

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

**PRENATAL ETANOL UYGULAMASININ
CORPUS CALLOSUM OLUŞUMUNDA ROL OYNAYAN
KİLİT AKSON BÜYÜME PROTEİNLERİNDEN GAP-43
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Nail Can ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANLAR

Doç. Dr. Zeliha KURTOĞLU

Doç. Dr. Necat YILMAZ

MERSİN – 2008

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

**PRENATAL ETANOL UYGULAMASININ
CORPUS CALLOSUM OLUŞUMUNDA ROL OYNAYAN
KİLİT AKSON BÜYÜME PROTEİNLERİNDEN GAP-43
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Nail Can ÖZTÜRK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANLAR

Doç. Dr. Zeliha KURTOĞLU

Doç. Dr. Necat YILMAZ

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP- TF TTB
(2K) 2007-2 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:

MERSİN – 2008

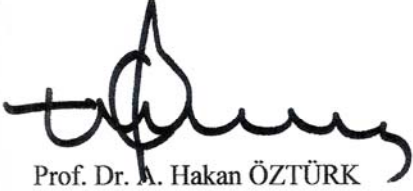
Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Anatomi Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “*Prenatal Etanol Uygulamasının Corpus Callosum Oluşumunda Rol Oyanayan Kilit Akson Büyüme Proteinlerinden GAP-43 Ekspresyonu Üzerine Etkisi?*” başlıklı çalışma, jürimiz tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

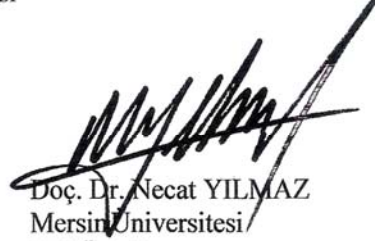
Tez Savunma Tarihi 18/06/2008



Doç. Dr. Zeliha KURTOĞLU
Mersin Üniversitesi
Jüri Başkanı



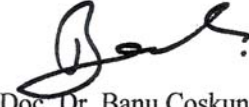
Prof. Dr. A. Hakan ÖZTÜRK
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Necat YILMAZ
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Mustafa AKTEKİN
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Banu Coşkun YILMAZ
Mersin Üniversitesi
Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü
İmza mühür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimize başladığım andan itibaren her konuda yardımlarını ve desteğini gördüğüm, başta danışman hocalarım olmak üzere Sayın Doç. Dr. Zeliha KURTOĞLU ve Doç. Dr. Ş. Necat YILMAZ'a, Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr A. Hakan ÖZTÜRK'e ve Sayın Doç. Dr Mustafa AKTEKİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görevli Sayın Ar. Gör. Dr. Sinem ÖZTUNA'ya ve Histoloji ve Embriyoloji ekibine;

Tezimin deney hayvanları ile ilgili aşamalarında benden yardımlarını esirgemeyen başta Sayın Veteriner Hekim Hasan Basri KIRBAŐ olmak üzere Mersin Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Labaratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni manevi açıdan destekleyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ ve/ veya TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖZET	viii
ABSTRACT	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1.Corpus Callosum Anatomisi	4
2.2. Corpus Callosum'un Fonksiyonu	5
2.3. Corpus Callosum'un Gelişimi	5
2.4. Kallozal Projeksiyonların Gelişimi	7
2.5. Corpus Callosum Gelişimini Regüle Eden Mekanizmalar	11
2.6. Glial Gelişim ve Komissür Oluşumu	12
2.7. Orta Hat Glial yapıların Zedelenmesi ile Beyinde Komissural Bozuklukların . Gözlenmesi	14
2.8. Orta Hat Glial Yapılarda Fibroblast Growth Factor (FGF) Sinyal Yolunun Önemi	14
2.9. Komissural Aksonların Yönlendirilmesi	15
2.10. Komissural Akson Yönlendirilmesine Etki Eden Bazı Önemli Moleküller. 15	
2.11. Orta Hat Oluşumunda GAP-43'ün Rolü.....	17
2.12. Corpus Callosum Agenezi (CCA)	18
2.13. CCA Hayvan Modelleri	19
2.14. İnsanlarda CCA'nin Sebepleri	19
2.14.1. Genetik Faktörler	19
2.14.2. Prenatal Alkol Maruziyeti	20
2.14.3. FASD'da Beyin Hasarı	21

3. GEREÇ ve YÖNTEM	25
3.1.Gebe Ratlar'ın Elde Edilmesi	25
3.2.İntragastrik Gavaj ile Etanol Uygulanması	25
3.2.1.Test prensibi	26
3.3. Fetüslerin Elde Edilmesi, Fiksasyon ve Kesitlerin Hazırlanması	26
3.4. İmmünfloresan Boyama	27
4. BULGULAR	28
5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	38
7. KAYNAKLAR	40
ÖZGEÇMİŞ	45

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1.	Corpus Callosum'un rostro-caudal hattaki görünümü; rostrum, genu, body (truncus) ve splenium.....	5
Şekil 2. 2.	Kallozal aksonların 6 karar noktasının şematik görünümü	9
Şekil 2. 3.	Orta hat glial populasyonlarının şematik görünümü	13
Şekil 3. 1.	Kontrol ve Deney gruplarına ait X 160 büyütme lik görüntüler	29
Şekil 3. 2.	Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.1 A, B'deki fotoğrafların X 400 büyütme lik görüntüleri.....	29
Şekil 3. 3.	Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.2 A, B'deki fotoğrafların DAPI boyası ile boyanmış X 400 büyütme lik görüntüleri	29
Şekil 3. 4.	Kontrol ve deney gruplarına ait X 160 büyütme lik görüntüler	30
Şekil 3. 5.	Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.4 A, B'deki fotoğrafların X 400 büyütme lik görüntüleri	31
Şekil 3. 6.	Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.4 A, B'deki fotoğrafların X 400 büyütme lik görüntüleri	31
Şekil 3. 7.	Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.6 A, B'deki fotoğrafların X 400 büyütme lik görüntüleri	32
Şekil 3. 8.	Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.7 A, B'deki fotoğrafların DAPI boyası ile boyanmış X 400 büyütme lik görüntüleri	32

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CA	commissura anterior
CC	corpus callosum
CH	commissura hippocampi
CI	capsula interna
CCA	corpus callosum agenezi
CCpn	corpus callosum projeksiyon nöronu
DCC	deleted in colorectal cancer
E	embriyonik gün
FAS	fetal alkol sendromu
FASD	fetal alcohol spectrum disorder
FSC	fissura sagittalis cerebri
FGFR1	fibroblast growth factor receptor 1
GAP-43	growth associated protein-43
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GW	glial wedge
IG	indusium griseum
IGG	indusium griseum glia
LT	lamina terminalis
MC	massa commissuralis
MSS	merkezi sinir sistemi
MZG	midline zipper glia
MARCK	myristoylated alanine-rich C kinase substrate
NK	neokorteks
NFI	nuclear factor 1
P	postnatal gün
PAR	paraphysis
PKC	protein kinaz C
Robo	roundabout
SHH	sonic hedgehog homolog
TA	talamik akson
VL	ventriculus lateralis

ÖZET

Prenatal Etanol Uygulamasının Corpus Callosum Oluşumunda Rol Oynayan Kilit Akson Büyüme Proteinlerinden GAP-43 Ekspresyonu Üzerine Etkisi

Corpus callosum (CC) beyinde iki serebral hemisferi birbirine bağlayan en geniş komissural yoldur. Corpus callosum'u oluşturan komissural aksonlar bir beyin hemisferindeki neokorteksin ilgili tabakalarındaki nöronlardan ve singulat korteksteki nöronlardan başlayıp karşı hemisferdeki hedef inervasyon noktalarına doğru oldukça uzun ve karmaşık bir yoldan geçmektedirler. Kallozal aksonlar bu yol boyunca hücre içi ve hücre dışı kaynaklı ipuçlarını takip ederek, bazı ara hedef bölgelere uğramakta ve buradaki etkileşimler sonucunda doğru yollarını bulmaktadırlar. Bu safhalardaki herhangi bir aksaklık CC anomalilerine sebep olabilmektedir. Aksonların doğru yönünü bulmada, hücre içi kaynaklı etkenlerden bir tanesi de akson terminallerindeki büyüme konilerinde eksprese edilen GAP-43 proteindir. GAP-43 proteininin ekspresyonu, akson büyüme konilerinde bulunan filopodia ve lamellopodialarda aksonun uzamasında etkili olan F-actin'in modülasyonunu sağlamaktadır.

Etanol, kullanımı bütün dünyada oldukça yaygın olan toksik bir ajandır. Hamilelik süresince alkol kullanan kadınların çocuklarında davranış bozukluğu ve nöropsikiyatrik problemlere karşı yatkınlık olduğu bildirilmiştir. Etanolün CC'da agenezi veya disgenezi yaptığı bilinmektedir. Çalışmamızda, etanol uygulanmış ve uygulanmamış gebe ratlardan 17. embriyonik günde elde edilmiş fetüs beyinlerinde, etanolün CC oluşumu üzerine etkisi olup olmadığının, GAP-43 ekspresyon paterni değerlendirilerek, immunfloresan mikroskopi ile karşılaştırılmıştır. Etanol uygulanmış grupta, kontrol grubuna kıyasla CC oluşumunu sağlayan kallozal liflerin gelişiminin ve corpus callosum oluşumunun etanol uygulamasından olumsuz bir şekilde etkilendiği gösterilmiştir. Sonuç olarak etanolün CC oluşumunu etkilediği immunofloresan mikroskopi ile GAP-43 ekspresyon paterni değerlendirilerek gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Corpus callosum, etanol, GAP-43, rat, immunofloresan mikroskopi

ABSTRACT

Effect of Prenatal Ethanol Exposure on Expression of GAP-43 Which is an Important Axon Guidance Protein in Corpus Callosum Formation

Corpus callosum (CC) is the largest commissural pathway interconnecting the two cerebral hemispheres. Commissural axons which take origin from the neocortical and cingulate neurons and project to the innervation areas of the contralateral hemisphere have a long and complicated navigation. Along this navigation callosal axons find their correct path by following intracellular and extracellular cues and interactions at some relay stations. Any fault at these steps can cause CC anomalies. GAP-43, one of the proteins expressed on the growth cones of the axon terminals is effective in the correct pathfinding as an intracellular factor. Expression of GAP-43 modulates F-actin in the filopodia and lamellopodia which are extensions on the growth cones and necessary for axonal elongation.

Ethanol is a toxic agent which is highly consumed worldwide. Predisposition to behavioral defects and neuropsychiatric problems were reported in children of women who consumed alcohol during pregnancy. Ethanol is known to cause agenesis and dysgenesis of CC. In the present study, possible effects of ethanol on CC formation were evaluated by GAP-43 expression pattern on the 17th embryonic day and compared in the ethanol treated and control groups by immunofluorescence microscopy. In the ethanol treated group development of callosal axons and CC formation were affected unfavorably in contrast to the control group. As a conclusion, unfavorable effects of ethanol were shown by evaluation of GAP-43 expression pattern via immunofluorescence microscopy.

Key words: Corpus callosum, ethanol, GAP-43, rat, immunofluorescence microscopy

GİRİŞ

Merkezi Sinir Sistemi (MSS) gelişimi üzerine temel ve klinik bazda birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen halen oldukça bakir bir konudur. Daha spesifik olarak MSS gelişimi boyunca aksonların başlangıç noktalarından asıl hedeflerine nasıl ulaştıkları, bu yol boyunca ne gibi mekanizmalardan etkilendikleri veya ne gibi mekanizmalarda rol oynadıkları, çevre hücrelerle ve çeşitli moleküller ile olan etkileşimlerini içeren “axonal pathfinding” konusunda literatürde henüz yeterli düzeyde bilgi bulunmamaktadır.

Corpus callosum (CC) beyinde iki serebral hemisferi birbirine bağlayan en geniş komissüral yol olup iki beyin hemisferi arasında homotopik ve heterotopik bağlantılar sağlamaktadır. Corpus callosum’u oluşturan komissüral aksonlar bir beyin hemisferindeki neokorteksin ilgili tabakalarındaki nöronlardan başlayıp karşı hemisferdeki hedef inervasyon noktalarına doğru oldukça uzun ve karmaşık bir yoldan geçmektedirler. Kallozal aksonlar bu yol boyunca hücre içi ve dışı kaynaklı ipuçlarını takip ederek birtakım ara hedef bölgelere uğramaktadırlar. Orta hat glial hücre popülasyonları, önemli ara hedef bölgelerdeki çevre yapılar ile karmaşık ilişkileri sayesinde kallozal aksonların bir sonraki hedef noktaya gidebilmelerini veya tam tersine hedeften sapıp anormal bir formasyon göstermelerini sağlayabilmektedir. CC gelişimi ile ilgili yapılacak çalışmalarda, bu komissüral yolun oluşumunda rol oynayan mekanizmalar ve onların nasıl çalıştıklarını gösterebilmek oldukça önemlidir.

Mutasyonel ve genetik çalışmalarda komissür oluşumunda aksonların uygun yollarını bulabilmesi için önemli olan çeşitli çevresel etkenlerin ortaya çıkarılmalarının yanında aktin regülasyonunun da önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Böylece, F-actin bağlayan proteinlerin delesyonunun komissür oluşumunu önlediği belirtilmektedir. Böylece, yönlendirme ipucu reseptörlerinin orta hattı geçmeye çalışan aksonların büyüme konilerindeki hücre iskeleti oluşumlarıyla nasıl bir etkileşime girdikleri çok az anlaşılabilmiştir. Growth associated protein-43 (GAP-43) tek bir kopya genden ibaret olup, protein kinaz C (PKC) için major bir nöronal substrattır ve büyüme tomurcuklarında F-actini modüle eder. Yani, F-actin cevabını düzenleyen GAP-43 ekstraselüler ipuçlarına cevap olarak, fosforilasyonu PKC tarafından gerçekleştirilen,

major büyüme konisi proteinlerinden biridir. Bu mekanizmadaki bir bozukluk CC oluşumunu önleyebilmektedir.

Corpus Callosum Agenezisi (CCA) insanlarda yaklaşık 50 farklı konjenital sendromda görülen bir kusurdur. Yakın zamanda yapılmış neonatal ve prenatal görüntüleme çalışmaları, en az her 4000 yeni doğandan birinde CCA görüldüğünü göstermektedir ve diğer görüntüleme çalışmalarında da nörogelişimsel kusurlara sahip bireylerin yaklaşık %3-5'inde CCA gözlenmiştir. Corpus callosum malformasyonları bu yapının, total agenezisi, parsiyel agenezisi (CC'nin sadece rostral veya kaudal parçasının gelişmemiş olması) ya da hipoplazisi şeklinde gözlenebilir. Total veya parsiyel CCA'nin büyük olasılıkla kallozal gelişimin erken safhalarındaki genetik, bulaşıcı, vasküler veya toksik vb. etkiler nedeniyle bozukluklardan kaynaklandığı belirtilmektedir. CCA görülen bazı bireylerin zeka katsayıları (intelligence quotients) normal sınırlar içinde bulunmakla birlikte yakın zamanda yapılan araştırmaların ışığında, bu bireylerin davranış bozukluklarına ve nöropsikiyatrik problemlere karşı eğilim gösterdiği gözlenmiştir. Bunlara bağlı olarak, CCA görülen kişilerde öğrenme güçlükleri, dil ve sosyal iletişim problemleri, uyuma düzensizlikleri gibi bozukluklar ortaya çıkabilmektedir.

Etanol bütün dünyada kullanımı çok yaygın toksik bir maddedir. Etanol özellikle anneler tarafından kullanıldığında fetüsün gelişimi üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Etanol'un MSS üzerine etkileri ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma yer almaktadır. Prenatal alkol maruziyeti MSS gelişiminde birçok olumsuz etkiler yapmaktadır. Otuz yıldan fazladır sürdürülen klinik insan araştırmaları, gebelik sırasında alkol kullanımının kalıcı davranışsal, sosyal ve kognitif beyin hasarlarına yol açtığına dair doğrudan kanıtlar sunmaktadır. Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD) grubuna giren denekler üzerine yapılan kantitatif manyetik rezonans görüntüleme çalışmalarında, CC anomalileri, vermis cerebellaris'in ön kısımları ve bazal ganglion küçülmeleri, assosiasyon korteksinde belirli bölgelerde gri cevher yoğunluğunun azalması gibi kesin yapısal anomaliler rapor edilmiştir.

Gelişmekte olan fare beyninde, embriyonik 15. günde ((E)15) orta hat glial popülasyonlarının gelişiminin gerçekleştiği ve bu embriyonik günde GAP-43 ve FGFR-1 gibi önemli moleküllerin işlev gördüğü bilinmektedir. Hemen ertesinde, (E)16'da, kallozal aksonların CC'ü oluşturmak üzere orta hattı geçtiği yapılan çalışmalarda

gösterilmiştir. Ratlarda ise CC'ü oluşturacak kallozal lifler orta hattı (E)17'de geçmektedirler. Fakat literatürde farelerde (E)15'de orta hat glial populasyonlarının oluşumunda önemli rolü olduğu bilinen GAP-43 molekülünün, ratlarda aynı embriyonik döneme denk geldiğini düşündüğümüz (E)17'deki işlevi hakkında tatmin edici ve spesifik bir bilgi bulunmamaktadır.

Bunun yanında yine farelerde yapılan çalışmalarda daha önce bahsedildiği üzere, GAP-43 molekülünün yoksunluğunda CC da dahil major ön beyin komissürlerinin gelişmediği gösterilmiştir. Ayrıca literatürde, ratlarda yapılan alkol çalışmalarında, (E)6-21 arası prenatal alkol uygulamasının, CC agenezisi ile sonuçlanabildiğine dair tatmin edici bilgiler bulunmaktadır.

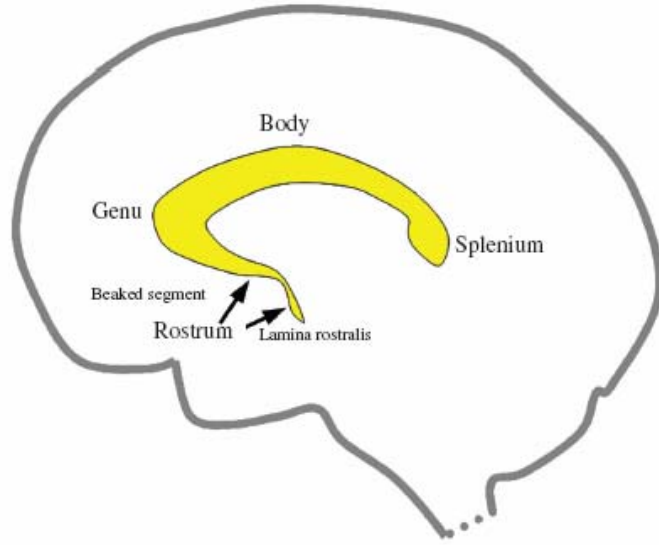
Bu çalışmada, yukarıda bahsedilen mevcut bilgiler ışığında, (E)6-17 arası alkol uygulanan ve aynı dönemde hiç alkol uygulanmayan (E)17'ye ait fetus beyinlerinin, CC'larının ön kısmının gelişeceği seviyeden elde edilen ve GAP-43 molekülü için işaretlenmiş koronal kesitlerinde immunfloresan yöntemi ile, karşıya geçip CC'ü oluşturacak olan liflerin paterni iki grup arasında karşılaştırılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ile CC oluşumuna etki ettiği bir çok çalışmada kanıtlanmış olan etanolün, CC gelişiminde etkili bir çok mekanizmadan birisi olan GAP-43 ile ilgili mekanizma üzerine etkisi olup olmadığı ortaya çıkarılmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Corpus Callosum Anatomisi

Corpus Callosum beyinde iki cerebral hemisferi birbirine bağlayan en geniş komissural yoldur. Fissura longitudinalis cerebri'nin tabanını ve ventriculus lateralis'lerin büyük bir kısmının tavanını oluşturan corpus callosum, yaklaşık 8 cm uzunluğundadır. Corpus callosum'a ait lifler laterale doğru gittikçe yelpaze şeklinde açılarak (radiatio corporis callosi) cortex cerebri'nin çeşitli bölgelerine gider. Esas fonksiyonu, beyinde sağ ve sol hemisferdeki eş alanlar arasında bağlantılar kurarak hemisferler arasında bilgi alışverişini ve koordinasyonu sağlamaktır. Corpus callosum, bir hemisfere ulaşan bilginin diğer hemisfere iletilmesinde rol oynayan en büyük ve önemli yoldur.

Corpus callosum önden arkaya doğru rostrum, genu, truncus ve splenium olmak üzere dört kısma ayrılır (Şekil 2.1). Rostrum'u oluşturan lifler her iki lobus frontalis'in orbital yüzlerini, genu'yu oluşturan lifler ise öne doğru kıvrılarak her iki lobus frontalis'in çeşitli kısımlarını birbirine bağlar. Genu'yu oluşturan liflerin meydana getirdiği kıvrıma forceps minor (forceps frontalis) adı verilmektedir. Corpus callosum'un truncus kısmından geçen lifler laterale doğru, splenium kısmından geçen lifler ise arkaya doğru uzanarak iki hemisfer arasında yoğun bağlantılar sağlar. Splenium'u oluşturan lifler mediale doğru bir seyir takip ederek her iki lobus occipitalis'in içerisine girer; bu liflerin meydana getirdiği kıvrıma forceps major (forceps occipitalis) adı verilmektedir. Truncus ve splenium'dan ayrılan liflerin bir kısmı ventriculus lateralis'in cornu inferius'unun lateral duvarını, cornu posterius'un ise tavanını ve lateral duvarını meydana getirir. Ayrıca cornu posterius'un lateral duvarını radiatio optica'dan ayrılan bu liflere tapetum adı verilmektedir (1).



Şekil 2.1 Corpus Callosum'un rostro-caudal hattaki görünümü; rostrum, genu, body (truncus) ve splenium (Richards ve ark., 2004) (2).

2.2. Corpus Callosum'un Fonksiyonu

Beynin karmaşıklığı yaptığı bağlantılardan kaynak alır. Bu, primat evrimi boyunca orantısız bir biçimde artan beyaz cevher hacmi ile karakterize edilir. Beyindeki en geniş birleştirici yapı olan CC, iki serebral hemisfer arasında bilgi aktarımı sağlayan 190 milyonun üzerinde akson içerir (1). Esas fonksiyonu, beyinde sağ ve sol hemisferdeki eş alanlar arasında bağlantılar kurarak hemisferler arasında bilgi alışverişini ve koordinasyonu sağlamaktır. Corpus callosum, homotopik ve heterotopik olan interhemisferik bağlantılar sağlar. Bu bağlantıların, tamamlayıcı (hemisferler arası bilgi birleştirici) ya da engelleyici (birbirinden bağımsız olan fonksiyonların yükseltilmesi için hemisferlerin birbirlerini inhibe etmesini sağlayan) oldukları konusunda tartışma olmasına rağmen, bağlantılar birincil olarak tamamlayıcı olarak görülmektedir ve bu interhemisferik transfer ile ilgili birçok çalışmanın odak noktasıdır (3).

2.3. Corpus Callosum'un Gelişimi

Sinir sistemi, embriyogenezin erken evresinde homojen bir ektoderm kılıfının önce katlanarak bir tüp oluşturması ve daha sonra beyin ve medulla spinalis'i oluşturmak üzere hem rostro-kaudal ekseninde hem de dorso-ventral ekseninde

farklılaşması ile oluşmaya başlar. Sınırlı bölgelerde bulunan genlerin ekspresyonları tütün hangi bölgelerinin hangi spesifik yapılara farklılaşacağını ve sinir sistemi dahilindeki hücre tiplerini belirler. Aynı kalıp genetik olaylar, ayrıca sinir sistemi orta hattı oluşumunu da regüle eder (2).

Önbeyinde bulunan tüm komissürlerin gelişimi için doğru bir orta hat oluşumu oldukça önemlidir. Önbeyin ilk başta, prosencephalon adı verilen tek bir vezikül içerir. Prosencephalon oluşumundan kısa bir süre sonra, bu tek vezikülün her iki yanında hücrel proliferasyon ve migrasyon yoluyla her iki telensefalik hemisferi oluşturacak olan tomurcuklar oluşur. Prosencephalon'un rostral bölgesi lamina terminalis (LT) olarak adlandırılır ve komissural tabakayı ya da lamina reuniens'i (LR) içerir (4). Lamina terminalis'in rostralinde lokalize olan Midline Glia (MG), orta hattı birbirine bağlayan, insanlarda büyük ihtimalle massa commissuralis'in dengi olan dorsal interhemisferik fissür içerisinde hücrel devamlılık gösteren bir bölgedir. Corpus callosum, kortikoseptal sınırda, serebral korteksin dorso-medial bölgesinde oluşmaktadır (3,4).

Önceleri, ilk olarak CC'un truncus parçasının oluştuğu ve bunu, öne ve arkaya doğru gerçekleşen genişlemelerin takip ettiği düşünülmekteydi (4). Fakat ayrıntılı Magnetic Resonance Imaging (MRI) çalışmaları, CC'un insan gelişimi sırasında rostro-kaudal ekseninde oluştuğu şeklinde yeni bir anlayış kazandırdı (6,7). Bu çalışmalar, gelişimin erken safhasında, CC'un rostral olarak rostrumun lamina reuniens (LR) bölgesinden ve kaudal olarak fornix tarafından geliştiği hakkında tatmin edici kanıtlar sağlamaktadır. Daha sonra gelişecek ilk bölgeler ise LR ve direkt olarak fornix/commissura hippocampi üzerinden geçecek olan CC'un truncus parçasının ön bölgeleridir (7).

6-8 haftalık, 15-30mm boyutundaki insan embriyolarında, kiazmatik plağın önünde konumlanmış olan telencephalon'un ince rostral duvarı, ventralde kiazmatik plağın hemen yakınında, ince bir şekilde kalıp LT'yi temsil ederken, paraphysis'in (PAR) yakınında konumlanmış olan daha çok dorsal kısımları ise hızlı bir hücrel artış ile kalınlaşma gösterir. Kalınlaşmış, hücrel yoğunluğa sahip dorsal kısım lamina reuniens'i temsil eder. Lamina reuniens gelişimin ilerlemesi ile area praecommissuralis'e dönüşür. Bu ise daha sonra area septalis'i oluşturacaktır. Bu oluşan area septalis'in içinde gömülmüş olarak commissura anterior gelişecektir (4).

8-11 haftalık 25-50 mm boyundaki embriyolarda, LR oldukça hücresel bir yoğunluğa sahip, ganglionik çıkıntılara midsagittal hatta hiçbir sınır olmadan bağlanan homojen bir hücre kitlesi görünümündedir. Bu median hücre kitlesi telencephalon impar ya da telencephalon medium'u temsil eder. Bu erken evrede LR'de midsagittal hattı geçen hiçbir lif bulunmaz. Lamina reuniens'in dorsal bölümünün primordium hippocampi olarak isimlendirilmesi, bu bölgede primordia fornix denilen fornix taslaklarının oluşmaya başlaması ile olur. Bunlar sağlı sollu birer tane olup, serebral hemisferlerin medial yüzünde erişkindeki seyirlerine benzer olarak kıvrılmaya başlarlar. Bu taslaklar 9 haftalık embriyoda dahi gözlenebilir. Onbir haftalık embriyolarda ise yine bu bölgede commissura hippocampi belirmeye başlar. Primordium hippocampi bölgesinde bu dönemde bile CC ve septum pellucidum'a ait bir gelişme gözlenmez (4).

Gelişimin daha ileri evrelerinde sulcus mediana telencephali medii, dejenere hücre kitleleri ile dolarak massa commissuralis (MC) adı verilen bir yapıyı oluşturur. Massa commissuralis hemisfer veziküllerinin izokortikal tabakalarından CC'a ait, henüz gelişmemiş olan komissural lifler için bir taslak görevi görür (4).

11-12 haftalık 50-60 mm boyutundaki embriyolarda, CC'un muhtemel öncü lifleri primordium hippocampi içindeki massa commissuralis'in hücresel yatak kısmına doğru penetre olmaya başlarlar. 12-13 haftalık 60-80 mm boyundaki embriyolarda, hızla büyüyen kallozal lifler, commissura anterior'dan farklı ve bağımsız olan eksiksiz kallozal komissural tabakayı oluşturur (4).

13-15 haftalık 90-100 mm boyundaki embriyolarda, primordium hippocampi'deki hücre proliferasyonu ve dejenere olmuş yapılar kaybolur ve 18-20 haftalık 140-160 mm boyundaki embriyolarda, erişkin beyinde bulunandan rostro-kaudal uzunluğu dışında farklı bir pozisyonda olmayan bir CC formu oluşmuş durumdadır (4).

2.4. Kallozal Projeksiyonların Gelişimi

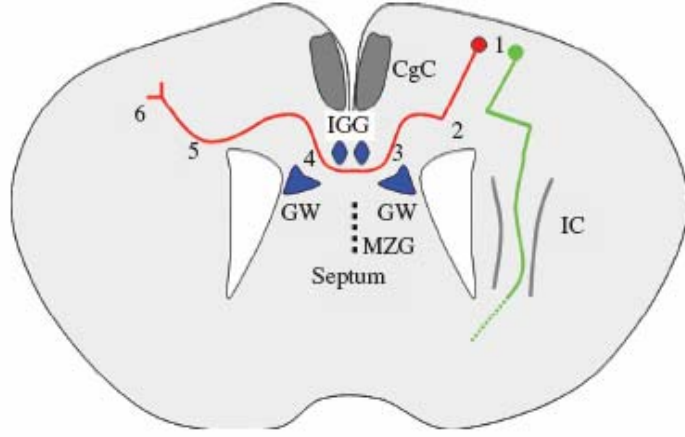
Serebral korteks altı hücresel tabakadan oluşmaktadır. CC boyunca karşıdan karşıya geçen major projeksiyon lifleri 2.,3. ve 5. tabakalardaki nöronlardan kaynak alır. Richards ve ark. (2004) farelerde, kallosal projeksiyon yolunun daha iyi tarif edilebilmesi için, bu yolu birbirinden farklı 6 önemli karar noktasına ayırmıştır (Şekil 2.2). Her bir katmandaki nöronlar, aksonları ventral olarak ara bölge adı verilen alana

doğru yönlendirmek üzere, marjinal bölge adı verilen alandan uzaklaştırmaktadırlar (1. karar). Sema3A gibi yol gösterici faktörlerin etkisinde, ventral yönde aksonlarını gönderirler. Bu aksonlar ara bölgeye ulaştıkları zaman laterale doğru gitmek yerine orta hatta doğru yönlendirler (2. karar). Bu karar noktası, kallosal aksonları laterale yani capsula interna'ya (CI) yönlendirecek olan subkortikal aksonlardan ayrıldığı noktadır (2).

Günümüzde bu farklılaşma kararının nasıl yapıldığı hakkında çok az şey bilinmektedir. Fakat aksonlar, bu karar noktasında etraf yapılarından etkilenmemek ve dolayısıyla farklı bölgelere yönelmeyi engellemek için, kendilerini soyutlamak amaçlı bölünerek ve medial ya da lateral uzantılar göndererek buldukları bölgeden kendilerini sınırlarlar. Zaten bu geçici bir karar olduğundan, aksonlar orta hattı geçtiğinde ve CI'ya ulaştığında, projeksiyonu sağlayacak pek az nöron bulunmaktadır. Kallosal aksonlar daha sonra singulat kortekse doğru uzayarak orta hatta yaklaşır. Aksonlar orta hatta dik olacak şekilde yaklaşır ve daha sonra aniden kortikoseptal sınırdan orta hattı geçmek için dönerler (3. karar noktası) (2).

Kortikoseptal sınırdan aksonlar, glial wedge (GW) ve indusium griseum (IG) olarak bilinen orta hat glial yapıları ile karşı karşıya gelirler. Aksonlar orta hattı geçtikten hemen sonra, kontralateral singulat kortekse ve daha sonra da kontralateral neokortekse (NK) girmek için dorsal yönde bir dönüş yaptıkları yer (4. karar) olan karşı hemisferdeki GW ile karşılaşır. Aksonlar kontralateral neokorteks içerisinde uzanırken inerve edecekleri hedef neokorteks alanını belirlerler (5. karar) (2).

Kallosal aksonların, kendilerine özel kontralateral kortikal alanı nasıl belirledikleri hakkında çok az şey bilinmektedir, fakat görünüşe göre, talamik aksonların (TA) kortikal hedef alanlarını bulmak için kullandıkları ipuçlarının benzerlerini kullanmaktadırlar. TA'lar, ventral önbeyini terk ettikleri zaman, hem köken aldıkları spesifik talamik nukleusun rostrokaudal yerleşimi sayesinde, hem de önbeyinde eksprese edilen, bu rostrokaudal projeksiyonun sürekliliğini sağlayan moleküller sayesinde bölgesel olarak sıralanırlar. Fakat TA'lar kortekse girdikleri zaman son hedef noktalarının lokalizasyonunu belirlemeye ihtiyaçları vardır ve büyük ihtimalle kortekste bölgesel olarak eksprese edilen molekülleri tanıyarak lokalizasyonu gerçekleştirirler (2).



Şekil 2.2 Kallozal aksonların 6 karar noktasının şematik görünümü (Richards ve ark., 2004) (2).

Corpus callosum, kortikoseptal sınırdaki, serebral korteksin dorsomedial bölgesinde gelişir (6). Bu yüzden, bu noktada (commissura hippocampi'nin rostralinde) orta hattı geçecek olan ilk aksonlar, bu yeni oluşan hüresel bölgede bir akson traktusuna öncülük ederek iki serebral hemisfer arasında çaprazlaşırlar (2).

Corpus callosum'u oluşturacak aksonların büyük bir kısmının neokorteksteki nöronlardan köken aldığı (8-10), fakat singulat koreksteki nöronların da CC'a öncülük ettiği gösterilmiştir (11). Rodentlerde orta hattı geçecek ilk neokortikal aksonlar rostrolateral neokorteksteki nöronlardan köken alırlar (12,13). Neokortikal aksonların, farede yeni oluşmakta olan CC'un projeksiyonunu sağlayan ilk aksonlar olduğu kabul edilmekteydi (13). Bu sebeple, CC'un öncülüğünün singulat aksonlar mı yoksa neokortikal aksonlar tarafından mı yapıldığı konusunda literatürde bir anlaşmazlık bulunmaktaydı (2).

Öncü aksonların, daha sonra gelişen ve hedeflerine doğru gitmekte olan aksonlara rehberlik ettikleri birçok canlı grubunda yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Omurgasızlarda (14-16), kurbağada (17), zebra balığında (18,19), tavukda (20), farede (21), ratta (22) ve kedide (23) öncü aksonların corpus callosum ile ilişkisi gösterilmiştir. Bu birçok türün araştırılmasında, araştırmacılar şu soruyu sormuşlardır, "Öncü aksonlar, daha sonra oluşacak aksonların gelişimi için gerçekten gerekli midir?" (2).

Bu soru, çekirge (16) ve zebra balığı (18) gibi daha basit canlılarda, öncü akson popülasyonlarının hem beyin-şoku tedavisi, hem de lazer ablasyon yöntemi ile spesifik olarak çıkartılması çalışmalarıyla cevap bulmuş oldu. Bu deneylerde, daha sonra gelişen aksonların kendi büyüme yollarını düzgün bir biçimde takip edemedikleri ve normal

hedeflerini inerve edemedikleri gözlenmiştir. Bu nedenle, öncü aksonlar sinir sisteminin düzgün olarak oluşabilmesi için gereklidir (2).

Memelilerde, kortikotalamik projeksiyonların öncülüğü, neokorteksin capsula interna'ya doğru giden ilk neokortikal aksonların geliştiği "subplate" adı verilen alt tabakasındaki nöronlar tarafından yapılır (22,23). Subplate çıkartma çalışmaları; subplate aksonlarının, hem kortikotalamik hem de talamokortikal yolların gelişimi için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, subplate öncü aksonları thalamus ve cortex arasındaki bağlantıların kurulmasına yardımcı olmaktadır (26,28). Subplate aksonlarının, laterale capsula interna'ya doğru devam eden neokortikal aksonların doğru yönlendirilmesinde kritik role sahip olmasına rağmen, CC'ü oluşturmak üzere mediale doğru devam eden neokortikal aksonların yönlendirilmesinde bir role sahip olmadığı görülmüştür (13,15,26).

Rostral kortikal (commissura hippocampi'nin rostralinde) orta hattı geçecek ilk aksonlar capsula interna'daki nöronlardan köken alırlar (13). Bu aksonlar orta hattı geçmeye ratlarda 17. embriyonik günde (E)17, farelerde ise (E)15.5'da başlarlar. Singulat aksonların kontralateral kortikal hemisfere doğru projeksiyon oluşturup oluşturmadıkları ve bunu neokortikal aksonlardan daha önce yapıp yapmadıkları daha önceleri çözülememişti (29).

Ozaki ve Wahlsten (1998), singulat aksonların CC'a öncülük etmediğini, çünkü kontralateral kortekse doğru projeksiyon göstermedikleri, bunun yerine commissura hippocampi'ye doğru projeksiyon gösterdiklerini ileri sürmüşlerdir. CC'un kaudal kısımlarının, commissura hippocampi ile birbirlerine yakın bir mesafede geliştikleri için böyle bir karışıklığın mümkün olabileceği düşünülmüştür (29,30). Geçmişte bu yol ancak tek bir projeksiyonun izolasyonunu sağlayabilen retrograd işaretleme tekniği ile araştırılmıştır. (11,13).

Rash ve Richards (2001), gelişim sırasında capsula interna'ya ait aksonal projeksiyonları araştırmak için anterograd işaretleme tekniği kullanmışlardır. Ayrıca, capsula interna'ya ait aksonlarının CC için öncü bir yol oluşturmak üzere orta hattı neokortikal aksonlardan daha önce geçip geçmediğini gösterebilmek için her iki yöntemi de kullanmışlardır. Corpus callosum boyunca aksonlarını gönderecek olan neokortikal nöronlar rostrolateral neokortekste bulunmaktadır (13). Singulat korteksten başlayacak kallozal projeksiyonun neokortikal aksonlardan önce orta hattı geçtiğini

belirlemek için, singulat kortekste DiI ve rostradorsal neokorteksteki DiA ile fare beyinlerini çift yönlü olarak boyamışlardır. Ayrıca, rostrolateral neocortex'teki nöronları hem anterograd hem de retrograd olarak işaretlemişlerdir. Sonuçlara göre, hiçbir beyinde neokortikal aksonlar orta hattı (E) 16'dan önce geçmemişler ve tüm beyinlerde neokortikal aksonlar oldukça geniş bir singulat akson grubunu takip etmişlerdir. Deneyler sırasında mediale doğru projeksiyon gösteren neokortikal aksonları işaretlediklerinde, ayrıca capsula interna'da retrograd olarak işaretlenmiş, enjeksiyon tarafına doğru rostrolateral olarak projeksiyon gösteren DiA pozitif nöronları fark etmişlerdir. (E)15'de, capsula interna'da bulunan nöronlar rostrolateral neokortekse yapılan bir enjeksiyon ile retrograd olarak işaretlenmişlerdir. Bu sonuca göre, capsula interna'da bulunan nöronlar, ayrıca ters yönde, medial olarak orta hatta doğru projeksiyon gösterecek olan ilk neokortikal nöronlara doğru rostrolateral bir projeksiyon göstermişlerdir. Bu aksonlar rostrolateral neokorteksin ara bölge (intermediate zone) adı verilen bölgesine, ilk neokortikal aksonların orta hatta ulaşmasından en az yarım gün önce ulaşırlar. Rash ve Richard'ın sonuçları, "Capsula interna'dan mediale doğru oluşan projeksiyon lifleri, neokortikal aksonlar için bir öncü yol oluşturur" hipotezini desteklemektedir. Dahası, neokortikal aksonların singulat aksonlara yakın bir pozisyonda büyüyerek ve onları yönlendirici olarak kullanarak orta hattı geçtiklerini gözlemişlerdir (29).

Son olarak, CI'da bulunan nöronların gelişimin erken safhalarında laterale doğru projeksiyon gösterdikleri gözlenmiştir. Bu aksonların rostrolateral neokortekse doğru, neokorteksteki nöronların orta hatta ilk aksonlarını gönderecekleri yere doğru projeksiyon oluşturdukları gözlenmiştir. Neokortikal aksonlar, alternatif olarak lateral projeksiyon gösteren bu singulat aksonları orta hatta ulaşmak için ve medial projeksiyon gösteren singulat aksonları da orta hattı geçmek için kullandıkları gözlenmiştir (29).

2.5. Corpus Callosum Gelişimini Regüle Eden Mekanizmalar

Gelişmekte olan beyinde aksonlar izleyecekleri doğru yolu bulmak için birçok değişik mekanizmayı kullanırlar. Akson sonundaki büyüme konisi adı verilen özelleşmiş uç oldukça hassastır ve çevresindeki çok küçük değişiklikleri bile algılama kabiliyetine sahiptir. Birçok akson yönlendirici molekül tanımlanmıştır ve bunlar difüze olabilen faktörler, hücrenel membranlara veya hücre dışı matrikse bağlanabilen faktörler

olarak ayrılabilir. Her bir grupta, permisif ve supresif (büyümeyi baskılayan fakat, aksonu geri itmeyen) moleküller olduğu gibi kimyasal çekici (chemoattractive) ve kimyasal itici (chemorepulsive) moleküller vardır (2).

Aksonlar, çoğunlukla son hedeflerine ulaşmak için oldukça uzun bir yol katetmek zorundadırlar ve kallozal aksonlar bunun için çok iyi bir örnektir. Bunun için, son hedef noktasının tek başına bir yönlendirici molekül kaynağı olması hiç pratik değildir. Sinir sisteminin bu durumla baş etmek için, son hedefe kadar olan bu uzun yolu, ara hedefleri devreye sokarak gerekli bir biçimde daha küçük ve kontrol edilebilir parçalara böler. Bu ara hedefler, aksonları belirli bir noktaya doğru yönlendiren ve daha sonrada onları bir sonraki ara hedefe iten yönlendirici faktörlerin ekspresyonunu gerçekleştirirler. Orta hat, bir ara hedef noktasıdır ve sinir sistemine ait komissürlerin oluşumu için özellikle orta hat glial hücre popülasyonlarının ekspresyonunu yaptığı moleküller nedeniyle kritik bir role sahip olduğu gösterilmiştir (2).

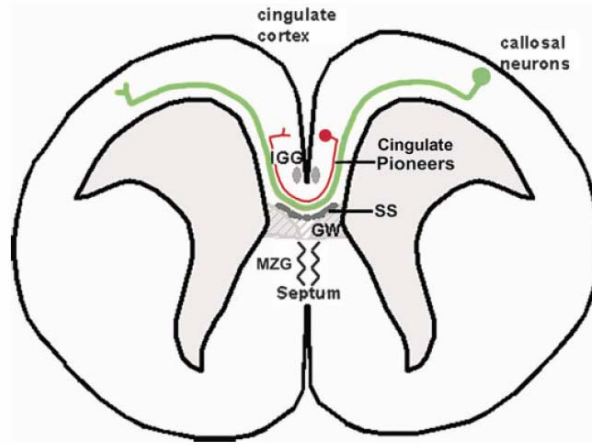
2.6. Glial Gelişim ve Komissür Oluşumu

Orta hat gliasının, meyve sineğinden memelilere kadar uzanan geniş bir yelpazede orta hat komissürlerinin regülasyonunu yaptığı bilinmektedir. Memeli sinir sisteminde, orta hat glial yapıları komissürlerin oluşumu için oldukça gereklidir. Özellikle, glial bir yapıda olan taban plağı, medulla spinalis'teki dorsal duyu nöronlarına ait komissural aksonların oluşumu için yönlendirici ipucu moleküller salgılar. Chiasma opticum'un retinal ganglion hücre aksonlarını yönlendirecek glia ve commissura anterior ile ilişkide olan glial tünel, sinir sisteminde komissural projeksiyonların oluşumu için oldukça önemli olan, orta hat glial yapılarıdır. Daha fazlası ise, insana kadar olan evrimsel süreçte, sadece bu orta hat glial yapıları korunmakla kalmayıp, onların komissural aksonlarını yönlendirmek için eksprese ettikleri moleküller de korunmuştur (2).

Orta hat gliası, ayrıca CC oluşumu için de gereklidir. Glial wedge (GW) adı verilen ve adını kama şekline benzemesinden alan gliyal hücre popülasyonu izole edilebilmiş ve in-vitro olarak Slit 2 gibi kallozal aksonların orta hattı geçmesi için şart olan moleküllerin ekspresyonunu gerçekleştirdiği gösterilmiştir. GW, serebral korteksin radial-gliyal iskeletininin bir parçasıdır ve RC2, BLBP ve GLAST gibi radial-gliyal hücre markırlarının ekspresyonunu sağlar. Öyle ki, GW üç ayırt edici özelliğe sahiptir; (i)

rostral kortekste, prototipik glial markırı olan glial fibrillary acidic protein’i (GFAP) eksprese eden ilk hücre grubudur; (ii) Slit 2 gibi önemli yönlendirici moleküllerin ekspresyonunu gerçekleştirmektedir (iii) ventriküler ucunu geri çekmeden önce pial ucunu geri çeker ki, bu da GW’in kama şeklini nasıl koruduğunun yanıtı olabilir (2).

Glial hücre topluluğuna ait, indusium griseum glia (IGG) ve midline zipper glia (MZG) adı verilen diğer iki populasyon yine orta hatta oluşurlar, fakat GW gibi radial-glial iskeletin bir parçası değildirler. Farede, orta hat birleşimi yaklaşık olarak (E)14-(E)15 arasında gerçekleşir ve bu bölgede MZG tarafından eksprese edilen moleküller aracılığı ile gerçekleşir. Aksonların büyümesi ve daha fazla uzaması için bir substrat bulunmaması durumunda orta hattı geçemeyecekleri için orta hat birleşimi CC oluşumu açısından oldukça önemlidir (2).



Şekil 2.3: Orta hat glial populasyonlarının şematik görünümü. (Ren. ve ark., 2006) (30).

Gelişmekte olan CC’un dorsalinde konumlanmış olan IGG’nın, Slit 2’nin ekspresyonunu gerçekleştirmesinin yanı sıra, orta hattı geçmeye yakın olan komissural aksonların yönlendirilmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (8).

Yakın zamanda yapılmış, bir “Conditional fibroblast growth factor receptor/glial fibrillary acidic protein (FGFR1/GFAP) knockout fare çalışması, IGG’nın CC oluşumu için oldukça önemli olduğunu göstermektedir. FGFR1 seçici olarak gliadan (nöronlardan değil) elendiği zaman, CC oluşumunun gerçekleşmediği gösterilmiştir (3).

2.7. Orta Hat Glial Yapılarının Zedelenmesi ile Beyinde Komissural Bozuklukların Gözlenmesi

Transkripsiyon faktörü olan Nuclear Factor 1 (NFI) ailesi orta hat glial gelişimini regüle eder. Nfia ve Nfib knock out fareler, orta hat bozukluklarına ek olarak akallozal bir fenotip gösterirler. NFI ailesine ait transkripsiyon faktörleri GFAP promotor bölgelerine bağlanırlar ve böylece GFAP'ın ekspresyonunu regüle ederler. Dahası, rat kortikal haberci hücrelerinde, NFI genleri GFAP aracılı astrosit farklılaşmasını regüle ederler. Hem Nfia, hem de Nfib mutantlarında orta hattaki GFAP ekspresyonunda düşüş gözlenmiştir. GFAP'ın glial oluşumunu direkt olarak regüle etmesine karşıt bir kanıt olarak, GFAP knockout farelerde, glial gelişim veya komissur oluşumunda bozukluklara rastlanmamıştır (31).

2.8. Orta Hat Glial Yapılarda Fibroblast Growth Factor (FGF) Sinyal Yolunun Önemi

Bazı çalışmalarda, orta hat glial yapılarındaki zedelenmelerin memeli önbeyin komissürlerinde kusurlara yol açtıkları gösterilmiştir. Fibroblast growth factors (FGFs) sinyal yolu, orta hat glial oluşumu ve komissur oluşumunda oldukça önemlidir. Birbirinden bağımsız iki farklı çalışmada, beyin spesifik FGFR1'e glial spesifik FGFR1'den yoksun farelerde, CC da dahil olmak üzere major komissural traktuslarda bozukluklar gözlenmiştir. Kallozal aksonlarda orta hattı geçerken gözlenen bu bozukluklar, orta hatta glial popülasyonlarda meydana gelen çarpıcı kusurlar ile ilişkilidir. GFAP boyama çalışmaları, FGFR1 delesyonunun, GW, IGG ve MZG gibi oldukça önemli glial popülasyonlarda kayıplara yol açtığını ortaya çıkarmıştır. Radial gliadaki somatik translokasyona yapılan müdahaleye bağlı olarak IGG'nin eksikliği, bir takım anahtar yönlendirici moleküllerin kaybına veya azalmalarına sebep olur. Orta hattı geçecek olan komissural aksonlarda gözlenen bozulmalar, bu anormal formasyonun bir sonucu olarak görülebilmektedir (31).

Özetle, bir takım yönlendirici olayların kallozal oluşum için kritik bir role sahip olduğu gösterilmiştir. Bunlar, orta hat glial yapılarının ve yönlendirici akson popülasyonlarının oluşumu ve bu yapılar tarafından eksprese edilen moleküllerin neokortikal kallozal aksonlar ve onları yönlendiren aksonlar ile olan etkileşimleri olarak görülmektedir (31).

2.9. Komissural Aksonların Yönlendirilmesi

Uzun mesafede etkili difüze olabilir faktörlerin, on seneden fazladır MSS'deki olgunlaşmamış aksonların orta hatta doğru gidişi ve orta hattan geçişinin yönlendirilmesinde oldukça önemli role sahip oldukları bilinmektedir. Netrinler, Deleted in Colorectal Cancer (DCC), Slit, Roundabout (Robo) proteinler gibi yönlendirici ligandlardan ve onların reseptörlerinden yoksun knockout farelerde, bu moleküllerin komissür gelişimi sırasında oynadıkları temel rol hem vertebralılar hem de vertebrasızlarda gösterilmiştir. Bu klasik akson yönlendirici moleküllere ek olarak, ayrıca Sonic hedgehog homolog (Shh), FGF ve Wnt gibi morfogener, akson yönlendirme için ipuçları ve lokalizasyon sağlamaktadırlar (31).

Daha ileri karmaşıklık, muhtemelen difüze olabilir yönlendirici faktörler ile heperan sülfatlı morfogenerler, chondroitin sülfatlar ve onların çekirdek glikoproteinleri arasındaki etkileşimleri yolu ile gerçekleşir. Heparan ve chondroitin sülfatlar, bu ligandların belirli bölgelerdeki ayırdedici sinyalizasyonu ve tekrar lokalizasyonu sağlarlar. Heparan ve chondroitin sülfatların üretimine katılan enzimlerden yoksun farelerde akson yönlendirme bozuklukları ve birçok komissural lif demetinde hasarlar gözlenmiştir (31).

Ephrin, Neuropilin, Plexin ve Semaphorin gibi aileleri de kapsayan kısa mesafede etkili akson yönlendirici ipuçları, hücre-hücre etkileşimleri için oldukça gereklidir. Bu moleküllerin fonksiyonları bazı canlı sistemlerinde oldukça iyi tarif edilmiştir, fakat ön beyin komissür oluşumunda da rol oynadıkları sadece yakın bir zamandır bilinmektedir (31).

2.10. Komissural Akson Yönlendirilmesine Etki Eden Bazı Önemli Moleküller

Slitler, vertebrasız sinir kordu orta hattında ve memeli medulla spinalis'inin tavan plağında eksprese edilen, orta hattı zaten geçmiş bulunan komissural aksonların tekrar karşıya geçmelerini önleyen kimyasal-itici ligandlardır (31). Slit genleri, akson dallanmasını, komissural akson yol buluculuğunu ve nöronal migrasyonu düzenleyen salınabilir ligandlar kodlamaktadırlar (32). Tanımlanmış başlıca Slit reseptörü Roundabout (Robo) protein ailesidir. Drosophila sinir kordunda ve memeli medulla spinalis'inde, Robo ekspresyonunu, orta hat geçişinden sonra regülasyonu artırılarak (komissural büyüme uçlarının Slit'e karşı oldukça hassas olduğu zaman) aksonların orta

hattı geri geçmelerini önlediği gösterilmiştir (33-37). Fakat beyin komissural ve çaprazlaşan aksonları, corpus callosum, chiasma opticum ve tractus corticospinalis de dahil olmak üzere, orta hattı geçmeden önce ve geçtikten sonra Robo ekspresyonunu gerçekleştirmektedirler ve Slit 2'ye cevap oluşturmaktadırlar (37-39). Bu yüzden, büyük ihtimalle Slit 2'nin sineklerde ve medulla spinalis orta hattında gözlenen farklı bir rolü olabilir, çünkü beyin komissural aksonları orta hattı geçtikten sonra, spinal komissural aksonlar gibi orta hatta yakın bir mesafede büyümek yerine, orta hattan uzaklaşarak büyümeye devam ederler (31).

Slit proteinleri ayrıca birçok geniş önbeyin traktusunun gelişimi için de oldukça önemlidir. Slit 2, Slit 1 ve her ikisinden de yoksun farelerde, kortikofugal, kallozal ve talamokortikal traktuslar da dahil olmak üzere bir çok yolda önemli akson yönlendirme bozuklukları gözlenmiştir. MSS'ne ait birçok traktusa ait analize göre ve Slit proteinlerinin fonksiyonu hakkındaki birçok genellemelerin ışığında, Slit'lerin görülen etkileri; (i) ventral bölgelere doğru aksonal büyümenin engellenerek dorsal pozisyonun korunması (ii) orta hatta doğru olan aksonal uzamanın engellenmesi (iii) aksonların özel bölgelere doğru kanalize edilmesi olarak sıralanmıştır (38).

Netrinler, gelişmekte olan memeli medulla spinalis'inde, komissural aksonları, dorsal medulla spinalis'ten ventral taban plağına doğru uzun mesafede etkileyerek yönlendirme yapan tanımlanmış ilk ipucu moleküllerdir (40,41). Kallozal aksonlar, nöral gelişim boyunca Netrin reseptörü olan DCC'yi eksprese ederler, fakat Netrin 1 knockout farelerde bütün önbeyin komissural projeksiyonlarının, agenezi görülmesine rağmen, orta hatta doğru Netrin'ler tarafından yönlendirildikleri hakkında doğrudan bir kanıt bulunmamaktadır (43).

Yakın zamanda elde edilmiş bir kanıtı göre, medulla spinalis taban plağından salınan bir Netrin proteini potansiyelinin olduğu saptanmıştır. Ek bir takım, çekici ipucu moleküller komissural aksonlar için yönlendirici olarak görev yapabilmektedir. Taban plağından eksprese edilen Morfogen ve Shh kimyasal-çekici bir ajan gibi davranarak, Netrin 1 ile işbirliği içerisinde komissural aksonların yönlendiriciliğini yapmaktadır. Shh ayrıca medulla spinalis'teki longitudinal aksonların ve retinal ganglion hücrelerinin yönlendiriciliğinde de görev almaktadır (42). Ek olarak, Netrinlerin Drosophila'da komissural aksonların orta hattı geçmeleri için kısa mesafede etkili çekici ipucu molekülleri sağladıkları da gösterilmiştir (43).

2.11. Orta Hat Oluşumunda GAP-43'ün Rolü

Mutasyonel ve genetik çalışmalarda komissür oluşumunda aksonların uygun yollarını bulabilmesi için önemli olan çeşitli çevresel etkenlerin ortaya çıkarılmalarının yanında actin regulasyonunun da önemli bir rolü olduğu gösterilmiştir. Böylece, myrisotylated alanine-rich C kinase substrate (MARCK), MacMARCKs, ankyrin_B, Mena ve p190RhoGAP gibi F-actin bağlayan proteinlerin delesyonu komissür oluşumunu önler. Ancak, bu gibi durumlarda orta hat oluşumu defektleri fenotipi de etkileyebilmektedir. Böylece, yönlendirme ipucu reseptörlerinin orta hattı geçmeye çalışan aksonların büyüme tomurcuklarındaki sitoskeletal oluşumlarla nasıl bir etkileşime girdikleri çok az anlaşılabilmiştir. Growth associated protein-43 tek bir kopya genden ibaret olup, PKC için major bir nöronal substrattır ve Mena, MARCKs, MacMARCKs ve p190RhoGAP gibi büyüme tomurcuklarında F-actini modüle eder. Yani, F-actin cevabını düzenleyen GAP-43 ekstraselüler ipuçlarına cevap olarak, fosforilasyonu PKC tarafından gerçekleştirilen, major gelişme tomurcukları proteinlerinden biridir. MARCKs için olduğu gibi, F-actinin regulasyonu bunun PKC tarafından fosforilasyon derecesine bağlıdır. Protein kinaz C tarafından fosforile edilen GAP-43 uzaysal olarak ayrılmış motil ve ilerliyen lamella ve filopodia oluşturarak in vitro aktin filamanlarını polimerizasyon-depolimerizasyon siklusünden kopararak stabilize olmasını sağlarlar. Buna karşın in vitro fosforile olmamış GAP-43 retrakte ve kollabe olan lamellerde artarak, F-actin polimerizasyonunu inhibe eder. Büyüme konilerindeki GAP-43'ün PKC tarafından fosforilasyonu L1 gibi Ig süper ailesi hücre adhezyon molekülleri (IgSF-CAMs) tarafından stimüle edilebilirler. Nöritler in vitro IgSF-CAM tarafından yürütülen sinyalizasyona tepki verebilmek için GAP-43'e gereksinim duyarlar (44).

Shen ve ark. in vivo olarak GAP-43'ün %100 homozigot (-/-) olduğu farelerde commissura anterior'un (CA), commissura hippocampi'nin (CH) ve CC'un oluşmadığını göstermişlerdir. Bu çalışmada orta hattaki birleşmenin oluşmuş olmasına rağmen komissural aksonların selektif olarak fasikülasyonlar oluşturması inhibe edilmiş ve TAG-1 işaretli aksonlar bilateral olarak Probst's demeti oluşumları gerçekleştirmiştir. Ayrıca bu aksonların gelişme tomurcuklarının uçlarındaki lamellerin daha küçük olduğu ve F-actin düzeylerinin düşük olduğu in vitro olarak gösterilmiştir.

Yine de, allellerinin bir tanesi tahrip edilmiş GAP-43 (+/-) farelerin %100'ünde CH ve CC'de defektler görülmüş fakat AC bundan etkilenmemiştir. Aynı çalışmada, fosforilasyonun yaklaşık %1 olduğu farelerde, CH ve CC bulunmazken, fosforilasyonun yaklaşık olarak %10 gerçekleştiği farelerde CH ve CC'nin normalden daha küçük olduğu gösterilmiştir. Bu iki sonucun, komissural aksonlardaki PKC aracılığı ile olan sinyalizasyonun defektif olduğunu düşündürmekte olduğu belirtilmektedir. Fakat, bu fenotipin sebebinin GW'in olduğu bölgede sürekli olarak Probst's demeti oluşmasına rağmen, hem GAP-43 (+/-) hem de GAP-43 (-/-) kortikal aksonların Slit 2 tarafından in vitro olarak engellendiği ve GW'in sinyalinin defektif olduğunu düşündürmekte olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, herşeye rağmen bütün bu verilerin GAP-43'ün fonksiyonel bir eşik değerinin komissür oluşumunda gerekli olduğu ve komissural gelişme tomurcuklarındaki F-actin'i regüle etmede yetersizliğin GAP-43'ün inhibe olmuş PKC fosforilasyonuna bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir (44).

2.12. Corpus Callosum Agenezi

Corpus Callosum Agenezi'si insanlarda yaklaşık 50 farklı konjenital sendromda görülen bir kusurdur (2). Yakın zamanda yapılmış neonatal ve prenatal görüntüleme çalışmaları, en az her 4000 yeni doğandan birinde CCA görüldüğünü göstermektedir ve diğer görüntüleme çalışmalarında da nörogelişimsel kusurlara sahip bireylerin yaklaşık %3-5'inde CAA gözlenmiştir (3).

Corpus callosum malformasyonları bu yapının, total agenezisi, parsiyel agenezisi (CC'nin sadece rostral veya kaudal parçasının gelişmemiş olması) ya da hipoplazisi şeklinde gözlenebilir. Total veya parsiyel CAA'nin büyük olasılıkla kallozal gelişimin erken safhalarındaki genetik, bulaşıcı, vasküler veya toksik vb. etkiler nedeniyle bozukluklardan kaynaklandığı belirtilmektedir (3).

Corpus callosum agenezisi görülen bazı bireylerin zeka katsayıları (intelligence quotients) normal sınırlar içinde bulunmakla birlikte yakın zamanda yapılan araştırmaların ışığında, bu bireylerin davranış bozukluklarına ve nöropsikiyatrik problemlere karşı eğilim gösterdiği gözlenmiştir. Bunlara bağlı olarak, CCA görülen kişilerde öğrenme güçlükleri, dil ve sosyal iletişim problemleri, uyuma düzensizlikleri gibi bozukluklar ortaya çıkabilmektedir (2).

2.13. CCA Hayvan Modelleri

Corpus callosum agenezisi hayvan modelleri, insanlarda CCA oluşumunda rol oynayan muhtemel genlerin tanımlanması için bir temel oluşturmaktadır. Farelerde CCA'ne yol açan genlerin inaktive edilmesi genellikle, capsula interna gibi diğer geniş lif demetlerinde de nörolojik hasarlara yol açmış ve bunun sonucu olarak birçok vakada konjenital ölüm gözlenmiştir. Çoğunlukla gen delesyonlarından kaynaklanan bu fenotipler, insan CCA'ne model olması açısından çok ağır bir model olabilir ve insanlarda bu gibi gen delesyonları, embriyonik veya perinatal ölümlerle sonuçlanabilir. Fakat farelerde, parsiyel veya total birçok CCA modelinde hayvanların normal bir yaşam süresi sürdükleri gözlenmiştir (3).

2.14. İnsanlarda CCA'nin Sebepleri

2.14.1. Genetik Faktörler

İnsanlarda CAA genetiği değişkenlik göstermektedir ve bu, kallozal gelişimin altında yatan kompleksliğe yansır. Güncel kanıtlar, tek gen Mendel mutasyonları ve düzensiz tek gen mutasyonlarının da içinde bulunduğu birçok kompleks genetik olaylar kombinasyonunun CAA etyolojisinde önemli bir rol oynadığına işaret etmektedir. Retrospektif derleme ve kesitsel çalışmalarda, %30-45 oranındaki CAA vakalarının açıklanabilir sebepleri olduğu rapor edilmiştir. Bunların yaklaşık %10'u kromozomal anomaliler ve geri kalan %20-35'i de muhtelif açıklabilen nedenlere bağlıdır. Fakat, sadece total CAA'li vakalar göz önünde bulundurulduğunda, tanımı yapılabilir sendromlu vaka oranı %10-15 oranına düşer, buna göre total CAA vakalarının %75'nin etiyolojisi bilinmemektedir (3).

Çevresel faktörlerin de, CCA oluşumunda önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir. Prenatal alkol maruziyeti, beyin gelişimini ve CC oluşumunu etkilediği bilinen ve üzerinde durulması gereken önemli çevresel bir faktördür. Bu konuda bilinmeyen, genetik faktörler hakkında bilinenlerden bile çok daha azdır. Klinik ve deneysel çalışmalar prenatal alkol maruziyetinin, CC gelişimi için hayati önem taşıyan gliogenez ve glial-nöronal etkileşimleri düşürdüğünü göstermiştir. Fetal Alkol Sendromu'nda (FAS) gözlenen CCA oranı yaklaşık olarak %6.8 oranındadır. Birçok FAS vakasında, hipoplazik CC gözlenmiştir ki, bu sadece kallozal oluşumun erken

safhalarında gerçekleşen bozulmalardan dolayı değil, ayrıca daha sonra gelişen aksonal budanma düzensizliklerinden de kaynaklanır. Şizofreni ve otizm gibi hastalıklarda gözlenen bazı mekanizma bozuklukları da kallozal hipoplaziye yol açabilir. Müzik eğitimi ve hipotiroidizm gibi muhtelif çevresel faktörler postnatal ve prenatal kallozal gelişimi etkileyebilmektedir (3).

2.14.2. Prenatal Alkol Maruziyeti

Etanol bütün dünyada kullanımı çok yaygın bir maddedir. Etanol özellikle anneler tarafından kullanıldığında fetüsün gelişimi üzerine olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Etanol'un MSS üzerine etkileri ile ilgili literatürde çok sayıda çalışma yer almaktadır. Prenatal alkol maruziyeti merkezi sinir sisteminin gelişiminde birçok olumsuz etkiler yapmaktadır. 30 yıldan fazladır sürdürülen klinik insan araştırmaları, gebelik sırasında alkol kullanımının kalıcı davranışsal, sosyal ve kognitif beyin hasarlarına yol açtığına dair doğrudan kanıtlar sunmaktadır (45-49). Fasiyal morfolojik bozuklukların bile, FAS'ın değerlendirilmesinde tanısal kriterlerden birisi olarak kullanılma gereği duyulmuştur (50-52). Buna rağmen, gebelik sırasında fazla miktarda alkol kullanan kadınlardan sadece küçük bir azınlığının doğurduğu çocuklarda FAS'a ait tanısal kriterlere rastlanmaktadır (53). Konu hakkındaki güncel görüşler, FAS'lı çocukların prenatal dönemde yoğun bir şekilde alkol almış annelerin çocuklarında görülen çeşitli teratojenik MSS disfonksiyonları popülasyonu içerisine dahil edilmesi gerektiğini belirtmektedirler. Bu derece zararlı sonuçlar, artık çok geniş bir spekturumda değişkenlik gösteren tip ve boyutta, alkole bağlı nörodavranışsal eksikliklerin yansıması olarak Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD) olarak isimlendirilmektedir. FAS'ın bir spektrum hastalığı parçası olmasının bir sonucu olarak, nörodavranışsal sekellerinin derecelendirilmesi ile fonksiyonel beyin sistemlerinin hasarları spesifik olarak kolayca ilişkilendirilememektedir. Buna rağmen, hiperaktivite ve dikkat bozukluğu, motor koordinasyon bozuklukları, sosyal davranışların düzenlenmesindeki eksiklikler veya psikososyal fonksiyonların zayıflığı, kavrama bozukluğu, matematiksel kabiliyet, sözel akıcılık ve analitik hafıza gibi belirli nörodavranışsal bozuklukların FAS vakalarında sıkça rastlandığı rapor edilmiştir. Buna uygun olarak, FAS'a ait spesifik bir nörodavranışsal fenotip olduğuna dair kesin ortak bir görüş bulunmamaktadır (54).

FASD üzerine yapılan kantitatif manyetik rezonans görüntüleme çalışmalarında, CC anomolileri, vermiş cerebellaris'in ön bölgeleri ve bazal ganglion küçülmeleri, assosiasyon korteksinde belirli bölgelerde gri cevher yoğunluğunun azalması gibi kesin yapısal anomaliler rapor edilmiştir (55-59). Fakat bu değişikliklerin, spesifik olarak FASD'nin nörodavranışsal defisitlere yol açtığı konusunda ikna edici yeterli düzeyde bilgi bulunmamaktadır (55).

2.14.3. FASD'da Beyin Hasarı

FASD fenotiplerindeki bu değişkenlik, kognitif ve davranışsal fonksiyon eksiklikleri ile sonuçlanan, alkolün neden olduğu prenatal beyin hasarlarında moleküler mekanizmaların nasıl işlediğini aydınlatmaya çalışan genç bilim adamları için oldukça teşvik edici bir alan oluşturmaktadır. FASD görülen farklı beyin hasarı profillerinin oluşumuna katılan birbiriyle ilişkili en az üç ana kaynak bulunmaktadır (54).

Birincisi; klinik ve deneysel çalışmalardan elde edilen bulgular ışığında, alkolle ilişkili doğuştan kusurlar, maternal yaşa, doğum yapmış olmaya, alkol bağımlılığının geçmişine, gebelikteki alkol kullanım şekline (miktar, sıklık, süre ve gelişimin hangi evrelerinde alındığı) bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (60-64).

İkincisi; diğer birçok potansiyel (fakirlik, sigara kullanımı ve diğer çeşitli kimyasallara maruziyet, beslenme bozuklukları, olumsuz prenatal bakım ve destek, olumsuz postnatal çevresel koşullar) koşullar fetal alkol maruziyeti ile ilişkili olup, FAS oluşumu için oldukça büyük bir risk oluşturmaktadır (65,66).

Üçüncüsü ise; daha verimli alkol dehidrogenaz enzimlerini kodlayan genetik maternal ADH2-3 alellerinin yeni dölde FAS oluşturabilecek potansiyel riskleri oldukça azaltması olarak kabul edilmektedir. Maternal ve fetal genotip, alkol maruziyeti karşılaştırılabilir bile olsa, alkol teratojenitesi riski ve hassasiyetini etkileyebilmektedir (67).

Maternal, çevresel ve genetik risk faktörlerine ek olarak, prenatal alkol bağımlı mekanizmaların açıklanmasıyla ilgili problem, bir bütünlük teşkil etmektedir, çünkü alkol gelişimsel olarak genetik ve moleküler olarak karşılıklı etkileşimde bulunan hücre ve moleküllerle ilişkide bulunmaktadır (54).

Beyin hasarında birden çok mekanizmanın rol oynadığı kabul edilmektedir (68-73). Alkolün nöroteratojenik etkisi sadece kullanım miktarına ve süresine değil, ayrıca

kullanımın, gelişimin hangi evresinde olduğuna da bağlıdır (54). Alkolün teratojenik etkisinin kritik olduğu periyodlar üzerine çalışmalar ilk defa farelerde erken embriyonik gelişim sırasında kraniyofasiyel anormalliklere ve beyin patolojilerini daha iyi anlayabilmek üzere yapılmıştır ve alkole bağlı geçici birçok hücre ölümleri rapor edilmiştir (74).

Alkolün beyin gelişimine etki ettiği birçok yol göz önünde bulundurulduğunda, alkol maruziyetinin gelişimsel işlemler üzerine etkileri hem önceden beklenen, hem de ortamdaki şartlara ve değişikliklere cevap verebilecek kapasiteye sahip, aktivite bağımlı ve biyolojik sinyal yolları ile düzenlenen uyarlanabilir işlemlerdir (54).

Alkolün beyin gelişimi üzerine, tropik sinyal yolları, hücre devamlılığı ve ölümü gibi programlanmış olaylar ile etki ettiği gösterilmiştir ve bu etkiler geçici hücre fonksiyonlarında ve gen regülasyonunda, geçici ve evrelere spesifik değişiklikler olarak görülmektedir (54).

Sonuç olarak, hücre döngüsü ve gelişimi, migrasyon, nörit gelişimi, hücre temasları ve adhezyon, yol bulma, sinaptik gelişim ve tropik sinyal yolları gibi gelişimsel işlemlerin zamanlanması ve eşzamanlılığının bozulması gibi farklı birçok moleküler mekanizma üzerinden gerçekleşebilir. Bu mekanizmalar, ya içsel gen regülasyonunun değiştirilmesi (retinoik asit gibi transkripsiyon faktörlerinin üretimine karışarak), hücre adhezyonu, oksidatif stres ve apoptotik basamakların aktivasyonu gibi hücre fonksiyonları, devamlılığı ve ölümünü kontrol eden moleküler sinyal yollarını etkileyerek, ya da tropik desteğin kaybı, özel zamanlı eksprese olan reseptörler ve onların iskelet proteinlerinin zarar görmesi, hedef populasyonların azalması gibi yollarla sinaptogenezin bozulması yolları ile gerçekleşebilir. Yapılan çalışmalarda etanolün patogenez basamaklarını başlatan, gelişmekte olan beyin dokusu ile olan birincil moleküler ilişkileri henüz tanımlanamamıştır. Dahası, alkole bağlı prenatal beyin hasarında, daha sonraki plastisite ve gelişimsel adaptasyonun nasıl olacağı konuları da çok iyi anlaşılabilmiş değildir (54).

Prenatal alkol maruziyeti, MSS üzerinde, mikrosefali, mental gerilik, motor fonksiyon kayıpları ve kognitif eksiklikler gibi gelişimsel kusurlara neden olmaktadır. Prenatal alkol maruziyetini takiben gerçekleşen birçok fonksiyonel eksiklik, hassas süreçlerde gerçekleşen gelişimsel değişimlerin kümülatif sonuçları olarak görülmektedir (73-79).

Ratlar, alkole bağı beyin hasarlarını araştırmak için başarılı bir model olarak kullanılmaktadır (80). İnsanlarla ratlar arasındaki farklılıklardan dolayı, ratlardaki (E)1-10 ve (E)11-20 periyotları, insanlardaki 1. ve 2. trimesterlere denk gelmektedir (81,82). Bundan dolayı, insanlardaki 2. trimestere denk gelen periyot ratların gebelik süresinin yarısını kaplamaktadır. 1. trimester boyunca alkol maruziyetinin fasiyal morfolojik bozukluklara yol açtığı bilinmektedir. Rodentlerde yapılan çoğu çalışma, insanlardaki 2. trimestere karşılık gelen süre boyunca alkolün, intrauterin büyüme geriliği ve mikrosefaliye yol açtığını göstermektedir. Yine de, gelişmekte olan beyin üzerine alkol uygulama zamanlamasının etkileri henüz çok kesin değildir, çünkü alkole bağı beyin hasarlarında konu hakkındaki kritik hassasiyeti açılmak için mevcut klinik ve deneysel çalışmalar yeterli bulunmamaktadır (83).

Beyin ağırlığındaki azalma (mikrosefali) bir MSS fonksiyon kaybı olarak görölmektedir. Alkole bağı beyin ağırlığındaki azalma daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Prenatal periyodun 2. yarısı ve erken postnatal dönemin, alkole bağı beyin ağırlığının azaldığı görölen yetişkin hayvanlardan elde edilen bulgular ışığında, kritik periyotlar olduğu anlaşılmıştır. Yetişkin kronik alkoliklerin serebral hemisferlerindeki beyaz cevher hacminde azalmalar gözlenmiştir. Fakat, düşük beyin ağırlığı ile kortikal gelişim arasındaki ilişki hala netlik kazanmamıştır (80).

Corpus callosum ikinci trimesterde oluşmaktadır. Ratlarda, bütün birincil dendritler postnatal 10. gün ((P)10) itibari ile oluşur ve dendrit dallanmasının miktarı ve derecesi (P)20'ye kadar belirgin şekilde artarak yetişkindeki görünümünü almaya başlar. Bu yüzden üçüncü trimester dendrit dallanması için oldukça önemli bir periyotdur. Prenatal alkol maruziyeti ayrıca, uzama ve regresyona katılan dendritlerin yeniden biçimlendirme paternlerini de etkiliyor olabilir (80).

Geçmişte yapılmış otopsi çalışmaları, CC'nin ağır prenatal alkol maruziyetinden etkilendiğini işaret etmektedir. Prenatal alkole maruz kalmış çocuklarda, CC'a ait özel bölgelerde (genu, isthmus, corpus ve splenium) küçölmeler rapor edilmiştir. Hayvan çalışmalarından elde edilen bazı klinik bulgular da CC hasarlarını desteklemektedir. Örneğin, prenatal alkole maruz kalmış rat ve farelerin kontrollerine kıyasla daha küçük CC'larının olduğu, fakat sadece bir çalışmada ratlarda CC büyüklüğünde bir değişiklik olmadığı görölmüştür. Prenatal olarak orta derecede alkole maruz bırakılmış BALB/c farelerde corpus callosum ve commissura anterior kontrollerle kıyaslandığında bu

yapıların bazı alanlarının daha küçük olduğu ortaya çıkarılmıştır. Prenatal alkole maruz kalmış bireylerde ayrıca manyetik rezonans görüntüleme yöntemleri ile de CC'un tam veya parsiyel olarak gelişmediği gösterilmiştir (80).

Fetal dönemlerinde alkol uygulanmış ratların, somatosensoryal CC projeksiyon nöronlarında (CCpn), büyük çoğunluğu daha derin korteks tabakalarında yerleşmiş ve geç jenerasyon göstermiş bir şekilde anormal dağılım gösterdikleri gözlenmiştir. Kallozal aksonların sonlandığı, korteksin 2., 3. ve 5. tabakalarındaki önemli değişimler, CC projeksiyonlarının prenatal alkol maruziyetinden etkilendiğini ayrıca göstermektedir. Fakat sadece sınırlı sayıda çalışmada alkolün CCpn zerine olan etkileri incelenmiştir (83).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gebe Ratlar'ın Elde Edilmesi

Deney protokolü Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Çalışmamızda Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edilen dişi ve erkek Wistar Albino ratlar çiftleştirilmek için kullanıldı. Çalışmamızda, karşılaştırmalarını yaptığımız kontrol ve deney gruplarından; etanol uygulanmamış 7 gebe rattan elde edilmiş 7 adet fetüs beyninden alınan ve GAP-43 antikoruna ile işaretlenen koronal kesitler kontrol grubunu, etanol uygulanmış 7 gebe rattan elde edilmiş 7 adet fetüs beyninden alınan ve GAP-43 antikoruna ile işaretlenen koronal kesitler ise deney grubunu oluşturmuştur. Her iki gruptaki bütün gebe ratlardan elde edilen fetüs sayısı ortalaması 8'dir. Her iki gruptan da, her gebe rattan elde edilmiş 1'er fetüs değerlendirmeye alındı.

Dişi ve erkek ratlar çiftleştirme işleminden önce birbirlerinden ayrı, ızgara kafeslerde en az 7-10 gün boyunca Üretim Ünitesi odasında bırakıldı. Çalışma süresince oda şartları, 23°C sıcaklıkta, %60 nem oranında ve 12 saat aydınlık-12 saat karanlık olacak şekilde ayarlandı. Çiftleştirme işlemi için ratlar, her bir kafese 3 dişi ve 1 erkek konulmak sureti ile bir gece (19:00–07:00) boyunca bekletildi. Bekletme süreci sonrası 07:00-08:00 saatleri arasında, erkek ratlar kafeslerden çekildi ve vajinal sürüntü yöntemi ile sperm bakıldı. Bu yöntemde, çiftleşmeye bırakılan her dişi rat için farklı olmak üzere pamuklu ucu serum fizyolojik ile nemlendirilmiş çubuklar kullanıldı. Çubuğun nemlendirilmiş pamuklu ucu dişi ratın vajinal açıklığından hafifçe vajina içersine sokularak basit bir rotasyon hareketi yaptırılıp, daha sonra lam üzerine birkaç kez sürülerek kurumaya bırakıldı. Kuruma gerçekleştikten sonra her bir lam ışık mikroskopunda incelendi. Vajinal sürüntüsünde sperm gözlenen dişiler 0.5 günlük gebe kabul edildi.

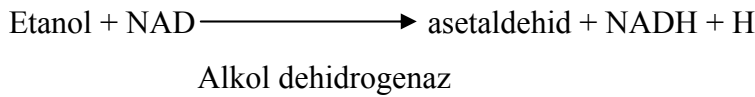
3.2 İntragastrik Gavaj ile Etanol Uygulanması

Deney grubunu oluşturan gebe ratlar Barınma Ünitesi'nde ayrı kafeslere alındı. Çalışmada iki farklı deney grubu oluşturuldu. (E)6-17 arasında intragastrik gavaj ile 7 gebe rata, 6gr/kg vücut ağırlığına göre %25(v/w) etanol uygulandı. Her uygulamadan 4 saat önce kafesteki hayvan yemi ortadan kaldırılarak ratların 4 saat sonunda midelerinin

boş kalması sağlandı ve böylece verilen etanolün mideden dolaşım sistemine daha hızlı geçmesi sağlandı. Deney grubuna ait 7 gebe rattan (E)17'de etanol uygulandıktan 2-3 saat sonra, kan alkol konsantrasyonuna bakılmak üzere kardiyak kanları alındı. Gebe ratlardan elde edilen kanlar, ağız kapalı ependorf tüpleri içerisine alınarak ve soğuk zincire uyularak Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında alkol düzeyleri değerlendirildi. Ependorf tüplerine alınan kan örnekleri 3000 devirde 5 dakika santrifuj edilerek serumları ayrıldı. Serum örneklerinde etanol düzeyi Cobas integra 800 (Roche diagnostics, Germany) cihazında enzimatik metod ile çalışıldı.

3.2.1 Test Prensipli

Bu reaksiyonda enzim olarak alkol dehidrogenaz enzimi ve koenzim olarak NAD kullanılmakta ve reaksiyon aşağıdaki gibi gerçekleşmektedir.



NADH oluşumu 378 nm de kantitatif olarak ölçüldü. Sonuçlar mg/dl cinsinden verildi.

3.3 Fetüslerin Elde Edilmesi, Fiksasyon ve Kesitlerin Hazırlanması

Gebe ratlar Xsilazin+Ketamin anestezisi ile uyutuldu. Ağrılı uyaranlara yanıt vermediği anlaşıldıktan sonra, cerrahi girişim için yerleştirilip abdomene dikkatli bir kesi yapılarak abdomen ön duvarı açıldı. Uterus içersindeki fetuslar plasentalarından çıkarıldı. Çıkarılan fetusların boyun hizasından mikromakas ile baş kısımları çıkartılıp, immünfloresan boyamaya uygun fiksasyonu sağlamak için %4'lük paraformaldehit çözeltisine alındı. Paraformaldehit çözeltisindeki dokular bir gece buzdolabında +4°C bekledikten sonra, frozen kesitler için 12 saat %20 sukroz, takiben %30'luk sukroz + %0.1'lik sodyum azid solusyonunda bekletildiler. Kesitler alınmadan yaklaşık 30 dk önce, dokular -20°C'e konarak donmaları sağlandı. Kriyostatla 11 µm kalınlığında kesitler alındı. Boyanana dek buzdolabında +4 °C'de saklandılar. Böylece kesitler immunfloresan boyama için hazır hale getirilmiş oldu.

3.4 İmmünfloresan Boyama

Boyama işlemi yapılmadan önce kesitler lamalar üzerinde pappen ile çevrildi. Daha sonra pastör pipetleri kullanılarak 7.4 pH'a sahip PBS solüsyonunda 10 saniye yıkandı. Kesitlerin etrafı yıkama işleminden sonra kağıt peçeteler ile dikkatlice zarar verilmeden kurulandı. Uygulanacak primer antikorun uygun olan 1/100 dilüsyona getirilmesi için PBS-BSA solüsyonu kullanıldı. Gerekli 1/100 dilüsyonu hazırlamak için Santa Cruz'dan ticari olarak elde edilen anti-mouse GAP-43 primer antikorundan mikro pipet ile 1 birim ve PBS-BSA solüsyonundan ise 99 birim çekilerek küçük ependorf tüpleri içerisinde karıştırıldı. İşlemden bir saat önce, inkübasyonda kullanılacak lam kutularının tabanına, inkübasyon sırasında kesitlerin kurummasını önlemek amacı ile ıslak gazlı bez yerleştirildi. Kesitlerin olduğu lamalar yere paralel gelecek şekilde yerleştirildi. Hazırlanan primer antikor, her bir kesit üzerine 50 µl gelecek şekilde dağıtıldı ve lam kutusunun ağzı kapanarak 37°C'ye ayarlı etüv içerisinde 90 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında yine Santa Cruz'dan ticari olarak elde edilen floresan (FITC) konjuge goat anti-mouse sekonder antikoruna uygun dilüsyon olan 1/100 oranında hazırlanarak +4°C'de buzdolabında saklandı. İnkübasyondan çıkarılan kesitler 3x2 dakika PBS solüsyonunda yıkandı. Son yıkamadan sonra kesitlerin etrafı peçete ile dikkatlice kurulandıktan sonra, önceden hazırlanmış sekonder antikordan mikro pipet kullanılarak her bir kesit üzerine 50 µl gelecek şekilde ışısız bir ortamda damlatıldı ve sekonder antikor lam kutusunun etrafı hiç ışık almayacak şekilde etüvde 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra kesitler 3x1 dakika PBS solüsyonunda yıkandı. Son yıkamadan sonra lamalar dikkatlice kurularak, Santa Cruze'dan ticari olarak elde edilmiş, çekirdekleri boyama özelliği olan DAPI içerikli Mounting Medium kapatma maddesi ile kesitler kapatıldı. Lamellerin etrafı, kesitlerin hava almaması için oje yardımı ile kapatıldı.

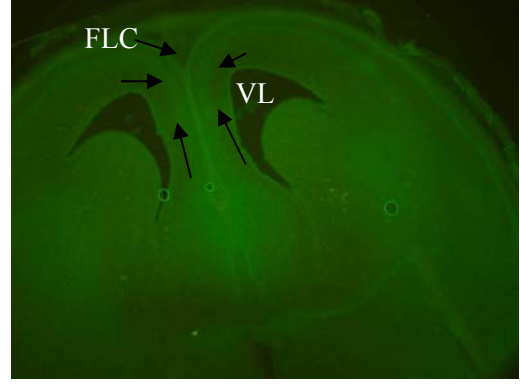
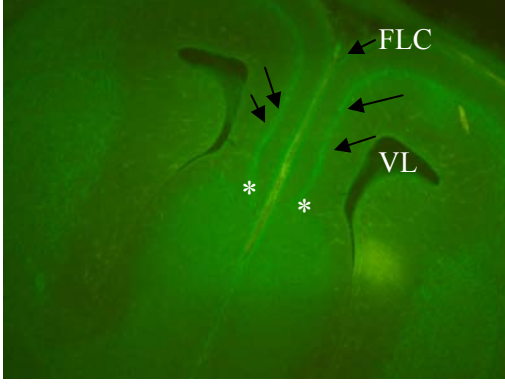
Kesitler, immünfloresan boyama sonrası Olympus BX50 floresan mikroskopunda incelendi. Daha sonra Olympus C- 7070 Camedia Wide Zoom dijital fotoğraf makinesi ile kesitlerin görüntüleri alındı.

4. BULGULAR

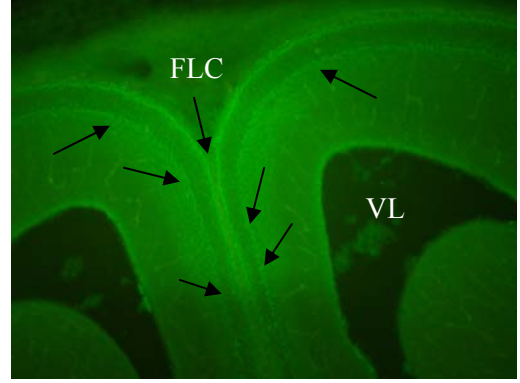
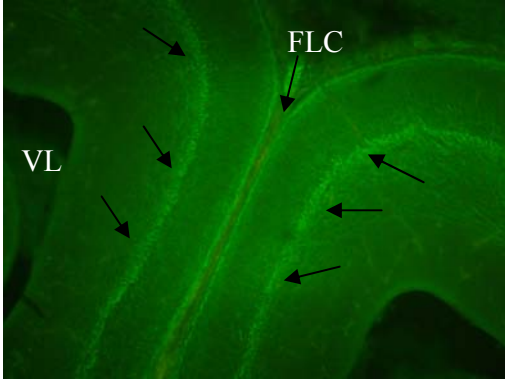
Çalışmamızda, belirli günlerde etanol uygulanmış deney ve etanol uygulanmamış kontrol gruplarında, (E) 17'de elde edilmiş rat fetüs beyinlerinin koronal kesitlerinde, corpus callosum'u oluşturacak olan kallozal aksonların terminal uçlarındaki büyüme konilerinde bulunan GAP-43 proteininin ekspresyon paternleri, immunfloresan yöntemiyle değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Her bir fetüs beyninden corpus callosum'un oluşması beklenen antero-posterior hat boyunca önden ve ortadan olmak üzere kesitler karşılaştırılmıştır. Etanol grubundaki gebe ratlara (E) 6–17 arasında her gün aynı saatlerde olmak üzere 6 gr/kg vücut ağırlığında etanol uygulanmıştır. Etanol uygulanan gruptaki gebe ratlar son gün etanol uygulandıktan 2 saat sonra kuyruklarından kan alınarak kan alkol düzeyleri değerlendirilmiştir. Bu ratlardan elde edilen kan alkol düzeyleri ortalaması 197 ± 90 mg/dl olarak bulunmuştur.

İki grubun karşılaştırmaları yapılırken, her iki grup için alınan kesitlerin aynı seviyelerden geçtiğini teyit etmek amaçlı üç kriter belirlenmiştir. Bunlardan bir tanesi lateral ventriküllerin genişliği, ikincisi lateral ventriküllerin içerisindeki plexus choroideus'un görülmesi ya da görülmemesi, diğeri ise fissura longitudinalis cerebri'nin derinliği olmuştur.

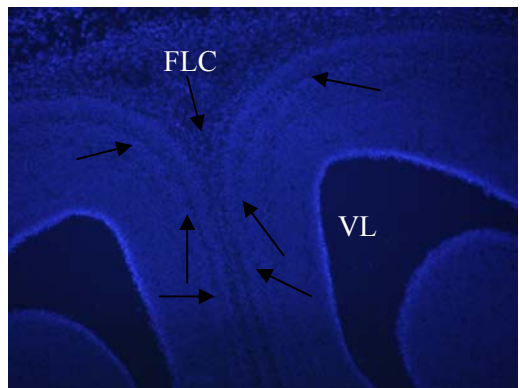
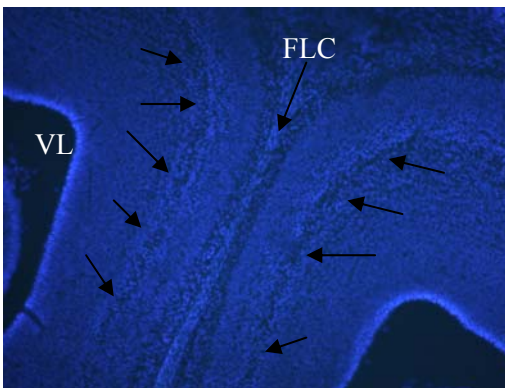
Her iki grupta, CC'un ön kısımlarından alınan kesitler karşılaştırıldığında, her iki gruba ait kesitlerde de CC'u oluşturacak liflerin tam olarak karşı tarafa geçeceği seviyeye kadar inmediği gözlenmiştir (Şekil 3.1). Ancak kontrol grubundaki CC'u oluşturacak liflerin akson büyüme konilerindeki GAP-43 ekspresyonları paterni belirgin ve kompakt bir şekilde görünüyor iken, etanol uygulanmış gruba ait rat fetüslerinden alınan kesitlerde bu liflerin GAP-43 ekspresyonlarının kontrol grubundaki kadar belirgin olmadığı ve kompakt görünümünün bozulduğu gözlenmiştir (Şekil 3.2). Bu sonuçlar sadece hücre çekirdeklerinin boyanmasını sağlayan DAPI boyanması ile de gösterilmiştir (Şekil 3.3).



Şekil 3.1 A, B: Kontrol ve deney grubuna ait X 160 büyütme, CC'un ön kısmına denk gelen koronal kesit; Okların işaret ettiği, parlak yeşil alanlar, kallozal aksonların büyüme konilerinde GAP 43 proteinin pozitif olarak boyandığı bölgeleri göstermektedir. Asteriks işaretli noktalar, CC'ü oluşturacak kallozal aksonların inmesi gereken seviyeye daha inmediğini göstermektedir (A). Deney grubunda bu bölgelerde görülen pozitif işaretlenme yoğunluğunun kontrol grubuna kıyasla daha az belirgin olduğu görülmektedir (B). VL (ventriculus lateralis), FLC (fissura longitudinalis cerebri)



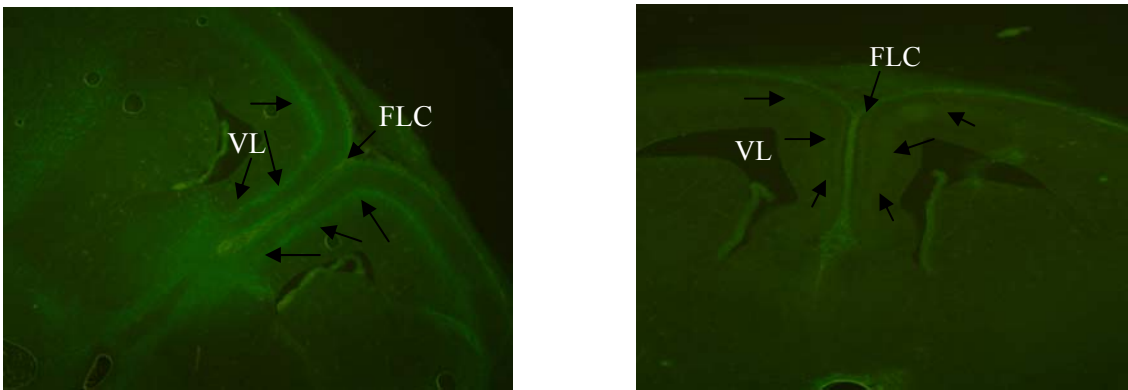
Şekil 3.2 A, B: Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.1 A, B'deki fotoğrafların X 400 büyütme görüntüleri görülmektedir.



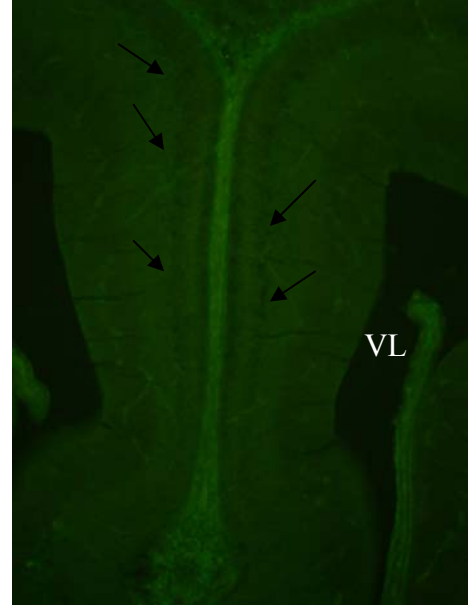
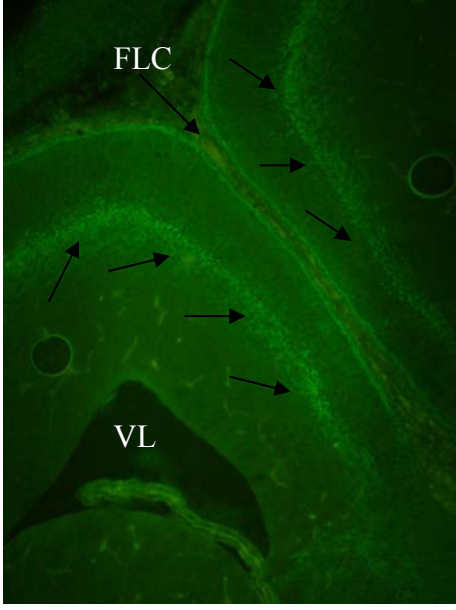
Şekil 3.3 A, B: Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.2 A, B'deki fotoğrafların sadece çekirdekleri boyama özelliği olan DAPI boyası ile boyanmış X 400 büyütme görüntüleri görülmektedir.

Her iki grupta, CC'un orta kısımlarından alınan kesitler karşılaştırıldığında, kontrol grubunda CC'ü oluşturacak liflerin orta hatta kadar gelip karşı tarafa geçmeye başladığı, orta hattı, yani CC'ü oluşturduğu gözlenmiştir, ancak etanol uygulanmış gruba ait kesitlerde kallozal liflerin orta hatta kadar geldiği fakat orta hattı geçmediği gözlenmektedir (Şekil 3.4 Şekil 3.5). Bu değerlendirme sadece hücre çekirdeklerini boyayan, DAPI ile boyanmış görüntülerde rahatlıkla yapılabilmektedir (Şekil 3.6). Kontrol grubuna ait fetüs beyinlerinden elde edilen CC'un orta seviyelerinden geçen koronal kesitlerde, CC'ü oluşturacak olan liflerin ekspresyon paternine göre değerlendirildiğinde, orta hatta ekspresyon paterninin daha yoğun olduğu gözlenirken, etanol uygulanmış gruba ait fetüs beyinlerinden alınan kesitlerde CC'ü oluşturacak aksonların büyüme konilerindeki GAP-43 ekspresyon paterninin kontrollere oranla daha zayıf olduğu gözlenmiştir. Ayrıca ekspresyon gösteren sahalar kontrollere daha belirgin sınırlar içerisinde gözlenirken etanol uygulanmış grupta bu sınırların dağınık olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.7).

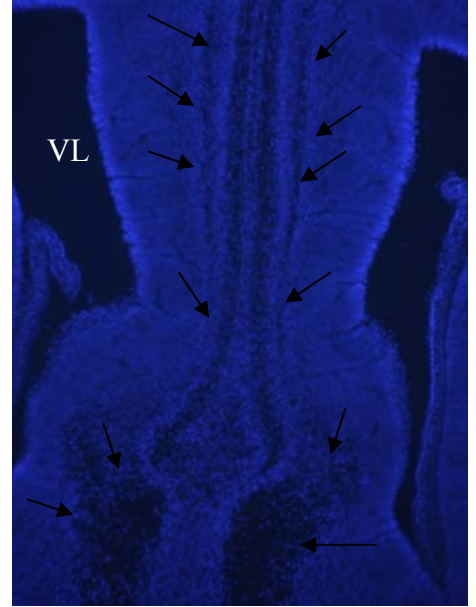
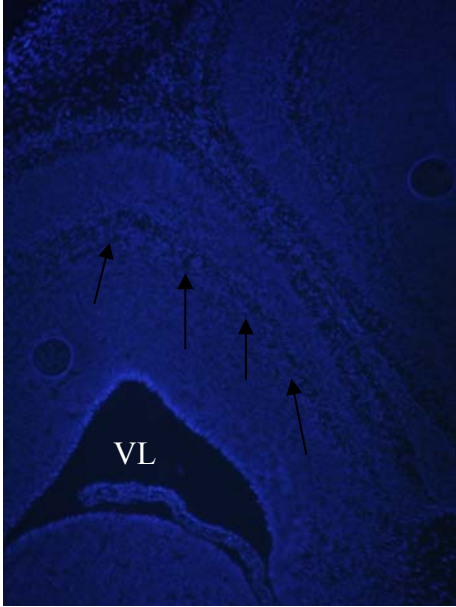
Fissura longitudinalis cerebri'nin altından geçmesi beklenen kallozal liflerin bulunduğu bölgede sadece aksonlar bulunacağı için bu bölgenin DAPI ile boyanmış kesitlerinde hücre ve dolayısıyla hücre çekirdeği bulunmayacağından boş alanlar şeklinde görülmesi gerekmektedir. Kontrol grubundan elde edilmiş kesitlerde boş alanlar orta hatta gözlenirken, etanol uygulanmış gruba ait kesitlerde boş alanlar orta hattın sadece lateralinde gözlenmektedir (Şekil 3.8).



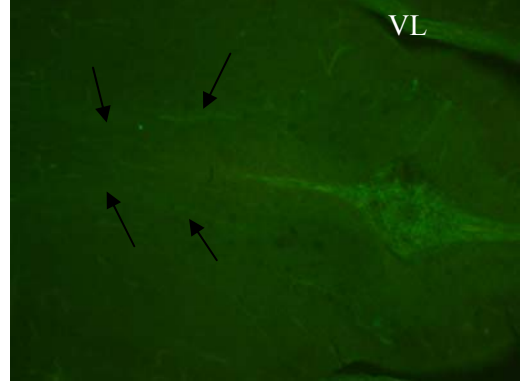
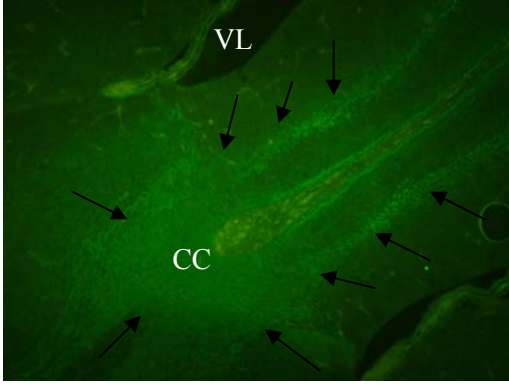
Şekil 3.4 A, B: Kontrol ve deney gruplarına ait, Şekil 3.1 A,B'deki kesitlerin alındığı fetüs beyinlerinin CC'un orta kısmına denk gelen koronal kesitlerinin X 160 büyütmelelik görüntüleri görülmektedir.



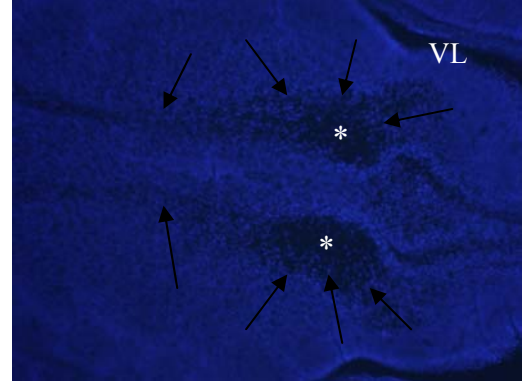
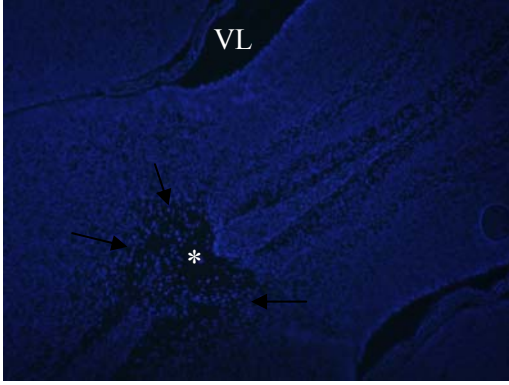
Şekil 3.5 A, B: Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.4 A, B'deki fotoğrafların X 400 büyütmeleik görüntüleri görülmektedir.



Şekil 3. 6 A, B: Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.5 A, B'deki fotoğrafların DAPI boyası ile boyanmış X 400 büyütmeleik görüntüleri görülmektedir.



Şekil 3.7 A, B: Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.6 A, B'deki fotoğrafların X 400 büyütmeleik görüntüleri görülmektedir. Daha büyük büyütmede kontrol grubunda GAP 43 proteinin orta hatta da pozitif boyandığı görülmektedir (A). Deney grubunda, orta hattın her iki yanında GAP 43 proteinin oldukça zayıf yoğunlukta boyandığı görülmektedir (B).



Şekil 3.8 A, B: Kontrol ve deney gruplarına ait Şekil 3.7 A, B'deki fotoğrafların DAPI ile boyanmış X 400 büyütmeleik görüntüleri görülmektedir. Kontrol grubunda asteriks işaretli çekirdek boyanmasının olmadığı boş alan, kallozal aksonların orta hattı geçtiğini işaret etmektedir (A). Deney grubunda orta hattın her iki yanında asteriks ile işaretli çekirdek boyanmasının olmadığı alan kallozal aksonların geldiği yeri işaret etmektedir. Orta hatta görülen çekirdek boyanması kallozal aksonların orta hattı geçemediğini işaret etmektedir (B).

5. TARTIŞMA

Corpus callosum, commissura anterior ve commissura hippocampi'nin dahil olduğu major ön beyin komissürleri iki serebral hemisferi birbirine bağlayan geniş akson traktuslarıdır. Bu komissüral liflerin, kontralateral hemisferdeki hedeflerine ulaşabilmeleri için aktif olarak yönlendirilmeleri gerekmektedir (30). Bu yolların oluşumu, beyindeki diğer major bağlantılar gibi uzun mesafeli ve kısa mesafeli yönlendirici ipuçları (long-range and short-range guidance cues) sayesinde kompleks ve sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Bu düzenlemelerde bir aksaklık olması, defektif gelişimler (disgenezis) veya tamamen yokluk (agenezis) gibi morfolojik beyin anormalliklerine sebep olabilmektedir (31). Corpus callosum agenezisinin insanlarda, geniş bir spektrumda anatomik, fizyolojik ve konjenital patoloji gösteren birbirinden farklı 50'den fazla konjenital sendrom ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Dahası bu kusurların nedenleri çok değişkenlik göstermekte ve yaklaşık olarak 40 kadar gen, insanlardaki CCA ile ilişkilendirilmektedir. Bu kusurların heterojenik yapıları incelendiğinde, komissüral gelişimin birçok hücrel ve moleküler mekanizma tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (30). Bu tür kusurların olasılıkla reseptör ekspresyonu ve akson büyüme konilerindeki sinyalizasyon gibi intrinsek hatalardan veya navigasyon için uygun ekstraselüler bir ortam oluşturulamamasından (örn; glial moleküler yönlendirici ipuçları ve hücre iskeletleri ile öncü aksonlar) kaynaklandığı düşünülmektedir. Genleri hedefleyen metodlardaki son gelişmeler, akson işaretleyicilerin gelişmesi ve hatta son zamanlardaki yüksek çözünürlüklü görüntüleme sistemleri, hepsi birden genlerin aksonal yönlendirmedeki etkilerini ve komissür oluşumundaki rollerini ortaya çıkarmıştır (31). Rodentlerde yapılan çalışmalarda, komissür gelişiminde hayati role sahip düzenleyici birçok genin ekspresyonunun gösterilmesinin yanı sıra, orta hat glial yapılar tarafından salınan akson yönlendirici moleküller, onların işlevleri ve singulat korteksten başlayan aksonların yönlendiriciliği gibi, corpus callosum oluşumu için oldukça önemli olan akson yönlendirici mekanizmalar da aydınlatılmıştır (30).

Gelişim sırasında stratejik bölgelerde lokalize olmuş glial hücre toplulukları önbeyin komissüral yollarını kuşatarak hücrel sınırlar oluşturmak üzere olgunlaşırlar. Bu glial yapılar, aksonların traktuslardan ayrılıp çevre yapılara girmelerini önleyen

yönlendirici ip uçları kaynağı görevi görerek, komissüral oluşumda kilit rol oynamaktadırlar. Orta hatta corpus callosum'un ventral ve dorsalinde konumlanan glial wedge (GW) ve indusium griseum glia (IGG), Slit 2 gibi kimyasal itici (chemorepellant) moleküller salarak kallozal aksonları yönlendirirler (31). Shu ve Richards (2001) GW tarafından eksprese edilen Slit 2'nin itici etkisinin, orta hatta gelen kallozal aksonların septuma girmelerini efektif olarak inhibe ettiğini ve onların orta hattı geçmek üzere mediale doğru dönmelerini sağladığını göstermişlerdir (84). Memeli beyinde Robo proteinlerinin komissüral aksonlar üzerinde, orta hattı geçmeden, geçtiği sırada ve sonrasında eksprese edildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır. Kallozal aksonların üzerlerinde regüle edilen Robo proteinleri, çevre glial yapılar tarafından eksprese edilen itici Slit proteinlerine cevap oluşturarak, aksonların büyüme konilerinde itici bir etkinin oluşmasına neden olurlar (31). Böylece kallozal aksonlar, orta hatta Slit-Robo etkileşimini kullanarak doğru bir biçimde orta hattı geçerler.

Alkol beyin gelişimi üzerine önemli teratojenik etkileri olan kimyasal bir ajandır. Alkolün, insanlarda CC gelişimi üzerine de olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir. Prenatal alkol kullanımının, MSS üzerine olan etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için, 30 yıldan fazladır yapılan klinik araştırmaların yanı sıra, birçok deneysel çalışma da yapılmıştır. Ratlar, alkolün beyin hasarları üzerine etkisini araştırmak için başarılı bir model olarak kullanılmaktadır. Prenatal alkol maruziyetinin insanlardaki CC gelişimi üzerine olan etkileri ve ratların alkol çalışmaları için neden iyi bir model olduğu Genel Bilgiler bölümünde ayrıntılı bir biçimde ele alınmıştır.

Miller (1997) çalışmasında, (E)6-21 arasında 6.7% (v/v) etanol uygulanmış ve (P) 90-92'de elde edilen matür ratlarda, somatosensoryal kortekste kallozal projeksiyon liflerinin dağılımının ve yoğunluğunun değiştiğini bildirmektedir. Etanole maruz bırakılmış ratlarda kontrollere oranla kallozal nöronların (CCpn) yoğunluğunun daha fazla olduğu ve kallozal liflerin laminaler dağılımının değiştiği gösterilmiştir. Kontrol grubuna ait ratlarda bu projeksiyonların 2., 3. ve 5. laminalarda sonlanmasına rağmen etanol uygulanmış gruba ait ratlarda bu liflerin çoğunun dağılımının 5. ve 6. laminalarda olduğu ve bunun olası sebebinin etanol'ün nöronal migrasyon ve aksonal budanmada yarattığı defektlerden kaynaklanmış olabileceği bildirilmektedir (83). Mei Qiang ve ark. (2002) (E)11-20 arasında, 1.2–6.0 gr/kg vücut ağırlığına göre etanol uyguladıkları ve (P) 3, 6 ve 10'da elde ettikleri rat beyinlerinde, 2. trimestere denk gelen prenatal etanol

maruziyetinin, kan alkol konsantrasyonuna bağlı bir biçimde, CCpn'ların dentrik dallanmasını ve beyin ağırlığını değiştirdiğini rapor etmişlerdir. Kontrol gruplarına oranla, CCpn'ların apikal ve dentrit uzantılarının sayısı ve boylarında artış gözlerken, beyin ağırlığında azalma gözlemişlerdir (80).

Rubert ve ark. (2006), beyin gelişimi sırasındaki prenatal etanol maruziyetinin, fonksiyonel anomaliler oluşturduğunu, nörogenez ve gliogenezini etkilediğini öne sürmüşlerdir. Daha önceki çalışmalarında da, embriyogenez boyunca alkol maruziyetinin radial gliya (RG) ve gliogenezin bozulmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir. Radial glia'nın nöral progenitor hücre görevi gördüğü anlaşıldıktan sonra, etanol'ün RG üzerine etkisini araştırmışlardır. Bunun sonucunda prenatal etanol maruziyeti sonucu hücre proliferasyonunun bozulduğunu ve kültüre edilen radial glia ile embriyonik fare serebral kortekslerindeki nöronlarda ve astrositlerde azalmalar olduğunu bildirmişlerdir. Alkol gruplarına ait (E)12 rat telensefalik kültürlerinde, bölünmekte olan RG progenitor sayısında ve brain lipid binding protein-pozitif RG oranında kontrol gruplarına göre düşüş gözlemişlerdir. Bunlara uygunluk gösterir nitelikte, alkol uygulanmış (E)12 rat telensefalon kültürlerinden elde ettikleri nörosfer formasyonu denemelerinde multipotent progenitor hücreleri sayısında anlamlı düşüşler gözlemişlerdir. Dahası, prenatal alkol uygulaması sonucu RG'nın progenitor durumunu belirleyen, aktif Notch 1 ve fibroblast growth factor receptor 2 seviyelerinde de düşüş gözlemişlerdir. Tüm bu bulgular, etanol'ün telensefalik RG progenitor havuzunun ve onun nöronlara ve astrositlere dönüşümünü azalttığını ve bunun da FAS'da gözlenen beyin fonksiyon bozukluklarının bir açıklaması olabileceğini ön görmüşlerdir (85). Glial wedge'in RG'dan geliştiği düşünöldüğünde bu glial progenitor hücrelerin etanol uygulamasından etkilenmesinden dolayı GW oluşumunda aksaklıklar oluşması muhtemeldir. Bunun da daha sonra CC'ü oluşturacak kallozal liflerin doğru yönlendirmelerini etkileyeceği düşünölebilir.

Bir neokorteksteki CCpn'dan kaynak alan kallozal aksonların kontralateral neokorteksteki son hedeflerine ulaşana kadarki, orta hat glial yapılarının oluşumu ve eksprese ettikleri moleküllerin kallozal aksonlar üzerinde eksprese edilen proteinler ile olan etkileşimleri ve buna bağlı aksonal yönlendirilmenin sağlanması ve singulat korteksten mediale ve laterale doğru projeksiyon gösteren, neokorteksteki CCpn'dan başlayan kallozal aksonlara yaptıkları yönlendiricilik gibi olaylar düzgün CC oluşumu

için oldukça önemli ve hassas olaylardır. Beyin gelişiminde önemli rolleri olduğu bilinen birçok molekül ve bunların birbirleriyle olan, değişik kombinasyonlardaki etkileşimlerini içeren karmaşık mekanizmalar, kallozal aksonların yön bulmasında “axonal pathfinding” önemli bir göreve sahiptir. Aksonların düzgün bir şekilde yönlendirilmelerinin yanı sıra diğer önemli ve üzerinde kesinlikle durulması gereken konu, yönlendiriciliği yapılan bu aksonların nasıl uzadıklarıdır.

Aksonların uzaması ve yönlendirilmesi, büyüme konilerindeki aktiviteye bağlıdır. Büyüme konileri, aktif olarak uzattığı ve geri çektiği filopodia ve lamellipodiaları ile son derece hareketli yapılardır. Lamellipodia ve filopodiaların aktifliği, büyüme konilerinin baş kısımlarında gerçekleşen F-actin polimerizasyonunu gerektirmektedir (86). Lin ve ark. (1996) yılında, polimerizasyon sonrası, F-actin’in retrograd olarak miyozin temelli bir mekanizma ile büyüme konisinin merkezine doğru taşındığını ve daha sonra depolimerize olduğunu bildirmişlerdir. Büyüme konilerindeki F-actin oldukça dinamik bir yapıdır ve büyük oranda geridönüşüme uğradığı bilinmektedir. F-actin geridönüşümü, bu filamanların dikensi görünümüne sahip uçlarındaki depolimerizasyon ile işaretli uçlarındaki polimerizasyonun sonucu, “treadmilling” oluşumuyla sonlanarak gerçekleşmektedir. Büyüme konilerindeki lamellipodiadaki tahmini F-actin geridönüşüm süresinin, F-actin’in 3-5 dakikalık bir devirde tam bir geridönüşüm sağladığına işaret etmektedir (87).

Çalışmamızda, etanol uygulanmış grupta GAP-43 ekspresyon paterni kontrol grubuna kıyasla farklılıklar göstermiştir. Bu farklılıklar etanol uygulanan gruptaki kallozal aksonları oluşturan yolda kallozal aksonların yoğunluğunun azalması ve düzensizleşmesi şeklindedir. Kallozal aksonların neokorteksteki ve singulat korteksteki köken aldığı nöronlardan başlayarak karşı tarafa geçmek için orta hatta gelene kadarki süreçte etanolün birçok basamakta etkili olmuş olabileceği düşünüldüğünde, bu farklılıkların yol boyunca gözleniyor olması etanolün etkisinin sadece orta hatta yaklaşmış ve karşı tarafa geçecek lifler üzerinde değil bütün bu yol boyunca aksonları etkileyen hem hücre içi hem de hücre dışı faktörler üzerinden etkilemiş olabileceğini düşündürmektedir. Gruplar arasında GAP-43 ekspresyon paterninin farklı olması etanolün sadece GAP-43 ekspresyonunu etkilediği anlamına gelmemelidir. Fakat etanol uygulanmış gruba ait ratlardan elde edilmiş fetüs beyinlerinin koronal kesitlerinde GAP-43 ekspresyon paterninin kontrol grubunun sonuçlarına göre farklılıklar

göstermesi etanolün GAP-43 ekspresyonu üzerinde de bir etkisi olduğunu düşündürmektedir. Kaldı ki akson uçlarındaki büyüme konilerinde eksprese edilen proteinlerin %1'ini GAP-43 proteini oluşturmaktadır. Koronal kesitlerimizde, kallozal liflerin sadece terminal uçlarındaki büyüme konilerinde eksprese edilen GAP-43'ün işaretlenmesi beklendiğinden, kesitlerde kallozal aksonların bir traktus benzeri görüntü oluşturmasıyla birlikte, ekspresyon paternini oluşturan her bir işaretlenme o seviyeye gelmiş olan kallozal akson büyüme konilerini temsil etmektedir.

GAP-43 dış ortamdaki ip uçlarına cevap oluşturarak akson büyüme konilerindeki F-actin regülasyonuna katılmakta ve böylece aksonun ilerlemesine ve yön bulmasına katkı sağlamaktadır. Prenatal alkol uygulamasının muhtemelen, akson büyüme konilerinde gerçekleşen F-actin regülasyonunu bu regülasyona katkıda bulunan GAP-43 ekspresyonu üzerinden olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir. Bu ilişki, deney gruplarımızda gözlenen, karşı tarafa geçmesi beklenen fakat geçemeyen kallozal aksonların niye karşıya geçemediklerinin açıklaması olabilir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, ratlarda kısmi olarak 1. ve 2. trimesteri kapsayan, (E)6-17 boyunca prenatal alkol uygulamasının, CC'ü oluşturacak kallozal liflerin bir hemisferden diğerine doğru ilerlemekte olduğu (E)17'de elde ettiğimiz fetüs ön beyinlerinde, kallozal aksonların büyüme konilerinde eksprese edilen GAP-43 proteininin ekspresyon biçimleri üzerine etkisini immünfloresan yöntem ile inceledik. Alkol uygulanmış gruplarda GAP-43 protein ekspresyon biçiminin, kontrol gruplarına kıyasla oldukça zayıf ve belirsiz olduğu görülmüştür. Buna göre kallozal aksonların CC'ü oluşturmak üzere ilerledikleri orta hat boyunca aksonların büyümesine intrinsek olarak katkıda bulunan GAP-43 protein ekspresyon paterninin prenatal alkol uygulaması neticesinde etkilendiği gösterilmiştir.

Corpus callosum'u oluşturacak olan kallozal aksonların son hedef noktalarına başarılı bir şekilde ulaşmaları, iki beyin hemisferi arasında düzgün bağlantılar kurulabilmesi açısından oldukça önemlidir. Kallozal aksonlar son hedeflerine ulaşana dek hücre içi ve dışı kaynaklı moleküllerin rol oynadıkları mekanizmalar ve ipuçlarının etkisinde devamlı olarak ara hedef noktalara doğru yönlendirilir ve uzarlar. Aksonların yönlendirilmesinde önemli rolü olan bazı temel mekanizmalar, hücre dışı kaynaklı moleküllerin, ancak hücre içinde üretilen moleküller ile etkileşime girmesi sonucu etkin bir biçimde işlemektedirler. Bu sebeple kallozal aksonların prenatal alkol uygulaması sonucunda olumsuz yönde etkilenip etkilenmediğinin daha iyi anlaşılabilmesi, aksonların yön bulmasında, hem kallozal aksonların büyüme uçlarındaki hücre içi kaynaklı moleküller hem de aksonların ilerlemekte olduğu çevrede gerek GW gibi glial hücre popülasyonları tarafından salınabilen Slit 2 gibi gerekse hücre membranlarına ya da ekstrasellüler matrikste bulunan moleküllerin bir arada rol oynadığı mekanizmalar üzerinden araştırılması da literatüre katkıda bulunacaktır.

Çalışmamızda GAP-43 proteininin ekspresyonu immünfloresan yöntemi kullanılarak incelenmiştir. İmmünfloresan yöntemi fetüs beyinlerinden elde ettiğimiz koronal kesitlerde GAP-43 proteininin eksprese olup olmadığını ve eksprese olmuş ise proteine özgü bir işaretlenme şeklinde ortaya çıkan ekspresyon paterninin lokalizasyonunu belirlememizi sağlamıştır. Kontrol ve deney gruplarına ait kesitler arasında GAP-43 protein ekspresyon paterni kalitatif olarak değerlendirilmiştir.

Western-Blotting yöntemi kullanılarak kontrol ve deney gruplarına ait fetüs beyinlerinde total GAP-43 protein ekspresyonunun karşılaştırılmasının yararlı olacağı düşünüldü. Bu yöntem ile GAP-43 proteininin ekspresyon düzeyi hakkında semikantitatif bulgular sağlanacaktır.

Ek olarak, kallozal aksonların, sadece sinir liflerini boyama özelliği olan anti-TAG-1 gibi bir primer antikor ile immün olarak işaretlenip floresan veya konfokal mikroskopi ile görüntülenmesi, bu aksonların prenatal alkol maruziyeti etkisindeki davranışlarının morfolojik olarak incelenmesi açısından çalışmamıza katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. **Taner D.** *Fonksiyonel Nöroanatomi*.5. Baskı, Ankara: Kalkan Matbaacılı San. Tic. L. Ş., **2005**; 277.
2. **Richards LJ, Plachez C, Ren T.** Mechanisms regulating the development of the corpus callosum and its agenesis in mouse and human. *Clin Genet*, Blackwell Munksgaard **2004**; 66: 276–289.
3. **Lynn K, Warren S, Adolphs R, Tyszka J, Richards L, Mukherjee P, Elliott H.** Agenesis of the corpus callosum: genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *NATURE Reviews /Neuroscience*, **2007**; 8(4):287-99.
4. **Rakic P, Yakovlev PI.** Development of the corpus callosum and cavum septi in man. *J Comp Neurol*, **1968**; 132:45.
5. **Silver J, Edwards MA, Levitt P.** Immunocytochemical demonstration of early appearing astroglial structures that form boundaries and pathways along axon tracts in the fetal brain. *J Comp Neurol*, **1993**; 328:415–436.
6. **Kier EL, Truwit CL.** The normal and abnormal genu of the corpus callosum: an evolutionary, embryologic, anatomic and MR analysis. *AJNR*, **1996**; 17: 1631–1641.
7. **Kier EL, Truwit CL.** The lamina rostralis: modification of concepts concerning the anatomy, embryology, and MR appearance of the rostrum of the corpus callosum. *AJNR*, **1997**; 18 (4): 715–722.
8. **Yorke CH Jr, Caviness VS Jr.** Interhemispheric neocortical connections of the corpus callosum in the normal mouse: a study based on anterograde and retrograde methods. *J Comp Neurol*, **1975**; 164:233–245.
9. **Wise SP, Jones EG.** The organization and postnatal development of the commissural projection of the rat somatic sensory cortex. *J Comp Neurol*, **1976**; 168:313–344.
10. **Ivy GO, Killackey HP.** The ontogeny of the distribution of callosal projection neurons in the rat parietal cortex. *J Comp Neurol*, **1981**; 195:367–389
11. **Koester SE, O’Leary DD.** Axons of early generated neurons in cingulate cortex pioneer the corpus callosum. *J Neurosci*, **1994**; 11:6608–6620
12. **Ozaki HS, Wahlsten D.** Prenatal formation of the normal mouse corpus callosum: a quantitative study with carbocyanine dyes. *J Comp Neurol*, **1992**; 323:81–90.
13. **Ozaki HS, Wahlsten D.** Timing and origin of the first cortical axons to project through the corpus callosum and the subsequent emergence of callosal projection cells in mouse. *J Comp Neurol*, **1998**; 400:197–206.
14. **Bate CM.** Pioneer neurones in an insect embryo. *Nature*, **1976**; 260:54–56.
15. **Bastiani MJ, Raper JA, Goodman CS.** Pathfinding by neuronal growth cones in grasshopper embryos: III. Selective affinity of the G growth cone or the P cells within the A/P fascicle. *J Neurosci*, **1984**; 4:2311–2328.
16. **Klose M, Bentley D.** Transient pioneer neurons are essential for formation of an embryonic peripheral nerve. *Science*, **1989**; 245:982–984.
17. **Bork T, Schabtach E, Grant P.** Factors guiding optic fibers in developing *Xenopus* retina. *J Comp Neurol*, **1987**; 264:147–158.

18. **Kuwada JY.** Cell recognition by neuronal growth cones in a simple vertebrate embryo. *Science*, **1986**; 233:740–746.
19. **Wilson SW, Easter SS Jr.** A pioneering growth cone in the embryonic zebrafish brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1991**; 88:2293–2296.
20. **Holley JA.** Early development of the circumferential axonal pathway in mouse and chick spinal cord. *J Comp Neurol*, **1982**; 205:371–382.
21. **Super H, Martinez A, Del Rio JA, Soriano E.** Involvement of distinct pioneer neurons in the formation of layer-specific connections in the hippocampus. *J Neurosci*, **1998**; 18:4616–4626.
22. **De Carlos JA, O’Leary DD.** Growth and targeting of subplate axons and establishment of major cortical pathways. *J Neurosci*, **1992**; 4:1194–1211.
23. **McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ.** Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science*, **1989**; 245:978–982.
24. **McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ.** Subplate pioneers and the formation of descending connections from cerebral cortex. *J Neurosci*, **1994**; 14:1892–1907.
25. **Ghosh A, Antonini A, McConnell SK, Shatz CJ.** Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature*, **1990**; 347:179–181.
26. **Ghosh A, Shatz CJ.** A role for subplate neurons in the patterning of connections from thalamus to neocortex. *Development*, **1993**; 117:1031–1047.
27. **Valentino KL, Jones EG.** The early formation of the corpus callosum: a light and electron microscope study in fetal and neonatal rats. *J Neurocytol*, **1982**; 11:583–609.
28. **Livy DJ, Wahlsten D.** Retarded formation of the hippocampal commissure in embryos from mouse strains lacking a corpus callosum. *Hippocampus*, **1997**; 7:2–14.
29. **Rash BG, LJ.Richards.** A Role for Cingulate Pioneering Axons in the Development of the Corpus Callosum. *The Journal Of Comparative Neurology*, **2001**; 434:147–157.
30. **Ren T, Anderson A, Shen WB, Huang H, Plachez C, Mori JS, Kinsman SL, Richards LJ.** Imaging, Anatomical, and Molecular Analysis of Callosal Formation in the Developing Human Fetal Brain. *The Anatomical Record Part A*, **2006**; 288A:191–204.
31. **Lindwall C, Fothergill T, and Richards LJ.** Commissure formation in the mammalian forebrain. *Current Opinion in Neurobiology*, **2007**; 17:3–14.
32. **Andrews W, Liapi A, Plachez C, Camurri L, Zhang J, Mori S, Murakami F, Parnavelas JG, Sundaresan V, Richards LJ.** Robo1 regulates the development of major axon tracts and interneuron migration in the forebrain. *Development*, **2006**; 133:2243–2252.
33. **Kidd, T, Brose K, Mitchell KJ, Fetter RD, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Tear, G.** Roundabout controls axon crossing of the CNS midline and defines a novel subfamily of evolutionarily conserved guidance receptors. *Cell*, **1998**; 92, 205–215.
34. **Kidd, T, Russell C, Goodman CS, Tear G.** Dosage-sensitive and complementary functions of roundabout and commissureless control axon crossing of the CNS midline. *Neuron*, **1998**; 20, 25–33.
35. **Zou Y, Stoeckli E, Chen H, Tessier-Lavigne M.** Squeezing axons out of the gray matter: a role for slit and semaphorin proteins from midline and ventral spinal cord. *Cell*, **2000**; 102, 363–375.

36. Long H, Sabatier C, Ma L, Plump A, Yuan W, Ornitz DM, Tamada A, Murakami F, Goodman CS, Tessier-Lavigne M. Conserved roles for Slit and Robo proteins in midline commissural axon guidance. *Neuron*, **2004**; 42, 213-223.
37. Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein C J, Goodman C. S, Mason CA, Tessier-Lavigne M. Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron*, **2002**; 33, 219-232.
38. Bagri A, Marín O, Plump AS, Mak J, Pleasure SJ, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M. Slit proteins prevent midline crossing and determine the dorsoventral position of major axonal pathways in the mammalian forebrain. *Neuron*, **2002**; 33, 233-248.
39. Shu T, Sundaresan V, McCarthy MM, Richards LJ. Slit2 guides both precrossing and postcrossing callosal axons at the midline in vivo. *J. Neurosci*, **2003**; 23, 8176-8184.
40. Serafini T, Kennedy TE, Galko MJ, Mirzayan C, Jessell TM, Tessier-Lavigne M. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. Elegans* UNC-6. *Cell*, **1994**; 78:409-424.
41. Serafini T, Colamarino SA, Leonardo ED, Wang H, Beddington R, Skarnes WC, Tessier-Lavigne M. Netrin-1 is required for commissural axon guidance in the developing vertebrate nervous system. *Cell*, **1996**; 87:1001-1014.
42. Charron F, Stein E, Jeong J, McMahon AP, Tessier-Lavigne M. The morphogen sonic hedgehog is an axonal chemoattractant that collaborates with netrin-1 in midline axon guidance. *Cell*, **2003**; 113:11-23.
43. Brankatschk M, Dickson BJ. Netrins guide *Drosophila* commissural axons at short range. *Nat Neurosci*, **2006**; 9:188-194.
44. Shen Y, Mani S, Donovan SL, Schwob JE, Meiri KF. Growth-Associated Protein-43 Is Required for Commissural Axon Guidance in the Developing Vertebrate Nervous System. *The Journal of Neuroscience*, **2002**; 22(1):239-247.
45. Jones KL, Smith DW. Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet*, **1973**; 2:999-1001.
46. Lemoine P, Harousseau H, Borteyru JP, Menuet JC. Children of alcoholic parents: abnormalities observed in 127 cases. *Ouest Med*, **1968**; 8:476-482.
47. Mattson SN, Riley EP. A review of the neurobehavioral deficits in children with fetal alcohol syndrome or prenatal exposure to alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, **1998**; 22:279-294.
48. Mattson SN, Riley EP. Brain anomalies in fetal alcohol syndrome. In: Abel EL, Ed. Fetal Alcohol Syndrome: From mechanism to prevention. Boca Raton: CRC Press, **1996**; pp51-68.
49. Streissguth AP, Aase JM, Clarren SK, Randels SP, LaDue RA, Smith DF. Fetal alcohol syndrome in adolescents and adults. *J Am Med Assoc*, **1991**; 265:1961-1967.
50. Mattson SN, Riley EP, Gramling L, Delis DC, Jones KL. Neuropsychological comparison of alcohol-exposed children with or without physical features of fetal alcohol syndrome. *Neuropsychology*, **1998**; 12:146-153.
51. Mattson SN, Riley EP, Gramling L, Delis DC, Jones KL. Heavy prenatal alcohol exposure with or without physical features of the fetal alcohol syndrome leads to IQ deficits. *J Pediatr*, **1997**; 131:718-721.
52. Streissguth AP, O'Malley K. Neuropsychiatric implications and longterm consequences of fetal alcohol spectrum disorders. *Semin Clin Neuropsychiatry*, **2000**; 5:177-190.

53. **Sokol RJ, Miller SI, Reed G.** Alcohol abuse during pregnancy: an epidemiological study. *Alcohol Clin Exp Res*, **1980**; 4:135–145.
54. **Goodlett CR, Horn KH, Zhou FC.** Alcohol Teratogenesis: Mechanisms of Damage and Strategies for Intervention. *Exp Biol Med*, **2005**; 230:394–406,
55. **Archibald SL, Fennema C, Gamst A, Riley EP, Mattson SN, Jernigan TL.** Brain dysmorphology in individuals with severe prenatal alcohol exposure. *Dev Med Child Neurol*, **2001**; 43:148–154.
56. **Riley EP, McGee CL, Sowell ER.** Teratogenic effects of alcohol: a decade of brain imaging. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **2004**; 127:35–41.
57. **Swayze VW, Johnson VP, Hanson JW, Piven J, Sato Y, Giedd JN, Mosnik D, Andreasen NC.** Magnetic resonance imaging of brain anomalies in fetal alcohol syndrome. *Pediatrics*, **1997**; 99:232–240.
58. **Sowell ER, Thompson PM, Mattson SN, Tessner KD, Jernigan TL, Riley EP, Toga AW.** Regional brain shape abnormalities persist into adolescence after heavy prenatal alcohol exposure. *Cereb Cortex*, **2002**; 12:856–865.
59. **Bookstein FL, Sampson PD, Connor PD, Streissguth AP.** Midline corpus callosum is a neuroanatomical focus of fetal alcohol damage. *Anat Rec*, **2002**; 269:162–174.
60. **Abel EL, Dintcheff BA.** Factors affecting the outcome of maternal alcohol exposure: I: parity. *Neurobehav Toxicol Teratol*, **1984**; 6:373–377.
61. **Abel EL, Dintcheff BA.** Factors affecting the outcome of maternal alcohol exposure: II: maternal age. *Neurobehav Toxicol Teratol*, **1985**; 7:263–266.
62. **Jacobson JL, Jacobson SW, Sokol RJ, Ager JW.** Relation of maternal age and pattern of pregnancy drinking to functionally significant cognitive deficit in infancy. *Alcohol Clin Exp Res*, **1998**; 22:345–351.
63. **West JR, Goodlett CR, Bonthius DJ, Hamre KM, Marcussen BL.** Cell population depletion associated with fetal alcohol brain damage: mechanisms of BAC-dependent cell loss. *Alcohol Clin Exp Res*, **1990**; 14:813–818.
64. **West JR.** Fetal alcohol-induced brain damage and the problem of determining temporal vulnerability: a review. *Alcohol Drug Res*, **1987**; 7:423–441.
65. **Abel EL.** An update on incidence of FAS: FAS is not an equal opportunity birth defect. *Neurotoxicol Teratol*, **1995**; 17:437–443.
66. **Abel EL, Hannigan JH.** Maternal risk factors in fetal alcohol syndrome: provocative and permissive influences. *Neurotoxicol Teratol*, **1995**; 17:448–462.
67. **McCarver DG, Thomasson HR, Martier SS, Sokol RJ, Li T.** Alcohol dehydrogenase-2*3 allele protects against alcohol-related birth defects among African Americans. *J Pharmacol Exp Ther*, **1997**; 283:1095–1101,.
68. **Schenker S, Becker HC, Randall CL, Phillips DK, Baskin GS, Henderson GI.** Fetal alcohol syndrome: current status of pathogenesis. *Alcohol Clin Exp Res*, **1990**; 14:635–647.
69. **Goodlett CR, Horn KH.** Mechanisms of alcohol-induced damage to the developing nervous system. *Alcohol Res Health*, **2001**; 25:175–184.
70. **Guerra C.** Neuroanatomical and neurophysiological mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal alcohol exposure. *Alcohol Clin Exp Res*, **1998**; 22:304–312.

71. **West JR, Chen WJ, Pantazis NJ.** Fetal alcohol syndrome: the vulnerability of the developing brain and possible mechanisms of damage. *Metab Brain Dis*, **1994**; 9:291–332.
72. **Sulik M, Porter R, Whelen J, Eds.** *Mechanisms of Alcohol Damage In Utero*. London: Pitman Books Ltd, **1984**; pp124–141.
73. **Abel EL.** Prenatal effects of alcohol on adult learning in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, **1979**; 239–243.
74. **Clarren SK, Smith DW.** The fetal alcohol syndrome. *N. Engl. J. Med*, **1978**; 298 1063– 1067.
75. **Editorial.** Overview of the effects of alcohol on the cerebral nervous system. *Neurochem. Int*, **1999**; 35-93.
76. **Jones KL, Smith DW, Ulleland CN, Streissguth AP.** Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet I*, **1973**; 1267– 1271.
77. **Meyer LS, Kotch LE, Riley EP.** Neonatal ethanol exposure: Functional alterations associated with cerebellar growth retardation. *Neurotoxicol. Teratol*, **1990**; 12 15– 22.
78. **Miller MW.** Effect of prenatal exposure to ethanol on the development of cerebral cortex: I. Neuronal generation, Alcohol. *Clin. Exp. Res*, **1988**; (12): 440–449.
79. **Shavywitz SE, Cohen DJ, Shaywitz BA.** Behavior and learning difficulties in children of normal intelligence born to alcoholic mothers. *J. Pediatr*, **1980**; (96): 978– 982.
80. **Qiang M, Wang MW, Elberger AJ.** Second trimester prenatal alcohol exposure alters development of rat corpus callosum. *Neurotoxicology and Teratology*, **2002**; (24)719–732.
81. **Dobbing J.** The later development of the brain and its vulnerability. In: J.A. Davis, Dobbing J. (Eds.), *Scientific Foundations of Pediatrics*. 2nd. Ed., London: William Heinemann Medical Books, **1981**; 841–847.
82. **Dobbing J, Sands J.** Quantitative growth and development of the human brain. *Arch. Dis. Child*, **1973**; (48) 757– 767.
83. **Miller MW.** Effects of prenatal exposure to ethanol on callosal projection neurons in rat somatosensory cortex. *Brain Research*, **1997**; 766121–128.
84. **Shu T, Richards LJ.** Cortical Axon Guidance by the Glial Wedge during the Development of the Corpus Callosum. *The Journal of Neuroscience*, **2001**; 21(8):2749–2758.
85. **Rubert G, Min˜ana R, Pascual M, Guerri C.** Ethanol Exposure During Embryogenesis Decreases the Radial Glial Progenitor Pool and Affects the Generation of Neurons and Astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, **2006**; (84):483–496
86. **Suter DM, Forscher P.** Substrate-cytoskeletal coupling as a mechanism for the regulation of growth cone motility and guidance. *J. Neurobiology*, 2000; 44(2):97-113.
87. **Gianluca Gallo, Yee HF, Jr, Letourneau PC.** Actin turnover is required to prevent axon retraction driven by endogenous actomyosin contractility. *J Cell Biol* , **2002**; 158(7):1219-28.

ÖZGEÇMİŞ

05.07.1983 tarihinde İzmir’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Mersin’de tamamladı. 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde lisans eğitimine başladı ve 2006 yılında mezun oldu. 2006 yılında Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2006 Aralık’ta araştırma görevlisi kadrosuna girdi.

Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı’nda araştırma görevlisi olarak görev yapmaktadır.