



**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**ORTA VE YÜKSEK DOZLARDA A VİTAMİNİNİN FETAL SIÇAN
KARACİĞERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

**TEZ TİPİ
YÜKSEK LİSANS
Duygu ASLAN**

**DANIŐMAN
Yrd. Doç. Dr. Hakan AY**

2017



T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZI ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANATOMİ ANABİLİM DALI

**ORTA VE YÜKSEK DOZLARDA A VİTAMİNİNİN FETAL
SIÇAN KARACİĞERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ**

TEZ TİPİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Duygu ASLAN

DANIŐMAN

Yrd. Doç. Dr. Hakan AY

2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

Duygu ASLAN'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "**Orta ve Yüksek Dozlarda A Vitamininin Fetal Sıçan Karaciğeri Üzerindeki Etkisi**" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "**KABUL**" edilmiştir.

01.03.2017

Üye : Yrd. Doç. Dr. Hakan AY



Üye : Prof. Dr. Hilmi ÖZDEN



Üye : Prof. Dr. Ferruh YÜCEL



Üye : Yrd. Doç. Dr. Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ



Üye : Doç. Dr. Tolga ERTEKİN



Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01.03/2017 tarih ve 1122.../53.91 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof Dr. Hasan Veysi GÜNEŞ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Gebelikte vitamin preparatları ile beraber verilen A vitamininin yüksek dozlarda alınmasının anne karnındaki yavruda yapısal bozukluklara neden olduğu bilinmektedir. A vitamininin, yüksek dozda alınması nedeniyle oluşan, konjenital malformasyonlar hakkında birçok çalışma bulunmakla beraber, makroskobik malformasyonların gözlenmediği, bu nedenle de teratojenik olarak sınıflandırılmayan dozların da zihinsel ve davranışsal bozukluklara sebep olabileceği bildirilmiştir.

Fetal kan ilk karaciğere uğradığından, gelen bütün maddelerin öncelikle karaciğeri etkilemesi beklenmektedir. A vitamini de aynı yolu izlemekle beraber, memelilerde karaciğerde depolanmaktadır. Teratojenik dozda A vitamininin karaciğer üzerindeki etkisi hakkında yeterli yayın bulunmamakla beraber, normalden daha yüksek ancak teratojenik olarak kabul edilmeyen dozda A vitamininin karaciğer üzerindeki etkileri incelenmemiştir. Çalışmamız teratojenik olarak kabul edilmeyen dozların karaciğer üzerindeki etkisini göstermeyi amaçlamıştır.

Çalışmamızda gebe sıçanlara, gebeliğin 10.-12. günlerinde, gavaj ile 10.000, 50.000, 100.000 ve 200.000 IU/kg Retinol palmitat verildi. Fetüsler 19. günde sezaryen ile alınarak diseke edildi ve karaciğerleri alındı. Histolojik işlemlerden sonra stereolojik yöntemlerle incelendi.

Çalışmamız, teratojenik olarak sınıflandırılmayan 50.000 IU/kg A vitaminin karaciğer üzerindeki olumsuz etkisinin teratojenik olarak sınıflandırılan dozlar kadar olduğunu göstermektedir.

Anahtar Sözcükler

Retinol palmitat, teratojen, karaciğer, Stereoloji

SUMMARY

Vitamin A, which is also consumed with routine prenatal vitamin supplements, is teratogen when consumed in high doses. There are many studies about morphologic congenital anomalies caused by high doses of vitamin A. Some studies are reporting effects of doses that are not recognized as teratogenic because they cause no major morphological malformation, but mental and behavioral disorders that can only detected in further ages.

Mammalian fetal blood passes first through the liver, because of that it is expected that chemicals in the blood will affect primarily the liver. Vitamin A uses the same way, and is also stored in the liver. There are few studies about the teratogenic effect of vitamin A on the fetal liver, and no studies about the doses that are not categorized as teratogenic. Our study aimed to show the effect of vitamin A doses on the liver that are not considered to be teratogenic.

Five groups consisting of 5 female rats on each group were used. 10.000, 50.000, 100.000, 200.000 IU/kg retinol palmitate were given by gavage to the experimental groups between 10.-12. days of pregnancy (P9-11). The fetuses were taken at P19 with C-sections. Their livers were dissected and prepared for histological and immunohistochemistry studies. The slides were evaluated using stereological principles.

Our study is reporting that, 50.000 IU/kg vitamin A, which is not considered as teratogenic, have the same teratogenic effect on the fetal rat liver, like doses that are considered as teratogenic.

Keywords

Retinyl palmitate, teratogen, liver, stereology

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	İ
ÖZET	ii
SUMMARY	iii
ŞEKİL DİZİNİ.....	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Teratolojiye Kısa Bir Bakış.....	4
2.1.1 Teratogenezin temel prensipleri.....	5
2.1.2 Teratoloji çalışmalarında tercih edilen denekler.....	6
2.2 Karaciğer Histolojisi	7
2.2.1 Stroma	7
2.2.2 Parankima	7
2.2.3 Karaciğer Yapı Elemanları	8
2.3 Sıçanlarda karaciğer hücrelerinin embriyolojik gelişimi	9
2.4 Sıçan Karaciğer Anatomisi.....	10
2.5 Vitaminler	10
2.5.1 Retinoidler	11
2.5.2 A Vitamininin Maternal / Fetal Taşınması	12
2.5.3 A vitamini teratojenitesi	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1 Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları.....	15
3.2 Deney Gruplarının Oluşturulması	15
3.3 Fetüslerin elde edilmesi:	16

3.4 Histolojik teknikler	17
3.4.1 Doku takibi	17
3.4.2 Doku gömme (Bloklama)	18
3.4.3 Doku kesimi	19
3.4.4 Boyama.....	19
3.5 Stereolojik analizler:	23
3.5.1 Birim alandaki hepatosit nükleus sayısı (N_A)	24
3.5.2 Ortalama Hepatosit Çekirdek Çaplarının Saptanması	25
3.5.3 Birim hacimdeki hepatosit çekirdek sayısı (N_V).....	26
3.5.4 Total hacim (V)	26
3.5.5 Toplam hepatosit sayısı	29
3.6 İstatistiksel Analizler	29
4. BULGULAR	30
4.1. Birim Alana Düşen Hepatosit Sayısı (N_A).....	30
4.2. Ortalama Hepatosit Çekirdek Çaplarının Saptanması.....	32
4.3. Birim Hacimdeki Hepatosit Çekirdek Sayısı (N_V).....	33
4.4. Total Karaciğer Hacmi	35
4.5. Toplam hepatosit sayısı.....	36
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇLAR	42
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	43
ÖZGEÇMİŞ.....	49

Tablo Dizini

Tablo 4.1 Birim alana düşen hepatosit sayısı	31
Tablo 4.2 Grupların hepatosit çekirdek çapları (Diameter).....	32
Tablo 4.3 Birim hacimdeki hepatosit sayısı (N_V)	34
Tablo 4.4 Cavalieri Yöntemi İle Hesaplanan Ortalama Karaciğer Hacimleri	35
Tablo 4.5 Toplam hepatosit sayısı ortalama değerleri.	37



Şekil Dizini

Şekil 3.1 Gavaj İşlemi	16
Şekil 3.2 Gebeliğin 19.gününde anne karnından alınan fetüsler.	17
Şekil 3.3 HE boyanan örnekler. Skala 50 μ	21
Şekil 3.4 HE boyanan örnekler, daha büyük büyütme. Skala 20 μ	22
Şekil 3.5 N_A hesaplamada kullanılan örnek tarafsız sayım çerçevesi.	24
Şekil 3.6 D'nin (Çap) hesaplanması için ölçülen a ve b çapları.	25
Şekil 3.7 Stereoinvestigator ile yapılan cavalieri yöntemi ile örnek hacim hesaplama. Kontrol grubu.	27
Şekil 3.8 Stereoinvestigator ile yapılan cavalieri yöntemi ile örnek hacim hesaplama. 10.000 IU grubu.	27
Şekil 3.9 Stereoinvestigator ile yapılan cavalieri yöntemi ile örnek hacim hesaplama. 50.000 IU grubu.	28
Şekil 3.10 Stereoinvestigator ile yapılan cavalieri yöntemi ile örnek hacim hesaplama. 100.000 iu grubu.	28
Şekil 3.11 Stereoinvestigator ile yapılan cavalieri yöntemi ile örnek hacim hesaplama. 200.000 IU grubu.....	29
Şekil 4.1 Grupların N_A değerlerinin grafikte gösterimi ve karşılaştırılması. .	31
Şekil 4.2 Grupların hepatosit çekirdek çap değerlerinin grafikte gösterimi. .	33
Şekil 4.3 Grupların N_V Değerlerinin Grafikte Gösterimi.	34
Şekil 4.4 Grupların Cavalieri yöntemi ile hesaplanmış ortalama karaciğer hacimleri değerlerinin grafikte gösterimi.	36
Şekil 4.5 Grupların toplam hepatosit sayısı değerlerinin grafikte gösterimi. .	37

Simge ve Kısaltmalar Dizini

IU	: International Unit (Uluslararası Ünite)
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
°C	: Derece Santigrat
RA	: Retinoik Asit
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
RBP	: Retinol Binding Protein
HE	: Hematoxylen- Eosin
IH	: İmmunohistokimyasal
SH	: Standart Hata
D	: Diamater
K	: Kontrol Grubu
TH	: Toplam Hepatosit sayısı
NA	: Number in Area
NV	: Number in Volume
C-myc	: Bir transkripsiyon faktörünü kodlayan düzenleyici bir gen
BrdU	: Bromodeoxyuridine (5-bromo-2-deoxyuridine)
TUNEL	: TdT-dUTP nick-end-labelling

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital malformasyon, doğumsal defekt veya konjenital anomali doğumda var olan gelişim kusurunu tanımlayan terimlerdir. Diğer bir deyişle çocuk doğduktan sonra saptanabilen ve yaşamla ilgili normal işlevleri bozan, makroskobik ya da gözle fark edilemeyen, hücresel boyutta olan, mikroskobik, prenatal yapısal anomali ya da normalden sapmaları kapsamaktadır (Hall, 1992; Moore & Persaud, 1993).

Konjenital malformasyonlar majör ve minör olarak sınıflandırılır. Majör konjenital malformasyonlar; yarık damak, yarık dudak, spina bifida, meningomyelose, anensefali gibi merkezi sinir sistemi anomalileri, kalp ve dolaşım sistemi anomalileri, omfalose, gastroşiz, anal atrezi gibi ölüme ya da ciddi sakatlığa neden olan, ciddi tıbbi, cerrahi ya da kozmetik sonuçları olan şekil bozukluklarıdır. Minör konjenital malformasyonlar ise cerrahi ve kozmetik sorunlar oluşturmayan, daha çok hücresel boyuttaki yapısal anomaliler veya normalden sapmalar şeklinde gözlenmektedir (Neyzi & Ertuğrul, 1989).

Konjenital anomaliler genetik veya çevresel kökenli olabilmektedirler. Günümüzde öncelikle, doğumdan sonra tedavisi güç olan bu hastalıkların önlenmesi amaçlanmaktadır. Bunun için de bilinen genetik faktörlerin iyi anlaşılması ve çevresel etkenlerin iyi kontrol edilebilmesi gerekmektedir (Cleves, Hobbs, Zhao, Krakowiak, & MacLeod, 2011)

Vitaminlerin sadece yararlı olduğu ve hiçbir zararı olmadığı kavramı birçok vitamin için geçerliliğini kaybetmeye başlamıştır. Bunların arasında

özellikle A vitamini en çok çalışılmış olanıdır ve vitaminler arasında embriyoya kolaylıkla nüfuz edebilenlerden biridir (McCaffery, Adams, Maden, & Rosa-Molinar, 2003). Multivitamin preparatları, konjenital bozukluklardan korunmak amacıyla gebelere rutin olarak verilmektedir (Hanson et al., 1996). A vitamini gelişim ve yaşamın sürdürülmesi için gerekli bir vitamin olmakla beraber, yüksek dozlarda tüketilmesi anne karnındaki yavru için teratojeniktir. Yüksek dozlarda A vitamini ve türevlerini (retinoid) kullanan annelerde, kendiliğinden düşükler; bebeklerinde ise, ekstremiteler, kulak, çene ve arcus aorta, anomalileri, konotrunkal, timüs, retina ve optik sinir bozuklukları, merkezi sinir sistemi (MSS) anomalileri ve yarı damak gözlenmiştir (S. A. Ross, McCaffery, Drager, & De Luca, 2000; Zhu et al., 2012)

A vitamininin, yüksek dozda alınması nedeniyle oluşan, teratojenik etkisi hakkında birçok çalışma bulunmakla beraber, makroskobik malformasyonların gözlenmediği, bu nedenle de teratojenik olarak sınıflandırılmayan dozların da zihinsel ve davranışsal bozukluklara sebep olabileceği bildirilmiştir (Ritchie, Webster, Eckhoff, & Oakes, 1998)

İnsanlarda gebeliğin ilk ayının sonuna doğru, büyük morfolojik bozukluklara sebep olmayan dozlarda (2,5 mg/kg) alınan Retinoik asidin (RA) çocukların zekâsını olumsuz etkileyebileceği sonucuna varılmıştır (Holson, Gazzara, Ferguson, & Adams, 1997). Birçok çalışma gebelik sırasında alınan A vitamini türevlerinin, teratojenik olarak sınıflandırılmayan dozlarının dahi (≤ 100.000 IU/kg), öğrenme ve diğer davranış parametreleri üzerinde bozukluklara sebep olabileceğini göstermiştir (McCaffery et al., 2003). Bu nedenle de gebelik sırasında retinoid seviyelerinin takip edilmesinin gerekliliği ile ilgili yayınlar yapılmıştır (Goldberg, 2012).

A vitamininin fetal karaciğer üzerindeki teratojenik etkisi hakkında yeterli çalışma bulunmadığından hâlâ araştırılması gereken bir saha oluşturmaktadır. Mehrotra ve Shah (2004), gebeliğin 11. gününde verilen düşük dozda intraperitoneal A vitamininin fetal karaciğerde histopatolojik bulgulara sebep olduğunu belirtmişlerdir (Mehrotra & Shah, 2004). Ancak çalışma bununla sınırlı kalmıştır ve başka bir analiz yapılmamıştır. Fetal kan öncelikle karaciğere uğramaktadır. Bu nedenle bu kan ile gelen bütün maddelerin öncelikle karaciğeri etkilemesi beklenmektedir. A vitamini de aynı yolu izlemektedir ve memelilerde karaciğerde depolanmaktadır (Castellucci & Kaufmann, 2006; Castellucci, Schepe, Scheffen, Celona, & Kaufmann, 1990). Normalden daha yüksek ancak teratojenik olarak kabul edilmeyen dozlarda A vitamininin karaciğer üzerindeki etkileri incelenmemiştir. Bu dozlarda verilen A vitamininin teratolojik etkilerini göstermek için, güncel ve güvenilir olan stereolojik metotları, fetal karaciğerin bir bölgesinin ya da tamamının hacmini hesaplamada ve bu hacim içinde kalan hepatosit yoğunluğu veya toplam hepatosit sayısını göstermek için kullanan çalışmalar bulunmamaktadır (Boyce, Dorph-Petersen, Lyck, & Gundersen, 2010).

Bu çalışmada amacımız prenatal gelişim döneminde orta ve yüksek dozda A vitaminine maruz kalan sıçan karaciğer dokusundaki hücresel ve morfolojik değişikliklerin incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda sıçan fetüslerinin retinoidlerden en çok etkilendiği 10.,11. ve 12. günlerde, 10.000 IU/kg, 50.000 IU/kg, 100.000 IU/kg ve 200.000 IU/kg dozlarında oral yolla alınan A vitamininin karaciğer hacmi ve total hücre sayısı üzerindeki etkisinin histolojik ve stereolojik yöntemlerle gösterilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Teratolojiye Kısa Bir Bakış

Gebe kadınların %80'inde gebelik sırasında reçeteli veya reçetesiz ilaç kullanımı söz konusudur (Gurnee & Sylvestri, 1998). Gebelikte maruz kalınan bazı ilaçlar ve kimyasallar plasentadan fetal dolaşıma geçerek fetüste malformasyon oluştururlar ve buna teratojenik etki adı verilir (Kayaalp, 2009). Bu etkiye sebep olan ajanlar arasında ilk sırayı ilaç ve kimyasallar almaktadır (Gurnee & Sylvestri, 1998).

Çevresel etkenlerden kaynaklanan doğumsal bozuklukları ve anormal prenatal gelişmeyi inceleyen ve önlemenin araştırmalarını yaparak, gelişmeye devam eden bilim dalına teratoloji denir. Yavrularda yapısal veya fonksiyonel bozuklukları arttıran, herhangi bir ilaç, kimyasal ajan, enfeksiyon veya radyasyon gibi çevresel etkenlere teratojen adı verilmektedir (Ornoy & Arnon, 1993).

1950den önce insanlarda doğumsal kusurlar ile ilgili bilgiye ulaşılamadığından bu bozuklukların genetik kökenli olduğu düşünülmekteydi. (Hanson et al., 1996) Embriyonik ve fetal zarlar, anne karın duvarı ve uterusun, embriyoyu dışarıdan gelecek zararlara karşı koruyan, geçilmez bir bariyer olduğu düşünülüyordu. 1920 ile 1930'lu yıllar arasında, A vitamini bakımından zayıf bir diyetle beslenen domuz yavrularında meydana gelen teratojenik etkiler ile ilgili ilk gözlemler yapılmaya başlanmıştır. Bu yavruların tümünde çeşitli şekil bozuklukları gözlenmiş ve en sık rastlanan bozukluk ise

yavruların gözsüz doğması olmuştur (Hale, 1935). Gregg'in 1941 yılında Rubella virüsünün insan embriyosu gelişiminin kritik döneminde konjenital malformasyonlara sebep olabileceğini göstermesi ve 1956'da çevresel cıva kontaminasyonu sonucu yavrularda görülen doğumsal şekil bozuklukları; teratojenik etkilerin sadece doğrudan alınan ilaç ve kimyasallarla sınırlı olmadığını göstermiştir (Adams, Heath, Imagawa, Jones, & Shear, 1956). Son olarak da 1961 yılında yaşanan Thalidomide faciası; erişkinlerde minimal toksisiteye neden olan bir analjezik ilacın, gelişen insan embriyosunda toksik olabileceğini göstermiştir. Daha da önemlisi; gebelikten önceki dört yıllık bir zaman diliminin herhangi bir döneminde tek bir düşük doza dahi maruz kalan annelerin bebeklerinde, %20-30 oranında ilaca bağlı konjenital malformasyonlar gözlenmiştir. Bu olaydan sonra; yeni ilaçların resmi olarak piyasaya sürülmeden önce, hayvanlar üzerinde test edilmesi şartı getirilmiştir. Yapılan bu çalışmalar sonucunda da teratogenezi artıran faktörler belirlenmiştir (Bailey, Knight, & Balcombe, 2005).

2.1.1. Teratogenezin temel prensipleri

Gelişmekte olan memeli embriyosunun *in utero* savunmasızlığının farkında olunmasıyla birlikte günümüzde hâlâ uygulanmakta olan teratolojinin altı ilkesi geliştirilmiştir. Teratolojinin bu ilkeleri Jim Wilson tarafından 1959'da ortaya konmuştur. Bu ilkeler teratojenik etkenleri ve gelişmekte olan organizmalar üzerindeki etkilerinin incelenmesini yönlendirmektedir:

1. Teratogenezise duyarlılık, deneğin genotipine ve çevresel etmenlerle olan etkileşim tarzına bağlıdır.
2. Teratogenezise duyarlılık, ajana maruz kalındığı zaman bulunulan gelişimsel aşamaya göre değişkenlik gösterir. Etkenlere duyarlılığın ve

bu etkenlerden etkilenen organ sistemlerinin duyarlılığının kritik evreleri bulunmaktadır.

3. Teratojenik etkenler, anormal gelişimi başlatmak üzere gelişmekte olan hücre ve dokularda kendilerine has şekillerde etki gösterir.

4. Ajanların gelişmekte olan dokulara erişimi etkinin doğasına bağlıdır. Bir teratojenin gelişmekte olan embriyo ile temasını çeşitli etmenler etkiler. Etkenin doğası, annenin etkene maruz kalma yolu, derecesi, plasental transfer ve sistemik emilimin hızı, anne ile embriyonik/fetal genotipin kompozisyonu gibi.

5. Normal dışı gelişim; ölüm, sakatlık, büyüme geriliği ve işlevsel kusur olmak üzere dört şekilde tezahür eder.

6. Normal dışı gelişimin frekansı ve derecesi, etkenin miktarı gözlemlenebilir etki yaratmayan düzeyden %100 ölümcül düzeye doğru gittikçe artar (Bailey et al., 2005; Wilson, 1973).

2.1.2. Teratoloji çalışmalarında tercih edilen denekler

Deney hayvanları, bir ilaç ya da kimyasala maruziyetin gebelik sırasında teratojenik bir risk olup olmadığının tespitinde ilk rehber olmaktadır. Değişik teratojen maddelere karşı duyarlılık gösteren, gebelik süresi kısa hayvan türleri seçilmelidir. Deneyler, testlerin güvenilirliği için en az iki hayvan türünde yapılmalıdır. Deneylerde kullanılan ilacın verilme yolu, tedavide uygulanan yol ile aynı olmalıdır (Bailey et al., 2005). Teratoloji çalışmalarında kemirgenler yaygın olarak kullanılmaktadır. Anatomik yapılarının ve embriyonik gelişim basamaklarının insana çok benzemesi, plasentalarının geçirgenliği, genetik stabiliteleri, çok sayıda fetüs vermeleri sıçanları bu tarz deneysel çalışmalar için uygun denekler haline

getirmektedir (Ferguson, 1977) .

2.2. Karaciğer Histolojisi

Karaciğer; bağ dokusundan oluşmuş, kendine özgü, Glisson kapsülü denilen hilumdan içeri girip karaciğer lobülleri arasında uzanan fibröz bir kapsülle sarılıdır (Kierszenbaum, 2006). Bu kapsülün altında parankima ve stroma adı verilen iki yapıdan oluşmuştur. Karaciğerin kendine özgü fonksiyonlarını yerine getiren hücre ve yapıların oluşturduğu organ içindeki küçük düzenlemelerin tümüne parankima, bunu oluşturan hücre ve diğer yapılara destek olan organ iskeletini oluşturan destek yapıların tümüne de stroma denir (Karaöz, 2002).

2.2.1. Stroma

Karaciğeri lobüllere ayıran fibröz bağ doku insanda az geliştiğinden lobül sınırları kolay ayırt edilemez. Lobüllerin birbirleri ile ilişkisinin olduğu kısımlarda bu fibröz bağ doku kalınlaşarak üçgen biçimli, içerisinde arter, ven ve safra kanalları içeren alanlar oluşturur. Bu alanlara Portal triad veya Kiernan aralığı ismi verilmektedir (Mescher, 2013).

2.2.2. Parankima

Hepatositler birer parankim hücresi olup, karaciğeri meydana getirir. Parankima birbiri ile ilişkili birkaç hücre kalınlığına sahip katmanların oluşturduğu duvar gibidir. Hepatositler ve sinüzoidler bu duvarın yapı taşlarını oluşturur (Ovalle & Nahirney, 2013).

2.2.3.Karaciğer Yapı Elemanları

Hepatosit: Fonksiyonlarından dolayı bir çok özellik gösteren hepatositler karaciğer parankima dokusunu oluşturan hücrelerdir. 20-30 µ çapları olan hepatositler çok köşeli geniş yapıya sahip hücrelerdir. Karaciğer hücrelerinin %80'ini hepatositler oluştururlar (Bejarano, Garcia, Rodriguez, Ruiz, & Tzakis, 2006).

Hepatik stellat hücresi (Ito hücresi ve perisinüzoidal liposit): Perisinüzoidal aralıkta (endotel hücresi ile hepatosit hücresi arasındaki aralık, Disse Aralığı, Spatium perisinusoideum) bulunan hücre türüdür. Ana görevi yağ depolamaktır (Senoo et al., 2010).

Endotel hücresi: Tek katlı yassı, delikli (fenestral) hücrelerdir. Koyu boyanan yassı nükleusları vardır. Sitoplazma miktarları azdır, sitoplazmada küçük pinositik keseleri vardır. Bazal membranları incedir (Junqueira & Carneiro, 2003; Kierszenbaum & Tres, 2015; Standring, 2008).

Kupffer hücresi (Kupffer yıldız hücreleri): Bu hücreler yabancı maddeleri tutarak, tuttukları yerlerden ayrılarak ve kan dolaşımına karışarak bağışıklık sistemine katkıda bulunurlar. Bu nedenle bu hücrelere, reticuloendotelial (fagositoz yapabilen hücreler) sistemin bir parçası olarak, vücut savunmasında ve korunmasında önemli görevler düşer (Junqueira & Carneiro, 2003; Kierszenbaum & Tres, 2015; Standring, 2008).

Safra yolları hücresi (tek katlı kübik epitel): Karaciğer lopcuklarının (lobulus hepatis) arasından başlayan ve canaliculis biliferiler birleşerek ductus biliferileri oluşturur. Bunlar da interlobüler aralıklardaki (Kiernan aralığı) ductus interlobularis biliferiye açılır. Bu safra kanalları da, etraftan devamlı olarak katılan kanallarla büyür ve duvarı kalınlaşır. Duvarlarında

silindirik bir epitel örtüsü görülür ve sonuçta iki büyük ductus hepaticus dexter ve sinister porta hepatis'e ulaşır (Junqueira & Carneiro, 2003; Kierszenbaum & Tres, 2015; Standring, 2008).

2.3. Sıçanlarda karaciğer hücrelerinin embriyolojik gelişimi

Sıçanlarda 10-16 günlük fetal sıçan karaciğerlerindeki sinüzoidlerin endotel hücreleriyle çevrili olduklarını ve gebeliğin 17. gününde aralıklı endotel hücrelerin önce görünüp sonra sayıca kademeli olarak arttıkları gözlemlenmiştir. Bazal membran, sıçanlarda gebeliğin 13-14. günüyle birlikte ortaya çıkmaktadır. Gebeliğin 12-14. günlerine kadar kuvvetli bağlantı noktalarına sahip aralıksız endotel hücrelerinin var olduğu gösterilmiştir (Bankston PW, 1980). Gebeliğin 15. gününden başlamak üzere aralıklı endotel hücreleri gözlenmiştir. Yapılan tüm çalışmaların vardığı ortak sonuç; yetişkin karaciğerinde olduğu gibi fetal hepatik sinüzoidal duvarlarda bazal membranın gözlemlenmediğidir. Endotel hücrelerinin gelişimiyle ilgili, gebelik esnasındaki en belirgin değişiklik erken gelişim aşamasındaki aralıksız hücrelerin, aralıklı hücrelerle yer değiştirmesidir. Bu da, farelerde gebeliğin 15. günü, sıçanlarda 17. günü, insanlarda da 12. haftada gerçekleşmektedir. Fare ve sıçanlarda doğumdan sonra 4-5. günlere kadar sinüzoidal ve perisinüzoidal yapılar tamamıyla oluşurlar (Enzan H, 1997).

İto hücrelerinin erken gebelik dönemindeki mikro yapı özellikleri açısından fibroblastlara benzedikleri, daha sonraki fetal yaşamda (farelerde gebeliğin 15. günü, sıçanlarda 16-18. günler civarında) ise kısmen miyofibroblast benzeri özellikler sergiledikleri kaydedilmektedir. Sıçanlarda doğumu takiben 4. ve 5. günlerde bazı farklılıklar halen varlığını sürdürmekte

ise de, sinüzoid ve perisinüzoidal yapılar, endotelyal hücreler ve İto hücreleri morfolojik olarak yetişkin aşamadakilere çok benzemektedir (Enzan H, 1997).

2.4. Sıçan Karaciğer Anatomisi

Sıçan karaciğeri; sağ lateral, sağ medial, sol lateral, sol medial ve caudal loblardan oluşmaktadır. Glisson kapsülü, her bir lobu ayrı ayrı sarar ve tüm loblar porta hepatis düzeyinde bir araya gelmektedir. Caudal lob ile sol lateral lob, bir periton yaprağı ile sol lateral lobun alt yüzeyinde yapışmaktadır. Portal Triad her lob için porta hepatis seviyesinde ve parankimin hemen dışında dallanmaktadır. Sıçanlarda safra kesesi bulunmadığından; hepatik kanal, pankreas kanalları ile birleşerek duodenuma dökülür. Sol lob ve median lob, tek lob şeklindedir ve median lob umbilikal fissür ile ikiye ayrılır. Sağ lob, iki küçük alt loba ayrılır. Kaudal lob ise, parakaval ve spiegel loblarına ayrılır (Kogure, Ishizaki, Nemoto, Kuwano, & Makuuchi, 1999).

2.5. Vitaminler

Vitaminler vücutta metabolik olayların normal bir şekilde meydana gelmesi ve sağlıklı durumun sürdürülmesi için gerekli olan, vücutta sentez edilemeyen veya yetersiz miktarda sentez edilen ve besinler içinde çevreden az miktarda alınması zorunlu maddelerdir (Kayaalp, 2000).

Sağlıklı yaşamın sürdürülebilmesi için besin içinde az miktarlarda alınmaları gereken vitaminlere ve demir, çinko, kalsiyum, iyot gibi esansiyel mineral bileşiklerine mikro besleyiciler adı verilir. Proteinler, yağlar, karbonhidratlar ve elektrolit dengesi için gerekli inorganik tuzlar gibi makro

besleyiciler saf olarak alındıklarında, yeterli miktarlarda metabolizmaya alınsalar bile, hastalığı engelleyemezler. Bu sebeple vitaminlerin, esansiyel aminoasitlerin, esansiyel doymamış yağ asitlerinin ve demir, magnezyum, molibden gibi esansiyel minerallerin de alınması gereklidir (Kayaalp, 2000).

Vitaminlerin fizyolojik olaylardaki önemleri, bunların bazılarında vücutta oluşan metabolitlerin hücrelerde koenzim ve kofaktör fonksiyonu yapmalarından kaynaklanmaktadır. A ve D vitamini öncülerinden oluşan aktif metabolitler ise; kendilerine özgü reseptörler aracılığı ile belirli genlerin ifade edilimi üzerinde steroid benzeri etkileriyle hedef hücrelerdeki temel olayları kontrol etmektedirler (Kayaalp, 2000).

Vitaminler, suda ve yağda çözünen vitaminler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Vitaminler genel olarak bitkisel besinlerden alınsa da, A ve D vitamini gibi yağda çözünen vitaminler vücutta birikmeleri nedeniyle hayvansal kaynaklı besinlerden de alınabilirler (Kayaalp, 2000).

2.5.1. Retinoidler

A vitamini ve A vitamini metabolitleri genel olarak retinoidler olarak adlandırılırlar ve fizyolojik konsantrasyonlar da gelişim, hücrel farklılaşma, üreme, görme, immün cevabın oluşturulması gibi canlılığın doğal fonksiyonlarının düzenlenmesinde görev almaktadırlar (H Nau, 1994; Heinz Nau, 1995; Noy, 2000; Pauken, LaBorde, & Bolon, 1999; Tzimas, Thiel, Chahoud, & Nau, 1997). Bunun yanı sıra birçok neoplastik ve dermatolojik hastalığın tedavisinde de kullanılmaktadırlar. Aktif A vitamini metaboliti olan all-trans retinoik asit (RA) omurgalıların embriyonik gelişimi sırasında organizmanın şekil ve yapısını etkileyen bir etken olarak hareket etmektedir (Vaessen, Meijers, Bootsma, & Van Kessel, 1990).

A vitamininin yetersiz olduğu durumlarda, embriyo segmentasyonu ve büyümesi başarısız olur, damarlanma durur ve sonuçta embriyo rezorbe olur (Thompson, Howell, Pitt, & McLaughlin, 1969; Vaessen et al., 1990; Wellik & DeLuca, 1995). Erişkinlerde A vitamini eksikliği ileri aşamada epitelin karakteristik özelliklerini değiştirerek ölümüne sebep olan skuamoz metaplaziye neden olmaktadır (Rhim & Kung, 1997; Semba et al., 1993). A vitamininin fazlalığı ise embriyogenez esnasında morfolojik bozukluklara sebep olurken, erişkinde membranolitik ve hepatotoksik etki yapmaktadır (H Nau et al., 1994). Bu sebeplerle, retinoid miktarının dengesinin korunması, sağlıklı organizmanın normal fizyolojisinin korunması için son derece önemlidir (S. A. Ross et al., 2000).

2.5.2. A Vitamininin Maternal / Fetal Taşınması

Dişide üremenin gerçekleşebilmesi için A vitamininin gerekli olduğu görülmüştür. Bununla beraber; buna bağlı üremenin gerçekleşmemesinin bu eksikliğin zamanlaması ve miktarına bağlı olduğu gözlenmiştir. Çiftleşmeden önce yüksek dozda A vitaminine maruz kalan dişilerin, vaginal Smear'lerinde keratinize olmuş hücreler görülmeye devam eder ve üreme daha implantasyondan önce bozulmaya uğrar. Vaginal epitelin farklılaşmış görünümüne rağmen A vitamini eksikliği bulunan dişilerde ovulasyon devam eder ve corpus luteumları düzenli veya düzensiz aralıklarla oluşmaya devam etmektedir (Clagett-Dame & DeLuca, 2002).

Retinoidler embriyoya annenin dolaşım sistemi vasıtasıyla ulaşmaktadır. Retinol, retinaldehit ve retinoik asidin taşınımı; bu kimyasalların gebe hayvanlara yüksek dozlarda verilmesiyle ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir (Greene & Pratt, 1976; Kochhar, Penner, & Satre, 1988; Rossant, Zirngibl, Cado, Shago, & Giguere, 1991; Schnorr et al., 2011). Kemirgenlerde vitellüs

kesesi plasentası, retinolün anneden fetüsey taşınmasında önemli bir işlev üstlenmektedir. Bu işlev gebelik boyunca da önemini korumaktadır (Johansson et al., 1997). Kemirgenlerin vitellüs kesesi ile insanların plasentasının benzer olduğu daha önceki çalışmalarda ortaya konulmuştur (Dancis et al., 1992). Retinol ve Retinoik asit; anneden fetüsey taşınabilmektedir (Clagett-Dame & DeLuca, 2002).

2.5.3. A vitamini teratojenitesi

Yüksek doz A vitamini alımının birçok hayvan türünde teratojen olduğu bildirilmiştir (Hathcock et al., 1990). Retinoik asit sendromu doğumsal defektlere, timüs, merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem üzerinde malformasyonlara sebep olur. Hamilelik esnasında retinoik asit almış dişilerin yavrularında da benzer anomaliler görülmüştür (Lammer et al., 1985). A vitamininin günlük ihtiyaçtan 50-500 kat daha fazla alındığında toksik etki göstermeye başladığı, insanlarda tek doz 500.000- 1.000.000 IU A vitamini alımından sonra da ölümün meydana geldiği rapor edilmiştir. Kronik olaylarda anoreksi, cilt derisinde kalınlaşma, kilo kaybı, dermatit, saç dökülmesi, hemoraji, spontan kemik kırıkları ve ölüm olayları görülmüştür (Eric Underwood, 2012). Gebelik esnasında verilış dönemi ve dozajına bağılı olarak teratojenik etki göstermektedir (Cunningham, Mac Auley, & Mirkes, 1994). A vitamini ve türevlerinin bu etkileri maternal plazmadaki miktara ve plasentaya geçişlerdeki farklılığa bağılı olarak da değişmektedir. Maternal plazmada en yüksek değere ulaşan retinoidin, all-trans retinoik asit olduğu bildirilmiş ve bunun embriyoda da en yüksek miktarda bulunduğu tespit edilmiştir (Kraft, Löfberg, Chahoud, Bochert, & Nau, 1989).

Retinoidlerin teratojenik etkisinde birçok mekanizma bulunmaktadır. Retinoik asidin programlanmış hücre ölümü üzerine hızlandırıcı etkiye sahip

olduğundan dolayı teratojenik etki gösterdiği düşünölmektedir. Bu etki genetik bilgiyi değiştirerek veya proteinlerin glikozilasyonuna yol açarak, lizozomal membranlardan enzimlerin sızıp hücrenin otolizine sebep olmasıyla gözlenir (Alles & Sulik, 1989). Organogenezin gerçekleştiği, fetal gelişimin erken dönemlerinde epitelde ve beyinde retinoik asit birikmesinin meydana geldiği, ancak gelişimin geç dönemlerinde bu birikimin tespit edilemediği bildirilmiştir (Dencker, d'Argy, Danielsson, Ghantous, & Sperber, 1986; Kraft et al., 1989).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları

Bu çalışmada 250-300 gr ağırlığında doğum yapmamış 25 adet Wistar ırkı dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık döngü içerisinde, su ve yem alımlarına dikkat edilen, sıcaklığı sabit tutulan ($21^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$) hayvan saklama odasında, 5-6 sıçan kapasiteli kafeslerde barındırıldı. Pelet yem ile beslenerek musluk suyu verildi.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Sıçanların menstrüel safhaları vaginal smear ile saptanarak, östrus döneminde olanlar erkek sıçanlarla çiftleştirildi. Çiftleşmenin ardından ertesi gün alınan vaginal smear'lerinde sperm gözlenen dişiler sperm mevcudiyetine göre gebelik günleri tayin edildi. Gebeliğin ilk günü (G0) olarak kabul edildi.

Çalışmada beşer adet anneden oluşan 5 grup oluşturuldu:

1. Grup: Kontrol grubu olarak kullanılan bu hayvanlara gebeliklerinin 10-11-12. günlerinde teratojen ajan yerine, gavaj yoluyla, 0,5 ml ayçiçek yağı verildi.
2. Grup: Bu gruptaki hayvanlara gebeliklerinin 10-11-12. günlerinde, gavaj yoluyla, 50 mg/kg (10.000 IU/kg) Vitamin A (Merck) verildi (Piersma, Bode, Verhoef, & Olling, 1996).
3. Grup: Bu gruptaki hayvanlara gebeliklerinin 10-11-12. günlerinde 250 mg/kg (50.000 IU/kg) Vitamin A gavaj yoluyla verildi.

4. Grup: Bu gruptaki hayvanlara gebeliklerinin 10-11-12. günlerinde 500 mg/kg (100.000 IU/kg) Vitamin A gavaj yoluyla verildi.

5. Grup: Grup: Bu gruptaki hayvanlara gebeliklerinin 10-11-12. günlerinde 1000 mg/kg (200.000 IU/kg) Vitamin A gavaj yoluyla verildi. (Şekil 3.1)

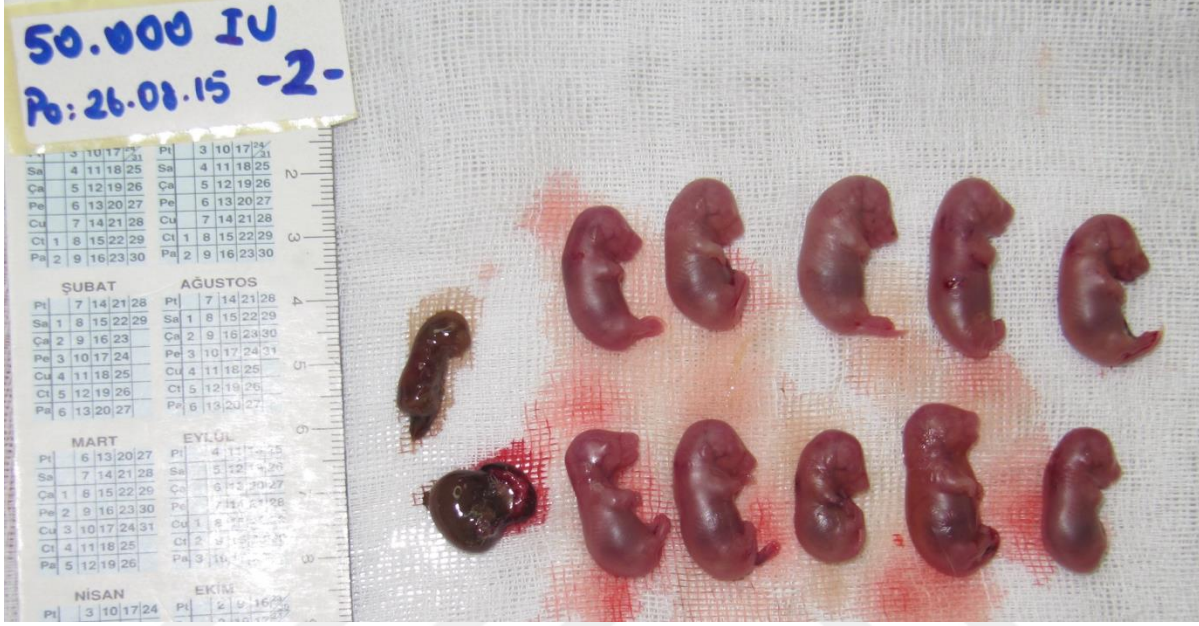


ŞEKİL 3.1 Gavaj İşlemi

3.3. Fetüslerin elde edilmesi:

Tüm gruplarda gebeliğin 19. günlerinde halotan ile anestezi edilen sıçanların abdomenleri açılarak, diseke edilen uteruslardan fetüsler çıkarıldı (Şekil 3.2); anneler ise exsanguinasyona maruz bırakılarak kurban edildi. Makroskobik incelemeleri yapıldıktan ve fotoğrafları çekildikten sonra fetüsler,

kardiyak perfüzyon ile tespit edilerek, abdomenleri açıldı ve karaciğerleri bir bütün olarak çıkarıldı. Karaciğerler histolojik preparasyon için doku kaplarında postfiksasyona maruz bırakıldı.



ŞEKİL 3.2 Gebeliğin 19.gününde anne karnından alınan fetüsler, solda iki adet rezorbasyon görülmekte.

3.4. Histolojik teknikler

3.4.1. Doku takibi

Karaciğerler gruplar halinde doku takip kasetlerine aktarıldılar; 12 saat akan çeşme suyu altında yıkandılar. Dokuların takibi aşağıdaki gibi yapıldı.

DOKU TAKİBİ	
<i>%60 Alkol</i>	1/2 saat
<i>%70 Alkol</i>	1 saat
<i>%80 Alkol</i>	1 saat
<i>%90 Alkol</i>	1 saat
<i>%96 Alkol</i>	1 saat
<i>Absolu Alkol</i>	1 saat
<i>Aseton</i>	1/2 saat
<i>Xylene</i>	20 dk
<i>Xlene</i>	20 dk
<i>Parafin - I</i>	20 dk
<i>Parafin - II</i>	20 dk
<i>Parafin - III</i>	30 dk

1.4.2. Doku gömme (Bloklama)

Metal gömme kalıbına az miktarda parafin döküldü, pens yardımıyla dokular kalıba yerleştirildi. Kalıp dolana kadar üzerlerine parafin ilave edildi. Kalıp içindeki dokulara bastırıldı ve tabana eşit olarak yapışmaları sağlandı. Üzerine blok kaseti kondu. Blok kasetinin deliklerini geçinceye kadar parafin ilave edildi. Kalıplar soğuk bir zemin üzerine alındı.

1.4.3. Doku kesimi

Mikrotom blok tutucu yuvasına blok kaseti takıldı. Dokunun ön yüzü tıraşlanarak doku bütünlüğüne ulaşıldı. 5 µ kalınlığında seri kesitler alındı (Leica RM 2125RT mikrotom ile). Kesitler, fırça yardımıyla 45 derece su banyosuna alındı. Suda açılan kesitler pozitif şarjlı lamlara alındı. Kesitler; sistematik rastgele örnekleme ile alındı. Bunun için her 12 kesitte bir, bir kesit lama alındı. Dolayısıyla 60 µ'da bir, bir kesit alınmış oldu.

1.4.4. Boyama

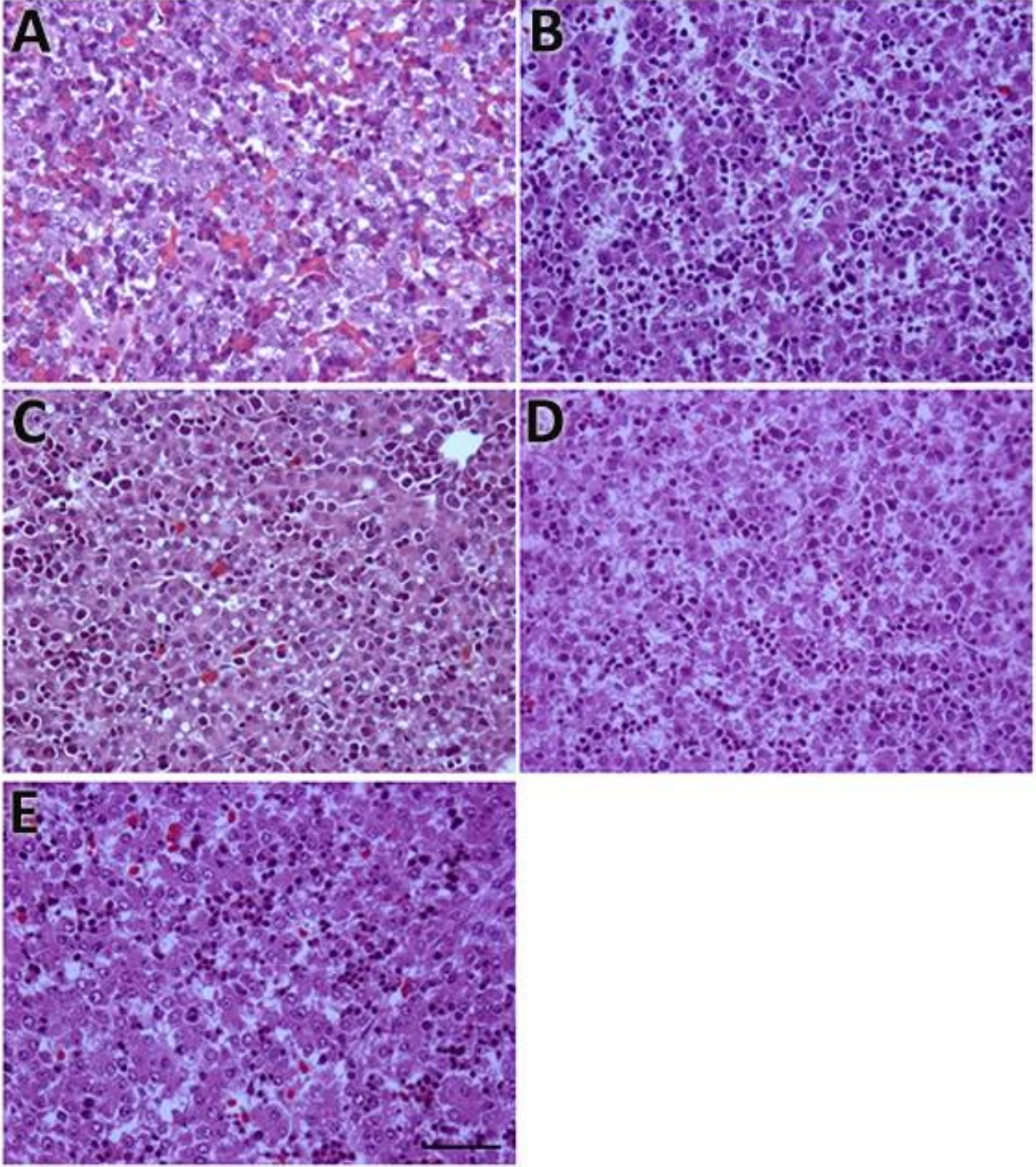
Deparafinizasyon: Kesitler 70° C'de 30 dakika etüv içinde bekletildi. İşleme aşağıdaki gibi devam edildi.

Deparafinizasyon	
<i>Xylene</i>	10 dakika
<i>Xylene</i>	10dakika
<i>Xylene</i>	10dakika
<i>Absolu Alkol</i>	1 dakika
<i>%96 Alkol</i>	1 dakika
<i>%90 Alkol</i>	1 dakika
<i>%70 Alkol</i>	1 dakika

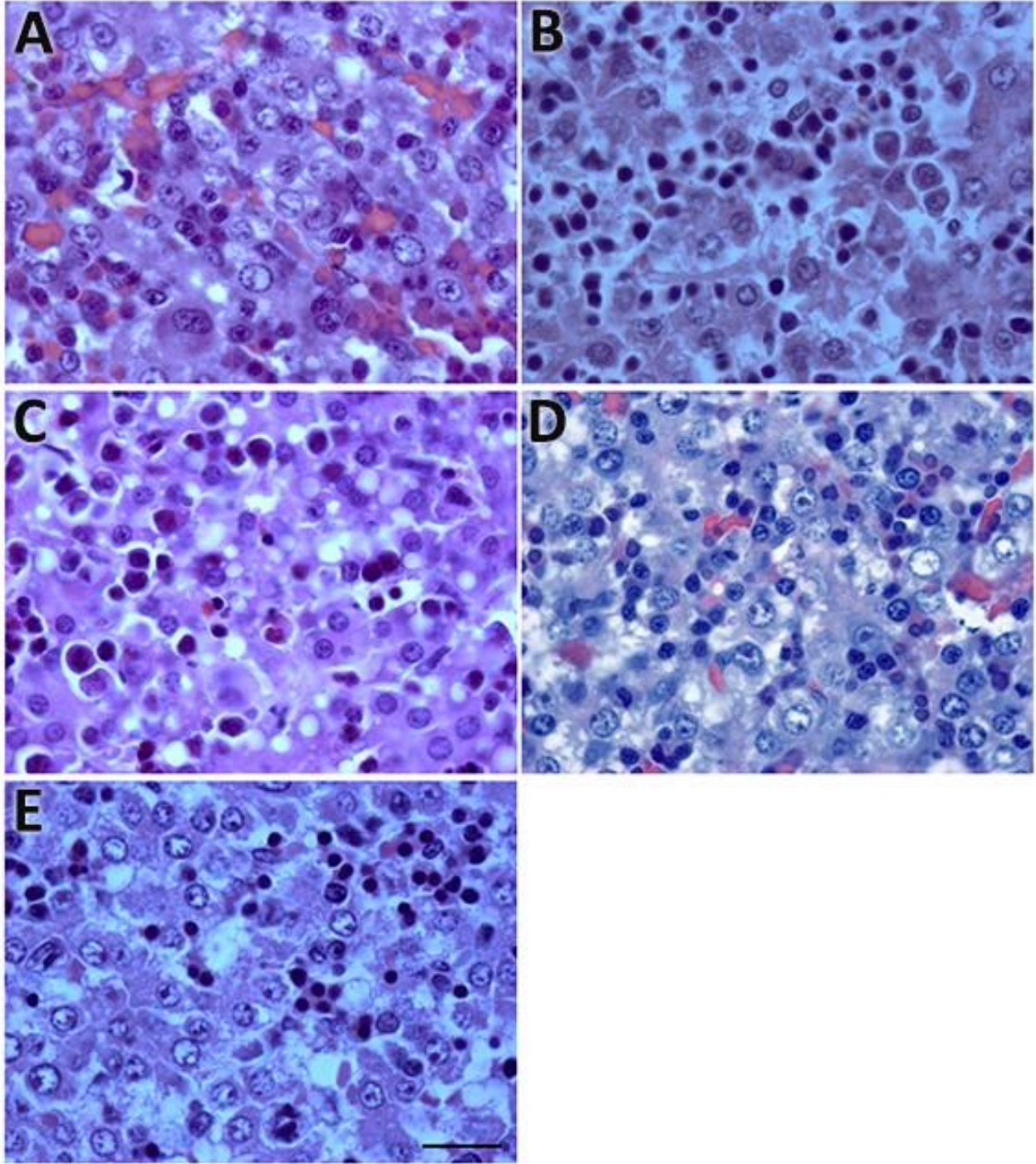
Deparafinizasyondan sonra boyama işlemine geçildi. Hematoxylin-Eosin (HE) boyama aşağıdaki gibi yapıldı.

Boyama (Hematoksilen - Eozin)	
<i>Akan çeşme suyu</i>	1 dakika
<i>Hematoksilen</i>	2 dakika
<i>Akan çeşme suyu</i>	1 dakika
<i>Asit - alkol: (%70 alkol içinde %0.3 HCl)</i>	1 kez batırılıp çıkarıldı
<i>Akan çeşme suyu</i>	1 dakika
<i>Amonyak - su (1 litre distile su içinde 10ml %37.5 Amonyak)</i>	1 kez batırılıp çıkarıldı
<i>Akan çeşme suyu</i>	1 dakika
<i>% 96 Alkol</i>	5 kez batırılıp çıkarıldı
<i>Eozin Y (Alkolik)</i>	5 dakika
<i>%70 Alkol</i>	10 kez çalkalandı
<i>%90 Alkol</i>	10 kez çalkalandı
<i>%96 Alkol</i>	10 kez çalkalandı
<i>Absolu alkol</i>	10 kez çalkalandı
<i>Xylene</i>	10 kez çalkalandı
<i>Xylene</i>	10 kez çalkalandı
<i>Xylene</i>	10 kez çalkalandı

Kapatma: Lam ortasına 1 damla Entellan (DPX) damlatıldı. 24x60 lamel 45 derece açı ile yayma yapar gibi kapatıldı.



ŞEKİL 3.3 HE boyanan örnekler. Kontrol (A), 10.000 (B), 50.000 (C), 100.000 (D), 200.000 (E) grupları görülmektedir. Skala 50 μ .



ŞEKİL 3.4 HE boyanan örnekler, daha büyük büyütme. Kontrol (A), 10.000 (B), 50.000 (C), 100.000 (D), 200.000 (E) grupları görülmektedir. Skala 20 μ .

3.5. Stereolojik analizler:

Morfometrik çalışmalarda, bir organın veya organ bileşenlerinin hacmi, bu bileşenlerin birbirlerine veya organın tamamına hacim oranları araştırmalarda sıklıkla kullanılan parametrelerdir. Belli bir bileşenin birim hacimdeki sayısından (Number in Volume) o bileşenin toplam sayısına ulaşmak istenildiğinde de toplam hacmin bilinmesi gerekir. Organ veya yapıların toplam hacimlerini veya bileşenlerinin hacimlerini hesaplamak için bir dizi farklı yöntemler kullanılmaktadır. Cavalieri prensibi, stereolojik yöntemlerde en sık kullanılan hacim hesaplama yoludur. (Mayhew & Gundersen, 1996; Weibel, 1969)

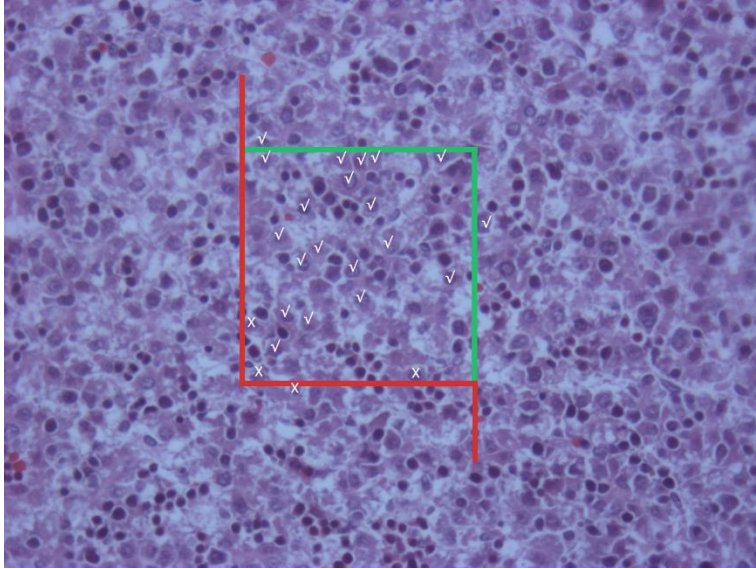
Çalışmamızda yukarıdaki bilgiler ışığında karaciğer diseksiyonu yapıldıktan sonra karaciğerler önce dilimlere, sonra şeritlere bölündü ve sistematik örnekleme yöntemiyle elde edilen bu şeritlerden her bir hayvan için yaklaşık 1cm³'lük 17 doku parçası alındı. Daha sonra bu dokular 24 saat %10'luk formaldehit içinde bekletildikten sonra, standart doku takip prosedürü takip edilerek; parafin blokları içine gömüldü. Hematoksilen-Eozin ile boyanan 5µm kalınlığındaki kesitler üzerindeki aşağıdaki parametreler hesaplandı;

1. Birim alandaki hepatosit nükleus sayısı (N_A)
2. Ortalama hepatosit çekirdek çaplarının saptanması (Diameter)
3. Birim hacimdeki hepatosit çekirdek sayısı (N_V)
4. Toplam karaciğer hacmi
5. Toplam hepatosit sayısı

3.5.1. Birim alandaki hepatosit nükleus sayısı (N_A)

Tarafsız sayım çerçevesi ile yapılan sayım işlemlerinde Grit üzerindeki noktaların her biri belli bir birim alanı (A) temsil ettiğinden, ilgilendiğimiz yapının sınırları içine düşen toplam nokta sayısını (bu birim alan değeriyle çarparsak; kesit yüzeyindeki ilgili yapının alanını tarafsız bir şekilde hesaplayabiliriz. Birim kare alanın bir kenarını temsil eden iki nokta arasındaki mesafe, küçültülen görüntülerde küçültme faktörüyle çarpılırken; büyütülen görüntülerde büyütme faktörüne bölünmelidir. Bu işlemden sonra gritteki iki nokta arasındaki gerçek mesafe (birim karenin bir kenar uzunluğu) bulunur ve bunun karesi alınarak, gerçek birim alan hesaplanır. Bu bilgiler doğrultusunda Stereoinvestigator'un fractinator probunun kesit üzerine sistematik olarak attığı tarafsız sayım çerçevelerine düşen hepatosit nükleusları sayıldı (Şekil 3.5).

N_A



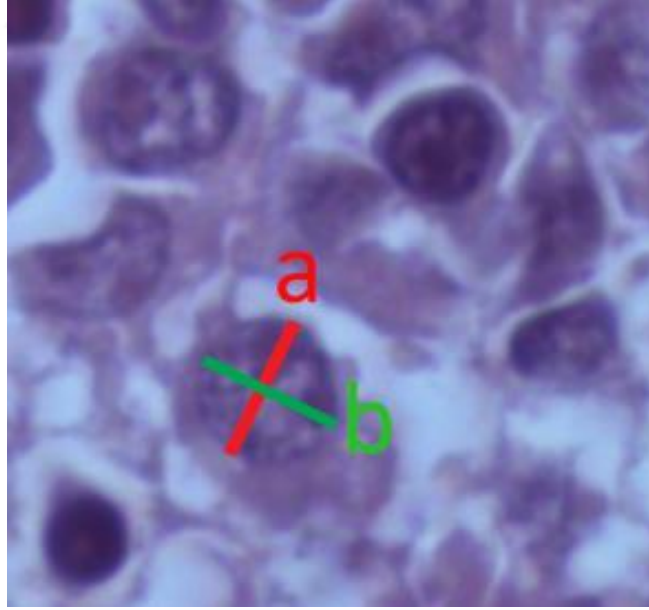
ŞEKİL 3.5 N_A hesaplamada kullanılan örnek tarafsız sayım çerçevesi. Çerçeve içerisinde kalan ve yeşil çizgiye değen çekirdekler sayılırken, kırmızı çizgiye değen ve dışarıda kalan çekirdekler sayılmamaktadır.

3.5.2. Ortalama Hepatosit Çekirdek Çaplarının Saptanması (Diameter)

NA için sayım yapılırken aynı zamanda yine yazılımda bulunan ölçüm aletiyle sayılan hepatosit nükleuslarının çapları ölçülerek kaydedildi. Çap (D); nükleusların en uzun yerinden geçen doğrunun uzunluğu (a) ile bunu tam ortadan dik kesen doğrunun uzunluğunun (b) çarpımının karekökü alınarak hesaplandı (Şekil 3.6).

$$D = \sqrt{a \cdot b}$$

Bu formül kullanılarak çizilen tüm hepatosit nükleuslarının ortalama çapları bulundu ve bu değerlerin aritmetik ortalamaları hesaplandı.



ŞEKİL 3.6 D'nin (Çap) hesaplanması için ölçülen a ve b çapları. B çapı a çapının tam ortasından dik açıyla geçmektedir.

3.5.3. Birim hacimdeki hepatosit çekirdek sayısı (N_v)

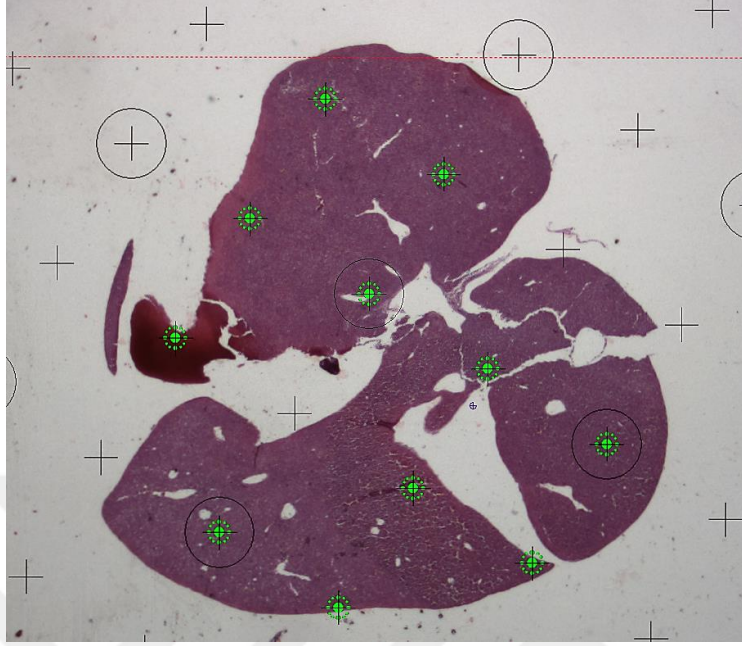
Kesitlerimiz ince kesildiğinden dolayı "disektör" gibi yöntemler kullanılmadı. Bu nedenle hesaplama Underwood' un formülüne göre yapıldı (EE Underwood, 1969). Formüle göre birim hacimdeki partikül sayısı (N_v); birim alandaki partikül sayısının (NA), kesitin ortalama partikül çapının (\bar{D}) kesit kalınlığıyla toplamına (T) bölümüne eşittir.

$$NV = \frac{NA}{\bar{D} + T}$$

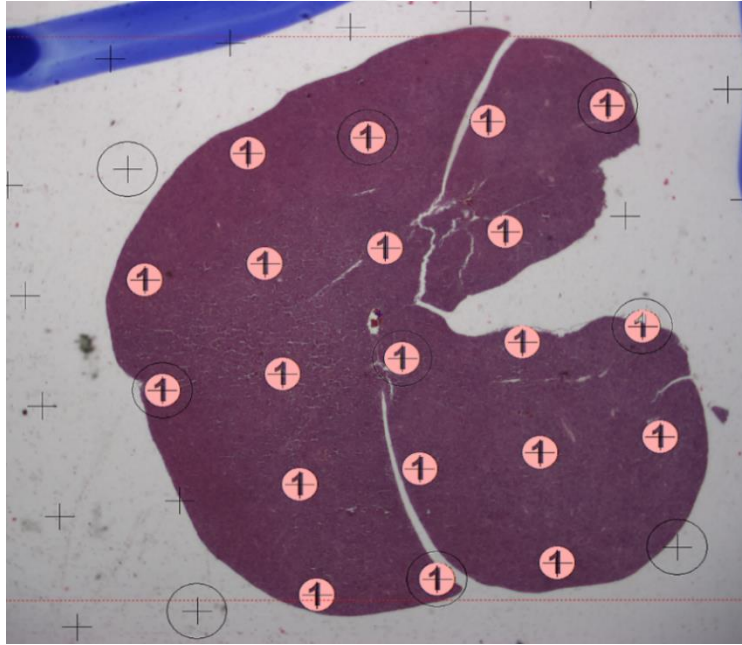
3.5.4. Total hacim (V)

Hacim; Cavalieri hacim hesaplama yöntemi ile belirlendi. Bu yöntem de Stereoinvestigator yazılımıyla gerçekleştirildi. Alınan seri kesitlerin üzerine (IH boyananlar dahil), rastgele açıyla atılan nokta gridin, kesit üzerine düşen noktaları sayıldı. Hacim (V); kesit kalınlığının (T) her bir noktasın temsil ettiği alan (a/p) ve sayılan toplam nokta sayısının ($\sum pi$) birbirleriyle çarpılmasıyla hesaplandı (Şekil 3.7, 3.8, 3.9, 3.10, 3.11).

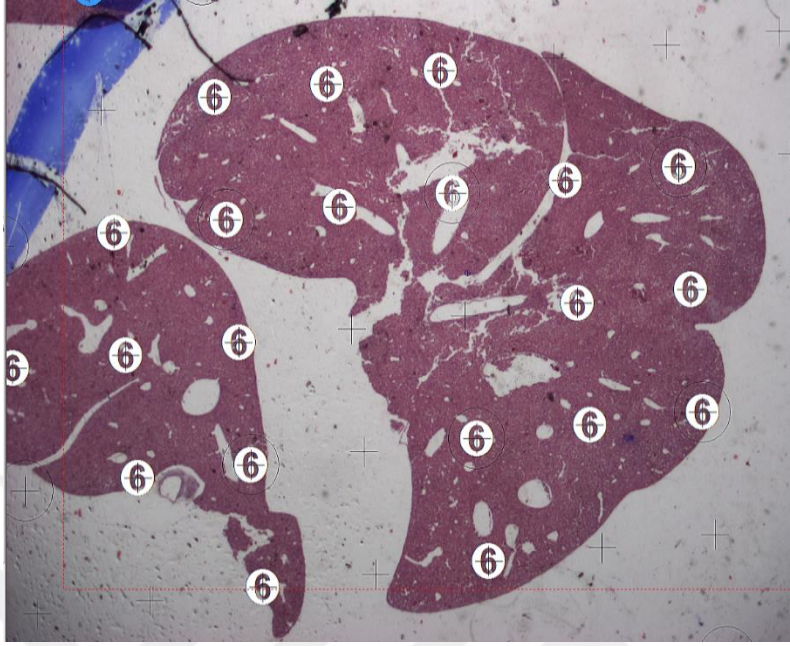
$$V = T \cdot a/p \cdot \sum pi$$



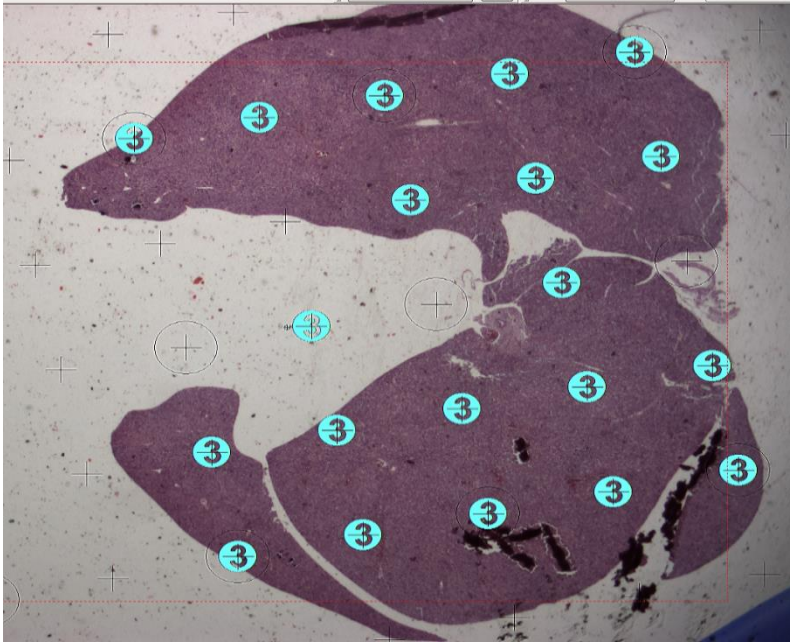
ŞEKİL 3.7 Stereoinvestigator ile yapılan cavalieri yöntemi ile örnek hacim hesaplama. Kontrol grubu. Rastgele açıyla atılan sayım ızgarasının karaciğer dokusuna değen kısımları sayılırken değmeyen kısımları sayılmamaktadır. (1,6x) büyütme kullanılmıştır.



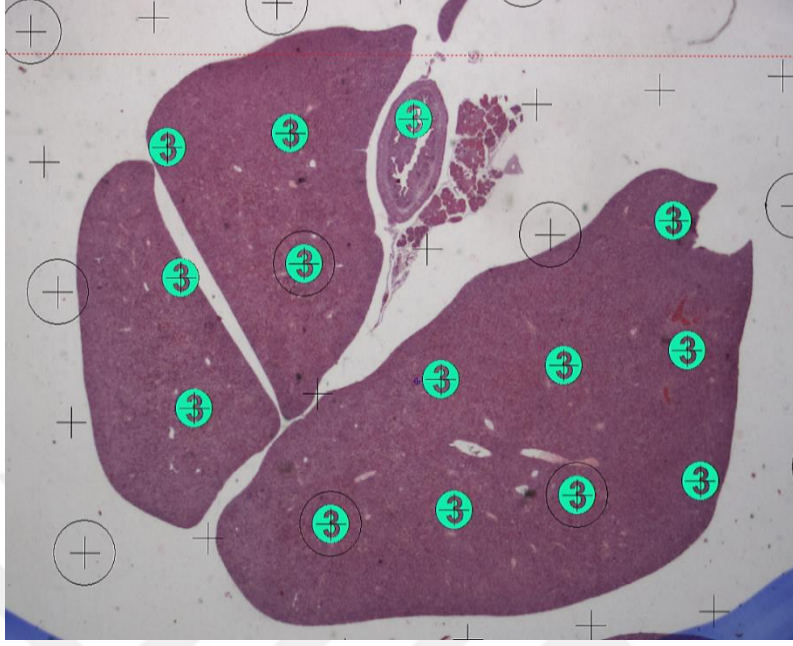
ŞEKİL 3.8 Stereoinvestigator ile yapılan cavalieri yöntemi ile örnek hacim hesaplama. 10.000 IU grubu. Rastgele açıyla atılan sayım ızgarasının karaciğer dokusuna değen kısımları sayılırken değmeyen kısımları sayılmamaktadır. (1,6x) büyütme kullanılmıştır.



ŞEKİL 3.9 Stereoinvestigator ile yapılan cavalieri yöntemi ile örnek hacim hesaplama. 50.000 IU grubu. Rastgele açıyla atılan sayım ızgarasının karaciğer dokusuna değen kısımları sayılırken değmeyen kısımları sayılmamaktadır. (1,6x) büyütme kullanılmıştır.



ŞEKİL 3.10 Stereoinvestigator ile yapılan cavalieri yöntemi ile örnek hacim hesaplama. 100.000 IU grubu. rastgele açıyla atılan sayım ızgarasının karaciğer dokusuna değen kısımları sayılırken değmeyen kısımları sayılmamaktadır. (1,6x) büyütme kullanılmıştır.



ŞEKİL 3.11 Stereoinvestigator ile yapılan cavalieri yöntemi ile örnek hacim hesaplama. 200.000 IU grubu. Rastgele açıyla atılan sayım ızgarasının karaciğer dokusuna değen kısımları sayılırken değmeyen kısımları sayılmamaktadır. (1,6x) büyütme kullanılmıştır.

3.5.5. Toplam hepatosit sayısı

Birim hacimdeki partikül sayısının (N_V) total hacimle (V) çarpılmasıyla hesaplandı.

$$Total\ sayı = N_V \cdot V$$

3.6. İstatistiksel Analizler

Deney ve kontrol gruplarına ait veriler, önce normalite testine tabii tutuldu. Normal dağıldıkları tespit edilince varyans analizi ile karşılaştırıldılar. Bu hesaplamalar için SPSS 22 yazılımı kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda karaciğerleri diseke edilen fetüsler üzerinde mikroskopik ve stereolojik incelemeler yapıldı. Gruplarda normal dağılım gözlemlendi için ortalamalar \pm standart hata (SH) ile birlikte verilmiştir. Gruplar arasındaki farklar tek yönlü varyans analizi ile değerlendirildi.

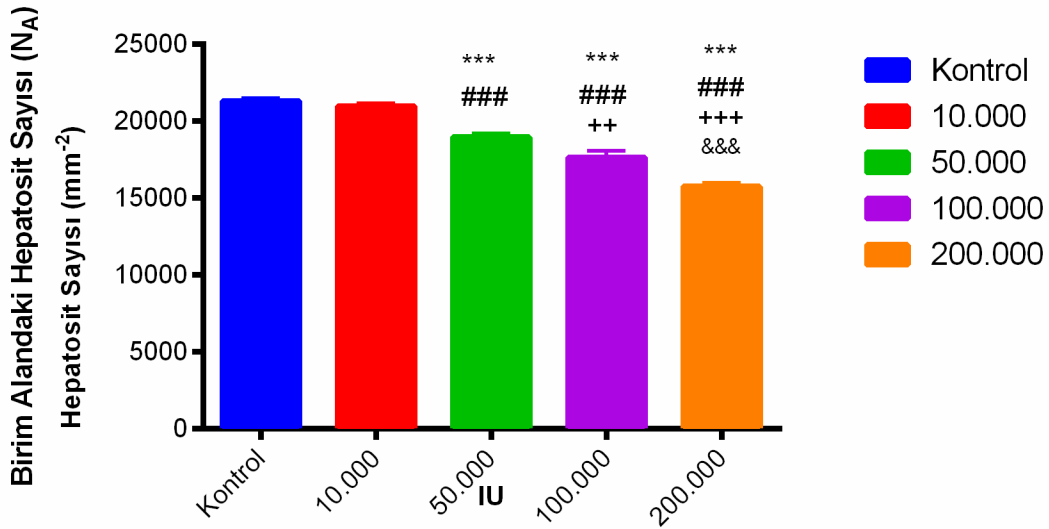
4.1 Birim Alana Düşen Hepatosit Sayısı (N_A)

Tüm sıçanlarda birim alandaki hepatosit sayısı "Number in area (N_A)" metoduna göre hesaplandı. Bu metoda göre Kontrol grubu $21,3 \cdot 10^3 \pm 0,1 \cdot 10^3$ mm⁻²; 1.grup (10.000 IU)'da $20,9 \cdot 10^3 \pm 0,2 \cdot 10^3$ mm⁻²; 2.grup (50.000 IU)'da $18,9 \cdot 10^3 \pm 0,2 \cdot 10^3$ mm⁻²; 3.grup (100.000 IU)'da $17,7 \cdot 10^3 \pm 0,4 \cdot 10^3$ mm⁻²; 4.grup (200.000IU)'da $15,7 \cdot 10^3 \pm 0,2 \cdot 10^3$ mm⁻² olarak hesaplandı. (Tablo 4.1) Verilerin varyans analizi sonucu $F(4,30)=81,08$ iken $p<0,001$ olarak elde edildi. Tüm bu sonuçlardan farklı olarak Kontrol Grubu ile 1. Grup arasında anlamlı bir fark gözlenemezken diğer gruplar arasında birim hacimde bulunan hepatosit sayısının anlamlı olarak azaldığı gözlemlendi ($p<0,001$) (Şekil 4.1).

TABLO 4.1 Birim alana düşen hepatosit sayısı

GRUPLAR	$N_A \pm SH$	ÇOKLU KARŞILAŞTIRMALAR
Kontrol (K)	$21,3 \cdot 10^3 \pm 0,1 \cdot 10^3$	
1.grup (10.000 IU)	$20,9 \cdot 10^3 \pm 0,2 \cdot 10^3$	
2.grup (50.000 IU)	$20,9 \cdot 10^3 \pm 0,2 \cdot 10^3$	***, ###
3.grup (100.000 IU)	$17,7 \cdot 10^3 \pm 0,4 \cdot 10^3$	***, ###, ++
4.grup (200.000 IU)	$15,7 \cdot 10^3 \pm 0,2 \cdot 10^3$	***, ###, +++, &&&

Kontrol grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması * ile, birinci grubun (10.000 IU) # ile, ikinci grubun (50.000 IU) + ile üçüncü grubun (100.000 IU) & sembolleri ile gösterilmiştir. p değerleri; üç simge= $p < 0,001$; iki simge= $p < 0,01$ tek simge= $p < 0,5$.



ŞEKİL 4.1 Grupların N_A değerlerinin grafikte gösterimi ve karşılaştırılması.

Kontrol grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması * ile, birinci grubun (10.000 IU) # ile, ikinci grubun (50.000 IU) + ile üçüncü grubun (100.000 IU) & sembolleri ile gösterilmiştir. P değerleri; üç simge= $p < 0,001$; iki simge= $p < 0,01$ tek simge= $p < 0,5$.

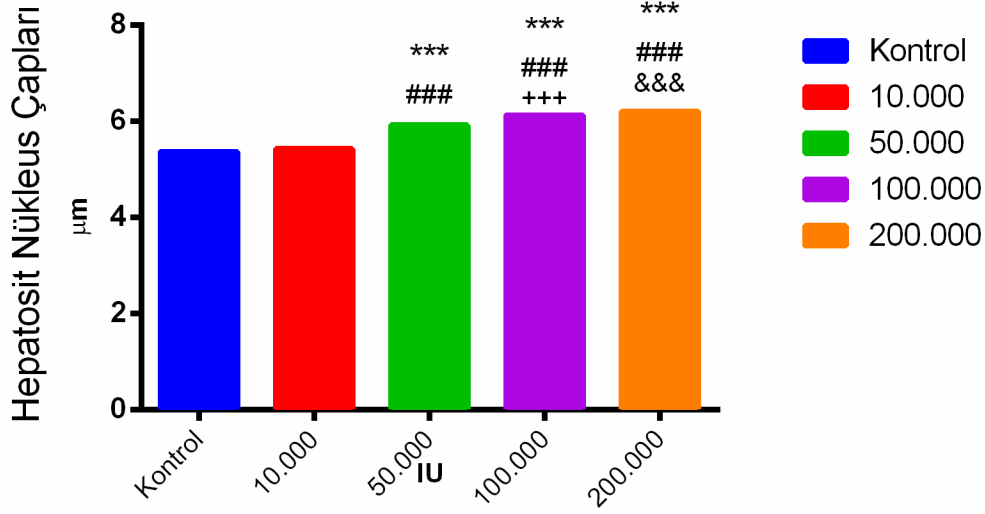
4.2 Ortalama Hepatosit Çekirdek Çaplarının Saptanması (Diameter)

Tüm sıçanlardan sistematik rastgele örnekleme yöntemiyle birim alandaki hepatosit çekirdek çapları ölçülerek hesaplandı. Ölçülen çekirdek çapları (D) Kontrol grubunda $5,4 \pm 2 \cdot 10^{-2}$; 1.grup (10.000 IU)'da $5,4 \pm 1 \cdot 10^{-2}$ μ ; 2.grup (50.000 IU)'da $5,9 \pm 7 \cdot 10^{-3}$ μ ; 3.grup (100.000 IU)'da $6,1 \pm 3 \cdot 10^{-2}$ μ ; 4.grup (200.000 IU)'da $6,2 \pm 2 \cdot 10^{-2}$ μ olarak hesaplandı (Tablo 4.2). Verilerin varyans analizi sonucu $F(4,30)=510,6$ iken $p < 0,001$ olarak elde edildi. Kontrol grubu ile birinci grup (10.000 IU) arasında bir fark bulunmadı, üçüncü (100.000 IU) ve dördüncü grup (200.000 IU) ($p < 0,5$) hariç, diğer gruplar arasındaki fark çok anlamlıydı ($p < 0,001$). Verilen A vitamini dozu arttıkça fetüs karaciğerlerinde hepatosit çaplarının doza bağlı olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi.

TABLO 4.2 Grupların hepatosit çekirdek çapları (Diameter).

GRUPLAR	$\bar{D} \pm SH$	ÇOKLU KARŞILAŞTIRMALAR
Kontrol (K)	$5,4 \pm 2 \cdot 10^{-2}$	
1.grup (10.000 IU)	$5,4 \pm 1 \cdot 10^{-2}$	
2.grup (50.000 IU)	$5,9 \pm 7 \cdot 10^{-3}$	***, ###
3.grup (100.000 IU)	$6,1 \pm 3 \cdot 10^{-2}$	***, ###, +++
4.grup (200.000 IU)	$6,2 \pm 2 \cdot 10^{-2}$	***, ###, &&&

Kontrol grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması * ile, birinci grubun (10.000 IU) # ile, ikinci grubun (50.000 IU) + ile üçüncü grubun (100.000 IU) & sembolleri ile gösterilmiştir. P değerleri; üç simge= $p < 0,001$; iki simge= $p < 0,01$ tek simge= $p < 0,5$.



ŞEKİL 4.2 Grupların hepatosit çekirdek çap değerlerinin grafikte gösterimi ve karşılaştırılması.

Kontrol grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması * ile, birinci grubun (10.000 IU) # ile, ikinci grubun (50.000 IU) + ile üçüncü grubun (100.000 IU) & sembolleri ile gösterilmiştir. P değerleri; üç simge= $p<0,001$; iki simge= $p<0,01$ tek simge= $p<0,5$.

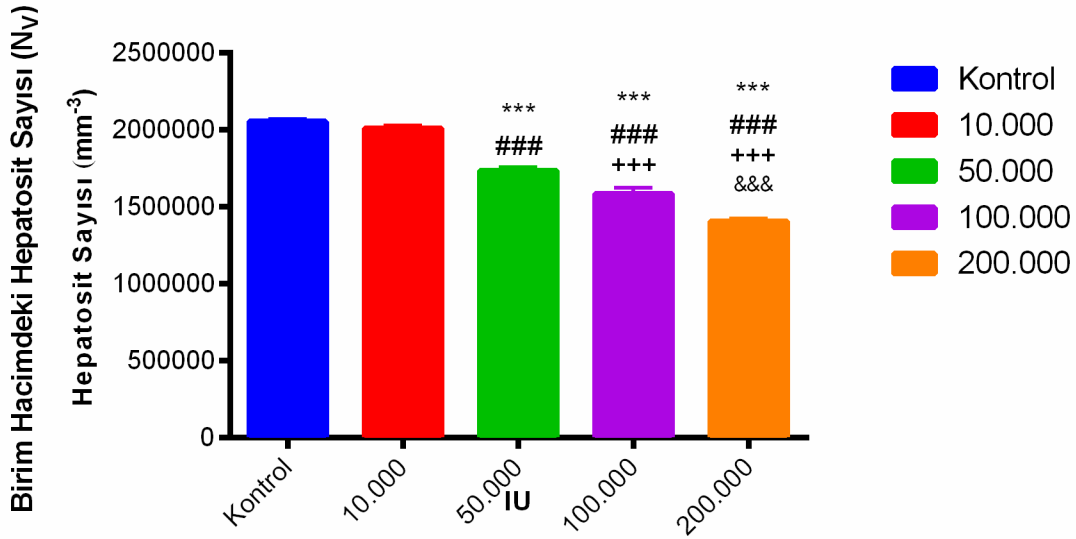
4.3. Birim Hacimdeki Hepatosit Çekirdek Sayısı (N_V)

Tüm sıçanlarda birim hacimdeki hepatosit sayısı "Number in volume" (N_V) metoduna göre hesaplandı. Buna göre hesaplanan N_V değeri Kontrol grubunda $2,1 \cdot 10^6 \pm 1,4 \cdot 10^4 \text{ mm}^{-3}$ bulunurken, 1.Grup (10.000 IU)'da $2,0 \cdot 10^6 \pm 1,9 \cdot 10^4 \text{ mm}^{-3}$, 2. Grup (50.000)'da $1,7 \cdot 10^6 \pm 2,2 \cdot 10^4 \text{ mm}^{-3}$, 3. Grupta (100.000)'da $1,6 \cdot 10^6 \pm 3,6 \cdot 10^4 \text{ mm}^{-3}$ ve 4. Grup (200.000 IU) 'da bu $1,4 \cdot 10^6 \pm 1,8 \cdot 10^4 \text{ mm}^{-3}$ olarak hesaplandı (Tablo 4.3). Grupların karşılaştırılması sonucu ($F_{(4,30)}=144,3$; $p<0,001$); Kontrol ve 10.000 grubu arasında anlamlı bir fark bulunmaz iken, diğer gruplar arasında birim hacimde bulunan hepatosit sayısında istatistiksel olarak anlamlı değere sahip düşüş saptandı. ($p<0,001$).

TABLO 4.3 Birim hacimdeki hepatosit sayısı (N_v)

GRUPLAR	$N_v \pm SH$ (mm^{-3})	ÇOKLU KARŞILAŞTIRMALAR
Kontrol (K)	$2,1 \cdot 10^6 \pm 1,4 \cdot 10^4$	
1.grup (10.000 IU)	$2,0 \cdot 10^6 \pm 1,9 \cdot 10^4$	
2.grup (50.000 IU)	$1,7 \cdot 10^6 \pm 2,2 \cdot 10^4$	***, ###
3.grup (100.000 IU)	$1,6 \cdot 10^6 \pm 3,6 \cdot 10^4$	***, ###, +++
4.grup (200.000 IU)	$1,4 \cdot 10^6 \pm 1,8 \cdot 10^4$	***, ###, +++, &&&

Kontrol grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması * ile, birinci grubun (10.000 IU) # ile, ikinci grubun (50.000 IU) + ile üçüncü grubun (100.000 IU) & sembolleri ile gösterilmiştir. P değerleri; üç simge= $p < 0,001$; iki simge= $p < 0,01$ tek simge= $p < 0,5$.



ŞEKİL 4.3 Grupların N_v Değerlerinin Grafikle Gösterimi Ve Karşılaştırılması.

Kontrol grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması * ile, birinci grubun (10.000 IU) # ile, ikinci grubun (50.000 IU) + ile üçüncü grubun (100.000 IU) & sembolleri ile gösterilmiştir. P değerleri; üç simge= $p < 0,001$; iki simge= $p < 0,01$ tek simge= $p < 0,5$.

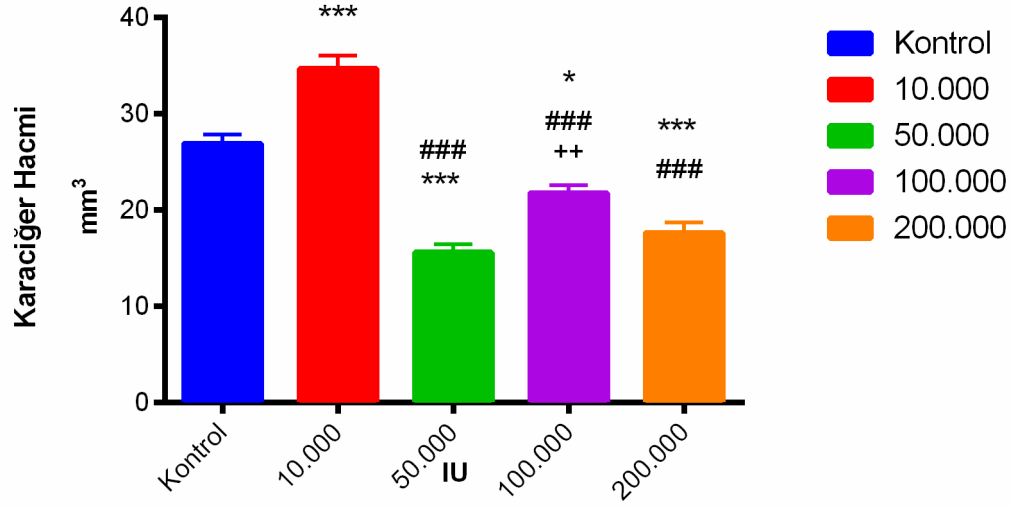
4.4. Total Karaciğer Hacmi

Cavalieri prensibi esasına dayanarak Stereo Investigator programı ile hesaplanan hacimler kontrol grubunda $26,9 \pm 0,96 \text{ mm}^3$; birinci grup (10.000 IU)'da $34,7 \pm 1,35 \text{ mm}^3$; ikinci grup (50.000 IU) 'da $15,6 \pm 0,87 \text{ mm}^3$; üçüncü grup (100.000 IU) 'da $21,8 \pm 0,85 \text{ mm}^3$; dördüncü grup (200.000 IU) 'da $17,6 \pm 1,08 \text{ mm}^3$ olarak bulundu. Tüm gruplar arasında anlamlı fark gözlemlenirken; Kontrol ve üçüncü grup arasındaki p değeri 0,5'den küçük, ikinci ve üçüncü grup arasındaki p değeri 0,01 den küçük hesaplandı. Diğer karşılaştırmalarda bulunan p değeri 0,001'den küçüktü. Kontrol grubu ile ikinci, üçüncü ve dördüncü gruplar karşılaştırıldığında doza bağlı olarak karaciğer hacminde anlamlı düzeyde azalma görüldü. Bunun haricinde Kontrol grubu ile birinci grup karşılaştırıldığında karaciğer hacminde anlamlı düzeyde artış görüldü.

Tablo 4.4 Cavalieri Yöntemi İle Hesaplanmış Ortalama Karaciğer Hacimleri

GRUPLAR	Karaciğer Hacmi \pm SH (mm^3)	ÇOKLU KARŞILAŞTIRMALAR
Kontrol (K)	$26,9 \pm 0,96$	
1.grup (10.000 IU)	$34,7 \pm 1,35$	***
2.grup (50.000 IU)	$15,6 \pm 0,87$	***, ###
3.grup (100.000 IU)	$21,8 \pm 0,85$	*, ###, ++
4.grup (200.000 IU)	$17,6 \pm 1,08$	***, ###

Kontrol grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması * ile, birinci grubun (10.000 IU) # ile, ikinci grubun (50.000 IU) + ile üçüncü grubun (100.000 IU) & sembolleri ile gösterilmiştir. P değerleri; üç simge= $p < 0,001$; iki simge= $p < 0,01$ tek simge= $p < 0,5$



ŞEKİL 4.4 Grupların Cavalieri yöntemi ile hesaplanmış ortalama karaciğer hacimleri değerlerinin grafikte gösterimi ve karşılaştırılması.

Kontrol grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması * ile, birinci grubun (10.000 IU) # ile, ikinci grubun (50.000 IU) + ile üçüncü grubun (100.000 IU) & sembolleri ile gösterilmiştir. P değerleri; üç simge= $p < 0,001$; iki simge= $p < 0,01$ tek simge= $p < 0,05$.

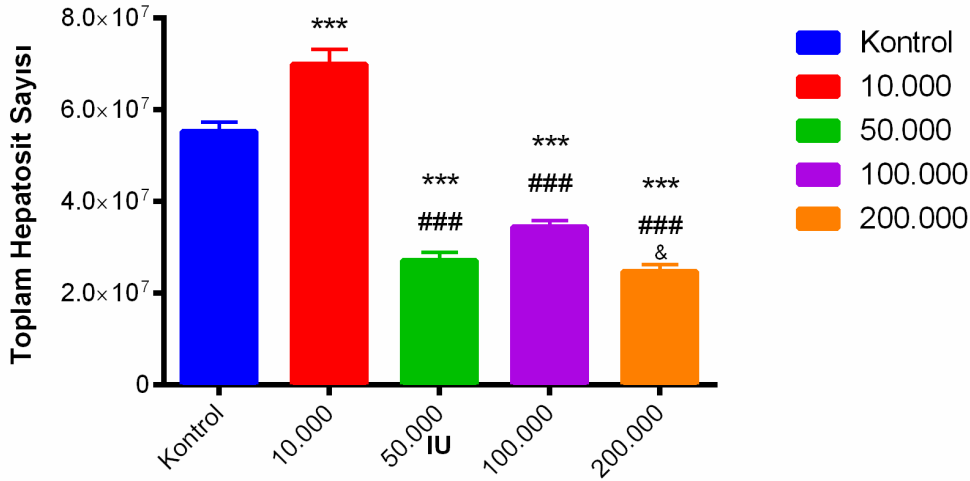
4.5. Toplam hepatosit sayısı

Hacim ve N_v 'nin çarpılması ile hesaplanan total hepatosit sayısı (TH) ise; Kontrol grubunda $55,3 \cdot 10^6 \pm 2,0 \cdot 10^6$; birinci grup (10.000 IU)'da $69,9 \cdot 10^6 \pm 3,2 \cdot 10^6$; ikinci grup (50.000 IU)'da $27,2 \cdot 10^6 \pm 1,7 \cdot 10^6$; üçüncü grup (100.000 IU)'da $34,5 \cdot 10^6 \pm 1,4 \cdot 10^6$; dördüncü grup (200.000 IU)'da $24,8 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^6$ olarak bulundu. Total hücre sayıları karşılaştırıldığında ($F_{(4,30)}=86,72$; $p < 0,001$); tüm grupların karşılaştırılması sonucu hesaplanan p değerleri üçüncü ve dördüncü gruplar arasındaki 0,5'den iken diğer gruplar karşılaştırıldığında p değeri 0,001'den küçük bulundu. Verilen A vitamini dozu arttıkça Toplam hepatosit sayısı 1. Grup(10.000 IU)'da Kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, diğer gruplarda anlamlı olarak azaldığı, bu azalmanın en fazla 2. Grup (50.000 IU)'da olduğu gözlemlendi.

TABLO 4.5 Toplam hepatosit sayısı ortalama değerleri.

GRUPLAR	TH \pm SH	ÇOKLU KARŞILAŞTIRMALAR
Kontrol (K)	$55,3 \cdot 10^6 \pm 2,0 \cdot 10^6$	
1.grup (10.000 IU)	$69,9 \cdot 10^6 \pm 3,2 \cdot 10^6$	***
2.grup (50.000 IU)	$27,2 \cdot 10^6 \pm 1,7 \cdot 10^6$	***, ###
3.grup (100.000 IU)	$34,5 \cdot 10^6 \pm 1,4 \cdot 10^6$	***, ###
4.grup (200.000 IU)	$24,8 \cdot 10^6 \pm 1,5 \cdot 10^6$	***, ###, &

Kontrol grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması * ile, birinci grubun (10.000 IU) # ile, ikinci grubun (50.000 IU) + ile üçüncü grubun (100.000 IU) & sembolleri ile gösterilmiştir. P değerleri; üç simge= $p < 0,001$; iki simge= $p < 0,01$ tek simge= $p < 0,5$.



ŞEKİL 4.5 Grupların toplam hepatosit sayısı değerlerinin grafikte gösterimi ve karşılaştırılması.

Kontrol grubunun diğer gruplarla karşılaştırılması * ile, birinci grubun (10.000 IU) # ile, ikinci grubun (50.000 IU) + ile üçüncü grubun (100.000 IU) & sembolleri ile gösterilmiştir. P değerleri; üç simge= $p < 0,001$; iki simge= $p < 0,01$ tek simge= $p < 0,5$.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda gebeliğin 10-12. gününde verilen oral 10.000 IU A vitamininin fetal karaciğer hacmini arttırdığı, 50.000 IU ve daha yüksek dozların ise azalttığı gösterilmiştir. A vitamininin fetal karaciğer hacimleri üzerindeki teratolojik etkisi ile ilgili çalışmalara rastlanamamıştır. Duitsman ve Olson (1996) yapmış oldukları çalışmada sıçanlara gebeliğin 8,5. gününde tek bir yüksek doz oral A vitamini vermişlerdir ve fetüslerdeki A vitamini miktarı ile morfolojik değişiklikleri karşılaştırmışlardır. Dokularda normalden yüksek ancak teratojenik olduğu varsayılan miktarlardan düşük A vitamininin karaciğer ağırlığını arttırdığını, daha yüksek dozların ise ağırlığını azalttığını bildirmişlerdir (Duitsman & Olson, 1996). Bu gözlemler; genelde hacimle birlikte ağırlığın da arttığı düşünüldüğünde verilerimizi destekler niteliktedir.

Karaciğer hacim değişikliklerinin en önemli nedenleri karaciğer hücre sayıları, bu hücrelerin hacimleri ve hücreler arası boşluklardır. Fetal karaciğerde daha sinüzoid yapıları gelişmediğinden hücreler arası boşluklar ile ilgili sistematik çalışmalar yapmak çok güçtür (Enzan et al., 1997). Bu nedenle çalışmamızda daha sofistike olan stereolojik yöntemler kullanılmıştır. Fetal karaciğer teratolojisi çalışmalarında ve hatta sadece fetal karaciğer çalışmalarında stereolojik yöntemlerle ilgili yayınların bulunmaması bu konunun ayrıntıyla tartışılmasını güçleştirmektedir.

Esasen çalışmamızda yapılmış olan tüm stereolojik ölçümler, fetal karaciğerdeki hücre sayılarını tahmin edebilmek için yapılmıştır.

Yaptığımız hesaplamalar sonucu fetal karaciğerlerin total hücre sayılarında 50.000 IU/kg dan itibaren keskin bir azalma gözlenmiştir. Bununla beraber 10.000 IU/kg'ın ise total hücre sayısını ileri derecede arttırdığı gözlenmiştir. Bu artış hacim hesaplamaları ile de doğru orantılı olduğundan hücre sayısının hacimle doğru orantılı olduğu da gösterilmiş oldu.

Çalışmalar RBP'in daha gebeliğin 7. gününden itibaren gelişen organ taslaklarında mevcut olduğunu bildirmektedir. Bu da A vitamininin organogenezde doğrudan etkili olduğunu göstermektedir. Yine yetersiz A vitamininin organ büyüme ve gelişmesini olumsuz etkilediği ve terapötik dozda verilen A vitamininin büyüme ve gelişme üzerinde olumlu etki gösterdiği de vurgulanmıştır (A. C. Ross & Gardner, 1994). Bu bilgiler; çalışmamızda 10.000 IU/kg A vitamininin karaciğer üzerindeki etkilerini açıklamaktadır; karaciğer hacmi ve orantılı olarak da hücre sayısı bu dozda artmıştır. Eş zamanlı olarak yapmış olduğumuz diğer bir çalışmada da aynı doz aralıkları ve aynı yöntemler kullanılmıştır, ancak ek olarak immuno-histokimyasal (IH) boyamalar ile desteklenmiştir. Eş zamanlı çalışmamızda 50.000 IU/kg ve bunun üzerindeki dozların üzerindeki dozların fetal karaciğerdeki apoptozisi arttırdığı ve hücre proliferasyonunu azalttığı görülmüştür (Ay, Soztutar, & Topal Aslan, 2016). Örneklerimiz üzerinde yapılan TUNEL ve BrdU boyamaları da bunu desteklemektedir. 10.000 IU/kg'da TUNEL boyanan hücrelerin sayısı kontrol grubundan farklı bulunmazken, BrdU pozitif hücrelerin sayısı tüm gruplardan anlamlı olarak fazla bulunmuştur. Bu veri 10.000 IU/kg dozdaki hücre artışının muhtemel açıklaması olabilir.

Teratojenlerin hücre bölünmesini azalttığı BrdU, hücre ölümünü de arttırdığı TUNEL boyamalar ile gösterilebilir (Smith et al., 2013). Eş zamanlı çalışmamızda da 50.000 IU/kg den itibaren BrdU boyanan hücrelerin sayısında ciddi bir azalma ve TUNEL boyanan hücrelerin sayısında da bununla ters

orantılı olarak anlamlı artışlar gözlenmiştir (Ay et al., 2016). Saraee ve arkadaşları (2014) kök hücrelerle yapmış oldukları bir çalışmada retinoik asidin doza bağımlı olarak apoptozu arttırdığının altını çizmişlerdir (Saraee et al., 2014). BrdU ve TUNEL işaretli hücrelerin sayılarındaki değişiklikler A vitamini ile yapılmış olan diğer çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Çalışmamızın verilerinde dikkat çeken bir diğer noktada doz yükseldikçe karaciğer hücrelerinin çekirdek çaplarının da arttığıdır. Daha 10.000 IU/kg'dan itibaren bu artış gözlenirse de, bu artış 50.000 IU/kg dan itibaren anlamlı olarak gözlenmiştir; 200.000 IU/kg dozda ise en yüksek değerine ulaşmaktadır. Yine paralel çalışmamızda IH boyamalar ile de kıyaslanınca da 50.000 IU/kg'a kadar TUNEL boyanan hücrelerin sayısının kontrollerden farklı olmadıkları gözlenmektedir. Ancak BrdU pozitif hücrelerin 10.000-50.000 IU/kg arasında veya 50.000 IU/kg'dan itibaren ciddi biçimde azaldığı gözlenmektedir. Bu A vitamininin çalışmamızda 50.000 IU/kg'dan itibaren hücre proliferasyonunu baskıladığını ve 100.000 veya 50.000-100.000 IU/kg arasındaki dozda da apoptotik hücrelerin sayısının arttığını göstermektedir (Ay et al., 2016). Davis ve arkadaşları (1990) retinoik asidin karaciğer hücreleri üzerindeki etkisi üzerine yapmış olduğu invitro çalışmada, karaciğer hücresi kültürüne verilen fazladan retinoik asidin hücre büyümesini ve bölünmesini durdurduğunu göstermiştir (Davis, Kramer, & Davidson, 1990). Bununla beraber yapılan bir konjenital malformasyon çalışmasında, karaciğer hücrelerinde hipertrofi ile beraber yüksek oranda apoptotik hücrelere de rastlandığı belirtilmektedir (Takahashi, Kutasy, Friedmacher, Takahashi, & Puri, 2016). Yine sıçanların karaciğerlerinin 2/3'ünün alındığı bir çalışmada karaciğer hücrelerinin hasarlı karaciğeri restore edebilmek için hipertrofi ve proliferasyona gittikleri gözlenmiştir (Xue, Guo, Chen, Niu, & Xu, 2015). Bu çalışmalar verilerimizi destekler ve açıklar niteliktedir. Görünüşe göre yüksek dozda A vitamini apoptoza sebep olduğundan mevcut sağlıklı hücreler karaciğerin fonksiyon

kaybını engellemek için hipertrofiye gitmektedirler. Ancak yüksek dozda A vitamini aynı zamanda hücre bölünmesini de baskıladığından dolayı yüksek dozlardaki karaciğer hücre sayıları ve dolayısıyla da hacimleri düşük kalmıştır.

Verilerimizde göze çarpan bir diğer nokta da 50.000 IU/kg doz alan grubun hacminin 100.000 IU/kg grubundan daha düşük olması. Bu total hücre sayısına da yansımıştır. Yine eş zamanlı paralel çalışmamızda da en düşük TUNEL (+) ve BrdU (+) hücre sayısı bu grupta hesaplanmıştır (Ay et al., 2016). A vitamininin sıçan fetal oesophagus'u üzerindeki etkisi ile ilgili yapılan bir çalışmada 50.000 IU/kg'ın da aralarında bulunduğu daha düşük ve daha yüksek dozda A vitamini kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda 50.000 IU/kg'ın daha yüksek dozlardan daha fazla bir teratojenik potansiyel gösterdiği belirtilmemiştir; ancak vücut ağırlığında azalma ile beraber, aralarında hepatomegalinin de bulunduğu teratojenik etkilerden bahsedilmiştir (Fagotti & Vilas-Boas, 1995). IH sonuçlarımız bu grubun fetüslerinde karaciğer hacimlerinin gelişimsel olarak küçük kaldığını düşündürmektedir. Bu grupta apoptozun kontrol ve 10.000 grubundan farklı olmaması karaciğer hacimlerinin küçük kalmasında başka mekanizmaların etkili olabileceği düşüncesini doğurmaktadır. Falasca ve arkadaşlarının (1998) yapmış oldukları bir invitro çalışmada A vitamininin fetal sıçan karaciğerindeki hepatositlerin apoptosisini artırdığını, fenotipin farklılaşmasını indüklediğini açıklamışlardır. Bunu da özellikle c-myc transkripsiyon faktörüne bağlamışlardır (Falasca, Favale, Gualandi, Maietta, & Devirgiliis, 1998). A vitamininin hücre bölünmesini baskılaması da karaciğer gelişimi üzerindeki bu olumsuz etkiyi vurgulamaktadır. Bu sonucun bu gruptaki hayvanların bireysel farklılığı mı olduğu yoksa bunun altında başka mekanizmaların mı yattığı konusuna açıklık getirebilmek için bu grubun tekrar edilmesi ve gerekirse daha ayrıntılı biyokimyasal ve genetik analizlerin yapılması gerekebilir (Fagotti & Vilas-Boas, 1995; Falasca et al., 1998).

6. SONUÇLAR

Çalışmamız gebeliğin 10.-12. günlerinde verilen oral A vitamininin 50.000 IU/kg'dan itibaren sıçan karaciğeri üzerinde büyümeyi baskılayıcı bir etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu etki kendini total karaciğer hacminin ve hücre sayısının azalması şeklinde göstermiştir. Bu etkinin 50.000 IU/kg dozdan itibaren, programlı hücre ölümünün artması ve hücre bölünmesinin baskılanmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Yapılacak çalışmalarla fetal karaciğerlerde bu etkinin moleküler sebepleri araştırılabilir. Bununla beraber çalışmamız fetal karaciğerler üzerinde ilk kez stereolojik yöntemler uygulayarak total hücre sayısını ortaya koyan çalışmalardan biridir. Sonuç olarak; çalışmamızın verileri ışığında, teratojenik bir doz olarak sınıflandırılmayan 50.000 IU/kg A vitamininin, fetal sıçan karaciğeri üzerinde daha yüksek dozlarla aynı teratojenik potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

7. Kaynaklar Dizini

- Adams, J., Heath, H., Imagawa, D., Jones, M., & Shear, H. (1956). Viral infections in the embryo. *AMA journal of diseases of children*, 92(2), 109-114.
- Alles, A. J., & Sulik, K. K. (1989). Retinoic-acid-induced limb-reduction defects: Perturbation of zones of programmed cell death as a pathogenetic mechanism. *Teratology*, 40(2), 163-171.
- Ay, H., Soztutar, E., & Topal Aslan, D. (2016). *The Effect Of Moderate And High Doses Of Vitamin A On The Liver Of Fetal Rats*. *Anatomy*.
- Bailey, J., Knight, A., & Balcombe, J. (2005). The future of teratology research is in vitro. *Biogenic Amines*, 19(2), 97-145.
- Bankston PW, P. R. (1980). The development of the sinuzoids of fetal rat liver. Morphology of endothelial cells, Kupffer cells and the transmural migration of blood cells into the sinuzoids. *Am J Anat*(159), 1-15.
- Bejarano, P. A., Garcia, M. T., Rodriguez, M. M., Ruiz, P., & Tzakis, A. G. (2006). Liver glycogen bodies: ground-glass hepatocytes in transplanted patients. *Virchows Archiv*, 449(5), 539-545.
- Boyce, R. W., Dorph-Petersen, K.-A., Lyck, L., & Gundersen, H. J. G. (2010). Design-based stereology: introduction to basic concepts and practical approaches for estimation of cell number. *Toxicologic pathology*, 38(7), 1011-1025.
- Castellucci, M., & Kaufmann, P. (2006). Basic structure of the villous trees *Pathology of the human placenta* (pp. 50-120): Springer.
- Castellucci, M., Schepe, M., Scheffen, I., Celona, A., & Kaufmann, P. (1990). The development of the human placental villous tree. *Anatomy and embryology*, 181(2), 117-128.
- Clagett-Dame, M., & DeLuca, H. F. (2002). The role of vitamin A in mammalian reproduction and embryonic development. *Annual review of nutrition*, 22(1), 347-381.
- Cleves, M., Hobbs, C., Zhao, W., Krakowiak, P., & MacLeod, S. (2011). National Birth Defects Prevention Study. Association between selected folate pathway polymorphisms and nonsyndromic limb reduction defects: a case-parental analysis. *Paediatr Perinat Epidemiol*, 25(2), 124-134.
- Cunningham, M. L., Mac Auley, A., & Mirkes, P. E. (1994). From gastrulation to neurulation: transition in retinoic acid sensitivity identifies distinct stages of neural patterning in the rat. *Developmental dynamics*, 200(3), 227-241.
- Dancis, J., Levitz, M., Katz, J., Wilson, D., Blaner, W. S., Piantedosi, R., & Goodman, D. S. (1992). Transfer and metabolism of retinol by the perfused human placenta. *Pediatric research*, 32(2), 195-199.

- Davis, B., Kramer, R., & Davidson, N. (1990). Retinoic acid modulates rat Ito cell proliferation, collagen, and transforming growth factor beta production. *Journal of Clinical Investigation*, 86(6), 2062.
- Dencker, L., d'Argy, R., Danielsson, B., Ghantous, H., & Sperber, G. (1986). Saturable accumulation of retinoic acid in neural and neural crest derived cells in early embryonic development. *Developmental pharmacology and therapeutics*, 10(3), 212-223.
- Duitsman, P. K., & Olson, J. A. (1996). Comparative embryoletality and teratogenicity of the all-trans isomers of retinoic acid, 3, 4-didehydroretinyl acetate, and retinyl acetate in pregnant rats. *Teratology*, 53(4), 237-244.
- Enzan H, H. H., Hiroi M, Kiyoku H, Saibara T, Onishi S. . (1997). Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells. . *Microscopy research and technique*, 39, 336-349.
- Enzan, H., Himeno, H., Hiroi, M., Kiyoku, H., Saibara, T., & Onishi, S. (1997). Development of hepatic sinusoidal structure with special reference to the Ito cells. *Microscopy research and technique*, 39(4), 336-349.
- Fagotti, M., & Vilas-Boas, O. (1995). Effects of hypervitaminosis A on rat fetus esophagus smooth muscle cells. *Brazilian journal of medical and biological research= Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas/Sociedade Brasileira de Biofisica...[et al.]*, 28(9), 973-975.
- Falasca, L., Favale, A., Gualandi, G., Maietta, G., & Devirgiliis, L. C. (1998). Retinoic acid treatment induces apoptosis or expression of a more differentiated phenotype on different fractions of cultured fetal rat hepatocytes. *Hepatology*, 28(3), 727-737.
- Ferguson, M. (1977). The mechanism of palatal shelf elevation and the pathogenesis of cleft palate. *Virchows Archiv A*, 375(2), 97-113.
- Goldberg, J. S. (2012). Monitoring maternal Beta carotene and retinol consumption may decrease the incidence of neurodevelopmental disorders in offspring. *Clinical medicine insights. Reproductive health*, 6, 1-8.
- Greene, R. M., & Pratt, R. M. (1976). Developmental aspects of secondary palate formation. *Journal of embryology and experimental morphology*, 36(2), 225-245.
- Gurnee, M. C., & Sylvestri, M. F. (1998). Teratogenicity of Drugs. *US Pharmacist*, 23(9), 36-47.
- Hale, F. (1935). The relation of vitamin A to anophthalmos in pigs. *American Journal of Ophthalmology*, 18(12), 1087-1093.
- Hall, J. (1992). Developmental defect in stillborn and newborn infants. *Developmental pathology of the embryo and fetus*. Philadelphia: JB. Lippincott company, 111-142.
- Hanson, J., Harris, C., Holmes, L., Juchau, M., Kimmel, G., Knudsen, T., . . . Sulik, K. (1996). A teratologist to extinction. Ad Hoc Committee on Grant Funding. *Teratology*, 53(4), 223.

- Hathcock, J. N., Hattan, D. G., Jenkins, M. Y., McDonald, J. T., Sundaresan, P. R., & Wilkening, V. L. (1990). Evaluation of vitamin A toxicity. *The American journal of clinical nutrition*, 52(2), 183-202.
- Holson, R. R., Gazzara, R. A., Ferguson, S. A., & Adams, J. (1997). Behavioral effects of low-dose gestational day 11-13 retinoic acid exposure. *Neurotoxicol Teratol*, 19(5), 355-362.
- Johansson, S., Gustafson, A.-L., Donovan, M., Romert, A., Eriksson, U., & Dencker, L. (1997). Retinoid binding proteins in mouse yolk sac and chorio-allantoic placentas. *Anatomy and embryology*, 195(6), 483-490.
- Junqueira, L., & Carneiro, J. (2003). *Temel Histoloji* (Y. AYTEKİN & S. SOLAKOĞLU, Trans.). İstanbul: Nobel Tıp kitabevi.
- Karaöz, E. (2002). *Sindirim Sistemi Histolojisi (ed) Özel Histoloji* Isparta: SDÜ Basımevi
- Kayaalp, S. (2000). *Tıbbi Farmakoloji* (Vol. 2): Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd.
- Kayaalp, S. (2009). Tıbbi Farmakoloji. *İlaçların toksik tesirleri ve toksikolojinin temel kavramları*.(12), 129-151.
- Kierszenbaum, A. L. (2006). Histoloji ve hücre biyolojisi. Çev. Ed. Ramazan DEMİR. Ankara: Palme.
- Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. (2015). *Histology and cell biology: an introduction to pathology*: Elsevier Health Sciences.
- Kochhar, D., Penner, J. D., & Satre, M. A. (1988). Derivation of retinoic acid and metabolites from a teratogenic dose of retinol (vitamin A) in mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 96(3), 429-441.
- Kogure, K., Ishizaki, M., Nemoto, M., Kuwano, H., & Makuuchi, M. (1999). A comparative study of the anatomy of rat and human livers. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences*, 6(2), 171-175.
- Kraft, J. C., Löfberg, B., Chahoud, I., Bochert, G., & Nau, H. (1989). Teratogenicity and placental transfer of all-trans-, 13-cis-, 4-oxo-all-trans-, and 4-oxo-13-cis-retinoic acid after administration of a low oral dose during organogenesis in mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 100(1), 162-176.
- Lammer, E. J., Chen, D. T., Hoar, R. M., Agnish, N. D., Benke, P. J., Braun, J. T., . . . Lott, I. T. (1985). Retinoic acid embryopathy. *New England Journal of Medicine*, 313(14), 837-841.
- Mayhew, T., & Gundersen, H. (1996). 'If you assume, you can make an ass out of u and me': a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat*, 188(Pt 1), 1.
- McCaffery, P., Adams, J., Maden, M., & Rosa-Molinar, E. (2003). Too much of a good thing: retinoic acid as an endogenous regulator of neural differentiation and exogenous teratogen. *European Journal of Neuroscience*, 18(3), 457-472.

- Mehrotra, N., & Shah, G. (2004). Effect of prenatal vitamin A in low doses on the liver and kidney of rat fetuses-A histological study. *J. Anat. Soc. India*, 53(2), 25-28.
- Mescher, A. (2013). *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, Thirteenth Edition: Text and Atlas, Thirteenth Edition*: McGraw-Hill Education.
- Moore, K., & Persaud, T. (1993). The Developing Human Clinically oriented embryology. *WB Saunders Company, Philadelphia, Pa*, 111, 142-173.
- Nau, H. (1994). Retinoid teratogenesis: toxicokinetics and structure-specificity *Use of Mechanistic Information in Risk Assessment* (pp. 118-127): Springer.
- Nau, H. (1995). Chemical structure—teratogenicity relationships, toxicokinetics and metabolism in risk assessment of retinoids. *Toxicology letters*, 82, 975-979.
- Nau, H., Chahoud, I., Dencker, L., Lammer, E., Scott, W., & Blomhoff, R. (1994). Teratogenicity of vitamin A and retinoids. *Vitamin A in health and disease.*, 615-663.
- Neyzi, O., & Ertuğrul, T. (1989). *Pediatri*, 2, 913-965.
- Noy, N. (2000). Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action. *Biochem. J*, 348, 481-495.
- Ornoy, A., & Arnon, J. (1993). Clinical teratology, In *Fetal Medicine. Western journal of medicine*, 159(3), 382.
- Ovalle, W. K., & Nahirney, P. C. (2013). *Netter's Essential Histology*: Elsevier Health Sciences.
- Pauken, C. M., LaBorde, J. B., & Bolon, B. (1999). Retinoic acid acts during peri-implantational development to alter axial and brain formation. *Anatomy and embryology*, 200(6), 645-655.
- Piersma, A., Bode, W., Verhoef, A., & Olling, M. (1996). Teratogenicity of a single oral dose of retinyl palmitate in the rat, and the role of dietary vitamin A status. *Pharmacology & toxicology*, 79(3), 131-135.
- Rhim, J. S., & Kung, H.-f. (1997). Human prostate carcinogenesis. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, 8(4).
- Ritchie, H., Webster, W., Eckhoff, C., & Oakes, D. (1998). Model predicting the teratogenic potential of retinyl palmitate, using a combined in vivo/in vitro approach. *Teratology*, 58(3-4), 113-123.
- Ross, A. C., & Gardner, E. M. (1994). The function of vitamin A in cellular growth and differentiation, and its roles during pregnancy and lactation *Nutrient Regulation during Pregnancy, Lactation, and Infant Growth* (pp. 187-200): Springer.
- Ross, S. A., McCaffery, P. J., Drager, U. C., & De Luca, L. M. (2000). Retinoids in embryonal development. *Physiological reviews*, 80(3), 1021-1054.
- Rossant, J., Zirngibl, R., Cado, D., Shago, M., & Giguere, V. (1991). Expression of a retinoic acid response element-hsplacZ transgene defines specific domains of transcriptional activity during mouse embryogenesis. *Genes & development*, 5(8), 1333-1344.

- Saraee, F., Sagha, M., Mohseni Kouchesfehiani, H., Abdanipour, A., Maleki, M., & Nikougoftar, M. (2014). Biological parameters influencing the human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells' response to retinoic acid. *BioFactors*, *40*(6), 624-635.
- Schnorr, C. E., Morrone, M. D. S., Weber, M. H., Lorenzi, R., Behr, G. A., & Moreira, J. C. F. (2011). The effects of vitamin A supplementation to rats during gestation and lactation upon redox parameters: Increased oxidative stress and redox modulation in mothers and their offspring. *Food and Chemical Toxicology*, *49*(10), 2645-2654.
- Semba, R. D., West, K., Sommer, A., Griffin, D., Ward, B., Scott, A., & Natadisastra, G. (1993). Abnormal T-cell subset proportions in vitamin-A-deficient children. *The Lancet*, *341*(8836), 5-8.
- Senoo, H., Yoshikawa, K., Morii, M., Miura, M., Imai, K., & Mezaki, Y. (2010). Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative--past, present and future. *Cell Biol Int*, *34*(12), 1247-1272. doi: 10.1042/CBI20100321
- Smith, F., Hu, D., Young, N. M., Lainoff, A. J., Jamniczky, H. A., Maltepe, E., . . . Marcucio, R. S. (2013). The effect of hypoxia on facial shape variation and disease phenotypes in chicken embryos. *Disease models & mechanisms*, *6*(4), 915-924.
- Standring, S. (2008). *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*.
- Takahashi, H., Kutasy, B., Friedmacher, F., Takahashi, T., & Puri, P. (2016). Expression of hepatic lipid droplets is decreased in the nitrofen model of congenital diaphragmatic hernia. *Pediatric surgery international*, *32*(2), 155-160.
- Thompson, J., Howell, J., Pitt, G., & McLaughlin, C. I. (1969). The biological activity of retinoic acid in the domestic fowl and the effects of vitamin A deficiency on the chick embryo. *British Journal of Nutrition*, *23*(03), 471-490.
- Tzimas, G., Thiel, R., Chahoud, I., & Nau, H. (1997). The area under the concentration-time curve of all-trans-retinoic acid is the most suitable pharmacokinetic correlate to the embryotoxicity of this retinoid in the rat. *Toxicology and applied pharmacology*, *143*(2), 436-444.
- Underwood, E. (1969). Stereology, or the quantitative evaluation of microstructures. *Journal of microscopy*, *89*(2), 161-180.
- Underwood, E. (2012). *Trace Elements in Human and Animal Nutrition 4e*: Elsevier.
- Vaessen, M.-J., Meijers, J., Bootsma, D., & Van Kessel, A. G. (1990). The cellular retinoic-acid-binding protein is expressed in tissues associated with retinoic-acid-induced malformations. *Development*, *110*(2), 371-378.
- Weibel, E. R. (1969). Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *International review of cytology*, *26*, 235-302.

- Wellik, D. M., & DeLuca, H. F. (1995). Retinol in addition to retinoic acid is required for successful gestation in vitamin A-deficient rats. *Biology of reproduction*, *53*(6), 1392-1397.
- Wilson, J. G. (1973). *Environment and birth defects*: Academic Pr.
- Xue, D., Guo, X., Chen, R., Niu, Z., & Xu, C. (2015). 14-3-3 Gene expression in regenerating rat liver after 2/3 partial hepatectomy. *Genetics and Molecular Research*, *14*(1), 2023-2030.
- Zhu, Y., Zhu, Y., Yin, H., Zhou, H., Wan, X., Zhu, J., & Zhang, T. (2012). All-trans-retinoic acid induces short forelimb malformation during mouse embryo development by inhibiting chondrocyte maturation rather than by evoking excess cell death. *Toxicology letters*, *211*(2), 172-186.



ÖZGEÇMİŞ

Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Duygu ASLAN

Doğum tarihi ve yeri: 02.06.1987 / ISPARTA

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

İletişim adresleri: duygutopal87@gmail.com

Eğitim Durumu: Anadolu Üniversitesi- Fen Fakóltesi – Biyoloji Bölümü
(Lisans)

Yabancı Dil: İngilizce

Kurslar ve Eğitim Programları:

ESOGÜ Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, 2014, Eskişehir

Kök Hücrede Uygulamalı Flow Sitometri Eğitimi,2015,Kocaeli

XIX. Kök Hücre Ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri Ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları,2015,Kocaeli