

Intrauterin gelişme geriliğine bağlı olarak fetal sıçan beyinde nörogenezisde oluşan değişikliklerin immun dokukimyasal yöntemle araştırılması

Immunohistochemical study of the changes during neurogenesis in the fetal rat brain related to intrauterine growth retardation

Ayşegül Uysal¹ Hüseyin Aktuğ¹ Mine Yurtseven¹
Safiye Aktaş² Özlem Yılmaz¹

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İzmir

²Dr. Behçet Uz Çocuk Hastalıkları ve Cerrahisi Hastanesi, Patoloji Laboratuvarı, Alsancak-İzmir

Özet

Amaç: Intrauterin gelişme geriliği (IUGG); yenidoğan ve çocukluk çağı gelişimsel bozukluklarla sonuçlanan, öğrenme ve davranış problemleri yanısıra mental retardasyona da yol açan gebeliğin en iyi bilinen komplikasyonlarından biridir. Çalışmamızın amacı, deneysel intrauterin gelişme geriliği oluşturulan fetal sıçan beyinde nörogenezis sürecindeki olası değişikliklerin vimentin ile gliaların ve nöron spesifik enolaz (NSE) ile nöronların immün dokukimyasal yöntemle araştırılmasıdır.

Gereç ve yöntem: Fertilize edilen dişi sıçanlar 3 gruba ayrıldı: Grup I: Kontrol grubu: Maternal sıçan-lara herhangi bir işlem yapılmadı. Grup II: Deney grubu (IUGG): Maternal sıçanlara 18. günde bilateral uterin arter ligasyonu yapıldı. Grup III: Sham grubu: Maternal sıçanlara 18. günde bilateral uterin arter ligasyonu dışındaki cerrahi işlem uygulandı. 20. günde sezeryan ile fütuslar çıkarıldı. Fetal beyinler, vimentin ve nöron spesifik enolaz ile immün dokukimyasal boyandı ve ışık mikroskopunda incelendi.

Bulgular: Kontrol gruplarında ventriküler zon ve subventriküler zonda vimentin ve NSE olumlu immün boyanma görüldü. IUGG oluşturulan fetal sıçan beyni hipokampal ve bazal nukleus alanlarında vimentin ve NSE olumlu boyanmasının azaldığı saptandı.

Summary

Purpose: Intrauterine growth retardation (IUGR) is one of the well known complications of pregnancy which results with infant and childhood postnatal abnormal developmental disorders including educational and behavioral problems as well as mental retardation. The aim of this study is to investigate possible alterations during neurogenesis in experimental intrauterine growth retarded fetal rat brains with vimentin for glial cells and neuron specific immunohistochemically stained enolase (NSE) for neurons.

Material and method: Fertilized female rats were divided into 3 groups: Group I (control): No maternal surgical procedures were applied to this group. Group II: (experimental IUGR): Uterine arteries of the maternal rats were ligated bilaterally on 18 th day. Group III (scheme): Maternal rats underwent surgical procedures except for bilateral intrauterine artery ligation in this group. All fetuses were removed by sectio on 20 th day. Fetal brains were stained immunohistochemically by vimentin and neuron specific enolase and examined on the light microscopy.

Results: Vimentin and NSE immunopositive staining were determined at the ventricular and subventricular zone in the control groups. In the fetal rat brains related IUGR, decreased vimentin and NSE immuno-positive staining was detected at the hippocampal and basal nuclei regions.

Sonuç: İUGG oluşturulan fetal sıçan beyni hipokampal ve bazal nükleus alanlarında vimentin ve NSE olumlu boyanmasının azalması bu moleküllerin bulunduğu hücrelerin gelişim sürecinde hipoksi ve iskemik koşullarından etkilenmiş olabileceğini göstermektedir. Postnatal olarak yeni gelişen nöron ve nöroglial hücrelerin kaynağı olan ventriküler ve subventriküler zonların proliferasyon sırasında etkilenmiş olmasının; mitoz, migrasyon ve matürasyona zararlı olabileceği bilgisi ile uyumludur.

Anahtar sözcükler: İntrauterin gelişme geriliği, fetal beyin, vimentin, nöron spesifik enolaz

Intrauterin gelişme geriliği (İUGG) gebeliğin genel bir komplikasyonu olup; perinatal morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. Prenatal hipoksi ve iskeminin daha az şiddetli olaylarına bir adaptasyonu ve uzun dönem sinir gelişim morbiditesi ile bağlantılıdır (1,2). İUGG sıklıkla klinikte gelişimsel sinir hastalıkları ile sonuçlanan uteroplacental yetmezliğin bir sonucu olarak besin maddelerinin ve oksijenin plasental transport kronik eksikliği şeklinde meydana gelmektedir (3). İUGG olan çocuklar sıklıkla sonradan entellektüel defisitler göstererek önemli bir halk sağlığı problemine neden olur (4). Mental zorluk, eğitim ve davranış problemleri ile sonuçlanan yeni doğan ve çocukluk çağı anormal nörolojik gelişim bozukluğunun görülme sıklığında bir artış meydana getirir (4,5). Uteroplacental yetmezlik hipoksi-iskemi serebral hasar ile bağlantılıdır ve şiddetli prenatal hipoksi-iskemi beyinde nekroz ve apoptozise neden olup fetal kayıp ve perinatal ölümle sonuçlanır (6-8). Santral sinir sisteminde nöronlar prenatal ve erken postnatal dönemde proliferasyon, migrasyon ve farklılaşma ile oluşmakta bu periyoddaki uygun olmayan fetal koşullar sinir sistemi gelişimini de olumsuz yönde etkilemektedir (9).

Klinikte intrauterin gelişme geriliğinin nedeni daha kompleks bir olay olmasına karşın deneysel hayvanlarda İUGG oluşturmak için en çok kullanılan model uterin arter ligasyonudur (10-19). İUGG çalışmalarının çoğunda beyinde histopatolojik değişiklikler saptanmıştır. Bu araştırmaların çoğu, beyin ve beyincik korteksi (10,12,13,15-17), daha az olmak üzere hipokampus ile ilgilidir (14,17).

Nöronal migrasyon radial glial fibriller boyunca meydana gelmektedir. Radial glial hücreler gelişimin ileri döneminde astrositlere dönüşür. Vimentin, radial glial hücre ve immatür astrositlerde baskın bir öncül ara fibril olup, fetal santral sinir sisteminde nöroektodermal orijinli hücrelerin çoğunda ekspresyon edilir (20-24). NSE, enolaz izoenzimlerinden olup memeli beyinlerinde nöronlarda bulu-

Conclusion: Hippocampal and basal ganglia regions of the brains of fetal experimentally IUGR developed rats' showed decreased positive staining that might suggest the cells expressing these molecules could have been affected by hypoxic and ischemic insults. This finding is compatible with the information that ventricular and subventricular zones which are the sources of postnatal newly developing neuron and neuroglia, by being affected at the period of proliferation might endanger to mitosis, migration and maturation.

Key words: Intrauterine growth retardation, fetal brain, vimentin, neuron specific enolase

nur. Nöronların gelişimsel farklılaşma sürecinde nöron dışı enolaz'dan NSE'ye doğru bir değişim görüldüğü bildirilmiştir. Sıçan ve Rhesus maymunlarında, fetal ve erken postnatal beyin gelişimi sırasında, proliferatif zonlarda nöron dışı enolaz seviyeleri yüksek olmasına rağmen, NSE'nin matür sinir hücreleri için farklılaşma sürecinde spesifik bir işaretleyici molekül olduğu bildirilmiştir (25).

Nörogenesis regülasyonunda hücre içi ve hücre dışı faktörler major rol oynamasına rağmen, alta yatan esaslar belirgin değildir. Embriyonel ve fetal dönem nörogenesis sürecinde migrasyon ve nöronal gelişimde bilinen moleküllerin beyin anomalilerine tam olarak nasıl yol açtığı, intrauterin gelişme geriliğinde fetal sinir sistemi gelişimindeki patojenik mekanizma ve risk faktörlerinin nedenleri açıklanamamıştır. Deneysel olarak intrauterin gelişme geriliği oluşturulan sıçan fetal beyni nörogenesis ile ilgili sınırlı sayıda immün dokü kimyasal çalışma bulunmakta, vimentin ve NSE ile ilgili olarak immün dokü kimyasal çalışma saptanamamıştır. Çalışmamızda, amacımız maternal uterin arter ligasyonuna bağlı olarak deneysel intrauterin gelişme geriliği oluşturulan fetal sıçan beyinlerinde vimentin ile gliaların ve NSE ile nöronların immün dokü kimyasal boyanması ile nörogenesis sürecindeki olası değişikliklerin araştırılmasıdır.

Gereç ve yöntem

Araştırmada kullanılan sıçanlar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney hayvanları merkezinden temin edilerek, "Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu" tarafından (2003/30) onaylanmıştır. Yaklaşık 200 gr. Ağırlığında yetişkin Wistar türü dişi albino sıçanlar; 22±3°C oda ısısında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ışık koşullarında, standart yem ve çeşme suyu verilerek uygun kafeslerde tutuldu. Her kafeste dört dişi sıçan bir erkek sıçanla bir gece boyunca kafeslerde bir arada bırakıldı.

Ertesi sabah vaginal plak oluşan sıçanlar ayrı kafeslere alınıp embriyonik olarak 0. gün (E0) kabul edildi ve üç gruba ayrıldı:

Grup I: Kontrol grubu, n: 5: Bu gruptaki tüm sıçanlara maternal olarak herhangi bir işlem yapılmadı.

Grup II: Deney grubu (İUGG), n: 5: Maternal dişi sıçanlara 18. günde (E18) bilateral uterin arter ligasyonu yapıldı. Cerrahi işlem, intraperitoneal xylazine (6 mg/kg) ve ketamin (30 mg/kg) ile anestezi uygulanan sıçanlara orta hat karın insizyonundan sonra embriyolar aşağıya çekilip serviks hizasında bilateral olarak uterin arterlere ligasyon yapıldı, deri altı ve deri sütür ile kapatıldı (18,19).

Grup III: Sham grubu, n: 5: Maternal dişi sıçanlara 18. günde bilateral uterin arter ligasyonu dışındaki Grup II'de belirtilen diğer cerrahi işlemler uygulandı.

Tüm gruplardan 20. günde (E20) yukarıda belirtilen anestezi altında seksio ile fötusları çıkarıldı. Vimentin ve NSE immun dokukimyasal boyaması için her anneden iki fötüs ayrıldı. Fötuslardan çıkarılan beyinler % 4 fosfat tamponlu paraformaldehit (pH 7.4) +4°C'de 1 gün tespit edildikten sonra fosfat buffered saline (PBS) ile yıkama yapıldı. Yükselen derecelerdeki alkol dizisi, xylolde şeffaflandırma ve parafin işlemlerinden sonra beyinler frontal yönde dik olarak parafine gömüldü. Parafin bloklardan, mikrotomda (Leica MR 21455) 5 mikron kalınlığında dorsal hipokampus seviyesinden koronal seri kesitler poly-L-lysin'li lamlara alındı. Kesitlerin oda sıcaklığında kuruması sağlandıktan sonra immun dokukimya için seçilen preparatlar boyamadan 1 gece önce 60°C etüvde bekletildi, deparafinizasyon ve dereceli alkol dizilerinden sonra distile suda yıkanarak sınırlayıcı kalem ile çevresi çizildi. PBS ile yıkama, hidrojen peroksit (%3), distile su, sitrat tamponda (pH: 5.0) mikrodalga işlemi ve soğutma, PBS yıkama işlemlerinden sonra vimentin (Dako, Denmark), NSE (Dako, Denmark) primer antikorları uygulandı. PBS yıkamasından sonra biyotinlenmiş sekonder antikor, PBS ve avidin-peroksidaz (HRP) enzim konjugat ve kromojen olarak diaminobenzidin (DAB) uygulandı. Hematoksilin zit boyamasından sonra dehidrate edilip Entellan ile kapatıldı. Işık mikroskopunda (Nikon E400) incelenerek, bir büyük büyütme alanında (x400) immun olumlu boyanma gösteren hücreler sayıldı.

Bulgular

Vimentin immun dokukimyasal inceleme sonucunda sıçan fötal beyini dorsal hipokampal düzeyden alınan koronal kesitlerde tüm gruplarda dura, koroid plexusda olumlu boyanma görüldü. Kontrol grubunda vimentin ile, ventrikülleri çevreleyen ventriküler zon ve subventriküler zonda bulunan glial hücre fibrillerinde immun olumlu boyanma görüldü (Resim 1). Maternal uterin arter ligasyonu ile intrauterin gelişme geriliği meydana gelen fötal beyinler kontrol grubu ve sham ile karşılaştırıldığında hipokampus ve bazal nukleusta büyük büyütme alanına düşen olumlu reaksiyon veren hücrelerin azaldığı görüldü. Kontrol grubuna göre vimentin olumlu hücreler sham grubunda daha fazla, İUGG grubunda daha az saptandı. Hipokampus ve bazal nukleus bir büyük büyütme alanında ortalama olarak; kontrol grubunda 36 hücrede (Resim 2), sham grubunda 62 hücrede, İUGG grubunda ise 16 hücrede olumlu boyanma görüldü (Resim 3).

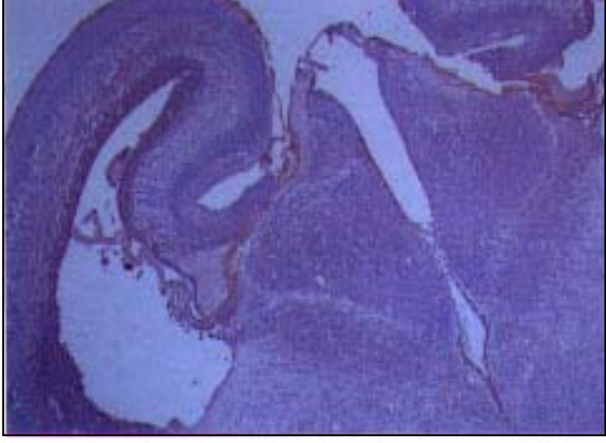
NSE immun dokukimya boyanmasında ise, kontrol grubunda ventriküler ve subventriküler zonda belirgin immun olumlu boyanma saptandı (Resim 4). Maternal uterin arter ligasyonu ile intrauterin gelişme geriliği meydana getirilen grupta hipokampus ve bazal nukleus alanlarında belirgin olarak immun olumlu hücrelerde azalma bulundu. Hipokampus ve bazal nukleus bir büyük büyütme alanında ortalama olarak kontrol grubunda 87 hücrede (Resim 5), sham grubunda 32 hücrede, İUGG grubunda ise 16 hücrede olumlu boyanma görüldü (Resim 6).

Tartışma

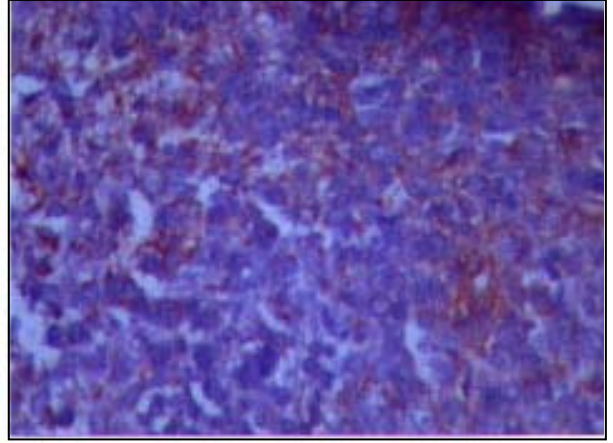
Santral sinir sistemi gelişiminde nöron ve nörogial hücreler; nöral tüp ventriküler ve subventriküler zondan prenatal ve erken postnatal dönemde proliferasyon, migrasyon ve farklılaşma ile oluşmaktadır. Bu gelişim sürecindeki olumsuz koşullardan beyin gelişimi olumsuz yönde etkilenmektedir (9).

İUGG çalışmalarının çoğunda beyinde histopatolojik değişiklikler tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda serebral myelinizasyonda (15), beyin kortikal kalınlık ve hipokampusta nöronal yoğunlukta belirgin azalma görülmüştür (17).

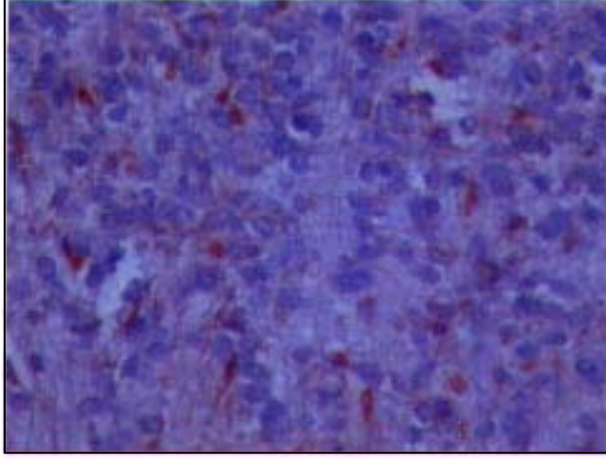
Tromboksan A-2 uygulanan İUBG sıçan modelinde, doğum sonrası yeterli beslenme olmasına rağmen postnatal 7. günde sıçanlarda gelişme geriliği, serebral kortekste incelenen (26), BrdU işaretlemesinden sonra postnatal serebral kortikal plakta işaretli hücrelerin belirgin ölçüde azaldığı ve nöronal migrasyonun geri kaldığı bildirilmiştir (27). İUGG oluşturulan sıçanlarda, serebral kortekste



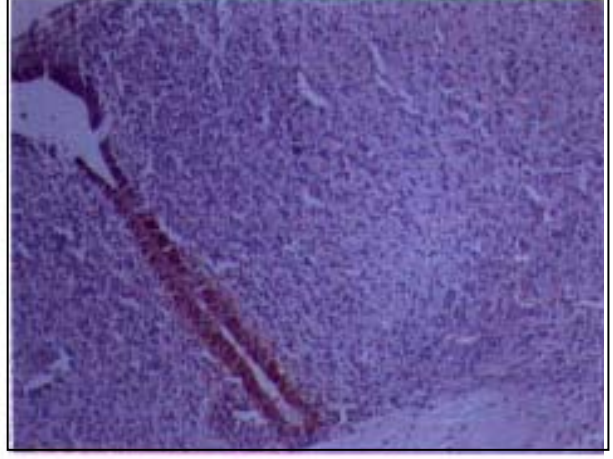
Resim 1. Kontrol grubu ftal sıçan beyni koronal kesitinde vimentin immun dokukimyasal boyanması. X40.



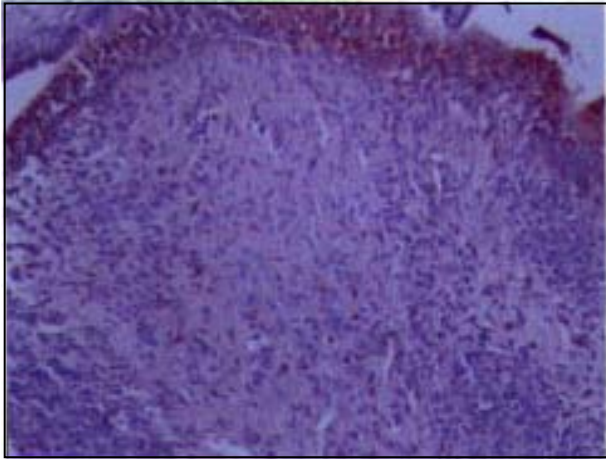
Resim 2. Kontrol grubu hipokampus vimentin immun olumlu radial uzanımlar. X400.



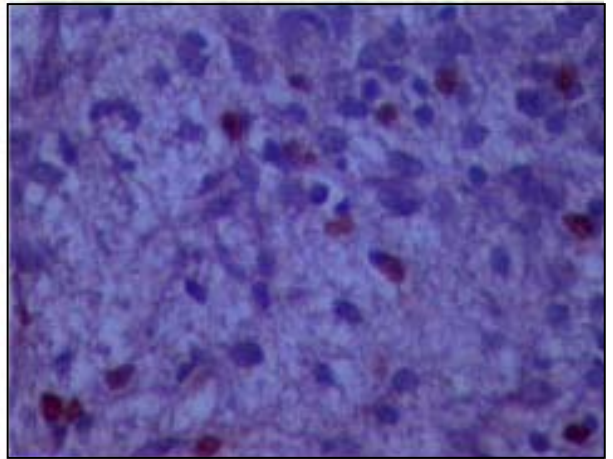
Resim 3. İUGG grubunda hipokampus vimentin immun dokukimyasal boyanması. X400.



Resim 4. Kontrol grubu ventriküler zon NSE immun olumlu boyanma. X100.



Resim 5. Kontrol grubu hipokampus NSE immun olumlu boyanma. X200.



Resim 6. İUGG grubunda hipokampus NSE immun dokukimyasal boyanması. X400.

nörotrofik faktörlerden BDNF ve NT-3'ün kontrollere göre daha az ekspresyon gösterdiği, nöronal migrasyon ve histolojik değişikliklerin bu moleküllerin ekspresyonundaki değişikliklere bağlı olabileceği düşünülmüştür (28). Hipokampal formasyon beynin öğrenme ve bellekle ilgili olan ve kritik önem taşıyan bir bölgesidir. Yetişkin nörogenezis sürecinde yeni nöronlar, insan da dahil çeşitli memelilerin hipokampusun gyrus dentatusunda gösterilmiştir (28-31). Nörogenezis regülasyonunda hücre dışı faktörlerin major rol oynamasına rağmen altta yatan esaslar tam olarak bilinmemektedir. Gelişimsel çalışmalar nöron ve nöroglial hücrelerin kaynağının subventriküler zon olduğunu göstermektedir (32,33).

Nöronal migrasyon, radial glial fibriller boyunca meydana gelerek söz konusu hücreler gelişimin ileri döneminde astrositlere dönüşmektedir (20,22). İnsan fetal beyninde, vimentin pozitif alanlar migrasyon olayları ile ilişkilendirilerek vimentin olumlu fibrillerdeki azalmanın dejeneratif olayların habercisi olduğu bildirilmiştir (20,34,35). Fötal koyun neokorteks ve serebellumunda GFAP, vimentin, NSE, nörofilament proteinleri tanımlanmış (36), vimentin 7 ve NSE 9 haftalık insan fetal beyninde gösterilmiştir (37). Fötal sıçan beyni kültür çalışmasında, GFAP ve vimentinin astroglial, NSE ve NF'in nöronal, galactoserebrozidin oligodendroglial işaretleyici olduğu bildirilmiştir (38). Çalışmamızda maternal uterin arter ligasyonu ile intrauterin gelişme geriliği meydana gelen fetal beyinlerde hipokampus ve bazal nukleus alanlarında kontrol grubuna göre vimentin olumlu hücrelerin daha az saptanması, nörogenezisde astrositlere dönüşecek olan radial glial hücrelerin ve migrasyonun hipoksi koşullarından etkilendiği şeklinde değerlendirilmiştir.

NSE, 9-23 haftalık insan fetal beyninin tüm alanlarındaki nöronlarda (39), sıçan olfaktor plağında 14. günde göç eden nöronların büyük çoğunluğunda bulunmaktadır (40). Ayrıca fetal sıçan beyni kültür çalışmasında NSE olumlu hücrelerin nöron, NSE olumsuz hücrelerin ise glia

olduğu saptanmıştır (41). NSE'nin tüm nöronlarda bulunan major bir glikolitik yol enzimi olduğu, nöronal fonksiyonel metabolik aktivite için uygun bir işaretleyici olup fetal beyinlerde zayıf, 1-2 haftalık postnatal dönemde kuvvetli reaksiyon verdiği saptanmıştır. Eğer nöronal glikolizis zayıflarsa, nörotransmitter üretimi ve aksonal transport da azalacaktır. Beyinde birçok enerji kapasitesi, oksidatif metabolizma için glikolitik basamağa bağlı olduğundan, glikolitik kapasitenin azalması ile birlikte NSE ekspresyonunun da azalacağı bildirilmiştir (42). Ayrıca, sağlıklı yeni doğan ve annelerinde kanda S-100 ve NSE konsantrasyonlarının sağlıklı yetişkinlere göre daha fazla olması, bu proteinlerin fetal gelişimde yüksek aktivitesi olarak değerlendirilmekte (43), gelişimsel civciv çalışması sonucunda NSE ve somatostatin ölçümlerinin işaretleyici olarak klinik uygulama olasılığı önerilmektedir (44). Çalışmamızda, intrauterin gelişme geriliği meydana getirilen grupta fetal hipokampus ve bazal nukleus alanlarında NSE immün olumlu hücrelerin azalması, nöronal fonksiyonel metabolik aktivitenin IUGG'ye bağlı olarak değişen hipoksi fizyolojik koşullarından etkilendiğini ve nörogenezis maturasyon sürecinde radial glial fibriller boyunca göç eden nöronların önemli bir proteini olduğu göstermektedir.

Sonuç olarak, maternal uterin arter ligasyonuna bağlı olarak IUGG oluşturulan fetal sıçan beyninde hipokampal ve bazal nukleus alanlarında vimentin ve NSE olumlu boyanmasının azalması bu moleküllerin bulunduğu hücrelerin nörogenezis sürecinin hipoksi koşullarından etkilendiğini göstermektedir. Beyin gelişiminde yeni nöron ve nöroglial hücrelerin kaynağı olarak bilinen proliferasyon bölgesi ventriküler ve subventriküler zonun fetal dönemde intrauterin gelişme geriliğinden etkilenmesinin, olumsuz koşullara bağlı olarak postnatal gelişim sürecini de değiştirebileceği böylece nöron ve nöroglial hücrelerin mitoz, migrasyon ve maturasyonunu etkileyebileceği sonucuna ulaşıldı.

Kaynaklar

1. Low JA, Handley-Derry MH, Burke SO, Peters RD et al.: Association of intrauterine fetal growth retardation and learning deficits at age 9 to 11 years. *Pediatr Res* 1997; 42(5): 684-9.
2. Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ: Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 2001; 50: 2279-86.
3. Soothill PW, Ajayi RA, Nicolaidis KN: Fetal biochemistry in growth retardation, *Early Hum Dev* 1992; 29(1-3): 91-7.
4. Harvey D, Prince J, Bunton J, Parkinson C, et al. Abilities of children who were small-for-gestational-age babies. *Pediatrics* 1982; 69(3): 296-300.
5. Rantakallio P. A 14-year follow-up of children with normal and abnormal birth weight for their gestational age. A population study. *Acta Paediatr Scand* 1985; 74(1): 62-9.
6. Edwards AD, Yue X, Cox P, Hope PL, et al. Apoptosis in the brains of infants suffering intrauterine cerebral injury. *Pediatr Res* 1997; 42(5): 684-9.
7. Valcamonico A, Danti L, Frusca T, Soregaroli M et al. Absent end-diastolic velocity in umbilical artery: risk of neonatal

- morbidity and brain damage. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170(3): 796-801.
8. Villar J, de Onis M, Kestler E, Bolanos F et al. The differential neonatal morbidity of the intrauterine growth retardation syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1990; 163: (1 Pt 1): 151-7.
 9. Morgane PJ, Austin-LaFrance R, Bronzino J, Tonkiss J et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17(1): 91-128.
 10. Bisignano M, Rees S. The effects of intrauterine growth retardation on synaptogenesis and mitochondrial formation in the cerebral and cerebellar cortices of fetal sheep. *Int J Dev Neurosci* 1988; 6(5): 453-60.
 11. Engelbregt MJT, Houdijk MECAM, Snijders CP, Delemarre-Van De Waal HA. The effects of intra-uterine growth retardation and postnatal undernutrition on onset of puberty in male and female rats. *Pediatric Research* 2000; 48(6): 803-807.
 12. Gonzalez-Barrios JA, Escalante B, Valdés J, León-Chávez BA et al. Nitric oxide and nitric oxide synthases in the fetal cerebral cortex of rats following transient uteroplacental ischemia. *Brain Research* 2002; 945: 114-122.
 13. Lane RH, Ramirez RJ, Tsirka AE, Kloesz JL et al. Uteroplacental insufficiency lowers the threshold towards hypoxia-induced cerebral apoptosis in growth-retarded fetal rats. *Brain Research* 2001; 895: 186-193.
 14. Mallard EC, Rehn A, Rees S, Tolcos M et al.: Ventriculomegaly and reduced hippocampal volume following intrauterine growth-restriction: implications for the aetiology of schizophrenia. *Schizophrenia Research* 1999; 40: 11-21.
 15. Nitsos I, Rees S. The effects of intrauterine growth retardation on the development of neuroglia in fetal guinea pigs. An immunohistochemical and an ultrastructural study. *Int J Dev Neurosci* 1990; 8(3): 233-44.
 16. Rees S, Harding R. The effects of intrauterine growth retardation on development of the Purkinje cell dendritic tree in the cerebellar cortex of fetal sheep: a note on the ontogeny of the Purkinje cell. *Int J Dev Neurosci* 1988; 6(5): 461-9.
 17. Rees S, Bocking AD, Harding R. Structure of the fetal sheep brain in experimental growth retardation. *J Dev Physiol* 1988; 10(3): 211-25.
 18. Reid GJ, Flozak AS, Simmons RA. Placental expression of insulin-like growth factor receptor-1 and insulin receptor in the growth-restricted fetal rat. *J Soc Gynecol Investig* 2002; 9(4): 210-14.
 19. Simmons RA, Templeton LJ, Gertz SJ. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. *Diabetes* 2001; 50: 2279-86.
 20. Ulfing N, Neudorfer F, Bohl J. Distribution patterns of vimentin-immunoreactive structures in the human prosencephalon during the second half of gestation. *J Anat* 1999; 195 (Pt 1): 87-100
 21. Albright CD, Tsai AY, Mar MH, Zeisel SH. Choline availability modulates the expression of TGFbeta1 and cytoskeletal proteins in the hippocampus of developing rat brain. *Neurochem Res* 1998; 23(5): 751-8.
 22. Dalmau I, Finsen B, Tonder N, Zimmer J et al. Development of microglia in the prenatal rat hippocampus. *J Comp Neurol* 1997; 377(1): 70-84.
 23. Tuba A, Kallai L, Kalman MA. Rapid replacement of vimentin-containing radial glia by glial fibrillary acidic protein-containing astrocytes in transplanted telencephalon. *J Neural Transplant Plast* 1997; 6(1): 21-9.
 24. Sarnat HB. Vimentin immunohistochemistry in human fetal brain: methods of standard incubation versus thermal intensification achieve different objectives. *Pediatr Dev Pathol* 1998; 1(3): 222-9.
 25. Schmechel DE, Brightman MW, Marangos PJ. Neurons switch from non-neuronal enolase to neuron-specific enolase during differentiation. *Brain Res* 1980; 190(1): 195-214.
 26. Hayakawa M, Shunji J, Ssaki J, Watanabe K. Neuropathological changes in the cerebrum of IUGR rat induced by synthetic thromboxan A2. *Early Hum Develop* 1999; 55: 125-136.
 27. Sasaki J, Fukami E, Mimura S, Hayakawa M et al. Abnormal cerebral neuronal migration in a rat model of intrauterine growth retardation induced by synthetic thromboxane A2. *Early Hum Develop* 2000; 58: 91-99.
 28. Fukami E, Nakyama A, Sasaki J, Mimura S et al. Under-expression of neural cell adhesion molecule and neurotrophic factors in rat brain following thromboxane A2-induced intrauterine growth retardation. *Early Hum Develop* 2000; 58: 101-110.
 29. Jang M, Shin M, Kim E, Kim C. Acute alcohol intoxication decreases cell proliferation and nitric oxide synthase expression in dentate gyrus of rats. *Toxicology Letters* 2002; 133: 255-262.
 30. Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 1996; 16(6): 2027-33.
 31. Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4(11): 1313-7.
 32. Levison SW, Goldman JE. Multipotential and lineage restricted precursors coexist in the mammalian perinatal subventricular zone. *J Neurosci Res* 1997; 48(2): 83-94.
 33. Hollyday M. Neurogenesis in the vertebrate neural tube. *Int J Devl Neuroscience* 2001; 19,161-173.
 34. Sarnat HB. Histochemistry and immunocytochemistry of the developing ependyma and choroid plexus. *Microsc Res Tech* 1998; 41(1): 14-28.
 35. Staagard M, Mollard K. The developing neuroepithelium in human embryonic and fetal brain studied with vimentin-

- immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)* 1989;180(1): 17-28.
36. Hewicker-Trautwein M, Trautwein G: An immunohistochemical study of the fetal sheep neocortex and cerebellum with antibodies against nervous system-specific proteins. *J Comp Pathol* 1993; 109(4): 409-21.
37. Sasaki A, Hirato J, Nakazato Y, Ishida Y. Immunohistochemical study of the early human fetal brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 1988; 76(2): 128-34.
38. Monnet-Tschudi F, Honegger P. Influence of epidermal growth factor on the maturation of fetal rat brain cells in aggregate culture. An immunocytochemical study. *Dev Neurosci* 1989; 11(1): 30-40.
39. Wilkinson M, Hume R, Strange R, Bell JE. Glial and neuronal differentiation in the human fetal brain 9-23 weeks of gestation. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1990; 16(3): 193-204.
40. Pellier V, Astic L. Histochemical and immunocytochemical study of the migration of neurons from the rat olfactory placode. *Cell Tissue Res* 1994; 275(3): 587-98.
41. Trapp BD, Marangos PJ, Webster HD. Immunocytochemical localization and developmental profile of neuron specific enolase (NSE) and non-neuronal enolase (NNE) in aggregating cell cultures of fetal rat brain. *Brain Research* 1981; 220(1): 121-130.
42. Rosenstein JM. Developmental expression of neuron-specific enolase immunoreactivity and cytochrome oxidase activity in neocortical transplants. *Exp Neurol* 1993; 124(2): 208-18.
43. Amer-Wahlin I, Herbst A, Lindoff C, Thorngren-Jerneck K et al. Brain-specific NSE and S-100 proteins in umbilical blood after normal delivery. *Clin Chim Acta* 2001; 304(1-2): 57-63.
44. Oi S, Matsumae M, Sato O, Matsumoto S: Neuronal over-maturation in dysraphism: ontogenic expression of neuropeptides in the fetal brain and developmental anomalies in exencephaly. *Childs Nerv Syst.* 1995; 11(9): 504-10.

Yazışma adresi:

Doç. Dr. Ayşegül UYSAL
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İzmir
Tel : 0232- 343 43 43
Fax : 0232- 342 21 42
