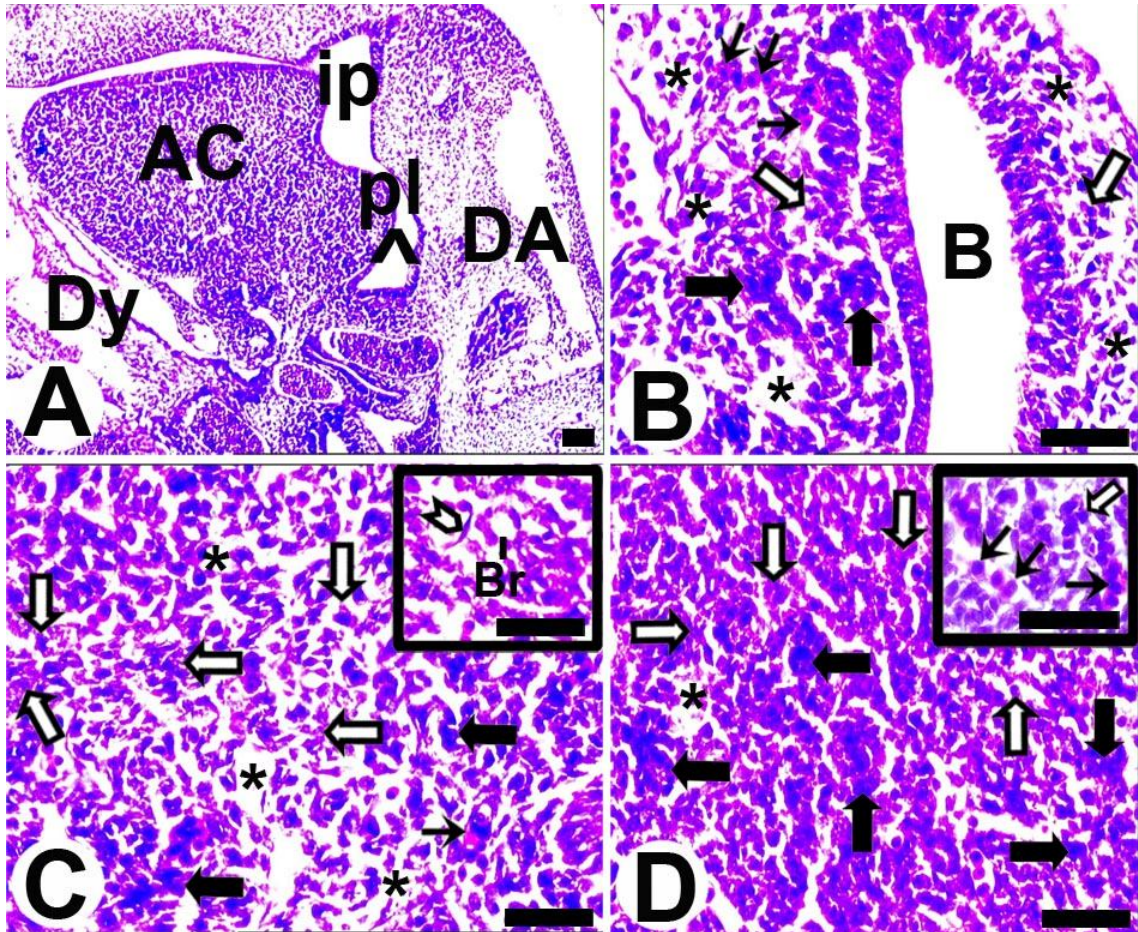
On iki günlük sıçan embriolarından elde edilen akciğerler histolojik olarak değerlendirildiğinde bu akciğerlerin gelişimin erken pseudoglandüler evresinde olduğu tespit edildi. Akciğer parankimi sıkıca bir araya gelmiş parankimal hücrelerden oluşuyordu. Hücreler arasında mitotik figürler mevcuttu. Bronşların duvarını döşeyen respiratuar epitel ve bronşiyol taslaklarında ise kübik ya da silindirik epitel gözlemlendi. Akciğer dokusu içerisinde büyük ve küçük çaplı damarlar seçiliyordu. Ayrıca parankimal hücreler arasında eozinofil sitoplazmalı makrofaj oldukları tahmin edilen hücrelere de rastlandı. Gelişmekte olan bronşiyol taslakları nadiren göze çarpıyordu ve bu yapıların epitelleri kübikti.

Mezenkimal bağ dokusundan oluşan akciğer interstisyumu içerisinde, stromal lif ve düz kas öncüsü olduğu düşünülen eozinofil boyanmış yapılar bulunuyordu (Şekil 52).



Şekil 52: Kontrol grubundaki 12 günlük sıçan embriolarına elde edilen akciğer kesiti. **Vd**, vücut duvarı; **pl**, plevra; **p**, akciğer parankimi; **BD**, bağ dokusu; **Bn**, bronş; **Br**, bronşiyol; **ka**, kapiller; **mi**, mitotik figür; **mz**, mezenkimal hücreleri; **P**, parankimal hücreler; **kalin ok**, akciğer interstisyumu; **inceok**, parankim içerisindeki makrofaj olası eozinofil sitoplazmalı hücreleri göstermektedir. C deki küçük resim çerçeveli alanı daha yakından göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 50 µm.

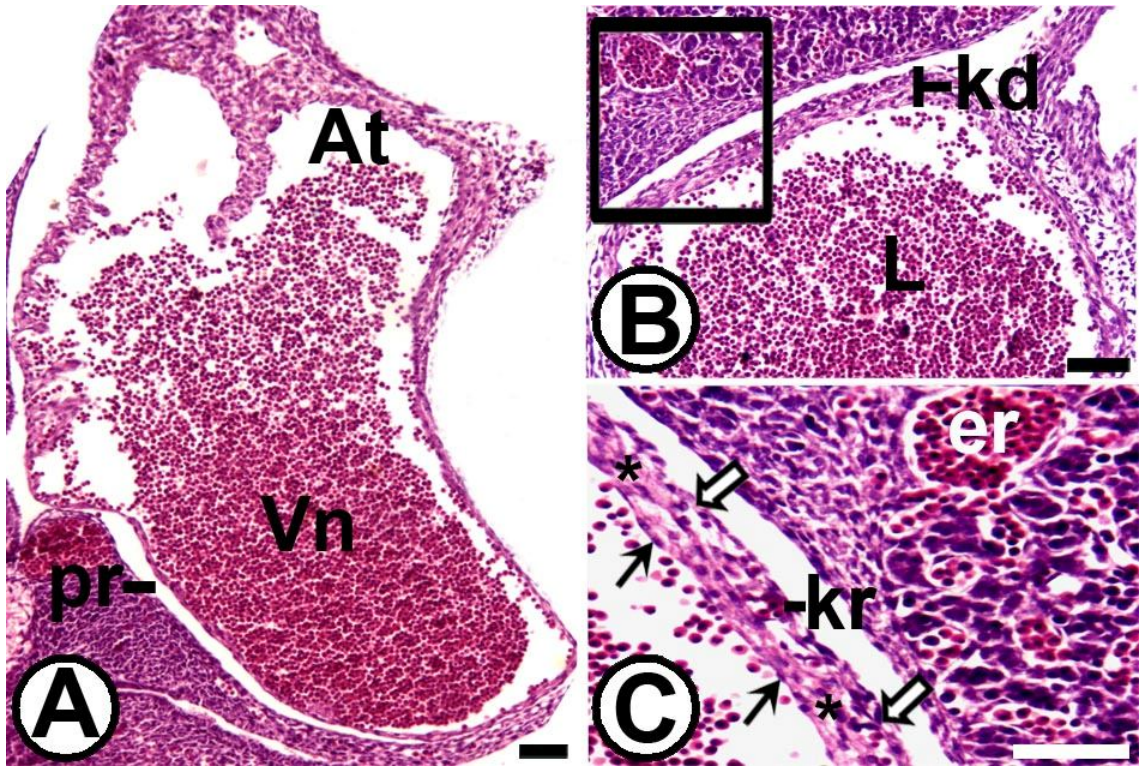
Tek doz LF uygulanan gebelerden elde edilen 12 günlük embriyoların akciğer kesitlerine bakıldığında ilk göze çarpan bulgu hücrelerinin kontrol grubundaki kadar sık yerleşimli olmadıklarıydı. Hücreler arası boşluklar kontrol grubundakine kıyasla artmıştı. Akciğer dokusu vaskülarize olmakla birlikte damar duvarları bütünlüğünü yitirmişti. Parankimi oluşturan hücrelerin sınırları bozulmuştu ve bu hücrelerden bazıları parçalanmıştı. Hücreler arası boşluklarda dejenere hücrelerden oluşan parçacıklar yer alıyordu. Şöyle ki; bu hücrelerin sitoplazma sınırları düzensizdi ve bazı alanlarda hücrelerin sınırları kaynaşmıştı ya da bu hücreler yığınlar oluşturmuştu. Bu gruba ait akciğer örneklerinde damarlarda dilatasyon geliştiği saptandı. Epitel hücrelerinin lümenine bakan yüzleri de hasarlanmıştı. Deney grubundan elde edilen akciğerlerin parankimi içerisinde makrofaj olduğu düşünülen eozinofil sitoplazmalı hücrelere kontrol grubundakinden daha sıklıkla rastlanıyordu (Şekil 53).



Şekil 53: Deney grubundaki 12 günlük sıçan embriyolarından elde edilen akciğer kesiti. **DA**, dorsal aorta; **AC**, akciğer; **Dy**, diyafram; **pl**, plevra; **ip**, intraplevral kese; **kd**, kan damarı; **B**, bronş taslağı; **Br**, bronşiol taslağı; **kalin ok**, küçülerek kümelenme gösteren hücreler; **inceok**, parankim içerisindeki makrofaj olası, sitoplazma sınırları düzensiz ve eozinofil sitoplazmalı hücreler; **beyaz dolgulu ok**, parankim içerisindeki dejenere olmuş hücreler; **yıldız**, parankim içerisinde görülen dilate olmuş damarları göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 50 µm.

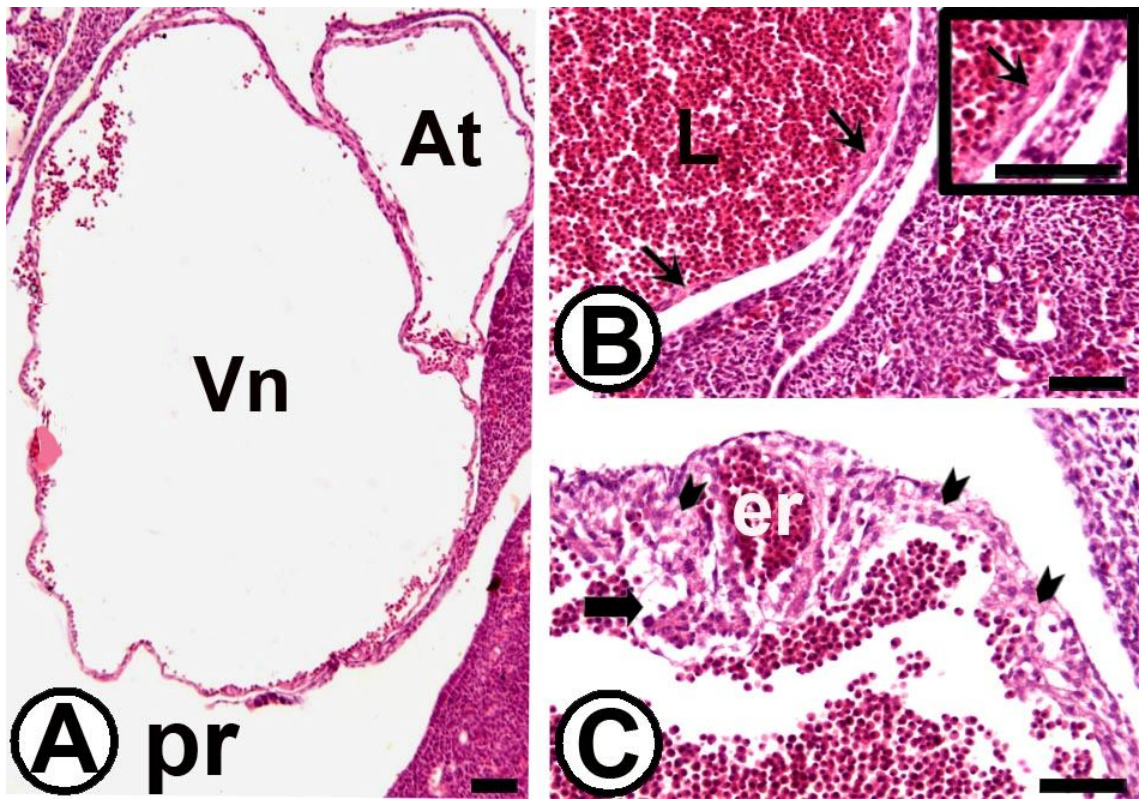
4.II.3.C. Oniki Günlük Embriyo Kalbine Ait Bulgular:

On iki günlük sıçan embriyolarının kalpleri histolojik olarak incelendiğinde kalp lümeninin ince bir duvar ile çevrili olduğu görüldü. Atriyum ve ventriküller birbirinden ayırt edilebilmekteydi bununla birlikte atriyal ve ventriküler septumlar henüz oluşmamıştı. Lümen içerisinde çok sayıda çekirdekli eritrosit bulunmaktaydı. Kalp duvarını oluşturan tabakalar değerlendirildiği zaman; bu tabakaların tek katlı yassı epitelden oluşan endokard, 1-2 sıra kas lifinden oluşan myokard ve koroner damar taslaklarını da içeren perikard olarak şekillendiği görüldü. Kas liflerinin sitoplazması soluk eozinofil boyanmıştı ve oval ya da yuvarlak çekirdekliydi. Hücreler kısa boyliydu ve çekirdek hücrenin ortasında yerleşmişti (Şekil 54).



Şekil 54: Kontrol grubundaki 12 günlük sıçan embriyolarından elde edilen kalp kesiti. Vn, ventrikül lümeni; At, atriyum lümeni; pr, perikardiyal kese; kd, kalp duvarı; L, lümen; er, eritrosit öncülü hücreler; kr, koroner damar, **ince ok**, endokard; **beyaz dolgulu ok**, epikard; **yıldız**, myokard; C’de B’deki çerçevede görülen alan daha yakından görülmektedir. **Boya:** HE, **Bar=** 50 µm.

Deney grubunu oluşturan 12 günlük embriyoların kalp kaslarının yer yer, kontrol grubunda gözlenmeyen daha kalın ve süngerimsi görünüşte alanlara sahip olduğu görüldü. Hem kas lifleri arasında hem de kas lifleriyle endokardı oluşturan endotel tabakası arasında boşluklar vardı. Ayrıca bu gruptaki kas liflerinin sınırları düzensizdi ve bir kısmı küçük çaplı vakuoller içermekteydi. Kimi bölgelerdeki kas lifleri ise kontrol grubundakilere kıyasla daha eozinofil boyanmıştı ve kalp duvarı daha inceydi. Buradaki liflerin sınırları ayırt edilemiyordu ve lifler birbirleriyle kaynaşmış gibi görünüyordu. (Şekil 55).

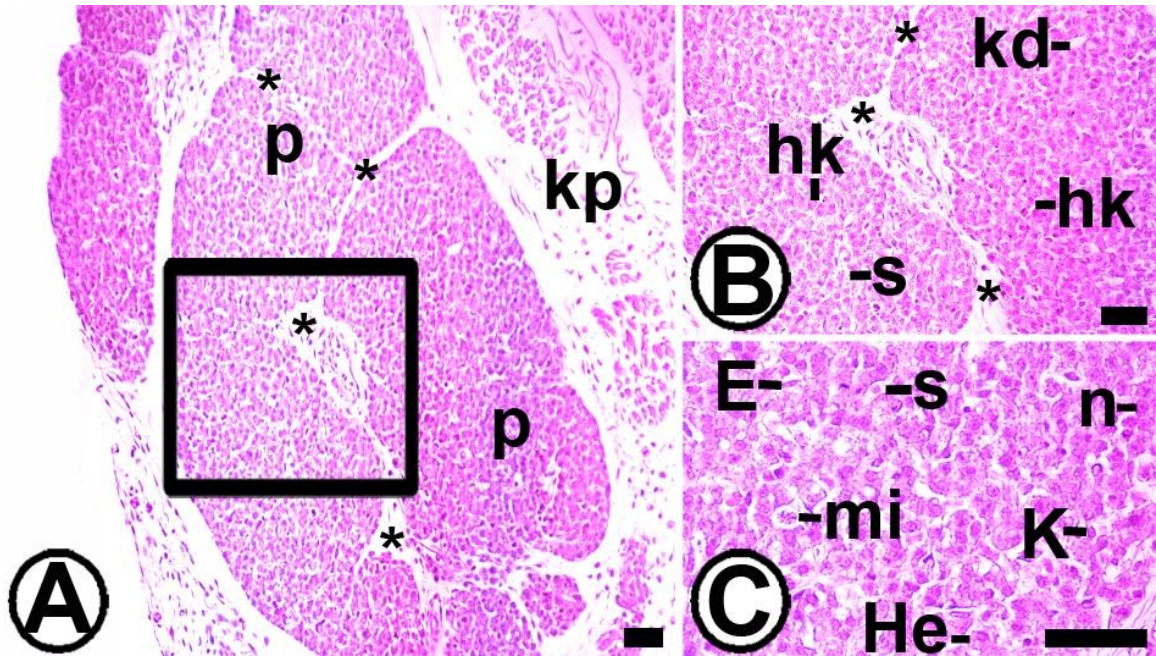


Şekil 55:Deney grubundaki 12 günlük sıçan embriyolarından elde edilen kalp kesiti. **Vn**, ventrikül lümeni; **At**, atriyum lümeni; **pr**, intraperikardiyal kese; **L**, lümen; **er**, koroner damar lümeninde yer alan eritrosit öncülü hücreler; **ince ok**, eozinofil boyanmış ve çekirdekten fakir görülen kalp duvarı; **Kalın ok**, Myokard ile endokard arasında yer alan geniş boşluklar; **siyah okbaşı**, myositler içerisindeki vakuolleri göstermektedir. B'deki küçük resimde lif sınırlarının ayırt edilemediği eozinofil boyanmış ve az sayıda çekirdek içeren kalp duvarı yakından izlenmektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 60 µm.

4.II.4. Onaltı Günlük Fetüs Grubuna Ait Bulgular:

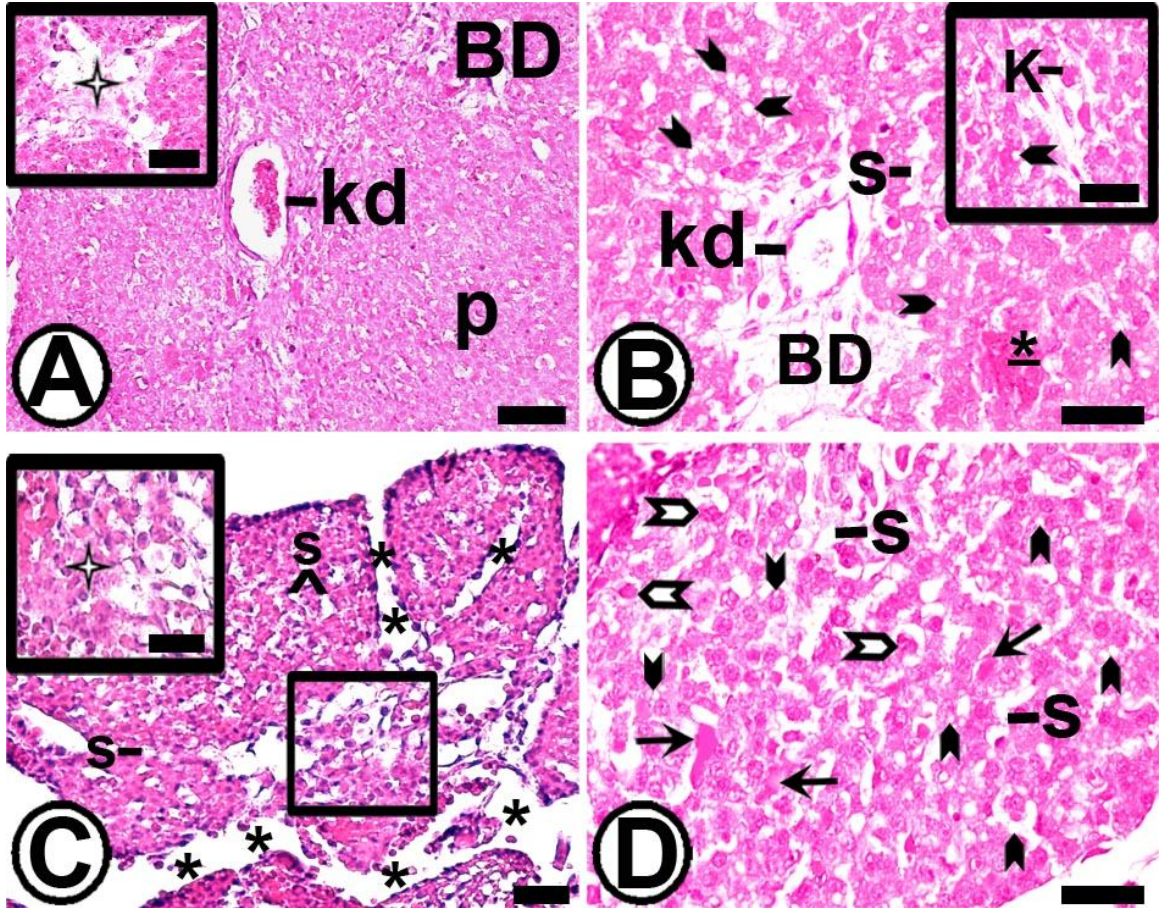
4.II.4.A. Onaltı Günlük Fetüs Karaciğerine Ait Bulgular:

Kontrol grubundaki onaltı günlük gebelerden çıkarılan sıçan fetüslerinden elde edilen karaciğer örnekleri 12 günlük sıçan embriyolarinkine kıyasla daha çok gelişmişti. Karaciğer parankimi daha sıkı görünümlüydü ve daha fazla hepatosit içermektedir. Bu hepatositler kordonlar oluşturmaktaydı. Karaciğeri dıştan saran bağ dokusu kapsülü gevşek bir yapıda görülmektedir ve bu kapsülden organın içerisine doğru giren septumlar onu loblara ayırmaktaydı. Bu bağ dokusu septumlarla birlikte büyük damarlar da organ içerisinde seyretmekteydi. Hepatosit kordonları arasında tek katlı yassı epitel ile döşeli sinüzoidler yer almaktaydı, fakat sinüzoid duvarları 12 günlük embriyolardaki kadar belirgin değildi. Sinüzoid duvarlarında seyrek olarak Kupffer hücreleri bulunmaktaydı. Hepatositler ökromatik çekirdeğe ve belirgin nükleolusa sahipti ve soluk eozinofil sitoplazmalıydı (Şekil 56).



Şekil 56: Kontrol grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen karaciğer kesiti. **kp**, kapsül; **p**, parankima; **hk**, hepatosit kordonu; **s**, sinüzoid; **kd**, kan damarı; **n**, nükleus; **mi**, mitotik figür; **He**, hepatosit; **E**, endotel hücresi; **K**, Kupffer hücresi; **yıldız**, bağ dokusu septumlarını göstermektedir. B’de A daki çerçeveli alan daha yüksek büyütmede izlenmektedir **Boya:** HE, **Bar=** 40 µm.

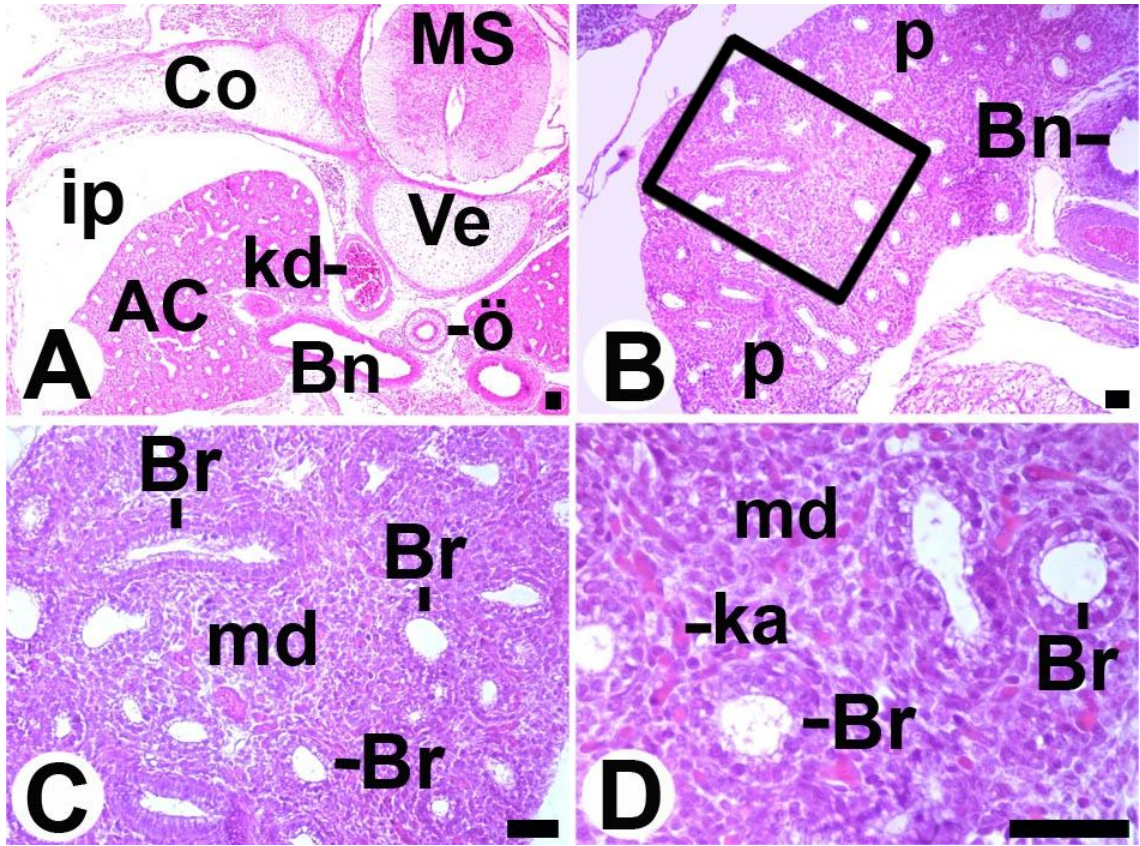
Deney grubuna ait 16 günlük fetüs karaciğerlerinde ilk göze çarpan bulgu, bağ dokusu septumlarında genişleme ve damar duvarlarında kalınlık artışıydı. Ek olarak, loblar arasında oldukça genişlemiş ve gevşek bir yapıda bağ dokusu alanlarına rastlanmaktaydı. Deney grubundaki karaciğerlerde hepatosit kordonları arasında bulunan sinüzoidler dilate idi ve parankim içerisinde hepatositlerden yoksun alanlar bulunmaktaydı. Kupffer hücreleri ise kontrol grubuna kıyasla iri çekirdekleri ve eozinofil sitoplazmalarıyla belirgindi. Farklı alanlarda yapılan ışık mikroskopik incelemede hepatositler arasında kan pıhtısına benzer eozinofil birikimler saptandı. Sınırları kaybolmuş dejenere hücrelerin bir araya gelerek oluşturduğu odaklar mevcuttu. Bazı hepatositler dejenere olarak küçülmüştü; bazılarında ise sitoplazmik içerik kaybı ile birlikte nukleusta kromatin yoğunlaşması saptandı. Ayrıca kimi hepatositlerin vakuoler içeriği de kontrol grubuna kıyasla artmıştı (Şekil 57).



Şekil 57: Deney grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen karaciğer kesiti. **kd**, duvarı kalınlaşmış duvarlı kan damarları; **p**, parankima; **BD**, bağ dokusu; **s-**, sinüzoid; **K-**, Kupffer hücresi; **ince ok**, kan pıhtısını andıran eozinofil birikimler; **siyah okbaşı**, hepatositler içerisindeki vakuoller; beyaz dolgulu okbaşı sitoplazmik içerik kaybı olan koyu çekirdekli hepatositler; **yıldız**, genişlemiş sinüzoidler; **altı çizili yıldız**, dejenere hepatositlerin bir araya gelerek oluşturduğu birikimler; **beyaz dolgulu yıldız**, genişlemiş bağ dokusu septumları; C'deki küçük resim çerçeveli alanı yakından göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 40 µm.

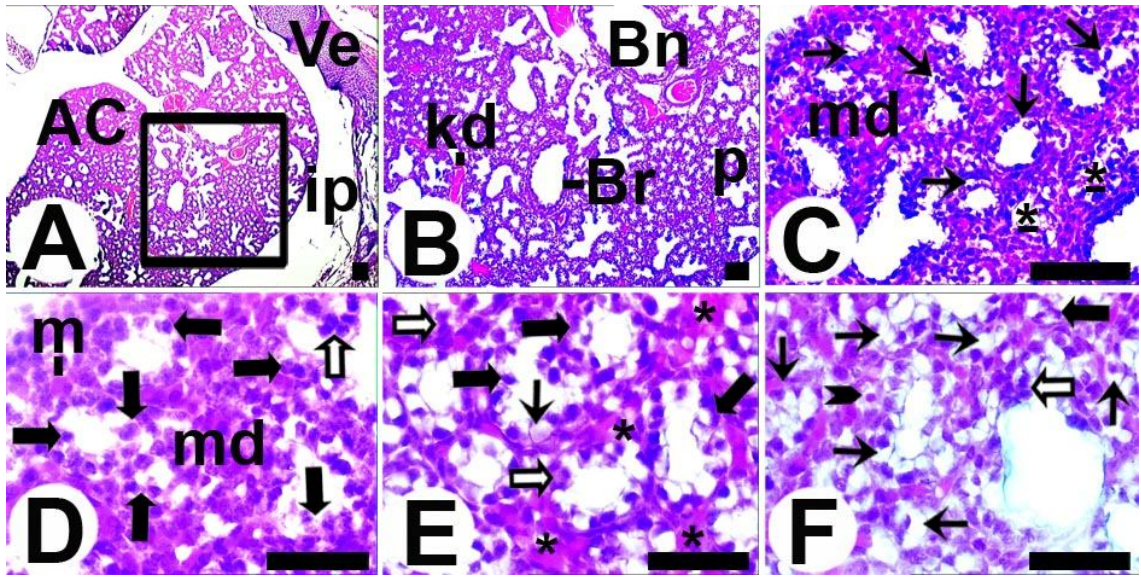
4.II.4.B. Onaltı Günlük Fetüs Akciğerine Ait Bulgular:

On altı günlük sıçan fetüslerinden elde edilen akciğerlerin histolojik görünümü, bu akciğerlerin embriyonik gelişim döneminin geç psödoglandüler evresinde olduğunu göstermekteydi. Akciğerler yapısal olarak dallanan iletili yapıları ve bu yapılar etrafında şekillenen endodermal dokusu ile salgı bezlerine benzemektedir. Bu akciğerlerde distal iletili üniteler olan terminal bronşiyollerin taslakları görülmekteydi. Vaskülarizasyon bronşlardan başlayarak periferik doğru ilerlemekteydi. Hava yolu epiteli de buna benzer şekilde merkezden periferik doğru farklılaşıyordu. Bronş ve bronşiyol gibi iletili yapıların epitelinin matür olduğu bu dönemde, distal hava yolları küboidal ve indifferansiyel epitel ile döşeliydi. Küçük bir lümenleri vardı ve bu yapılar arasında geniş bağ dokusu septumları bulunuyordu (Şekil 58).



Şekil 58: Kontrol grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen akciğer kesiti. **MS**, medulla spinalis; **Co**, Kosta; **Ve**, vertebra; **ip**, plevral boşluk; **AC**, akciğer; **kd**, kan damarı; **ö**, özefagus; **Bn**, bronş; **Br**, bronşiyol; **p**, parankima; **ka**, kapiller; **md**, akciğer interstisyumunu oluşturan mezenkimal doku; C’de B’deki çerçeveli alan daha yüksek büyütmede gösterilmiştir. **Boya:** HE, **Bar**= 50 µm.

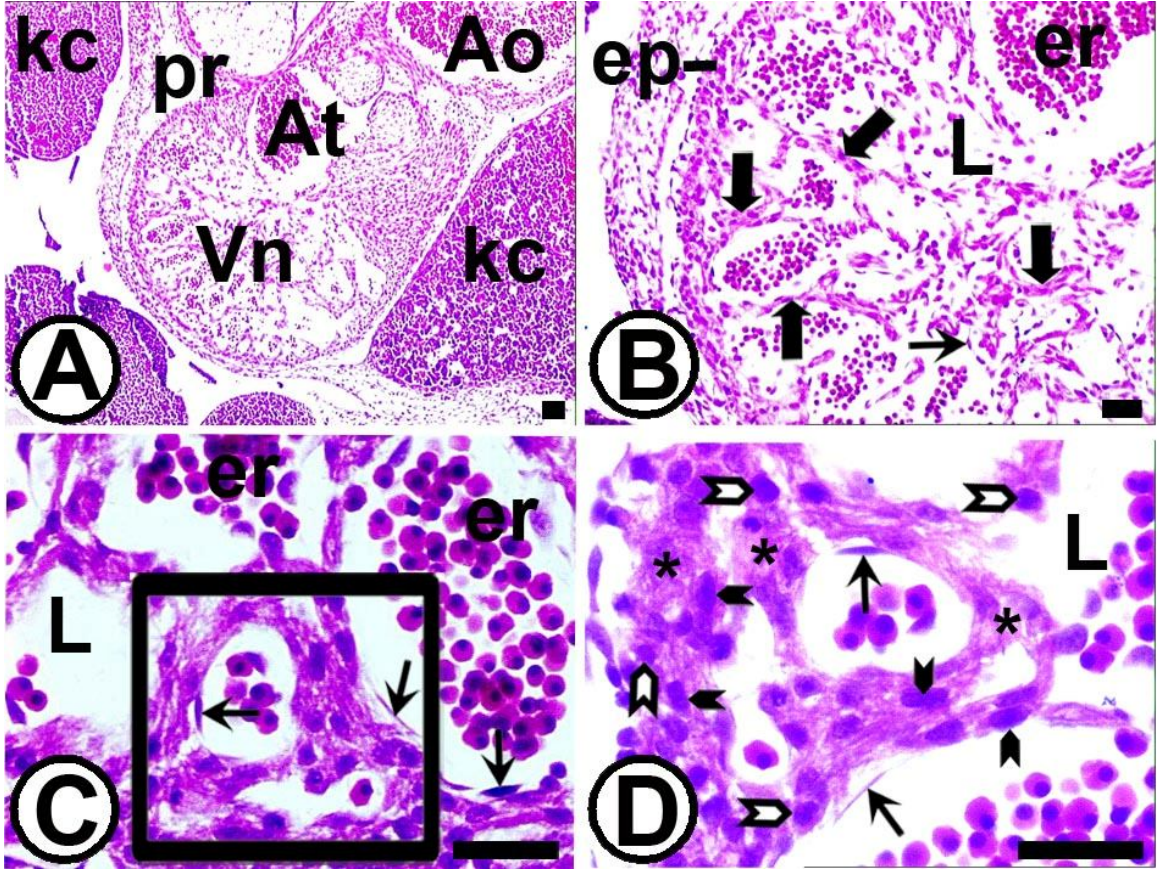
Tek doz LF uygulanan 16 günlük sıçan akciğerleri histolojik açıdan incelendiğinde iletili kısımlardaki dallanmaların kontrol grubuna kıyasla daha fazla olduğu dikkat çekiyordu. Bronşiyol taslaklarını döşeyen epitel tabakasının yüksekliğinde azalma saptandı. Ayrıca bazı epitel hücreleri parçalanmıştı. Bir kısım hücrelerde ise geniş sitoplazmik boşluklara rastlanıyordu. İntersitisyel bağ dokusu içerisinde eozinofil boyanmış alanlar görüldü. Bu bölgelerde daha önce LF uygulanan erişkin sıçanlarda da gözlenen boya almamış soluk sitoplazmalı hücreler de bulunuyordu (Şekil 59).



Şekil 59: Deney grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen akciğer kesiti. **AC**, akciğer; **Ve**, vertebra; **ip**, plevral boşluk; **kd**, kan damarı; **Bn**, bronş; **Br**, bronşiyol; **p**, parankima; **md**, akciğer intersitisyumunu oluşturan mezenkimal doku; **m**, makrofaj olası hücre; **kalin ok**, parçalanmış, dejenere olmuş epitel hücreleri; **beyaz dolgulu ok**, sitoplazma sınırları kaybolmuş ve kaynaşmış epitel hücreleri; **ince ok**, hidropik dejenerasyona uğramış epitel hücreleri; **siyah okbaşı**, bağ dokusundaki boya almamış soluk sitoplazmalı hücreler; **yıldız**, alveoller arasında görülen eozinofil alanlar; **altı çizili yıldız**, duvarı dejenere olmuş bronşiyoller; B’de A’deki çerçeveli alan daha yüksek büyütmede gösterilmiştir. **Boya:** HE, **Bar**= 50 µm.

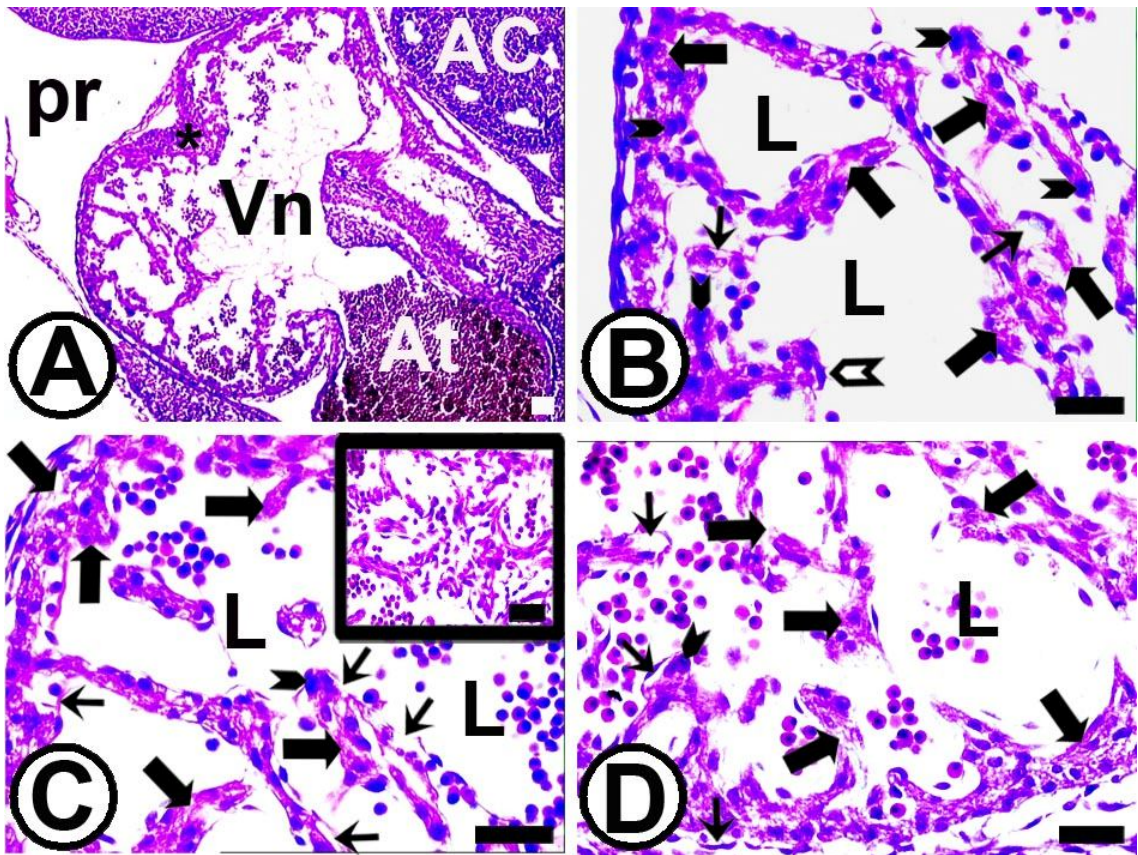
4.II.4.C. Onaltı Günlük Fetüs Kalbine Ait Bulgular:

Kontrol grubuna ait 16 günlük sıçan fetüslerinin kalpleri histolojik olarak üç temel tabakadan oluşuyordu. Bu tabakalar dıştan içe doğru epikard, myokard ve endokard olarak sıralanıyordu. Kalp dokusu dıştan perikard adı verilen çift katlı zarla çevriliydi. Bu zarın iç (visseral) tabakası tek katlı yassı epitel olup aynı zamanda kalbin epikard tabakasının yüzeyini oluşturuyordu. Perikardın dış (parietal) tabakası ise fibröz perikard adı verilen dıştaki mezenkimal bağ dokusundan zengin kalın tabakanın perikard boşluğuna bakan yüzeyini döşeyen tek katlı yassı epitel tabakasını oluşturuyordu. Atriyum bölünmüş olmakla birlikte ventrikül henüz tamamıyla sağ ve sol olarak birbirinden ayrılmamıştı. Kalp lümeni küçük adacıklar oluşturan kalp dokusu ile bölünüyordu. Bu adacıkların içini ilkel kalp kası lifleri (myokard) oluştururken adacıkların kalp lümenine bakan kısmı tek katlı yassı epitel (endokard) ile döşeliydi. Söz konusu adacıkların dış kısımlarında koroner damar öncülleri oldukları tahmin edilen tek katlı yassı epitel ile döşeli ve lümeni çekirdekli eritrositler ile dolu yapılara rastlandı. Öncül kalp kası lifleri detaylı olarak incelendiğinde bu liflerin kısa boylu ve orta kısımda yerleşik oval ya da yuvarlak bir çekirdeğe sahip olduğu belirlendi. Liflerin sitoplazması eozinofil boyanmakta olup heterojen görünümdeydi (Şekil 60).



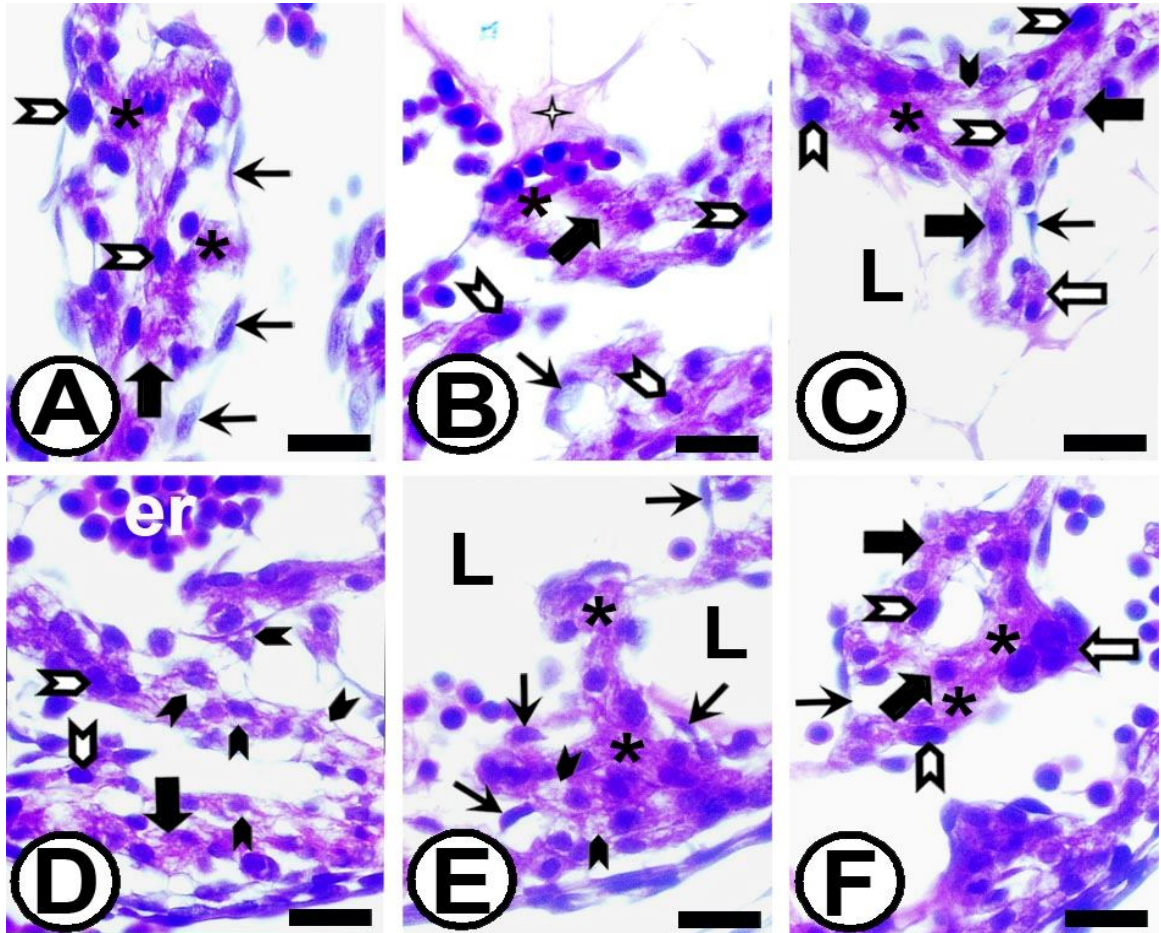
Şekil 60: Kontrol grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen kalp kesiti. **kc**, karaciğer; **pr**, perikard boşluğu; **Ao**, aort kesesi; **At**, atriyum; **Vn**, ventrikül; **ep**, epikard; **er**, eritrosit öncülü hücreler; **L**, lümen; **ep**, epikard; **kalin ok**, myokardı oluşturan myositler; **ince ok**, endokard; **siyah okbaşı**, myosit çekirdekleri; **beyaz dolgulu okbaşı**, kalp interstisyumunu oluşturan mezenkim hücrelerinin çekirdekleri; **yıldız**, myosit sarkoplazmasını göstermektedir; D'de C'deki çerçeveli alan daha yüksek büyütmede gösterilmiştir. **Boya:** HE, **Bar**= 40 µm.

Deney grubundan elde edilen 16 günlük fetüs kalplerinin histolojik açıdan kontrol grubundaki fetüs kalplerinden farklı görünümdeydi. Deney grubu kalplerinin duvarları kontrol grubununkilere kıyasla daha az myosit içeriyordu ve kalp lümenleri daha genişti. Kalp duvarı ise daha incedi. Myositler daha asidofil sitoplazma ve daha koyu bazofil çekirdeğe sahipti. Bazı myositlerde sitoplazma kaybı ya da perinükleer sitoplazmada yoğunlaşma izleniyordu. Myosit ve endotel hattı arasına bakıldığında vakuoler oluşumlar göze çarpıyordu. Kan hücreleri de kontroldekilere kıyasla daha küçük çaplıydı (Şekil 61).



Şekil 61: Deney grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen kalp kesiti. **AC**, akciğer; **pr**, perikard boşluğu; **At**, atriyum; **Vn**, ventrikül; **L**, lümen; **kalin ok**, eozinofil sitoplazmalı, sitoplazma kaybı olan ve parçalanmış myositler; **ince ok**, endokardın endotel tabakası; **siyah okbaşı**, koyu bazofil boyalı myosit çekirdekleri; **beyaz dolgulu okbaşı**, iri görümlü endotel çekirdekleri; **yıldız**, myokardı göstermektedir; C'deki küçük resimde parçalanmış myositlerden oluşan alan gösterilmiştir. **Boya:** HE, **Bar**= 40 µm.

Epikard tabakasının tek katlı yassı epitelini oluşturan hücreler, hat boyunca koyu bazofil çekirdekliydi. Endotel hattı ise kesintiliydi. Myokardın bazı alanlarında kas lifleri birbirinden ayrılmıştı ve büyük sitoplazmik vakuoller içermekteydi. Lümenin endokarda bakan kısmında eozinofil birikimler bulunmaktaydı. Myokard ile endokard arasında yer alan geniş boşluklar dikkat çekiciydi. Bu boşluklarda yer yer kan hücreleri de yer alıyordu. Deney grubu fetüslerinde kalp kası liflerinde parçalanma ve atrofik değişikliklerin yanı sıra lif sınırlarının da düzensiz olduğu gözlemlendi. Bazı liflerde anormal çekirdek morfolojisi de saptandı. Bu anormal çekirdekler kesitte gözlenen diğer liflerin çekirdeklerine kıyasla daha büyüktü ve kıvrıntılıydı. Bu grupta lif sınırları gibi endotel sınırları da düzensizdi (Şekil 62).



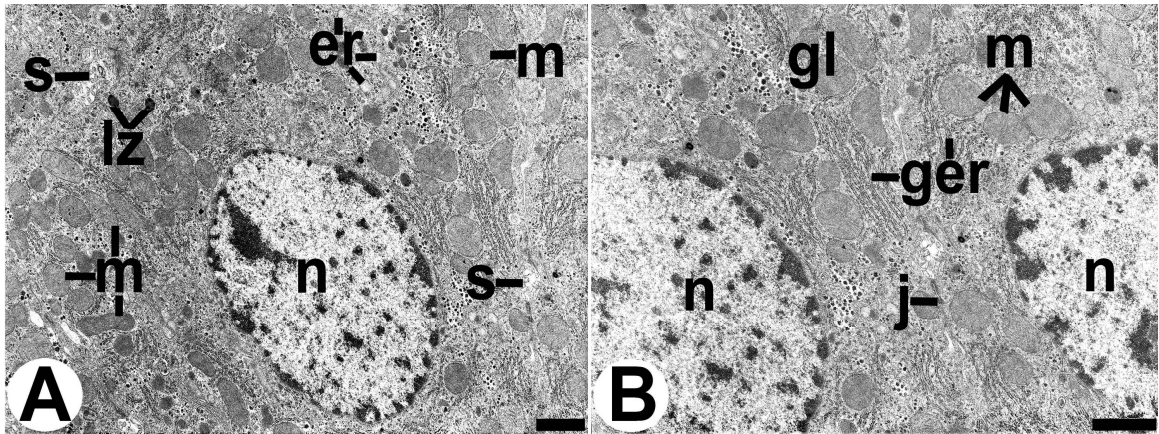
Şekil 62: Deney grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen kalp kesiti. **er**, eritrosit öncülü olan hücreler; **kalin ok**, myokardı oluşturan eozinofil sitoplazmalı, sitoplazma kaybı olan ve parçalanmış myositler; **Beyaz dolgulu ok**, sitoplazması kaynaşmış görülen hücreler; **ince ok**, endokardın endotel tabakası; **siyah okbaşı**, myositlerde görülen vakuoller; **beyaz dolgulu okbaşı**, koyu bazofil boyalı myosit çekirdekleri; **yıldız**, eozinofil boyanmış myosit sarkoplazması; **beyaz dolgulu yıldız**, endotel hattının lümenine bakan kısmında bulunan eozinofil birikimleri göstermektedir. **Boya:** HE, **Bar**= 40 µm.

4.III. Elektron Mikroskopik Bulgular:

4.III.1. Erişkin Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular:

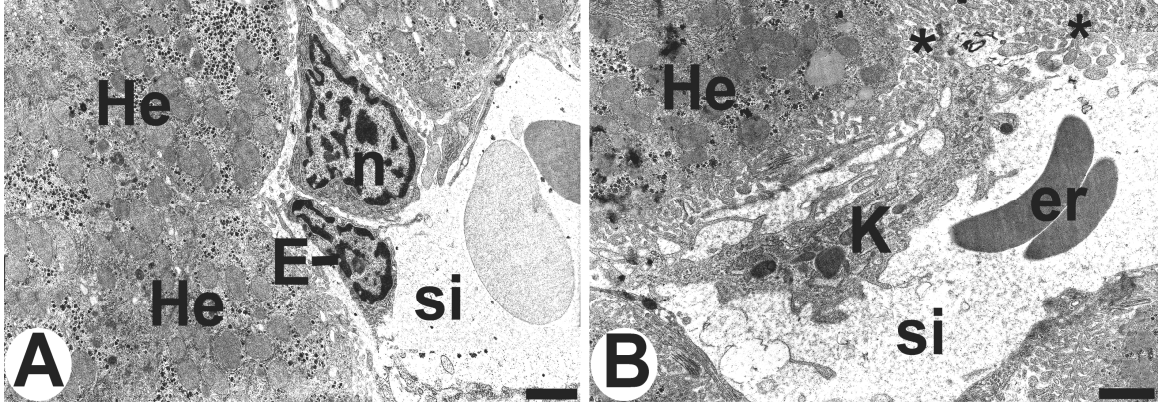
4.III.1.A. Karaciğere İlişkin Elektron Mikroskopik Bulgular:

Kontrol grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer örnekleri elektron mikroskobu altında incelenerek doku örneklerinin ince yapıları değerlendirildi. Bu değerlendirmeden elde edilen sonuçlara göre erişkin karaciğerinin büyük kısmını oluşturan hepatositler yuvarlağa yakın poligonal şekilli idi. Bu hücrelerin ortasında küresel ya da oval biçimli ökromatik bir nükleus mevcuttu. Nükleus içerisinde bulunan 1-2 adet nükleolus açıkça seçilebiliyordu. Çekirdeğin etrafında gözlenen mitokondri, endoplazmik retikulum vb. organeller sağlıklı görünümdeydi. Sitoplazma içerisinde az miktarda glikojen partikülleri göze çarpmaktaydı. Hepatositler birbirine bitişik olup sinüzoidlere yakın konumluydu (Şekil 63).



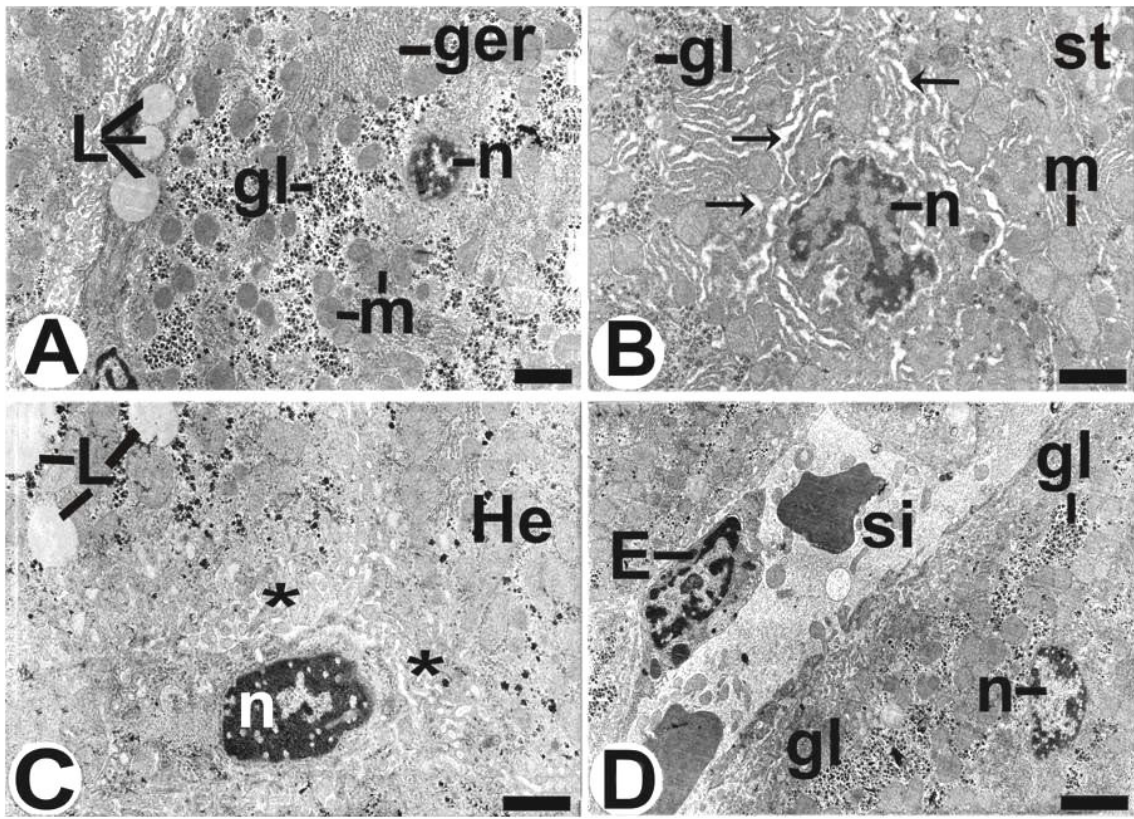
Şekil 63: Kontrol grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **n**, hepatosit nükleusu; **m**, mitokondri; **er**, düz yüzlü endoplazmik retikulum; **ger**, granüler endoplazmik retikulum; **lz**, lizozom; **s**, safra kanalikülü; **gl**, glikojen; **j**, bağlantı kompleksini göstermektedir. **Bar= 1 µm**.

Bu sinüzoidler olağan görünüme sahip ince duvarlı bir yapıda olup; kan hücrelerini ve mononükleer fagositik sistemin bir üyesi olan Kupffer hücrelerini içermektedir. Hepatositler ile sinüzoidler arasında bulunan Disse aralığı hepatosit mikrovillusları ve sinüzoid duvarı tarafından sınırlandırılmıştı ve normal genişlikteydi. Bu bölgede A vitamini ve yağ depolamak üzere özelleşmiş Ito hücreleri mevcuttu (Şekil 64).



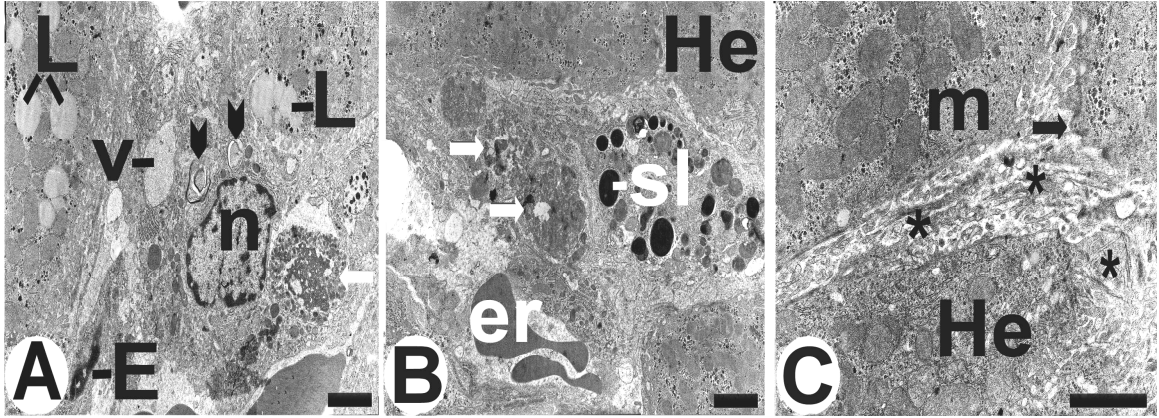
Şekil 64: Kontrol grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **n**, endotel hücresinin nükleusu; **He**, hepatosit; **E**, endotel hücresi; **si**, sinüzoid; **er**, eritrosit; **K**, Kupffer hücresi; **yıldız**, Disse aralığını göstermektedir. **Bar**= 1 μ m.

Tek doz letal faktör uygulanan erişkin dişilere ait karaciğerlerin ince yapısı değeriendirildiğinde gerek hepatositler gerekse İto ve endotel hücreleri elektron yoğun kromatinli, çentikli ve küçülmüş piknotik nükleusları ile dikkat çekmekteydi. Hepatosit sitoplazması incelendiğinde düz yüzlü endoplazmik retikulum veziküllerinin kontrol grubuna kıyasla genişlediğı ve çoğaldığı gözlemlendi. Sitoplâzma içerisinde geniş glikojen depo alanları da bulunmaktaydı. Hepatositlerin sinüzoid duvarına bakan kısımlarında sitoplazma içerisinde büyük lipid damlaları izlenmekteydi. Hepatositler ile sinüzoidler arasındaki Disse aralığı ise genişlemişti (Şekil 65).



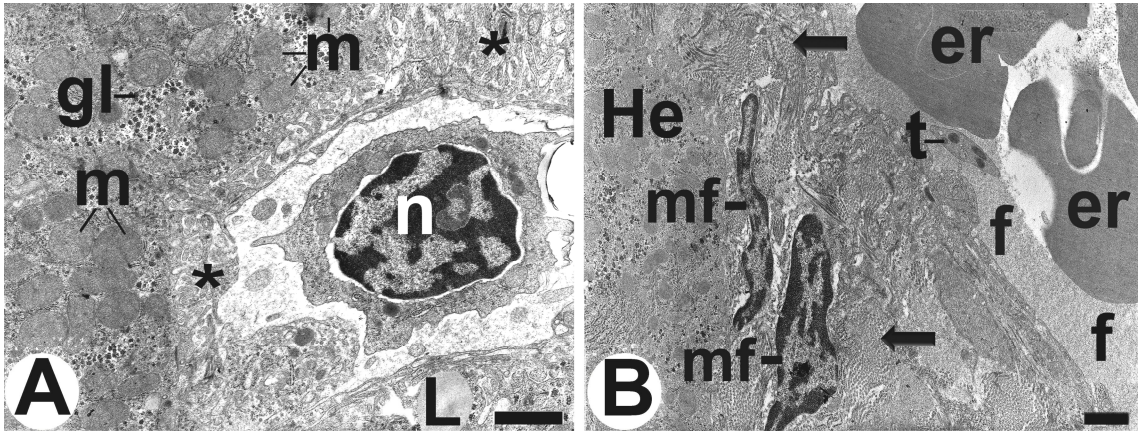
Şekil 65: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **L**, lipid damlacığı; **ger**, granüler endoplazmik retikulum; **gl**, glikojen; **n**, hepatosit nükleusu; **m**, mitokondri; **st**, sitoplazma; **He**, hepatosit; **E**, endotel hücresi; **si**, sinüzoid; **ok**, düz yüzlü endoplazmik retikulumun genişlediğı alanlar; **yıldız** genişlemiş Disse aralığını göstermektedir. Çekirdek morfolojisinin bozulduğu oval (D) ya da fasülye şeklinde olup küçülerek piknotik yapı kazandığı (A, B ve C) dikkat çekmektedir. **Bar**= 1 µm.

Kupffer hücreleri kontrol grubundakilere kıyasla daha büyük olup sitoplazma açısından zengindi. Hepatositler ve Kupffer hücreleri çok sayıda primer ve sekonder lizozom içermekteydi. Hepatositler arası mesafe ve bu bölgelerdeki safra kanalikülleri genişlemişti. Sözü edilen genişlemiş hücreler arası mesafeye bakan hepatosit mikrovillusları da düzleşerek küntleşmişti. Ek olarak, bu hepatositlerdeki bazı primer lizozomların membranlarında myelinleşmeye benzer değişimler saptandı. Disse aralığında hepatositlerin ve Kupffer hücrelerinin yakın komşuluğunda, belirgin bir yapı sergilemeyen elektron-yoğun materyal içeren ve hücresel debrisye benzeyen, membranla çevrili sitoplazmik parçacıklar görüldü. (Şekil 66).



Şekil 66: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **L**, lipid damlacığı; **v**, vakuol; **n**, hepatosit nükleusu; **E**, piknotik nükleuslu endotel hücresi; **er**, eritrosit; **sl**, Kupffer hücresi içerisinde bulunan sekonder lizozom; **He**, hepatosit; **m**, mitokondri; **siyah ok**, düzleşmiş hepatosit mikrovillusları; **beyaz ok**, Disse aralığında hücresel debrisye benzeyen elektron-yoğun materyal içeren sitoplazmik parçacıklar; **siyah okbaşı**, primer lizozomların membranlarında myelin benzeri birikimler; **yıldız**, genişlemiş, geniş safra kanalikülünü de içeren hücreler arası mesafeyi göstermektedir. **Bar**= 1,5 µm.

Tek doz letal faktör uygulanan erişkin sıçanların karaciğerlerinde sinüzoidler içerisinde lenfositlere sıklıkla rastlandı (Şekil 67). Hepatositler ile sinüzoidler arasında yer alan Disse aralığı kontrol grubundakine kıyasla genişti. Ayrıca bu alanlarda yoğun kromatinli, İto hücrelerinin değişimiyle oluşmuş miyofibroblastlar olabileceği tahmin edilen uzunca çekirdekli ve ince şekilli hücrelerin yanı sıra bol miktarda kollagen liflerin varlığı da göze çarpıyordu (Şekil 67). Sinüzoid duvarlarında da fibrin birikimi görülmektedir.

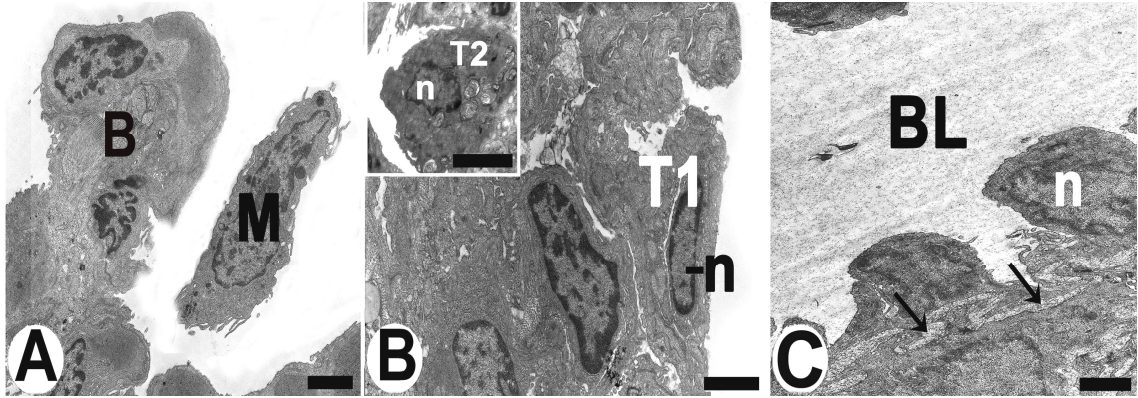


Şekil 67: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **L**, lipid damlacığı; **n**, lenfosit nükleusu; **m**, mitokondri; **gl**, glikojen; **He**, hepatosit; **er**, eritrosit; **mf**, myofibroblast; **f**, fibrin birikimi; **t**, trombosit; **siyah ok**, perisinüzoidal yerleşimli bağ dokusu fibrilleri; **yıldız**, genişlemiş Disse aralığını göstermektedir. **Bar**= 1 μ m.

4.III.1.B. Akciğere İlişkin Elektron Mikroskopik Bulgular:

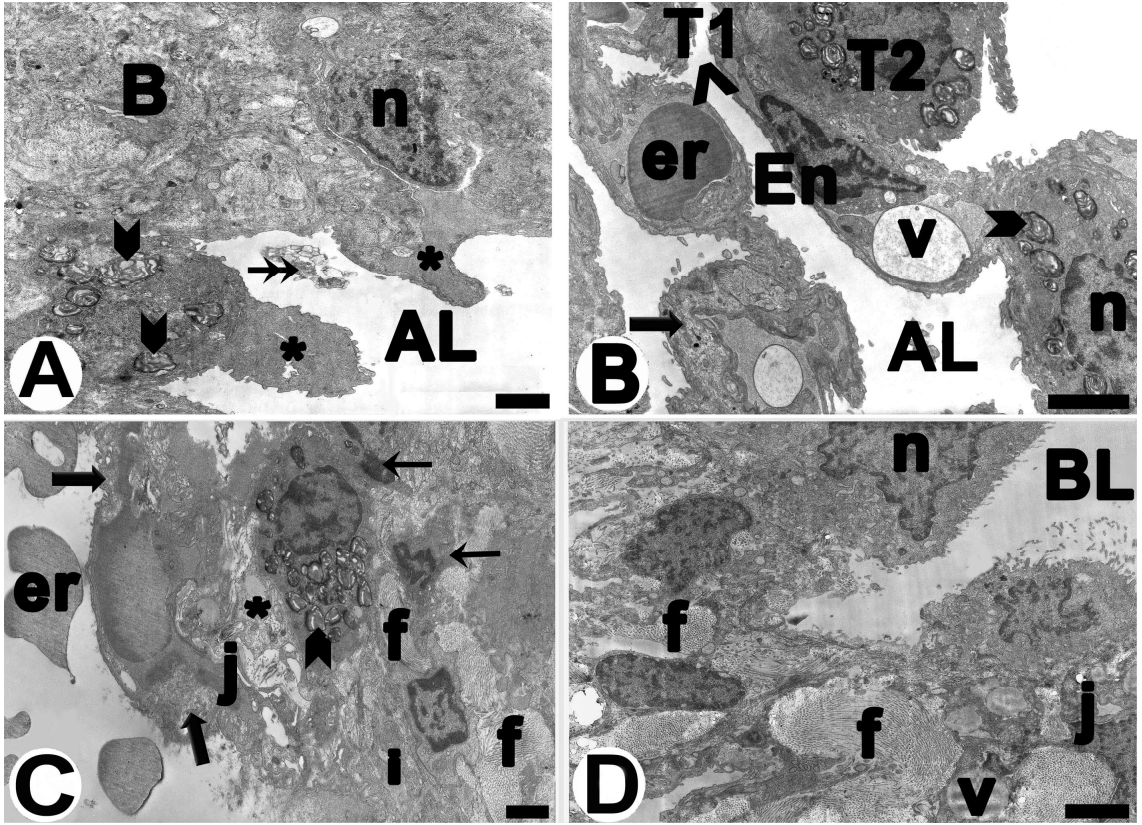
4.III.1.B. Akciğere İlişkin Elektron Mikroskopik Bulgular:

Kontrol grubu erişkin dişi sıçanlara ait akciğerlerin ince yapısı elektron mikroskopik olarak değerlendirildi. Bu değerlendirmenin sonucunda elde edilen bulgulara göre akciğer; alveoller, interalveoler septumlar ve iletili yapılarından oluşmaktaydı. Alveol duvarları yassı şekilli oval nükleuslu tip 1 pnömositlerin yanı sıra yuvarlak çekirdekli ve kübik yapıdaki tip 2 pnömositlerden oluşmaktaydı. Tip 1 pnömositlerin yakın komşuluğunda kesintisiz kapiller tipte damarlar yerleşmişti. Tip 1 pnömositler ve bu kapillerler arasında ince yapıda kan-hava bariyeri bulunmaktaydı. Tip 2 pnömositler bağ dokusu septumlarına yakın yerleşimliydi ve lamellar cisimler içermekteydi. Alveoller içerisinde nadiren alveoler makrofajlar seçilebilmekteydi. Alveoller arasında az sayıda bağ dokusu hücresi içeren inter-alveoler septumlar yer almaktaydı. Bronşiyoller kübik hücrelerden oluşmakta olup bazal membranları inceydi ve sağlıklı görünümdeydi (Şekil 68).



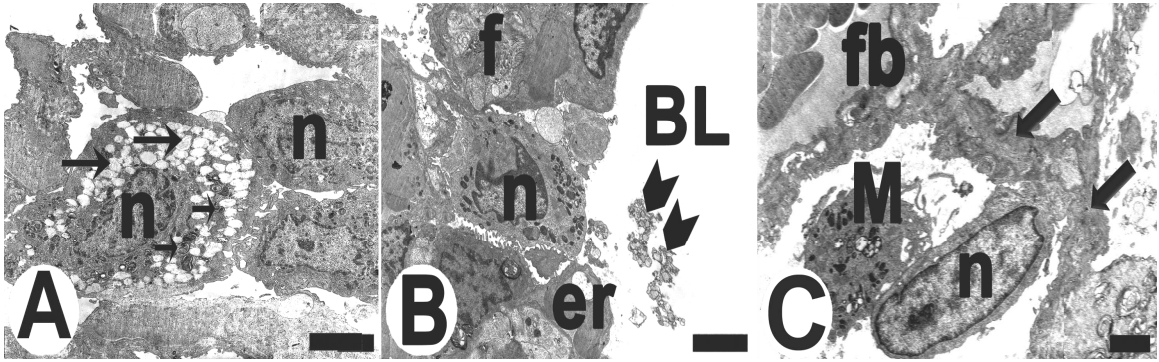
Şekil 68: Kontrol grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **B**, bağ dokusu; **M**, makrofaj; **T1**, tip 1 pnömosit, **T2**, tip 2 pnömosit; **BL**, bronşiyol lümeni; **n**, nükleus; **ince ok**, bronşiyol epitelinin oturduğu bazal laminayı göstermektedir; küçük resimde ise Tip 2 pnömositin detaylı görüntüsü izlenmektedir. **Bar**= 3 μ m.

Deney grubundaki erişkin dişi sıçanların akciğer kesitleri elektron mikroskopunda incelendiğinde tip 1 pnömositlerin kontrol grubundakilere kıyasla daha iri olduğu gözlemlendi. Ayrıca bu pnömositlerde çekirdek kromatininde yoğunlaşma ve hücre sınırlarında düzensizlik gibi dejenerasyonlar saptandı. Tip 2 pnömositler ise kontrol grubundakilere kıyasla daha iriydi ve daha çok sayıda lamellar cisim içermektedir. Bu lamellar cisimler büyüklük bakımından heterojendir; bir kısmı ise gevşek yapıdaydı. Tip 1 pnömositlerde gözlenen hücre sınırı düzensizlikleri tip 2 pnömositlerde de göze çarpmaktaydı. Kan-hava bariyeri de kontrol grubundakine kıyasla kalındı ve hücreler arası mesafe kontrol grubuna kıyasla geniştir. Ayrıca tek doz LF uygulanan erişkin sıçanların oluşturduğu gruptan elde edilen akciğer örneklerinde, alveoller içerisinde serbest yapıdaki sürfaktan veziküllerinin yanı sıra eritrositlerin de bulunması ilginçti. Gerek alveol gerekse bronşiyol duvarında kontrol grubunda rastlanmayan fibröz materyal birikimleri izlendi. Bağ dokusu septumlarında çok sayıda piknotik nükleuslu ve elektron yoğun sitoplazmalı hücre bulunduğu belirlendi. Bu gruba ait dokuların ultrastrüktürel değerlendirmesinde kontrol grubunda gözlenmeyen diğer bir bulgu da tip 1 pnömosit komşuluğundaki kapiller damarlar içerisinde elektron-az yoğun materyal ile dolu vakuollerin belirlenmesiydi (Şekil 69).



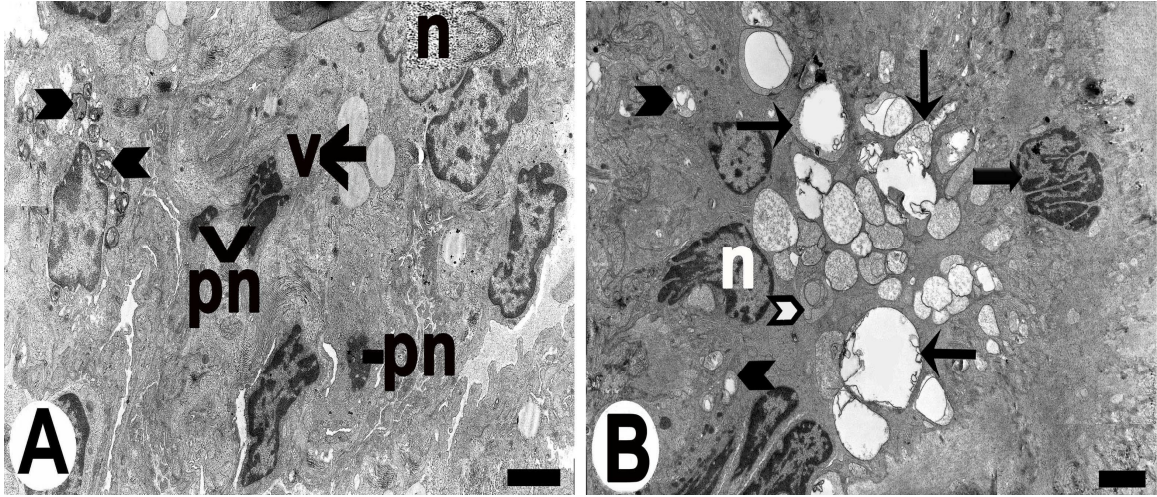
Şekil 69: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **BD**, bağ dokusu; **n**, nükleus; **AL**, alveol lümeni; **T1**, tip 1 pnömosit, **T2**, tip 2 pnömosit; **er**, eritrosit; **v**, vakuol; **j**, genişlemiş bağlantı kompleksleri; **i**, geniş intersellüler mesafe; **f**, alveol ve bronşiol duvarlarında izlenen fibröz meteryal birikimi; **BL**, bronşiol lümeni; **kalin ok**; kontrole kıyasla kalın görünen kan hava bariyeri; **ince ok**, bağ dokusu septumunda izlenen piknotik nükleuslu ve elektron yoğun sitoplazmalı hücreler; **siyah okbaşı**, yapısı bozuk ve gevşek lamellar cisimler; **çift başlı ok**, alveol lümeninde serbest halde bulunan sürfaktan vezikülleri; **yıldız**, lümene doğru çıkıntı yapmış, düzensiz tip 1 ve tip 2 pnömosit hatlarını göstermektedir. C’de alveol lümeninde bulunan eritrositler dikkat çekmektedir. **Bar**= 3 µm.

Yine bu gruptan elde edilen ince kesitlerde hem alveollerin hem de bronşiyollerin lümeninde, kontrol grubundakilere kıyasla daha büyük çapa sahip olan makrofajlara rastlandı. Bu makrofajlar çok sayıda sekonder lizozomun yanında krista yapısı bozularak şişmiş mitokondriler içeriyordu. Bronşiyol duvarını döşeyen epitel hücrelerinden bir kısmı aktifti ve salgı üretmekteydi. Bronşiyol duvarındaki epitel hücreleri arasındaki bağlantılara bakıldığında bu hücrelerin etrafındaki hücrelerden ayrılmış olduğu görüldü. Farklı kesitlerdeki bronşiyol duvarını oluşturan hücrelerde de çekirdek ve sitoplazmanın elektron-yoğun olduğu tespit edildi. Bronşiyol komşuluğundaki damarlar içerisinde ise fibrin birikimi görülmekteydi (Şekil 70).



Şekil 70: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **BL**, bronşiyol lümeni; **n**, nükleus; **er**, eritrosit; **f**, bronşiyol duvarlarında izlenen fibröz materyal birikimi; **M**, alveoler makrofaj; **fb**, respiratuar bronşiyol komşuluğunda yer alan damar içerisindeki fibrin birikimi; **kalin ok**, respiratuar bronşiyol duvarında gözlenen elektron-yoğun alanlar; **ince uzun ok**, makrofajlar içerisinde bulunan içeriği bozuk mitokondriler; **ince kısa ok**, bu hücrelerde bulunan sekonder lizozomlar; **siyah okbaşı**, bronşiyol lümeninde serbest halde bulunan sürfaktan veziküllerini göstermektedir. **Bar**= 2 μ m.

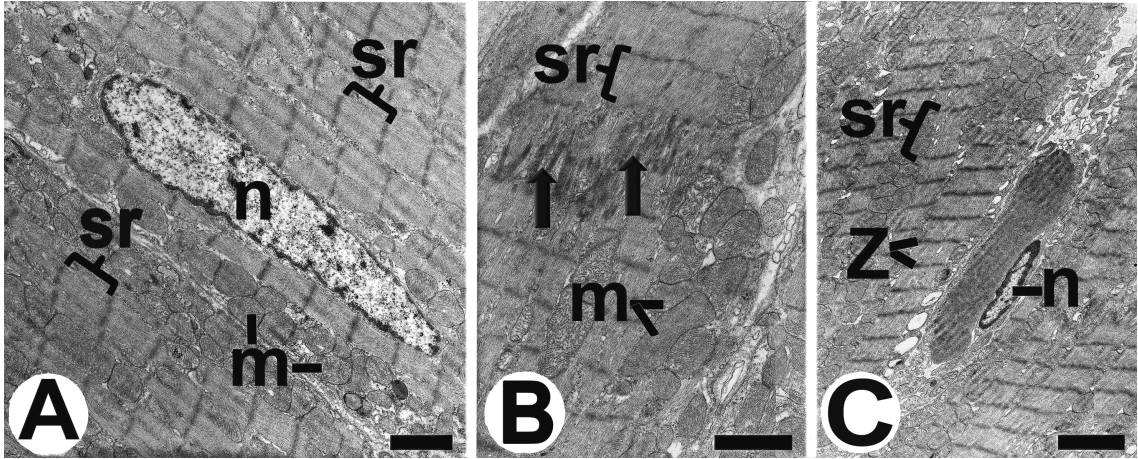
Bağ dokusu septumları elektron mikroskopik olarak incelendi ve bu bölgelerde çok sayıda vakuol ve sağlıklı yapısını kaybetmiş mitokondri içeren hücreler bulunduğu görüldü. Mitokondrilerin büyüklüğü heterojendi. Şöyleki; bir kısmı küçük ve parçalanmış kristal iken diğer bir kısmı şişmiş kristalıydı. Bu hücrelerden bazıları çentikli ya da piknotik çekirdeğe sahipti (Şekil 71).



Şekil 71: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **pn**, piknotik nükleus; **v**, vakuol; **n**, sağlıklı görünümlü nükleuslar; **kalin ok**, çentikli nükleus; **ince ok**, şişmiş kristal dev mitokondriler; **siyah okbaşı**, krista yapısı bozulmuş boyutları küçük mitokondriler; **beyaz dolgulu okbaşı**, myelin benzeri meteryal içeren mitokondriyi göstermektedir. **Bar**= 1 µm.

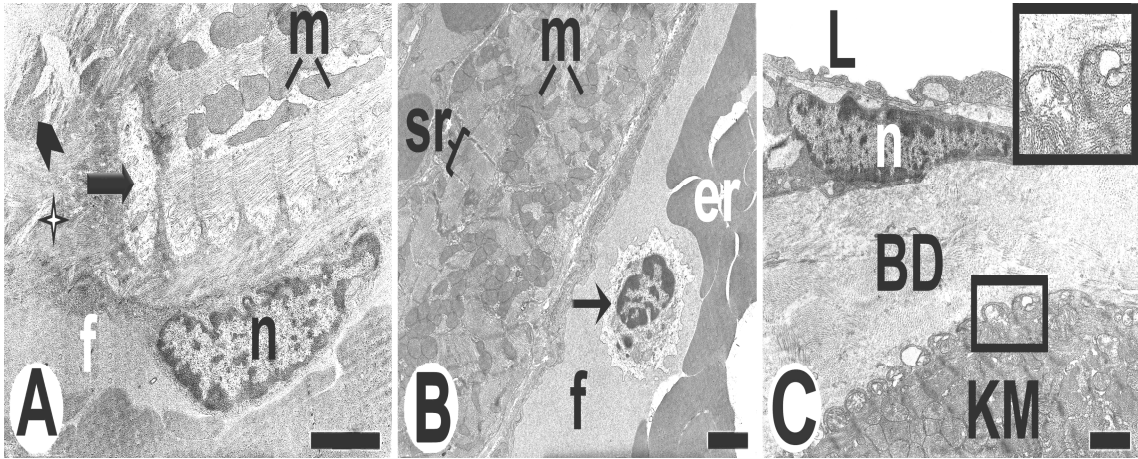
4.III.1.C. Kalbe İlişkin Elektron Mikroskopik Bulgular:

Kontrol grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen kalp dokusu kesitlerinde çoğunlukla kardiyosit veya myosit adı verilen kas hücreleri izlenmekteydi. Bu hücreler arasında çeşitli boyutlardaki kan damarları göze çarpıyordu. Ayrıca kas hücrelerini çevreleyen satellit hücreleri de nadiren görüldü. Her myosit sarkolemma denen bir zarla çevriliydi ve içinde kontraktıl yapılar olan myofibriller bulunmaktaydı. Sarkolemmadan hücre içine ve dışına uzanan tübüller mevcuttu. Hücrenin hemen tüm genetik bilgisini depolayan nükleus lifin merkezinde yer almaktaydı. Myofibriller arasında ve sarkolemmanın hemen altında enerji üretiminden sorumlu olan mitokondriler gözlenmekteydi. Myofibriller, ince ve kalın myofilamentlerden meydana gelmekteydi. Bu myofibrillerin özel düzenlenişiyle oluşmuş sarkomer denen bölümler seçiliyordu. Sarkomerler arasında bulunan ve Z çizgileri olarak adlandırılan yapılar kolaylıkla görülmüyordu. Lifleri oluşturan kas hücreleri birbirleri ile diskus interkalaris denen bağlantı bölgeleri aracılığıyla ilişki kurmaktaydı (Şekil 72).



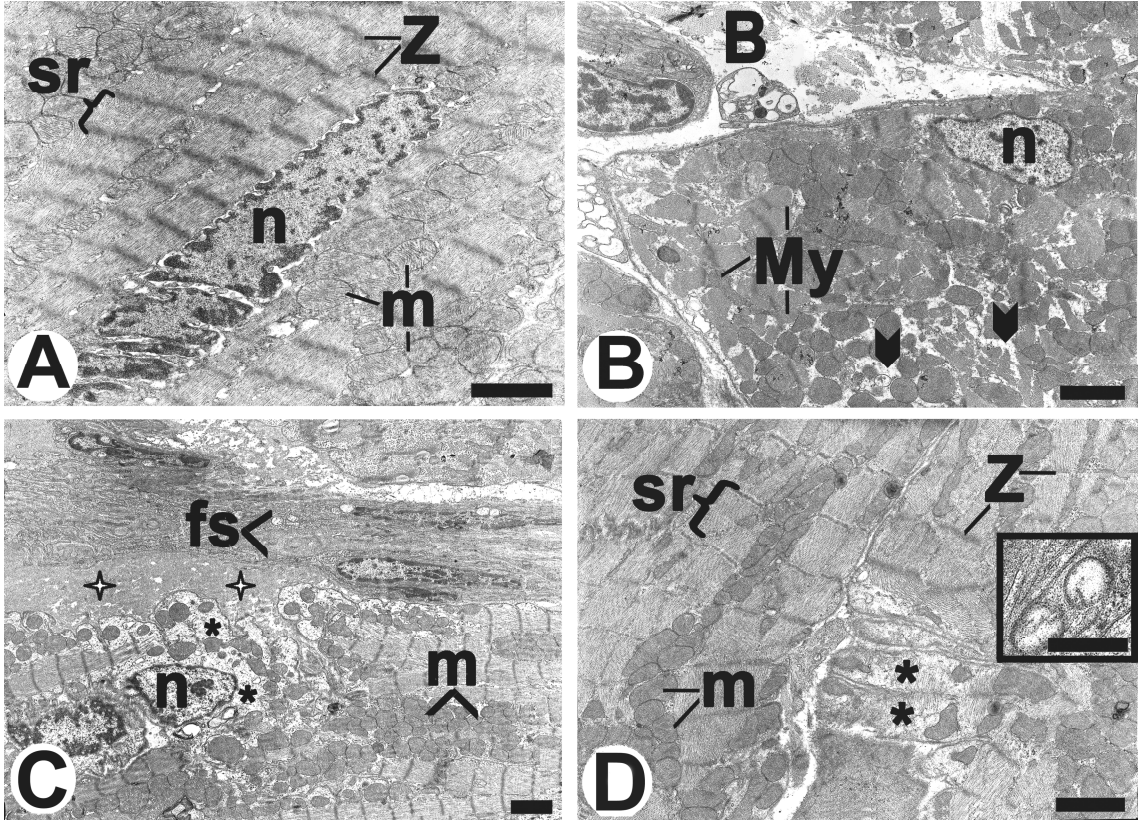
Şekil 72: Kontrol grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **n**, sağlıklı görünümlü nükleuslar (A'da myositin nükleusunu C'de ise endotel hücresi nükleusunu göstermektedir.); **sr**, sarkomer; **m**, mitokondri; **Z**, Z çizgileri; **kalin ok**, diskus interkalarisleri göstermektedir. **Bar= 2** μ m.

Deney grubuna ait ultra-ince kalp kesitlerinde ilk göze çarpan bulgu bazı kas liflerindeki çekirdeklerin kenara itilmiş şekilde sarkolemma yakınında gözlenmesiydi. Sarkoplazmadaki myofibril düzeni kontrol grubuna kıyasla belirgin şekilde bozulmuştu. Ayrıca böyle liflerde, organeller ile myofibriller arasında sarkoplazmik şişmeyi yansıtan düzensiz görünümlü, boşalmış alanlar da izlenmekteydi. Deney grubuna ait kesitlerde bazı kalp kası liflerinin kontrol grubundakilere kıyasla daha kalın Z çizgilerine sahip oldukları görüldü. Sarkolemmının hemen altında T-tübülleri arasında kalan sarkoplazmik alanlarda belirgin hidropik dejenerasyonu yansıtan görünümünün yanı sıra özellikle mitokondrilerdeki hasar dikkat çekiciydi. Diskus interkalarislere komşu alanlarda ise belirgin bir hatta sahip, içi elektron-az yoğun materyalle dolu, vakuole benzer yapılar saptandı. Kalp kası lifleri arasında oldukça geniş, kollajen iplikçiklerinden zengin bağ dokusu alanları bulunmaktaydı. Damar yapıları içerisinde fibrin birikimi gözleniyordu ve bu fibrin materyal içerisine gömülü lenfoid hücrelerin varlığı da dikkati çekiyordu. Bu fibrin tabaka içeren lümeni daralmış damarlarda yer alan eritrositler de düzgün şekilli değildi. Bu eritrositler yassı şekil almış ve birbirlerine yakın konumlanmış şekilleriyle bir bariyeri andırmaktaydı (Şekil 73, 74).



Şekil 73: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **n**, endotel hücrelerinin nükleusları; **sr**, sarkomer; **m**, mitokondri; **f**, damar lümenlerindeki fibrin birikimi; **er**, eritrosit; **BD**, yoğun fibröz içerikli bağ dokusu; **KM**, kardiyak myosit; **L**, damar lümeni; **kalin ok**, genişlemiş diskus interkalarislere denk gelen kısımlarda bulunan vakuoler yapılar; **ince ok**, fibrin meteryal içinde bulunan lenfoid hücre; **siyah okbaşı**, myosit içerisindeki myofibril görünümünde olmayan fibröz yapılar; **beyaz dolgulu yıldız**, sarkoplazmadaki düzensiz görünümlü alanları göstermektedir. C'deki küçük resimde çerçeveli alanda yer alan bozuk kristal mitokondriler daha yakından görülmektedir. **Bar=** 1,5 μ m.

Bu grupta yer alan myositler arasında çok sayıda fibrosit bulunmaktaydı. Myosit sarkoplazmasına yakından bakıldığında sadece yukarıda bahsedilen şekliyle hücrenin periferinde kalmayıp perinükleer bölgede de izlenen genişlemiş sarkoplazmik retikulum tübülleri mevcuttu. Ayrıca hem kesintiye uğramış myofibrillerin bulunduğu bölgede hem de yine perinükleer alanda ödematöz şişme saptandı. Bu ödemli sarkoplazma içeren myositler ile bağ dokusu arasındaki kısımlarda bağ dokusunun şekilsiz elemanlarından oluşan materyal birikimi gözlenmekteydi (Şekil 74). Farklı alanlarda yapılan ultrastrüktürel değerlendirmede, çentikli yapıda nükleusa sahip myositler görüldü. Bu gruba ait örneklerden elde edilen enine kesitlerde ise nükleusların kenara itildiği ve myofibrillerin parçalı görünümde olduğu saptandı. Mitokondriler ve myofibriller arasında boşluklar oluşmuştu. Kas lifleri içinde enine ilerleyen transvers tübüller genişlemişti ve bunların arasında kalan sarkoplazmik alanlarda şişme bulguları vardı. Myositler arasında piknotik çekirdekli endotel hücreleri de bulunmaktaydı (Şekil 74).

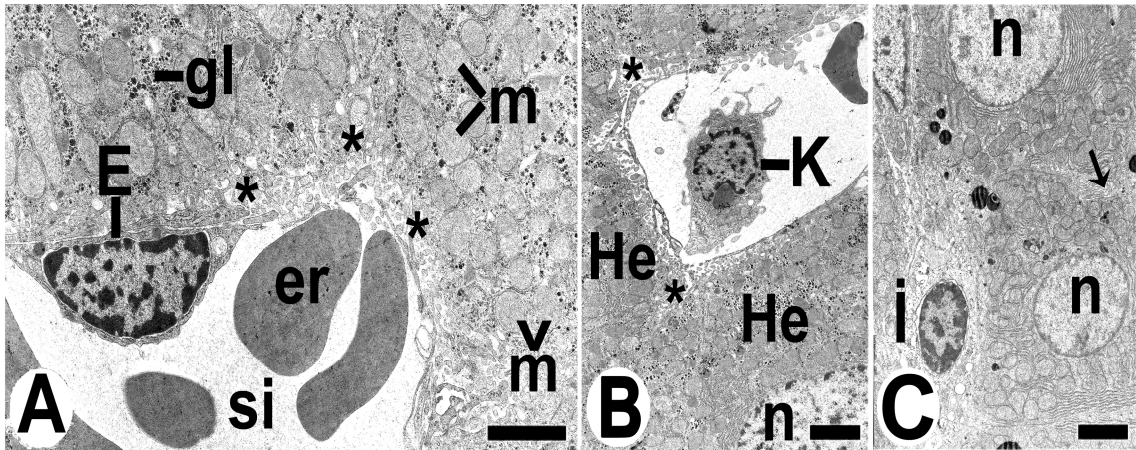


Şekil 74: Deney grubundaki erişkin sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **n**, myosit nükleusları; **m**, mitokondri; **fs**, fibrosit; **sr**, sarkomer; **Z**, Z çizgisi; **My**, myofibril, **B**, bağ dokusu (intersitisyumu); **yıldız**, transvers tübüller arasında kalan şişmiş sarkoplazmik kısımlar; **beyaz dolgulu yıldız**, myositler ile bağ dokusu intersitisyumu arasındaki kısımlarda bağ dokusunun şekilsiz elemanlarından oluşan materyal birikimini göstermektedir. D'deki küçük resimde bozuk kristal mitokondriler görülmektedir. **Bar**= 1µm.

4.III.2. Yavru Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular:

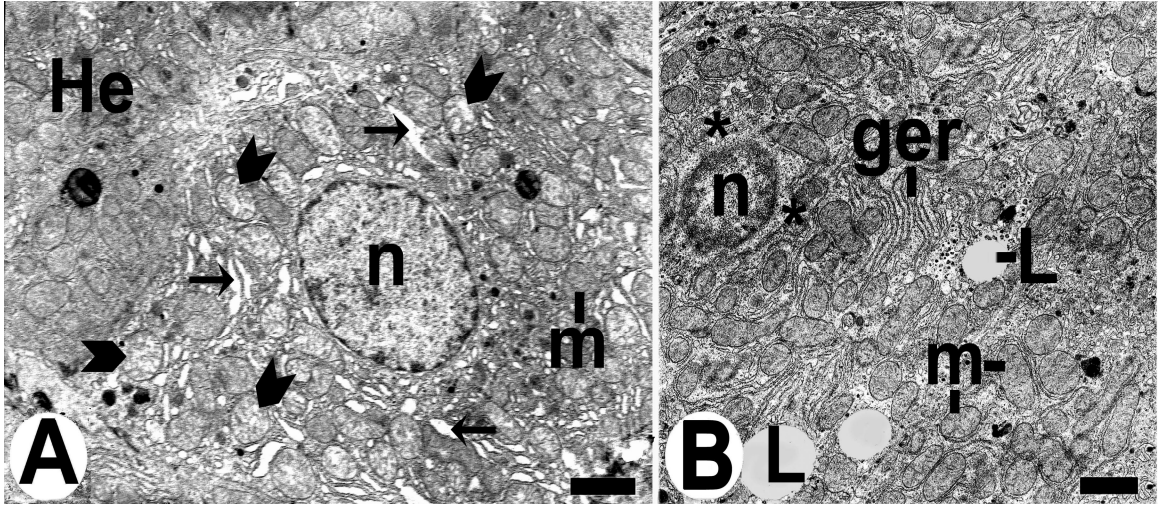
4.III.2.A. Karaciğere İlişkin Elektron Mikroskopik Bulgular:

Kontrol grubunu oluşturan 10 günlük yavru sıçanlardan elde edilen karaciğer örnekleri elektron mikroskobu altında incelendiğinde karaciğer ince yapısının olağan görünümünde olduğu tespit edildi. Hepatositler poligonal yapıda olup sitoplazma içerisinde mitokondri ve endoplazmik retikulum belirgindi ve erişkin karaciğerinden farklı olarak yer yer küçük glikojen depolarına daha sık rastlanmaktaydı. Hepatositler ara sı mesafeler dardı ve hepatositler birbirine bitişik olarak gözlenmekteydi. Karaciğeri oluşturan diğer yapılar da incelendiğinde sinüzoid duvarındaki endotel hücreleri ve Kupffer hücrelerinin de normal görünümleri içerisinde oldukları görüldü. Disse aralığının genişliğinde ve İto hücrelerinin yapısında da herhangi bir patoloji saptanmadı (Şekil 75).



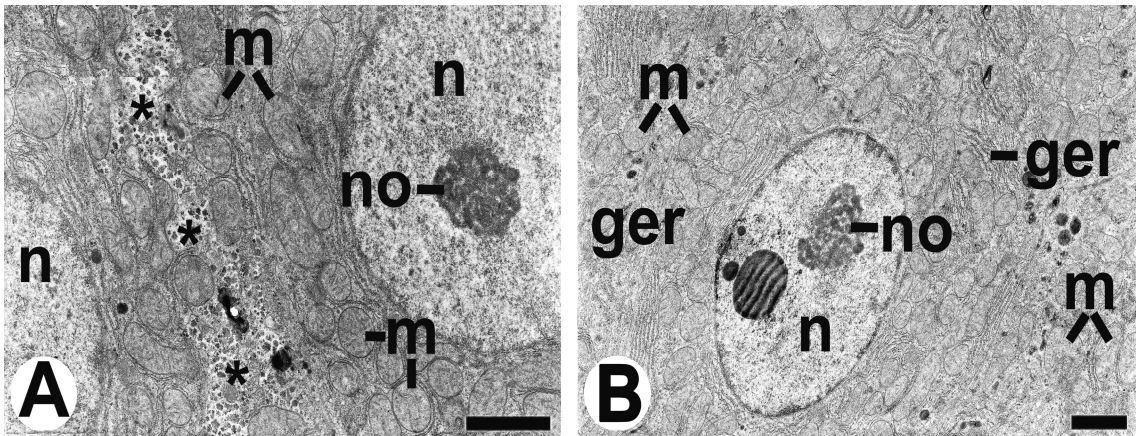
Şekil 75: Kontrol grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **n**, hepatosit nükleusları; **m**, mitokondri; **E**, endotel hücresi; **gl**, glikojen; **si**, sinüzoid; **er**, eritrosit; **He**, hepatosit; **K**, Kupffer hücreleri; **i**, İto hücresi; **ince ok**, hepatositler arasında bulunan safra kanalikülü; **yıldız**, Disse aralığını göstermektedir. **Bar**= 2 μ m.

Tek doz LF uygulanan 10 günlük sıçan yavrularının karaciğerlerinin ince yapısının değerlendirilmesi sonucu hepatositlerin hasara uğradığı görüldü. Hepatosit çekirdekleri küçülmüştü ve piknotik yapıdaydı; ayrıca çekirdek etrafında organelden yoksun alanlar bulunması da dikkati çekmekteydi. Hepatositleri oluşturan organelerin yapısına bakıldığında düz yüzlü endoplazmik retikulum sistemalarının genişlediği, mitokondri kristallarının bozulduğu ve lipid damlacıklarının arttığı gözlemlendi (Şekil 76).



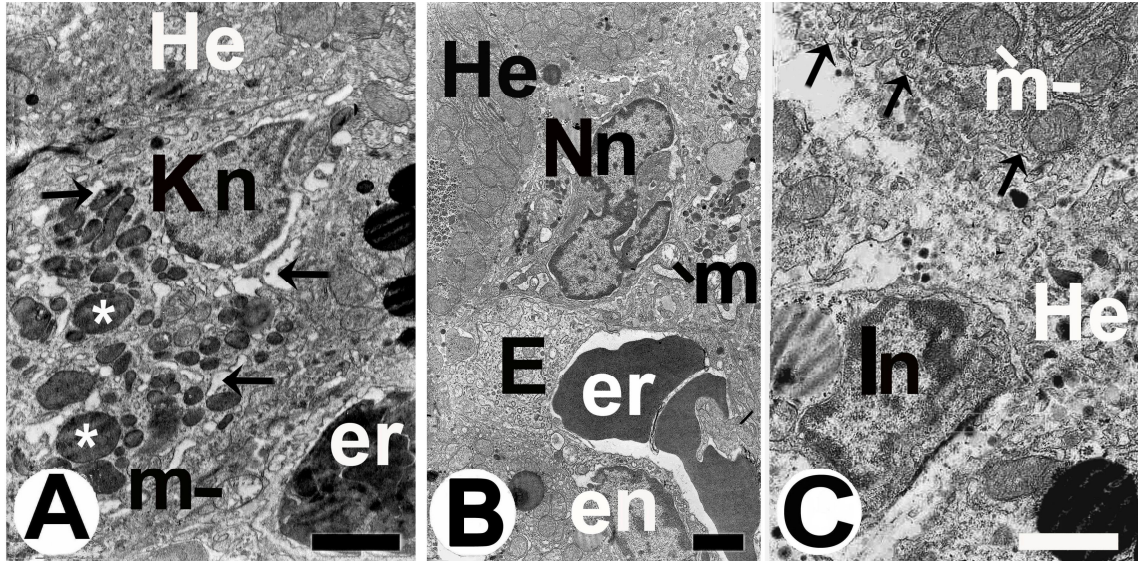
Şekil 76: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **n**, hepatosit nükleusu; **m**, sağlıklı mitokondri; **ger**, granüler endoplazmik retikulum; **He**, hepatosit; **L**, lipid damlacığı; **ince ok**, genişlemiş düz yüzlü endoplazmik retikulum sisternaları; **siyah okbaşı**; kristalleri dejenere olmuş mitokondriler; **yıldız**, perinükleer ödem içeren alanları göstermektedir. B'de görülen hepatosit nükleusunun küçülmüş olduğu ve kromatininin yoğunlaştığı dikkat çekmektedir. **Bar= 1 µm**.

Deney grubundaki yavru sıçanlardan alınan karaciğer örnekleri üzerinde yapılan ultrastrüktür değerlendirmesinin sonuçlarına göre; çekirdekçikler aktif görünümdeydi ve kontrol grubundakine kıyasla daha belirgindi. Hepatositler içerisinde ve hücreler arası ortamda glikojen depoları genişlemişti (Şekil 77).



Şekil 77: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **n**, hepatosit nükleusu; **no**, hepatosit nükleolusu; **m**, sağlıklı mitokondri; **ger**, granüler endoplazmik retikulum; **yıldız**, glikojen içeriği artmış hepatositler arası mesafeyi göstermektedir. Her iki resimde de nükleolusların aktif ve iri olduğu dikkat çekmektedir. **Bar= 1 µm**.

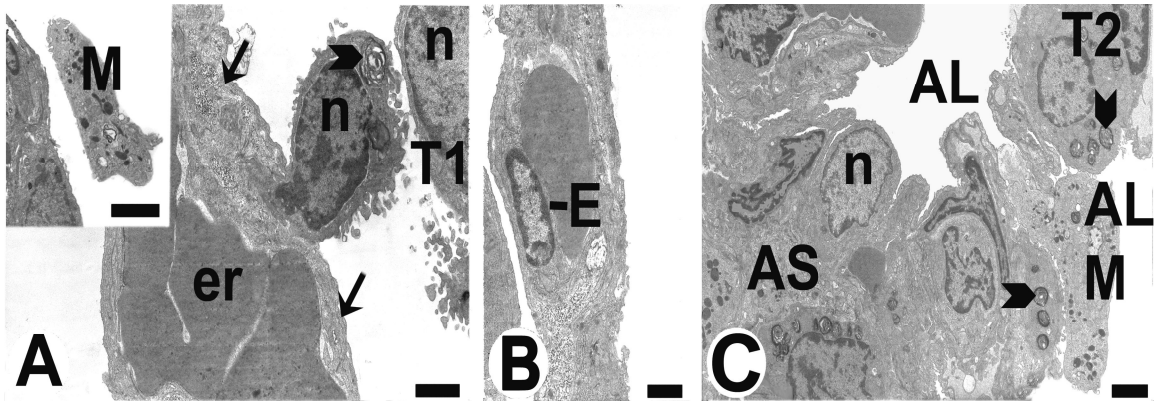
Kupffer hücreleri, bol sitoplazmik içeriği ve çok sayıdaki sekonder lizozomlarıyla aktif görünümdeydi. Hepatositlerdeki gibi Kupffer hücrelerinde de düz yüzlü endoplazmik retikulum sisternaları genişlemişti. Hem hepatositler hem de Kupffer hücreleri kontrol grubundakilere göre daha çok sayıda sekonder lizozom içermekteydi. Ayrıca hepatositlerin membranları düzgün bir sınır oluşturan devamlı yapısını kaybetmişti ve kesintiliydi. Bunun yanında hepatositlerin Disse mesafesine bakan yüzlerinde olağan bir şekilde izlenmesi gereken mikrovilluslar da yer yer yoktu (Şekil 78 C). Endotel hücreleri kontrol grubundakine kıyasla daha fazla sitoplazma içermekteydi. Disse aralığı ise genişlemişti (Şekil 78).



Şekil 78: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen karaciğer kesiti. **He**, hepatosit; **Kn**, Kupffer hücresi nükleusu; **Nn**, nötrofil nükleusu; **E**, endotel hücresinin sitoplazması; **en**, endotel hücresinin nükleusu; **In**, Ito hücresi nükleusu; **m**, bozuk kristal mitokondriler; **er**, eritrosit; **ince ok**, Kupffer hücresi içerisinde genişlemiş düz yüzlü endoplazmik retikulum sisternaları; **çift başlı ok**, sürekliliğini yitirmiş hepatosit membran hattı, bu sürekliliğin kaybolduğu noktalarda hepatosit sınırı dışına taşmış sitoplazmik içerik dikkat çekmektedir; **yıldız**, Kupffer hücreleri içerisindeki sekonder lizozomları göstermektedir. **Bar**= 1,5 µm.

4.III.2.B. Akciğere İlişkin Elektron Mikroskopik Bulgular:

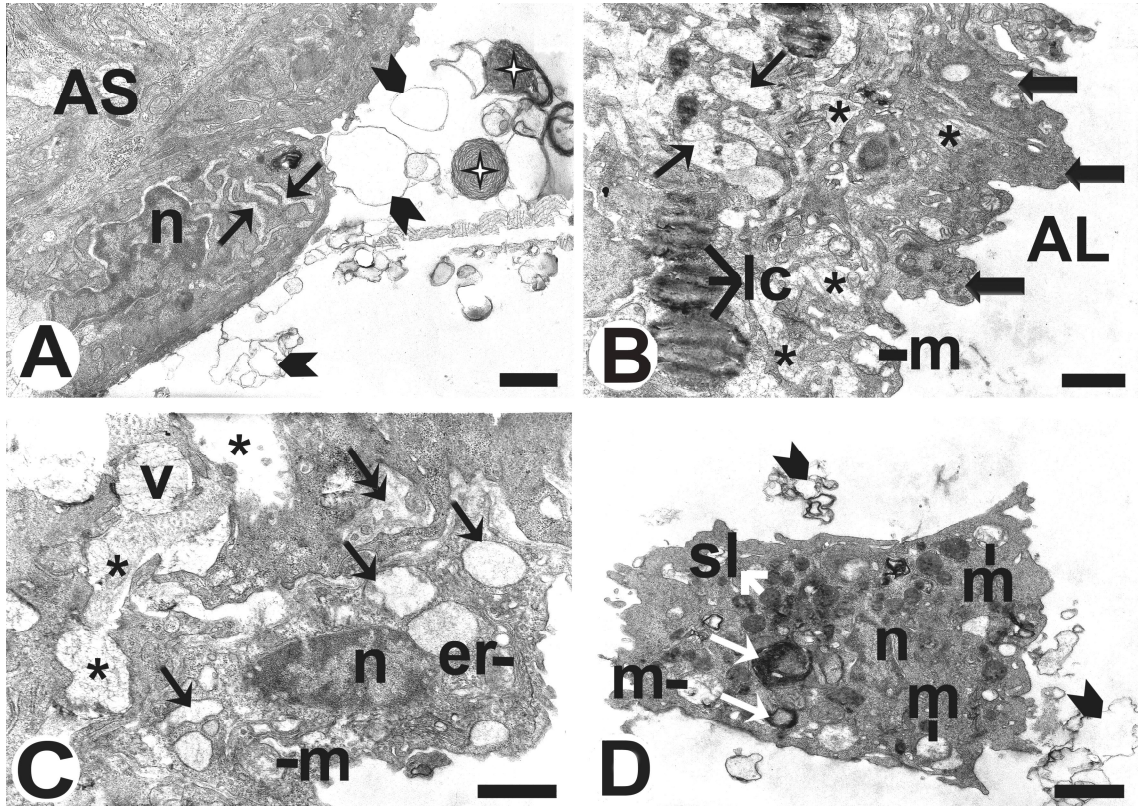
Kontrol grubundaki yavru sıçanlara ait elektron mikroskopik akciğer örneklerinde akciğerin iskeletini oluşturan alveol ve bronşioollerin erişkin kontrol grubundakinden farklı olmadığı görüldü. Alveolleri oluşturan tip 1 pnömositler bilinen yassı görünümündeydi ve kapiller tipteki damarlarla komşuluk ilişkisi içerisinde idi. Tip 1 pnömositler ve kapillerler arasında bulunan kan hava bariyeri normal incelikteydi. Tip 2 pnömositler ise bağ dokusu septumlarına yakın yerleşimli olup kübik şekilli idi ve az sayıda lamellar cisime sahipti. Alveol lümeninde bulunan makrofajlar oval görünümündeydi ve az miktarda sitoplazma içermektedir. İnter-alveoler septumlar ince yapıda olmakla birlikte tip 2 pnömositleri ve rutin bağ dokusu hücrelerini içermektedir. Bronşiooller kübik ya da silindirik hücrelerden oluşmakta olup sağlıklı olarak izlendi (Şekil 79).



Şekil 79: Kontrol grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **M**, makrofaj; **n**, nükleus; **er**, eritrosit; **T1**, tip 1 pnömosit; **E**, endotel hücresi; **AS**, inter-alveoler septum; **AL**, alveol lümeni; **T2**, tip 2 pnömosit; **ince ok**, kan hava bariyeri; **siyah okbaşı**, lamellar cisimleri göstermektedir. Küçük resimde alveoler makrofaj görülmektedir. **Bar**= 3 µm.

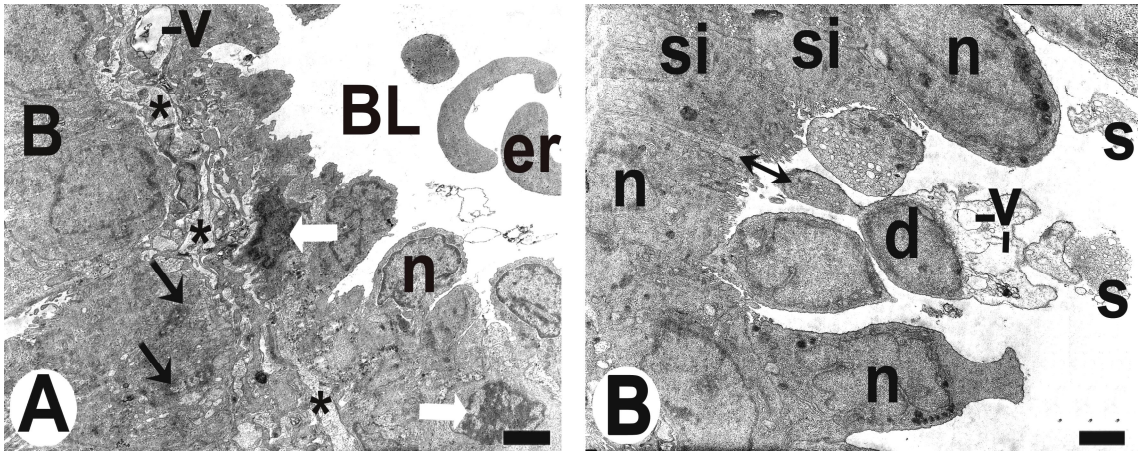
Deney grubundaki yavru sıçanlara tek doz LF uygulandıktan 24 saat sonra elde edilen akciğer örnekleri ince yapı açısından değerlendirildiğinde bu örneklerde bir dizi patolojik değişikliğin gerçekleşmiş olduğu görüldü. Öncelikle tip 1 pnömositlerin çekirdeklerinin ileri derecede çentikli olduğu tespit edildi. Ayrıca yine tip 1 pnömosit sitoplazması içerisinde yer alan düz yüzlü endoplazmik retikulum sisternaları genişlemişti. Bazı tip 1 pnömositler geniş vakuoller içermektedir ve kimi alanlarda tip 1 pnömosit hattı düzensiz, kalın ve elektron yoğun görülmektedir. Tip 2 pnömositler ise çok sayıda, iri ve yapısı bozulmuş lamellar cisimler içermiyordu.

Alveol lümeni içerisinde yer alan makrofajlar kontrol grubundakilere kıyasla daha büyüktü; küçük bir çekirdeğe ve bol sitoplazmik içeriğe sahipti. Bu makrofajlar miyelin benzeri yapılar içermekteydi ve mitokondrileri ise şişmişti. Yine alveol lümeni içerisinde çok sayıda membran artığı ve ekstrasellüler lamellar cisimler bulunmaktaydı. Alveol epitelinin oturduğu bazal membran kalınlığı kontrol grubuna kıyasla artmıştı. Hem bronşiyol hem de alveol lümeni içerisinde eritrositlerin varlığı dikkat çekiciydi (Şekil 80).

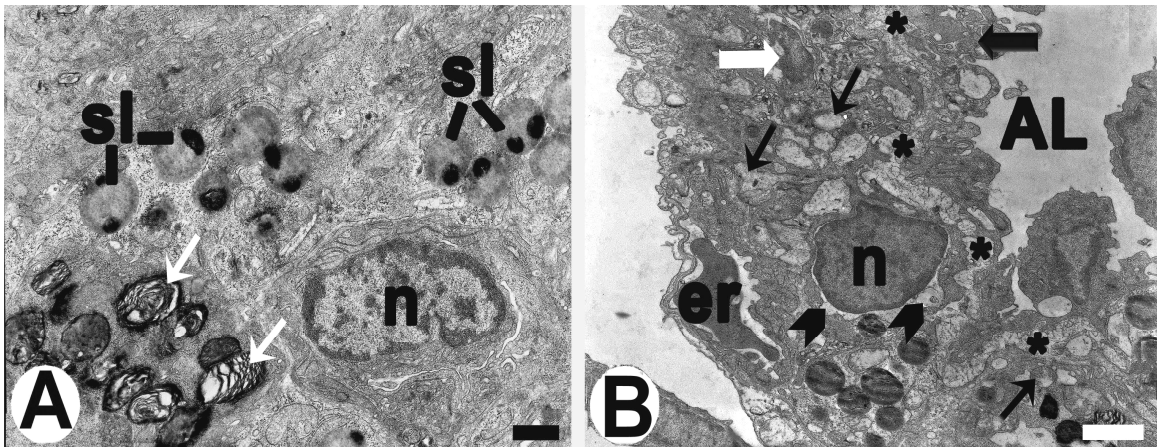


Şekil 80: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **AS**, inter-alveoler septumu; **n**, pnömositlerin ve alveoler makrofajın (D) nükleusu; **AL**, alveol lümeni; **lc**, yapısı bozulmuş lamellar cisimler; **er**, sağlıklı görünümlü düz yüzlü endoplazmik retikulum sisternaları; **m**, kristalleri dejenere olmuş mitokondriler; **v**, vakuol; **sl**, sekonder lizozom; **Kalın ok**, kalınlaşmış ve bol sitoplazma içeren tip 1 pnömosit hattı; **ince ok**, tip 1 ve tip 2 pnömositlerde görülen genişlemiş endoplazmik retikulum sisternaları; **siyah okbaşı**, alveol lümeninde bulunan membran artıkları; **beyaz ince ok**, makrofaj içerisindeki miyelin benzeri yapılar; **yıldız**; kalınlaşmış alveol bazal membranı; **beyaz dolgulu yıldız**, alveol lümeninde bulunan ekstrasellüler lamellar cisimleri göstermektedir **Bar=** 2 µm.

Ek olarak bazı bronşiyollerin lümenlerinde, salgı materyali olası yapılarla birlikte, epitel yüzeyinden lümene doğru sarkmış ve yer yer epitelle bağlantısı görülemediğinden lümene dökülmüş izlenimi uyandıran ve sitoplazmasında vakuoler dejenerasyonlar saptanan hücreler ya da hücre artıkları bulunmaktaydı. Bu bronşiyollerin bazal membranı ise kontroldekine kıyasla daha kalındı. Bronşiyol duvarlarında elektron-yoğun çekirdekli hücreler bulunuyordu ve bu bronşiyollerin lümenlerinde eritrosit varlığı da dikkat çekmekteydi (Şekil 81). Bağ dokusu tabakasındaki hücreler çok sayıda bozuk kristal mitokondri içermekteydi ve bu hücrelerin perinükleer sitoplazmaları ödemliydi. Ayrıca yine bu hücreler çok sayıda sekonder lizozom da içermekteydi (Şekil 82).



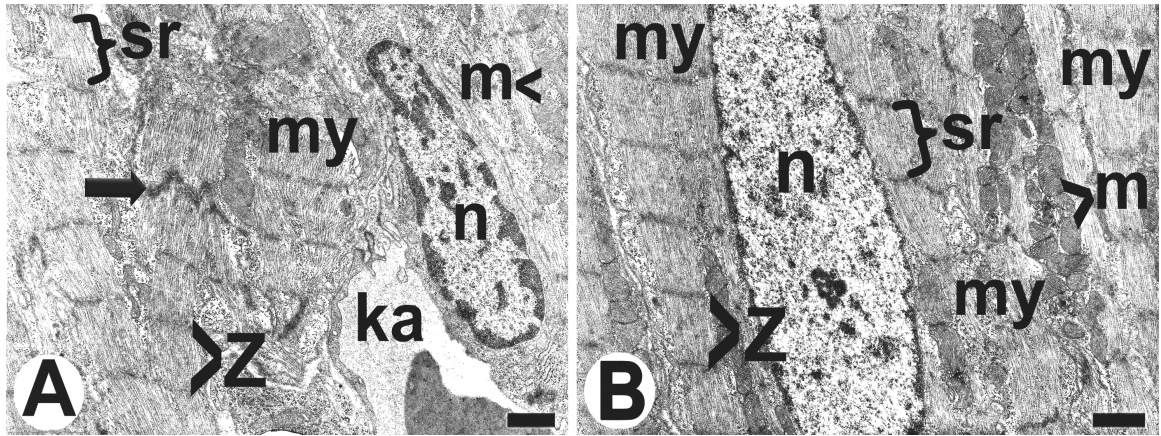
Şekil 81: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **B**, bağ dokusu; **n**, nükleus; **BL**, bronşiyol lümeni; **er**, eritrosit; **v**, vakuöl; **si**, bronşiyol epitel hücrelerinin sitoplazmaları; **s**, bronşiyol lümeni içerisindeki sitoplazma artıkları; **d**, bronşiyol duvarıyla arasındaki bağlantı görülemeyen epitel hücresi; **beyaz oklar**, piknotik bronşiyol hücresi nükleusları; **ince ok**, küçülmüş bağ dokusu hücresi nükleusları; **yıldız**, kalınlaşmış bronşiyol bazal membranı; **çift yönlü ok**, bronşiyol duvarıyla epitel hücresinin bağlantısının seçilemediği alanı göstermektedir. **Bar**= 1,5 µm.



Şekil 82: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen akciğer kesiti. **n**, nükleus; **sl**, sekonder lizozom; **AL**, alveol lümeni; **er**, eritrosit; **siyah kalın ok**, kalın kan hava bariyeri; **beyaz kalın ok**, küçülmüş bağ dokusu hücresi nükleusu; **siyah ince ok**, kristalleri ve sınırları bozuk mitokondriler; **beyaz ince ok**, gevşek yapıda ve iri lamellar cisimler; **siyah okbaşı**, perinükleer ödem; **yıldız**, kalınlaşmış alveoler bazal membranı göstermektedir. **Bar**= 1 µm.

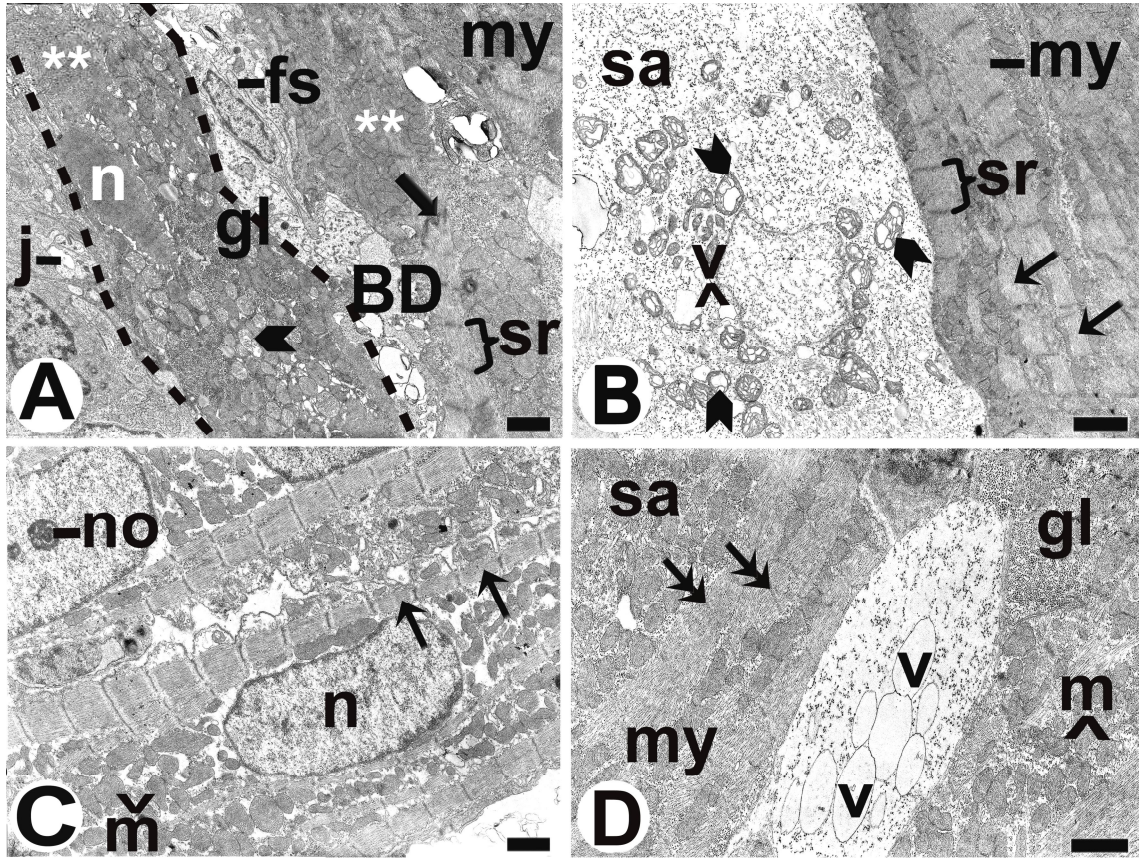
4.III.2.C. Kalbe İlişkin Elektron Mikroskopik Bulgular:

Kontrol grubundaki 10 günlük yavru deneklere ait ultra ince kesitlerde kalp dokusunun erişkin kontrol deneklerinki ile büyük ölçüde aynı yapıya sahip olduğu tespit edildi. Dokunun büyük çoğunluğu kardiyak myositlerden oluşmaktaydı ve bu hücreler arasında seyrek olarak damarlar göze çarpıyordu. Kardiyak myositlerin detaylı yapısı incelendiğinde hücrelerin belirgin bir çekirdeği bulunan merkezi yerleşimli bir çekirdeğe sahip olduğu görüldü. Myositler, sitoplazmayı dolduran ve sarkomer adı verilen birimleri oluşturan miyofilamentlerin yanı sıra çok sayıda mitokondri de içermektedir. Hücreler arasındaki bağlantı bölgeleri olan diskus interkalarisler de normal görünümdeydi. (Şekil 83).



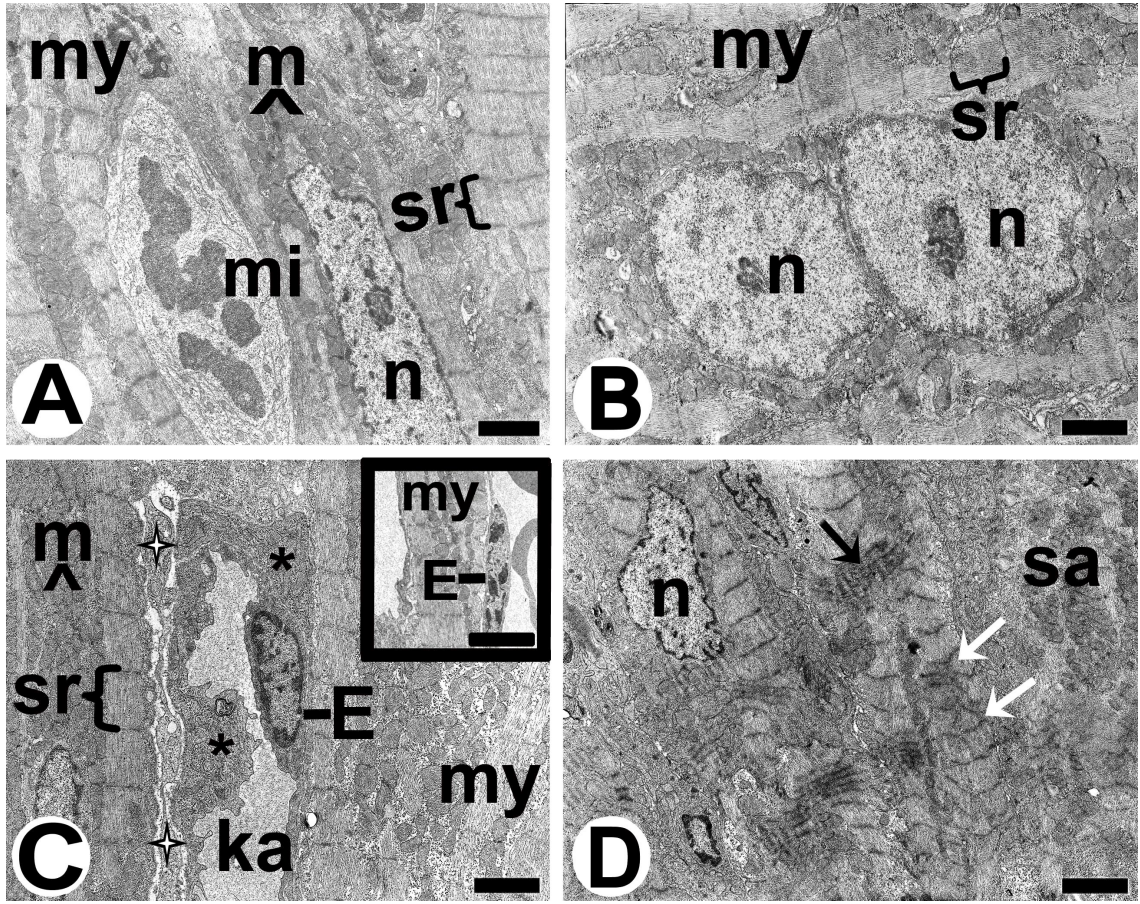
Şekil 83: Kontrol grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **n**, nükleus; **sr**, sarkomer; **my**, myofibril; **ka**, kapiller; **Z**, Z çizgisi; **m**, mitokondri; **kalın ok**, diskus interkalarisi göstermektedir. **Bar**= 1 µm.

Deney grubundaki yavru sıçanların kalp örneklerinden hazırlanan ince kesitler elektron mikroskopunda incelendiğinde; normal görünümlü kardiyak myositler arasında hem sitoplazması hem de çekirdeği elektron-yoğun olarak izlenen myositlere rastlandı. Bazı kas liflerinde ileri derecede sarkoplazmik ve mitokondriyal şişme ile karakterize ciddi patolojik değişim izlenirken, bazılarında da vakuoler dejenerasyonlar saptandı. (Şekil 84).



Şekil 84: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **n**, nükleus; **sr**, sarkomer; **BD**, bağ dokusu; **j**, genişlemiş bağlantı kompleksi; **fs**, fibrosit; **gl**, glikojen; **sa**, sarkoplazma; **v**, vakuol; **my**, myofibril; **m**, mitokondri; **no**, nükleolus; **kalın ok**, diskus interkalaris; **ince ok**, sağlıklı görünümlü ve düzgün yapıli myofibriller; **çift başlı ok**, sağlıklı görünenlere kıyasla incelmış Z çizgileri; **siyah okbaşı**, bozuk kristali mitokondriler; **çift yıldız**, sarkoplazma içerisindeki elektron yoğun görülen ve myofibril içermeyen alanları göstermektedir. A'da kesik çizgilerle çevrili alanda kenara itilmiş nükleusu ve elektron yoğun sitoplazmasıyla hasarlı bir myosit görülmektedir. **Bar= 1 µm**.

Farklı alanlar gözden geçirildiği zaman myositlerden bir kısmının mitoz geçirdiği saptandı. Bölünmenin bir ileriki aşamasındaki kimi hücreler ise çift çekirdekli olarak görölüyordu. Bir kısım myositlerde diskus interkalarisler kalınlaşmıştı ve Z çizgilerinin düzeni bozulmuştu. Bazı sarkomerlerin de anormal görünümde oldukları tespit edildi. Endotel hücrelerinin sitoplazma hattı düzensiz ve genişlemiş olarak gözlenirken bu hücrelerin çekirdekleri ise çentikli yapıdaydı. Ayrıca damar duvarlarını döşeyen endotel hücrelerinin sitoplazmalarının artmış olduğu ve lümene doğru çıkıntı yapan bu bölümlerin lümeninde daralmaya neden olduğu gözlendi (Şekil 85).

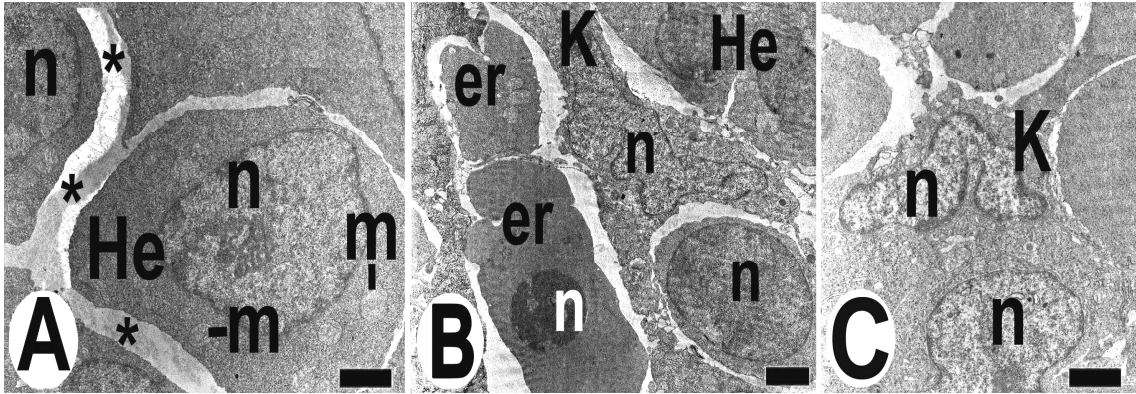


Şekil 85: Deney grubundaki yavru sıçanlardan elde edilen kalp kesiti. **n**, nükleus; **sr**, sarkomer; **my**, myofibril; **m**, mitokondri; **mi**, mitoz geçirmekte olan nükleus; **E**, endotel hücrenin nükleusu; **ka**, kapiller; **sa**, sarkoplazma; **siyah ince ok**, sıklığı artan Z çizgileri; düzensiz hatlı sarkomerler; **yıldız**, endotel hücrelerinin sitoplazma içeriğinin arttığı ve lümeni daralttığı alanları göstermektedir. Küçük resimde çentikli endotel nükleusu görülmektedir. **Bar**= 2 µm.

4.III.3. Fetüs Grubuna Ait Elektron Mikroskopik Bulgular:

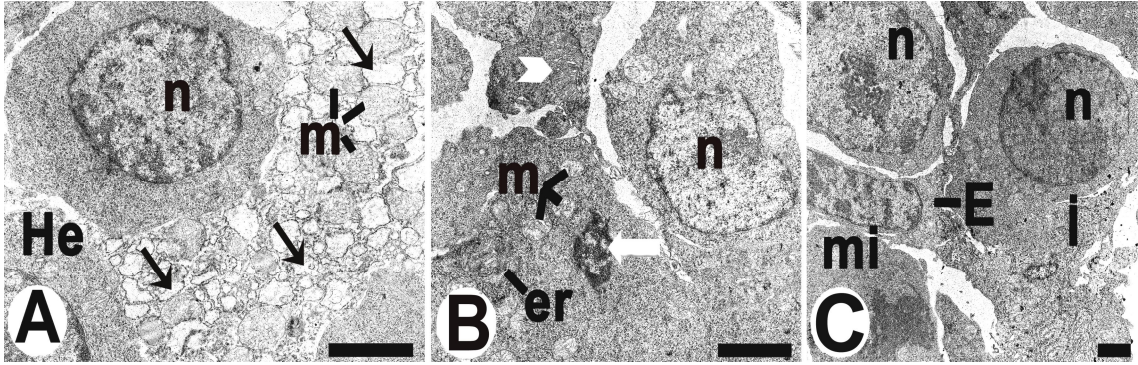
4.III.3.A. Karaciğere İlişkin Elektron Mikroskopik Bulgular:

Kontrol grubunda yer alan 16 günlük gebelerden alınan sıçan fetüslerinden elde edilen karaciğer örnekleri de elektron mikroskopik olarak değerlendirildi. Bu değerlendirmede fetüs karaciğerlerinin büyük çoğunlukla parankimal hücreler ve öncül kan hücreleri tarafından oluşturulduğu görüldü. Bu hepatositler diğer kontrol gruplarındakilere kıyasla daha küçüktü ve çekirdekleri de daha iriydi. Çekirdeğin içerisinde gevşek kromatin yapısı ile çekirdekçiğin varlığı açıkça ayırt edilebilmekteydi. Çekirdek-sitoplazma oranı da diğer kontrol gruplarına kıyasla yüksekti. Bu hepatositlerde sitoplazmik içerik olarak glikojen partiküllerinin çokluğu ve organel olarak da az sayıda mitokondri varlığı dikkat çekmekteydi. Hücreler birbirine sıkıca bağlı değildi. Birbirinden ayırık yerleşimli bu hepatositler arasında Kupffer hücreleri de kolaylıkla seçilebilmekteydi. Bu hücreler girintili-çıkıntılı yüzeye sahip ökromatik görünümlü çekirdekleri ve sitoplazmik uzantılarıyla belirgindi (Şekil 86).



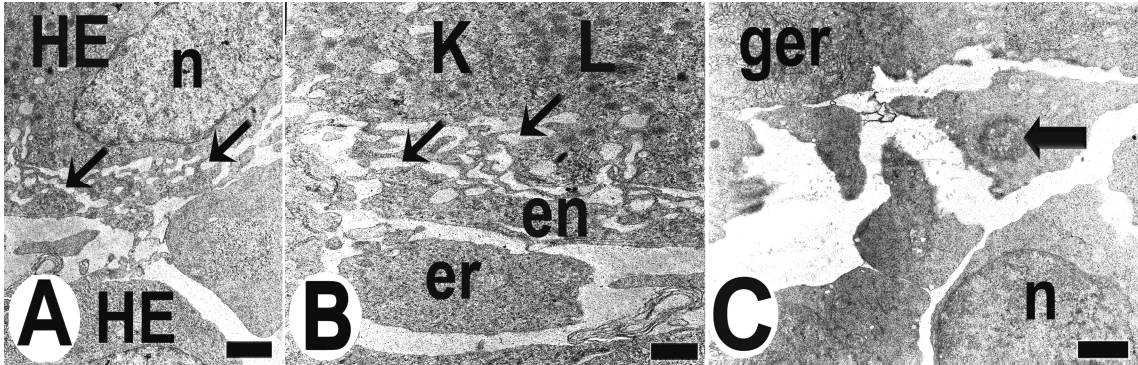
Şekil 86: Kontrol grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen karaciğer kesiti. **n**, nükleus; **He**, hepatosit; **er**, eritrosit; **K**, Kupffer hücresi; **m**, mitokondri; **yıldız**, geniş hücreler arası mesafeyi göstermektedir. **Bar=** 1,5 µm.

Deney grubundaki 16 günlük gebelerden LF uygulamasını takiben elde edilen fetüslerin karaciğerleri aynı grubun kontrol örneklerine kıyasla bazı patolojik değişiklikler göstermekteydi. Bazı hepatositlerin çekirdekleri piknotikti ve kenara itilmişti. Bu hepatositlerin sitoplazmasında dev mitokondriler yer almaktaydı; diğer bazı mitokondrilerin de krista yapısı bozuktu. Farklı alanlarda yapılan incelemede sağlıklı hepatositler arasında yer genişlemiş düz yüzlü endoplazmik retikulum sisternalarının yanı sıra düzensiz sınırlı ve dejenere olmuş kristalı mitokondrileri ile hasarlandıkları anlaşılan hepatositlere de rastlandı. Yine bu gruba ait karaciğer kesitlerinde mitotik figürler de dikkat çekmekteydi (Şekil 87).



Şekil 87: Deney grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen karaciğer kesiti. **n**, nükleus; **mi**, mitoz; **He**, hepatosit; **m**, mitokondri; **er**, endoplazmik retikulum; **E**, endotel hücresi; **İ**, küçülmüş nükleuslu İto hücresi; **kalin beyaz ok**, piknotik nükleus; **İnce ok**, genişlemiş düz yüzlü endoplazmik retikulum sisternaları, **beyaz okbaşı**, dev mitokondrileri göstermektedir. **Bar**= 1 µm.

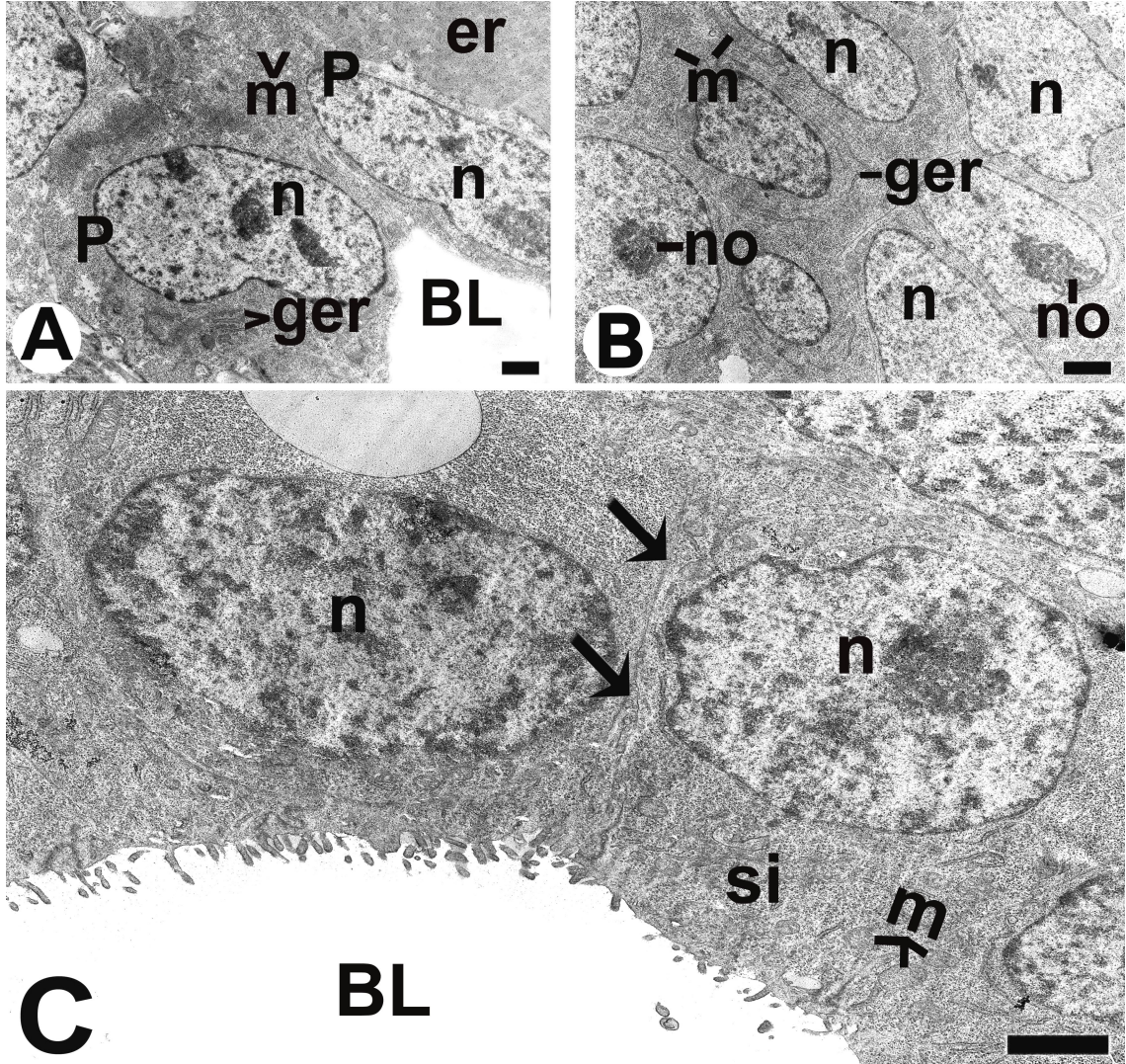
Kupffer hücrelerinin çekirdekleri kontrol grubundakilerden daha iriydi ve sitoplazma miktarı da daha fazla olup çok sayıda lizozom ile oldukça genişlemiş düz yüzlü endoplazmik retikulum sisternalarını içeriyordu. Bu yapılarıyla Kupffer hücreleri aktif görünümdeydi. Ayrıca büyük hepatositler arasında, membranla çevrili olan ve bazen koyu bir nükleer fragman da içeren sitoplazmik parçacıklar görüldü. Bu yapılar apoptotik cisimler olarak yorumlandı (Şekil 88).



Şekil 88: Deney grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen karaciğer kesiti. **n**, nükleus; **L**, lizozomlar; **er**, eritrosit; **en**, endotel hücresi; **K**, Kupffer hücresi; **He**, hepatosit; **ger**, hepatositin granüllü endoplazmik retikulumdan zengin sitoplazması; **kalin ok**, koyu kromatinli küçük bir nükleer parça içeren apoptotik cisim; **İnce ok**, genişlemiş düz yüzlü endoplazmik retikulum sisternalarını göstermektedir. **Bar**= 1 µm.

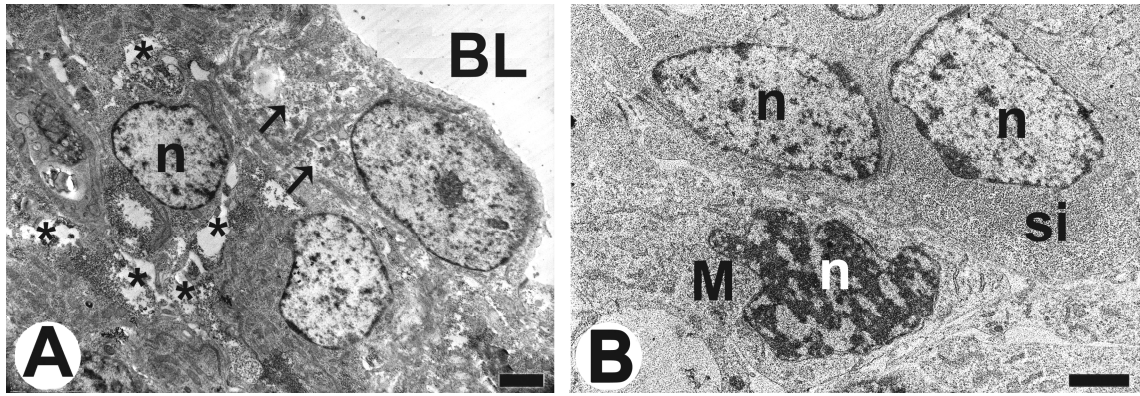
4.III.3.B. Akciğere İlişkin Elektron Mikroskopik Bulgular:

Kontrol grubu 16 günlük fetüslerin akciğerleri geç psödoglandular evrede olup parankiması, bronşiyol öncülerine kadar dallanmış iletilci bölümün tübüler yapılarını içeriyordu. Bronşiyollerin duvarı tek katlı kübik epitel ile döşenmişti ve epitel hücrelerinin apikal yüzeyinde kısa mikrovilluslar bulunuyordu (Şekil 89).

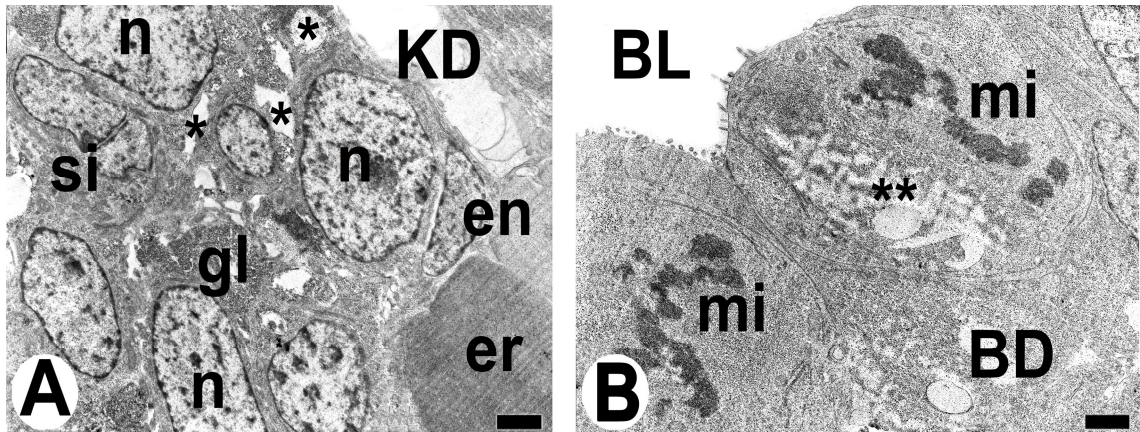


Şekil 89: Kontrol grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen akciğer kesiti. **BL**, bronşiyol lümeni; **P**, bronşiyol duvarını döşeyen epitel hücreleri; **er**, eritrosit; **n**, nükleus; **no**, nükleolus; **si**, sitoplazma; **m**, mitokondri; **ger**, granüler endoplazmik retikulum; **ince oklar**, bronşiyol hücrelerinin birbirleriyle olan sınırlarını göstermektedir. **Bar**= 1 µm.

Deney grubundan elde edilen 16 günlük fetüslerin akciğerlerinde kontrol grubuna ait örneklerden farklı olarak gözlenen bulgulardan ilki bronşiyolleri döşeyen epitel hücrelerinin sitoplâzmalarında ödem gerçekleştiğinin saptanmasıydı. Ayrıca bu hücreler elektron yoğun ve fibröz birikimler içermekteydi. Hücreler arasındaki bağlantı bölgelerinin içeriğinde elektron yoğun materyal de bulundurarak genişlediği saptandı. Bu alanlarda izlenen makrofajlar elektron yoğun çekirdek yapısına sahipti. Bronşiyollerin duvarında sıklıkla mitotik figürlere rastlandı. Bu mitoz geçirmekte olan hücrelerin sitoplâzması içerisinde vakuoler dejenerasyon tarzında patolojik değişimler gözlemlendi (Şekil 90, 91).



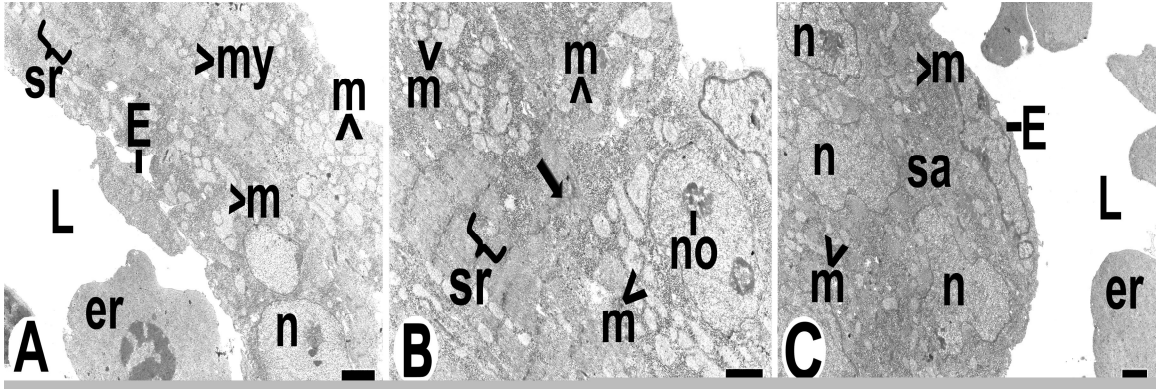
Şekil 90: Deney grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen akciğer kesiti. **BL**, Bronşiyol lümeni; **n**, nükleus; **si**, sitoplazma; **M**, makrofaj, **ince oklar**, bronşiyolü döşeyen epitel hücreleri içerisinde bulunan ödematöz birikim olası elektron-az yoğun alanlar; **yıldız**, hücreler arasında bulunan ve kontrol grubunda görülmeyen ve granüler elektron-yoğun materyal içeren boşlukları göstermektedir. **Bar**= 1,5 µm.



Şekil 91: Deney grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen akciğer kesiti. **BL**, bronşiyol lümeni; **er**, eritrosit; **n**, nükleus; **si**, sitoplazma; **gl**, glikojen; **mi**, mitotik figür; **yıldız**, hücreler arasında bulunan ve kontrol grubunda görülmeyen elektron yoğun materyal içeren boşluklar; **çift yıldız**, mitotik bronşiyol hücrelerindeki vakuoler dejenerasyon alanlarını göstermektedir. **Bar**= 1 µm.

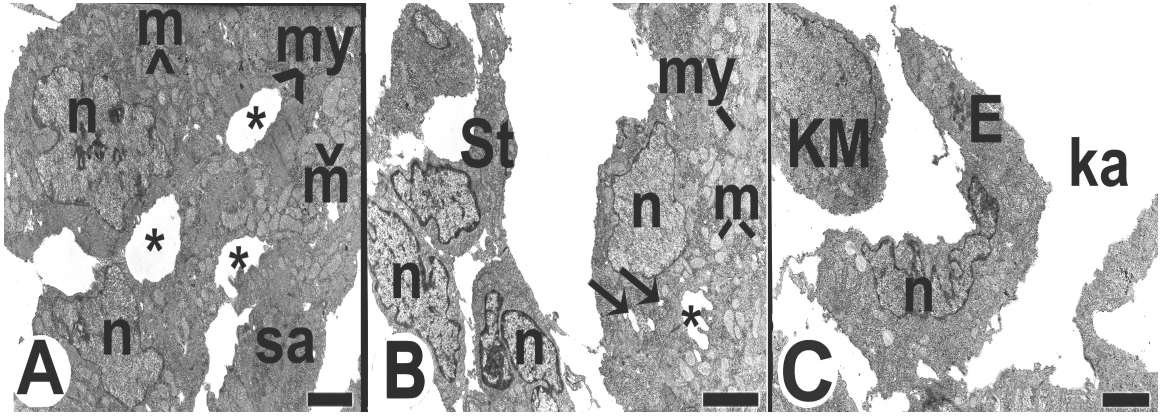
4.III.3.C. Kalbe İlişkin Elektron Mikroskopik Bulgular:

Kontrol grubundaki 16 günlük fetüslerden elde edilen kalp dokusu örnekleri erişkin ve yavru grubunda da bahsedildiği gibi, merkezi yerleşimli oval bir çekirdek içeren kardiyak myositlerden oluşuyordu. Çekirdekler içerisinde gevşek kromatin yapıya sahip çekirdekçikler kolaylıkla seçilebilmekteydi. Mitokondriler çekirdeğin etrafında ve myofibriller arasında belirgin olarak göze çarpmaktaydı. Hücreler Z çizgileri tarafından bölünmüş sarkomerlerden oluşan myofibrillere sahipti. Kas liflerini oluşturmak üzere myositler birbirine diskus interkalarisler aracılığı ile bağlanmıştı. Kas liflerinin arasında damarları da içeren ince bağ dokusu alanlar bulunuyordu (Şekil 92).

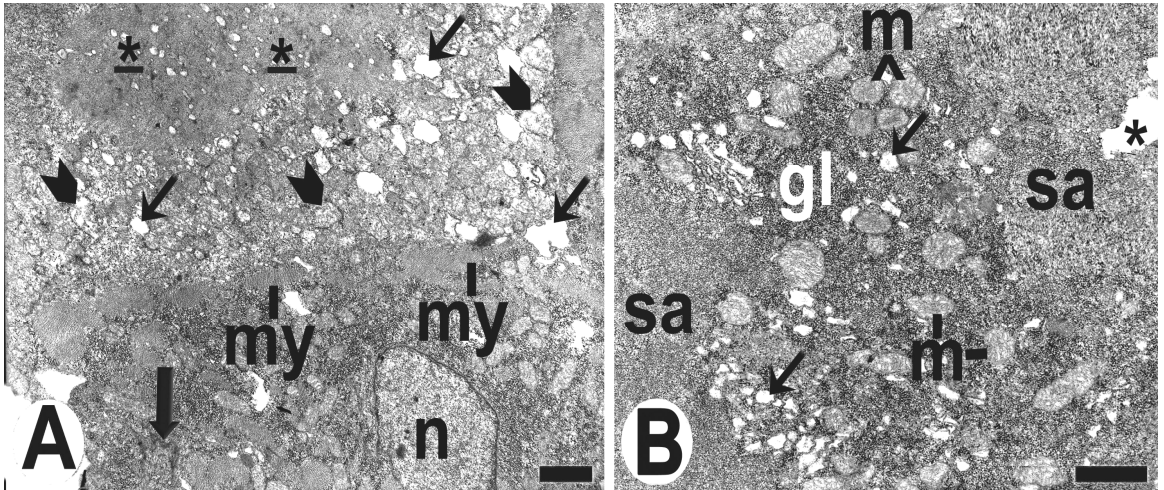


Şekil 92: Kontrol grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen kalp kesiti. L, lümen; er, eritrosit; n, nükleus; no, nükleolus; sa, sarkoplazma; sr, sarkomer; m, mitokondri; my, myofibril; E, endotel hücresi; **kalin ok**, diskus interkalarisi göstermektedir. Bar= 1 µm.

Deney grubunda yer alan gebe sıçanlardan elde edilen fetüslerin kalp dokularındaki myositler arasında geniş boşluklar bulunmaktaydı. Hücreler, krista yapısı bozulmuş mitokondrilerin yanı sıra genişlemiş sarkoplazmik retikulum sisternaları da içermekteydi. Myofibril içeriği daha önceki gruplarda da bahsedildiği gibi sağlıklı görünümde değildi ve çizgilenme özelliğini kaybetmişti. Ayrıca sarkoplazma içerisinde elektron-yoğun görünümlü ve herhangi bir organel yapısı içermeyen düzensiz alanlar mevcuttu. Damar duvarlarını oluşturan endotel hücreleri ile myositler arasında geniş boşluklar bulunmaktaydı. Bu endotel hücreleri çentikli çekirdek yapısına sahipti ve kontrol grubundakilere kıyasla daha iri ve bol sitoplazmalıydı (Şekil 93, 94).



Şekil 93: Deney grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen kalp kesiti. **n**, nükleus; **sa**, sarkoplazma; **m**, mitokondri; **my**, myofibril; **st**, endotel hücresinin sitoplazması; **KM**, kardiyak myosit; **E**, endotel hücresi; **ka**, kapiller; **ince oklar**, genişlemiş sarkoplazmik retikulum sisternaları; **yıldız**, hücreler arasında görülen geniş boşlukları göstermektedir. B ve C de myositlerden ayrı duran endotel hücreleri dikkat çekmektedir. **Bar**= 1,5 µm.



Şekil 94: Deney grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinden elde edilen kalp kesiti. **n**, nükleus; **sa**, elektron yoğun görünen sarkoplazma; **m**, mitokondri; **my**, çizgilenme özelliğini kaybetmiş olan myofibriller; **gl**, glikojen; **ince oklar**, genişlemiş sarkoplazmik retikulum sisternaları; **siyah okbaşı**, krista yapısı bozuk mitokondriler; **yıldız**, hücreler arasında görülen geniş boşluklar; **altı çizili yıldız**, myositler içerisindeki düzensiz, elektron yoğun içerikli sarkoplazma alanlarını göstermektedir. **Bar**= 1 µm.

TARTIŞMA

Şarbon, *Bacillus anthracis* tarafından oluşturulan, septisemik özellikte akut bir enfeksiyonun adıdır. Enfeksiyon, vücut ısısının yükselmesi, dalağın şişmesi, kanın katran gibi koyu renk alması ve pıhtılaşmaması, deri altı ve subseröz dokularda sero-hemorajik infiltrasyonların oluşması ile karakterize zoonozdur¹¹⁹. Son zamanlarda şarbon etkeni ve toksinlerinin biyolojik savaşta potansiyel bir ajan olarak kullanımının gündeme gelmesi ve haberleşme sektöründe çalışanlarla kimi medyatik kişilerin, aldığı mektup ya da paket gibi şarbon sporu taşıyan malzemelerle bulaş yolu ile hastalığa yakalanması şarbonu güncel bir konu haline getirmiştir.

Şarbon etkeni olan *Bacillus anthracis*'in 2 önemli virülans faktörü (kapsül ve toksinler) vardır. Şarbon hastalığından ölen hayvanların filtre edilmiş plazmasının verildiği kobaylarda da ölüm gerçekleştiğinin gösterilmesi, ölüme ekzotoksinlerin sebep olmasıyla açıklanmıştır. Bu toksin 3 farklı antijenik komponentten [Faktör I ödem faktörü (Edema Factor, EF), Faktör II koruyucu antijen (Protective Antigen, PA) ve Faktör III öldürücü faktör (Lethal Factor, LF)] oluşur. Bu faktörlerden ikisi ya da üçü bir arada etki gösterir. Örneğin; deney hayvanlarında, PA+LF'den oluşan letal toksinin (LT ya da LTx) öldürücü etki gösterdiği bilinmektedir¹²⁰.

Konuyla ilgili bütün bu bilinenlere ek olarak, sunulan çalışmada *Bacillus anthracis*'in ürettiği toksik maddelerden biri olan LF'nin diğer faktörler olmaksızın tek başına herhangi bir etki gösterip gösteremeyeceği merak edildi ve çalışma buna göre planlandı. Böylece erişkin, yavru, embriyo ve fetüs dönemlerindeki sıçanlara intraperitoneal yoldan bidistile su (kontrol gruplarına) veya tek doz LF (deney gruplarına) uygulamasından 24 saat sonra elde edilen doku örnekleri stereolojik, ışık ve elektron mikroskopik açılardan değerlendirildi. Çalışma sonucunda elde edilen bulgular, kaynak kitap ve makaleler ışığında yorumlandı.

Bu çalışmada kullanılan karaciğer, akciğer ve kalp örnekleri histolojik olarak değerlendirildiğinde, tüm organlarda ortak olarak gözlenen bulgulardan biri damar patolojileriydi. Bu patoloji, karaciğer sinüzoidlerinde dilatasyon şeklinde karşımıza çıkmaktaydı. Mevcut literatürde, antraks toksini kaynaklı hepatik sinüzoidal dilatasyondan söz edilmemekle birlikte bu toksinlerin damar patolojilerine ve organ yetmezliklerine yol açabileceğini bildiren çalışmalar vardır^{88, 121}.

Buna göre, letal faktörün damar patolojileri kapsamında sinüzoidal dilatasyona da sebep olabileceği düşünüldü.

Yine, incelenen tüm organlarda damarlar içerisinde pıhtı oluşumu ve eritrosit birikimi izlendi. Yer yer damar duvarlarının bütünlüğü kaybolmuştu ve damar duvarlarında enflamatuvar hücre infiltrasyonları ile fibrinoid nekroz gözlemlendi. Endotel hücreleri ise hipertrofiye uğramıştı. Bu konu hakkındaki mevcut çalışmacılardan bir kısmı *B.anthraxis*'in veya toksinlerinin meydana getirdiği ölüm şeklinin; vasküler geçirgenlikte değişimler, inflamasyon, fibrin birikimi, tromboz, nötrofil göçü ve bu göçe bağlı gelişen endotelyal hücre hasarının yanı sıra TNF- α üretimini de içeren sitokin indüklü şok olduğunu ifade etmektedir¹²². Bazı araştırmacılar ise LT'nin deneysel olarak uygulanmasından sonra oluşan patolojik hasarın sitokinlerden bağımsız olduğunu öne sürmektedir¹²¹. Bizim bulgularımız ilk bahsedilen görüş ile paralellik göstermekle birlikte bu mekanizmalar hakkında yoruma gidilebilmesi için kan bulguları da değerlendirilmelidir.

LT'nin yarattığı toksik etki ile hemoraji, plevral effüzyon ve vaskülit neden olabileceği bildirilmektedir¹²³. Vasküler fonksiyon bozukluğu şarbon patogenezinin önemli bir bileşeni olarak değerlendirilmesine rağmen bu fonksiyon bozukluğunun altında yatan neden henüz tam olarak bilinmemektedir^{124,125}. LT enjekte edilen deneklerde vasküler sızıntı geliştiği rapor edilmiştir¹³³¹²⁶. Steele ve ark.'nın bildirdiğine göre LT, TNF- α indüklü VCAM-1 ekspresyonunu arttırıp, monositlerin endotele adhezyonunu sağlayarak vaskülit neden olmaktadır¹³⁴¹²⁷. Başka bir görüşe göre ise LT endotelyal adhezyon moleküllerinin salınma düzenini etkileyerek normal protektif enflamatuvar cevabın oluşmasını engelleyebilir. Böylece lökositlerin normal olmayan ve gereksinim dışında damarlardan çıkışı mümkün hale gelir¹³⁵¹²⁸. Vaskülit, endotel adhezyon moleküllerinin aşırı salınmasının yanı sıra VCAM-1 ve diğer adhezyon moleküllerinin artmış serum seviyeleri ile karakterize bir durumdur¹³⁶¹²⁹. VCAM-1, lenfosit, monosit, bazofil ve eozinofillerin yüzeyinde mevcut olan VLA-4 adlı integrin sınıfından bir moleküle bağlanır ve böylece bu lökositlerin damar dışına çıkışı sağlanır¹³⁴¹²⁷. Bir damarda vaskülit gelişmesi durumunda, endotelyal nekroz, intra-vasküler fibrin birikimi, tunika intima ve media'da enflamatuvar hücre infiltrasyonu ve damar duvarlarında fibrinoid nekroz bulguları görülmektedir. Bu şekilde hasarlanan damarlarda hasarın ilk aşamasında nötrofil ağırlıklı, ilerleyen evrelerde de mononükleer hücre ağırlıklı infiltrasyonlar oluşmaktadır⁸⁸. Bizim çalışmamızda deneklere LF uygulamasından sonra elde edilen doku örneklerinde gözlenen bulgular bilinen vaskülit tablosuna uymaktadır. Vaskülitin patolojik mekanizması ise tam olarak bilinmemektedir. LT'nin direkt ya da indirekt etkisi proinflamatuvar sitokinlerin serbestleşmesiyle ilişkili olabilir¹²².

Çalışmamızda gerek akciğerde gerekse kalpte damar dışında kan hücrelerinin bulunması, hemoraji olarak değerlendirildi ve yukarıda anlatılan damar duvarı hasarına bağlı olarak geliştiği düşünüldü.

Hemosiderin birikimi, eritrositlerin mononükleer fagositik sistem elemanlarınca parçalanarak içlerindeki hemoglobinin yıkılmasıyla ortaya çıkar. Eritrosit yıkımıyla açığa çıkan demirli pigment, hücrelerde, damarlarda ya da bağ dokusunda altın sarısı renkte birikir^{137,130}. Normalde sürekli fakat yavaş tempoda giden bu olay, patolojik durumlarda artmaktadır. Uzun süren kalp yetmezliği, akciğerde uzamış konjesyon sonucu alveollerdeki fagositik mononükleer hücreler içinde hemosiderinin görülmesine neden olur. Bu pigmentli makrofajlar kalp hatası hücreleri olarak adlandırılırlar. Kanımızca, bu çalışmada toksik etkiyle ortaya çıkan damar duvarı hasarı ve damar geçirgenliğinin artması^{122,123,126} sonucu dokuya sızan eritrositlerin mononükleer fagositik sistem hücreleri tarafından yakalanarak parçalanması, dokudaki hemosiderin birikimlerinin nedeni olmalıdır. Uzun yıllardan beri bilindiği gibi, demir metabolizması çeşitli enfeksiyonlarda önemli ölçüde değişmektedir. Ayrıca son zamanlarda yapılan bazı çalışmalara göre, mononükleer fagositik sistem hücreleri tarafından fagosit edilen toksinler hemosiderin ile inaktive edilebilmektedir. Bu sonuç son zamanlarda seri halde yapılan araştırmalarla desteklenmiş ve bu araştırmalar sonucunda in vitro şartlar altında demirin çeşitli bakteri eksotoksinlerinin toksin etkisini ortadan kaldıracı olduğu anlaşılmıştır^{138,139,131,132}. Çalışmamızda, LF uygulamasından 24 saat sonra elde ettiğimiz karaciğer, akciğer ve kalp örneklerinde özellikle damarlarda ve makrofajlar içerisinde hemosiderin birikimi gözlemlendi. Bu birikimler demir metabolizması ile toksik hasar arasındaki bu ilişkiyle açıklanabilir. Yani LF uygulamasından sonra, toksinin direkt etkisiyle oluşan damar hasarını takiben dokuya sızan eritrositleri yakalayıp parçalayarak dokuda hemosiderin pigmenti birikimine yol açan mononükleer fagositik sistem hücrelerinin aktivitesi artmakta, bir yandan da bu olay, dokudaki toksik hasarın azaltılması için kullanılan indirekt bir mekanizma haline dönüşebilmektedir. Gerçekten biz de deney gruplarına ait organların mikroskopik değerlendirmesinde, Kupffer hücresi ve alveolar makrofaj gibi mononükleer fagositik hücrelerin aktivitesinin arttığını gösteren bulgular saptadık.

Tek doz LF uygulanan deneklere ait karaciğer kesitlerinde hepatosit kordonlarının düzeni kontrol grubundakilere kıyasla bozulmuştu. Bu olay hepatosellüler proteinlerde ortaya çıkması olası hipoksik hasardan ya da hepatositlerde görülen nekrotik değişikliklerden kaynaklanabilir. Nitekim Moayeri ve arkadaşları¹²¹ da yaptıkları çalışmada LF ve PA'nın bir araya gelmesiyle oluşan letal toksini (LT) deneklere

uygulamışlar ve LT'in direkt olarak yol açtığı vasküler yetmezliğin dokularda hipoksiye ve bu hipoksinin sonucu olarak ta koagülatif nekroza yol açtığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da karaciğerde nekroz odakları saptandı. Ayrıca hücre hasarının nekroza giden aşamalarını yansıtır şekilde, sınırları belirsiz olup bir arada kaynaşmış gibi görülen hepatosit kümeleri, etrafındaki diğer hücelere kıyasla daha eozinofil sitoplazmalıydı ve kromatini yoğunlaşmış küçük çekirdek içeriyordu. Ayrıca deney grubu karaciğerlerindeki hepatositlerde kısmi veya yaygın sitoplazmik içerik kaybının ya da incelmış hepatosit kordonlarının belirlenmesi de nekroz bulgusu olarak değerlendirilebilir.

LT'in yol açtığı karaciğer patolojilerinden ve vasküler hasardan söz eden literatürdeki mevcut çalışmalar^{88,122}, hücresel ya da organeller düzeyinde yapılmış detaylı histolojik araştırmalar değildir. Hepatositlerde vakuoler dejenerasyon, hepatosit kordonları arasında hyalin ve hemosiderin birikimi, hepatositlerde intersellüler bağlantı kaybı gibi bulgular ilk kez bu çalışmamızda tespit edildi. Hücreler arasındaki bağlantı kaybı, yukarıda damar bulgularını yorumlarken belirtilen toksinin adezyon moleküllerinin sentezi üzerine olan etkilerinden kaynaklanıyor olabilir.

Hücredeki vakuoler dejenerasyonlar enfeksiyonlarda, toksik olaylarda ya da şok durumlarında ortaya çıkan protein metabolizmasındaki bozukluklardan dolayı gelişir. Bu dejenerasyon tipi bulanık şişme yada balonlaşmayı da içeren hidropik dejenerasyon şeklinde olabilir. Bulanık şişmede mikroskobik olarak, tutulan hücrelerin sitoplazmaları şiş ve granüllü (tanecikli) görünür. Granüller protein yapısındadır. Elektron mikroskobunda hücreler içinde endoplazmik retikulum genişlemiş, mitokondriler şişmiş durumdadır. Hücrenin sodyum ve su içeriği artmıştır. Benzer durumlar balonlaşma ve hidropik dejenerasyonda da görülür. Fakat bu son bahsedilen iki tipte sitoplazma içinde granüller yoktur çok sayıda ve sınırları belirgin vakuoller (balonlaşma) ya da sınırları ayırt edilemeyen ve tüm hücreyi kaplayan vakuolizasyon belirgindir. Elektron mikroskobik tablo ise ortaktır. Bu olayda genellikle geriye dönüş mümkün olmakla birlikte, hücreler nekroza da gidebilir¹⁴⁰¹³³.

Antraks üzerinde çalışanlar elektron mikroskobunu genellikle etken bakterinin ya da bu bakteri sporunun yapısını incelemek için ya da sporun veya toksinlerin hücre içerisine girişini saptamak amacıyla kullanılmışlardır. Yaptığımız çalışmayla ilk kez elektron mikroskobik düzeyde, LF uygulanan hayvanların organlarındaki histopatolojik değişiklikler de değerlendirilmiştir.

Karaciğere ilişkin elektron mikroskobik bulgularımıza göre gerek hepatositler gerekse endotel hücreleri elektron-yoğun kromatinli piknotik nükleusları ile dikkat

çekmekteydi. Bu da ölüme giden hücreler için beklenen bir bulgu olmakla birlikte hücrelerin ölüm şeklini ortaya koyabilmek açısından gerekli bir tanıdır. Şöyle ki hem ışık hem de elektron mikroskobik düzeyde karaciğerde epoptozu gösteren bulgular ve apoptotik cisimler gözlenmiştir. Demekki LF'nin dokularda yol açtığı patolojik etkiler hücrelerin nekroza ya da apoptoza gitmesiyle sonuçlanmaktadır¹⁴¹¹³⁴. Diğer organellerin de ince yapısına bakıldığında, sadece hepatosit düzeyinde kalmayıp pnömositlerde ve hatta kalp kası hücrelerinde düz yüzlü endoplazmik retikulum sisternalarının genişlediği gözlendi. Düz yüzlü endoplazmik retikulumun hücrelerde detoksifikasyon alanı olduğu çok yaygın olarak bilinen bir bilgidir⁹⁴. Bu bulgumuz da incelen tüm organlardaki hücrelerin LF uygulamasından sonra toksik etkiye maruz kaldığını göstermektedir. Yine hidropik zedelenme ile toksik yada metabolik zedelenmenin çeşitli şekillerinde ortaya çıkması olası yağlı değişiklik sitoplazmada lipid vakuollerinin ortaya çıkmasıyla belirir ve böylece çalışmamızda LF uygulamasından sonra hepatositlerde görülen lipid içeriğindeki artış da LF'nin hepatositler üzerinde toksik etkiye yol açtığını göstermektedir.

Deney grubuna ait karaciğerlerin hepatositleri incelendiğinde sitoplazma içerisinde gözlenen geniş glikojen depo alanları hücrelerde ortaya çıkan rejenerasyona yönelik bir savunma şeklidir.

Ayrıca, çalışmamızın deney gruplarından elde edilen organların mikroskobik değerlendirmelerinde mitokondrilerde gözlenen dejenerasyonlar LF'nin neden olduğu oksidatif stresin çok açık bir göstergesidir. Literatürde mitokondriyal hasar ile oksidatif stresin ilişkisini gösteren çok sayıda makale bulunmakta olup, yukarıda belirtildiği gibi toksik durumlarda gelişen hidropik dejenerasyonda mitokondrilerde de şişme meydana gelmektedir. Bilindiği gibi doku kanlanması aralıklı olarak bozulması, hücrede meydana gelen hasarın en büyük sebebidir. İskemide enerji ihtiyacının artışı ve oksidatif fosforilasyon ile ATP sentezinin azalması nedeni ile enerji depoları azalır. Ancak hasarın çoğu iskemi sırasında değil de reperfüzyon sırasında olmaktadır. Reperfüzyonla sağlanan oksijen molekülleri serbest oksijen radikallerine dönüşür. Bu radikaller çok iyi oksidan ve redüktan olup, lipid peroksidasyonu ve protein hasarı yapar; böylece hücre fonksiyonunda bozulma ve nekroz meydana gelir¹⁴²¹³⁵. Bu noktada hücreler için ölüm ya da hayatta kalım olarak nitelendirilebilecek bir durum olan ve bizim çalışmamızda da gözlenen mitokondriyal hasarlar ortaya çıkmaktadır ki bu da sırasıyla çekirdek ve sitoplazma değişikliklerini de içeren ölüm kaskadını başlatmaktadır. Bizce bu dejenerasyonların temel nedeni hücrelerin yeterli seviyede oksijenlenememesi sonucu ortaya çıkan serbest radikal hasarıdır.

Hyalin sözcüğü, makroskopik olarak beyazımsı, parlak, ışık mikroskopunda ise hematoxilen-eozin boyası ile homojen eozinofil görünen maddeler için kullanılır. Hyalinin esas yapısı proteindir. Epitelyal ya da mezankimal kaynaklı olabilir. Epitelyal kaynaklı ise, her zaman hücre içindedir. Mezankimal kaynaklılar hücre içinde ya da hücreler arasında olabilir. Hücreler arası hyaline pek çok nedenle rastlanabilir. Bağ dokusu iplikcikleri arasına glikoprotein tabiatında bir madde otururken iplikcikler de kaynaşır ve homojen pembe bir görünüm alır. Kronik iltihap alanlarında, hipertansiyon, diabet ve arteriosklerozda damar duvarlarında, trombüslerin ve hematomların kalıntılarında bu tür hyalin değişiklik görülebilir¹⁴⁰¹³³. Bizim çalışmamızda organlarda ekstrasellüler olarak gözlenen hyalin birikimlerinin, kanamalardan ya da hücre ölümünden sonra geriye kalan artıklar (debris) ya da gelişen skar dokusu tarafından oluşturulduğu düşünüldü.

Bu çalışmada çeşitli organlar üzerine olası histopatolojik etkilerini araştırdığımız LF, mitojen ile aktive edilen protein kinaz inhibitörlerinden biri olmanın yanı sıra, çinko bağımlı bir endopeptidazdır. Birçok hücre tipinde tek başına varlık gösteremeyen LF'nin PA ile birleşmesiyle oluşan LT'nin çoğu hücre tipinde aktif olmasına karşın sadece belli makrofaj tiplerini lizise uğratabildiği bildirilmiştir¹⁴³¹³⁶. Çalışmamız sırasında detaylı histopatolojik değerlendirmelerle belirlenen hepatositlerin düzgün sınırlarını yitirerek girintili-çıkıntılı bir görünüm kazanması, sitoplazmik içeriğin boşalmış görünmesi, çekirdeklerin de benzer şekilde düzensiz sınırlı ve yer yer kromatini çözülmüş görünümde olması bu hücrelerin lizise uğradığını gösterebilir. Bazı araştırmacılar LT'nin yol açtığı litik etkiye hepatositlerin de makrofajlar kadar hassas olabileceği fikrine sahiptir¹²¹; ancak bunu gösteren bir bulguya mevcut literatürde rastlanmamıştır. LF'nin antijen sunan hücrelerde protein yıkımına yol açarak lizis oluşturduğu bildirilmektedir¹⁴⁴¹³⁷. Kanımızca, LF'nin makrofajlar üzerinde sergilediği bu proteolitik aktivitesini¹⁴⁵¹³⁸ diğer hücrelerde de göstermesi beklenebilir.

Perisinüzoidal alana bakıldığında Disse mesafesinin genişlemiş olması, damarlarda gelişen vasküler geçirgenlik artışından olabilir. Bu geçirgenlik artışından dolayı gelişmesi olası ödem sadece Disse mesafesinde değil hücreler arası aralığın artışında ve hepatositlerin mikrovilluslarındaki küntleşmede de etkili olabilir. Yine bu konuda hepatositlerde gözlenen ve oksidatif hasardan dolayı gelişen hipertrofi de mikrovilluslardaki küntleşmenin nedeni olabilir.

Hepatositlerin yanı sıra, benzer dejenerasyonlar Ito hücrelerinde de görülmekteydi. Disse mesafesindeki kollajen fibriller hepatositlere destek olan retikülin çatıyı oluşturur. Bu çatının korunması da karaciğerin rejenerasyonunun ve

bütünlüğünün devamı için gereklidir. Eğer retiküler çatı bozulur ise hepatosit hasarının iyileşmesi fibrozis ile sonuçlanır. Perisinüzoidal alanlarda miyofibroblastların ve kollajen liflerin varlığı da karaciğerde ortaya çıkan doku hasarının tamir edilmesi için gelişecek fibrozisin başlangıcı olarak değerlendirilebilir^{147,139,140}. Karaciğer hasarıyla birlikte Ito hücrelerinin kollajen sentezleyen miyofibroblastlara dönüştüğü ve fibroziste rol aldığı bilinmektedir. Karaciğer fibrozunun artışı aynı zamanda kan akımını ve karaciğer içi kan dolaşımını etkileyerek, onun yeniden düzenlenmesine ve vasküler çatının bozulmasına, sonuç olarak da siroza yol açmaktadır¹⁴⁰. Oksidatif stresten dolayı hücrelerin etrafındakilerle bağlantısının kaybolması bilinen bir durumdur. Ito hücrelerindeki hasar ise muhtemelen bozulan Kupffer hücresi-Ito hücresi arasındaki bağlantı kaybından kaynaklanabilir. Normalde Kupffer hücresi, uzantıları aracılığı ile sinüzoid içerisinde bulunan tüm hücreler (pit hücreleri, endotel hücreleri) ve endotelde bulunan fenestrasyonlar yolu ile hepatosit ve yağ depolayan hücreler ile temas eden membranlara sahiptir. Deneysel iltihap reaksiyonu oluşturulan deneysel modellerde lenfosit ve pit hücrelerinin Kupffer hücreleri ile temasa geçtiği gözlenmiştir. Ayrıca endotelial hücrelerin fenestrasyonlarından Kupffer hücrelerinin mikrovillus uzantılarının Disse aralığına doğru çıkıntı yaptığı ve bu şekilde hepatosit mikrovillusu ve Ito hücreleri ile temasta olduğu bilinmektedir^{148,141}. Uyarılan Kupffer hücrelerinden sitokin salınması (IL-1, IL-6, IL-12, TNF α) sonucu ise lokal sitokin konsantrasyonu artar. Kupffer hücrelerinden salınan sitokinler yoluyla endotelial hücreler, polimorfonükleer lökositler, trombositler, lenfositler ve Ito hücreleri uyarılır ve sitokin salınımına katkıda bulunurlar. Lokal sitokin salınımına aynı zamanda hepatositler de katılır. Salınan sitokinler ise hepatosit ve endotelial hücre hasarına yol açar^{149,142}. Kupffer hücreleri; polimorfonükleer hücreler, eozinofiller, trombositler ve dökülmüş endotel hücrelerinin agregasyonunun yanı sıra sinüzoid lümeninin obstrüksiyonuna da neden olur. Sinüzoidlerin hipoperfüzyonu ile sonuçlanan bu durum, Disse aralığını genişletir. Diğer taraftan kemotaktik faktörlere (Lökotrien B₄, C_{5a}) ek olarak, lipopolisakkaritlerin (LPS) indüklemesiyle hepatosit ve Kupffer hücrelerinden nötrofil kemotaksisine neden olan IL-8 salınımı olur. Bunun sonucunda adhezyon moleküllerinde (sinüzoidal endotel hücrelerinde intersellüler adezyon molekül-1 ve nötrofillerde integrin) artış yoluyla nötrofil göçü ve adezyonu gerçekleşir. Bunu takiben serbest oksijen radikallerinde, proteazlarda artış ve hepatosit hasarı ortaya çıkar^{150,143}.

Deney grubundaki deneklerden elde edilen karaciğer örneklerinde sinüzoid sınırları düzensizdi ve bu sinüzoidlerin duvarlarında eozinofil sitoplazmalı ve hipertrofik Kupffer hücrelerine rastlandı.

Elektron mikroskopik incelemede ise Kupffer hücreleri kontrol grubundakilere kıyasla daha büyük olup sitoplâzma açısından zengindi. Bu bulgu LF uygulamasından sonra Kupffer hücrelerinin aktive olduğunu göstermektedir. Bu olayın, yukarıda anlatılan mekanizmayla gelişmiş olması olası görünmektedir.

Deney grubu karaciğerlerinde hepatosit ve Kupffer hücrelerinin sitoplâzmasında çok sayıda primer ve sekonder lizozom görüldü. Ek olarak hepatositlerin sitoplâzmalarında bulunan bazı primer lizozomların membranlarında myelin benzeri birikimler de tespit edildi. Hücrelerin çok sayıda lizozom içermeleri onların sindirim aktivitelerinin arttığını göstermektedir. Lizozom sayısı ve hacmindeki artış, hücre hasarının bir sonucu olarak gelişmektedir¹⁵¹¹⁴⁴. Hem hepatositlerde hem de Kupffer hücrelerinde bulunan ve lizozomlarla çevrelenmiş olarak karşımıza çıkan elektron yoğun materyal, fagosit edilmiş fakat sindirilemeyen ya da henüz sindirimi tamamlanmamış bir materyal olarak yorumlandı. Bu fagositozun nedeni vasküler sızıntının ya da ortamdaki ölen hücrelerin elimine edilmeye çalışılması olabilir.

Deney grubu karaciğerlerinin incelemesinde, elektron mikroskopik düzeyde göze çarpan diğer bir bulgu da hepatositler arasında kontrol grubundakilere kıyasla genişlemiş gözüken safra kanaliküllerinin yer almasıydı. Bu konuyla ilgili literatürde safra kanalikülleri hakkında elektron mikroskopik bir bilgi olmamasına karşın, şarbondan kaynaklanan ölümlerin sebebi olan septik şok durumunda safra kanallarını çevreleyen aktin ve miyozin filamentlerinin polimerizasyon ve depolimerizasyonunun etkilenmesiyle safra kanaliküllerinin kontraksiyonunun da bozulduğu düşünülmektedir¹⁵²¹⁴⁵. LF uygulanan deneklerden elde ettiğimiz karaciğerlerin elektron mikroskopik kesitlerinde gördüğümüz safra kanaliküllerindeki genişleme, söz edilen kasılma düzensizliklerinden kaynaklanmış olabilir.

Bu çalışmada elde edilen diğer bir bulgu da hepatosit kordonları arasında yama tarzında ve damarlar etrafında gözlenen mononükleer hücre infiltrasyonlarıdır. Bu infiltrasyonların nedeni ise tartışmalıdır. Bazı araştırmacılar bu odaksal ya da diffüz olarak gözlenebilen infiltratif hücrelerin, LT uygulaması sonucu ortaya çıkan sitokin salınmasından kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir¹⁵³¹⁴⁶. Bazıları ise bu durumun toksik hasardan dolayı ortaya çıkan nekrotik değişikliklere cevap olarak geliştiğini bildirmişlerdir¹⁵⁴¹⁴⁷. Kanımızca, her iki şekilde de infiltrasyonun ortaya çıkabilmesi için vasküler geçirgenlikte artış olması gerekir. Enflamasyonda gözlenen infiltratif hücre tipleri konusunda da farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Bazı çalışmalarda bu infiltratif hücrelerin hem polimorfonükleer hem de mononükleer tipte olabileceği bildirilmiştir¹³³¹²⁷.

Diffüz ve odaksal seyreden infiltrasyon alanlarında çoğunlukla mononükleer tipte hücreler izlememize karşın, özellikle diffüz sahalarda ve damar lümenlerinde nötrofil ve eozinofil gibi polimorf nüveli hücreler de gördük.

Literatürde LT'nin deney hayvanlarına uygulanmasından sonra akciğerde meydana gelen patolojik değişimleri konu alan az sayıda makale bulunmaktadır. Bunlardan birisinde, LT uygulanan deney hayvanlarında pulmoner ödem ve hemoraji geliştiği bildirilmiştir^{155,148}. Twenhafel ve ark. yaptıkları çalışmada akciğer bulgularına daha detaylı olarak değinmiştir. Bu araştırmacılar kullandıkları deney hayvanlarına aerosol haline getirilmiş *B.anthraxis* sporu uygulamışlar ve bu uygulamanın sonucunda akciğerde akut inflamasyon, nekroz ve hemoraji bulgularının yanı sıra akciğer interstisyumunun genişlediğini; fibrin birikimler, ödem, az miktarda makrofaj ve nötrofil içerdiğini bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada, deney grubu akciğerlerindeki alveollerin fibrin, makrofaj ve lenfositlerden oluşan ödem içerdiğini; alveol hücrelerinin dejenere olup duvarının bozulduğu rapor edilmiştir^{156,157,149,150}.

Çalışmamızda LF uygulanan deneklerden elde edilen akciğer örneklerinde kollabe olmuş alveoller, interalveolar septumda bağ dokusu artışı ve alveol duvarlarında hyalinleşme dikkat çekiciydi. Ayrıca tek doz LF uygulanan sıçanların akciğerlerden elde edilen görüntülerdeki diğer bir bulgu da, bağ dokusu içinde mononükleer hücrelerden oluşan ve yer yer bronşiyol epiteli ve damar duvarlarına da nüfuz eden infiltrasyon sahalarının, ödem ve kanama alanlarının bulunmasıydı. Guarner ve ark. da inceledikleri solunum şarbonu vakalarında alveol duvarında hyalin birikimi ve akciğer intersitisyumunda mononükleer hücre infiltrasyonu, ödem ve kanama oluştuğunu gözlemişlerdir¹²³. Deney grubunda akciğer parankimi incelendiğinde, kontrol grubunda gözlenmeyen, periferinde uzantılar taşıyan çok çekirdekli yabancı cisim dev hücrelerinin varlığı da çarpıcıydı. Ağır iltihap tablosunda, ortamda fagositlerin kolayca fagosit edip sindiremeyeceği maddeler varsa hücrelerin yanyana gelip sitoplazmalarının kaynaşmasıyla çok çekirdekli dev hücrelerin meydana geldiği bilinmektedir^{157,150}.

Bazı araştırmalarda, solunum sistemi şarbonu ve LT uygulanmasından sonra plevral effüzyon gözlenmiştir^{123,156,149}. Bizim çalışmamızda bu bulguya rastlanmadı.

Akciğer interstisyumu içerisinde bulunan damarlarda da pıhtı oluşumu, eritrosit ve fibrin birikiminin yanı sıra vaskülit ve fibrinoid nekroz izlendi. Bu vasküler dejenerasyonlar, daha önce de belirttiğimiz gibi şarbon toksinlerinin yol açtığı klasik bir durumdur. Ancak tek başına etkisiz olarak bilinen LF'nin bu patolojik değişimlere yol açması ilginçtir.

Bizim kanımıza göre, LF uygulamasından sonra akciğerde izlenen histopatolojik değişimler akut respiratuar distres sendromu (ARDS) tablosuna uymaktadır. Şöyleki; ARDS süreci genellikle birbiriyle ilişkili ve birbiriyle örtüşen eksudatif, proliferatif ve fibrotik evrelerden oluşur. Eksudatif evre genellikle ilk haftada ortaya çıkar. Bu evrede interstisyel intraalveoler ödem, hemoraji ve alveol duvarlarında hyalin membranlar vardır. Alveoller atelektazik ve ödemli, duktus alveolarisler dilatedir. Tip I hücrelerde yaygın hasar vardır. Yaygın endotel hasarı ve intravasküler fibrin birikimi de tabloya sıklıkla eşlik eder. 4-10. günler arası proliferatif evredir. Bu evrede ilk evrede biriken eksuda organize olup, tip 2 hücreler proliferate olurken alveol duvarında da fibroblast ve myofibroblastlar proliferate olup buradaki fibrinöz eksudaya geçerler. Fibroblastlar eksudayı granülasyon dokusuna çevirir ve daha sonra ortamda kollojen birikmesi ile fibröz doku oluşur. En son aşamada epitel hücreleri organize granülasyon dokusunun üzerini örterek alveol içi eksudayı interstisyel dokuya dönüştürürler. Fibrotik evrede kollajenöz fibrozis ve bazı nadir olgularda da mikrokistik bal peteği oluşumu ve nadiren bronkopulmoner displazi oluşur. Bu değişiklikler sonucu alveol bazal membranı da yeniden oluşur^{158,159,151, 152}. Bizim çalışmamızda da bu bulgular hemen hemen tümüyle izlenmiştir. Işık mikroskopik akciğer bulgularımızın ARDS tablosu ile örtüşmesinin yanı sıra elektron mikroskopik olarak izlediğimiz tip 1 hücre dejenerasyonu, tip 2 hücrelere sıklıkla rastlanması, bu hücrelerin bozuk ve gevşek görünümlü lamellar cisimler içermesi de bulgularımızı destekliyordu. Alveol ve bronşiyol lümenleri içerisinde de hücrelerin salgılama fonksiyonlarının arttığını gösteren salgı materyali olası yapılar ve ekstrasellüler sürfaktan lamelleri bulunuyordu. Ek olarak hem alveollerin hem de bronşiyollerin bazal membranlarında izlenen kalınlaşma da ARDS tablosunun bir parçası olarak değerlendirilebilir. Deney grubundaki hayvanların hem akciğerlerinde hem de karaciğerlerinde, olası iskeminin yol açtığı hipoksik hasar sonucu ortaya çıktığı düşünülen hücresel hasarlar bulunmaktaydı. Bu bulgular, sitoplazma eozinofilisinde artış, bronşiyol epitelinde hiperplazi ya da metaplazi, bronşiyol lümeninde bronşiyol epitelinden dökülmüş oldukları düşünülen hücrelerin varlığı şeklinde özetlenebilir. Daha önceki çalışmalarda, ince barsak ve akciğerlerin enzim seviyeleri nedeniyle, iskeminin yol açtığı patolojik değişikliklerden en çok etkilenen organlar olduğu rapor edilmiştir^{142,135}.

LF'nin kalp dokusu üzerine etkileri detaylı olarak incelendiğinde, liflerin diziliminin düzensiz olduğu ve aralarında kontrol grubunda gözlenmeyen geniş bağ dokusu boşluklar ve ödem alanlarının yanı sıra dev çekirdeklerin de bulunduğu görüldü. Ayrıca bu liflerin sınırları da düzgün değildi. Kalp kası liflerinin bazıları nekroza

uğramış yada dejenere olmuştu. Çoğunlukla yoğun eozinofil sitoplâzmalı kas liflerinin hem sitoplâzma hem de çekirdeklerinde vakuol oluşumu gözlenmekteydi. Bu ışık mikroskopik bulgular muhtemelen, damar hasarlarının yol açtığı oksijen yetersizliğinden kaynaklanmaktadır. Watson ve ark.'nın yaptıkları çalışmada LT'nin hipotansiyona yol açtığı böylece doku perfüzyonunun azalmasına ve laktik asidoza neden olduğu belirtilmiştir¹⁶⁰¹⁵³.

Tek doz LF uygulaması yapılan erişkin dişilerin kalp kesitleri ışık mikroskopunda incelendiğinde göze çarpan bulgulardan birisi de hem perikardiyum komşuluğunda hem de atriyum aort kavşağında kahverengi yağ dokusu odaklarına rastlanmasıydı. Twenhafel ve ark. da yaptıkları solunum şarbonu deneyinde perikardiyal yağ dokusu miktarının arttığını belirlemişlerdir¹⁵⁶¹⁴⁹. Gerek dejenere lifler etrafında gerekse liflerin arasındaki bağ dokusu içerisine yerleşmiş immün hücreler ve eozinofil sitoplazmalı fibroblastlar bulunmaktaydı. Daha önce de bahsedildiği gibi fibroblast göçü enflamatuar sürecin bir parçasıdır. Culley ve ark.⁸⁷ da LT uyguladıkları deneklerden elde ettikleri kalp örneklerinde, interstisyumda fibroblast infiltrasyonu gözlemişlerdir.

LF uygulanan deneklerden elde edilen kalplerin ışık ve elektron mikroskopik kesitlerinde görülen soluk ve ödemli yapıdaki sitoplazma LF'nin proteolitik etkisini gösterebilir. Diskus interkalarislerin yapısında görülen bozulmalar ve bunlara yakın yerleşimli vakuoler oluşumlar, hücreler arası bağlantıların zayıfladığı anlamına gelmektedir.

Tek doz LF uygulanan gebe sıçanlardan elde edilen embriyo ve fetüslerin karaciğerleri histolojik açıdan değerlendirildiğinde; sinüzoidal dilatasyon, hepatositlerde boyut değişiklikleri, eozinofillik artışı, koyu bazofil çekirdekler ve vakuol oluşumu gibi histopatolojik bulgulara rastlandı. Bu bulgular postnatal dönemdeki bulgularımıza benzerdi. Bu durum LF'nin metabolik etkilerinin fetal dönemde de postnatal dönemdekinden farklı olmadığını gösterebilir. Onaltı günlük fetüs karaciğerlerinin elektron mikroskopik kesitlerinde piknotik hepatosit ve İto hücresi çekirdekleri, dev ya da krista yapısı bozuk mitokondriler, iri çekirdekleri ve bol sitoplazmaları ile aktif görünümlü Kupffer hücreleri görüldü. Diğer bulgular muhtemelen hipoksiden kaynaklanmaktadır. Akciğerlere bakıldığında ise LF uygulanmasının ardından interstisyumda ödem oluşumu, hasarlanmış bronşiyol hücrelerine ek olarak makrofaj olası hücrelere de sık rastlanması, bu gelişim evresindeki fetüslerin akciğerlerinde de postnatal dönemlerdeki deneklerin akciğerlerinde saptananlara benzer patolojik değişikliklerin olduğunu düşündürdü.

Deney grubundaki sıçan embriyo ve fetüslerinin kalpleri histolojik olarak incelendiğinde kas liflerinde eozinofilinin artması, lifler arasındaki bağ dokusu alanların genişlemesi, myokard ile endotel tabakası arasında boşlukların oluşması, kaynaşmış gibi görünen ve vakuoller içeren liflerin bulunması, yavru ve erişkin deneklerde elde edilen bulguları çağrıştırıyordu.

Fetüs akciğer ve kalplerine ilişkin elektron mikroskopik bulgularımızın çoğu ışık mikroskopik olarak gözlenen hücresel hasarları ayrıntılı olarak göstermekteydi. LF uygulamasından sonra mitotik figürlerin belirlenmesi, kas lifi sarkoplazmasının glikojen ile dolu oluşu ve hücreler arasında satellit hücreler olabileceği düşünülen yapıların bulunması fetüs kalplerinde gerçekleşmesi olası rejenerasyon durumuna işaret etmektedir.

B.anthraxis'in ya da toksinlerinin fetal dönemdeki etkilerine ilişkin olarak günümüze değin yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Sunduğumuz çalışma bu yönü ile de ilktir. Sıçan embriyolarından ve fetüslerinden elde edilen ışık ve elektron mikroskopik bulgular ele alındığında LF'nin etkilerinin prenatal ve postnatal dönemlerde benzer olduğu anlaşılmaktadır. Her iki dönemde de hasara neden olan faktörün, toksik damar patolojilerinden kaynaklanan hipoksi olması muhtemeldir. Fakat fetal dönemde ortaya çıkan bu hipoksik hasarın fetal kanlanma yetersizliğinden mi yoksa plasenta yoluyla fetüse geçmesi olası LF'nin oluşturduğu toksik etkiden mi kaynaklandığı çalışılması gereken bir konudur.

Literatürde şarbon hastalığı sırasında ya da antraks toksinlerinin deneysel olarak uygulanmasından sonra karaciğer, akciğer ya da kalp hacimlerinde ortaya çıkabilecek herhangi bir değişiklik bulgusuna rastlanmamaktadır. Ayrıca konu ile ilgili herhangi bir stereolojik çalışma da yapılmamıştır. Dolayısı ile bu çalışmadaki stereolojik bulgular da literatürde ilk olacaktır. Bu nedenle çalışmamızda saptanan organ hacimlerindeki değişikliklere yol açabilecek olası nedenler, elde edilen mikroskopik bulgular yardımıyla ve dolaylı literatür bilgisiyle yorumlanmaya çalışıldı.

Erişkin sıçanlardan elde edilen karaciğer, akciğer ve kalplerin ışık mikroskopik seri kesitleri kullanılarak bu organların hacimlerinin Cavalieri yöntemi ile stereolojik olarak hesaplanması sonucunda, LF uygulanan sıçanların karaciğer hacimlerinin kontrol grubundakilere kıyasla anlamlı ölçüde arttığı görüldü. Erişkin deneklerin karaciğerlerinde görülen bu hacim artışı deney grubundaki yavru deneklerde de gözlenmekteydi. Erişkin deneklerin karaciğerleri %26,9 büyürken yavru deneklerin karaciğerleri LF uygulanmasından sonra %38,8 büyümüştü. Her iki gruba ait karaciğerlerdeki hacimsel artış oranı istatistiksel olarak değerlendirildiğinde bu farkın

anlamli olduğu görüldü ($p < 0,05$ Independent Samples t -Test). Bu hepatomegalinin olası nedeni ışık mikroskopik olarak ta gösterilen sinüzoidal dilatasyon olabilir. Ayrıca hem erişkin hem de yavru deneklerde gözlenen hücreler arası boşlukların artması, vakuoler dejenerasyon, myofibroblastlar tarafından kollajen sentezinin artırılması ve hatta Disse mesafesinin genişlemesi karaciğerdeki hacim artışına neden olabilir.

Aynı hacim değerlendirmesi akciğer için yapıldığında; kontrol ve deney grubundaki erişkin sıçan akciğerlerinin hacim değerleri sırasıyla $3,4 \text{ cm}^3$ ve $4,7 \text{ cm}^3$ olarak tespit edildiğinden; LF uygulamasından sonra akciğer hacimlerinin de kontrol grubundakine göre anlamlı ölçüde arttığı düşünöldü. Benzer şekilde yavru sıçan akciğerlerinin hacim değerleri sırasıyla $1,8 \text{ cm}^3$ ve $2,5 \text{ cm}^3$ olarak tespit edildi. Her iki grupta da hacim artışı anlamlı olmakla birlikte; ağırlık artış oranları yüzdeye vurulduğunda yavru akciğer hacimlerinin LF uygulamasından sonra erişkin deneklere oranla anlamlı bir şekilde daha fazla arttığı görüldü ($p < 0,05$ Independent Samples t -Test).

Burada ilginç olan diğör bir nokta da hem erişkin hem de yavru deneklerde karaciğer ve akciğerlerdeki ortalama büyüme oranlarının birbirlerine çok yakın seviyede olmasıydı. Şöyle ki; erişkin ve yavru akciğerleri LF uygulamasından sonra sırasıyla %27 ve %38 büyüme göstermekteydi ve bu oranlar bize karaciğerde gözlenen büyüme oranlarını çağrıştırmaktaydı. Bu sonuca göre her iki organ üzerinde de benzer morfometrik etkiye neden olabilecek ortak bir etkenin varlığı olası idi.

Hem erişkin hem de yavru kalpleri üzerinde yapılan stereolojik değerlendirmenin sonuçlarına göre tek doz LF uygulanmasının hem erişkin hem de yavru kalpleri üzerinde hacim artışına neden olduğu görüldü. Bununla birlikte kalp hacimlerinde görölen bu artış sadece yavru denekler için anlamlıydı ($p < 0,05$ Independent Samples t -Test).

Stereolojik çalışmamızın diğör basamağı prenatal dönemdeki sıçan embriyo ve fetüsleri üzerinde yürütöldü. Çalışmanın yapılacağı ve prenatal dönemdeki deneklerin elde edileceğı günlere sıçanların embriyolojik gelişim süreci gözden geçirilerek karar verildi ve çalışmalar embriyo ve fetüs olmak üzere iki ayrı dönemde gerçekleştirildi¹⁶¹¹⁵⁴.

Bu aşamada prenatal dönemdeki denekler üzerinde yapılan stereolojik çalışmadan elde edilen bulgulardan ilki embriyo ya da fetüslerin total hacimlerine ilişkindi. Kontrol ve deney grubundaki 12 günlük embriyoların ortalama hacim değerlerinin $0,27 \text{ cm}^3$ ve $0,18 \text{ cm}^3$ olarak tespit edildi. İki gruba ait sonuçlar arasında görölen bu anlamlı fark

deney gruplarına uygulanan tek doz letal faktörün intra-uterin büyüme geriliğine neden olabileceği şeklinde yorumlandı ($p < 0,01$, Independent Samples *t*-Test).

Bu kanımızı güçlendiren diğer bir sonuç ta deney grubundaki 16 günlük sıçan fetüslerinin ortalama hacimlerinin de kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde düşük olarak bulunmasıydı ($p < 0,05$ Independent Samples *t*-Test). Her iki sonuç birlikte değerlendirildiğinde embriyo hacimlerinde görülen düşüşün fetüs dönemindekinden daha anlamlı düzeyde oluşu, LF'nin neden olmuş olabileceği olası büyümeyi geriletici etkinin gebeliğin erken dönemlerinde daha önemli olduğunu düşündürmektedir.

Prenatal denekler üzerindeki stereolojik çalışma biraz daha detaylandırıldı ve hem embriyo hem de fetüslerin organ hacimleri de stereolojik olarak değerlendirildi. Geline bu noktada LF uygulanan 12 günlük embriyoların karaciğer hacimlerinin kontrol grubundakilere kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı belirlendi ($p < 0,05$ Independent Samples *t*-Test). Karaciğer hacminde LF uygulamasına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülen bu azalma 16 günlük sıçan fetüslerinde de görüldü. Erişkin ve yavru grubunda izlenen karaciğerlerdeki hacim artışının tam aksi olan bu sonuç aslında embriyo ve fetüslerin total hacmindeki düşüşten kaynaklanan bir yanılgıdır. Bu yanılgıyı önlemek için karaciğer hacimlerinin toplam embriyo veya fetüs hacmine oranı değerlendirildiğinde; bu oranların deney gruplarında kontrol gruplarına kıyasla anlamlı ölçüde arttığı gözlemlendi. Embriyo ve fetüslerin akciğer bulguları da karaciğer bulgularıyla paralellik göstermekteydi. Yine başlangıçta azalmış gibi görülen akciğer hacimleri toplam embriyo ya da fetüs hacmine oranlandı ve hacim değerlerinin azalmadığı; tersine anlamlı ölçüde arttığı görüldü ($p < 0,05$ Independent Samples *t*-Test).

Kalp hacimlerinin embriyo ve fetüslerdeki değerlerine bakıldığında LF uygulamasının hem embriyo hem de fetüslerde kalp hacminde artışa neden olduğu açıkça görülmekteydi. Bununla birlikte kalp hacimlerinde görülen bu artış ne embriyo ne de fetüslerde istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p < 0,05$ Independent Samples *t*-Test). Bu durumda kalp hacmi değerleri için de toplam hacim oranlamasına gidildi ve total hacim azalmasına rağmen görülen kalp hacmi artışının çok anlamlı olduğu gözlemlendi ($p < 0,01$ Independent Samples *t*-Test).

Stereolojik sonuçların da böylece değerlendirilmesinin ardından iki soru aklı gelmekteydi. Bu sorulardan ilki; kalpte, karaciğerde ve akciğerde gerçekleşen hacim artışının sebebinin ne olduğuydu. Diğer bir soru da organlarda görülen hacim artışına sebep olan etkenin farklı gelişim dönemlerinde farklı etkiler gösterip göstermediği idi. Bu sorulardan ilki literatür bilgisi ışığında cevaplanmaya çalışıldı. Organlarda meydana gelen hacim artışının bağ dokusu artışı, ödem, hemoraji ve sinüzoidal dilatasyon gibi

nedenlerden kaynaklandığı düşünöldü. İkinci sorunun yanıtı ise histopatolojik bulgularla açıklanamadı. Histolojik bulgularımıza bakıldığında, deneklerimizin yaş farkı bu bulgulara yansımamaktaydı, yani elde edilen histolojik bulgular tüm gruplarda paraleldi. Fakat morfometrik bulgularımıza bakıldığında, LF'nin oluşturduğu toksik etkiden hacim anlamında yavrular erişkinlerden, embriyolar ise fetüslerden daha çok etkilenmişti.

Literatürde LF'ün dokular üzerinde patolojik bir etkiye neden olduğundan bahseden çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışmalarda genellikle *B.anthraxis* tarafından salgılanan faktörlerin ikili veya üçlü kombinasyonlarının etkilerinden söz edilmektedir^{162,163,155, 156}.

Bu çalışmada elde edilen en önemli sonuç, *B.anthraxis* letal faktörünün protektif antijen olmaksızın tek başına uygulandığında dokularda ciddi toksik hasarlara yol açabileceğinin gösterilmesidir. Bu çalışmada LF uygulamasını takiben gösterilen histolojik bulgulardan, LT (PA+LF) uygulaması yapılmış önceki çalışmalarda söz edilmektedir^{87,88,121}. Buna göre LF intraperitoneal yoldan belli bir dozda uygulandığında, protektif antijene ihtiyaç duymaksızın letal toksinin etkilerini aynen gösterebilmektedir.

Kanımıza göre tüm damar sistemini etkileyebilecek bu maddenin diğer birçok organda da histopatolojik değişikliklere neden olması olasıdır.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen bulguların ışığında LF'ün sıçanlarda oluşturduğu dokusal hasarla çeşitli organlarda yetmezliğe giden bir tabloya sebep olabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR:

1. <http://www.bilkent.edu.tr/~bilheal/aykonu/November/sarbn.htm>.
2. Dirckx JH. Virgil on anthrax. Am J Dermatopathol 1981; 3: 191-195.
3. Shafazand S, Doyle R, Ruoss S, Weinacker A, Raffin TA. Inhalational anthrax: epidemiology, diagnosis, and management. Chest 1999; 116:1369-1376.
4. Swartz MN. Aerobic Spore-Forming Bacilli. In: Microbiology. Ed., Davis, D. B., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Gisberg, H. S. 4th Ed.; Philadelphia, 1990.
5. Sirard JC, Malville M, Fouet A, Mock M. Physiopathologie moléculaire de la maladie du charbon. Revue Méd. Vet. 1996 ; 10: 653-670.
6. Arda M, Minbay A, Leloğlu N, Aydın N, Akay Ö. Özel Mikrobiyoloji. Atatürk Üniversitesi Basımevi; Erzurum, 1992.
7. Morens DM. Characterizing a "new" disease: epizootic and epidemic anthrax, 1769-1780. Am J Public Health. 2003; 93: 886-893.
8. İzgür M, İlhan Z. Antraks ile İlgili Gelişmeler. YYÜ Vet Fak Derg 2002; 13: 88-94.
9. Hudson MJ, Beyer W, Böhm R, et al. *Bacillus anthracis*: balancing innocent research with dual-use potential. Int J Med Microbiol 2008; 298: 345-364.
10. <http://www.bibilgi.com/%C5%9Farbon-hastal%C4%B1%C4%9F%C4%B1>.
11. Davies JCA. A major epidemic of anthrax in Zimbabwe, Part 1. Cent Afr J Med 1982; 28: 291-298.
12. Anthony DW. Tabanidae as disease vectors. In: Maramorosch K, ed. Biological transmission of disease agents. New York: Academic Press, 1962; 93-107.
13. Elçin Öİ. Potansiyel Tehlike: Şarbon. Sürekli tıp eğitimi dergisi 2001; 10: 366-370.
14. Turnbull P. Anthrax. In: Panker MT, Collier U. Principles of Bacteriology. Virology and Immunity. London: Eudward Arnold, 1990; 366.
15. Karahocagil MK, Akdeniz N, Akdeniz H, et al. Cutaneous anthrax in Eastern Turkey: a review of 85 cases. Clin Exp Dermatol 2008; 33: 406-411.
16. Holty JE, Kim RY, Bravata DM. Anthrax: a systematic review of atypical presentations. Ann Emerg Med 2006; 48: 200-211.
17. Bravata DM, Holty JE, Wang E, et al. Inhalational, gastrointestinal, and cutaneous anthrax in children: a systematic review of cases: 1900 to 2005. Arch Pediatr Adolesc Med. 2007 Sep;161(9):896-905.

18. Lever MS, Stagg AJ, Nelson M, et al. Experimental respiratory anthrax infection in the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Int J Exp Pathol* 2008; 89(3): 171-179.
19. <http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/zoonoses.html>.
20. <http://www.ccohs.ca/oshanswers/diseases/anthrax.html>.
21. Donegan S, Bellamy R, Gamble CL. Vaccines for preventing anthrax. *Cochrane Database Syst Rev* 2009; 2: 6403.
22. Velimirovic B. Anthrax in Europe. *Rev Sci Tech Off Int Epiz* 1984; 3: 527.
23. Hugh-Jones M. 1996–1997 Global anthrax report. *J Appl Microbiol* 1999; 87: 189-191.
24. Lew DP. *Bacillus anthracis* (anthrax). In: *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th edn. New York: Churchill Livingstone, 2000: 2215–2220.
25. Clegg SB, Turnbull PC, Foggin CM, Lindeque PM. Massive outbreak of anthrax in wildlife in the Malilangwe Wildlife Reserve, Zimbabwe. *Vet Rec* 2007; 160:113-118.
26. Abramova FA, Grinberg LM, Yampolskaya OV, Walker DH. Pathology of inhalational anthrax in 42 cases from the Sverdlovsk outbreak of 1979. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 2291–2294.
27. Meselson M, Guillemin J, Hugh-Jones M, et al. The Sverdlovsk anthrax outbreak of 1979. *Science* 1994; 266: 1202–1208.
28. Anaya-Velázquez F. Bioethics, bioweapons and the microbiologist. *Rev Latinoam Microbiol* 2002; 44: 38-45.
29. Frazier AA, Franks TJ, Galvin JR. Inhalational anthrax. *J Thorac Imaging* 2006; 21: 252-258.
30. Doganay M, Metan G. Human Anthrax in Turkey from 1990 to 2007. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 22: 1-10.
31. Kaya A, Taşyaran MA, Özkurt Z, et al. Şarbon: 68 olgunun değerlendirilmesi. *Flora* 1997; 1: 515-4.
32. Doğanay M. Human anthrax in Turkey. *Salisbury Med Bull* 1990; 68: 13.
33. [TC Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri 2004 Çalışma Yıllığı \[Ministry of Health of Turkey. Basic Health Services 2004 Annual Statistics. Available at: http://www.saglik.gov.tr/extras/istatistikler/temel2004/tablo-55.htm\]](http://www.saglik.gov.tr/extras/istatistikler/temel2004/tablo-55.htm).
34. Ozkurt Z, Parlak M, Tastan R, Dinler U, Saglam YS, Ozyurek SF. Anthrax in eastern Turkey, 1992-2004. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(12): 1939-1941.
35. <http://www.uzunhayat.com/dermatoloji/sarbon-antraks.html>

36. Siegrist DW. The threat of biological attack: why concern now *Emerg. Infect. Dis.* 1999; 5: 505-508.
37. Dolev E. Bioterrorism and how to cope with it. *Clin Dermatol* 2002; 20: 343-345.
38. Hillemann MR. Overview: cause and prevention in biowarfare and bioterrorism. *Vaccine* 2002; 20: 3055-3067.
39. Demidov V. Bioterrorism: how well are we protected? *Trends Biotechnol* 2002; 20: 192.
40. Hamburg MA. Bioterrorism: responding to an emerging threat. *Trends Biotechnol* 2002; 20: 296-298.
41. Christopher GW, Chieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM. Biological warfare, a historical perspective. *JAMA* 1997; 278: 412-417.
42. Ruoff KL. Biological warfare. *Clin Microbiol Newsletter* 1998; 20: 173-176.
43. Poupard JA, Miller LA. History of biological warfare: catapults to capsomeres. *Ann NY Acad Sci* 1992; 666: 9-20.
44. Harris S. Japanese biological warfare research on humans: a case study of microbiology and ethics. *Ann NY Acad Sci* 1992; 666: 21-52.
45. Wear DJ. Smallpox: The greatest killer: smallpox in history. *JAMA* 2003; 289: 1171-1173.
46. Innes EA. Emerging parasitic disease, bioterrorism and the new world order. *Parasitol Today* 1999; 15: 427-428.
47. Pavlin JA. Epidemiology of bioterrorism. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 528-530.
48. Fox A. and 17 other attendees. Report of the "Bioterrorism workshop" Duke University Thomas Center on april 2-4, 2002. *J. Microbiol. Meth* 2002; 51: 247-254.
49. Simon JD. Biological terrorism: preparing to meet the threat. *JAMA* 1997; 278: 428-430.
50. Khan AS, Morse S, Lillebridge S. Public-health preparedness for biological terrorism in the USA. *The Lancet* 2000; 356: 1179-1182.
51. Manchee RJ, Steward WD. The decontamination of Gruinard Island. *Chem Br* 1998; 690-691.
52. Kortepeter M, Christopher G, Cieslak T, et al. USAMRIID's Medical Management of Biological Casualties, Handbook. Maryland: Fort Detrick, 4th Ed. 2001; 12-18.
53. Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, et al. Anthrax as a biological weapon. Medical and public health management. *JAMA* 1999; 281: 1735-1745.

54. Pezard C, Berche P, Mock M. Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun* 1991; 10: 3472-3477.
55. Bisping W, Amtsberg G. Colour Atlas for the Diagnosis of Bacterial Pathogens In Animal. Paul Parey Scientific Publishers, Berlin and Hamburg, 1988.
56. Cybulski RJ, Sanz P, McDaniel D, Darnell S, Bull RL, O'Brien AD. Recombinant *Bacillus anthracis* spore proteins enhance protection of mice primed with suboptimal amounts of protective antigen. *Vaccine*. 2008; 26: 4927-4949.
57. http://www.veterinerhekim.net/forum/forum_posts.asp?TID=2929
58. Sylvestre P; Couture-Tosi E; Mock M. A collagen-like surface glycoprotein is a structural component of the *Bacillus anthracis* exosporium. *Mol Microbiol* 2002; 45:169-178.
59. Brahmbhatt TN, Darnell SC, Carvalho HM, et al. Recombinant exosporium protein BclA of *Bacillus anthracis* is effective as a booster for mice primed with suboptimal amounts of protective antigen. *Infect Immun* 2007; 75: 5240-5247.
60. Sanz P; Teel LD, Alem F; Carvalho HM, Darnell SC, O'Brien AD. Detection of *Bacillus anthracis* spore germination in vivo by bioluminescence imaging. *Infect Immun* 2008; 76: 1036-1047.
61. Glomski IJ, Corre JP, Mock M, Goossens PL. Noncapsulated toxinogenic *Bacillus anthracis* presents a specific growth and dissemination pattern in naive and protective antigen-immune mice. *Infect Immun* 2007; 75(10): 4754-4761.
62. Little FS, Knudson GB. Comparative efficacy of *Bacillus anthracis* live spore vaccine and protective antigen vaccine against anthrax in the quinea pigs. *Infect Immun* 1986; 52: 509-512.
63. Makino S, Uchido I, Terakado N, Sasakawa C, Masanosuke S. Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol* 1989; 171: 722-730.
64. Uchido I, Sekizaki T, Hoshimoto K, Terakodo N. Association of the encapsulation of *Bacillus anthracis* with a 60 mega dalton plasmid. *J Gen Microbiol* 1995; 131: 363-367.
65. Maldonado-Arocho FJ, Fulcher JA, Lee B, Bradley KA. Anthrax oedema toxin induces anthrax toxin receptor expression in monocyte-derived cells. *Mol Microbiol* 2006; 61: 324-337.
66. Manayani DJ, Thomas D, Dryden KA, et al. A viral nanoparticle with dual function as an anthrax antitoxin and vaccine. *PLOS Pathog* 2007; 3:1422-1431.

67. Pezard C, Duflot E Mock, M. Construction of *Bacillus anthracis* mutant strains producing a single toxin component. J Gen Microbiol 1993; 139: 2459-2463.
68. Fish DC, Mahlandt BG, Dobbs JP, Lincoln RE. Purification and properties of in vitro-produced anthrax toxin components. J Bacteriol 1968; 95: 907-918.
69. Leppla SH. Anthrax toxin edema factor: a bacterial adenylate cyclase that increases cyclicAMP concentrations of eukaryotic cells. Proc Natl Acad Sci USA 1982; 79: 3162-3166.
70. Munier H, Bouhss A, Krin E, et al. The role of histidine 63 in the catalytic mechanism of Bordetella pertussis adenylate cyclase. J Biol Chem 1992; 267: 9816-9820.
71. Kochi SK, Schiavo G, Mock M, Montecucco C. Zinc content of the *Bacillus anthracis* lethal factor. FEMS Microbiol Lett 1994; 124: 343-348.
72. Labruyère E, Mock M, Ladant D, et al. Characterization of ATP and calmodulin-binding properties of a truncated form of *Bacillus anthracis* adenylate cyclase. Biochemistry 1990; 29: 4922-4928.
73. Escuyer V, Duflot E, Sezer O, Danchin A, Mock M. Structural homology between virulence-associated bacterial adenylate cyclases. Gene 1988; 71: 293-298.
74. Petosa C, Collier RJ, Klimpel KR, Leppla SH, Liddington RC. Crystal structure of the anthrax toxin protective antigen. Nature 1997; 385: 833-838.
75. Bradley KA, Mogridge J, Mourez M, Collier RJ, Young JA. Identification of the cellular receptor for anthrax toxin. Nature 2001; 414: 225-229.
76. Milne JC, Furlong D, Hanna PC, Wall JS, Collier RJ. Anthrax protective antigen forms oligomer during intoxication of mammalian cells. J Biol Chem 1994; 269: 20607-20612.
77. Arora N, Leppla SH. Residues 1-254 of anthrax toxin lethal factor are sufficient to cause cellular uptake of fused polypeptides. J Biol Chem. 1993; 268(5): 3334-3341.
78. Quinn CP, Singh Y, Klimpel KR, Leppla SH. Functional mapping of anthrax toxin lethal factor by in-frame insertion mutagenesis J Biol Chem 1991; 266: 20124-20130.
79. Klimpel KR, Arora N, Leppla SH. Anthrax toxin lethal factor contains a zinc metalloprotease consensus sequence which is required for lethal toxin activity. Mol Microbiol 1994; 13(6):1093-100.

80. Vitale G, Pellizzari R, Recchi C, Napolitani G, Mock M, Montecucco C. Anthrax lethal factor cleaves the N-terminus of MAPKKs and induces tyrosine/threonine phosphorylation of MAPKs in cultured macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248: 706-711.
81. Freer JH. Toxins As Virulence Factors of Gram Positive Pathogenic Bacteria of Veterinary Importance. In: *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*. Ed., 10th, J. A. American Society For Microbiology, Ames, Iowa, 1988.
82. Brossier F, Mock M. Toxins of *Bacillus anthracis*. *Toxicon*. 2001; 39(11): 1747-1755.
83. Ascenzi P, Visca P, Ippolito G, Spallarossa A, Bolognesi M, Montecucco C. Anthrax toxin: a tripartite lethal combination. *FEBS Lett* 2002; 531: 384-388.
84. Kolesnik VS, Tafel'shtein EE, Kolesnik RS, Starovoitova TP, Kondrat'eva AM. Experimental characteristics of anthrax intoxication. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1987; (8): 98-101.
85. Bonventre PF, Sueoka W, True CW, Klein F, Lincoln R. Attempts to implicate the central nervous system as a primary site of action for *Bacillus anthracis* lethal toxin. *Fed Proc*. 1967; 26(5): 1549-1453.
86. Firoved AM, Miller GF, Moayeri M, et al. *Bacillus anthracis* edema toxin causes extensive tissue lesions and rapid lethality in mice. *Am J Pathol* 2005; 167(5): 1309-1320.
87. Culley NC, Pinson DM, Chakrabarty A, Mayo MS, Levine SM. Pathophysiological manifestations in mice exposed to anthrax lethal toxin. *Infect Immun* 2005; 73(10): 7006-7010.
88. Grinberg LM, Abramova FA, Yampolskaya OV, Walker DH, Smith JH. Quantitative pathology of inhalational anthrax. I: quantitative microscopic findings. *Mod Pathol* 2001; 14: 482-495.
89. Bonuccelli G, Sotgia PG, Frank TM, et al. Anthrax toxin receptor (ATR/TEM8) is highly expressed in epithelial cells lining the toxin's three sites of entry (lungs, skin, and intestine). *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: 1402-1410.
90. Duong S, Chiaraviglio L, Kirby JE. Histopathology in a murine model of anthrax. *Int J Exp Pathol* 2006; 87(2): 131-137.
91. Kalaycı Ş. *Histoloji*. Bursa. Uludağ Üniversitesi basımevi, 1987; 449-466.
92. Ross Mh, Pawlina W, Kaye GI. *Histology A Text and Atlas*, Lippincott Williams and Wilkins; Fourth edition, 2002.

93. Welsch. U. Sobotta/Hammersen.tercüme,Tekelioğlu M. Histoloji. İstanbul. Beta AŞ, 1994; 168-173.
94. Fawcett DW. Bloom and Fawscett. A textbook of histology. Eleventh edition. W.B Saunders Company. Philadelphia-London-Toronto-Mexico-Rio de Janerio-Sydney-Tokyo-Hong Kong, 1986; 652-684.
95. Bejarano PA, Garcia MT, Rodriguez MM, Ruiz P, Tzakis AG. Liver glycogen bodies: ground-glass hepatocytes in transplanted patients. Virchows Arch 2006; 449(5): 539-545.
96. Lefkowitch JH, Haythe JH, Regent N. Kupffer cell aggregation and perivenular distribution in steatohepatitis. Mod Pathol 2002;15: 699-704.
97. Niir GK, O'Morchoe CC. Pattern and distribution of intrahepatic lymph vessels in the rat. Anat Rec 1986; 215(4): 351-360.
98. Sato Y, Harada K, Ikeda H, et al. Hepatic stellate cells are activated around central scars of focal nodular hyperplasia of the liver--a potential mechanism of central scar formation. Hum Pathol 2009; 40: 181-188.
99. Nakatani K, Kaneda K, Seki S, Nakajima Y. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function. Med Electron Microsc. 2004; 37(1): 29-36.
100. Guyton AC, Hall JE. Textbook of Medical Physiology. Çeviri: Çavuşoğlu H. Tıbbi Fizyoloji. İstanbul: Nobel Kitap Evi, 2001; 797-802.
101. Trutmann M, Sasse D. The lymphatics of the liver. Anat Embryol (Berl) 1994; 190: 201-209.
102. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. Çeviri: Başaklar AC. Lagman's Medikal Embriyoloji. Ankara: Palme Yayıncılık, 2002. Moore KL, Persaud TVN. Before We Are Born. Toronto: B Saunders, 2002; 215-292.
103. Gartner LP, Hiatt JL. Color Atlas of Histology. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2005; 303-323.
104. Abraham L. Kierszenbaum Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş - Çev.Ed: Prof.Dr. Ramazan Demir (Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology - Abraham L. Kierszenbaum). Palme Yayıncılık, 2006; 339-362.
105. Young B, Lowe JS, Stevens A, Heath JW, Deakin PJ. Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. Elsevier Health Science, 5th Edition Philederphia, USA, 2005; 130-147.
106. Bishop AE. Pulmonary epithelial stem cells. Cell Prolif 2004; 37: 89-96.
107. Widdicombe JG, Pack RJ. The Clara cell. Eur J Respir Dis. 1982 May;63(3):202-20.

108. Moore KL, Persaud TVN. Developing human. Toronto: B Saunders, 1998;201-381.
109. Larsen WJ, Lawrence S. Sherman, S. Potter S, Scott WJ. Human Embryology London: Churchill Livingstone, 2001; 319-435.
110. Moore KL, Persaud TVN. Before We Are Born. Toronto: B Saunders, 2002; 241-360.
111. 80.251.40.59/sports.ankara.edu.tr/koz/ana-fiz/dolasim.anatomi.pdf.
112. Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology: Text & Atlas. McGraw-Hill 11th Ed. 2005; 226-230.
113. Gundersen HJ. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones in memory of William R Thomson. J Microsc 1986;143: 3-45.
114. Sahin B, Aslan H, Ünal B, et al. Brain volumes of the lamb rat and bird do not show hemispheric asymmetry: A stereological Study. Anal Stereol 2001; 20: 9-13.
115. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. Am J Physiol 1990; 258:148-156.
116. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. APMIS 1988; 96: 379-394.
117. Mackay CE, Pakkenberg B, Roberts N. Comparison of compartment volumes estimated from MR images and Physical sections of formalin fixed cerebral hemispheres. Acta Stereol 1999; 18: 149-159.
118. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. J Microsc 1987; 147: 229-263.
119. http://www.kkgm.gov.tr/birim/hay_sagl/Hastaliklar/sarbon.html
120. Young JA, Collier RJ. Anthrax toxin: receptor binding, internalization, pore formation, and translocation. Annu Rev Biochem. 2007; 76: 243-265.
121. Moayeri M, Haines D, Young HA, Leppla SH. *Bacillus anthracis* lethal toxin induces TNF-alpha-independent hypoxia-mediated toxicity in mice. J Clin Invest. 2003;112: 670-682.
122. Hanna PC, Acosta D, Collier RJ. On the role of macrophages in anthrax. Proc. Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10198–10201.
123. Guarner J, Jernigan JA, Shieh WJ, et al. Inhalational Anthrax Pathology Working Group. Pathology and pathogenesis of bioterrorism-related inhalational anthrax. Am J Pathol 2003;163(2): 701-709.

124. Fritz DL, Jaax NK, Lawrence WB, et al. Pathology of experimental inhalation anthrax in the rhesus monkey. *Lab Invest* 1995; 73: 691-702.
125. Shieh WJ, Guarner J, Paddock C, et al. Anthrax Bioterrorism Investigation Team, The critical role of pathology in the investigation of bioterrorism-related cutaneous anthrax. *Am J Pathol* 2003; 163: 1901-1910.
126. Cui X, Moayeri M, Li Y, et al. Lethality during continuous anthrax lethal toxin infusion is associated with circulatory shock but not inflammatory cytokine or nitric oxide release in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004; 286: 699-709.
127. Amber D, Steele AD, Jason M. Warfel JM, Agnillo FD. Anthrax lethal toxin enhances cytokine-induced VCAM-1 expression on human endothelial cells *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 1249-1256.
128. Warfel JM, Steele AD, Agnillo FD. Anthrax lethal toxin induces endothelial barrier dysfunction. *Am J Pathol* 2005; 166: 1871-1881.
129. Sundy JS, Haynes BF. Cytokines and adhesion molecules in the pathogenesis of vasculitis. *Curr Rheumatol Rep* 2000; 2: 402-410.
130. Cotran S, Kumar V, Robbins SL: Robbins Pathologic Basis of Disease, Saunders Company, Philadelphia 1989; 39-86.
131. <http://dergiler.ankara.edu.tr/dergiler/11/650/8304.pdf>
132. Tielemans CL, Lenclud CM, Wens R, Collart FE, Dratwa M. Critical role of iron overload in the increased susceptibility of haemodialysis patients to bacterial infections. Beneficial effects of desferrioxamine. *Nephrol Dial Transplant*. 1989;4(10):883-887.
133. <http://www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM/1215/unite02.pdf>.
134. Squires RC, Muehlbauer SM, Brojatsch J. Proteasomes control caspase-1 activation in anthrax lethal toxin-mediated cell killing. *J Biol Chem* 2007; 282: 34260-34267.
135. Akçay MN, Akçay G, Balık AA, Demirtaş T. Multi Organ Yetmezliği (Etyopatogenez, Önlenmesi ve Tedavisi Konusunda Son Görüşler) *T Klin Tıp Bilimleri* 1995; 75-80.
136. Singh Y, Leppla SH, Bhatnagar R, Friedlander AM. Internalization and processing of *Bacillus anthracis* lethal toxin by toxin-sensitive and resistant cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 11099-11102.
137. Baldari CT, Tonello F, Paccani SR, Montecucco C. Anthrax toxins: a paradigm of bacterial immune suppression. *Trends Immunol* 2006; 27: 434-440.

138. Tang G, Leppla SH. Proteasome activity is required for anthrax lethal toxin to kill macrophages. *Infect Immun* 1999; 67: 3055-3056.
139. Wang XL, Zhang LM, Tang FX, Guo ZW, Wu CY, Xiong ZJ. Ultrastructural dynamic observation on murine schistosomal hepatic fibrosis. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi*. 2002; 20: 216-219.
140. Han NI, Chung KW, Ahn BM, et al. Ultrastructural changes of hepatic stellate cells in the space of Disse in alcoholic fatty liver. *Korean J Intern Med*. 2001;16(3):160-166.
141. Jones AL, Spring-Mills E. *The Liver and Gallbladder, Cell and Tissue Biology A Textbook of Histology*'de 6.Ed., Ed. Weiss L. München, Urban&Schwarzenberg Inc, 1988; 696.
142. İto L, Hiroyuki M, Kosugi L, Shirasawa H. Alteration in Fc receptor activity in sinusoidal endotelial cells and Kupffer cells during D-Galactosamine (GalN)-induced liver injury in rats. *Virchows Arch B Cell Pathology* 1990; 58: 417.
143. Szabo G, Romics L, Frendl G. Liver in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Clin Liver Dis* 2002; 6: 1045-1066.
144. http://tip.erciyes.edu.tr/Ders_Notlari/Cerrahi_Tip/Patoloji/Turhan%20Okten/ders.htm
145. Mete B. Sepsiste Böbrek ve Karaciğer. *Güncel Bilgiler Işığında Sepsis Sempozyumu* 2006; 51: 35-43.
146. Langer M, Malykhin A, Maeda K, et al. *Bacillus anthracis* peptidoglycan stimulates an inflammatory response in monocytes through the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *PLoS ONE*. 2008; 3(11): 3706.
147. Boudghène-Stambouli O, Mérad-Boudia A, Aïssa-Mamoun A. Anthrax: an unusual escharotic lesion. *Ann Dermatol Venereol* 1999; 126(10): 718-719.
148. Kuo SR, Willingham MC, Bour SH, et al. Anthrax toxin-induced shock in rats is associated with pulmonary edema and hemorrhage. *Microb Pathog*. 2008; 44: 467-472.
149. Twenhafel NA, Leffel E, Pitt ML. Pathology of inhalational anthrax infection in the african green monkey. *Vet Pathol*. 2007 Sep;44(5):716-21.
150. <http://www.aof.anadolu.edu.tr/kitap/EHSM/1215/unite03.pdf>.
151. Bernard G, Artigas A, Carlet J, et al. The American-European consensus conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149: 818.

152. Gürsel G. Akut Solunum Sıkıntısı Sendromu. In Ekim N, Türkteş H(Eds) Göğüs Hastalıkları Acilleri. Ankara Bilimsel Tıp Yayınevi 2000; 197-210.
153. Watson LE, Kuo SR, Katki K, et al. Anthrax toxins induce shock in rats by depressed cardiac ventricular function. PLoS ONE 2007; 2: 466.
154. <http://embryology.med.unsw.edu.au/OtherEmb/Rat.htm>
155. Turk BE. Manipulation of host signalling pathways by anthrax toxins. Biochem J 2007; 402(3): 405-417.
156. Firoved AM, Moayeri M, Wiggins JF, Shen Y, Tang WJ, Leppla SH. Anthrax edema toxin sensitizes DBA/2J mice to lethal toxin. Infect Immun 2007; 75: 2120-2125.