Evcil ve yaban ördeklerinde m.ekstensor carpi radialis ve m.fleksor carpi ulnaris'in immunohistokimyasal yöntemle karşılaştırılması

ÖZET

Bu çalışmada, evcil ve yaban ördeklerin m.extensor carpi radialis ile m.fleksor carpi ulnaris'i, m-ATPase ve indirekt immunperoksidazla boyandıktan sonra, histokimyasal ve immunohistokimyasal özellikleri incelendi.

M.ekstensor carpi radialis'de iki tip ekstrafuzal kas teli (tip IIA ve tip IIB) saptandı. Evcil ördekte tip IIB'ler, yaban ördeğinde ise tip IIA'lar daha fazla sayıdaydı. M.feksor carpi ulnaris'de üç tip ekstrafuzal kas teli (tip I, tip IIA ve tip IIB) gözlendi. Evcil ördekte tip IIB'ler, yaban ördeğinde tip I ve tip IIA'lar daha fazla sayıda bulundu.

Anahtar kelimeler : İmmunohistokimya, Histokimya, ATP'ase, m.ekstensor carpi radialis, m.fleksor carpi ulnaris.

A comparative study on m.extensor carpi radialis and m.flexor carpi ulnaris by immunohistochemical technique in wild and domestic ducks

SUMMARY

In this study, the histochemical and immunohistochemical characteristics of m.extensor carpi radialis and m.flexor carpi ulnaris were examined after having stained by m-ATPase and indirect immunoperoxidase techniques in wild and domestic ducks.

Two types of extrafusal fibers (type IIA and type IIB) were identified in m.extensor carpi radialis. There were more type IIB and type IIA fibers in domestic and wild ducks, respectively. Three types extrafusal fibers (type I, type IIA and type IIB) were observed in m.flexor carpi radialis. There were more type I, type IIA and type IIB fibers, in wild and domestic ducks, respectively.

Key words : İmmunohistochemistry, Histochemistry, ATP-ase, m.extensor carpi radialis, m.flexor carpi ulnaris.

AMAÇ VE KAPSAM

Günümüzde kas teli tip analizi, normal kasların fonksiyonu, metabolizması gibi özelliklerini veya iskelet kaslarında görülen muskuler distrofi gibi bazı hastalıkların tanısında önemli yer tutar (3,5,6,11,29). İlk olarak iskelet kasını kırmızı ve beyaz kas telleri olarak Ronuter 1873'te ayırmış ve o günden bugüne kadar kas özelliği yönünden bu ayırım önem kazanmıştır (7,9). Yıllar içinde kasların homojen yapıda olmadıkları anlaşılmış ve bu amaçla kas teli tipi analizini yapan çok sayıda farklı histokimyasal tanımlama metodları geliştirilmiştir. Değişik tanımlama metodları, farklı canlılara uygulanınca, sonuçların tüm türlerde aynı olmadığı saptanmış ve doğal olarak sınıflandırmada da tablo 1'de görüldüğü üzere farklı yöntemler önerilmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar incelenecek olursa genel olarak üç tip klasifikasyon olduğu görülür.

1- Metabolik sınıflandırma : Bu yöntemle kasın hızlı ya da yavaş oluşuna yani, kontraksiyon hızına veya kullandığı yakıt maddesine göre oksidatif, oksidatif glikolitik ve sadece glikolitik diye ayırımının yapıldığı ya da laktik asit birikimine göre yorgunluğa dirençli ve dirençsiz olarak ayrılabildiği biyokimyasal özelliklere yönelik sınıflandırmadır (10,19,25).

2- Miyofibriller ATP ase sınıflandırma : Miyozinin pH labilitesine dayanarak yapılır. Buna göre kas telleri genel olarak Tip I, Tip II A ve Tip II B olarak ayırt edilir. Bu da kas tellerinin asit stabil (aside dirençli), alkali labil ; asit labil, alkali stabil ya da hem asit hem de alkali stabil olarak nitelendiren sınıflandırmadır (13).

3- İmmunohistokimyasal (monoklonal antikor veya poliklonal antikor) sınıflandırma :

İskelet kası proteinlerine (myozin) karşı elde edilmiş spesifik antikorların kullanıldığı ayırım yöntemidir (14,35).

TABLO I : Literatür bilgilerine göre kas teli tiplerinin sınıflandırılması.

	YAVAŞ KASLAR	HIZLI KASLAR	
	KIRMIZI	KIRMIZI	BEYAZ
Brooke ve Kaiser (1970)	I	IIA	IIB
Peter ve ark.(1972) •	SO	FOG	FG
Stein ve Padykula (1962)	B	C	A
Burke (1978) *	S	FR	FF
Ashmore ve Doerr (1971)	β red	α red	α white
Shafiq ve ark.(1971)	I	IIA	IIB
Koening ve Fardeau (1973)	F_1	F_2B	F_2A
Khan (1976)	I red A ve I red B	II red	II white
Toutant ve ark. (1981)	β_1 ve β_2	α R	α W
Gauthier ve Lowey (1979)	Red (slow)	Red (fast)	White
Barnard ve ark. (1982)	I	IIA	IIB

• SO : Slow oxidative ; FOG: Fast oxidative glycolytic; FG: Fast glycolytic.

∗ S: Slow,fatigue resistant; FR: Fast, fatigue resistant; FF:Fast, fatigue sensitive.

Normal şartlarda vücudumuzda var olan hücrelerin özelliği genetik yolla geçmektedir. İskelet kasını oluşturan hücrelerin ya da kas tellerinin, genetik şifrenin bir yansıması şeklinde ortaya çıkan özellikleri çevre faktörleri ile değişebilmektedir. Genel olarak bilinirki her kasın fonksiyonuna bağlı, farklı tel kompozisyonu vardır. Aynı türün aynı kasında farklılık olabileceği gibi aynı canlının simetrik kasları birbirinden farklı kompozisyonda olabilmekte ya da sonradan değişebilmektedir. Değişime neden olan faktörler koşma, ağır kaldırma, uçma veya sürekli antreman gibi kasın işleyişi ve kullanımına neden olan etmenlerdir. Koşan atletler ile koşmayan insanlar, koşu atları ile normal atlar, uçan veya uçmayan kanatlılar, evcil

ve yaban canlılar gibi örnekler aynı türün farklı bireyleri için değişiklikler gösterebilir (12). Sürekli kullanılan kaslar için de insanların sağ ve sol el kasları arasında bulunan tel farklılığı örnek olarak verilebilir (15). Kasın gücünün fazlalığı, o kasın büyüklüğü ile değil, içerdiği kas teli tipi ile ilgili olduğu vurgulanmaktadır (39). Evcil ve yaban canlılarda olduğu gibi yaşam şeklinin karşılaştırıldığı, ya da antreman, koşu gibi isteğe bağlı hareketlerin irdelendiği araştırmalarda kırmızı kas tellerinin oranının, yani oksidatif enzim kapasitesinin fazla olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, istenen türde istenilen kasın enzim histokimyasal ya da immunohistokimyasal yöntemlerle kas teli tipi ortaya konmak istendiğinde, alınan biyopsi materyalinin miktarı ve büyüklüğü de önemlidir. Bazen alınan materyal kasın tümü hakkında fikir vermeyebilir. Yukarıda da anlatıldığı gibi kullanıma bağlı değişikliklerde, vücut hareketinin farklı fazları sırasında kasın farklı yerleri kullanılır. Sonuç olarak kasın kas teli popülasyonunun dağılımı temelde genetik olarak geçer, fakat fonksiyonel ihtiyaca cevap verecek şekilde adapte olur (15,21).

Türler arasında karşılaştırma yapılırken, bazen kas telinin çapı da önemli olmaktadır. Fakat kas telinin karşılaştırması yapılacaksa, alınan materyal aynı şartlarda alınmalı ve işlenmelidir. Bu arada geçen zaman ve saklama koşulları benzer olmalıdır. Çünkü kas telleri ölümden belli bir süre sonra morfolojik değişiklikler sergilemektedir. İnsanda ölümden 18-48 saat sonra kas tellerinin şişmeye başladığı bildirilmiştir (30).

Son yıllarda kas teli tiplendirmesinde immunohistokimyasal yöntemlerin kullanımı artmıştır. Daha özel olarak, bu yönteme günümüzde miyozin boyama yöntemi denilmektedir. Yapılan araştırmalarda kontraksiyon hızı ile miyozin ağır zincirinin ilişkisi olduğu ispatlanmıştır(27,35). Hızlı ya da yavaş kas tellerinin içerdikleri miyozinin türe ya da bireye göre değişebildiği uzun zamandan beri bilinmektedir. Fakat, yapılan araştırmalar sonucunda miyozinin hafif zincir çeşitleri ile ağır zincir çeşitleri karşılaştırılmış, hızlı ya da yavaş kas

tellerinde hafif zincir grubunun benzer olduğu, buna karşılık ağır zincir grubunun farklı olduğu saptanmıştır (33). Örneğin, hızlı kas telleri histokimyasal yöntemle slow ve fast olarak ayrılır. Fast'ler kendi arasında ayrıldığında farklılığa neden olanın ağır zincir olduğu gözlenmiştir. Zaten miyofibriller ATP ase'nin histokimyasal boyanma yoğunluğu, miyozinin ağır zincir kompozisyonu ile yakından ilişkili olduğu çeşitli araştırıcılar tarafından da ortaya konmuştur (26,32).

Bu çalışmada kanatların açılmasında etkili olan m. ekstensor carpi radialis ve m. Fleksor carpi ulnaris'in özelliklerini ortaya koymak amacıyla hem histokimyasal, hem de monoklonal antikor kullanarak kes tellerinin özelliklerinin saptanması ve diğer araştırıcıların yaptıkları çalışmalarla tartışılması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

I. Kas örneklerinin toplanması ve hazırlanması.

Kas örnekleri, 10 evcil ve 10 yaban ördeğin sağlı sollu m.ekstensor carpi radialis ve m. fleksor carpi ulnarisleri izole edilerek elde edildi.

Evcil ördeklerin kasları ölümden hemen sonra izole edilerek +4 °C'ye alındı. Daha sonra kaslar parçalara ayrılarak % 2'lik Nobel Agar'a gömüldü ve -196 °C'lik likit nitrojende dondurularak her bir kas parçasının ayrı ayrı bloğu yapıldı. Elde edilen bloklar -20 °C'ye ayarlanmış kriyostat haznesine konularak, blok derecesinin -20 °C'ye inmesi için bir süre bekletildi ve Bright marka kriyostat ile 10 µ'luk seri kesitler alındı.

Toplam 10 adet olan yaban ördeklerinden kas örnekleri, 4 tanesinden ölümden hemen sonra, bir tanesinden ölümden 2-3 saat sonra, 4 tanesinden ölümden 12 saat sonra, derin dondurucuda dondurulmuş bir tanesinden de çözüldükten sonra alındı ve evcil ördekler için yukarıda anlatılan işlemler uygulandı.

II. Histokimyasal Yöntemler.

Hızlı ve yavaş çalışan kas telleri farklı pH'lardaki ATP ase aktivitesine bakılarak birbirinden ayırt edilebilir. ATP ase'a bağlı kas teli tipinin belirlenmesinde Brook ve Kaiser'in (6) modifiye yöntemi uygulandı. Bu amaçla tespit edilmemiş kesitlere değişik asit (pH : 4.2, 4.3, 4.5, 4.6) ve alkali (pH : 10.2, 10.3, 10.4, 10.5, 10.6) preinkubasyonlar uygulandı ve ördeklerde ATP ase demonstrasyonu için denenen pH'lardan asit pH için 4.5 ve alkali pH için 10.2'nin en iyi çalışan pH'lar olduğu saptandı.

A) Asit stabil kas tellerinde ATP ase demonstrasyonu için (pH : 4.5) :

1- Alınan kesitler, pH'sı 4.5 olan 0.2 M asetat tamponu içinde oda ısısında 2.5 dakika bekletildi,

2- Akarsuda yıkandı,

3- Üç kere distile suda yıkandı,

4- 0.2 M tampon ile hazırlanan inkubasyon solusyonunda, oda ısısında 1 saat tutuldu,

5- % 2'lik kalsiyum klorürde üç kere çalkalandı,

6- % 2'lik kobalt klorürde 3 dakika tutuldu,

7- Akarsuda yıkandıktan sonra distile suda çalkalandı,

8- % 1'lik amonyum sülfitte 3 dakika tutuldu,

9- Akarsuda yıkandıktan ve dereceli alkoller ile xylol'den geçirildikten sonra üzerleri kapatıldı.

B) Alkali stabil kas tellerinde ATP ase demonstrasyonu (pH : 10.2)

1- Alınan kesitler pH'sı 10.2 olan 0.2 M sodyum barbital tampon solusyonunda 20 dakika tutuldu.

2- Akarsuda yıkandıktan sonra 0.2 M tamponda hazırlanan inkubasyon solusyonunda, oda ısısında 20 dakika tutuldu,

3- Akarsuda yıkandı,

4- % 2'lik kalsiyum klorürde üç kere çalkalandı,

5- % 2'lik kobalt klorürde 3 dakika tutuldu,

6- Akarsuda yıkandıktan sonra distile suda çalkalandı,

7- % 1'lik amonyum sülfitte 3 dakika tutuldu,

8- Akarsuda yıkandıktan ve dereceli alkoller ile xylol'den geçirildikten sonra üzerleri kapatıldı.

C) Gliserofosfat Dehidrogenaz Demonstrasyonu :

1- pH'sı 7.2 NBT'li 0.1 M fosfat tampondan 1 ml, GPDH'dan bir damla ve % 0.5'lik menadion'dan 2 damla alınarak boya solusyonu hazırlandı. Alınan kesitler üzerine bu solusyondan konarak kesitlerin rengi mavi oluncaya kadar bekletildi.

2- Distile suda çalkalandı.

3- Dereceli alkoller ve xylol'den geçirildikten sonra üzerleri kapatıldı.

III. İmmunohistokimyasal Yöntem

Jelatinle kaplanmış lamlara alınan kriyostat kesitlerine indirekt immunperoksidaz yöntemi kullanılarak aşağıda belirtilen şekilde boyama yapıldı.

1- Saf asetonda oda ısısında 10 dakika tespit edildi,

2- Çevreleri dakopen ile sınırlandırıldı, veya pap pen Z, 782-1 (Sigma)

3- Primer antikorlar uygun oranlarda PBS-BSA (phosphate buffer solution-bovine serum albumin) ile sulandırılarak kesitler üzerine damlatıldı ve 1 saat süreyle oda ısısında bekletildi.

4- PBS yıkama solusyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,

5- Sekonder antikor (Antimouse IgG peroxidaz-Sigma) uygun oranlarda PBS-BSA

solusyonu ve ördek serumu ile sulandırılarak kesitler üzerine damlatıldı ve 30 dakika süreyle nemli ortamda bekletildi.

6- PBS yıkama solusyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,

7- Tris Buffer ve H2 O2 ile taze hazırlanan DAB (3.3'- diaminobenzidin tetraklorürsigma) solusyonu ile 20 dakika inkube edildi ve reaksiyon görünür hale getirildi.

8- PBS yıkama solusyonu ile 3 kez 10 dakika süre ile yıkandı,

9- Serum fizyolojik ile yıkandı,

10- 20 dakika oda ısısında CuSO4 (Bakır sülfat) içinde bekletildi,

11- Akarsuda yıkandı,

12- Disitle suda yıkandı,

13- Mayer'in hematoksileni ile zıt boyaması yapıldı,

14- Akarsuda yıkandı,

15- Dehidrasyon için, sırasıyla ; % 80, % 96, % 100'lük alkollerde 5'er dakika bekletildi,

16- 2 kez 5'er dakika ksilolde bekletilerek dokular şeffaflaştırıldı,

17- Entellan kullanılarak kesitler kapatıldı.

IV. Fotoğraf Çekimi

Kesitler Carl Zeis marka araştırma mikroskobu ile incelendi ve uygun bölgelerin fotoğrafları çekilerek değerlendirildi.

BULGULAR

Araştırmada kanatların açılmasında rol oynayan m.ekstensor carpi radialisin ve kanatların kapanmasında rol oynayan m.fleksor carpi ulnarisin genel özelliklerini ortaya koymak amacıyla evcil ve yaban ördeklerden elde edilen her iki kastan alınan kesitler alkali

ve asit preinkubasyona tabi tutularak miyofibriller ATPase boyaması yapıldı. Bu histokimyasal boyama sonucunda m.ekstensor carpi radialisin sadece hızlı tellerin iki tipini içerdiği ve kesinlikle yavaş kas tellerinin bulunmadığı saptandı. M.fleksor carpi ulnarisin incelenmesi sonucu hem yavaş kas tellerinin hem de kırmızı kas tellerinin her iki tipinin olduğu gözlendi.

Evcil ördeklerin m.ekstensor carpi radialisin asit (pH: 4.5) preinkubasyondan sonra hiç boya almadıkları (asit labil) görüldü (şek.1). Alkali (pH:10.2) preinkubasyona tabi tutulan kesitler boyanma yönünden dönüşüm göstererek bütün teller (alkali stabil) boyandılar (şek.2).

Aynı kasın seri kesitlerine uygulanan immunperoksidaz kullanılan anti slow (yavaş kas tellerininin teşhisi için, klon numarası NOQ7.5.4D) ve anti fast (hızlı kas tellerininin teşhisi için, klon numarası MY-32) monoklonal antikor boyaması sonucunda elde edilen bulgular şöyleydi: NOQ7.5.4D klon nolu antikor ile boyamada, pH:4.5'teki gibi hiç bir telin boyanmamasına karşılık (şek.3), MY-32 klon nolu antikor boyamasında hızlı tellerin iki tip boyandığı gözlendi. Buna göre koyu boyananlar tip IIA ve açık boyananlar tip IIB idi (şek.4). α-gliserofosfat dehidrogenaz (α-GPDH) enzim boyasında tip IIA'nın orta, tip IIB'nin koyu boyandıkları görüldü.

Yaban ördeklerin m.ekstensor carpi radialisin asit ve alkali preinkubasyon sonrası miyofibriller ATPase boyaması sonucunda ise evcil olanların aksine hem pH:4.5 (şek.5) hem de pH:10.2 (şek.6) preinkubasyona tabi tutulan kesitlerin hepsinin boyandığı saptandı. Bu da normalde tanımlanan hem asit hemde alkali stabil olan tonik teller olduğunu göstermektedir.

Asit ve alkali preinkubasyon uygulanan preperatları takip eden kesitlere anti slow (NOQ7.5.4D) ve anti fast (MY-32) antikorları kullanıldığında , evcil ördeklerde olduğu gibi NOQ7.5.4D ile kesitlerin boyanmadığı (şek.7), MY-32 antikoru ile tip IIA (koyu) be tip IIB

(açık) olmak üzere iki tip teşhis edildi (şek.8).

Evcil ve yaban ördeklerin m.ekstensor carpi radialis kasının hızlı kas tellerinin teşhisi için spesifik olarak kullanılan MY-32 antikoru ile yapılan boyama sonucunda incelendiğinde arada farklılık olduğu gözlendi. Evcil ördeklerde tüm kasın tip IIA ve tip IIB kas teli dağılımı yaklaşık olarak eşitken, yaban ördeklerin kasının yarısının saf tip IIA olduğu, diğer yarısının ise Tip IIA ve tip IIB olmak üzere karışık bir dağılım saptandı. Burada dikkati çeken diğer bir özellik yaban ördeklerinde tip IIA'lerin tip IIB'dan daha büyük çaplı olduğuydu (şek.8). Evcil ördeklerde ise bunun tam tersi görüldü (şek.4).

Evcil ördeklerin m.fleksor carpi ulnaris kasının asit preinkubasyondan sonraki incelenmesinde kasta tel tipi açısından dağılım farklılığı gözlendi. Farklılık sadece enine kesitteki bölge farklılığı değildi. Kasın totali uzamına incelendiğinde, kasın başı, ortaları veya sonu gibi değişik bölgelerden enine kesitler alındığında, tablo her defasında değişkendi. Bir bölge tamamen tip II kas tellerinden oluşurken, diğer bölgelerde tip I teller ya seyrek ya da tip II teller ile eşit durumdaydı. Bu durumu ortaya koymak için değişik bölgelerden alınan kesitlere m. ekstensor carpi radialis'te olduğu gibi asit ve alkali preinkubasyon sonrası miyofibriller ATPase boyaması ile spesifik immun boyama uygulandı. Şekil 9'da seyrek sayıda var olduğu görülen bölgeden alınan kesitlerde pH:4.5'te tip I tellerin boyandığı, tip II tellerin ise hiç boya almadığı gösterilmektedir. Şekil 10'da ise aynı bölgenin pH:10.2'de boyanması sonucu tip I'lerin boya almadığı sadece tip II'lerin boyandığı görülüyor.

NOQ7.5.4D antikoru ile sadece tip I tellerin boyandığı (şek.11), buna karşılık MY-32 antikoru ile tip II'leri boyanabildiği (şek.12) saptanmıştır. Fakat burada dikkat çekici olan kısım tip IIB'ların çok sayıda olmasına karşın, tip IIA'lerin az sayıda olmasıydı (şek.12).

Şekil 13-16 arası da aynı kasın, tel tipi açısından tip I ile tip II tellerin yaklaşık olarak eşit oldukları alan sergilenmektedir. Dağılım dışında şekil 9-12 arası gösterilen bölgenin aynı

özelliklerini taşıdığı görülüyor.

α-gliserofosfat dehidrogenaz enzim boyamasında tip I'ler soluk boyandılar. Fakat tip IIA'ların orta ve tip IIB'lerin koyu boyandıkları saptandı. Buda şekil 17'de asit stabil tellerin dışındaki yerlerin, yani tip II'lerin, şekil 18'de α-gliserofosfat dehidrogenaz enzim boyamasında orta ve koyu olarak boyandığı gösterilmektedir.

Yaban ördeklerin m.fleksor carpi ulnaris kasının incelenmesinde de evcil ördeklerde olduğu gibi tip I, tip IIA ile tip IIB olmak üzere üç tip kas teli görüldü ve dağılım yönünden de bölgesel farklılık olduğu dikkat çekti.

M.ekstensor carpi radialiste olduğu gibi m.fleksor carpi ulnariste de alışılmış özellikler dışında kasın bazı bölgeleri hem asit (şek.19) hem de alkali (şek.20) preinkubasyon sonrası miyofibriller ATPase boyaması yapıldığında boyandıkları saptandı. Buna karşılık diğer bölgelerde ise normal şartlarda beklendiği gibi asit preinkubasyonda boyanan tip I teller, alkali preinkubasyonda boya almadılar. Bunun tersi olarakta alkali stabil tip II tellerde asit preinkubasyonda boyanmadılar.

Yavaş tellerin belirlenmesi için kullanılan NOQ7.5.4D antikoru ile yaban ördeklerden elde edilen seri kesitlere uygulanan boyama sonucu çoğunlukla bir bölümün tamamen tip I tellerden oluştuğunu, diğer alanlarda ise tip I tellerin seyrek olduğu gösterilmiştir (şek.21). Hızlı tellerin belirlenmesinde kullanılan MY-32 antikoru ile yapılan boyamada tip II tellerin boya aldığı, tip I'lerin boyanmadığı ve bunun yanında da hızlı teller kendi aralarında karşılaştırıldığında tip IIA'larin tip IIB'lerdan fazla oldukları saptanmıştır (şek.22). Yapılan α-gliserofosfat dehidrogenaz enzim boyamasında da beklenen sonuçlara varıldı.

Çalışmada kullanılan ve avlandıktan yaklaşık 12 saat sonra -20$_{o}$C derin dondurucuda dondurulmuş olan yaban ördeğinin araştırma konusu kaslarından alınan kesitlere uygulanan aynı boyamalar sonucunda reaksiyonların yeni vurulmuş yaban ördeklerinden elde edilen

sonuçlarla aynı olduğu görüldü. Fakat fibra müskülarisler arasındaki bağdokuda, muhtemelen donup-çözülmeye bağlı olabileceğini düşündüğümüz, ayrılmalar ve tellerde şişme olduğu görülmektedir . Söz konusu durum m.fleksor carpi ulnaris kasından alınan örneklerde de görüldüğü gibi, yavaş (şek.23) ve hızlı (şek.24) kas tellerinin belirlenmesinde kullanılan antikor boyamalarında, reaksiyon açısından bir sorun teşkil etmediği saptanmıştır.

Ayrıca kas tellerinin çapı açısından yapılan karşılaştırmada m.ekstensor carpi radialiste yaban ördeklerinini tel çapının evcil ördek kasına göre genelde daha küçük olduğu ve yaban ördeğinin kendi içinde tellerin irili ufaklı olduğu saptanmıştır (şek. 25). M.fleksor carpi ulnariste ise genelde yaban ördeklerinin kas teli çapı, evcil ördeklerden daha küçüktü, fakat tellerin kendi içinde birbirine yakın büyüklükte oldukları asit (şek. 26) ve alkali (şek. 27) preinkubasyon sonrası miyofibriller ATP-ase boyamasında açık şekilde görülmektedir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, uçan (Yaban) ve uçamayan (evcil) ördeklerin, kanatların açılmasında etkili m.ekstensor carpi radialis ve kanatların kapanarak eski halini almasında etkili m.fleksor carpi ulnaris kaslarının genel özellikleri açısından elde edilen bulgular birbirinden farklı, fakat uçma sırasında kanatların kullanımı yönünden açıklayıcı ve çoğunlukla diğer araştırıcıların evcil ve yaban türler arasındaki karşılaştırmalı çalışmaları ile uyumluydu.

Kas teli tipi belirleme çalışmaları uzun yıllar önce başlamıştır. Bunun için çok sayıda araştırıcı değişik metodlar ve adlandırmalar yapmışlardır (Tablo I). Fizyolojik ve patolojik durumlarda miyofibriller ATP-ase enzim boyaması uygulaması kasın durumunu ortaya koymada ve değerlendirmede yardımcı olmuştur (22,23,36,38,40). Çok sayıda araştırıcı trafından bu amaçla metodlar geliştirilmesine karşılık, genelde Brook ve Kaiser'in (6) yöntem günümüzde klasikleşmiştir ve ya olduğu gibi yada modifiye edilerek kullanılmaktadır. Bu

yöntemde kas tellerinin sınıflandırması, asit pH ya da alkali pH'da preinkubasyondan sonra boyandıklarında, asit stabil, alkali labil ya da alkali stabil , asit labil olarak değerlendirilmesi şeklinde yapılmaktadır. Her canlı için değişik pH değerleri saptamak zorunludur. Çünkü uygun olmayan Ph'lar ya da yanlış ölçümler tip ayrımındaki değerlendirmeyle ilgili doğru ve kesin sonucu almayı bazen engelleyebilmektedir (8,12,32,34,37,41). Bu gibi nedenlerle, günümüzde artık klasik histokimyasal metodların kas teli tipi arasındaki farkı ortaya koymada yetersiz kaldığı söylenmektedir (32). Daha çok tercih edilen yol, değişik karakterdeki miyozin ağır zincir proteinlerine karşı spesifik olarak elde edilmiş antikorlar kullanılarak, kesin olarak tiplendirme yapılmasıdır (11,22,23,28,40,41). Bu çalışmada sigma firmasının üretimi olan anti slow (klon no: NOQ7.5.4D) ve anti fast (klon no: MY-32) monoklonal antikorlarını kullanarak immunperoksidaz boyamasını uyguladık. NOQ7.5.4D klon nolu antikor ile tip I teller spesifik olarak boyandı. Bu da Semper ve arkadaşlarının (27) bulguları ile uyumluydu. Fakat MY-32 klon nolu antikor ile yapılan boyama sonucunda, Havvenith ve arkadaşlarının (14) iddia ettikleri gibi, tip II 'lerin alt tiplerinin ayırımının kesinlikle yapılamadığı konusuna katılmıyoruz. Çünkü bu araştırmada hem evcil hem yaban ördeklerden alınan m.ekstensor carpi radialis ve m.fleksor carpi ulnaris kaslarının her ikisinde de tip IIA ve tip IIB ayrımı yapılmıştır.

Kaslar arasında ya da kasın kendi içerisinde kas teli tipleri yönünden farklılık olması, onun fonksiyonu ile ilgili bulunmuştur (15,16). Nitekim uçma , koşma ve yüzme gibi fonksiyonları yerine getiren kaslarda fazla enerji kullanıldığından kas teli tipinin oranı ile enerji tüketimi arasında paralellik görülmüştür (10,16,17,35,38). Fakat alınacak kas materyalinin (biyopsi) büyüklüğü bazen kasın tümü hakkında doğru bilgiyi veremeyebilir. Henrikson-Larsen ve arkadaşlarının (15) insan tibialis anteriyor kasında, Altunay ve arkadaşlarının (2) kazların m.iliofibularis kasında yaptıkları araştırmada, kasın her tarafının

aynı özellikte olmadığı görülmüştür. Çalışmamızda da hem evcil hem yaban ördeklerin m.fleksor carpi ulnaris kasının tel tipi dağılımı her yerde aynı değildi.

Maier (20) , güvercinlerde çalıştığı 14 kanat kasından 12 tanesinin tamamen hızlı, iki tanesinde ise % 5-10 gibi düşük oranda yavaş kas teli içerdiğini bildirmiştir. Uçma ile ilgili pektoral ve suprakrokoid kaslarının da genelde hızlı kas tellerinden meydana geldiği bilinmektedir (8,24). Bunların dışında evcil ve yaban memelilerde yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda, yabanlarda hızlı tellerin oranının yükseldiği ve bunların içinde tip IIA tellerin daha fazla olduğu belirtilmektedir (1,4,12,18,31) .

Essen-Gustavson ve arkadaşlarının (12) yaptıkları araştırmada yaban hayatta sürekli hareket halinde olan canlıların, antreman yaptırılan ratlarda, koşu atlarında tip IIA / tip IIB oranının evcil olanlara göre yükseldiğini ve bunu da tip IIA' nın yorgunluğa dirençli oksidatifglikolitik
karakterde olmasına bağlanmaktadırlar. Bu araştırmada da yaban ördeklerin m.ekstensor carpi radialis kasında tip IIA' ların çoğunlukta oluşu, uçma sırasında kanatların uzun süreli açık kalmasıyla ihtiyaç duyulan gücü sağlamaya çalışmakla açıklanabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, sadece hızlı tellerden oluşan m.ekstensor carpi radialis kasının yaban ördeklerde tip IIA'nın tip IIB'ye oranla fazla oluşu, diğer türlerin evcil ve yaban hayvan karşılaştırması ile uyum göstermiştir. Hem hızlı hem yavaş kas tellerinin bulunduğu m.fleksor carpi ulnariste ise yaban ördeklerde tip I ve tip IIA' nın yüksek oranda varlığıda, iniş sırasında, yorgunluğa dirençli güçlü kasların gerekliliği ile ifade edilebileceği sanılmaktadır. Evcil ördeklerde ise, sadece kısa süreli havalanma veya kendini havalandırma sırasında kullanılan aynı kaslarda tip IIB' lerin oranının yüksek oluşunu, fonksiyona yönelik yorgunluğa dirençli olmayan, fakat hızlı kontraksiyon yapabilen kas tellerine ihtiyaç

duyulduğunun göstergesi olduğunun kanısına varıldı.

Bu Çalışmada diğer araştırıcılarla ayrıldığımız nokta MY-32 monoklonal antikorun immunperoksidaz boyama yönteminin, hızlı (tip II) tellerin subtiplerine ayırmada kullanılamayacağı konusuydu. Fotoğraflarda da görüleceği üzere MY-32 antikoru ile net bir şekilde alt tiplerin guruplanması gösterilmektedir.

Şekil 1 : Evcil ördekte, ekstensor carpi radialis kasının ekstrafuzal kas tellerinde asit (pH: 4.5) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 2 :Evcil ördekte, ekstensor carpi radialis kasının ekstrafuzal kas tellerinde alkali (pH: 10.2) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 3 : Evcil ördekte, ekstensor carpi radialis kasının ekstrafuzal kas tellerinde, NOQ7.5.4D monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 4 : Evcil ördekte, ekstensor carpi radialis kasının ekstrafuzal kas tellerinde, MY-32 monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 5 : Yaban ördekte, ekstensor carpi radialis kasının ekstrafuzal kas tellerinde asit (pH: 4.5) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 6 : Yaban ördekte, ekstensor carpi radialis kasının ekstrafuzal kas tellerinde alkali (pH: 10.2) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 7 : Yaban ördekte, ekstensor carpi radialis kasının ekstrafuzal kas tellerinde, NOQ7.5.4D monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 8 : Yaban ördekte, ekstensor carpi radialis kasının ekstrafuzal kas tellerinde, MY-32 monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 9 : Evcil ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde asit (pH: 4.5) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 10 : Evcil ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde alkali (pH: 10.2) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 11 : Evcil ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde, NOQ7.5.4D monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 12 : Evcil ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde, MY-32 monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 13 : Evcil ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde asit (pH: 4.5) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 14 : Evcil ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde alkali (pH: 10.2) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 15 : Evcil ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde, NOQ7.5.4D monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 16 : Evcil ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde, MY-32 monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 17 : Evcil ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde asit (pH: 4.5) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 18 : Evcil ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde α-gliserofosfat dehidrogenaz reaksiyonu. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 19 : Yaban ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde asit (pH: 4.5) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X165

Şekil 20 : Yaban ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde alkali (pH: 10.2) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X165

Şekil 21 : Yaban ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde, NOQ7.5.4D monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X165.

Şekil 22 : Yaban ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde, MY-32 monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X165.

Şekil 23 : Yaban ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde, NOQ7.5.4D monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 24 : Yaban ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde, MY-32 monoklonal antikoru ile immunperoksidaz boyama. I: Tip I, IIA: Tip IIA, IIB: Tip IIB. X275.

Şekil 25 : Yaban ördekte, ekstensor carpi radialis kasının ekstrafuzal kas tellerinde alkali (pH: 10.2) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. X165

Şekil 26 : Yaban ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde asit (pH: 4.5) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. I: Tip I, II: Tip II. X275.

Şekil 27 : Yaban ördekte, fleksor carpi ulnaris kasının ekstrafuzal kas tellerinde alkali (pH: 10.2) preinkubasyondan sonra ATP-ase reaksiyonu. I: Tip I, II: Tip II. X275.

KAYNAKLAR

1. **Aguera, E., Diz, A., Vazquez-Auton, J. M., Vivo, J., Monterde, J. G.** (1990) *Differences in fibre population in dog muscles of different functional purpose.* Anat Histol Embryol , 19, 128-134.

2. **Altunay, H., Alabay, B., Özcan, Z., Ergün, L.** (1997) *Kazlarda M. iliofibularis ve M. biventer cervicis'in ekstrafuzal kas tellerinde enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.* Ankara Üniv Vet Fak Derg **44**, 201-213.

3. **Ashmore, C. R., Doerr, L.** (1971) *Postnatal development of fiber types in normal and dystrophic skeletal muscle of the chick*. Expl Neurol, **30** , 431-446.

4. **Bader, V. R.** (1983) *Vergleichende histometrische und histologische Untersuchungen an der Skelettmuskulatur von Wild- und Hausschweinen.* **96**, 89-97.

5. **Barnard,E.A.,Lyles,J.M.,Pizzey,J.A.** (1982) *Fibre types in chicken skeletal muscles and their changes in muscular dystrophy*. J Physiol ,**331**, 333-354.

6. **Brook, M. H., Kaiser,K.K.** (1970) *Muscle fiber types: How many and what kind?* Arch Neurol, **23**, 369-379.

7. **Burke, R.** (1978) *Motor units: physiological/ histochemical profiles, neural connectivity and functional specialization.* Am Zool, **18**, 127-134. In:**Rokx, J. T. M., Van Willigen, J. D., Jansen, H. W. B.** (1984) *Muscle fibre types and muscle spindles in the jaw musculature of the rat.* Archs oral Biol, **29**, 25-31.

8. **Caldow, R.W.G., Furness, R.W.** (1993) *A histochemical comparison of fibre types in the M. pectoralis and M. supracoracoideus of the great skua Catharacta skua and the herring gull Larus argentatus with reference to kleptoparasitic capabilities.* J Zool, Lond **229**, 91-103.

9. **Dahl, H. A., Roald, L.** (1991) *How unequivocal is the muscle fibre type concept?* Anat Embryol **184**, 269-273.

10. **Deshpande, B. R., Kallapur, V. L., Venkatesh, K.** (1984) *Metabolic differentiation of homologous leg muscles of two aquatic birds at the level of enzymatic organization.* Arch Int Physiol Biochem, **92**, 65-72.

11. **Dodson, A., Garson, J., Burke, M., Anderton, B. H.** (1987) *Monoclonal antibody that detect human type I muscle fibres in routiely fixed wax embedded sections.* J Clin Pathol **40**, 172-174.

12. **Essen-Gustavsson, B., Lindholm, A.** (1984) *Fiber types and metabolic characteristics in muscles of wild boars, normal and halothane sensitive Swedish landrace pigs.*Comp Biochem Physiol **78A**, 67-71.

13. **Gauthier,G.F. and Lowey,S.** (1979) *Distribution of miyosin isoenzymes among skeletal muscle fibre types.* J Cell Biol, **81**, 10-25. In: **Rokx, J. T. M., Van Willigen, J. D., Jansen, H. W. B.** (1984) *Muscle fibre types and muscle spindles in the jaw musculature of the rat.* Archs oral Biol, **29**, 25-31.

14. **Havenith,M.G., Visser,R., Schrijvers-van Schendel,J.M.C., Bosman,F.T.** (1990) : *Muscle fiber typing in rutinely processed skeletal muscle with monoclonal antibodies.* Histochemistry **93**, 497-499.

15. **Henriksson-Larsen, K. B., Lexell, J., Sjöström, M.** (1983) *Distribution of different fibre types in human skeletal muscles. I. Method for the preparation and analysis of crosssections of whole tibialis anterior.* Histochem J **15**, 167-178.

16. **Horák, V., Ševcíková, K., Knízetová , H.** (1989) *Histochemical fiber types in the thigh muscles of 4 chicken inbred lines.* Anat Anz, **169**, 313-320.

17. **Kaiser,C.E.,George,J.C.** (1973) *İnterrelationship amongst the avian orders Galliformes,*

colimbiformes, and anseriformes as evinced by the fiber types in the pectoralis muscle. Can J Zool, **51**, 887-892.
18. **Khan,M.A.** (1976) *Histochemical sub-types of three fiber-types of avian skeletal muscle.* Histochemie, **50**, 9-16. In: **Barnard,E.A.,Lyles,J.M.,Pizzey,J.A.** (1982) *Fibre types in chicken skeletal muscles and their changes in muscular dystrophy*. J Physiol ,**331**, 333-354.

19. **Koenig,J. and Fardeau, M.** (1973) *Étude histochimique des muscles grands dorsaux antérieur et postérieur du poulet et des modifications observées après dénervation et réinnervation homologue ou croisée.* Archs Anat Microsc, **62**, 249-267. In: **Barnard,E.A.,Lyles,J.M.,Pizzey,J.A.** (1982) *Fibre types in chicken skeletal muscles and their changes in muscular dystrophy*. J Physiol ,**331**, 333-354.

20. **Maier, A.** (1983) *Differences in muscle spindle structure between pigeon muscles used in aerial and terrestrial locomotion.* Am J Anat,**168**, 27-36.

21. **Morales-Lopez, J. L., Agüera, E., Rodriguez-Barbudo, M. V., Dız, A.** (1990) *Adaptaciones en la composicion fibrilar del musculo Longisimo lumbar a entrenamientos de resistencia.* Anat Histol Embryol **19**, 369-377.

22. **Nakamura, T., Kawahara, H., Miyashita, H., Watarai, K., Takagi, M., Tachibana, S.** (1987) *Cross reactive identification of types 1 and 2C fibers in human skeletal muscles with monoclonal anti-neurofilament (200 kd) antibody.* Histochemistry **87**, 39-45.

23. **Oldfors,A., Seidal, T.** (1989) *Immunohistochemical demonstration of different muscle fibre types in paraffin sections.* Histopathol **15**, 420-423.

24. **Parker, G. H., George, J. C.** (1976) *Effect of intense exercise on intracellular glycogen and fat in pigeon pectoralis.* Acta anat **96**, 568-573.

25. **Peter,J.B.,Barnard,R.J.,Edgarton,V.R.,Gillespie,C.A., Stempel,K.E.** (1972) *Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits*. Biochemistry , **11**, 2627-2633.

26. **Rowlerson,A.**(1994) : *An outline of fibre types in vertebrate skelatal Muscle: Histochemical identification on myosin isoforms.* BAM. **4**, 333-352.

27. **Semper,A.E., Fitzsimons,R.B., Shotton,D.M.** (1988) : *Ultrastructural identification of type 1 in human skeletal muscle. Immungold labelling of thin cryosections with a monoclonal antibody against slow myosin.* J. Neurol.Sci. **83**, 93-108.

28. **Shafiq, S. A., Shimizu, T., Fischman, D. A.** (1984) *Heterogeneity of type 1 skeletal muscle fibers revealed by monoclonal antibody to slow myosin.* Muscle Nerve **7**, 380-387.

29. **Shafiq,S.A.,Askanas,V., Milhorat,A.T.** (1971) *Fiber types and preclinical changes in chicken muscular dystrophy.* Arch Neurol, **25**, 560-571. In: **Suzuki, A., Tsuchiya, T.,**

Ohwada, S., Tamate, H. (1985) *Distribution of myofiber types in thigh muscles of chickens.* J Morph, **185**, 145-154.
30. **Shorey, C. D., Cleland, K. W.** (1988) *Morphometric analysis of frozen transverse sections of human skeletal muscle taken post-mortem.* Acta anat **131**, 30-34.

31. **Solomon, M. B., Eastridge, J. S.** (1987) *Occurrence of giant fibers in muscles from wild pigs native to the United States.* Meat Science **20**, 75-81.

32. **Srihari, T., Damadei, A., Pons, F., Leger, J., Leger, J. J.** (1986) *Purification and characterization of myosins from human and rabbit skeletal muscles by using specific monoclonal antibodies.* Comp Biochem Physiol **85B**, 523-529.

33. **Staron,R.S., Pette,D.** (1986) : *Correlation between myofibrillar ATPase activity and miyosin heavy chain composition in rabbit muscle fibers.* Histochemistry **86**, 19-23.

34. **Stein, J. M., Padykula, H. A.** (1962) *Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers of the rat.* Am J Anat, **110**, 103-124.

35. **Suzuki, A., Tsuchiya, T., Ohwada, S., Tamate, H.** (1985) *Distribution of myofiber types in thigh muscles of chickens.* J Morph, **185**, 145-154.

36. **Talesera,G.L.,Goldspink,G.**(1978) : *A combined histochemical and biochemical study of myofibrillar ATP-ase in pectoral, leg, and cardiac muscle of several species of birds.* Histoc.J.**10**, 695-710.

37. **Toutant, J. P., Rouaud, T., Le Douarin, G. H.** (1981) *Histochemical properties of the biventer cervicis muscle of the chick : A relationship between multiple innervation and slow-tonic fibre types.* J Histochem, **13,** 481-493.

38. **Yellin, H., Guth, L.** (1970) *The histochemical classification of muscle fibers.* Exp neurol, **26**, 424-432.

39. **Young, A.** (1984) *The relative isometric strength of type I and type II muscle fibres in the human quadriceps.* Clin Physiol **4**, 23-32.

40. **Ziegan, J.** (1979) *Combinations of enzyme-histochemical methods for differentiating of fibers types and evaluating the skeletal musculature.* Acta hictochem, **65**, 34-40.

41. **Zhang, Y., Rushbrook, J. I., Shafiq, S. A.** (1985) *Avian adductor profundus muscle: characterization of a pure slow tonic region by histochemical, monoclonal antibody and peptide mapping studies.* J Muscle Res Cell Motil, 6, 333-345.

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ

ARAŞTIRMA FONU PROJESİ
KESİN RAPORU

Evcil ve yaban ördeklerinde m.ekstensor carpi radialis ve m.fleksor carpi ulnaris'in immunohistokimyasal yöntemle karşılaştırılması

Proje yürütücüsü : Doç.Dr. Hikmet Altunay
Araştırıcılar : Prof.Dr. Belma Alabay
Doç.Dr. Ziya Özcan
Doç.Dr. Levent Ergün

Proje numarası :20000810004
Başlama tarihi :27.03.2000
Bitiş tarihi :15.02.2002
Rapor tarihi :15.02.2002

Ankara Üniversitesi Araştırma Fonu Müdürlüğü
Ankara - 2002