

T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ  
ANA BİLİM DALI

**SIÇAN BÖBREKÜSTÜ BEZİ MEDULLA'SINDAKİ SINIR  
BÜYÜME FAKTÖRLERİNİN DOĞUM ÖNCESİ VE SONRASI  
GELİŞİMİNİN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Seyhan TÜRK**

Tez Danışmanı

Prof.Dr.Celal ILGAZ

ANKARA  
Ekim 2007

**T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı  
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından  
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

**Tez Savunma Tarihi: 17/10/2007**

**İmza  
Ünvanı Adı ve Soyadı  
Gazi Üniversitesi  
Jüri başkanı  
Prof.Dr.Deniz Erdogan**

**İmza  
Ünvanı Adı ve Soyadı  
Gazi Üniversitesi**

**Prof.Dr. Celal Ilgaz**

**İmza  
Ünvanı Adı ve Soyadı  
Gazi Üniversitesi**

**Prof.Dr. Engin Çalgüner**

## İÇİNDEKİLER

<b>Kabul ve Onay</b>	<b>I</b>
<b>İçindekiler</b>	<b>II</b>
<b>Şekiller, Resimler, Grafikler</b>	<b>III</b>
<b>Tablolar</b>	<b>V</b>
<b>Semboller, Kısaltmalar</b>	<b>VI</b>
<b>Önsöz</b>	<b>VII</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Böbreküstü Bezi Gelişimi	4
2.2. Böbreküstü Bezi Anatomisi	6
2.3. Böbreküstü Bezi Histolojisi	10
2.3.a Korteks	10
2.3.b Medulla	13
2.4. Böbreküstü Bezi Fizyolojisi	16
2.5. Sinir Büyüme Faktörleri	23
2.5.a Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	23
2.5.b Sinir Büyüme Faktörü (NGF)	28
2.5.c Nörofilament Protein (NF)	32

<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	<b>36</b>
3.1. Deney Hayvanlarını Gruplandırma	36
3.2. İmmünohistokimyasal Yöntem	37
<b>4.BULGULAR</b>	<b>40</b>
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>61</b>
<b>6. SONUÇ</b>	<b>73</b>
<b>7. ÖZET</b>	<b>74</b>
<b>8. SUMMARY</b>	<b>76</b>
<b>9. KAYNAKLAR</b>	<b>78</b>
<b>10.ÖZGEÇMİŞ</b>	

## **KISALTMALAR ve SİMGELER**

**A:** Adrenalin

**DA:** Dopamin

**NA:** Noradrenalin

**ER:** Endoplazmik retikulum

**VMA:** Vanilmandelik asit ( 3-metoksil-4-hidroksimandelik asit)

**α:** Alfa

**β:** Beta

**ACTH:** Adrenokortikotrop hormon

**NGF:** Sinir büyüme faktörü

**FGF:** Fibroblast büyüme faktörü

**NF:** Nörofilament

**K<sup>+</sup>:** Potasyum

**NA<sup>+2</sup> :** Sodyum

**PNMT:** Fentolamin N-metiltransferaz

**NPY:** Nöropeptid

**PN:** Postnatal

**CNTF:** Ciliary nörotropik faktör

**TH:** Tirozin Hidroksilaz

**SG:** Sempatik gangliyon

**K:** Kromaffin hücre

## I.GİRİŞ

Böbreküstü bezleri gelişimsel, yapısal ve işlevsel olarak birbirinden farklı, korteks ve medulla katmanlarından oluşur.

3,6,8,14,19,30,33,34,82

Korteks; farklı tipte steroid sentezleyen üç katmandan yapıdır. Kapsül altında yerleşik zona glomeruloza katmanı minerelokortikoidleri, orta kat zona fasikülata glukokortikoidleri ve en iç katman zona retikularis seks steroidlerini oluşturur. Medulla nöral krista kökenlidir, katekolaminleri salgılayan kromaffin hücreler ile sempatik gangliyon hücrelerinden yapıdır. <sup>3,8,10,30,67</sup>

Krista nöralis (kabartı) öncüllerinden sempatik gangliyon hücreleri; sıçanlarda embriyonik gelişimin 11.gününde, insanda da 3.haftadan itibaren izlenmeye başlarlar. Bu hücreler, vücutta kalp, kan damarları, düz kaslar ve bezlerin işlevlerini denetleyen, otonom sinir sisteminin bir bölümü olan sempatik sinirlere bağlıdır. <sup>1,14,16,71</sup>

Sempatik sinirler, omuriliğin T1-L2 segmentlerinden çıkıp önce sempatik gangliyonlara, oradan da doku ve organlara dağılırlar. Sempatik sinirlerde sempatik yol, gangliyona bağlanıp oradan ayrıldığı için pregangliyoner ve postgangliyoner nöron olarak iki nörondan oluşur. <sup>11</sup>

Böbreküstü bezi'nin medulla katmanına giden sempatik sinir, omurilikten çıktıktan sonra hiç bir gangliyonda duraksamadan bezin epinefrin salgılayan medulla hücrelerinde sonlanır.<sup>11</sup>

Kromaffin hücreler, endokrin ve sempatik sinir hücrelerine benzemeleri nedeniyle geçmişten günümüze değin araştırmacıların ilgisini çekmiştir. 17 yy. başlarında doğumu izleyerek kromaffin hücreler göz çukuru üzerine yerleştirilmiş (Olson 1970), ya da NGF'li kültür ortamında geliştirilmiş ve bunların sempatik nöronlara dönüştüğü gözlemlenmiştir. Birçok araştırmada sempatik ganglion hücrelerinin NGF(Nerve Growth Factor)'ye yanıt verdiği buna karşın kromaffin hücrelerin vermediği saptanmıştır.<sup>71</sup>

NGF ve FGF(Fibroblast Büyüme Faktörü) iki farklı peptid olmalarına karşın böbreküstü bezi medulla hücrelerine etkileri yapısal olarak eşdeğir. Mezenşimal hücreler için mitojenik erki olan bFGF 1974 yılında tanımlanmıştır [Delrieu,I.Febs Letters 468, 6-10 (2000)] ve sonrasındaki araştırmalarda FGF'nin sinir hücrelerinin çoğalma ve farklanmasını aktive ettiği, mitoz sonrası farklanmış nöronların yaşam süresini uzattığı ve yeniden yapılanmalarında etkili olduğu izlenmiştir.<sup>40,71</sup>

Nörofilament proteinler, nöron oylumu ve şeklinin düzenlenmesi, akson çapı ve uzunluğunun belirlenmesinde işlev görürler

(Swallow and Griffiths,1977; Sims and Redding 1980). NGF ve FGF gibi böbreküstü bezi medulla hücrelerini etkileyen sinir büyüme faktörleridir.  
20,48,134,135

Yapılan çalışmalarda sempatik gangliyon hücrelerinin gelişimi, farklanması ve yeniden yapılanmasında sinir büyüme faktörlerinin rolü olduğu bildirilmiştir. <sup>14,16,59,40</sup> Bu nedenle bizde çalışmamızda; sıçan böbreküstü bezi medulla katmanında pregangliyonik sempatik gangliyon hücrelerinin doğum öncesi ve doğum sonrası dönemlerde gelişimini özgün antikolar kullanarak ışık mikroskop düzeyinde immünohistokimyasal yöntemler ile incelemeyi amaçladık.

## II. GENEL BİLGİLER

### 1. BÖBREKÜSTÜ BEZİ GELİŞİMİ

Böbreküstü bezlerinin (adrenal, sürrenal bez) korteks ve medulla kısımları farklı embriyonik kökenlidir. Korteks mezodermden, medulla nöral krista hücrelerinden gelişir. <sup>3,6,14,15,16,17,21,30,34,35,48</sup>

Omurgalılarda örneğin balıklarda korteks ve medulla yaşam boyu birbirinden ayrı iki organdır. Amfibialarda ikisi yan yana durur, reptil ve kuşlarda birbirine karışmaya başlarlar. Memelilerde medulla, korteksin kenar kısmından merkezine doğru ilerleyip, bunun içine girer ve ikisi tek bir organ oluştururlar. <sup>67</sup>

İnsanda korteks gelişimin 6.haftasında gonadlar ile dorsal mezenter kökleri arasında her iki yanda, mezenşimal hücre toplulukları olarak izlenir. Fötal korteksi oluşturan hücreler karın arka duvarını döşeyen mezotelden köken alırlar. <sup>16,17</sup> Medullayı oluşturan hücreler nöral kristadan farklıdır ve sempatik sinir sisteminin parçasıdır. Aorta'nın yanında sempatik kordondan ayrılan hücreler korteks taslağının iç tarafında toplanarak korteks'in iç kısmına girerler. Bu hücreler burada feokromoblast ve sempatoblastlar'a farklıdır. Feokromoblastlar medullanın kromaffin

hücrelerini, sempatoblastlar ise sempatik gangliyon hücrelerini yaparlar.

17,35,96

İntrauterin yaşamın 3. ayında yeni bir grup mezenşimal hücre çoğalarak fotal korteksi çevreler. Bu hücreler kalıcı korteksi oluştururlar. İç kattaki fotal korteks intrauterin yaşamın sonlarına doğru atrofi olurken, kalıcı korteksin bu gelişimi doğumdan sonra 2-3 yıl daha sürer. <sup>17,35</sup>

Böbreküstü bezlerinin tipik korteks bölümleri geç fotal yaşamda farklanmaya başlar. Doğumda zona glomeruloza ve zona fasikülata katmanları gelişmiş haldedir. Zona retikularis katmanı ise 2, 3. yılın sonuna değin ayırt edilemez. <sup>17,35</sup>

İnsan fötüsünde böbreküstü bezleri böbreklerden daha büyüktür. Bu büyüklük fotal korteksin genişliği nedeniyle. Medulla doğumdan sonra oldukça küçüktür. <sup>17,35</sup>

1. yılda fotal korteks'in gerilemesine bağlı olarak böbreküstü bezleri hızla küçülür. Bezler doğumdan sonra ilk 2-3 haftada ağırlıklarının 1/3'ünü yitirirler, 2-3. yılın sonunda da özgün ağırlıklarını alırlar. <sup>17,35</sup>

## 2. BÖBREKÜSTÜ BEZİ ANATOMİSİ

Böbreküstü bezleri (adrenal gland, glandulae suprarenales, sürrenal bez) insanda onbirinci trokal vertebra düzeyinde retroperitoneal olarak her iki böbreğin üst kutbunun iç yanına yerleşmiş sarısı renkteki endokrin bezlerdir. Sağ ve sol bezlerin şekilleri birbirinden farklıdır. Sağ taraftaki piramit, soldaki ise yarım ay şeklinde olup diğerinden biraz daha büyüktür. Eni ve genişliği 3-5cm, kalınlığı da 4-6mm kadardır. Ağırlığı yaklaşık 3,5-5gr'dır. Böbreği saran capsula fibrosa'nın dışında fascia renalis'in içinde yer alır. Bez dıştan gevşek bağ dokusuyla sarılmıştır.<sup>3,6,9,10,23</sup>

Sağ gl.suprarenalis, karaciğer'in sağ lobu ve vena cava inferior'un arkasında, diafragmanın önünde ve sağ böbreğin üst kutbunda bulunur.<sup>3,6,9,10,23</sup>

Piramit şekilli olan sağ bezin facies anterior, facies posterior ve facies renalis olarak üç yüzü vardır<sup>6,8,10,23,26</sup>

**Facies anterior**, bu yüzün medial bölümü v.cava inferior ile lateral kısmı ise karaciğer ile komşudur. Karaciğer'e komşu bu bölümün üst kısmı peritonsuzdur ve karaciğer'in area nuda'sı ile komşudur. Bazen önyüzün alt

kısmıyla duodenum komşuluk yapar. Tepe kısmında ve önkenar yakınında v.surrnalis'in çıktığı hilum bulunur. <sup>8,10,23</sup>

**Facies posterior;** üst ve alt olarak iki bölüme ayrılır. Bu iki bölüm arasında bir kenar içerir.Üst bölüm biraz konveks olup diafragma ile komşuluktur. Alt bölüm konkavdır ve böbreğin ön yüzüyle komşudur. <sup>8,10,23</sup>

**Facies renalis;** aşağı ve öne bakar. Konkav olan bu yüz, böbreğin alt kutbuna oturur. <sup>3,6,8,10,23</sup>

Sol gl.suprarenalis, yarım ay şeklinde olup üç yüzü ve iki kenarı vardır <sup>3,6,9,10,23</sup>

**Facies anterior;** bu yüzün üst bölümü periton ile mide'nin kardiasından ve dalağın arka ucundan ayrılır. Alt kısmı peritonsuzdur. Doğrudan pankreas ve dalak arterleriyle komşudur. Hilum,ön yüzün alt bölümü yakınındadır.

**Facies posterior;** bir kabartıyla iki bölüme ayrılır. Dış yan bölüm böbrek, iç yan bölüm ise sol diafragma krusu ile komşudur.

**Facies renalis;**Sol böbreğin üst ucunun iç kenarına uyan yüzdür.

Ön ve arka yüzler arasında oluşan kenarın yukarıda kalan bölümüne margo süperior , medialde kalan bölümüne de margo medialis denir. Medial kenarlar her iki yanda ggl.coeliacum ile komşudur.<sup>6,8,10,23</sup>

Gl.suprarenalis sinistra'nın ön yüzünün üst parçası peritonlu, diğer yüzleri peritonsuzdur.

Esas bezin çevresindeki bağ dokusu içinde sadece korteks dokusu içeren ve gl.suprarenalis accessoriae denilen küçük bezler bulunabilir. Gl.suprarenalisler dışta korteks, içte medulla katmanlarından oluşur.<sup>3,6,8,9,10,23,97,98</sup>

**Korteks**; çeşitli hormonlar salgılar ve yaşam için gereklidir. Çıkarılırsa kişi ölür. Korteks dıştan içe doğru; zona glomeruloza, zona fasciculata ve zona retikularis olarak 3 kattan oluşur.<sup>3,6,9,10,11,15,23,33,82</sup>

**Medulla**; yaşamsal yapı değildir. Çıkarılması önemli bozukluklara neden olmaz. Yokluğu kromaffin paragangliyonlarınca doldurulur. Adrenalin ve noradrenalin üreten kromaffin hücreler ile tek ya da küçük gruplar halindeki sempatik gangliyon hücrelerinden oluşmuştur.<sup>3,6,9,10,11,15,16,23,33,71,82</sup>

Damarları: A.suprarenalis superior (a.phrenica inferior'un dalı), a.suprarenalis media (aorta abdominalis'in dalı) ve a.suprarenalis inferior'dan (a.renalis'in dalı) gelir. <sup>6,8,10,23</sup>

Organa gelen arter dalları beze girmeden önce plexus subcapsularis denilen ağı yaparlar. Buradan çıkan damarlar, zona glomerulosa'da hücreler arasındaki sinusoidlere açılırlar. Sonra zona fasciculata'da hücre kordonları arasından zona retikularis'de bulunan damar ağı ile birleşirler. Buradan başlayan küçük venüller medulla'da kromaffin hücreler arasından geçip v.medullaris'e açılırlar. V.medullaris'ler , v.suprarenalis'e dökülürler. Glandula suprarenalis hilumundan çıkan v.suprarenalis, sağda v.cava inferior'a, solda v.renalis sinistra'ya açılır. Bazı büyük arter dalları doğrudan medullaya girip burayı besler. <sup>6,8,10,23</sup>

Lenf drenajı: Nodi lymphatici aortici laterales'de sonlanır. <sup>6,8,10,23</sup>

Sinirleri: Preganglionik sempatik lifler medulla'da kromaffin hücrelere dağılır. Korteks'in çalışması esas olarak hipofiz ön lobundan salınan ACTH (adrenokortikotropik) ile denetlenir. <sup>6,8,10,23</sup>

### 3.BÖBREKÜSTÜ BEZİ HİSTOLOJİSİ

Böbreklerin üst kutuplarında yerleşik böbreküstü bezleri, dıştan kollejen lifler, fibroblastlar ve yağ dokusundan zengin bağ dokusu bir kapsül ile sarılıdır. Kapsülden parankimaya bağ dokusu bölmeleri girer. Parankima yapısal ve işlevsel iki bölümden oluşmuştur. <sup>3,6,7,9,15,30,34</sup>

**Korteks:** Organın %80-%90'ını oluşturan, dış sarımsı katmandır.

**Medulla:** İçteki koyu ve yoğun bölümdür. Organın %10-%20'sini oluşturur.

#### a. KORTEKS

Korteks 3 bölüm içerir. Bunlar dıştan içe doğru;

1)Zona glomeruloza

2)Zona fasikulata

3)Zona retikularis , katlarıdır. <sup>3,6,7,9,15,30,34</sup>

**Zona glomeruloza:** Kapsül altında yer alan ince bir bölgedir. İnsanda korteks oylumunun %13-15'ini oluşturur. Bu bölgede piramidal şekilli çok yüzlü hücreler yumak şeklinde gruplar yaparlar. Aralarında sinuzoidal tipte

kılcal damarlar bulunur. Hücrelerde çekirdek heterokromatiktir ve 1-2 çekirdekçik içerir. Hücre sitoplazmaları asidofiliktir. Sitoplazmada bol, geniş, granülsüz endoplazmik retikulum (DER) tubulusları, lameli, kristal, mitokondriyonlar, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, granüllü endoplazmik retikulum (GER) tubulusları, serbest ribozomlar ve lipit damlacıkları bulunur. Bu katmanda minerokortikoid hormonlar, başlıca aldosteron sentezlenir. Bu hormonların salınımı anjiotensin II ve ACTH tarafından düzenlenir. Anjiotensin II böbreklerden salınan renin'in başlattığı tepkime dizgesi sonucu oluşur. ACTH ise hipofiz ön lobu bazofil hücrelerinden salgılanır. Bu katmandan hormon salınımında Anjiotensin II, ACTH'da etkindir. <sup>15,30,33,34,97</sup>

Minerolokortikoidler hormonlar böbrek tubuluslarını etkileyerek, vücudun sıvı ve elektrolit dengesini denetler. Aldosteron K<sup>+</sup>'un atılımını, Na<sup>+</sup>'un ise tutulumunu artırır. Su Na<sup>+</sup> ile birlikte tutulur, normal kan volümü ve elektrolit dengesi sağlanır. <sup>4,15</sup>

**Zona fasikülata:** Korteksin %75'ini oluşturur. Hücreler kordon şeklinde uzunlamasına düzenlenmiştir. Hücre kordonları arasında sinuzoit tip kapillerler bulunur. Hücreler zona glomeruloza'dakilerden daha geniş ve poligonal şekillidir. Kordonlar bir, iki sıra hücre katından yapıldır. Hücre sitoplazmaları açık asidofiliktir. Sitoplazma bol, iri lipit damlacıkları içerir. Bu nedenle alışlagelmiş histolojik yöntemlerle hazırlanan preparatlarda,

mikroskopta hücre sitoplazmaları köpüksü görülür. Sitoplazma bol granülsüz endoplazmik retikulum sisternaları, mitokondriyonlar, granüllü endoplazmik retikulum tubulusları, lizozomlar ve lipofuksin pigmenti kapsar. Bu kat hücrelerinde C vitamini de ölçülebilir düzeydedir.

Bu katmandaki hücreler, glikokortikoid, kortisol ve kortikosteron gibi hormonları salgılar. Bu hormonların yapımı ACTH tarafından uyarılır. Glikokortikoid hormonlar karbonhidrat, yağ ve protein metabolizmasını denetlerler. Protein sentezini azaltırlar, glikoneojenezi arttırırlar. Yağ dokudan, yağ asitleri ve gliserolü serbestleştirirler. Bu hormonların antiinflamatuvar etkileri vardır. Yüksek dozlarda bağışıklık sistemini baskırlar. Bu katmanın derin kısmı doğurganlık yaşındaki kadınlarda ve hamilelikte genişler. Yaşlı erkeklerde bu bölgede atrofi görülür. <sup>7,15,30</sup>

**Zona retikularis:** Zona fasikülata ve medulla katmanları arasında yerleşiktir. Korteks'in %7'sini oluşturur. Hücreler poligonal şekillidir ve koyu asidofilik boyanırlar. Anastomozlaşan kordonlar halinde düzenlenmişlerdir. Hücreler zona fasikülata'dakilerden daha küçüktürler ve daha az lipit damlacığı kapsarlar. Hücreler çok miktarda kahverengi lipofuksin pigmenti içerirler. Sitoplazma lizozom ve granülsüz endoplazmik retikulum sisternalarından zengindir. Medullaya yakın kısımlarda piknotik çekirdekli, koyu sitoplazmalı dejenere hücreler gözlemlenir. <sup>3,8,15,30,34</sup>

Bu katman hücreleri erkeklik hormonları olan androjenleri sentezlerler. Bunların sentez ve salınımı ACTH'nın etkisi altındadır.

## **b. MEDULLA**

Böbrek üstü bezi'nin iç kısmına yerleşik medulla 2 tip hücre kapsar.

3,6,7,9,15,30,34

**1)Kromaffin hücreler:** Katekolaminleri (epinefrin-adrenalin, norepinefrin – noradrenalin) sentezlerler. Bunları granüller halinde sitoplazmalarında biriktirirler ve gerekli olduğunda kana verirler.<sup>3,6,7,9,15,16,24,30,34,71</sup>

**2)Sempatik gangliyon hücreleri:** Bağ doku içerisinde tek tek ya da gruplar halinde bulunurlar.<sup>3,6,7,9,15,30,34</sup>

### **Kromaffin Hücreler:**

Parankimanın çoğunluğunu yaparlar. Kısa kordon ya da gruplar oluştururlar. Bu hücrelerin arası kapillerler ve retiküler lif ağlarıyla doldurulmuştur. Kromaffin hücreler potasyum bikromat gibi krom tuzlarıyla işleme sokulduklarında içerdikleri epinefrin (adrenalin) ve norepinefrin'in (noradrenalin) oksidasyonu sonucu granülleri kahverengi boyanır.

Schmorl'un Giemsa yönteminin Prof.Dr.Kamile Şevki Mutlu tarafından modifiye edilen şekli olan Şevki Yöntemi'yle bu hücreler ve granülleri kırmızı renkte gözlenir.<sup>3,8,23</sup>

Kromaffin hücreler granül içeriklerine göre ikiye ayrılırlar:

- 1) Epinefrin (adrenalin) salgılayan hücreler
- 2) Norepinefrin (noradrenalin) salgılayan hücreler

Bu iki hücre tipi elektron mikroskopu, histokimyasal boyamalar ve floresans özelliklerine göre ayırt edilebilirler.<sup>3,8,22,23,30,34,59</sup>

Epinefrin salgılayan hücre granülleri elektron mikroskopunda az yoğundur. İçerik granülü tümüyle doldurmuştur ve homojen görünümlüdür.<sup>8</sup>

Norepinefrin salgılayan hücre granülleri ise daha büyüktür. Granül içeriği düzensizdir. Ortada elektron yoğun bir öz bölge,elektron açık bir çevresel kısım ile çevrelenmiştir.<sup>8</sup>

Kromaffin hücrelerin iki tipinde de iyi gelişmiş, çekirdek üstü yerleşimli Golgi kompleksi, granüllü endoplazmik retikulum tubulusları ve bol mitokondriyon bulunur.<sup>3,34</sup>

Kromaffin hücrelerin yaklaşık %80'i epinefrin üretmekte, %20'si ise norepinefrin sentezlemektedir. Bazı hücre granüllerinde ATP-enkefalinler ve kromagraninler bulunur. Kromograninler epinefrin ve norepinefrin bağlayıcı proteinlerdir. <sup>8,22,34,59</sup>

### **Sempatik Gangliyon Hücreleri:**

Katekolaminler sempatik sinir sisteminde nörotransmitter olarak sentezlenirler. Böbreküstü bezi medullası da modifiye olmuş sempatik bir gangliyon olarak düşünülür. Tipik gangliyon hücreleri kromaffin hücre kordonları arasında tek tek yada kordonlar halinde dağılırlar. Medulla pregangliyonik sempatik (kolinerjik) splanknik sinirlerce uyarılır. <sup>3,8,15,30,34</sup>

## 4. BÖBREKÜSTÜ MEDULLA FİZYOLOJİSİ

### Katekolaminler

Noradrenalin (norepinefrin), Adrenalin (epinefrin) ve Dopamin böbreküstü bezi medullası'ndan salınan katekolaminler'dir. İnsanda ven katekolamin çıkışının çoğu adrenalindir. Noradrenalin, noradrenerjik sinir uçlarından da dolaşıma katılır. <sup>2,5,15,19,34</sup>

Noradrenalin, tirozin'in hidroksilasyonu ve dekarsilasyonu ile oluşturulurken, adrenalin noradrenalin'in metilasyonu ile yapılır. Noradrenalin'in adrenaline dönüşümünü katalize eden enzim fentolamin – N - metiltransferaz (PNMT) 'dir. Bu enzim beyin ve böbreküstü bezi medulla'sında önemli miktarlarda bulunur. Böbreküstü bezi medulla'sındaki PNMT glikokortikoidlerle uyarılır ve glukokortikoidler korteksten medulla'ya gelen kanda yükselir. Hipofizektomi'den sonra kanda glukokortikoidler düşer ve adrenalin sentezi azalır. <sup>2,18,21,59</sup>

Sirtüstü yatan kişilerde, serbest noradrenalin'in plazma düzeyi yaklaşık 300 pg/mL (1.8 nmol/L)'dir. Ayağa kalkıldığında bu %50 – 100 oranında artar. Plazma noradrenalin'i böbreküstü bezlerinin çıkarılması ile değişmez ancak serbest adrenalin düzeyi hemen sifıra düşer.

Plazma serbest dopamin düzeyi yaklaşık 35pg/ml (0.23 nmol/L)'dir ve dopamin önemli miktarda idrarda bulunur. <sup>2,22</sup>

Plazma dopamin'inin yarısı böbreküstü bezi medulla'sından gelirken kalan yarısı sempatik ganglionlar ve otonom sinir sisteminin diğer bölümleri kökenlidir. <sup>2,5,22</sup>

Katekolaminler, dolaşımda yaklaşık 2 dakikalık bir yarı ömre sahiptir. Çoğunlukla metoksile edilirler ve sonra 3 – metoksil – 4 – hidroksimandelik aside (vanilmandelik asit, VMA) okside edilir. Salınan katekolaminlerin yaklaşık %50'si idrarda serbest ya da konjuge metanefrin ve normetanefrin , %35'i ise VMA olarak görülür. Az miktarda serbest adrenalin ve noradrenalin atılır. Normal insanda günde yaklaşık 30µg noradrenalin , 6 µg adrenalin ve 700 µg VMA atılmaktadır. <sup>2,42,98</sup>

### **Medulla'dan salınan diğer maddeler ;**

Medulla'da, adrenalin ve noradrenalin hücre granüllerinde ATP ile birlikte depolanırlar. Granüller ayrıca kromogranin A'yı da içerirler. Salgılama; salgı hücrelerini uyarayan pregangliyonik nöronlardan salgılanan asetilkolin ile başlar. Asetilkolin katyon kanallarını açar, hücreye giren Ca<sup>++</sup> ekzositozu tetikler. Böylece granüllerden katekolaminler, ATP ve proteinler birlikte salgılanır. <sup>25,58,98</sup>

Medulla'nın adrenalin içeren hücreleri, ayrıca opioid peptidleri kapsar ve salgılanır. Öncül molekül pre-proenkefalin'dir. Medulla'da ayrıca vasodepresor bir polipeptit olan adrenomedüllin'de bulunmaktadır.<sup>2,47,97,98</sup>

### **Adrenalin ve Nordrenalin'in etkileri;**

Noradrenalin ve adrenalin, noradrenarjik sinir boşalımının çağrıştırmaya ek olarak kas ve iskelet kasında glikojenoliz, plazma laktat düzeyinde artma ve metabolik hızın uyarılmasını da kapsayan metabolik etkiler gösterirler. Adrenalin ve noradrenalin'in etkileri  $\alpha$  ve  $\beta$  adrenerjik reseptörler ile oluşturulur.<sup>2,5,59,98</sup>

Noradrenalin ve adrenalin , yalıtılmış kalbin kasılma gücünü ve hızını artırır. Bu yanıtlara  $\beta$  reseptörler aracılık eder. Katekolaminler miyokard'ın uyarılabilirliğini de artırır, ekstra sistoller'e ve bazen daha ciddi kalp aritmitlerine neden olur. Noradrenalin  $\alpha$  reseptörler ile birçok oranda vazokonstrüksiyon yaparken adrenalin  $\beta$  reseptörleriyle, iskelet kası ve karaciğer kan damarlarında genişleme yapar. Bu genelde diğer bölgelerde adrenalin ile oluşturulan vazokontraksiyona baskın gelir ve total periferik düşer. Normal insan ve hayvanlara yavaş bir şekilde noradrenalin verildiğinde sistolik ve diastolik kan basıncı artar. Hipertansiyon, karotis ve aortik baroreseptörleri uyarır, bu da noradrenalin'in doğrudan kalp atımını hızlandırıcı etkisini baskılar ve refleks bradikardi oluşturur. Sonuçta kalp

debisi düşer. Adrenalin geniş bir nabız basıncına neden olur, ancak baroreseptör uyarımı, kalbe hormonun doğrudan etkisini örtmede yetersiz kaldığından, kalp hızı ve debisi artar. <sup>5,8,23,97</sup>

Katekolaminler uyanıklılığı artırır. Adrenalin ve noradrenalin etkisi bunda eşittir. Ancak insanda adrenalin genelde daha fazla endişe ve korku uyandırır. <sup>2,3,10,15,26</sup>

Katekolaminler, kan glukozunu etkileyen birçok farklı etkinliklere sahiptir. Adrenalin ve noradrenalin glikojenolize neden olur. Bu etkiyi, döngüsel AMP'yi artırarak fosforilazı etkinleştiren  $\beta$  – adrenerjik reseptörler ve hücre içi  $Ca^{+2}$ u arttıran  $\alpha$  – adrenerjik reseptörler yapar. Ek olarak, katekolaminler,  $\beta$  – adrenerjik düzenekler ile insulin ve glukagon salgılanmasını artırırken, adrenerjik mekanizmalarla, bu hormonların salgılanmasını baskılar. <sup>2,18,58</sup>

Adrenalin ve noradrenalin ayrıca metabolik hızda karaciğer'den bağımsız güçlü bir artış ile kan laktat derişimindeki artışla aynı anda gelişen hepatektomi ile ortadan kalkan daha küçük ve gecikmiş bir artış yapar. Bu kalorijenik etki tiroit ve böbreküstü korteksi yokluğunda görülmez. Dopamin –  $\beta$ - hidrosilaz genlerinin devre dışı bırakılmış olması nedeniyle noradrenalin ve adrenalin üretemeyen fareler soğuga karşı

dayanıksızdır , ancak bunlarda metabolik hız artmıştır ve bunun nedeni bilinmemektedir. <sup>2,98</sup>

Böbreküstü bezi medulla tümörlerinin (feokromositoma ) çoğu noradrenalin salgılar. Burada nöbet halinde veya sürekli hipertansiyon en belirgin bulgudur. Adrenalin salgılayan feokromositoma'lar daha az hipertansiyona neden olurlar, daha çok nöbet halinde hiperglisemi, glikozüri ve diğer metabolik etkileri yaparlar. <sup>10,43,64</sup>

### **Dopamin'in Etkileri:**

Dışarıda verilen dopamin olasılıkla özgün bir dopaminerjik reseptöre etki ederek renal vazodilatasyon yapar. Ayrıca mezenterde de vazodilatasyon oluşur. Kalpte  $\beta_1$  – adrenerjik reseptörler üzerindeki etkisi nedeniyle , artı inotropik etkiye sahiptir. İlimli dozlardaki dopamin'in belirgin etkisi sistolik basınçtaki artıştır. Diastolik basınç ise değişmez. Bu etkileri nedeniyle dopamin travmatik ve kardiyojenik şok tedavisinde yararlıdır. <sup>2,5,28,59,98</sup>

Dopamin böbreküstü bezi korteksinde yapılır ve idrarda önemli miktarlarda bulunur. Natriureze neden olur ve bu etkisini  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  ATPaz'ı baskılayarak gösterir. <sup>2,3,5,6,8</sup>

## **Böbreküstü Medulla'sı Salgısının Düzenlenmesi, Nöral denetim;**

Bazı ilaçlar medulla'ya doğrudan etki ederken fizyolojik uyarılar, sinir sistemi yoluyla medulla salgılanmasını etkiler. Katekolamin salgılanması bazal durumlarda düşüktür, adrenalin ve daha az olarak da noradrenalin uykuda azalır. <sup>11,98</sup>

Böbreküstü medulla salgısının artması " Sempatoadrenal sistemin acil işlevi " denilen koşullarda ortaya çıkan sempatik boşalımın parçasıdır. <sup>28</sup>

Dolaşımdaki katekolaminlerin metabolik etkileri bazı koşullarda önemlidir. Soğuğa etkin kalan hayvanlarda katekolaminlerin kalorijenik etkisi buna örnek verilebilir. Böbreküstü bezi denerve edilen denekler soğuğa etkin bırakıldıklarında normallere karşın daha çok titrerler. Hipoglisemi de katekolamin salgısı için güçlü bir uyarandır. <sup>8,1,11,28,</sup>

## **Seçici Salgilama**

Böbreküstü bezi medulla salgısı arttığında, bez salgısında noradrenalin'in adrenalin'e oranı genelde değişmez. Bununla birlikte asfiksi ve hipoksi bu oranı arttırır.

Noradrenalin salgısı, kişinin daha önceden deneyimi bulunduğu duygusal bunalımlarla artırılır, ancak adrenalin salgısı, kişinin beklemediği bir bunalımla karşılaşması halinde artar.<sup>8,2,3,15,30</sup>

## 5. SİNİR BÜYÜME FAKTÖRLERİ

### a.FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ (FGF)

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) birçok dokuda etkin olup hücrel çoğalma ve farklılaşmayı aktive eden bir uyarıcı ailesidir. [ MayY.Zhao,H.Zhau X. 2002,sep: 122(6)586-99 ]. İlk kez mezenşimal hücreler için mitojen olarak bulunmuştur. <sup>118</sup>

Fibroblast büyüme faktörleri (FGF) polipeptit büyüme faktörlerinin büyük bir grubunu oluştururlar. Fibroblast Büyüme Faktörleri (FGF) birçok organizmada (hemodotlardan insanlara kadar ) bulunmaktadır. <sup>115</sup>

Fibroblast büyüme faktör (FGF) ailesinin, en az 9-22 adet yapısal ve biyolojik aktiviteleri açısından benzerlik gösteren, 17-34 kDa aralığında molekül ağırlığına sahip olan üyeleri vardır. Ancak Drosophila'larda FGF'nin molekül ağırlığı 84kDa 'dur.<sup>116,117</sup> Omurgalılarda gen yapısı ve aminoasit sırası bakımından FGF yüksek oranda korunmuşlardır. FGF'leri çeşitli mezoderm ve nörektoderm kökenli hücreler(fibroblastlar, osteoblastlar, düzkas hücreleri,endotel hücreler,

kondrositler, melonositler gibi) için kuvvetli mitojenik etkileri, nörotropik özellikleri ve heparin bağlanma yetileriyle özelleşmişlerdir.<sup>120</sup>

Fibroblast büyüme faktörleri'nin en çok bilinen iki tipi vardır. Bunlar farklı izoelektrik noktalara (pL) sahiptirler. Asidik FGF'nin izoelektrik noktası 4.5 - 6, bazik FGF'nin ise 9.6-9.8'dir. Bu iki büyüme faktörü %55 sıra eşdeşliğine sahiptir.<sup>120</sup>

aFGF ve bFGF 'nin birinci derece ürünleri 155 amino asit'lik 18 kDa ağırlığında olup; yüksek oranda birbirine benzerler. Her iki şekil benzer fizyolojik etkiler içerir ve aynı reseptör üzerinden etkileşirler. Eşdeş özellikleri mezodermal kökenli hücreleri uyarmaları ve aktivitelerinin hücre dışı matriksle yakından ilişkili olmasıdır. Ancak, heparin olmadığında aFGF,bFGF'den 30-100 kez daha az etkindir. FGF'ler yaralanan dokuların iyileşmesini aktive ederler. FGF hücre çoğalması döngüsünde G1 fazının kışalmasını uyarır. Bölünme zamanı 72 saatten 18 saate düşer. (Clymer MA.Schwaber MK.Davidson J.M,1996 Mor:lob(3 Pt 1) : 280-5). bFGF, hedeflenen hücrelerde proteaz üretimini artırarak matriksin yeniden şekillenmesini hızlandırabilir. FGF'ye karşı antikor uygulamasıyla granülasyon dokusunun oluşumunda artış olur.<sup>119</sup>

bFGF 1974 yılında karakterize edilmiştir. (Delrieu,I.FEBS Letters 468, 6-10 (2000) ) Çeşitli uzunluklarda insan bFGF vardır;

dokulardan ilk izole edilen baskın formu 146 aminoasit dizisi (Pro<sub>1</sub>-Ala-Leu.....Ser<sub>146</sub>) içeren ve N (azot)ucundan en az 11 aminoasit dizisi (Gly-Thr-Met-Ala<sub>1</sub>-Ala<sub>2</sub>-Gly<sub>3</sub>-ser<sub>4</sub>-Ile<sub>5</sub>-Thr<sub>6</sub>-Thr<sub>7</sub>-Leu<sub>8</sub>) kadar uzatılabilen şeklidir.

120

Genom taraması ile bir çok Fgf geni bulunmuştur. İnsanda 22 Fgf geni tanımlanmıştır. bFGF'yi kodlayan, Fgf 2 geni insanlarda; 4.kromozom, q26-q27 bandı üzerinde yer almaktadır. (Ornitz,D.M., Itoh, N. Fibroblast growth factors-2, IJBCB, 32, 115-120 (2000) ).<sup>119, 121</sup>

bFGF'nin yapısı; 4nm çapında hidrofobik dizilerin iç kısmında ve çok sayıda yüklü dizilerin ise yüzeyde yer aldığı küresel bir proteindir. bFGF,  $\beta$ -bükülmeleri ile birbirine bağlı 12 antiparalel  $\beta$ -yaprak şeritlerinden oluşmaktadır.<sup>115,120</sup>

bFGF salınımı hala biyoloji alanında yanıt bekleyen bir sorudur. bFGF klasik bir işaret sırasına sahip değildir ve bu nedenle işaret iletim yolu ile salınmaz. Hücrelerden bFGF'nin salınımı ile ilgili görüş ise bFGF'nin hücre ölümü, yaralanma ve kimyasal yaralanma gibi edilge düzenekler sonucu salındığı görüşüdür. (Bikfalvi,A., Klein,S., Pintucci,G., Rifkin, D.B.Biological roles of fibroblast growth factor-2, Endocrine Rev.,18: 26-45(1997) ) Salınan bFGF ekstraselüler alanda heparan sülfat proteoglikanlarına (HSPG) bağlı olarak depolanmaktadır.<sup>119</sup>

bFGF; çok sayıda hücre, doku ve organ sistemlerinin fonksiyon ve gelişiminde etkili olan bir büyüme faktörüdür. bFGF öncelikle, fibroblastik hücreler için mitojenik bir faktör olarak tanımlanmıştır. bFGF dokuların rejenerasyonunda etkilidir. (Okada-Ban, M., Thiery,J.P., Jouanneau, J.Fibroblast growth factor-2, IJBCB, 32, 263-267(2000) ).

Endotel hücre çoğalması, göç etmesi ve yeni kan damarı oluşumunun uyarılması bFGF'nin en iyi karakterize edilen fonksiyonlarıdır.  
122,123

bFGF'nin son zamanlarda nörodejenaratif hastalıkların tedavisi (Alzheimer, Parkinson, beyin iskemisi v.s.) üzerine etkisi yoğun bir şekilde çalışılmaktadır.<sup>124</sup> bFGF; nöronlar, hipokampus, striatum, medulla spinalis, beyincik ve parasempatik gangliyonlar üzerine tropik etkiye sahiptir. Mitoz sonrası farklılaşmış nöronların yaşamını uzatır.<sup>125</sup> SSS yaralanmaları sonrasında sistemin rejenerasyonunda bFGF önemli bir rol oynamaktadır.<sup>119, 122</sup>

bFGF ve reseptörlerinin düzeyi nörodejeneratif hastalıklarda , Parkinson hastalığında, substantia nigra nöronlarında bFGF kaybı söz konusudur.

Claus ve arkadaşları tarafından in vivo bFGF uygulamasının dopaminerjik nöronları kurtardığı ve bu nedenle Parkinson hastalığının tedavisinde ümit verici olduğu bildirilmiştir.<sup>126</sup>

## **b. SİNİR BÜYÜME FAKTÖRÜ (NGF)**

1959 yılında Cohen tarafından tanımlanan bir makromoleküldür. <sup>128</sup> Duyu ve sempatik sinirlerin rejenerasyonunda ve gelişmesinde önemli işlevi olduğu gösterilmiş olup <sup>127,128</sup> , sinir kesisinden etkilenen hedef organca salgılanır. Akson yaralanmasını izleyen, aksonal tepkimeyi ve hücre ölümünü engeller.

Sinir Büyüme Faktörü (NGF), insülin gibi peptidlerin etkilerine aracılık eden, hem enzim hem reseptör işlevi gören proteinlerdir. Hücre içine bakan bölümlerinde tirozin kinaz etkinliği gösterir.<sup>78</sup> Proteinlerin tirozin amino asitlerine fosfor ekleyerek onların etkinliğini değiştirir. Reseptöre büyüme faktörünün bağlanmasıyla , reseptör proteinleri ikililer oluştururlar ve iç yüzlerindeki tirozin kinaz, ilk önce reseptörün kendisini fosforlar. Bundan sonra hücrenin hayatta kalması, farklılaşması ve gelişmesi yönünde bir dizi biyokimyasal olay başlatılır. Tek alt birimli bir G proteini olan Ras etkinleştirir, bunun ardından hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz (ERK) enzim basamakları ile bir dizi fosforlanma olayı gerçekleşir. Son aşamada transkripsiyon faktörünün fosforlanmasıyla hücre yüzeyinden DNA'ya haber iletilmiş olur (Doç.Dr.Murat Rezaki, Prof.Dr.Turgay Dalkara, Davranış Biyokimyası).

Tirozin kinaz reseptörler , sinir büyüme faktörü (NGF) ile birlikte EGF (Epidermal Büyüme Faktörü), FGF (Fibroblast Büyüme Faktörü), BDGF (Beyin Kaynaklı Büyüme Faktörü) ve insülin'i bağlamaktadır. Bunlar G proteini eşleşen reseptörlerden 2 nedenle farklıdır.

1)Membranı tek kez geçerler.

2)Sitoplazmik domainleri, proteinlerin tirozin rezidüllerini fosforile eden protein kinaz aktivitesi içerirler.<sup>129</sup>

Tirozin kinazlar için substrat olan proteinler nöral fonksiyonlarda uzun süreli değişikliklere yol açabilecek proteinler sınıfındadır. Tirozin kinazlar bu özelliklerinin dışında, ekstrasellüler bağlanma bölgesi içermektedirler. En iyi tanımlanmış etkileri, gen transkripsiyonunda değişikliklere yol açacak adaptör proteinler ve protein kinazlar ile ilgili kaskad reaksiyonlarını başlatmasıdır.<sup>129</sup>

NGF periferel efektör doku ile bunu sınırlendirilen sinirler arasında retrograd mesajcı olarak rol oynayan trofik bir proteindir. ( Ebandal et al, 1980, Karschingand Thoenen, 1983, Bart et, al, 1984, Angeletti et, al, 1984 ) Periferel dokularda, NGF kaynağının ,sinirlerin innerve ettikleri hedef dokular olduğu tahmin edilmektedir. Düz kas hücreleri, fibroblastlar, astrositler ve diğer hücreler

kültür ortamında Sinir Büyüme Faktörü (NGF) sentezlerler.<sup>130,131</sup> NGF embriyonik ve postnatal yaşamda dorsal kök gangliyon ve sempatik hücrelerin yaşaması, gelişimi ve nörotransmitter sentez düzenlenimi için gereklidir.<sup>132</sup> (A.J.Doupe, S.C.Lands, P.H.Paterson 1985, D.J.Anderson, 11, Cell 47, 1986) .

Sinir Büyüme Faktörü (NGF) reseptörü iki alt ünite içerir; bunlar düşük çekicilikli P75 ve yüksek çekicilikli Tirozin kinaz alt ünitesi TrkA'dır. TrkA Sinir Büyüme Faktörü(NGF)'nün büyüme ve yaşamının sürdürülmesinden sorumludur.<sup>37,133</sup>

TrkA'nın diğer bir önemli özelliği de, farklı hücre tiplerinde farklı hücrel yanıtlar verilmesine yol açmasıdır.<sup>37</sup>

Bizim çalışmamıza koşut yayınlarda böbreküstü bezi medullası Sinir büyüme faktörü (NGF)'nün şu özellikleri de ortaya konulmuştur:

- NGF, kromaffin hücrelerde lif büyümesini sağlamaktadır. <sup>16</sup>
- NGF'nün yapısal ve biyokimyasal olarak adrenal bez hücrelerinin bir çevresel etken yeteneği kazanmasında ya da yitirmesinde yaş bağımlı yetisi vardır. <sup>14</sup>

- NGF n6rit genişliğini uyarır. <sup>14,40</sup>
- Y6ksek NGF dozları sempatik gangliyonların oylumunu artırırken, adrenal medulla oylumunu etkilemez. <sup>16</sup>

### c. NÖROFILAMENT PROTEİN (NF)

NF'ler sinir hücre iskeleti için özelleşmiş orta boy filamentlerdir. Omurgalılarda sodyum dodesulfad poliakrilamid (SDS polyacrylamide) jelde yaklaşık 70-150-200 KD moleküler ağırlıkta, 3 heteropolimer bileşikten oluşmuştur.<sup>20,48</sup>

Lasek ve Hoffmann'ın öncülük ettiği aksonal taşınma çalışmalarında, yavaş taşınımının hareketli bir yapısı olarak NFP'ler ilk kez sıçanlarda varlığı belirlenmiştir.<sup>134</sup> Son yıllardaki araştırmalarda bu görüşü desteklemektedir .

Nöron oylumu ve şeklinin düzenlenmesi ve boş alanların doldurulmasında NFP'ler diğer hücre iskelet proteinleri ile birlikte işlev yaparlar (Swallow and Griffiths,1977; Sims and Redding 1980). Uzun aksonal işlevleri olan büyük nöronları oldukça fazla NFP'leri içermelerine karşın, çok küçük nöronlarda NFP'leri son derece az sayıda ya da hiç bulunmamaktadır.<sup>137,48</sup> NFP'lerin çoğunun aksona özgü olduğu ve miyelinli aksonlarda daha çok sayıda bulunduğu bildirilmektedir . Akson çapı ve uzunluğunun NFP'ler tarafından belirlendiği de son bulgular arasındadır.<sup>137</sup>

NFP'lerce son derece asimetrik aksonların oluşturulması ile yüksek omurgalılarda daha karmaşık bir nöronal dolaşımın sağlandığı da öne sürülmektedir .

Shaw ve Debus <sup>135</sup> memeli ve kanatlılarda NFP'lerin benzer özellik taşıdığını vurguladıkları çalışmalarda, memeli ve kanatlılardaki nörofilament tripleks proteinlerini büyük , orta , küçük boy olarak sınıflandırmışlardır (Tablo 1).

**Tablo 1:** Çeşitli türlere ait nörofilament proteinlerin SDS poliakrilamid jeldeki molekül ağırlıkları

	Küçük boy	Orta boy	Büyük boy
Sıçan	68	145	200
Fare	68	145	200
Kobay	68	152	219
Tavşan	68	152	203

Kedi	68	152	217
Sığır	72	168	212
Domuz	72	173	217
Kaz	72	160	190
Civciv	72	166	182

Hirokawa ve arkadaşları memelilerin omurilik ve periferik sinir aksonlarında nörofilament tripleks proteinlerin üç boyutlu bir kafes şeklinde olduklarını, bu üç boyutlu kafeste 73KD ve 145KD NFP'lerin ayrıca proteinler arası çapraz bağları da sağladığını ileri sürmüşlerdir.<sup>20,134</sup>

Tüm diğer orta boy filamentlerde olduğu gibi NFP'lerinde 40KD'luk çekirdek öz bölgeyi içerdikleri ve bu bölgenin çift sarmal yapı göstermesi ile diğerlerinden ayrıldığı belirtilmektedir.<sup>48,134</sup>

Çekirdek bölgenin bir tarafına 10KD moleküler ağırlıkta terminal bir bölge, diğer yanına 15-75 KD arasında değişen bir -COOH

terminalinin bağlanmakta olduğu ve NFP'lerin büyüklüğünün bunlardaki –COOH terminalinin uzunluğu ile doğru orantılı olduğu kaydedilmektedir .

Nörofilament proteinler, ara filamanlar ailesindedirler. Yapısal olarak baktığımızda 3 parçadan oluşurlar. Bunlar; NF-H, NF-L, NF-M'dir.<sup>20,135</sup> NF-H 200 dalton, NF-L 170 dalton ve NF-M2'de 150 dalton ağırlığındadır. Bütün bunlar değişik genlerce kodlanmaktadır. NF genleri dokuya özel gelişim sırasında ekspresyonlara sahiptir. Embriyogenezin ilk evrelerinde nöronal fenotip gösterirler. NF-L ve NF-m parçacıkları gelişen fare beyinlerinde doğumun 11.gününde mRNA'ları izlenebilir. NF-H mRNA'sı yalnızca postnatal dönemde belirlenebiliyor. (Julien,J,\_p, Ramachandran, K, and grosveld, F. (1986) Mol .Brain Res.1, 243-250.).

### III. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 1.Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi (GÜDAM)' nden sağlanan yenidoğan, genç, ergin ve yaşlı yaş gruplarının her birinden üçer adet olarak Wistar Albino cinsi 20 adet sıçan ve fetal gelişimin incelenmesi ereğiyle de 16 ve 19 günlük embriyolar kullanıldı.

Deneklerin bakıldığı odalarda ısı 21-23°C ve ışık / zaman ayarı 14 / 10 saat olarak belirlendi. Sıçanlar intraperitoneal ketamin (44 mg / kg ) ve xylazine (5 mg / kg ) enjeksiyonuyla uyutularak ötenazi gerçekleştirildi. Ötenazi sonrası deneklerin karın bölgeleri açılarak böbreküstü bezleri alındı. Doğum öncesi deney grubu için alınan embriyonlar ise tüm olarak incelendi.

Embriyolojik dönemlerde yapılacak olan çalışmalar için 4 adet dişi ve 4 adet erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 4 ayrı kafese her birinde bir erkek ve bir dişi olacak şekilde yerleştirildi ve bu şekilde döllenmenin gerçekleşmesi beklendi. Dişi sıçanlarda vajinal plağın izlendiği an gebeliğin oluştuğu kabul edildi. Vajinal plağın görüldüğü ilk gün embriyolojik gelişimin

0. günü olarak belirlendi. Gebelik sonrası erkek sıçan kafesten uzaklaştırıldı ve dişi sıçanların günlük bakımı 16 ve 19. güne kadar sürdürüldü. İstenilen güne ulaşıldığında ise aynı şekilde gebe sıçanlara da fetal dozda intraperitoneal olarak anestezi uygulanıp servikal dislokasyon uygulanarak ötanazi sağlandı, ardından seri şekilde gebelik ürünleri (embriyolar) çıkarılarak %10'luk nötral formalinde 72 saat tespit edildi.

## **2.İmmünohistokimyasal Yöntem**

Tespit edilen dokular alışılagelmiş ışık mikroskop izleme yönteminden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan bloklardan polizimli lamlara, 4 - 5 µm kalınlığında kesitler deparafizine edilmek ereğiyle 15' X 2 ksilol'e etkin bırakıldılar. Daha sonra 10'ar dakika olarak sırasıyla %100, %96 ve %80'lik alkol serilerinden geçirildiler.

Dehidrate edilen dokular alkolden arındırılmak için 5' X 2 kez distile sudan geçirildikten sonra, doku içerisinde formaldehit'in kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak ereğiyle 1µ citrate tamponu ( Lab Vision,USA ) ile mikrodalga fırında retriiver işlemi gerçekleştirildi.

Daha sonra, 15 dakika % 3' lük hidrojen peroksit ( TA-015-HP, Lab Vision, USA ) ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz

aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS ( Phosphate buffer saline ) ( Lab Vision ) ( pH 7.4 ) ile camlar yıkandı.

Yıkanan camlara 5 dakika Ultra V block (TA – 015 – UB, TA – 125 – UB Lab Vision, USA, 85 – 9043 – Zymed, USA ) uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi. Bu amaçla kesitler NGF primer antikor [ Santa Cruz NGF – rabbit primer antikor (Cat; SC – 548 ) ] ve FGF primer antikor [ Santa Cruz – FGF – 2 (147) primer antikor ( Cat; SC – 79 ) ] ile oda ısısında 1 gece +4°C 'da, NF pimer antikor [ Lab Vision NF – AB-1 (2F11) primer antikor (Cat; MS – 359 – S1] ile 60 dakika oda ısısında bekletildiler.

Daha sonra PBS ile yıkanan camlara 20 dakika biyotinli sekonder antikor ( TR – 015 – BN, Lab Vision, USA ) , ( TS – 125 – HR, Lab Vision, USA ) , ( 85 – 9043, Zymed, USA ) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. PBS ile yıkanan camlar 20 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine ( TS – 015 – HR, Lab Vision, USA ) , ( TS – 125 – HR, Lab Vision, USA ) , ( 85 – 9043, Zymed, USA ) etkin bırakıldı, böylece camlarda enzimin biyotine bağlanması sağlandı.

Son olarak ortama kromojen AEC ( 3 – amino – 9 – ethylcarbazde ) ( TA – 015 – HAS, TA – 015 – HAC, Lab Vision, USA ) , (

Cat: 00 – 2007, Lot: 50481594, Zymed, USA ) eklenerek yaklaşık 10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir ürünün ortaya çıkması sağlandı.

Zemin boyası olarak Mayer'in Hemotoksilen'i ( 0B52Y092, Merck ) kullanıldı. Negatif boyama primer antikor aşamasında yapıldı. Bu şekilde boyanan camlar ultra - mount ile kapatılıp, bilgisayar donanımlı foto - ışık mikroskopta ( DCM 4000, Lacia, Germany ) değerlendirildi.

#### IV. BULGULAR

Embriyonik 16.günde FGF(Fibroblast Growth Factor) immün boyaması yapılan grupta kromaffin ve sempatik gangliyon hücrelerinin aynı düzeyde tutulum gösterdikleri belirgin olarak ayırt ediliyordu. Sempatik gangliyon hücrelerinde çekirdek ökromatik boyanırken, çekirdekçik belirgin olarak gözlemlendi. Tutulum sitoplazmikti. Kromaffin hücrelerinde zar tutulum göstermezken, sempatik gangliyon hücrelerinde belirgin zar tutulumu da dikkat çekiciydi (Resim1 A,B). NGF (Nerve Growth Factor) immün boyaması yapılan grupta ise, kromaffin hücrelerinde yoğun tutulum izlenirken, sempatik gangliyon hücre tutulumunun daha az olduğu ayırt ediliyordu (Resim2 A,B). NF(Nörofilament Protein) immün boyaması yapılan grupta ise sempatik gangliyon hücrelerinin minimal düzeyde ince tanecikli tutulum gösterdiği izlenirken, kromaffin hücrelerin tutulum göstermediği görülüyordu (Resim3).

Embriyonik 19.günde FGF tutulumunun yine sempatik gangliyon ve kromaffin hücrelerde sitoplazmik tutulumu oldukça yaygındı (Resim4). NGF tutulumu ise kromaffin hücre ve sempatik gangliyon hücrelerinde sitoplazmik ve aynı şekilde yoğundu (Resim5 A,B). NF immünohistokimya boyaması yapılan grupta ise sempatik gangliyon ve

kromaffin hücrelerinin çok az düzeyde ince tanecikli tutulumu belirgindi (Resim6).

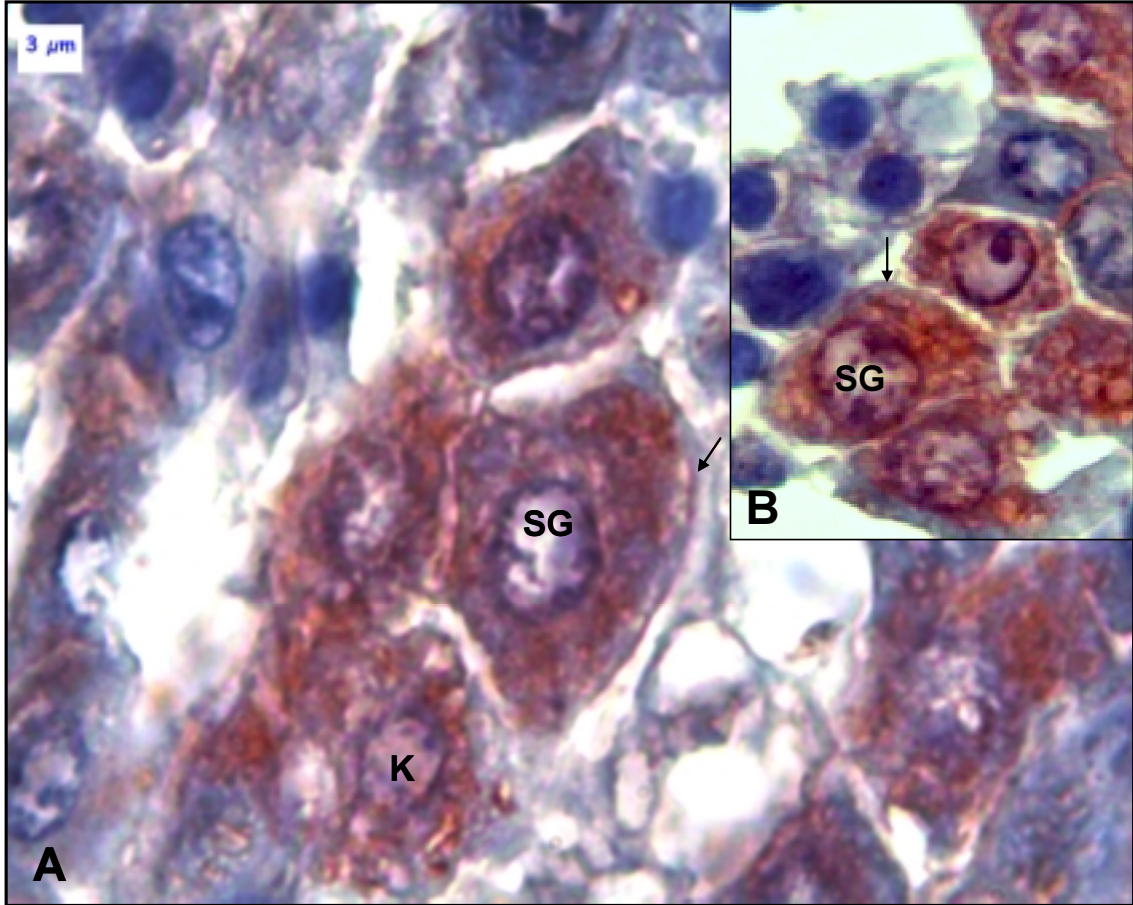
Yenidoğanda, kromaffin hücre tutulumunun her üç antikor grubunda minimal düzeyde olmasına karşın, FGF (Resim7) ve NGF(Resim8) gruplarında sempatik gangliyon hücre sitoplazmalarının son derece kuvvetli tutulum gösterdikleri ayırt edildi. NF tutulumunun ise önceki gruplara karşın artarak, orta düzeye ulaştığı saptandı. Sempatik gangliyon hücrelerinde tutulum ince tanecikli olarak gözlemlendi (Resim9).

Genç grupta, her üç antikor da kromaffin hücrelerde gözlenmezken, sempatik gangliyon hücrelerinde FGF (Resim10) ve NGF (Resim11) tutulumlarının son derece yoğun olduğu ilgiyi çekti. NF tutulumlarının ise, sempatik gangliyon hücrelerinde ince granüllü ve uzun çizgisel yapıda tutulum olduğu izleniyordu (Resim12).

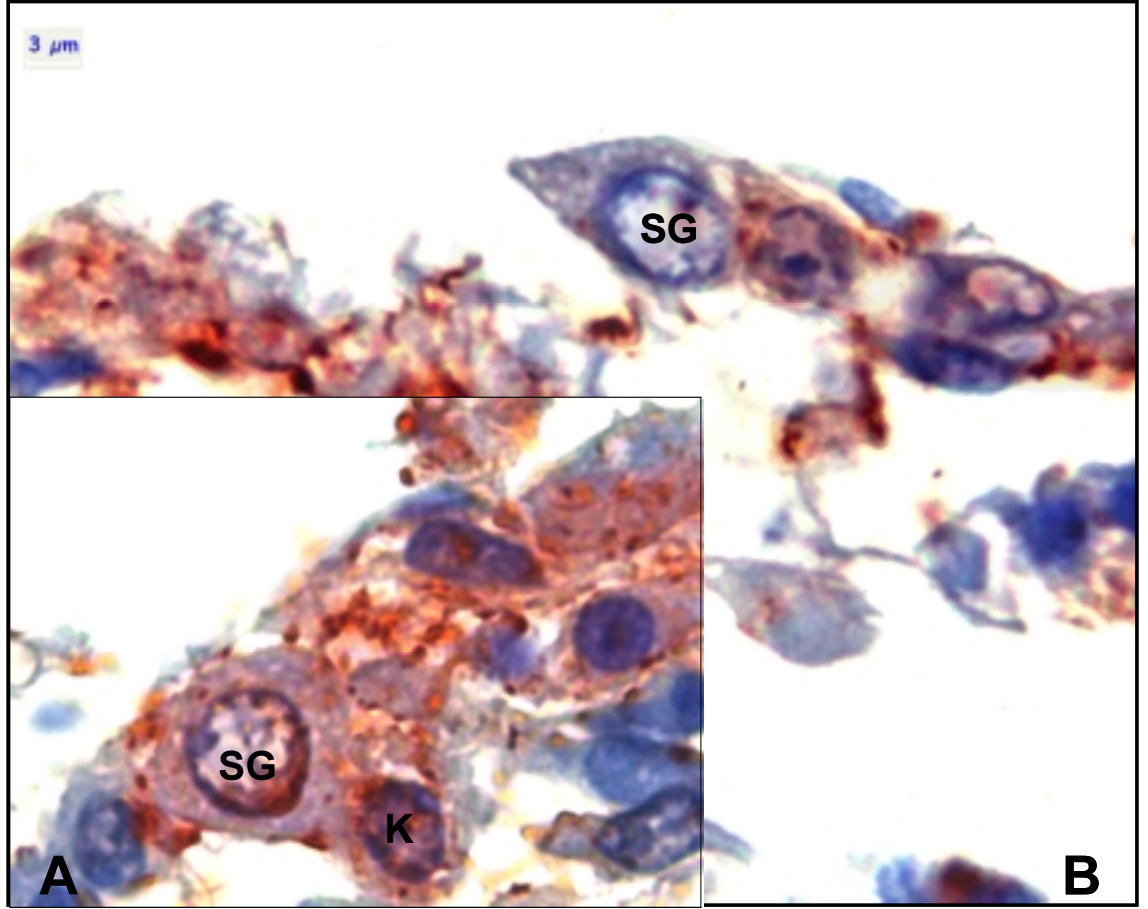
Ergin grupta ise, sempatik gangliyon hücrelerinin oldukça gelişkin olduğu, FGF tutulumunun oldukça kuvvetli olup, yer yer hücre uzantılarında da tutulumun varlığı dikkat çekti (Resim13 A,B). Yine NGF tutulumunun da sitoplazmik düzeyde ve oldukça yoğun olduğu görüldü (Resim14). FGF ve NGF immünohistokimya yapılan gruplarda kromaffin hücrelerin boyanmaması dikkat çekiciydi. NF immünohistokimya yapılan

ergin grubunda sitoplazmada yaygın tutulumu izleniyordu. Yine bu grupta medulla bağ dokusunun oldukça arttığı dikkat çekiciydi (Resim15).

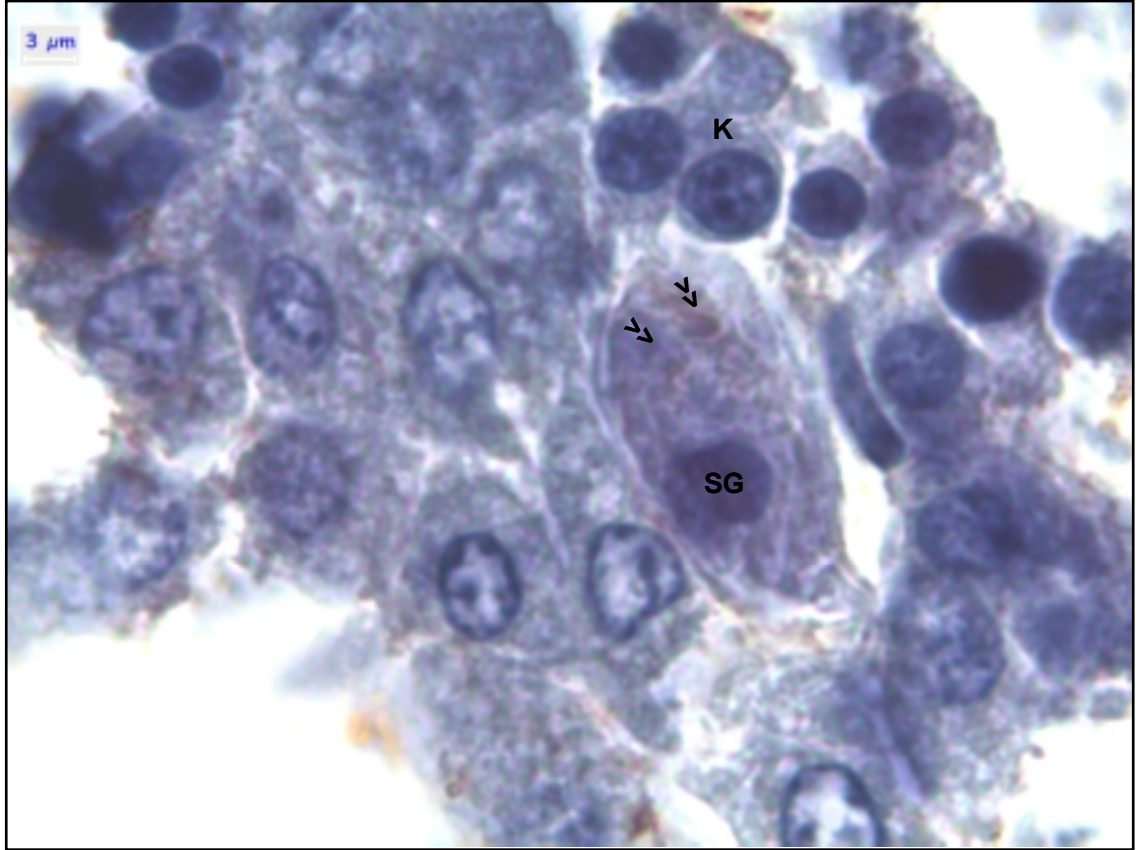
Yaşlı grupta FGF (Resim16), NGF (Resim17) ve NF (Resim18) immün boyamalarında sempatik gangliyon hücrelerinde kuvvetli tutulum izlenirken, kromaffin hücrelerde her üç antikor içinde reaktivite saptanmadı.



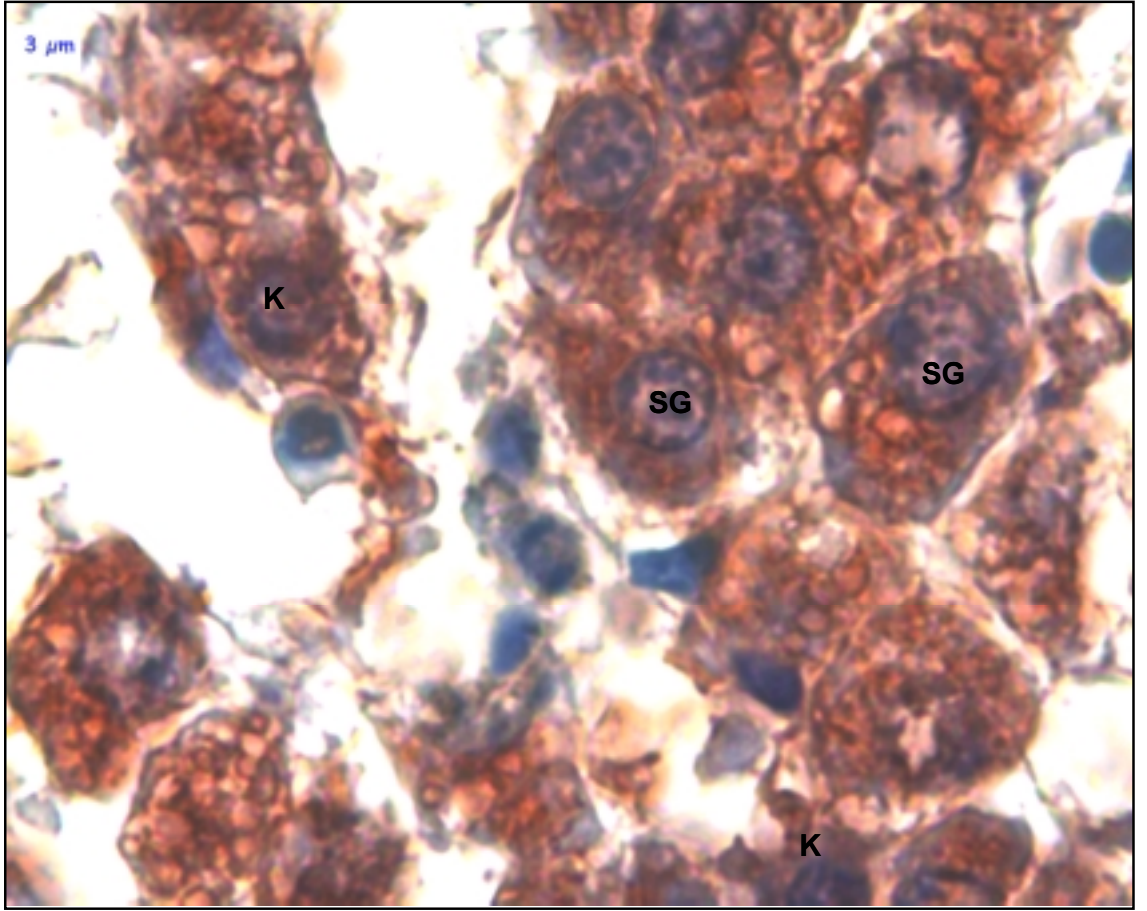
**Resim 1:** Embriyonik 16.gün FGF immünreaktivitesi; (K):Sitoplazmik tutulum gösteren Kromaffin hücreler, (SG): Sitoplazmik ve membranöz tutulum gösteren sempatik gangliyon hücreleri, (↓): Membranöz tutulum görülüyor (İmmünperoksidaz-Hematoksilen A,B X1000 ).



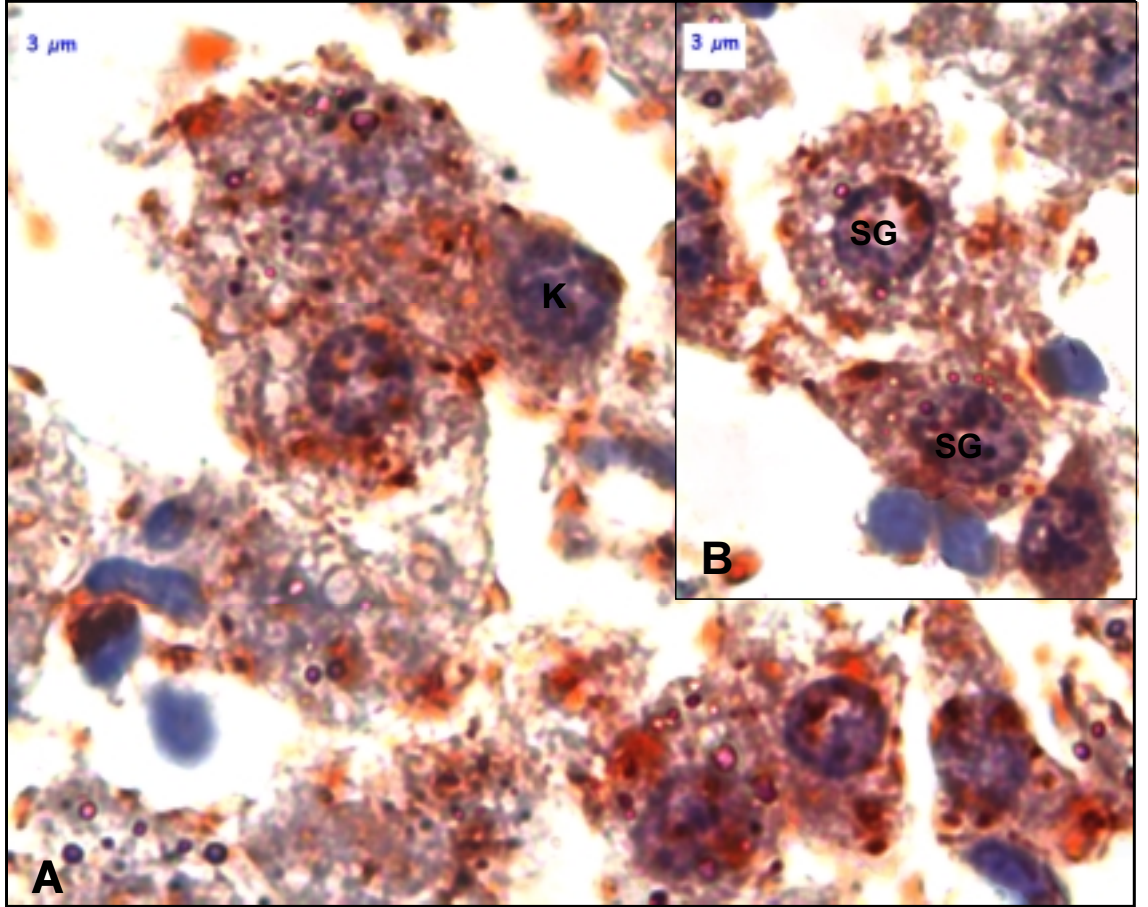
**Resim 2:** Embriyonik 16.gün NGF immünreaktivitesi; (K): Yoğun tutulum gösteren kromaffin hücre, (SG): Zayıftan ortaya değişen sempatik gangliyon hücresi (İmmünperoksidaz-Hematoksilen A,B X1000 ).



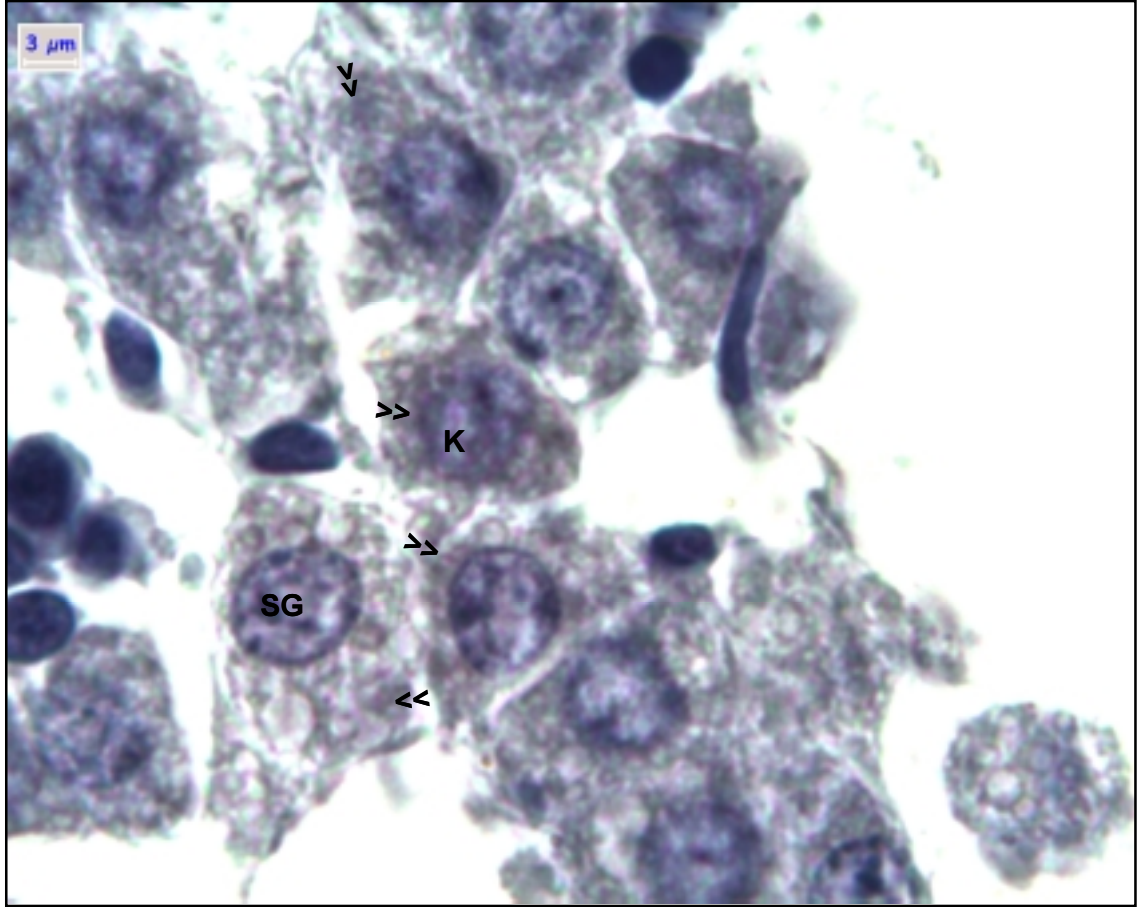
**Resim 3:** Embriyonik 16.gün NF immünreaktivitesi; (K): Negatif tutulum izlenen kromaffin hücre, (SG): Minimal tanecikli tutulum gösteren sempatik gangliyon hücresi, (»): Kromaffin hücrelerde tanecikli tutulum (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X1000 ).



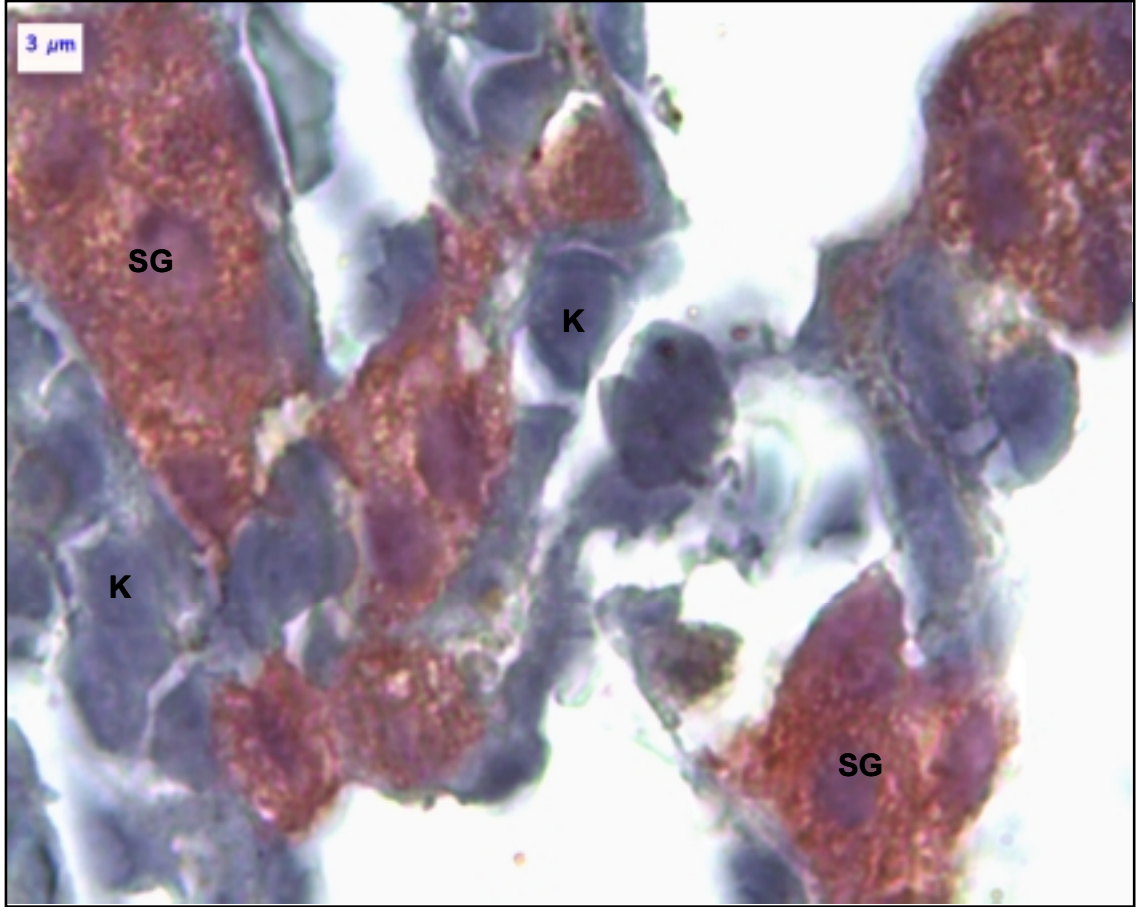
**Resim 4:** Embriyonik 19.gün FGF immünreaktivitesi; sempatik gangliyon hücreleri (SG) ve Kromaffin hücrelerindeki (K) yaygın sitoplazmik tutulum izleniyor (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X1000 ).



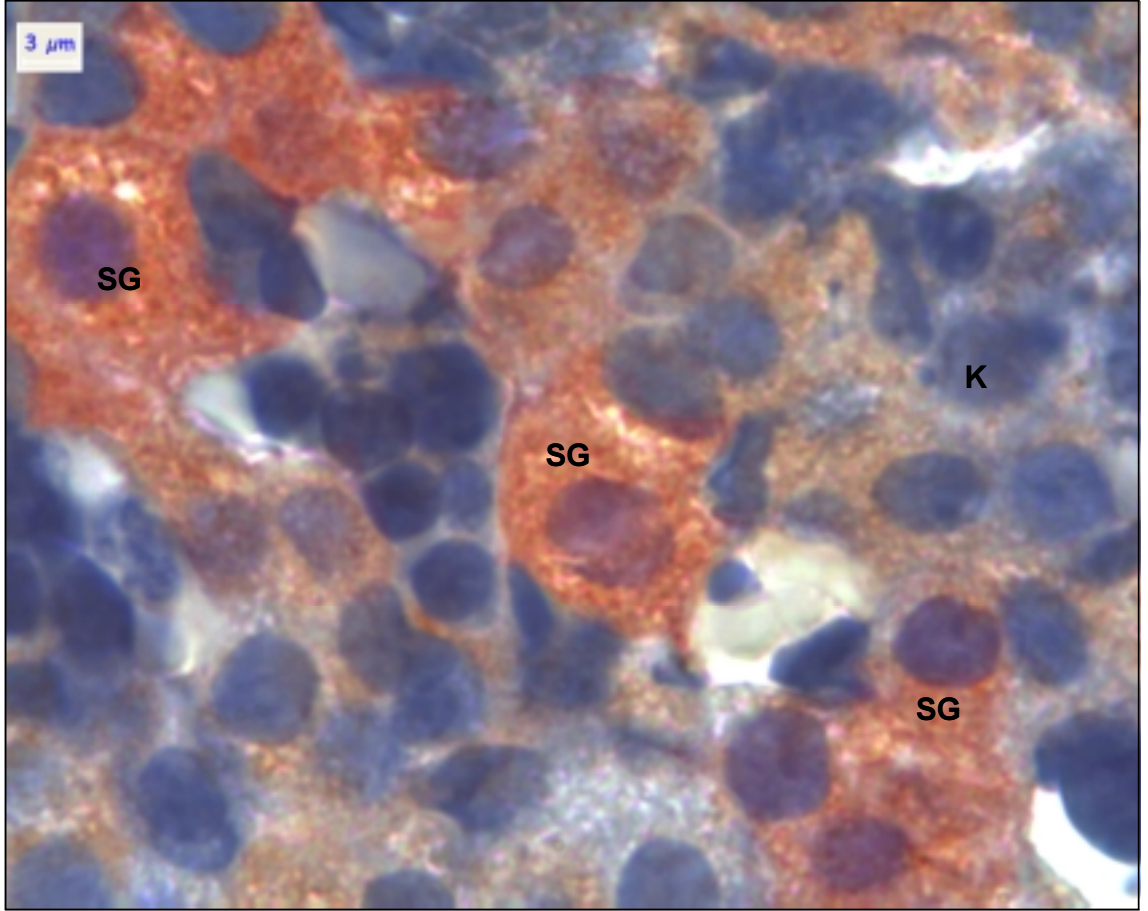
**Resim 5:** Embriyonik 19.gün NGF immünreaktivitesi; sempatik gangliyon hücreleri (SG) ve Kromaffin hücrelerindeki (K) yaygın sitoplazmik tutulum izleniyor (İmmünperoksidaz-Hematoksilen A,B X1000 ).



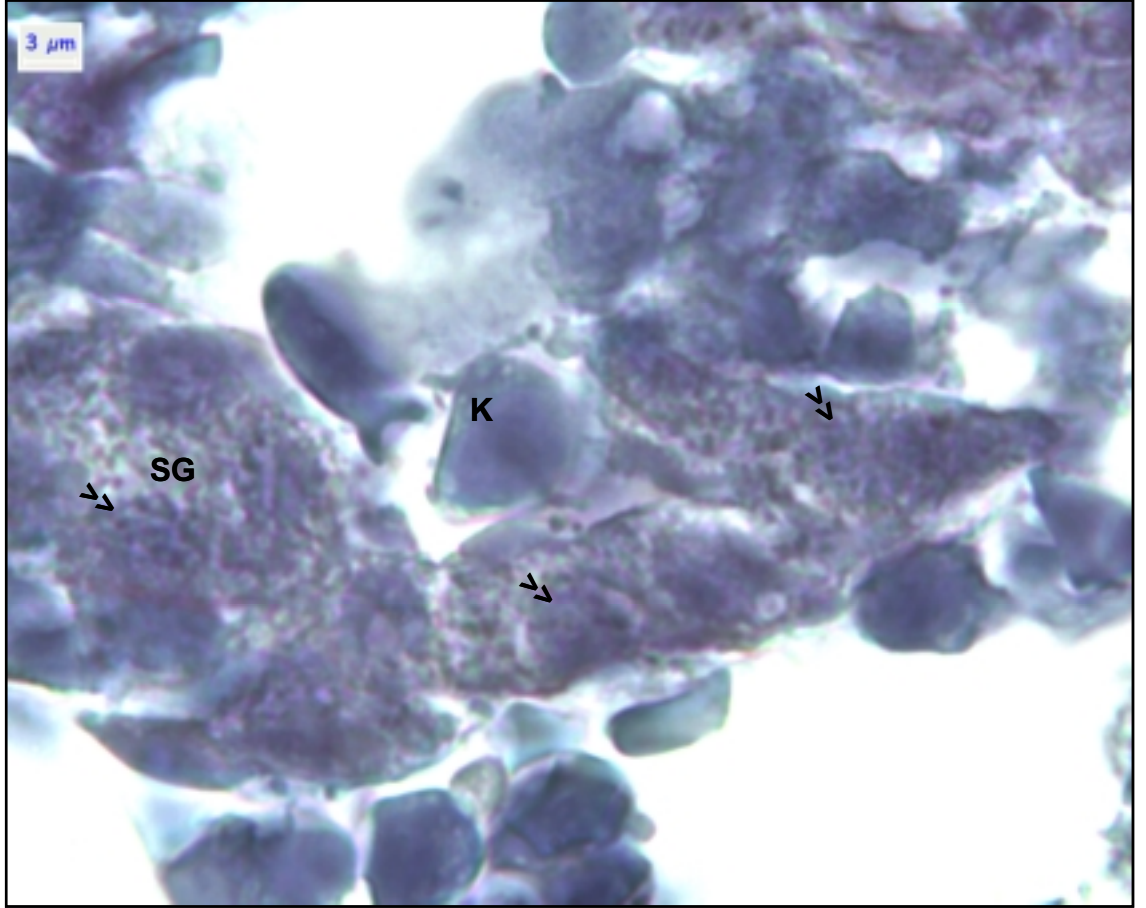
**Resim 6:** Embriyonik 19.gün NF immünreaktivitesi; sempatik gangliyon hücreleri (SG) ve kromaffin hücrelerinde (K) çok zayıf tanecikli tutulum izleniyor. (»): Kromaffin ve sempatik gangliyon hücrelerinde gözlenen tanecikli tutulum (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X1000 ).



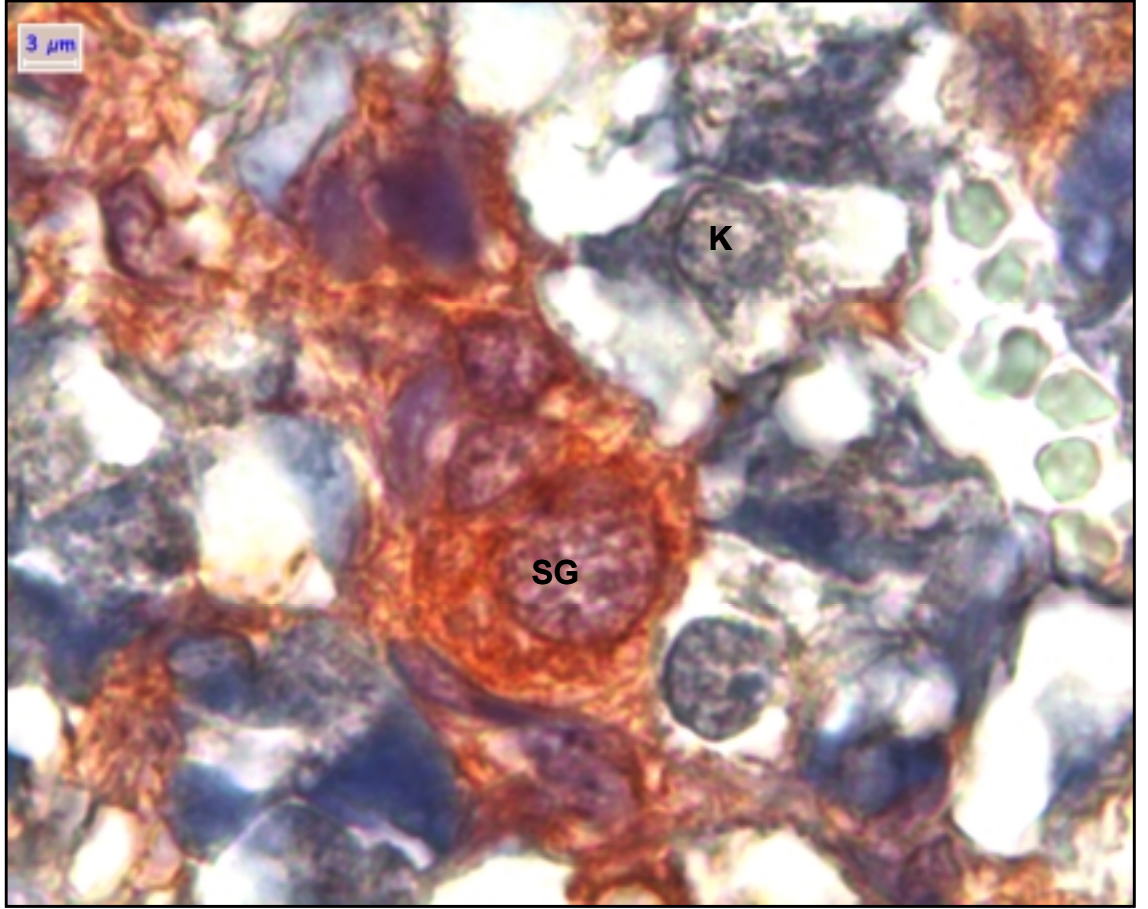
**Resim 7:** Yenidoğan FGF immünreaktivitesi; (K): Negatiften zayıf tutulum gösteren kromaffin hücre, (SG): Kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren sempatik gangliyon hücreleri izleniyor (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X1000 ).



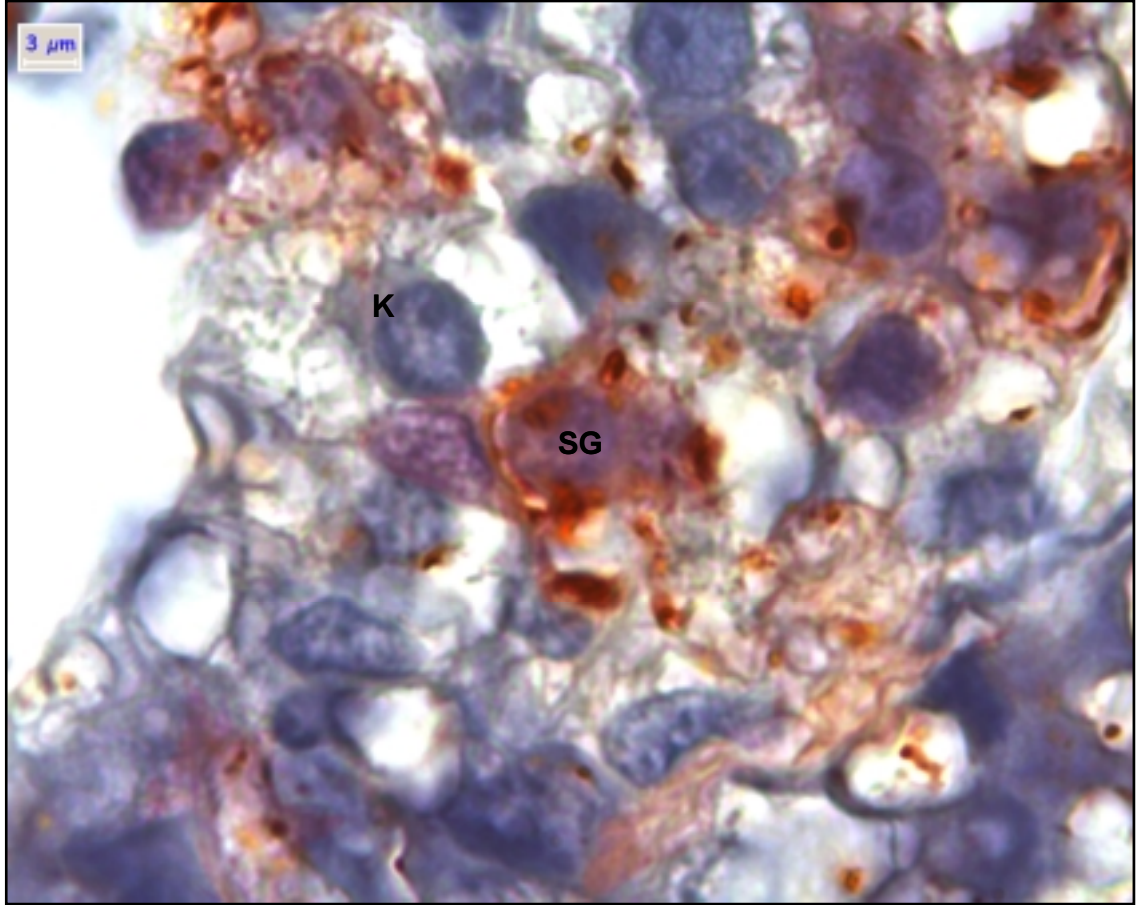
**Resim 8:** Yenidoğan NGF immünreaktivitesi; (K): Negatiften zayıfa tutulum gösteren kromaffin hücre, (SG): Kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren sempatik gangliyon hücreleri izleniyor (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X1000 ).



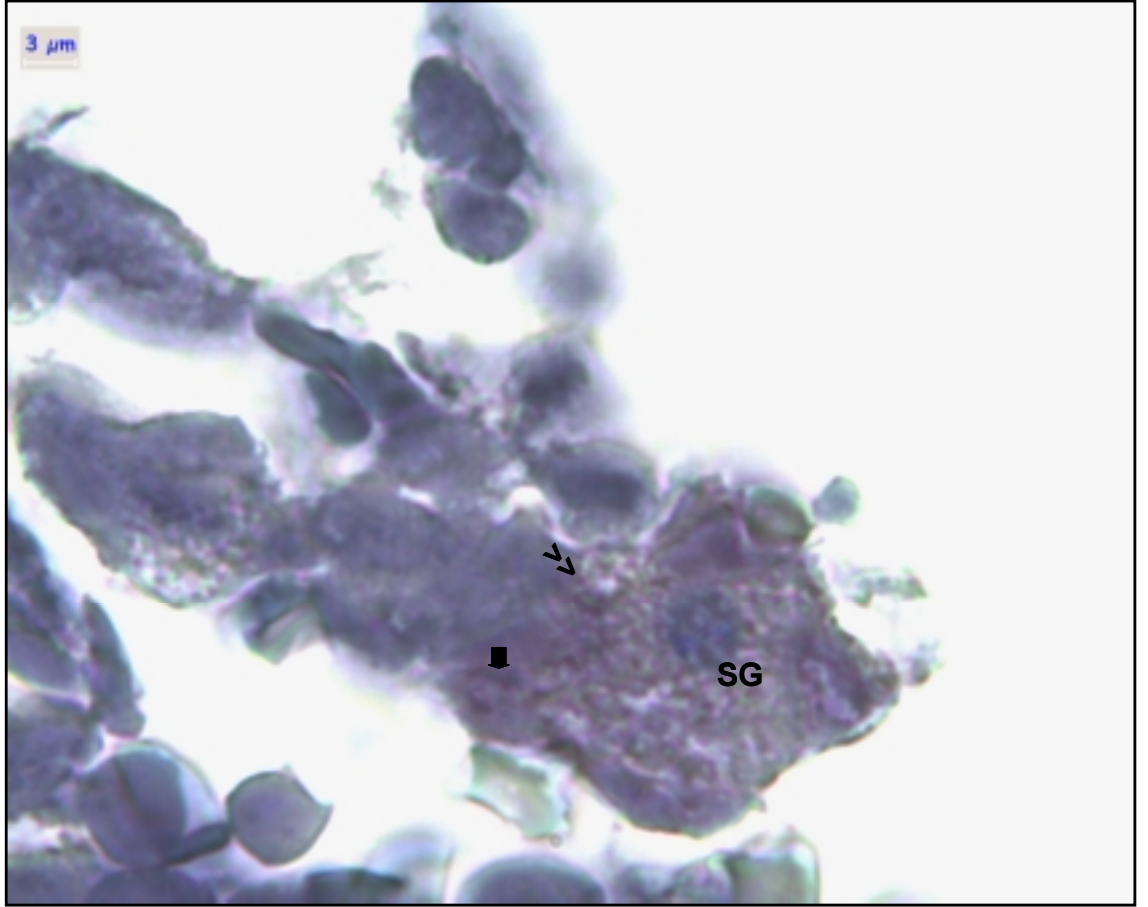
**Resim 9:** Yenidoğan NF immünreaktivitesi; (K): Negatif tutulum gösteren kromaffin hücreler, (SG): Zayıftan ortaya değişen tanecikli tutulum gösteren sempatik gangliyon hücresi, (↓): Membranöz tutulum, (»): İnce tanecikli tutulum (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X1000 ).



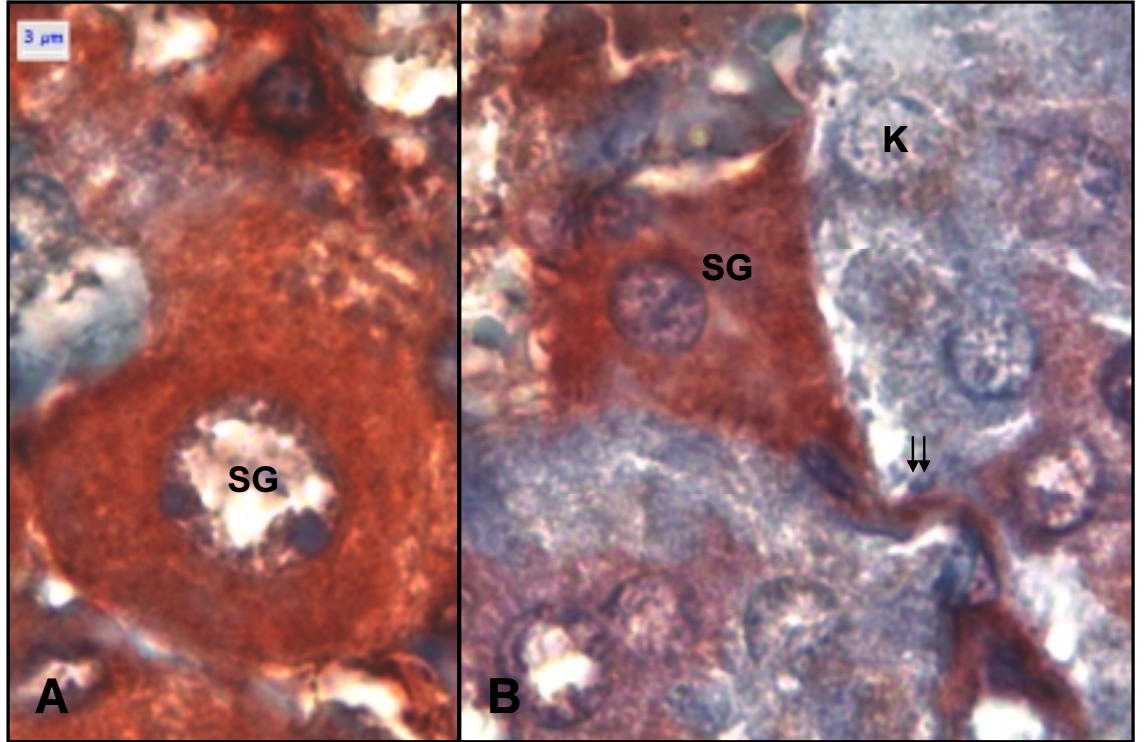
**Resim 10:** Genç FGF immünreaktivitesi; (K): Negatif tutulum gösteren kromaffin hücreler, (SG): Kuvvetli sitoplazmik tutulum saptanan sempatik gangliyon hücresi (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X1000 ).



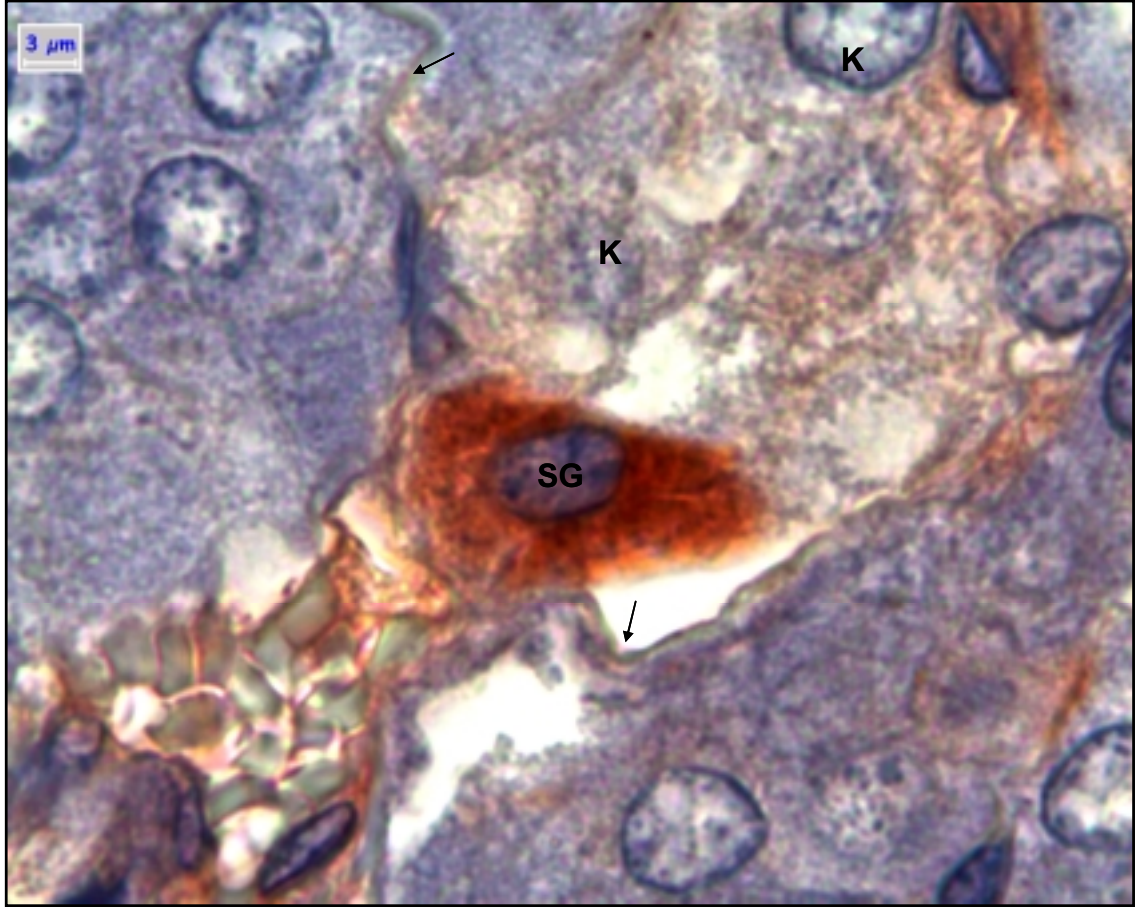
**Resim 11:** Genç NGF immünreaktivitesi; (K): Negatif tutulum gösteren kromaffin hücreler, (SG): Kuvvetli sitoplazmik tutulum saptanan sempatik gangliyon hücresi (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X1000 ).



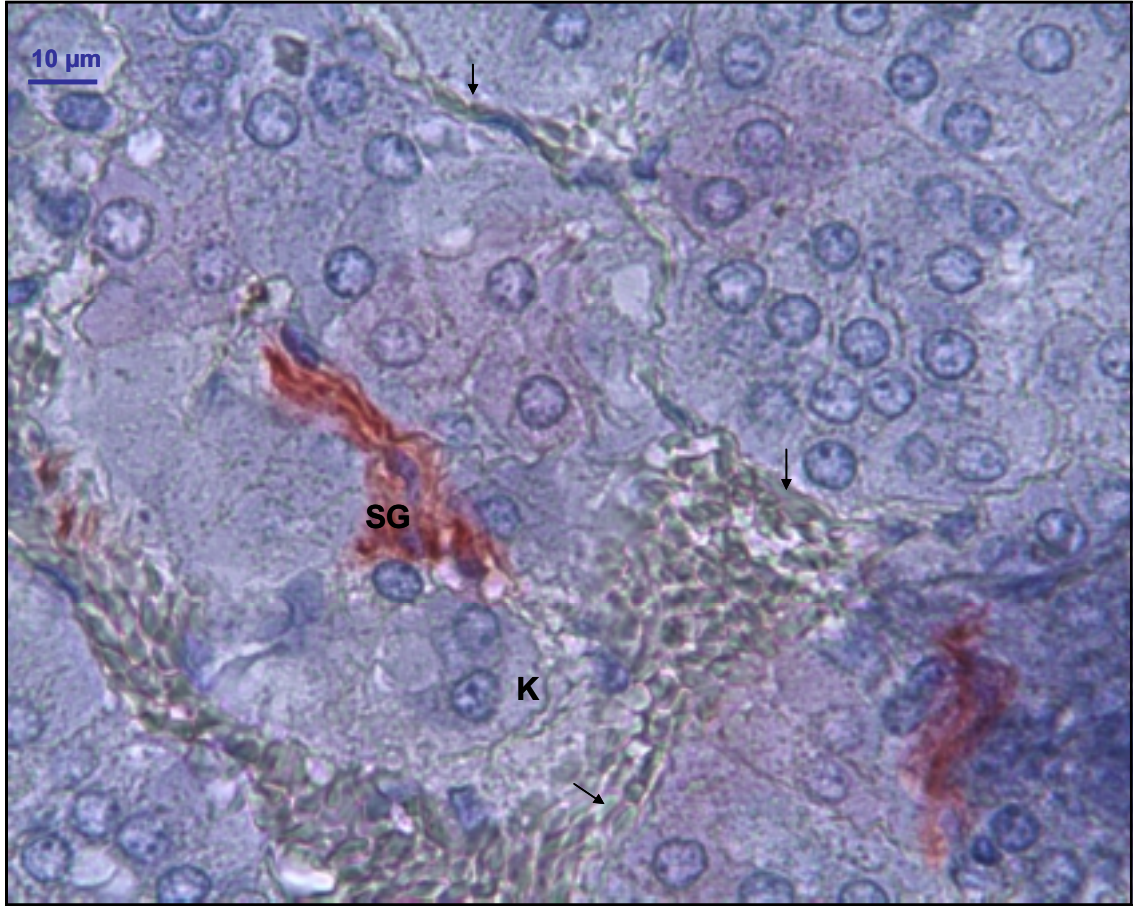
**Resim 12:** Genç NF immünreaktivitesi; sempatik gangliyon hücrelerinde (SG) tanecikli (») ve çizgisel (↓) tutulum izleniyor (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X1000).



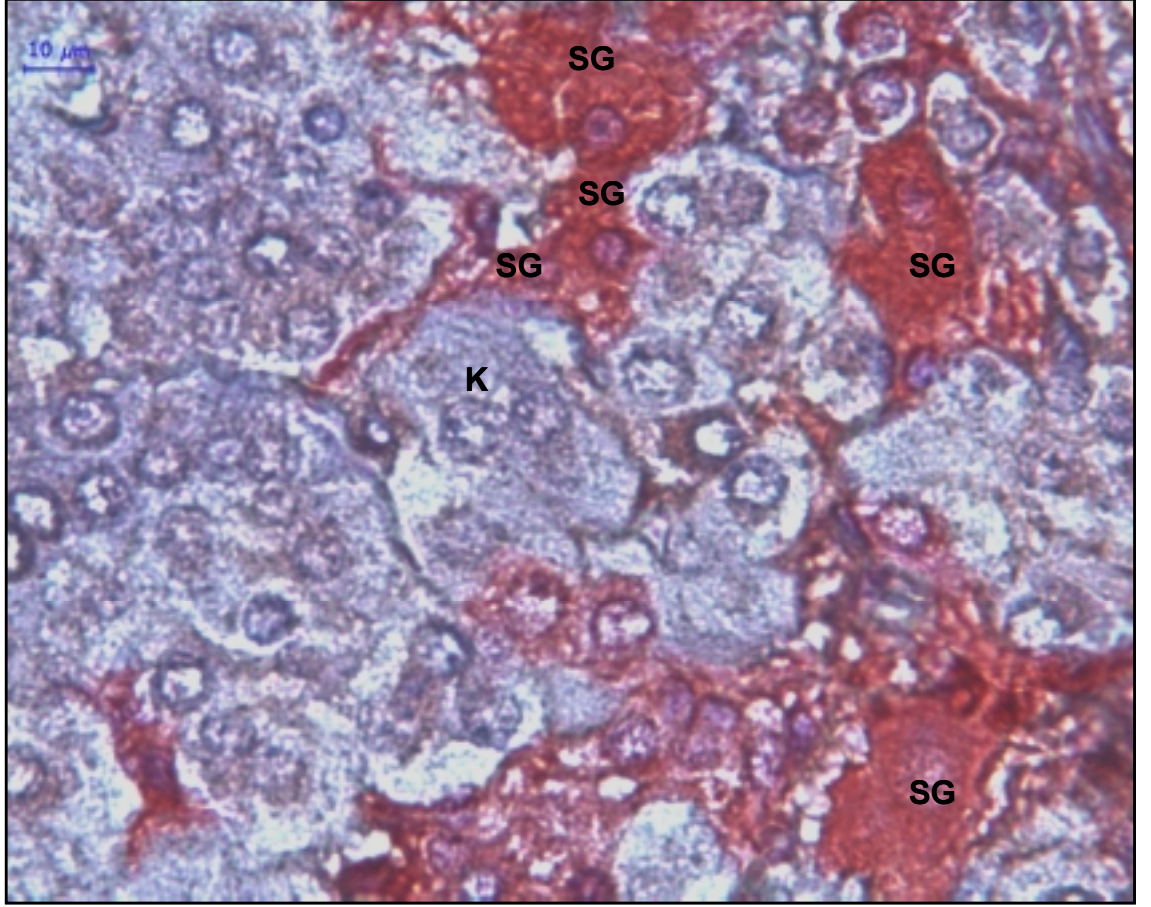
**Resim 13:** Ergin FGF immünreaktivitesi; (K): Negatif tutulum izlenen kromaffin hücreler, (SG): Kuvvetli tutulum gösteren sempatik gangliyon hücreleri, (»): Sempatik gangliyon hücre uzantılarındaki kuvvetli FGF tutulumu (İmmünperoksidaz-Hematoksilen A,BX1000 ).



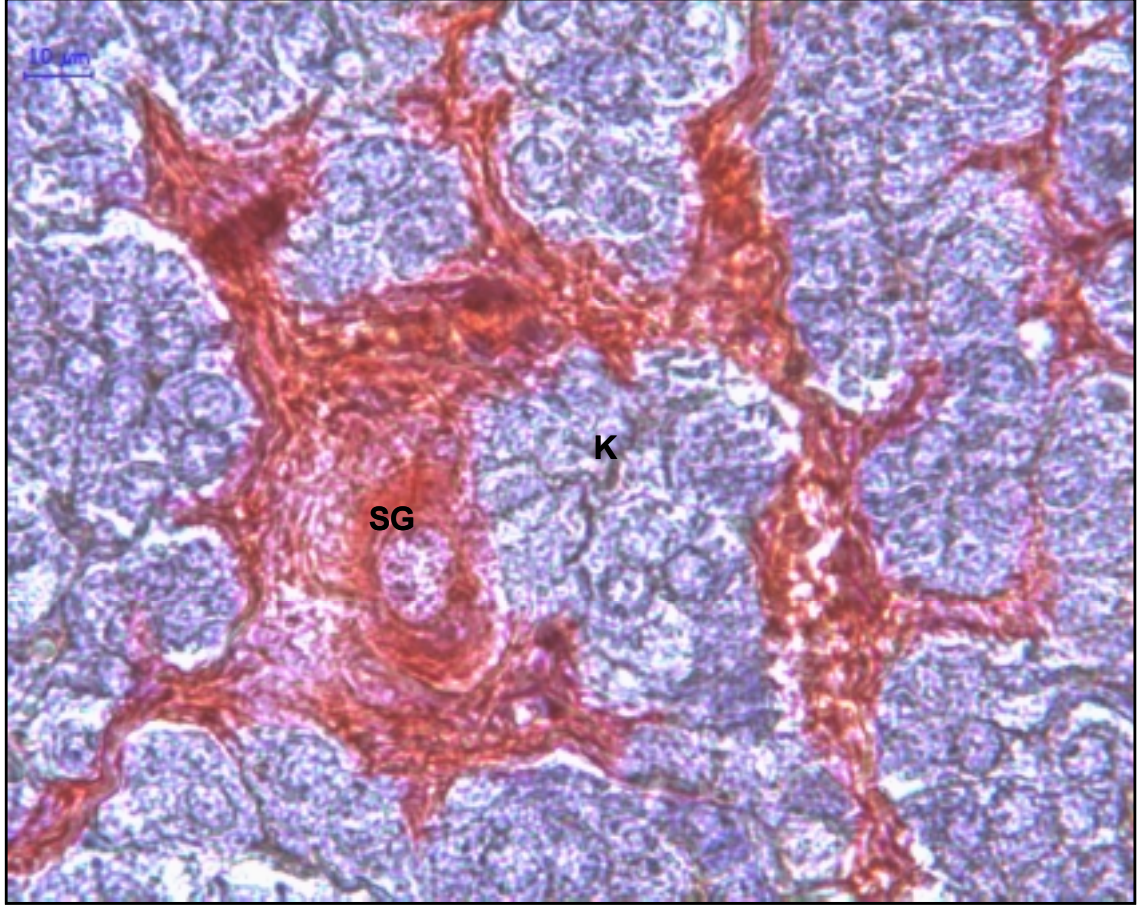
**Resim 14:** Ergin NGF immünreaktivitesi; (K): Negatif tutulum gösteren kromaffin hücreler, (SG): Kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren sempatik gangliyon hücresi, (↓): Medullada artan kollojen lif (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X1000 ).



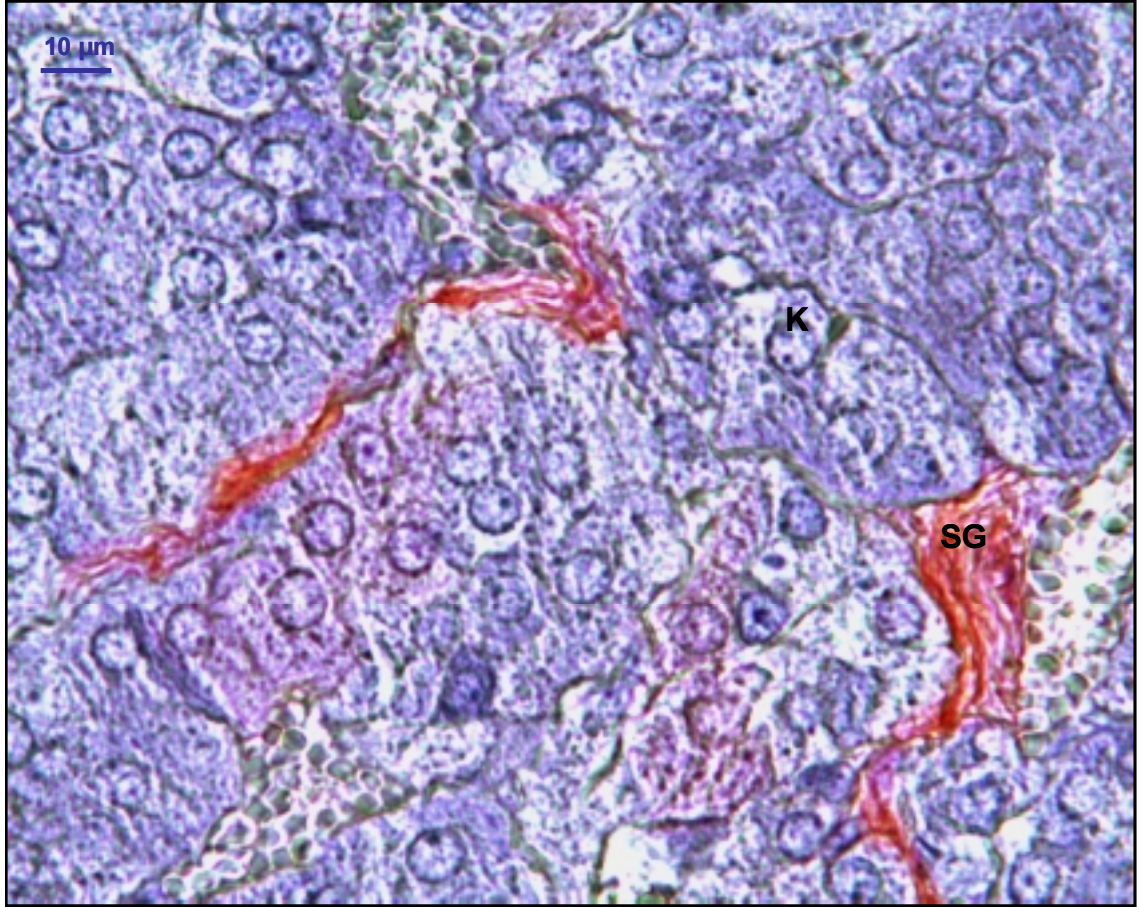
**Resim 15:** Ergin NF immünreaktivitesi; (K): Negatif tutulum gösteren kromaffin hücreler, (SG): Kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren sempatik gangliyon hücresi, (↓): Medullada artan kollojen lif (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X 400 ).



**Resim 16:** Yaşlı FGF immünreaktivitesi; (K): Negatif tutulum gösteren kromaffin hücreler, (SG): Kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren sempatik gangliyon hücresi (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400 ).



**Resim 17:** Yaşlı NGF immünreaktivitesi; (K): Negatif tutulum gösteren kromaffin hücreler, (SG): Kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren sempatik gangliyon hücresi (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400).



**Resim 18:** Yaşlı NF immünreaktivitesi; (K): Negatif tutulum gösteren kromaffin hücreler, (SG): Kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren sempatik gangliyon hücresi (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400).

## V. TARTIŞMA

Böbreküstü bezlerinin iç kısmında yerleşik medula katmanı kromaffin ve sempatik gangliyon hücrelerini içerir. Sempatik gangliyon hücreleri ; kromaffin hücre kordonları arasında tek tek ya da gruplar halinde bulunurlar. Literatürde işlevsel olarak birbirinden farklı bu iki tip hücreyi inceleyen çok sayıda gelişimsel, yapısal, biyokimyasal ve klinik çalışma bulunmaktadır.

Yapılan bir çok çalışmada medulla hücrelerinde NGF'nin varlığı araştırılmıştır. Çalışmaların sonucunda her iki tip hücrenin de nöral krista'dan köken almalarına karşın, sempatik gangliyon hücrelerinin NGF'ye yanıt verebildiği, kromaffin hücrelerinin ise vermediği belirlenmiştir. <sup>14,16,21,27,37,40,59,84</sup>

Jennifer L. ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları çalışmada kanatlı embriyonlarının gelişiminde böbreküstü bezi hücrelerinin NGF'ye yapısal ve biyokimyasal yanıtı incelenmiştir. Bu erekle 7 ve 11 günlük embriyonlarda nöropeptid ve mRNA düzeyleri araştırılmıştır. NGF varlığında nöropeptid (NPY) ve mRNA düzeyleri artarken, kromaffin hücre kültürlerinde NGF'nin bir etkisi olmadığı saptanmıştır. 7 günlük embriyonlara ait sempatik hücre kültürlerinde ise, NGF'ye biyokimyasal ve yapısal yanıt oluştuğu gözlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, NGF'nin

kromaffin hücrelerde morfolojik modülasyonu sempatik nöronlardan daha erken indüklediği vurgulanmıştır. <sup>14</sup>

Unsicker ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; sıçan adrenal bezine ait hücre kültürlerine NGF eklenmesinin hücre farklanmasına etkisi incelenmiştir. Araştırmacılar kültürün ilk gününden başlayarak bir grup kromaffin hücrelerde sinir lif büyümesi olduğunu, kültürün 2-3 gününde ise hücrelerin kısmen çok kenarlı şekil aldığını belirlemişlerdir. Kültürün ilk günlerinde sempatik gangliyon hücrelerine farklanan hücreler kromaffin hücrelerle oranlandığında, 1/40 oranında nöronal hücre varlığını saptamışlardır. Araştırmacılar ilerleyen günlerde bu oranın %50-70 olduğunu, NGF'nin yüksek yoğunlukta uygulanmasının ise sempatik gangliyon hücre farklanmasını arttırdığını vurgulamışlardır. <sup>16</sup>

Bizim çalışmamızda da Unsicker ve arkadaşları'nın bulgularına koşut embriyonik 16.günden yenidoğana kadar kromaffin hücrelerde NGF tutulumu izlenirken genç gruplardan itibaren bunun gözlenmediği saptanmıştır. Bu bulgu NGF'nin kromaffin ve sempatik gangliyon hücre gelişimini düzenleyici rol oynadığını, böbreküstü bezi erişkin formlarında ise sadece sempatik gangliyon hücrelerinden sentezlendiğini göstermektedir.

A.A.J.Verhofstad ve arkadaşları sıçan böbreküstü bezi medullasının doğum öncesi ve doğum sonrası gelişimini immünohistokimyasal yöntemler kullanarak ve kan katekolamin düzeyini ölçerek incelemiştir. E16.gün - PN 7.gün aralıklarında, hergün elde edilmiş böbreküstü bezi doku örneklerinde dopamin (DA), noradrenalin (NA), fentolamin N-metil transferaz (PNMT) ve adrenalin (A) ion-pair reversed-phase likit kromatografisi ile elektrokimyasal ayırım yapılarak medullada 3 gelişim fazı tanımlanmıştır; 1.faz'da (E16. -17.günler); medullar hücrelerin DBH ve NA ile immunoreaksiyon verdiği, adrenalin düzeyinin ise NA ile karşılaştırıldığında son derece zayıf olduğu, 2. faz'da (E 18. - PN 2.veya 3. günler) tüm medullar hücrelerin DBH, NA, PNMT ve A ile immünoaksiyon verdiği belirlenmiştir. Ayrıca bu fazda adrenalin yoğunluğunun günlük olarak arttığı ve E20.günde en üst düzeye ulaştığı saptanmıştır. Adrenalinin PN 1. - 3.günde toplam katekolaminlerin %75'ini oluşturduğu vurgulanmıştır. 3.fazın PN 2 ya da 3.günde başladığı belirtilirken, bu dönemde medullar hücre sayısının arttığı ve bu hücrelerde DBH ve NA'le immünoaksiyonu saptanmıştır. İlerleyen günlerde NA'nın sentezlenip depolandığı gözlemlenmiş, doğum sonrası adrenalin yoğunluğunun doğumdan sonraki 4.günde %79'a kadar yükseldiği belirlenmiştir. Araştırmacılar bu sonuçlara dayanarak adrenalin sentezinin olasılıkla gebeliğin 16.ve 17.günlerinde başladığını bildirmişlerdir. <sup>59</sup>

Togarı ve arkadaşlarının 1985 yılında fare böbreküstü bezi medulla'sında hücre kültürleriyle yaptığı çalışmada; sempatik gangliyon hücrelerine farklı PC12 (kromaffin hücreler) hücrelerinin FGF ile NGF'ye verdikleri yanıt incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda FGF'nin bazı etkilerinin NGF'ye benzediğini, özellikle hipofiz fibroblast büyüme faktörünün etkisiyle örtüştüğünü gözlemlemişlerdir. Ancak araştırmacılar FGF'nin, farklı olarak büyümeyi 3 gün sonra durdurduğunu belirtmişlerdir. NGF eklenen hücrelerin, yenilenmesini daha hızlı gerçekleştirdiği, FGF+NGF uygulanan hücrelerde bu yenilenmenin çok daha hızlı olduğu vurgulanmıştır.<sup>40</sup>

K.Unsickerin yaptığı bir diğer çalışmada kromaffin hücreleri büyüme faktörlerinin (NGF, FGF, IGF, TGF- $\beta$ , Interleukins, CNTF, Kromagranin) salgılama mekanizmaları moleküler düzeyde incelenmiş ve bu maddelerin Parkinson hastalığının tedavisindeki olası önemi araştırılmıştır. Çalışmanın sonunda; kromaffin hücrelerin tüm bu faktörleri sentezlediği belirlenirken, Parkinson hastalığındaki rolü kesin olarak belirtilememesine karşın, kromaffin olmayan hücrelerin NGF ile verilmesi sonucunda Parkinson hastalığında iyileştirici rolüyle benzer özellikler gösterdiği vurgulanmıştır. Transplantasyonu yapılmış kromaffin hücrelerin salgıladığı büyüme faktörleri sinir hücrelerini koruyup, Parkinson hastalarının sinir sistemine (motor) bağlı erklerini kontrol etmesine destek olması nedeniyle, bu hastalığın gelecekteki tedavisinde kromaffin hücre

transplantasyonun kullanılabileceği vurgulanmıştır. NGF mRNA düzeyinin Parkinson hastalığında çok miktarda arttığı da belirtilmiştir.<sup>71</sup>

Bizim çalışmamızda, FGF ve NGF'nin f3tal ve yenidoğanda benzer oranda her iki tip medulla h3crelerinden de sentezlendiği g3zlenirken, Togari ve Unsicker'in bulgularından ayrıcalıklı olarak NGF'nin yenidoğandan sonra kromaffin h3crelerden sentezlenmediği saptanmıştır. Ancak artan yaşı koşut sempatik gangliyon h3crelerinde FGF sentezinin arttığı belirlenmiştir.

Tavuk embriyonlarda yapılan bir diğer çalışmada K.S.Vogel ve arkadaşları, kromaffin ve sempatik gangliyon h3crelerinin k3kenlerini belirleyebilmek erkiyle h3cre k3lt3r3nde imm3nohistokimya ve imm3nblot y3ntemleri kullanılarak 3zg3n antik3rler olan NF ile A2B5 antik3ru ve PNMT enziminin lokalizasyonunu incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda literat3rdeki diğer çalışmalarda da belirtildiği gibi, sempatik gangliyon h3creleri ile kromaffin h3creleri aynı k3kenden geliştiği bildirilmiştir .

48,14,16,24,71

1987 yılında 8 g3nl3k sıçanların b3brek3s3t3 bezi medullasından elde edilen h3crelerin k3lt3re edilmesi ile yapılan çalışmada; NGF ve CNTF(ciliary n3rotropik fakt3r)'nin katekolamin depolanmasına ve TH(Tirozin Hidroksilaz) ile PNMT(phenylethanolamine

N-methyltransferase) aktivitelerine etkisi incelenmiştir. NGF, hücrelerin sürekliliği, gelişimi, fonksiyonel yetilerinin gelişimi için önemli bir faktördür. NGF'nin en önemli etkisi TH aktivitesini indüklüyor olmasıdır. NGF ve CNTF'nin hedefi kromaffin hücrelerdir. Yapılan çalışmada da, NGF ve CNTF'nin hücrelerin yaşam sürelerini etkilediği izlenmiş ve 4 günlük hücre kültürlerinde hücre kaybını engellediği vurgulanmıştır. NGF, CNTF'nin etkisinden farklı bir etki göstermemiş, TH aktivitesini artırıp, PNMT aktivitesini etkilememiştir. Çalışma sonucunda; NGF ve CNTF'nin adrenal bez kromaffin hücrelerinde etkili olduğu izlenmiştir. CNTF ve NGF bu hücrelerin yaşamını %148 ve %53 oranında artırırken birlikte verilmeleri durumunda artışın daha yüksek düzeyde olduğu gözlenmiş ve yine aynı durumda katekolamin miktarlarını azalttığını, adrenalinin ve dopamin miktarlarını artırdığını ancak noradrenalin düzeyini etkilemediğini belirtmişlerdir.<sup>84</sup>

Michael H.Lidenbaum ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; NGF(Nerve Growth Factor)'nin NF(Nörofilament Protein) alt grupları (NF-H, NF-L, NF-M ) üzerindeki etkileri incelenmiştir. NF-H, NF-L, NF-M birbirinden farklı genler tarafından kodlanırlar. Yaoılan araştırmada bu alt grupların embriyogenezin ilk dönemlerinde nöronal fenotip gösterdiği saptanmıştır. NF-L ve NF-M mRNA'ları fare beyinde gelişimin 11.gününde izlenirken, NF-H mRNA'sı yalnızca postnatal dönemde izlenebilmiştir. İmmünoblot ve hücre kültürü yapılan incelemelerde, NF-H'nin yalnızca

NGF'nin uzun süreli uygulamasında arttığı gözlenmiştir. NGF uygulaması NF-L ve NF-M'nin mRNA düzeyini 12 ve 14 kat arttırırken, NF-H'nin mRNA'sında bir değişiklik gözlenmemiştir. Çalışmanın sonunda, NGF'nin NF-H'yi etkilemesinin genetik kontrolde transkripsiyon sonrası olduğu vurgulanmıştır. NGF'nin, NF-L'nin mRNA'sının üzerine etkisi olmadığı belirtilirken, NF-M'nin mRNA düzeyinin kromaffin hücrelerde arttığı vurgulanmıştır. Transkripsiyon öncesi ya da sonrası dönemlerde NGF'nin, NF'nin alt gruplarının ekspresyonunu denetlediği gözlemlenmiştir.<sup>20</sup>

Bizim çalışmamızda da; NF tutulumunun yaşa koşut arttığı, sempatik gangliyon hücrelerindeki NGF artışı ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu literatür ile uyumlu olarak NGF'nin NF sentezini arttırmasının bir sonucu olabilir kanısına varılmıştır.

Arie M. Michelsohn ve David J. Anderson'un 1992 yılında yaptıkları çalışmada, sıçan böbrekütü bezi kromaffin hücrelerinde, glukokortikoidlerin sentezi incelenmiştir. Çalışmada norepinefrini epinefrine çeviren enzim olan PNMT(phenylethanolamine-N-methyltransferase) antikoru kullanılmıştır. Hücre kültürü ile yapılan bu çalışmada; PNMT'nin E-16.5 - E-17.5'a kadar gözlenmediği belirtilmiştir. PNMT'nin etkisinin glukokortikoidlere bağlı olduğunu vurgulanmıştır. Çalışma sonucunda; glukokortikoidler, hem erken sinirsel farklılaşmayı, hem de PNMT'yi indüklediği saptanmıştır.<sup>21</sup>

2002 yılında Katrin Huber ve arkadaşlarının fare embriyoları ile yaptıkları çalışmada kromaffin hücrelerin gelişmesinde MASH1'in rolünü, MASH1+/+ ve MASH1-/- tip fareler ile immünofloresans, in-situ hibridizasyon ve elektron mikroskobu yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Araştırmanın sonucunda, MASH1'in sempatik gangliyon hücre farklanmasında önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte MASH1'in mutanti olan MASH1-/-'in, bütün periferik sinirler ve katekolaminerjik nöronlarda yoğun dejenerasyona neden olduğu vurgulanmıştır .<sup>24</sup>

Böbreküstü bezi kromaffin ve sempatik gangliyon hücreleri birbirleriyle ilişkili ancak nöral kista'dan köken alan diğer hücrelerden farklı fenotipe sahiptirler. Kromaffin hücrelerin fenotiplerini belirleyen moleküler faktörler henüz tamamlanmamıştır. Glukokortikoid sinyalleri bir işaretleyici olarak düşünülse de yeterli olmadığı bildirilmiştir (Development 126(1999)2935). Bu konu ile ilgili olarak Stephanie E. Combs ve arkadaşlarının 2001 yılında kanatlı hayvan embriolarında yaptıkları çalışmada, TGF- $\beta$  (Transforming growth factor-  $\beta$ s)'nın embriyonik gelişimi değişik yollardan denetlediği belirtilmiştir. TGF- $\beta$ 'nın böbreküstü bezi progenitör (öncül) hücrelerine etki ettiği vurgulanmıştır .

Çalışmada TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3'leri anti- TGF- $\beta$  kullanarak bu faktörleri nötralize etmişler ve bunun sonucunda da kromaffin hücrelerin tipik özelliklerini kazandığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak da, TGF- $\beta$  nötralizasyonunun hücre bölünmesine etkisi olduğu ancak bu etkinin kromaffin hücrelerin özgün özelliklerinin kazanmasını sağlamadığı vurgulanmıştır.<sup>27</sup>

2000 yılında Regine Hepp ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı çalışmada, böbreküstü bezleri gelişimi sırasında hücre bağlantıları için gerekli protein olan Snap-25 düzeyi PCR ve immünofloresan yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda Snap-25 ilk haftada en yüksek düzeyde gözlenirken, yetişkinlerde azaldığı belirlenmiştir. Bunun sonucunda da yaşa bağlı hücresel bağlantıların azaldığı belirtilmiştir.<sup>39</sup>

Alzheimer, beyin hücrelerinin ölümü nedeniyle ortaya çıkan ve yaşlılarda yaygın olarak görülen bunamanın temel nedenlerinden biridir.

Mark Tuszynski,. nöronların ölümünün engellenmesi ve beyin hücreleri arasında yeni bağlantıların kurulmasını sağladığı için NGF(Nerve Growth Factor) ile ilgili çalışmalar yapmış ve bunun sonunda, NGF'nin nöronları koruduğu ve bellek yitimini engellediğini belirtmiştir. 2001 yılında yaptıkları çalışma sonucunda, Tuszynski ve ekibi, NGF gen terapisinin

Rheusus maymunlarında yaşla ilgili sinirsel dejenerasyonu geri döndürdüğünü bildirmişlerdir.<sup>69</sup>

Diğer çalışmalardan ayrıcalı olarak Andreas Schober ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptıkları çalışmada, böbreküstü bezleri ve medulla spinalis incelenmiştir. Yapılan çalışmada amaç her iki dokuda nörotopin reseptörü olan trkB ve trkC'nin ve ligandlarının etkisinin izlenmesidir. Nörotropin ve onların trk reseptörleri gelişmede ve erişkin sinir sisteminde önemli olan sinyal moleküllerini oluştururken, sempatik nöronlarda ve kromaffin hücrelerde artışa yol açarlar. NT-3(Neurotrophin-3) ve NGF(Nerve Growth Factor)'nin sempatik nöron gelişimi üzerine etkisi olduğu düşünülerek, kromaffin hücrelerin gelişiminin sürekliliğini ve pregangliyonik innervasyonda nörotropinlerin işlevi hakkında temel oluşturmak ereğiyle in-situ hibridizasyon yöntemi kullanılarak medulla spinalis'in IML(intermediolateral column) kolonunda ve böbreküstü bezinde , BDNF, NT-3 ve reseptörleri trkB ve trkC lokalizasyonlarını incelemişlerdir. BDNF, embriyonel adrenal korteks'te yoğun olarak izlenirken, medulla kromafin hücrelerinde tutulum saptanmamıştır.<sup>44</sup>

1998 yılında Yusuf Nergiz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ; mikrodalga uygulanmış ratların böbreküstü bezlerinde Askorbik Asit'in yerleşimindeki değişiklikler izlenmiştir. Çalışmada sıçanları 3 grupta inceleyerek, 1.grup; kontrol grubu .2.grup'ta; sıçanlara 13 gün süreyle ,

günde 1 saat 9450 MHz frekansında , 2,65 mW/cm<sup>2</sup> dozunda mikrodalga uygulananmıştır. 3.grupta ise; sıçanlara 52 gün süreyle günde 1 saat 9450 MHz frekansında, 2,65 mW/cm<sup>2</sup> dozunda mikrodalga uygulanmıştır. Çalışmalar sonucunda; ilk grupta; Askorbik asit granülleri homojen bir dağılım gösterirken, 2.grup'ta kapsul, kapiller endoteli ve zona gromeruloza askorbik asitten tamamen yoksun olmasına karşın; fasikülata,retikülaris ve medulla katmanları askorbik asit yönünden farklı dağılım göstermiştir. 3. grup böbreküstü bezlerinde ise farklı çap ve yoğunlukta askorbik asit granülleri organın kapsülü dahil tüm doku genelinde izlenmiştir. Sinüzoidlerin endotellerinde bu birikim belirgin olarak gözlenmiştir. Sonuçta da; uzun süreli mikrodalga uygulanan sıçanların böbreküstü bezlerinde Korteks katmanı'nda ve Medulla katmanı'ndaki kromaffin hücrelerin'de askorbid asit granüllerinde artışın, strese karşı vücut direncini artırmaya yönelik olduğu belirtilmiştir. <sup>33</sup>

Yapılmış birçok in-vitro çalışmada , böbreküstü bezi medulla hücrelerinin sinir büyüme faktörleri ile etkileşerek sempatik nöronlara farklılaşabileceği vurgulanmıştır. <sup>14,16,48,59</sup>

Bizim çalışmamızda da fetal ve yenidoğan döneminde özellikle FGF ve NGF hem kromaffin hem de sempatik gangliyon hücrelerinde gözlenmiştir. Bu bulgu literatür ile uyumlu olarak büyüme faktörlerinin gelişim döneminde kromaffin hücrelerden de sentezlenip,

hücrelerin sempatik gangliyon hücrelerine farklanmasını sağlayabiliyor olabileceğini düşündürmüştür. NF antikoru da bu etkiyi göstermekte ama FGF ve NGF kadar etkin olmadığı izlenmiştir.

## VI. SONUÇ

Sonuç olarak, böbreküstü bezi medulla katmanında doğum öncesi ve sonrası evrelerde kromaffin ve sempatik gangliyon hücre gelişiminin incelendiği çalışmamızda, nöral hücre yüzey işaretleyicilerinin eksprese edildiği, özellikle FGF ve NGF'nin doğum sonrası evrede yoğun artış gösterdiği, NF antikorunun ise genç evreden sonra yetişkin düzeye ulaştığı belirlenmiştir.

Bu bulgular ışığında sempatik gangliyon ve kromaffin hücre gelişimlerinin belirlenmesinde nöronal belirteçler olarak FGF, NGF ve NF'nin uygun işaretleyiciler olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

## VII. ÖZET

Bu çalışmada; sıçan böbreküstü bezi medulla hücrelerinin doğum öncesi ve doğum sonrası dönemlerde gelişiminin özgün antikolar kullanarak ışık mikroskop düzeyinde immünohistokimyasal yöntemler ile incelenmesi amaçlandı.

Bu amaçla çalışmamızda embriyonik 16. ve 19. gün, yenidoğan, genç, ergin ve yaşlı dönemlerde sıçanlardan böbreküstü bezi dokuları alındı ve alışılmış ışık mikroskop takibinden geçirilerek, parafin bloklar hazırlandı. Medulla gelişimini incelemek ereğiyle indirekt immünohistokimyasal yöntemler ve FGF, NGF ve NF antkorları kullanılarak hazırlanan preparatlar Leica DM 4000 foto ışık mikroskopta değerlendirildi.

Embriyonik 16.günde, FGF ve NGF tutulumu sempatik gangliyon ve kromaffin hücrelerinde gözlenirken, NF tutulumunun sadece sempatik gangliyon hücrelerinde minimal düzeyde olduğu saptandı. Embriyonik 19.günde FGF ve NGF immünreaktivitesi sempatik gangliyon ve kromaffin hücrelerde benzer düzeyde izlenirken, NF tutulumunun daha zayıf olduğu görüldü. Yenidoğan evresinde FGF, NGF ve NF antikolarıyla yapılan immün boyamada kromaffin hücre tutulumunun minimal düzeyde olmasına karşılık, FGF ve NGF sempatik gangliyon hücrelerinde kuvvetli olarak belirlendi. NF antikoruyla da orta düzeyde tutulum saptandı. Genç

evreden başlayarak ilerleyen yaş gruplarında, kromaffin hücrelerde her üç antikora karşı izlenen negatif tutulumun gelişimin ilerlemesi ile değişmediği gözlenirken, sempatik gangliyon hücrelerinde tutulumun yaşa koşut arttığı saptandı. Ayrıca ergin evrede medullada bağ dokusunun arttığı ilgiyi çekti.

Çalışmamızın sonucunda incelediğimiz evrelerde her üç antikorda kromaffin hücre tutulumlarının yaşa koşut azaldığı ve daha sonra negatif reaksiyon gösterdiği saptanırken, sempatik gangliyon hücre tutulumlarının artarak devam ettiği izlendi. Elde ettiğimiz bulgular ışığında sempatik gangliyon ve kromaffin hücre gelişimlerinin belirlenmesinde nöronal belirteçler olarak FGF, NGF ve NF'nin uygun işaretleyiciler olarak kullanılabileceği kanısına varıldı.

## VIII. SUMMARY

In this study, the prenatal and postnatal development of the rat adrenal medulla cells is aimed to be investigated through using original antibodies with immunohistochemical methods at the level of light microscope.

For this reason, adrenal tissue samples were taken from rats of age ranging from embryonic 16<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> days, newborn, young, adolescent and elderly and gone through the conventional light microscope check and paraffin blocks were prepared. Indirect immunohistochemical methods as well as preparates which were prepared by using FGF, NGF and NF antibodies were analyzed in Leica DM 4000 photo light microscope in order for the investigation of the medulla development under the scope of our study.

It was detected that while FGF and NGF eclipses were being observed in ganglion and chromaffin cells in embryonic 16<sup>th</sup> day, NF eclipse was just only observed in sympathetic ganglion cells at minimum levels. While the FGF and NGF immune reactivity was being observed at similar levels in sympathetic ganglion and chromaffin cells in embryonic 19<sup>th</sup> day, the NF eclipse was observed as meager. In the period of newborn, FGF and NGF were detected as strong in the sympathetic

ganglion cells during the immune painting done within FGF, NGF and NF antibodies, even though chromaffin cell eclipse was detected at minimum levels. It was seen that the negative eclipse observed against each three antibodies did not change with the progress of the development as well as the eclipses in sympathetic ganglion cells was observed to increase parallel to the age concerning the age groups starting from adolescence. Besides, the fact that medulla connective tissues increased during the adolescence was also seen as an interesting factor.

As a result of our study, it was finally that while the chromaffin cell eclipses decrease parallel to the age and then show negative reaction, the sympathetic ganglion cell eclipses continue increasingly observed in the each of three antibodies concerning the periods investigated. Under the light of the obtained findings, FGF, NGF and NF were decided to be appropriate markers as neuronal determinants in definition of the sympathetic ganglion and chromaffin cell developments.

## IX. KAYNAKLAR

1. Noyan A., Fizyoloji.10.baskı. Ankara.1998. S:187-200
2. S.Castonzo Linda., Fizyoloji. Nobel Kitabevi;1999. S:237-250
3. Erdoğan D., Hatipoğlu M.T., Görgün M., Ilgaz C. Özel Histoloji. 1.baskı.Ankara: SBAD Yayınları; 1996.
4. John B,Joseph B.III Michael B., Fizyoloji . Saray Tıp Kitabevi;1994. S:357-363
5. Yaman K., Fizyoloji. Vipaş Yayınevi. S:464-466
6. Anatomi,Histoloji,Embriyoloji.Ankar: Nobel Kitabevi; 1998
7. Akay M.T. Genel Histoloji. 5.Baskı.Ankara: Palme Yayınevi; 2001.
8. Anatomi ve Histoloji ders notları. Metay Y. Hacettepe.1992. S:121-127
9. Fazıl N.,Eralp İ., İnsan Anatomisi; Fatih Y. 1981. S:140-145
- 10.Ozan H. Anatomi. 2004 S:469-472
- 11.Aktümsek A., Anatomi ve Fizyoloji. Nobel.2001 S:108-112 S:186-189
- 12.Sancak B.,Cumhur M.,fonksiyonel Anatomi baş,Boyun ve İç organlar. 1999. S:350-351
- 13.Department of Biology, University of Puerto Rico, P.O Box 23360, UPR Station, Rio Piedras, Puerto Rico, PR 00931-3360, USA, Accepted 26 March 2003
- 14.Jennifer L.Barreto-Estrada, Wanda E. Medina-Ortiz, Jose E. Garcia-Arraras. The morfohological and biochemical response of avian embryonic symphoadrenal cells to nevre growth factor is

- developmentally regulated. *Developmental Brain Research* 2003;144:1-8.
- 15.Gartner L.P., Hiatt J.L. *Color Textbook of Histology*. Philadelphia: W.B. Saunderscompany; 1992.
- 16.Uniscker K.,Krisch B.,Otten U.,Thoenen H. Nerve growth factor-induced fiber outgrowth from isolated rat adrenal chromaffin cells:impairment by glucocorticoids. *Neurobiology* 1978; 7:3498-3502.
- 17.Persaund M. *İnsan Embriyolojisi*. Çeviri Editörleri: Yıldırım M.,Okar İ., Dalçık H. 6.Baskı Ankara: Nobel Kitabevi; 2002.
- 18.Vogel K.S. ,Weston A. The Sympathoadrenal lineage in Avian embryos. *Developmental Biology* 1990; 139:1-12.
- 19.Irmak M.K., Öztaş E., Vural H. Dependence of fetal hairs and sebaceous glands of fetal adrenal cortex and possible control from adrenal medulla. *Medical Hypotheses* 2004; 62:486-492.
- 20.Lindenbaum H., Carbonetto S, Grosveld F., Mushynski E. Transcriptional and Post-transcriptional effects of nerve growth factor on expression of the three neurofilament subunits in PC-12 cells. *The Journal Of Biological Chemistry* 1987;12:5662-5667.
- 21.Michelsohn A.M., Anderson D.J. Changes in competence determine the timing of two sequential glukokortikoid effects on sympathoadrenal progenitors. *Neuron* 1992; 8:589-604.

- 22.Lim K-C.,Lakshmanan G., Crawford S.E., Yi Gu, Grosveld F., Engel J.D. Gata 3 loss to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system. *Nature Genetics* 2000; 25: 209-211.
- 23.Hatipoğlu M.T. *Anatomi ve Fizyoloji*. 14.baskı. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi; 2002.
- 24.Huber K., Brühl B., Guillemot F., Olson E.N., Ernsberger U., Unsicker K. Development of chromoffin cells depends on Mash1 function. *Development* 2002; 129:4729-4738.
- 25.Barkatullah S.C., Pogue K.M., Depreitere J.,Boutajangout A., Liang F., Depotter W., Curry W.J. Immunohistochemical localization of WE-14 in the devolving porcine sympathoadrenal cell lineage. *Histochem Cell Biology* 2001; 116:255-262.
- 26.Hatipoğlu M.T. *Anatomi Sözlüğü*. 5.Baskı. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi; 2000.
- 27.Combs S.E., Ernsberger U., Krieglstein K., Unsicker K. Reduction of endogenous TGF- $\beta$  does not effect phenotypic development of sympathoadrenal progenitors into adrenal chromoffin cells. *Mechanisms of Development* 2001; 109:295-302.
- 28.Joussaelin-Hosaja M., Tobin C., Venault P., Joubert C., Chapouthier G. Effects of adrenal medulla graft on recovery of GABAergic and dopaminergic neuron deficits in mice: behavioural, pharmacological and immunohistochemical study. *Behavioural Brain Research* 2003; 140:185-193.

- 29.Karkevelas G., Katsetos C.D., Geddes J.F., Herman M.M.,Vinores S.A., Cooper H.S., Provencio J., Frankfurter A. Class III  $\beta$ -Tubulin isotype ( $\beta$ -III) in the adrenal medulla: II. Localization in primary human pheochromocytomas. The Anatomical Record 1998; 250:344-350.
- 30.Erbengi T. Histoloji. 2.baskı. Ankara: Ankara Güneş Evi; 1990.
- 31.Holgert H., Lagercrantz H., Dagerlind A., Hartman B.K., Cozzari C., Brimijoin S., Hökfelt T. Effects of immunological sympathectomy on postnatal peptide expression in the rat adrenal medulla. Developmental Brain Research 1996; 97:88-95.
- 32.Katsetos C.D., Herman M.M., Mörk S.J. Class-III  $\beta$ -Tubulin in human development and cancer. Cell Motility and the Cytoskeleton 2003; 55:77-96.
- 33.Nergiz Y., Ketani M.A.,Akdağ Z., Çelik S., Şahan Ö.M. Mikrodalga uygulanmış ratların böbreküstü bezlerinde Askorbik Asit'in lokalizasyonundaki değişiklikler.Tr.J.Biology 1998; 22: 43-51
- 34.Junqueira L.C., Carniora J. Basic Histology Tenth Edition. The McGraw-Hill Company 2003; 413-419.
- 35.Langman. Medikal Embriyoloji. Çeviri editörü: Prof.Dr. Başaklar A.C. 9.baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005.
- 36.Feng J.T.,Hu C.P. Dysfunction of releasing adrenaline in asthma by nerve growth factor. Medical Hypotheses 2005; 65: 1043-46.
- 37.Yılmaz S., Kurnaz L. NGF ile uyarılan TrkA sinyal yolağının ,PC12 hücrelerinde bilgisayarla simülasyonu 2002.

38. Dolle J.P., Rezvan A., Allen F.D., Lazorovici P., Lelkes P.I. Nerve Growth Factor-Induced migration of endothelial cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2005; 315:1220-1227.
39. Hepp R., Grant N.J., Aunis D., Langley K. Snap-25 regulation during Adrenal Gland development : comparison with differentiation markers and other Snares. *The Journal of Comparative Neurology* 2000; 421: 533-542.
40. Togari A. , Dickens G. , Kuzuya H. , Groff G. The effect of fibroblast growth factor on PC12 cells. *The Journal of Neuroscience* 1985; 2:307-316.
41. Weiss (L) ed: *Cell and Tissue Biology, A Text Book of Histology*. 6.ed. Baltimore: Urban and Schwarzenberg;1998.
42. Fulop T., Smith. Physiological stimulation regulates exocytic mode through calcium activation of Protein Kinase C in Mouse chromaffin cells. *Biochemical Journal Immediate Publication* , Published on 20 Jun 2006 as manuscript BJ20060654.
43. Colombo-Benkmann M., Muhm M., Herfarth C., Heym C., Senninger N. Induction of orthotopic rat adrenomedullary neoplasia by intraadrenal pheochromocytoma cells transplantation. *World Journal of Surgery* 2002; 26: 35-42.
44. Schober A., Wolf N., Kahane N., Kalcheim C., Kriegstein K., Unsicker K. Expression of neurotrophin receptors trkB and trkC and their

- ligands in rat adrenal gland and the intermediolateral column of the spinal cord. *Cell Tissue Res* 1999; 296: 271-279.
45. Chalmers G.R., Fisher L.J., Nijima K., Patterson P.H., Gage F.H. Adrenal chromaffin cells transdifferentiate in response to a nerve growth factor source in vivo. *Experimental Neurology* 1995; 133: 32-42.
46. Harada A., Kato H., Negishi M. Direct interaction of Rnd1 with FRS2 $\beta$  regulates Rnd1-induced down-regulation of RhoA activity and is involved in Fibroblast Growth Factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *The Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 18418-18424.
47. Frazier D.P., Cox D., Godshalk E.M., Schaffer P.A. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript promoter is activated through Ras and Raf by Nerve Growth Factor and Sodium Butyrate in PC12 cells. *Journal of Virology* 1996; 70: 7424-7432.
48. Vogel K.S., Weston J.A. The sympathoadrenal lineage in Avian embryos. II. Effects of glucocorticoids on cultured neural crest cells. *Developmental Biology* 1990; 139: 13-23.
49. Langley K., Grant N.J. Molecular markers of sympathoadrenal cells. *Cell Tissue Res* 1999; 298: 185-206.
50. Feria-Velasco A., Castillo-Medina S., Verdugo-Diaz L., Castellanos E., Orozco-Suarez S., Sanchez-Gomez C., Drucker-Colin R. Neuronal differentiation of chromaffin cells in vitro, induced by extremely low frequency magnetic fields or Nerve Growth Factor: A histological and

ultrastructural comparative study. *Journal of Neuroscience Research* 1998; 53: 569-582.

51. Espejo E.F., Gonzalez-Albo M.C., Moraes J-P., Fadwa El Banoua, Flores J.A., Caraballo I. Functional regeneration in a rat Parkinson's model after intrastriatal grafts of glial cell line-derived neurotrophic factor and transforming growth factor  $\beta$ 1-expressing extra-adrenal chromaffin cells of the Zuckerkandl's Organ. *The Journal of Neuroscience* 2001; 21: 9888-9895.

52. Arimura A., Shioda S. Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and its receptors: Neuroendocrine and endocrine interaction. *Frontiers in Neuroendocrinology* 1995; 16: 53-88.

53. Reissmann E., Ernsberger U., Franchis-West P.H., Rueger D., Brickell P.M., Rohrer H. Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development* 1996; 122: 2079-2088.

54. Jimenez N., Hernandez-Cruz A. Modifications of intracellular  $Ca^{2+}$  signaling during nerve growth factor-induced neuronal differentiation of rat adrenal chromaffin cells. *European Journal of Neuroscience* 2001; 13: 1487-1500.

55. Quintero E.M., Willis L.M., Zaman V., Lee J., Boger H.A., Tomac A., Hoffer B.J., Stromberg I., Granholm A.C. Glial cell line-derived neurotrophic factor is essential for neuronal survival in the locus

- coeruleus-hippocampal noradrenergic pathway. *Neuroscience* 2004; 124: 137-146.
- 56.Schober A., Minichiello L., Keller M., Huber K., Layer P.G., Roig-Lopez J.L., Garcia-Ararras J.E., Klein R., Unsicker K. Reduced acetylcholinesterase (AChE) activity in adrenal medulla and loss of sympathetic preganglionic neurons in TrkA-deficient, but not TrkB-deficient,mice. *The Journal of Neuroscience* 1997; 17: 891-903.
- 57.Viemari J.C., Bevengut M., Burnet H., Coulon P., Pequignot J.M., Tiveron M.C., Hilaire G. Phox2a gene, A6 neurons, and noradrenaline are essential for development of normal respiratory rhythm in mice. *The Journal of Neuroscience* 2004; 24: 928-937.
- 58.Zammit D.J., Berzins S.P., Gill J.W., Randle-Barrett E.S., Barnett L., Koentgen F., Lambert G.W., Harvey R.P., Boyd R.L., Classon B.J. Essential role for the lymphostromal plasma membrane Ly-6 superfamily molecule tyomic shared Antigen 1 in development of the embryonic adrenal gland. *Molecular and Cellular Biology* 2002; 22: 946-952.
- 59.Verhofstad A.A.J. ,Coupland R.E. ,Parker T.R. ,Goldstein M . Immunohistochemical study on the development of the noradrenaline- and adrenaline-storing cells of the adrenal medulla of the rat. *Cell Tissue Res* 1985; 242:233-243.

- 60.Lamouche S., Yamaguchi N. Role of PAC1 receptor in adrenal catecholamine secretion induced by PACAP and VIP in vivo. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2001; 280: 510-518.
- 61.Doupe A.J., Landis S.C., Patterson P.H. Environmental influences in the development of neural crest derivatives: Glucocorticoids, growth factors, and chromaffin cell plasticity. *The Journal of Neuroscience* 1985; 5: 2119-2142.
- 62.Tyson D.R., Larkin S., Hamai Y., Bradshaw R.A. PC12 cell activation by epidermal growth factor receptor: role of autophosphorylation sites. *Developmental Neuroscience* 2002; 21: 63-74.
- 63.Salmenkivi K., Heikkila P., Liu J., Haglund C., Arola J. VEGF in 105 pheochromocytomas: enhanced expression correlates with malignant outcome. *APMIS* 2003; 111: 458-64.
- 64.Brede M., Nagy G., Philipp M., Sorensen J.B., Lohse M.J., Hein L. Differential control of adrenal and sympathetic catecholamine release by  $\alpha_2$ -adrenoceptor subtypes. *Molecular Endocrinology* 2003; 17(8): 1640-1646.
- 65.Allmendinger A., Stoeckel E., Sarma M., Unsicker K., Huber K. Development of adrenal chromaffin cells is largely normal in mice lacking the receptor tyrosine kinase c-Ret. *Mechanisms of Development* 2003; 120: 299-304.
- 66.Bush M.L., Miyashiro J.S., Ingram V.M. Activation of a neurofilament kinase, a tau kinase, and a tau phosphatase by decreased ATP levels

- in nerve growth factor-differentiated PC-12 cells. *Neurobiology* 1995; 92: 1861-1865.
- 67.Özbek E. Böbreküstü Bezleri. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi* 1997; 4(2): 248-258.
- 68.Tischler A.S., Tsokas P., Shahsavari M., Powers J.F. Immunoreactivity of normal rabbit serum with epinephrine (E) cells of the rat adrenal medulla after microwave antigen retrieval. *Cell Tissue Res* 1998; 293: 563-566.
- 69.Tyzunski M. *Nerve Growth factor* 2002.
- 70.Katsetos C.D., Karkavelas G., Herman M.M., Vinos S.A., Provencio J., Spano A.J., Frankfurter A. Class III  $\beta$ -Tubulin isotype ( $\beta$  III) in the adrenal medulla: I.localization in the developing human adrenal medulla. *The Anatomical Record* 1998; 250: 335-343.
- 71.Unsicker K. The chromaffin cell: paradigm in cell,developmental and growth factor biology. *J. Anatomy* 1993; 183: 207-221.
- 72.Behrsing H.P., Vulliet P.R. Mitogen-activated Protein Kinase mediates purinergic-enhanced nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells. *Journal of Neuroscience Research* 2004; 78: 64-74.
- 73.Vogel K.S., Marusich M.F., Weston J.A. Restriction of Neurogenic a $\beta$ gabeylity during neural crest cell differentiation. *Journal of Neurobiology* 1993; 24(2): 162-171.
- 74.Nolan J.A., Trojannowski J.Q., Hogue-Angeletti R. Neurons and neuroendocrine cells containe chromogranin: Detection of thr molecule

- in normal bovine tissues by immunochemical and immunohistochemical methods. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1985; 33(8): 791-798.
75. Vincent S.r., McIntosh C.H.S., Reiner P.B., Brown J.C. Somatostatin immunoreactivity in the cat adrenal medulla. *Histochemistry* 1987; 87: 483-486.
76. Ait-Ali D., Turquier V., Grumolato L., Yon L., Jourdain M., Alexandre D., Eiden L.E., Vaudry H., Anavar Y. The Pro-inflammatory cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 stimulate neuropeptide gene transcription and secretion in adrenochromaffin cells via activation of ERK 1/2 and p38 protein kinases, and activation Protein-1 transcription factors. *Molecular Endocrinology* 2004; 12(10): 2003-0129.
77. Hamelink C., Tjurmina O., Damadzic R., Young W.S., Weihe E., Lee H-W., Eiden L.E. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is a sympathoadrenal neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucomeostasis. *PNAS* 2002; 99(1): 461-466.
78. Faydacı G., Tahran F., Gül A.E., Erbay E., Kuyumcuoğlu U. Role of nerve growth factor on bladder outlet obstruction. *Türk Üroloji Dergisi* 2004; 30(1): 72-79..
79. Matsumoto I., Nijima A., Oamura Y., Sasaki K., Tsuchiya K., Aikawa T. Acidic fibroblast growth factor activates adrenomedullary secretion and sympathetic outflow in rats. *AMJ Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 1998; 275: 1003-1012.

80. Riberio L., Martel F., Azevedo I. The release of 3H-1-methyl-4-phenylpyridinium from bovine adrenal chromaffin cells is modulated by somatostatin. Department of Biochemistry 2006.
81. Förander P., Kriegstein K., Söderström S., Strömberg I. Mutual induction of TGF  $\beta$ 1 and NGF after treatment with NGF or TGF  $\beta$ 1 grafted chromaffin cells of the adrenal medulla. *Experimental Neurology* 2000; 164: 303-313.
82. Elvan Özbek. Erişkin Guinea pig adrenal bezinde saptanan olağan dışı histolojik görünüm. *Türkiye Klinikleri Tıp bilimleri* 1999; 19: 78-84.
83. Wolf N., Krahn K., Bieger S., Frödin M., Taft G.S., Kriegstein K., Unsicker K. Transforming growth factor- $\beta$ , but not ciliary neurotrophic factor, inhibits DNA synthesis of adrenal medullary cells in vitro. *Neuroscience* 1999; 90(2): 1823-1832.
84. Seidl K., Manthorpe M., Varon S., Unsicker K. Differential effects of nerve growth factor and ciliary neurotrophic factor on catecholamine storage and catecholamine synthesizing enzymes of cultured rat chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry* 1987; 49: 169-174.
85. Oberle S., Schober A., Meyer U., Holtmann B., Henderson C., Sendtner M., Unsicker K. Loss of leukemia inhibitory factor receptor  $\beta$  or cardiotrophin -1 causes similar deficits in preganglionic sympathetic neurons and adrenal medulla. *The Journal of Neuroscience* 2006; 26(6): 1823-1832.

- 86.Chou A.H., Howard B.D. İnhibition by Wnt-1 or Wnt-3a of nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells is reversed by bibindolylmaleimide-I but not by several other PKC inhibitors. *Oncogene* 2002; 21: 6348-6355.
- 87.Temur A., Atlı M., Karadağ H. Sığır adrenal korteksi üzerine histolojik ve biometrik bir çalışma. *BAÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 2006; 8.1.
- 88.Takekoshi K., Nomura F., Isobe K., Motooka M., Nammoku T., Nakai T. İdentification and initial characterization of stathmin by the differential display method in nerve growth factor-treated differential display method in nerve growth factor-treated PC12 cells. *European Journal of Endocrinology* 1998; 138: 707-712.
- 89.Fulop T., Radabaugh S., Smith C. Activitiy-dependent differential transmitter relase in mouse adrenal chromaffin cells. *The Journal of Neuroscience* 2005; 25(32): 7324-7332.
- 90.Macdonald G.J., Matt D.W. Adrenal and placental steroid secretion during pregnancy in the rat. *The Endocrin.Sos.* 1984.
- 91.Morrison S.F., Cao W-H. Differnt adrenal sympathetic preganglionic neurons regulate epinephrine and nor epinephrine secretion.*Am J Physiol Regulatory integrative Comp Physiol* 2000; 279: 1763-1775.
- 92.Holman M.E., Coleman H.A., Tonta A., Parkington H.C. Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of Guinea-pigs. *Journal of Physiology* 1994; 478: 115-124.

- 93.Jensen I., Pilowsky P., Llewellyn-Smith I., Minson J., Chalmers J.  
Sympathetic preganglionic neurons projecting to the adrenal medulla and  
aorticorenal ganglion in the rabbit. *Brain Research* 1992; 586: 125-129.
- 94.Dr.Şakir Poyraz. Prooperatif uygulanan oral karbonhidrat  
solüsyonlarının cerrahi olarak oluşan sters yanıtı etkileri. Uzmanlık tezi  
2005.
- 95.Hristic M., Kalafatie D., Places B., Manojlovic M. The Influence of  
prolonged dexamethasone treatment of pregnant rats on the perinatal  
development of the adrenal gland of their Offspring. *The Journal of  
Experimental Zoology* 1997; 279: 54-61.
- 96.Junqueira L.C., Carneiro J., Kelly R.O. Temel Hisyoloji. Çeviri editörleri:  
Aytekin Y., Solakoğlu S., Ahışhalı B. 1.Baskı. İstanbul: Barış Kitabevi;  
1998.
- 97.Guyton & Hall. Tıbbi Fizyoloji (Text book of Medical Physiology).  
10.Baskı. Pennsylv: W.B.Saunders Company; Çeviri: Nobel Kitabevi;  
2001.
- 98.Ganong W.F. Review of Medical Physiology. 22.Baskı. Singapore:  
McGraw –Hill Company; 2005.
- 99.Rieger F., Shelanski M.L., Grene L.A. The effects of nerve growth factor  
on acetylcholinesteras and its multiple forms in cultures of rat PC12  
pheochromocytoma cells: Increased total spesific activity and  
appearance of the 16 S molecular form. *Developmental Biology* 1980;  
76: 238-243.

100. Noordman Y.E., Jansen P.A.M., Hendriks W.J. Tyrosine-specific MAPK phosphatases and the control of ERK signaling in PC12 cells. *J. Mol Signal* 2006; 1:4.
101. Eriksson M., Taskinen M., Leppä S. Mitogen activated protein kinase-dependent activation of c-Jun and c-Fos is required for neuronal differentiation but not for growth and stress response in PC12 cells. *J. Cell Physiology* 2007; 210(2): 538-548.
102. Rasouly D., Shavit D., Zuniga R., Elejalde RB., Unsworth BR., Yayon A., Lazarovici P., Lelkes PI. Staurosporine induces neurite outgrowth in neuronal hybrids (PC12EN) lacking NGF receptors. *J. Cell Biochem* 1996; 62(3): 356-371.
103. Murata T. Neurotrophic factor responsiveness of adrenal medullary cell line tsAM5D immortalized with temperature-sensitive SV40 T-Antigen. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126(4): 265-272.
104. Lemos D.R., Goodspeed L., Tonelli L., Antoch M.P., Ojeda S.R., Urbanski H.F. Evidence for circadian regulation of *atf5* but not tyrosine hydroxylase by the chromaffin cell clock. *Endocrinology* 2007.
105. Kobayashi H., Yanagita T., Yokoo H., Wada A. Pathophysiological function of adrenomedullin and proadrenomedullin N-terminal peptides in adrenal chromaffin cells. *Hypertension Research* 2003; 26: 71-78.
106. Hamelink C., Tjurmina O., Damadzic R., Young W.S., Weihe E., Lee H-W., Eiden L.E. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide

- is a sympathetic neurotransmitter involved in catecholamine regulation and glucohomeostasis. *Neurobiology* 2002; 99(1): 461-466.
107. Inoue M., Fujishiro N., Ogawa K., Muroi M., Sakamoto Y., Imanaga I., Shioda S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide may function as a neuromodulator in guinea-pig adrenal medulla. *J. Physiology* 2000; 528 : 473-478.
108. Lamouche S., Martineau D., Yamaguchi N. Modulation of adrenal catecholamine release by PCAP in vivo. *Am.J. Physiology* 1999; 276: 162-170.
109. Schober A., Wolf N., Huber K., Hertel R., Kriegstein K., Minichiello L., Kahane N., Widenfalk J., Kalcheim C., Olson L., Klein R., Lewin R., Unsicker K. TrkB and Neurotrophin-4 are important for development and maintenance of sympathetic preganglionic neurons innervating the adrenal medulla. *The Journal of Neuroscience* 1998; 18: 7272-7284.
110. Cairns L.A., Minuzzo M., Ricciardi-Castagnoli P., Pozzi L., Ottolenghi S. Immortalization of neuro-endocrine cells from adrenal tumors arising in SV40 T-transgenic mice. *Oncogene* 1997; 14: 3093-3098.
111. Wakade A.R., Wakade T.D., Poosch M., Bannon M.J. Norepinephrine transport and transporter mRNA of rat chromaffin cells are controlled by dexamethasone and nerve growth factor. *Journal of Physiology* 1996; 494: 67-75.

112. Venihaki M., Gravanis A., Margioris A.N. Comparative study between normal rat chromaffin and PC12 rat pheochromocytoma cells: Production and effects of corticotropin-releasing hormone. The Endocrine Society 1997; 698-705.
113. Houchi H., Hamano S., Masuda Y., Ishimura Y., Azuma M., Ohuchi T., Oka M. Stimulatory effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on catecholamine synthesis in cultured bovine adrenal chromaffin cells: involments of tyrosine hydroxylase phosphorylation caused by Ca<sup>2+</sup> influx and cAMP. Jpn J Pharmacology 1994; 66(3): 323-30.
114. Frodin M., Gammeltoft S. Insulin-like growth factors act synergistically with basic fibroblast growth factor to promote chromaffin cell proliferation. Neurobiology 1994; 91: 1771-1775.
115. Ornitz D.M., Hoh N. Fibroblast growth factors, Genome Biology 2000 ; 3005:1-12.
116. Nimni M.E. Polypeptide growth factors; targeted delivery systems. Biomaterials 1997; 18,1201.
117. Nugent, M.N., Lozzo R.V. Fibroblast growth factor 2. JBCB 2000; 32: 115-120.
118. Ciğer S. yara iyileşmesi ve büyüme faktörleri. Alsancak Devlet Hastahanesi Dermatoloji kliniği Notları 1996.

119. Çetin M., Çapan Y. bFGF (Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü) ve formülasyonlarında yeni yaklaşımlar. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi 2004; 24(2): 107-124.
120. Wang Y.J., Shahrokh Z., Vemuri S., Eberlein G., Beylin I., Bussch M., " Characterization, stability, and formulations of basic fibroblast growth factor." Prealman R., Wang Y.J. (derleyenler). Formulation and characterization and stability of protein drugs, New York, London, Plenum Press 1996; 141-180.
- Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and haematology, FGF-2 fibroblast growth factor 2 (basic).  
[www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes-gc/GC-FGF2.html](http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Genes-gc/GC-FGF2.html) 2003.
122. Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G., Rifkin D.B. Biological roles of fibroblast growth factor-2. Endocrine Rev. 1997; 18: 26-45.
123. Claus P., Werner S., Timmer M., Grothe C. Expression of the fibroblast growth factor-2 isoforms and the FGF receptor 1-4 transcripts in the rat model system of Parkinson's disease. Neurosci Lett. 2004; 360(3): 117-120.
124. Ma J., Qui J., Hirt L., Dalkara T., Moskowitz M.A. Synergistic protective effect of caspase inhibitors and FGF against brain injury induced by transient focal ischemia. Br.J. Pharmacology 2001; 133: 345-350.
125. Baird A., Walicke P.A. Fibroblast growth factors. Br.Med.Bull 1989; 45: 438-452.

126. Matson M.P., Tomaselli K.J., Reydey R.E. Calcium-destabilizing and neurodegenerative effects of aggregated  $\beta$ -amyloid peptide are attenuated by bFGF. *Brain Res.* 1993; 621: 35-49.
127. Berg D.K. New neuronal growth factors. *Am. Rev. Neurosci* 1984; 7: 149-70.
128. Lipton S.A. Growth factors for neuronal survival and process regeneration. Implications in the mammalian central nervous system. *Arch.Neurol.* 1989; 46: 1241-1248.
129. Sinatik İletinin modülasyonu: ikincil mesajcılar. Ege Üniversitesi Yayınları.
130. Creedon D.J., Tuttle J.B. Nerve growth factor synthesis in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1991; 18:730-735.
131. Fukuwa S., Fukuwa Y., Satayoshi E. Synthesis and secretion of nerve growth factor by Mouse astroglial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 136: 57-61.
132. Johnson E.M., Garin P.D., Brandeis L.D. Dorsal root ganglion neurons are destroyed by exposure in utero to maternal antibody to nerve growth factor. *Science* 1980; 210: 916-18.
133. Barker P.A., Lomen-Hoerth C., Gensch E.M. Tissue specific alternative splicing generates two isoforms of the trkA receptor. *J Biol Chem.* 1993; 268: 15150-157.

134. Hoffmann P.N., Lasek R.J., Griffin J.W., Price D.L. Slowing of the axonal transport of neurofilament proteins during development. *The Journal of Neuroscience* 1983; 3(8): 1694-1700.
135. Geisler N., Fischer S., Vandekerckhove J., Van Damme J., Plessmann U., Weber K. Protein-chemical characterization of NF-H, the largest mammalian neurofilament component, intermediate filament-type sequences followed by a unique carboxy-terminal extension. *EMBO J.* 1985; 4(1): 57-63.

## **X. ÖZGEÇMİŞ**

1981 yılında Kırşehir'de doğdum. İlkokul öğrenimimi Faik Erbağı ilkokulu'nda, ortaokulu Ahmet Cevdet Paşa İlköğretim okulu'nda, lise öğrenimimi ise Yabancı dil ağırlıklı İncirli Süper Lisesi'nde tamamladım. 2004 yılında Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü lisans eğitimimi bitirdim. 2005 yılında Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan, tezimin hazırlanmasında büyük desteklerini gördüğüm Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız çok değerli Sayın Prof.Dr. Deniz Erdoğan'a ve çok değerli danışmanım Sayın Prof.Dr. Celal Ilgaz'a, öğretim yılı boyunca bana katkılarından dolayı Sayın Prof.Dr. Tahir Hatipoğlu'na, Prof. Dr. Suna Ömeroğlu'na, Yrd.Doç.Dr. Gülnur Take'ye, Yrd.Doç.Dr. Çiğdem Elmas'a, Uzman Dr. Neşe Lortlar'a, deneylerim süresince benden hiçbir yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör.Seren Gülşen Giray'a, Arş.Gör. Fatma Helvacioğlu'na, Arş.Gör. Güleser Çağlar'a, Arş.Gör. Murat Taş'a, Arş.Gör. Yeşim Bardakçı'ya ve tüm dönem arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan ve desteklerini benden hiç esirgemeyen sevgili aileme teşekkür ederim.