

**T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
ANESTEZİYOLOĞI VE REANİMASYON SERVİS ŞEFLİĞİ**

**TİYOPENTALİN ERKEN DÖNEM CİVCİV
EMBRİYOSUNDA NÖRAL TÜP GELİŞİMİNE ETKİLERİ**

**Gökhan İNANGİL
Hv.Tbp. Kd. Ütđm.**

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi K.lığı'nın
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Programı İçin Öngördüğü
UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL

2010

T.C.
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
HAYDARPAŞA EĞİTİM HASTANESİ
ANESTEZİYOLOĞI VE REANİMASYON SERVİS ŞEFLİĞİ

TİYOPENTALİN ERKEN DÖNEM CİVCİV
EMBRYOSUNDA NÖRAL TÜP GELİŞİMİNE ETKİLERİ

Gökhan İNANGİL
Hv. Tbp. Kd. Ütđm.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Haydarpaşa Eğitim Hastanesi K.lığı'nın
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Programı
İçin Öngördüğü
UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıŐtır.

TEZ DANIŞMANI
Güner DAĞLI
Prof. Tbp. Kd. Alb

İSTANBUL
2010

GATA Askeri Tıp Fakültesi Dekanlığına:

“TİYOPENTALİN ERKEN DÖNEM CİVCİV EMBRİYOSUNDA NÖRAL TÜP GELİŞİMİNE ETKİLERİ” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Anesteziyoloji ve Reanimasyon Servisi’nde uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir.

İMZA

Tez Danışmanı : Prof.Tbp. Kd. Alb. Güner DAĞLI

Başkan : Doç.Tbp. Kd. Alb.Sezai ÖZKAN

Üye : Prof. Hv. Tbp. Kd. Alb.Ahmet ÇOŞAR

Üye : Doç. Tbp. Kd. Alb. M. Emin ORHAN

ONAY:

Hv. Tbp.Kd. Ütgm. Gökhan İNANGİL’in 02 /07 / 2010 tarihinde savunduğu bu tez akademi kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

M. Zeki BAYRAKTAR
Prof. Tbp. Tümgeneral
GATF Dekanı ve Eğitim Hastanesi
Baştabibi

TEŞEKKÜR

Bu tez konusu GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Servis Şefliği tarafından Nisan 2007 tarihinde verilmiş ve Anesteziyoloji ve Reanimasyon Servisi'nde yapılmıştır.

Bu çalışmada, Tiyopentalin Erken Dönem Cıvıv Embriyosunda Nöral Tüp Gelişimine Etkilerinin ortaya konması, amaçlanmıştır.

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca bana her türlü yardım ve desteklerini sağlayan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan başta değerli hocam Prof. Tbp. Kd. Alb. Güner DAĞLI'ya, Doç. Tbp. Alb. Sezai ÖZKAN'a, Doç. Tbp. Bnb. Hüseyin ŞEN'e, Yrd. Doç. Tbp Bnb. Kamer DERE'ye, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum tüm asistan, anestezi teknisyeni ve hemşire arkadaşlarım ile yardımcı klinik personeli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca hep yanımda olan başta annem ve babam olmak üzere tüm sevdiklerime teşekkür ederim.

Gökhan İNANGİL

Hv. Tbp. Kd. Ütğm.

ÖZET

TİYOPENTALİN ERKEN DÖNEM CİVCİV EMBRİYOSUNDA NÖRAL TÜP GELİŞİMİNE ETKİLERİ

Bu çalışmanın amacı tiyopentalin erken dönem civciv embriyosunda nöral tüp gelişimine etkilerini ortaya koymaktır. Bu amaçla 100 adet özel patojen bulunmayan (SPF) yumurta kullanıldı. SPF yumurtalar 4 grupta incelendi. Tüm gruplar 30 saat boyunca $37,2 \pm 0,1$ °C sıcaklık ve $\% 60 \pm 5$ nem oranında inkübe edildi ve Hamburger – Hamilton sınıflamasına göre 8. evrede bir embriyolojik gelişme elde edildi. 30. saat sonunda Grup A (kontrol grubu)(n=25), in ovo 0,1 ml $\%0,9$ NaCl ve diğer gruplara da aynı hacimde yumurta ağırlığına göre doz ayarlaması yapılarak sırasıyla 2 mg/kg, 4 mg/kg, 8 mg/kg dozlarında olacak şekilde, Grup B (n=25) 0,14 mg/0,1 ml, Grup C (n=25) 0,28 mg/0,1 ml ve Grup D (n=25) 0,58 mg/0,1 ml konsantrasyonlarında tiyopental enjekte edildi. 72. saatin sonunda tüm embriyolar yumurtadan çıkartıldı ve hematoksilen eozin ile patolojik olarak incelendi. A ve B gruplarında nöral tüp defekti saptanmazken C ve D gruplarında toplam olarak 6 embriyoda defekt izlendi (2'si C grubunda ve 4'ü D grubunda). Sonuç olarak tiyopentalin 4-8 mg/kg gibi terapötik ve supratrapötik dozlarda erken dönem tavuk embriyosunda NTD insidansını arttırdığı gözlemlenmiştir. Tiyopentalin organogenezin devam ettiği gebeliğin ilk aylarında kullanıldığında, yenidoğanda NTD gelişimini tetikleyebileceği ve nörolasyon üzerinde olumsuz etkileri olabileceği kanaatindeyiz. Ancak tiyopentalin nörolasyondaki etkisini tam olarak ortaya koymak için daha ileri ve farklı embriyo modelleri üzerinde çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler : Nöral tüp defekti, Erken dönem civciv embriyosu, Nörolasyon, Tiyopental

Destekleyen Kurumlar : GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi

Yazar : Hv. Tbp. Kd. Ütgm. Gökhan İNANGİL

Danışman : Prof. Tbp. Kd. Alb. Güner DAĞLI

SUMMARY

**THE EFFECTS THIOPENTAL ON NEURAL TUBE DEVELOPMENT
IN EARLY STAGE OF CHICK EMBRYOS**

The aim of this study is to demonstrate the effect of thiopental in early stage chick embryos on neural tube development. One hundred specific pathogen-free (SPF) chick eggs were used to investigate the neurulation. SPF eggs were investigated in four groups. All of the groups were incubated at $37,2 \pm 0,1$ °C and 60 ± 5 % relative humidity for 30 hours and the eighth stage of the embryonic development as defined by Hamburger and Hamilton, was reached. At 30th hour, group A (control group) (n=25) was administered in ovo 0,1 ml saline (%0,9 NaCl) and the other groups were administered same volume of thiopental calculated in increasing dosages for 2 mg/kg, 4 mg/kg, 8 mg/kg for each egg with concentrations of 0,14 mg/0,1 ml Group B (n=25), 0,28 mg/0,1 ml Group C (n=25), 0,58 mg/0,1 ml Group D (n=25) respectively. At the end of 72 hours all of embryos were extracted from eggs and they underwent pathological examination with hematoxilen eosine. While the groups A and B showed no neural tube defects, totally six defective embryos were detected in the groups C and D (two in group C and four in group D). Our results suggested that thiopental caused neural tube closure defects when injected at suprathapeutic dosage levels. However further studies and different models are needed for its role in neurulation.

Keywords : Neural tube defect, Early chick embryo, Neurulation, Thiopental

Supported by : GATA Haydarpaşa Training Hospital

Author : Gökhan İNANGİL, MD

Counsellor : Güner DAĞLI, MD, Prof.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
İNGİLİZCE ÖZET	VI
İÇİNDEKİLER	VII
KISALTMALAR	X
ŞEKİLLER DİZİNİ	XI
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İnsanda Nöral Dokunun Embriyolojik Gelişimi	3
2.2. Nöral Tüp Defekti (NTD)	6
2.3. Teratojenler	8
2.4. Tavuk Embriyosu Gelişimi	12
2.4.1. Yumurtlama Öncesi Embriyonun Gelişmesi	12
2.4.2. Yumurtlama Sonrası Embriyonun Gelişmesi	13
2.4.3. Ekstraembriyonik Membranlar	14
2.4.4. Embriyonik Gelişme Döneminde Meydana Gelen Değişmeler	15
2.4.5. Kuluçka Koşulları	16

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
2.5. Hamburger - Hamilton Sınıflaması	17
2.6. Özel Patojen Bulunmayan (SPF - Specific Patogen Free) Yumurta	19
2.7. Tiyopental	21
2.7.1. Çalışmamızda Neden Tiyopental Seçildi?	21
2.7.2. Etki Mekanizması	22
2.7.3. Fiziko-kimyasal Özellikleri	22
2.7.4. Metabolizma ve Farmakokinetik	23
2.7.5. Organ Sistemlerine Etkileri:	23
2.7.6. Kontraendikasyonlar	25
2.7.7. İlaç etkileşimleri	26
3.GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereç	27
3.1.1. Deney Hayvanı	27
3.1.2. Laboratuar Koşulları	27
3.1.3. İnkübatör	28
3.2. Yöntem	28
3.2.1. Tavuk Embriyolarına Etkin Madde Enjeksiyonu (30. Saat Çalışması)	29
3.2.2. Tavuk Embriyolarının Elde Edilmesi (72. Saat Çalışması)	30
3.2.3. Tavuk Embriyolarının Işık Mikroskopik İncelemesi	31

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
3.2.4. Histopatolojik Takip	31
3.2.4.1. Parafin Doku Takibi	31
3.2.4.2. Hematoksilen – Eozin Boyaması	32
3.2.5. İstatistiksel Analiz	32
4.BULGULAR	33
4.1. Makroskopik Bulgular	33
4.2. Embriyonun Bütününün Işık Mikroskobu Altında İncelenmesi	33
4.3. Histopatolojik Bulgular	34
4.3.1. Hematoksilen – Eozin Boyama	34
4.4. İstatistiksel Değerlendirme	35
5.TARTIŞMA	37
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	45
7.KAYNAKLAR	46

KISALTMALAR

NTD	: Nöral tüp defekti
GATA HEH	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi
TGF	: Dönüştürücü büyüme faktörü (transforming growth factor)
SSS	: Santral sinir sistemi
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
SPF	: Özel patojen bulunmayan (<i>specific patogen free</i>)
HE	: Hematoksilen - eozin
NMDA	: N-metil-D-Aspartat
GABA A	: Gama Amino Butirik Asit Tip A
Pax	: Çiftli kutucuk (<i>paired box</i>) geni
mm	: milimetre
ml	: mililitre
mg	: miligram
μ	: mikron
°C	: santigrat derece
%	: yüzde

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1: Nöral tabakanın şekillenmesi	3
2.2. Nörülasyon ve nöral tüpün oluşumu	4
2.3. Nörülasyon kusuru sonucu oluşan nöral tüp defektlerine örnekler	7
2.4: İnsan prenatal gelişiminin kritik dönemlerinin şematik görünümü	9
2.5. Ekstraembriyonik membranlar	15
2.6. Erken dönem tavuk embriyosu gelişimi ve primitif çizginin oluşumu	17
2.7 Erken dönem tavuk embriyosu gelişimi ve somitlerin oluşumu	18
2.8. Evre 18 embriyonun sagittal planda histopatolojik görünümü	19
2.9 Yumurtanın yapısı	20
2.10. Tiyopental Sodyumun farmakolojik yapısı.	22
3.1. Kullanılan malzemeler ve inkübatör	28
3.2. 30. saat çalışması	30
3.3. 72. saat çalışması	31
4.1. HE ile boyanmış A grubundan 72. saat bir embriyo kesitleri	34
4.2: Nöral tüp defekti izlenen kesitlerden örnekler	35

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
2.1. FDA tarafından yapılan hamilelikte ilaç kategorileri	10
2.2. En sık karşılaşılan teratojen ajan grupları	11
4.1. Gruplara göre denek sayıları	33
4.2. Grupların istatistiksel analiz sonuç tablosu	36

1. GİRİŞ

Doğum defektleri bir yaş altı çocuklarda önde gelen ölüm sebeplerindedir. Nöral tüp defektleri (NTD), doğumsal kalp defektlerinden sonra en sık doğum defektidir. Bununla beraber prenatal ve postnatal dönemde önemli tıbbi, finansal ve sosyal sorunlara yol açmaktadır. NTD etiyojisi oldukça kompleks olup hem genetik hem de çevresel faktörler NTD gelişiminde rol oynamaktadır. Bu yüzden NTD her zaman araştırmacıların ilgisini çekmiştir. Konu ile ilgili çeşitli deneysel modellemeler ortaya atılmıştır.

Gebelerde anestezi indüksiyonunda sıkça kullanılan bir ajan olan tiyopentalin, teratojen olmadığı bildirilmesine rağmen anormal embriyogeneze sebep olabileceği yönünde yayınlar da bulunmaktadır. Embriyo özellikle organogenez döneminde teratojenler olarak bilinen ilaç ve çevresel faktörlere daha duyarlıdır. Erken dönem civciv embriyosu modeli, memelilerde embriyonel gelişimin ilk bir ayına uyan ve kimyasalların embriyonel gelişim üzerine etkilerinin incelendiği bir modeldir.

Çalışmamızın amacı, erken dönem civciv embriyosunda tiyopentalin NTD üzerine etkilerini histopatolojik olarak inceleyerek ortaya koymaktır.

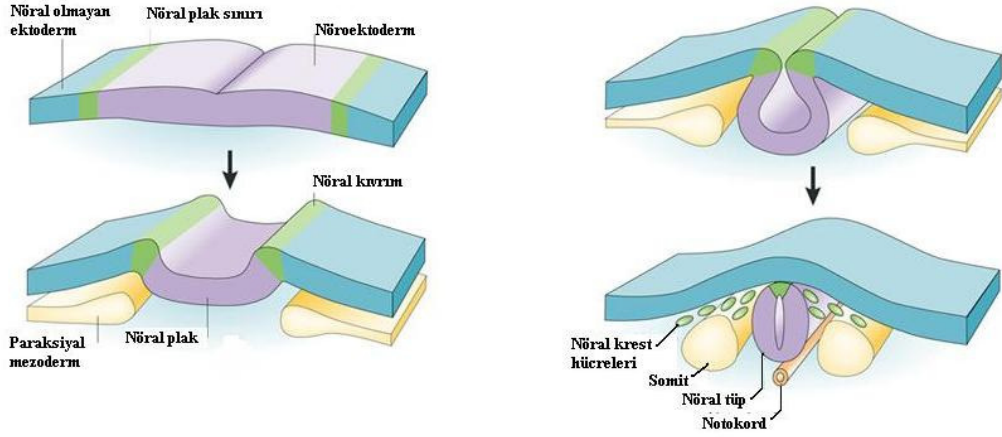
2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsanda Nöral Dokunun Embriyolojik Gelişimi

Dişiden gelen oositin erkekten gelen sperm ile fertilizasyonu sonucu oluşan zigot, hücre bölünmesi, hücre göçü, programlı hücre ölümü (apoptozis) ve büyüme sonucu çok hücreli insan yapısına dönüşür. Prenatal dönem kendi içinde ilk 8 haftayı kapsayan “embriyonik dönem” ve 57. günden itibaren fetusun anneyi terk etmesine kadar devam eden “fetal dönem” olarak ikiye ayrılır (1,2).

Fertilizasyonu takiben totipotent bir hücre olan zigot bölünmeye başlar. Bu dönemde birbirini izleyen bir seri mitotik bölünme ile daha küçük hale gelen ve sayısı artan blastomerler oluşur. Üç bölünmeden sonra blastomerler iç ve dış tabakaları olan, birbirine sıkıca tutunan bir hücre topu haline gelmek üzere bir araya gelirler. Embriyo yeniden bölünerek 16 hücreli “morula (dut)” şekline gelir (3). Fertilizasyondan 3 veya 4 gün sonra morula uterus boşluğuna ilerlerken içinde bir kavite oluşmaya başlar. Bu kavitenin içerisine sıvı dolar ve blastokist boşluğu oluşur. Bu evredeki embriyoya “blastokist”, boşluğa da “blastosel” adı verilir. Üçüncü haftanın en belirleyici olayı gastrulasyondur. Gastrulasyon, primitif çizginin belirmesi ile başlar. Primitif çizginin sefalik ucu genişleyerek primitif düğümü (Hensen düğümü) yapar.

Epiblast hücreleri, primitif çizgi ve düğüm boyunca invajine olarak iki yeni hücre tabakasını yani “endoderm” ve “mezodermi” oluştururlar. İntraembriyonik mezodermal germ tabakasının hücreleri yolk sac ve amnionu örten ekstraembriyonik mezodermle ilişki kuruncaya kadar diğer iki germ tabakasının arasına göç ederler (Şekil 2.1.) (4-6).

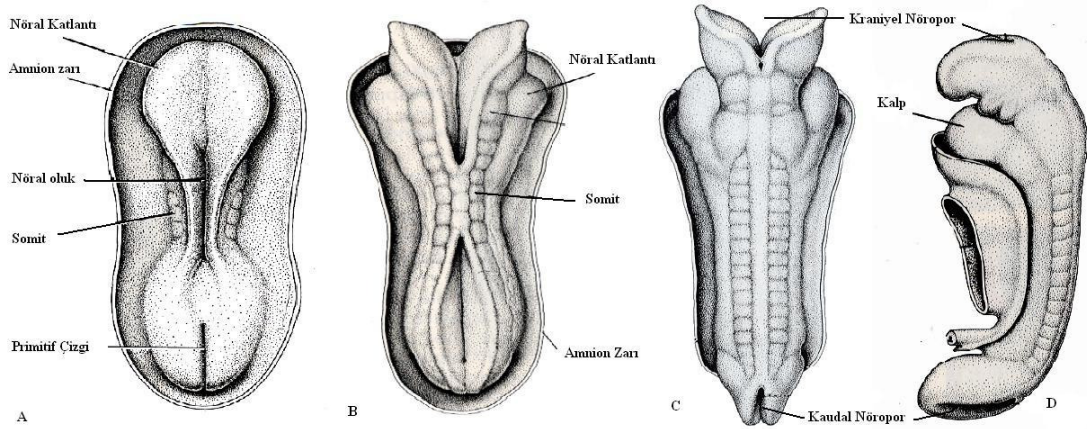


Şekil 2.1. Nöral tabakanın şekillenmesi

Primitif çukurda, invajine olan prenotokordal hücreler ise prokordal plağa ulaşana kadar ilerler. Bu hücreler, notokordal plak halinde endoderme karışırlar. Gelişimin daha ileri evrelerinde, notokordal plak endodermden ayrılır ve solid bir kordon görünümüne sahip “notokord” oluşur (Şekil 2.1). Embriyonun orta hat eksenini oluşturan notokord aksiyal iskeletin ana çatısıdır (3, 4). Notokord oluşuktan sonra ektodermden nöral tüp gelişimini sağlarken, her iki yanında bulunan mezodermi de etkileyerek segmentlere ayrılmaya zorlar. Önce mezodermin dorsalinde yarıklanma olur. Bunun sonucunda oluşan ufak mezoderm parçalarından somitler gelişir. Somitler, ilk olarak embriyonun gelecekteki oksipital bölgesinde ortaya çıkar. Somitlerin oluşması, henüz primitif çizginin arka ucuna gelmeden sona erdiğinden embriyonun kaudal kısmında mezoderm yarıklanmadan kalır. Yarıklanma mezodermin yalnızca dorsal bölümünde sınırlıdır. İlk segmentin önündeki mezoderm de yarıklanma göstermez. İnsanda ilk somit çifti gelişimin 20. gününde embriyonun servikal bölgesinde belirir (3, 4).

Üçüncü embriyolojik hafta içerisinde, embriyonun dorsal orta hattında bulunan ektoderm kalınlaşmaya başlar ve nöral tabakayı oluşturur. Ektodermin indüksiyonunda özellikle TGF (*transforming growth factor* - dönüştürücü büyüme faktörü) ailesi içinde yer alan aktivin, fibroblast büyüme faktörü, bunun dışında retinoik asit ve çeşitli nörotransmitterler gibi sinyal molekülleri görev almaktadır (3, 7, 8).

Bu tabakanın her iki lateral sınırı yükselti yaparak ortalarında boylu boyunca uzanan çukurumsu oluk oluşumuna neden olurlar. İşte bu tabaka lateralinde oluşan yükselti nöral katlantı, ortadaki oluk ise nöral oluk olarak adlandırılır. İşte bu oluşan nöral oluk, lateralinde yükselti olarak bulunan nöral katlantıların mediale doğru yaklaşarak birleşmesi ile silindir şeklinde kapanır ve nöral tüpü oluşturur (Şekil 2.2). Kaynaşma gelecekte boynun oluşacağı 4. somit bölgesinden başlar sefalik ve kaudal yönde devam eder. Kaynaşma tamamlanincaya kadar nöral tüpün kaudal ve sefalik uçları, amnion boşluğu ile sırasıyla kranial ve kaudal nöroporlar yoluyla ilişkidir. Kranial nöropor 25. gün (18 - 20 somitli evre) ve posterior nöropor 27. gün dolaylarında (25 somitli evre) kapanır. Nöroporların kapanmasıyla nörolasyon artık tamamlanmıştır. Sinir sistemi, kaudal bölgesi dar ve sefalik bölgesi daha geniş, içinde spinal kord, birkaç dilatasyon ve beyin keseciklerinin yer aldığı kapalı bir tübüler yapı haline gelmiştir. Bu evrede embriyo yaklaşık 3 - 5 mm boyundadır (4).



Şekil 2.2: Nörolasyon ve nöral tüpün oluşumu

Üç tabakalı embriyonun oluştuğu gastrulasyon dönemi sonrası embriyoda SSS (Santral sinir sistemi) gelişimi, 28. günde tamamlanan “primer nörolasyon” olarak adlandırılır. Bu hafta içerisinde başlayan spinal kordun distal kısımları olan kauda equina ve liflerinin oluşumu başlayacak ve bu evre de sekonder nörolasyon evresini oluşturacaktır. Sekonder nörolasyon evresinde tüm nöral tüpün üzeri, yüzey ektodermi ile kapanmış durumdadır.

İntrauterin hayatın 30. gününde oluşan bu hücre grubunda vakuolizasyon gelişir. Vakuollerin birbirleri ile birleşmesi sonucu hücre grubu içinde tek bir kavite oluşur. Bu olaya “kanalizasyon” adı verilmektedir. 38. günde bu hücre grubu ile nörolasyon sonucu oluşmuş olan üst medulla spinalis ile L1-2 hizasında birleşir ve füzyon oluşur (5). Nöral tüpün distalindeki kaudal hücre kütlesi kuyruk şeklinde uzanır. Bu oluşum gerçekleşirken çok sayıda lümen ve ependimal topluluklar filum terminale içinde organize olurlar ve distal konus medullaris meydana gelir. Bu kabaca oluşan distal spinal kord, 38. günde kaudal nöral tüpün lümeninde azalma yani retrogresif diferensiyasyon ile, kuyruk tomurcuğunun regresyonu başlar. En kaudal kısımda olan hücre grubu 6. ve 7. haftada regresyona uğrar ve ileride filum terminale olacak olan fibröz bir bant oluşur (4).

Birleşmeden sonra gelişen, kontrollü ve planlı hücre ölümü ile bu dönemde nörolasyon ve nöral dokunun üzerinin cilt ile kapanması tamamlanmıştır. Posterior nöroporun bulunduğu bölge, gelişmiş fetüste T11-L4 segmentleri arasına uymaktadır ve burası myelodisplazinin en sık karşılaşıldığı bölge olarak bilinmektedir (9). Posterior nöroporun kapanması ile birlikte pia, araknoid ve duramater gelişmeye başlar. SSS 40. gününde ventral yüzde belirmeye başlayan dura mater, 52. günde tüm sistemi sarar (4, 9).

Vertebral kanalın oluşumu ise 3 evrede tamamlanır. İlk evrede membranöz yapıda olan ventral subkordal ve dorsal subkordal zonlar nöral tüpün lateralinden göç eden mezenkim hücreleri tarafından oluşturulur. Bu süreç 25. günde başlar. Bu ventral ve dorsal subkordal zonların her ikisi de medial ve lateral gruplara ayrılıp, medial gruplar vertebra oluşumunu, lateral gruplar ise paraspinal kas gruplarının oluşumuna yol açarlar. Ayrıca bir grup mezenkim topluluğu hemen sonra nöral tüpün posterioruna uzanarak posterior nöral ark ve meninkslerin oluşumunda da etkindir. Vertebral kolon oluşumunun diğer evreleri, yukarıda bahsettiğimiz zonların bilateral ve simetrik olarak çalışması ile vertebral kolonun ve disk aralıklarının farklılaşması yani kondrifikasyon evresi ve vertebra oluşumunun tamamlanmasını içeren osifikasyon evreleridir. Vertebral kolonun kaudal

oluşum evresi ileri derecede organize olmayıp, gerek sakrum gerekse de koksiks oluşumu bir seri regresyonu da içerir. Bu aşamalardaki disorganizasyon lipomlar, teratomlar gibi kaudal regresyon anomalilerinin oluşumuna yol açabilirler (10).

2.2. Nöral Tüp Defekti (NTD)

Nöral tüp defektleri prenatal ve postnatal dönemde önemli tıbbi sorunlara yol açabilen, ayrıca önemli finansal ve sosyal boyutları da olan konjenital malformasyonlardır. Çocuk felci, müsküler distrofi ve travmatik paraplejiden daha fazla çocuğu özürlü kılmaktadır Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 10.000 canlı doğumda 3 nöral tüp defekti saptanırken (3), bu oran İzmir Tepecik SSK hastanesinde yapılan bir çalışmada 1000 canlı doğumda 8,9 olarak saptanmıştır (11). Nöral tüp defeklerinin etyolojisi kesin olarak bilinmemektedir. Ancak bir çok etken, ayrı ayrı bu patolojiye sebep olabilmektedir.

Embriyonik hayatın ikinci haftasında nöroektoderm belirir ve 4. haftanın sonunda nöral tüp kapanır, diğer bir deyişle nörolasyon tamamlanır Dolayısıyla gestasyonun bu ilk ayı içerisinde oluşabilecek duraklamalar NTD'lerine neden olur. Geri kalan embriyolojik dönemde, nöronların çoğalarak tabakalar oluşturması ve bu tabakalara doğru göçü gerçekleştiğinden, bu aşamada oluşabilecek patolojilere de "migrasyon anomalileri" denir. Malformasyonlar, herhangi bir bozukluğa neden olmayacak kadar basit ya da ağır nörolojik hasara yol açabilecek veya yaşamla bağdaşmayacak kadar ağır ve karmaşık da olabilir. Bu defektler tipine ve bulunduğu bölgeye göre ciddiyet olarak farklılık göstermektedir Beyin sapı, serebellum bozukluğu, hidrosefali, sfinkter kusurları, ortopedik deformiteler gibi bir çok sistem de beraberinde tutulabilir ve tedavide ekip yaklaşımını gerektirir.

Nörolasyon defekti sonucu oluşan orta hat kapanma kusurları arasında myelomeningosel, lipomyelomeningosel, split kord malformasyonu, dermal sinus traktı ve ensefalosel sayılabilir Anensefali SSS'ni etkileyen en ciddi ve aynı zamanda en sık görülen nöral tüp defekti olup nöral

katlantılarda yetersiz füzyon sonucu parsiyel veya total sekonder beyin hasarına yol açmaktadır. Bu defekt tüm NTD olgularının %50-65 ini kapsamaktadır ve ölümcüldür (12,13).



Spina Bifida Occulta

Meningocele

Meningomyelocele



Lipomyelomeningocele

Meningomyelocele

Anensefali

Şekil 2.3. Nörülasyon kusuru sonucu oluşan nöral tüp defektlerine örnekler

Kuyruk tomurcuğunun kanalizasyonu hatası sonucu oluşan orta hat kapanma defektleri, kuyruk tomurcuğunu oluşturan hücre grubunun kanalizasyon ile ayrışması ve apoptozis ile fazla hücrelerin ortamdaki kaldırılması aşamadaki defektler nedeni ile oluşur. Bunlar arasında; terminal myelosistosel, sakral lipom ve kalın filum terminale sayılabilir. Bu gruptaki anomaliler "spina bifida okkulta" olarak da bilinmektedir. Defektin üzeri sıklıkla ciltle kaplıdır. Bu olgulara eşlik edebilecek nörolojik, kutanöz, ortopedik ve ürolojik bir takım bulgular olabilir.

2.3. Teratojenler

Teratojen, embryo-fetal dönemde maruz kalınması durumunda bebekte kalıcı olarak yapı veya fonksiyonel değişikliğe neden olarak anomali oluşumuna neden olan veya anomali insidansını arttıran ajanlar veya faktörlerdir. Doğumda ortaya çıkan malformasyonların sadece % 10'unda neden teratojenlerdir. Hızlı farklılaşma dönemi sırasında, organlar ve embriyonun bazı bölümleri teratojenlere daha duyarlıdır (Şekil 2.4) (1.) Biyokimyasal farklılaşma, morfolojik farklılaşmadan önce gelişir ve bu sırada yapılar teratojenlere daha duyarlıdır. Hücrel farklılaşma başlayıncaya kadar, teratojenler anomali oluşmasına neden olacak şekilde etkili değillerdir. Ancak bunların erken dönem etkileri embriyonun ölümüne neden olabilir. Bir teratojen, hücrelerin hepsini ya da çoğunu hasarlayabilir, bu da embriyonun ölümü ya da sadece birkaç hücrenin ölümü ile sonuçlanabilir. Bu durumda zigottan itibaren gelişen, embriyo ile birlikte plasentanın embriyolojik bölümü ve ilişkili tüm membranlarını kapsayan iç ve dış yapılar kendini yenileyebilir ve embriyo doğum defekti oluşmadan gelişebilir. Majör gelişim defektleri, erken dönem embriyolarda daha yaygındır (%10-15), fakat çoğu ilk 6 haftada kendiliğinden düşükle sonlanır. Spontan düşüklerin %50-60'ında kromozom anomalileri bulunmaktadır (1).

Tablo 2.1. FDA tarafından yapılan hamilelikte ilaç kategorileri

Kategori	Açıklaması
A	En güvenilir ilaçlardır. Gebelerde zararlı etkisi saptanmamıştır. En sık kullandığımız ilaçlardan penisilinler, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler ve parasetamol bu gruptadır
B	Gerekli ise rahatça kullanılabilir. Hayvanlarda fetotoksik değildir, gebelerde kontrollü inceleme yoktur. Ya da hayvanlarda fetotoksiktir, ama gebelerde fetotoksosite doğrulanmamıştır. Famotidin, lansoprazol, loperamid bu grupta yer almaktadır
C	Yarar zarar oranına göre kullanılabilir. Hayvanlarda teratojenik veya embriyosid, gebelerde kontrollü inceleme yoktur. Ya da hayvanlarda ve gebelerde ilaç incelenmemiştir. Analjezik dozda aspirin bu kategoridedir.
D	Gebede ciddi, yaşamsal bir sorun var ve alternatif yoksa kullanılabilir. Gebelerde teratojenitesi kanıtlanmıştır
X	Gebelerde kontrendikedir. Teratojenitesi kanıtlanmış, yarar/zarar oranı çok düşüktür

Birçok kalıtsal ve çevresel etkenlerin embriyonik gelişimi, ekstrasellüler matriksi, intrasellüler çevreyi, hücre yüzeyini ve fetal çevreyi değiştirerek etkilediği gösterilmiştir. İlk hücresel yanıtın birden fazla şekilde (genetik, moleküler, biyokimyasal ve biyofiziksel) gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu da hücresel döngüde farklı sıralanmanın oluşmasına neden olur. Bu farklı lezyonlar, intrauterin ölüm, gelişme geriliği, fetal büyüme geriliği veya fonksiyon bozuklukları gibi çeşitli şekillerde en son defektin şekillenmesine neden olur. En sık bilinen teratojen ajanlar Tablo 2.2'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. En sık karşılaşılan teratojen ajan grupları.

D kategorisi	İlaçlar
1.Santral Sinir Sistemi ilaçları	İmipramin amitriptilin, klomipramin, nortriptilin, opipramol, diazepam
2.Kardiyovasküler ilaçlar	ACE inhibitörleri, Diüretikler (Tiazidler, indapamid, spironolakton) Ca kanal blokerleri (Verapamil)
3.Hormonlar	Medroksiprogesteron, linestrenol, etisteron, kortizon
4.Oral antidiyabetikler	Klorpropamid, tolbutamid, gliburid, tolazamid
5.Antitiroidler	Metimazol, propiltiyourasil, karbimazol
6.Antibiyotikler	Tetrasiklinler, aminoglikozidler, sulfonamidler
7.Antiepileptikler	Fenobarbital, fenitoin, valproik asit, primidon, trimetadion
8.Narkotik analjezikler	
9. Antineoplastikler	Aminopterin, metotreksat
10.Diğerleri	Povidon iyot, potasyum iyodür, radyoopak maddeler, yüksek doz Vitamin D.
X kategorisi	
1.Sedatif-hipnotikler ve alkol	Etanol, flunazepam, temazepam, triazolam
2.Oral antikoagülanlar	Varfarin
3.Bazı hormonlar ve antagonistleri	Östrojenler, projestinler, mifepriston, danazol, oral kontraseptifler, testosteron
4.Bazı aşular	Kızamık, kızamıkçık, kabakulak
5.Gastrointestinal sistem ilaçları	Mizoprostol
6.Hipolipidemik ilaçlar	Lovastatin, simvastatin, atorvastatin
7.Antineoplastikler	
8.Antimalaryal ilaçlar	Kinin
9.Antiviral ilaçlar	Ribavirin
10.Vitaminler	Vitamin K, Vitamin A (yüksek dozda)

2.4. Tavuk Embriyosu Gelişimi

Memeli hayvanlarda, embriyonal gelişim anne karnında gözlenirken, avianlarda (kanatlılar), tamamen vücut dışında gerçekleşir. Cıvciv embriyonal gelişimini, oluşumu için gerekli bütün besin maddelerinin depolandığı yumurta içinde tamamlar. Yumurtadan cıvciv gelişimi için bazı çevre koşullarına ihtiyaç duyulur. Günümüzde bu işlem yumurtaların kuluçka makinalarına konması ile de sağlanabilmektedir (13).

Tavuk embriyosunun gelişmesi iki bölüm altında incelenebilir:

1. Yumurtlama öncesi embriyonun gelişmesi.
2. Yumurtlama sonrası embriyonun gelişmesi.

2.4.1. Yumurtlama Öncesi Embriyonun Gelişmesi

Embriyonik gelişmenin ilk safhası 40,6-41,7°C arasında değişen vücut sıcaklığında, tavuk vücudunda olmaktadır. Tavuk ve horozların çiftleşmesi sırasında sperm yumurta kanalında hızla yol alarak 30 dakikada infundibulumu ulaşır. Yumurtlanmadan önceki embriyonik gelişim, ovulasyondan sonraki 15 dakika içerisinde zigotun oluşumu ile infundibulumda başlatılır (13).

Zigot oluşumundan sonra embriyonik yapı gelişmeye başlar. Yaklaşık 4 saat sonra ilk hücre bölünmesi meydana gelir. Yumurta, istmusa girdikten 1 saat sonra embriyo 16 hücreden ibarettir. Uterustaki ilk 4 saat içerisinde gelişen embriyodaki hücre sayısı, aynı şekilde geometrik bölünmeler sonucu 256'yı bulur. Yumurta henüz yumurta kanalında iken disk şeklinde "blastoderm" adı verilen tek katlı bir hücre kümesinden ibarettir. Embriyonik gelişmenin gerçekleştiği yer bunun merkezidir. Blastodermin bu merkez kısmı saydamdır. Sarı ile temas halinde kalan saydam olmayan dış kısma nazaran daha koyu renklidir. Bu safha döllenmeden sonraki yaklaşık 24 saat sonra ve yumurta yumurtlamadan hemen önce meydana gelir. İlk hücre farklılaşması uterusu yumurta yumurtlanmadan hemen önce meydana gelir. Yani blastoderm iki hücre tabakası halinde farklılaşır. Bunlardan yüzeyde ve dışta olana "ektoderm", içte olana "endoderm" adı verilir. Döllenmiş yumurta, yumurtlandığı zaman bu iki tabakadan oluşmaktadır (15).

2.4.2. Yumurtlama Sonrası Embriyonun Gelişmesi

Yumurta, kuluçka makinesine konuncaya kadar embriyo, uyku evresindedir. Embriyonal gelişmenin kuluçka makinesinde ihtiyaç duyduğu optimum sıcaklık, $37,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'dir. Ancak 24°C üzerindeki sıcaklıklarda da embriyo gelişebilecektir. Yumurtlama sonrasında embriyonal gelişmeyi tam olarak durdurmak için $15-18^{\circ}\text{C}$ arasında bir çevre sıcaklığı sağlanmalıdır. Bu amaçla kuluçkalık yumurtaların kuluçka makinesine konmadan önce muhafaza edildikleri yerin sıcaklığının bu optimum sınırlar içerisinde olmasına dikkat edilmelidir (13).

Dölleniş yumurta $37,5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıktaki kuluçkaya konduğunda embriyonal gelişme kaldığı yerden devam eder. Hücre bölünmesi hızla meydana gelirken farklılaşmanın da devam ettiği ve ektoderm ile endoderm tabakalarından 3. tabaka olan "mezoderm" oluşur. Embriyonal gelişmenin daha ileri aşamalarında her tabakadan farklı doku ve organ sistemlerinin meydana geldiği görülür (13).

Ektoderm tabakasından; deri, tüyler, gaga, tırnaklar, sinir sistemi, gözün mercek ve retina tabakaları ile ağzın mukoza tabakası meydana gelir. Bunlar hemen hemen vücudun bütün dış kısımlarını oluşturur.

Endoderm tabakasından; sindirim, solunum ve endokrin sistemleri oluşur.

Mezoderm tabakasından; kas, kemik, kan, üreme sistemi ve boşaltım sistemi gelişir.

Embriyonun 21 günlük kuluçka periyodu boyunca bu üç tabakadan oluşan doku ve organ sistemleri meydana gelir (13, 16).

2.4.3. Ekstraembriyonik Membranlar

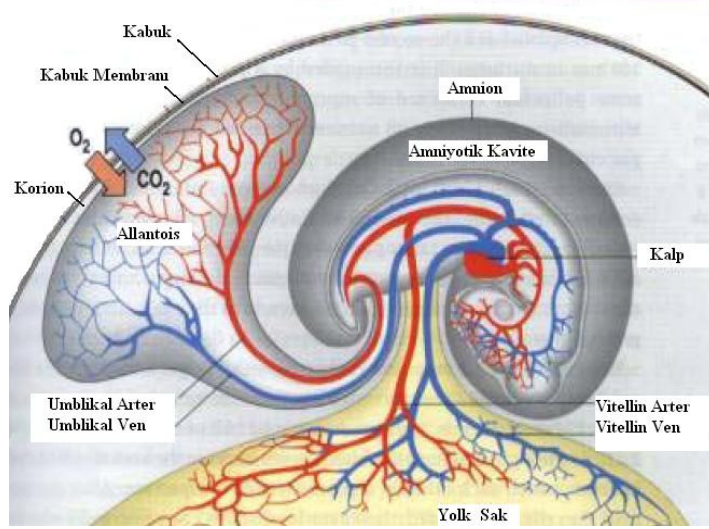
Tavuk embriyosunun annenin vücudu ile herhangi bir anatomik-organik bağılılığı olmadığından, yumurtanın kapsadığı besin maddelerini kullanabilmek için bazı membranlara (zar kese) sahiptir. Embriyonun büyümesinde fonksiyonel olan 4 embriyonal zar veya kese vardır (13, 16).

Amnion: Kuluçkanın 2. gününde oluşmaya başlar ve 3 - 4. gün embriyoyu tamamen içine alacak şekilde kapanır. Kan damarları olmayan saydam sıvı dolu bir kesedir. Embriyonun gelişimine yardım eder ve onu mekanik şoklardan korur (13, 16).

Korion: Kuluçkanın 2. gününde, ektoderm ve mezoderm tabakalarından amnion kesesi ile beraber diğer bir kese gelişir ki, buna korion kesesi denir. Metabolik fonksiyonların tamamlanmasında rol oynar (13, 16).

Allantois: Korion ile amnion arasında kan damarları kaplı allantois kesesi gelişir. Fonksiyonel akciğer gelişinceye kadar geçici solunum organı olarak görev yapar. Geliştiği zaman embriyoyu tamamen çevreler. Embriyo kanı, bu membran yardımıyla oksijen alır ve karbondioksit verir. Embriyonal böbreklere ait salgılar, bu zar tarafından allantoik boşluğa atılır. Bu zar, albuminin sindirilmesine ve yumurta kabuğundan kalsiyum absorbe edilmesine de yardım eder. Allantois, kuluçka makinesindeki gelişmenin 3. gününde ortaya çıkar ve 12. gününde tamamen gelişmiş olur (13, 16).

Yumurta Sarısı Kesesi: Bu zar yumurta sarısını çevreleyen kan damarları ile kaplanmış bir kesedir. Yumurta sarısının eriyebilir ve sindirilebilir bir şekle dönüşmesini sağlayan bir enzim salgılar. Bu sayede yumurta sarısı absorbe edilip gelişen embriyo içerisine taşınabilir. Kuluçkadan çıkıştan hemen önce, yumurta sarısı zarı, civcivin vücut boşluğu içerisine çekilir ve burada yine besin deposu görevi yapar (13, 16).



Şekil 2.5. Ekstraembriyonik membranlar

2.4.4. Embriyonik Gelişme Döneminde Meydana Gelen Değişmeler

Hava Boşluğu: Kuluçka döneminde kabuk yüzeyindeki gözenekler vasıtasıyla su kaybı olur. Bu su kaybı, yumurta içeriğinin büyüklüğünün azalmasına ve hava boşluğunun büyümesine neden olur. Kuluçkanın 19. gününden sonra hava boşluğu genellikle yumurtanın 1/3'ünü kaplamaktadır.

Civcivin Yumurta İçindeki Konumu: Embriyo yaklaşık 17.günde yumurta içinde çıkış pozisyonunu alır. Bu durumda, boyun hava boşluğuna yönelir ve baş öne doğru, gaga sağ kanadın altında, ayaklar vücudun iki yanındadır ve çoğu kez ayaklar başa değerkler.

Civciv Embriyosunun Gelişme Dönemleri: Yumurta yumurtlandıktan sonra kuluçka devresinde embriyonik gelişme 4 dönemde tamamlanır.

Birinci Dönem: 1-5. günler (İç organların gelişmeye başlaması).

İkinci Dönem: 6-14. günler (Dış organların gelişmeye başlaması).

Üçüncü dönem: 15-20. günler (Embriyonun büyümesi)

Dördüncü dönem: 21. gün (Civcivin çıkışı).

Bu sürecin tamamlanmasıyla yaklaşık 20+1/2 günlük kuluçka dönemi sona erer (13, 16).

2.4.5. Kuluçka Koşulları

Başarılı bir kuluçka ve kuluçka çıkışının gerçekleştiği inkübatörler için dikkat edilmesi gereken dört önemli faktör vardır (13, 16). Bunlar; sıcaklık, nem, havalandırma ve çevirmedir.

a. Sıcaklık: Kuluçka döneminde sıcaklık kontrolü en kritik faktördür. Çünkü gelişen embriyo, çevre ısısına oldukça hassastır. Her embriyonun gelişmesini en iyi şekilde tamamlayabileceği optimum bir sıcaklık derecesi vardır. Optimum gelişim sıcaklığı bütün yumurtalar için aynı değildir.

Yumurtalar farklı özelliklerde olabileceklerinden genellikle 37.5-37.7°C arasındaki ortalama inkübasyon sıcaklığı uygulanır. Bu uygun sıcaklık şartlarının üzerinde veya altında bulunan koşullarda embriyo gelişebilir, fakat tam sağlıklı olmaz (13, 16).

b. Nem: Embriyonun sağlıklı ve normal büyüklükte bir civciv olarak gelişimi için yumurtanın içerdiği suyun bir miktarının buharlaşmış olması gerekir. Eğer yumurta içeriği çok çabuk buharlaşırsa civciv normalden küçük, yeterli bir hızda buharlaşmadığında ise civciv daha iri olur. Su kaybını kontrol edebilmek için yumurtayı çevreleyen havanın rutubetini kontrol etmek gerekir. İnkübatörde nem oranının %52-55 olması gerekir (13, 16).

c. Havalandırma: Gelişmekte olan embriyo, sabit bir oksijen düzeyine, karbondioksit ve suyun atılmasına ihtiyaç duyar. Embriyo solunumunun sağlanması için inkübatörün iyi bir havalandırma sistemine sahip olması gerekir. İnkübasyonun ilk haftalarında embriyolar CO₂'e karşı çok duyarlıdırlar. Bu nedenle CO₂ oranının %0,1-0,4 arasında olması gerekir. (13, 16).

d. Çevirme: Gelişen embriyonun kabuk membranlarına yapışmasını ölmesini engellemek için yumurtaların inkübasyon sırasında düzenli olarak çevrilmesi gerekir. İnkübatörde yumurtalar künt uçları yukarı ve sivri uçları aşağı dönük olarak bulundurulmalıdır. Bu durumda embriyonun baş kısmı

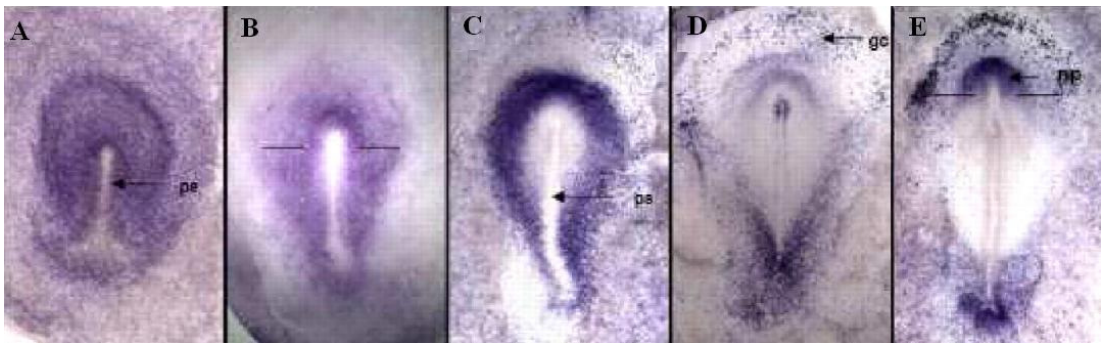
künt uçta ve hava odacığına yakın olarak gelişir. Başlangıçta yumurtaların uzun eksenini düşey ile 45° açı yapacak şekildedir. 90° çevrilmeye yumurta diğer tarafa 45° eğik duruma gelir. Çevirme 2-3 saatte bir veya en azından günde beş kez olmalıdır (13, 16).

2.5. Hamburger - Hamilton Sınıflaması

Dölleniş yumurtadan tavuk oluşumu 21 günlük inkübasyon süresi ile tamamlanır. Bu inkübasyon süreci boyunca embriyonun gelişimi üzerine çeşitli sınıflamalar yapılmıştır. 1900' lü yılların başlarında Keibel ve Abraham tavuk embriyolarının morfolojik karakterlerine göre bir evreleme tanımlamışlardır (15). Ancak 1951 yılında Hamburger ve Hamilton tarafından tarif edilen gelişimsel evreleme kabul edilmiş olup günümüzde geçerliliğini korumaktadır (17).

Hamburger-Hamilton'a göre tavuk gelişimi 45 seri kronolojik sınıflamadan oluşmaktadır. Bu sınıflamaya göre;

1) Embriyonun inkübasyon periyodunun çok erken dönemleri olan ve primitif çizginin (*primitif streak*) gelişimin gerçekleştiği evrede embriyonun eksen ve kenarları görülebilir hale gelmektedir. Bu süreç evre 1 - 6 dönemlerine (0. - 25. saatler) uyar (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Erken dönem tavuk embriyonu gelişimi ve primitif çizginin oluşumu

A.Evre 3, **B.**Evre 3+, **C.**Evre 4, **D.**Evre 5, **E.**Evre 6 tavuk embriyoları

2) Evre 5 – 8'deki (19. - 26. saatler) embriyolar, nörülasyon evresindedir. Kranial formasyon, nöral katlantı, nöral tüp, notokord oluşumu bu dönemde gerçekleşmektedir (15, 17).

3) Evre 6 - 14 dönemlerde (23. - 54. saat) paraksiyal mezodermin segmentasyonu ile somitler gelişir. Somitlerin oluşumu düzenli olarak her 90 dakikada bir görülür. Hamburger - Hamilton'a göre 10. evrede embriyo 10 somite sahiptir. Bu dönemden sonra embriyoda her dönemde 3 somit belirir. Fakat 14. dönemdeki embriyo 22 somite sahiptir Deneysel çalışmalarda ve özellikle nöral tüp gelişimi araştırmalarında 30. saat çok önemlidir. Bu aşamada etkisi araştırılan ajan enjekte edilmektedir. Ayrıca deneklerin istenilen evrede olup olmadıkların kontrolü yapılmaktadır. 30. saat embriyolar, çoğu kez Hamburger – Hamilton sınıflamasına göre evre 9'dadır (Şekil 2.7).

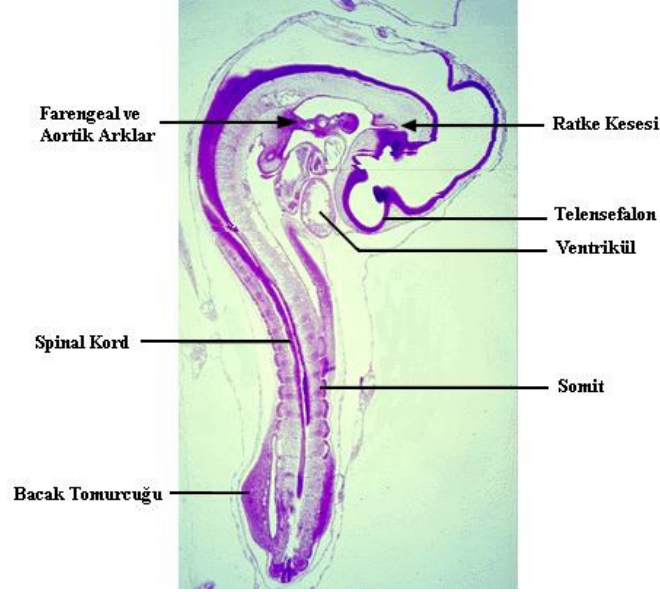


Şekil 2.7. Erken dönem tavuk embriyosu gelişimi ve somitlerin oluşumu. Sırasıyla 30, 48, 56, 72. saatlere ait embriyolar

4) Evre 8 - 14 sürecinde (24. - 48. saat) aynı zamanda sindirim sistemi, kan adacıkları, göz ve kalp şekillenmeye başlar. 44. saatte ilk kalp atımı başlar (15, 17).

5) Evre 18 - 23 (54. - 72. saat) sonunda embriyonun kanat ve ekstremiteleri gelişmeye başlar. Sonraki dönemlerde embriyo dönme ve kıvrılma hareketleri ile 21 günlük gelişimine devam eder (15, 17). İn ovo

deneysel tavuk embriyosu modellerinde, özellikle nöral tüp gelişimi araştırmalarında bir diğer önemli dönem 72. saattir. Bu aşamada etkisi araştırılan ajanın nöral tüp üzerindeki etkileri histopatolojik olarak incelenmektedir. 72. saat embriyolar çoğu kez Hamburger – Hamilton sınıflamasına göre evre 18'dir (Şekil 2.8).



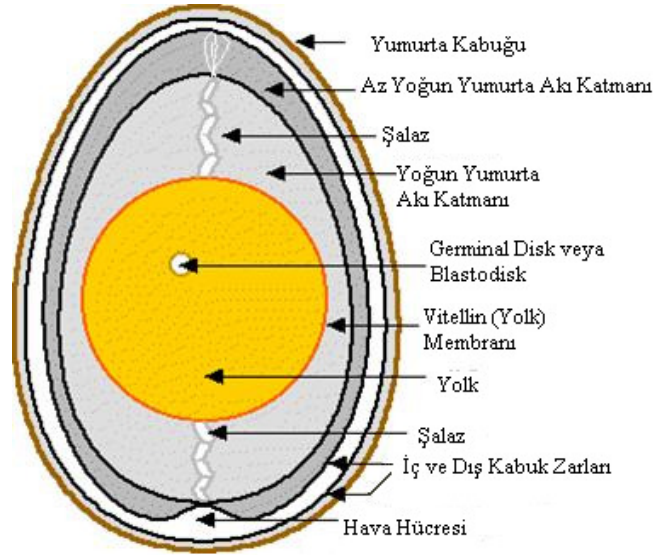
Şekil 2.8. Evre 18 embriyonun sagittal planda histopatolojik görünümü

2.6. Özel Patojen Bulunmayan (SPF - *Specific Patogen Free*) Yumurta

Canlı tavuk yumurtalarının gelişimi, embriyolojide oldukça gelenekselleşmiştir. Evcil kümes hayvanlarından elde edildikleri için istenilen dönemlere ait embriyoların rahatlıkla elde edilebilmesi ve inkübasyon periyotlarının kısa olması açısından vertebralıların, özellikle memelilerin gelişimi için tavuk embriyosu çok iyi bir model olmaktadır.

Deneysel araştırma konusu, insanda nörolasyon olduğuunda; tavuk embriyoları, insan nörolasyon paterni ile benzer özellikler göstermesi nedeniyle bu tip çalışmalarında tercih edilen bir denek grubudur (18-21).

Virüs araştırmalarında ve aşı üretiminde tavuk embriyosu önemli bir yer tutmaktadır. Ticari yumurtaların enfekte olabilecekleri ihtimali ile “**SPF**” terminolojisi ortaya atılmıştır. SPF (Specific Pathogen Free); bünyelerinde belirli patojenler ve bunlara ait antikorlar bulunmayan tavuklardan meydana gelmiş bir sürüdür. Bu sürülerin barındırıldığı kümeslerin ısı, yem, hava, su ve diğeri gerekli materyalleri tamamen kontrollü olarak özel sistemlerle sağlanır. SPF sürülerinin arı olduğu hastalıklar; adenovirüs, Gumboro (Enfectious Bursal Disease: IBD), Marek, Reovirüs, Newcastle disease (yalancı tavuk vebası), İnfluenza tip A (Avian influenza – tavuk vebası), Egg Drop Syndrome 76 (EDS76), enfeksiyöz bronşitis, enfeksiyöz laringotrakeitis, Leucosis tip A ve B, avian ensefalomyelitis, paramyxo 1 ve 2, mycoplasma gallisepticum, mycoplasma synovie (enfeksiyöz sinovitis), salmonella gallinarum (tavuk tifosu), salmonella pullorum, fowl pox (çiçek) ve chicken anemia virus enfeksiyonudur (enfeksiyöz anemi). SPF sürüleri hayvanlarının solunum, sindirim, ürogenital sistemleri, deri ve mukozalarında hastalık yapıcı karakterde hiçbir patojen mikroorganizma bulunmamaktadır.



Şekil 2.9. Yumurtanın yapısı

2.7. Tiyopental

Tiyopental, barbitürat grubundan kısa etki süreli pentobarbitalin tiyo türevidir. Lundy tarafından 1935 yılında kullanıma sokulmasından itibaren hızlı hipnotik etkisinden dolayı en sık kullanılan indüksiyon ajanı olmuştur (22). Çok kısa etkili başka barbitüratlar mevcut olsa da anestezi indüksiyonunda inhalasyon anestezikleri ile birlikte en sık tiyopental kullanılmaktadır (23).

2.7.1. Çalışmamızda Neden Tiyopental Seçildi?

Teratogenez riskine rağmen, genel anestezi hamileliğinin ilk trimestirindeki hastalarda kullanılmak durumundadır. ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 1979 yılında, ilaçları hamilelikte kullanımları ve olası fetal riskler açısından Tablo 2.2'de belirtildiği gibi sınıflandırmıştır. Bu sınıflamada farmakolojik maddenin gebelik kategorisi, o maddenin gebe anne tarafından kullanılması halinde fetüste ortaya çıkacak hasar oluşturma riskinin bir belirteçidir. Gebelik kategorileri, anne sütüne geçen farmakolojik maddeler ya da metabolitlerinin oluşturduğu riskleri içermez.

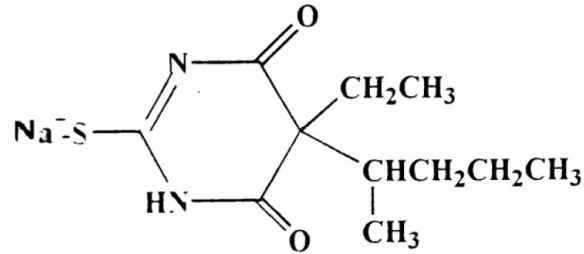
Tiyopental 1930'lu yıllardan beri kullanılmakta ve gebelerde ilk trimesterda teratojenik olmadığı ratlarda (24) ve insanlarda retrospektif (25) olarak gösterilmiş bir indüksiyon ajanıdır. Ancak anormal embriyogeneze sebep olabileceği yönünde yayınlar da bulunmaktadır (26). Etkisini GABA ve benzodiyazepin reseptörlerinin aktivitesini artırarak gösteren tiyopental, FDA tarafından C kategorisi olarak değerlendirilmiştir. Bununla beraber teratojen olarak bilinen başta diazepam olmak üzere benzodiyazepinlerle benzer mekanizmalar ve reseptörler üzerinden etki gösterdiğinden bu çalışmada tiyopentalin nörolasyona etkilerini ortaya koymayı amaçladık.

2.7.2. Etki Mekanizması:

Barbitüratlar bilinç dahil pek çok vital fonksiyonu kontrol eden, beyin sapında yerleşmiş retiküler aktive edici sistemi (nöron ve düzenleyici merkezlerden oluşan kompleks polisinyaptik ağ) deprese ederler. Santral sinir sisteminde spesifik sinapslarda iki tip etki oluştururlar; inhibitör nörotransmitterlerin etkilerini kolaylaştırır veya artırır. GABA'nın etkisi ile açılan Cl iyon kanallarının uzun süre açık durumda kalmasına neden olurlar. Eksitator nörotransmitterlerin (asetilkolin, glutamik asit) sinaptik etkilerini inhibe eder. Tüm bu bulgular barbitüratların santral sinir sistemindeki etkilerinin spesifik barbitürat reseptörleri aracılığı ile oluştuğunu düşündürmektedir (27, 28).

2.7.3. Fiziko-kimyasal Özellikleri

Anestezi uygulamasında kullanılan tiyobarbitüratlarda 2. karbondaki oksijen atomunun yerini bir sülfür (S) atomu almıştır. Bu küçük kimyasal değişiklik barbitüratın santral sinir sistemindeki etkisinin çabuk başlamasını ve kısa sürmesini sağlar (28).



Şekil 2.10. Tiyopental Sodyumun farmakolojik yapısı.

Kimyasal yapısı: Sodyum 5-etil-5-(1-metilbütil)-2-tiobarbitürat

Tiyopental, anestezi pratiğinde; premedikasyonda, indüksiyonda ve anestezi idamesinde kullanılmaktadır. İnkomplet iskemide beyni korumak amaçlı da kullanılmaktadır. Tiyopental İV indüksiyon ajanı olarak kullanılan mükemmel bir hipnotiktir. Tiyopental 15–30 sn'de etki ederek yumuşak bir indüksiyon sağlar. Tiyopentalin indüksiyon dozu 3–5 mg/kg' dır (29).

2.7.4. Metabolizma ve Farmakokinetik

Klinik anesteziye, indüksiyonda genellikle intravenöz yolla kullanılır. Çocuklarda rektal yol kullanılabilir. Tiyopentalin intravenöz uygulanmasını takiben santral sinir sistemindeki etkisinin başlangıç zamanı, fizyokimyasal özellikleri ile özellikle yüksek lipid eriyebilirliği ve pKa değeriyle ilgilidir. Tiyopentalin 3–5 mg/kg dozda uygulanması, 10–15 dakika süren bilinç kaybı ve 5–10 dakika süren bir anestetik devre oluşturur. Tiyopentalin etkisinin kısa olmasının nedeni ilacın beyinden diğer dokulara yeniden dağılımıdır (27). Tiyopentalin beyinden yeniden dağılımında kaslar ve cilt dokusu yağ dokusundan daha önemli bir rol oynar (30). Tekrarlayan uygulamaları periferik kompartmanı dolduracağından yeniden dağılım meydana gelmez ve etkinin süresi daha çok eliminasyona bağımlı hale gelir.

Tiyopentalin metabolizması karaciğerde olur. Oksidasyon, N-dealkilasyon, desülfürasyon ve barbitürik asit halkasının yıkılması ile oluşan metabolitlerin çoğu inaktiftir, suda erir ve idrarla atılırlar. Ağır karaciğer hastalığında indüksiyon dozu azaltılmalıdır (31).

2.7.5. Organ Sistemlerine Etkileri:

Kardiyovasküler Etkileri

Intravenöz olarak uygulanan indüksiyon dozları kan basıncında düşüşe ve kalp hızında artışa neden olur. Medüller vazomotor merkezin depresyonu periferik kapasitans venlerini dilate ederek kanın periferik göllenmesini artırır ve sağ atriuma venöz dönüşü azaltır. Taşikardi muhtemelen santral vagolitik bir etkiye bağlıdır. Kalp debisi sıklıkla kalp hızındaki bir yükselme ve kompensatuar baroreseptör refleksiyle artan miyokardial kontraktilite ile sağlanır. Resistans damarların sempatik yolla uyarılan vazokonstriksiyonu, periferik vasküler rezistansı arttırabilir. Bununla birlikte yeterli baroreseptör yanıt yokluğunda (hipovolemi, KKY, β -adrenerjik blokaj sepsis) kompanse olmayan periferik göllenme ve maskelenmemiş direkt miyokardial depresyona bağlı olarak, kalp debisi ve arterial kan basıncı dramatik olarak düşebilir (27). İyi kontrol altında olmayan hipertansif hastalar

indüksiyon sırasında kan basıncındaki dalgalanmalara özellikle eğilimlidirler.

Tiyopentalin kardiyovasküler etkileri; volüm durumu, bazal otonomik tonus ve daha önceki kardiyovasküler hastalıklara bağlı olarak belirgin farklılık gösterir. Pek çok hastada yavaş uygulama hızı ve preoperatif hidrasyon ile bu etkiler azaltılabilir. Özellikle hızlı enjeksiyonla normal dozdaki tiyopental hipotansiyon, dolaşım kollapsı, hatta kardiyak arreste neden olabilir. Bu nedenle 30–45 saniye en uygun enjeksiyon süresidir Aynı zamanda koroner kan akımı, kalp hızı ve miyokardın oksijen tüketimini artırır ve kan basıncı, kardiyak output ve stroke volümü düşürür. Damarlarda, direkt olarak damar düz kasını etkileyerek vazodilatasyona neden olur. Venöz tonüsü azaltır ve venöz dönüşte azalmaya neden olur. Histamin salınımına neden olur ve hipotansiyon, ürtiker, allerjik reaksiyon oluşturabilir (26, 27).

Solunum Sistemi Etkileri

Tiyopental doza bağımlı olarak, medullar depresyonla solunumu hem sayı hemde derinlik olarak azaltır. Solunum merkezinin karbondioksite cevap verme yeteneğini baskılar. Laringeal reflekslerin duyarlılığı artığından, üst solunum yolunda tükürük, mukus ve yabancı cisim bulunması, anestezi yüzeyel olduğunda, laringospazm ve bronkospazma yol açabilir (26-28, 32).

Santral Sinir Sistemi Etkileri

Tiyopental yüksek anestezi dozlarında, Beynin oksijen tüketimini azaltır, beyin metabolizma hızını önemli derecede düşürür. Beyin metabolizma hızındaki azalma beyin kan akımı gereksiniminde azalmaya neden olur, bu beyin damarlarında vazokonstriksiyon oluşması ile sağlanır (30). Beyin kan akımındaki azalma, beyin kan volümünde ve intrakraniyal basınçta düşmeye neden olur. Beyin metabolizması üzerindeki bu etki beynin hem hasara uğrayan hem de perfüze olan sağlam bölgelerini korur.

Tiyopental, beynin kan akımını azaltması, perfüzyon basıncını artırması, metabolizma hızını düşürmesi nedeniyle kafa içi basınç artışı olan hastaların indüksiyonunda çok yararlı bir ajandır (33). Hipnoz, sedasyon ve bilinç kaybı yapar. Ağrı eşiğini düşürerek bazen antianaljezik etki gösterirler. Kas gevşemesi yapmazlar. Tiyopental düşük dozları ile (50-100 mg intravenöz olarak) pek çok grand mal nöbeti kontrol altına alır.

Diğer Etkileri

Tiyopental indüksiyon dozlarında (3–5 mg/kg) karaciğer fonksiyonunda önemli bir değişiklik oluşturmaz. Hepatik kan akımı azalır. Kronik maruz kalışta hepatik enzimlerin indüksiyonu ile bazı ilaçların (örn: digitoksin) metabolizma hızını arttırırken, sitokrom P 450 sistemi ile birliktelik diğer bazı ilaçların biyotransformasyonunu etkiler (örn: trisiklik antidepresanlar) (27).

Tiyopentalin böbrek fonksiyonları üzerindeki etkisi primer olarak renal kan akımı ile ilgilidir. Kardiyovasküler depresyon renal kan akımında azalma ve böylece böbrek fonksiyonunun düşmesine neden olur (27, 28).

2.7.6. Kontraendikasyonları

Aminolevülinik asit sentetazın indüksiyonu porfirin (hem sentezinde bir ara ürün) oluşumunu uyarır, bu da hassas bireylerde akut intermittan porfiri veya variegata porfiriye hızlandırabilir. Bu yüzden kontrendikedir. İnfantlar, yenidoğanlar ve yaşlı hastalar, kardiyak rezervi sınırlı hastalar (mitral stenozu, kardiyak tamponat, hipovolemi), karaciğer, böbrek yetmezliği ve endokrin bozuklukları bulunan hastalarda kullanılması rölatif olarak kontrendikedir (32).

Anafilaktik veya anafilaktoid allerjik reaksiyonlar nadirdir. Sülfür içeren tiyopental invitro olarak mast hücrelerinden histamin salınımına neden olur; hipotansiyon, ürtiker, allerjik reaksiyon görülür (30). Bu nedenle astmatik veya atopik hastalarda tercih edilmeyebilir. Tiyopental sezaryen indüksiyonunda hızla anneden fetüse geçer, ancak 4 mg/kg veya daha düşük dozlarda fetal beyin barbitüratlardan etkilenmez (34). Tiyopentalin anneden fetüse hızlı transferine karşın birçok faktör tiyopentalin fetüse etkilerini sınırlandırır. Bu

faktörler, ilacın umbilikal venöz kandan hepatik atılımı, fetal dolaşımdaki geniş şantlar ve anne kanındaki ilaç konsantrasyonunun çok çabuk düşmesidir (30). Tiyopentalin 8 mg/kg gibi yüksek dozlarının ise neonatal depresyon yaptığı bilinmektedir (35).

Belirgin derecede alkalidir (pH>10). % 2,5' luk konsantrasyonunun kullanılması önerilmektedir; daha yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında enjeksiyon ile ağrı ve venöz tromboz insidansı yüksektir.

2.7.7. İlaç etkileşimleri:

Kontrast madde ve sülfonamidler veya tiyopentalle aynı protein-bağlanma bölgelerini işgal eden diğer ilaçlar, serbest ilaç miktarını artırarak tiyopentalin etkileri potansiyelize ederler.

Etanol, narkotikler, antihistaminikler ve diğer santral sinir sistemi depresanları barbitüratların sedatif etkilerini potansiyelize etmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, GATA HEH Komutanlığı Anesteziyoloji ve Reanimasyon Servis Şefliği'nin 14.11.2003 gün ve 0530-132-03 sayılı yazısı ile tarafıma tez konusu olarak verilmiştir.

Çalışmanın histopatolojik değerlendirme aşamaları,133155 protokol numarası ile GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Komutanlığı Patoloji Servisi'nde gerçekleştirildi.

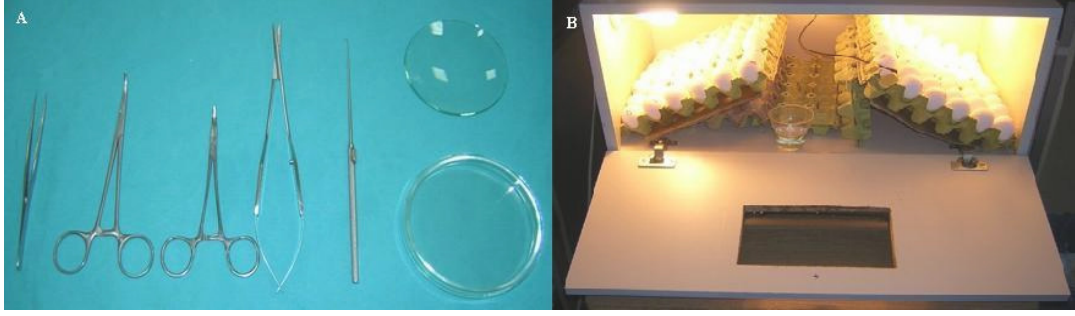
3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanı

Ağırlıkları 65 ± 5 gr arasında 100 adet beyaz Leghorn tipi, fertil ve günlük SPF yumurtalar kullanıldı. Bu özel patojen bulunmayan SPF yumurtalar, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, SPF Ünitesi / MANİSA'dan temin edildi.

3.1.2. Laboratuvar Koşulları

İnkübatör, 100 adet günlük – beyaz – fertil, 65 ± 5 gr ağırlığında SPF yumurta, büyük cam kap, petri kutusu, saat camı, penset, doku makası, gaz tampon, insülin enjektörü, flaster, araştırılan etken maddenin istenilen dilüsyon oranının sağlanması için enjektör , lup ve elde edilen embriyoların saklanması için %5'lik formol dolu kaplar kullanıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. A. Başlıca kullanılan malzemeler **B.** İnkübatörde SPF yumurtalar

3.1.3. İnkübatör

İnkübatörde, $37,2 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ sabit ortam sıcaklığını sağlamak için 60W gücünde toplam 2 adet ampul ve bunların kesintisiz güç kaynağına takılı olduğu elektrik bir devre ile bağlı Dixell XR10CX termostat sensörü, ortam sıcaklığını homojenize etmek için bir fan, yine ortamdaki nem oranını $\%60 \pm 5$ olarak sağlayabilmek için 1 bardak dolusu su, havalandırma deliği ile 30 adet yumurta kapasiteli kaplar mevcuttur (Şekil 3.1.B).

3.2. Yöntem

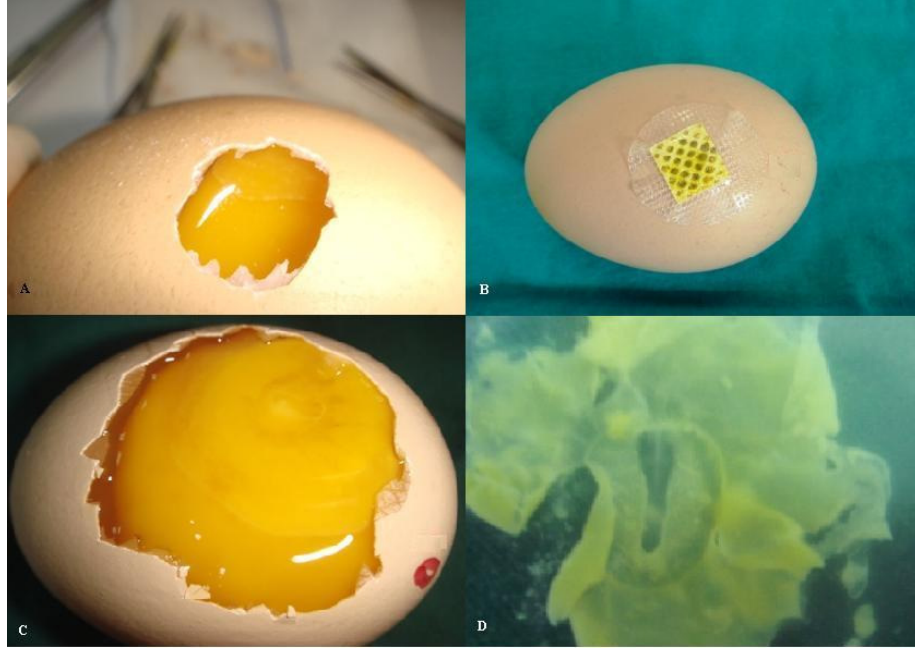
Çalışmamızda muhtemel nonfertil çıkabilecek yumurtaları ve istem dışı yumurtaların hasar görebileceğini de hesaba katarak 100 adet Leghorn tipi, günlük, beyaz tavuk yumurtası kullanıldı. 25'er denek içeren 4 grupta çalışma planlandı. Tiyopental sodyum doz aralığının 2 – 8 mg/kg olduğu göz önünde bulundurularak, ilaç dozları 65 ± 5 gr ağırlığındaki yumurtalar için hesaplanarak dilue edildi. **A grubu (kontrol grubu, n=25)** olarak; 0,1 ml serum fizyolojik (SF) enjekte edilen grup, **B grubu (minimal doz grubu, n: 25)** olarak; 2 mg/kg olacak şekilde doz ayarlaması yapılarak 0,14 mg / 0,1 ml tiyopental sodyum enjekte edilen grup, **C grubu (normal doz grubu, n=25)** olarak 4 mg/kg olacak şekilde doz ayarlaması yapılarak 0,28 mg / 0,1 ml tiyopental sodyum enjekte edilen grup ve **D grubu (yüksek doz grubu, n=25)** olarak 8 mg/kg olacak şekilde doz ayarlaması yapılarak da; 0,58 mg / 0,1 ml tiyopental sodyum enjekte edilen grup olarak planlandı. Çalışmada günlük yumurta kullanılacağı için ve inkübatörde 50 adet yumurta kapasitesi olması nedeni ile önce A ve C, daha sonra da B ve D grupları çalışıldı.

İnkübatör, istenen ideal ortam sıcaklığı olan $37,2 \pm 0,1$ °C ve nem oranı $\%60 \pm 5$ oluncaya kadar 1 saat süreyle boş olarak çalıştırıldı. Daha sonra yumurtalar dikey düzleme 45° açı ile hepsi aynı yönde yerleştirildi ve 30 saatlik çalışma başlatıldı. Her 3-4 saatte bir yumurtaların tamamı dikey düzlemdeki açıları karşı yöne 45° olacak şekilde yönlendirildi.

3.2.1. Tavuk Embriolarına Etken Madde Enjeksiyonu (30. Saat Çalışması)

Yumurtalar, 30. saatin sonunda inkübatörden çıkarılarak çalışma masası üzerinde çalışıldı. Daha önceden dilüsyon yöntemi ile belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanmış olan solüsyonlar, insülin enjektörlerine çekildi. Künt kısmı yukarı gelecek şekilde eğimli bir şekilde ele alınan yumurtaların ekvatorlarına yakın bir kısımdan, yaklaşık çapı 0,5 cm olan küçük bir delik açıldı ve bu delik lup altında embriyo diski görülünceye kadar hafifçe genişletildi. Embriyo diskinin altına, 0,1 ml'lik solüsyonlar insülin enjektörü ile enjekte edildi. Bu aşamada enjektörde hiç hava kabarcığının olmamasına ve tüm deneklere eşit miktarda enjeksiyonlar yapılmasına özellikle dikkat edildi. Yumurtanın kabuğundaki açıklık, flaster ile sızdırmaz bir şekilde kapatıldı ve bu kısım aşağı gelecek şekilde yine dikey düzlemde 45° açı ile inkübatördeki yumurta kabına yerleştirildi (Şekil 3.1.B).

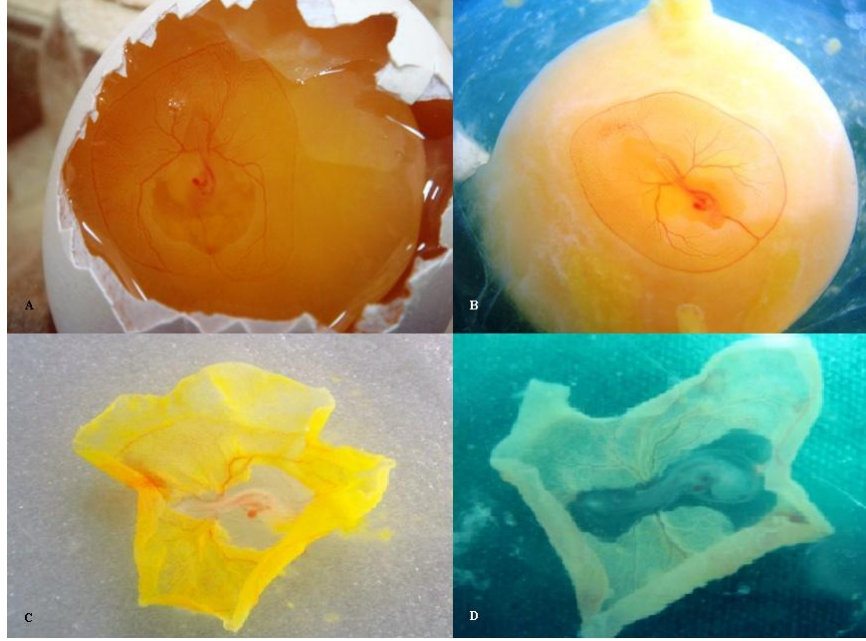
Bu aşamanın sonunda elde edilen embriyoların 30 saatlik (Hamburger - Hamilton'a göre evre 8) olduğunun görülmesi ve standardizasyonun sağlanması için, her gruptan ikişer adet embriyoya, doku makasıyla lup altında embriyo diski ile birlikte 360° lik dairesel bir kesim yapıldıktan sonra içi $\%5$ 'lik formol dolu ependorflara yerleştirildi.



Şekil 3.2. **A.**30.saat çalışması için enjeksiyon amacı ile kabuğun açılması **B.**Enjeksiyon sonrası bant ile kapatılmış yumurta **C.**Kontrol amaçlı 30.saatte açılan bir yumurta **D.**Evre 8 30.saat embriyo diski

3.2.2. Tavuk Embriolarının Elde Edilmesi (72. Saat Çalışması)

Yumurtalar, 72. saatin sonunda inkübatörden çıkarılarak çalışma masası üzerinde çalışıldı. Yine künt ucu yukarıda ve eğimli bir şekilde elde tutulan yumurtanın kabuğu dikkatlice kırılarak içinde petri kabı ve saat camı bulunan, su ile doldurulmuş büyük cam kap içerisine sokuldu. Yumurtanın sarısının polar uçlardaki şalazların tutucu etkisi ile yumurta kabuğunun kenarında yaralanmamasına dikkat edilerek suda yüzdürüldü. Petri kabına alınan yumurta sarısındaki embriyo diskinin vaskülarizasyonu, embriyonun büyüklüğü ve kardiyak aktivitesi gözlemlendi. Lup altında doku makası ile 360° lik çepeçevre bir kesim yapılarak embriyo diski yumurta sarısından ayrıldı. Su içerisinde yüzdürülerek saat camı üzerine alındı. Suyun kohezyon gücüne dikkat edilerek saat camı yavaşça kaptan çıkartıldı. Elde edilen embriyo, %5'lik formol dolu olan ve aynı gruba ait cam şişelere konuldu.



Şekil 3.3. 72. saat çalışması

3.2.3. Tavuk Embriyolarının Işık Mikroskopik İncelemesi

Elde edilen tüm embriyolar, saat camları üzerine alınarak ışık mikroskobu (Nikon E600, Japan) altında X10 büyütme ile gelişimi ve nöral tüp defekti açısından, diğer histopatolojik inceleme aşamasından önce tarandı.

3.2.4. Histopatolojik Takip

Tüm histopatolojik boyama ve inceleme aşamaları, GATA HEH K.lığı Patoloji Servisi'nde yapıldı.

3.2.4.1. Parafin Doku Takibi

Embriyolar parafin doku takibi için %5'lik formol solüsyonu içerisinde 24-48 saat tespit edildi. Fiksatiflerin uzaklaştırılması amacı ile 5 dakika distile su ile yıkandı. Dehidratasyon amacı ile üçer dakika %50'den %100'e kadar artan etil alkol serilerinden geçirildi. %90'lık alkolde iken embriyoların parafin bloklar içinde ve kesit aşamasında görünürlüğünü sağlamak için bir damla eozin boyası (15935, Certistain, Merck, Darmstadt) ilave edildi. Ardından ikişer dakika şeffaflaştırma amacı ile iki kez ksilene tabi tutuldu. 60°C'lik etüv

içerisinde 10 dakika ksilen - parafin uygulandıktan sonra baş - kuyruk doğrultuları belirlenerek dokular parafin bloklar içerisine gömüldü (Microm EC 350-1, Germany). Bloklardan bıçağına 7° açı verilen *rotary* mikrotom (Leica RM 2255, Germany) aracılığı ile 5 µ'luk seri kesitler alındı. Her bir parafin blokta embriyonun değişik seviyelerinden hematoxilen - eozin (HE) boyama için 20 kesit elde edilerek lamlara alındı.

3.2.4.2. Hematoxilen – Eozin Boyaması

Kesitler, deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, otuzar dakika süreyle iki kez ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için, %96'dan %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Hematoxilen (510820, Bio Optica, Italy) ile 2 dakika boyandıktan sonra boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akar suda yıkandı. Diferansiyasyon için 2-3 saniye asit alkolde tutulup 1 dakika eozin (15935, Certistain, Merck, Darmstadt) boyası ile boyandı ve akar su altında 5 dakika yıkandı. Daha sonra %80 ve %96'lık alkol serilerinden geçirilip şeffaflaştırma amacı ile otuzar dakika iki değişim ksilende tutuldu ve entellan (360294H, BH15 1TD, England) ile otomatik olarak kapatıldı (Tissue – Tek G2C, Sakura, The Netherlands).

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın istatistiksel analizi, SPSS 15.0 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar, Pearson KiKare testi ile analiz edildi.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Deneysel çalışmamızın 30. saat çalışmalarında, daha önceden hazırladığımız kontrol ve diğer denek grupları için artan konsantrasyonlardaki tiyopental etken maddesinden daha önce tarif edilen teknikle embriyo diski altına 0,1ml'lik enjeksiyonlar yapıldı B ve D grubuna ait birer yumurta hasarlandığından dolayı, her gruptan birer yumurta non-fertil olarak tespit edildiğinden çalışma dışı tutuldu.

Her grupta ikişer yumurtada embriyolar, randomize bir şekilde çalışmanın 30. saat standardizasyonu için çıkartıldı. Lup altında yapılan sayımlarda tüm gruplara ait embriyoların evre 9'da (4 – 6 somitli) oldukları saptandı.

Tablo 4.1. Gruplara göre denek sayıları.

Gruplar	Başlangıç yumurta sayısı	Çalışma dışı tutulan yumurtalar			Çalışmaya dahil edilen Yumurta sayısı
		Hasarlanan	Non-Fertil	Standardizasyon (30. saat)	
A	25	0	1	2	22
B	25	1	1	2	21
C	25	0	1	2	22
D	25	1	1	2	21
Toplam	100	2	4	8	86

72. saat çalışmasında ise; önce A ve C, daha sonra da B ve D grupları çalışıldı. Makroskopik değerlendirmede, embriyoların gelişimlerinin genel olarak iyi olduğu ve lup altındaki incelemede de evre 18 ile uyumlu oldukları saptandı.

4.2. Embriyonun Bütününün Işık Mikroskobu Altında İncelenmesi

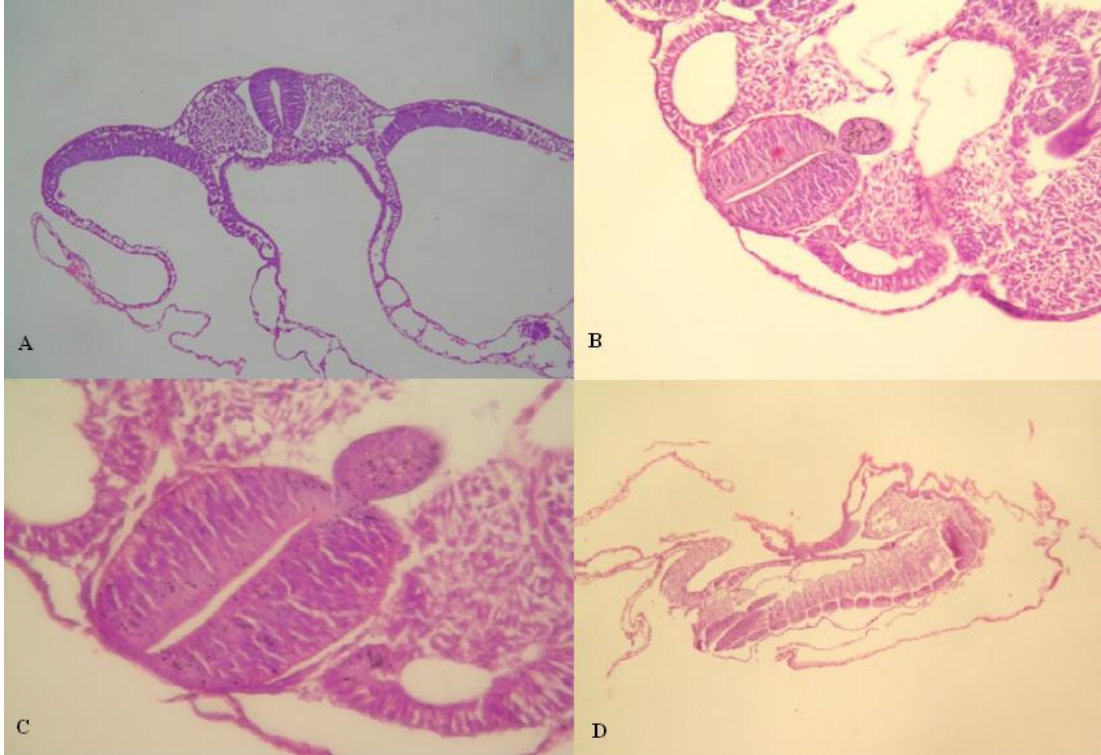
Elde edilen tüm embriyolar histopatolojik inceleme aşaması öncesinde, saat camları üzerine alınarak ışık mikroskobu (Nikon E600,

Japan) altında X10 büyütme ile gelişimi ve nöral tüp defekti açısından tarandı. Bu mikroskopik çalışmamızda hiçbir embriyoda NTD saptanmadı.

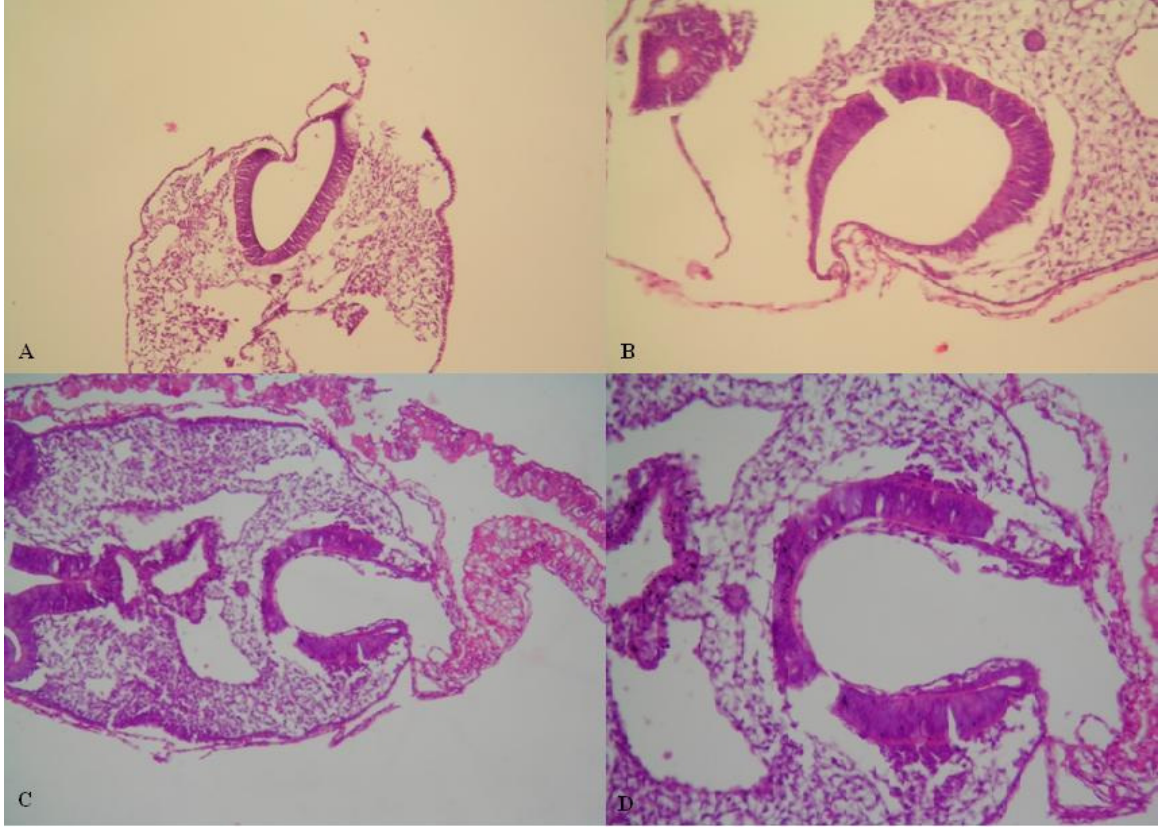
4.3. Histopatolojik Bulgular

4.3.1. Hematoksilen – Eozin Boyama

HE boyama için her bir embriyodan alınan 10 kesit, toplamda 870 kesit incelendi. Hamburger – Hamilton sınıflamasına göre 72. saat (evre 18) normal bir embriyonun özellikleri incelendi A ve B gruplarında herhangi bir embriyonun herhangi bir seviye kesitlerinde NTD bulgusuna rastlanmadı (Şekil 4.1 A - B). Ancak C grubunda 2 embriyoda ve D grubunda da 4 embriyoda NTD saptandı (Şekil 4.3 C - D).



Şekil 4.1. HE ile boyanmış A grubundan 72. saat bir embriyo kesitleri, **A.** X40 büyütme, **B.** X100 büyütme, **C.** X200 büyütme **D.** X10 büyütme sagittal kesit.



Şekil 4.2. Nöral tüp defekti izlenen kesitlerden örnekler, **A.** C grubu (X40), **B.** C grubu (X100), **C.** D grubu (X40), **D.** D grubu (X100)

4.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızdaki denek sayıları Tablo 4.1’de özetlenmiştir. A ve B gruplarında, NTD saptanan bir denek yoktu. Dolayısıyla A ve B gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılmasına gerek yoktu. C grubunda 2 denekte (%9), D grubunda ise 4 denekte (%19) NTD olduğu histopatolojik olarak saptandı. C grubunun A ve B grubu ile yapılan karşılaştırmasında, p değeri sırası ile 0.23 ve 0.15 olarak saptandı. Ancak D grubunun A grubu ile yapılan karşılaştırmasında, p değeri 0.048 olarak saptandı ($p < 0.05$). Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ortaya kondu. C grubunun D grubu ile yapılan karşılaştırmasında ise, p değeri 0.34 olarak saptandı. Yani C grubu ile D grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı. Tüm gruplar, ikili matrisde SPSS 15.0 programına girilerek incelendiğinde ise, p değeri 0.044 olarak saptandı ($p < 0.05$) Tablo 4.2).

Her ne kadar C ile D grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da tüm gruplar ele alındığında, D grubunun istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkardığı izlendi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2.Grupların istatistiksel analiz sonuç tablosu.

GRUPLAR	NÖRAL TÜP DEFEKTİ		İSTATİSTİKSEL ANALİZ (p değeri) [Gruplar]
	(+)	(-)	
A (n=22)	0	22	
B (n=21)	0	21	
C (n=22)	2	20	0.244 [A - C]
D (n=21)	4	17	0.048 [A - D]
TOPLAM (n=86)	6	80	0.044 [A - B - C - D]

5. TARTIŞMA

Doğum defektleri bir yaş altı çocuklarda önde gelen ölüm sebeplerindedir. NTD, doğumsal kalp defektlerinden sonra en sık doğum defektidir. Bununla beraber prenatal ve postnatal dönemde önemli tıbbi, finansal ve sosyal sorunlara yol açmaktadır. Spina bifidadan anensefaliye uzanan bir yelpazesi olan NTD'leri, ABD'de 10.000 canlı doğumda 3 olarak saptanırken (36), bu oran İzmir Tepecik SSK hastanesinde yapılan bir çalışmada 1000 canlı doğumda 8,9 olarak saptanmıştır (11).

NTD patogenezi hakkında mevcut bilgilerimizin büyük çoğunluğu insan embriyo ve fetüslerinden ziyade hayvan modelleri ile sağlanmıştır. Hayvan modellerinden sıklıkla memeli, kanatlı ve amfibiler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu modellemelerin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları vardır. Örneğin; memeli modellemeleri olan rat ve fareler daha komplike ve uzun süreli bir çalışma gerektirirken, kanatlı ve amfibilerdeki modellemeler ise daha basit ve pratik yöntemlerdir. Erken dönem tavuk embriyosu modeli de memelilerde embriyonel gelişimin ilk ayına uyan ve kimyasalların embriyonel gelişim üzerine etkilerinin incelendiği ideal bir modeldir (18-21).

NTD etiolojisinde genetik faktörler (trizomi 13, 18, 21), coğrafi faktörler, anne yaşı, sosyoekonomik faktörler, çinko ve folat metabolizması ile ilgili hastalıklar, diabetes mellitus rol oynamaktadır. Ayrıca hamileliğin ilk ayında gastrulasyon olarak bilinen üç germ yaprağının organizasyonu ile dokuların organları oluşturmak üzere farklılaştığı kritik dönemde. embriyonun maruz kaldığı kimyasalların gelişim kusurlarına neden oldukları bilinmektedir (3, 4, 37, 38).

Kanatlılarda nörolasyon da diğer canlılara benzer şekilde primer ve sekonder olarak başlıca iki devrede incelenebilir. Primer nörolasyon devresinde beynin tamamı ve spinal kordun üst lumbosakral seviyelerine kadar, nöral yapılar oluşur. Kaudal nöroporun kapanması ile eş zamanlı olarak sekonder nörolasyon ortaya çıkar. Bu devrede de spinal kordun en uç kısımları oluşur. Kuyruk tomurcuğu ile ilgili nöroepitelyal hücre grubunun

ortaya çıkması ve kanal oluşturacak şekilde yapı değiştirmesi bu devrede görülen olaylardır.

Nörülasyon ektoderm, mezoderm ve endodermin olduğu gastrulasyon devresinin olaylarından biridir. Nörülasyon karmaşık bir olay olup, hücre içi ve dışı birçok etken rol oynar. Hücre içi etkenlerden en önemlisi mikofilamentlerin kontraktil aktivitesidir (39-41). Hücre dışı etkenler ise ekstrasellüler matriks, notokord ve çevre ektodermdir.

Ekstrasellüler matriks, hem hidrostatik içerik olarak, hem de hücre etkileşimlerine katkı ile katlanma ve oluklanmaya etki eder. Katlanma ve oluklanmadan sonra karşı karşıya gelen hücrelerin birbirlerinin tanıyıp yapışması ile kapanma oluşur. Kapanma nöroepitel ve yüzeyel epitel arasındaki hücreler arası boşlukta proteoglikanların birikimi, bazal lamina komponentlerinin sentezi ile düzenlenir (42-44).

Nöral kıvrımlar dorsalde birbirleri ile birleşerek nöral tüpü oluştururlar ve aynı zamanda yüzeyel ektodermden birleşerek nöral tüpü örter. Nöral kıvrımların birleşmesinde hücre içi mikofilamentlerin apikal büzüşme ya da kasılmaya neden olduğu ve önemli rol oynadıkları öne sürülmektedir (39, 40, 45). Nagele ve ark. (46), 400 µg/ml diazepam ile in vitro kültür ortamında yaptıkları çalışmada, elektron mikroskopik olarak tavuk embriyolarının yaklaşık %80'inde özellikle orta beyin bölgesinde NTD ile karşılaşmışlardır. İlaçların mikofilamanlar üzerinde etkisini önceden kestirmek pek mümkün değilse de diazepamın kültür ortamında kas ve diğer hücrelerde myozinin sentez ve birikimini spesifik olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (46 - 49). Böylece diazepamın myozin üzerinden, nöroepitelyal hücrelerde apikal mikofilamanlardaki kontraktil aktiviteyi ve gelişen nöroepitelyal hücrelerdeki apikal konstriksiyonu inhibe ederek NTD oluşturduğu anlaşılmıştır (50, 51).

Nöral kıvrımların yükselmesi sırasında nöroepitelde intrasellüler serbest kalsiyum düzeyinde sabit bir artma olmakta, nöral kıvrımlar birleştiği esnada maksimuma erişmekte ve daha sonra azalmaktadır. Bu bulgular intrasellüler serbest kalsiyumun apikal mikofilament demetlerinin kontraktil aktivitesini kontrol ettiğini desteklemektedir. Lokal anestetiklerle tavuk embriyosundaki nöral katlantıların artış nedenini, organizasyonun ve

nöroepitelyal hücrelerdeki mikroflamanların kalsiyuma bağlı fonksiyonlarının kesintiye uğraması sonucu oluştuğunu bildirilmiştir (52).

Kalsiyum antagonistlerinin civciv embriyo kültürlerinde uygulanması nöral kıvrımların oluşmasının gecikmesine, kalsiyum agonistleri ise nöral kıvrımların erken oluşmalarına ve yükselmelerine neden olmuştur (39). Papaverin (53), diazepam (50), cytochalasin B (54) gibi mikrofilamentleri etkileyen ajanlarla deneysel olarak nöral tüp defektlerinin oluşturulması da mikrofilamenlerin nörolasyondaki rollerinin önemini desteklemektedir. Mikrotübülleri harap eden kolşisinin nörolasyonu inhibe ettiğinin ortaya konmasından sonra hücre uzamasında mikrotübüllerin önemli etkilerinin olduğu öne sürülmüştür (45).

Nöral kıvrımların birleşmesine katkıda bulunan hücrel mekanizmalardan birisi de hücre membranındaki çıkıntılarının etkileşimidir. Bu çıkıntılar amfibiyanlar (55), civcivler (56) ve memeli embriyolarında (57) tanımlanmışlardır. Bu çıkıntılar nörolasyon boyunca belirgin hale gelirler ve nöral kıvrımların birleşmesi sırasında maksimuma ulaşmış ve daha sonra azalır. Nöral kıvrımın birbirine değmeleri sırasında, hücreler arası saha çok daralır, hücrelerin yüzey glikokaliksleri birbirine karışmaktadır. elektron mikroskopu bulguları nörolasyonda hem hücre içi iskelet elemanlarının hem de yüzey örtülerinin rollerini ortaya koymaktadır.

Bitkisel kökenli bir protein sınıfından olan lektinler hücreleri aglütine ederler ve polisakkarid ya da kompleks karbonhidratları bağlama özellikleri vardır. Her bir lektin spesifik şekerleri bağlamaktadır. Con-A, α -D-mannosyl ve α -D-glicosyl bağlarına spesifiktir. WGA ise, sialyl ve β -N acetylglucosaminyl bağlarına spesifiktir. Lektinler, söz konusu şekerleri içeren hücre yüzey örtülerine (glikoproteinlere, glikolipidlere ve glikozaminoglikanlara) bağlanmaktadır. Kolunmar hücrelerin bazal membranları fibronektin, sulfatlı glikozamioglikan ve laminin'den zengin olup, apiko-bazal polariteye neden olur (58, 59). Lektinler, nörolasyonun değişik evrelerinde nöral plak ve nöral kıvrımların değişik lokalizasyonlarında farklı miktarlarda bağlanmaktadır (60, 61). Ayrıca nöroepitel hücre yüzeyindeki glikozaminoglikanların karakteri de nörolasyon sırasında değişkenlik gösterir

(42). Nöroepitel karbonhidratları hücre tanımı, hücre adezyonu, hücre hareketi ve diferensiyasyonunda rolleri vardır. Lektin sonuçları nörolasyonda hücre tanıma ve adezyonunda karbonhidratların rollerini göstermektedir.

Erken dönem tavuk embriyosunda çalışılmış bir diğer teratojen olan etanolün uygulandığı embriyonel gelişim basamağının önemi vardır. Enhart ve ark. doza bağımlı olarak, embriyolarda gelişen defekt insidansının arttığını bildirmişlerdir (62). Pennigton ve ark. in ovo verilen tek doz 1 gr/kg etanolün, tavuk embriyolarının gelişimlerinin yedinci gününde total embriyo ve beyin dokusu ağırlığını yarı yarıya azalttığını bildirmişlerdir (63). Yapılan çalışmalar, tavuk embriyolarının inkübasyonlarının dokuzuncu gününden önce yani embriyonel karaciğer dokusunda klas I alkol dehidrojenaz enzim üretimi ve aktivitesi başlamadan verilen etanolün metabolize olmadığını göstermiştir. İn ovo verilen 42 mg/dl etanol, 80 - 100 mg/dl olan ortalama intoksikasyon dozunun çok altındadır. Bu da etanolün, metabolitleri olan asetaldehit ve asetattan daha fazla teratojen olduğunu düşündürmektedir (64). Etanolün gastrulasyon dönemindeki embriyoya major etkisi, nöral krista hücre popülasyonu gelişimini duraksatması ve hücre topluluğunda kayıp yaratmasıdır. Bu etkinin mekanizması net olarak açıklanabilmiş değildir. Nöral doku gelişimi için kritik olan hücreler arası sinyalin kaybına neden olabileceği gibi, etanolün indüklediği kontrolsüz apoptozisin nöral tüp kapanma defekti gelişiminden sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Zira hem N-metil-D-aspartat (NMDA) antagonisti hem de γ -aminobutirik asit Tıp A (GABA A) agonist özellikler gösteren etanolün nöroapoptotik dejenerasyona sebep olduğu bildirilmiştir (65) Barutçuoğlu ve ark. (21) bir çalışmalarında, düşük doz etanol konsantrasyonlarında bile embriyonun gelişimsel olarak kontrol grubuna göre belirgin şekilde geri kaldığını ve NTD oluşturduğunu göstermiştir.

Valproik asitin kullanımına 1978 yılında ABD'de izin verilmiş bundan 2 yıl sonra valproat ve fetal anomalilerle ilgili bildirimler yayınlanmaya başlamıştır (66-69). İn ovo tavuk embriyosuna valproat enjekte edilerek yapılan çalışmalarda daha önceden diğer embriyolarda da gösterilen nöral tüp defekti, kardiyovasküler, kraniyofasial, omurga ve ekstremiteler gelişim anomalilerini ve

büyüme geriliği ile artmış mortaliteyi içeren sonuçlar gösterilmiştir. Valproat ile ilişkili insan ve diğer embriyolarda nöral tüp defekti gelişimi hakkında çok sayıda bildiri mevcuttur (70, 71).

Somit olarak adlandırılan paraaksiyel mezoderm hücreleri nöral tüp gelişimi esnasında simetrik bir şekilde nöral tüp etrafında dizilir. Somitler, vertebralı hayvanların segmental bir yapıda şekillenmesi için çok önemlidir. Valproat enjekte edilmiş tavuk embriyolarında somitler genişler, düzensiz bir yapı alır ve dizilimi bozular (72, 73). Ayrıca somit anomalileri ile ilgili benzer sonuçlar diğer bazı deney hayvanı embriyolarında da bildirilmiştir (74, 75). Valproatla ilgili kardiyak anomaliler kültüre edilmiş tavuk embriyolarında da gösterilmiştir (73). Literatürde insan fetal valproat sendromu ile ilişkili olarak, %26 çocukta konjenital kardiyak defekt olduğu bir çalışmada bildirilmiştir (76). Valproatla ilişkili mikroftalmi, pigment anomalileri, aniridi, koroid fissürün inkomplet kapanması, lens yerleşim bozuklukları ve kataraktı içeren göz anomalileri ve bununla ilgili *Pax-2* ve *Pax-6* gen mutasyonları bildirilmiştir (76-78). Kas – iskelet sistemi ile ilgili olarak da tavuk embriyosu ve diğer deney hayvanlarında anomaliler hakkında bildiriler mevcuttur (70, 74). İnsanda ise in utero valproatla etkilenmeye bağlı olarak kas – iskelet sistemi anomalileri insidansı %63 olarak bildirilmiştir (76). Valproatın gelişimsel defektlere neden olması ile ilgili birçok mekanizma teorisi ortaya atılmıştır. Bunlardan bir tanesi “embriyonik folat metabolizmasındaki değişim teorisi” dir (79). Folat, amino asit, protein, pürin ve pirimidin metabolizması ile metilasyon gibi biyokimyasal reaksiyonlarda önemlidir. Bunlar da embriyogenezin differansiyasyon ve proliferasyon aşamalarında çok önemli basamaklardır. Diğer bir teori de “hipoksi teorisi” olup bradikardiye sekonder kan akımında yavaşlama ve hipoksi olarak açıklanabilir (80).

Büyüme, farklılaşma ve organogenezde vitamin A ve bunun oksidatif metaboliti *all-trans-retinoik asit* etkilidir (86, 87). Eksikliği ve fazlalığındaki embriyotoksitesi ve konjenital anomali spektrumu valproat ile benzerdir (81).

Fenitoin, infantlarda konjenital malformasyonlara neden olan ve deneysel hayvan çalışmalarında çeşitli defektlere neden olduğu bildirilmiş

çok yaygın kullanılan bir antiepileptiktir (82). Fenitoinin teratojenitesi ile ilişkili birçok hipotezler ortaya atılmıştır. Epoksid hidrolaz ve glutatyon S transferaz gibi detoksifikasyon enzimlerinin inhibisyonu, glukokortikoid reseptörleri ile interaksyonlar ve folat metabolizmasının inhibisyonu bunlar arasında yer almaktadır (82). Fenitoin, folik asit metabolizmasını hızlandırır ve mikrozomal enzimleri indükler, böylece gebe bir kadının serum folat düzeyi düşer. Daha önceden fenitoinin kortizonla benzer mekanizmalarla damak anomaliler, glukokortikoidler gibi prostoglandin sentez inhibisyonu yaparak teratojen etki gösterdiği hakkında da bildiriler mevcuttur (83). Folat desteklenmesinin antikönlzanların teratojen etkilerini azalttığı bilinmektedir (84) Güney ve ark. (18) yaptıkları bir çalışmada, tavuk embriyolarında erken dönemde folik asitin fenitoin ile gelişen NTD insidansını azalttığını bildirmişlerdir.

Metotreksat ve aminopterin gibi folat antagonistlerinin insanda ve deneysel çalışmalarda teratojen olduğu bildirilmiştir. Deneysel ve insan çalışmalarında, gebeliğin özellikle hem nörolasyon hem de somitasyon evrelerinde folat desteklenmesinin doğumsal defektlerin insidansını azalttığı bildirilmiştir (85, 86).

Her ilaç, yeterli miktarda ve uygun gestasyonel dönemde belirli süre uygulandığında plesentayı geçmesi halinde teratojenik karaktere sahiptir (87). Bu durum anesteziye maruziyetin çoğu kez tek ve kısa süreli olduğu anestezi ajanları ve adjuvanları için de geçerlidir (88, 89). Bugüne kadar kullanılan hiçbir anestezi ajanı insanda teratojen olarak tanımlanmamıştır (90, 91). Anestezi ajanlarının teratojenitesi ile ilgili çalışmalar ratlarda üreme, eser miktardaki anestezi ajana kronik mesleki maruziyetin bulunduğu epidemiyolojik çalışmalar ve hamilelik süresince cerrahi uygulanan kadınlardan elde edilen verilerle sınırlıdır. Duncan ve ark. (92) Kanada Manitoba'da 1971-78 yılları arasında cerrahi operasyon geçiren 2.565 gebenin ve eşlenmiş kontrol grubunun dahil edildiği retrospektif bir çalışmada, gruplar arasında teratojenik etkiyi ispatlayacak anlamlı bir fark bulamamışlar, ancak kontrol grubuna göre artmış spontan abortus riski saptamışlardır.

Anestezi pratiğinde kullanılan propofol, etomidat, tiyopental ve ketamin gibi indüksiyon ajanları klinik olarak etkin dozlarda gebelerde güvenli olarak bulunmuştur (93-96). Mazze ve ark.'nın (97,98) 1973-81 yılları arasında İsveç'te gebeliği esnasında cerrahi operasyon uygulanan 5.405 ve apendektomi uygulanan 778 gebenin dahil edildiği retrospektif çalışmalarda konjenital anomali riskinin artmadığı bildirilmiştir. Tiyopentalin gebelerde ilk trimestırda teratojenik olmadığı ratlarda (24) ve insanlarda (25) retrospektif çalışmalar ile ortaya konmuştur. Ancak anormal embriyogeneze sebep olabileceği yönünde yayınlar da bulunmaktadır (26). Etkisini GABA ve benzodiyazepin reseptörlerinin aktivitesini artırarak gösteren tiyopental teratojen olarak bilinen başta diazepam olmak üzere benzodiyazepinlerle benzer mekanizmalar ve reseptörler üzerinden etki göstermektedir. Ikonomidou ve ark. (99) infant ratlarda NMDA glutamat reseptörlerini bloke eden ilaçların gelişmekte olan beyinde yaygın apoptotik nörodejenerasyona sebep olduğunu ortaya koymuşlardır. Yine benzer çalışmalar ile GABA A reseptörlerini aktive eden (100, 101), hem NMDA antagonisti hem de GABA A agonist özellikler gösteren etanol (65), GABA A reseptörlerini aktive eden ve sodyum iyon kanallarını bloke eden antiepileptik ilaçların (102), hem NMDA antagonisti hem de GABA mimetik özellikleri olan midazolam, nitroz oksit, ketamin ve izofloran gibi anestezik ilaçların (103,104) benzer nöroapoptotik dejenerasyona sebep olduğu bildirilmiştir. Tiyopental ile erken dönem civciv embriyosunda yaptığımız çalışmamızda, minimal doz grubu (2 mg/kg) ve normal doz gruplarının (4 mg/kg) kontrol grubu ile karşılaştırılması istatistiksel olarak anlamsız iken yüksek doz grubu (8 mg/kg) kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Normal doz grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen 2 embriyoda NTD'e rastladık.

Hamilelikte ilaç kullanımı konusunda bilgilerimiz, ilaçların etkilerine yönelik prospektif çalışma yapmak etik olmadığından maalesef sınırlıdır. İlaçların ve metabolitlerinin büyük kısmı placentaya aracılığı ile fetusa geçer. Büyük moleküllü, yağda az çözünen, fazla oranda iyonize olan ve plazma proteinlerine önemli ölçüde bağlanan ilaçların plasentayı aşması, anne ile fetus arasında difüzyon dengesine ulaşması uzun zaman alacağından verilen

tek doz zararsız olabilir. Ancak özellikle ilaçla kronik tedavi durumunda bu durumun önemi artar. Sedasyon, analjezi ve anestezi için kullanılan birçok ilaç düşük moleküler ağırlık, yüksek yağda çözünürlük, az iyonize olma, ve plazma proteinlerine az bağlanma gibi sebeplerden placentayı geçme eğilimindedir (105). İlaç placentayı geçtiğinde teratojenite fetal gelişim evresine bağlıdır. Döllenme ve implantasyon aşamasında ya hep ya hiç prensibi geçerlidir. Bu aşamada embriyo hücreleri henüz farklılaşmadığından, ölen hücrelerin yenilenmesi mümkündür. Döllenme sonrası 18-56. günler arasında organogenez olduğundan teratojenlere en hassas dönemdir. Bu dönemde dokular hızlı bir şekilde farklılaşmakta olduğundan oluşan hasarın düzeltilmesi mümkün değildir ve sıklıkla yapısal anomaliler ortaya çıkar. Organogenez tamamlandığında ise teratojen, fetal büyümeyi, organ büyüklüğü ve fonksiyonuna etki edecektir (106, 107).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Teratogenez riskine rağmen, genel anestezi hamileliğinin ilk trimestirindeki hastalarda kullanılmak durumundadır. Günümüzde anestezi indüksiyonunda en sık kullanılan ajan olan tiyopentalin çeşitli çalışmalar ile gebelikte kullanımının teratojen olmadığı ortaya konmuştur. Erken dönem tavuk embriyosunda yapılan bu çalışmamızda, tiyopentalin in ovo terapötik ve supratherapötik dozlarda NTD insidansını arttırabileceğini gözlemledik. Çalışmamızda 4 mg/kg ve 8 mg/kg dozlarında tiyopentalin direk embryo diski altına enjekte edildiği gruplarda deneysel olarak NTD oluşurken minimal doz grubumuzda (2 mg/kg) ve kontrol grubunda NTD'e rastlanmadı. Tiyopentalin organogenezin devam ettiği gebeliğin ilk aylarında kullanıldığında, yenidoğanda NTD gelişimini tetikleyebileceği ve nörolasyon üzerinde olumsuz etkileri olabileceği kanaatindeyiz. Ancak tiyopentalin nörolasyondaki etkisini tam olarak ortaya koymak için daha ileri ve farklı embryo modelleri üzerinde çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Moore KL., The developing human: Clinically Oriented Embryology, 8th Ed., T.V.N. Persaud, Saunders Elsevier, 2008.
2. Petorak I., Medikal Embriyoloji., Beta Yayıncılık, İstanbul, 244-250, 1984.
3. Sadler TW., Langman's Medikal Embriyoloji; (Prof. Dr. A. Can Başaklar) 7. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 39-88, 1996.
4. Larsen WJ., Human Embryology; 2nd Edition, Churchill Livingtone, New York: 19-106, 1997.
5. Persaud M., İnsan Embriyolojisi (Prof Dr. Mehmet Yıldırım, Prof Dr. İmer Okar, Prof Dr. Hakkı Dalçık) 6. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul:17-47,2002.
6. Schoenwolf GC., Smith JL., Mechanism of neurulation. Traditional viewpoint and recent advances. Development, 109, 243-270,1990.
7. Colas JF., Schoenwolf GC., Towards a cellular and molecular understanding of neurulation, Dev. Dyn, 221, 117-145, 2001.
8. Lemire RJ., Siebert JR., Neuroembryolgy. Neurosurgery 2nd Edition, 346, 3411-3444,1996.
9. Aksoy K.,Temel Nöroşirürji, Cilt II, TND Yayınları, Ankara, 1335-1337, 2005.
10. Şenel A., Spinal Embriyoloji ve Anatomi, <http://turknorosirurji.org.tr> [17/04/2010].
11. Çağlayan S., Kayhan B., Menteşoğlu S., Akşit S., Changing incidence of neural tube defects in Aegean Turkey. Paediatr Perinat Epidemiol, 3, 62-65, 1989.

12. Thomas JA., Markovac J., Ganong WF., Anencephaly and other neural tube defects. *Front Neuroendocrinol*, 15, 197-201, 1994.
13. Hunter AG., Brain and spinal cord, Human malformations and related anomalies. Newyork Oxford University Pres, 109-37, 1993.
14. Şenköylü N., Modern Tavuk Üretimi, 3. baskı, Anadolu Matbaa, İstanbul, 109-131, 2001.
15. Hamburger V., Hamilton HL., A series of normal stages in the development of the chick embryo, *Dev Dyn*, 195, 231-272, 1951.
16. Aksoy T., Tavuk Yetiştiriciliği, 3.baskı, Şahin Matbaa, Ankara: 101-128,1999.
17. Bellairs R., Osmond M., The Atlas of Chick Development, 2nd Edition, Elsevier, Academic Press, California, USA, 2005.
18. Güney Ö., Canbilen A., Konak A. Acar O., The effects of folic acid in the prevention of neural tube development defects caused by phenytoin in early chick embryos, *Spine*, 28, 442-445, 2003.
19. Temiz C., Temiz P., Demirel A., Sayın M., Umur AŞ., Özer FD., Effect of sodium phenytoin concentration on neural tube development in the early stages of chicken embryo development, *J Clin Neurosci*, 16, 307-311, 2009.
20. Selçuki M., Vatansever S., Umur AŞ., Temiz C., Sayın M., Apoptosis seems to be the major process while surface and neural ectodermal layers detach during neurulation. *Childs Nerv Syst*, 24, 577-580, 2008.
21. Barutçuoğlu M., Selçuki M., Vatansever S., Umur AŞ., İnan S., Erken dönem tavuk embryonal tüp gelişiminde etanolün etkisi. *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 11, 32-36, 2001.
22. Marshall BE., Longnecker DE., General Anesthetics. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 9 th Ed., New York, The McGraw-Hill Companies, Inc, 307-329, 1996.

23. Trevor AJ, Miller RD. General Anesthetics. Basic and Clinical Pharmacology. Ed. Katzung Bg. 7 th Ed. Connecticut, Appleton & Lange, 409-423, 1998.
24. Persaud TV., Animal experimental studies On The Problem of the teratogenic effect of barbiturates. Acta Biol Med Ger, 14, 89-90, 1965.
25. Heinonen OP., Slone D., Sapiro S., Birth Defects and Drugs in Pregnancy. Littleton, Mass Publishing Sciences Group Inc, 516. 1977.
26. Novitt AD., Gilani SH., Abnormal embryogenesis induced by thiopental. J Clin Pharmacol, 19, 697–700,1979.
27. Kayhan Z., Klinik Anestezi, 2. Baskı, Logos Yayıncılık Tic.A.Ş., 83–108. 1997.
28. Morgan GE., Mikhail MS., Murray MJ., Clinical Anesthesiology, third edition, Lange Medical Boks/McGraw-Hill Companies, 151–177, 2002.
29. Miller RD. Miller’s Anesthesia, Sixth Edition, Elsevier Inc, 326–333, 2005.
30. Işık G., İntravenöz Anestezikler. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Anesteziyoloji AD. Ders Notları, 2004.
31. Beskow A., Werner O., Westrin P., Faster recovery after anesthesia in infants after intravenous induction with methohexital instead of thiopental. Anesthesiology, 83, 976-979, 1995.
32. Kayaalp SO., Tıbbi Farmakoloji, 11. baskı, Feryal Matbaacılık, 672–677 2005.
33. Baugman VL, Brain protection during neurosurgery. Anesthesiol Clin. North Am, 20, 315–327, 2002.
34. Shineder SM., Levinson G., Anesthesia for Obstetrics. İn: Miller RD, ed. Anesthesia 4. ed. USA: Churchill Livingstone, 2031-76, 1994.

35. Kuczkowski KM., Reisner LS., Lin D., Anesthesia for Cesarean section. In: Chetnut DH, editor. *Obstetric Anesthesia Principles and Practice 3.* ed USA, Elsevier Mosby, 421-46, 2004.
36. Centers for Disease Control and Prevention, Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *Morbidity Mortality Weekly*, 41, 1-7, 1992.
37. Becker SR., Shibley IA., Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. *Alcohol Alcohol*, 33, 457-464, 1998.
38. Cartwright, MM., Smith SM., Stage dependent effects of ethanol on cranial neural crest cell development: partial basis for the phenotypic variations observed in fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res*, 19, 1454-62, 1995.
39. Ferreira MC., Hilfer SR., Calcium regulation of neural fold formation: visualization of the actin cytoskeleton in living chick embryos. *Dev Biol*, 159, 427-440, 1993.
40. Lee HY., Kosciuk MC., Nagele RG., Roisen FJ., Studies on the mechanisms of neurulation in the chick: possible involvement of myosin in elevation of neural folds. *J Exp Zool*, 225, 449-457, 1983.
41. Schoenwolf GC., Folsom D., Moe A., A reexamination of the role of microfilaments in neurulation in the chick embryo. *Anat Rec*, 220, 87-102, 1988.
42. McLone DG., Knepper PA., Role of complex carbohydrates and neurulation. *Pediatr Neurosci*, 12, 2-9, 1985.
43. Newgreen DF., Kerr RS., Minichiello J., Warren N., Changes in cell adhesion and extracellular matrix molecules in spontaneous spinal neural tube defects in avian embryos. *Teratology*, 55, 195-207, 1997.
44. Schoenwolf GC., Cell movements driving neurulation in avian embryos. *Development*, (Suppl 2), 157-168, 1991.

45. Karfunkel P., The activity of microtubules and microfilaments in neurulation in the chick. *J Exp Zool*, 181, 289-302, 1972.
46. Nagele R.G., Bush, K.T., Hunter, E.T., Koseiuk, M.C., Lee, H., Biomechanical basis of Diazepam-induced neural tube defects in early chick embryos: a morphometric study. *Teratology*, 40, 29- 36, 1989.
47. Bandman E., Walker C.R., Strohman RC., Diazepam inhibits myoblast fusion and expression of muscle specific protein synthesis. *Science*, 200, 559-561, 1978.
48. Nagele RG., Pietrolungo JF., Kosciuk MC., Lee H., Roisen FJ., Diazepam inhibits the spreading of chick embryo fibroblasts. *Exp Cell Res*, 143, 153 - 162, 1983.
49. Walker CR., Bandman E., Strohman RC., Diazepam induces relaxation of chick embryo muscle fibers in vitro and inhibits myosin synthesis. *Exp Cell Res*, 123, 285-291, 1979.
50. Güney Ö., Selçuki M., Ünlü A., Bağdatoğlu C., The effect of diazepam on the development of neural tube defects in early chick embryos. *Turk Neurosurg*, 9, 44-47, 1999.
51. Lee HY., Keresztury MF., Kosciuk MC., Nagele RG., Roisen FJ., Diazepam inhibits neurulation through its action on myosin-containing microfilaments in early chick embryos. *Comp Biochem Physiol C*, 77, 331- 334, 1984.
52. Lee H., Nagele RG., Neural tube defects caused by local anesthetics in early chick embryos. *Teratology*, 31, 119-127, 1985.
53. Lee H., Nagele RG., Neural tube closure defects caused by papaverin in explanted early chick embryos. *Teratology*, 20, 321-332, 1979.
54. Linville GP., Shepard TH., Neural tube closure defects caused by cytochalasin B. *Nature New Biol*, 236, 246-247, 1972.

55. Mak LL., Ultrastructural studies of amphibian neural fold fusion. *Dev Biol*, 65, 435-446, 1978.
56. Bancroft M., Bellairs R., Differentiation of the neural plate and neural tube in the young chick embryo. *Anat Embryo*, 147, 309-335, 1975.
57. Waterman RE., Topographical changes along the neural fold associated with neurulation in the hamster and mouse. *Am J Anat*; 146, 151-172, 1976.
58. Duband JL., Thiery JP., Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. *Dev Biol*, 94, 337-350, 1980.
59. Sanders EJ., Recent progress towards understanding theories of the basement membrane in development. *Can J Biochem Cell Biol*, 61, 946-956 1983.
60. Griffith CM., Sanders EJ., Changes in glycoconjugate expression during early chick embryo development: a lectin-binding study. *Anat Rec*, 231, 238-250, 1991.
61. Wilson DB, Wyatt DP, Patterns of lectin binding during mammalian neurogenesis. *J Anat*, 186, 209-216, 1995.
62. Ernhart CB., Jokol RJ., Martier S., Moron P., Nadler D., Ager JW., Wolf A., Alcohol teratogenicity in the human: a detailed assessment of specificity, critical period and threshold. *Am J Obstet Gynecol*, 156, 33-39, 1987.
63. Pennigton S., Kalmus G., Brain growth during ethanol induced hypoplasia. *Drug Alcohol Depend*, 20, 279-286, 1987.
64. Cartwright MM., Smith SM., Increased cell death and reduced neural crest cell numbers in ethanol exposed embryos: partial basis for the fetal alcohol syndrome phenotype. *Alchol Clin Exp Res*, 19, 378-386, 1995.

65. Olney JW., Tenkova T., Dikranian K., Qin YQ., Labruyere J., Ikonomidou C., Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing C57BL/6 mouse brain. *Dev Brain Res* 133, 115–26, 2002.
66. Brown NA., Kao J., Fabro S., Teratogenic potential of valproic acid, *Lancet*, 1, 660–661, 1980.
67. Dalens B., Raynaud EJ., Gaulme J., Teratogenicity of valproic acid, *J Pediatr*, 97, 332–333, 1980.
68. DiLiberti JH., Farndon PA., Dennis NR., Curry CJ., The fetal valproate syndrome. *Am J Med Genet*, 19, 473–481, 1984.
69. Tein I., MacGregor DL., Possible valproate teratogenicity. *Arch Neurol*, 42, 291–293, 1985.
70. Padmanabhan R., Hameed MS., Exencephaly and axial skeletal malformations induced by maternal administration of sodium valproate in the MF1 mouse. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 14, 192–205, 1994.
71. Malone FD., D'Alton ME., Drugs in pregnancy: anticonvulsants, *Semin Perinatol*, 21, 114–123, 1997.
72. Barnes GL, Mariani BD., Tuan RS., Valproic acid-induced somite teratogenesis in the chick embryo: relationship with Pax-1 gene expression. *Teratology*, 54, 93–102, 1996.
73. Kelly PG., Regan CM., Studies on valproate-induced perturbations of neurulation in the explanted chick embryo. *Toxicology*, 71, 137–144, 1992.
74. Menegola E., Broccia ML., Prati M., Giavini E, Stage-dependent skeletal malformations induced by valproic acid in rat. *Int J Dev Biol*, 42, 99–102, 1998.

75. Pennati R., Gropelli S., de Bernardi F., Sotgia C., Action of valproic acid on *Xenopus laevis* development: teratogenic effects on eyes. *Teratog Carcinog Mutagen*, 21, 121–133, 2001.
76. Kozma C., Valproic acid embryopathy: report of two siblings with further expansion of the phenotypic abnormalities and a review of the literature. *Am J Med Genet*, 98, 168–175, 2001.
77. Tremblay P., Gruss P., Pax: genes for mice and men. *Pharmacol Ther*, 61, 205–226, 1994.
78. Dahl E., Koseki H., Balling R., Pax genes and organogenesis. *Bioessays*, 19, 755–765, 1997.
79. Wegner C., Nau H., Alteration of embryonic folate metabolism by valproic acid during organogenesis: implications for mechanism of teratogenesis. *Neurology*, 42, 17–24, 1992.
80. Azarbayjani F., Danielsson BR., Pharmacologically induced embryonic dysrhythmia and episodes of hypoxia followed by reoxygenation: a common teratogenic mechanism for antiepileptic drugs? *Teratology*, 57, 117–126, 1998.
81. Maden M., Gale E., Kostetskii I., Zile M., Vitamin A deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects, *Curr Biol*, 6, 417–426, 1996.
82. Bennett GD., Lau F., Calvin JA., Finnel RH., Phenytoin-induced teratogenesis: a molecular basis for the observed developmental delay during neurulation. *Epilepsia*, 38, 415–23, 1997.
83. McDavitt JM., Gautieri RF., Mann DE., Comparative teratogenicity of cortisone and phenytoin in mice. *J Pharm Sci*, 70, 631-634, 1981.
84. Biale Y., Lewenthal H., Aderet NB., Congenital malformations due to anticonvulsive drugs. *Obstet Gynecol*, 45, 439-442, 1975.

85. Milunsky A., Jick H., Jick SS., Bruell CL., MacLaughlin DS., Rothman K., Willett W., Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. *JAMA*, 262, 2847-2852, 1989.
86. Eskes TK., Steegers-Theunissen RP., Primary prevention of neural-tube defects with folic acid. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 53, 147-152, 1994.
87. Rosen MA., Management of anesthesia for the pregnant surgical patient, *Anesthesiology*, 91, 1159-1163, 1999.
88. Brodsky JB., Anesthesia and surgery during early pregnancy and fetal outcome, *Clin. Obstet. Gynecol*, 26, 449-457, 1983.
89. Kuczkowski KM., Nonobstetric surgery in the parturient: anesthetic considerations, *J Clin. Anesth*, 18, 5-7, 2006.
90. Fanzago E., Anaesthesia for non obstetric surgery in pregnant patients, *Minerva Anesthesiol*, 69, 416-427, 2003.
91. Littleford J., Effects on the fetus and newborn of maternal analgesia and anesthesia : a review, *Can J Anesth*, 51, 586-609, 2004.
92. Duncan PG, Pope WD, Cohen MM, Fetal risk of anesthesia and surgery during pregnancy. *Anesthesiology*, 64, 790-794, 1986.
93. Barash PG., Cullen FB., Stoelting RK., *Clinical Anesthesia*, 5th ed, , Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 1175-1180, 2006.
94. Goodman S., Anesthesia for nonobstetric surgery in the pregnant patient, *Semin. Perinatol*, 26, 136-145, 2002.
95. Jauniaux E., Gulbis B., Shannon C., Maes V., Bromley L, Rodeck C., Placental propofol transfer and fetal sedation during maternal general anaesthesia in early pregnancy, *Lancet*, 352, 290-291, 1998.

96. Friedman JM., Teratogen update Anesthetic agents. *Teratology*, 37,69-77, 1988.
97. Mazze RI., Kallen B., Reproductive outcome after anesthesia and operation during pregnancy : a registry study of 5404 cases, *Am J Obstet Gynecol*, 161, 1178-1185, 1989.
98. Mazze RI., Kallen B., Appendectomy during pregnancy : a Swedish registry study of 778 cases, *Obstet. Gynecol*, 77, 835-840, 1991.
99. Ikonomidou C., Bosch F., Miksa M., Bittigau P., Vočckler J. Dikranian K., Tenkova TI., Stefovská V., Turski L., Olney JW., Blockade of glutamate receptors triggers apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*; 283, 70–4, 1999.
100. Ikonomidou C., Bittigau P., Ishimaru MJ., Wozniak DF., Koch C., Genz K., Price MT., Stefovská V., Horster F., Tenkova T., Dikranian K., Olney JW., Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287, 1056–60, 2000.
101. Dikranian K., Ishimaru MJ., Tenkova T., Labruyere J., Qin YQ., Ikonomidou C., Olney JW., Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol Dis*; 8, 359–79, 2001.
102. Bittigau P., Sifringer M., Genz K., Reith E., Pospischil D., Govindarajalu S., Dzierko M., Pesditschek S., Mai I., Dikranian K., Olney JW., Ikonomidou C., Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Nat Acad Sci*, 99, 15089 –94, 2002.
103. Jevtovic-Todorovic V., Hartman RE., Izumi Y., Benshoff ND., Dikranian K., Zorumski CF., Olney JW., Wozniak DF., Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci*, 23, 876–82, 2003.

104. Young C., Jevtovic-Todorovic V., Qin YQ., Tenkova T., Wang H., Labruyere J., Olney JW., Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain, *Br J Pharmacol*; 146, 189–97, 2005.
105. Wunsch MJ., Stanard V., Schnoll SH., Treatment of pain in pregnancy, *Clin. J. Pain*, 19, 148-155, 2003.
106. Diav-Citrin O., Koren G., Human teratogens : a critical evaluation, Nausea and vomiting of pregnancy, Toronto, Koren G. and Bishai R., eds, , 181-196, 2000.
107. Van de Velde M., De Buck F., Anesthesia for non-obstetric surgery in the pregnant patient, *Minerva Anesthesiol*, 73, 235-240, 2007.