

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA PROGRAMI

İNSAN FETUSUNDA LENFO-RETİKÜLER SİSTEME DAHİL APENDİKS'İN
HİSTOLOJİK VE EMBRİYOLOJİK ARAŞTIRILMASI

DR. M. AYŞE ARVAS

58 759

Tezin Enstitüye Veriliş Tarihi :
Tezin Sözlü Savunma Tarihi : 25.09.1997
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Haluk ARVASI
Jüri üyesi : Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN
Jüri üyesi : Prof. Dr. Yurdağül CANBERK
Enstitü Müdürü : Doç. Dr. Murat ERTÜRK

TRABZON-1997

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	
I. GİRİŞ	1-2
II. GENEL BİLGİLER	3-8
III. HÜCRE SIKLUSU	9-11
IV. AKIM SİTOMETRİ	12-16
V. MATERYAL METOD	17-19
VI. BULGULAR	20-32
VI.1. Işık mikroskopik bulgular	20-24
VI.2. Akım sitometrik bulgular	25-32
VII. TARTIŞMA	33-36
VIII. SONUÇLAR	37
IX. ÖZET	38
X. İNGİLİZCE ÖZET	39
XI. KAYNAKLAR	40-42

ÖNSÖZ

“İnsan Fetusunda Lenfo-Retiküler Sisteme Dahil Apendiks’in Histolojik ve Embriyolojik Araştırılması” K.T.Ü. SABE Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak hazırlanmıştır. Çalışmalar literatür ve laboratuvar araştırmaları olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasının konusunu oluşturan apendiks üzerinde çok sayıda mikroskobik çalışma yapılmıştır. Ancak akım sitometri kullanılarak yapılan çalışmalar az sayıdadır. Özellikle fetus apendiksi üzerinde akım sitometri ile yapılan çalışmalar yok denecek kadar azdır.

Bu çalışma sırasında ve doktora eğitimimde her türlü kolaylığı gösteren bilimsel katkılarını esirgemeyen tez hocam sayın Prof. Dr. Haluk ARVASI’ye, Prof. Dr. Yavuz ÖZORAN’a, entitümüzün değerli müdürü sayın Doç. Dr. Murat ERTÜRK’e ve çalışmamda desteklerini esirgemeyen arkadaşlarıma sevgi, saygı, ve hürmetlerimi arz ederim.

Ekim 1997

Dr. M. Ayşe ARVAS

I.GİRİŞ

Abdominal Tonsil olarak da adlandırılan appendix vermiformis (apendiks) sindirim sisteminin bağışıklıkla doğrudan ve en fazla ilişkisi olan organdır (1).

İnsanlarda fonksiyonu halen tartışılmakta olan apendiksin ftal hayatta duktus allantoise bağlı olduğu iddiaları vardır. Bu nedenle tubulus alimentoriusun devamı olan bu yapı doğum sonrası lenforetiküler sisteme dahil edilmektedir. Ancak bu ikilem tam olarak açıklanabilmiş değildir (2,3,4).

Çekumun bir evaginasyonu olan apendiks duvarında bol miktarda lenfoid nodül bulundurur. Apendiks kr sonlanan bir invaginasyon olduğu için hızla yenilenmez, genellikle iltihaplanır ve çıkarılır. Apendiksin iltihaplanmadan çıkarıldığında vücutta bir kayıp etkisine sebep olup olmadığı tartişmalı bir konudur. İnsanlar için iltihaplandığında tehlikeli olan bir yapının bu durumla karşılaşılmadan çıkarılması doğru değildir? Bu soru bu güne kadar tam anlamıyla cevaplanamamıştır (5-9).

Apendiks embriyo 12 mm (8.Hafta) iken primitif barsak halkasının kaudal parçasından konik şekilde genişleme gösteren ekal şişliğin distal ucunda primitif apendiks adı verilen dar bir divertikül şeklinde gelişmeye başlar(1). Apendiks kolonun aşağı inişi sırasında olduğundan, apendiksin neden sıklıkla çekum veya kolonun arkasında yer aldığının anlaşılması zor değildir(8-10).

Apendiks çekumun bir evaginasyonudur, duvarında bol lenfoid nodül bulunduğu için küçük dar ve düzensiz bir lümene sahiptir. Genel yapısı kalın bağırsağınkine benzemesine karşın daha az sayıda ve daha az intestinal bez içerir, taenia coli yoktur(4,12,13,14).

Tartışmalı olan sindirim sistemindeki görevinin ötesinde sindirim kanalının diffüz, lenfoid follikül oluşturan ve lenfoid folliküllerin agregat oluşumu ile ortaya çıkan peyer plakları halindeki lenfoid dokunun en yoğun bulunduğu organdır. Lenfoid doku birikimi intrauterin gelişim süresince başlayarak doğum sonrasında da devam eder ve puberte ile gerilemeye başlar(4,7,9).

Embriyonal dönemde apendiks üzerine ışık mikroskopik düzeyde çalışılmasına rağmen akım sitometri ile yapılan çalışmalara çok az rastlanmaktadır. Floresan aktiviteli analiz ve ayırma, başka bir ifade ile akım sitometri (FCM) optikte başvurulan yeniliklerden birisidir. FCM teknolojisi ile yapılan çalışmalar hematoloji, onkoloji gibi bazı bölümlerde rutin hale gelmeye başlamıştır (11,13,15).

Akım sitometri tekniği hücre siklusu analizi tekniklerinden birisidir. Bu teknik ile S fazı belirlenebildiği gibi G_0/G_1 ve G_2/M fazları da belirlenebilmektedir. Akım sitometri başlıca hücrelerin fenotipik analizinin yapılmasında, hücrelerin taşıdıkları özelliklere göre ayırt edilmesinde ve DNA analizinde kullanılmaktadır (16-22).

Bu bilgiler ışığında apendiksin doğum öncesi ve doğum sonrası ışık mikroskopik ve akım sitometrik özelliklerinin incelenmesi önem kazanmaktadır. Embriyonal dönemde sindirim sisteminden geliştiği bilinen apendiksin doğum sonrasında lenforetiküler sisteme dahil edilmesi bu çalışmanın yapılmasını önemli hale getirmektedir. Çalışmada lenfoid dokunun en yoğun proliferasyon dönemi ve bunun diğer histolojik oluşumlarla ilişkisi ortaya konmaya çalışılmıştır. Bu amaçla akım sitometrik değerlendirme ilk istirahat (G_1), mitoz öncesi (G_2), aktif proliferasyon (S) hücre siklusu dönemleri çeşitli fetal dönemlerde histolojik verilerle kıyaslı olarak ele alınmıştır. Bu bilgiler ve elde edilecek bulgularla sonuca varılması düşünülmektedir.

II.GENEL BİLGİLER

Apendiksin Yapısal Nitelikleri

Fötal hayatta duktus allantoise bağlı olduğu kabul edilen ve tubulus alimentoriusun devamı olan apendiks doğum sonrası lenforetiküler sisteme dahil edilmektedir. Apendiks duvarında bol miktarda lenfoid nodül bulundurur. Kör sonlanan bir invaginasyon olduğu için hızla yenilenmez, genellikle iltihaplanır ve çıkarılır. Apendiksin iltihaplanmadan çıkarıldığında vücutta bir kayıp etkisine sebep olup olmadığı tartışmalı bir konudur. İnsanlar için iltihaplandığında tehlikeli olan bir yapının bu durumla karşılaşmadan çıkarılması yönünde eğilimler vardır. Ancak bu konu tam anlamıyla açıklanmamıştır (1,4,7,9)

Anatomisi:

Kalın bağırsağın başlangıç kısmı olan çekum, sağ fossa iliakada bulunur. Kalın bağırsağın en geniş bölümü olan çekum'un karın ön duvarındaki projeksiyonu üçgen bir alanla gösterilebilir. Kör bir kese şeklinde olan çekum, yukarıda kolon assendens ile devam eder. Çekum ile kolon assendens'in sınırında ileum'un açıldığı ostium valvae ilealis bulunur. Uzunluğu 6 cm, genişliği 7,5 cm kadardır. Çekum arkada m. iliakus ile m. psoas major üzerine oturur ve bunlar arasında recessus retrocaecalis denilen bir çıkmaz oluşur. Apendiks vermiformis, genellikle bu çıkmazın içinde bulunur. Genellikle çekum'un her tarafı peritonla örtülüdür (2,,9,13).

Çekumda Görülebilen Varyasyonlar:

1. İntrauterin hayatın erken dönemlerinde çekum, geniş tabanlı, kısa bir koni şeklindedir. Bu koninin tepesi yukarı-medialde, ileum'un kalın bağırsakla birleştiği yere doğru yönelmiştir. Fetus büyüdükçe çekum'unda enine oranla boyu daha fazla büyüyerek uzun bir tüp şeklini alır. Tepesinin pozisyonu da başlangıçta olduğu gibi ileum'un distal ucuna doğru yönelmiştir. Gelişme devam ederken tüpün alt kısmının büyümesi durur, buna karşılık üst kısım büyümesine devam eder. Doğumdan ince olan apendiks vermiformis, koni şeklindeki çekum'un tepesine tutunmuş bir çıkıntı olarak görülür. Bu çekumun infantil

şeklidir ve %2 oranında tüm hayat boyu bu şeklini muhafaza eder. Çekum da görülen 3 tenia apendiks vermiformisten başlar ve üçünün aralarındaki mesafe birbirine eşittir.

2. Koni şeklinde olan çekum, ön tarafta bulunan tenia libera'nın her iki tarafı genişleyerek kese şekline dönüşür ve koni, küp şeklini alır. Tenia libera'nın her iki yanındaki kese, birbirine eşit büyüklüktedir. Koninin tepesinden çıkan apendiks vermiformis bu tipte keselerin arasındaki çukurluktan çıkar. Bu tip %3 oranında görülür.

3. Bu tip çekum %90 oranında insanlarda en çok görülen tiptir. Sağ taraftaki kese daha büyük olmak üzere, asimetrik olarak gelişir. Sağ kesenin daha fazla büyümesi sonucu daha fazla aşağıya iner, bunun neticesi olarak apendiks vermiformisin tutunduğu kısım, sola ileum ile çekum'un birleşme yerine doğru kayar.

4. Üçüncü tipin daha genişlemiş şeklidir. Yani sağ kese büyümesine devam ederek apendiks vermiformis'in tutunduğu tepe kısmı daha fazla sola, yani ileum ile çekumun birleşim yerine itilmiştir. Bu tip %4 oranında görülür (2,4,12,13).

Embriyolojisi:

Gastrointestinal kanal, endodermal germ yaprağından köken alan en önemli organ sistemidir. Oluşumu büyük ölçüde sefalokaudal (baş-kuyruk) ve lateral yönlerde katlanmasına bağlıdır. Tüp biçimli ilkel bağırsak kanalının oluşumu pasif bir olaydır ve iki yöndeki katlanma (bükülme) sonucu endodermle döşeli vitellus kesesinin bir bölümünün vücut boşluğu içinde kalmasıyla gerçekleşir. Embriyo ile vitellus kesesi arasındaki geniş ilişki de, katlanma sonucunda daralır ve sonuçta bu ilişki yalnızca dar ve uzun vitellin kanal aracılığı ile sağlanır hale gelir (7,9,).

Sefalokaudal yöndeki katlanmanın ilerlemesiyle, endoderm ile döşeli vitellus kesesinin git gide daha büyük bölümü embriyonun bedeni içinde kalmaya başlar. Endoderm, embriyonun ön (anterior) bölgesinde ön (baş) bağırsağı, kuyruk bölgesinde ise son (arka) bağırsağı oluşturur. Ön ve arka bağırsaklar arasında kalan kısım ise orta bağırsaktır (7,9).

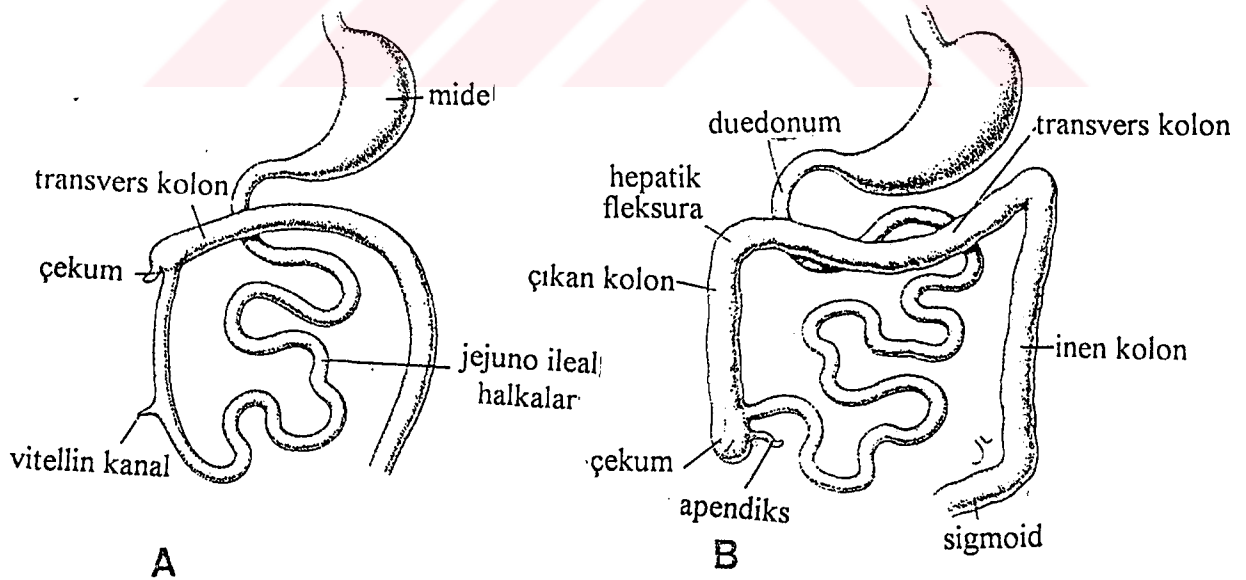
Orta bağırsağın gelişimi bağırsağın ve mezenterin hızla uzaması ve sonuçta primer bağırsak halkasının oluşmasıyla karakterizedir. Barsak halkası tam tepe noktasından vitellin kanal yoluyla yolk kesesiyle açık bir ilişki içindedir. Bu halkanın sefalik parçasından,

duedonumun distali, jejenum ve ileumun proksimali gelişir. Kaudal parçasından ise distal ileum, çekum, apendiks, çıkan kolon ve transvers kolonun 2/3 proksimal parçası oluşur (4.).

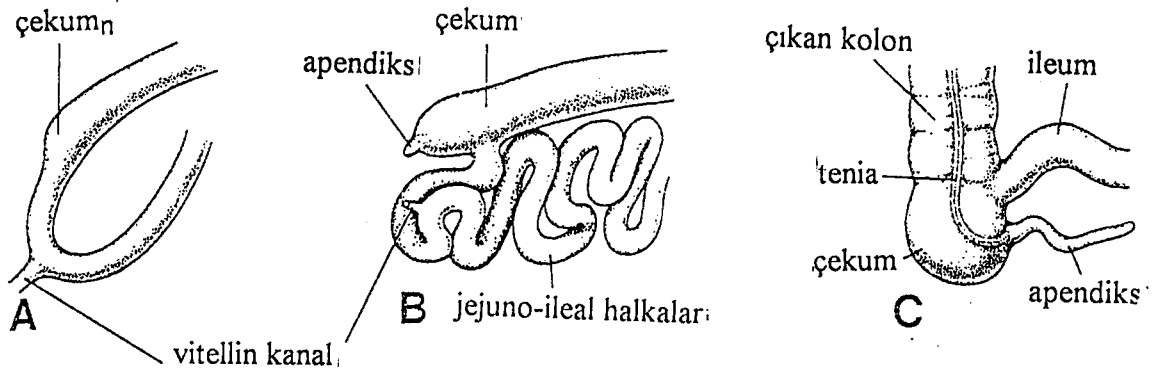
6.haftada bağırsaklar hızla büyüyerek umblikal kord içine herniye olurlar. 10.haftada bağırsaklar karın boşluğuna geri dönmeye başlarlar. Bu olaylar sırasında orta bağırsak saatin aksi yönünde 270 derecelik bir dönüşte yapar (9).

Jejenumun proksimal parçası karın içine dönen ilk bağırsaktır ve sol tarafta yer alır. Daha sonra geri dönen bağırsak halkaları birbirinden daha sağda yer alacak şekilde yerleşir. Embriyo 12 mm iken primitif bağırsak halkasının kaudal parçasından konik bir genişleme şeklinde beliren çekal şişlik ise, karın boşluğuna en son dönen bağırsak bölümüdür. Geçici bir süre karaciğerin sağ lobunun altında sağ üst kadranda kalan çekum, daha sonra çıkan kolon ve hepatic fleksurayı oluşturarak aşağı doğru iner ve sonunda sağ iliak fossaya yerleşir. Bu sırada çekal şişliğin distal ucunda primitif apendiks adı verilen dar bir divertikülde belirir (7,9) (Şekil 1).

Apendiks kolunun aşağı inişi sırasında oluştuğundan, apendiksın neden sıklıkla çekum veya kolonun arkasında yer aldığıın anlaşılması zor değildir. Apendiksın aldığı bu pozisyonlar retroçekal veya retrokolik olarak tanımlanır (7,9) (Şekil 2).



Şekil 1: A. 270 derecelik rotasyondan sonra bağırsakların görünümü. İnce bağırsaklar kıvrıntılıdır ve çekum tomurcuğu sağ üst kadrana yerleşmiştir. B. Bağırsakların son pozisyonu. Çekum ve apendiksın karın sağ alt kadrana yerleşmiştir (9).



Şekil 2: Çekum ve apendiksin gelişim evreleri (9).

A: 7 hafta

B: 8 hafta

C: Yenidoğan

Histolojisi:

Sindirim sistemi, sindirim kanalı ve buna bağlı bezlerden oluşmuştur. Sindirim sisteminin fonksiyonu, vücudun büyüme ve enerji ihtiyaçları için gerekli metabolitleri sindirilmiş besinlerden sağlamaktadır(4,5,12).

Sindirim kanalının dış ortama açık oluşu, patojen organizmaların ve yerleşimine uygun bir ortam oluşturur. Bu nedenle sindirim kanalında tek tek lenf follikülleri (Nodus lymphaticus solitarius) ile gruplaşmış lenf follikülleri toplulukları (Noduli lymphatici agregatii) yaygındır(4,12).

Gastrointestinal kanalın tamamı bazı genel yapısal özellikler gösterir. Ortasında değişen çaplarda bir lümen içerir. Bu lümen dört ana tabakadan oluşan bir duvarla çevrilidir. İçten dışa doğru sırasıyla mukoza, submukoza, muskularis mukoza ve serozadır. Bu tabakaların yapıları şu şekilde şematize edilebilir (Şekil 1).

1. Tunika Mukoza: Lamina epitelyalis, lamina propria ve muskularis mukozadan oluşmuştur.

Lamina epitelyalis; bağırsakların fonksiyonuyla uygunluk sağlamak üzere, tek katlı prizmatik, fırçamsı kenarlı olup, aralarında sellula kalsiformisler bulunur. Işık mikroskopunda fırçamsı kenar olarak tanımlanan epitel hücrelerinin apikal yüzeyi, elektron mikroskopunda mikrovilli yapısında gözlenir ve emilim için uygun yüzey artışı yansıtır. İnce bağırsaklarda absorpsiyonun daha fazla olması için villus yapısına rastlanır iken, kalın bağırsakta villus yapısı yoktur.

Kalın bağırsakta glandula intestinalis'ler uzundur ve çok sayıda goblet ve emici (absorbtı) hücre az sayıda enteroendokrin hücre ile karakterizedir. Emici hücreler silindirik ve kısa düzensiz mikrovilluslara sahiptir. Bu organ asıl fonksiyonlarına çok uygunluk gösterir. Suyun absorpsiyonu, dışkı kitlesinin oluşumunu ve mukus salgılanmasını sağlar. Mukus sulu jöle kıvamındadır ve sadece yüzeyi kayganlaştırmakla kalmaz, bakterileri ve partiküllü maddelerin yüzeyini örter. Epitel hücrelerinin bazal yüzünden dışarıya sodyumun aktif transportunu takiben suyun absorpsiyonu pozitifdir.

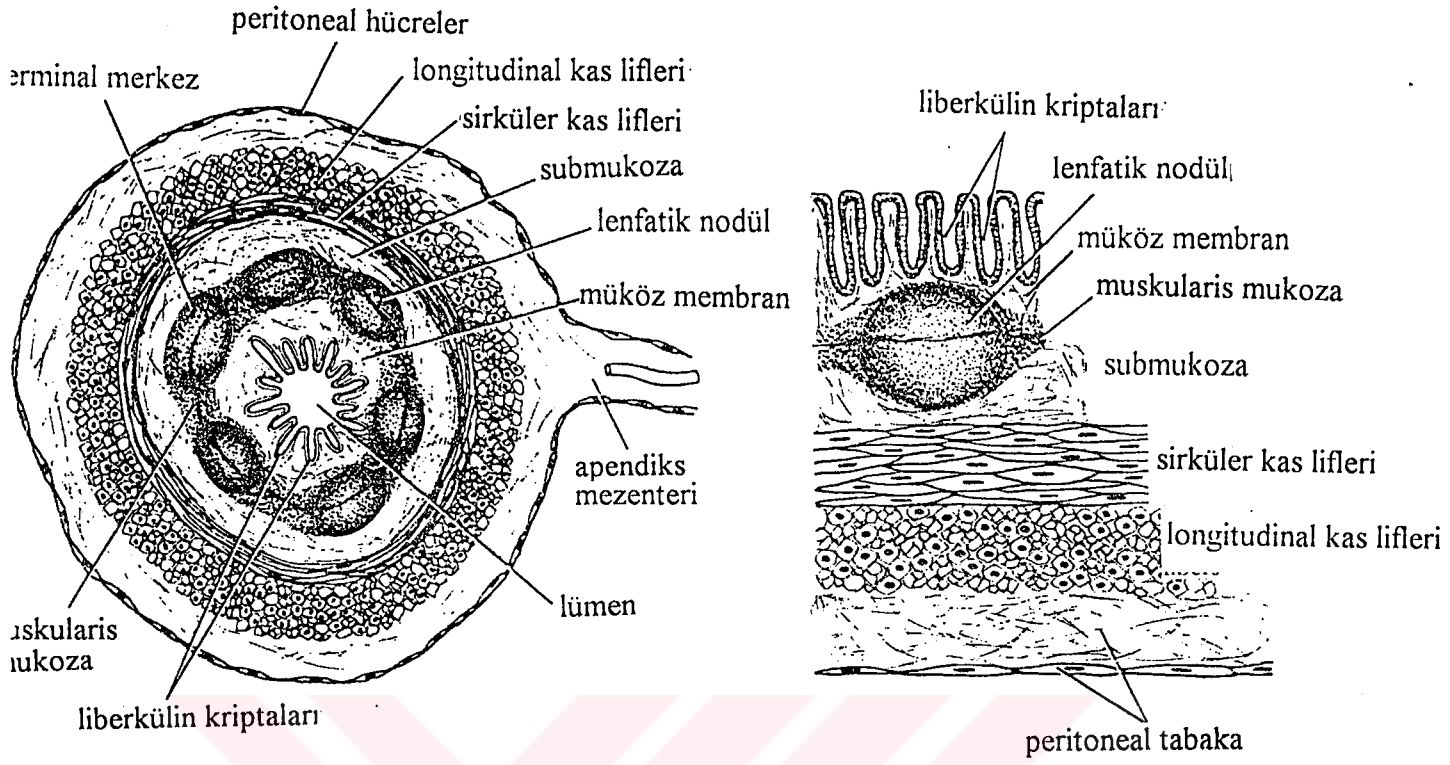
Lamina propria; lenfoid hücreler ve lenf folliküllerinden zengindir. Tek tek serpiştirilmiş olarak (Lymphonodus solitarius) rastlanır. Nodüller genellikle submukozaya kadar geçebilir. Bu nedenle bu bölgelerden lamina muskularis mukoza kesintiler gösterir. Lenfoid dokunun fazla olmasının nedeni, kalın bağırsakta oldukça yüksek bakteriyel popülasyonun bulunmasıdır.

2. Tunika Submukoza: Gevşek bağ dokusu yapısı ile mukozanın kaydırılmasını sağlayan bu tabakada, lamina propria'da olduğu gibi, çeşitli bağ dokusu hücreleri bulunur. Yağ hücrelerinden zengin bir tabaka oluşturur.

3. Tunika Muskularis Mukoza: İçteki sirküler tabakasının düzenli olmasına karşın, dıştaki longitudinal kas demetleri üç bant halinde gözlenir. Bunlara "taenia coli" denilmektedir. Bu şerit halindeki kas yapısı, kalın bağırsak duvarının dış yüzünün düzgün olmayıp, kabartılı görünmesine neden olur.

Kalın bağırsakların iç yüzünde de, yarım ay şekilli kıvrımlar gözlenir. Bunlar "plika semilunaris" adını alır. Ancak bu plikalar ince bağırsaktaki "Kerkring" plikalarından farklı olarak, sabit şekilli olmayıp, longitudinal kasın varlığına tabidir. Eğer kas gerginliği önlenir ise, bu yarım ay şeklindeki plikalar da kaybolur.

4. Tunika Seroza: Kan ve lenf damarları ile sinirlerin girdiği bölge olup, subseroza'da sinir pleksusları yer alır (4,5,12,13,28) (Şekil 3).



Şekil 3: Apendiksten alınan kesitin şematik görünümü. Bezler ve çok sayıda lenfoid nodüller görülmekte.

III. HÜCRE SIKLUSU

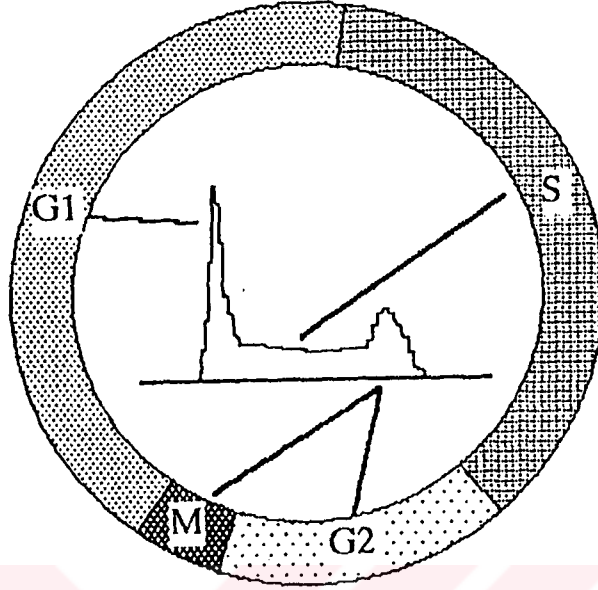
Çok hücreli diploid organizmalarda yaşam tek bir hücre olan ovumun spermiumla birleşerek meydana getirdiği zigot ile başlar (9,10,16,17). Vücut hücrelerinin birbirinden farklı; bölünme farklılıkları ve bölündükten sonra kazandıkları özelliklerden kaynaklanır. İleri derecede diferansiye olmuş sinir ve kas hücreleri dışındaki hemen hemen bütün soma hücreleri bölünme ve çoğalma gücüne sahiptirler. Kemik iliği ve gastrointestinal kanaldaki epitel hücreleri sürekli olarak replike olurlarken hepatositler gibi bazı hücrelerde ancak stimülasyonlarla çoğalmaya girerler (15,17,18,19,20,25).

Hücre siklusu ister gelişme ister yenilenme amacıyla olsun bir hücrenin mitoz hazırlanması (interfaz) ve mitoz bölünmeyi kapsayan iki interfaz arasındaki devredir (IF+M). Mitoz öncesi dönem hücre bölünmesine hazırlık olaylarının geçtiği dönemdir. Mitoz dönemi ise hücre bölünmesinin gerçekleştiği dönemdir. Yüksek ökaryotlarda hücre siklusunun %90'ını kaplayan interfaz 16-24 saat sürerken mitoz bölünme 1-2 saatte tamamlanır. İnsan vücudunda bulunan 10^{13} - 10^{14} hücrenin tamamı aynı sürede bölünmez. Genel süre 8 saat-100 gündür. Hücre siklusundaki bu durum farklılığı G_1 fazının uzunluğuna bağlı olarak değişim göstermektedir (2,12,17,18,26,27).

Memeli hücrelerin bölünmesinde kısa mitoz (M Fazı), postmitotik (G_1 Fazı), DNA sentezini içeren (S Fazı), kısa premitotik (G_2 Fazı) ve DNA sentezinin olmadığı istirahat (G_0) evreleri mevcuttur. Premitotik hücreler G_2 fazına girerler ve DNA sentezi bu dönemde durur. G_1 fazı başladığında mitoz tamamlanmış olur. Bu evrelerin özellikleri şu şekilde açıklanabilir (17,18,23).

1. G_1 Fazı : DNA'nın ön sentezleme aşamasıdır. Bu aşamada sabit olarak varolan DNA miktarında RNA ve protein sentez edilir. Bu tür bir sentezlemeye gen miktarlanması (gen dosajı) denir. Bölünmeyen hücreler için G_0/G_1 fazı proliferasyona geçişte spesifik yolları kapsar ve hücreleri DNA sentezine hazırlar. G_0/G_1 fazı istirahat fazı veya presentez fazı olarak bilinir. İnsan vücudundaki farklılaşmamış hücrelerin çoğu bu fazdadır. Bu

hücrelerin DNA içerikleri $2N$ olarak ifade edilen diploid özelliktedir. Bu fazın sonunda DNA sentezi başlar. Süresi yaklaşık 8-10 saat sürer (16,17,23,37) (şekil 4).



Şekil 4 : Hücre siklusu ve DNA histogramı ile ilişkisi: G_0 proliferasyon yapmayan, siklus dışı hücreleri tanımlar. G_1 (post mitotik faz): RNA ve protein sentezi var, DNA sentezi yoktur. S (sentez fazı): DNA sentezi başlar, RNA sentezi devam eder ve protein sentezi maksimumdur. G_2 (post sentetik faz): DNA sentezi tamamlanır, RNA ve protein sentezi G_1 kadardır. M (mitoz): Somatik hücre bölünmesi (22).

2. S Fazı: Aktif DNA sentezi ile kromozom duplikasyonu başlar. Hücrelerin DNA içeriği $2N-4N$ arasında artış gösterir. DNA sentezi yaklaşık 7-8 saat sürer. Ayrıca RNA ve protein sentezi de devam eder (16,22,23).

3. G_2 Fazı: DNA sentezinin son aşaması ile mitozun başlangıcına kadar sürecek olan fazdır. DNA içeriği en yüksek düzey olan iki katına (tetraploid $4N$) çıkmıştır. Bu aşamada tekrar bir RNA ve protein sentezi olur. Ayrıca RNA ve protein sentezine ilaveten fosfolipid ve karbonhidratlarda hücre siklusunun G_1-S-G_2 aşamalarında sentezlenmektedir. Bu fazda yaklaşık 3-4 saat sürer (16,17,22,23).

4. M Fazı: Bu fazda ökaryotik hücreler mitozda kromozomlarını ikiye ayırırlar. Önce nükleus sonra hücre ikiye bölünür. Bu fazda yaklaşık bir saat kadar sürer (16,20,22,23).

Mekanizması olarak oldukça karışık olan ökaryotik hücre siklusunun mitoz evresi genellikle profaz, metafaz, anafaz ve telafaz safhalarına bölünerek incelenir. Mitoz evresi oldukça dinamik ve devamlıdır. Mitozun sona yaklaşmış aşamalarından biri olan sitokinazdan sonra diploid bir ata hücreden iki diploid yavru hücre meydana gelir. Mitozda en önemli olay kromozomların ikiye bölünmesi ile birlikte her kromozomun aynı kalıtsal maddeyi tanmasıdır. Bu yarımlardan her biri interfazın sentez safhasında DNA replikasyonu ile oluşan birbirinin ve ona DNA molekülünden birini alarak hazırlanmış olduğundan aynı kromozoma ait iki kromatid kalıtım yükü bakımından birbirine eşittir (4,20,27,32)(Şekil 4).

5. G₀ Fazı: DNA sentezinin bulunmadığı hücre siklusunun bölünmeyen istirahat halinde olduğu dönemdir. Bu dönemin hangi mekanizmalarla meydana geldiği bilinmemektedir (16,17,23).



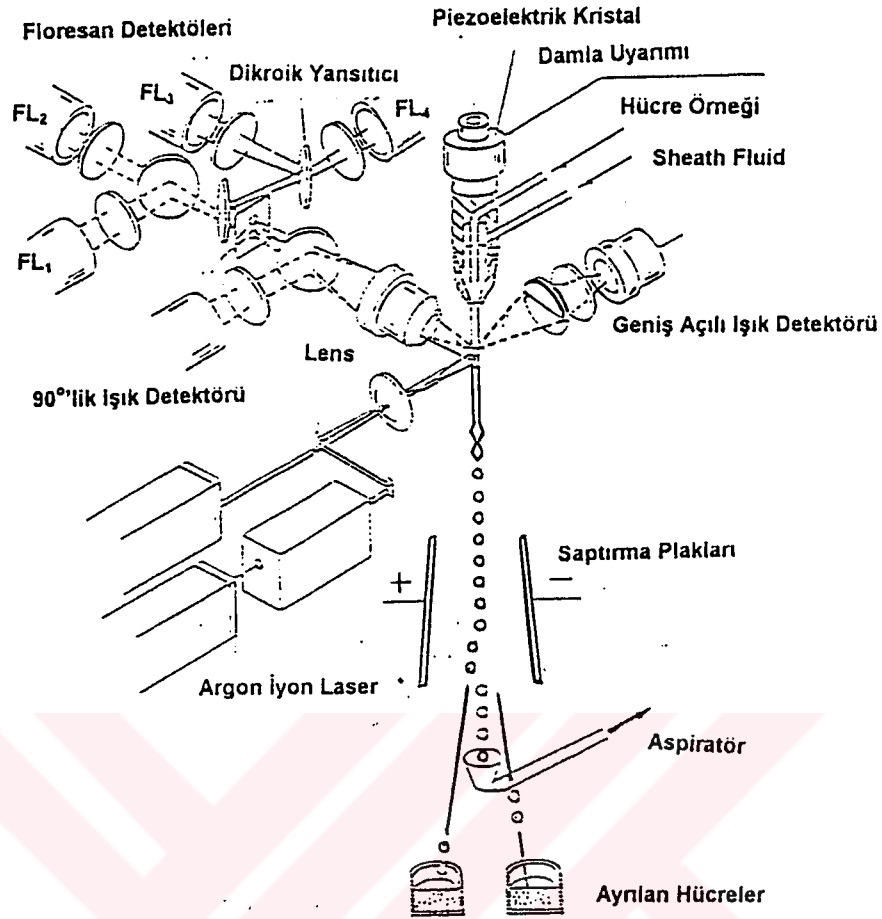
IV. AKIM SİTOMETRİ

Tek hücre düzeyinde hızlı, istatistiksel ve kantitatif tayin sağlayan, hücre ve bileşenlerini analiz etmek için geliştirilmiş bir sistem olan akım sitometri hücrenin fiziksel özelliklerini, yüzey antijenlerini, reseptörlerini, hücre içi bileşenlerini, nükleer DNA-RNA'sını ve diğer hücresel parametrelerinin kantitatif tayinini sağlar. Hedley'in 1983'de dokulardan akım sitometrik DNA analiz metodunu geliştirmesi ve Ethidium Bromide (EB), proidium iodide (PI), Acridine Orange (AO) Chromycine A3 (A3), Hoechst 33258-33342, Diamidine Phenylindole (DAPI), Mithramycin, gibi floresan boyaların kullanılması yapılan çalışmalara hassasiyet ve kolaylık sağlamış, teşhise yönelik hale getirmiştir (20,24,35-40).

Akım sitometri sisteminde boyanmış hücreler hızlı bir şekilde yoğun lazer alanından geçirilirler ve floresan boyalar uyarılır. Boyanın floresan emisyonu hassas fototüp tarafından belirlenir, çoğaltılır, dijitalize edilir ve bilgisayar sistemine aktarılır. Bilgi olarak toplanır ve analiz edilir. Bu şartlar altında her bir hücredeki DNA içeriğinin tam olarak ölçümü yapılır ve istatistiksel olarak bir kaç dakikalık periyotta farklı sayıda hücre ölçümlenebilir (10.000-1.000.000). İki yada üç farklı floresan boya ile multi parametrik analiz yapılarak çeşitli parametrelere göre hücre ayrımı (Cell Sorting) yapılır (20,22,37,39,38,40)(Şekil5).

Hücre siklusu analiz tekniklerinden olan akım sitometri ile S fazı belirlenebildiği gibi G_0/G_1 ve G_2/M fazları da belirlenebilmektedir. Malign hücre içerisindeki DNA'nın akım sitometrik analizinde birbirinden bağımsız üç ayrı parametre bulunmaktadır.

1. Aneuploid hücre popülasyonunun tespiti
2. Aneuploid hücre popülasyonunun seviyesi ve DNA indexi
3. Hücre proliferasyon hızının ölçümüdür (20,37,39).



Şekil 5 : Akım sitometri cihazının şematik görünümü

Buradan elde edilen sonuçlar tanı konulmasında güçlük çekilen hastaların teşhis ve tedavisinde yardımcı olmaktadır (20,37,40).

Akım sitometri sisteminde hücreler ince bir sıvı akımı içinde tek sıra halinde geçmektedir. Bu geçiş esnasında hücrelerin üzerine isabet ettirilen lazer ışını ile hücre yüzeyindeki farklı işaretlerin verdikleri dalga boyları ve farklı renlerdeki floresan boyalarla sağlanan ışık yansımaları çok sayıdaki fotodetektörlerde toplanırlar. Her bir hücreden gelen ışık dağılımları ve uyarımlar elektronik olarak ilgili hücrelerin tanımlanmasında kullanılırlar(18,23,40). Hücreler lazer ışın demetinin içinden geçtiği sırada, lazer ışığının bir kısmı dağılır. Işık dağılımının yoğunluğu, hücrelerin büyüklüğü, şekilleri ve iç yapısal özelliklerine göre farklı açılar içerir. Bu önemli özellikler şu şekilde sıralanabilir.

1.Hücre grubunun belirlenmesi: 90^0 lik dik açı ile gelen ışık dağılımı floresan almış hücrelerin büyüklüğünü tespit eder.

2.Hücre büyüklüğünün önemi: Işık dağılımlarının hepsi hücre büyüklüğü ile etkilenir. Benzer boyuttaki hücreler daha fazla sayıda uyarıma neden olurken, küçük boyutlu hücrelerde ışık dağılım açısı küçüktür.

3.Hücre yapısı: 90^0 lik açı ile gelen ışık dağılımının miktarı hücrelerin iç yapısına göre tanımlanmasında önemlidir. Aynı büyüklükteki hücreler granülarite dağılımına göre ayrılırlar (18,22,23,40) (Şekil 5).

Akım sitometri'nin en önemli uygulama alanları;

1.Floresan boyalarına tutunmuş monoklonal antikoları kullanarak hücrelerin fenotipik analizinin yapılması,

2.Hücrelerin taşıdıkları özelliklere göre ayırt edilmesi (Cell Sorting),

3.DNA analizidir (18,22,23,37).

Akım sitometrik DNA analizi bir popülasyondaki hücrelerin DNA miktarının dağılımı çalışmasıdır. Bu hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Hücre popülasyonları bölünen ve bölünmeyen fazlardaki hücrelerin karışımından ibarettir. Bu yöntemle taze, dondurulmuş, formalinle tespit edilmiş ve parafinde bloklanmış dokulardan elde edilen hücre süspansiyonları kullanılabilir. DNA içeriğinin akım sitometrik yöntemle analizinde propidium iodide (PI) gibi DNA'ya spesifik floresan boyası ile doğru olarak ölçülebilir (10,11,18,22).

Bu boya hücrelerin DNA'sına bağlanır ve DNA'ya bağlanan boyanın miktarı ise her bir hücredeki total DNA ile orantılıdır. Böylece bir hücre popülasyonunda DNA'da bir kayıp veya ilave (aneuploidi) tespit edilebilir duruma gelir. DNA içeriği anormallikleri tümörlerdeki kromozom anormalliklerini göstermesi yanında kromozom sayısındaki değişiklikleri de yansıtır. Bu teknik ile total DNA miktarından değişiklikler yapmayan translokasyon gibi kromozom anormallikleri saptanamaz. (18,22,23,37,40)

Akım sitometride elde edilen floresan yoğunluğu doğrudan doğruya hücrenin içerdiği DNA miktarına orantılıdır. En az DNA içeren hücreler G_0/G_1 fazında, bunun iki katı G_2/M fazında, S fazındaki hücreler ise ikisinin arasında bir DNA muhtevası gösterir. Siklusun

G_0/G_1 , G_2+M ve S faz uzunlukları bu üç grubun birindeki hücre fraksiyonundan kolayca hesaplanır (11,18,20,27).

DNA analizinde asenkron hücre popülasyonları siklusun G_0/G_1 hücreleri daima büyük fraksiyonda toplanırlar ve $2N$ diploid DNA içeriğine sahiptirler. Diploid DNA içeriği kromozomların sayısı ve büyüklüğü ile ilgili olup her canlı için sabittir. Hücreler G_2 ve M fazına ulaştıklarında DNA içeriği iki katına çıkar. Bunlar G_0/G_1 pikinden ve orijinden uzakta yer alırlar. Siklusun S fazındaki hücreler $2N+N$ arasında DNA içeriğine sahip olup G_0/G_1 ile G_2/M pikleri arasında yer alır. Akım sitometri ile DNA analizinden G_0/G_1 fazındaki hücrelerin DNA içeriği ve hücre siklusu fazlarında kaç hücre olduğu bilgisi sağlanır (8,39,)

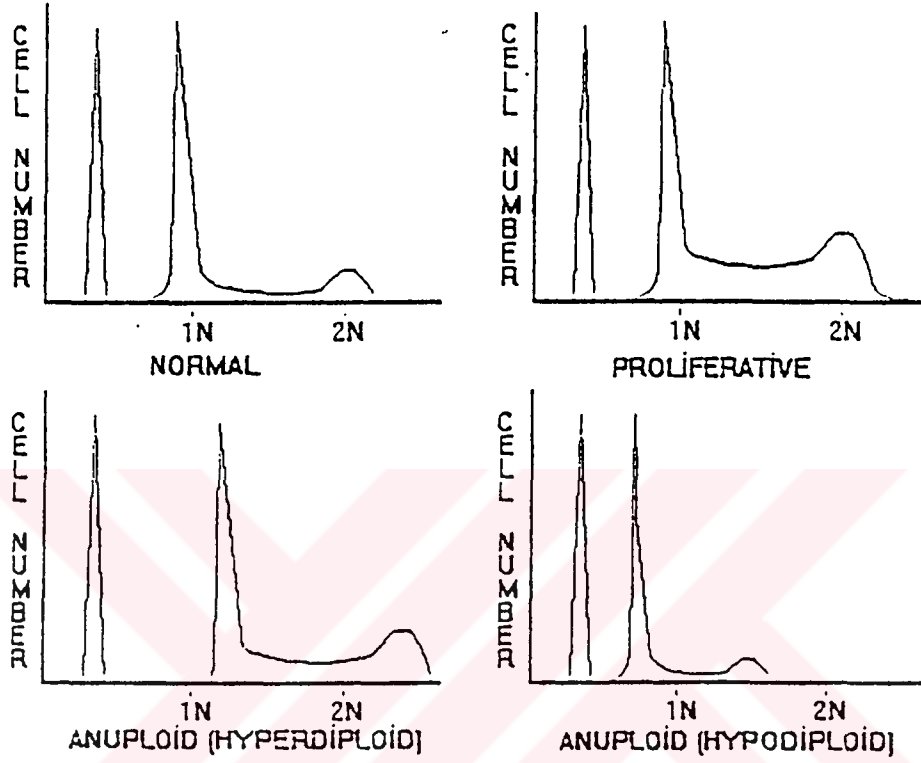
Hücre siklusunda G_0/G_1 fazındaki replike olmayan diploid hücreler aynı DNA içeriğine sahiptirler. Bu DNA içeriği $2N$ diye ifade edilir ve insanlarda 46 kromozomdan oluşur. S fazında DNA sentezi yapılır ve hücresel DNA miktarında artış olur. G_2 ve M fazındaki hücreler $4N$ DNA içeriğine ulaşmış olurlar. Mitozdan sonra orjinal hücrelerin yerine $2N$ DNA içeriğine sahip yeni hücreler alırlar (3,12,28).

DNA histogramlarında y-aksisi hücrelerin (nükleus) sayısını, x-aksisi'ni ise artmakta olan floresansı (DNA miktarı) temsil eder. Aktif proliferasyon göstermeyen bir hücre popülasyonunun analizinde S faz fraksiyonu ($SPF=S$ phase fraction) ve G_2/M fazları fazlaca saptanmaz. Halbuki normal kemik iliği gibi aktif bir dokunun analizinde daha yüksek SPF ve G_2/M fazında hücreler görülecektir(22,23).

DNA histogramlarında DNA içeriğinin dağılımı hücre popülasyonun yanında pik çevresinde de bir miktar değişkenlik gösterir. Bu değişkenlik cihaz hatalarından, boyama yönteminden veya DNA boyanmasından dolayı hücreden hücreye farklılıklar gösterebilir ve her hücre popülasyonun G_0/G_1 piki için coefficient of variation (CV) olarak ifade edilir. CV hücre popülasyonunun ortalama pik kanalı numarasının standart sapmaya bölünmesiyle belirlenir. Böylece CV histogramın kalitesini belirler. CV ne kadar küçük ise histogram o kadar güvenilirdir (18,22,23,37).

Diploid miktarda DNA taşıyan hücre popülasyonunun G_0/G_1 fraksiyonu DNA indeksi (DI) olarak ifade edilir. Normal diploid popülasyonda tanımlanan DNA indeksi 1.0'dır. Malign hücreden çoğunlukla normal diploid DNA içeriğinden sapmalar gösterir ve

histogramda ekstra pikler verir. DNA içeriği artmış ise hiperploid, azalmış ise hipoploid olarak tanımlanır (11,18,23) (Şekil 6).



Şekil 6 : Sık rastlanan DNA histogramlarınının grafiksel anlamları.

V. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma Ekim 1996-Eylül 1997 tarihleri arasında KTÜ Tıp Fakültesi SABE Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalında yapılmıştır.

Intrauterin yaşları 18,2-36,4 hafta arasında değişen toplam 30 adet fetus çalışmaya dahil edildi (30). Çalışmaya dahil edilen 30 adet fetus 3 gruba ayrıldı. IV. grup herhangi bir apendiks patolojisi olmayan 5 adet otopsi materyalinden oluşturuldu.

Çalışma gruplarının oluşturulması:

I. Grup: 18-24 haftalık fetus

II. Grup: 25-30 haftalık fetus

III. Grup: 31-36 haftalık fetus

IV. Grup: Sağlıklı erişkin grup

Fetuslardan apendiksin çıkartılması için sağ abdominal bölgeden batin açıldı. Deri ve deri altı diseksiyonu yapılarak apendikse ulaşıldı ve apendiks çıkarıldı. Apendiksten alınan parçalar numaralandırılarak % 10'luk tamponlanmış formaldehit solüsyonuna konuldu. Rutin alkol-ksilol doku takip serinden sonra parafin bloklara gömüldü.

Işık Mikroskopik değerlendirme için,

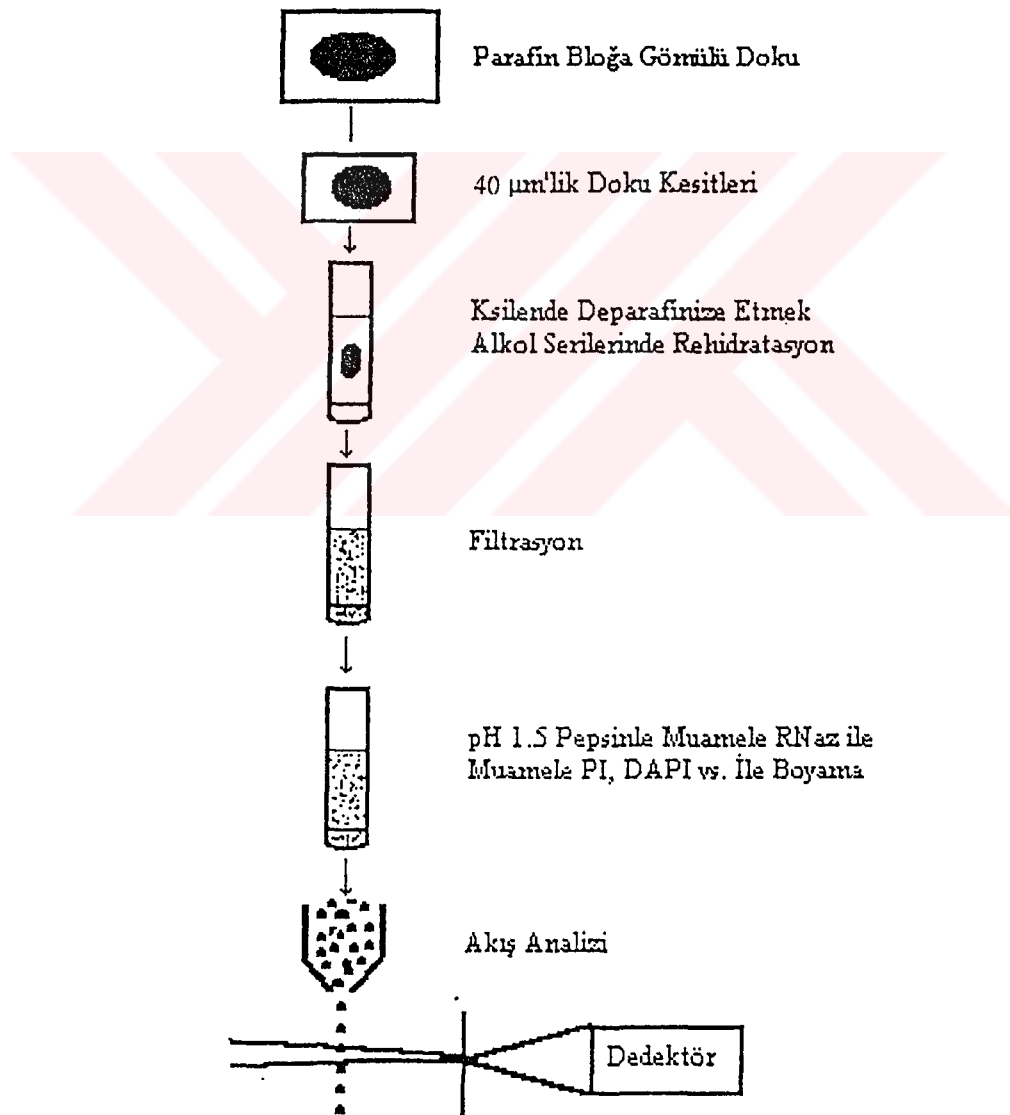
Hazırlanan parafin bloklardan pika marka mikrotom ile 5-7 μ kalınlığında alınan kesitler Hematoksilen Eozin (H&E) boyası ile boyandı. Olympus marka ışık mikroskopunda kesitler incelendi ve resimleri çekildi. Yapılan çalışma ile apendiks vermiformisin lenfoid doku gelişim süreci, histolojik tabakaları ve kript yapısına ait hücresel-yapısal özellikler ışık mikroskopik düzeyde değerlendirildi.

Akım Sitrometrik Analiz için; (Hedley metodu), (11).

Bunun için sırayla şu işlemler yapıldı.

1. Parafin bloğa gömülü dokular işaretlendikten sonra Reichert marka mikrotomla 40µ kalınlığında 3'er adet kesildi.
2. Tüp içerisine alınan parçalara iki defa 10 ml ksilen konularak 2x10 dakikada parafini giderildi.
3. %100, %90, %75, %50, etanol serilerinden 10'ar dakika geçirilir.
4. Doku örnekleri bir gece veya 6 saat distile suda bekletildi.
5. Ertesi gün örnekler iki defa daha distile suda yıkandı ve saat camına aktarıldı.
6. Bistüri ile ince ince ince doğrandı, enjektöre çekildi ve 16 G iğneden iki defa geçirildi. 10 ml'si konik tüpe alındı.
7. 10 dakika 500 devirde santrifüj edildi, süpernatant atıldı.
8. PH:1,5 olan % 0,5 pepsin solüsyonundan (100 mg pepsin + 20 ml %0,9 serum fizyolojik) 3 ml eklenerek vortekslendi. 37⁰ C' de 30 dakika inkübe edilirken 5 dakika aralıklarla vortekslendi.
9. 3 ml RPMI 1640 medium (320-1875) solüsyonu ile nötralize edilip 500 devirde 10 dakika santrifüjlendi. Süpernatant atıldı.
10. Tekrar 3 ml RPMI solüsyonu eklenerek 47 µm'lik filtreden geçirildi.
11. 300 µl solüsyondan alındı DNA prepte (DNA-prep LPR coulter 6604454 < 0,1 % NaN₃ - 0,1 %Propidium Iodide) hazırlandı ve 15 dakika inkübasyondan sonra akım sitometride analiz edildi.

Akım sitometri cihazı (Coulter Epics Elite ESP) DNA kontrolü ile standardize edildi. Her bir hücreden sayılarak 488 nm Argon-Iyon lazerde analiz edildi. Hücre akım hızı numunedeki hücre yoğunluğuna göre ayarlandı. Ortalama 25.000 hücre sayılarak bilgisayar sistemine aktarıldı (Şekil 7). Böylece analiz edilmek istenen hücre popülasyonu agregat ve hasarlı hücrelerden büyük ölçüde temizlendi. DNA histogramında G_0/G_1 , S, G_2/M fazındaki hücrelerin oranları, CV değerleri Multicycle bilgisayar programı kullanılarak değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizinde 486 DX 66 bilgisayarda statgraf 5.0 versiyon paket programı kullanıldı. Grupların ikişerli karşılaştırılmasında parametrik varsayımlar yerine getirilmediğinden ve gruplar bağımsız olduğundan non parametrik Mann-Whitney-U testi kullanıldı (25).



Şekil 7 : Parafin bloğa gömülü dokulardan Akım sitometrik DNA analiz yöntemi.

VI. BULGULAR

VI.1. Işık Mikroskopik Bulgular:

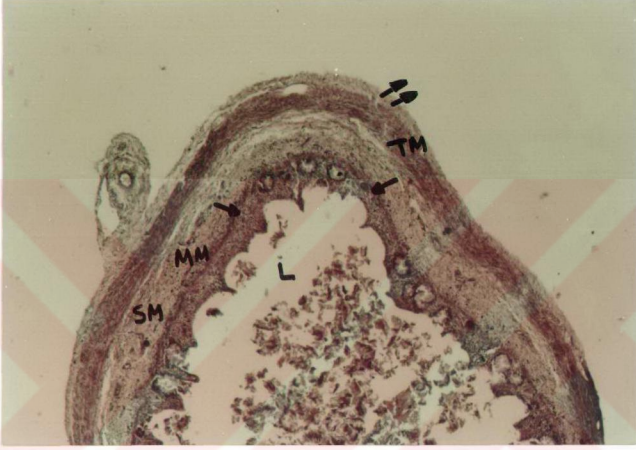
Apendiksin fetal dönemde gelişimini incelemek için bu çalışmaya 30 adet insan fetusu alındı. Fetusların ayak uzunlukları ölçülerek intrauterin yaşları, dış genital organ muayenesi ile de cinsiyetleri saptandı. Yapılan ölçümler sonucu fetusların 18.2-36.4 hafta arasında olduğu tespit edildi. İnsan fetus apendikslerinin, normal insan erişkin apendiksi ile karşılaştırılması amacıyla oluşturulan sağlıklı erişkin grubun yaş ortalaması 41.5 yıl olarak saptandı. Işık mikroskopik çalışmada fetusların haftalara göre dağılımları Tablo I. de gösterilmiştir.

Tablo I : Işık mikroskopik çalışmaya dahil edilen fetusların yaş gruplarına göre dağılımı.

GRUP	HAFTALAR	SAYI	%
I	18-24	9	30
II	25-30	12	40
III	31-36	9	30
TOPLAM		30	100

I.GRUP

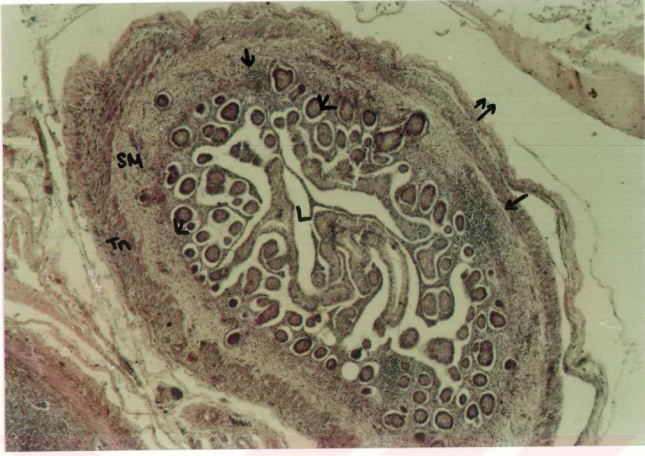
18-24 haftalık insan fetus apendikslerinin H&E ile boyanmış kesitlerinde histolojik tabakalarının ve kript yapısının biçimlendiği görüldü. Lenfositler yalnızca L. propriada, az sayıda ve diffüz nitelikte idi (Resim 1).



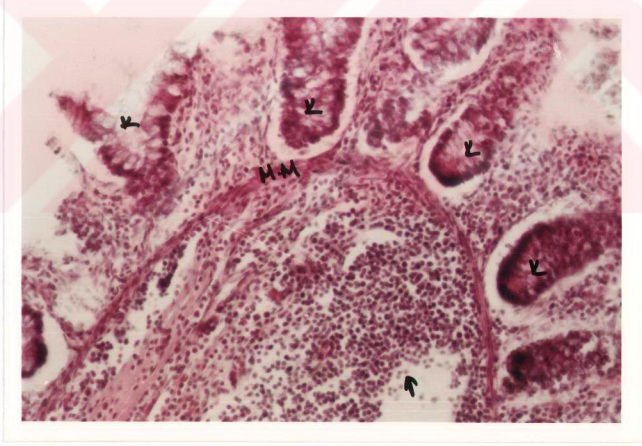
Resim 1: Apendiks lamina propriasında az sayıda ve follikül oluşturmayan lenfosit birikimi görülmekte (→). (S: Seroza, L: Lümen, TM: Tunika Muskularis, MM: Muskularis Mukoza, SM: Submukoza) (H& E X4).

II.GRUP

25-30 haftalık fetus apendiksleri alınıp H&E ile boyandığında L: propria ve tela submukoza tabakalarında diffüz nitelikte lenfoid follikül bulunduğu görüldü. Histolojik tabakaların gelişimini sürdürdüğü kriptlerin düzenli olarak büyüdüğü ve boylarının düzenli hal aldığı görüldü (Resim 2,3).



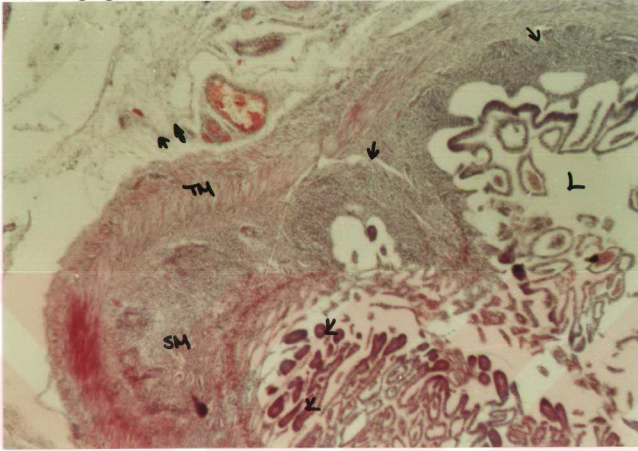
Resim 2: Difflüz lenfoid dokunun lamina propria ve tela submukozada yoğunlaştığı dikkati çekmektedir (→). (↗↗: Seroza, L: Lümen, TM: Tunika Muskularis, SM: Submukoza K: Kript) (H&EX4).



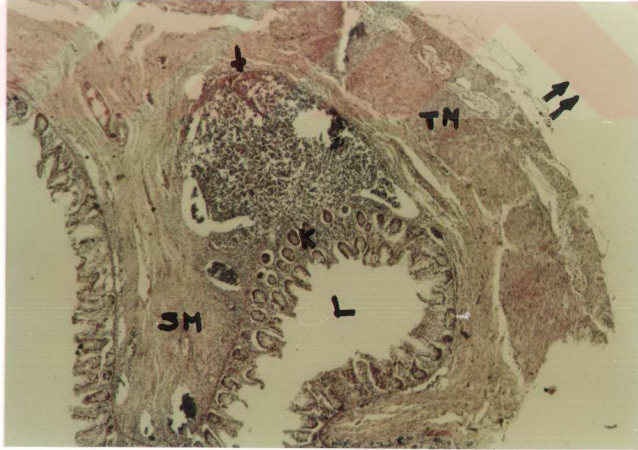
Resim 3: Resim 2 de görülen alanın ileri büyütmesi. Tela submukozada lenfositik hücre kümelenmesinin yoğunlaştığı izlenmekte (→). (MM: Muskularis Mukoza, K: Kript) (H&EX20).

III. GRUP

31-36 haftalık fetus apendiksleri alınıp H&E ile boyandığında apendiksin matür nitelik kazanması ile birlikte lenfoid follüküllerin agregatlar oluşturduğu ve diffüz lenfoid dokuda artış olduğu görüldü (Resim 4,5).



Resim 4: Çapı büyümüş lenfoid follükül dikkati çekmektedir (→). (L: Lümen, TM: Tunika Muskularis , SM: Submukoza K: Kript) (H&EX4).



Resim 5: Lenfoid agregatların tüm mukoza boyunca ilerleyişi görülmekte (→). (TM: Tunika Muskularis , SM: Submukoza K: Kript) (H&EX4).

IV. GRUP

Sağlıklı erişkin insan apendikslerinden oluşturulan grubun H&E ile boyanmış kesitlerinde T. mukozada epitelin tek katlı prizmatik görünümde olduğu, kriptlerin bol sayıda görüldüğü izlendi. Lamina propriada lenfositler ve lenf folliküllerinin bol sayıda olduğu, nodül çaplarının submukozaya kadar ilerlediği görüldü. Tunika submukoza ve Tunika muskularis ince bağırsakların görünümünde idi. Tunika seroza bu tabakaları sınırlayarak göze çarpmakta idi.



VI.2. Akım Sitometrik Bulgular

Işık mikroskopik düzeyde çalışılan 30 adet fetusun oluşturduğu gruplarda değişiklik yapılmadan akım sitometrik çalışma grupları oluşturuldu. Akım sitometrik çalışmada kullanılan fetus sayılarının haftalara göre dağılımı ve gruplandırılması tabloda gösterilmiştir (Tablo II).

Tablo II: Akım sitometrik çalışmaya dahil edilen fetusların haftalara göre dağılımı ve gruplandırılması.

GRUP	HAFTALAR	SAYI	%
I	18-24	9	30
II	25-30	12	40
III	31-36	9	30
TOPLAM		30	100

IV. Grup olarak erişkin sağlıklı grup toplam beş apendiksden oluşturulmuş ve kontrol grubu olarak alınmıştır.

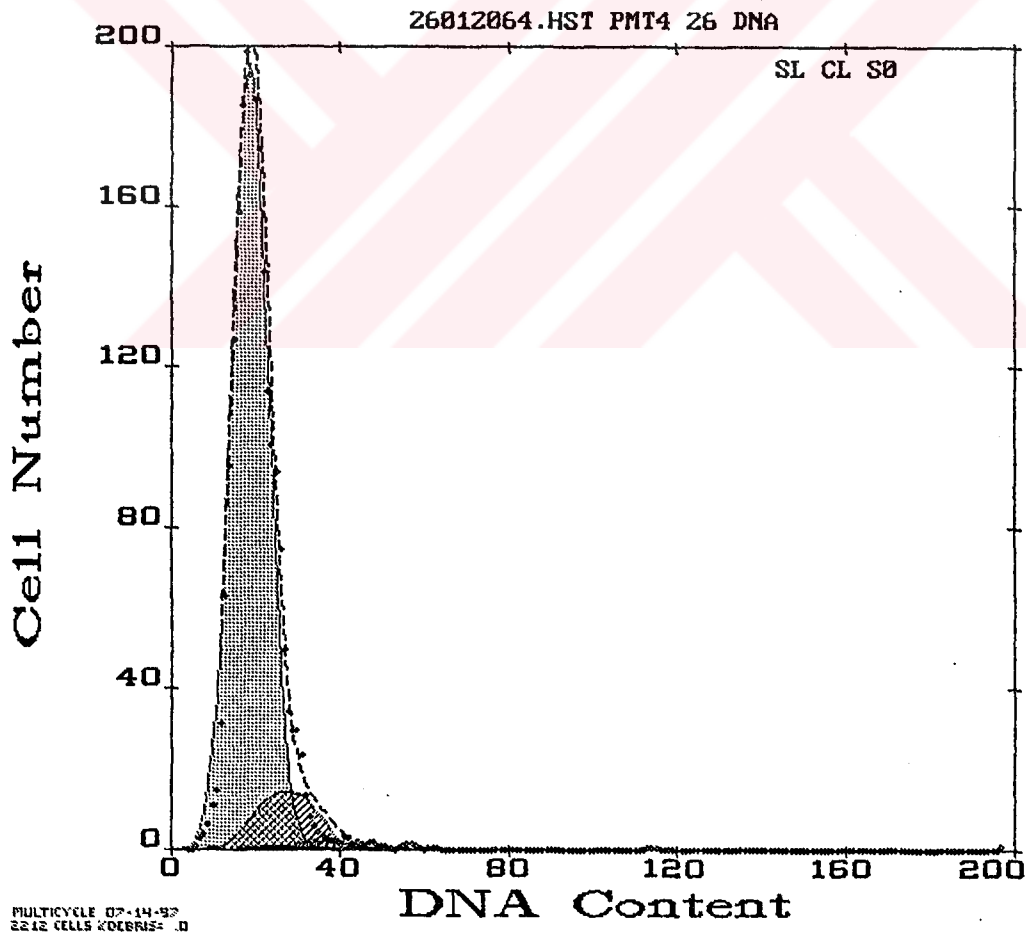
Akım sitometrik analiz ile grupların G_0/G_1 , G_2/M ve S fazları ile bu fazların CV'leri bulunarak ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda gruplar birbirleri ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.

I.GRUP :

18-24 hafta arası insan fetusu apendikslerinden oluşturulan grubun akım sitometrik analiz sonuçlarının ortalamaları, G_1 : 85.43 ± 1.68 , CVG_1 : 4.76 ± 1.13 , G_2 : 2.47 ± 0.93 , CVG_2 : 4.54 ± 0.88 , S : 12.05 ± 1.43 olarak belirlenmiştir (Tablo III), (Şekil 8).

Tablo III: I. Grubun Akım Sitometrik Analiz Sonuçları.

No	% G_1	CVG_1	% G_2	CVG_2	% S
1	88.0	4.4	1.0	4.9	11.0
2	83.0	3.9	2.5	3.7	14.5
3	85.5	5.2	1.3	5.2	13.2
4	84.3	6.4	2.2	6.5	13.5
5	84.1	4.1	3.1	4.3	12.8
6	86.5	3.9	2.9	3.9	10.6
7	84.2	6.3	4.1	4.5	11.7
8	85.8	5.5	2.9	4.1	11.3
9	87.5	3.2	2.3	3.8	10.2
Ort. Ve SD	85.43 ± 1.68	4.76 ± 1.13	2.47 ± 0.93	4.54 ± 0.88	12.05 ± 1.43



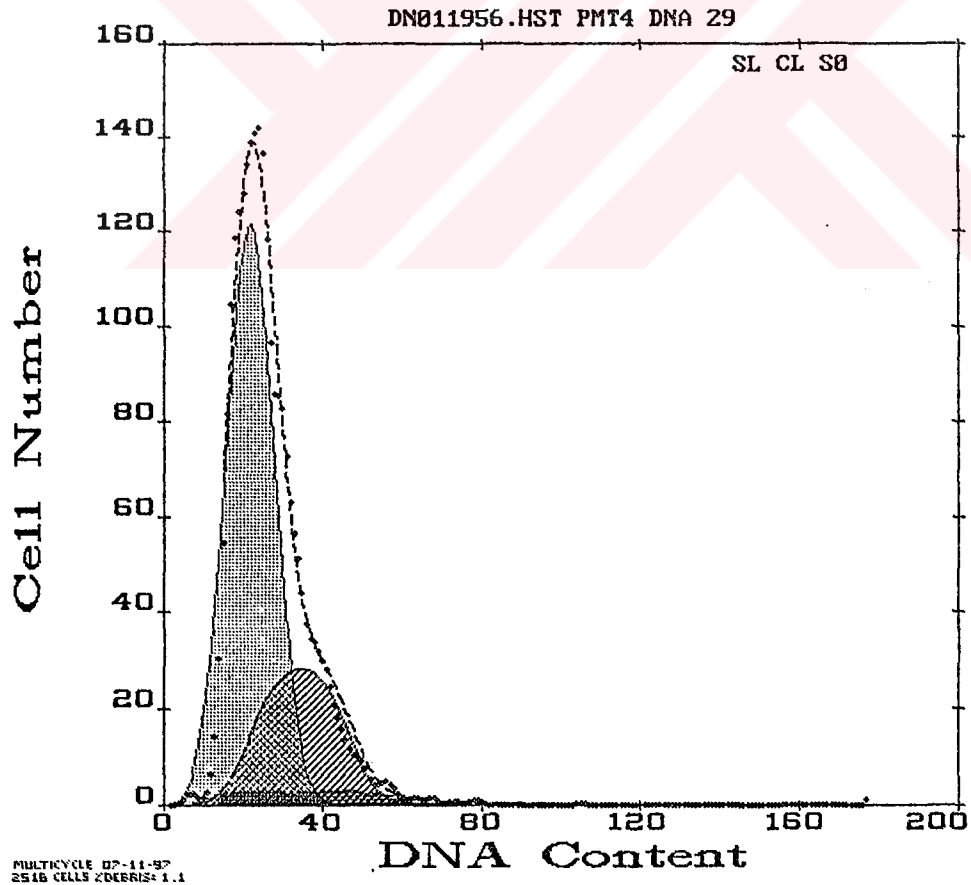
Şekil 8: I. Grubun Histogram Örneği

II.GRUP :

25-30 hafta arası insan fetusu apendikslerinden oluşturulan grubun akım sitometrik analiz sonuçlarının ortalamaları. G_1 : 73.12 ± 2.20 , CVG_1 : 6.07 ± 1.25 , G_2 : 5.14 ± 1.21 , CVG_2 : 5.71 ± 0.93 , S : 21.86 ± 2.61 olarak belirlenmiştir (Tablo IV), (Şekil 9).

Tablo IV : II. Grubun Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

No	%G ₁	CVG ₁	%G ₂	CVG ₂	%S
1	73.5	6.5	3.6	5.8	23
2	75.0	7.3	3.8	5.2	21.2
3	72.0	5.5	3.9	4.8	25
4	71.8	6.1	5.5	4.2	22.7
5	70.5	5.5	6.2	5.7	23.3
6	71.0	3.5	4.9	6.5	24.1
7	70.0	4.8	3.8	6.8	26.2
8	75.0	5.9	5.7	7.2	19.3
9	72.0	6.3	6.5	4.6	21.5
10	75.5	8.2	6.3	5.2	18.2
11	74.0	7.5	7.0	6.5	19
12	76.6	5.8	4.5	6.1	18.9
Ort. Ve SD	73.12 ± 2.20	6.07 ± 1.25	5.14 ± 1.21	5.71 ± 0.93	21.86 ± 2.61



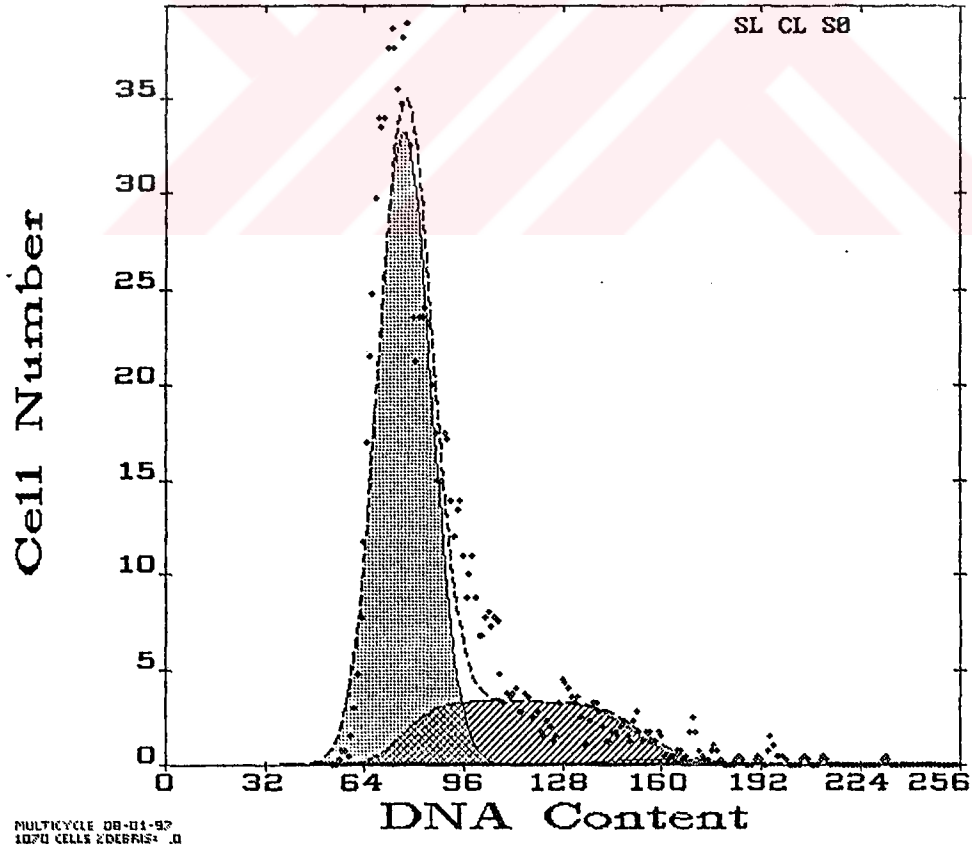
Şekil 9: II. Grubun Histogram Örneği.

III.GRUP :

31-35 hafta arası insan fetusu apendikslerinden oluşturulan grubun akım sitometrik analiz sonuçları ortalamaları, G_1 : 64.7 ± 1.98 , CVG_1 : 5.41 ± 1.01 , G_2 : 2.85 ± 0.74 , CVG_2 : 5.23 ± 0.90 , S : 32.3 ± 2.38 olarak belirlenmiştir (Tablo V) ,(Şekil 10).

Tablo V : III. Grubun Akım Sitometrik Analiz Sonuçları

No	%G ₁	CVG ₁	%G ₂	CVG ₂	%S
1	65.5	7.3	3.5	6.2	31.0
2	64	6.7	3.1	5.5	32.9
3	66.2	5.5	2.5	3.8	30.0
4	63.0	4.4	2.0	5.9	35.0
5	62.3	5.7	1.7	6.3	36.0
6	66.8	4.9	3.4	5.2	29.8
7	63.5	5.1	4.0	4.5	32.5
8	68.3	4.5	3.5	5.6	28.2
9	63	4.6	3.0	4.1	34.0
Ort. Ve SD	64.7 ± 1.98	5.41 ± 1.01	2.85 ± 0.74	5.23 ± 0.90	32.3 ± 2.38



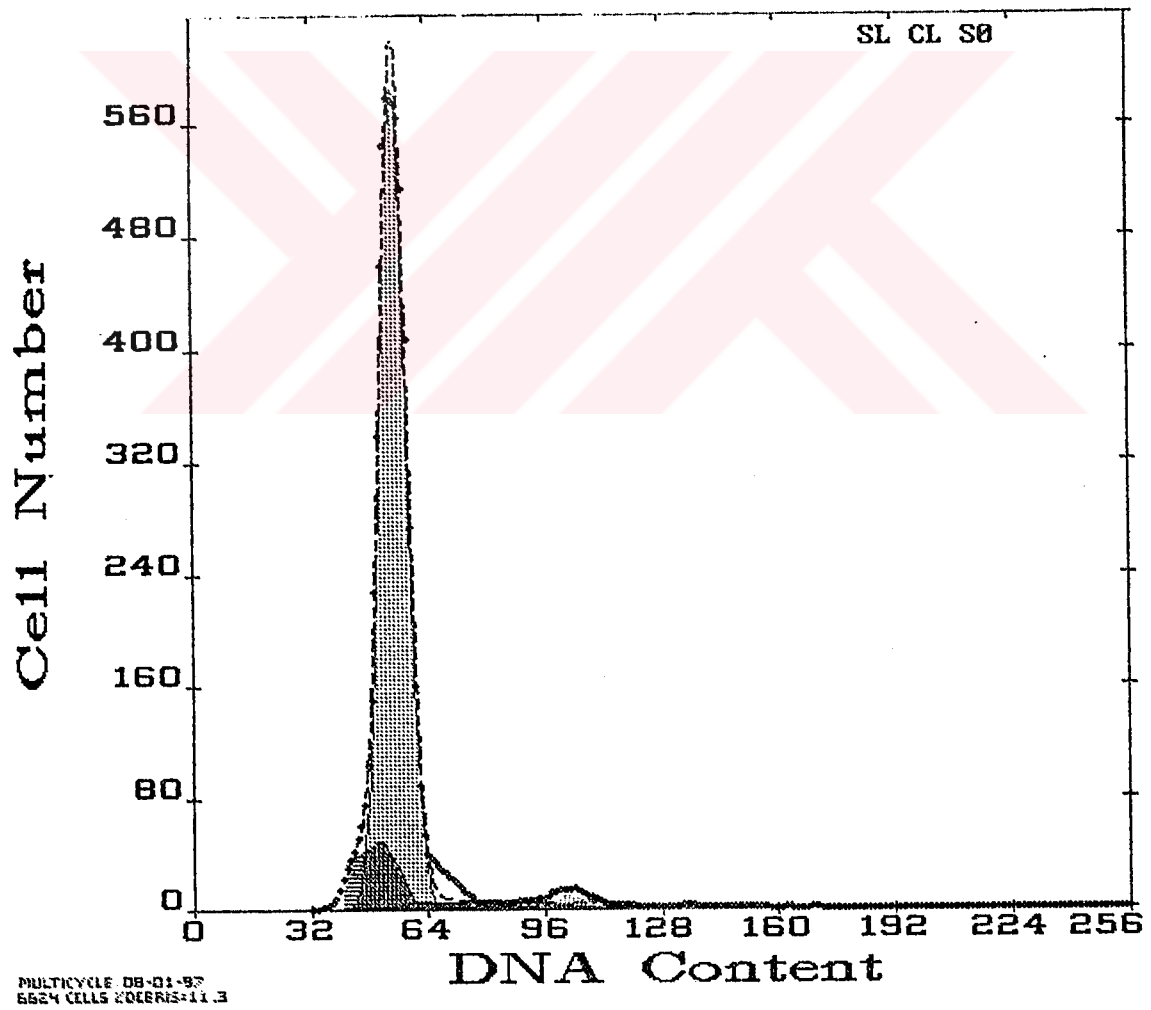
Şekil 10: III. Grubun Histogram Örneği

IV.GRUP :

Erişkin sağlıklı grubun akım sitometrik analiz sonuçları ortalamaları, G_1 : 93.56 ± 1.02 , CVG_1 : 3.44 ± 0.77 , G_2 : 3.58 ± 0.49 , CVG_2 : 3.46 ± 0.48 , S : 2.86 ± 0.55 olarak belirlenmiştir (Tablo VI), (Şekil 11).

Tablo VI: IV. Grup Sağlıklı Erişkinlerin Akım Sitometrik Analiz Sonuçları.

NO	% G_1	CVG_1	% G_2	CVG_2	%S
1	93.0	4.5	3.8	4.1	3.2
2	94.5	3.8	3.0	3.5	2.5
3	93.0	2.5	4.0	3.1	3.0
4	94.8	2.9	3.1	3.7	2.1
5	92.5	3.5	4.0	2.9	3.5
Ort. Ve SD	93.56 ± 1.02	3.44 ± 0.77	3.58 ± 0.49	3.46 ± 0.48	2.86 ± 0.55



Şekil 11: IV. Grubun Histogram Örneği

Grupların İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması :

I. ve II. Grup karşılaştırıldığında, G_1 faz değerlerinde (P:0.00014), CVG_1 değerlerinde (P:0.0389), G_2 faz değerlerinde (P:0.00043), CVG_2 değerlerinde (P:0.011), S faz değerlerinde (P:0.0001) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($P>0.05$), (Tablo VII).

Tablo VII: Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre I. ve II. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması

	I. GRUP	II. GRUP	P
$\%G_1$	85.43±1.68	73.12±2.20	0.0014
CVG_1	4.76±1.13	6.07±1.25	0.0389
$\%G_2$	2.47±0.93	5.14±1.21	0.00043
CVG_2	4.54±0.88	5.71±0.93	0.011
$\%S$	12.05±1.43	21.86±2.61	0.0001

I. ve III. Grup karşılaştırıldığında G_1 faz değerlerinde (P:0.0004), S faz değerlerinde (P:0.0004) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken CVG_1 , G_2 , CVG_2 değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı. ($P>0.05$), (Tablo VIII).

Tablo VIII: Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre I. ve III. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması

	I. GRUP	III. GRUP	P
$\%G_1$	85.43±1.68	64.7±1.98	0.0004
CVG_1	4.76±1.13	5.41±1.01	0.18
$\%G_2$	2.47±0.93	2.85±0.74	0.35
CVG_2	4.54±0.88	5.23±0.90	0.13
$\%S$	12.05±1.43	32.3±2.38	0.0004

I. ve IV. Grup karşılaştırıldığında G_1 faz değerinde (P: 0.003), CVG_1 değerinde (P:0.004), G_2 faz değerinde (P: 0.03), CVG_2 değerinde (P: 0.01), S faz değerinde (P: 0.003) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.($P>0.05$), (Tablo IX).

Tablo IX: Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre I. ve IV. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması.

	I. GRUP	IV. GRUP	P
$\%G_1$	85.43±1.68	93.56±1.02	0.003
CVG_1	4.76±1.13	3.44±0.77	0.004
$\%G_2$	2.47±0.93	3.58±0.49	0.03
CVG_2	4.54±0.88	3.46±0.48	0.01
$\%S$	12.05±1.43	2.86±0.55	0.003

II. ve III. grup karşılaştırıldığında G_1 faz değerinde (P: 0.0001), G_2 faz değerinde (P: 0.0004), S faz değerinde (P: 0.0001) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken, CVG_1 ve CVG_2 değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($P>0.05$), (Tablo X).

Tablo X: Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre II. ve III. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması

	II. GRUP	III. GRUP	P
$\%G_1$	73.12±2.20	64.7±1.98	0.0001
CVG_1	6.07±1.25	5.41±1.01	0.13
$\%G_2$	5.14±1.21	2.85±0.74	0.0004
CVG_2	5.71±0.93	5.23±0.90	0.26
$\%S$	21.86±2.61	32.3±2.38	0.0001

II. ve IV. grup karşılaştırıldığında G_1 faz değerinde (P: 0.001), CVG_1 değerinde (P: 0.004) G_2 faz değerinde (P:0.03), CVG_2 değerinde (P:0.001 ve S faz değerinde (P:0.001) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (P>0.05), (Tablo XI).

Tablo XI : Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre II. ve IV. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması

	II. GRUP	IV. GRUP	P
% G_1	73.12±2.20	93.56±1.02	0.001
CVG_1	6.07±1.25	3.44±0.77	0.004
% G_2	5.14±1.21	3.58±0.49	0.03
CVG_2	5.71±0.93	3.46±0.48	0.001
%S	21.86±2.61	2.86±0.55	0.001

III. ve IV. grup karşılaştırıldığında G_1 faz değerinde (P: 0.003), CVG_1 değerinde (P: 0.006), CVG_2 değerinde (P: 0.007) ve S faz değerinde (P: 0.003) istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunurken G_2 faz değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (P: 0.05), (Tablo XII).

Tablo XII: Akım Sitometrik Analiz Sonuçlarına Göre III. ve IV. Grupların İstatistiksel Karşılaştırılması.

	III. GRUP	IV. GRUP	P
% G_1	64.7±1.98	93.56±1.02	0.003
CVG_1	5.41±1.01	3.44±0.77	0.006
% G_2	2.85±0.74	3.58±0.49	0.1
CVG_2	5.23±0.90	3.46±0.48	0.007
%S	32.3±2.38	2.86±0.55	0.003

VII:TARTIŞMA

İnsanlarda fonksiyonu halen tartışılmakta olan apendiks,abdominal tonsil olarak da adlandırılır. Sindirim sisteminin bağışıklıkla doğrudan ve en fazla ilişkili organı olan apendiksin f6tal hayatta duktus allantoise bağlı olduğu iddiaları vardır. Bu nedenle tubulus alimentoriusun devamı olan bu yapı doğum sonrası lenforetik6ler sisteme dahil edilmektedir. Ancak bu ikilem tam olarak açıklanabilmiş değildir(1-9).

Çekumun bir evaginasyonu olan apendiks duvarında bol miktarda lenfoid nod6l bulundurur. Apendiks k6r sonlanan bir invaginasyon olduğu için hızla yenilenmez, genellikle iltihaplanır ve çıkarılır. Apendiksin iltihaplanmadan çıkarıldığında v6cutta bir kayıp etkisine sebep olup olmadığı tartişmalı bir konudur. İnsanlar için iltihaplandığında tehlikeli olan bir yapının bu durumla karşılaşılmadan çıkarılması doğru değildir? Bu soru bu g6ne kadar tam anlamıyla cevaplanamamıştır (2,3,7,9,12).

Apendiks embriyo 12 mm (8.Hafta) iken primitif barsak halkasının kaudal parçasından konik şekilde genişleme g6steren ekal şişliğin distal ucunda primitif apendiks adı verilen dar bir divertik6l şeklinde gelişmeye başlar(7,9). Apendiks kolonun aşağı inişi sırasında olduğundan, apendiksin neden sıklıkla çekum veya kolonun arkasında yer aldığının anlaşılması zor değildir(2,4,7,9).

Apendiks çekumun bir evaginasyonudur, duvarında bol lenfoid nod6l bulunduğu için k66k dar ve d6zensiz bir l6mene sahiptir. Genel yapısı kalın bağırsağinkine benzemesine karşın daha az sayıda ve daha az intestinal bez içerir, taenia koli yoktur(4,12).

Tartişmalı olan sindirim sistemindeki g6revinin 6tesinde sindirim kanalının diff6z, lenfoid follik6l oluşturan ve lenfoid follik6llerin agregat oluşumu ile ortaya çıkan peyer plakları halindeki lenfoid dokunun en yoğun bulunduğu organdır. Lenfoid doku birikimi intrauterin gelişim s6resince başlayarak doğum sonrasında da devam eder ve puberte ile gerilemeye başlar(4,9,12).

Çalışmada 18-36 haftalar arasında insan fetus apendiks 6rnekleri yapısal olarak ışık mikroskobu d6zeyinde akım sitometri verileri ile kıyaslı olarak değerlendirilmiştir. Erken d6nemde (18-25 hafta) seroza-kas-mukoza gibi ana histolojik tabakalar oluşmaktadır.

Ayrıntılı histolojik yapı görülmemektedir. Bu dönemde ancak az sayıda, yalnızca lamina propriada diffüz ve düzensiz şekilde lenfosit görülmekte, buna istirahat dönemindeki hücre sayısının fazla oluşu, aktif proliferen hücrenin az sayıda bulunuşu akım sitometrik olarak eşlik etmektedir (7,9).

Ara dönemde (25-30 hafta) kript paterni gelişimi (boyca uzama ve düzenli dizilim) başlamakta ve bununla birlikte lenfoid folliküller sayıca artmaktadır. Bu bulgular ilgili kaynaklar ile de uyum göstermektedir (7,9,14,28).

Yapısal olarak olgun histolojik tabakalanma ve kript yapısı 31-36 haftalardan itibaren ortaya çıkmaktadır. Bu nitelik agregat lenfoid folliküller (peyer plakları) ile birlikte ortaya çıkmaktadır. Buda gelişim süresince apendiks ana histolojik katları ile lenfoid dokunun paralel geliştiğini kanıtlamaktadır (4,7,9,28).

Akım sitometri ile çalışılan apendikslerden elde edilen sonuçlar tartışılmadan önce tekniğin incelenerek tartışılması bu konuda yapılacak çalışmalara ışık tutması açısından uygun görülmüştür.

Hücre örneklerinin hazırlanması akım sitometrik çalışmanın en önemli aşamasıdır. Hücrelerin kohezyon göstermeden tek tek bulunabildikleri bir süspansiyon halinde olmaları gereklidir. Örnekler parafine gömülü, taze ve dondurularak saklanmış dokulardan elde edilmiş olabilir (11,18,23).

Parafinde bloklanmış dokuların akım sitometri ile incelenmesi taze dokulara göre bazı avantajlar sağladığı görülmüştür. Parafinde bloklanmış dokuların önce ışık mikroskopik inceleme şansı olduğundan dokunun en uygun kısmını seçmek mümkün olabilir. Taze dokularda yeterli ve doğru örnekleme yapıp yapılmadığını kontrol etmek ise çok zordur. Ayrıca parafin bloklu dokularda geriye dönük çalışmaların yapılabilmesi, arşivlerdeki bir çok materyalin değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır (20,23,39).

Çalışmamızda da dikkat edildiği gibi parafinde bloklaşmış dokuların çalışılmasında, sonuçların kaliteli ve doğru olması için doku tipi, fikzatifin çeşidi, fikzasyonda bekleme şartları, doku işlenmesi, parafin bloklarında saklama şartları, kesit kalınlığı ve diğer faktörler önemlidir. Arşiv materyali ve diğer solid dokulardan DNA analizi yaparken histogramların kaliteli olabilmesi için doku kesitlerinin kalınlığı da önemli bir faktördür (30-50 μm). 30 μm

kesitlerde hücre hasarları görülebilmektedir. Çalışmamızda kesit kalınlığı 40 µm olarak alınmıştır (20).

Hücre nükleusları parafin ile tespit edilmiş dokularda daha iyi korunduğundan DNA içeriğinin incelenmesi daha verimli olabilir (22,40). Formalinle fixe edilip parafinde bloklanmış dokuların taze dokulara göre bazı dezavantajları vardır. Bu dokularda boyanan nükleusların DNA floresansında tahmin edilemeyen ve her hücre için farklılık gösteren önemli azalmalar olabilmektedir. Bu nedenle DNA içerik ölçümlerinde referans noktalarının tespiti için dışarıdan standartlar kullanılmakta, bu da sonuçların karşılaştırılmasında sorunlara neden olmaktadır (18,22,23,39).

Parafinize dokularda yapılan deparafinizasyon işlemi incelenecek hücrelerin membranlarının ve stromal elementlerin zarar görmelerine neden olur. Bu yüzden parafinize dokularda genellikle nükleuslar ile ilgili çalışmalar yapılabilmektedir (18,22).

Çalışmamızda akım sitometrik analiz için Hedley metodu kullanılmıştır. Hedley metodu analizi yapılacak hücre süspansiyonlarında 10-30 bin hücre sayımının yeterli görülmektedir (11), Çalışmamızda tüm materyallerden 10-20 bin hücre sayımı yapılmış buda kaynak verileriyle desteklenmiştir (39).

Çalışmada kullanılan pepsin, kromozomların histon ve nonhiston proteinleri ile DNA arasındaki bağları gevşetip kovalent hale getirerek boyanın DNA ile bağlanmasını sağlar. Enzimatik muamele sonucunda hücrelerin tekrar birbirine yapışması ve agregat oluşması engellenir (11,18).

Floresan boyalarla DNA analizi yapmak ve verim almak, hücrelerin boya ile muamelesi, sıcaklık, pH gibi faktörlerin kontrolü altındadır. Çalışmalarımızda kullanılan PI boyası canlı hücrelere giremediğinden hücrelerin ölü veya canlı olduğunun test edilmesinde de kullanılır. Ayrıca CV'si diğer floresan boyalara göre daha küçük olduğu içinde çok tercih edilmektedir (18,22,23).

Bu literatürler eşliğinde parafin bloklardaki insan fetus ve erişkin apendiks gruplarına akım sitometri tekniği ile DNA analizi uygulandı. G₀/G₁, G₂/M, S fazları ve CV değerleri gruplar arasında karşılaştırıldı.

Akım sitometrik DNA çalışmamızda diploid yapının dışında aneuploid (hipodiploid, hiperdiploid) yapılara rastlanmamıştır. Çalışma gruplarının az sayıda oluşu bunun nedeni olarak açıklanabilir. Diploid DNA içeriğine sahip hücre popülasyonunun DNA indexi 1 olarak kabul edilmektedir (18). G_0/G_1 fazındaki hücreler % olarak en yüksek değerine burada sahiptirler. Çalışmamızdaki grupları incelediğimiz zaman, DNA indeksinin diploid özellikte olduğu ve G_0/G_1 fraksiyonu tüm gruplarda en yüksek faz değerlerine burada ulaştığı tespit edilmiştir .

G_0/G_1 faz yüzdesi fetus gruplarında mitotik aktiviteden dolayı düşük bulunurken, erişkin grupta mitotik aktivitenin azalması ile G_0/G_1 faz yüzdesindeki artış kaynak verileri ile de desteklenmiştir (11,18).

G_2/M fazı DNA içeriğinin iki katına çıkıp mitozun gerçekleştiği fazdır (18). Bu fazda elde edilen değerler dolaylı olarak mitotik aktiviteyi göstermektedir. I. II. III. grup fetuslarının mitotik aktiviteleri kontrol grubu olarak değerlendirilen IV. gruba göre daha fazla bulunmuştur. Bunun nedeni olarak erişkin grup apendiks örneklerinde S faz düşüklüğü gösterilmiştir. S faz değerleri proliferasyon hızı hakkında bilgi vermektedir. Aktif DNA içeriğinin 2 katına çıktığının göstergesidir (11,18). S fazı fetus grupları arasında istatistiksel yönden anlamlı bir fark ifade etmektedir. Fetus grupları arasında ilerleyen haftalarla birlikte S fazı değerlerinde artış saptanmıştır. Bu artışın doğuma yakın haftalarda devam ettiği kaynak verileriyle de desteklenmiştir (11,18,39). Erişkin grup apendiks S faz değerleri, tüm fetus apendiks gruplarıyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur.

Sonuç olarak ışık mikroskopik ve akım sitometrik analiz ile fetus gruplarında mitotik aktivitenin hızlı olduğunu, erişkin yaş grubunda ise mitotik aktivitenin azaldığını söyleyebiliriz .Ancak çalışma gruplarının sayısı arttırılıp yeni çalışmalar planlanır ise sonuçlar daha iyi yorumlanabilir. Bu nedenle embriyonal, fetal ve postnatal dönemlere ait çok sayıda apendiks birlikte değerlendirilip yorumlamanın daha iyi olacağı düşünülmektedir.

VIII. SONUÇLAR

1. Hücre proliferasyon sürecinin intrauterin dönemde giderek arttığı en yüksek değerine 31-36 haftalarda ulaştığı tespit edilmiştir.
2. Fetus apendiksini gelişimi sırasında her hangi bir dönemde aneuploid, tetraploid yapıya rastlanmamıştır.
3. Mitotoik aktivitenin fetal dönemde arttığı, erişkin dönemde ise azaldığı tespit edilmiştir.
4. 31-36 haftalar arsında apendiksin erişkin görünümünü kazandığı gözlenmiştir.
5. Proliferasyon dönemindeki hücre sayısı histolojik bulgulardaki olgunlaşma ile paralel gitmektedir.
6. Çalışmanın devamında lenfoid tiplendirmesi yapılarak hangi dönemde hücresel ve hümorale bağışıklık olduğu gösterilmelidir.
7. Apendiksin embriyonal, fetal ve postnatal dönemlerde fonksiyonu sırasındaki tartışmalı değişikliklerin anlaşılması için akım sitometrik, elektron mikroskopik ve immünohistokimyasal olarak çalışılması gerekmektedir.

IX. ÖZET

Bu çalışmada insan fetusu apendiksini gelişimini ışık mikroskobu ve akım sitometrik analiz ile inceleyerek, morfolojik ve fonksiyonel bakımdan erişkin apendiksi ile karşılaştırmak ve yapılacak olan araştırmalara katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Çalışma Ekim 1996-Eylül 1997 tarihleri arasında K.T.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışma grupları intrauterin yaşları 18,2-36,4 hafta arasında değişen toplam 30 adet fetus ve 5 adet erişkin otopsi materyalinden oluşturuldu.

Ayrıntılı histolojik yapı, kript gelişimi ve lenfoid follikül oluşumu histolojik boyama yöntemleri ile, apendiks hücrelerinin proliferasyon gücü ise akım sitometrik analizlerle incelendi.

Işık mikroskobik çalışmada, yapısal olarak seroza-kas-mukoza gibi olgun histolojik tabakalanma ve kript yapısının 31-36 haftalardan itibaren ortaya çıktığı tespit edildi. Bu niteliğin de agregat lenfoid folliküller (peyer plakları) ile ortaya çıktığı ve gelişim süresince apendiks ana histolojik katları ile lenfoid dokunun paralel geliştiğini kanıtlamaktadır.

Akım sitometrik analizde S faz (DNA sentez fazı) değerleri ileri fetal haftalarda erken fetal haftalara göre kayda değer ölçüde yüksek bulundu. Bu değerlerin yetişkin apendiks örneklerinde düşük olduğu görüldü.

X.SUMMARY

In this study the development of appendiks in human fetus is examined using light microscopy and flow cytometric analysis. The data obtained is compared with adult appendix morphologically and physiologically.

The study is carried out between October 1996-September 1997 in KTÜ Medical Faculty, Department of Hystology and Embryology . Study groups consist of 30 fetus (ranging 18.2-36.4 weeks of gestation) and 5 adult autopsy material.

Detailed hystological structure, crypte development and lymphoid follicle formation is observed using hystological staining, proliferation potential of appendix cells is examined by flow cytometric analysis.

The mature hystological layering of T. Seroza-T. Muscularis-T. Mucoza and crypte structure is detected to form between 31-36 weeks of gestation, by light microscopic study. This formation process is observed to be simultaneous to the development of aggregate lymphoid follicles (Peyer Plaques). Thus proving the parallel development of main hystological layering and lymphoid tissue.

In Flow cytometric analysis S phase (DNA synthesis phase) results are significantly higher in late weeks of gestation compared to earlier weeks. These results are lower in adult appendiks materials.

XI. KAYNAKLAR

1. Erkoçak A: Özel Histoloji. Ankara Üniversitesi. Ankara,1980.
2. Odar İV: Anatomi ders kitabı. Salmanlar Ofset. Ankara,1984.
3. Paker Ş:Histoloji. Uludağ Üniversitesi. Bursa,1990.
4. Jangueri CL, Carneiro j, Kelley RO: Temel Histoloji (Çev.Ed. Y.Aytekın). Barış Kitapevi. İstanbul, 1993.
5. Erbenđi T: Histoloji I. BETA. İstanbul, 1984.
6. Şeftalıoğlu A: Genel insan embriyoloğisi. AÜ Basımevi. Ankara, 1991.
7. Keith L, Moore TVN: The developing human clinically oriented embriyoloji. 5.th Edition,WB Saundurs Company. Philadelphia, 1988.
8. Maskar Ü: Embriyoloji ders kitabı, İstanbul Üniversitesi. İstanbul,1964.
9. Sadler TW: Langman's medical embriyology.6 th edition, Williams and Wilkins. Bultimore, 1990.
10. Petorak İ: Medikal Embriyoloji. BETA. İstanbul,1986.
11. Hedley DW: Flow cytometry using parafin-embedded tissue: Five years on. Cytometry, 10: 229-241, 1989.
12. Leeson TS,Leeson CR, Paparo AA: Text/Atlas of histology. WB Saunders Company. Philadelphia, 1988.
13. Wheater PR,Burkitt HG, Daniels VG: Fonksiyonel Histology.2 th edition Churchill Livingstone. Edinburg,1987.
14. Erbenđi T, Clara M: Histoloji atlası.3 baskı. İstanbul Üniversitesi. İstanbul,1984

15. Sağlam M: Genel Histoloji. 3 baskı. Emel matbaacılık. Ankara ,1987.
16. Yenson M: İnsan biyokimyası. 6 baskı. BETA. İstanbul,1988.
17. Watson JD, Hopkins NH and Roberts JW: Moleküler biology of the gene. Fourth ed. Benjamin /Cumming, 1987.
18. Riley RS, Mahin EJ and Ross W: Clinical application of flow cytometry. First ed. Igaku-Shoin Medical Publishers Inc. New York,1993.
19. Ekmekci A, Erbaş D: Kanserin moleküler mekanizması: Onkojenler ve büyüme faktörleri. Ankara, 1991.
20. Uçar F: Malignansi tanısında periferik kan,hücre süspansiyonları ve solid dokularda flow sitometrik DNA ve hücre siklusu analizleri. Doktora tezi, KTÜ Sağlık Bilimleri Enst., Trabzon ,1994 (Yayınlanmamış).
21. Givan AL: Flow Cytometry: First Principles. Wiley-Liss Inc. New York, 1992.
22. Ormerod MG: Flow Cytometry. First ed. BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford, 1994.
23. Aydın S: İnsan fetus karaciğerinin ışık mikroskopik ve akım sitometrik incelenmesi. Uzmanlık tezi, KTÜ Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, 1996 (Yayınlanmamış).
24. Cremer C, Haussmann M, Zuse P, Aten JA, Barths J, and Buhning HJ: Flow Cytometry of Chromosomes: Principles and applications in medicine and molecular biology, 82(1): 9-18, 1989.
25. Saunders Dawson B,Trapp RG: Basic and clinical bioistatistic. Second ed.,Prentice-Hall International, Connecticut, 1984, pp.117-118.
26. Robertis EDP and Robertis JREMF:Cell and molecular biology. Eight ed. Lea&Febringer. Philadelphia, 1987.
27. Günalp A, Ayter Ş,Lüleci G: Tıbbi biyoloji. Meteksan, Ankara 1989.

28. Bloom W and Fawcett DW: A textbook of Histology. 11 th ed. WB Saunders Company. Philadelphia, 1986.
29. Mathews C.K, Van Holde KE: Biochemistry. Benjamin/Cummings. California, 1990.
30. Mercer BM, Sklar S, Shariatmadar A, Gilieson MS, D'Alton ME: Fetal foot length as a predictor of gestational age. Am. J Obstet. Gynecol., 156,p:350-355, 1987.
31. Gözükara EM: Biyokimya. Repromat Ltd. Ankara, 1990.
32. Menteş NK, Menteş G(ed):Harper'in biyokimyaya bakışı. EÜ Tıp fak yay. İzmir, 1988.
33. Breel M, Griffionen A, Terhart H, Kraal GG: An antigen expressed by murine CD8+T cells and activated B cells. Immunobiology. 179 (2-3): 159-171, 1989.
34. Vikingson A, Pederson K, Muller D: Enumeration of IFN-gamma producing lenfosites by flow cytometry and correlation with quantitative measurement of IFN-gamma. J Immunol. Methods. 173(2):219-228, 1994.
35. Coventry BJ, Neoh S. HA Comparison of the sensitivity of immunoperoxidase staining methods with high-sensitivity fluorescence flow cytometry-antibody quantitation on the cell surface .Histochem -Cytochem. 42(8):1143-1207, 1994.
36. Watkins JR, Loken MR, Knight KL: Two B-cell subpopulations identified by F.C. Immunology.56(2):315-320, 1985.
37. Odacı E: 6-9 aylık insan fetusu dalak hücrelerinin flowcytometric ve immunohistokimyasal yöntemlerle araştırılması. Doktora tezi, KTÜ SABE Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Trabzon, 1997 (Yayınlanmamış).
38. Hedley DW Friandler ML, Taylor IW: Application of dna flow cytometry to paraffin-embedded archival material for the study of aneuploidy and Its clinical signifiante. Cytometry. 6(1):327-333, 1985.
39. Hirons GT, Fawcett JJ, Crissman HA: TOTO and YOYO: New very bright fluoro. chromes for DNA content analyses by F.C..Cytometry. 15(2):129-140, 1994.
40. Shapiro HM.:Practical flow cytometry. Sec. Ed. Alan R Liss,Inc.New York,1989.

ÖZET

Bu çalışmada insan fetusu apendiksini gelişimini ışık mikroskobu ve akım sitometrik analiz ile inceleyerek, morfolojik ve fonksiyonel bakımdan erişkin apendiksi ile karşılaştırmak ve yapılacak olan araştırmalara katkıda bulunmak amaçlanmıştır.

Çalışma Ekim 1996-Eylül 1997 tarihleri arasında K.T.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışma grupları intrauterin yaşları 18,2-36,4 hafta arasında değişen toplam 30 adet fetus ve 5 adet erişkin otopsi materyalinden oluşturuldu.

Ayrıntılı histolojik yapı, kript gelişimi ve lenfoid follikül oluşumu histolojik boyama yöntemleri ile, apendiks hücrelerinin proliferasyon gücü ise akım sitometrik analizlerle incelendi.

Işık mikroskobik çalışmada, yapısal olarak seroza-kas-mukoza gibi olgun histolojik tabakalanma ve kript yapısının 31-36 haftalardan itibaren ortaya çıktığı tespit edildi. Bu niteliğin de agregat lenfoid folliküller (peyer plakları) ile ortaya çıktığı ve gelişim süresince apendiks ana histolojik katları ile lenfoid dokunun paralel geliştiğini kanıtlamaktadır.

Akım sitometrik analizde S faz (DNA sentez fazı) değerleri ileri fetal haftalarda erken fetal haftalara göre kayda değer ölçüde yüksek bulundu. Bu değerlerin yetişkin apendiks örneklerinde düşük olduğu görüldü.

SUMMARY

In this study the development of appendiks in human fetus is examined using light microscopy and flow cytometric analysis. The data obtained is compared with adult appendix morphologically and physiologically.

The study is carried out between October 1996-September 1997 in KTÜ Medical Faculty, Department of Hystology and Embryology . Study groups consist of 30 fetus (ranging 18.2-36.4 weeks of gestation) and 5 adult autopsy material.

Detailed hystological structure, crypte development and lymphoid follicle formation is observed using hystological staining, proliferation potential of appendix cells is examined by flow cytometric analysis.

The mature hystological layering of T. Seroza-T. Muscularis-T. Mucoza and crypte structure is detected to form between 31-36 weeks of gestation, by light microscopic study. This formation process is observed to be simultaneous to the development of aggregate lymphoid follicles (Peyer Plaques). Thus proving the parallel development of main hystological layering and lymphoid tissue.

In Flow cytometric analysis S phase (DNA synthesis phase) results are significantly higher in late weeks of gestation compared to earlier weeks. These results are lower in adult appendiks materials.