

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNATÖRLÜĞÜ**

**TYL-2015-6188
NİKOTİNİN EMBRİYONAL KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ
TERATOJENİK ETKİSİNE KARŞI MELATONİNİN KORUYUCU
ROLÜ**

**Proje Ekibi
Doç. Dr. Tolga ERTEKİN (Yönetici)
Öğr. Gör. Halil YILMAZ (Yüksek Lisans Tez Öğrencisi, Araştırmacı)
Yrd. Doç. Dr. Mehtap NİSARİ (Araştırmacı)
Arş. Gör. Emre ATAY (Araştırmacı)
Arş. Gör. Hatice SUSAR (Araştırmacı)
Arş. Gör. Özge AL (Araştırmacı)
Öğr. Gör. Ahmet PAYAS (Araştırmacı)**

Yüksek Lisans Tez Projesi

Ekim 2016

KAYSERİ

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**NİKOTİNİN EMBRİYONAL KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ
TERATOJENİK ETKİSİNE KARŞI MELATONİNİN KORUYUCU
ROLÜ**

**Hazırlayan
Halil YILMAZ**

**Danışman
Doç. Dr. Tolga ERTEKİN**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TYL-2015-6188 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Ekim 2016
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı : Halil YILMAZ

İmza :



YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

"Nikotinin Embriyonal Kemik Gelişimi Üzerindeki Teratojenik Etkisine Karşı Melatoninin Koruyucu Rolü" adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Halil YILMAZ



Danışman

Doç. Dr. Tolga ERTEKİN



Anatomi Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Erdoğan UNUR



KABUL VE ONAY

Doç. Dr. Tolga ERTEKİN danışmanlığında Halil YILMAZ tarafından hazırlanan “Nikotinin Embriyonal Kemik Gelişimi Üzerindeki Teratojenik Etkisine Karşı Melatoninin Koruyucu Rolü” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Anatomi** Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

.... / / 2016

JÜRİ:

İMZA

Danışman : Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

(Erciyes Ünv. Tıp Fakültesi Anatomi ABD)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Şerife ÇINAR

(KTO Karatay Ünv. Tıp Fak. Anatomi ABD)

Üye : Yrd. Doç. Dr. Mehtap NISARI

(Erciyes Ünv. Tıp Fakültesi Anatomi ABD)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.... / /

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez çalışmam boyunca titiz çalışmasıyla bilgi ve desteğini esirgemeyen Sayın Hocam Doç. Dr. Tolga ERTEKİN'e,

Anatomi Anabilim Dalında geçirdiğim süre boyunca yetişmemde büyük emekleri olan Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Erdoğan UNUR, Anabilim Dalı değerli hocaları Sayın Prof. Dr. Kenan AYCAN, Sayın Prof. Dr. Nihat EKİNCİ, Sayın Prof. Dr. Harun ÜLGER, Sayın Doç. Dr. Niyazi ACER, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehtap NİSARİ, Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayşe SAĞIROĞLU'na,

Eğitimim boyunca ve bu çalışmayı yaparken benden emeğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Seher YILMAZ, Arş. Gör. Hatice SUSAR, Arş. Gör. Özge AL ve kıymetli dostum Arş. Gör. Emre ATAY'a,

Yüksek lisans öğrenimim süresince sıcak bir ortamda birlikte çalıştığımız yüksek lisans ve doktora öğrenimini yapan kıymetli tüm arkadaşlarıma,

Eğitimim boyunca desteğini esirgemeyen Anatomi Anabilim Dalı çalışanları Hüseyin ÇELEBİ, Ahmet ALPAY, Kazım KARABULUT ve Ferhat ÇAKMAKKAYA'ya,

Tezin yapılmasında katkıları olan DEKAM yöneticileri ile çalışanlarına, tez çalışmasına maddi destek sağlayan Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne,

Bugünlere gelmem için fedakârlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen ve üzerimde büyük emekleri olan sevgili ANNEM ve BABAM'a,

Tüm bu çalışmaları yapmamız için bize pozitif bilimi rehber gösteren Gazi Mustafa Kemal ATATÜRK'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

NIKOTİNİN EMBRİYONAL KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNDEKİ TERATOJENİK ETKİSİNE KARŞI MELATONİNİN KORUYUCU ROLÜ

Halil YILMAZ

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anatomi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Ekim 2016
Danışman: Doç. Dr. Tolga ERTEKİN**

ÖZET

Bu çalışmada, ikili boyama yöntemi ile düşük (3mg/kg) ve yüksek doz (6mg/kg) nikotin gebe ratların fetuslarında ortaya çıkaracağı muhtemel iskelet sistemi değişiklikleri ve bu değişikliklere karşı melatonin (10 mg/kg) koruyucu rolü araştırıldı. Bu amaçla çalışmamızda 18 adet erişkin dişi Wistar-albino türü rat kullanıldı. 2 dişi ve 1 erkek rat aynı kafese konuldu ve vajinal smear testi ile gebe olan ratlar tespit edildi. Gebe ratlar her gruba 3 rat düşecek şekilde 6 gruba ayrıldı. Gruplar kontrol, düşük doz nikotin, yüksek doz nikotin, düşük doz nikotin+melatonin, yüksek doz nikotin+melatonin ve melatonin olarak oluşturuldu. Deney gruplarına gebeliğin 1-20. günleri arasında nikotin uygulanırken tedavi gruplarına nikotine ek olarak melatonin uygulandı.

Kontrol grubuna ise aynı günlerde 1 ml/kg serum fizyolojik uygulandı. Gebeliğin 20. gününde fetuslar sezeryanla alınarak ağırlıkları ve baş-kıç uzunlukları ölçüldü. Daha sonra ikili iskelet boyama yöntemi kullanılarak fetusların kemik yapıları Alizarin Red S ile kırmızıya, kıkırdak yapıları da Alcian Blue ile mavi renge boyandı. Fetuslara ait ön ve arka ekstremitte kemikleri (scapula, humerus, ulna, radius, femur, tibia, fibula, el ve ayak iskeletleri) öncelikle stereomikroskop altında incelendi ve fotoğrafları çekildi. Daha sonra Image J programı kullanılarak total kemik uzunlukları, kemikleşme sergileyen bölgenin uzunlukları ve kemikleşme oranları hesaplandı. El ve ayak iskeletlerinde ise kemikleşme dereceleri belirlendi. Elde edilen veriler SPSS programında değerlendirildi.

Kemik total boy uzunluğu değerlendirildiğinde; düşük doz nikotin grubu ile kontrol grubu arasında bir fark olmadığı ($p<0.05$), yüksek dozda verilen nikotin ise total kemik boy uzunluğunu anlamlı derecede kısalttığı ($p<0.05$), bu gruplara melatonin verildiğinde ise total kemik boy uzunluğunun kontrol grubuna yaklaştığı ($p<0.05$) tespit edildi. Kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğu ölçüldüğünde ise bu değer nikotin gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede kısaldığı ($p<0.05$), nikotine ek melatonin

verildiğinde ise kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğunun arttığı ($p<0.05$) ve kontrol grubuna yaklaştığı belirlendi.

Bu verilere göre, gebelik sırasında kullanılan nikotinin iskelet sistemi üzerinde kemikleşmeyi geciktirdiği ve güçlü bir antioksidan olan melatoninin ise bu teratojenik etkiyi ortadan kaldırdığı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Rat, nikotin, melatonin, kemikleşme, ikili iskelet boyaması.

THE PROTECTIVE ROLE OF MELATONIN AGAINST NICOTINE'S TEROATOGENIC EFFECTS ON EMBRYONIC BONE DEVELOPMENT

Halil YILMAZ

**Erciyes University, Institute of Health Sciences
Department of Anatomy
Post Graduate Thesis, October 2016
Consultant: Doç. Dr. Tolga ERTEKİN**

ABSTRACT

This study aimed to demonstrate the effects of low (3 mg/kg) and high (6 mg/kg) doses of nicotine on fetuses skeletal system and the protection of melatonin (10 mg/kg) against to these effects via double staining method. For this purpose, we used 18 adult female Wistar-albino rats. 2 female and 1 male rat were put in the same cage and pregnant rats were identified with the vaginal smear test. Pregnant rats were divided into 6 groups (n:3 rats for each groups). Groups was established as control, low doses of nicotine, high doses of nicotine, low doses of nicotine + melatonin, high doses of nicotine + melatonin and melatonin groups. While nicotine was applied to the experimental group during 1-20 of gestation days, melatonin was given to treatment groups as a preservative against to nicotine. 1mg/kg saline was enjected to the control group on the same days. Fetuses were delivered by cesarean section on the 20th day of pregnancy and then their weights and lengths were measured. After that fetal bone structures were painted in red with Alizairn Red S, cartilage structures were painted in blue with Alcian Blue by using double staining method. Firstly, fore and hindlimb of painted fetuses (scapula, humerus, ulna, radius, femur, tibia, fibula, hand and foot skeleton) were invstigated under a stereo microscope and than their photos were taken. After that, the length of total bone and ossifying's area and the rate of ossifying was calculated by using Image J program. The degree of ossification was determined on hand and foot skeleton. Finally, the measured data were analyzed with SPSS. Considering the length of the bones; no differences were determined between the low doses of nicotine and the control groups, although the total bone lengths were significantly shorten in the high dose of nicotine group ($p<0.05$). When melatonin was given to nicotine groups; we determined that the total bone lengths were closer to of the control group. Considering the length of ossifying area; these measures were significantly shorter in the nicotine groups than the control group ($p<0.05$). When

melatonin was added to nicotine groups; these values increased and close to the control group ($p<0.05$). According to our data; we detected that the usage of nicotine during pregnancy causes the delay of skeletal ossification and the melatonin as a powerful antioxidant eliminates the teratogenic effects of nicotine.

Keywords: Rat, nicotine, melatonin, ossification, double skeletal staining

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	iii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iv
KABUL VE ONAY	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR ve SİMGELER	xiv
TABLOLAR LİSTESİ	xv
ŞEKİLLER LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. NİKOTİN	3
2.1.1. Nikotinin Etki Mekanizması	5
2.1.2. Nikotinin Genel Etkileri	6
2.1.2.1. Nikotinin Psikoaktif Etkileri	6
2.1.2.2. Nikotinin Merkezi Sinir Sistemine Etkileri	6
2.1.2.3. Nikotinin Sempatik Sinir Sistemine Etkileri	6
2.1.2.4. Nikotinin Kanserojen Etkisi	7
2.1.3. Nikotinin Fetal Etkileri	7
2.1.3.1. Nikotinin Fetal Gelişim Üzerindeki Genel Etkileri	7
2.1.3.2. Nikotinin Fetal Kemik Gelişimine Etkileri	8
2.2. MELATONİN	8
2.2.1. Melatoninin Biyosentezi	10
2.2.2. Melatonin Metabolizması ve Fizyolojisi	12

<u>2.2.3. Melatoninin Fonksiyonları</u>	13
<u>2.2.3.1. Antioksidan Etkisi</u>	13
<u>2.2.3.2. Bağışıklık Sistemi Etkileri</u>	13
<u>2.2.3.3. Melatoninin Tıbbi Kullanımı</u>	13
<u>2.3. KEMİK DOKUSU</u>	14
<u>2.3.1. Kemik Matriksi</u>	15
<u>2.3.2. Periosteum ve Endosteum</u>	16
<u>2.3.3. Kemik Hücreleri</u>	17
<u>2.3.3.1. Osteoprogenitör Hücreler</u>	17
<u>2.3.3.2. Osteoblastlar</u>	17
<u>2.3.3.3. Osteositler</u>	17
<u>2.3.3.4. Osteoklast</u>	18
<u>2.3.4. Kemikleşme (Ossifikasyon)</u>	19
<u>2.3.4.1. İntramembranöz Kemikleşme</u>	19
<u>2.3.4.2. İntrakartilaginöz Kemikleşme</u>	20
<u>2.3.4.3. Endokondral Kemikleşme</u>	20
<u>2.3.4.4. Perikondral Kemikleşme</u>	21
<u>2.3.5. Kemiğin Beslenmesi</u>	21
<u>2.4. RATLARDA İSKELET SİSTEMİ GELİŞİMİ</u>	21
<u>2.4.1. Rat İskelet Sistemi</u>	21
<u>2.4.1.1. Skeleton axiale</u>	22
<u>2.4.1.2. Skeleton appendiculare</u>	22
<u>2.5. Fetal İskelet Sisteminin Boyanması</u>	25
<u>3. GEREÇ VE YÖNTEM</u>	27
<u>3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR</u>	27
<u>3.2. DENEY HAYVANLARININ SEÇİLMESİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ</u>	28

<u>3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI</u>	28
<u>3.4. BOYAMA SÜRECİ</u>	33
<u>3.5. MORFOMETRİK ÖLÇÜMLER</u>	36
<u>3.6. SPSS ANALİZİ</u>	38
<u>4. BULGULAR</u>	40
<u>4.1. MORFOLOJİK BULGULAR</u>	40
<u>5. TARTIŞMA VE SONUÇ</u>	75
KAYNAKÇA	84
<u>ÖZ GEÇMİŞ</u>	

KISALTMALAR ve SİMGELER

MAO	: Monoamin oksidaz
ACh	: Asetilkolin
NNN	: N-Nitronicotine
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
G protein	: Guanin nükleotid-bağlayıcı proteinler
DEKAM	: Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi
i.p.	: Intra peritoenial
sc.	: Subkutan
mm	: Milimetre
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
MT1	: Melatonin 1
MT2	: Melatonin 2
MT3	: Melatonin 3
ml	: Mililitre
KOH	: Potasyum hidroksit
Ort	: Ortalama
S.S	: Standart Sapma
OH	: Hidroksit
O₂	: Oksijen
NO	: Nitrik oksit
KMY	: Kemik mineral yoğunluğu
MDA	: Malondialdehit
GSH	: Glutatyon
GSH-Px	: Glutatyon peroksidaz
SOD	: Süperoksit dismutaz

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. İkili İskelet Sistemi Boyama Yöntemi	35
Tablo 4.1. Fetus gruplarına ait boy (baş-kıç uzunluğu) verileri	41
Tablo 4.2. Fetus gruplarına ait ağırlık (gr) verileri.....	42
Tablo 4.3. Scapulaya ait istatistiksel veriler.....	46
Tablo 4.4. Humerus kemiğine ait istatistiksel veriler.....	50
Tablo 4.5. Ulna kemiğine ait istatistiksel veriler.....	54
Tablo 4.6. Radiusa ait istatistiksel veriler	57
Tablo 4.7. Metakarpal kemiklerde kemikleşme dereceleri	60
Tablo 4.9. Tibia'ya ait istatistiksel veriler.....	68
Tablo 4.10. Fibula'ya ait istatistiksel veriler	71
Tablo 4.11. Ayak iskeletleri kemikleşme dereceleri	74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Nicotiana Tobacum Bitkisi (16)	3
Şekil 2.2. Tütünde bulunan alkaloidlerin yapısı (16)	4
Şekil 2.3. Melatoninin Kimyasal Yapısı (58)	9
Şekil 2.4. Melatoninin sentezi (SAM: S-adenozil metionin, SAH: S-adenozil homosistein) (58).	10
Şekil 2.5. Pineal Bezin İnervasyonu (58)	11
Şekil 2.6. Kompakt kemiğin yapısını gösteren şematik çizim (95).	15
Şekil 2.7. Osteoblast ve osteositlerin görünümü. H-E. Büyütme x 150 (95).	18
Şekil 2.8. Köpek fetusu çene kemiğinde, osteoklastların ve osteoblastların yerleşimi. H-E. Büyütme x 95 (95).	19
Şekil 2.9. Intramembranöz kemikleşmenin başlangıcı (95).	20
Şekil 2.10. Kıkırdak model üzerine endokondral kemikleşmenin oluşumu (95).	20
Şekil 2.11 Rat iskelet sistemi görünümü (104).	25
Şekil 3.1. İkiye Bir Ratların Çiftleştirilmesi	28
Şekil 3.2. Gebe Kabul Edilen Dişi Ratların Ağırlıklarının Ölçülmesi.....	29
Şekil 3.3. Maternal Ratlara Subkutan Nikotin Uygulaması.....	31
Şekil 3.4. Maternal Ratlara Intraperitoneal Melatonin Uygulaması	31
Şeki 3.5. Fetusların Gebe Rat Karnından Explantasyonu.....	32
Şekil 3.6. Fetusun Plasenta ile Gösterimi	33
Şekil 3.7. Fetusların Baş-Kıç Uzunluklarının Ölçülmesi	33
Şekil 3.8. Derileri Soyulup Gözleri ve İç Organları Çıkarılan Fetuslar.....	34
Şekil 3.9. Boyama Süreci Tamamlanan Fetusların Saf Gliserinde Saklanması	37
Şekil 3.10. Image J Programında Ölçümler	38
Şekil 4.1 Nikotine Bağlı Şok Etkisi	40
Şekil 4.2. Scapulalara ait görüntüler	45
Şekil 4.3. Humeruslara ait görüntüler	49

Şekil 4.4. Radius ve ulnalara ait görüntüler	53
Şekil 4.5. El İskeletine ait görüntüler.....	59
Şekil 4.6. Femurlara ait görüntüler	63
Şekil 4.8. Ayak iskeletlerine ait görüntüler	73

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Gebelik döneminde yaşam şartları nedeniyle anne adayları bazı kimyasallara maruz kalabilir. Bu kimyasallar fiziksel ve kimyasal özellikleri gereği embriyo üzerinde bir takım teratojenik etkilere neden olabilir. Aynı zamanda bu teratojenler embriyonun gelişim sürecinde genetik farklılıklara ve gen delesyonlarına sebebiyet verebilir. Konjenital malformasyonlar; embriyogenezis döneminde ortaya çıkan gelişim bozukluklarının doğumla birlikte görülmesidir. Konjenital malformasyonlar yaşam boyunca ciddi sağlık sorunlarına hatta ölüme neden olabilir. Embriyonun teratojenik maddelerden etkilenmesinin ve fetusun zarar görmesinin temel sebepleri arasında böbreklerin teratojenik maddelerin atılımını sağlayamaması ve detoksifikasyon yapacak enzimlerin bu süreçte immatür olması sayılabilir (1, 2).

Alkol, sigara, kafein gibi günlük hayatta çok sık kullanılan tüketim ürünlerinin gebelik sürecinde güçlü bir teratojenik etkiye sahip olduğu birçok bilimsel çalışmada kanıtlanmıştır. Sigara tüketimi insan sağlığı açısından zararlı sonuçları olan bir bağımlılıktır. Sigaradaki temel bağımlılık yapıcı madde nikotindir. Cinsiyet, nikotine ilk maruz kalınma yaşı, genetik yatkınlık, nikotin dozu ve kullanım paternleri gibi etkenler nikotin bağımlılığında bireysel farklılıkların ortaya çıkmasından sorumludur (3). Nikotin plasentayı geçebilen ve fetal dolaşıma karışabilen bir bileşiktir (4). Gebelik döneminde aktif olarak sigara kullanımı ya da pasif sigara maruziyeti göbek kordonu ve plasenta değişiklikleri, plasenta dekolmanı, dış gebelik, bebekte gelişme geriliği, abortus ve erken doğum, düşük doğum ağırlığı, bebekte doğum öncesi ve sonrası ani ölüm gibi önemli hastalık ve durumların riskini artırmaktadır (5). Gebelik esnasında alınan nikotinin fetusun kemik gelişiminde gerilemelere yol açtığı, eksik veya tam ossifikasyona olmamış kemik sayısında da artışlara neden olduğu daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (6).

Nikotinin oksidan-antioksidan dengesini bozarak fetusta gelişim geriliğine yol açtığına dair kanıtlar her geçen gün artmaktadır. Deneysel çalışmalarda, ratlara nikotin uygulamasının; oksidatif stres belirteçlerinde yükselmeye, serbest radikal süpürücü enzimlerin aktivitesinde düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden deneysel çalışmalarda nikotinin teratojenik etkilerine karşı antioksidanlardan faydalanılmaktadır (5,7). Güçlü bir antioksidan olan melatonin epifiz bezinin pinealosit adı verilen hücrelerinden salgılanır. Literatürde değişik teratojenlere karşı melatoninin koruyucu ya da tedavi edici etkileri alabileceği gösterilmiştir (8-10).

İkili iskelet boyaması; kemiğin ve kıkırdak sahalarının farklı renklerde boyanarak belirlendiği bir yöntemdir. Teratojenlerin iskelet sistemi üzerinde etkisi belirlemede iki iskelet boyaması sıklıkla tercih edilen bir yöntem olup, elde edilen bulgular gelişimsel bozuklukların tanısında kullanılmaktadır (11, 12).

İncelediğimiz kadarıyla literatürde nikotinin kemik gelişimi üzerine yapacağı teratojenik etkiye karşı melatoninin koruyucu etkisi araştırılmamıştır. Bu çalışmanın amacı; gebelik döneminde değişik dozlarda nikotin kullanımına bağlı olarak oluşabilecek kemik hasarını ve nikotine karşı melatoninin koruyucu etkilerini ikili boyama metodu kullanarak incelemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NİKOTİN

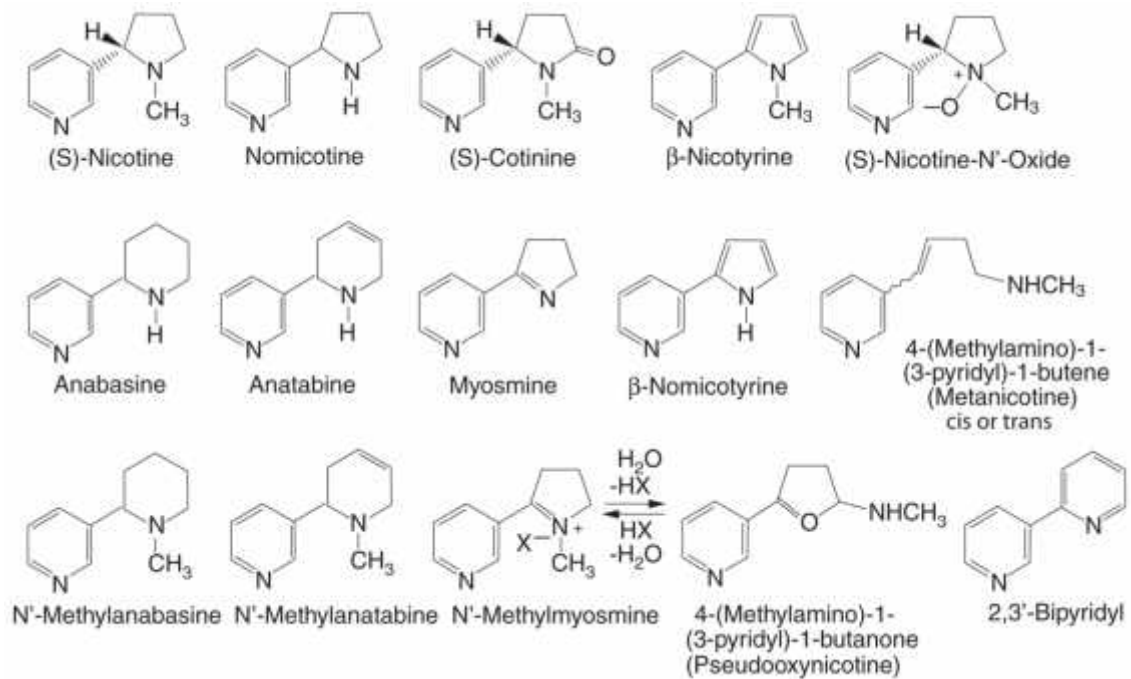
Sigara kullanımı dünyada yüksek oranda ölüme ve kalıcı hastalıklara yol açmaktadır (13). Sigarada polonyum, radon, metanol, toluen, kadmiyum, bütan, dikloro difenil trikloroethan, hidrojen siyanür, aseton, naftalin, arsenik, amonyak, karbon monoksit gibi 4000'den fazla toksik madde bulunmaktadır. Bunların en önemlilerinden biri de nikotindir (14).

Tütün bitkisinin Fransa'nın Lizbon elçisi Jean Nicot tarafından Fransız kraliyet ailesine düğün hediyesi olarak götürülmesinden sonra 1570'li yıllarda tütün bitkisi *Nicotiana tabacum* şeklinde isimlendirmeye başlanmıştır (Şekil 2.1). *Nicotiana tabacum*, Solanaceae ailesinin bir üyesi olup, bu ailenin diğer üyeleri olan patates, domates, patlıcan ve biber gibi sebzeler de düşük miktarda nikotin içermektedir. Bu ailenin üyesi olamayan karnabahar ve çay gibi bitkilerde de nikotin tespit edilmiştir (15).



Şekil 2.1. Nicotiana Tobacum Bitkisi (16)

Nikotin bir alkaloid olup birincil ticari kaynağı kurutulmuş tütün bitkisi (*Nicotinia tabacum* ve *Nicotinia rustica*) yapraklarıdır (14). Kurutulmuş tütün yaprağında %0.5-8 oranında nikotin bulunur ve toplam alkaloidlerin %95'ini oluşturur; diğer alkaloidler ise nornikotin, anabazin, kotinin, nikotin N-oksit'dir (Şekil 2.2), (16). Bir adet sigara genellikle 0.6-2 mg nikotin içerir. Kimyasal yapısı Pinner tarafından ortaya çıkarılmış olan nikotin, bir piridin halkası ile N-metil pirolidin halkasının kombinasyonundan oluşan bir tersiyer amindir (17,18).



Şekil 2.2. Tütünde bulunan alkaloidlerin yapısı (16)

Nikotin kimyasal formülü $C_{10}H_{14}N_2$ ve molekül ağırlığı 162.23 mol/gr'dır (14). Nikotin hipogroskopik renksiz eter, alkol gibi yağı çözen sıvılarda kolayca çözünür. Temel formunda 60°C ve 210°C arasında suyla karıştırılabilir. Erime noktası -79°C, parlama noktası 95°C, tutuşma noktası 240°C, kaynama noktası 247°C'dir. Nikotin zayıf bir bazdır ve pH'ya bağlı olarak biyolojik membranları geçebilir (19). Suda fazla çözünmesine rağmen lipofilik olduğu için kan beyin bariyerini çok hızlı geçebilir (18).

2.1.1. Nikotinin Etki Mekanizması

Nikotin; ağız, deri, akciğer, farink mukozasından emilir. Emilimi alkali ortamlarda kolay olurken asidik ortamda zorlaşır. Bronşiol ve alveollerde fizyolojik pH ve toplam yüzey alanı büyüklüğünden dolayı kolayca Emilimi gerçekleşir (16).

Sigara içiminde fizyolojik bağımlılığın en önemli sorumluları Monoamin oksidaz (MAO) inhibitörleri ile nikotin arasındaki kuvvetli etkileşimdir. MAO mitokondri dış zarında bulunur. Monoamin oksidaz A geni tarafından sentezlenir. Bu protein dopamin, norepinefrin ve serotonin gibi amin nörotransmitterlerini sentezler. MAO enzimleri MAO inhibitörleri tarafından kontrol altında tutulur. Nikotin kullanımı MAO inhibitörlerini sayıca anlamlı derecede azaltır ve MAO enzimlerini ise yükseltir. Böylece serotonin, dopamin ve nöroepinefrin gibi monoaminerjik nörotransmitterlerin düzeyi nikotin alımından kısa süre sonra hızlı bir şekilde artış gösterir (20).

Nikotinin ikinci etki mekanizması vücutta bulunan bazı endojen maddeleri taklit veya vücutta devam eden bazı fizyolojik olayları bloke etmesidir Bu süreçlerden en önemlisi Fizyolog John Newport Langley tarafından keşfedilmiş olup nikotinin, vücutta nörotransmitter bir madde olan asetilkolini (ACh) taklit ederek etki göstermesidir. Nikotin, ACh'e kimyasal benzerliği sayesinde otonom sinir sistemine ait ganglionlarında önce uyarım sonrasında da blokaj etkisi yapar. Nikotin, ACh salgısını artırarak konsantrasyon ve hafıza üzerinde; ACh ve nöroepinefrin salgısını artırarak da uyanıklık üzerinde pozitif yönde etki gösterir. Nikotine bağlı olarak ACh ve beta-endorfinin artması ağrıda azalmaya, sadece Beta-endorfinin artması ise anksiyetede azalmaya sebep olur. Yüksek dozlarda nikotin, serotonin ve opioid aktivitesini artırır ve bu sayede sakinlik sağlayarak ağrı kesici etki gösterir. Nikotin aynı zamanda dopaminin pozitif etkisini uzatır. Tüm bu etkiler beyin ödül sisteminde bir duyarlılık oluşturarak merkezi sinir sisteminde sürekli bir nikotin ihtiyacı oluşturur (16, 21-26).

Santral sinir sistemindeki kolinerjik etkiler hem nikotinik hemde muskarinik mekanizmaları içermektedir (27). Nikotinin vücuttaki etki yerleri kas-sinir kavsığı, otonomik ganglionlar ve merkezi kolinerjik sinapslardır (3). Nikotinin başlıca metabolize olduğu yer karaciğerdir. Metabolit ürünü ‘cotinine’ olup yarılanma ömrü 14-20 saat kadardır (28, 29).

2.1.2. Nikotinin Genel Etkileri

2.1.2.1. Nikotinin Psikoaktif Etkileri

Nikotinin ruh halini değiştiren rahatlatıcı ve uyarıcı özelliklere sahip olduğu literatürde rapor edilmiştir (30). Hızlı bir şekilde nikotinle etkileşime giren reseptörler (dopamin, serotonin, ACh, gamma-amino butirik asit, glutamat) noradrenalin ve opioid peptileri uyarır (16,31). Nikotinin psikoaktif etkilerinin birçoğunun ortaya çıkmasında bu nörotransmitter ve hormonların salgılanması sorumludur.

Her uyarıcı gibi nikotinde çok düşük oranda nöropsikiyatrik bir rahatsızlık olan akatizi'ye (huzursuzluk, yerinde duramama), ayrıca iştah azalması ve metabolizma hızının artmasına bağlı olarak kilo kaybına yol açabilir (32).

2.1.2.2. Nikotinin Merkezi Sinir Sistemine Etkileri

Nikotin, nikotinik ACh reseptörlerine bağlanarak bazı nörotransmitterlerin miktarında artışa sebep olur. Beyin ödöl sisteminin en büyük iştirakçisi olan dopamin seviyesinin artması, öfori ve rahatlama hissi vermesi nikotin tüketiminde bağımlılığa neden olur. Yapılan çalışmalarda nikotin yüklenen ratlarda hassaslaşma, ve hiperaktivite oluşmuştur.

Beyinde nikotin ve nikotine duyarlı reseptörler striatum nucleus accumbens, substantia nigra pars compacta, area ventralis tegmentalis bölgelerinde etkileşime girer (16, 33-36).

Sigara içimi nedenli kronik nikotine maruz kalındığında beyin sapı ve beyincik alanlarındaki nAchr (alpha4beta2) reseptörlerin oranında artma görölürken habenulopeduncular yapıdaki reseptörlerde artış görölmez (37-39).

2.1.2.3. Nikotinin Sempatik Sinir Sistemine Etkileri

Nikotin splanknik sinirde uyarıma yol açar, bunun sonucu adrenal medullada epinefrin salınımı artar ve bu yolla nikotin sempatik sinir sistemi üzerinde etki gösterir. Nikotin epinefrin artışı üzerindeki diğer etkisini ise preganglionik sempatik liflerdeki nikotinik ACh reseptörlerini aktive ederek ve sonuçta ACh salınımında artışa yol açarak sağlar. Nikotinik ACh reseptörleri periferde nöromuskuler kavşak, otonomik gangliyonlar, adrenal medullanın kromafin hücreleri ve duyuusal sinir uçlarında etkileşime girer. Bu etkileşimlerin sigarayı bırakmadaki düşük oranın açıklayıcısı olduğu düşünölmemektedir (16, 40-42).

2.1.2.4. Nikotinin Kanserojen Etkisi

Sigara içilmesi ile kanser arasında bağlantı olduğu 18. yüzyıldan itibaren araştırmacıların dikkatini çekmiş ve 1761 de İngiliz doktor John Hill, "Cautions Against the Immoderate Use of Snuff" (Aşırı Enfiye Kullanımına Dikkat) isimli raporu ile tütün-kanser arasındaki ilişkiyi açıklamıştır. Daha sonraki yıllarda sigara kullanımı ile özofagus, larinks, mesane, meme, mide ve akciğer kanserleri arasındaki ilişkiler istatistiksel olarak ortaya konmuştur (14, 43). N-Nitrosornicotine (NNN) Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından Grup 1 Karsinojen olarak sınıflandırılmaktadır (44).

Nikotinin karsinogenezisde doğrudan veya dolaylı bir şekilde rol aldığı hayvan modellerinde ve in vitro hücre kültürü çalışmalarında gösterilmiştir. Nikotin kolinerjik ve adrenerjik sinyalleri artırır (45). Böylece apoptozu engelleyen, tümör gelişimini teşvik eden büyüme faktörlerini aktive eder. Nikotin ayrıca anjiyogenezisi uyarak kanser oluşumunu teşvik eder (46). In vivo bir çalışmada nikotin uygulanan kanserli farelerde tümör büyüklüğünün 2 kat, metatazin 9 kat ve tümör yenilenmesinin ise 3 kat arttığı belirtilmiştir (47, 48).

2.1.3. Nikotinin Fetal Etkileri

2.1.3.1. Nikotinin Fetal Gelişim Üzerindeki Genel Etkileri

Nikotin sigara kullanan annelerin maruz kaldığı birçok bileşikten sadece biridir. Bu bileşiklerden 30 tanesinin olumsuz sağlık sonuçlarına sebep olduğu tespit edilmiştir. 1 Nisan 1990'da California Çevre Koruma Kurumu Başkanlığı Çevre Sağlığı Tehlike Değerlendirme Ofisi gelişimsel toksisiteye neden olduğu bilinen kimyasalların listesine nikotini eklemiştir. Gebelik sırasında nikotine maruz kalan çocuklarda tip 2 diyabet, obezite, hipertansiyon, nörodavranışsal kusurlar, solunum fonksiyon bozukluğu ve kısırlık oranında artış görüldüğü bildirilmiştir (48, 49). Pasif içicilikte dahi nikotin anne sütüne geçmektedir.

Nikotinin fetal gelişim üzerindeki olumsuz etki mekanizmaları tam olarak bilinmese de, nikotin kullanımına bağlı olarak oluşan plasental ve umbilikal damarlardaki vazokonstriksiyon ve hipoksi fetusun yetersiz beslenmesine sebep olur. Nikotin kullanımına bağlı olarak fetus sinir sisteminde nörotransmitter sistem bozulmakta ve anormal beyin gelişimi görülmektedir. Aynı zamanda yenidoğanlarda sinirsel davranışlardaki anormalliklerin (bozulmuş oryantasyon, otomatik regülasyon ve kas

tonusundaki anormalliklerin) nikotine maruz kalma sonucunda olduğu belirlenmiştir (50). Yapılan çalışmalarda hamilelikte sigara tüketiminin perinatal ve fetal mortalite riskini artırdığı gösterilmiştir. Gebelik boyunca günde 10'un üzerinde sigara içiliyorsa postnatal doğum ağırlığını ortalama 170 gr, 15'in üzerinde sigara kullanılıyorsa ortalama 300 gr azaldığı bildirilmiştir. Sigara içimi premature insidansını artırmaktadır. Prematüre doğumların %15'inden, düşük doğum ağırlıklı bebeklerin ise %20-30'u kadarından sigaranın sorumlu olduğu bildirilmektedir (51).

2.1.3.2. Nikotinin Fetal Kemik Gelişimine Etkileri

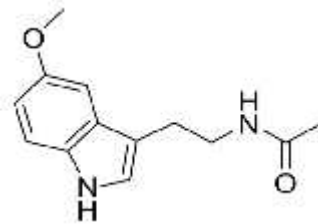
Vazokonstrüktör bir madde olan nikotin trombosit adezyonunu ve mikrovasküler tıkanıklığı artırır. Nikotinin kemik gelişimi üzerindeki etkileri osteoblast, osteoklast, fibroblast ve makrofajlar üzerine tesir etmesi ile gerçekleşmektedir. Nikotinin kemik gelişimi üzerindeki etkileri doza bağlı olup yüksek dozda verilen nikotin;

- 1- Osteoblast aktivitesini düşürüp osteoklast aktivitesini artırarak kemik dokusu yıkımına neden olur (52).
- 2- Fibroblast ve makrofajların yenilenmesini ve doku göçlerini azaltarak skar oluşumunun azalmasına sebep olur (53).
- 3- Trombosit adezyonunu artırarak mikropıhtı oluşmasına ve mikropenfüzyonu azalmasına neden olur. Bu durumda doku iskemisine yol açar.
- 4- Kanda B-endorfin gibi katekolaminlerin, adrenokortikotropik hormonun (ACTH) ve kortizolun seviyelerini yükseltir. Katekolamin salınımı, kalp hızını, kan basıncını, O₂ ihtiyacını artırır, akut dönemde de orta ve büyük çaplı arterlerde kan akımının azalmasına yol açar. Bu durumda fetal iskelet sisteminin yeterince beslenememesine sebep olur.
- 5- Kemik gelişiminde önemli bir rol üstlenen D vitamininin vücutta depolanmasını azaltmaktadır (54).

2.2. MELATONİN

Kimyasal ismi N-asetil 5-metoksi triptamin olarak da bilinen melatonin hormonu özellikle gece saatlerinde epifiz bezi (pineal bez) tarafından salgılanır (Şekil 2.3.). 1958 yılında Yale Üniversitesi'nden Prof. Aaron B. Lerner ve ark. tarafından keşfedilmiştir. Lerner ve ark. melatoninin deri hastalıklarında tedaviye yardımcı olduğunu, 1970'li

yılların ortasında ise pineal bezden salındığını ve biyolojik saat ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Melatoninin keşfinden daha öncesinde 1917’de Carey Pratt McCord ve Floyd P. Allen pineal bez özü ile besledikleri ineklerin deri altında renk açılmaları olduğunu gözlemlemiştir. Daha sonraki yıllarda melatoninin, amfibi ve sürüngenlerde deride renk değiştirme mekanizması ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (55-57).



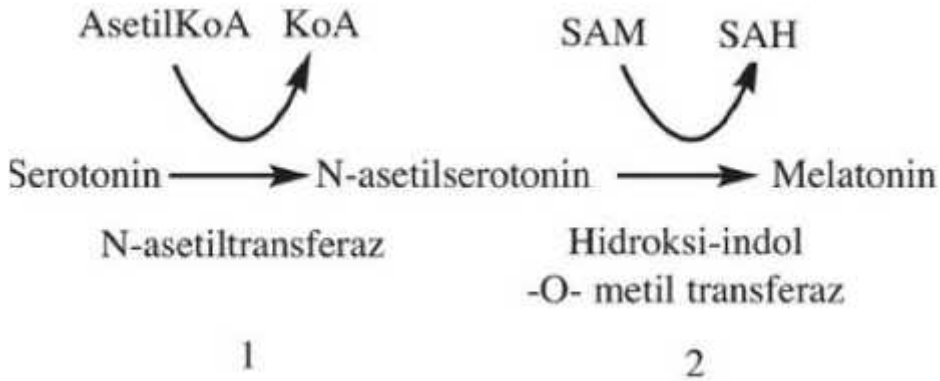
Şekil 2.3. Melatoninin Kimyasal Yapısı (58)

Melatonin hayvanlarda, bitkilerde, bakterilerde ve mantarlarda bulunan bir maddedir (59,60). Ana görevi vücudun biyolojik saatini koruyup ritmini ayarlamak olan melatonin hormonu son yıllarda tüm dünyada gittikçe artan bir ilgiyle araştırılmaktadır. Temel görevi olan biyolojik ritmi ayarlamamanın dışında hücre yenilenmesi, bağışıklık sisteminin güçlenmesi, vücut ısısının düzenlenmesi gibi başka önemli görevlerde de yer alır. Melatonin lipofilik yapıda olmasından dolayı bilinen en güçlü antioksidanlar birisidir. 1993 yılında melatoninin antioksidan olduğu keşfedilmiş olup (61) ilk patent 1995 yılında Richard Wurtman tarafından uyku rahatsızlığı çeken hastalarda tedavi için alınmıştır. Lipofilik olması tüm vücut alanlarına ulaşabilmesine ve kan-beyin bariyerini geçebilmesini sağlamaktadır. Melatonin ayrıca hücre çekirdeğinin ve mitokondrial DNA’nın korunmasında da kısmen rol oynar (62). Birçok araştırma yapılmasına rağmen melatoninin bütün fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (63).

Hayvanlarda uyku saati, kan basıncı gibi fizyolojik fonksiyonlar melatoninin sentezlenmesini etkiler (16). Melatonin bitkilerde fizyolojik olarak ışık periyodunun düzenlenmesi, sert çevre koşullarına karşı savunma ve bitki büyümesi görevlerinde yer alır. Melatonin mısır, kiraz, pirinç, üzüm, domates ve birçok yenilebilir meyvede bulunur (64-66).

2.2.1. Melatoninin Biyosentezi

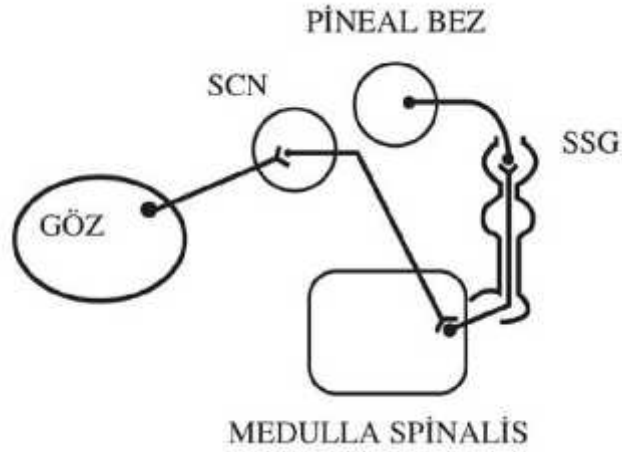
Melatonin hormonunun %80'lik kısmı pineal bez yapısında bulunan ve parankimal hücrelerin çoğunluğunu oluşturan pinealositler tarafından sentezlenir. Pineal bez dışında harder bezi, lakrimal bez, retina, eritrositler, trombositler ve gastrointestinal sistemdeki bazı hücrelerin de melatonin sentezlediği bildirilmiştir. Ancak diğer kaynaklardan sentezlenen miktarın kan dolaşımındaki melatonin düzeyine katkısı çok düşüktür (67). Bu hücreler tarafından gerçekleştirilen melatonin sentezi için triptofan aminoasidine gereksinim vardır. Kan dolaşımından pinealosit hücreleri içerisine alınan triptofan, ilk önce triptofan 5-hidroksilaz enzimi aracılığıyla 5-hidroksitriptofan'a, 5-hidroksitriptofan ise L-aromatik aminoasit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) vasıtasıyla 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) çevrilir. Serotonin de N-asetiltransferaz (NAT) ile N-asetilserotonin'e ve son olarak Nasetilserotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonine dönüştürülür (68) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Melatoninin sentezi (SAM: S-adenozil metionin, SAH: S-adenozil homosistein) (58).

Melatonin salgılanmasını etkileyen temel faktör ışıktır. Retinadan ışık duyusu impulslarını getiren lifler, hipotalamus'un nucleus suprachiasmaticus'una gelir. Sonra mesencephalondaki formatio reticularis uyarılır. Buradan impulsar iki yolla corpus pinealeye ulaşır. Birinci yol doğrudan corpus pineale'ye gider ve bezin salgısını stimüle eder. İkinci yol ise tractus reticulospinalisin lifleri ile birlikte medulla spinalise gelir ve simpatik sistemin üst segmentlerini uyarır. Bu simpatik uyarı preganglionik liflerle ggl. cervicale superius'a geçer. Buradan da n. pinealis aracılığı ile corpus pinealeye gelir. Corpus pineale'deki pinealositlerde bol miktarda melatonin ve serotonin mevcuttur.

Simpatik uyarı pinealositlerin içerisindeki bu mediatörlerin salgılanmasını inhibe eder. Simpatik etki ortadan kalktığında sekresyon başlar (Şekil 2.5). Bu nedendir ki karanlıkta bu inhibe edici etki olmayacağı için bezin salgısı artar (69).



Şekil 2.5. Pineal Bezin İnervasyonu (58)

Akşam 21.00-22.00 saatlerinde melatonin salgılanması artmaya başlar, özellikle gece saat 23:00–05:00 sıralarında melatonin zirve yapar ve kandaki konsantrasyonu 3-10 kat artar. 02.00-04.00 saatlerinde en üst seviyeye ulaşır. Sabah 05.00-07.00’de azalmaya başlar ve 07.00’den sonra bazal seviyelere düşer (63). Melatonin salgısının seviyesi yeni doğan bebeklerde doğumdan sonra yaklaşık olarak 3. ayda düzenli bir hale gelir (70). Çocuklar ergenlik çağına geldiği zaman gecelik melatonin salınımı uykuya daha geç gidilmesi ve geç saate kadar uyanık olmaktan dolayı gecikir. Yaş ilerledikçe insanın melatonin üretimi azalır (71).

Sirkadiyen ritim bitkilerin, hayvanların, mantarların ve siyanobakterilerin 24 saatlik periyot içerisindeki biyokimyasal ve psikolojik davranışlarının bütünüdür. Melatonin fotoperiyod ile ilgili bilgileri aktararak vücut fonksiyonlarının ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde görev alır (72).

Norepinefrin pineal bezde bulunan en önemli nörotransmitterdir ve pinealosit membranındaki postganglionik reseptörlere ($\beta 1$ ve $\alpha 1$ adrenerjik reseptörler) bağlanması ile fonksiyon gösterir. Melatonin sentezinin yaklaşık %85’i $\beta 1$ reseptörlerinin uyarılmasıyla , %15’i ise $\alpha 1$ reseptörlerinin uyarılmasıyla gerçekleşir. Bu nedenle

melatonin düzeyinin belirlenmesinde β -blokör ilaç kullanımı etki etmektedir. Melatonin düzeyleri ısı, med-cezir ve β -blokör ilaçlar gibi birçok faktörden etkilenebilmektedir (73).

2.2.2. Melatonin Metabolizması ve Fizyolojisi

Melatonin sentezlendikten sonra depolanmaz. Düşük molekül ağırlık ve lipofilik, hidrofilik özelliklerinden dolayı pasif difüzyonla dışarı atılır. Kanda bulunan melatonin % 70 oranında plazma albuminine bağlıdır. Dolaşımdaki melatonin beyin omurilik sıvısı da dahil olmak üzere tüm biyolojik sıvılara dağılır. Melatonin anneden fetüse plasental yol, yenidoğanda ise süt ile geçmektedir. Melatoninin kandaki yarılanma süresi 10-40 dakikadır. Esas olarak karaciğerde metabolize olmaktadır (73).

Mevsimsel olarak gece-gündüz süresinin değişimi melatonin sekresyonunu etkiler. Sekresyon süresinin değişmesi yüzünden hayvanlarda üreme, davranış, büyüme, kamuflaj renklendirme gibi davranışlarında mevsimsel farklılıklar gösterir. Melatonin bazı kuşlar ve hamsterlarda hipofizin ön lobundan salınan folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinleştirici hormonu (LH) salınımını engelleyerek cinsel duyguları bastırır. Bu da üreme mevsimlerinin bu tür canlılarda yaz aylarına sarkmasına neden olur (74).

İnsanlarda faz yanıt eğrisine göre uykudan bir kaç saat önce küçük miktarlarda melatonin kullanıldığında (0.3 mg), sirkadiyen saati erkene kaydırmasından dolayı sabah erken kalkmayı ve gündüz uyanık olmayı teşvik eder. İnsanlarda oral yoldan uygulanan melatonin %90'ı karaciğerde tek bir geçişte temizlenir, az miktarı da idrar yolu ve tükürükle atılır (75, 76).

Memelilerde melatonin reseptörleri G proteine (guanin nükleotid-bağlayıcı proteinler) bağlıdır ve iki farklı reseptör vardır. Bu reseptörler MT1 (Melatonin 1) ve MT2 (Melatonin 2) olarak tanımlanmış olup amfibi ve kuşlarda ise ayrıca MT3 reseptörü tespit edilmiştir. MT1 reseptörleri, hipofizin pars tuberalis bölümünde ve hipotalamusun nucleus suprachiasmaticusunda bulunmaktadır. MT2 reseptörü ise retinada bulunmaktadır. Bu temel bölgeler dışında MT1 ve MT2 reseptörleri cerebellum, retinal yollar ve ganglion hücrelerinde de bulunur (77).

2.2.3. Melatoninin Fonksiyonları

2.2.3.1. Antioksidan Etkisi

Biyolojik saati düzenlemesinin yanı sıra melatonin güçlü bir antioksidan ve serbest radikal temizleyicisidir (78). Melatonin hücre duvarını ve kan beyin bariyerini kolaylıkla geçebilir. Antioksidan olarak hidroksit (OH), oksijen (O_2^-), nitrik oksit (NO) gibi serbest oksijen ve nitrojen içeren radikallerin temizlenmesinde görev alır (79). Melatoninin genel antioksidan etkisi diğer antioksidanlarla birlikte çalıştığında artış sergiler. Melatoninin E vitamininden iki kat daha aktif olduğu kanıtlanmış olup C vitamini ve E vitamini gibi diğer klasik antioksidanlardan melatoninin ayıran özellik amfifilik olmasıdır. Mitokondriyal hedef antioksidanları gibi diğer sentetik antioksidanlarla (mito Q, mito E) karşılaştırıldığında melatoninin mitokondriyal oksidatif strese karşı koruyucu rolünün iki kat daha fazla olduğu kanıtlanmıştır (80-82).

2.2.3.2. Bağışıklık Sistemi Etkileri

Melatoninin bağışıklık sistemi ile etkileşimde olduğu bilinmesine rağmen etki mekanizmasının ayrıntıları tam anlamıyla ortaya çıkarılamamıştır. Antiinflamatuvar etkisi literatürde en çok çalışılan konulardan birisidir. Preklinik çalışmalarda melatonin sitokin üretimini artırdığı ve edinilmiş immün yetmezliğe karşı reaksiyon gösterdiği tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda viral bakteri enfeksiyonu gibi bulaşıcı hastalıklara karşı faydalı olduğu rapor edilmiştir (83).

2.2.3.3. Melatoninin Tıbbi Kullanımı

Melatonin son zamanlarda insomnia hastalarında ve geç uyuma alışkanlığı olan, vardiyalı işlerde çalışan, hızlı seyahat etmesi gereken kişilerde uyku bozukluğu nedeniyle çalışılmış olup olumlu sonuçlar vermiştir (84).

Şizofreni hastalarında ve major depresif bozukluk bulunan hastalarda yapılan çalışmalarda melatoninin uzun süreli salınması uyku kalitesini artırmıştır (85). Uyku döngüsü bozukluğu olan çocuklarda (86) ve hipertansiyon hastalarında melatoninin uzun süreli salınımı uykuda kan basıncı kontrolünü artırmıştır (87). Melatoninin özellikle batıdan doğuya uçuşlarda görülen jet lag etkisini azalttığı, uyku uyanıklık döngüsünün yeniden düzenlenmesine yardımcı olduğu, gecikmiş adaptasyona uyumu artırdığı bildirilmiştir (88).

Melatonin, ameliyat öncesi depresyonu azaltmada placebo ilaçlara göre daha etkili sonuçlar vermekte ve ameliyat sonrası anksiyeteyi de azaltmaktadır (89). Melatonin, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu hastalarda metilfenidata ek olarak verildiğinde ilacın etkililiğini artırmakta ve etki süresini uzatmaktadır (90). Melatonin kullanımı migren ve küme tipi baş ağrısı oluşumunu engellemekte ve ilerlemesini azaltmaktadır (91). Melatonin, oksidatif stresi azaltarak safranin safra kesesi taşına dönüşmesini azaltmaktadır (92).

Melatonin, radyasyonun hücre duvarında oluşturduğu yıkımı ve zararı en az seviyeye düşürür. Radyasyonun biyolojik zararın %70'i serbest hidroksillerin DNA, protein ve hücre duvarına saldırmasından kaynaklanmaktadır. Melatonin güçlü bir antioksidan olarak bu serbest hidroksilleri ortadan kaldırarak çok güçlü bir koruyucu etki oluşturmaktadır (93).

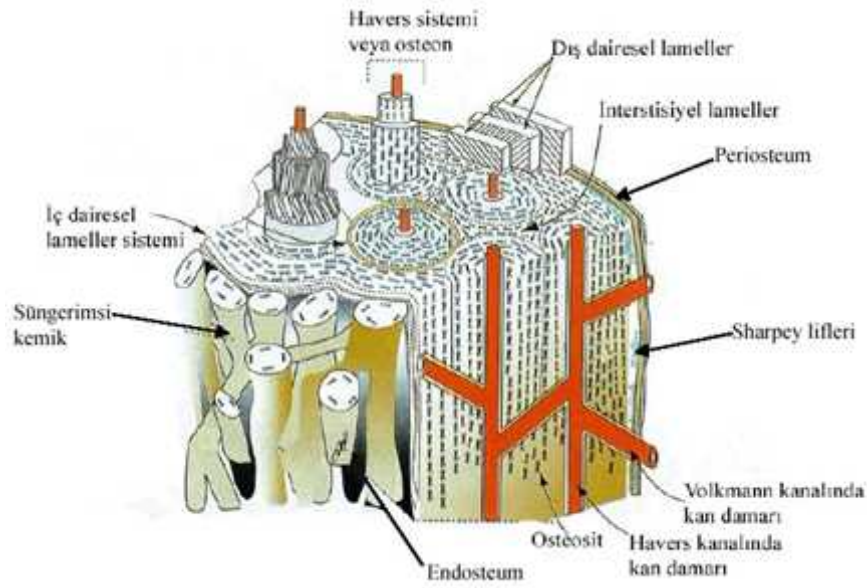
2.3. KEMİK DOKUSU

Kemik dokusu bağ dokusunun özelleşmiş bir şeklidir. Diğer bağ dokusu tipleri gibi hücreler ve hücreler arası maddeden oluşmaktadır. Kemik dokusunun en iyi ayırt edici özelliği dokunun sertliğini sağlayan hücreler arası maddenin kalsifikasyonudur. Bu özelliği kemik dokusunu insan vücudunun en sert yapılarından biri haline getirir. Kemik dokusu yumuşak dokuları destekler ve hayati önem taşıyan organları korur (kafatası ve göğüs kafesi gibi). Kemik dokusu ayrıca kan hücrelerini yapan kemik iliği hücrelerini bulundurur. Kalsiyum fosfat ve diğer bazı iyonlar için depo olarak işlev görür ve bu minerallerin derişiminin sabit tutulmasını sağlar. Hormonal, metabolik ve besinsel koşullara duyarlı olan aktif bir dokudur. İskelet kasların hareketi sırasında kemik dokusu bir manivela görevi yaparak vücut hareketlerine katkıda bulunur (94-96).

Kemik dokusu; kemik matriksi ve kemik matriksi içinde laküna adı verilen boşluklarda bulunan 3 tür hücreden (osteosit, osteoblast ve osteoklast) oluşur (94).

Kemik dokusunun kompakt ve spongioz kemik olmak üzere iki ayrı formu vardır. Kompakt kemik sıkı tertiplenmiş, boşluk içermeyen bir dokudur (Şekil 2.6). Spongioz kemik dokusunun ise gevşek, labirent veya bol boşluklu tarzda bir görünümü vardır. Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Uzun kemiklerin uç tarafındaki bölgeye epifiz, bunların arasında yer alan uzun bölgeye ise diyafiz adı verilir. Epifiz bölgesi aynı zamanda kemiğin büyümesinde rol oynar (epifiz plağı). Epifiz kısmı ince kompakt kemikle kaplı

olup spongiyöz kemik dokusundan yapılmıştır. Diyafiz bölümü ise sadece kompakt kemik dokusundan yapılmıştır. Diyafizin ortasında da kemik iliği bulunur. Kafatası gibi yassı kemiklerin her iki tarafı kompakt, içi veya ortası ise spongiöz kemik olarak tertiplenmiştir. Kafatası kemiklerinin iki laminası arasında kalan bölgeye diploe denir (94).



Şekil 2.6. Kompakt kemiğin yapısını gösteren şematik çizim (95).

Kemikler genellikle periosteum adı verilen ve osteojenik (kemik oluşturabilme) aktivitesi olan bir bağ dokusuyla çevrilidir. Periosteum eklem kıkırdağının bulunduğu bölgede yer almaz. Diyafizdeki kemik iliği kavitesi ve spongiöz kemikteki boşlukların etrafı ince bir bağ dokusuyla çevrilidir. Bu yapı endosteum adını alır ve osteojenik aktiviteye sahiptir. Kemik dokusu kıkırdak dokusunun aksine bol damarlıdır. Ancak matiksinin sert olması difüzyon için elverişli değildir. Dolayısıyla dokunun beslenmesi kanaliküllerle olmaktadır. Bu kanaliküllerin içinde kemik hücreleri yerleşiktir. Hücreler sitoplazmik uzantılarıyla birbirleri ve komşu damarlarla ilişki kurarak metabolizma gerçekleştirilir (96).

2.3.1. Kemik Matiksi

Kemik matiksi organik ve inorganik maddelerden oluşur.

Organik maddeler:

Kemik organik matriksi osteoid adı verilen, osteoblastlar tarafından salgılanan mineralize olmamış organik yapıdan oluşur ve inorganik tuzların depolanıp kristalleşmesi için kemiğe formunu verir. Matriksin %90'ı Tip I kollajen, geri kalanı proteindir. En sık rastlanılan proteinler; osteonektin, osteokalsin, osteopontin ve kemik siyaloproteindir. Bu proteinlerin işlevleri tam olarak bilinmemekle birlikte mineralizasyonda rol oynadıkları düşünülmektedir. Gelişmiş bir kemik dokuda lifler birbirlerine paralel ve porlar bırakacak şekilde dizilmiş olup, aralarında hidroksiapatit kristalleri yerleşiktir. Minerallerin kollajen liflerle ilişkisi, kemik dokusunun sertliği ve direncinden sorumlu olmalarından kaynaklanır. Kemik, dekalsifiye edildiğinde şeklini korur ancak bir tendon kadar esnek hale gelir. Çoğunluğunu kollajenin oluşturduğu organik matriks kemikten uzaklaştırıldığında ise yine şeklini korur ancak kırılgan hale gelir (94, 97).

İnorganik madde: İnorganik maddeler kemiğin kuru ağırlığının yarısını oluşturmaktadır. Kalsiyum ve fosfat en fazla bulunan maddelerdir. Bunun yanı sıra bikarbonat, potasyum, sodyum, magnezyum ve sitrat da matriks içinde bulunmaktadır. Hidroksiapatit kristalleri $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ kalsiyum ve fosfatın birleşmesi ile oluşur. Hidroksiapatit kristalleri plakalar şeklinde dizilerek amorf madde ve fibriller tarafından sarılmış hidroksiapatit kabuğu adı verilen tabakayı oluşturur. Oluşan bu tabaka ile iyon alışverişi sağlanır. Hidroksiapatit kristalleri kollajen lif segmentlerine sıkıca bağlıdır ve bu sayede kristal ve kollajenin yerlerinden ayrılmasını engeller. Böylelikle kemik yapısı gerilme ve sıkışmaya karşı direnç kazanmış olur (97, 98).

2.3.2. Periosteum ve Endosteum

Periosteum; Eklem yüzeyleri dışında, tüm kemikler periost ile çevrelenmiştir. Periosteum iki tabakadan oluşur. Dış tabakada fibroblastlar ve fibriller bol miktarda bulunur. Periosteumun iç tabakasında farklılaşarak osteoblastları oluşturan osteoprogenitör hücreler yer alır. Osteoprogenitör hücreler kemik büyüme ve onarımında önemli rol oynarlar. Periost kemiğe Sharpey lifleri aracılığıyla yapışır. Sharpey lifleri dış esas lamellere uzanan ve matriks içine giren fibril demetleridir (94, 97, 99).

Endosteum; Kemik iliği kavitesi ile spongioz kemiğin trabeküllerini örten yapıya endosteum denir. Endosteum çok az bağ dokusu ve tek tabakalı osteoprogenitör

hücrelerden oluşmuştur. Periosteum ve endosteum kemik dokusu beslenmesi, büyümesi ve tamiri için gerekli olan hücreleri sağlamaktadır (94, 97, 99).

2.3.3. Kemik Hücreleri

2.3.3.1. Osteoprogenitör Hücreler: Mezenkimal kökenli bu hücreler, büyüme-gelişme döneminde aktivitelerini korurken, erişkin dönemde yaralanma sonrası iyileşme fazında aktive olurlar. Osteoklast ve osteoblastların oluşumuna öncülük ederler. Osteoprogenitör hücrelerin çekirdekleri oval ve soluk boyanan, stoplazmaları ise asidofilik karakterlidir. Periosteumun derin tabakasında, havers kanallarında ve endosteumda bulunurlar (100).

2.3.3.2. Osteoblastlar: Osteoblastlar kemik yapımından sorumlu hücrelerdir. Osteoblastlar Tip 1 kollajen, proteoglikan ve glikoprotein sentezi yaparak kemik matriksin organik kısımlarının üretiminden sorumludurlar. Mineralize olmayan kemik matriksini oluşturmak için kollajen sentezler ve bu yapının kalsifiye olmasına aracılık ederler. Osteoprogenitör hücreler tarafından oluşturulurlar (Şekil 2.7). Büyüme ve tamirde görev alırlar (100).

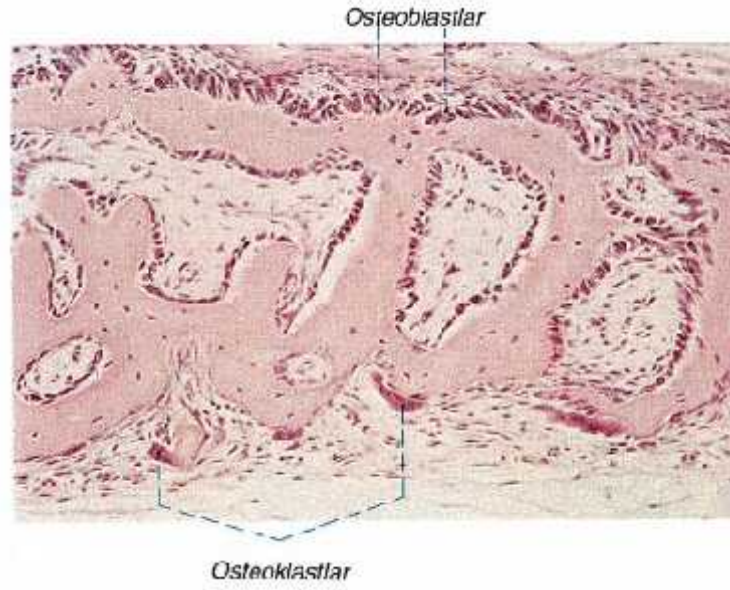
Işık mikroskobunda incelendiğinde şekillenmekte olan kemik yüzeyinde tek sıra halinde dizildikleri görülmektedir. Prizmatik veya kuboidal şekildedirler. Üretim işlevleri azaldığında yassılaşırlar ve stoplazmalarındaki bazofil özellik azalmaya başlar (94).

2.3.3.3. Osteositler: Bölünme özelliği olmayan ileri derecede farklılaşmış olgun kemik hücreleridir. Kemik matriksi içerisinde laküna isimli boşluklarda bulunurlar ve her lakünada bir osteosit bulunacak şekilde yerleşmişlerdir (Şekil 2.7). Osteositler uzantıları sayesinde hem birbirleriyle hem de havers kanalları ile bağlantı kurarlar. Bu bağlantılar yoluyla besinlerin hücreden hücreye geçmesini, oksijen ve karbondioksitin de kan yoluyla uzaklaştırılmasını sağlarlar (97).



Şekil 2.7. Osteoblast ve osteositlerin görünümü. H-E. Büyütme x 150 (95).

2.3.3.4. Osteoklast: Kemik iliği granülosit-makrofaj öncül hücrelerinden köken alan ve kemik rezorbsiyonundan sorumlu olan, çok çekirdekli hücrelerdir. Kemik rezorbsiyonundan sonra apoptozise uğrarlar. Kemik yıkımının gerçekleştiği bölgelerde enzimatik aktivite ile açılmış Howship lakünası adı verilen oyuklar bulunur ve osteoklastalar bu oyuklara yerleşmiş olarak bulunurlar (Şekil 2.8). Kollajenaz ve diğer enzimleri salgılayarak protonları hücre altı cebe gönderir, böylece kolajen sindirimini ve kalsiyum tuz kristallerinin eritilerek emilmesini sağlayarak kollajen kemik yıkımını gerçekleştirirler. Kemiğin yeniden şekillenme aşamasında osteoklast ile osteoblastın uyumlu çalışması kemik malformasyonunun oluşmaması için önem teşkil etmektedir (94, 97, 102).

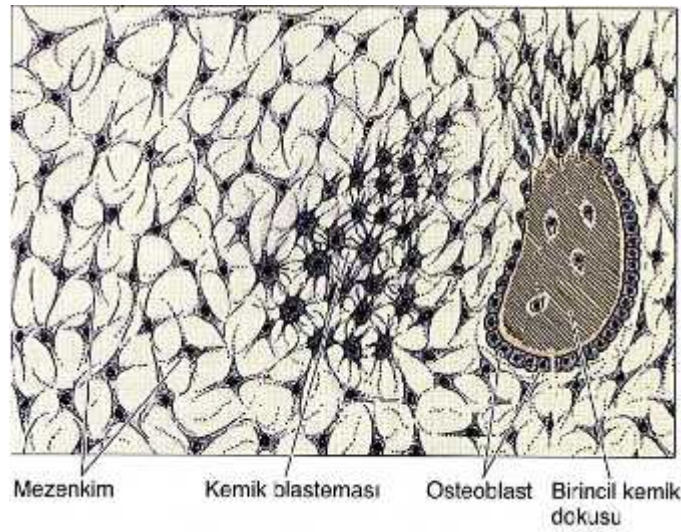


Şekil 2.8. Köpek fetusu çene kemiğinde, osteoklastların ve osteoblastların yerleşimi. H-E. Büyütme x 95 (95).

2.3.4. Kemikleşme (Ossifikasyon)

Kemikleşme intramembranöz ve intrakartilaginöz olmak üzere iki biçimde gerçekleşmektedir. İntrakartilaginöz kemikleşme endokondral ve perikondral olmak üzere iki biçimdedir.

2.3.4.1. İntramembranöz Kemikleşme: Embriyonal mezenşimal bağ dokusu yapısının doğrudan kemik dokusuna dönüşümü şeklinde gerçekleşen kemikleşmedir. Bu kemikleşme modelinde bağdokusu hücreleri doğrudan osteoblastlarla yer değiştirir. Osteoblast hücreleri osteoid salgırlar. Osteoblastlar da zamanla osteositlere dönüşür. İntramembranöz kemikleşme sonucunda süngerimsi yapıda kemikler oluşur. Klavikula, frontal kemik, nazal kemik, temporal kemiğin squamosası, oksipital kemiğin squamosası, parietal kemik, mandibula bu kemikleşme modeli ile kemikleşir (Şekil 2.9).

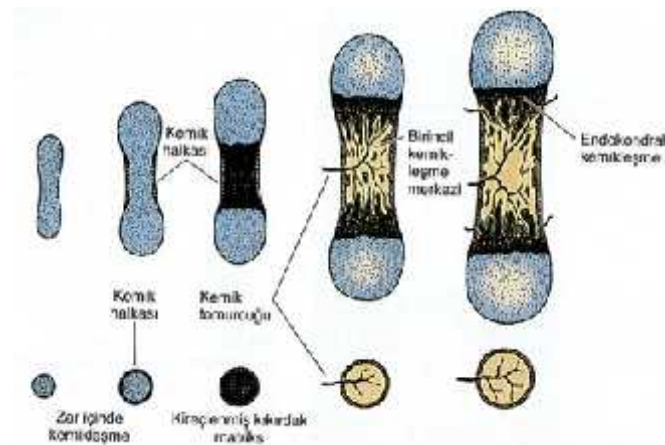


Şekil 2.9. Intramembranöz kemikleşmenin başlangıcı (95).

2.3.4.2. İntrakartilaginöz Kemikleşme: Bu kemikleşme modelinde bağ dokusu önce kıkırdak dokusuna sonra kemik dokusuna dönüşür. Sekonder kemikleşmede önce gelişecek kemiğin hyalin kıkırdaktan bir taslağı oluşur. Uzun ve kısa kemikler bu şekilde kemikleşmektedir.

Bu şekilde kemikleşen kafa kemikleri chondrocranium'u oluşturur. İntrakartilaginöz kemikleşmede 2 farklı yol izlenir ve bu yüzden endokondral kemikleşme ve perikondral kemikleşme olmak üzere iki alt modeli vardır.

2.3.4.3. Endokondral Kemikleşme: Bu modelde kemikleşme kemiğin iç kısmından başlar ve diğer kısımlara yayılır. Kısa kemiklerde görülen bir kemikleşme modelidir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Kıkırdak model üzerine endokondral kemikleşmenin oluşumu (95).

2.3.4.4. Perikondral Kemikleşme: Kemik taslağının dış kısmından başlayan bir kemikleşme modelidir. Perikondriumun iç kısmında bulunan osteoblastların aktivitesi ile kemik dokusu diafiz bölgesinde kemiğin her tarafını sarar. Bu tabaka giderek kalınlaşarak kemikleşme tamamlanır. Bu kemikleşme modeli uzun kemiklerin kemikleşmesinde görülür (94, 97).

2.3.5. Kemiğin Beslenmesi

Kemik beslenmesini sağlayan damar sistemi çok iyi organize olmuş olup kemiklerde oluşan bir hasarın onarımı daha kolay olmaktadır. Kemiklerin beslenmesi 3 yoldan gerçekleşir.

- 1) Kemiklerin dış yüzeyinde foramen nutricium denilen delikler bulunur ve bu deliklerden vasa nutricia denilen damarlar girerek spongioz tabakaya ulaşır ve kemiğin beslenmesini sağlar
- 2) Kompakt kemiklerin beslenmesini a. periostales denilen arterler besler.
- 3) Eklem kıkırdığının beslenmesi metafiziyel ve epifiziyel dallar tarafından sağlanır (94-101).

2.4. RATLARDA İSKELET SİSTEMİ GELİŞİMİ

2.4.1. Rat İskelet Sistemi

Ratlarda embriyonal hayatın 9. günü sonunda veya 10. günün başında somit gelişimi başlar. 11. günün sonunda 25, 13. günde 45 somit ve 16. günün sonunda ise 65 somit gelişir. 16. günden itibaren ilk kemikleşme merkezleri ortaya çıkar. İlk kemikleşme merkezleri clavícula'da, kaburgalarda ve kafatasının bazı kemiklerinde görülür. 16. günde kalça, diz, omuz ve dirsek eklemlerine ait boşluklar belirginleşmeye başlar. 17. günde kemikleşme ekstremitelerine ve kafatasının diğer kemiklerine yayılırken el bileği ve ayak bileği eklemlerine ait boşluklar belirginleşir. 18. günde kafa hızla büyür ve damak taslakları kaynaşır. 19. ve 20. günlerde ön ve arka ekstremitelerin parmak eklemlerine ait boşluklar ortaya çıkar. Ratlarda 22. günde doğum gerçekleşir. Yenidoğan bir ratda uzun kemiklerin gövde ve diyafizleri büyük oranda kemikleşmiştir fakat epifizleri hala kıkırdak yapıdadır. Sekonder kemikleşme merkezlerinin çoğu doğumdan sonraki günlerde de varlığını devam ettirir (94, 103, 104).

Rat iskelet sistemi; İskelet sistemi skeleton axiale ve skeleton appendiculare olmak üzere iki kısma ayrılarak incelenir (94, 103).

2.4.1.1. Skeleton axiale: Vücudun eksenini oluşturan columna vertebralis, göğüs kafesi ve kafatası kemiklerinden meydana gelir.

Kafatası kemikleri: Bir kısmı tek (os ethmoidale, os occipitale, os hyoideum, os interparietale, os vomer, os palatinum), bir kısmı çift (os parietale, os sphenoidale, os temporale, os lacrimale, os incisivum, os nasale, os zygomaticum, os pterygoideum, os frontale, maxilla, mandibula) olmak üzere toplam 28 kemikten meydana gelmiştir.

Kulak kemikçikleri ise stapes, incus, os lenticulare, malleus olmak üzere 4 çifttir (103-105).

Omurga: Rat omurgası 57-61 vertebradan meydana gelir. Bu vertebraların 7'si servikal, 13'ü torakal, 6'sı lumbal, 4'ü sakral ve 27-31'i kaudal bölgede bulunur. Servikal vertebraların en büyüğü atlas ve axis'tir. Axis'in spinal çıkıntısı kısa ve sivridir. Torakal vertebradan kuyruk kısmına kadar vertebraların boyu 2mm'den 7mm'ye kadar doğrusal olarak artar. Torakal vertebraların gövdelerinde ve transvers çıkıntıları üzerinde kaburgalarla eklem yapmaya yarayan eklem yüzleri bulunur. Lumbal vertebralar iyi gelişmiş ve aynı uzunlukta olup basık, geniş, büyük gövdeli ve belirgin çıkıntıları vardır.

Sakrumun toplam uzunluğu 20-23 mm olup transvers çıkıntıları ve eklem çıkıntıları oldukça belirgindir. Sakral vertebralar arka ayaklara destek sağlar. Kaudal bölgede bulunan ilk dört vertebra sacral vertebraya benzer ve bu vertebralardan sadece ilk ikisinde arcus vertebralis tam olarak gelişmiştir. Sakral vertebraların diğerlerinde arcus vertebralis tam olarak kapanmaz ve arka kısımları "U" şeklinde açık kalır. Bu kısım özellikle kuyruğun sonuna doğru yassılaşarak uzamıştır (103-105).

Göğüs kafesi kemikleri: Rat göğüs kafesinde 13 çift costae ve 1 adet sternum olmak üzere toplam 27 adet kemik bulunur. Kaburgalar dorsalde göğüs omurları ile ventralde de sternum ile eklem yaparlar. 13 çift kaburganın ilk 7 çifti sternum ile direkt eklem yapar ve bu kaburgalara costae verae adı verilir. Son 6 çiftine de costae spuriae denir. Bunların ilk 3 çifti 7. kaburgaya tutunarak sternumla bağlantı kurarken, kalan son 3 çifti (costae fluctuantes) ise serbest olarak sonlanır. Sternum göğüs kafesinin önünde ve orta hatta bulunan bir kemiktir (103-105).

2.4.1.2. Skeleton appendiculare: Ön taraf ve arka taraf kemiklerinden oluşur.

Ön taraf kemikleri: Ön taraf kemikleri sağ ve sol taraf olmak üzere toplam 64 kemikten oluşur. Bu kemikler; clavicula, scapula, humerus, radius, ulna ve ön ayak kemikleridir.

Clavicula: Clavicula proksimalde sternum ile distalde omuz ekleminin kranial tarafı ile eklem yapar. Clavicula'nın proksimal kısmı kalın distal kısmı ise yassıdır (103-105).

Scapula: Üçgen şeklinde yassı bir kemik olan scapula, thoraxın dış yüzünün ön tarafına yerleşmiştir. Üç kenarı, üç köşesi ve iki yüzü vardır. Scapulanın dış yüzünde bulunan spina scapulae orta hatta doğru gittikçe kalınlaşır. Spina scapulae'nın uç kısmına acromion denir ve burası yassılaştırmıştır (103-105).

Humerus: Humerus, scapula'dan sonra gelen uzun bir kemiktir. İki ucu ve bir gövdesi vardır. Proksimal ucu scapula ile distal ucu da önkol kemikleri ile eklem yapar. Proksimal uçta caput humeri, tuberculum majus ve tuberculum minus bulunur. Humerus'un distal kısmında da iki ayrı epikondil bulunur ve her ikisi de gelişmiştir. Humerus'un proksimalinde yer alan epifiz plağı 2. yılın sonuna kadar kaybolmaz ve varlığını sürdürür (103-105).

Radius ve Ulna: Radius ve ulna benzer çaplarda kemiklerdir. Ulna, olecranon'un gelişiminin daha iyi olmasından dolayı radius'tan 1/6 oranında daha uzundur. Bu iki kemik arasında dar bir aralık bulunur. Radius ve ulna'nın distal kısmındaki epifizyal kırıkdaıkları 2 yıl sonra kemikleşmeye başlar.

Ön ayak iskeletinde 27 adet kemik bulunur. Bunlar; ossa carpi (8 adet), ossa metacarpi (5 adet) ve ossa digitorum manus (14 adet)'dur (103-105).

Carpal kemikler: Ön ayak bileği (el bileği) kemikleri iki sıra halinde dizilmiştir. Proksimal sırada üç adet kemik bulunur. Bu kemikler; intermediolateral, ulnar ve aksesuar kemikler olarak adlandırılır. Distal sırada 1'den 4'e kadar isimlendirilen (os carpale primum, secundum, tertium ve quartum) 4 adet karpal kemik bulunur. İkinci ve üçüncü karpal kemikler arasına giren merkezi bir kemik (os centralis) vardır. Ayrıca bunların dışında kanca şeklinde sesamoid kemikler vardır. Bu kemiklerden medialdekine os falciforme (os marginale), lateraldekine de phalanx postminimi denir (103-105).

Metakarpal kemikler: Ossa metakarpale; 5 adet metakarpal kemik vardır. Bunların en kısası I. metakarpal kemik en uzununu ise III. metakarpal kemiktir.

Parmak kemikleri (Ossa digitorum phalangs): 5 parmaktan oluşur ve ilk (baş) parmak iki falankstan diğer parmaklar da üç falankstan oluşur (103-105).

Arka taraf kemikleri: Arka taraf kemikleri sağ ve sol tarafta olmak üzere toplam 64 kemikten oluşur. Bu kemikler; os coxae, femur, tibia, fibula, patella ve arka ayak kemikleridir (103-105).

Os coxae: Os coxae, kaudal kısımda sakral vertebraların sağ ve sol tarafında bulunur. Arka tarafta sakral vertebralar ön tarafta da symphysis pubis aracılığı ile pelvis boşluğunu oluşturur. Os coxae ilium, ischium, pubis ve acetabular kemiklerden oluşur (103-105).

Femur: Proksimal ve distal olmak üzere iki ucu ve bir gövdesi olan uzun bir kemiktir. Proksimal tarafta caput femoris ve caput femorisi destekleyen boynu vardır. Femur üzerinde üç trochanter vardır. Bunlar; trochanter major, trochanter minor ve trochanter tertius. Distal uçta iç ve dış iki kondili vardır (103-105).

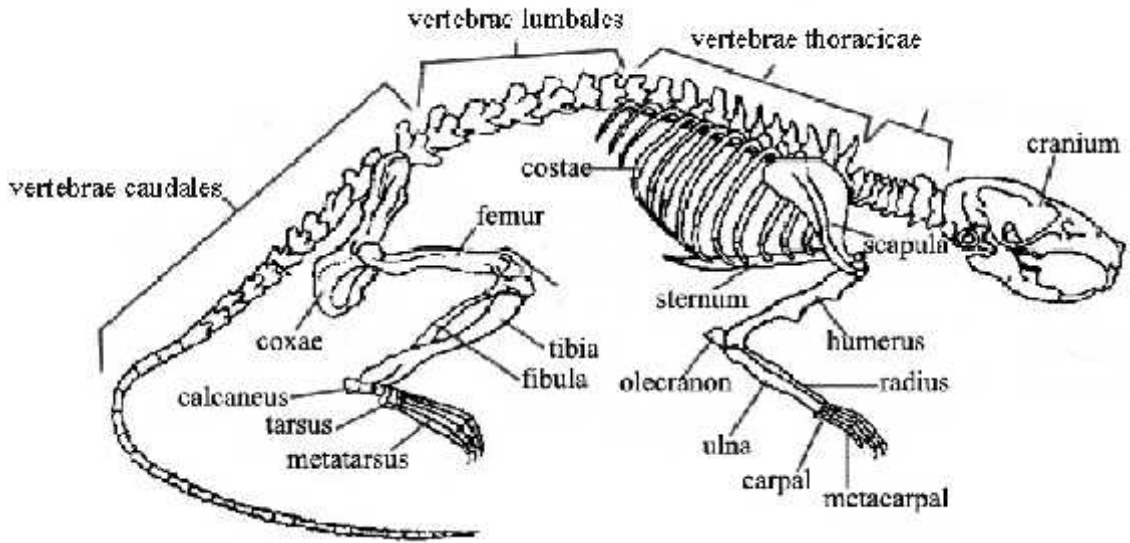
Tibia ve Fibula: Ratlarda tibia ve fibula kemiklerinin anatomik yapısı insandakinden biraz farklıdır. Anatomik olarak tibia ve fibulayı ratda tek bir kemik olarak ele almak mümkündür. Çünkü; tibia ve fibula, distalde ve proksimalde birleşen tek bir kemiktir. Çok genç hayvanlarda bile kısmi bir kemikleşme ile birleşen bu kemikler, yaş ilerledikçe daha iyi kaynaşırlar. Ancak dikkatle incelenecek olursa iki kemik arasındaki ayrım yaşlı hayvanlarda bile görülebilir. Birleşme, kraniyalde fibröz eklemleşme biçimindeyken kaudalde tam birleşme mevcuttur (103-105).

Arka ayak iskeletinde 27 adet kemik bulunur. Bunlar; ossa tarsi (8 adet), ossa metatarsi (5 adet) ve ossa digitorum pedis (14 adet)'dir.

Ossa tarsi: 8 adet kemikten oluşan ossa tarsi, iki sıra halinde dizilmiştir. Proksimal sırada talus, calcaneus, os tibiale mediale tarsi ve talus ile distal sıra arasında da os naviculare (os tarsi centrale) yer alır. Distal sıra ise medialden laterale doğru os cuneiforme mediale, intermedium, laterale ve cuboideum (os tarsale I, os tarsale II, os tarsale III, os tarsale IV) şeklinde dizilmiştir (103-105).

Ossa metatarsi: 5 adet metatarsal kemik vardır. En kısası birinci metatars, en uzununu ise üçüncü metatars'tır.

Ossa digitorum pedis: Birinci parmakta iki falanks, diğer dört parmakta üçer falanks olmak üzere toplam 14 adet falanks vardır (Şekil 2.11) (103-105).



Şekil 2.11 Rat iskelet sistemi görünümü (104).

2.5. Fetal İskelet Sisteminin Boyanması

İkili iskelet boyaması; iskeleti oluşturan kemik ve kıkırdakların farklı boyalar ile farklı renklerde veya aynı rengin farklı tonlarında boyanması işlemidir. Teratojenik ve gelişimsel çalışmalarda ikili iskelet boyaması kullanılır.

Teratojenik çalışmalarda çeşitli kimyasal maddelerin iskelet sistemi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Deneysel çalışmalarda gebe deney hayvanlarının yavru veya fetusları kimyasal maddeye maruz bırakıldıktan sonra iskelet sistemi boyanır ve iskelet gelişimlerinin farklı aşamalarında oluşan malformasyon veya varyasyonlar belirlenir. Böylelikle verilen kimyasal ajanın iskelet sistemindeki teratojenik etkileri ortaya konmaya çalışılır (106-108).

Belchier, kemiği bütün şekilde ilk kez boyayan ve bu sayede kemiğin gelişimi ve anatomisi hakkındaki ilk bilgileri 1735-1736 yılları arasında ortaya koyan araştırmacı olarak bilinir. Belchier araştırmalarında, bitki köklerini toz haline getirip hayvanların yemlerine katmış ve bu hayvanların kemiklerinin kırmızı boyandığını gözlemlemiştir. Kemik gelişimi ile ilgili bu metod daha sonra başka araştırmacılar tarafından kullanılmış ve geliştirilmiştir. Kömür katranından elde edilen alizarin redin ikili boyama yönteminde kullanılmasıyla kemik boyama çalışmaları ivme kazanmıştır. 1830 yılına gelindiğinde John Hunter kemik büyümesi çalışmalarında Belchier'in belirlediği bu metodu kullanmıştır. Literatürde en güvenilir sonucu veren çalışmalar 1926 yılında Dawson

tarafından yayımlanmıştır. Dawson çalışmalarında alizarin redin oranını artırarak yöntemin başarı oranını yükseltmiştir (106-108).

Fakat sadece kemiğin boyandığı bu yöntemlerde kıkırdakta oluşan hasarları ve anomalileri gözden kaçmakta ve kemiğin yanında kıkırdağın boyanmasının da gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu çalışmalara ilk olarak Wijhe methylen blue solüsyonu ile kıkırdağı maviye boyamak için kullanmıştır. Lundval ise Wiche' nin metoduna sadık kalarak sadece methylen blue yerine Methyl Green ve Toluidin Blue'yu çalışmalarında tercih etmiştir. Kemik ve kıkırdağın ayrı ayrı boyandığı bu çalışmalarda Williams (1941) ve Burdi (1965) kemik dokuyu Alizarin Red-S kıkırdak dokuyu Toluidin Blue ile boyamışlardır. Fakat ilerleyen dönemde Toluidin Blue çalışmalarında boyamanın solduğu etkisini kısa sürede kaybettiği görülmüş kıkırdak dokusunu boyamak için Alcian Blue tercih edilmeye başlanmıştır. Ojeda ve arkadaşları 1970 yılında kıkırdak dokunun boyanmasında Alcian Blue'nun kullanıldığı yöntemi yayınlamışlardır (106-108).

1971 de Simons ve Van Horn tarafından ilk defa yayınlanan kemik dokunun Alizarin Red-S, kıkırdak dokunun Alcian Blue ile boyanması kabul görmüş ikili iskelet boyaması metodu günümüzde sıklıkla tercih edilir olmuştur (104,106-108).

Inouye 1976 yılında tek bir solusyon içerine Alizarin Red-S ve Alcian Blue'yu katarak kemik ve kıkırdak dokuları aynı anda boyamıştır. Inouye tarafından belirlenen bu method etkin ve hızlı olması nedeniyle ikili iskelet boyama çalışmalarında altın standardı oluşturmuştur (104, 106-108).

İkili iskelet sistemi boyaması teratojenik ve gelişimsel çalışmalarda geçmişte olduğu gibi günümüzde de kullanılan etkin bir metoddur.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 15/97 nolu kararı alındıktan sonra başlatıldı ve çalışma süresince yapılan tüm işlemler etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışmamız Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TYL-2015-6188 nolu projesi ile desteklendi.

3.1. KULLANILAN KİMYASALLAR

Absolit Etil Alkol (%99.5) Merck (Almanya)

Acetic Acid (Glacial) 100 % Anhydrous Gr Emsure Merck (Almanya)

Alcian Blue 8 Gx (C.I.74240) For Microscopy Certis Merck (Almanya)

Alizarin Red S Sigma-Aldrich (Almanya)

Diethylether For Analysis Emsure Merck (Almanya)

Etil Alkol %96

Glycerol Gr For Analysis Merck (Almanya)

Melatonin powder, 98% (TLC) Sigma-Aldrich (Almanya)

Nikotin Sigma-Aldrich (Almanya)

Potassium Hydroxide Gr For Analysis Merck (Almanya)

Xylene For Analysis Emsure Xylene For Analysis Emsure

3.2. DENEY HAYVANLARININ SEÇİLMESİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ

Çalışmamızda kullanılan 180-220 gr ağırlığında 18 adet 5-7 aylık Wistar-Albino ırkı ratlar Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları ve Klinik Araştırma Merkezinden (DEKAM) temin edildi. Dişi ratlar 21 gün süreyle erkek ratlardan ayrı kafeslerde tutuldu ve bu süre zarfında gebe olmadıkları kesin olarak belirlenen dişi ratlar çalışmamıza dahil edildi. Ratlar eşleşmenin gerçekleştirileceği gün saat 17.00 de iki dişi bir erkek olacak şekilde kafeslere alındı (Şekil 3.1). Ertesi sabah 07.00’de dişi ratlar erkeklerden ayrılarak vaginal smear testine tabi tutuldu. Smear testinde sperm görülen dişiler 0.5 günlük gebe kabul edildi ve ayrı kafeslere alındı.



Şekil 3.1. İkiye Bir Ratların Çiftleştirilmesi

Ratlar araştırma süresince 19-21 °C sabit sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık dönemlerin bulunduğu özel hazırlanmış, otomatik olarak klimatize edilen odalarda korundu. Ratlar normal pellet cinsi yem ile beslendi.

3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

Vaginal smear testinde pozitif kabul edilen gebe ratlar 0.5 günlük hamile kabul edilerek ağırlıkları ölçüldü (Şekil 3.2). Gebe ratlar rastgele 6 gruba (n=3) dağıtıldı. Her gruptaki gebe rat sayısı; gruplarda en az 15 fetusta ölçüm yapılmak istenmesi, diseksiyon ve ikili iskelet boyaması aşamalarında oluşabilecek hasarlar göz önüne alınarak belirlendi.

Yeterli fetus sayısına ulaşıldıktan sonra sakrifiye edilmeyen anneler DEKAM'a teslim edildi.



Şekil 3.2. Gebe Kabul Edilen Dişi Ratların Ağırlıklarının Ölçülmesi

Gruplar;

Kontrol Grubu: Bu grupta bulunan Ratlara gebeliklerin 1. ile 20. günleri arasında her gün serum fizyoloji (SF) (1ml/kg/gün) uygulaması günde bir kez saat 17.00'da intraperioteneal (i.p.) olarak yapıldı. Gebe ratlar 20. gün sakrifiye edildi. İki annede yeterli fetus sayısına ulaşıldığı için kalan anne DEKAM'a teslim edildi. Bu grupta 2 fetus içlerinin boşaltılması, 1 fetus şeffaflandırma aşamasında 2 denek ise ekstremitelerin ayrılması aşamasında zarar gördüğü için elendi.

Düşük Doz Nikotin Grubu: Bu grupta bulunan ratlara 1. günden itibaren 20 gün süresince her gün saat 16:30'da 3mg/kg/gün nikotin uygulaması subkutan (sc.) olarak yapıldı (Şekil 3.3). Gebe ratlar 20. gün sakrifiye edildi. Bu grupta 2 fetus içleri boşaltılması, 3 fetus boyama, 2 fetus ise şeffaflandırma aşamasında elendi.

Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubu: Bu grupta bulunan ratlara gebeliklerinin 1. günü ile 20. günleri arasında her gün saat 16:30'da 3mg/kg/gün nikotin uygulaması sc. ve bu uygulamayı takiben yarım saat sonra 10 mg/kg/gün melatonin uygulaması i.p. olarak yapıldı (Şekil 3.4). Gebe ratlar 20. gün sakrifiye edildi. Bu grupta 3 denek içlerinin

temizlenmesi 2 denek boyama, 2 denek şeffaflandırma, 2 denek ise ekstremiteleri ayırma işlemleri sonrasında çalışmadan diskalifiye edildi.

Yüksek Doz Nikotin: Bu grupta bulunan ratlara 1. günden itibaren 20 gün süresince nikotin uygulaması yapıldı. Nikotin uygulaması ikiye bölünmüş olarak sabah 07:00 ve akşam 16:30 saatlerinde 3mg/kg dozunda sc. olarak uygulandı. Gebe ratlar 20. gün sakrifiye edildi. Bu grupta 4 fetus içlerinin temizlenmesi, 3 fetus şeffaflandırma, 1 fetus da ekstremitelerinin ayrılması aşamasında çalışmanın dışında bırakıldı.

Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubu: Bu grupta bulunan ratlara 1. günden itibaren 20 gün süresince nikotin uygulaması ikiye bölünmüş olarak sabah 07:00 ve akşam 16:30 saatlerinde 3 mg/kg dozunda sc. olarak yapıldı. Melatonin uygulaması ise sirkadyen ritm dikkate alınarak akşamki nikotin uygulamasından yarım saat sonra 10 mg/kg/gün dozunda i.p. olarak uygulandı. Gebe ratlar 20. gün sakrifiye edildi. 2 fetus içlerinin çıkarılması, 2 fetus boyama, 2 fetus şeffaflandırma ve 1 fetus ekstremitelerin ayrılması aşamasında zarar gördüğü için çalışmanın dışında bırakıldı.

Melatonin Grubu: Bu grupta bulunan ratlara sirkadiyen ritm gözönünde bulundurularak gebeliklerin 1. günü ile 20. günleri arasında her gün saat 17:00'da 10 mg/kg/gün melatonin uygulaması i.p. olarak yapıldı. Gebe ratlar 20. gün sakrifiye edildi. Bu grupta 2 denek içlerinin boşaltılması, 1 denek şeffaflandırma, 3 denek ise ekstremitelerin ayrılması aşamasında zara gördüğü için çalışmadan elendi.



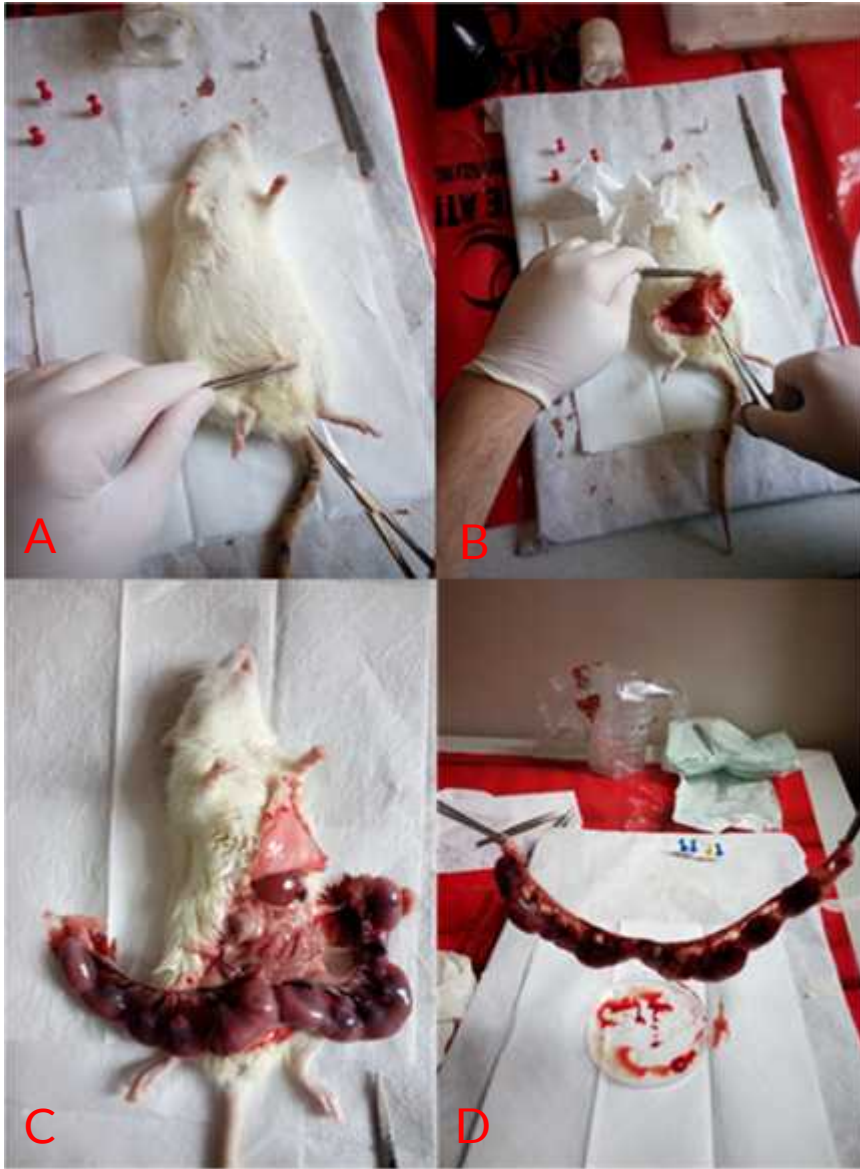
Şekil 3.3. Maternal Ratlara Subkutan Nikotin Uygulaması



Şekil 3.4. Maternal Ratlara Intraperitoneal Melatonin Uygulaması

Ratlara verilecek nikotin miktarının ayarlanmasında çözücü solüsyon olarak SF kullanıldı. Toz halinde olan melatoninin çözme işlemi ise etil alkol (%1 oranında) ve PBS kullanıldı. Her iki madde de günlük olarak hazırlandı ve stok solüsyon yapılmadı.

Gebe Ratlar, gebeliğin 20. gününde ketamin (75 mg/kg)+ ksilazin (10 mg/kg) anestezisi altına alındı. Anestezi edilen ratların karın bölgesi %70'lik alkol ile temizlendikten sonra transvers bir kesi ile karın ön duvarları kaldırıldı (Şekil 3.5). Uterus ve içerisindeki fetuslar plasentaları ile tek tek diseke edildi (Şekil 3.6).



Şeki 3.5. Fetusların Gebe Rat Karnından Explantasyonu

A. Karın Ön Duvarının Temizlenmesi, **B.** Karın Ön Duvarının Kaldırılması

C. Uterusun Çıkartılması, **D.** Plasentanın Uterus İçerisinde Gösterimi



Şekil 3.6. Fetusun Plasenta ile Gösterimi

Plasentalarından ayrılan fetusların ağırlıkları tartılıp, baş-kıç uzunluğu dijital kumpas ile ölçülerek kayıt altına alındı (Şekil 3.7). Fetuslar makroskopik olarak incelenip yüksek doz eter inhalasyonu ile öldürüldü.



Şekil 3.7. Fetusların Baş-Kıç Uzunluklarının Ölçülmesi

3.4. BOYAMA SÜRECİ

Fetusların iskelet sisteminin ikili iskelet boyama yöntemiyle boyanması için; tüm fetuslar %70 lik etil alkol içinde 4-7 gün bekletilerek içerdiği suyun çekilmesi sağlandı. Bu işlemi takiben saf asetonda 1-3 gün süreyle bekletilerek yağlarından arındırıldı. Sonrasında derileri soyulup, iç organları ve gözleri çıkarıldı (Şekil 3.8). Bütün bu işlemler sırasında bazı zarar gören fetuslar çalışmaya dahil edilmedi. Fetusların iskeletinin boyama işlemi aşağıda belirtilen protokol çerçevesinde gerçekleştirildi (Tablo 3.1).



Şekil 3.8. Derileri Soyulup Gözleri ve İç Organları Çıkarılan Fetuslar

Tablo 3.1. İkili İskelet Sistemi Boyama Yöntemi

<i>Teknik Aşamalar</i>	<i>Solüsyonlar</i>	<i>Süre</i>
Tespit	% 70'lik etil alkol	4-7 gün
Yağdan arındırma	saf aseton	1-3 gün
Boyama	<u>Boyanın hazırlanışı</u> 1. solüsyon: 300mg Alcian Blue + 100ml %70'lik etil alkol 2. solüsyon: 100mg Alizarin Red S + 100ml %95'lik etil alkol 3. solüsyon: 1. solüsyon + 2. Solüsyon + 100ml Glacial asetik asit 4. solüsyon: Hazırlanan ilk üç solüsyonun içerisine 1700 ml %70'lik etil alkol ilave edilerek hazırlanır.	7 gün süreyle 38-40 C° de etüvde bekletildi
Şeffaflandırma	1) %1'lik KOH 2) %1'lik KOH (80 ml)+%20'lik gliserin (20 ml) 3) %1'lik KOH (50 ml)+%50'lik gliserin (50 ml) 4) %1'lik KOH (20 ml)+%80'lik gliserin (80 ml)	1-3 gün 5-7 gün 5-7 gün 5-7 gün
Saklama	%100'lük gliserin	

Boya solüsyonunun hazırlanması: Boya solüsyonu ayrı ayrı hazırlanan solüsyonların belirli yöntemlerle birleştirilmesi ile elde edildi.

Bu solüsyonların hazırlanması:

1. solüsyon: 100 ml %70'lik etil alkol içerisinde 300 mg Alcian Blue'nun sürekli karıştırılarak eritilmesi ile elde edildi.

2. solüsyon: 100 ml %95'lik etil alkol içerisinde 100 mg Alizarin Red-S sürekli karıştırılarak eritilmesi ile hazırlandı.

3. solüsyon: Daha önce hazırlanmış olan birinci solüsyonun içine ikinci solüsyon azar azar katılarak elde edildi. Bu iki solüsyonun tamamen karıştırılması beklendi sonrasında karışıma 100 ml Glacial Asetik Asit eklendi.

4. solüsyon: Üçüncü solüsyon hazırlandıktan sonra karışıma 1700 ml %70'lik etil alkol ilave edildi.

Boyama süreci: Asetondan çıkarılan fetuslar, cam kaplar içerisinde bulunan boya solüsyonunun içerisine alındı. Solüsyonun bulunduğu cam kaplar hava almaması için saklama kapları ile sarıldı ve sıcaklığı 38-40⁰ C'ye ayarlanmış etüve alındı. Etüvde 7 gün süreyle bekletilerek dokuların boyanması sağlandı. 7. günün sonunda fetuslar, akan musluk suyu altında 2 saat süre ile yıkanarak su ile tepkimeye girmesi sağlandı. Sonrasında şeffaflaştırma aşamasına geçildi.

Şeffaflaştırma aşaması: Toplam 4 aşamadan oluşmaktadır.

1. aşama: Boyanmış olan fetuslar 1 gün süreyle %1'lik KOH içerisinde bekletildi.

2. aşama: 5 gün süreyle 80 ml %1'lik KOH ve 20 ml %20'lik gliserinden oluşan karışım içinde bekletildi.

3. aşama: 5 gün süreyle 50 ml %1'lik KOH ve 50 ml %50'lik gliserinden oluşan karışımda bekletildi.

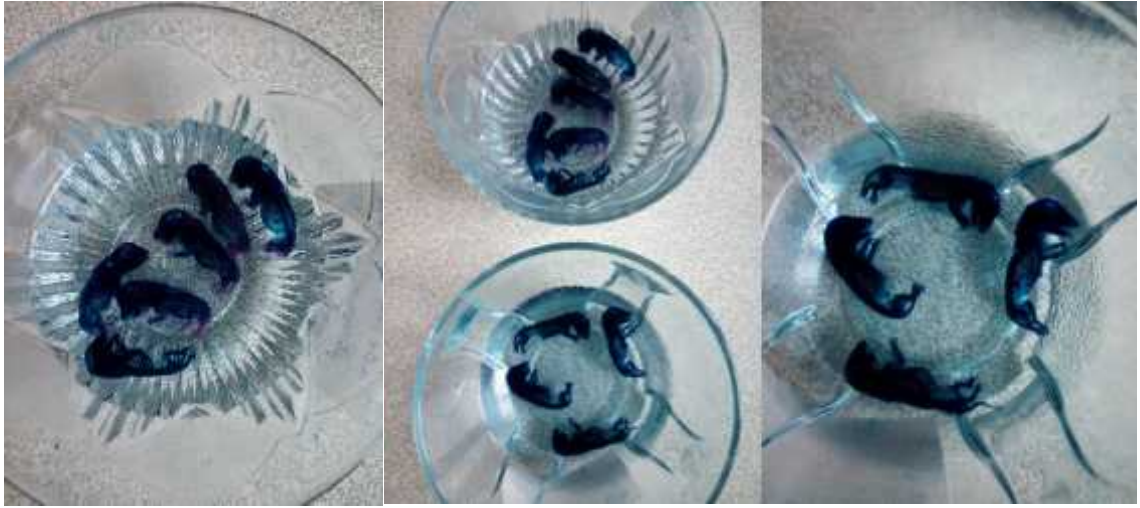
4.aşama: 20 cc %1'lik KOH ve 80 ml %80'lik gliserinden oluşan solüsyon içinde 5-7 gün süreyle bekletildi.

Şeffaflandırma işleminin tamamlanmasından sonra fetuslar %100'lük gliserin içerisine alınarak saklandı.

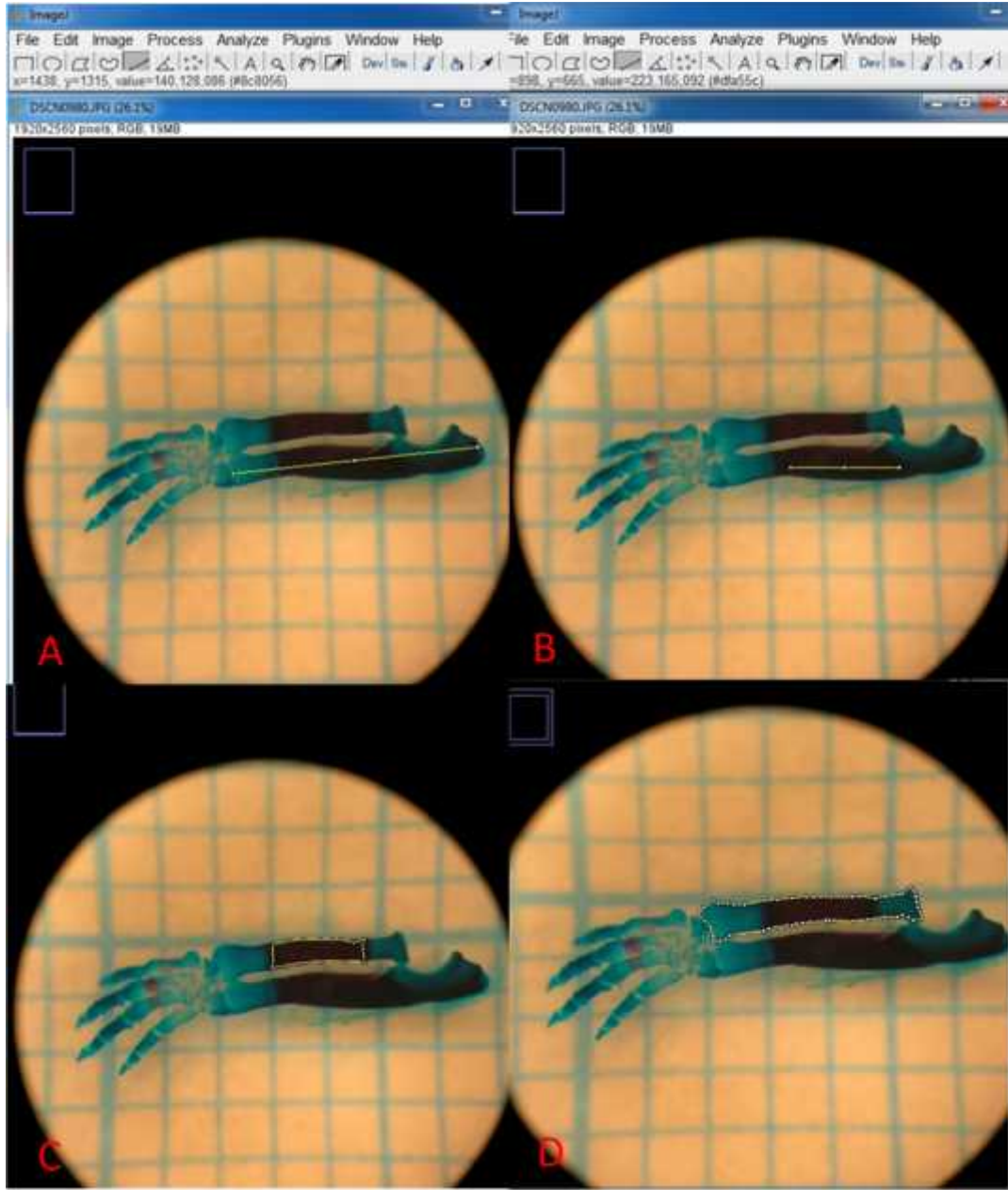
3.5. MORFOMETRİK ÖLÇÜMLER

Morfometrik ölçümler için fetus ekstremitelerinin Nikon E5700 fotoğraf makinası ile stereomikroskopta fotoğrafları çekildi. Fotoğraf çekme işlemi milimetrik kâğıt üzerinde gerçekleştirildi. Daha sonra elde edilen fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarıldı. Aktarılan fotoğraflarda incelenecek olan kemiğe ait uzunluk ve alan ölçümleri Image J

(<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>) programı kullanılarak ölçüldü. Öncelikle resimlerin orijinal görüntü ile eş olması için resimler üzerindeki milimetrik kağıttaki değerler baz alınıp Image J programının analyze-set scale bölümü kullanılarak uygun eşikleme (kalibrasyon) yapıldı (Şekil 3.9). Yapılan eşikleme sonucu Image J programının wand tool özelliği ile ölçüm yapılacak alan ve mesafe manuel olarak belirlendi ve sonuçlar mm değerinde elde edildi. Kemikleşme yüzey alanının tüm kemik yüzey alanına oranını bulmak için; $(\text{Kemikleşme Alanı} / \text{Tüm Kemik Alanı} \times 100)$ formülü kullanıldı (Şekil 3.10).



Şekil 3.9. Boyama Süreci Tamamlanan Fetusların Saf Gliserinde Saklanması



Şekil 3.10. Image J Programında Ölçümler

- A.** Kemik Total Boy Uzunluğu Ölçümü, **B.** Kemikleşme sergileyen Bölgenin Ölçümü
C. Total Yüzey Alanı Ölçümü, **D.** Kemikleşme Gösteren Bölgenin Yüze Alan Ölçümü

3.6. SPSS ANALİZİ

İkili iskelet boyaması protokolu uygulanan kemiklerin Image J programı ile tüm kemik uzunluğu, kemikleşme uzunluğu, tüm kemik yüzey alanı ve kemikleşme yüzey alanı ölçüldü. Elde edilen veriler Windows 64 bit işletim sistemi uyumlu IBM SPSS

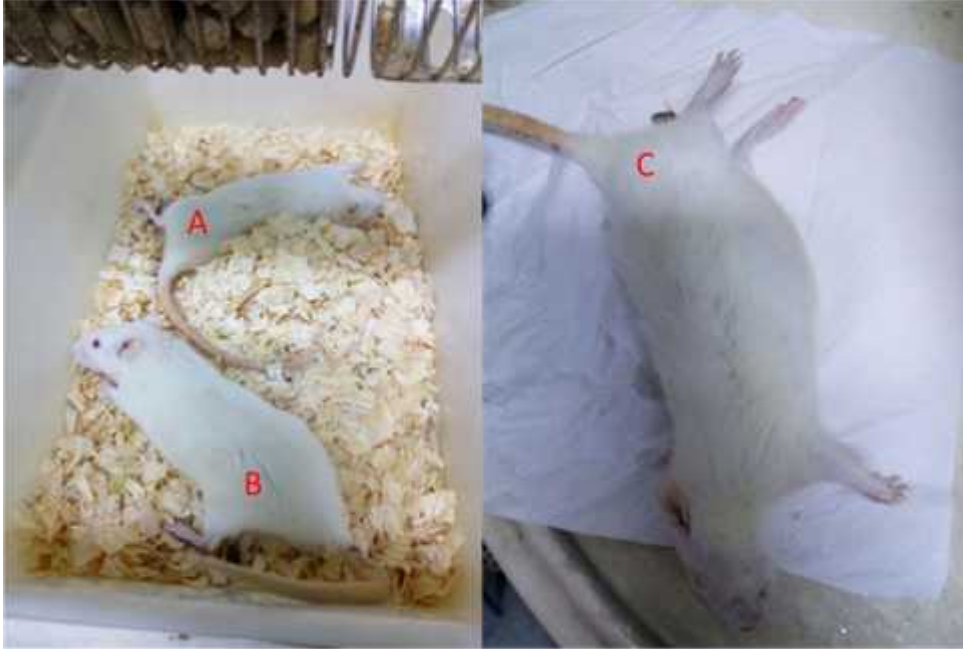
(Statistical Package for the Social Sciences) Statistics 22 programında analiz edildi. Verilerin yerleştirilmesinden sonra verilere One-Way ANOVA testi uygulandı. Normal dağılımın olduğu belirlendikten sonra 'Post Hoc Multiple Comparison' komutu ile yüzde 95 güven aralığında ($p < 0.05$) 'Tukey Testi' uygulandı. El ve ayak iskeletlerinde kemikleşme derecelerini analiz etmek için Pearson Ki-kare testi yapıldı. Analiz sonucuna göre p değeri $p < 0.05$ olan gruplar arasında anlamlı fark olduğu kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. MORFOLOJİK BULGULAR

Çalışmamızda 6 grup vardı. Bunlar kontrol, melatonin, düşük doz nikotin, yüksek doz nikotin, düşük doz nikotin+melatonin, yüksek doz nikotin+melatonin gruplarıdır.

Makroskobik olarak bakıldığında ilk bulgu nikotin verilen ratlarda şok etkisinin görülmesidir. Şoka giren ratlarda ilk önce 1 dakika kadar şiddetli konvülsiyon (iskelet kaslarında görülen kasılma ve gevşeme), gövdede hiperekstansiyon kasılmaları, ardından 2-3 dakika süren sedasyon durumu gözlemlendi. İlerleyen günlerde bu etkilerde azalma görüldü (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Nikotine Bağlı Şok Etkisi

A. Şiddetli Konvülsiyonlar, **B.** Sedasyon Durumu, **C.** Gebeliğin İlerleyen Döneminde Azalan Konvülsiyonlar

Tüm gruplarda boyama işlemine başlamadan önce fetusların boy uzunlukları ve ağırlıkları tespit edildi. Tüm gruplardan elde edilen boy (Baş-Kıç uzunlukları) verileri Tablo 4.1’de, ağırlık verileri ise Tablo 4.2’de gösterildi. Boy ölçümlerinde kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklar bulundu ($p<0.05$). Fetus baş-kıç uzunluklarının nikotin verilen gruplarda azaldığı, melatonin verilen gruplarda ise kontrol grubuna yaklaştığı belirlendi.

Tablo 4.1. Fetus gruplarına ait boy (baş-kıç uzunluğu) verileri.

FETUS RAT NO	BOY (mm)					
	Kontrol	Düşük Doz Nikotin	Düşük Doz Nikotin +Melatonin	Yüksek Doz Nikotin	Yüksek Doz Nikotin+ Melatonin	Melatonin
1	27.75	27.48	28.17	23.43	27.02	29.39
2	28.94	27.73	29.93	27.95	25.44	29.81
3	28.08	24.59	30.20	26.48	26.37	30.16
4	30.02	26.63	28.51	22.79	27.73	28.27
5	27.50	28.25	30.30	22.16	25.11	27.90
6	29.71	27.67	30.07	25.02	27.31	27.98
7	29.60	27.62	27.96	24.29	28.56	28.89
8	31.08	28.88	28.05	26.42	26.99	27.40
9	30.48	27.00	28.82	23.54	27.54	29.54
10	28.93	26.04	29.01	25.60	26.29	30.85
11	31.98	29.03	28.03	27.33	25.80	28.64
12	29.26	27.68	28.20	23.80	26.80	30.25
13	30.95	28.95	28.52	25.74	28.60	31.25
14	29.42	28.84	27.85	24.58	25.62	28.86
15	29.97	29.28	27.78	24.06	27.10	28.64
ORT±SS	29.57±1.25	27.71±1.28 ^{a,d}	28.76±0.91	24.87±1.6 ^{a,c,d,e}	26.81±1.05 ^{a,d}	29.18±1.12

ANOVA testi ($p<0.05$)

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b; Düşük Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c; Yüksek Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d; Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e; Düşük Doz Nikotin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Kontrol grubunda ortalama ağırlık 2.40 ± 0.13 gr olarak ölçülürken, nikotin verilen gruplarda ağırlıkların azaldığı ($p < 0.05$), melatonin verilen gruplarda ise sadece nikotin verilen gruplara göre ağırlığın arttığı ($p < 0.05$) kontrol grubuna yaklaştığı tespit edildi.

Tablo 4.2. Fetus gruplarına ait ağırlık (gr) verileri

FETUS RAT NO	Ağırlık (gr)					
	Kontrol	Düşük Doz Nikotin	Düşük Doz Nikotin +Melatonin	Yüksek Doz Nikotin	Yüksek Doz Nikotin+ Melatonin	Melatonin
1	2.14	2.15	2.60	2.00	2.28	2.16
2	2.33	2.12	2.19	2.12	2.28	2.28
3	2.34	1.94	2.67	2.16	1.89	2.50
4	2.43	2.35	2.15	1.53	2.09	2.47
5	2.29	2.26	2.37	1.90	2.31	2.56
6	2.67	2.14	2.38	1.96	2.29	2.30
7	2.52	2.35	2.46	2.03	2.32	2.55
8	2.30	2.08	2.31	1.83	1.99	2.52
9	2.35	2.16	2.25	1.96	2.14	2.30
10	2.53	2.21	2.16	2.03	2.23	2.44
11	2.37	2.25	2.15	2.01	2.20	2.48
12	2.44	2.52	2.18	2.09	2.12	2.56
13	2.58	2.09	2.21	2.17	2.13	2.48
14	2.37	2.26	2.14	2.12	2.32	2.35
15	2.44	2.26	2.29	1.99	2.03	2.42
ORT $\pm$ SS	2.40 ± 0.13	$2.20 \pm 0.13^{a,d}$	2.30 ± 0.16	$1.99 \pm 0.15^{a,c,d,e}$	$2.17 \pm 0.13^{a,d}$	2.42 ± 0.12

ANOVA testi ($p < 0.05$)

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b; Düşük Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c; Yüksek Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d; Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e; Düşük Doz Nikotin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Çalışmamızda tüm gruptaki fetusların ön ekstremitelerinde scapula, humerus, radius ve ulna kemiklerinde arka ekstremitelerinde ise femur, tibia ve fibulada kemiklerinde ölçümler yapıldı. Bu ölçümler; kemik total uzunluğu, kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu, kemik total alanı ve kemikleşme sergileyen bölgenin alan hesaplamalarıdır. El ve ayak iskeletlerinde ise kemiklerin kemikleşme derecelerine göre sayımlar yapıldı. Her fetusa ait sağ ve sol iki taraflı inceleme yapıldığı için toplamda her kemikten 30 adet incelemeye dahil edildi.

Ortalama 30-40 günlük bir boyama sürecinden sonra öncelikle fetusların stereomikroskop altında fotoğrafları alındı. İnceleyeceğimiz kemiklerin morfometrik ölçümlerinde fotoğraf çekimi esnasında milimetrik kağıt klavuz olarak kullanıldı. Morfometrik ölçümler sonucunda elde edilen veriler deney grupları, kendi tedavi grupları ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı.

Kontrol Grubuna Ait Scapulaların Morfolojik Bulguları: Bu grupta 15 fetusa ait 30 adet scapula incelendi. Scapulaların uzunlukları 3.82 ile 3.27 mm arasında değişmekte ve ortalama uzunluk 3.45 ± 0.12 mm olarak belirlendi. Scapula'lar incelendiğinde kemikleşmenin spina scapuladan başlayıp cavitas glenoidalis doğru ilerlediği ve bu alanların kırmızıya boyandığı görüldü. Acromion, margo dorsalis scapula ve cavitas glenoidalis kıkırdak yapıda olup mavi renk ile boyanmış durumdaydı. Scapulaların kemikleşme sergileyen bölgesinin uzunluğu ortalama 1.75 ± 0.09 mm ve scapulaların ortalama $\%39.30 \pm 1.77$ 'sinin kemikleşmiş olduğu tespit edildi (Şekil 4.2), (Tablo 4.3).

Düşük Doz Nikotin Grubuna Ait Scapulaların Morfolojik Bulguları: Bu grupta 15 fetusa ait 30 adet scapula incelendi. İncelenen scapulaların en uzununu 3.67 mm, en kısasının ise 3.01 mm olduğu, ortalama uzunluğun 3.36 ± 0.15 mm olduğu belirlendi. İncelenen scapulaların uzunlukları kontrol grubundan düşük olmasına rağmen aralarında anlamlı bir fark bulunmadı. İncelemeye alınan tüm scapulalarda kemikleşme görüldü. Kemikleşmenin spina scapuladan başlayıp scapula orta hattına ilerlediği tespit edildi. Cavitas glenoidalis, margo dorsalis scapula ve acromionda kemikleşme görülmedi. Ortalama kemikleşme uzunluğu 1.31 ± 0.22 mm iken kemiklerin $\%33.35 \pm 3.45$ 'inin kemikleştiği belirlendi. Bu gruptaki kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ve kemikleşme alanı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aradaki rakamsal farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0.05$), (Şekil 4.2), (Tablo 4.3).

Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Scapulaların Morfolojik Bulguları: Bu grupta scapulaların uzunluğu 3.19-4.24 mm arasında olup ortalama 3.56 ± 0.23 mm'dir. Scapula uzunlukları kontrol ve düşük doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmadı.

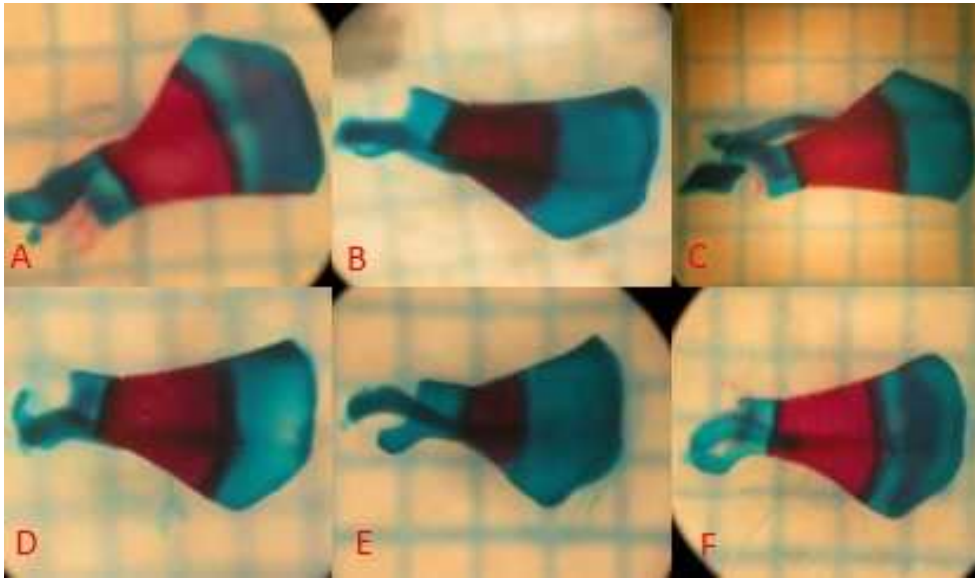
Bu grupta incelenen scapulaların hepsinde kemikleşme görüldü. Hem spina scapulada hemde scapula gövdesinde kemikleşme vardı. Kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğunun 1.71 ± 0.27 mm ve scapulaların $\%37.95 \pm 5.15$ 'inin kemikleştiği belirlendi. Kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ve yüzey alanı düşük doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Nikotine karşı verilen melatoninin kemikleşme oranını arttırdığı ve kontrol grubuna yaklaştırdığı, melatoninin koruyucu bir rol üstlendiği belirlendi (Şekil 4.2) (Tablo 4.3).

Yüksek Doz Nikotin Grubuna Ait Scapulaların Morfolojik Bulguları: Bu grupta stereomikroskop altında incelen görüntülerde total kemik uzunluğunun ortalama 3.09 ± 0.35 mm olduğu görüldü. Scapulaların total boy uzunluğu hem kontrol grubundan hemde düşük doz nikotin grubundan anlamlı olarak kısaydı ($p < 0.05$). Genel olarak kemikleşme spina scapulanın gövdeye tutunduğu yerde, gövdede ise ince bir şerit halindeydi. Kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ortalama 1.21 ± 0.36 mm olarak hesaplandı. 2 kemikte ise hiç kemikleşmenin olmadığı gözlemlendi. Kemiklerde yapılan alan hesaplamalarında $\%29.31 \pm 8.54$ 'ünün kemikleştiği tespit edildi. Kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ve kemikleşme alanının kontrol ve düşük doz nikotin gruplarından anlamlı derecede küçük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Nikotin fetus iskelet sisteminde oluşturduğu zararın ve kemik gelişimindeki gerilemenin doza bağlı olarak arttığı tespit edildi (Şekil 4.2), (Tablo 4.3).

Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Scapulaların Morfolojik Bulguları: Scapulalar makroskobik olarak incelendiğinde yüksek doz nikotin grubuna göre daha uzun ve kırmızı bölgenin daha yoğun olduğu gözlemlendi. Stereomikroskop altında yapılan ölçümlerde ortalama kemik uzunluğu ise 3.49 ± 0.18 mm olarak belirlendi. Kemik uzunluğu yüksek doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gösterdi ($p < 0.05$). Makroskobik olarak incelendiğinde kemikleşmeyi gösteren kırmızı boyama spina scapulanın angulus acromiye kadar olan parçasında, gövdede ise margo dorsalis scapula yakınlarına kadar bir alanı sınırlamaktaydı. Kemikleşme gösteren alanın uzunluğu ortalama 1.58 ± 0.09 mm olarak tespit edildi. Alan

hesabına bağılı olarak belirlenen kemikleşme yüzdesi ise $\%36.09 \pm 3.10$ olarak hesaplandı. Bu grupta kemikleşme görülme-yen scapula yoktu. Kemikleşme uzunluğu ve kemikleşme yüzdesi yüksek doz nikotin grubundan anlamlı derecede fazlaydı ($p < 0.05$) ve kontrol grubuna yaklaşı-maktaydı (Şekil 4.2), (Tablo 4.3).

Melatonin Grubuna Ait Scapulaların Morfolojik Bulguları: Çalışmamızda bu grupta incelenen scapulalar 3.17-3.84 mm arasında uzunluğa sahipti. Bu kemiklerin ortalama uzunluğu ise 3.50 ± 0.15 mm olarak hesaplandı. Kemikleşme sergileyen bölgelerin boyutları dikkate alındığında kırmızı bölgenin uzunluğu 1.53-1.98 mm arasında olup ortalama uzunluk 1.72 ± 0.09 mm olarak hesaplandı. Kemikleşme oranı ise $\%36.90 \pm 2.75$ olarak tespit edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak bir fark belirlenmedi. Tek başına melatonin verilmesinin kemik gelişmesinde herhangi bir toksititeye yol açmadığı görüldü (Şekil 4.2), (Tablo 4.3).



Şekil 4.2. Scapulalara ait görüntüler

A: Kontrol Grubu

B: Düşük Doz Nikotin Grubu

C: Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubu

D: Melatonin Grubu

E: Yüksek Doz Nikotin Grubu

F: Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubu

Tablo 4.3. Scapulaya ait istatistiksel veriler

SCAPULA KEMİĞİNE AİT VERİLER										
	N	Kemik Boyu			Kemikleşme Uzunluğu			Kemikleşme Yüzde Oranı		
		Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama
Kontrol	30	3.27	3.82	3.54±0.12	1.55	1.98	1.75±0.09	34.39	42.35	39.30±1.77
DDN	30	3.01	3.67	3.36±0.15	0.71	1.79	1.31±0.22 ^{a,b,d}	23.15	42.00	33.35±3.47 ^{a,b,d}
DDN+ MEL	30	3.19	4.24	3,56±0.23	1.23	2.40	1.71±0.27	28.62	51.35	37.95±5.14
YDN	30	1.44	3.57	3.09±0.35 ^{a,c,d,e}	0	1.57	1.21±0.36 ^{a,c,d,e}	0	37.35	29.31±8.54 ^{a,c,d,e}
YDN+ MEL	30	3.14	3.96	3.49±0.17	1.33	1.95	1.58±0.09	29.59	44.55	36.09±3.10
MEL	30	3.17	3.84	3.50±0.15	1.53	1.98	1.72±0.09	33.39	44.97	36.90±2.75

ANOVA testi uygulandı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

(**DDN**; düşük doz nikotin, **YDN**; yüksek doz nikotin, **MEL**; melatonin)

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b; Düşük Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c; Yüksek Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d; Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e; Düşük Doz Nikotin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Kontrol Grubuna Ait Humerusların Morfolojik Bulgular: Deneyimizde kontrol grubuna ait humeruslar incelendiğinde kemik uzunlukları 4.11 ile 4.32 mm arasında ve ortalama kemik uzunluğu 4.19 ± 0.04 mm olarak bulundu.

Kemiğin gövdesinden başlayan kemikleşme merkezinin proksimal ve distal uçlara doğru yayıldığı ve proksimalde tuberositas deltoidea'yı içine alacak şekilde genişlediği görüldü. Kemikleşmenin gerçekleştiği bu kısımlar kırmızı renkte iken, proksimalde caput ve collum humeri, distalde ise trochlea humeri kıkırdak yapıda ve mavi renk ile boyanmış durumdaydı. Humeruslarda kemikleşme gösteren bölgenin ortalama uzunluğu 1.93 ± 0.20 mm olarak hesaplanırken kemikleşme oranının $\%43.71 \pm 2.33$ olduğu belirlendi (Şekil 4.3), (Tablo 4.4).

Düşük Doz Nikotin Grubuna Ait Humerusların Morfolojik Bulguları: Bu grupta incelenen humeruslar ortalama 4.11 ± 0.08 mm uzunluğuna sahipti. Total kemik uzunluğu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında elde edilen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Kemikleşme gövdede tuberositas deltoidea'ya kadar devam etmekteydi. Kemikleşme gösteren bölgenin ortalama uzunluğunun 1.68 ± 0.18 mm ve kemiğin $\%38.79 \pm 5.74$ 'ünün kemikleştiği tespit edildi. Kemikleşme gösteren bölgenin uzunlukları ve kemikleşme oranları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha azdı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Düşük dozda verilen nikotinin kemik total uzunluğunu değiştirmese de kemikleşmeyi azalttığı görüldü (Şekil 4.3), (Tablo 4.4).

Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Humerusların Morfolojik Bulguları: Bu grupta incelenen humerusların ortalama total kemik uzunlukları 4.17 ± 0.19 mm ölçüldü. Kemik uzunlukları kontrol grubu ve düşük doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi (Şekil 4.3), (Tablo 4.4).

Kemik gövdesinden başlayan kemikleşmenin tuberositas deltoideayı içerisine aldığı proksimal ve distal yönde ilerlediği görüldü. Kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu 1.94 ± 0.20 mm ve kemikleşme oranı $\%42.93 \pm 3.98$ olarak hesaplandı. Kemikleşme gösteren bölgenin uzunluklarındaki ve kemikleşme oranlarındaki artışın düşük doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olduğu ($p < 0.05$) ve değerlerin kontrol grubuna yaklaştığı tespit edildi. Düşük doz nikotine karşı verilen melatonin fetus humerusundaki kemikleşme geriliğini ortadan kaldırdığı belirlendi (Şekil 4.3), (Tablo 4.4).

Yüksek Doz Nikotin Grubuna Ait Humerusların Morfolojik Bulguları: Makroskopik olarak bakıldığında incelenen humerusların diğer gruplardakine oranla daha küçük olduğu, kemikleşme gösteren bölgenin daha kısa olduğu görüldü. Bu gruba ait humerusların ortalama kemik uzunluğu 3.87 ± 0.14 mm ölçüldü. Humerusların boy uzunlukları hem kontrol hem de düşük doz nikotin grubundan istatistiksel olarak anlamlı derecede kısa bulundu ($p < 0.05$).

Kemikleşme alanları incelendiğinde 2 kemikte tam kemikleşmenin olmadığı görüldü. Corpus humeri ortasından başlayan kemikleşme sınırlı ve küçük bir alanı kaplamaktaydı. Tuberositas deltoidea'nın mavi renkte ve kıkırdak yapıda olduğu görüldü. Humeruslarda

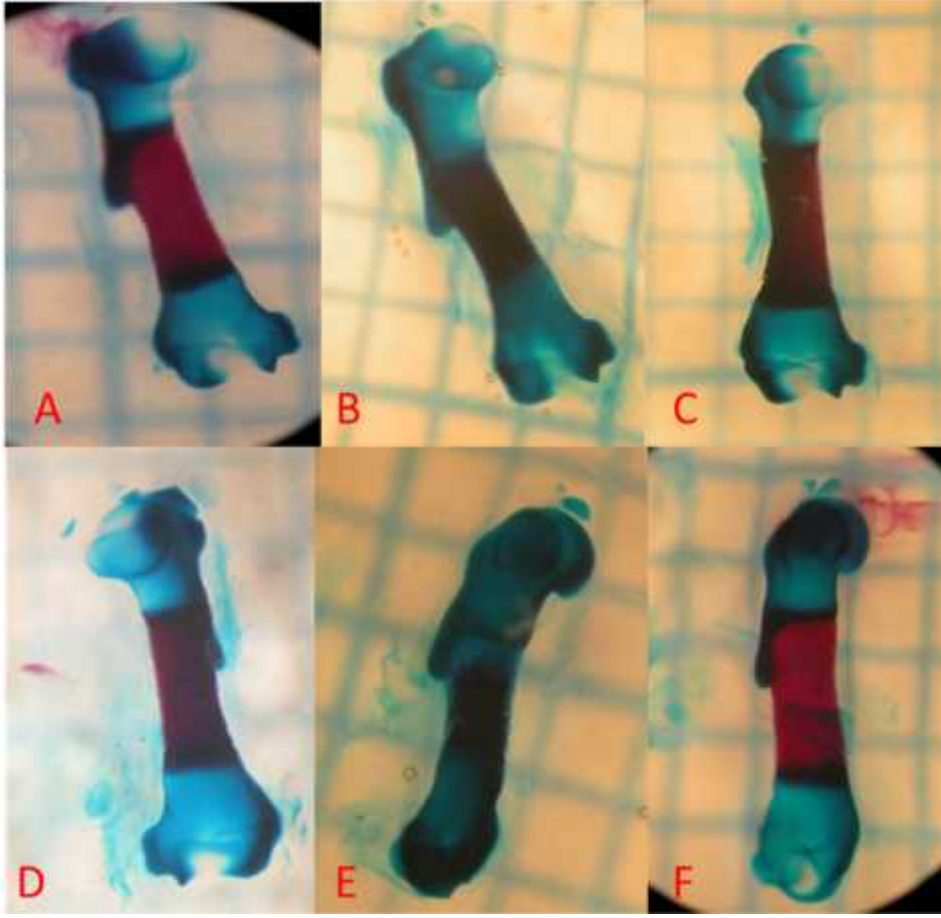
kemikleşme sergileyen bölgenin uzunlukları ortalama 1.28 ± 0.38 mm, yüzey alanının ise $\%31.42 \pm 10.33$ 'ünün kemikleştiği hesaplandı. Kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğu ve kemikleşme yüzdesinin hem kontrol grubundan hem de düşük doz nikotin grubundan anlamlı derecede düşük olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Elde etmiş olduğumuz verilerden fetus humerusunda nikotinin kemik gelişimindeki geriletici etkisinin doza bağlı olduğu tespit edildi (Şekil 4.3), (Tablo 4.4).

Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Humerusların Morfolojik Bulguları:

Çalışmamıza bu grupta dahil edilen humeruslar çıplak gözle incelendiğinde yüksek doz nikotin grubuna göre boyunun daha uzun olduğu, kırmızı rengin daha belirgin ve daha geniş bir alanda boyandığı farkedildi. Stereomikroskop görüntüsü altında kemik uzunluğu ortalama 4.14 ± 0.09 mm olarak belirlendi. Kemik boyları değerlendirildiğinde yüksek doz nikotin grubundaki humeruslara göre daha uzundu ve bu rakamsal fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi.

Humerusların kemikleşme gösteren bölgelerinin ortalama uzunluğunun 1.58 ± 0.09 mm olduğu tespit edildi. Yapılan alan ölçümlerinde ise kemikleşme sergileyen bölgelerin total kemiğe oranının ortalama $\%38.52 \pm 8.65$ olduğu hesaplandı. Yüksek doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında daha fazla alan kemikleşmişti ve bu rakamsal fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Yüksek doz nikotine karşı verilen melatoninin, humerus kemiğinde kemikleşmeyi pozitif yönde etkilediği tespit edildi (Şekil 4.3), (Tablo 4.4).

Melatonin Grubuna Ait Humerusların Morfolojik Bulguları: Bu gruptaki humerusların makroskopik incelenmesinde herhangi bir anomali veya humeruslarda anormal kemik gelişimleri görülmedi. Stereomikroskop incelemesinde kemik boylarının $3.99-4.45$ mm arasında ve ortalama total kemik boyunun ise 4.20 ± 0.11 mm olduğu ölçüldü. Corpus humeriden başlayan kemikleşme proksimalde tuberositas deltoideayı içine alacak şekilde yukarıya, distal uçta ise suprakondiler bölgeye kadar uzanmaktaydı. Kemiğin $\%42.94 \pm 2.35$ 'nin kırmızıya boyandığı ve kemikleşme sergilediği belirlendi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hiçbir parametrede istatistiksel bir fark bulunmadı (Şekil 4.3), (Tablo 4.4).



Şekil 4.3. Humeruslara ait görüntüler

A: Kontrol Grubu **B:**Düşük Doz Nikotin Grubu **C:**Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubu
D: Melatonin Grubu **E:** Yüksek Doz Nikotin Grubu **F:** Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubu

Tablo 4.4. Humerus kemiğine ait istatistiksel veriler

HUMERUS KEMİĞİNE AİT VERİLER										
	N	Kemik Boyu			Kemikleşme Uzunluğu			Kemikleşme Yüzey Alanı		
		Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama
Kontrol	30	4.32	4.11	4.19±0.04	0.97	2.13	1.93±0.20	40.25	48.56	43.71±2.33
DDN	30	3.93	4.33	4.11±0.08	0.92	1.92	1.68±0.18 ^{a,b,d}	20.11	49.03	38.79±5.74 ^{a,b,d}
DDN+ MEL	30	3.71	4.66	4.17±0.19	1.71	2.60	1.94±0.19	35.34	51.05	42.93±3.98
YDN	30	3.38	4.32	3.87±0.14 ^{a,c,d,e}	0	1.71	1.28±0.37 ^{a,c,d,e}	0	47.47	31.42±10.33 ^{a,c,d,e}
YDN+ MEL	30	3.90	4.36	4.14±0.09	1.63	2.04	1.81±0.09	36.26	48.61	40.83±3.06
MEL	30	3.99	4.45	4.20±0.11	1.62	2.14	1.89±0.11	32.68	47.71	42.94±2.35

ANOVA testi uygulandı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

(**DDN**; düşük doz nikotin, **YDN**; yüksek doz nikotin, **MEL**; melatonin)

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b; Düşük Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c; Yüksek Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d; Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e; Düşük Doz Nikotin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Kontrol Grubuna Ait Ulnaların Morfolojik Bulguları: Bu grupta 15 fetusa ait 30 kemik üzerinde inceleme yapıldı. Yapılan incelemeler sonucu ulnaların en büyüğü 4.36 mm, en küçüğü ise 3.95 mm olarak ölçüldü. Bu gruptaki ulnaların ortalama total uzunluğu 4.12 ± 0.08 mm olarak hesaplandı.

Bu gruptaki ulnaların gövdesinin büyük oranda kemikleştiği görüldü. Extramitas proximaliste tuberositas ulna'nın kemikleştiği görülürken, olecranon, processus coronodeus ve incisura torchlearis'in kemikleşmediği tespit edildi. Extramitas distalis ise kıkırdak yapısını korumaktaydı. Kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu 1.94 ± 0.13 mm olarak ölçüldü. Alan ölçümleri sonucu ulnaların $\%46.08 \pm 2.82$ 'sinin kemikleştiği hesaplandı (Şekil 4.4), (Tablo 4.5).

Düşük Doz Nikotin Grubuna Ait Ulnaların Morfolojik Bulguları: Yapılan incelemelerde ulnaların ortalama 4.06 ± 0.15 mm total kemik uzunluğuna sahip olduğu hesaplandı. Ulnaların boyları 3.81-4.46 mm arasında değişmekteydi. Total kemik uzunlukları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (Şekil 4.4), (Tablo 4.5).

Ulnalarda kemikleşme sergileyen bölgelerin uzunlukları ortalama 1.62 ± 0.21 mm ve alan ölçümlerinde kemikleşme yüzdesi $\%35.77 \pm 4.72$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğunun anlamlı olarak daha kısa ($p < 0.05$) ve yüzey alanının daha az kemikleştiği görüldü ($p < 0.05$). Düşük dozda verilen nikotinin ulna kemiğinde total kemik uzunluğunu azaltmadığı ama kemikleşmeyi azalttığı tespit edildi (Şekil 4.4), (Tablo 4.5).

Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Ulnaların Morfolojik Bulguları:

İncelenen ulnalarda kemikleşmenin corpus ulnadan başlayıp proksimal ve distal yönde ilerlediği görüldü. Kemiklerin total boy uzunluğunun üst sınırı 4.68 mm, alt sınırı ise 3.57 mm ölçüldü. Ortalama total kemik boy uzunluğu 4.12 ± 0.28 mm olarak hesaplandı. Bu gruptaki veriler kontrol ve düşük doz nikotin grupları ile karşılaştırıldığında her iki grup ile de total kemik boylarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Ulnaların kemikleşme sergileyen bölgelerinin ortalama uzunluğu 1.89 ± 0.18 mm olarak hesaplandı. Alan ölçümleri sonucu ulnalarda kemikleşme oranı $\%42.86 \pm 8.33$ olarak ölçüldü. Kemikleşme uzunlukları ve kemikleşme alanları, düşük doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında aradaki pozitif fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark belirlenmedi. Düşük doz nikotine karşı verilen melatoninin ulna kemiğinde kemikleşmeyi artırdığı ve kontrol grubuna yaklaştırdığı tespit edildi (Şekil 4.4), (Tablo 4.5).

Yüksek Doz Nikotin Grubuna Ait Ulnaların Morfolojik Ölçümleri: Ulnalar makroskopik olarak incelendiğinde diğer gruplardan kemik boylarının daha kısa olduğu gözlemlendi. Kemikleşme alanının daha mat bir kırmızıyla boyandığı ve sadece corpus ulna'da kemikleşme olduğu görüldü. 2 kemiğin ise gövdelerinin tam kemikleşmediği tespit edildi.

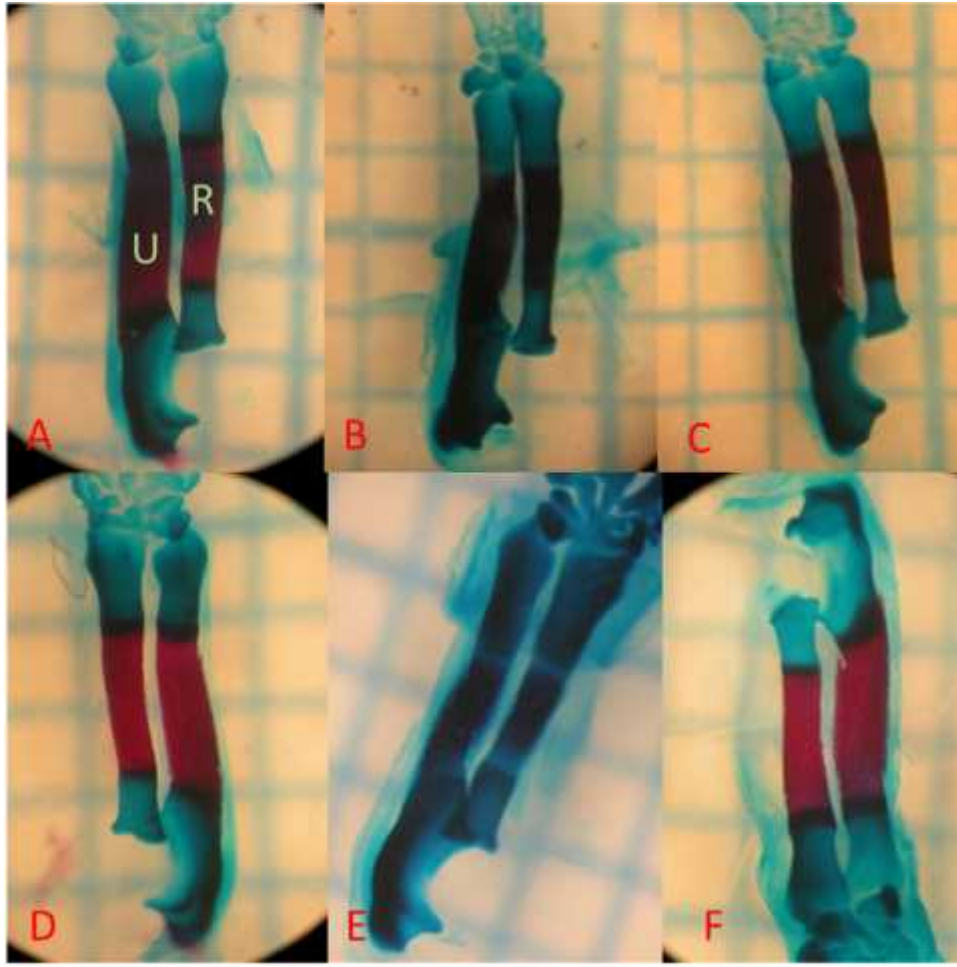
Stereomikroskop altında yapılan incelemelerde ulnaların total kemik boyunun ortalama 3.74 ± 0.2 mm olduğu belirlendi. Bu grupta incelenen ulnaların kemikleşme sergileyen bölgelerinin ortalama uzunluğu 1.23 ± 0.4 mm ve alan ölçümlerinde kemikleşme oranı $\%30.32 \pm 11.14$ olarak hesaplandı. Kırmızı alanların sadece corpus ulna'nın merkezinde olduğu görüldü. İstatistiksel değerlendirmede tüm verilerin kontrol grubu ve düşük doz nikotin grubundan anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Nikotinin

dozu arttırıldıkça ulna kemiğinde kemikleşmenin azaldığı tespit edildi (Şekil 4.4), (Tablo 4.5).

Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Ulnaların Morfolojik Ölçümleri: Bu grupta ulnaların stereomikroskop altında yapılan değerlendirilmesinde ortalama total kemik uzunluğu 4.07 ± 0.14 mm ölçüldü. Total kemik uzunlukları yüksek doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha uzundu ($p < 0.05$), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise aralarında anlamlı bir fark yoktu.

Bu gruptaki ulnalarda kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu 1.83 ± 0.14 mm ve kemikleşme oranı $\%42.14 \pm 4.82$ olarak hesaplandı. Bu gruptaki ulnaların kemikleşme uzunluğu ve yüzey alan kemikleşmesi oranı yüksek doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde bir fark belirlendi. Kontrol grubundan ortalama kemikleşme uzunluğu daha kısa olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Yüksek doz nikotine karşı melatonin tedavisi ulna kemiğinde kemikleşmeyi kontrol grubu verilerine yaklaştırdığı tespit edildi (Şekil 4.4), (Tablo 4.5).

Melatonin Grubuna Ait Ulnaların Morfolojik Ölçümleri: Annelerine sadece melatonin verilen fetusların olduğu bu grupta ulnaların total uzunluğu en küçük 3.73 mm, en büyük ise 4.68 mm, ortalama uzunluk ise 4.03 ± 0.22 mm olarak ölçüldü. Makroskopik incelemede corpus ulna kemikleşmiş, olecranon, processus coronoideus, incisura trochlearis ve extramitas distalis'in kıkırdak yapıda olduğu görüldü. Kemikleşmenin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında benzerlik gösterdiği belirlendi. Kemikleşme gösteren bölgenin ortalama uzunluğu 1.89 ± 0.15 mm, alan hesaplamaları sonucu kemikleşme yüzdesi $\%47.60 \pm 4.83$ olarak hesaplandı. Yapılan istatistiksel değerlendirmelerde hiçbir parametrede kontrol grubu ile aralarında anlamlı bir fark bulunmadı. Melatonin tedavisinin ulnalarda bir yan etki oluşturmadığı tespit edildi (Şekil 4.4), (Tablo 4.5).



Şekil 4.4. Radius ve ulnalara ait görüntüler

A. Kontrol Grubu

B. Düşük Doz Nikotin Grubu

C. Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubu

D. Melatonin Grubu

E. Yüksek Doz Nikotin Grubu

F. Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubu

(U: Ulna, R: Radius)

Tablo 4.5. Ulna kemiğine ait istatistiksel veriler

ULNA KEMİĞİNE AİT VERİLER										
	N	Kemik Boyu			Kemikleşme Uzunluğu			Kemikleşme Yüzey Alanı		
		Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama
Kontrol	30	3.95	4.36	4.12±0.08	1.74	2.20	1.94±0.13	41.28	52.31	46.08±2.82
DDN	30	3.81	4.46	4.06±0.15	0.89	1.93	1.62±0.21 ^{a,b,d}	25.00	46.19	35.77±4.72 ^{a,b,d}
DDN+MEL	30	3.57	4.68	4.12±0.28	1.50	2.19	1.89±0.17	29.32	68.29	42.86±8.33
YDN	30	3.33	4.03	3.74±0.19 ^{a,c,d,e}	0	1.71	1.23±0.40 ^{a,c,d,e}	0	46.79	30.32±11.14 ^{a,c,d,e}
YDN+MEL	30	3.72	4.32	4.07±0.14	1.45	2.03	1.83±0.13	33.77	54.89	42.14±4.82
MEL	30	3.73	4.39	4.09±0.15	1.57	2.17	1.89±0.15	38.67	56.50	47.60±4.83

ANOVA testi uygulandı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

(**DDN**; düşük doz nikotin, **YDN**; yüksek doz nikotin, **MEL**; melatonin)

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b; Düşük Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c; Yüksek Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d; Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e; Düşük Doz Nikotin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Kontrol Grubuna Ait Radiusların Morfolojik Ölçümleri: Bu grupta 15 fetusa ait 30 radius ile çalışıldı. Makroskopik olarak bakıldığında kemikleşmenin corpus radii'nin merkezinden başladığı, proksimal ve distal yönde uzandığı görüldü. Proksimalde tuberositas radii hizasında kemikleşme olduğu, bu seviyenin üzerinde caput radii'nin kıkırdak yapıda ve mavi renkte boyalı olduğu görüldü. Extramitas distalis seviyesindeki yapıların tamamen kıkırdak yapıda ve mavi boyandığı tespit edildi. Radiusların ortalama total boy uzunluğu 3.24 ± 0.1 mm ve kemikleşme sergileyen alanının ortalama uzunluğu ise 1.58 ± 0.13 mm olarak hesaplandı. Radiuslarda yapılan alan hesaplamaları sonucu kemikleşme sergileyen bölgelerin tüm kemiğe oranı $\%40.80 \pm 3.73$ olarak belirlendi (Şekil 4.4), (Tablo 4.6).

Düşük Doz Nikotin Grubuna Ait Radiusların Morfolojik Ölçümleri: Radiusların makroskopik incelemesinde kontrol grubuna göre, mavi renkli alanın kırmızı renkten

daha baskın olduğu görüldü. Stereolomikroskoptaki ölçümlerde ise radiusların ortalama total kemik uzunluğu 3.18 ± 0.11 mm olarak belirlendi. Ortalama boy uzunluğu kontrol grubundan daha kısa olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi. Bu grupta radiuslarda kemikleşme sergileyen bölgelerin ortalama uzunluğu 1.24 ± 0.14 mm olarak ve kemikleşme oranının ise $\%35.54 \pm 5.68$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşük doz nikotin grubunda kemikleşen bölge uzunluğu ve oranının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi ($p < 0.05$), (Şekil 4.4), (Tablo 4.6).

Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Radiusların Morfolojik Ölçümleri: Bu gruptaki radiusların makroskopik incelemesinde kemik boylarında farkedilebilir bir değişiklik olmadığı, kemikleşme uzunluğuna bakıldığında kırmızı boyalı alanın düşük doz nikotin grubuna göre daha distal seviyelere indiği görüldü. Radiusların ortalama total uzunluğu 3.20 ± 0.22 mm olarak belirlendi. Kontrol ve düşük doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında kemik total boy uzunluğu bakımından anlamlı bir fark belirlenmedi ($p < 0.05$).

Kemikleşme sergileyen alanların ortalama uzunluğu 1.47 ± 0.18 mm ve bu alanın tüm kemiğe oranı ortalama $\%39.58 \pm 5.95$ olarak hesaplandı. Kemikleşme uzunluğu ve oranı bu grupta düşük doz nikotin grubundan daha fazlaydı ve bu pozitif fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$). Düşük doz nikotine karşı melatonin uygulamasının kemikleşmedeki gerilemeyi azalttığı tespit edildi (Şekil 4.4), (Tablo 4.6).

Yüksek Doz Nikotin Grubuna Ait Radiusların Morfolojik Bulguları: Bu grupta radiusların total uzunluğunun $2.36-3.53$ mm arasında değiştiği ve ortalama uzunluğun 2.93 ± 0.23 mm olduğu belirlendi. Bu kemik uzunluğu tüm gruplar arasında en düşük olandı. Total kemik uzunluğu düşük doz nikotin grubundan ve kontrol grubundan kısa ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$).

Ortalama kemikleşen alan uzunluğu 1.05 ± 0.36 mm ve radiuslarda kemikleşme oranı $\%31.36 \pm 9.98$ olarak belirlendi. Bu grupta iki kemikte kemikleşme görülmedi. Bu grupta elde edilen kemikleşme gösteren bölgenin alan uzunluğu ve kemikleşme oranı verilerinin kontrol ve düşük doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Uygulanan nikotin dozu arttırıldıkça radiustaki kemikleşmenin azaldığı tespit edildi (Şekil 4.4), (Tablo 4.6).

Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Radiusların Morfolojik Bulguları: Bu grupta radiusların ortalama uzunluğu 3.16 ± 0.16 mm olarak ölçüldü. İstatistiksel analizlere göre kemik uzunluğu bakımından bu grupta elde edilen verilerin yüksek doz nikotin grubundan anlamlı derecede fazla olduğu ($p < 0.05$), kontrol grubu ile aralarında bir farkın olmadığı belirlendi. Radiuslarda kemikleşme gösteren bölgenin ortalama uzunluğu 1.37 ± 0.09 mm olarak hesaplandı. Alan hesaplamaları sonucunda ise kemikleşme yüzdesi $\%40.02 \pm 4.73$ olarak belirlendi (Şekil 4.4), (Tablo 4.6).

Kemikleşme yüzdesinin yüksek doz nikotin grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede daha fazla olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Bu değer kontrol grubuna yaklaşmasına rağmen kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha azdı ($p < 0.05$), (Şekil 4.4), (Tablo 4.6) .

Melatonin Grubuna Ait Radiusların Morfolojik Bulguları:

Bu gruptaki radiuslarda corpus radii kemikleşmiş, tuberositas radii seviyesi üstü ve extramitas distalis kıkırdak yapıdaydı. Bu yönü ile kontrol grubuna benzerlik göstermekteydi. Stereomikroskop altında yapılan ölçümlerde radiusların ortalama total kemik uzunluğu 3.31 ± 0.14 mm, ortalama kemikleşme uzunluğu 1.50 ± 0.13 mm ve kemikleşme yüzdesi $\%39.44 \pm 4.54$ olarak hesaplandı. Kontrol grubu ile istatistiksel karşılaştırılmasında aralarında anlamlı bir fark belirlenmedi ($p < 0.05$), (Şekil 4.4), (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Radiusa ait istatistiksel veriler

RADIUS KEMİĞİNE AİT VERİLER										
	N	Kemik Boyu			Kemikleşme Uzunluğu			Kemikleşme Yüzey Alanı		
		Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama
Kontrol	30	3.02	3.38	3.24±0.10	1.34	1.84	1.54±0.12	32.94	50.00	40.80±3.73
DDN	30	2.90	3.37	3.18±0.10	0.73	1.59	1.24±0.14 ^{a,b,d}	14.38	45.25	35.54±5.68 ^{a,b,d}
DDN+MEL	30	2.87	3.76	3.20±0.21	1.08	1.97	1.47±0.18	29.87	54.86	39.58±5.95
YDN	30	2.36	3.53	2.93±0.25 ^{a,c,d,e}	0	1.69	1.05±0.35 ^{a,c,d,e}	0	42.72	31.36±9.98 ^{c,d,e}
YDN+MEL	30	2.76	3.41	3.16±0.16	1.14	1.62	1.37±0.09 ^{a,d}	30.20	49.68	40.02±4.73
MEL	30	2.94	3.48	3.21±0.15	1.17	1.74	1.50±0.13	31.78	47.71	39.44±4.54

ANOVA testi uygulandı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

(**DDN**; düşük doz nikotin, **YDN**; yüksek doz nikotin, **MEL**; melatonin)

a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

b; Düşük Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c; Yüksek Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d; Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e; Düşük Doz Nikotin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

El İskeleti Kemik Gelişimi

El iskeletinde tüm gruplarda karpal kemiklerde ve falankslarda kemikleşme görülmedi. Metakarpal kemiklerde ise değişik derecelerde kemikleşme tespit edildi. Bu yüzden el kemiklerinde sadece metakarpal kemiklerde gruplar arası istatistiksel karşılaştırma yapıldı. Metakarpal kemikler tam, kısmi ve hiç kemikleşme göstermeyenler şeklinde sınıflandırıldı.

Kontrol Grubu: Kontrol grubunu incelediğimizde 3. ve 4. metakarpal kemiklerde tam kemikleşme görürken, 2. metakarpal kemikte ise bazen tam bazen kısmi kemikleşme olduğu tespit edildi. 1. ve 5. metakarpal kemiklerde ise henüz kemikleşmenin başlamadığı tespit edildi. Bu grupta toplam 150 metakarpal kemikte yapılan incelemede; 76 kemikte tam, 14 kemikte kısmi kemikleşme görüldü. 60 metakarpal kemik ise tamamen kıkırdak yapıdaydı (Şekil 4.5), (Tablo 4.7).

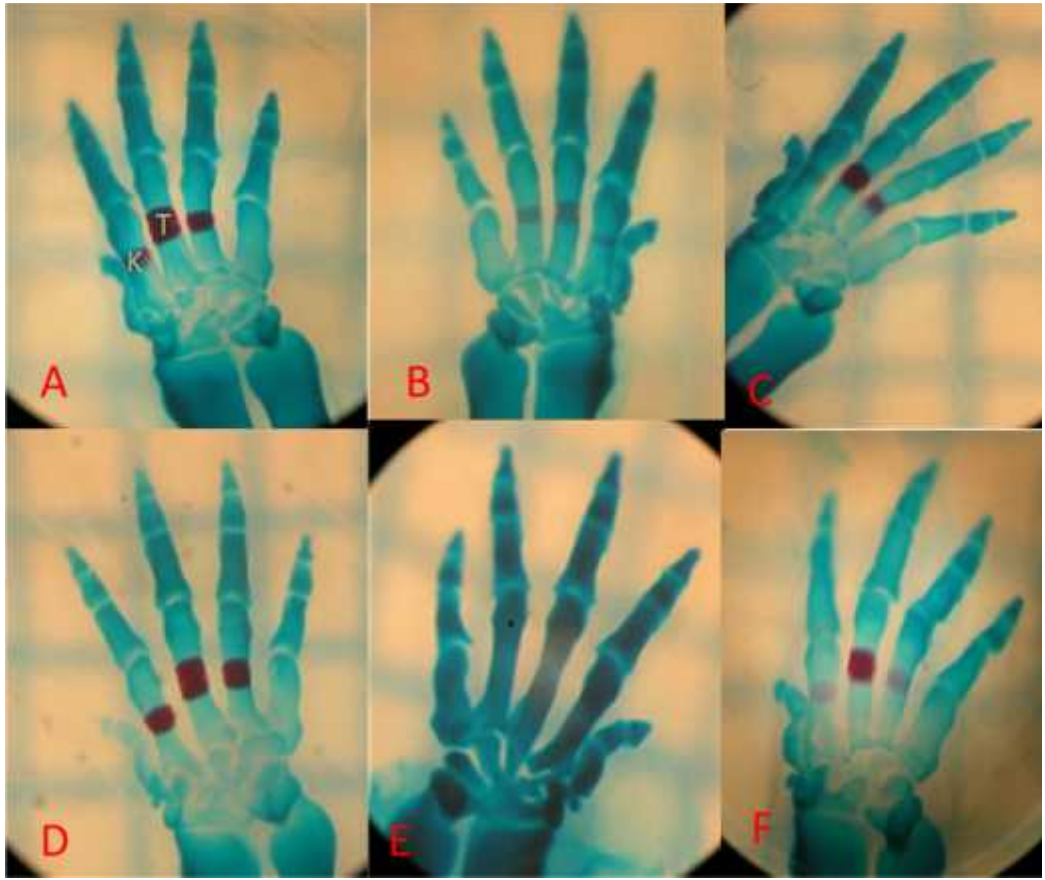
Düşük Doz Nikotin Grubu: Bu grupta incelediğimiz el iskeletlerinde 1. ve 5. metakarpaller tamamen kıkırdak yapıdaydı. Genellikle 2. ve 4. metakarpaller kısmi kemikleşme sergilerken, 3. metakarpallerin tam kemikleştiği görüldü. 30 metakarpalde tam kemikleşme, 54 metakarpalde kısmi kemikleşme görülürken ve 66 metakarpalde hiç kemikleşme belirlenmedi. Bu grup tam kemikleşme yönünden kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tam kemikleşen kemik sayısında anlamlı derecede azalmanın olduğu ($p<0.05$) ve kemikleşme derecesinin kısmi kemikleşme yönünde değişim sergilediği tespit edildi (Şekil 4.5), (Tablo 4.7).

Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubu: Düşük doz nikotin grubunun tedavi grubu olan bu grupta 1. ve 5. metakarpaller kıkırdak, 3. ve 4. metakarpaller tam kemikleşmiş, 2. metakarpaller ise kısmi kemikleşmiş durumdaydı. Bu grupta 66 metakarpal kemikte tam kemikleşme, 24 metakarpalde kısmi kemikleşme görülürken, 60 kemikte hiç kemikleşme görülmedi. Tam kemikleşmenin düşük doz nikotin grubuna göre anlamlı derecede arttığı tespit edildi ($p<0.05$). Bu gruptaki veriler kontrol grubu ile benzerlik göstermekteydi (Şekil 4.5), (Tablo 4.7).

Yüksek Doz Nikotin Grubu: Bu grupta incelediğimiz metakarpallerde kemikleşme son derece düşüktü. Hiç bir kemikte tam kemikleşme görülmemişken 18 metakarpalde kısmi kemikleşme belirlendi. Bu grup kemikleşme derecesi yönünden kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kemikleşme derecesinin tam kemikleşmeden kemikleşmeme yönünde değişim gösterdiği ve bu sayısal farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$), (Şekil 4.5), (Tablo 4.7). Bu grupta bradidaktililer tespit edildi.

Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubu: Yüksek doz nikotin grubunun tedavi grubu olan bu grupta kemikleşen ve kısmi kemikleşen kemik sayısında artış gözlemlendi. Bu grupta 3. ve 4. metakarpallerde tam kemikleşme görülürken, 2. metakarpallerde kısmi kemikleşme tespit edildi. 1. ve 5. metakarpaller ise kıkırdak yapıdaydı. İncelenen kemiklerde 58 metakarpal tam, 32 metakarpal kısmi kemikleşme sergilerken, 60 metakarpalin ise kıkırdak yapıda olduğu belirlendi. Yüksek doz nikotin grubuna göre tam kemikleşme sergileyen kemik sayısındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) ve kemikleşme yönünden sonuçların kontrol grubuna yakın olduğu tespit edildi (Şekil 4.5), (Tablo 4.7).

Melatonin Grubu: Bu grupta 1. ve 5. metakarpaller kıkırdak yapıdaydı. 3. ve 4. metakarpaller tam kemikleşme sergilerken, 2. metakarpallerin bazılarının kısmi bazılarının ise tam kemikleşme sergilediği belirlendi. 78 metakarpalde tam kemikleşme, 12 metakarpal kemikte kısmi kemikleşme belirlenirken 60 metakarpal ise hiçbir kemikleşme tespit edilmedi. Bu gruptaki kemiklerin kemikleşme dereceleri incelendiğinde; tam kemikleşme sergileyen kemik sayısının kontrol grubuna yakın olduğu, düşük doz ve yük doz nikotin grubundan ise istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu belirlendi ($p<0.05$), (Şekil 4.5), (Tablo 4.7).



Şekil 4.5. El İskeletine ait görüntüler

A. Kontrol Grubu B. Düşük Doz Nikotin Grubu C. Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubu
D. Melatonin Grubu E. Yüksek Doz Nikotin Grubu F. Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubu
(T; Tam Kemikleşme, K; Kısmi Kemikleşme)

Tablo 4.7. Metakarpal kemiklerde kemikleşme dereceleri

Metakarpal Kemiklerde Kemikleşme Dereceleri				
	Veri Sayısı (n)	Tam Kemikleşme	Kısmi Kemikleşme	Hiç Kemikleşmemiş
Kontrol	150	76	14	60
DDN	150	30 ^{a,c,e}	54	66
DDN+ MEL	150	66	24	60
YDN	150	0 ^{a,b,d,e}	18	132
YDN+ MEL	150	58	32	60
MEL	150	78	12	60

Ki-kare testi $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

(**DDN**; düşük doz nikotin, **YDN**; yüksek doz nikotin, **MEL**; melatonin)

a; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır

b; Düşük Doz Nikotin Grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

c; Düşük doz nikotin+melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

d; Yüksek doz nikotin+melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

e; Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.

Kontrol Grubuna Ait Femurların Morfolojik Ölçümleri: Bu gruba toplam 30 adet sağ ve sol femur dahil edildi. İkili boyama işlemine tutulan femurlar işlem sonrasında makroskopik olarak incelendi. İncelenen femurların gövde kısımları kemikleşmiş olup kırmızı renkte görülmekteydi. Kemikleşmenin corpus femoris'in orta hattından başlayıp proksimal ve distal yönde ilerleme gösterdiği belirlendi. Kemikleşme proksimal kısımda trochanter major'un tam altına kadar ilerlemiş ve bu seviyenin üzerindeki trochanter minor, collum femoris ve caput femoris'in kıkırdak yapıda olduğu ve mavi ile boyandığı tespit edildi. Extremitas distalis'de ise femur kondilleri mavi renkle boyanmış olup ve kıkırdak yapıdaydı. Proksimal kısımdaki kıkırdak uzunluğu distal kısımdakine göre daha fazlaydı.

Stereomikroskop altında yapılan ölçümlerde bu gruptaki femurların ortalama uzunluğunun 3.85 ± 0.21 mm olduğu, en düşük ve en yüksek değerlerin sırasıyla 3.07-4.21 mm olduğu belirlendi. Femurlarda kemikleşme sergileyen alanın ortalama uzunluğu 1.28 ± 0.1 mm olarak ve kemikleşme oranı ise $\%31.08 \pm 3.14$ olarak hesaplandı (Şekil 4.6), (Tablo 4.8).

Düşük Doz Nikotin Grubuna Ait Femurun Morfolojik Ölçümleri: İnceleme yapılan femurların boy uzunluğunun 3.37-4.01 mm arasında farklılık gösterdiği ve ortalama değerin 3.76 ± 0.16 mm olduğu belirlendi. Bu gruptaki femurların total boy uzunluğu kontrol grubundan daha kısa olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

Bu grupta femurlar incelendiğinde kemikleşme gösteren alanın ortalama uzunluğu 0.91 ± 0.15 mm olarak ve kemikleşme oranları ise $\%23.10 \pm 3.17$ olarak hesaplandı. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu grupta kemikleşme gösteren bölge uzunluğu ve kemikleşme yüzdesinin kontrol grubundan anlamlı derecede daha düşük olduğu belirlendi ($p < 0.05$), (Şekil 4.6), (Tablo 4.8).

Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubu: Çalışmamızda bu gruptaki femurların total kemik uzunluğu 2.79-4.62 mm arasında olup ortalama uzunluk 3.83 ± 0.36 mm olarak ölçüldü. Femur boy uzunlukları kontrol ve düşük doz nikotin grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. Kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğu ortalama 1.27 ± 0.43 mm olarak ve kemikleşme oranı ise $\%30.61 \pm 8.09$ olarak hesaplandı. Düşük doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ve kemikleşme yüzdesi daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmedi (Şekil 4.6), (Tablo 4.8).

Yüksek Doz Nikotin Grubuna Ait Femurun Morfolojik Ölçümleri: Bu gruptaki femurlar makroskobik olarak incelendiğinde; hem kemik boyunda hem de kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğunda azalma fark edildi. Stereomikroskopta ölçülen femurların ortalama total boy uzunluğu 3.51 ± 0.15 mm olarak kaydedildi. Yapılan istatistiksel analizlerde femur total boy uzunluğu hem kontrol hem de düşük doz nikotin grubundan anlamlı derecede kısa bulundu ($p < 0.05$).

Yapılan makroskopik gözlemlerde corpus femoriste başlayan kemikleşmenin çok küçük bir alanda olduğu ve 4 kemikte ise kemikleşmenin başlamadığı tespit edildi. Femurlarda kemikleşme gösteren bölgenin ortalama uzunluğu 0.78 ± 0.35 mm olarak ölçüldü. Yapılan alan ölçümlerinde femurların kemikleşme oranı $\%19.34 \pm 9.94$ olarak hesaplandı.

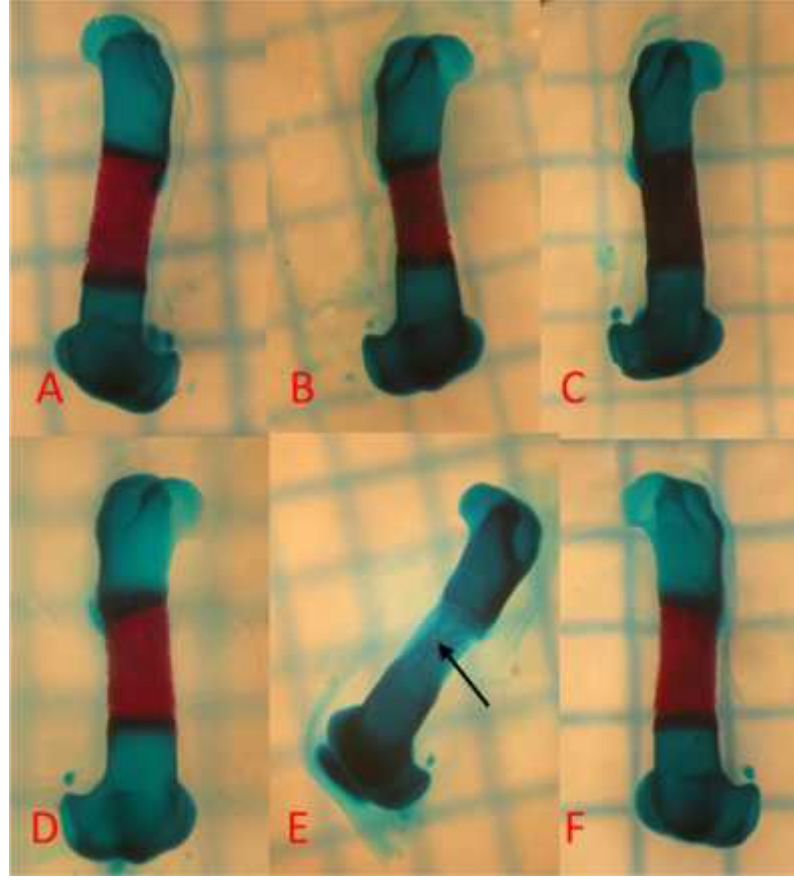
Bu gruptaki femurların boy uzunlukları, kemikleşme sergileyen bölgelerinin uzunlukları ve kemikleşme oranları kontrol ve düşük doz nikotin grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulundu ($p<0.05$), (Şekil 4.6), (Tablo 4.8). Nikotin uygulamasının femur gelişiminde gerilemeye yol açtığı ve bu teratojenik etkinin doza bağlı olduğu tespit edildi.

Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Femurun Morfolojik Ölçümleri:

Yüksek doz nikotin grubunun tedavi grubu olan bu grupta femur boyları ortalama 3.76 ± 0.1 mm olarak hesaplandı. Yüksek doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında femur boyu bu grupta istatistiksel olarak daha uzun bulundu ($p<0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise aralarında anlamlı bir fark görülmedi.

Bu grupta kemikleşmeye bağlı olarak corpus femoris'in kırmızı renkte olduğu, proksimal ve distal uçların ise henüz kemikleşmemiş olup kıkırdak yapıda ve mavi renkte olduğu tespit edildi. Kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu 0.98-1.46 mm arasında olup ortalama uzunluk 1.19 ± 0.11 mm olarak hesaplandı. Femurlarda kemikleşme oranı ortalama $\%26.99\pm4.0$ olarak hesaplandı. Bu gruptaki femurların hepsinin kemikleştiği tespit edildi. Bu gruptaki femurlar, yüksek doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla kemikleştiği ve kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğunun arttığı belirlendi ($p<0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise aralarında anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.6), (Tablo 4.8). Nikotine karşı melatonin uygulamasının femurlarda kemikleşmeyi artırarak kontrol grubuna yaklaştırdığı tespit edildi.

Melatonin Grubuna Ait Femurun Morfolojik Ölçümleri: Bu gruptaki femurların makroskobik incelemesinde kontrol grubu ile benzerlikler gösterdiği tespit edildi. Femurların gövde kısımlarının kemikleştiği ve kırmızı renkle boyandığı belirlendi. Proksimal ve distal uçların ise henüz kıkırdak yapıda olduğu tespit edildi. Ortalama femur boyunun 3.88 ± 0.15 mm olduğu ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı belirlendi. Bu grupta kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu 1.27 ± 0.11 mm olarak ve kemikleşme oranı 30.79 ± 2.72 hesaplandı. Bu verilere göre kontrol ve melatonin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.6), (Tablo 4.8). Tek başına melatonin uygulamasının femur gelişiminde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlendi.



Şekil 4.6. Femurlara ait görüntüler

A. Kontrol Grubu, **B.** Düşük Doz Nikotin Grubu, **C.** Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubu
D. Melatonin Grubu, **E.** Yüksek Doz Nikotin Grubu, **F.** Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubu
 → Kemik Yıkımına Bağlı Süngerimsi Doku

Tablo 4.8. Femur’a ait istatistiksel veriler

FEMUR ‘A AİT VERİLER										
	N	Kemik Boyu			Kemikleşme Uzunluğu			Kemikleşme Yüzey Alanı		
		Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama
Kontrol	30	3.07	4.21	3.85±0.21	1.12	1.52	1.28±0.10	25.85	40.60	31.08±3.14
DDN	30	3.27	3.91	3.66±0.16	0.61	1.22	0.91±0.15 ^{a,b,d,e}	18.15	30.50	23.10±3.17 ^{a,b,d,e}
DDN+MEL	30	3.39	4.62	3.87±0.29	0.88	1.99	1.34±0.36	18.75	55.87	29.76±7.41
YDN	30	3.07	3.85	3.51±0.19 ^{a,c,d,e}	0	1.17	0.78±0.35 ^{a,c,d,e}	0	31.46	19.34±9.94 ^{a,c,d,e}
YDN+MEL	30	3.22	4.05	3.76±0.18	0.98	1.46	1.19±0.11	20.59	36.36	26.99±4.00
MEL	30	3.54	4.19	3.88±0.15	1.01	1.46	1.27±0.11	24.44	35.59	30.79±2.72

ANOVA testi (p<0.05)

(DDN; düşük doz nikotin, YDN; yüksek doz nikotin, MEL; melatonin)

*a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**b; Düşük Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**c; Yüksek Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**d; Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**e; Düşük Doz Nikotin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.*

Kontrol Grubuna Ait Tibiaların Morfolojik Ölçümleri: Bu grupta 15 fetusa ait 30 tibia üzerinde inceleme yapıldı. Makroskobik incelemede kemiklerin corpus tibia kısmının ortasından kemikleşmenin başladığı ve bu bölgenin kırmızı renkte olduğu tespit edildi. Corpus tibia’nın merkezinden proksimal ve distal uçlara doğru kemikleşmenin devam ettiği görüldü. Kemikleşme extremitas proximalis’de tuberositas tibia seviyesine kadar ilerlemiş olup tibia kondilleri kıkırdak yapıdaydı. Extramitas distalisin ise tamamının kıkırdak yapıda olduğu, malleolus medialis ve facies articularis inferior’in mavi renkte boyandığı belirlendi.

Bu gruptaki tibiaların ortalama total boy uzunluğu 3.79 ± 0.14 mm, kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu 1.42 ± 0.13 mm ve kemikleşme oranı $\%35.06 \pm 4.88$ olarak hesaplandı (Şekil 4.7), (Tablo 4.9).

Düşük Doz Nikotin Grubuna Ait Tibiaların Morfolojik Ölçümleri: Bu grupta yapılan makroskobik incelemelerde tibialarda extremitas proximalis yönünde kemikleşmenin daha az olduğu farkedildi. Stereomikroskop altında yapılan ölçümlerde total boy uzunluğunun ortalama 3.63 ± 0.17 mm olduğu belirlendi. Bu grupta total boy uzunlukları kontrol grubundan daha kısa olmasına rağmen bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Yaptığımız ölçümlerde tibialarda kemikleşme gösteren bölgenin ortalama uzunluğu 1.04 ± 0.14 mm ve kemikleşme oranı $\%26.04 \pm 4.96$ olarak hesaplandı. Bu gruptaki tibialarda kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğu ve kemikleşme oranı kontrol grubundan az olup, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$), (Şekil 4.7), (Tablo 4.9).

Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Tibiaların Morfolojik Ölçümleri: Düşük doz nikotin grubunun tedavi grubu olan bu grupta ilk olarak makroskobik inceleme yapıldı. Yapılan incelemelere göre bu kemiklerde herhangi bir anomali görülmeyp kemikleşme uzunluğu kontrol grubu ile benzerlik göstermekteydi.

Stereomikroskop ile yapılan tibia boy uzunluğu ölçümlerine göre en kısa tibia 3.35 mm, en uzun tibia ise 4.56 mm olarak ölçüldü. Ortalama tibia boy uzunluğu ise 3.78 ± 0.38 mm olarak hesaplandı. Total boy uzunluğu verileri kontrol grubu, düşük doz nikotin grubu ve düşük doz nikotin+melatonin grupları arasında karşılaştırıldı ve aralarında anlamlı bir fark bulunmadı.

Tibialarda kırmızı ile boyanan alanın uzunluğu 0.98 mm ile 2.23 mm arasında olup ortalama uzunluk 1.40 ± 0.34 mm olarak hesaplandı. Tibialarda kemikleşme oranı $\%34.85 \pm 6.62$ şeklinde belirlendi. Kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ve kemikleşme oranı verileri düşük doz nikotin ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; düşük doz nikotin grubu ile aralarında belirlenen sayısal fark istatistiksel olarak anlamlı iken ($p < 0.05$), kontrol grubu ile anlamlı bir fark belirlenmedi (Şekil 4.7), (Tablo 4.9).

Yüksek Doz Nikotin Grubuna Ait Tibiaların Morfolojik Ölçümleri: Bu grupta inceleme yapılan tibialar makroskobik olarak gözlemlendiğinde en küçük tibiaların bu grupta

olduğu görüldü. Kemikleşme mesafelerine bakıldığında ise yine en küçük kemikleşme bölgelerinin bu grupta olduğu ve 4 kemikte hiç kemikleşme olmadığı belirlendi.

Image J programı ile yapılan ölçümlerde ortalama total tibia boyunun 3.25 ± 0.24 mm olduğu hesaplandı. Kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu 0.84 ± 0.37 mm olarak, kemikleşme oranı ise $\% 23.40 \pm 10.55$ olarak tespit edildi. Bu grupta her üç parametrede kontrol ve düşük doz nikotin gruplarından küçüktü ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$), (Şekil 4.7), (Tablo 4.9). Nikotinin tibia kemiğinde kemikleşmeyi azalttığı ve nikotinin dozu arttıkça bu etkinin arttığı tespit edildi.

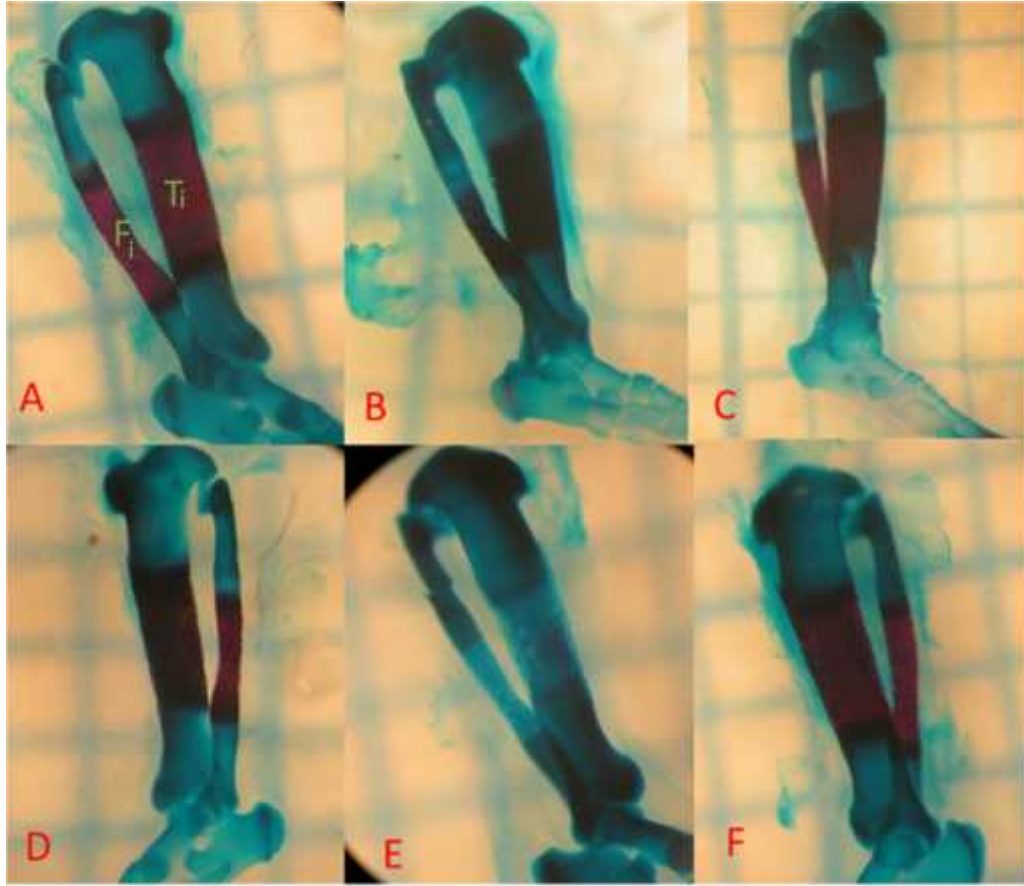
Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Tibiaların Morfolojik Ölçümleri: Bu grup yüksek doz nikotin grubunun tedavi grubudur. Makroskobik gözlemde tibialarda kırmızı alanın kemik gövdesinde belirgin olduğu ve tüm kemiklerde kemikleşmenin olduğu görüldü.

Bu grupta tibia total boy uzunlukları 2.97 ile 3.78 mm arasında olup ortalama uzunluk 3.50 ± 0.19 mm olarak hesaplandı. Bu gruptaki tibiaların total boy uzunlukları yüksek doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında daha fazlaydı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$).

Bu grup tibialarda kemikleşme gösteren alanın ortalama uzunluğu 1.42 ± 0.14 mm olarak, kemikleşme oranı ise $\%34.47 \pm 3.62$ olarak tespit edildi. Bu grupta kemikleşme sergileyen alanın uzunluğu ve kemikleşme oranı yüksek doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında daha fazlaydı ve oluşan sayısal fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$), (Şekil 4.7), (Tablo 4.9). Nikotine ek melatonin tedavisinin; tibialarda azalan kemikleşmeyi artırdığı ve kontrol grubuna yaklaştırdığı tespit edildi.

Melatonin Grubuna Ait Tibiaların Morfolojik Ölçümleri: Bu gruptaki tibiaların makroskobik incelemesinde kontrol grubuna benzerlik gösterdiği tespit edildi. Makroskobik incelemede kemikleşmenin corpus tibiadan başladığı ve extremitas proximal ve distalis'e doğru devam ettiği belirlendi. Kemikleşmenin proksimalde tuberositas tibia seviyesine kadar ilerlediği, buranın üst kısmında kalan tibia kondillerinin kırık yapıda olduğu tespit edildi. Extramitas distalis'in ise tamamen kırık yapıda olduğu görüldü. Tibia total boy uzunluğu 3.44-4.26 mm arasında değişmekte olup ortalama 3.85 ± 0.18 mm olarak ölçüldü. Bu grupta kemikleşme sergileyen alanın ortalama uzunluğu 1.42 ± 0.14 mm ve kemikleşme oranının $\%34.49 \pm 2.42$ olduğu hesaplandı.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hiçbir parametrede anlamlı fark bulunmadı (Şekil 4.7), (Tablo 4.9). Uygulanan dozda melatoninin tek başına verilmesinin tibiada kemikleşmeye etkisinin olmadığı tespit edildi.



Şekil 4.7. Tibia ve fibulalara ait görüntüler

A. Kontrol Grubu, **B.** Düşük Doz Nikotin Grubu, **C.** Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubu

D: Melatonin Grubu, **E.** Yüksek Doz Nikotin Grubu, **F.** Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubu
(**Ti**; tibia, **Fi**; fibula)

Tablo 4.9. Tibia'ya ait istatistiksel veriler

TIBIA'YA AİT VERİLER										
	N	Kemik Boyu			Kemikleşme Uzunluğu			Kemikleşme Yüzey Alanı		
		Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama
Kontrol	30	3.55	4.11	3.79±0.14	1.17	1.78	1.42±0.13	26.04	47.05	35.06±4.88
DDN	30	3.26	3.94	3.63±0.17	0.83	1.37	1.04±0.14 ^{a,b,d}	18.43	37.28	26.04±4.96 ^{a,b,d}
DDN+ MEL	30	3.35	4.56	3.78±0.32	0.98	2.23	1.40±0.33	19.63	47.79	34.85±6.62
YDN	30	2.65	3.72	3.25±0.23 ^{a,c,d}	0	1.16	0.84±0.37 ^{a,c,d}	0	42.42	23.40±10.55 ^{a,c,d}
YDN+ MEL	30	2.97	3.78	3.50±0.18	0.99	1.50	1.27±0.11	28.15	42.24	34.47±3.62
MEL	30	3.44	4.26	3.85±0.18	1.12	1.64	1.42±0.13	27.71	38.32	34.49±2.42

ANOVA testi (p<0.05)

(DDN; düşük doz nikotin, YDN; yüksek doz nikotin, MEL; melatonin)

*a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**b; Düşük Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**c; Yüksek Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**d; Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**e; Düşük Doz Nikotin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.*

Kontrol Grubuna Ait Fibulaların Morfolojik Ölçümleri: Bu grupta 15 fetusa ait 30 adet fibula incelendi. Fibulalarda kemikleşmenin kemik gövdesinde başladığı; proksimal ve distal yönde ilerlediği görüldü. Gövdede kemikleşen kısmın kırmızı renkte; extremitas proximalis'de caput fibulae, extremitas distalis'de ise malleolus lateralis'in henüz kıkırdak yapıda olduğu için mavi renk ile boyandığı görüldü. Yapılan kemik boyu ölçümlerinde fibula ortalama total boy uzunluğu 3.45±0.10 mm, kemikleşme sergileyen alanın ortalama uzunluğu 1.39±0.14 mm olarak hesaplandı. Bu grup fibulaların kemikleşme oranının % 38.80±4.88 olduğu tespit edildi (Şekil 4.7), (Tablo 4.10).

Düşük Doz Nikotin Grubuna Ait Fibulaların Morfolojik Ölçümleri: Annelerine 3mg/kg/gün nikotin verilen fetusların bulunduğu bu grupta, fibulaların ortalama total boy uzunluğu 3.44±0.16 mm olarak hesaplandı. Bu gruptaki fibulaların total boy uzunlukları kontrol grubundan kısa olmasına rağmen istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir fark bulunmadı. İnceleme yapılan 30 fibulaya ait kemikleşme bölgeleri ölçüldü. Ortalama kemikleşme uzunluğu 0.94±0.2 mm ve kemikleşme gösteren alanın tüm alana oranının

ortalama 24.16 ± 5.53 olduğu hesaplandı. Yapılan istatistiksel analize göre; düşük doz nikotin grubunun kemikleşme sergileyen bölge uzunluğu ve kemikleşme oranı kontrol grubundan anlamlı derecede azdı ve bu sayısal farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$), (Şekil 4.7), (Tablo 4.10).

Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Fibulaların Morfolojik Ölçümleri: Bu grup düşük doz nikotin grubunun tedavi grubu olarak planlandı ve elde edilen verilen düşük doz nikotin grubu ile kıyaslandı. Bu grupta ortalama fibula total boy uzunluğu 3.42 ± 0.30 mm olarak hesaplandı. Elde ettiğimiz verilere göre fibula total boy uzunluklarında, kontrol grubu, düşük doz nikotin ve düşük doz nikotin+melatonin grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Kırmızı ile boyanan kemikleşme alanı ölçüldüğünde bu grupta ortalama uzunluk 1.29 ± 0.35 mm ve kemikleşme oranı 38.91 ± 9.08 olarak hesaplandı. Bu grupta kemikleşen bölgenin uzunluğu ve kemikleşme oranı düşük doz nikotin grubundan daha fazlaydı ve bu farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$), (Şekil 4.7), (Tablo 4.10).

Yüksek Doz Nikotin Grubuna Ait Fibulaların Morfolojik Ölçümleri: Annelerine 6 mg/kg/gün nikotin verilen fetusların bulunduğu bu gruptaki fibulalar makroskobik olarak incelendiğinde; en kısa kemiklerin bu grupta olduğu görüldü. Kemikleşme sergileyen bölge dikkate alındığında ise kemiğin gövdesinde küçük bir alanın kırmızı ile boyandığı ve 4 kemikte hiç kemikleşmenin olmadığı tespit edildi.

Yapılan ölçümler sonucunda fibula ortalama total boy uzunluğu 3.01 ± 0.2 mm olarak hesaplandı. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu grup fibula total boy uzunluğunun hem düşük doz nikotin grubundan hem de kontrol grubundan anlamlı derecede kısa olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Kemikleşme sergileyen bölgenin ortalama uzunluğu 0.76 ± 0.4 mm ve kemikleşme gösteren bölgenin tüm alana oranı ortalama 20.92 ± 9.89 olarak hesaplandı. Fibulaların kemikleşme sergileyen bölge uzunlukları ve kemikleşme oranları hem kontrol hem de düşük doz nikotin grupları ile karşılaştırıldı. Yapılan istatistiksel testler sonucunda yüksek doz nikotin grubunun kemikleşme verilerinin diğer iki gruptan daha az olduğu belirlendi ($p < 0.05$), (Şekil 4.7), (Tablo 4.10). Nikotin dozu arttıkça fibulada kemikleşmenin azaldığı tespit edildi.

Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubuna Ait Fibulaların Morfolojik Ölçümleri: Yapılan ölçümlerde bu grupta fibula total kemik boyu 2.75-3.53 mm arasında olup

ortalama uzunluk 3.23 ± 0.20 mm olarak kaydedildi. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda bu gruptaki fibulaların total kemik boyu yüksek doz nikotin grubundan anlamlı derecede uzun bulundu ($p < 0.05$).

Fibulalarda kemikleşme gösteren bölgenin uzunluğu ve kemikleşme alanı ölçüldü. Ortalama uzunluk 1.25 ± 0.18 mm ve kemikleşme oranı $\% 29.26 \pm 6.18$ olarak hesaplandı. Bu gruptaki iki parametreye ait veriler yüksek doz nikotin grubu ile karşılaştırıldığında aradaki pozitif yöndeki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$), (Şekil 4.7), (Tablo 4.10). Nikotine karşı verilen melatonin fibula da kemikleşmeyi artırarak kontrol grubuna yaklaştırdığı tespit edildi.

Melatonin Grubuna Ait Fibulaların Morfolojik Ölçümleri: Bu gruptaki fibulalar makroskobik olarak incelendiğinde kontrol grubu ile benzerlik görüldü. Ölçüm yapılan fibula boyları 2.96-3.69 mm arasında olup, ortalama total uzunluk 3.41 ± 0.15 mm olarak hesaplandı. Corpus fibulae’da görülen kemikleşme alanı ölçüldüğünde ortalama uzunluk 1.32 ± 0.12 mm ve kemikleşme oranı $\%38.34 \pm 6.19$ olarak hesaplandı. Kemik uzunluğu, kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ve kemikleşme oranı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı (Şekil 4.7), (Tablo 4.10). Melatoninin belirlenen dozda tek başına verildiğinde fibula kemikleşmesinde bir etki göstermediği belirlendi.

Tablo 4.10. Fibula'ya ait istatistiksel veriler

FIBULA'YA AİT VERİLER										
	N	Kemik Boyu			Kemikleşme Uzunluğu			Kemikleşme Yüzey Alanı		
		Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama	Min	Max	Ortalama
Kontrol	30	3.27	3.64	3.45±0.09	1.21	1.69	1.39±0.14	26.66	46.15	38.80±4.88
DDN	30	3.19	3.95	3.44±0.15	0.44	1.41	0.94±0.20 ^{a,b,d,e}	14.81	34.69	24.16±5.53 ^{a,b,d,e}
DDN+MEL	30	2.90	4.09	3.42±0.29	0.8	2.09	1.29±0.35	25.88	60.17	38.91±9.08
YDN	30	2.44	3.44	3.01±0.19 ^{a,c,d,e}	0	1.23	0.76±0.39 ^{a,c,d,e}	0	30.55	20.92±9.89 ^{a,c,d,e}
YDN+MEL	30	2.75	3.53	3.23±0.19	0.73	1.53	1.25±0.17	19.04	42.68	29.26±6.18
MEL	30	2.96	3.69	3.41±0.15	1.00	1.51	1.32±0.12	22.85	51.21	38.34±6.19

ANOVA testi (p<0.05)

(DDN; düşük doz nikotin, YDN; yüksek doz nikotin, MEL; melatonin)

*a; Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**b; Düşük Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**c; Yüksek Doz Nikotin+Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**d; Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.**e; Düşük Doz Nikotin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.*

Ayak İskeletinde Kemikleşme: Ayak iskeletinde kemikleşme gösteren kemikler sayıldı. Tarsal kemiklerde ve phalanxlarda kemikleşme gözlenmemişken metatarsal kemiklerde kemikleşme tespit edildi.

Kontrol Grubu: Kontrol grubunda incelediğimiz 3. ve 4. metatarsal kemiklerde tam kemikleşme görülürken, 2. ve 5. metatarsal kemiklerde genellikle kısmi kemikleşme görüldü. Bu grupta 150 metatarsal kemik tarafımızca incelenmiş olup 90 kemikte tam, 30 kemikte kısmi kemikleşme görülmüşken, 30 tanesi ise tamamen kıkırdak yapıdaydı (Şekil 4.8), (Tablo 4.11).

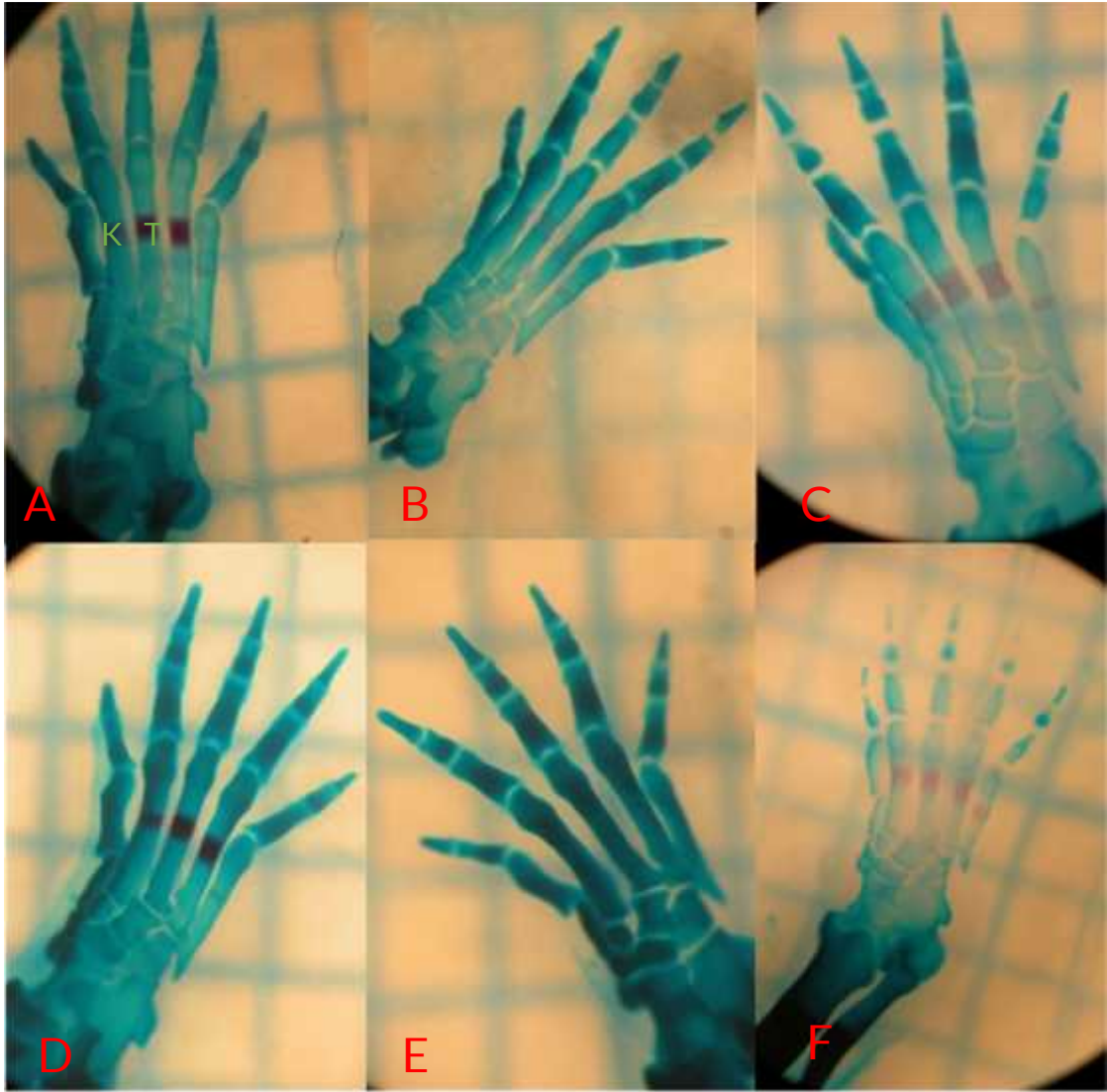
Düşük Doz Nikotin Grubu: Bu grupta incelediğimiz ayak iskeletlerinde genellikle kısmi kemikleşme görüldü. İncelenen tüm ayak iskeletlerinde 1. metatarsal kıkırdak yapıda iken, 2., 3., 4. metatarsallar genellikle kısmi kemikleşme sergilemekteydi. 30 metatarsalda tam kemikleşme, 76 metatarsalda kısmi kemikleşme görülürken ve 44 metatarsalda hiç kemikleşme görülmedi. Bu grup tam kemikleşme yönünden kontrol grubu ile karşılaştırıldığında tam kemikleşen kemik sayısında anlamlı derecede azalmanın olduğu (p<0.05) ve kemikleşme derecesinin kısmi kemikleşme yönünde değişim sergilediği tespit edildi (Şekil 4.8), (Tablo 4.11).

Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubu: Düşük doz nikotin grubunun tedavi grubu olan bu grupta 1. metatarsallar kıkırdak, 2., 3. ve 4. metatarsallar genellikle tam kemikleşmişken, 5. metatarsallar kısmi kemikleşme sergilemekteydi. 90 metatarsalda tam kemikleşme, 30 metatarsalda kısmi kemikleşme görülürken, 30 metatarsal ise kıkırdak yapıdaydı. Bu gruptaki veriler kontrol grubu ile benzerlik göstermekteydi. Tam kemikleşmenin düşük doz nikotin grubuna göre anlamlı derecede arttığı tespit edildi ($p<0.05$). Bu gruptaki veriler kontrol grubu ile benzerlik göstermekteydi (Şekil 4.8), (Tablo 4.11).

Yüksek Doz Nikotin Grubu: Bu grupta incelediğimiz metatarsallarda kemikleşme son derece düşüktü. Hiç bir kemikte tam kemikleşme görülmemişken, 24 tanesinde kısmi kemikleşme tespit edildi. 126 kemik ise tamamen kıkırdak yapıdaydı. Bu grupta bradidaktili görüldü. Bu grup kemikleşme derecesi yönünden kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kemikleşme derecesinin tam kemikleşmeden hiç kemikleşme yönünde değişim gösterdiği ve bu sayısal farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$), (Şekil 4.8), (Tablo 4.11).

Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubu: Yüksek doz nikotin grubunun tedavi grubu olan bu grupta kemikleşen ve kısmi kemikleşen kemik sayısında artış gözlemlendi. Bu grupta 3. ve 4. metatarsallerde tam kemikleşme görülürken 2. ve 5. metatarsallerde kısmi kemikleşme tespit edildi. 1. metatarsaller ise tamamen kıkırdak yapıdaydı. 62 metatarsal tam, 28 metatarsal kısmi kemikleşirken, 60 metatarsal ise kıkırdak yapıdaydı. Yüksek doz nikotin grubuna göre tam kemikleşme sergileyen kemik sayısındaki artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$) ve kemikleşme yönünden sonuçların kontrol grubuna yakın olduğu tespit edildi (Şekil 4.8), (Tablo 4.11). Nikotine ek melatonin verildiğinde metatarsal kemiklerde tam kemikleşme gösteren metatarsal sayısının arttığı ve kontrol grubuna yaklaştığı tespit edildi.

Melatonin Grubu: Bu grupta kemikleşme gösteren kemikler kontrol grubuna benzemektedir. 1. metatarsallar kıkırdak, 5. metatarsallar yarım kemikleşirken 2.,3. ve 4. metatarsalların tam kemikleştiğini gözlemledik. Bu gruptaki kemiklerin kemikleşme dereceleri incelendiğinde; tam kemikleşme sergileyen kemik sayısının kontrol grubuna yakın olduğu, düşük doz ve yük doz nikotin grubundan ise istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu belirlendi ($p<0.05$), (Şekil 4.8), (Tablo 4.11).



Şekil 4.8. Ayak iskeletlerine ait görüntüler

A. Kontrol Grubu, **B.**Düşük Doz Nikotin Grubu, **C.** Düşük Doz Nikotin+Melatonin Grubu
D. Melatonin Grubu, **E.**Yüksek Doz Nikotin Grubu, **F.**Yüksek Doz Nikotin+Melatonin Grubu
 (T; tam kemikleşme, K; kısmi kemikleşme)

Tablo 4.11. Ayak iskeletleri kemikleşme dereceleri

Ayak İskeleti Kemikleşme Dereceleri				
	Veri Sayısı (n)	Tam Kemikleşme	Kısmi Kemikleşme	Hiç Kemikleşmemiş
Kontrol	150	90	30	30
DDN	150	30 ^{a,e}	76	44
DDN+ MEL	150	82	38	60
YDN	150	0 ^{a,b,d,e}	24	126
YDN+ MEL	150	62	28	60
MEL	150	90	30	60

Ki-kare testi $p < 0.05$

(**DDN**; düşük doz nikotin, **YDN**; yüksek doz nikotin, **MEL**; melatonin)

***a**; Kontrol Grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır*

***b**; Düşük Doz Nikotin Grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.*

***c**; Düşük doz nikotin+melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.*

***d**; Yüksek doz nikotin+melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır.*

***e**; Melatonin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlıdır*

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sigara tüketimi insan sağığı açısından zararlı sonuçları olan bir bağımlılıktır. Sigara dumanındaki temel bağımlılık yapıcı madde nikotindir. Cinsiyet, nikotine ilk maruz kalınma yaşı, genetik yatkınlık, nikotin dozu ve kullanım paternleri gibi etkenler nikotin bağımlılığında bireysel farklılıkların ortaya çıkmasından sorumludur (3).

Nikotin piridin ve pirolidin halkasından oluşan ve tobacco bitkisinin yapraklarından izole edilen alkaloid bir bileşiktir. Endojen nörotransmitter ACh gibi davranır ve beyinde birden çok reseptör subtipiyle etkileşime girer. Nikotinik Sistem, kognitif fonksiyonun nöral temelinde hayati rol oynar (16). Literatürde nikotinin oksidan-antioksidan dengesini bozarak hasar yaptığıyla ilgili kanıtlar giderek artmaktadır. Deneysel çalışmalarda, ratlara nikotin uygulamasının; oksidatif stres belirteçlerinde yükselmeye, serbest radikal süpürücü enzimlerin aktivitesinde düşüşe neden olduğu gösterilmiştir. Klinikte nikotin ile meme kanseri, akciğer kanseri, böbrek ve karaciğer hasarı arasında güçlü bir ilişkinin olduğu belirlenmiştir (5, 109).

Nikotin %88 oranında plasentadan geçebilen ve fetal dolaşıma karışabilen bir bileşiktir. Anne sütüne de geçen nikotin, anne sütüyle beslenen bebeğin direkt olarak etkilenmesine neden olur (4). Gebelik döneminde aktif olarak sigara kullanımı ya da pasif sigara maruziyeti; göbek kordonu ve plasentada değişiklikleri, plasenta dekolmanını, dış gebeliği, abortus ve erken doğumu, düşük doğum ağırlığını, fetusun anatomik sistemlerinde gelişme geriliği ve anomalilerini (üriner, solunum ve sinir sistemi yapısında gerilemeler ve anomaliler gibi), bebekte doğum öncesi ve sonrası ani ölüm gibi önemli hastalık ve durumların riskini artırmaktadır. Doğum öncesi sigaraya maruz kalan bebeklerde hiperaktivite, dikkat eksikliği, heceleme, okuma ve matematik problemlerinin öğrenilmesinde zorluklar gibi entellektüel gelişimlerinde yetersizlikler görülür. Nikotinin kemik mineral yoğunluğu (KMY) üzerindeki teratojenik etkisinin değerlendirildiği bir

çalışmada erkeklerin femur üst uç bölgesinde KMY'nun azaldığı ve alınan nikotinden anlamlı olarak etkilendiği sonucuna varılmıştır (4, 5, 110).

Sağlık örgütleri tarafından savaş açılan sigara bağımlılığı ile ilişkili olarak, gebelikte nikotin kullanımı birçok araştırmacının dikkatini çekmiş olup, çalışmalarında nikotine bağlı fetuslarda oluşan teratojenik etkiler çeşitli yöntemlerle araştırılmıştır.

Literatürde değişik dozlarda nikotin kullanılmış olup; Oruç ve ark. (1996) neonatal dönemde molar dişler üzerine nikotinin etkisini araştırdıkları çalışmalarında 1.67 mg/kg nikotini i.p. yolla gebeliğin 6-21.günleri arası vermişlerdir. Akkoyun ve ark. (2012) nikotinin fetus böbreğinde oluşturduğu hasarı inceledikleri çalışmalarında 5 mg/kg nikotini i.p. yolla gebelik boyunca ve laktasyonun ilk 15 günü süresince uygulamışlardır. Güneş ve ark. (2007) ile Yavaşcan ve ark. (2005) düşük doz ve yüksek doz nikotin uygulamalarında 3mg/ kg ve 6 mg/ kg nikotin dozlarını tercih etmişlerdir (111, 112). Ratlarda 3 mg/kg nikotin uygulamasının yarım pakete, 6 mg/kg nikotin uygulamasının ise bir paket sigara kullanımına karşılık geldiği çalışmalarda bildirilmiştir (113). Bizde yaptığımız literatür taramasının ışığında çalışmamızda düşük doz için 3 mg/kg, yüksek doz için 6 mg/kg subkutan nikotin uygulamasını tercih ettik. Literatürde nikotin kullanımında doza ve süreye bağlı olarak tolerans geliştiği ve ilk kullanımda vücudun nikotine karşı reaksiyon gösterdiğini belirten çalışmalar vardır. Oruç ve ark. (1996) yaptıkları çalışmalarında gebe ratlara nikotin verdiklerinde ratlarda şok etkisini görmüşlerdir. Bu etkinin önce 1-2 dakika süren şiddetli konvülsiyonlar ve sonrasında ise 3-4 dakika süren sedasyon şeklinde olduğunu ve bu şok sonucunda gebe ratlarından bir tanesinin öldüğünü belirtmişlerdir (111). Çalışmamızda; bu şok etkisini azaltmak için nikotin uygulaması subkutan şeklinde ve yüksek doz gruplarında ise uygulama sabah ve akşam ikiye bölünerek yapıldı. Bunun sonucunda çalışmamızda şok süresi daha kısa sürdü ve hiç bir denek bu aşmada kaybedilmedi.

Nikotinin fetusta konjenital malformasyonlara neden olduğuylla ilgili literatürde birçok çalışma vardır. Konjenital malformasyonlar; embriyogenezis döneminde ortaya çıkan gelişim bozuklukların doğumla görülmesidir. Bu malformasyonlar canlının yaşam boyunca ciddi sağlık sorunlarına hatta ölüme neden olabilir.

Kurtoglu ve ark. (2011) hamilelik ve laktasyoperiyodu boyunca (doğumdan sonra 21. güne kadar) uygulanan nikotinin (6 mg/kg ve 3 mg/kg) fetustardaki aorta abdominalis'in intima kalınlığını arttığını rapor etmişlerdir (112).

Akkoyun ve ark. (2012) gebelik boyunca ve doğumu izleyen 15. güne kadar nikotine (i.p. 5mg/kg) maruz bıraktıkları ratların yavrularında böbrek dokularındaki hasarı hem biyokimyasal olarak hemde imminohistokimyasal olarak rapor etmişlerdir. Biyokimyasal olarak nikotin uygulanan gruplarda oksidan ve antioksidan dengenin bozulduğunu, kontrol grubuna göre malondialdehit (MDA) ve NO düzeylerinde artışı, glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve süproksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzim düzeylerinde ise düşüşü tespit etmişlerdir (114).

Banderalli ve ark. (2015) insanlar üzerinde yaptıkları klinik bir takip çalışmasında hamilelik ve laktasyon dönemindeki kısa ve uzun süreli nikotin kullanımının çocuklarda teratojenik etkilerini araştırmışlardır. Hamilelikte kısa süre nikotin kullanımının erken doğum, düşük doğum ağırlığı, fetal büyüme geriliği, yenidoğanda değişmiş beyin yapı ve fonksiyonları, fetal kalp gelişim sorunları, alveolarasyon düşüklüğüne sebep olduğunu rapor etmişlerdir. Uzun dönem kullanımın ise; obezite, yüksek kan basıncı, hırıltılı solunum, astım, bozulmuş akciğer fonksiyon, bronşit, hava yolu aşırı duyarlılığı riskini arttığını bildirmişlerdir. Laktasyon süresince kısa dönem nikotin kullanımının nörogelişimsel ve davranışsal bozukluklara, uyku bozukluğuna, ani bebek ölümü sendromu riskinde artmaya, uzun dönem kullanımının ise bunlara ek olarak obezite, astım ve rhinitise sebep olduğu rapor edilmiştir (115).

Khaldoyanidi ve ark. (2001) nikotinin in vitro olarak kemik iliği endotelial hücreleri ve akciğer endotelial hücreleri üzerinde etkisini inceledikleri çalışmalarında hücreler arası etkileşimde ve hücre göçünde etkili olan CD44 antijenin ekspresyon düzeylerini araştırmışlardır. Çalışmalarında nikotinin her iki endotelial hücre grubunda CD44 hücre yüzey antijenini düşürdüğünü ve bu durumun hematopoez üzerinde etkili olduğunu rapor etmişlerdir (116).

Ataibiş ve ark. (2012) prenatal nikotin uygulamasının yavru ratlarda diş sürmesi ve çene gelişimi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmaların da; gebelik süresince 0.15 mg/kg (Grup 1), 0.3 mg/kg (Grup 2), 0.6 mg/kg (Grup 3) dozlarda nikotini i.p. olarak vermişlerdir. Çalışmada nikotine maruz bırakılan anne ratların erken doğum yaptığı (Kontrol: 20.9 gün, Grup 1: 20.3, Grup 2: 20.4, Grup 3: 20.1), yavrularının doğum ağırlığının (Kontrol: 12.07 gr, Grup 1: 10.7, Grup 2: 10.5 Grup 3: 10.6) kemik mineral içeriğinin (Kontrol: 0.128 gr, Grup 1: 0.113, Grup 2: 0.108, Grup 3: 0.108) ve kemik mineral yoğunluğunun (Kontrol: 0.142gr/cm², Grup 1: 0.134 gr/cm², Grup 2: 0.131 gr/cm², Grup 3: 0.128 gr/cm²), azaldığı rapor edilmiştir. Prenatal dönemde nikotin

alımının doğan yavruların gelişiminde olumsuz bir rol oynadığı, bir bütün olarak tüm vücut sistemini etkilediği, buna göre diş sürmesi ve çene gelişiminde de eksiklikler meydana getirdiği sonucuna varılmıştır (117).

Bizde çalışmamızda nikotin alan gruplarda fetusların baş-kıç uzunluklarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığını (baş-kıç uzunlukları düşük doz nikotin alan grupta ortalama %7, yüksek doz nikotin alan grupta %16 azaldı) belirledik. Doğum ağırlıkları ise kontrol grubunda ortalama 2.40 gr, düşük doz nikotin grubunda 2.20 gr, yüksek doz nikotin grubunda ise 1.99 gr olarak hesaplandı ve gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). Çalışmamızda nikotin uygulaması literatür benzer şekilde fetuslara ait demografik bulgularda azalamaya sebep olmuştur.

Teratolojik çalışmalarda en önemli başlıklardan biri iskelet sisteminde oluşabilen anomalilerdir. İkili iskelet boyaması teratojenik çalışmalarda uzunca bir süredir kullanılan güvenilir ve objektif bir yöntemdir. İlk ikili iskelet sistemi boyaması 1971 yılında Simons ve Van Horns tarafından yapılmış günümüze gelene kadar çeşitli farklılıklar göstermiştir (107,108). Bizde çalışmamızda bu ekolden gelerek ilerleyen kemiğin alizarin red, kıkırdığın Alcian Blue ile boyandığı Inouye metodunu kullandık. Literatürde bu yöntemle teratojenik madenin iskelet sistemi üzerinde oluşturduğu muhtemel hasarlar; total kemik uzunluğu, kemikleşme sergileyen bölgenin uzunluğu ve kemik kıkırdak oranları ölçülerek değerlendirilmiştir (95, 104, 107).

Öztürk ve ark. (2014) sağlıklı rat fetuslarının ön ekstremitte kemik gelişimini inceledikleri çalışmalarında gebeliklerinin 20. gününde ortalama kemik uzunluklarını scapulada 4.9 ± 0.27 mm, humerusta $5.4\pm.16$, ulnada 5.2 ± 0.2 mm ve radiusta 4 ± 0.16 mm olarak bulmuşlardır (104). Çalışmamızda ise kontrol grubundaki 20 günlük fetuslarda ortalama kemik uzunlukları scapulada 3.45 ± 0.12 mm, humerusda 4.19 ± 0.04 , ulnada 4.12 ± 0.08 , radiusda 3.24 ± 0.1 mm olarak belirlendi. İki çalışma arasında çıkan sayısal farklılıkların gebelik süresini hesaplama yönteminin farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çünkü Öztürk ve ark. çalışmalarında vajinal smear da sperm pozitif bulunan ratları 0 günlük gebe kabul ederken, biz ise aynı durumdaki ratları 0.5 günlük gebe olarak hesapladık.

Sigaranın endokondral kemikleşme üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle iskelet sisteminin gelişimindeki gerilemeden sorumlu olduğu ve sigara içindeki kimyasaldan bir olan nikotinin bu gecikmede baş aktör olduğu çalışmalarda bildirilmiştir. Bununla beraber nikotinin bu gerilemede nasıl bir etki gösterdiği tam olarak açıklanmamıştır.

Feltes ve ark. (2013) çalışmalarında iskelet gelişimine etki eden genler belirleyerek nikotinin bu genlerden hangilerine üzerinde teratojenik etki gösterdiğini ortaya koymayı amaçlamıştır. Nikotinin HOX genine etki ederek embriyoda iskelet sisteminin gelişimini geciktirdiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca nikotinin ERBB2, ERBB3, ERBB4 gibi tirozinkinaz ailesi üyelerine ait yapıları da etkileyerek iskelet gelişiminde hasara yol açtığını bildirmişlerdir (118).

Kawakita ve ark. (2008) çalışmalarında gebe ratların içme suyuna nikotin katmış ve 20 günlük fetuslarda iskelet sisteminin gelişimini incelemişlerdir. Çalışmalarında nikotinin büyüme plaklarındaki kondrositlere direkt etki ederek matriks sentezini azalttığını ve $\alpha 7$ nAChR (nikotinin spesifik reseptörü) reseptörü aracılığı ile hipertrofik farklılaşmayı baskıladığı ve bu sayede kemik gelişiminde gecikmeye sebep olduğunu bildirmişlerdir (119). Literatürde nikotinin kemik gelişimi üzerindeki etkileri doza bağlı olup yüksek dozda verilen nikotinin osteoblast aktivitesini düşürüp osteoklast aktivitesini artırarak kemik dokusu yıkımına neden olduğu bildirilmiştir (52).

Kurtoglu ve ark. (2005) nikotinin kemik gelişimine olumsuz etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 3 mg/kg nikotini i.p. yolla gebelik ve laktasyon boyunca maternal ratlara vermişlerdir. Deney sonunda 21 günlük yavrularda kemik dansitesi, kemik mineral içeriği ve femur uzunluklarını değerlendirmişlerdir. Nikotin uygulanan annelerin yavrularının doğum ağırlıklarının 5.47 ± 0.39 gr ve kontrol grubundan düşük olduğunu tespit etmişlerdir. 21 günlük yavruların femur boylarının ise kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğunu (kontrol: 21.1 ± 0.3 , deney grubu 19.1 ± 1.6 mm) bildirmişlerdir. Ayrıca nikotin uygulanan gruptaki 21 günlük yavruların kemik dansitelerinin, epifiz ve hipertrofik zon kalınlıklarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olduğunu rapor etmişlerdir (112).

Carmines ve ark. (2003) çiftleşmeden önce 4 hafta süresince sigara dumanına maruz bırakılan erkek ratlar ile gebelik öncesi (2 hafta) ve gebelik süresince (20 gün) sigara dumanına maruz bırakılan dişi ratların fetuslarında nikotinin teratojenik etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında ise 150 mg (total partikuler madde) TPM/m³ sigara dumanı uygulamasının fetal vücut ağırlıkları üzerinde etkisinin olmadığı, 300 ve 600 mg TPM/m³ dozlarının negatif yönde etkili olduğu bildirmişlerdir. 20. gün sezaryen ile çıkarılan fetüsler iskelet gelişimi açısından değerlendirildiğinde 150 mg TPM/m³

(11.2 ± 1.09 mg/mg³ Nikotin) dozunun teratojenik etki göstermediği fakat doza bağlı olarak 300 mg TPM/m³ (18.6 ± 2.07 mg/m³ Nikotin) ve 600 mg TPM/m³'e (41.8 ± 3.71 mg/m³ Nikotin) maruz kalan gruplarda eksik veya osifike olmamış kemiklerin sayısında (suftaoccipital, sternebrae) önemli bir artışın olduğu rapor edilmiştir (6).

Bizde deneyimizde Baştuğ ve ark. gibi nikotin uygulanan annelerin fetuslarında ön ve arka ekstremitelere ait uzun kemiklerin total boy uzunluklarının, kemikleşme sergileyen bölgelerin uzunluklarının ve bu kemiklerin kemikleşme oranlarının kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha az olduğunu belirledik. Yüksek doz nikotin verilen grupta 4 fetusun ön ve arka ekstremitelerindeki uzun kemiklerde kemikleşme görülmedi. Çalışmamızda el ve ayak iskeletine ait kemiklerde kemikleşme dereceleri incelendiğinde; düşük doz nikotin grubunda kontrol grubuna göre tam ossifikasyon sergileyen metakarp ve metatarsalların sayısının azaldığı, yüksek doz nikotin grubunda ise tam kemikleşmenin el ve ayak iskeletinde görülmediği tespit edildi. Çalışmamızda belirlemiş olduğumuz kemikleşme derecesi ve nikotin dozu arasındaki zıt yöndeki ilişki Carmines ve ark. (2003) bulguları ile benzerlik sergilemekteydi.

Nikotinin canlılarda oksidan-antioksidan dengesini bozarak teratojenik etki gösterdiği bir çok çalışmada belirtilmiştir. Mızrak ve ark (2010) çalışmalarında nikotinin (düşük doz 0.4 mg/kg ve yüksek doz 6 mg/kg) prenatal ve postnatal dönemde kullanımının yavru ratların anatomik ve fizyolojik gelişimine zarar verdiğini göstermişlerdir. Doğumdan sonraki 12. ayda ratlarda düşük doz nikotinin herhangi bir fizyolojik zarara yol açmadığı fakat bağımlılığa neden olduğunu belirlemişlerdir. Yüksek doz nikotin gruplarında ise kontrol grubuna göre karaciğer MDA düzeylerinde anlamlı bir yükseklik, böbrek SOD aktivitelerinde ise anlamlı bir düşüş saptanmışlardır. Nikotinin oksidan-antioksidan dengesini bozarak fizyolojik gelişim parametrelerinde ciddi değişimlere yol açtığını tespit etmişlerdir (5).

Son yıllarda nikotine karşı doğal veya sentetik antioksidanların koruyucu etkisi araştırmacıların dikkatini çekmektedir, bu antioksidanların en güçlülerinden biri de melatonindir. Yavaşcan ve ark. (2005), Sener ve ark. (2004) ve Baykan ve ark. (2008) fetal gelişimde nikotinin teratojenik etkilerine karşı maternal ratlara i.p. olarak melatonin uygulamışlardır. Bu çalışmalarda 10 mg/kg melatonin dozu, uygulama şekli olarak da i.p. enjeksiyon tipi tercih edilmiştir. Çalışmalarda ayrıca sirkadiyen ritm gözönüne

alınarak enjeksiyonları saat 17:00'de yapılmıştır. Bizde çalışmamızda literatüre benzer şekilde melatonin dozunu 10 mg/kg olarak belirledik ve enjeksiyonları gebeliğin ilk gününden 20. gününe kadar saat 17:00'de i.p. olarak uyguladık.

Yavaşcan ve ark. (2005) maternal nikotin kullanımı (yüksek doz 6 mg/kg/gün, düşük doz 3 mg/kg/ gün) sonucu yavrularda oluşan miyokardiyal hasara karşı antioksidan ajanlar olan melatonin (10 mg/kg/gün) ve ginkgo bilobanın (150 mg/kg/gün oral) olası koruyucu etkilerini biyokimyasal ve patolojik parametreler kullanarak değerlendirmiştir. Ratlara gebelik öncesi, gebelik ve laktasyon süresi boyunca toplam 11 hafta nikotin uygulaması, gebelik ve üç haftalık laktasyon boyuncada melatonin uygulaması yapılmıştır. Çalışma sonucunda nikotine bağlı miyokardiyal hasarın patogeneğinde miyokardiyal antioksidan enzimlerde azalmanın (miyokardiyal GSH-Px ve SOD değerlerinde azalma) serbest radikallerde ve lipid peroksidasyon ürünlerinde artışın rol oynadığı tespit etmişlerdir. Melatoninin ise belirtilen dozda miyokardiyal MDA ve NO düzeylerinde anlamlı düşüşü ve miyokardiyal GSH-Px ve SOD düzeylerinde ise anlamlı artışı sağlayarak antioksidan özellik sergilemiştir. Çalışmalarında melatoninin nikotine bağlı ağır kardiyak hasarı önleyebileceği sonucuna varmışlardır (8).

Kapucu ve ark. (2004) kronik nikotin uygulamasının (0.6 mg/kg nikotin bitartarat) ürogenital sistem ve aorta neden olabileceği oksidan hasara karşı melatoninin (10 mg/kg) koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında Wistar Albino türü gebe ratlara 21 gün süresince hem nikotin hem de melatonin uygulaması yapmışlardır. Sonuç olarak nikotinin yeni doğan ratlarda urogenital sistemde ve aortada oksidan hasara neden olduğu ve buna bağlı olarak doku fonksiyonlarını bozduğunu belirlemişlerdir. Güçlü bir antioksidan olan melatoninin ise lipid peroksidasyon ve glutatyon düzeylerinde artışa sebep olarak belirlenen bu oksidan hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (9).

Baykan ve ark. (2008) hamilelik ve emzirme döneminde nikotin uygulanmış gebe ratların yeni doğan yavrularında melatoninin nikotine bağlı miyokardiyal hasarı önlemedeki rolünün araştırmışlardır. Bu çalışmada Sprague-Dawley ratlara yüksek doz (6 mg/kg) ve düşük doz (1 mg/kg) nikotin uygulaması (gebeliğin başından laktasyon periyodu bitene kadar 11 hafta) yapılmış tedavi grubuna ise ek olarak melatonin (10 mg/kg) verilmiştir. Çalışmaları sonucunda melatoninin serbest radikaller olan NO ve MDA düzeylerini düşürdüğü, plasma GSHPx ve SOD düzeylerini yükselttiği böylelikle nikotin oluşturdugu myokard hasarına karşı koruyucu etki gösterdiğini rapor etmişlerdir (10).

Birçok teratojenik maddenin iskelet sistemi üzerinde oluşturabileceği muhtemel hasarlara karşı antioksidan etkileri nedeniyle melatoninin koruyucu rolü literatürde değişik yöntemlerle çalışılmıştır

Mahabady ve ark. (2011) sodyum valproat uygulanmış maternal ratların yavrularında muhtemel oluşabilecek iskelet sistemi hasarlarına karşı melatoninin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Sadece 300 mg sodyum valproat uygulanan gebe ratların fetuslarının %17.70'inde yarık damak, %20'sinde spida bifida ve %20'sinde ise eksensefali görüldüğünü rapor etmişlerdir. Tedavi gruplarından 5 mg/kg melatonin uygulanan grupta ise sırasıyla bu anomalilerin %4.16, %8.33, %8.33 şeklinde, 10 mg/kg melatonin uygulanan grupta ise %5.2, %0, %0 şeklinde olduğunu belirlemişlerdir. (120).

Çalışmamızda 3 mg/kg nikotin ve 6 mg/kg nikotin verilen gebe ratların fetuslarında ekstremitte kemiklerinde oluşan kemikleşmedeki gecikmeye karşı melatoninin koruyucu etkisi araştırıldı. Scapulalarda kemikleşme oranları kontrol grubunda 39.30 ± 1.7 , düşük doz nikotin grubunda 33.35 ± 3.45 , yüksek doz nikotin grubunda ise 29.31 ± 8.54 olarak belirlendi. 10 mg/kg melatonin verilen düşük doz nikotin+melatonin grubunda kemikleşme derecesi 37.95 ± 5.14 , yüksek doz nikotin+melatonin grubunda ise 36.09 ± 3.10 olarak hesaplandı. Üst ve alt ekstremitedeki diğer kemikleri incelediğimizde (humerus, radius, ulna, femur, tibia, fibula) tedavi gruplarındaki nikotine karşı 10mg/kg melatonin uygulamasının sadece 3mg/kg nikotin uygulanan gruba göre kemikleşme oranını %10, 6 mg/kg nikotine karşı ise %22 oranında artırdığı sonucuna ulaşıldı. Melatonin uygulaması sonucu elde etmiş olduğumuz bulgular literatür ile uyumluluk göstermekte olup 10 mg/kg melatoninin doz uygulamasının nikotin iskelet sistemindeki oluşturduğu teratojenik hasara karşı koruyucu rol oynadığı belirlendi.

Çalışmamız sonucunda nikotine maruz kalan gebe ratların fetuslarında nikotin dozu ile orantılı olarak; düşük doğum ağırlığında artma, baş-kıç uzunluğunda kısalma, tam ossifikasiye olmuş kemik sayısında azalma, kemik gelişiminde gecikme ve buna bağlı olarak kemikleşme oranında azalma tespit edildi. Nikotine karşı melatonin veriliğinde ise; doğum ağırlığı ve boy uzunluklarının artış göstererek kontrol grubuna yaklaştığı, ossifikasiye olmayan kemiklerin sayısının azaldığı ve kemik gelişiminde normal gelişimin yakalandığı belirlendi. Melatoninin antioksidan özellikleri nedeniyle kemik gelişiminde nikotine karşı güçlü bir koruyucu rolü olduğunu ve sonuçlarımızın melatonin ile ilgili gelecekte yapılacak çalışmalara fayda sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Soy K. Gebelikte kullanılan ilaçların teratojenik etkileri. Zeynep Kamil Tıp Bülteni 1987; 19: 397-400.
2. Süzer Ö. Süzer Farmakoloji. 3. Baskı, Kelebek Matbacılık, İstanbul 2005: ss 295-303.
3. Nesil T. Sıçanlarda Nikotin Tercihinin Olusturulması ve Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2007: 12.
4. Yıldız A. Gebelik Ve Laktasyon Döneminde Nikotine Maruz Kalan Wistar Albino Sıçanların Yavrularının Akciğerlerinde Meydana Gelen Değişiklikler Ve Bu Değişiklikler Üzerine Melatoninin Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Malatya 2012: 22.
5. Mızrak S. Pre-Postnatal Nikotin Maruziyetinin Sıçanda Oksidan Stres Ve Antioksidan Savunma Parametrelerine Etkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, İzmir 2010: 13.
6. Carmines EL, Gaworski CL, Faqi AS, et al. In Utero Exposure to 1R4F Reference Cigarette Smoke: Evaluation of Developmental Toxicity. Toxicol Sci 2003; 75: 134-47.
7. Xiao DL, Wang L, Huang X, et al. Protective Effect of Antenatal Antioxidant on Nicotine-Induced Heart Ischemia-Sensitive Phenotype in Rat Offspring. PLoS One 2016; 26; 11.
8. Yavaşcan S. Maternal nikotin kullanımının yavru rat kalbine etkisinin melatonin ve ginkgo biloba kullanımı ile önlenebilirliği, Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri 2005: 1.
9. Sener G, Kapucu C, Paskaloglu K, et al. Melatonin reverses urinary system and aorta damage in the rat due to chronic nicotine administration. J Pharm Pharmacol 2004; 56: 359-66.
10. Baykan A, Narin N, Narin F, et al. The protective effect of melatonin on nicotine-induced myocardial injury in newborn rats whose mothers received nicotine. Anadolu Kardiyol Derg 2008; 8: 243-8.

11. Soysal H. Sıçan fetuslarında fenitoin, folik asit ve vitamin E'nin kemik gelişimi üzerine etkileri. Doktora tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2010: 4-20.
12. Söylemezoğlu T. İlaçların ve Kimyasal Maddelerin Teratojen Etkileri. Diyarbakır Eczacı Odası Bülteni 1986; 2: 31-33.
13. D'Souza MS, Markou A. Neuronal mechanisms underlying development of nicotine dependence: implications for novel smoking-cessation treatments. *Addict Sci Clin Pract* 2011; 6: 4-16.
14. Doğan YH. Nikotin Beyindeki Ödül Sistemleri Üzerindeki Etkisinde Cinsiyet Farklılığı, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir 2006: 8.
15. Akkoyun HT. Fötal Dönemde Nikotine Maruz Kalan Sıçanlarda Oluşan Böbrek Hasarının Engellenmesinde Ellagic Asitin Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum 2012: 16.
16. Benowitz NL, Hukkanen J, Jacob P. Nicotine Chemistry, Metabolism, Kinetics and Biomarkers. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 192: 29–60.
17. Kayıran İS. Gebe Sıçanlara Verilen Nikotin Ve Alkolün Yenidoğanların İntervertebral Disk Konnektif Dokuları ve Nukleus Pulposus Üzerine Histopatolojik Etkileri, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kahramanmaraş 2010: 29.
18. WEB_(2015).<http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/nicotine.htm#PartTitle:1> (24.10.2015).
19. WEB_(2015).http://www.sciencemadness.org/library/books/the_plant_alkaloids.pdf (1.11.2015).
20. Ayers JT, Xu R, Dwoskin LP, et al. A General Procedure for the Enantioselective Synthesis of the Minor Tobacco Alkaloids Nornicotine, Anabasine, and Anatabine. *The AAPS Journal* 2005; 7: 752-58.
21. Ludwig J, Höffle-Maas A, Samochocki M, et al. Localization by site-directed mutagenesis of a galantamine binding site on $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor extracellular domain. *J Recept Signal Transduct Res* 2010; 30: 469-83.
22. Changeux JP. The nicotinic acetylcholine receptor: the founding father of the pentameric ligand-gated ion channel superfamily. *J Biol Chem* 2012; 287: 40207-15.

23. Foll BL, Goldberg ST. Effects of nicotine in experimental animals and humans: an update on addictive properties. *Handb Exp Pharmacol* 2009; 192: 335–367.
24. Parrott AC. Nesbitt's Paradox resolved? Stress and arousal modulation during cigarette smoking. Department of Psychology, Tehisis Of Doctora, University of East London 1998: 27-39.
25. Xue Y, Domino EF. Tobacco/Nicotine and Endogenous Brain Opioids Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2008; 32: 1131–1138.
26. Parrott AC. Nicotine psychobiology: how chronic-dose prospective studies can illuminate some of the theoretical issues from acute-dose research. *Psychopharmacology (Berl)* 2006; 184: 567-76.
27. Marshall DL, Redfern PH, Wonnacott S. Presynaptic nicotinic modulation of dopamine release in the three ascending pathways studied by in vivo microdialysis: comparison of naive and chronic nicotine-treated rats. *J Neurochem* 1997; 68: 1511-9.
28. Jarvis MJ1, Russell MA, Benowitz NL, et all. Elimination of Cotinine from Body Fluids: Implications for Noninvasive Measurement of Tobacco Smoke Exposure. *Am J Public Health* 1988; 78: 696-8.
29. Valenca SS, Gouveia L, Pimenta WA, et all. Effects of Oral Nicotine on Rat Liver Stereology. *Int J Morphol* 2008; 26:1013-1022.
30. Akl EA, Jawad M, Lam WY, et all. Motives, beliefs and attitudes towards waterpipe tobacco smoking: a systematic review. *Harm Reduct J* 2013; 10: 12.
31. Coleman I. Pharmacologic intervention in habitual smoking. *Ochsner J* 1999; 1: 145-8.
32. Cropley M, Ussher M, Charitou E. Acute effects of a guided relaxation routine (body scan) on tobacco withdrawal symptoms and cravings in abstinent smokers. Department of Psychology, University of Surrey, Guildford 2007: 989-93.
33. Benwell MEM, Balfour DJK. The effects of acute and repeated nicotine treatment on nucleus accumbens dopamine and locomotor activity. *Br J Pharmacol* 1992; 105: 849-856.
34. Yani DC, Sahraei H, Meftahi GH, et all. Effect of Transient Inactivation of Ventral Tegmental Area on the Expression and Acquisition of Nicotine-Induced Conditioned Place Preference in Rats. *Iranian Biomedical Journal* 2015; 19: 214-219.

35. Teo MY, Wyk MW, Lin J, et al. Differential effects of nicotine on the activity of substantia nigra and ventral tegmental area dopaminergic neurons in vitro. *Acta Neurobiol Exp* 2004; 64: 119-130.
36. Coleman I. Pharmacologic intervention in habitual smoking. *Ochsner J* 1999; 1: 145-8.
37. Xiu X, Puskar NL, Shanata JAP, et al. Nicotine Binding to Brain Receptors Requires a Strong Cation- π Interaction. *Nature* 2009; 458: 534–537.
38. Hicks JH, Dani JA, Lester RAJ, et al. Regulation of the sensitivity of acetylcholine receptors to nicotine in rat habenula neurons. *J Physiol* 2000; 15: 579-97.
39. Tu B, Gu Z, Shen J, et al. Characterization of a nicotine-sensitive neuronal population in rat entorhinal cortex. *J Neurosci* 2009; 29: 10436–10448.
40. Jiloha RC. Biological basis of tobacco addiction: Implications for smoking-cessation treatment. *Indian J Psychiatry* 2010; 52: 301-7.
41. Hezel M, Groat WC, Galbiati F. Caveolin-3 Promotes Nicotinic Acetylcholine Receptor Clustering and Regulates Neuromuscular Junction Activity *Mol Biol Cell* 2010; 15: 302-10.
42. Albuquerque EX, Pereira EFR, Alkondon M, et al. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* 2009; 89: 73–120.
43. Stewart BW and Kleihues P. International Agency for Research on Cancer World Cancer Report, IARC, Lyon, 2003: pp 133-157.
44. Knezevich A, Muzic BSJ, Hatsukami BSD, et al. Nornicotine Nitrosation in Saliva and Its Relation to Endogenous Synthesis of N'-Nitrosonornicotine in Humans. *Nicotine Tob Res* 2013; 15: 591-5.
45. Wong HSP, Yu L, Lam EKY, et al. Nicotine Promotes Colon Tumor Growth and Angiogenesis through β -Adrenergic Activation. *Toxicol Sci* 2007; 97: 279-87.
46. Ye YN, Liu ESL, Shin VY, et al. Nicotine Promoted Colon Cancer Growth via Epidermal Growth Factor Receptor, c-Src, and 5-Lipoxygenase-Mediated Signal Pathway. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 66-72.
47. Lang K, Drell TL, Lindecke A, et al. Induction Of A Metastatogenic Tumor Cell Type By Neurotransmitters And Its Pharmacological Inhibition By Established Drugs. *Int J Cancer* 2004; 112: 231–8.

48. WEB_ California Department web site.
<http://www.cdph.ca.gov/programs/tobacco/Documents/Media/State%20Health-e-cig%20report.pdf>. erişim tarihi 24.12.2015.
49. Schraufnagel DE, Blasi F, Drummond MB, et al. Am J Respir Crit Care Med 2014; 190: 611-8.
50. Behnke M and Smith VC. Prenatal substance abuse: short- and long-term effects on the exposed fetus. Pediatrics 2013; 131: 1009-24.
51. Öncü SK. Gebelikte Ve Laktasyon Döneminde Nikotin Maruziyetinin Kognitif Fonksiyonlar Üzerine Olan Olumsuz Etkileri Omega 3 Kullanımı İle Önlenebilir Mi?, Tıpta Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri 2012: 4-6.
52. Rocha MIPNM. Nicotine effects on bone metabolism: in vitro studies with human osteoclasts and co-cultures of osteoclasts and osteoblasts in an hydroxyapatite surface, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto, Master Thesis, Porto 2011: 20-32.
53. Fang Y and Svoboda KKH. Nicotine inhibits human gingival fibroblast migration via modulation of Rac signalling pathways. J Clin Periodontol 2005; 32: 1200–1207.
54. Abate M, Vanni D, Pantalone A, et al. Cigarette smoking and musculoskeletal disorders. Muscles, Ligaments and Tendons Journal 2013; 3: 63-69.
55. Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, Classification, and Pharmacology of G Protein-Coupled Melatonin Receptors. Pharmacol Rev 2010; 62: 343-80.
56. Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowska I, et al. Localization And Biological Activities Of Melatonin In Intact And Diseased Gastrointestinal Tract (Git). Journal Of Physiology And Pharmacology 2007; 58: 381-405.
57. WEB_ (2015) sleepdex website, <http://sleepdex.org/melatonin.htm> (16.12.2015).
58. Ayturan A. Nos İnhibisyonu Ve Tuz İle Oluşturulan Hipertansiyonda Melatoninin Kan Basıncı, Adma, Rho Kinaz, NADPH Oksidaz, Hsp90, Kaveolin-1 Düzeyleri Ve Vasküler Cevaplara Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ 2013: 22-24.
59. Peres R, Amaral FG, Marques AC, et al. Melatonin Production in the Sea Star *Echinaster brasiliensis* (Echinodermata). Biol Bull 2014; 226: 146-51.

60. Porter JK, Stuedemannt JA, Thompson FN, et al. Melatonin and Pineal Neurochemicals in Steers Grazed on Endophyte-Infected Tall Fescue: Effects of Metoclopramide. *J. Anim. Sci* 1993; 71: 1526-1531.
61. Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtmant RJ, et al. Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 91: 1824-8.
62. He C, Wang J, Zhang Z, et al. Mitochondria Synthesize Melatonin to Ameliorate Its Function and Improve Mice Oocyte's Quality under in Vitro Conditions. *Int. J. Mol. Sci* 2016; 17: 939.
63. Özçelik F, Erdem M, Bolu A, et al. Melatonin: Genel Özellikleri ve Psikiyatrik Bozukluklardaki Rolü. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar-Current Approaches in Psychiatry* 2013; 5: 179-203.
64. Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, et al. Functional roles of melatonin in plants, and perspectives in nutritional and agricultural science. *Journal of Experimental Botany* 2012; 63: 577–97.
65. Boutin JA, Audinot V, Ferry G et al. Molecular tools to study melatonin pathways and actions. *J Exp Bot* 2012; 63: 577-97.
66. Flores DG, Velardo B, Garrido M, et al. Ingestion of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindl. cv. Crimson Globe) increases the urinary 6-sulfatoxymelatonin and total antioxidant capacity levels in young, middle-aged and elderly humans: Nutritional and functional characterization of their content. *Journal of Food and Nutrition Research* 2011; 50: 229-236.
67. Hardeland R. Melatonin in plants and other phototrophs: advances and gaps concerning the diversity of functions. *Journal of Experimental Botany* 2015; 66: 627–646.
68. Erdoğan E. Kortikal Displazi Oluşturulmuş Sıçanlarda Melatonin Kannabinoid-1 Reseptörü İlişkisi, Tıpta Uzmanlık Tezi, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi, Ankara 2010: 27.
69. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. 4. Baskı, Güneş Kitabevi, Cilt 2 Ankara 2012:289.
70. Dixon BJ, Reis C, Ho WM, et al. Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Int. J. Mol. Sci* 2015; 16: 22368-22401.
71. Crowley SJ and Carskadon MA. Modifications To Weekend Recovery Sleep Delay Circadian Phase In Older Adolescents. *Chronobiol Int* 2010; 27: 1469–1492.

72. Tal1 O, Haim A, Harel1 O, et all. Melatonin as an antioxidant and its semi-lunar rhythm in green macroalga *Ulva* sp. *Journal of Experimental Botany* 2011; 62: 1903–1910.
73. Kenan S. Erişkin Erkek Farelerde 2,4 D-Amin İle Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine Melatoninin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 2014: 28.
74. Lincoln GA, Andersson H, Loudon A. Clock genes in calendar cells as the basis of annual timekeeping in mammals – a unifying hypothesis. *Journal of Endocrinology* 2003; 179: 1–13.
75. Faber MS, Jetter A, Fuh U. Assessment of CYP1A2 Activity in Clinical Practice: Why, How, and When. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2005; 97: 125–134.
76. Schernhammer ES, Rosner B, Willett WC. Epidemiology of Urinary Melatonin in Women and Its Relation to Other Hormones and Night Work. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 936-943.
77. Vico1 AC, Reiter RJ, Lardone PJ, et al. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2006; 7: 423-431.
78. Tan DJ, Chen LD, Poeggeler B, et al. Melatonin: a potent endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine Journal* 1993; 1: 57-60.
79. Reiter RJ, Manchester LC, Tan DX. Neurotoxins: free radical mechanisms and melatonin protection. *Curr Neuropsychopharmacol.* 2010; 8: 194-210.
80. Lowes DA, Webster NR, Murphy MP. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *British Journal of Anaesthesia* 2013; 110: 472–80.
81. Duell PB, Wheaton DL, Shultz A, et al. Inhibition of LDL oxidation by melatonin requires supraphysiologic concentrations. *Clinical Chemistry* 1998; 44: 1931–6.
82. Pieri C, Marra M, Moroni F, et al. Melatonin: a peroxyl radical scavenger more effective than vitamin E. *Life Sci.* 1994; 55: 271-6.
83. Vico AC, Lardone PJ, Santos JMF, et al. Human Lymphocyte-Synthesized Melatonin Is Involved in the Regulation of the Interleukin-2/Interleukin-2 Receptor System. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2005; 90: 992–1000.

84. Hickman AB, Klein DC, Dyda F. Melatonin Biosynthesis: The Structure of Serotonin N-Acetyltransferase at 2.5 Å Resolution Suggests a Catalytic Mechanism. *Molecular Cell* 1999; 3: 23–32.
85. Fumero ALM and Gonzalez PA. Role of Melatonin in Schizophrenia. *Int J Mol Sci* 2013; 14: 9037-50.
86. Leersnyder HD, Bresson JL, Blois MC, et al. β 1-adrenergic antagonists and melatonin reset the clock and restore sleep in a circadian disorder, Smith-Magenis syndrome. *J Med Genet* 2003; 40: 74–78.
87. Benova TE, Bacova BS, Viczenczova C. Protection of Cardiac Cell-to-Cell Coupling Attenuate Myocardial Remodeling and Proarrhythmia Induced by Hypertension. *Physiol. Res* 2016; 65: 29-42.
88. Opie LH and Lecour S. Melatonin has multiorgan effects *European Heart Journal – Cardiovascular Pharmacotherapy* 2016; 2: 258–265.
89. Andersen LPH, Werner MU, Rosenberg J, et al. A systematic review of peri-operative melatonin. *Anaesthesia* 2014; 69: 1163–1171.
90. Millán IC, Carballo AM, Casas IM, et al. Methylphenidate Ameliorates Depressive Comorbidity in ADHD Children without any Modification on Differences in Serum Melatonin Concentration between ADHD Subtypes. *Int. J. Mol. Sci* 2014; 15: 17115-17129.
91. Peres MFP, Masruha MR, Zukerman E, et al. Potential therapeutic use of melatonin in migraine and other headache disorders. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2006; 15: 367-375.
92. Wang DQH and Carey MC. Therapeutic uses of animal biles in traditional Chinese medicine: An ethnopharmacological, biophysical chemical and medicinal review. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 9952-75.
93. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, et al. One molecule, many derivatives: A never ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res.* 2007; 42: 28-42.
94. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Temel Histoloji*. 7. Baskı, Aytekin Y (Editör), Barış Kitabevi, İstanbul 1993: ss 158-195.
95. Ünlü FY. Sıçan Fetuslarında Ve Yenidoğanlarında Dekametazonun Kemik Gelişimi Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2016: 9-19.

96. Atalay C. Hidroksiapatit Esaslı Kemik Grefti- Trombositten Zengin Plazma Kombinasyonunun Tavsan Maksillasında Oluşturulan Deneysel Kemik Defektlerinde Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkilerinin Histolojik Açıdan Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2011: 6-17.
97. Özdamar S, Yakan B, Kutlubay R. Genel Histoloji. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Kayseri 2000: ss 47-74.
98. Işık D. Er, Cr:Ysgg Lazer Ve Cerrahi Frezle Oluşturulan Kemik Defektlerinde Kemik Morfogenetik Protein (Bmp) ve Greft Materyali (B-Tcp+Ha) Uygulanarak Kemik İyileşmesinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2008: 35-44.
99. Gürer MU. Deneysel Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerine Uygulanan Sentetik Kemik Grefti Ve Bazik Fibroblast Büyüme Faktörünün Yeni Kemik Oluşumuna Etkisinin Histomorfometrik Olarak İncelenmesi, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas 2011: 3-8.
100. Burdurlu Ç. Kritik Boyutlu Kemik Defektlerinde Lokal Simvastatin Ve Led İle Uygulanan Fotobiyomodülasyonun Kemik İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Histopatolojik İncelenmesi, Doktora Tezi, Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul 2014: 5-18.
101. Özer K. Ratlarda Oluşturulan Kritik Boyutlu Kemik Defektlerine Doksisisiklin Veya Rifamisin İle Karıştırılarak Uygulanan Sığır Kaynaklı Demineralize Kemik Greftinin Kemik İyileşmesine Olan Etkisinin Histomorfometrik Olarak İncelenmesi, Doktora Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sivas 2014: 3-10.
102. Uygur HŞ. Kritik Büyüklükteki Kranial Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Devekuşu Yumurtası Ve Demineralize Kemik Matriksinin Etkilerinin Karşılaştırılması, Tıpta Uzmanlık Tezi, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara 2009: 1-10.
103. Hebel R, Stromberg MW. Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat. BioMed Verlag Wörthsee, 1986; 9: 231-57.
104. Öztürk M. Sıçan ön ekstremitesine ait kemiklerin gelişimi esnasında ortaya çıkan kemik ve kıkırdak alanların ikili boyama yöntemi ile tespiti ve stereolojik yöntemle

- oranlarının hesaplanması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2014: 40-60.
105. Özkan ZE. Macro-Anatomical Investigations on the Forelimb Skeleton of Mole-Rat (*Spalax leucodon* Nordmann) III Skeleton axiale. *Veterinarski Arhiv* 2007; 77: 281-289.
 106. Menegola E, Broccia ML, Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. *Teratology* 2001; 64: 125-133.
 107. Sunay BF. İkili İskelet Boyamaları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 31: 119-126.
 108. Sunay FB, Ersoy S, Kahveci Z. İkili iskelet boyamasında mikrodalga ışınının kullanılması. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2009; 35: 113-118.
 109. Vurbic D, Higgins ST, P McDonough SR, et al. Maternal Body Mass Index Moderates the Influence of Smoking Cessation on Breast Feeding Nicotine & Tobacco Research 2014; 16; 527–535.
 110. Hideki Tanaka, Tanabe N, Kawato T, et al. Nicotine Affects Bone Resorption and Suppresses the Expression of Cathepsin K, MMP-9 and Vacuolar-Type H⁺ - ATPase d2 and Actin Organization in Osteoclasts. *PLoS One* 2013; 8: 59402.
 111. Oruç Ş. Ratlarda hamilelik döneminde verilen nikotinin, neonatal dönemde molar dişler üzerine etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır 1996: 7-15.
 112. Kurtoglu S, Gunes T, Koklu E, et al. Influence of Maternal Nicotine Exposure on Neonatal Rat Bone: Protective Effect of Pentoxifylline. *Exp Biol Med* 2007; 232:398-405.
 113. Mayer B. How much nicotine kills a human? Tracing back the generally accepted lethal dose to dubious self-experiments in the nineteenth century. *Arch Toxicol* 2014; 88: 5–7.
 114. Akkoyun HT. Fötal Dönemde Nikotine Maruz Kalan Sıçanlarda Oluşan Böbrek Hasarının Engellenmesinde Ellagic Asitin Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Erzurum 2012: 87-100.
 115. Banderalli G, Martelli A, Landi M, et al. Short and long term health effects of parental tobacco smoking during pregnancy and lactation: a descriptive review. *Transl Med* 2015; 13: 327.

116. Khaldoyanidi S, Sikora L, Orlovskaya I, et al. Correlation between nicotine-induced inhibition of hematopoiesis and decreased CD44 expression on bone marrow stromal cells. *Blood* 2001; 98: 303-12.
117. Ataibış T. Ratlarda Prenatal Nikotin Alımının Diş Sürmesi Ve Çene Gelişimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun 2012: 41-60.
118. Feltes BC, Poloni JF, Notari DL, et al. Toxicological Effects of the Different Substances in Tobacco Smoke on Human Embryonic Development by a Systems Chemo-Biology Approach. *PLoS One* 2013; 8: 61743.
119. Kawakita A, Sato K, Makino H, et al. Nicotine Acts on Growth Plate Chondrocytes to Delay Skeletal Growth through the $\alpha 7$ Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptor. *Plos One* 2013; 8; 3945.
120. Mahabady M, Najafzadeh H, Ranjbar R, e al. Melatonin and Vitamin E Protects Against Sodium Arsenite-Induced Skeletal Malformations in Rats. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* 20113; 3: 184-9.



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 12.08.2015
No:15/97

Toplantı Sayısı: 07

Karar

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 12.08.2015 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Çağrı ŞAKALAR	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	KATILMADI
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	KATILMADI
Nüket KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	KATILMADI
Serpil SARIÖZKAN	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	KATILMADI
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Hamiyet ÜNAL	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	
Asiye GÖKBELEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi A.D.'dan Doç. Dr. Tolga ERTEKİN tarafından sunulan "Nikotinin Embriyonal Kemik Gelişimi Üzerindeki Teratojenik Etkisine Karşı Melatoninin Koruyucu Rolü." başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 12.08.2015
Etik kurul Başkan Vekili : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA
İmza :

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Halil YILMAZ
Uyruğu : Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 21 Ağustos 1987, Melikgazi\KAYSERİ
Medeni Durumu : Bekâr
Tel : +90 554 237 59 73
E-mail : halil87yilmaz@hotmail.com
Yazışma Adresi : Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı - KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ Tıp Fakültesi Anatomi AD	2016
Lisans	Muğla Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu	2011
Lise	Kocasinan Yabancı Dil Ağırlıklı Lise	2005

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2015–	Nevşehir Hacı Bektaş Veli Üniversitesi	Öğretim Görevlisi
2011-2015	75. Yıl İstikbal Reh. ADM	Fizyoterapist

YABANCI DİL

İngilizce (YDS-55.00)

YAYINLAR

- Yılmaz H**, Ertekin T, Atay E, Nisari M, Susar H, Al Ö, Payas A. Nikotin'in Sıçan Fetuslarında Arka Ekstremitte Kemik Gelişimi Üzerine Etkisi. 17. Ulusal Anatomi Kongresi, 5-9 Eylül 2016, Eskişehir (S28).
- Atay E, Ertekin T, **Yılmaz H**, Susar H, Al Ö, Nisari M, Yay A, Unur E. Hamilelik Döneminde Bisfenol A'ya Maruz Kalan Dişi Ratların Fetuslarında Ön Ekstremitte Kemik Gelişimlerinin İkili Boyama Yöntemi İle Belirlenmesi. 17. Ulusal Anatomi Kongresi, 5-9 Eylül 2016, Eskişehir (P108).

3. Susar H, Aycan K, Ertekin T, Nisari M, Ömerli A, Al Ö, Atay E, **Yılmaz H**. İdrar Kaçıran Kadınlarda Prolapsus Evrelerinin Pelvis Çaplarıyla İlişkisi. 17. Ulusal Anatomi Kongresi, 5-9 Eylül 2016, Eskişehir (P08).