T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİEMETİKLERİN RAT EMBRİYOLARI GELİŞİMİ ÜZERİNE TOKSİK VE TERATOJEN ETKİLERİNİN İN VİTRO KÜLTÜR ORTAMINDA ARAŞTIRILMASI

Zeliha FAZLIOĞULLARI

DOKTORA TEZİ

ANATOMİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ahmet Kağan KARABULUT

KONYA-2011

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTİEMETİKLERİN RAT EMBRİYOLARI GELİŞİMİ ÜZERİNE TOKSİK VE TERATOJEN ETKİLERİNİN İN VİTRO KÜLTÜR ORTAMINDA ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

ANATOMİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ahmet Kağan KARABULUT

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 09102049 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2011

i. ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Zeliha FAZLIOĞULLARI tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Anatomi (Tıp) Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Prof. Dr. Taner ZİYLAN Selçuk Üniversitesi	.....
Danışman:	Prof. Dr. Ahmet Kağan KARABULUT Selçuk Üniversitesi	.....
Üye:	Prof. Dr. Hasan ACAR Selçuk Üniversitesi	.....
Üye:	Prof. Dr. Harun ÜLGER Erciyes Üniversitesi	.....
Üye:	Doç. Dr. İsmihan İlknur UYSAL Selçuk Üniversitesi	.....

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu …… tarih ve …… sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Orhan ÇETİN
Enstitü Müdürü

ii. ÖNSÖZ

Doktora tezimde kullandığım yöntem olan İn Vitro Embriyo Kültürü sistemini kuran, yöntemi öğreten ve bu konuda çalışma imkanı sunan, çalışmalarımın her safhasında yakın ilgi, yardım ve desteğini gördüğüm değerli hocam Prof. Dr. Ahmet Kağan KARABULUT'a saygı ve şükranlarımı sunar, hayatımdaki olumlu değişimlerdeki etkisinden dolayı teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca bilgisini, tecrübesini ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmalar sırasında sonsuz desteğini daima yanımda hissettiğim sayın hocam Doç. Dr. İsmihan İlknur UYSAL'a teşekkür ederim.

Bilgi birikimi ve tecrübesiyle bu çalışmanın genetik kısmının gerçekleştirilmesinde destek veren sayın hocam Prof. Dr. Hasan ACAR'a,

Lisansüstü eğitimim süresince desteğini esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Taner ZİYLAN'a,

Çalışmanın her aşamasında büyük emek sarfeden ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşım Yrd. Doç. Dr. Nadire ÜNVER DOĞAN'a,

Çalışmaya Histoloji ve Embriyoloji alanlarındaki deneyimleri ile katkı sağlayan sayın hocam Prof. Dr. Ender ERDOĞAN'a,

Çalışmanın istatistiksel analizinin yapılmasında yardımcı olan sayın Orhan FAZLIOĞULLARI'na,

Araştırmanın yapılabilmesi için gerekli maddi desteği 09102049 nolu projeyle sağlayan Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne,

Hayatımın her aşamasında desteklerini esirgemeyen annem, babam ve kardeşlerime, sevgili eşim Umut ve varlığı ile hayatıma anlam katan biricik kızım Nil'e teşekkür ederim.

iii. İÇİNDEKİLER

iv. SİMGE VE KISALTMALAR vii
1. GİRİŞ 1
1.1. Toksikoloji ve Teratoloji Hakkında Temel Kavramlar 3
1.1.1. Teratogenezisde Temel Prensipler 5
Teratogenezise duyarlılık, konseptusun genotipi ve çevresel etkenler ile etkileşimine bağlıdır 5
Teratojenik ajana duyarlılık, bu ajana maruz kalınan gelişim basamağına göre değişmektedir 5
Teratojenik ajanlar, gelişen hücre ve dokularda özel mekanizmalar aracılığıyla anormal embriyogeneze sebep olurlar 7
Anormal gelişim kendini ölüm, şekil bozuklukları, büyüme geriliği ve fonksiyonel bozukluklar şeklinde gösterir 7
Gelişen bir dokuya zararlı bir çevresel ajanın girmesi, ajanın yapısına bağlıdır 8
Anormal gelişim, teratojenik ajanın doz artışına bağlı olarak hiçbir etki göstermeyeceği gibi öldürücü seviyeye kadar artabilir 8
1.1.2. Teratojenik Etki Mekanizmaları 8
Sitotoksik etkiye bağlı teratogenezis 8
Önemli besin maddelerinin dışarıdan alınmasının veya enerji üretiminin bozulması 9
Uteroplasental kan akımının azaltılması 9
Farklılaşma ile ilgili spesifik olayların bozulması 9
Doku osmolaritesinin değişmesi 10
1.1.3. Deney Hayvanlarının İn Vivo Teratojenite Testlerinde Kullanılması 10
1.1.4. Gelişimsel Toksikolojide Kullanılan İn Vitro Teknikler 11
Embriyo kültürü (Whole Embryo Culture - WEC) 12
Mikropellet testi (Micromass Test) 14
Embriyonik kök hücre testi (Embryonic Stem Cell Test - EST) 15
Zebra balığı embriyo kültürü (Zebrafish Embryo Culture) 15
1.2. Ratlarda Erken Embriyolojik Gelişim 17
1.3. İn Vitro Rat Embriyo Kültürü 24
1.3.1. Kullanılabilir Embriyo Kültür Teknikleri 24

Saat camı kültürü 24
Dönen şişe metodu 24
Sirkülasyon metodları 24
1.3.2. Kültür İçin Besiyeri Geliştirilmesi 25
1.3.3. Kültür Ortamında Solunum ve Metabolizma 26
1.3.4. İn Vitro Embriyo Kültürünün Önemi 27
1.4. Antiemetik İlaçlar 29
1.4.1. Dimenhidrinat 32
1.4.2. Metoklopramid 33
1.4.3. Trimetobenzamid HCl 34
1.5. Apopitozis 35
1.5.1. Hücre Dışı Uyarılarla Apopitozisin Tetiklenmesi 38
1.5.2. Hücre İçi Apopitotik Yollar 39
1.5.3. Apopitozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler 40
Morfolojik görüntüleme yöntemleri 40
İmmunohistokimyasal yöntemler 40
Anneksin V yöntemi 40
TUNEL yöntemi 41
ISEL (In Situ End Labelling) Yöntemi 41
M30 yöntemi 41
Kaspaz-3 yöntemi 42
Biyokimyasal Yöntemler 42
Agaroz jel elektroforezi 42
Western blotting 43
Flow sitometri 43
İmmünolojik yöntemler 43
ELISA 43
Flourimetrik yöntem 43
Moleküler biyoloji yöntemleri 43
DNA microarrays 43
1.6. Amaç 44
2. GEREÇ VE YÖNTEM 45
2.1. Embriyo Kültürü Aşamaları 45
2.1.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Çiftleştirilmesi 45

2.1.2. Serum Hazırlanması 46
2.1.3. Rat Embriyolarının (9,5 günlük) Eksplantasyonu 48
2.1.4. Rat Embriyolarının Kültürü 53
2.1.5. Morfolojik Değerlendirme 55
Yolk sak damarlanması 59
Allantois gelişimi 60
Embriyo fleksiyonu 60
Kalp gelişimi 60
Kaudal nöral tüp gelişimi 61
Ön beyin gelişimi 61
Orta beyin gelişimi 61
Arka beyin gelişimi 62
Kulak gelişimi 62
Göz gelişimi 62
Burun gelişimi 63
Yutak kavislerinin gelişimi 63
Maksilla gelişimi 63
Mandibula gelişimi 64
Ön ekstremite tomurcuğunun gelişimi 64
Arka ekstremite tomurcuğunun gelişimi 64
Somit gelişimi 64
2.2. DNA İzolasyonu 65
2.2.1. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması 65
Nüklei lizis buffer 65
%70'lik etanol 65
2.2.2. Embriyoların Toplanması ve Dokuların Parçalanması 65
2.2.3. DNA Presipitasyonu 66
2.2.4. DNA'nın Yıkanması 66
2.2.5. DNA'nın Çözünmesi 66
2.3. Jel Elektroforezi 66
2.3.1. Jel Elektroforezde Kullanılan Solusyonların Hazırlanması 66
50xTAE tamponu 66
1xTAE tamponu 67
0,5 M EDTA 67

2.3.2. Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Yüklenmesi 67
%2'lik agaroz jelin hazırlanması 67
Örneklerin jele yüklenmesi 67
Örneklerin jelde yürütülmesi 68
Görüntüleme 68
2.4. İstatistik 68
3. BULGULAR 69
3.1. Dimenhidrinat'a Ait Bulgular 69
3.2. Metoklopramid'e Ait Bulgular 75
3.3. Trimetobenzamid HCl'e Ait Bulgular 80
3.4. Apopitozis Değerlendirmesi 86
4. TARTIŞMA 89
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 95
6. ÖZET 97
7. SUMMARY 98
8. KAYNAKLAR 99
9. EKLER 108
10. ÖZGEÇMİŞ 109

iv. SİMGE VE KISALTMALAR

A: Arka beyin,

Apaf-1: Apopitotik proteaz aktive eden faktör

C: Karbon

DNA: Deoksiribo-Nükleik-Asit

dUTP: Deoksi-uridin-tri-fosfat

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

ER: Endoplazmik retikulum

EST: Embryonic Stem Cell Test – Embriyonik kök hücre testi

FDA: Food and Drug Administration - Gıda ve İlaç Dairesi

Gt: Göz tomurcuğu,

IAP: Apopitozis inhibitör protenleri

K**:** Kalp,

Kt: kulak tomurcuğu,

KTB: Kemoreseptör tetikleyici bölge

MM: Micromass Assay - Mikropellet testi

N_2: Azot

O: Orta beyin,

O_2: Oksijen

Ö: Ön beyin,

PS: Fosfatidilserin

RNA: Ribo-nükleik-asit

S: Somitler

Tdt: Deoksinükleotidil transferaz

TNF: Tümör nekrozis faktör

TUNEL: TdT-mediated dUTP - biotin nick end labelling

WEC: Whole Embryo Culture - Embriyo kültürü

YD: Yolk sak damarları

Yk- Yutak kavisleri

1. GİRİŞ

Bulantı ve kusma hamilelikte oldukça yaygın (%80) görülen bir durumdur. Ancak bu sorun genellikle gebeliğin 20. haftasında çözülür. Fakat %10-20'lik bir grupta bu şikayetler devam eder (Quinlan ve Hill 2003, Einarson ve ark 2007). Bazen bu bulantı ve kusmalar kişide dehidratasyona, elektrolit dengesinin bozulmasına, metabolik bozukluklara ve kilo kaybına neden olabilir ki bu ağır durum hiperemesis gravidarum olarak isimlendirilir (Elaikim ve ark 2000). Hiperemesis gravidarum insidansı %0,3-2 arasında değişmektedir (Sonkusare 2008). Bu ağır tablonun oluşmasında anne adayının genç olması, çoklu gebelikler ve fetusun dişi olması gibi faktörlerin etkisi olduğu düşünülmektedir. Asıl sebep net olarak belirgin değildir ancak gonadotropin ve tiroid hormonlarının seviyesinin artması, gastrik ritm bozukluğu ile otonom sinir sistemi ve psikolojik faktörlerin de bu durumu indüklediği belirtilmiştir (Asker ve ark 2005). Plasentanın büyüme ve gelişmesinin de bulantı ve kusmayı arttırdığı bildirilmektedir (Huxley 2000).

Gebelikteki bulantı-kusmanın ortaya çıkmasında birçok neden gösterildiğinden de anlaşıldığı gibi aslında etiyoloji tam olarak ortaya konulamamıştır. Bu nedenle, tercih edilen tedavi seçenekleri nedeni değil, yakınmayı ortadan kaldırmaya yöneliktir. Bulantı-kusmanın fizyolojisine bakıldığında gastrointestinal sistem, vestibüler sistem, koku duyusu, merkezi sinir sistemi gibi birçok farklı uyarı merkezinin bulantı-kusmayı başlatabildiği görülmektedir. Bulantı ve kusmaların önlenmesi için kullanılan ilaçlar çok çeşitlidir. Bu ilaçların gebelikteki bulantı-kusmayı önlemedeki etki yolağı ortaya konulamamıştır (Lane 2007).

Gebelik bulantı ve kusmanın tedavisi semptomların ciddiyetine göre değerlendirilir. Öncelikle diyet değişikliği, psikolojik tedavi, ilaç tedavisi uygulanır ve hatta total parenteral beslenmeye kadar gidilebilir (Abell ve Riely 1992). Farmakolojik tedavide pridoksin, antiemetikler, antihistaminikler, antikolinerjikler, motilite düzenleyici ilaçlar ve kortikosteroidler kullanılır (Quinlan ve Hill 2003). En çok kullanılan ilaçlar klasik H_1 blokeri antihistaminikler ve vitamin B6'dır. Birçok antihistaminik ilaç olmasına rağmen sadece buklizin, siklizin, dimenhidrinat, difenhidramin, doksilamin, hidroksizin ve meklizin antiemetik özelliğe sahiptir. Doksilamin ve meklizin, vitamin B6 eklenerek veya eklenmeden, en sık kullanılan ilaçtır. Meklizin ve dimenhidrinatın kullanıldığı araştırmalarda her iki ilacın da

plasebo ile karşılaştırıldığında gebelik bulantı kusmalarının azaltılmasında daha etkili olduğu gösterilmiştir. Meklizin verilen 41 hastadan 40'ında (%97,6), plasebo verilen 34 hastadan 16'sında (%47) semptomların çözüldüğü gözlenmiştir. 77 hasta üzerinde yapılan kontrollü çalışmada ise dimenhidrinat verilenlerin %59'u, plasebo verilenlerin ise %47,4'ü tamamen ya da kısmi olarak düzelmiştir (Leathem 1986).

Antiemetiklerin insanlar üzerindeki teratojenik etkileri konusunda kesin bir bilgi mevcut değildir (Biringer 1984). Ancak laboratuvar fareleri ile yapılan in vivo çalışmalarda, meklizinin insanlarda kullanılan doza göre 25-50 kat artırılarak verilen dozlarda ratlarda yarık damağa (teratojenik etki) neden olduğu gösterilmiştir (King 1963). Dimenhidrinat ve metoklopramid de hamilelikte geniş kullanıma sahip antiemetiklerdir (Ruedy 1984, Vlastarakos ve ark 2007). Ancak bu ilaçların kullanımı ile izole fetal malformasyonlar arasındaki ilişki kesin değildir (Ruedy 1984). Ayrıca akut migren tedavisinde normal tedaviye ilaveten ve vertigo ataklarında da metoklopramid kullanılmaktadır (Kalra ve Elliot 2007, Vlastarakos ve ark 2008).

Antihistaminiklerden özellikle doksilamin ve difenhidramin ile ilgili yoğun çalışmalar mevcut olmasına rağmen, dimenhidrinat ve meklizin ile dopamin antagonisti ilaçlardan metoklopramid ve trimetobenzamid HCl'nin gebelikte kullanılabilirliği ile toksik ve teratojenik etkileri konusunda detaylı ve karşılaştırmalı bir çalışma mevcut değildir (Magee ve ark 2002).

Gebelik bulantı-kusmasını tedavi etmek için fenotiazinler, domperidon, droperidol, metoklopramid ve trimetobenzamid gibi birçok dopamin antagonisti kullanılmaktadır. Fenotiazinlerin etkinliğini değerlendiren çalışmalarda belirgin başarı elde edilmiştir ve fenotiazinlerin gebelikte kullanımının fetal anomali riskinde bir artışa yol açmadığı gösterilmiştir. Bu ilaçların etkinliklerinin değişkenliği, fenotiazin türlerinin farklı reseptörler üzerinden etkili olmasına bağlıdır (Magee ve ark 2002).

Metoklopramidin gebeliğin bulantı kusmasında kullanımıyla ilgili yeterince çalışma olmasa da, en çok kullanılan ilaçlardan biridir. Metoklopramidin teratojenite yaratıcı etkisi hakkındaki bilgiler sınırlı olmakla beraber, anomali sıklığını artırmayacağı yönünde yeterince güven verici olduğu bildirilmiştir. En sık görülen

yan etkisinin, hafif şiddette de olsa, ekstra piramidal bulgular olduğu gösterilmiştir (Poortinga ve ark 2001). Antiemetiklerin toksik ve teratojenik etkileri konusunda bilgilerin sınırlı olması, bu konunun araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

1.1. Toksikoloji ve Teratoloji Hakkında Temel Kavramlar

Toksikoloji, eski Yunanca'da zehir (toxicon) bilgisi (logos) anlamına gelmektedir. Toksikoloji canlı organizma üzerinde kimyasal maddelerin oluşturduğu morfolojik ve fonksiyonel değişiklikleri inceler. Canlı organizmadaki bu değişikliklerin yapısı ve mekanizması, kimyasal maddelerin toksik etki alanları, hedef organları ve doz-yanıt ilişkileri, toksik riskleri, akut ve kronik belirtilerin tanınması ve tedavisi de toksikolojinin çalışma alanıdır (Dökmeci 2001).

İnsan sağlığını bozan mineral, bitkisel, hayvansal ya da sentetik maddelere zehir ya da toksik madde adı verilmektedir. Tedavide kullanılan kimyasal madde ya da ilaçlar çok sayıda etki meydana getirebilir. Bunlardan bir kısmı tedaviye yöneliktir, diğer kısmı ise tedavide yan etkiler ya da istenmeyen etkiler olarak bilinir (Dökmeci 2001). Bu etkilerin bir kısmı dönüşümlü olabileceği gibi bir kısmı da hücre ölümü (dönüşümsüz) ile sonuçlanabilir (Vural 1996). Dönüşümlü yan etkiler genellikle ilacın metabolize edilmesi ve eliminasyonuyla kısa sürede kaybolurlar ve bunların çoğu yan etki kavramı içinde tanımlanırlar. Dönüşümsüz etkiler ise doku ya da organlarda patolojik hasar oluşturan ve dokunun kendini yenilemesi olanaksız olan etki şekilleridir ve genellikle toksik etki şeklinde tanımlanırlar. İlaç ya da kimyasal maddelerin dönüşümsüz olarak toksik etkilerinin başlıcaları mutajenik, karsinojenik ve teratojenik olarak ortaya çıkmaktadır (Dökmeci 2001).

Fiziksel ve kimyasal etkenlerin mutajenik ve genotoksik etkileri, hücre çekirdeğinde DNA molekülünü bozarak hücresel fenotipi değiştirmeleri olayıdır. Kanserler somatik hücrelerin kontrol edilemeyen malign proliferasyonlarıdır. Spontan olarak oluşabildikleri gibi, iyonize radyasyon gibi fiziksel ajanlar olabildiği gibi, viruslarla ya da kimyasal maddelerin etkisiyle de oluşabilmektedirler. Karsinojen bir etkinin toksik etkisinin ortaya konulmasını sağlayan basit bir yöntem bulunmamaktadır. Vinil klorür, benzen ve naftilamin gibi bazı maddeler uzun süre ciltle temas ettiklerinde, oral ya da parenteral yolla uygulandıklarında kanser oluşturabilmektedirler (Dökmeci 2001).

Bazı ilaçlar ve kimyasal maddelerin gebe kadınlar tarafından alındıklarında plasentadan fetal dolaşıma geçerek fetusta oluşturdukları malformasyonlara teratogenezis (teratojenik etki) adı verilir (Kayaalp 2009). Çevresel etkenlerden kaynaklanan doğumsal bozuklukları ve anormal prenatal gelişmeyi inceleyen ve doğumsal defektleri önlemenin araştırmalarını yaparak gelişmeye devam eden bilim dalına ise teratoloji denilir (Bailey ve ark 2005). Teratoloji kelime olarak "canavar" anlamına gelen Grekçe "teras" kelimesinden türemiştir (Sever ve Mortensen 1996). Yavrularda yapısal veya fonksiyonel bozuklukları arttıran, herhangi bir ilaç, kimyasal ajan, enfeksiyon veya radyasyon gibi çevresel etkenlere teratojen adı verilmektedir. 1950'den önce insan konjenital malformasyonları ile ilgi fazla bilgiye ulaşılamadığından defektlerin çoğunun genetik orijinli olduğuna inanılıyordu (Hanson ve ark 1996). Embriyonik ve fetal zarlar (amnion ve koryon), anne karın duvarı ve uterusun embriyoyu dışarıdan gelecek zararlara karşı koruyan geçilmez bir bariyer olduğu düşünülüyordu. İlk kez 1920 ile 1930'lu yıllarda, yağca yüksek veya vitamin A bakımından zayıf bir diyetle beslenmenin domuz yavrularında teratojenik etkisi olabileceğine ilişkin gözlemler yapılmaya başlanmıştır. Bu yavruların tümünde çeşitli şekil bozuklukları gözlenmiş ve en sık gözlenen anomali ise yavruların gözsüz doğması olmuştur (Hale 1935). 1941'de Gregg'in rubella virüsünün insan embriyosu gelişiminin kritik döneminde konjenital malformasyonlara sebep olabileceğini göstermesi ve 1956'da çevresel civa kontaminasyonu (Igata 1993) sonucu yavrularda görülen doğumsal bozukluklar; teratojenik etkilerin sadece doğrudan alınan ilaç ve kimyasallarla sınırlı olmadığını göstermiştir. Son olarak da 1961 yılında yaşanan Talidomit faciası, erişkinlerde minimal toksisiteye neden olan bir ilacın gelişen insan embriyosunda toksik olabileceğine dikkat çekmiştir (McBride 1961). Böylece teratolojinin ilk prensibi, tür içi veya türler arası farklılıklar, ortaya çıkmıştır. Bu olaydan sonra yeni ilaçların resmi olarak piyasaya sürülmeden önce hayvanlar üzerinde test edilmesi zorunlu hale getirilmiştir (Bailey ve ark 2005).

İnsan konjenital anomalilerinin %20-25'i genetik faktörlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bunlar tek gen defekti ya da sayısal ve yapısal anomaliler ile kromozom mozaizmi gibi kromozomal aberasyonlar sonucunda ortaya çıkarlar. Anomalilerin %10'u ise çevresel faktörlerin etkisine bağlıdır. Bu faktörler, kimyasallar, ilaçlar, hormonlar, vitaminler, iyonize radyasyon, infeksiyon ajanları, fiziksel ajanlar, beslenme yetersizliği ve metabolik hastalıkları da içine alan maternal

koşullar şeklinde sıralanabilirler. Malformasyonların %60-75'inin nedeni bilinmemektedir. Bunlar multifaktöriyel (gen ve çevre etkileşimleri), poligenik olabildikleri gibi, gelişimdeki spontan hatalar ya da teratojenlerin sinerjistik etkileşimleri sonucu da ortaya çıkabilmektedir (Brent ve ark 1993).

1.1.1. Teratogenezisde Temel Prensipler

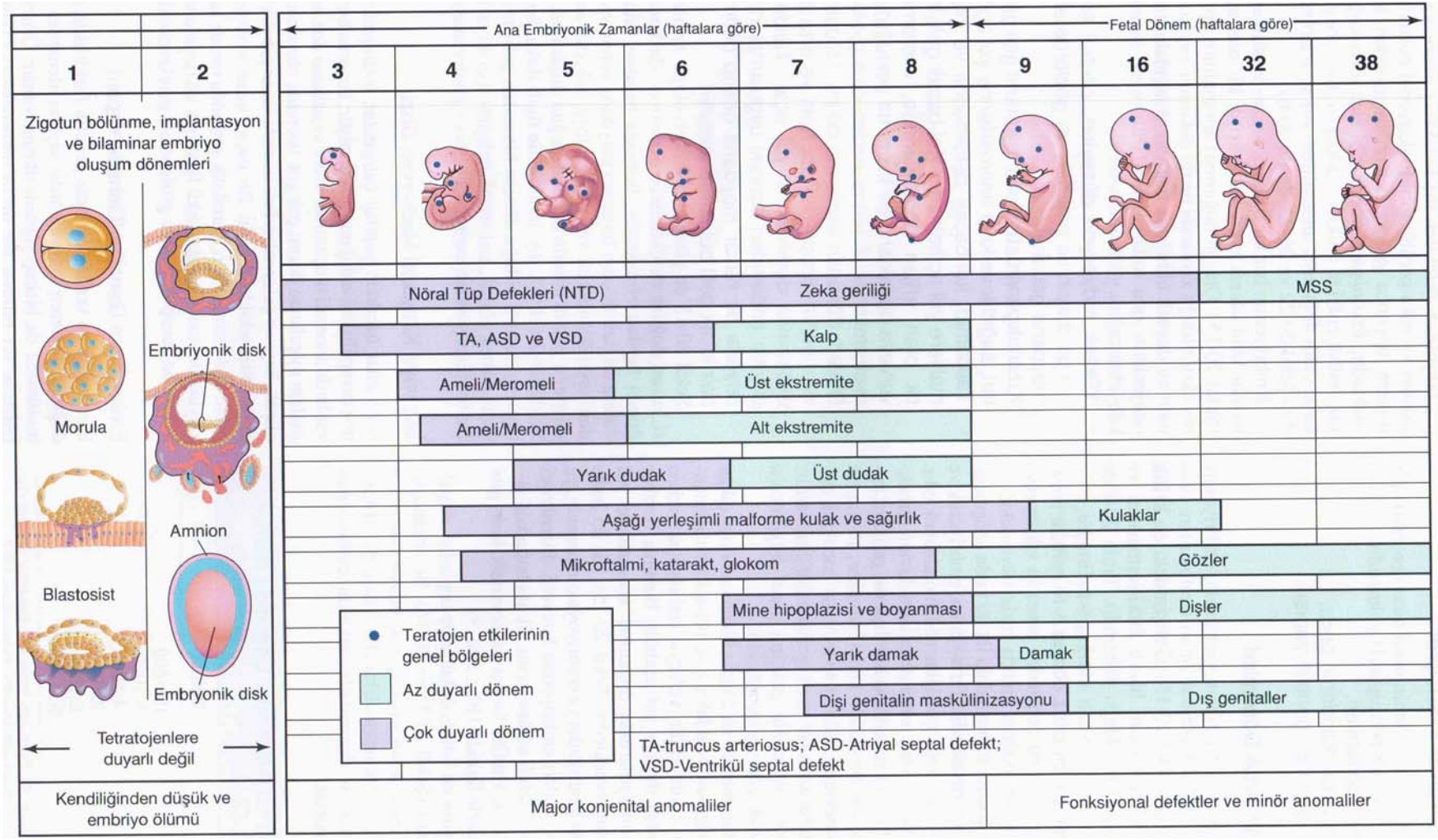
Teratogenezise duyarlılık, konseptusun genotipi ve çevresel etkenler ile etkileşimine bağlıdır:

Tüm teratolojik çalışmalarda, tür içi veya türler arası farklılıklar gözlenebilmektedir. Bu farklılıklar türlerin veya bireylerin genetik yapısına, çevresel faktörlere, metabolik yollar ve ürünlerindeki farklılıklara ve plasentalarının özelliklerine bağlı olabilmektedir (Bailey ve ark 2005).

Teratojenik ajana duyarlılık, bu ajana maruz kalınan gelişim basamağına göre değişmektedir:

Teratojene karşı en hassas olunan dönem organogenezin kritik periyoduna denk gelmektedir; organogenezin erken döneminde (nörulasyon esnasında) bir maruziyet olursa, merkezi sinir sistemi hasar görebilir, geç döneminde ise ürogenital ya da büyüme bozukluklarına neden olabilir (Bailey ve ark 2005). Gelişimdeki en kritik dönem, hücre bölünmesinin, hücre farklılaşmasının ve morfogenezin en yoğun olduğu dönemdir (Moore ve Persaud 2008). Bu dönem içinde embriyonun teratojen maruziyetinin hangi organların gelişim sürecine denk geldiği malformasyonların belirlenmesi açısından önemlidir (Şekil 1.1). Örneğin talidomit, embriyoda 25-31. günlerde üst extremitelerde, 28-33. günlerde ise alt ekstremitelerde malformasyonlara neden olmaktadır (Brent ve ark 1993).

Organogenezden önce gerçekleşen bir teratojen maruziyetinde düşük ile sonuçlanabileceği gibi, embriyo hiç etkilenmeden normal gelişimine devam edebilir. Bazı teratojenler (Aktinomisin D, siklofosfamid gibi) ise, ancak organogenezden önce alındıklarında malformasyonlara neden olurlar. Çünkü bunların aktif hale gelebilmeleri için zamana ihtiyaç vardır (Bailey ve ark 2005).



Şekil 1.1. İnsan embriyolojik gelişiminde teratojen etkilerin olabileceği kritik dönemler (Moore ve Persaud 2008).

İnsan gelişimi birbirleri ile ilişkili üç evreye ayrılabilir. Gelişimin birinci evresi büyümedir (Moore ve Persaud 2008). Büyüme; hücre, doku ya da organların kitlesel olarak artışı şeklinde tanımlanabilir. Büyüme, benzer hücrelerin çoğalmasını yani proliferasyonunu da içine alabilir (Brown 1967). Böylece hücre bölünmesi ile hücre ürünlerinin oluşması da büyüme periyodu içinde değerlendirilir. İkinci evre morfogenezdir. Vücudun ve organların tümünün ya da bir kısmının şeklinin büyüklüğünün ve diğer özelliklerinin oluştuğu evredir. Morfogenezde birbirini izleyen çeşitli karmaşık etkileşimler belirli bir düzen içinde oluşur. Doku ve organların oluşumları sırasındaki hücre hareketleriyle karşılıklı etkileşim gerçekleşir. Gelişimin üçüncü evresi farklılaşma, fizyolojik yönden olgunlaşmadır (Moore ve Persaud 2008). Farklılaşma periyodu, hücre içi komponentlerin fiziksel ve kimyasal organizasyonu ya da hücrelerdeki yapı ve organizasyon değişikliklerini içerir (Brown 1967). Farklılaşmanın tamamlanması ile doku ve organlar özelleşmiş fonksiyonlarını gerçekleştirme yeteneğine sahip olurlar (Moore ve Persaud 2008).

Teratojenik ajanlar, gelişen hücre ve dokularda özel mekanizmalar aracılığıyla anormal embriyogeneze sebep olurlar:

Teratojenik patogenez, çoğunlukla apopitozis, biyosentez ve morfogenezde değişikliklere neden olarak etkilemektedir. Bu etkileri; mitoza müdahele ederek, RNA veya protein sentezini değiştirerek, substratlarda, prekürsörlerde veya enerji kaynaklarında yetersizliğe sebep olarak, membran transport sürecini değiştirerek, hücre yüzeyi veya matriksinde değişikliğe sebep olarak veya osmolariteyi değiştirerek gerçekleştirebilmektedir (Bailey ve ark 2005).

Anormal gelişim kendini; ölüm, şekil bozuklukları, büyüme geriliği ve fonksiyonel bozukluklar şeklinde gösterir:

Teratojenik ajana implantasyondan önce maruz kalınması, embriyonun ölümüne neden olabilirken, erken organogenezis döneminde merkezi sinir sistemi, gözler ve ekstremitelerde, geç organogenezisde ise kulaklar, dış genital organlar, dişler ve damakta malformasyonlara neden olmaktadır. Daha geç evrelerde ise yapısal doku defektleri, büyüme geriliği veya fonksiyonel bozukluklara neden olabilmektedir (Bailey ve ark 2005).

Gelişen bir dokuya zararlı bir çevresel ajanın girmesi, ajanın yapısına bağlıdır:

Ajanın yapısı, annenin ajana maruz kalma şekli, süresi ve derecesi, plasental geçiş oranı, sistemik emilimi, maternal ve embriyonik genotip komposizyonu, ajanın tesirini etkileyebilir. Plasental geçiş oranı, türler arası teratojenite farklılıklarında önemli bir belirleyicidir (Bailey ve ark 2005).

Anormal gelişim, teratojenik ajanın doz artışına bağlı olarak hiçbir etki göstermeyeceği gibi öldürücü seviyeye kadar artabilir:

Teratojenik etki ancak, teratojenik ajan miktarı belirli bir eşik değerini aşarsa gözlenebilir. Her teratojenin bir eşik değeri bulunmaktadır. Bunun altındaki miktarlarda hiçbir etki gözlenmezken; eşik değeri aşıldığında, teratojenik etkiler doz ile doğru orantılı olarak artış gösterirler. Bu etkiler gözle görülemeyecek kadar küçük veya embriyonun ölümüne sebep olabilecek kadar büyük etkiler şeklinde olabilir (Bailey ve ark 2005).

1.1.2. Teratojenik Etki Mekanizmaları

Etkenlerin fetusun gelişmesini bozması için mutlaka hücrelerdeki genetik materyalin bozulması gerekmez. Teratojenik etkinin oluşması, etkenin embriyo veya fetusun gelişmesini kısıtlı veya kapsamlı bir şekilde değiştirmesine ve hücre farklılaşmasını bozmasına bağlıdır. Teratojenik etkiyi oluşturan başlıca mekanizmalar (Kayaalp 2009);

Sitotoksik etkiye bağlı teratogenezis:

Bunlar DNA yapısını genotoksik etkileriyle bozmak veya DNA sentezini inhibe etmek ya da mitoz esnasında iğcik oluşumunu bozmak suretiyle sitotoksik etki yaparlar. Buradaki etki hücrenin çekirdek dışı yapılarının etkilenmesiyle oluşan klasik sitotoksik etkiden farklıdır. Sitotoksik teratojenlerin diğer bölümünü oluşturan klasik sitotoksik etkili ilaçların, anne üzerinde de toksik olmalarından dolayı ilaç olarak tıbbi kullanıma girme olasılıkları pek yoktur. DNA replikasyonunu, transkripsiyonunu ve hücre bölünmesini bozan ilk tür maddeler embriyo hücreleri gibi hızlı çoğalma gösteren hücrelerde öldürücü etki yaparlar, fakat annede sindirim kanalı epiteli, kemik iliği, kıl folikülü gibi hızlı çoğalan hücreler dışında diğerlerini

etkilemezler. Bu maddeler uygulandıkları sırada en hızlı proliferasyon gösteren organ ve dokularda en fazla etkiye neden olurlar. Etkileri malformasyonlara neden olur (Kayaalp 2009).

Önemli besin maddelerinin dışarıdan alınmasının veya enerji üretiminin bozulması:

Gebenin beslenme yetersizliği nedeniyle yeterli kalori ve protein alamaması, folik asit ve A vitamini gibi vitaminlerin yetersizliği, fetusta genellikle büyüme geriliği, santral sinir sisteminin olgunlaşmasının gecikmesi ve tiroid bozukluğu gibi durumlara neden olabilir. Mitokondriyal protein sentezini inhibe eden, glikolizi bozan, trikarboksilik asit döngüsünü bozan etkenler fetal hücrelerin enerji metabolizmasını bozarlar. Bunun sonucu olarak malformasyon oluşmaz ancak büyüme geriliği ya da embriyo ölümü meydana gelir (Kayaalp 2009).

Uteroplasental kan akımının azaltılması:

Deney hayvanlarında vazokonstriktör ilaçların, plasentaya gelen maternal kan akımını azaltmak ve fetal kan akımını bozmak suretiyle büyüme geriliği veya malformasyon yaptığı gibi embriyo ölümüne de neden olduğu gözlenmiştir (Kayaalp 2009).

Farklılaşma ile ilgili spesifik olayların bozulması:

Bu mekanizma ile teratojenik etki yapan ilaçların belirgin bir genotoksik ya da sitotoksik etkisi yoktur. Embriyoyu öldürmeleri ve büyüme geriliği yapmaları olağan değildir. Organogenez döneminde verildiklerinde belirli yapıların gelişmesini bozarak, belirli malformasyon çeşitlerinden oluşan kendilerine özgü sendromlar yaparlar. Teratogenez mekanizmalarının ilaca spesifik olduğu düşünülmektedir. Örneğin, glukokortikoidlerin normal dozları embriyogenez için gerekli olduğu halde, yüksek dozlarda gebe sıçanlara verildiklerinde spesifik olarak yarık damak oluşumu gözlenmiştir (Kayaalp 2009).

Doku osmolaritesinin değişmesi:

Embriyo dokularının osmolaritesinin kimyasal etkenler tarafından değiştirilmesi organogenezi bozabilir (Kayaalp 2009).

1.1.3. Deney Hayvanlarının İn Vivo Teratojenite Testlerinde Kullanılması

Deney hayvanları ile yapılan gelişimsel toksikoloji çalışmaları, bir ilaç ya da kimyasala maruziyetin gebelik sırasında teratojenik bir risk olup olmadığının tespitinde ilk rehber olmaktadır. Değişik teratojen maddelere karşı duyarlılık gösteren, gebelik süresi kısa hayvan türleri seçilmelidir. Testlerin güvenirliliği için en az iki hayvan türünde yapılması gerekir. Bunlardan biri fare ya da rat olabileceği gibi diğer tür tavşan olabilir. Hayvan grupları her doz için 20 hayvandan oluşmalıdır. Çünkü oluşabilecek anomalilerin sıklığı düşük oranda olabilir (Bailey ve ark 2005).

Deneylerde kullanılan ilacın veriliş yolu, tedavide uygulanan yolun aynı olmalıdır. En düşüğü tedavide kullanılana eşdeğerde ve en yüksek doz da annede minimum toksisite oluşturan doz olmak üzere genellikle üç ayrı dozda ilaç verilir (Bailey ve ark 2005).

Teratoloji çalışmalarında kullanılan hayvan türleri ile insanlar arasında birçok fizyolojik ve biyokimyasal farklılıklar vardır. Buna rağmen en çok tercih edilen hayvan türleri kemirgenlerdir. Bu farklılıklar kısaca aşağıda özetlenmiştir:

1. Anatomik farklılıklar; Örneğin insanlarda tek bir plasenta varken, kemirgenlerde ve tavşanlarda iki plasenta vardır (Bailey ve ark 2005).

2. Farklı türlerin yetişkinleri ile fetusları arasındaki metabolik farklılıklar; Bunlar test edilen ajanın emilimini, dağılımını, metabolizmasını ve atılımını etkiler. Teratogenez için ilaçların metabolik aktivasyonu gerekir ve belirli türlerde inaktivasyon oranın değişmesinden dolayı, ilaçların yarılanma ömürlerinin belirlenmesi de önemlidir. Embriyonik veya fetal dokulardaki metabolik aktivasyon, maternal sistemdekinden daha büyük öneme sahiptir. Örneğin bazı nükleotit antimetabolitlerinin aktivasyonu. Bazı teratojenik metabolitlerin yarılanma ömrü o kadar kısadır ki sadece hedef dokuları etkiler (Bailey ve ark 2005).

3. Potansiyel teratojenlere karşı verilen cevap farklılıkları; Örneği insanlarda teratojen olarak bilinen aminopterin (kemoterapide kullanılan, immünsupresif özelliği olan bir folik asit türevi), farelerde teratojen değil iken ratlarda teratojen etki göstermektedir (Bailey ve ark 2005).

4. Hayvanların çevresel faktörlere duyarlılığı; Hayvanların yaşadıkları ortamdaki pestisit artıkları metabolizmalarını etkileyebilir. Bazı türlerde ısı farklılıkları, basınç, çeşitli çevresel stimülanlar ve diyet gibi farklılıklar konjenital malformasyonların oluşumunu indükleyebilir (Bailey ve ark 2005).

5. Test edilen maddelerin veriliş şekli ve dozu; İlaç ya da kimyasalların veriliş yolu, farklı hayvanlarda emilim farklılıkları ve metabolik yol farklılıklarına neden olur. Bazı teratojenler sadece oral yolla alındığında etkili olurken, bazıları ise çok yüksek dozlarda alındığında etkili olmaktadır (Bailey ve ark 2005).

6. Diğer faktörler; Bir defada doğurulan yavru sayısı, postnatal etkiler ve hayvanların bakım ve büyütülme şartları da testler için önem taşımaktadır (Bailey ve ark 2005).

1.1.4. Gelişimsel Toksikolojide Kullanılan İn Vitro Teknikler

Daha önceleri embriyo ya da fetus gelişiminin karmaşık yapısı ve gebelik sırasında anne ile fetus arasındaki karmaşık etkileşimlerden dolayı in vivo testler en az iki hayvan türü üzerinde gerçekleştiriliyordu. Bu testler: fertilite ve erken embriyonik gelişim, pre ve postnatal gelişim ile embriyo ya da fetus gelişimi olmak üzere üç farklı çalışmayı gerektiriyordu (Augustine-Rauch ve ark 2010). Bu çalışmalar çok fazla zaman gerektiren, pahalı ve aşırı derecede hayvan tüketimine neden olan çalışmalardı (Daston ve D'Amato 1989). Ayrıca zamanla sayıları artan kimyasallar ve bunların teratolojik özelliklerinin araştırılması ile çalışmalarda kullanılan deney hayvanlarının tüketimi artacaktı. Bu nedenlerle, var olan çeşitli bileşiklerin teratojenite potansiyellerini belirlemek ve bu esnada hızlı sonuç alabilmek, maliyeti düşürmek ve en önemlisi de hayvan tüketimini azaltmak amacıyla son 30-40 yıldır alternatif in vitro teknikler geliştirilmeye başlandı (New ve ark 1976a, Daston ve D'Amato 1989, Seiler ve ark 2006). Bu periyotta hücre kültürleri, embriyolardan elde edilen hücre kültürleri, embriyonik organ kültürleri ve

kemirgenlerin ve diğer bazı memeli türlerinin tüm embriyo kültürü gibi çeşitli in vitro metodlar geliştirildi (Daston ve D'Amato 1989). Konuyla ilgili metodları değerlendirmek için çeşitli ülkelerde değişik merkezler kuruldu. Bu merkezlerden biri olan 1991'de kurulmuş olan Avrupa Alternatif Metodları Değerlendirme Merkezi (European Centre for the Validation of Alternatif Methods - ECVAM)'nin 1997-2000 çalışmaları sonucunda üç farklı embriyotoksisite testinin güvenilirliği resmi olarak kabul edilmiştir. Bunlar sırasıyla;

A) Rat embriyolarının kültüre edilip, değerlendirildiği embriyo kültürü (Whole Embryo Culture - WEC),

B) Rat embriyolarının ekstremite tomurcuğundan alınan hücrelerin kültürü ile gerçekleştirilen mikropellet testi (Micromass Assay - MM),

C) Hiçbir gebe hayvanın ölümünü gerektirmeyen, fare embriyonik hücrelerinin kültürü temeline dayanan embriyonik kök hücre testidir (Embryonic Stem Cell Test - EST) (Liebsch ve Spielmann 2002).

ECVAM tarafından yapılan değelendirmede, in vivo olarak teratojenik etkileri hakkında yeterli bilgiye sahip olunan 20 kimyasal madde bu üç in vitro test ile çalışılmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında mikropellet testinde %70 oranında, embriyonik kök hücre kültürü ve tüm embriyo kültüründe ise %80 oranında in vivo test sonuçları ile uyumluluk tespit edilmiştir (Piersma 2006). Alternatif metodlar geliştirilmeye devam edilmiş ve son yıllarda Zebra balığı embriyoları ya da larvalarının kültürü de gelişimsel toksisite testlerinde kullanılmaya başlanmıştır (Augustine-Rauch ve ark 2010). Bu tekniklere kısaca bir bakacak olursak;

Embriyo kültürü (Whole Embryo Culture - WEC)

Bu metod ilk defa Dennis New ve arkadaşları tarafından 1970'lerde İngiltere'de Cambridge Üniversitesi'nde rat embriyolarının kültürü yapılarak geliştirilmiştir. Rat embriyolarında ana organ taslaklarının şekillendiği kritik dönem olan 9,5-11,5. gebelik günleri arasında in vitro olarak homojen serum içerisinde 48 saat kültürü yapıldığında, embriyo büyüme ve gelişmesinin in vivo şartlardaki büyüme ve gelişme ile aynı oranda olduğu gösterilmiştir (New ve ark 1976a). Teknik kuruluşunda çeşitli kimyasalların teratojenik potansiyellerini, in vivo yerine in vitro

olarak araştırmak amacıyla kullanılmıştır. Kültür, kemirgenlerin embriyolarının organ taslaklarının geliştiği erken organogenezis döneminde, belirli bir hızla dönen tüplerde 48 saatlik bir periyotta yapılmaktadır. Kültür ortamı olarak anne serumu kullanılmakta olup, ayrıca değerlendirilecek olan kimyasallar ya da diğer ajanlar bu ortama eklenmektedir. Kültür süresince değişen oranlarda oksijen, karbondioksit ve azot gazlarından oluşan karışım kültür şişelerine verilmektedir (New 1978). Kültür bitiminde embriyolar morfolojik olarak değerlendirilip, varsa oluşan anomaliler tespit edilmekte ve embriyolojik büyüme ve gelişme değerlendirilmektedir (Brown ve Fabro 1981, Van Maele Fabry 1990). Bu kültür yöntemi ile teratojenik mekanizmalar, embriyo fizyolojisi, embriyo gelişimi ve organogenezis gibi farklı araştırmalar için kullanılabilir. Bu sistem kullanılmak suretiyle çeşitli büyüme faktörlerinin (Çizelge 1.1), bir çok farmakolojik ve teratojenik ajanın (Çizelge 1.2) etkileri araştırılmış ve elde edilen sonuçlar tıp biliminin hizmetine sunulmuştur.

Çizelge 1.1. Büyüme faktörlerinin etkilerinin araştırıldığı embriyo kültürü çalışmaları.

Büyüme faktörleri	**Çalışma**
Vasküler endotelyal büyüme faktörü ve basic fibroblast büyüme faktörü	Ratajska 1995
Prolaktin	Karabulut ve Pratten 1998 Karabulut ve ark 1999
Epidermal büyüme faktörü ve vasküler endotelyal büyüme faktörü	Jojovic ve ark 1998
Anjiyotensin II	Tebbs ve ark 1999
Fibroblast büyüme faktörü, vasküler endotelyal büyüme faktörü, platelet kökenli büyüme faktörü	Ülger ve ark 2000
Plasental laktojen	Karabulut ve ark 2001
İnsulin benzeri büyüme faktörü I ve II, epidermal büyüme faktörü	Kurzawa ve ark 2002
Vasküler endotelyal büyüme faktörü	Ülger ve ark 2004
Anti–basic fibroblast büyüme faktörü	Unur ve ark 2009

Çizelge 1.2. Çeşitli farmakolojik ve teratojenik ajanların etkilerinin embriyo kültürü ile değerlendirilmesi.

Ajanlar	Toksik	Teratojenik	Çalışma
Sodyum salisilat		+	Mc Garrity ve ark 1981
		+	Greenaway ve ark 1982
	+	+	Karabulut ve ark 2000a
Asetil salisilik asit ve	+	+	Yokoyama ve ark 1984
salisilik asit	+	+	Joschko ve ark 1993
	+	+	Karabulut ve ark 2000a
	+	+	Singh ve Sinha 2009
Klorakin	+	+	Tagoe ve ark 1995
Edoferon-Kappa A	+	+	Karabulut ve ark 2000b
Heparin	+	+	Kesby 2000
Diklofenak		+	Chan ve ark 2001
Asetaldehit		+	Menegola ve ark 2001
Butil benzil fitalat	+		Saillenfait ve ark 2003
Nondepolarizan kas gevşeticiler	+	+	Karabulut ve ark 2004
Antikoagulanlar	+	+	Uysal ve ark 2006
Nitroimidazopridazin	+	+	Woehrmann ve ark 2006
Makrolid grubu antibiyotikler	+	+	Karabulut ve ark 2008
Mitomisin C	+	+	Singh ve Sinha 2010

Mikropellet testi (Micromass Test)

Potansiyel teratojenlerin zararlı etkilerini belirlemede kullanılan in vitro testlerden biridir. Mikropellet tekniği, rat embriyolarının farklılaşmamış orta beyin veya ekstremite tomurcuğu hücrelerinin in vitro koşullarda kültürü temeline dayanır (Flint 1986). Test edilen bileşiklerin embriyonik gelişim üzerindeki inhibe edici etkisi, nörogenez ve kondrogenez olmak üzere iki açıdan değerlendirilir. Ayrıca hücre farklılaşması ve hücre yaşamı bakımından değerlendirme yapılarak sitotoksisite çalışmalarına da olanak sağlar (Bacon ve ark 1990). 13 günlük gebe ratlardan alınan 34-36 somitli rat embriyolarının orta beyin ve ekstremite tomurcuğu

hücreleri disseke edilir. Bunlar enzimle muamele edilerek tek hücreli süspansiyon haline getirilir. Bu hücreler 5 gün kültüre edildikten sonra, orta beyin hücreleri farklılaşarak nöronları ve ekstiremite tomurcuğu hücreleri de farklılaşarak kıkırdak oluşumunu sağlarlar. Bunlar fikse edilip farklı boyalarla boyanırlar. Sonuçta farklılaşmış hücre odakları sayılıp, hiçbir ajan olmadan kültüre edilen kontrol grubu odakları ile karşılaştırılır (Flint ve Orton 1984). Bu teknikte doku kaynağı olarak kemirgen ya da civciv embriyoları kullanılabilir (Minta ve ark 2004). Embriyogenez sırasında hücre adezyonu, hareketi, hücreler arası etkileşim, bölünme ve farklılaşma gibi hücre hareketlerinin incelenmesini sağlar (Tshuchiya ve ark 1992).

Embriyonik kök hücre testi (Embryonic Stem Cell Test - EST)

Embriyonik kök hücre testi, kimyasalların ya da ilaç adaylarının embriyotoksik potansiyelini değerlendirip sınıflandırılmasında kullanılır. Kimyasallar bu testle değerlendirilirken zaman ve maddi bakımdan oldukça kazanç sağlarken, hayvan kullanımı da oldukça aza indirgenir (Peters ve ark 2007). Fare embriyonik kök hücreleri zayıf bağlanma kapasiteli kuyucuklarda kültüre edilir ve embriyo benzeri yapılar oluşur. Bu yapılar test edilecek bileşiklerin değişik konsantrasyonlarda ilave edildiği kültür ortamlarında 10 gün kültüre edilir. Sonrasında kardiyomiyosit hücreleri atmaya başlar. Bu yapılar skorlanarak, test edilen bileşikler güçlü embriyotoksik, zayıf embriyotoksik ya da embriyotoksik değil şeklinde ayrılabilir (Buesen ve ark 2009, Augustine-Rauch ve ark 2010).

Zebra balığı embriyo kültürü (Zebrafish Embryo Culture)

Zebra balığının hem yetişkinleri hem de embriyoları, önceleri ekolojik toksikoloji çalışmaları için kullanılırken, sonradan özellikle gelişimsel genetik araştırmaları için uygun bir materyal haline gelmiştir (Hörstgen-Schwark 1993). Bakımı ve beslenme kolaylığı, yumurtalarının dışarıda fertilizasyonu, kolay kültüre edilebilmeleri, embriyolarının hızla büyümesi ve fertilizasyon sonrasında toplam 72 saatte organogenez sürecinin tamamlanmasından dolayı gelişimsel toksikoloji çalışmalarında da kullanılması önem kazanmıştır (Augustine-Rauch ve ark 2010). Schulte ve Nagel (1994) tarafından tanımlanan bu metodda 4 hücreli aşamaya ulaşmış olan döllenmiş yumurtalar kullanılmakta olup, kültür 96 kuyucuklu platelerde, 26°C'de gerçekleştirilir. Her bir konsantrasyon için 24 yumurta kullanılıp,

her bir test 2 defa tekrarlanır. 6 gün sonra kültür tamamlanır ve embriyolar ışık mikroskobu altında morfolojik açıdan değerlendirilir (Schulte ve Nagel 1994).

Teratoloji çalışmalarında kullanılan değişik in vitro kültür tekniklerinin avantajları ve dezavantajları Çizelge 1.3'de özetlenmiştir (Brown ve Fabro 1982).

Çizelge 1.3. Teratoloji çalışmalarında in vitro kültür tekniklerinin avantajları ve dezavantajları (Brown ve Fabro 1982).

Avantajları	Dezavantajları
Karmaşık faktörler bertaraf edilir.	Karmaşık in vivo etkileşimler göz ardı edilir.
Direkt embriyotoksisite çalışılabilir.	Tüm hayvanın farmakokinetiği göz ardı edilir.
Kesin konsantrasyonlar belirlenebilir.	Maternal ksenobiyotik mekanizması yoktur.
Biyokimyasal ve radyoizotopik çalışmaları kolaylaştırır.	In vitro gelişim anormal olabilir.
Gelişme basamağı tam olarak belirlenebilir.	Embriyogenezin sadece sınırlı bir peryodu çalışılabilir.
Plasenta bariyeri elimine edilir.	
Mikrocerrahi uygulamalarını kolaylaştırır.	
Embriyolar sürekli gözlemlenebilir.	
İnsan dokuları da kullanılabilir.	
Embriyonik metabolizma çalışılabilir.	

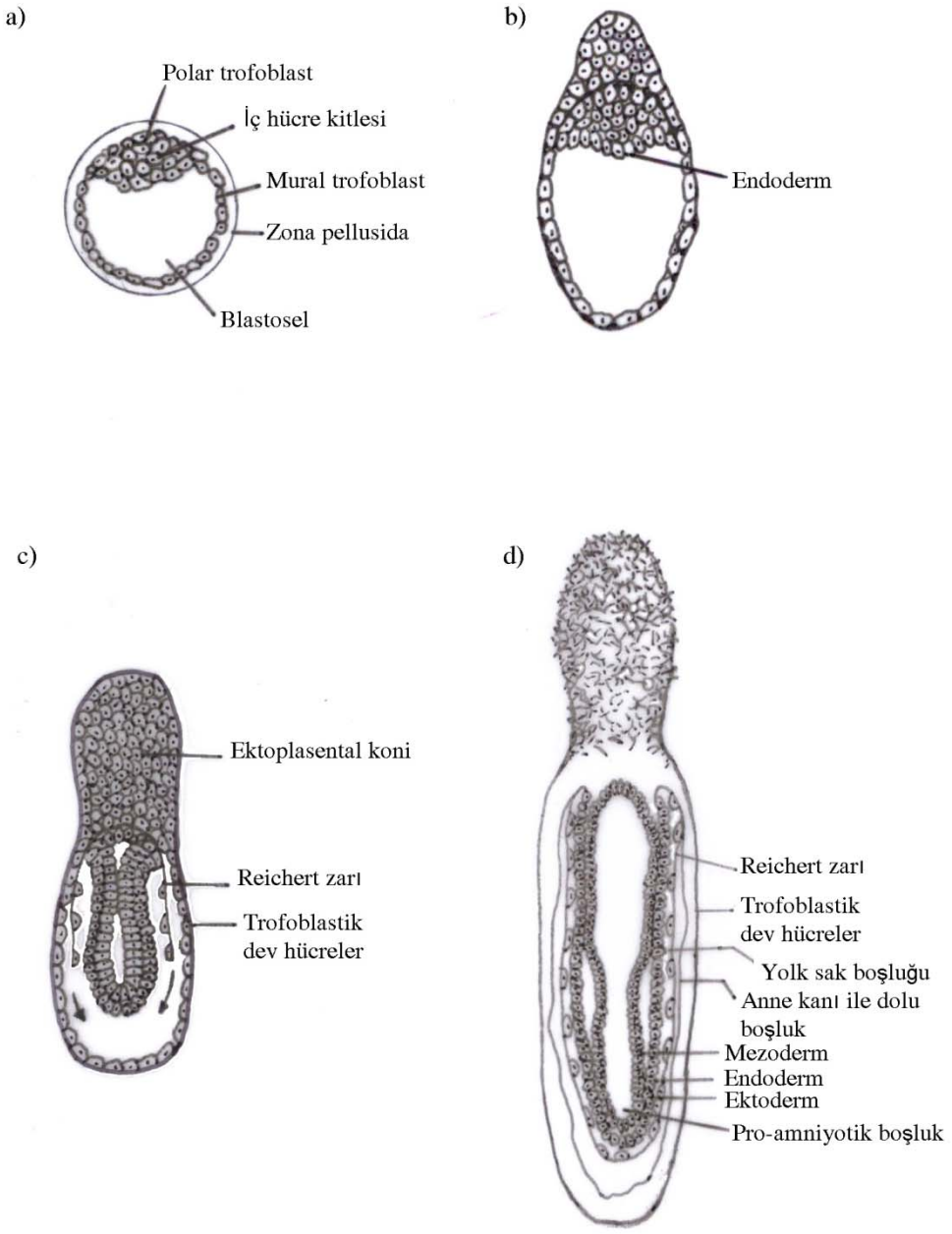
1.2. Ratlarda Erken Embriyolojik Gelişim

Embriyo kültürü sırasında büyüme ve gelişmenin normal seyrinde devam ettiğini anlayabilmemiz, kültür sonrasında meydana gelebilecek anomalileri tanımlayabilmemiz ve gelişen organ taslaklarında morfolojik skorlamayı doğru olarak yapabilmek için, öncelikle rat embriyosunun normal gelişim periyodunu bilmek gerekmektedir.

Ratlarda fertilizasyon çoğunlukla tuba uterina'nın ampulla kısmında meydana gelir. Oluşan zigot tüp boyunca aşağıya doğru ilerler ve ilk mitoz bölünmelerinin tamamlandığı geç morula safhasında uterus boşluğuna girer (Theiler 1989). Morula kısa bir süre uterus boşluğunda serbestçe yüzer ve sonrasında morula içerisinde sıvı dolu bir boşluk gözlenir (blastosel) ve morula artık blastosiste dönüşür (Beck ve Lloyd 1977) (Şekil 1.2.a).

Aynı gelişme aşamasındaki rat blastosisti ile insan da dahil olmak üzere diğer memeli embriyolarındaki blastosistler benzer yapıya sahiptir. Blastosistin dış tarafındaki trofoblastik tabakadan ileride plasenta, iç tarafında yerleşmiş olan hücrelerden de embriyo, yolk sak, allantois ve amniyon gelişecektir. Blastosist, zona pellusida adı verilen yarı saydam bir yapı ile çevrilidir. Zona pellusida, blastosistin tuba uterina'ya implantasyonunu engeller. Gestasyonun 4-5. günlerinde zona pellusida dejenere olur ve implantasyon başlar. Ratlarda implantasyon uterusun anti-mezometriyal kısmındaki bir olukta meydana gelir (Beck ve Lloyd 1977). İnsanda ise, fertilizasyondan sonra yaklaşık 6. günde blastosistin embriyonik kutup bölgesindeki endoderme tutunmasıyla implantasyon başlar (Moore ve Persaud 2008). Her iki cinste de implantasyon, trofoblastların maternal dokulara doğru hızla çoğalıp ilerlemesiyle devam eder (Steven ve Morris 1975).

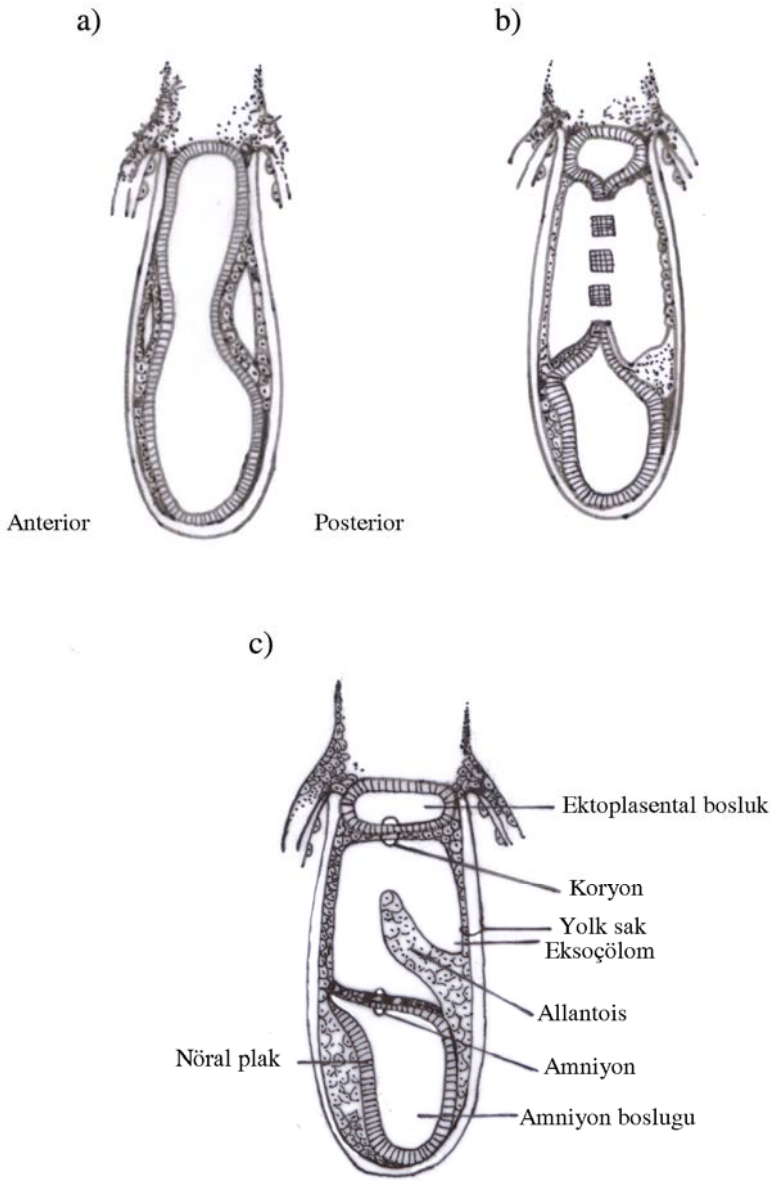
Ratlarda polar trofoblast hücrelerinde bölünmeler devam eder ve ektoplasental koni meydana gelir (Şekil 1.2.a, b, c), bu hücreler maternal eritrositleri içine alıp sindirirler ve ilerde koryallantoyik plasentanın fetal kısmını oluştururlar. Mural trofoblastlar ise bölünmezler ve primer dev hücrelere dönüşürler (Steven ve Morris 1975).



Şekil 1.2. Laboratuvar ratlarında fetal zarların gelişimi (Steven ve Morris 1975). **a)** İmplantasyon öncesi blastosist hali, **b)** Blastosistin implantasyonu, polar trofoblastın çoğalması ve iç hücre kitlesinin farklılaşması, **c)** Germ tabakalarının inversiyonu ve Reichert zarının orijini, **d)** Mezodermin erken safhadaki görünümü.

5-6. günler arasında iç hücre kitlesi farklılaşarak endoderm ve ektodermi oluşturmaya başlar. İç hücre kitlesi hızla çoğalmaya devam eder ve endodermi, blastosel içine doğru iter (Şekil 1.2.b). Ektodermin içerisinde ilk amniyotik boşluk meydana gelir, böylece endoderm tarafından çevrelenmiş ektodermden bir silindir oluşur (Şekil 1.2.c). Germ tabakasının inversiyonu ile yumurta silindirinin oluşması kemirgenlere özgü bir durumdur. Bu iki katmanlı silindir diğer memelilerdeki iki katmanlı germ diskine eşdeğerdir. Bu aşamada embriyoyu çevreleyen koryon yoktur ve embriyo ile anne kanı ayrılması gerekmektedir. Reichert zarı, silindir içindeki kapillerlerin primer dev hücrelere doğru geçmesini engelleyen ve sadece kemirgenlerle, böcek yiyenlerde bulunan embriyo dışı bir zardır. Bu zar ilk defa Gine domuzlarında Reichert tarafından bulunmuş olup, Reichert zarı olarak isimlendirilmiştir. Reichert zarı gestasyonun 6. gününde mural trofoblast ile ektoplasental konun birleşme yerinden aşağıya ve blastosel içine doğru trofoblastik dev hücreler ile pariyetal endoderm arasında ortaya çıkar (Şekil 1.2.c,d). 8. güne gelindiğinde, kalın hiyalin bir zar olan Reichert zarı tüm embriyoyu çevreler (Steven ve Morris 1975). Reichert zarı embriyonun erken dönem beslenmesinde ve korunmasında önemli rol oynar, embriyoyu anne kanından ayırır fakat, sızıntı şeklinde organik sıvı geçişine izin verir ve embriyo bu sıvı içinde yüzer. Besinler yolk sak endoderminden pinositozla alınır (Beck ve Lloyd 1977) ve 11-12. günlerde kan adacıklarının birleşmesiyle dolaşım başlayana kadar besinler, embriyoda difüzyon ile yayılır. Yolk sak aynı zamanda sindirim fonksiyonu da yapar. Embriyonik protenlerin sentezi için gerekli aminoasitleri elde etmek için dışarıdan alınan proteinlerin yıkımını gerçekleştirir (Freeman ve Lloyd 1983).

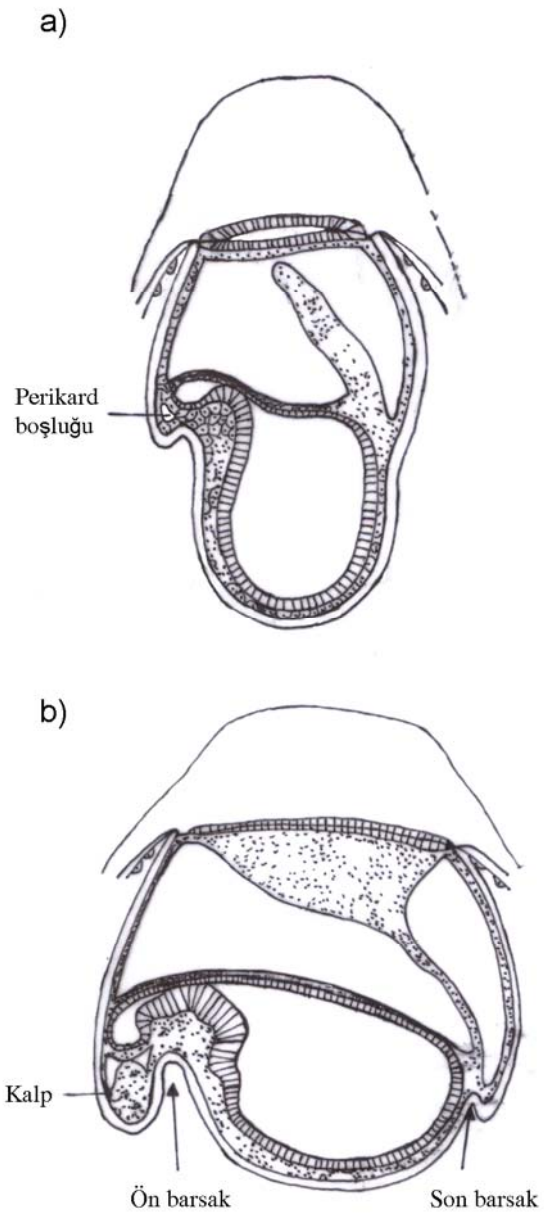
Reichert zarı 18. güne kadar kalır ve sonra yırtılarak plasenta kenarına çekilir. Desidual doku içerisindeki kapiller kanallar, trofoblastlar ile Reichert zarı arasındaki sinus benzeri boşluğa girdiği için, gebeliğin ilk aşamalarında yolk sak ile embriyonik endodermi anne kanından ayıran tek yapı Reichert zarıdır. Bu zarın bulunması germ tabakalarının inversiyonuna kadar gereklidir, böylece koryon diğer türlerde olduğu gibi tüm embriyoyu çevrelemez (Steven ve Morris 1975).



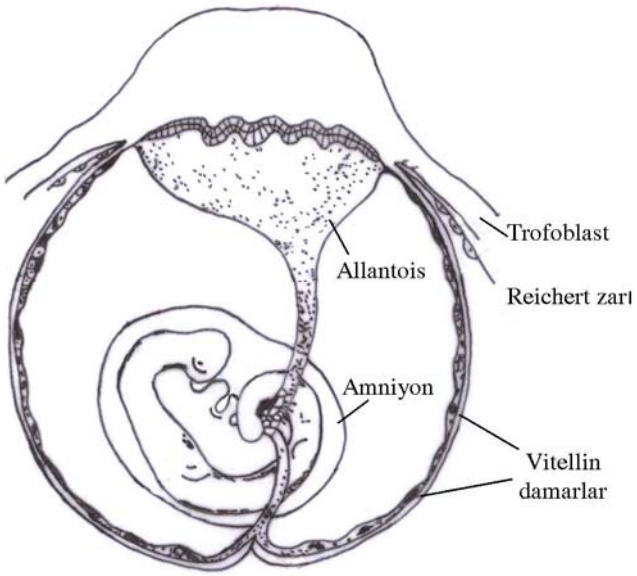
Şekil 1.3. a-c) Laboratuvar ratlarında amniyon, koryon ve yolk sak'ın oluşumu (Steven ve Morris 1975).

Gebeliğin 8. gününde mezoderm oluşmaya başlamasıyla gastrulasyon evresi başlar. Mezoderm hücreleri, endoderm ile ektoderm arasında bir hat boyunca ilerler ve embriyo çevresini sarar (Şekil 1.2.d ve Şekil 1.3.a) . Mezoderm hücreleri arttıkça ileride embriyonun posterior ucuna denk gelecek kısımda bir boşluk (pro-amniyotik boşluk) oluşmaya başlar ve bu boşluk büyüyerek çevresindeki hücrelerle beraber silindirik bir halka şeklini alır (Şekil 1.3.a). Daha sonra mezoderm hücrelerinin sayıca artmasıyla beraber ektoderm ve mezoderm hücreleri silindirin orta kısmından

içeriye doğru ilerlemeye başlar ve sonunda iki taraf birleşir (Şekil 1.3.b). Boşluk etrafında horizontal seyirli iki membran oluşur. Biri ektoplasental koni yakınında olan koryon, diğeri de ileride embriyoyu oluşturacak olan ilkel hattın hemen üzerinde olan amniyondur (Şekil 1.3.c). Böylece konseptus; ektoplasental boşluk, yolk sak boşluğu (ekstra embriyonik çölom) ve amniyon boşluğu olmak üzere 3 odacığa ayrılılır (Steven ve Morris 1975).



Şekil 1.4. Laboratuvar ratlarında **a)** Allantois ve koryonun kaynaşması ile koryoallantoik plasentanın oluşumu, **b)** Ön barsak ve son barsak oluşumu (Steven ve Morris 1975).



Şekil1.5. Laboratuvar ratlarında allantoik plasentanın ileri gelişimi ve barsak oluşumunun tamamlanmasıyla embriyonun dorsale doğru konveks olacak şekilde tamamen dönmesi (Steven ve Morris 1975).

Bu sırada embriyonun posterior ucunda ekstra embriyonik mezodermin hızla çoğalmasıyla allantois oluşur (Şekil 1.3.c, Şekil 1.4.a). Allantois, ekstra embriyonik çölomdan koryona doğru uzanır. Bu gelişim yaklaşık olarak, embriyoların in vitro kültür için alınıp hazırlandığı 9,5. günde gerçekleşir (Beck ve Lloyd 1977).

9-10. güne gelindiğinde embriyoda baş ve kuyruk kıvrımı oluşmaya başlar, bu aşamada embriyoda 5-12 somit vardır. Allantois, koryon ile birleşirken ektoplasental boşluk yok olmaya başlar (Şekil 1.4.b). Allantoik damarlar, koryon ektodermi üzerinde dağılmaya başlar, böylece anne ile embriyonik dolaşım koryon ile birbirinden ayrılmış olur. Böylece koryoallatoik (hemokoryal) plasenta oluşur (Şekil 1.5). İki dolaşım arasındaki geçiş difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, aktif transport ya da pinositoz aracılığıyla sağlanır. Koryoallantoik plasenta 11-12. günlerde aktif hale gelir (Beck ve Lloyd 1977). Yolk sakın, embriyonun beslenmesindeki rolü kademeli olarak azalır (Steven ve Morris 1975). Organogenezisin önemli kısmı 15. güne kadar devam eder. 16. günde pariyetal yolk sak, trofoblast ve desidua kapsularis rezorbe olur. 18. günde de Reichert zarı yırtılarak ayrılır (Beck ve Lloyd 1977).

Ratlarda 21 günlük bir periyot olan gebeliğin, in vitro kültür ortamında da değerlendirilmesinin yapılabildiği 9,5. gününden 11,5. gününe kadar organ taslaklarının gelişim süreci Çizelge 1.4'de özetlenmiştir (Andrews 1986).

Morfolojik değerlendirmede kullanılan spesifik gelişimsel parametreler, Gereç ve Yöntemler kısmında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Çizelge 1.4. Rat embriyosunda 9,5-11,5. günlerde oluşan gelişimsel özelliklerin özetlenmesi (Andrews 1986).

Gestasyonel yaş (Gün)	Somit sayısı	Gelişimsel özellikler
9,5-9,75	0-3	Amniyon ve koryon tarafından ayrılmış 3 boşluk ve embriyonun posterior ucunda allantois tomurcuğu görülür haldedir.
9,75-10	4-6	Nöral plak ortaya çıkar ve kalınlaşır, nöral kıvrımlar oluşur, baş ve kuyruk kıvrımları, otik sulkus görülür.
10-10,5	7-9	Nöral tüp ortadan başlayarak kısmen kapanır, embriyo dorsalde konveks olacak şekilde dönmeye başlar, ilk yutak kavsi ortaya çıkar.
10,5-10,75	10-14	Nöral kıvrımlar kaynaşır, otik çukur oluşur ve optik vezikül ortaya çıkar.
10,75-11,5	16-22	Anterior nöropor ve rombensefalik çatı kapanır. Embriyo fleksiyonu tamamlanır, ön ayak tomurcuğu görülebilir, posterior nöropor ve otik çukur kapanmaya başlar.
11,5-12,0	23-28	Posterior nöropor kapanır, üçüncü yutak kavisleri oluşur, sağ ve sol kalp ayırt edilmeye başlar, arka ayak tomurcuğu görülmeye başlar, optik vezikül invaginasyonu ile lens plağı oluşur.

1.3. İn Vitro Rat Embriyo Kültürü

1.3.1. Kullanılabilir Embriyo Kültür Teknikleri

İmplantasyon sonrası embriyoların kültürü ile ilgili New (1978) tarafından tanımlanmış olan 3 önemli metod vardır;

Saat camı kültürü

Bu teknikte kültür ortamı hareketsizdir, fare ya da rat embriyoları bu sistem ile ekstremite tomurcuğunun erken gelişim aşamasına kadar ulaşabilirler. Kültür için hazırlanan embriyolar saat camı içerisinde bulunan besiyeri içine konulur ve bu cam da bir petri kabı içine yerleştirilir. Petri kabına nemli pamuk yerleştirilmek suretiyle rutubetli bir atmosfer ortamı oluşturulur. Son olarak bu petriler, uygun oksijen, karbondioksit ve azot gazları içeren, 37°C sıcaklığındaki kapalı odacıklarda inkübe edilir (New 1978).

Dönen şişe metodu

Embriyolar, içerisinde uygun şekilde hazırlanmış besiyeri bulunan şişeler içerisine konulur ve gerekli oksijen, karbondioksit ve azot gazlarından oluşan karışımla desteklenir. Bu şişeler, inkübatör içerisine yerleştirilmiş olan ve dakikada 30-60 devirle dönen silindirler üzerine yerleştirilerek, 37°C'de kültür süreci gerçekleştirilir. Şişelerin sabit bir şekilde dönmesiyle gelişen embriyolar ortamdaki besinlerden ve gazlardan aynı oranda faydalanırken, test edilen kimyasal ajanlara da eşit oranda maruz kalmış olurlar. Ayrıca bu sayede besinler, kimyasallar ya da oluşan metabolik atıklar bir yerde birikmemiş olur (New 1978).

Bu sistem kolay ve ucuz bir yöntemdir. Bu metod ile kültüre edilen embriyolar, durgun olan metodla kültüre edilen embriyolara göre daha iyi gelişmektedir. Bizim çalışmamızda da bu sistem kullanılmıştır.

Sirkülasyon metodları

Bu metodlar için komplex aparatların kullanılması gerekmektedir. Bu sistemde embriyo sabit dururken, besiyeri olarak kullanılan medyum, embriyolar etrafında sürekli dolaşır. Bu sistem ile dönen şişe metodunda embriyo gelişimi eşit

oranda gerçekleşir. Ancak bu sistemde kullanılan aparatlar oldukça pahalı olmakla beraber aynı anda çok az sayıda embriyonun kültürüne imkan verdiği için tercih edilmeyen bir yöntemdir. Bununla birlikte embriyo sabit kaldığı için sürekli gözlemlenip embriyo gelişimi değerlendirilebilir (New 1978).

1.3.2. Kültür İçin Besiyeri Geliştirilmesi

Embriyonik gelişim, otolog serum denilen embriyo ile aynı hayvandan alınan serum ya da aynı türe ait gebe veya gebe olmayan dişiler ile erkek hayvanlardan alınan serum olan ve homolog serum adı verilen serumda eşit olarak gerçekleşmektedir. Farklı türlere ait hayvanlardan hazırlanan serumlar (heterolog serum) ise zayıf bir gelişime ya da embriyonun ölümüne sebep olabileceği gösterilmiştir (New 1978).

New ve ark (1976b), kültür ortamı olarak kullanılan serumun hazırlanması ve kültür sırasında ortama verilen gaz karışımlarının oranlarının belirlenmesi ve optimum şartların sağlanması için çeşitli modifikasyonlar yapmışlardır. Kullanılacak serumun hazırlanmasında en uygun olanı tercih etmek için üç farklı yol izleyerek, kan dolaşımı, embriyo fleksiyonu, allantois gelişimi, nöral tüpün kapanması, ortalama yolk sak çapı, ortalama somit sayısı ve embriyo protein miktarı değerlendirilmiştir. İlk olarak rattan alınan kan vakit geçirmeden hemen santrifüj edildiğinde, süpernatant içinde hemen fibrin oluşumu gözlenmiş ve bu pıhtı forseps ile alınıp sıkılmak suretiyle içinde bulunan komponentlerin tüpe bırakılmasını sağladıktan sonra tekrar santrifüj edilip elde edilen serum kullanılmıştır. İkinci olarak ilk santrifüjü hemen yapılan tüplerin içeriği karıştırıldıktan sonra 18 saat bekletilip, tekrar santrifüj edilip serum hazırlanmıştır. Üçüncü olarak da kanlar alındıktan sonra 18 saat bekletildikten sonra santrifüj aşamalarından geçirilerek serum hazırlanmıştır. Bütün serumlar ısı ile inaktive edilip, aynı oranda gaz karışımları kullanılarak kültür gerçekleştirilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda hemen santrifüj edilip, oluşan fibrin sıkıldıktan sonra tekrar santrifüj edilerek elde edilen serumda gelişmenin daha iyi olduğu ve protein sentezinin de daha fazla olduğu gösterilmiştir (New ve ark 1976b).

New ve ark (1976b), kullanılacak olan serumun ısı ile inaktivasyonunu değerlendirmek için yaptıkları araştırmada yalnızca hemen santrifüj edilmek

suretiyle hazırlanan serum kullanılmışladır. 56°C'de 30 dakika boyunca ısı ile inaktive edilen serumda kültüre edilen embriyoların, ısı ile inaktive edilmeyen kontrol serumunda büyütülen embriyolara göre daha iyi geliştiği ve protein sentezinin de daha iyi olduğu gösterilmiştir (New ve ark 1976b).

1.3.3. Kültür Ortamında Solunum ve Metabolizma

New ve ark (1976b), embriyo kültürünün ilk aşamasında kullanılacak olan gaz karışımındaki optimum O_2 konsantrasyonunu araştırmışlardır. İlk 24 saatlik kültür peryodunda %5 ya da %20'lik O_2 konsantrasyonuyla kültüre başlanmasının etkilerini değerlendirmek için her iki konsantrasyon için de hem ısı inaktivasyonu yapılmış hem de ısı ile inaktive edilmemiş kontrol grubu serumunda kültür gerçekleştirilmiştir. Sonuçta kan dolaşımı, embriyo fleksiyonu, allantois gelişimi, ortalama yolk sak çapı, somit sayısı ve protein sentezinde önemli bir farklılık gözlenmezken nöral tüp gelişiminde önemli farklılık gözlenmiştir. Isı inaktivasyonu yapılan ve %5'lik O_2 konsantrasyonuyla başlanan kültür koşullarında değerlendirilen 24 embriyonun tamamında da nöral tüp gelişiminin tamamlandığı gözlenirken, ısı inaktivasyonu yapılmadan %20'lik O_2 konsantrasyonuyla başlanan kültür koşullarında değerlendirilen 24 embriyodan sadece 9 embriyoda nöral tüp gelişiminin tamamlandığı tespit edilmiştir (New ve ark 1976b). Jauniaux ve ark (2003), insanda da gebeliğin ilk trimestrında embriyonun O_2 kullanımının oldukça düşük miktarda olduğunu bildirmişlerdir. İnsanda bu dönemde eksoçölomik boşlukta O_2 taşıma sistemleri yoktur. Oluşan serbest O_2 radikalleri fetal dokularda pre-eklempsi'ye neden olabileceği gibi düşüklere de sebebiyet verebilmektedir. New ve ark (1976b), in vitro sistemlerde iyi bir gelişmenin sağlanabilmesi için kültür süreci ilerledikçe artan O_2 konsantrasyonuna ihtiyaç olduğunu göstermişlerdir. Buna göre %5'lik O_2 konsantrasyonu ile başlayan kültürde, 24. saatte %20 ve 40. saatte de %40'lık O_2 konsantrasyonuna ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre optimum gaz karışımı Çizelge 1.5'te özetlenmiştir (New ve ark 1976b).

Çizelge 1.5. Embriyo kültüründe kullanılan optimum gaz karışımı (New ve ark 1976b).

Ekplantasyondan sonra geçen zaman (Saat)	Gaz karışımı
0	%5 O_2, %5CO_2, %90 N_2
24	%20 O_2, %5CO_2, %75 N_2
40	%40 O_2, %5CO_2, %55 N_2
48	%95 O_2, %5CO_2

Shepard ve ark (1970)'nın C_{14} işaretli glukoz kullanarak, rat embriyolarındaki enerji elde etme yollarını araştırmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre 10,5 günlük embriyolarda glukoz alımı oldukça yüksek düzeylerde olup, bunun %90'ı laktik asite dönüştürülmektedir. Oniki buçuğuncu günde glukoz kullanımı yarıya düşer ve sonuçta %68'i laktik asite dönüşür. Bu değerlere bakıldığında 10,5 günlük embriyoda, gerekli enerjinin büyük kısmı glikoliz ile küçük bir kısmı da Krebs devri ve elektron transport zinciri ile elde edilmektedir. Nükleik asit sentezi için de pentoz fosfat yolu oldukça aktiftir. Organogenez süresince Krebs devri ve elektron transport zincirinin önemi giderek artar.

1.3.4. İn Vitro Embriyo Kültürünün Önemi

Hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalar teratojenite hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu aşamada deneylerin in vivo mu yoksa in vitro mu olması avantaj sağlayacaktır sorusu gündeme gelmektedir. İn vivo testler daha ucuz ve hızlı olmasına rağmen birçok denemenin yaşayan yetişkin hayvanlar üzerinde yapılması mümkün değildir. Ancak alternatif olarak karşımıza in vitro kültür teknikleri çıkmaktadır. Çok sayıda kimyasalın ve olası teratojen ajanların potansiyel teratojenik zararlarını araştırmak için in vitro embriyo kültürü mükemmel bir metoddur. İn vivo hayvan deneyleri sonucu belirlenen 2000'den fazla kimyasal teratojen olarak rapor edilmiştir. Ancak bu ajanlardan sadece 20 kadarı insanlarda malformasyonlara sebebiyet vermektedir. İn vitro embriyo kültür sistemlerinde etkili ilaç dozları doğru belirlendiğinde herhangi bir yanlış pozitifliğe meydan verilmemektedir (Webster ve ark 1997).

Olası teratojen ajanların insan gebeliği esnasında ve insan embriyosu üzerinde çalışılması etik açıdan kabul edilemez olduğu için, hayvan modellerinin farmakolojik maddeler ve diğer ajanların embriyo üzerindeki toksik etkilerinin araştırılmasında kullanılması çok önemli hale gelmiştir. Teratoloji çalışmalarında en çok kullanılan hayvanlar kemirgenlerdir. Anatomik yapılarının ve embriyonik gelişim basamaklarının insana çok benzemesi, plasentalarının geçirgenliği, genetik stabiliteleri, çok sayıda fetus vermeleri ve gebelik sürelerinin kısa olması özellikle ratları bu tarz deneysel çalışmalar için uygun denekler haline getirmektedir (Ferguson 1977).

Embriyonik gelişmenin en kritik dönemi, embriyoda ana organ taslaklarının geliştiği dönem olan insanda 15-60. günler olup, bu dönem ratlarda 9,5-11,5. günlere denk gelmektedir. Teratojenlerin malformasyonlara sebebiyet verdikleri dönem de büyük olasılıkla bu dönemdir. Daha erken dönemlerde teratojene maruz kalmak gebeliğin sonlanmasına sebep olurken, daha geç dönemlerde ana organ sistemleri şekillenmiş olduğu için teratojenlere maruz kalma; fizyolojik anomalilere ya da organlarda fonksiyon bozukluğuna sebep olacaktır. İlaçların ve potansiyel teratojenlerin etkilerinin daha önceden saptanabilmesi ve doğumsal malformasyonların etiyolojisinin aydınlatılması amacı ile uzun yıllardır deneysel hayvan çalışmaları önem kazanmış ve bu amaçla in vivo ve in vitro çalışmalar eş zamanlı olarak yürütülegelmiştir. Memeli gelişimi sürecinde bütün ana organ sistemleri embriyonun uterus duvarına implantasyonundan sonra şekillenmeye başladığından dolayı embriyo üzerinde bu aşamada yapılabilecek in vivo çalışmalar oldukça sınırlı olmaktadır, çünkü bu aşamada embriyo net olarak izlenememekte ve amnioskopi, radyografi ve ultrasonografi gibi çalışmalar için de çok küçük olmaktadır. Buna karşın in vitro embriyo kültürü erken memeli embriyosu gelişimi döneminde embriyonun anneden ayrılarak annesel faktörlerin etkilerinden izole edilmesi açısından önem taşımaktadır (New ve ark 1976a).

Ayrıca in vitro embriyo kültürü araştırmacıya organ gelişimi sürecindeki embriyonun sürekli gözlemlenebilmesi ve kültür ortamına ilave edilen potansiyel teratojenlerin ve bazı farmakolojik ajanların organ gelişimi döneminde embriyonik büyüme ve gelişme üzerine etkilerinin eş zamanlı takibine imkan vermesi açısından da önemlidir. Yüksek doğurganlığa sahip ratların kullanıldığı bu metodun ilgili

bilimsel alanların dikkatini çekmek için oldukça değerli olduğu bildirilmiştir (Flick ve Klug 2006). Günümüzde kullandığımız bu tekniğin temeli New (1966)'in rat embriyolarının rat serumunda plazma pıhtısında olduğu kadar iyi büyüyebildiğini göstermesiyle atılmış olup, New ve ark (1978) tarafından geliştirilmiştir. Birçok araştırmada kullanılan bu rat embriyosu kültürü tekniği (New 1978) ile embriyoların in vitro ortamda uterus içinde olduğu kadar çabuk büyüdüğü gösterilmiştir (New ve ark 1978).

1.4. Antiemetik İlaçlar

Kusma, mide ve ince barsağın üst kısmının içeriğinin diyafragma ve karın kaslarının kasılması sonucu ağız yolundan dışarı boşalmasıdır. Kusma öncesinde fenalık duygusunun ağır bastığı özel bir duyumsama durumu olan bulantı ortaya çıkar; kusma sırasında da devam eder. Bulantı ve kusma haline emezis adı verilir (Babaoğlu ve Kayaalp 2009). Kusmayı sağlayan ilaçlar emetik, kusmayı önleyen ilaçlar da antiemetik olarak isimlendirilirler (Dural 2002).

Kusma nörofizyolojisi bakımından karmaşık bir reflekstir ve beyin sapında bulunan kusma merkezi tarafından koordine edilir. Bulantı ve kusma bir hastalık değil, çeşitli hastalıkların semptom ve işaretlerinden biridir (Babaoğlu ve Kayaalp 2009). Kusma merkezi (area postrema), 4. ventrikülün tabanında her iki yarısında obex ile trigonum nervi vagi arasında bulunan küçük yuvarlak kabartı şeklindedir (Arıncı ve Elhan 2006). Kemoreseptör tetikleyici bölgenin (KTB) hemen yanında yer alır. Kusma merkezi, kusma ile ilgili hareketleri başlatan ve onları koordine eden motor bir merkezdir (Babaoğlu ve Kayaalp 2009).

Kusma somatik ve visseral olayları kapsar. Kusma tükrük salgılanması ve bulantı ile başlar. Epiglottis, kusulan maddenin trakeaya kaçmasını önlemek için kapanır. Göğüs orta inspirasyon şeklinde tutulur. Karın duvarının kasları kasılırlar ve göğüs sabit bir durumda tutulduğundan karın içi basıncı artar. Özofagus ve mide sfinkterleri açılır ve midede bulunan maddeler dışarı atılırlar (Dural 2002). Çeşitli yerlerden gelen duysal uyarılar, kusma refleksini aktive ederler. Bunların başlıcaları;

a) Gastrointestinal kanal mukozası ve diğer visseral duysal sinir uçlarının patolojik olaylar (iltihap ve iskemi gibi) ya da ağızdan alınan ilaç, zehirli madde veya

bakteri toksinleri ile uyarılması: bu uyarılar ya n. vagus içindeki afferent liflerle doğrudan doğruya veya splanknik sinirler içindeki sempatik afferent liflerle medulla spinalis üzerinden dolaylı olarak beyin sapına ulaştırılırlar. N. vagus'un duyusal gangliyonu olan ganglion nodosum'un ilaçlarla uyarılması da vagal afferent lifleri aktive eder ve kusmaya neden olur (Babaoğlu ve Kayaalp 2009).

b) Santral sinir sistemi içinde oluşan uyarılar: Ruhsal nedenlere bağlı bulantı kusma bu şekilde oluşur. Göz ya da burundan gelen uyarıların algılanmasından sonra oluşan uyarılar da kusmaya neden olur. Kafa içi basıncın artması da önemli bir bulantı kusma nedenidir (Babaoğlu ve Kayaalp 2009).

c) Kemoreseptör tetikleyici bölgenin (KTB) sistemik dolaşıma giren ilaçlar, diğer ksenobiyotikler ve endojen toksinler tarafından direkt olarak uyarılması: KTB, area postrema'da lateral retiküler formasyon içinde bulunan bir kemoreseptör bölgesidir ve aynı zamanda duysal bir nukleustur. N. vagus'un afferent aksonlarının sinaps yaptığı nucleus tractus solitarii'ye yakındır ve onunla bağlantılıdır. Bu bölgede kan-beyin bariyeri yoktur. KTB, santral sinir sistemi içinden gelen bir kısım duysal uyarıları ve periferden gelenlerin çoğunu kusma merkezine gönderen bir ara istasyon görevi yapar. Aynı zamanda kandaki bulantı- kusma yapıcı maddelerin sensörüdür. KTB'deki nöronlarda yoğun şekilde serotonin 5-HT_3, dopamin D_2, kolinerjik M_1 ve opioid reseptörleri bulunur. Nucleus tractus solitarii de 5-HT_3, D_2, M_1 ve opioid reseptörlerden zengindir, ayrıca histamin H_1 reseptörler de bulunur. Bunların aktivasyonu nöronların duyarlılığını arttırır. Antidopaminerjik ilaçlarla bu reseptörlerin bir kısmının blokajı, bu istasyonunun çeşitli yerlerden gelen uyarılara duyarlılığını azaltır veya tam bir inhibisyon yapar (Babaoğlu ve Kayaalp 2009).

d) İç kulaktaki denge organının, taşıt tutması halinde veya iç kulak hastalıklarında olduğu gibi uyarılması: Bu şekilde oluşan kusmaya bazen vertigo (baş dönmesi) de eşlik eder (Babaoğlu ve Kayaalp 2009).

1980 yılından itibaren FDA (Food and Drug Administration = Gıda ve İlaç Dairesi), tüm ilaçların uzun yıllar süren hayvan ve insan deneylerinden elde edilen veriler doğrultusunda teratojenite açısından sınıflandırılması şartını getirmiştir. Bu sınıflandırma gebelik sırasında ilaç kullanımını kolaylaştırmak için yapılmış olup, tüm ilaçlar fetus için oluşturdukları risk oranında güvenliden (A kategorisi) çok

riskliye (X kategorisi) kadar değişen A, B, C, D ve X olarak gruplara ayrılmışlardır (Tüzün ve Karaaslan 1997). Bulantı ve kusmanın önlenmesi için kullanılan ilaçlar FDA'nın yaptığı sınıflandırmada A kategorisinden C'ye kadar değişebilmektedir (Briggs ve ark 2005) (Çizelge 1.6). FDA'ya göre ilaç kategorileri (Law ve ark 2010);

A kategorisi; Hamile kadınlarda yapılan kontrollü çalışmalarda gebeliğin ilk trimesterında kullanıldığında fetusta herhengi bir risk oluşturduğu gösterilememiş (ayrıca ileri dönemlerde kullanıldığında da artmış riske ait kanıt olmayan) ilaçlardır.

B kategorisi; Hayvanlar üzerinde yapılan deneylerde fetal risk ortaya çıkarmayan ancak insanlarda kontrollü çalışma yapılmamış olan ilaçlar ya da hayvanlarda fertilitede azalma dışında başka olumsuz etkiler saptanmasına rağmen bu bulgunun insanlar üzerinde ilk trimesterda kullanılarak yapılan kontrollü çalışmalarda saptanmadığı ilaçlardır.

C kategorisi; Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda istenmeyen etkiler saptanan ancak insanlarda kontrollü çalışma yapılmamış olan ilaçlar ya da hayvan ve insanlar üzerinde hiç çalışılmamış ilaçlar. Bu kategorideki ilaçlar gebelikte sadece gerçekten gerekli olduğunda yani potansiyel yararın potansiyel zararından fazla olduğu durumlarda verilmelidir.

D kategorisi; Fetus üzerinde olumsuz etki riski yarattığı konusunda kanıtlar olan ancak gebe kadınlarda kullanımından elde edilecek yararın bilinen bu riske karşın kabul edilebilir olduğu ilaçlar. Örneğin anne adayının hayatını tehdit eden ciddi bir hastalık sırasında kullanılması gereken ilaçlardır.

X kategorisi; Hayvanlarda ya da insanlarda yapılan araştırmalarda fetal anomalilere neden olduğu kanıtlanmış ya da deneyim ve gözlemlerde fetusta risk yarattığı konusunda kanıtlar bulunan ilaçlar ile gebelikte kullanımında ortaya çıkabilecek olan zararın olası yararından fazla olduğu bilinen ilaçlar. Bu tür ilaçlar gebe ya da gebelik şüphesi olanlarda kesinlikle kontraendikedir.

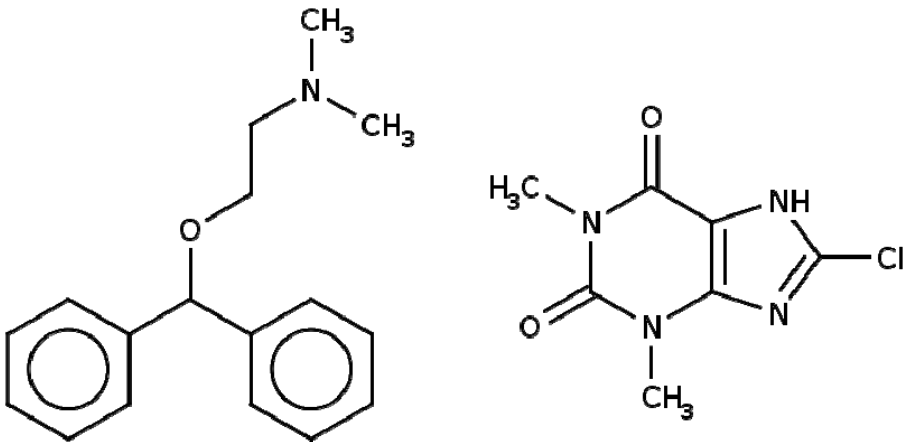
Çizelge 1.6. Bulantı ve kusmada kullanılabilen ilaçların teratojenite açısından FDA sınıflaması (Briggs ve ark 2005).

Farmakolojik isim	FDA Sınıfı
Pyridoxine	A
Doxylamine	B
Cyclizine	B
Meclizine	B
Dimenhydrinate	B
Dippenhydramine	B
Metoclopramide	B
Scopolamine	C
Promethazine	C
Chlorpromazine	C
Trimethobenzamide	C
Droperidol	C
Ondansetron	C
Kortikosteroidler	C

1.4.1. Dimenhidrinat

H_1 grubu antihistaminiklerdendir. Özellikle hareket hastalığı (taşıt tutması), gebelik ve postoperatif durumlardan kaynaklanan bulantı ve kusmalarda etkilidir (Dural 2002). Antihistaminik terimi H_1 reseptör blokajı yapan ilaçları tanımlamak için kullanılır. Bu bileşikler histamin sentezini ve salınımını engellemezler ancak hedef dokudaki reseptörlerini bloke ederler. Antihistaminikler, H_1 reseptörlerinin nazal ve bronşial mukus oluşumunu artırması, düz kasların kasılmalarını artırması (bronşiyolleri daraltması ve barsaklarda kasılma ve diyare oluşumu), sistemik kan basıncını azaltması, dilatasyon ve kapiller geçirgenliğin artırılması gibi etkilerini inhibe edici özellik gösterirler. Ancak bu ilaçların bazıları (difenhidramin, dimenhidrinat, siklizin ve meklizin) antiemetik olarak da kullanılmaktadırlar. Antiemetik etkileri, antihistaminik etkilerinden bağımsız olarak ortaya çıkmaktadır. Bunlar kemoreseptörler ve vestibüler yollar aracılığıyla ortaya çıkan kusmayı engelleyebilirler veya durdurabilirler (Mycek ve ark 2001). Dimenhidrinat, FDA'nın ilaç sınıflandırmasına göre B kategorisine ait bir ilaçtır (Briggs ve ark 2005).

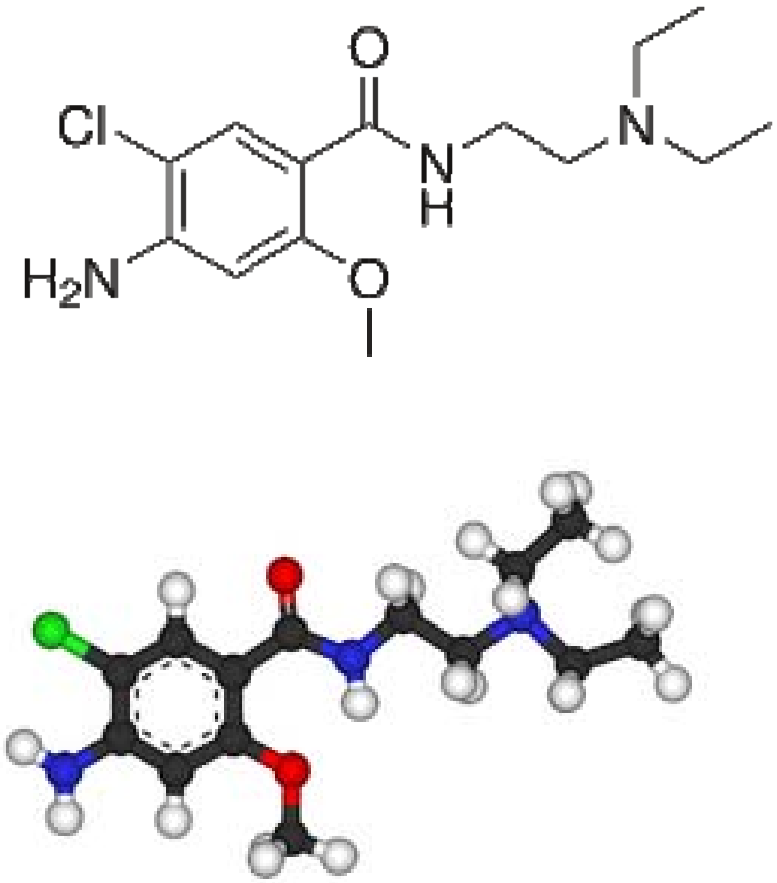
Difenhidramin'in kloroteofilin türevidir ve moleküler formülü $C_{24}H_{28}ClN_5O_3$ şeklindedir (Şekil 1.6). Molekül ağırlığı 469,9638 g/mol'dür (Medicalook 2008a)



Şekil 1.6. Dimenhidrinat'ın açık molekül formülü (NN-dimethyl-2-diphenylmetoxyethylamine; 8-chloro theophyllinate) (Wikimedia.org 2009).

1.4.2. Metoklopramid

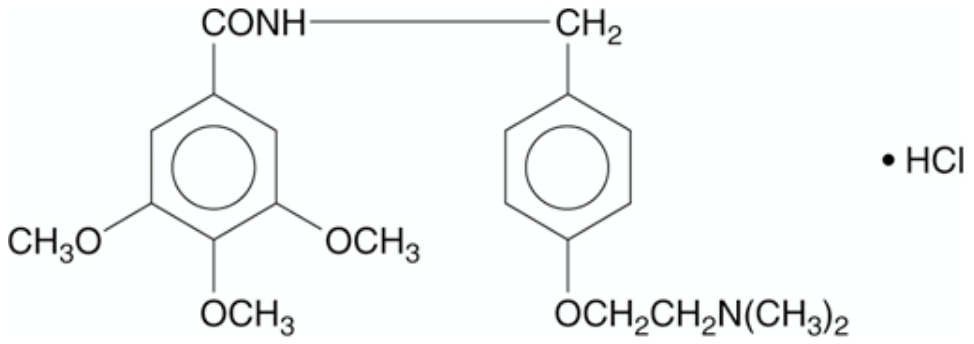
Metoklopramid, dopamin reseptör antagonistidir ve KTB inhibe edici olarak görev yapar. Küçük dozlarda santral sinir sisteminde ve periferde dopamin D_2 reseptörlerini bloke eder. Yüksek dozda daha belirgin olmak üzere, serotonin 5-HT_3 reseptörlerini bloke eder. Metoklopramid'in periferdeki faaliyeti ile mide ve barsaklardaki motilite artar. Peristaltik hareketler sırasında barsak veya mide segmentinin oral yöndeki kısmında kasılmayı ve anal yöndeki kısımda gevşemeyi güçlendirerek hareketin, barsak içeriğini anal yönde itme bakımından etkinliğini ve verimliliğini arttırır (Rang ve ark 1999, Babaoğlu ve Kayaalp 2009). Kemoterapiye, radyasyona, kronik böbrek yetmezliğine, morfin ve benzeri narkotik analjeziklere bağlı kusmaya karşı kullanılır. Gebelik kusmasına karşı etkilidir. Migren nöbeti sırasında ortaya çıkan bulantı ve kusmayı da inhibe edebilir. Ancak taşıt tutmasını önleme de yarasızdır (Babaoğlu ve Kayaalp 2009, Trevor ve ark 2010). FDA'nın ilaç sınıflandırmasına göre B kategorisinde bulunur (Briggs ve ark 2005). Bir benzamid türevi olan metoklopramidin kimyasal formülü $C_{14}H_{22}ClN_3O_2$ olup (Şekil 1.7), molekül ağırlığı 299,796 g/mol'dür (Medicalook.com 2007).



Şekil 1.7. Metoklopramid'in açık molekül formülü (4-amino-5-chloro-N-(2-diethylaminoethyl)-2-methoxy-benzamide) (Wikipedia.org 2009).

1.4.3. Trimetobenzamid HCl

Zayıf dopamin D_2 reseptör blokörü etki gösteren bir ilaçtır. KTB'yi inhibe eder. Antiemetik etkinliği düşüktür. Özellikle gastroenterite bağlı bulantı ve kusmalarda etkilidir. Vertigo ve taşıt tutmasına karşı etkili değildir. Gebelik kusmalarını da geçirebilir, fakat fetus üzerindeki etkileri belirli olmadığı için kaçınılmaktadır (Babaoğlu ve Kayaalp 2009). FDA'nın ilaç sınıflandırmasında C katagorisinde yer alır (Briggs ve ark 2005). Trimetobenzamid'in kimyasal formülü $C_{21}H_{28}N_2O_5$ şeklindedir (Şekil 1.8) ve 388,458 g/mol molekül ağırlığına sahiptir (Wikipedia.org 2007).



Şekil 1.8. Trimetobenzamid HCl'nin yapısal formülü (N-{[4-(2-dimethylaminoethoxy)phenyl]methyl}-3,4,5-trimethoxy-benzamide monohydrochloride) (Drugs.com 2010).

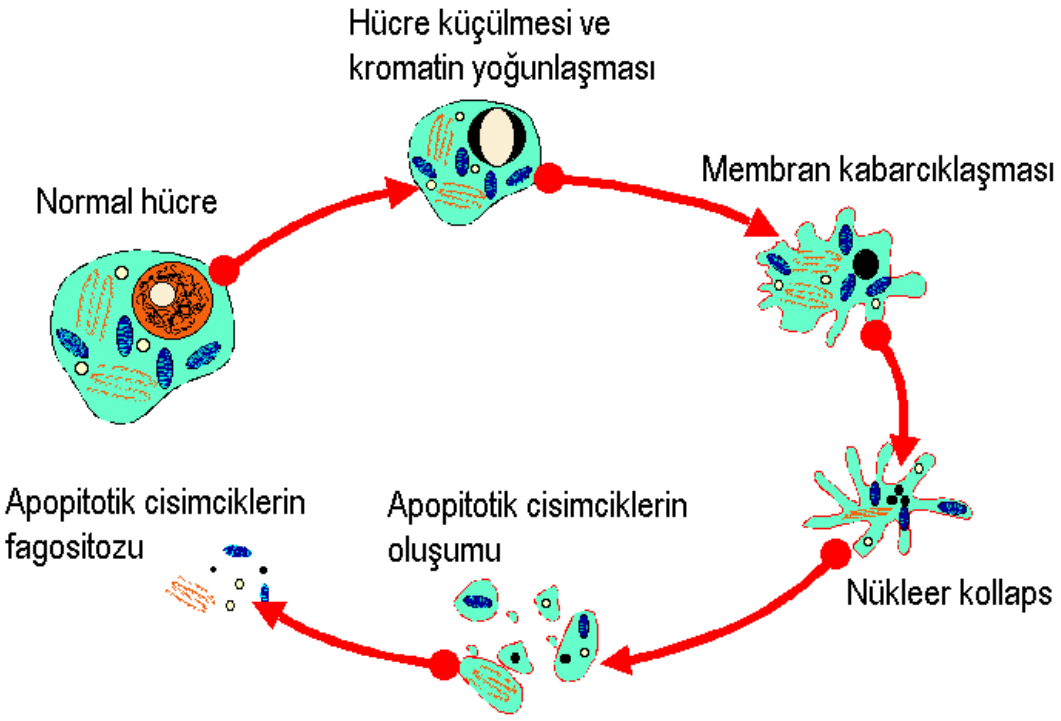
1.5. Apopitozis

Apopitozis, çok hücreli organizmalarda normal doku homeostazisi, malignite ve gelişim sırasında kritik rol oynayan, sıkı bir kontrol mekanizması olan, tipik bir morfoloji gösteren, evrimsel olarak korunmuş, genetik ve biyokimyasal olarak programlanmış hücre ölümüdür (Mainwaring ve ark 1998, Gao ve Kwaik 2000). Programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü veya hücre intiharı olarak da isimlendirilmektedir (Majno ve Joris 1995, Kroemer ve ark 2009). Bu programlı hücre ölümü ile inflamasyona neden olmadan, istenmeyen, hasarlanmış hücreler yok edilmektedir. Çok hücreli organizmalarda homeostazis, hücre çoğalması (proliferasyon) ve hücre ölümü arasındaki dengenin devamı ile sağlanır. Apopitozis ile hücre proliferasyonu canlıda hep bir denge içerisinde devam eder. Bu dengenin düzenlenmesindeki oluşacak bozukluklar, konjenital defektler, maligniteler, otoimmün hastalıklar, immün yetmezlikler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi değişik hastalıkların gelişiminde etkili olabilmektedir (Ayaşlıoğlu 2001).

İlk defa Kerr ve ark (1972), hem fizyolojik hem de patolojik durumlarda gelişebilen bu ölüm şeklinde hücrede meydana gelen değişiklikleri elektron mikroskobu ile ortaya koymuşlar ve "Apopitozis" olarak isimlendirmişlerdir. Yunanca bir kelime olan apopitozis, çiçek petallerinin ya da ağaç yapraklarının dökülmesi anlamına gelmektedir.

Apopitozis, hücre büzüşmesi, yüzeyinde sitoplazmik çıkıntılar meydana gelmesi, sitoplazmada yoğunlaşma, DNA fragmentasyonu ve son olarak da her biri membranla çevrili olarak apopitotik cisimciklere ayrılması ve komşu hücreler ya da

fagositler tarafından hızla fagosite edilmesi gibi bir seri morfolojik olaylar zinciri ile karakterize edilir (Cohen ve ark 1992, Saraste ve Pulkki 2000). Apopitotik cisimcikler fagosite edilerek dokudan hızla uzaklaştırıldığı için inflamatuvar reaksiyon görülmez ve böylece komşu hücrelere zarar vermeksizin hücre ölümü gerçekleşir (Ayaşlıoğlu 2001) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Apopitozisde görülen morfolojik değişiklikler (Microbiologybytes.com 2007).

Apopitozis çok hücreli bir organizmanın embriyonik dönemdeki gelişiminden başlayarak erişkin bir organizma olmasına ve yaşlanmasına dek birçok gelişim aşamasında homeostazisin sürmesini sağlayan önemli bir fizyolojik olaydır. Apopitozis, homeostazisin korunmasında embriyonik dönemde ekstremitelerin ve içi boşluklu organların oluşumunda, merkezi sinir sistemi gelişiminde nöron sayısının düzenlenmesinde yer alarak; doğumdan sonra T ve B lenfositlerin seçiminde temel bir işlev yürüterek, ayrıca DNA'sı ağır hasar gören ya da virüsle infekte hücrelerin ölümünü sağlayarak temel bir rol oynar (Mountz ve Zou 2001, Pole ve ark 2002). Ayrıca embriyonal gelişme sırasında tubuler yapılardaki lümen gelişimi, dudakların şekillenmesi, parmaklar arasındaki perdenin kaldırılması gibi olaylarda hayati rol oynar (Kerr ve ark 1972). Gelişme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin sinyalleri olmadığında hücreler apopitoza giderler. Ancak apopitozis çok çeşitli iç ve dış uyarı

ile tetiklenebilmektedir. Toksinler, iyonize radyasyon, reaktif oksijen radikalleri, çeşitli kimyasallar, yaşlanma veya iskemi sonucu gelişen subletal hasarlar hücredeki apopitotik süreci aktive edebilir. Çekirdekte, hücre membranında, mitokondride veya hücre içi herhangi bir bölgeden gelebilecek bir uyarı apopitozis başlatabilir (Ayaşlıoğlu 2001). Temel olarak apopitozis iki yolla başlatılır;

1. Hücre dışından tetiklenen, pozitif (TNFα varlığı) ya da negatif (büyüme faktörü yokluğu) ekstrensek yol (Kroemer ve ark 2009),

2. Hücre içinde DNA hasarı, endoplazmik retikulum stresi ya da mitokondriden tetiklenen intrensek yol. Mitokondri aracılığıyla düzenlenen hücre içi yol aslında hücre dışı ve hücre içi etkenlerin ortaklaştığı bir mekanizma oluşturur (Kroemer ve ark 2009).

Apopitotik süreç ister hücre içi, isterse hücre dışı mekanizmayla başlamış olsun, apopitotik süreç kaspazlar adı verilen proteolitik enzimler tarafından gerçekleştirilir. Kaspazlar, sitoplazmada inaktif proenzimler halinde bulunan, aktif katalitik bölgesinde sistein içeren ve substratlarını aspartat içeren özgül bir bölgeden kesen proteaz enzimlerdir (Elmore 2007). Çoğu apopitoziste rol alan ondört farklı kaspaz tanımlanmıştır. Tüm kaspazlar hücre içinde inaktif olarak bulunurlar ve proteolitik işlemle kırılarak aktif olurlar. Kaspazlar, yapısal özelliklerine ve fonksiyonlarına göre üç grupta sınıflandırılırlar; inflamatuar kaspazlar olarak adlandırılan grup I kaspazlar (kaspaz 1, kaspaz 4, kaspaz 5), başlatıcı kaspazlar olarak bilinen grup II kaspazlar (kaspaz 2, kaspaz 8, kaspaz 9, kaspaz 10) ve efektör kaspazlar olarak adlandırılan grup III kaspazlar (kaspaz 3, kaspaz 6, kaspaz 7). Ölüm reseptörleri aracılığıyla tetiklenen apopitotik sinyal, kaspaz 8 veya kaspaz 10 gibi başlatıcı kaspazların aktivasyonunu sağlarken mitokondriyal apoptotik sinyaller kaspaz 9'u aktif hale getirir. Daha sonra bu kaspazlar diğer kaspazları aktifleştirerek proteolitik bir yolağa neden olurlar. Bu yolak sonunda efektör kaspazlar olan kaspaz 3, 6 veya 7 aktive olur. Bu aktivasyon, nükleaz inhibitörü, hücre iskeleti ve önemli hücre proteinlerinde bölünmeye yol açarak DNA'da parçalanmaya ve tipik morfolojik değişikliklere neden olur (Chowdhury ve ark 2006). Yaşayan hücrelerde kaspaz aktivasyonu apopitozis inhibitör protenleri (IAP) adı verilen hücresel proteinler aracılığıyla kontrol altında tutulurlar. IAP proteinlerinin aşırı salınımı pro-

apoptotik Bcl-2 ailesinin tetiklediği apoptozisi inhibe eder (Salvesen ve Duckett 2002).

1.5.1. Hücre Dışı Uyarılarla Apopitozisin Tetiklenmesi

Apopitozis, ölüm reseptörleri adı verilen birbiriyle yapısal olarak akraba olan birkaç reseptör tarafından aktif olarak uyarılır. En iyi bilinen örnekleri TNFα ve Fas-Ligand reseptörleridir (Spierings ve ark 2004, Suda ve Nagata 1994). Ölüm reseptörleri hücre zarı içine tutunmuş, bir ucu hücre dışına, bir ucu hücre içine bakan, hücre içi tarafında prokaspaz 8'in aktiflenmesini sağlayan bir ölüm bölgesi (death domain) bulunan reseptörlerdir. Hücre zarında bulunan kendileri için özgün reseptörlere bağlanan ligandlar reseptörün trimerik (üç bileşenden oluşan) bir yapıya dönüşmesine yol açarlar ve hücre içinde adaptör moleküller adı verilen bir dizi molekülle etkileşerek prokaspaz 8'i iki farklı büyüklükte parçaya böler. Başlatıcı kaspaz denen aktif kaspaz 8, inaktif durumdaki proenzimler olan kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7 nin bir zincir biçiminde aktiflenmesine yol açar. Aktiflenen tüm kaspazlar hücre makromoleküllerini parçalayarak tipik apopitoz morfolojisinin oluşumuna yol açarlar (Elmore 2007).

Bcl-2 proteinleri apopitozis regülasyonunda denetim noktası olarak, önemli rol oynar. Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur. Bu gruplardan biri apopitozisi tetikleyici ve diğeri ise apopitozisi baskılayıcı etkiye sahiptir (Dejean ve ark 2006). Ölüm sinyali olmadığı zaman Bcl-2 proteinleri hücre içinde ayrı kompartmanlarda bulunurlar. Ölüm sinyali alındığı zaman, apoptozisi indükleyen üyeler değişime uğrarlar, daha sonra mitokondrinin dış membranına entegre olurlar ve mitokondriden apopitozisi başlatıcı bir faktör olan sitokrom c'nin salıverilmesine neden olurlar. Bu olaylar gerçekleşirken apopitozisi baskılayan üyeler ise inaktif olurlar (Griffiths ve ark 1999).

Hücreye sitotoksik T reseptörleri yoluyla ulaşan Fas ligandı, ya da TNFα, hücre yüzeyinde bulunan kendine özgü reseptörlerine bağlanarak apopitozu uyarabilir (Suda ve Nagata 1994, Sutton ve ark 2000). Hücre dışından gelen sinyallerin hücre içinde apopototik makinayı çalıştırmasına aracılık eden yollardan biri de sfingolipid yoludur. Sfingomiyelin, hücre zarının yapıtaşlarından biridir. Radyasyon ve kemoterapinin yanı sıra ölüm reseptörleri aracılığıyla da aktiflenebilen

bir enzim olan sfingomiyelinaz tarafından seramid'e dönüştürülür. Seramid, mitokondriyal yol üzerinden apopitozu tetikler (Taha ve ark 2006).

1.5.2. Hücre İçi Apopitotik Yollar

Mitokondri, hücre içi ya da dışı yollardan gelen ölüm sinyallerinin üzerinde birleştiği bir organeldir. Temel olarak mitokondrideki solunum zincirinde yer alan bir enzim olan sitokrom c sitoplazmaya dağılır. Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apopitotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak apopitozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar (Ripple ve ark 2010). Apopitozom, kaspaz 9'u aktifleştirir ve kaspaz 9, diğer kaspazları proteolitik bir zincir halinde aktifleştirerek apopitozisin gerçekleşmesini sağlar (Chowdhury ve ark 2006).

Mitokondride dış zar potansiyelinin değişmesi Bcl-2 ailesi adı verilen bir protein grubu tarafından düzenlenir. Bu zar potansiyelinin değişmesi uygulamacı kaspazların aktivasyonu ve apopitozisle sonuçlanır (Chowdhury ve ark 2006, Elmore 2007). Endoplazmik retikulum (ER) da, apopitotik süreci başlatabilen organellerden biridir (Keane ve ark 2001). Protein katlanmasında temel bir işlev yapan ER da bu katlama işlevi bozulduğunda, katlanmamış proteinlerin yol açtığı bir stres ortaya çıkar. Bu stresin aşırı olması ya da uzaması, proteaz ve kinazların doğrudan aktivasyonu ve hücre içi kalsiyumun artışıyla mitokondriyal yolu aktive eden bir etki oluşturur (Xu ve ark 2005). Endoplazmik retikulum ile mitokondri arasında yer değiştirerek hücre içinde çok düşük bir derişimde tutulan kalsiyumun da önemli bir apopitotik düzenleyici olduğunu gösteren bulgular vardır. Kalsiyumun mitokondride düzeyinin artmasının da mitokondriyal apopitotik yolu uyardığı bildirilmiştir (Demaurex ve Distelhorst 2003).

p53, DNA gardiyanı da denen ve bu güne kadar üzerinde en çok çalışılan tümör süpressör proteinlerden biridir. p53 sitoplazmada bulunan ve DNA'nın ya da hücrenin ağır biçimde hasar görmesi durumunda, DNA da belli genlerin aktivasyonuna, belli genlerin de baskılanmasına yol açarak apopitozisi tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür (Erster ve Moll 2005).

1.5.3. Apopitozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apopitotik yolla hücre ölümünü belirlemede kullanılan temel yöntemler morfolojik ya da biyokimyasal değişiklikleri tespit etme prensibine göre çalışır. Buna göre kullanılan metodlar aşağıda sıralanmıştır:

1. Morfolojik görüntüleme yöntemleri
2. İmmunohistokimyasal yöntemler
3. Biyokimyasal yöntemler
4. İmmunolojik yöntemler
5. Moleküler biyoloji yöntemleri

Morfolojik görüntüleme yöntemleri

Elektron mikroskobisi, ışık mikroskobu ve floresan mikroskobu aracılığı ile apopitozisde meydana gelen morfolojik değişiklikler gözlemlenebilir. Elektron mikroskobu ile değerlendirme apoptoziste en değerli yöntem ("gold standard") olarak düşünülmektedir. Mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nukleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı, nukleus fragmentasyonu gibi hücre içi detaylar da incelenebilir (Alison ve Sarraf 1992).

Hematoksilen ile boyanan ve hücre içerisinde yer alan yoğunlaşmış nükleus ve apoptotik cisimlerin gösterilmesinde ışık mikroskobu kullanılır. Işık mikroskobu, apoptotik hücreleri saptamada zayıftır. Ayrıca floresan maddelerin kullanımı ile ışık mikroskobunun gücü arttırılabilir. Hoechst 33258, DAPI gibi floresan boyalar çekirdekteki değişiklikleri belirlemek için kullanılabilir. Bu mikroskobik teknikler sadece apopitozisin geç dönemlerini tespit edebilmek için kullanılırlar ve çok sayıdaki örneğin gösterilmesinde yetersizdirler (Alison ve Sarraf 1992, Galluzi ve ark 2009).

İmmunohistokimyasal yöntemler

Anneksin V yöntemi:

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS

molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Bu moleküller floresan bir madde ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilir. Böylece apopitotik hücreler saptanmış olur (Galluzi ve ark 2009, Stadelmann ve Lassmann 2000).

TUNEL yöntemi:

Apopitozis çalışmalarında kullanılan yaygın bir testtir (Chohan ve ark 2006, Martins ve ark 2007, Moallem ve ark 2009). TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling) yöntemi, tek ya da çift zincir halindeki DNA kırıklarında, DNA'nın 3'-OH ucuna deoksinükleotidil transferaz (TdT)'ın spesifik olarak bağlanması prensibine dayanır (Jerome ve ark 2000). Histolojik kesitlerin proteolitiklerle muamelesinden sonra, DNA kırıklarının olduğu bölgelerde TdT, X-dUTP (X= biotin, floresan olabilir) ile birleşir. İşaretlenmiş hücrelerin ışık veya floresan mikroskobu, flow sitometri veya immünohistokimyasal yöntemlerle incelenebilmesini sağlar (Gavrieli ve ark 1992).

ISEL (In Situ End Labelling) Yöntemi:

TUNEL yönteminin modifikasyonu ile oluşturulmuştur. Bu yöntemde DNA kırıklarının 3' OH ucu deoksinükleotidil transferaz (TdT) yerine bu kez DNA polimeraz I ile işaretlenir. dUTP uçlarının tanınmasına imkan sağlayan biyotin veya floresan boya ile kompleks oluşturabilir. In situ end labelling (ISEL) yöntemi, TUNEL yöntemine göre daha az duyarlıdır ve daha fazla zaman alıcıdır (Huerta ve ark 2007).

M30 yöntemi:

Apopitozisde kaspazların en önemli substratlarından biri de hücre iskeletinde yer alan sitokeratin 18'dir. Sitokeratin 18 apoptozise giden hücrelerde yeni bir epitop oluşumuna neden olacak şekilde apoptozise özel bir pozisyonda kırılır. Oluşan yeni antijen kaspazla kırılmış sitokeratin 18 ya da M30 antijen olarak isimlendirilir. M30 antijen apoptotik hücrelerden salınarak seruma çıkabilir ve ELISA ile düzeyleri kolayca ölçülebilir (Demiray ve ark 2006, Ulukaya 2009).

Kaspaz-3 yöntemi:

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal metodla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apopitotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler (Overbeeke ve ark 1998).

Biyokimyasal Yöntemler

Agaroz jel elektroforezi:

Agaroz jel, orta büyüklükte ve büyük DNA moleküllerini elektroforezle ayırmak için en yaygın destek ortamıdır. En çok 50 kb'a kadar olan nükleik asitler agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılabilir. Agaroz konsantrasyonu ayarlanarak jelde moleküllerin hareket ettiği porların çapı değiştirilebilir. Jelin konsantrasyonu arttıkça, porların çapı küçülür. Böylece küçük DNA parçaları için yüksek, büyük DNA parçaları için ise düşük agaroz konsantrasyonları kullanılarak nükleik asitlerin en iyi şekilde ayrılmaları sağlanır (Güleş ve Eren 2008).

Agaroz jeller genellikle floresan bir boya olan ethidium bromide ile boyanır ve UV ışığı altında DNA parçaları görüntülenir. DNA'nin jelde görünür hale gelmesi, ethidium bromide'in DNA'nin iki zinciri arasına girerek 300 veya 360 nm dalga boyundaki ışığı soğurması sonucu floresan etki göstermesi ile gerçekleşir.

Apopitoziste endonükleaz aktivasyonu DNA'da, 180-200 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internükleozomal bölgelerden) parçalanmalara yol açar. Bunun sonucu agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekroziste görülmez. Bu nedenle apoptozisi nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (Cohen ve ark 1992).

Western blotting:

Bu metod yardımıyla apopitozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür. Sitokrom c'nin mitokondriden dışarı çıkıp çıkmadığı da bu metodla belirlenebilir (Krysko ve ark 2008).

Flow sitometri:

Flow sitometri yardımıyla floresan bir madde ile işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen herhangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozisin saptanmasında kullanışlı bir yöntemdir (Overbeeke ve ark 1998, Galluzi ve ark 2009).

İmmünolojik yöntemler

ELISA:

ELISA ile, kültürü yapılmış hücre populasyonlarında, hücre kültürü süpernatantlarında, serum ve plazmada DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (Huerta ve ark 2007, Galluzi ve ark 2009).

Flourimetrik yöntem:

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir (Krysko ve ark 2008).

Moleküler biyoloji yöntemleri

DNA microarrays:

DNA microarray teknolojisi moleküler biyoloji yöntemleriyle fizikokimya yöntemlerinin ilerlemesinin doğal bir sonucu olarak ortaya çıkan ve günümüzde halen gelişimi devam eden bir yöntemdir. En basit mikroarray mikroskop lamının

yüzeyine binlerce DNA molekülünün noktalar halinde değişik yöntemlerle sabitlenmesiyle oluşturulur. Daha sonra bu noktalara hibridizasyon yöntemiyle eklenen diğer DNA (bu DNA molekülü floresans veya radyoaktif maddelerle etiketlenmiştir) molekülünün belirli absorpsiyonlarda floresans yayma prensibine dayanmaktadır (Karaca ve Onus 2004). Aynı anda ve kısa bir süre içinde (önceden aylarca sürerken) yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA'larının) ve apopitozise özgü hücre yüzey ölüm reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı sunmaktadır ve henüz DNA parçalanmadan apopitozise gidecek hücreyi erken evrede gösterebilmektedir (Sato ve ark 2008).

1.6. Amaç

New (1978) tarafından bulunan kültür tekniği rat embriyosunun gebeliğin 9,5 ve 11,5 günleri arasında in vitro olarak takibi için oldukça elverişli olduğu için bu çalışmada kullanılmıştır. Bu çalışma ile, gebeliğin özellikle ilk döneminde yani ana organ taslaklarının geliştiği birinci trimestrda mide bulantısı ve kusma, vertigo veya migren tedavisi için kullanılan antiemetik ilaçlar dimenhidrinat, metoklopramid ve trimetobenzamid HCl'nin in vitro kültür ortamında memeli embriyosu gelişimine etkileri araştırıldı. Deneylerden elde edilen sonuçlar, rutinde kullanılan bu üç ilacın toksik ve teratojen etkilerinin karşılaştırılmasına olanak sağlayarak en güvenli kullanılabilecek ilacın tespitine de yardımcı olacak veriler sağlayacaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Embriyo Kültürü Aşamaları

2.1.1. Deney Hayvanlarının Seçimi ve Çiftleştirilmesi

Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi'nde 21ºC ortam ısısında ve 12 saatlik aydınlık / karanlık ortamında su ve besin gereksinimleri sağlanan, ağırlığı 150-200gr arasında değişen bir erkek ve bir dişi Wistar rat (Rattus Norvegicus) akşam saatlerinde çiftleşme kafesine konularak gece bir arada bırakıldı (Resim 2.1). Ertesi sabah dişi ratta vajinal smear yapıldı. Vajinal smear için bir pastör pipetine 0,5 ml serum fizyolojik çekildi ve yardımcı bir kişi tarafından smear yapılacak hayvan karnı yukarı bakacak şekilde sıkıca tutuldu. Pipet ucu vajinaya yerleştirildi ve serum fizyolojik içeri püskürtüldü. Pipet ucu hiç dışarı çıkarılmadan vajinaya püskürtülen sıvı, negatif basınç oluşturularak tekrar pipetin içine çekildi. Pipetle alınan sıvı temiz bir lamın üzerine alınıp, boyama yapmaksızın direkt lamel kapatılarak mikroskop altında incelendi. Pipetin ucuna takılan vajinal plak varlığı veya vajinal smearda sperm saptanması (Resim 2.2) ile çiftleşmenin gece yarısı civarında olduğu düşünülüp o günün öğle saati dişinin 0,5 günlük gebe olduğu varsayılarak dişiler ayrı bir kafese alınıp 9 gün optimum şartlarda tutuldular.



Resim 2.1. Çiftleşme için bir arada bırakılan erkek ve dişi ratlar.



Resim 2.2. Vajinal smearde spermlerin görüntüsü (X60 büyütme).

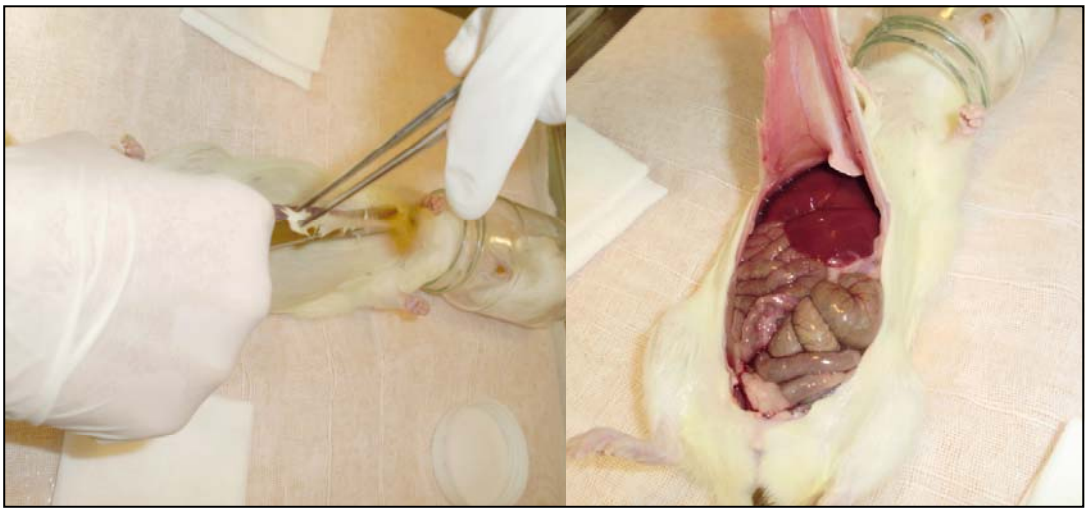
2.1.2. Serum Hazırlanması

Serum elde etmek için erkek ve/veya dişi Wistar ratlar özel olarak hazırlanan anestezi kutusunda dietil eter ile anestezi edildi (Resim 2.3). Göz kırpma refleksinin kaybolmasına bakılarak anestezinin tamamlandığına karar verildi. Daha sonra kutudan çıkartılıp sırt üstü yatırılan ratlarda anestezinin devamlılığını sağlayabilmek için dietil eter ile ıslatılmış gazlı bez konulmuş cam kavanoz içine hayvanın başı yerleştirildi. Anestezi altındaki ratın karın ön duvarı % 70'lik etanol ile silinerek tüylerin kontaminasyonu önlendi. Bunu takiben pubis üzerinden sternuma doğru orta hat boyunca deriye insizyon yapıldı. Her iki kaburga yayına doğru iki insizyon daha yapılarak karın ön duvarı derisi ve kasları V şeklinde kaldırıldı (Resim 2.4.a-b). Karın içi organlar steril spançlarla sağ tarafa yatırılarak abdominal aorta'nın bifurkasyosundan (çatallanma yerinden) steril bir enjektör ile maksimum düzeyde kan alındı (Resim 2.5). Alınan kan santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra pıhtılaşmasına izin verilmeden hemen 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Örneğin ağzı kapatılıp 30 dakika bekletildikten sonra, fibrin ile birlikte çöken proteinleri serbestleştirmek için steril forsepsler ile serum içindeki pıhtı sıkıldı. Örnekler tekrar 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, serum ayrılarak protein inaktivasyonu için (antijenik özelliklerini kaybettirmek amacıyla) 56ºC'lik su banyosunda 30 dakika bekletildi. Gelişebilecek olası enfeksiyonları önlemek amacıyla gram (+) bakteriler için kültür

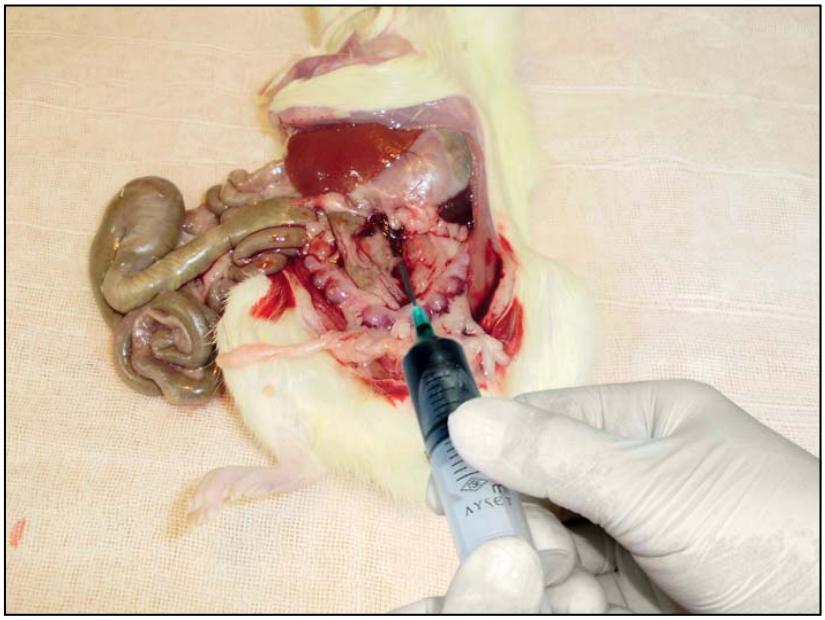
sıvısına penisilin (100 IU/ml) ve gram (-) bakteriler için de streptomisin (100µg/ml) eklenerek kültür ortamı hazırlandı. Hazırlanan serum -20ºC de dondurulup bekletilerek kullanılacağı zaman çıkarılıp su banyosunda 37ºC ye getirildi.



Resim 2.3. Ratların anestezi edildiği anestezi kabini ve sonrasında embriyoların eksplantasyonun yapıldığı çeker ocak.



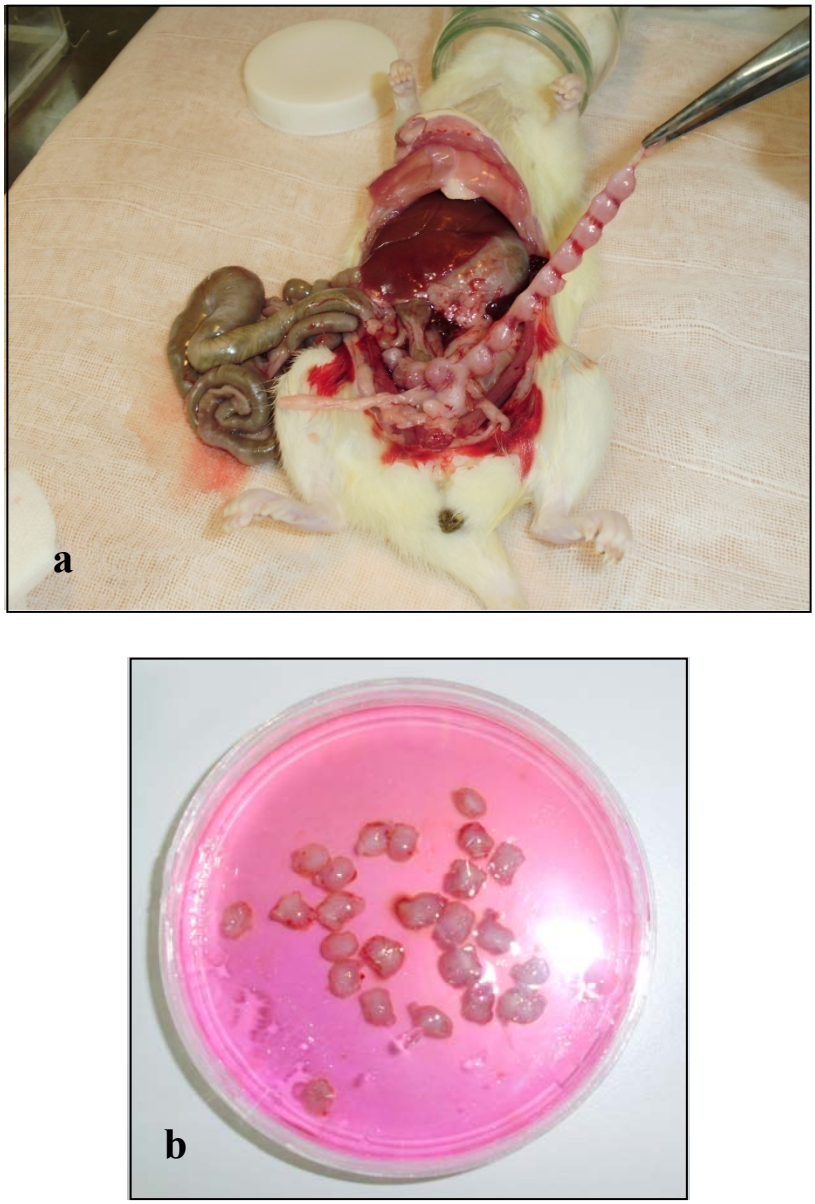
Resim 2.4. Anestezi altındaki ratlarda **a)** deri insizyonu ve **b)** karın ön duvarının açılması.



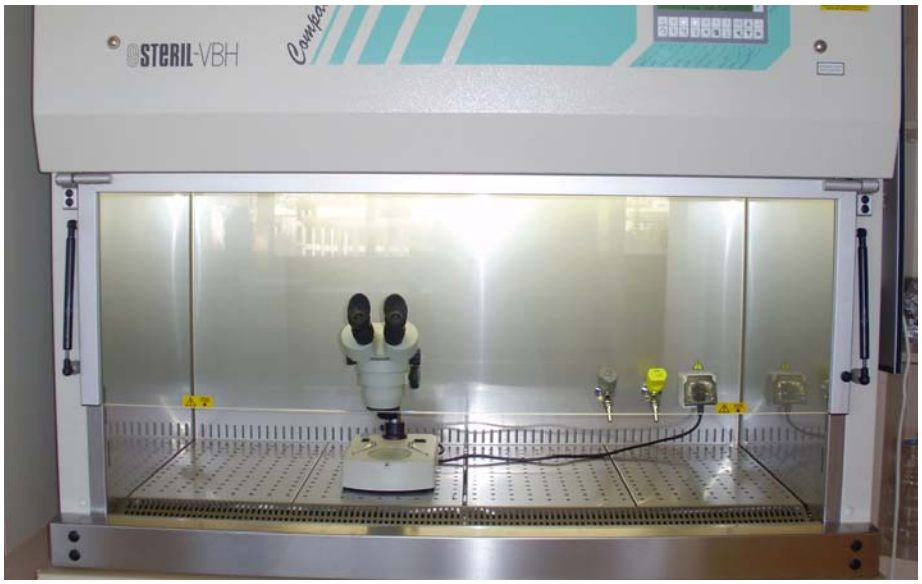
Resim 2.5. Ratlardan serum hazırlanmak üzere aorta abdominalis'in açılması ve bifurcatio aorta'dan kanın alınması.

2.1.3. Rat Embriyolarının (9,5 günlük) Eksplantasyonu

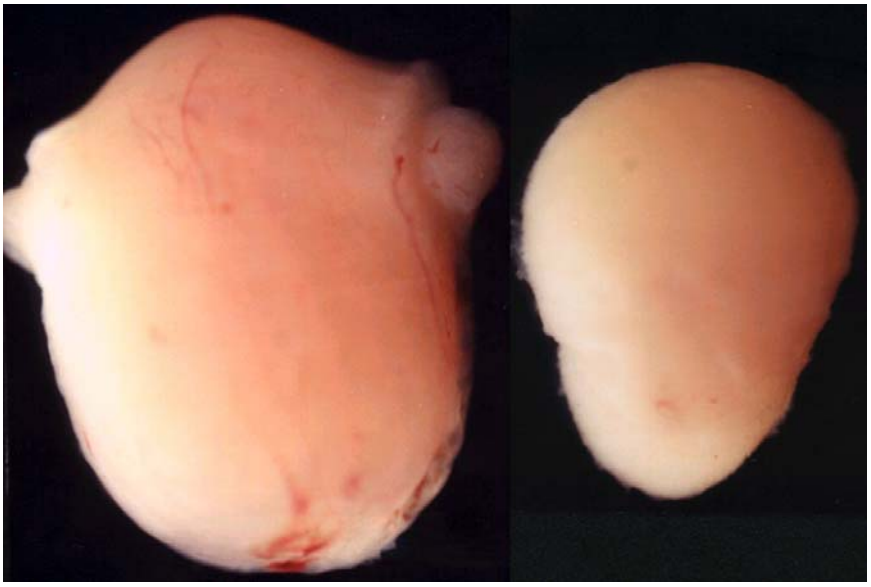
Gebeliklerinin 9,5 uncu gününde dişi ratların karın ön duvarı anestezi altında açılıp daha önce tarif edildiği şekilde kanları alınarak serum hazırlamada kullanıldı. Daha sonra içerisinde embriyo bulunan ve sayıları 8-15 arasında değişen keselerin oluşturduğu uterus diseke edilerek, bu keseler tek tek kesilip steril 37ºC Hanks dengeli tuz solüsyonu (Sigma, USA) içeren petri kaplarına alındı (Resim 2.6.a-b). Daha sonraki işlemler "lamin-air flow" kabin içerisinde ve mikroskop altında gerçekleştirildi (Resim 2.7). Burada steril "Jewellers" forseps kullanılarak uterus kas tabakası ve desidua çıkartılıp (Resim 2.8.a-b), desidua boylamasına ikiye ayrılarak bir yüzünde yerleşmiş olan ve bu aşamada sadece yaklaşık 1 mm boyundaki embriyoya zarar vermemeye özen gösterilerek alındı (Resim 2.9.a-b). Kemirgenlere has bir yapı olan ve uterus içerisinde antijenlere karşı bir bariyer özelliği taşıyan Reichert zarı da ayrılarak embriyo kültüre hazır hale getirildi (Resim 2.10.a-b, Resim 2.11). Bu işlemler uterus içerisindeki tüm embriyolar için tekrar edildi. Tüm embriyolar taze steril Hanks dengeli tuz solusyonu içeren başka bir petri kabına alındı. Biriken embriyolar sıraya dizilip hasarlanmış olanlar, gelişimi geri kalanlar ya da anormal görünümlü olduğu saptanan embriyolar çalışmaya dahil edilmedi.



Resim 2.6. a) 9,5 günlük gebe ratlardan uterus konseptuslarının disseke edilmesi, **b**) konseptusların steril Hanks dengeli tuz solüsyonu içeren petri kaplarına alınması.



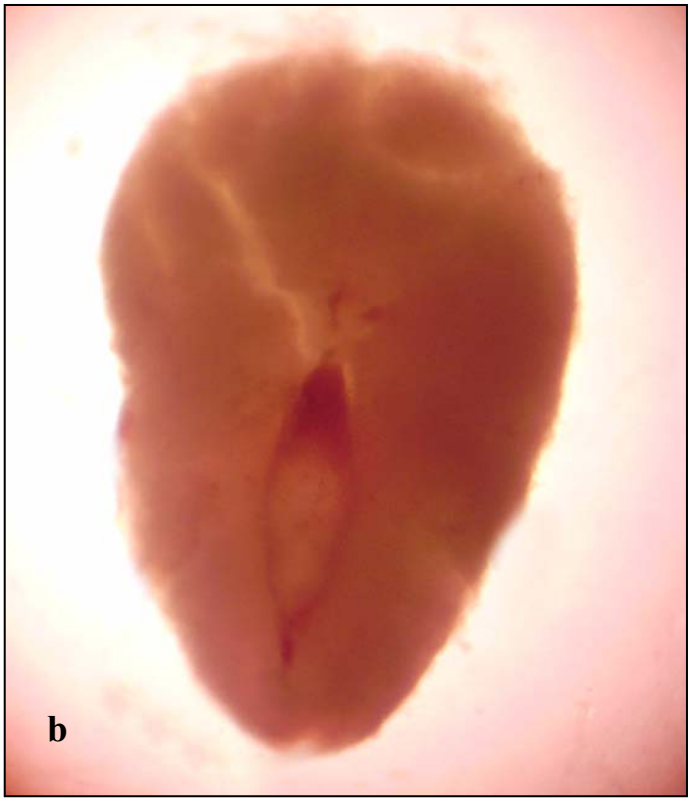
Resim 2.7. Embriyoların diseksiyonun yapıldığı Lamin-air flow kabin ve stereo mikroskop.



Resim 2.8. 9,5 günlük gebe ratlardan diseke edilen; **a)** uterus kas tabakası ile sarılı konseptus, **b)** kas tabakası uzaklaştırıldıktan sonra desiduanın görünümü (X20).

a)

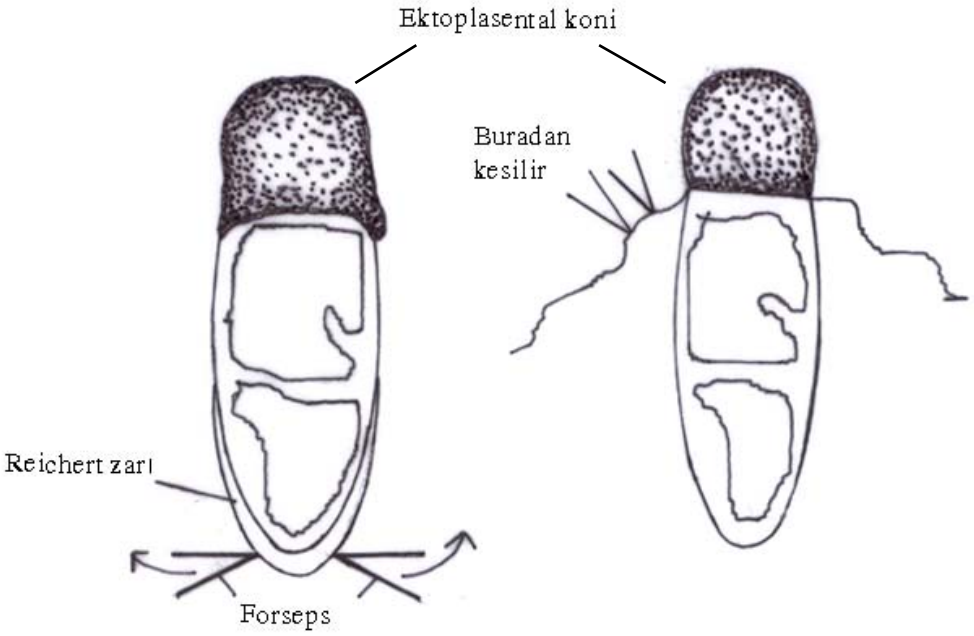




Resim 2.9. a) Desiduanın uzun ekseni boyunca ikiye ayrılması, **b)** Uzun ekseni boyunca ikiye ayrılmış desiduanın bir yüzünde yerleşmiş olan embriyo (X60).



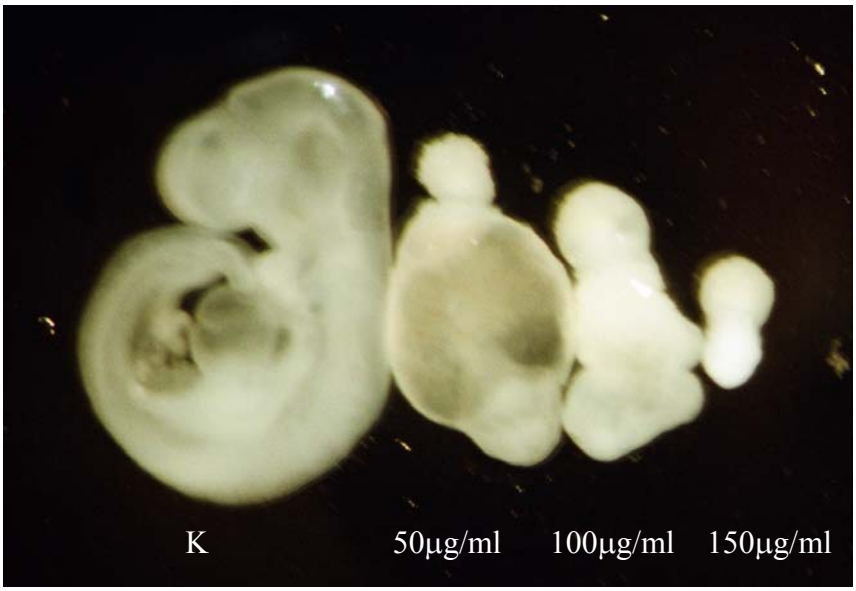
Resim 2.10. Gebe (9,5 günlük) ratlardan diseke edilmiş embriyoların: **a)** Reichert zarı görünümü, **b)** Reichert zarı ayrıldıktan sonraki görünümü (X60).



Resim 2.11. Gebe (9,5 günlük) ratlardan diseke edilmiş embriyolardan Reichert zarı'nın ayrılması (Şematik görünüm).

2.1.4. Rat Embriyolarının Kültürü

Kültür ortamı olarak; kontrol grubunda normal rat serumu kullanılırken, deney grupları için rat serumuna değişen konsantrasyonlarda dimenhidrinat (2.5µg/ml, 5µg/ml, 10µg/ml, 15µg/ml, 20µg/ml)**,** metoklopramid (10µg/ml, 20µg/ml, 30µg/ml, 40µg/ml, 50µg/ml) ve trimetobenzamid HCl (25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml, 100µg/ml) ilave edildi. Kontrol grubu ve her bir ilaç konsantrasyonu için en az 10 rat embriyosu kullanıldı. Deney gruplarında kullanılan ilaçların konsantrasyonları hesaplanırken öncelikle ilaçların plasental geçiş oranları araştırıldı. Bunlardan sadece metoklopramid'in plasental geçiş oranının term döneminde 0,63 olduğu (Arvela ve ark 1983) bilgisine ulaşıldı. Gebeliğin diğer dönemlerinde bu konuyla ilgili çalışma tespit edilemedi. Metoklopramid'in insan için kullanılan günlük maksimum dozu üzerinden rat için kullanılacak doz, rat-insan ağırlık oranına göre hesaplandı (1/500). Ardından plasental geçiş oranına göre kültürde embriyo başına kullanılacak ortalama ilaç dozu belirlendi. Elde edilen ortalama doza göre maksimum ve minimum dozlar tespit edildi. Dimenhidrinat ve trimetobenzamid HCl'nin ise plasental geçiş oranlarını bildiren herhangi bir çalışma tespit edilemediğinden, ilk olarak metoklopramid referans alınmak üzere embriyoların gelişmesini sağlayabilecek olan maksimum ve minimum dozlar tespit edildi. Dimenhidrinat için ilk olarak hesaplanan dozlarda (50µg/ml, 100µg/ml, 150µg/ml) ilaç ileri derecede toksisiteye neden olduğu için kültür sonrası skor yapılamadı ve dozlar düşürülerek deneyler tekrarlandı (Resim 2.12). Trimetobenzamid HCl için konsantrasyon optimizasyonu esnasında 125µg/ml ilaç kullanıldığında (maksimum dozun bir üst dozu) kültür ortamında gelişen embriyoların skor yapılamayacak özellikte olduğu saptandı. Bu nedenle trimetobenzamid HCl'de biri kontrol grubu ve dördü de deney grubu olmak üzere toplam beş grup ile çalışma yapıldı. Diğer iki ilaçta ise toplam altışar grupta deneyler gerçekleştirildi.



Resim 2.12. Dimenhidrinat'ın skor yapılmış kontrol grubu ve deneme dozlarında yolk sak içinde bulunan embriyolar (X18).

Eksplantasyonu takiben embriyolar 50 ml'lik steril cam şişelere 1 embriyo/1 ml serum olacak şekilde yerleştirilip şişenin ağzı plastik tıpa ile kapatılmadan önce New ve ark (1976b) ve New (1978)'in belirttikleri gibi %5 O_2, %5 CO_2, %90 N_2 içeren gaz karışımı ile 1 dakika süre ile gaz verildi ve böylece embriyoların oksijen gereksinimleri karşılanmış oldu. Ağzı kapatılan kültür şişeleri 37ºC sabit kabin ısısına sahip bir inkübatörde dakikada 30-40 devirle dönen tüpler üzerine yatay olarak yerleştirildi (Resim 2.13). 24 saat sonra embriyolara, oksijen konsantrasyonu %20'ye çıkarılıp azot içeriği %75'e düşürülen ve karbondioksit oranı sabit kalan gaz karışımıyla 1 dakika gaz verilerek yeniden inkübatöre konuldu. Embriyoların morfolojik değerlendirmelerinin yapılacağı son gün ise 40. saatte embriyolara oksijen konsantrasyonu %40'a çıkarılıp azot içeriği %55'e düşürülen gaz karışımı verilip, kültür süresi 48 saat olunca embriyolar büyüme ve gelişme açısından değerlendirilmek üzere steril Hanks dengeli tuz solusyonu içeren petri kabına kesik uçlu steril pasteur pipetlerle dikkatli bir şekilde aktarıldı.

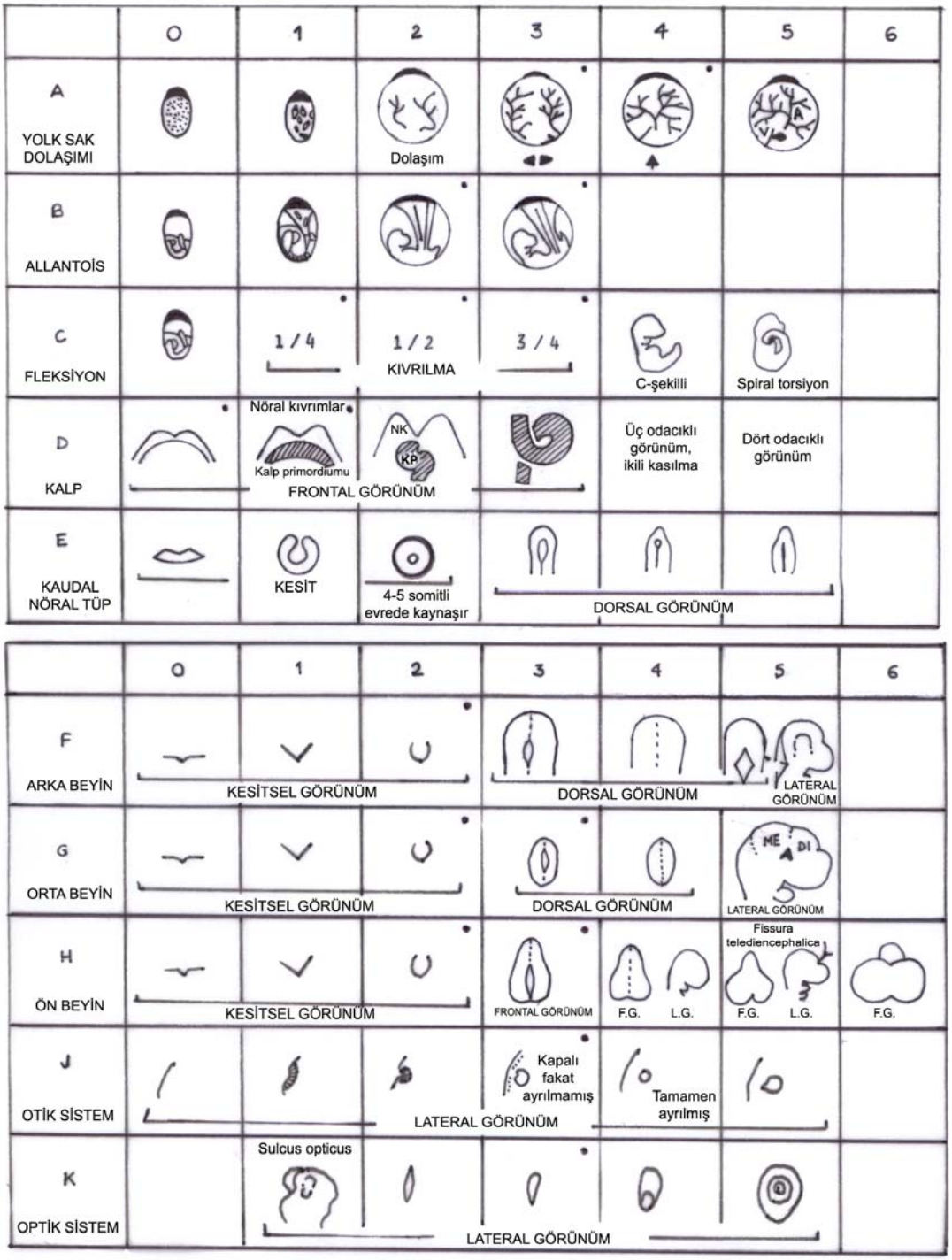


Resim 2.13. Kabin ısısı 37°C ye ayarlanan ve dakikada 30-40 devirle dönen tüplerden oluşan bir embriyo kültür cihazı.

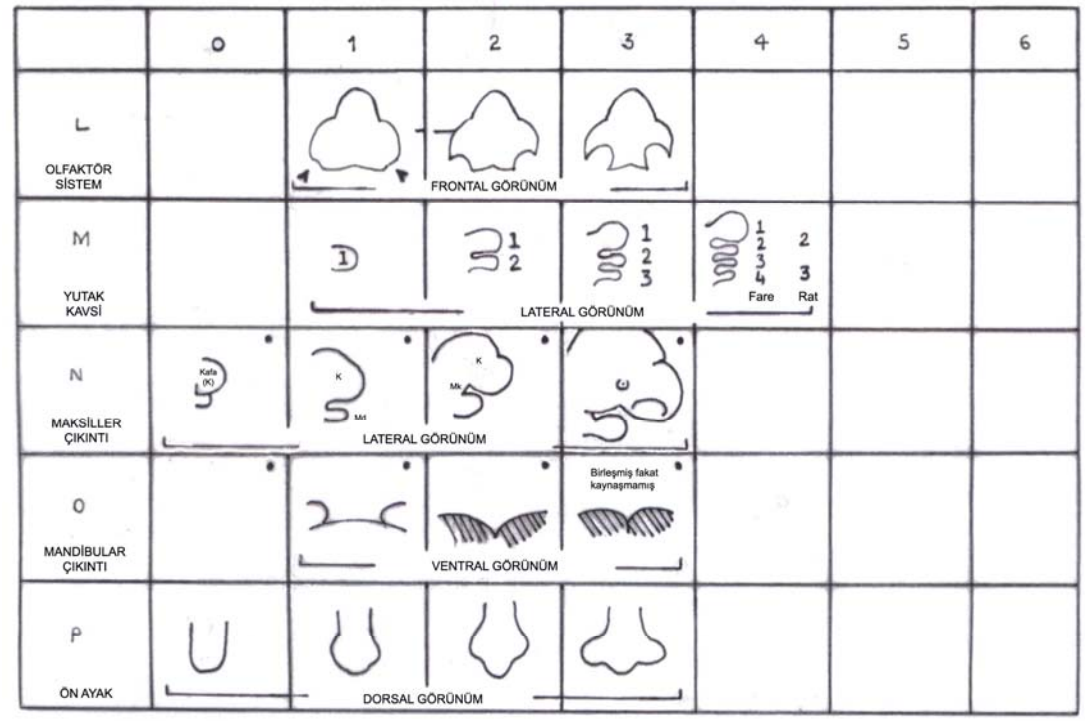
2.1.5. Morfolojik Değerlendirme

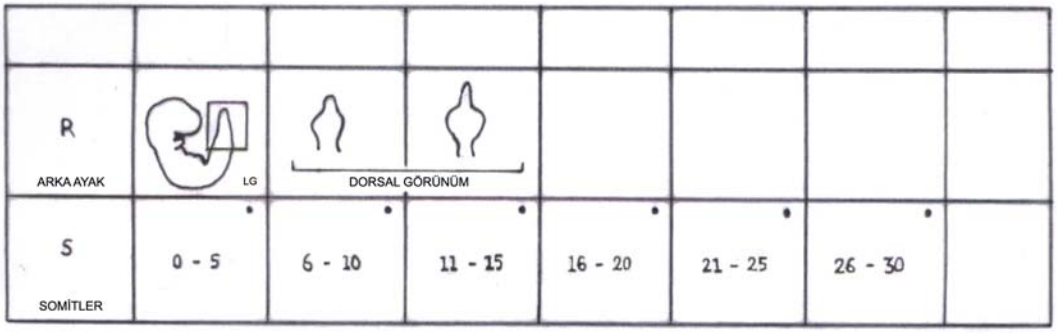
1981'de Brown ve Fabro tarafından yayınlanan ve 1990'da Van Maele Fabry tarafından geliştirilen bir sistem ile 11,5 günlük gebelik dönemine denk gelen 48 saatlik kültür sonrasında embriyolar morfolojik açıdan 17 parametre (Çizelge 2.1) ile mikroskop altında değerlendirildi. Bu sistemde her bir morfolojik parametre için 0 – 5 arasında bir sayısal skor verilerek değerlendirme yapıldı. Morfolojik parametreler; ortalama yolk sak çapı, yolk sak damarlanması (Resim 2.14), allantois gelişimi, embriyonun fleksiyonu, kalp gelişimi, nöral tüp kuyruk kısmının gelişimi, ön, orta ve arka beyin gelişimi, göz, kulak, burun ve yutak kavislerinin gelişimi, maxilla ve mandibula gelişimi, ön ve arka ekstremite tomurcuklarının gelişimi, tepe-kıç mesafesi ile somit sayısı değerlendirildi (Resim 2.15). Skorlama sırasında embriyolarda gözlenen anomaliler kaydedilerek görüntülendi.

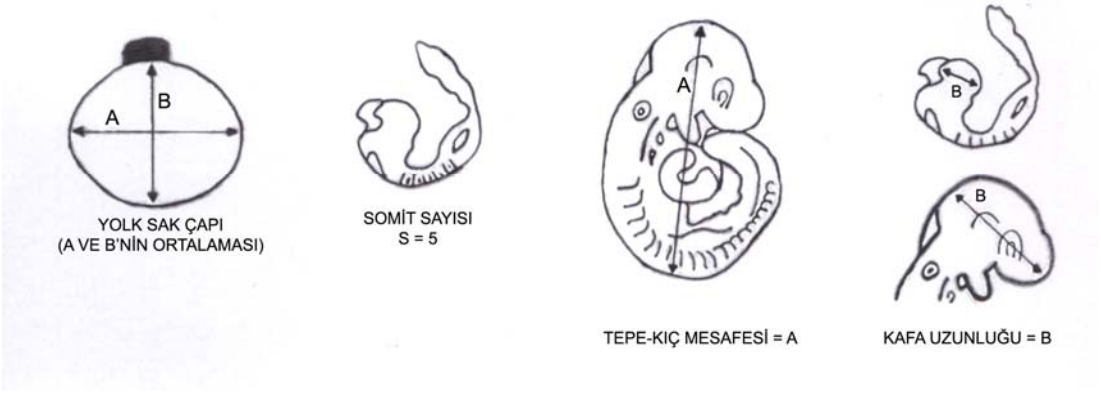
Çizelge 2.1. Morfolojik skorlamada kullanılan parametreler (Van Maele Fabry 1990).

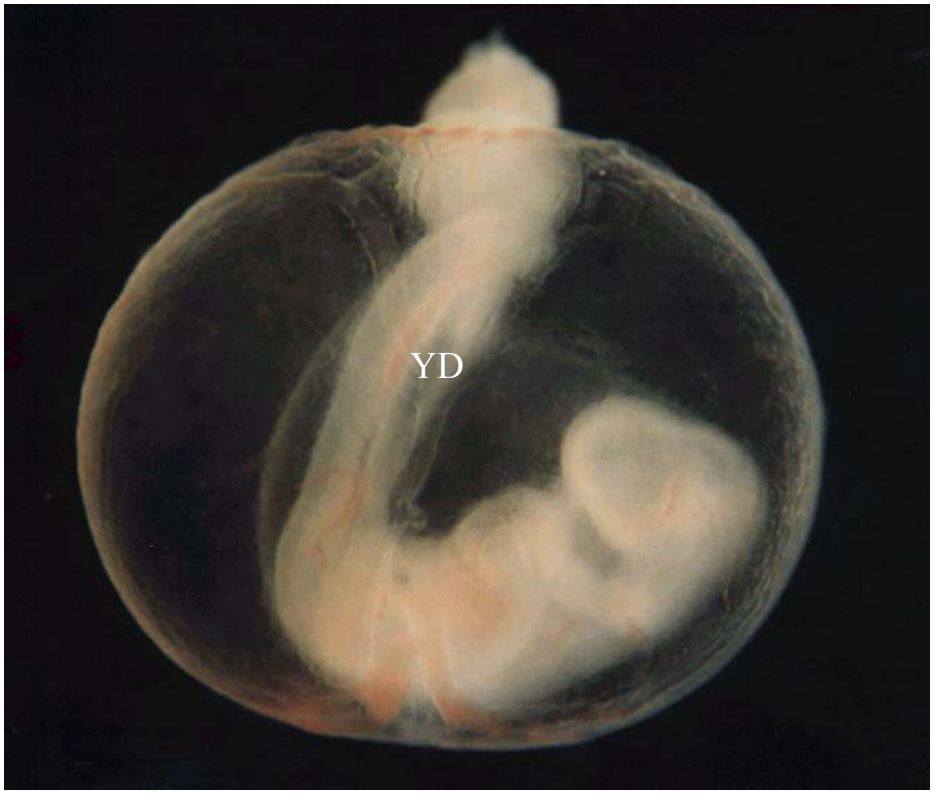


Çizelge 2.1. (Devamı) Morfolojik skorlamada kullanılan parametreler (Van Maele Fabry 1990).

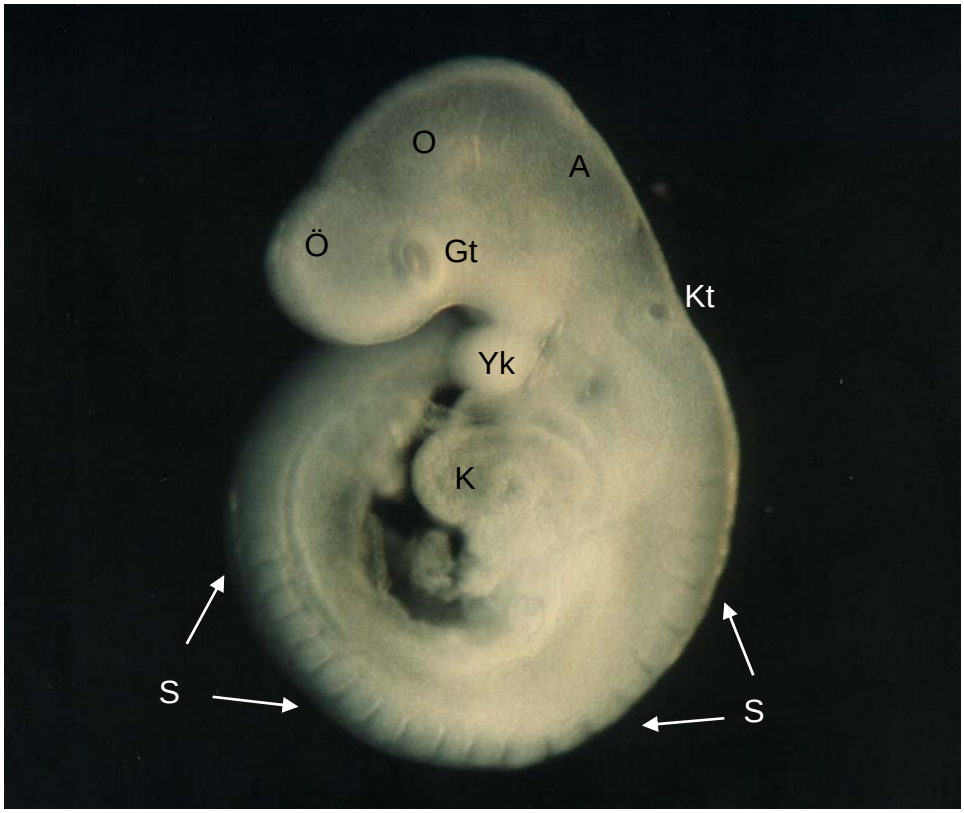








Resim 2.14. 11,5 günlük bir rat embriyosunun 48 saatlik kültürü sonrasındaki yolk sak ile çevrili görüntüsü (YD- Yolk sak damarları) (X25).



Resim 2.15. 11,5 günlük bir rat embriyosunun 48 saat in vitro kültürü takiben yolk sak kesesi ayrıldıktan sonra sol yan bakıdan görüntüsü. Ö- Ön beyin, O- Orta beyin, A- Arka beyin, Gt- Göz tomurcuğu, K- Kalp, Kt- kulak tomurcuğu, Yk- Yutak kavisleri, S- Somitler (X25)

Yolk sak damarlanması

Yolk sak embriyonel tabakalardan mesodermin iç katmanı ile endodermin dış katmanından meydana gelir. Fonksiyonel koryoallantoik plasenta oluşumundan önceki embriyo gelişiminin erken döneminde anne ile embriyo arasındaki alışverişin esas kaynağıdır. Yolk sak üzerindeki ilk dolaşım sistemi 10. günde kan adacıkları şeklinde görülür. Eğer yolk sak üzerinde kan adacıkları oluşmamış ise skor 0 olarak kaydedilir. Kan adacıkları, anjiyoblast adı verilen mezenşimal hücrelerin agregasyonu ile şekillenir. Her bir adacığın içerisinde pirimitif endotelyal hücrelerin çevrelediği bir boşluk meydana gelir ve içerisinde kan hücreleri oluşur. Kan adacıkları arasında anastomozlar oluşup, yolk sak etrafında taç şeklini oluşturmuşsa skor değeri 1'dir. Çok sayıda anastomoz oluştuğu zaman, ilk yolk sak damarları gözlenebilir ve vitellin damarlar aracılığı ile embriyonik dolaşım ile bağlantı başlar (skor 2). Bu aşamada vitellin arter ve venin orijini açıkça ayırt edilebilir. Vitellin arter ve venin orijini net olarak gözükür halde iken yolk sak damarları tam bir ağ oluşturuyorsa skorlamada 3 verilir. Vitellin ven, embriyoya baş kısmı yakınından

girer, vitellin arter ise kuyruk kısmına yakın olacak şekilde embriyodan ayrılır. Her iki vitellin damarın orijinleri birbirine yaklaşırsa skor 4 olarak kaydedilir. Eğer vitellin arter ile vitellin ven distalde birbirlerinden ayrılırsa skorlamada 5 olarak değerlendirilir (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Allantois gelişimi

Allantois, 8,5 günlük embriyonun kaudal ucunda ekstra-embriyonik mezodermin proliferasyonu sonucu oluşur. Allantois ekstra-embriyonik çölomdan koryona doğru gelişir (skor 0). Gebeliğin 9-10. gününde allantoisin vasküler mezodermi koryon ile birleşir (skor 1). Allantoiste iki rudimenter damar açığa çıkmış ise skorlamada 2 değeri verilir. Onbirinci güne gelindiğinde umblikal arterin önüne doğru yeni bir aortik orijinden vitellin arter şekillenir (skor 3) (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Embriyo fleksiyonu

Başlangıçta embriyo ventral tarafa doğru konvekstir (skor 0). Embriyonun posteriorunda 1/4'lük rotasyon oluştuğunda skorlamada 1 değeri verilir. Rotasyon 1/2 olacak şekilde baş ve kuyruk kısmında geliştiğinde skor 2 ve gövde kısmı da rotasyona katıldığında (3/4) skor 3 olarak değerlendirilir. Embriyoda rotasyon tamamlanıp C şeklini aldığında ve dorsal kısmı konveksleştiğinde skorlamada 4 değeri verilir. Embriyo fleksiyonu devam eder ve kuyruk tomurcuğu ön beynin arkasına doğru uzanıp, spiral şekil aldığında skor 5 olarak kaydedilir (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Kalp gelişimi

Endokardial kalıntı görülemiyorsa skor değeri 0 olarak kaydedilir. Kalp oluşumu kardiyojenik kord olarak bilinen iki zincirli mezenşimal hücre ile başlar, sonra bu kordun kanalize olması ile birlikte kalp tek tüp şeklini alır ve embriyonun ön ucunda mezodermin at nalı şeklinde kalınlaşması ile ilk kalp taslağı meydana gelir (skor 1). Oluşan tüp uzunluğu boyunca S şeklini alıp, kalp atmaya başlamışsa skorlamada 2 değeri verilir. Kalp büyümeye devam eder, katlanır ve kıvrımlı bir görünüm alır (skor 3). Yaklaşık olarak 11,5. günde kardiak sistem gelişir ve üç çemberli görünüm alır. Kardiak tüpte atriumlardan ventriküllere doğru ve

ventriküllerden de bulbusa doğru olmak üzere iki kasılma görüldüğünde skor değeri 4 olarak kaydedilir. Gelişme devam edip kalp 4 çemberli hale geldiğinde, sağ ve sol atrium belirginleşir ve skorlamada 5 verilir.

Kaudal nöral tüp gelişimi

Sinir sistemi nöral plak olarak bilinen embriyonik ektodermden gelişir (skor 0). Nöral plağın her iki tarafından içe doğru katlanmasıyla orta hat boyunca nöral oluk meydana gelir (skor 1). Nöral kıvrımların birleşmesi ile (9,5. günde) 4-5. somitler seviyesinde nöral tüp şekillenmeye başlar (skor 2). Nöral kıvrımlar orta hattan hem kaudal hem de kranial yöne doğru birleşmeye devam eder, anterior ve posterior nöroporlar oluşur (skor 3). Posterior nöropor küçük bir açıklık kalana kadar kapandığında skor 4 ve 11,5. günde açıklık tümden kapandığında skor 5 olarak kaydedilir (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Ön beyin gelişimi

Nöral plak aşamasında iken henüz prosencephalon görülmüyorsa skor 0 olarak kaydedilir. Prosencephalik kıvrımlar oluşup V şeklini aldığında skor 1 ve kıvrımların uçları birbirine yaklaşarak U şeklini aldığında skor 2 olarak değerlendirilir. Kıvrımlar önce kısmi olarak birleşir (skor 3) ve kıvrımların tamamen birleşmesi sonucu da prosencephalon oluşur (skor 4). Bu aşamada embriyoya lateralden bakıldığında başı koçbaşı şeklinde görülür. Lateral ventriküllerin genişlemesi sonucu telencephalon'da dışa doğru şişkinlikler oluşur (skor 5) ve lateral bakıda telencephalik fissür görülür hale gelir. Telencephalon hemisferleri genişlemeye devam eder ve ilkel beynin geri kalan kısmı da iyi gelişmiş olarak görülür hale geldiğinde de skor 6 olarak kaydedilir (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Orta beyin gelişimi

Orta ve arka beyin benzer bir gelişme seyri gösterir. Nöral plak aşamasında iken skor 0, mezensefalik nöral katlanmalar V şeklini aldığında skor 1 ve her iki uç birbirine yaklaşarak U şeklini aldığında da skor 2 olarak değerlendirilir. Daha sonra bu katlantılar kısmen kapanır (skor 3) ve tamamiyle kapanmasıyla da mesencephalon oluşur (skor 4). Prosencephalon, diencephalon (thalamus, epithalamus ve

hypothalamus'tan oluşan) ve telencephalon (serebral hemisferlerden oluşan) olmak üzere iki bölümden meydana gelir. Beyin gelişmeye devam eder ve mesencephalon ve diencephalon arasında yeni bir bölümün geliştiği görülür (skor 5) (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Arka beyin gelişimi

Beyin nöral tüpün anterior ucundan oluşur. Nöral kıvrımların kranial taraftaki birleşmesi sonucu başlıca 3 beyin vezikülü meydana gelir. Bunlar arka beyin (rhombencephalon), orta beyin (mesencephalon) ve ön beyin (prosencephalon)'dur. Arka beyin nöral kıvrımların iki şişkinliğinden şekillenir. Eğer değerlendirilen embriyoda sadece nöral plak var ise skor 0 olarak kaydedilir. Nöral kıvrımlar ilk olarak V şeklini alır (skor 1) ve daha sonra iki ucu birbirbirine yaklaşarak U şeklini alır (skor 2). Rombencephalon'un hiçbir bölgesinde birleşme yok ise skor 2'dir. Kıvrımlar birleşmeye başlayıp anterior nöropor oluştuğunda açıklık mevcut iken skorlamada 3 ve kapandığında ise 4 olarak değerlendirilir. 4. ventrikülün trasparan çatısı ile nöral tüpün pontin bölgesinde dorsal fleksiyon gelişir ve skorlamada 5 olarak kaydedilir (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Kulak gelişimi

Otik sistem iç kulak gelişimi ile kendini gösterir. Otik gelişim ile ilgili hiçbir işaret yok ise skor 0 olarak kaydedilir. Gebeliğin 9. gününde arka beynin alt kısmındaki ektodermin kalınlaşması sonucu, otik primordiumun çentik ya da yassılık şeklinde gözükmesiyle otik gelişim başlar (skor 1). Her bir otik primordium, şekillenen otik çukurun altındaki mezenşim içine doğru invagine olur (skor 2). Böylece epidermisten ayrılmadan otik vezikül kapanır (otosist) (skor 3). Gelişim sırasında otosist tamamen epidermisten ayrılır (skor 4). Recessus dorsalis ve ductus endolymphaticus gelişimiyle de skor 5 değeri verilir (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Göz gelişimi

Optik gelişime dair herhangi bir sinyal yok ise skor 0 olarak kaydedilir. Gebeliğin 9. günü civarında ön beyni oluşturacak olan nöral kıvrımların içinde bir çift oluk ortaya çıkar, bunlar sulcus opticus'lardır (skor 1). Nöral kıvrımlar,

prosencephalon'u olşturmak üzere birleştiğinde, nöral tüp içinde sulcus opticus'lar uzanır ve bu aşamada yüzeyden bakılınca optik primordium uzatılmış gibi görülür (skor 2). Sonunda ovalimsi bir şekil alır (skor 3). Sulcus opticus'lar üzerlerini kaplayan mezoderme doğru genişlerler ve optik veziküller oluşur. Ampül benzeri veziküller, yüzeyel ektoderme kadar uzanır. Bu aşamada optik sistem saydam görülür ve ventriküler sistemin dışında ince bir doku tabakası olarak ayırt edilir. Veziküllerin proksimal uçlarında daralma meydana gelir ve bu darlık veziküllerin içinde koyu renkli olarak görülür (skor 4). Optik vezikül ektoderm yüzeyine yaklaştığı zaman kimyasal ajanlar aracılığıyla lens oluşur (skor 5) (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Burun gelişimi

Olfaktör sistem gelişimine dair herhangi bir sinyal yok ise skor 0 olarak kaydedilir. 6-10 somitli aşamada olfaktör plak ortaya çıkar (skor 1), bu plakların üzerinde kenarlar görülür hale gelir (skor 2). Gelişim sırasında bu kenarlardan dağ sırası gibi farklı olfaktör yükseltileri oluşur (skor 3) (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Yutak kavislerinin gelişimi

Yutak kavisleri, baş ve boyundaki birçok yapıyı meydana getireceklerdir. Bunlar gelişen beynin aşağısında ve gelecekteki farinks duvarlarında şekillenirler. Yutak kavisleri, ektoderm tarafından kaplanan ve endoderm tarafından sınırlanan mezometrial kalınlaşmayla oluşur. Her bir kavis iskeletle ilgili, sinirlerle ilgili ve damarlarla ilgili elementler içermektedir. Krista nöralis hücreleri yutak kavislerine doğru göç ederler ve bunun sonucu olarak yutak kavisleri olarak bilinen şişkinlikler ortaya çıkar. Eğer hiçbir kavis görülmüyorsa skor 0 olarak kaydedilir. İlk ve en geniş yutak kavsi yaklaşık 9,5. günde ortaya çıkar (skor 1) ve bunu izleyen sırada diğer ikisi oluşur (skor 2 veya 3). İkinci kavis çok büyümüş ve üçüncüyü gizliyorsa skor 4 olarak değerlendirilir (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Maksilla gelişimi

Maksiller çıkıntı, birinci yutak kavsinden öne ve arkaya doğru şişkinliklerin oluşmasıyla gelişir. Maksiller çıkıntıya dair hiçbir iz yok ise skor 0 olarak kaydedilir.

Birinci yutak kavsi başın ön kısmından derin bir yarıkla ayrılmaya başlar (skor 1) ve maksiller çıkıntının ilk taslağı ortaya çıkar (skor 2). Mandibular çıkıntı ile ön beyin arasındaki yarık modifiye olup da maksiller taslak gelişir ve skor 3 olarak değerlendirilir (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Mandibula gelişimi

Mandibular çıkıntılar birinci yutak kavsinden gelişir ve 30 somitli aşamadan sonra birleşir. Morfolojik gelişim basamakları açık olarak erken embriyonik dönemde gözlenir. Eğer yutak kavsi görünmüyor ise skor 0 olarak kaydedilir. İlk olarak mandibular çıkıntının ön uçları birbirlerinden oldukça ayrıdır (skor 1), daha sonra bu uçlar birbirine değecek kadar yaklaşır (skor 2) ve birleşir (skor 3) (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Ön ekstremite tomurcuğunun gelişimi

Ön ekstremite tomurcuğunun gelişimine dair herhangi bir sinyal yok ise skor 0 olarak kaydedilir. Ön ekstremite tomurcuğu, Wolffian kristası üzerinde, 9-13. somitlerin karşısındaki mezoderm hücrelerinin proliferasyonu ile gelişmeye başlar (skor 1). Mesodermin proliferasyonu devam eder ve ayrı bir ekstremite tomurcuğu oluşur (skor 2). Ekstremite tomurcuğunun distal ucu yassılaşır ve pedal benzeri bir görünüm oluşur (skor 3) (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Arka ekstremite tomurcuğunun gelişimi

Arka ekstremite tomurcuğunun gelişimine dair herhangi bir sinyal yok ise skor 0 olarak kaydedilir. Arka ekstremite tomurcuğu, 26-30 somitli aşamada Wolffian kristasının dışa doğru farklı bir çıkıntı oluşturmasıyla gelişmeye başlar (skor 1). Proliferasyon devam eder ve sonunda arka ekstremite tomurcuğu meydana gelir (skor 2) (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

Somit gelişimi

Notokord ve nöral tüp oluştuğunda bunların her iki yanındaki intraembriyonik mezoderm prolifere olarak kalın ve longitudinal paraksiyel mezoderm kolonlarını oluşturur. Bu mezoderm farklılaşarak somit adı verilen kübik cisim çiftlerine

bölünmeye başlar. Bu somitler aksiyel iskeletin büyük kısmını, bununla ilişkili olan kaslar ve komşu derinin dermisini oluştururlar. İlk somit çifti notokordun kraniyal ucunun biraz kaudalinde belirir. Diğer çiftlerde sırasıyla kraniyokaudal yönde oluşur. Somit sayısı, farklılaşmayı değerlendirmek ve embriyo yaşını belirlemek için kullanışlı bir yoldur. Embriyo 0-5, 6-10, 11-15, 16-20, 21-25 ve 26-30 somitli hale geldiğinde sırasıyla 0-5 arasında skor değeri verilir (Van Maele Fabry 1990) (Çizelge 2.1).

2.2. DNA İzolasyonu

2.2.1. DNA İzolasyonu İçin Gerekli Solüsyonların Hazırlanması

Nüklei lizis buffer

10 mM Tris (Vivantis, Malaysia)……..…1.21 gr
400 mM NaCl (Merck, Germany)...…….……23.4 gr
2 mM Na_2EDTA (Vivantis, Malaysia)…….……0.7 gr

Distile su ile1lt'ye tamamlanır ve pH:8,2 olarak ayarlanarak +4°C'de saklandı.

Proteinaz K (Vivantis, Malaysia)…….……...20 mg/ml

%70'lik etanol

%96'lık etanol……..…73 ml
dH_2O…….……..100 ml'ye tamamlanır ve oda ısısında saklandı.

2.2.2. Embriyoların Toplanması ve Dokuların Parçalanması

Serum fizyolojik içerisinde saklanan embriyolardan her bir ilaç dozuna ait olanlar 12000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatantları pipet ile alınıp uzaklaştırıldı. Pellet olarak kalan embriyolar nüklei lizis buffer eklenerek ve pipetaj yapılarak tek bir ependorf tüpte birleştirildi. Boşaltılan tüpler ikinci defa santrifüj yapılarak son hacimde 500µl nüklei lizis buffer olacak şekilde yıkama yapılarak aynı tüp üzerine eklendi. Pipetaj ve vorteks yapıldıktan sonra her bir ependorf üzerine 15µl proteinaz K eklendi. Tüpler vorteks ile iyice karıştırıldıktan sonra 55°C'de bir

gece su banyosunda bekletildi. Örnekler su banyosundan alınıp vorteks ile karıştırılıp homojen hale getirildikten sonra üzerine 500µl kloroform eklendi ve tekrar vorteks ile karıştırıldı. Tüpler 13000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi ve üç ayrı faz oluşumu sağlandı.

2.2.3. DNA Presipitasyonu

DNA içeren üst tabakadaki şeffaf kısım alınarak ayrı bir ependorf içerisindeki 1 ml %96'lık alkolün üzerine eklendi ve alt üst edildikten sonra DNA yumak halinde görülür hale gelmesi sağlandı. 14000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilip alkol içerisindeki DNA'nın ependorfun dibine çökmesi sağlandı. Tüpler yavaşça ters çevrilerek süpernatantı uzaklaştırıldı.

2.2.4. DNA'nın Yıkanması

Pellet üzerine 400µl %70'lik alkol eklenip 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. %70'lik alkol ilave edilerek tüpün dibinde pellet şeklinde kalan DNA'nın kuruması için ependorf tüp ters çevrilip havada kurumaya bırakıldı.

2.2.5. DNA'nın Çözünmesi

Havada kurutulan DNA üzerine 100µl steril distile su ilave edilip vorteks ile karıştırıldı ve 37°C'de benmaride 10-15 dakika bekletilip DNA'nın tamamen homojenize olması sağlandı. Çözünen DNA örnekleri kullanılana kadar +4°C'de saklandı.

2.3. Jel Elektroforezi

2.3.1. Jel Elektroforezde Kullanılan Solusyonların Hazırlanması

50xTAE tamponu

Tris baz (Vivantis, Malaysia)…….……24,2 gr
Glasiel asetik asit (Merck, Germany) ……...5,71 gr
0,5 M EDTA (pH:8)…….…..10 ml
dH_2O…….……..100 ml'ye tamamlandı.

1xTAE tamponu

50x TAE tamponu ……10 ml
dH_2O …….……490 ml

0,5 M EDTA

EDTA $2H_2O$ ……..……...18,6 gr
dH_2O ……80 ml
NaCl …..……...……2 gr karıştırılıp ve NaOH ile pH:8'e ayarlandıktan sonra otoklavda steril edildi.

2.3.2. Jelin Hazırlanması ve Örneklerin Jele Yüklenmesi

%2'lik agaroz jelin hazırlanması

Agaroz (Sigma, USA)……..2 gr
1xTAE (Tris, Asetik asit ve EDTA)…….…...100 ml

Elde edilen DNA örneklerini fragmentasyon bakımından değerlendirmek için agaroz TAE içerisinde mikrodalga fırında eritilip, 720W'da 3 dakika kaynatıldı. Daha sonra jelin sıcaklığı 50°C'ye kadar düşürüldükten sonra üzerine 30µl ethidium bromür (Sigma, USA) ilave edilip homojen hale getirildi. Kenarları kapatılmış submarine üzerine kuyucukları oluşturmak üzere ilk olarak taraklar yerleştirildi ve jel döküldü. Jel oda ısısında, çeker ocak içinde katılaştıktan sonra kullanılana kadar +4°C'de saklandı.

Örneklerin jele yüklenmesi

6x yükleme boyası (Vivantis, Malaysia)……...4µl
DNA ……..……..20µl

Jel üzerinden taraklar dikkatlice uzaklaştırılarak kuyucuklar oluşturuldu, jel elektroforez tankına geçirildi. Elde edilen DNA örneklerini eşit konsantrasyonlarda yüklemek için ve 260/280 nm UV'de kalitesini ölçmek için Nanodrop ND-1000 ile miktar tayini yapıldı. Belirli ilaç dozlarında kültüre edilen embriyolardan elde edilen DNA örnekleri yükleme boyası ile karıştırılıp jel kuyucuklarına yüklendi. Gözlenen

bantların büyüklüğünü tespit etmek için, 100 bç'lik marker (Vivantis, Malaysia) kullanıldı.

Örneklerin jelde yürütülmesi

Örnekler jelde 100 volt'da 15 dakika elektrik akımı altında yürütüldü.

Görüntüleme

Jel, UV görüntüleme cihazı altında değerlendirildi ve fotoğraflandı.

2.4. İstatistik

Kültür sonrası yapılan morfolojik değerlendirmede elde edilen toplam morfolojik skor ve somit sayısı normal dağılım göstermediği için non-parametrik Kruskal Wallis ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel analizler SPSS version 15.0 (Inc, Chicago, Illinois, USA)'da yapıldı. Verilerde önemli bir fark bulunduğunda, farkın nerede olduğunu göstermek için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Yolk sak çapı, Tepe kıç mesafesi gibi diğer iki büyüme değişkeni ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan's test ile değerlendirildi. Deney ve kontrol grupları arasındaki malformasyon insidansı Fisher's Exact test ile karşılaştırıldı. $P<0,05$; $P<0,01$ ve $P<0,001$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Her bir ilaç için yapılan deneylerde bütün kontrol grubu embriyoları normal gelişim gösterdiler. Değişen konsantrasyonlardaki antiemetik grubu ilaçlarda kültüre edilen embriyolar ile kontrol grubu embriyoları karşılaştırıldığında, deney gruplarında kullanılan antiemetiklerin bütün gelişimsel parametrelerde (toplam morfolojik skor, somit sayısı, tepe kıç uzunluğu ve yolk sak çapı) doza bağlı olarak gelişimsel gerilemeye neden olduğu tespit edildi. Özellikle trimetobenzamid HCl ve dimenhidrinat'ın, metoklopramide göre daha fazla gelişimsel toksisiteye neden olduğu gözlenirken, trimetobenzamid HCl'nin daha fazla anomaliye neden olduğu saptandı.

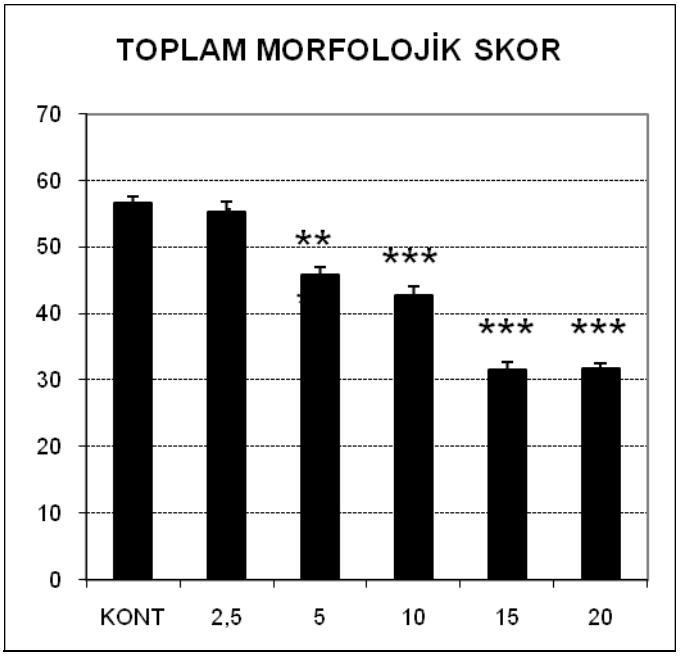
3.1. Dimenhidrinat'a Ait Bulgular

Dimenhidrinat ile kültüre edilen embriyolar, kontrol grubu embriyoları ile karşılaştırıldığında, dimenhidrinat'ın doza bağlı olarak yüksek dozlarda gelişimsel toksisiteye neden olduğu gözlendi (Resim 3.1). Toplam morfolojik skor, yolk sak çapı ve tepe-kıç uzunluğunda ikinci dozdan (5µg/ml) itibaren (Grafik 3.1, 3.2, 3.3) ve somit sayısında da ilk dozdan (2,5µg/ml) başlayarak istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.01$ ve $P<0.001$) düzeyde gelişme geriliğine yol açtığı gösterildi (Grafik 3.4).

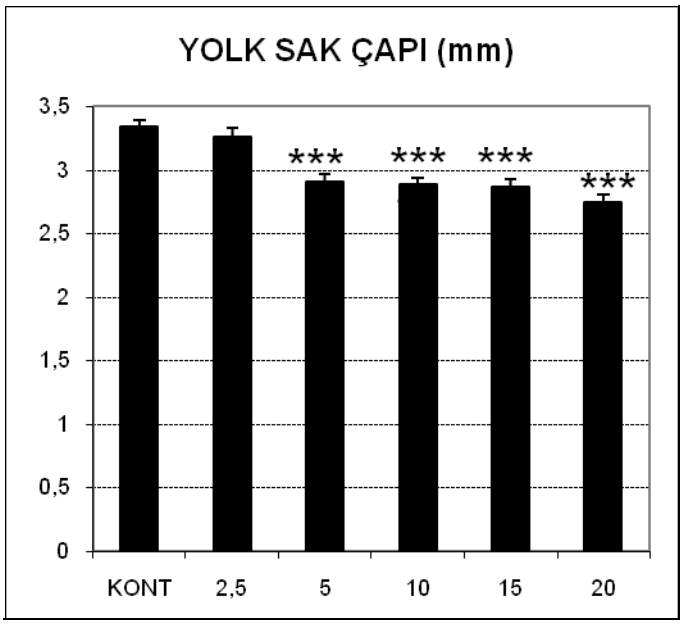
Morfolojik açıdan değerlendirildiğinde dimenhidrinat'ın 15µg/ml ve 20µg/ml dozlarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($P<0.001$) hematom (Resim 3.2.a) ve 5µg/ml, 10µg/ml ve 15µg/ml dozlarında da anlamlı derecede ($P<0.01$ ve $P<0.001$) mikrosefali (Resim 3.2.b) gözlendi. Ayrıca deney gruplarına ait bazı embriyolarda maksiller deformite (Resim 3.3.a), anormal fleksiyon (Resim 3.3.b), ödem (Resim 3.4.a) ve orta beyin deformitesi (Resim 3.4.b) tespit edildi (Çizelge 3.1).



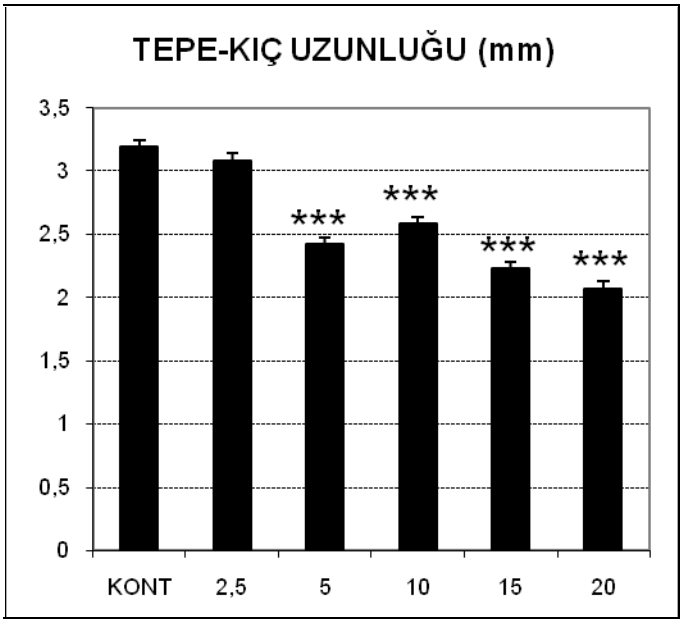
Resim 3.1. Rat serumuna eklenmiş, artan konsantrasyonlardaki Dimenhidrinat varlığında 11,5 günlük rat embriyolarının sağ lateral görüntüsü (X9).



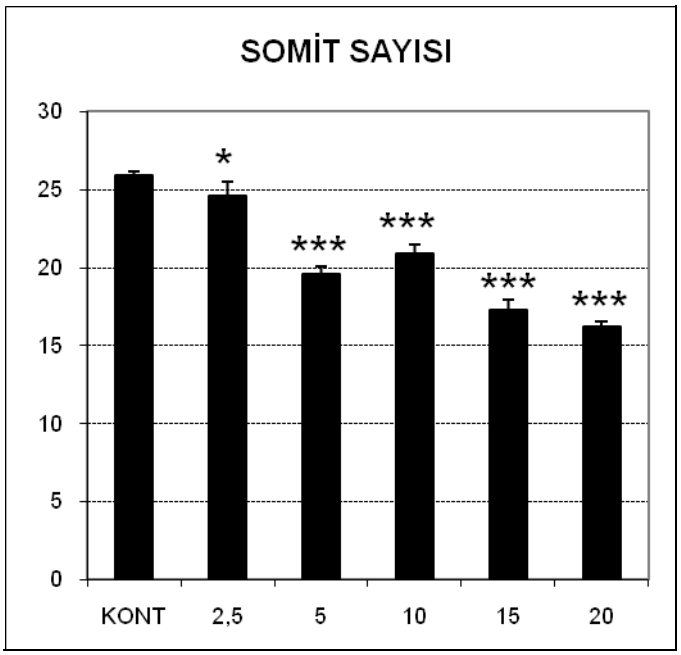
Grafik 3.1. Dimenhidrinat'ın toplam morfolojik skor üzerine etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. **, *** kontrol değerlerinden P<0.01, P<0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



Grafik 3.2. Dimenhidrinat'ın yolk sak çapı üzerine etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. *** kontrol değerlerinden P<0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



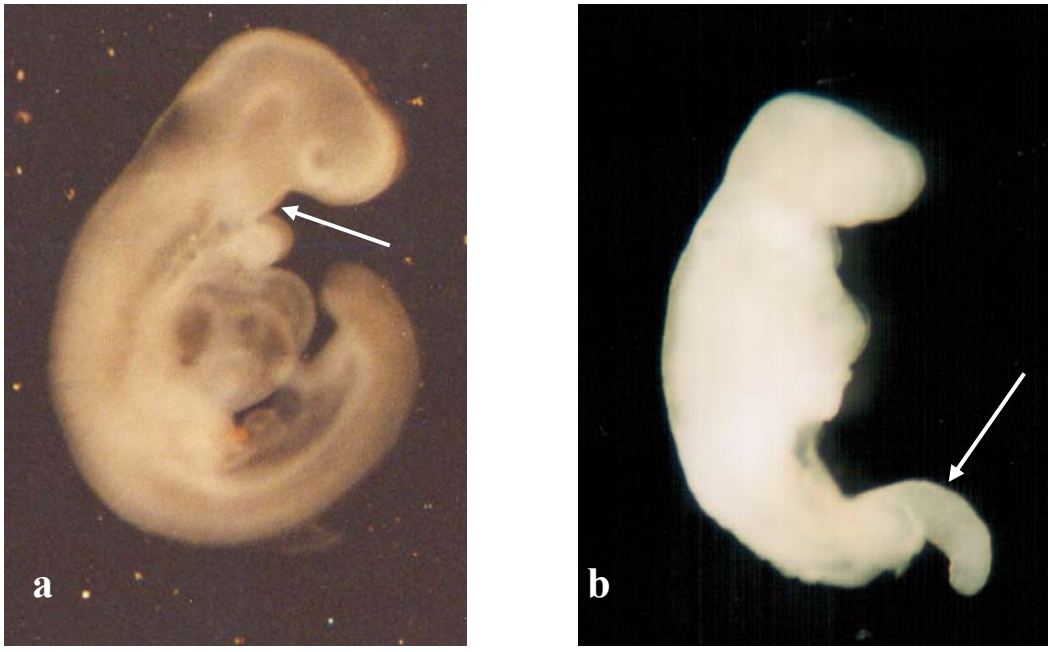
Grafik 3.3. Dimenhidrinat'ın tepe-kıç uzunluğu üzerine etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. *** kontrol değerlerinden P<0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



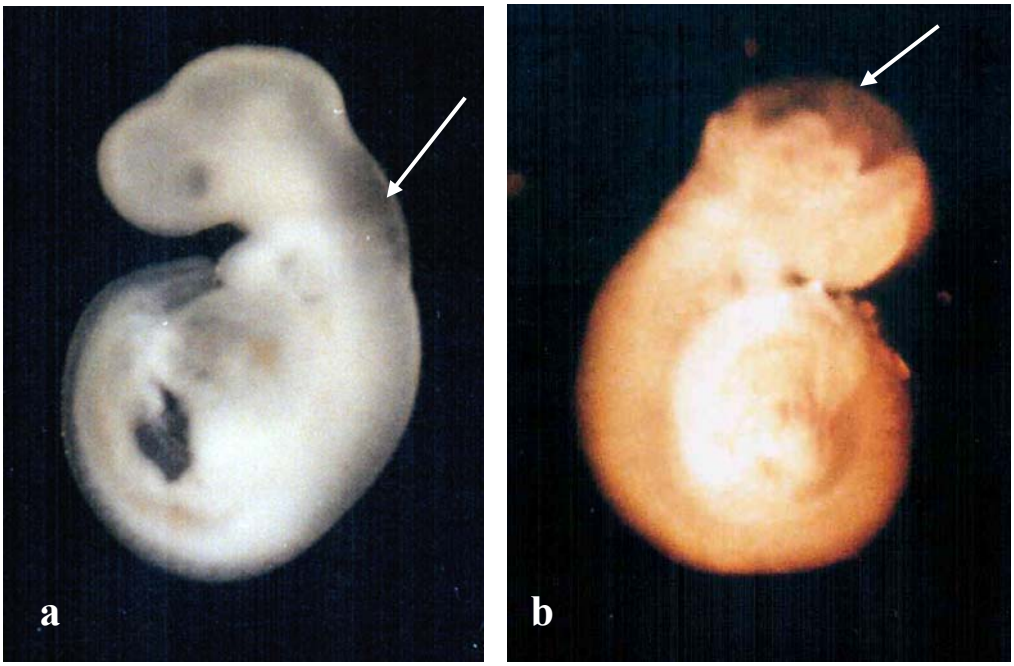
Grafik 3.4. Dimenhidrinat'ın somit sayısı üzerine etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. *, *** kontrol değerlerinden P<0.05, P<0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



Resim 3.2. **a)** 48 saatlik kültür sonrası değişik lokalizasyonlarda hematom gözlenen 11,5 günlük rat embriyosu, **b)** mikrosefali ve anormal fleksiyon bulunan embriyonun sağ lateral görüntüsü (X18).



Resim 3.3. a) Dimenhidrinat ile 48 saat kültür sonrası maksiller deformite gözlenen sağ lateral pozisyonda 11,5 günlük rat embriyosu (X18), **b)** Anormal fleksiyon gözlenen rat embriyosu (X20).



Resim 3.4. Dimenhidrinat ile kültüre edilen 11,5 günlük rat embriyosunda **a)** arka beyinde ödem, **b)** orta beyin deformitesi (X18).

Çizelge 3.1. Dimenhidrinat (2,5µg /ml, 5µg /ml, 10µg /ml, 15µg /ml ve 20µg /ml) ile 48 saat kültüre edilen 11,5 günlük rat embriyolarında inkübasyon sonrası saptanan anomalilerin tipleri ve sıklıkları.

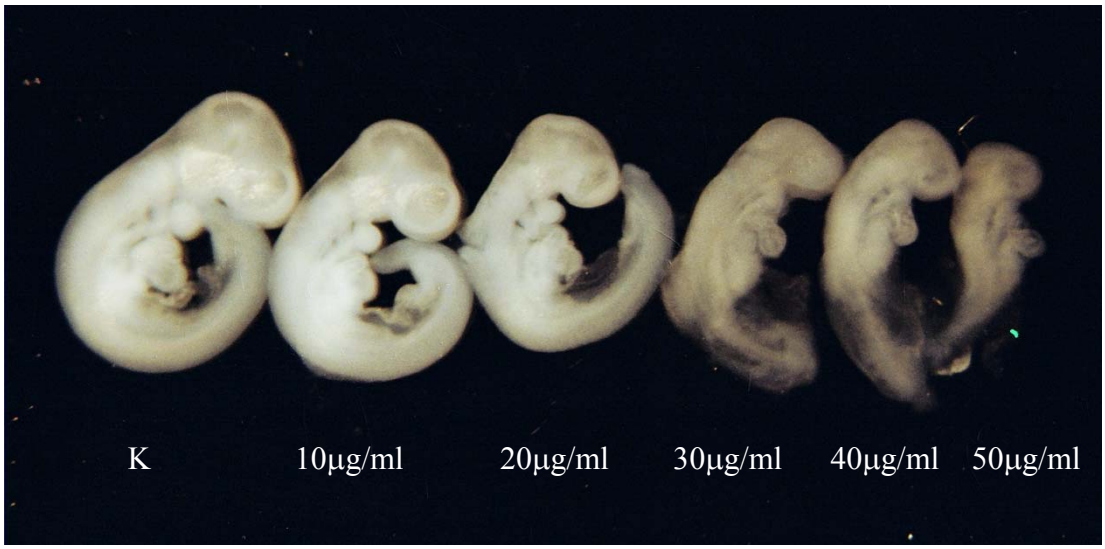
İnkübasyon	Hematom	Maksiller deformite	Anormal fleksiyon	Mikrosefali	Ödem	Orta beyin deformitesi
Kontrol	0/10 (%0)	0 (%0)	1 (%10)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Dimenhidrinat 2,5µg/ml	0/10 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
5µg/ml	1/10 (%10)	1 (%10)	0 (%0)	6 (%60) **	0 (%0)	0 (%0)
10µg/ml	1/10 (%10)	0 (%0)	1 (%10)	4 (%40) **	0 (%0)	0 (%0)
15µg/ml	10/10 (%100)***	0 (%0)	0 (%0)	8 (%80) ***	2 (%20)	0 (%0)
20µg/ml	10/10 (%100)***	0 (%0)	2 (%20)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%20)

*, **, *** Kontrol gruplarından P<0.05, P< 0.01, P< 0.001 de istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

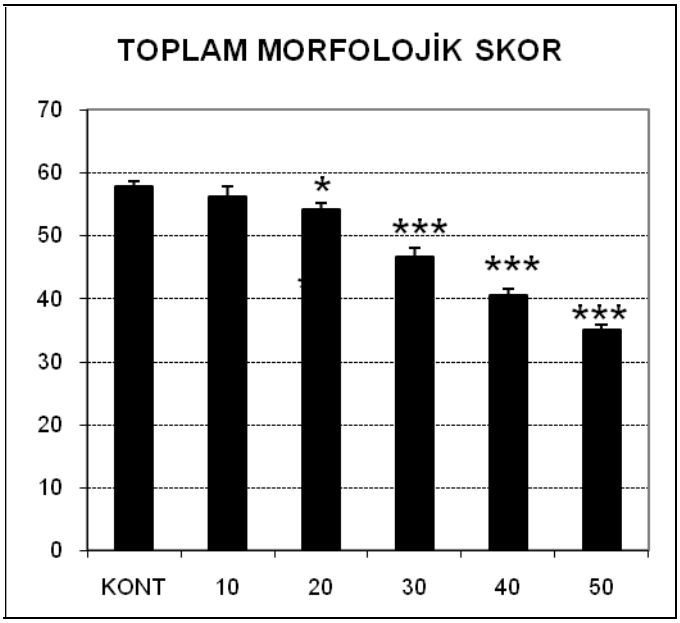
3.2. Metoklopramid'e Ait Bulgular

Kontrol grubu embriyoları ile metoklopramid (10µg/ml, 20µg/ml, 30µg/ml, 40µg/ml ve 50µg/ml) varlığında kültüre edilen embriyolar kıyaslandığında toplam morfolojik skor ve somit sayısında 20µg/ml'lık, yolk sak çapında ve tepe kıç uzunluğunda 30µg/ml'lık ilaç konsantrasyonundan itibaren istatistiksel açıdan anlamlı ölçüde toksisite tespit edildi ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$). Metoklopramid'in doza bağlı gelişimsel etkileri Resim 3.5 ve Grafik 3.5, 3.6, 3.7, 3.8'de gösterildi.

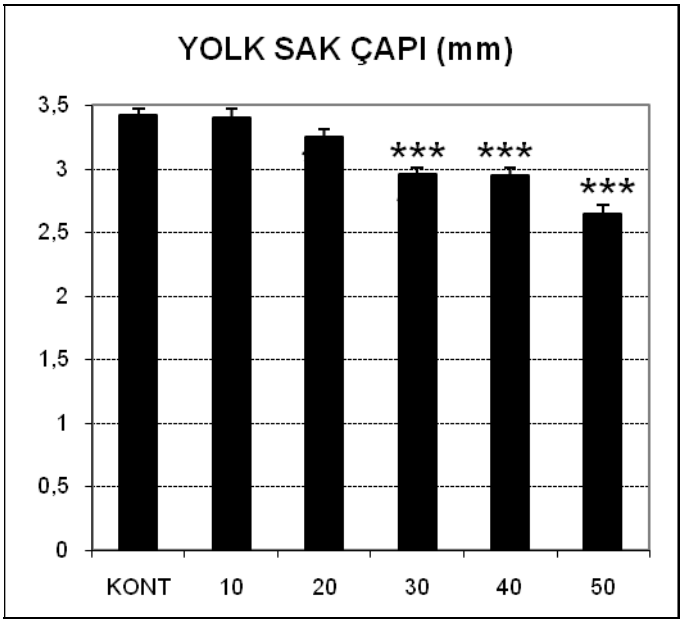
Yapılan morfolojik değerlendirmede metoklopramid'in istatistiksel olarak anlamlı düzeyde herhangi bir malformasyona neden olmadığı gözlendi. Kültür sonrası istatistiksel olarak anlamlı olmamakla beraber hematom, maksiller deformite, nöral tüp defekti, situs inversus (Resim 3.6) ve anormal fleksiyon gösteren embriyolar da tespit edildi. Metoklporamid'e ait morfolojik değişiklikler Çizelge 3.2'de belirtildi.



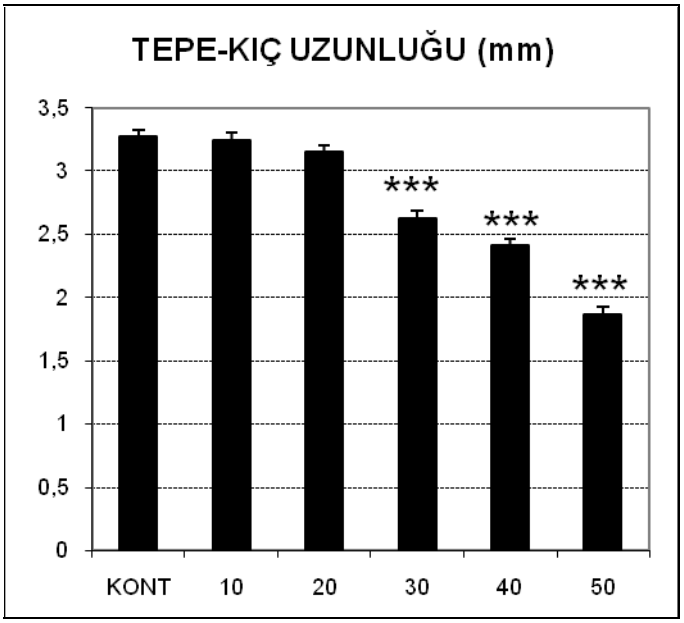
Resim 3.5. Rat serumuna eklenmiş artan konsantrasyonlardaki metoklporamid varlığında 48 saatlik kültür sonrasında 11,5 günlük rat embriyolarının sağ lateral görüntüsü (x10).



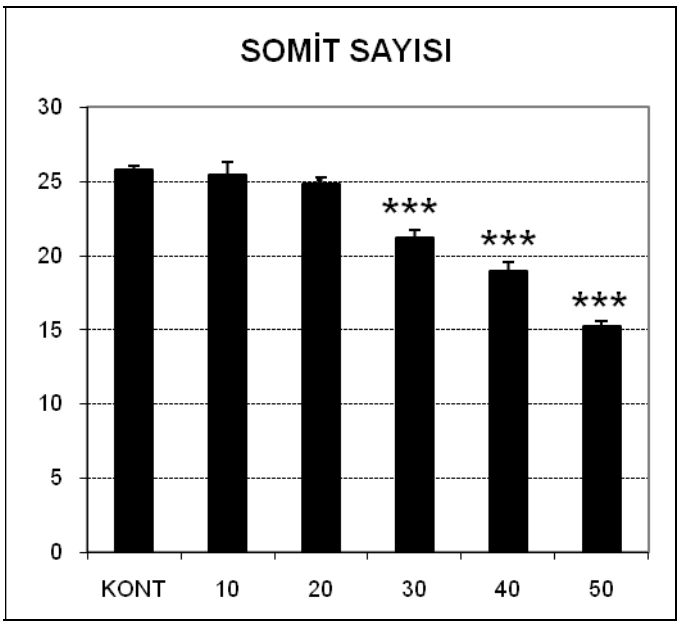
Grafik 3.5. Metoklopramid'in toplam morfolojik skor üzerine etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. *, *** kontrol değerlerinden P<0.05, P<0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



Grafik 3.6. Metoklopramid'in yolk sak çapı üzerine etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. *** kontrol değerlerinden P<0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



Grafik 3.7. Metoklopramid'in tepe-kıç uzunluğu üzerine etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. *** kontrol değerlerinden P< 0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



Grafik 3.8. Metoklopramid'in somit sayısı üzerine etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. *** kontrol değerlerinden P< 0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



Resim 3.6. Metoklopramid ile 48 saat kültüre edilen 11,5 günlük rat embriyosunda situs inversus (X18)

Çizelge 3.2. Metoklopramid (10µg/ml, 20µg/ml, 30µg/ml, 40µg/ml ve 50µg/ml) ile 48 saat kültüre edilen 11,5 günlük rat embriyolarında inkübasyon sonrası saptanan anomalilerin tipleri ve sıklıkları.

İnkübasyon	Hematom	Maksiller deformite	Nöral tüp defekti	Situs inversus	Anormal fleksiyon
Kontrol	0/10 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%10)	0 (%0)
Metoklopramid 10µg/ml	0/10 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
20µg/ml	0/10 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%10)	0 (%0)
30µg/ml	1/10 (%10)	1 (%10)	1 (%10)	1 (%10)	0 (%0)
40µg/ml	0/10 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
50µg/ml	0/10 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	1 (%10)	1 (%10)

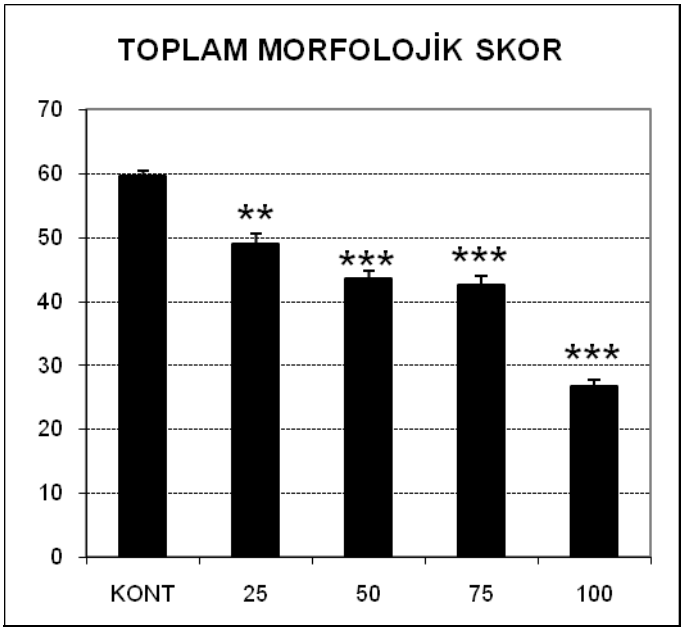
3.3. Trimetobenzamid HCl'e Ait Bulgular

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında trimetobenzamid HCl ile 48 saat kültüre edilmiş 11,5 günlük rat embriyolarında ilk dozdan (25µg/ml) itibaren tüm dozlarda tepe-kıç uzunluğunda, yolk sak çapında ve toplam morfolojik skorda doza bağlı olarak ve istatistiksel olarak anlamlı derecede büyüme ve gelişme geriliği gözlendi ($P<0.01$, $P<0.001$) (Resim 3.7). 50µg/ml ve 100µg/ml'lık trimetobenzamid HCl varlığında kültüre edilen embriyolar ise somit sayısında istatistiksel olarak anlamlı derecede gelişme geriliği tespit edildi ($P<0.01$, $P<0.001$) (Grafik 3.9, 3.10, 3.11, 3.12).

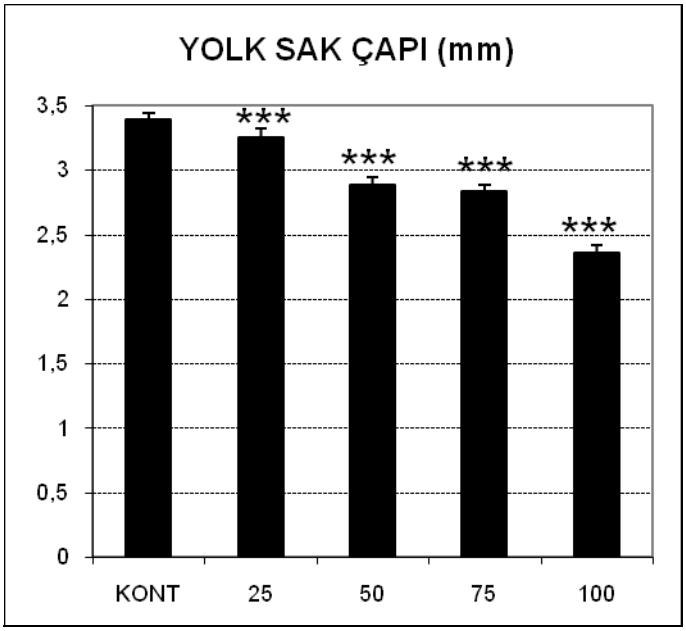
Trimetobenzamid HCl'nin uygulanan tüm dozlarında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($P<0.01$, $P<0.001$) hematom oluşumuna sebebiyet verdiği gözlendi (Resim 3.8.a,b,c). 75µg/ml ve 100µg/ml'lık dozlarında önemli ölçüde ($P<0.01$, $P<0.001$) nöral tüp açıklığı (Resim 3.9.a) ve anormal kuyruk fleksiyonu (Resim 3.9.b) meydana getirdiği gözlenirken, 50µg/ml ve 100µg/ml'lık ilaç dozlarında somit deformitesine ($P<0.01$) neden olduğu gözlendi (Resim 3.9.c). Ayrıca istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 50µg/ml ve üzerindeki tüm dozlarda maksiller deformiteye sebep olduğu tespit edildi. Doza bağlı gelişimsel deformiteler Çizelge 3.3'te gösterildi.



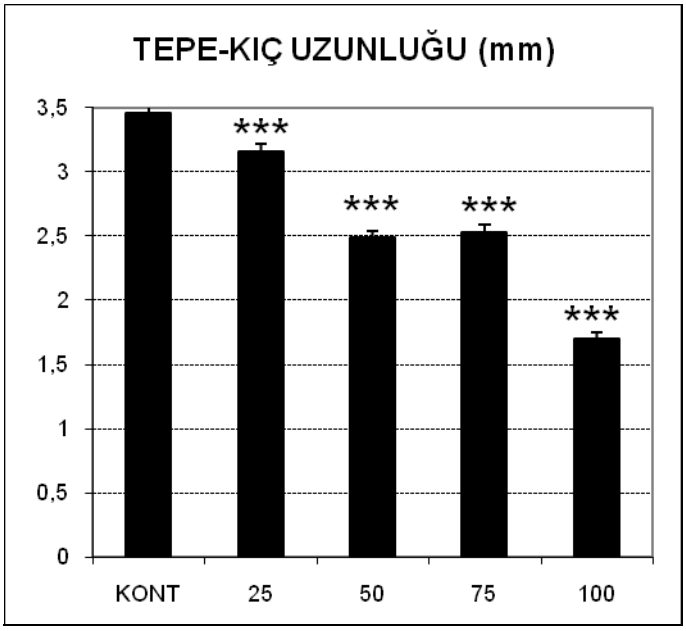
Resim 3.7. Rat serumuna eklenmiş, artan konsantrasyonlardaki Trimetobenzamid HCl varlığında 11,5 günlük rat embriyoların sağ lateral görüntüsü (x10)



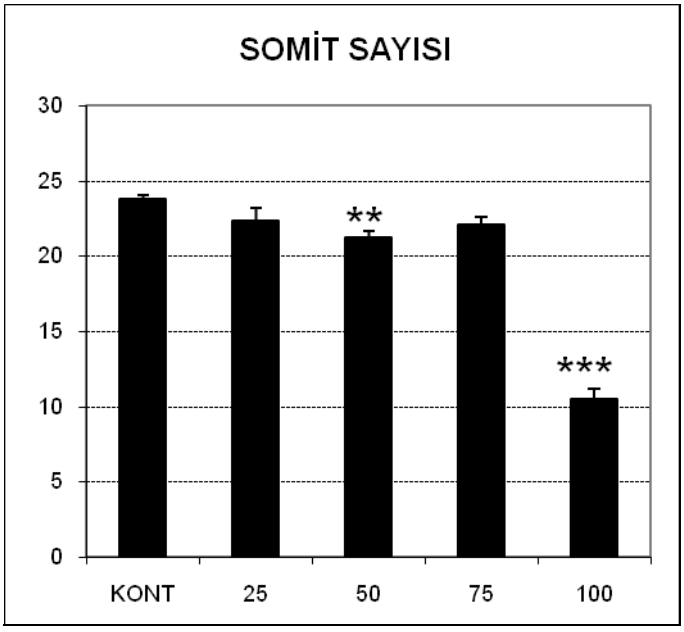
Grafik 3.9. Trimetobenzamid HCl'nin toplam morfolojik skor üzerine etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. **, *** kontrol değerlerinden P< 0.01, P< 0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



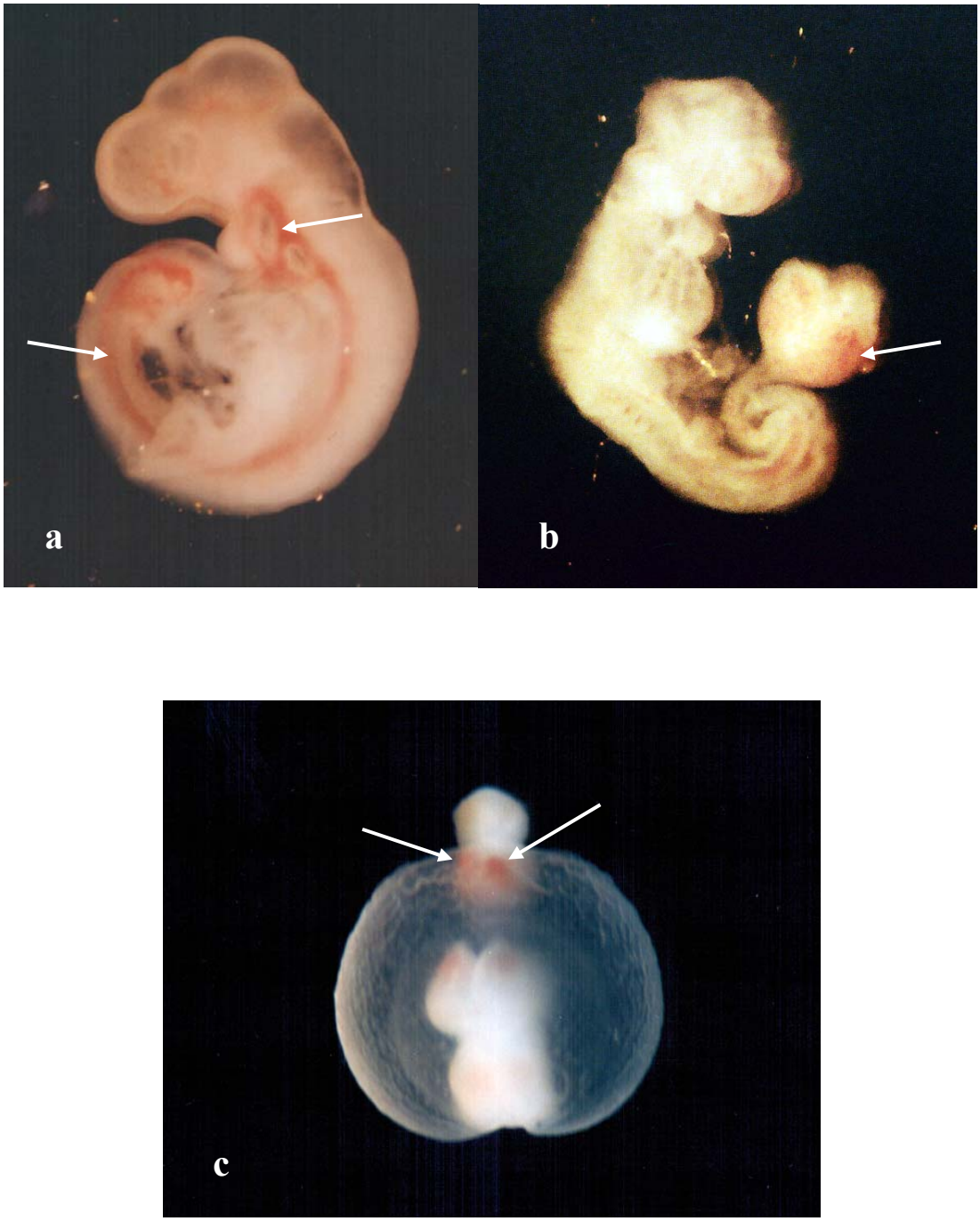
Grafik 3.10. Trimetobenzamid HCl'nin yolk sak çapı üzerine etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. *** kontrol değerlerinden P<0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



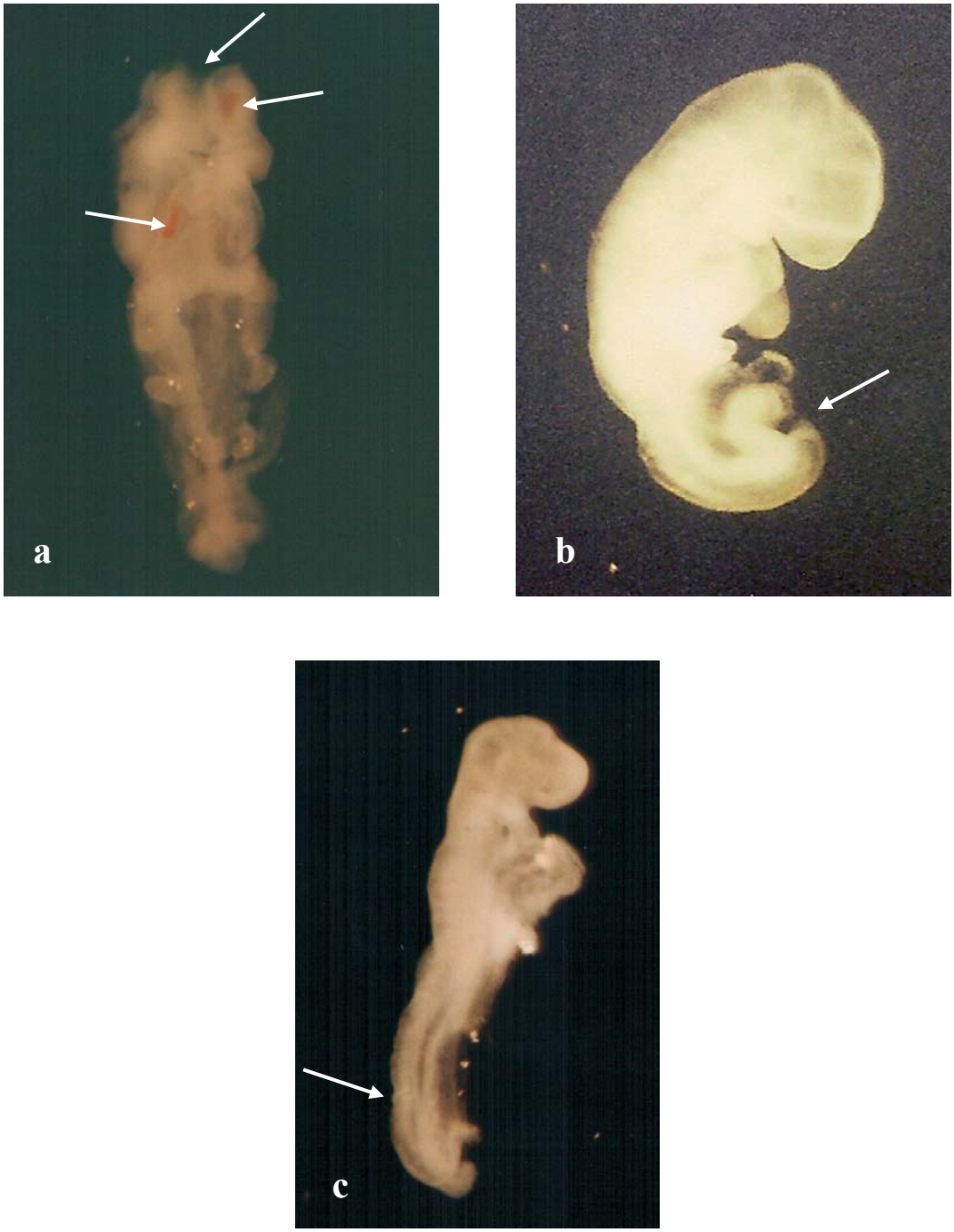
Grafik 3.11. Trimetobenzamid HCl'nin tepe-kıç uzunluğu üzerine doza bağlı etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. *** kontrol değerlerinden P< 0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



Grafik 3.12. Trimetobenzamid HCl'nin somit sayısı üzerine doz bağlı etkileri. (Değerler, ortalama ± standart hata olarak verilmiştir. **, *** kontrol değerlerinden P< 0.01, P< 0.001 de istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.)



Resim 3.8. Trimetobenzamid HCl ile kültüre edilen embriyolarda görülen hematomlar; **a)** embriyonun değişik bölgelerinde (X20), **b)** allantoiste (X20) ve **c)** yolk sakta (X10).



Resim 3.9. a) Kültür sonrası gelişme geriliği, nöral tüp kapanma defekti ve değişik lokalizasyonlarda hematom gözlenen frontal görünümde bir rat embriyosu, **b)** gelişme geriliği ve anormal kuyruk fleksiyonu görülen bir embriyo, **c)** somit deformitesi gözlenen rat embriyosu (X20).

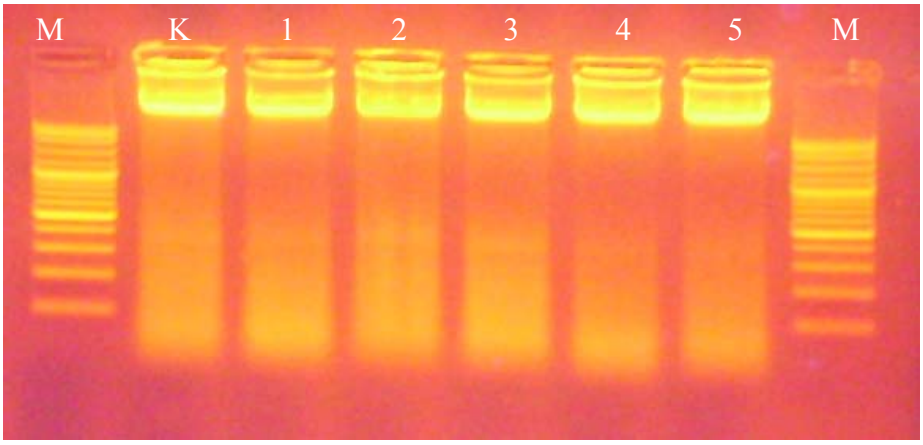
Çizelge 3.3. Trimetobenzamid HCl (25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml ve 100µg/ml) ile 48 saat kültüre edilen 11,5 günlük rat embriyolarında inkübasyon sonrası saptanan anomalilerin tipleri ve sıklıkları.

İnkübasyon	Hematom	Maksiller deformite	Nöral tüp defekti	Situs inversus	Anormal fleksiyon	Somit deformitesi
Kontrol	0/10 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Trimetobenzamid HCl 25µg/ml	6/10 (%60)**	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%20)	0 (%0)
50µg/ml	4/10 (%40)**	2 (%20)	0 (%0)	0 (%0)	2 (%20)	4 (%40)**
75µg/ml	9/10 (%90)***	2 (%20)	6 (%60)**	1 (%10)	4 (%40)**	0 (%0)
100µg/ml	8/10 (%80)***	2 (%20)	10 (%100)***	0 (%0)	5 (%50)**	6 (%60)**

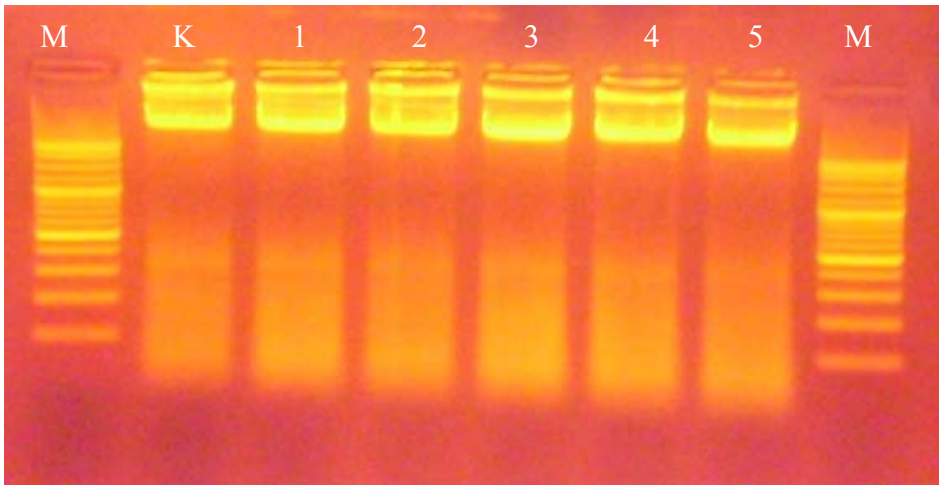
, * Kontrol gruplarından P< 0.01, P< 0.001 de istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterir.

3.4. Apopitozis Değerlendirmesi

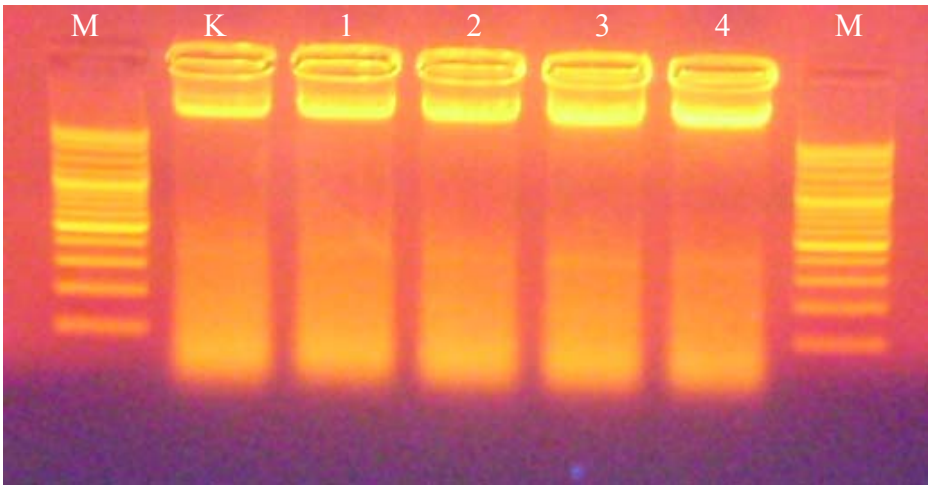
Morfolojik değerlendirmeleri tamamlanan embriyolordan elde edilen DNA'lar agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Yapılan değerlendirme sonucunda marker olarak kullanılan 100 baz çiftlik DNA parçaları jel üzerinde ayırt edilebilirken, bizim embriyolarımızdan elde ettiğimiz DNA'ların herhangi bir fragmentasyon görülmemesine karşılık merdivenleşme oluşturmadığı ve yayma (smear) şeklinde yürüdüğü gözlendi. Sonuçta her üç antiemetik ilacın da DNA fragmentasyonu oluşumunda kontrol ile deney grupları arasında fark olmadığı ve kullanılan dozlar arasında da fark olmadığı tespit edildi (Resim 3.10, 3.11, 3.12).



Resim 3.10. Dimenhidrinat ile kültüre edilmiş embriyo DNA'ları; M: marker, K: kontrol, 1-5. Kuyucuklar sırasıyla; 2,5µg /ml, 5µg /ml, 10µg /ml, 15µg /ml ve 20µg/ml'lik ilaç dozları.



Resim 3.11. Metoklopramid ile kültüre edilmiş embriyo DNA'ları; M: marker, K: kontrol, 1-5. Kuyucuklar sırasıyla; 10µg/ml, 20µg/ml, 30µg/ml, 40µg/ml ve 50µg/ml'lik ilaç dozları.



Resim 3.12. Trimetobenzamid HCl ile kültüre edilmiş embriyo DNA'ları; M: marker, K: kontrol, 1-4. Kuyucuklar sırasıyla; 25µg/ml, 50µg/ml, 75µg/ml ve 100µg/ml'lik ilaç dozları.

Eğer kullanılan antiemetikler DNA fragmentasyonu oluştursaydı, yani apopitozisi indükleseydi, agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü ya da deney grubundaki smear görüntüsü, kontrol grubundan farklı olarak gözlenecekti. Bu bulgu çalışmada kullanılan antiemetiklerin apopitozise etkisi olmadığını göstermektedir.

4. TARTIŞMA

Embriyo gelişiminin kritik dönemi olan organogenezis aşamasında anne adayının teratojenik ajanlara maruz kalması embriyoda çeşitli malformasyonlara ya da gelişimsel bozukluklara neden olmaktadır. Bu etkilerin görülebilmesi bireyin genetik yapısı ile çevresel etkenler arasındaki etkileşime bağlıdır. Teratojene verilen cevap, bu ajana maruz kalınan gelişim basamağına bağlıdır. Teratojenik ajana implantasyondan önce maruz kalınması, embriyonun ölümüne sebep olabilirken, daha geç evrelerde veya düşük dozlarda maruz kalınması, büyüme yavaşlaması veya fonksiyonel bozukluklar şeklinde kendini gösterebilir (Bailey ve ark 2005).

Teratojenik etki türün veya bireyin genetik yapısına, plasentanın özelliklerine, çevresel faktörlere, metabolik yollara ve ürünlerdeki farklılıklara bağlı olabilmektedir (Bailey ve ark 2005). İn vivo deneylerde hayvanlar için zararlı etki göstermeyen bir kimyasal ajan, insanlar için teratojenik olabilmektedir. Örneğin Talidomit, ratlar ve fareler için teratojen etki göstermezken tavşanlar ve insanlar için teratojeniktir (Webster ve ark 1997). Burada türler arası farklılıklar devreye girmektedir. Ancak in vitro embriyo kültüründe türe özgü koruyucu sistemler (örneğin kemirgenlere özgü Reichert zarının çıkarılması gibi) devre dışı bırakıldığından Talidomit'in teratojenik bir ajan olduğu rat embriyo kültür metodu ile de gösterilmiştir (Webster ve ark 1997).

Teratojenite gelişimi, teratojen ajanın dozajına bağlı olarak da değişmektedir. Teratojenik etki ancak ajan miktarının belirli bir eşik değerini aşması sonucu gözlenebilir. Her teratojenin bir eşik değeri bulunmaktadır. Bunun altındaki miktarlarda hiçbir etki gözlenmezken, eşik değer aşıldığında teratojenik etkiler doz ile doğru orantılı olarak artış gösterirler. Bu etkiler, çıplak gözle görülemeyecek durumlardan embriyonun ölümüne kadar değişik şekillerde olabilmektedir (Bailey ve ark 2005). Normalde günlük kullanımda zararlı bir etkisi olmayan glukozun, Torchinsky ve ark (2003)'nın in vitro embriyo kültürü tekniği ile yüksek konsantrasyonlarda yaptıkları çalışmada malformasyona sebebiyet verdiği gözlenmiştir.

Teratojenik ajanlar, gelişen hücre ve dokularda özel mekanizmalar aracılığıyla anormal embriyogeneze sebep olurlar. Teratojenik patogenez, çoğunlukla

apopitozis, biyosentez ve morfogenezde değişikliklere sebep olarak ortaya çıkmaktadır. Bu etkilerini mitoza müdahele ederek, RNA veya protein sentezini değiştirerek, substratlarda, prekürsörlerde veya enerji kaynaklarında yetersizliğe sebep olarak, hücre yüzeyi veya matriksinde değişikliğe sebep olarak gerçekleştirmektedirler (Bailey ve ark 2005). Günümüzde gelişen teknoloji ile birlikte, embriyo kültürü yapılarak teratojenite bakımından değerlendirilen ajanların ilave teknikler (apopitozis tespiti için tunel – Menegola ve ark 2001; immünohistokimyasal olarak TNFα ekspresyonu, apopitozis (tunel metodu) ve kaspaz aktivitesi - Torchinsky ve ark 2003; flow sitometri, tunel ve agaroz jel elektroforezi yöntemleri ile apopitozis değerlendirmesi – Singh ve ark 2009; flow sitometri ve agaroz jel elektroforezi yöntemleri ile apopitozis değerlendirmesi Singh ve Sinha 2010) kullanılarak etki mekanizmaları da araştırılmaktadır. Biz de bu çalışmada antiemetiklerin toksik ve teratojenik etkilerini in vitro embriyo kültürü tekniği ile değerlendirdikten sonra, apopitozise olan etkilerini agaroz jel elektroforezi yöntemiyle araştırdık. Çalışmamızda kullanılan antiemetiklerin ve bunların farklı dozlarının kontroller ile karşılaştırıldığında apopitozis yolaklarını uyarmadığı tespit edilmiştir. Yapılan literatür araştırmasında ise antiemetiklerin apopitozise etkisi ile ilgili bir çalışma tespit edilmemiştir.

Antihistaminikler uzun süreden beri gebelikteki bulantı kusmanın kontrolünde kullanılmaktadırlar. Bazı antihistaminiklerin (meklizin, doxilamin-pridoksin kombinasyonu) hayvanlarda fötal malformasyonlarla ilişkili olduğu bilinmektedir (King 1963, Einarson 1988). Ancak dimenhidrinat ile yapılan çalışmalarda istatistiksel olarak anlamlı oranda herhangi bir malformasyonla ilişkili olduğu gösterilmemiştir. McColl (1963) tarafından gebe ratlar ve tavşanlar üzerinde yapılan in vivo çalışmada da insanda kullanılan normal dozlara göre oldukça yüksek dozlar kullanılmasına rağmen bir batında bulunan yavru büyüklüğü, ağırlığı ve mortalitesi bakımından hiçbir farklılık gözlenmemiştir. Çalışmada ratlar için günlük 75mg/kg, tavşanlar için de 50-100mg/kg dimenhidrinat verilmiştir. Diseksiyon mikroskobu altında iç organları değerlendirilmiş ve boyama yapılarak kemik yapıya bakılmıştır ancak kontrol grubuna göre bir farklılık gözlenmemiştir. Bizim çalışmamızda dimenhidrinatın günlük dozu hesaplanırken plsental geçiş oranı bilinmediği için, plasental geçiş oranını bildiğimiz metoklopramide göre doz ayarı yapıldı. Ancak ilk aşamada belirlenen bütün dozların embriyo gelişimi aşırı derecede

etkilediği gözlendi. Sonrasında embriyoların gelişimlerini sağlayabilecekleri minimum ve maksimum doz aralıkları 2,5 – 20µg/ml olarak ayarlandı. Çalışmamızda ortalama günlük doz embriyo başına 10µg/ml olacak şekilde verildi. Sonuçta dimenhidrinatın en küçük dozdan itibaren önemli derecede toksisiteye neden olduğu belirlendi.

Czeizel ve Vargha (2005)'nın yaptıkları çalışmada kontrol grubu olarak değerlendirilen ve anomalisi bulunmayan 38151 yenidoğan bebekten 1726 (%4,5)'sının annesinin gebelikte dimenhidrinat kullandığı ve konjenital malformasyona sahip 22843 yeni doğandan sadece 914'ünün (%4) annesinin gebelikleri esnasında dimenhidrinat ile tedavi edildiği bildirilmişlerdir. Böylece dimenhidrinat'ın teratojenik etkiye sahip olmadığını bildirmişlerdir. Ancak gebeliklerinin ilk trimestrında dimenhidrinat tedavisi alan gebelerin bebeklerinde düşük oranda obsturiktif üropatiye neden olduğunu göstermişlerdir.

Desdicioğlu ve ark (2010)'nın yaptıkları histopatolojik bir çalışmada, gebelikleri boyunca dimenhidrinat alan ratların yavruları değerlendirilmiştir. Yavrulardan yenidoğan, laktasyon ve erişkin dönemde beyin, akciğer, kalp, karaciğer ve böbrek dokuları alınarak boyanıp, incelenmiştir. Sonuçta verilen dimenhidrinat'ın yeni doğan dönemi, laktasyon dönemi ve erişkin dönemde ratların organlarında histopatolojik olarak herhangi bir değişikliğe neden olmadığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ise dimenhidrinat'ın, somit sayısında 2,5µg/ml dozundan itibaren, toplam morfolojik skor, yolk sak çapı ve tepe kıç uzunluğunda ise 5µg/ml dozundan başlayan ve doza bağlı olarak gelişimsel toksik etkileri tespit edilmiştir. Bununla birlikte ilacın 15µg/ml ve 20µg/ml dozlarında hematoma ve 5µg/ml, 10µg/ml ve 15µg/ml dozlarında da mikrosefaliye neden olduğu gözlendi. Desdicioğlu ve ark (2010)'nın yaptıkları çalışmada dimenhidrinat, ratlara tüm gebelikleri süresince verilmiş olduğu halde bizim çalışmamızda sadece organogenez aşamasında ilaç verilmiştir. Desdicioğlu ve ark (2010)'nın yaptıkları araştırmanın in vivo bir çalışma olması, bizim değerlendirmemizin ise in vitro bir araştırma oluşu; in vivo çalışmalarda plasental geçiş oranı, bazen de ilaçlar karaciğerde metabolize olduktan sonra metabolitlerin etkilerinin orijinal molekülden farklı olabilmesi durumu söz konusu olabildiğinden sonuçlardaki farklılığın ortaya çıkmasını

açıklayabilir. Sonuçlar arası bu farklılığın diğer toksisite test metodları olan mikromass assay ve embriyonik stem cell test metodları ile çalışılmasında yarar olduğu açıktır.

Gastrik motiliteyi arttırıcı etkisi bulunan, hamilelikteki bulantı ve kusmalar için sıklıkla kullanılan metoklopramid ile ilgili gebelik döneminde yapılmış fazla çalışma yoktur. Sorensen ve ark (2000)'nın 6 yıllık bir süreçte yaptıkları araştırmada metoklopramid ile tedavi edilmiş 309 hasta ile hiçbir ilaç tedavisi görmemiş olan 13327 kontrol bireyi karşılaştırılmıştır. Sonuçta değerlendirilen gruplar arasında malformasyonlar, doğum ağırlığı ve erken doğum gibi parametreler arasında hiçbir farklılık tespit etmemişlerdir.

Retrospektif bir çalışmada, 81703 yenidoğandan 3458 (%4,2)'si ilk trimestrda metklopramid'e maruz kalmıştır. Bunlardan %5,3'ünde major konjenital malformasyonlar, %8,5'unda düşük doğum ağırlığı, %6,3'ünde erken doğum, %1,5'inde perinatal ölüm tespit edilirken; ilaç maruziyeti olmayanlarda ise %4,9'unda major konjenital malformasyonlar, %8,3'ünde düşük doğum ağırlığı, %5,9'unda erken doğum ve %2,2'sinde perinatal ölüm tespit edilmiştir. Sonuç olarak her iki grup arasında istatistiki açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır (Matok ve ark 2009).

Bizim yaptığımız araştırmada da önceki çalışma sonuçları ile uyumlu olarak istatistiksel olarak anlamlı bir malformasyon tespit edilmezken, insanlarda kullanılan normal dozların üzerine çıkıldığında gelişimsel toksisiteye neden olduğu gözlenmiştir.

Zayıf dopamin D2 reseptör blokörü etkisi olan trimetobenzamid, antihistaminiklere yapısal olarak benzemesine rağmen, histamin blokörü olarak düşük aktiviteye sahiptir (Babaoğlu ve Kayaalp 2009). Yapılan hayvan çalışmaları, trimetobenzamid HCl ve metabolitlerinin başlıca karaciğere, böbreklere ve akciğerlere dağılım yaptığını göstermiştir. Trimetobenzamid HCl, tek bir dozdan sonra, genellikle iki saat içinde kandan temizlenir; ancak 24 saatin üzerinde bir süre, kanda ölçülebilir düzeyde ilaç konsantrasyonunun devam ettiği bazı hastalarda gözlenmiştir. İnsanlarda, kesin metabolizma yolu ortaya konulamamıştır (Healthinkonline.com 2010)

Milkovich ve Van Den Berg (1976) tarafından, bazı antiemetik ilaçların teratojenitesini değerlendiren bir prospektif çalışmada, gebeliklerinin ilk trimesterinde trimetobenzamid HCl almış 193 kadın takibe alınmıştır. Beş yaşından itibaren kendini gösteren ana konjenital anomali insidansı, bulantı için hiç ilaç almayan kadınların çocuklarında %3,5 iken trimetobenzamid HCl almış kadınlarda %5,8 olarak bulunmuştur. Bu farkın p=0,05 seviyesinde olduğu belirlenmiştir. Ancak, değerlendirilen bireylerde herhangi bir özel anomali tipi baskın olarak saptanmamıştır.

Heinonen ve ark (1977) tarafından yürütülmüş bir projede, gebeliğin ilk 4 ayında trimetobenzamid HCl ile tedavi edilmiş 340 kadının bebekleri ve gebeliğin herhangi bir döneminde trimetobenzamid HCl almış 700 kadının bebekleri takibe alınmıştır. Büyük ve küçük anomali sıklığının, tedavi alan gruplarda beklenenden yüksek olmadığı gözlenmiştir.

Ross ve ark (2003) tarafından Amerika'da yapılan bir çalışmada, infant lösemisinin sebepleri arasında gebelikte annenin ilaç kullanımının yer alıp almadığı araştırılmıştır. İstatistiksel olarak önemli olmamakla beraber, amoksisilin, nistatin, klomifen, levotiroksin, sefaklor ve trimetomenzamid HCl ile belirgin negatif birliktelik saptanmıştır. Karşılaştırılan vaka sayısı çok fazla olmadığı için, bu bilgiler ışığında daha fazla vaka-kontrol çalışmalarının gerektiği bildirmişledir.

Bayhan ve ark (2005), ratlar üzerinde yaptıkları in vivo bir çalışmada trimetobenzamid HCl'nin teratojenik etkisini araştırmışlardır. Gebelikleri süresince farklı dozlarda (17 mg/kg, 34 mg/kg ve 51 mg/kg) trimetobenzamid HCl verilen ratlar gebeliğin 20. gününde sakrifiye edilerek, yavruları alınmıştır. Yapılan değerlendirmede kemik ve kıkırdak dokuda doza bağlı olarak gelişme geriliği görülürken, fetal vücut ağırlılığında da azalma tespit edilmiştir.

Bizim in vitro olarak yaptığımız değerlendirmede de trimetobenzamid HCl'nin ilk dozundan (25 µg/ml) itibaren tüm dozlarda tepe-kıç uzunluğunda, yolk sak çapında ve toplam morfolojik skorda doza bağlı ve istatistiksel olarak anlamlı derecede büyüme ve gelişme geriliğine sebep olduğu gözlendi. 50 µg/ml ve 100 µg/ml'lık ilaç dozlarındaki embriyolarda ise somit sayısında istatistiksel olarak anlamlı derecede gelişme geriliği tespit edildi. Hematom, nöral tüp açıklığı, anormal

kuyruk fleksiyonu gibi malformasyonlar tespit edilirken, 50 µg/ml ve 100 µg/ml'lık dozlarda gelişen embriyolarda diğer malformasyonların yanı sıra somit deformitesi de gözlendi. Bu sonuç Bayhan ve ark (2005) ile Milkovich ve Van Den Berg (1976)'in yaptığı çalışmaların sonuçlarını desteklemektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamızda kullandığımız antiemetiklerle ilgili toksik ve teratojenik etkileri konusunda detaylı ve karşılaştırılmalı bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle çalışmamızda, bir gebenin embriyo gelişiminin kritik döneminde farmakolojik tedavi gerektiğinde kullanılan antiemetik ilaçların gelişen embriyo üzerinde varsa toksik ve teratojenik etkilerini karşılaştırmalı olarak araştırdık. Ayrıca bu ilaçların apopitozis üzerine etkilerini değerlendirdik.

Trimetobenzamid HCl, metoklopramid ve dimenhidrinat ile karşılaştırıldığında embriyonik gelişimsel parametreler üzerine daha toksik bulundu. Ayrıca teratojenik potansiyelinin de daha fazla olduğu belirlendi.

Agaroz jel elektroforezi değerlendirmesi sonucunda da antiemetiklerin DNA fragmentasyonu olşumunda etkili olmadığı ve kullanılan dozlar arasında farklılık göstermediği tespit edildi.

Çalışma sonucunda, antiemetikler içerisinde embriyo gelişimi üzerine en az toksik ve teratojen etkisi olan ilaç metoklopramid olarak belirlendi. Dolayısıyla bu çalışma sonuçlarının; gebelerde özellikle 1. trimestrda antiemetik ilaç tercihi konusunda göz önünde bulundurulmasının yararlı olacağı düşünüldü.

Çalışmamızda antiemetik ilaçların embriyo gelişimi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için, günümüzde geçerliliği kabul edilen önemli in vitro alternatif metodlardan biri olan rat embriyo kültürü tekniği kullanıldı. Bundan sonraki aşamada benzer toksisite çalışmaları farklı in vitro alternatif metodlarla (micromass assay, stem cell test) da yapılarak çalışmanın sonuçları desteklenebilir ve bu durumda klinisyenler için de tedavide önemli bir yol gösterici olabilir. Kültür sonucunda elde ettiğimiz embriyolarda apopitozis sürecinin etkilenip etkilenmediğini araştırmak için de agaroz jel elektroforezi yöntemini kullandık. Bu yönteme göre yapılan değerlendirmede antiemetiklerin apopitozisi etkilemediği tespit edilmiştir. Sonraki aşamalarda çalışma geliştirilip, apopitozisi değerlendirmek için immunohistokimyasal yöntemler, morfolojik yöntemler ya da diğer biyokimyasal yöntemler gibi farklı yöntemler kullanılıp sonuçlar karşılaştırılabilir. En az 2 yöntemle ilaçların apopitozisi etkilemediği gösterilirse, bu durumda teratojenik etki

mekanizmalarından hangisine sebebiyet verdiklerini araştırmak gerekecektir. Çalışma daha da ilerletilerek, antiemetiklerin moleküler düzeyde kromozom anomalileri oluşturup oluşturmadıkları araştırılabilir.

6. ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Antiemetiklerin Rat Embriyoları Gelişimi Üzerine Toksik ve Teratojen Etkilerinin In Vitro Kültür Ortamında Araştırılması

Zeliha FAZLIOĞULLARI

Anatomi (Tıp) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2011

Hamilelikteki bulantı ve kusma genel bir şikayettir ve uzun sürdüğü zaman sıklıkla farmakolojik tedavi gerektirir. Bunla birlikte antiemetik ilaçların embriyonik büyüme üzerine toksik ve teratojenik etkisi belirli değildir. Böylece antiemetik olarak kullanılan metoklopramid, dimenhidrinat ve trimetobenzamid HCl'nin embriyonik büyüme ve gelişme üzerine direkt toksik ve teratojenik etkilerini rat embriyo kültürü tekniği ile araştırmayı ve karşılaştırmayı amaçladık.

9,5 günlük embriyolar disseke edilip ve 48 saat kültüre edildi. Kontrol grubu için kültür ortamı olarak tam rat serumu kullanılırken, deney grupları için seruma farklı konsantrasyonlarda metoklopramid (10-50µg/ml), dimenhidrinat (2,5-20µg/ml) ve trimetobenzamid HCl (25-100µg/ml) eklendi. Her konsantrasyon için en az 10 embriyo kullanıldı. Antiemetiklerin toplam morfolojik skor, yolk sak çapı, tepe-kıç mesafesi ve somit sayısı gibi embriyonik gelişimsel parametreler üzerine doza bağlı etkileri morfolojik yöntem kullanılarak karşılaştırıldı. Embriyolar malformasyonlar bakımından değerlendirildi.

Kontrol embriyoları ile karşılaştırıldığında, antiemetik kullanılan embriyolarda doza bağlı olarak tüm büyüme ve gelişme parametrelerinde belirgin düşüş belirlendi. Trimetobenzamid HCl'nin metoklopramid ve dimenhidrinat'a göre daha fazla gelişimsel toksisiteye sebep olduğu bulundu. Dimenhidrinate hematom, mikrosefali, anormal fleksiyon deformitesi, ödem ve orta beyin deformitesine sebep olurken, trimethobenzamide HCl ise önemli derecede, hematom, maksiller deformite, nöral tüp defekti, anormal fleksiyon deformitesi ve somit deformitesine neden olmaktaydı. Kullanılan tüm ajanlarda nükleer DNA fragmentasyonu oluşumu açısından, kontrol grubu ile deney grupları arasında farklılık gözlenmedi.

Çalışmada üç farklı antiemetik ilacın da rat embriyoları üzerine doza bağlı gelişimsel toksisitesi belirlendi. Bunlardan trimetobenzamid HCl, metoklopramid ve dimenhidrinat ile karşılaştırıldığında embriyonik gelişimsel parametreler üzerine daha toksik bulundu. Ayrıca teratojenik potansiyelinin de daha fazla olduğu belirlendi.

Anahtar Sözcükler: Antiemetikler; toksisite; teratojenite; rat embriyosu; in vitro kültür yöntemi.

7. SUMMARY

Investigation of Developmental Toxicity and Teratogenicity of Antiemetics on Rat Embryos Cultured In Vitro

Nausea and vomiting in pregnancy is a common complaint and when long-standing, pharmacological treatment is often needed. However, the toxic and teratogenic effects of antiemetic drugs on embryonic development are not clear. Therefore, we aimed to investigate and compare the direct toxic and teratogenic effects of metoclopramide, dimenhydrinate and trimethobenzamide HCl, antiemetic drugs, on embryonic growth and development in cultured rat embryos.

9,5 day embryos were dissected and cultured for 48 hours. Whole rat serum was used as a culture medium for the control group while different concentrations of metoclopramide (10-50µg/ml), dimenhydrinate (2,5-20µg/ml) and trimethobenzamide HCl (25-100µg/ml) were added to serum for the experimental groups. At least 10 embryos were used for each concentration. Dose-dependent effects of antiemetics on embryonic developmental parameters such as total morphological score, yolk sac diameter, crown-rump lenght and somit number were compared using morphological method. Embryos were evaluated for the presence of any malformations.

The antiemetics significantly decreased all growth and developmental parameters dose dependently when compared with the control embryos. While trimethobenzamide HCl was found to cause more developmental toxicity than metoclopramide and dimenhydrinate. Dimenhydrinate also caused haematoma, microcephaly, abnormal tail torsion, oedema, and middle brain deformity most frequently while trimethobenzamide HCl caused haematoma, maxillary deformity, open neural tube, abnormal tail torsion and somite deformity at the significant level. There was no difference regarding the fragmentation of nuclear DNA of the all used three different agents, in different concentrations, between controls and experiment groups.

In this study, dose-dependent developmental toxicity of three different antiemetics on rat embryos was determined. Trimethobenzamide HCl was found to be more toxic compared with metoclopramide and dimenhydrinate on embryonic developmental parameters. It was also determined to have more teratogenicity potential.

Key words: Antiemetics; toxicity; teratogenicity; rat embryos; in vitro culture method.

8. KAYNAKLAR

1. Abell TL, Riely CA. Hyperemesis gravidarum. Gastroenterol Clin North Am. 1992; 21(4):835-49.

2. Alison MR, Sarraf CE. Apoptosis: a gene-directed programme of cell death. J R Coll Physicians Lond. 1992;26(1):25-35.

3. Andrews KE. Epidermal Growth Factor: Growth Promotion and Pinocytosis in Rat Embryonic Tissues. BSc Thesis, University of Leicester, 1986.

4. Arıncı K ve Elhan A. Anatomi 2. Cilt, 4. Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi, 2006, 281-282.

5. Arvela P, Jouppila R, Kauppila A, Pakarinen A, Pelkonen O, Tuimala R. Placental transfer and hormonal effects of metoclopramide. Eur J Clin Pharmacol. 1983;24(3):345-8.

6. Asker C, Norstedt Wikner B, Källén B. Use of antiemetic drugs during pregnancy in Sweden. Eur J Clin Pharmacol. 2005;61.12:899-90.

7. Augustine-Rauch K, Zhang CX, Panzica-Kelly JM. In vitro developmental toxicology assays: A review of the state of the science of rodent and zebrafish whole embryo culture and embryonic stem cell assays. Birth Defects Res C Embryo Today. 2010;90(2):87-98.

8. Ayaşlıoğlu E. Apopitoz. T Klin J Med Sci. 2001;21:57-62.

9. Babaoğlu MÖ ve Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji. Ed. Kayaalp SO. Konu: Emetik, antiemetik ve prokinetik ilaçlar.12. Baskı, Ankara, Pelikan Yayıncılık, 2009;1394-405.

10. Bacon WJ, Duffy PA and Jones K. Studies on variability of the micromass teratogen test Toxicology in Vitro. 1990;4(4-5):577-81.

11. Bailey J, Knight A, Balcombe J. The Future of Teratology research is in vitro. Biogenic. Amines. 2005;19:97-145.

12. Bantle JA, Finch RA, Burton DT, Fort DJ, Dawson DA, Linder G, Rayburn JR, Hull M, Kumsher-King M, Gaudet-Hull AM, Turley SD. FETAX interlaboratory validation study: phase III--Part 1 testing. J Appl Toxicol. 1996;16(6):517-28.

13. Bayhan G, Askar I, Ketani A. Teratogenic effect of trimethobenzamide: An experimental study. Biotechnol & Biothechnol Eq. 2005;134-137.

14. Beck F, Lloyd JB. Comparative Placental Transfer. In: A handbook of teratology, Vol. III, Ed. Wilson JG and Fraser FC, New York, Plenum Press, 1977;155-186.

15. Biringer A. Antinauseants in pregnancy: teratogens or not? Can Fam Physician. 1984;30: 2123-25.

16. Brent RL, Beckman DA, and Landel CP. Clinical teratology**.** Curr Opin Pediatr 1993**;**5(2):201-211.

17. Briggs GG, Freeman RK and Yaffe SJ. Drugs in pregnancy and lactation, 7. Edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2005;980-81.

18. Brown DM, Determination of cell development, differentiation and growth, Pediat Res. 1967;1:395-408.

19. Brown NA, Fabro SE. In vitro approach to Teratogenicity Testing. In: Snell K, ed. Developmental Toxicology. London, Croom Helm. 1982;33-57.

20. Brown NA, Fabro SE. Quantitation of rat embriyonic development in vitro: a morphological scoring system. Teratology. 1981;24:65-78.

21. Buesen R, Genschow E, Slawik B, Visan A, Spielmann H, Luch A, Seiler A. Embryonic stem cell test remastered: comparison between the validated EST and the new molecular FACS-EST for assessing developmental toxicity in vitro. Toxicol Sci. 2009;108(2):389-400.

22. Chan LY, Chiu PY, Siu SS, Lau TK. A study of diclofenac-induced teratogenicity during organogenesis using a whole rat embryo culture model. Hum Reprod. 2001;16(11):2390-3.

23. Chohan KR, Griffin JT, Lafromboise M, De Jonge CJ, Carrell DT. Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. J Androl. 2006;27(1):53-9.

24. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Current concepts in apoptosis: The physiological suicide program revisited. Cellular and molecular biology letters 2006;11:506-25.

25. Cohen GM, Sun XM, Snowden RT, Dinsdale D, Skilleter DN. Key morphological features of apoptosis may occur in the absence of internucleosomal DNA fragmentation. Biochem J. 1992;286(Pt 2):331-4.

26. Czeizel AE, Vargha P. A case-control study of congenital abnormality and dimenhydrinate usage during pregnancy. Arch Gynecol Obstet. 2005;271(2):113-8.

27. Daston GP and D'amato RA. In vitro techniques in teratology. Toxic Ind Hlth. 1989;5(3):555–85.

28. Dejean LM, Martinez-Caballero S, Manon S, Kinnally KW. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. Biochim Biophys Acta. 2006;1762(2):191-201.

29. Demaurex N, Distelhorst C. Apoptosis-the calcium connection. Science 2003;300(5616):65-7.

30. Demiray M, Ulukaya EE, Arslan M, Gokgoz S, Saraydaroglu O, Ercan I, Evrensel T, Manavoglu O. Response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer could be predictable by measuring a novel serum apoptosis product, caspase-cleaved cytokeratin 18: a prospective pilot study.Cancer Invest. 2006;24(7):669-76.

31. Desdicioğlu K, Cankara N, Evcil EH, Desdicioğlu R, Kapucuoğlu N, Malas MA. Gebe ratlarda kullanılan dimenhidrinat ve ondansetronun postnatal dönemdeki yavru ratların organlarında oluşturacağı etkilerin histopatolojik yönden araştırılması. Turkiye Klinikleri J Gynecol Obst. 2010;20(3):149-54.

32. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins: suppressors of apoptosis. Genes Dev 1999;13:239-52.

33. Dökmeci İ. Toksikoloji, 3. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2001; 6-17.

34. Drugs.com. Trimethobenzamide Official FDA information, side effects and uses, Updated 23 December 2010. http://www.drugs.com/pro/trimethobenzamide.html. Erişim tarihi Mayıs 2010.

35. Dural EAÖ. Farmakoloji. 3. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 2002;395-7.

36. Einarson A, Maltepe C, Boskovic R, Koren G. Treatment of nausea and vomiting in pregnancy: an updated algorithm. Can Fam Physician. 2007;53(12):2109-11.

37. Eliakim R, Abulafia O, Sherer DM. Hyperemesis gravidarum: a current review. Am J Perinatol. 2000;17(4):207-18.

38. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death.-Toxicol Pathol. 2007;35(4):495-516.

39. Erster S, Moll UM. Stress induced p53 runs a transcription-independent death program. Biochem Biophys Res Commun. 2005; 331:843-50.

40. Fairweather DV. Nausea and vomitng in pregnancy. Am J obstet Gynecol. 1968;102:135.

41. Ferguson MWJ. The mechanism of palatal shelf elevation and the pathogenesis of cleft palate**.** Virchows Arch A Path Anat Histol. 1977;375:97-113.

42. Flick B, Klug S . Whole embryo culture: an important tool in developmental toxicology today. Curr Pharm Des. 2006;12(12):1467-88.

43. Flint OP. An in vitro test for teratogens: its practical application. Food Chem Toxicol. 1986;24(6-7):627-31.

44. Flint OP, Orton TC. An in vitro assay for teratogens with cultures of rat embryo midbrain and limb bud cells. Toxicol Appl Pharmacol. 1984;76(2):383-95.

45. Freeman SJ, Lloyd JB. Evidence that protein ingested by the rat visceral yolk sac yield amino acids for synthesis of embryonic protein. J Embryol Exp Morph. 1983;73:307-15.

46. Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes.Cell Death Differ. 2009;16(8):1093-107.

47. Gao LY and Kwaik YA. Hijacking of apoptotic pathwaysby bacterial pathogens. Microbes and Infection. 2000;2(14):1705-19.

48. Gavrieli Y, Sherman Y and Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol. 1992;119:493-501.

49. Greenaway JC, Shepard TH, Fantel AG, Juchau MR. Sodium salicylate teratogenicity in vitro. Teratology. 1982;26:167-71.

50. Gregg NM. Congenital cataract following German measles in the mother. 1941. Aust N Z J Ophthalmol. 1991;19(4):267-76.

51. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, Dive C, Hickman JA. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in-vivo precede the onset of apoptosis. J Cell Biol. 1999;144:903-914.

52. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. YYÜ Veteriner Fakültesi Dergisi, 2008;2:73-8.

53. Hale F, Development in the Pig The Relation of Vitamin A to the Eye, J Anim Sci. 1935;126-28.

54. Hansen WF, Yankowitz J. Pharmacologic therapy for medical disorders during pregnancy. Clin Obstet Gynecol. 2002;45(1):136-52.

55. Hanson JW, Harris C, Holmes LB, Juchau MR, Kimmel GL, Knudsen TB, Mirkes PE, Sadler TW, Schoenwolf GC, Sulik KK. A teratologist to extinction. Ad Hoc Committee on Grant Funding. Teratology. 1996;53(4):223-4.

56. Healthinkonline.com. Group Health Incorporated, healthinkonline.com, updated 2010. http://www.ghi.healthinkonline.com/modules/goldstandard/monograph.asp?cpnum=1602&name=Trimethobenzamide.Erişim Tarihi Mayıs 2010.

57. Heinonen OP, Slone D, Shapiro S. Birth Defects and Drugs in Pregnancy. Littleton, Mass. Publishing Sciences Group. 1977;323-489.

58. Hörstgen-Schwark G. Production of homozygous diploid zebra fish (Brachydanio rerio), Aquaculture. 1993;112(1):25-37.

59. Huerta S, Goulet EJ, Huerta-Yepez S, Livingston EH. Screening and detection of apoptosis. J Surg Res. 2007;139(1):143-56.

60. Huxley RR. Nausea and Vomiting in Early Pregnancy: Its Role in Placental Development. Obstetrics & Gynecology. 2000;95(5):779-82.

61. Igata A. Epidemiological and clinical features of Minamata disease. Environ Res. 1993;63(1):157-69.

62. Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus-a review. Placenta. 2003;24(Suppl A):86-93.

63. Jerome KR, Vallan C, Jaggi R. The tunel assay in the diagnosis of graft-versus-host disease: caveats for interpretation. Pathology. 2000;32(3):186-90.

64. Jojovic M, Wolf F, Mangold U. Epidermal growth factor, vascular endothelial growth factor and progesterone promote placental development in rat whole-embryo culture. Anat Embryol (Berl). 1998;198(2):133-9.

65. Joschko MA, Dreosti IE, Tulsi RS. The teratogenic effects of salicylic acid on the developing nervous system in rats in vitro. Teratology. 1993;48(2):105-14.

66. Kalra AA and Elliott D. Acute migraine: Current treatment and emerging therapies. Ther Clin Risk Manag. 2007;3(3):449-59.

67. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. Growth promoting effects of human placental lactogen during early organogenesis: a link to insulin-like growth factors. J Anat. 2001;198(Pt 6):651-62.

68. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. The mechanism of growth-promoting effects of prolactin in embryogenesis--links to growth factors. Cells Tissues Organs. 1999;164(1):2-13.

69. Karabulut AK, Pratten MK. Species-specificity of growth-promoting effects of prolactin during rat embryogenesis. J Anat. 1998;192(Pt 1):1-12.

70. Karabulut AK, Reisli R, Uysal II, Celik JB, Ziylan T. An investigation of non-depolarizing muscle relaxants on embryonic development in cultured rat embryos. Eur J Anaesthesiol. 2004;21(9):715-24.

71. Karabulut AK, Ulger H, Pratten MK. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against salicylate-induced embryonic malformations in vitro. Toxicol In Vitro. 2000a;14(4):297-307.

72. Karabulut AK, Ulger H, Pratten MK. Teratogenicity of edoferon kappa A, a molecule derived from salicylate, in cultured rat embryos: differences from salicylate and interaction with free oxygen radical scavenging enzymes. Anat Histol Embryol. 2000b;29(6):363-70.

73. Karabulut AK, Uysal II, Acar H, Fazliogullari Z. Investigation of developmental toxicity and teratogenicity of macrolide antibiotics in cultured rat embryos. Anat Histol Embryol. 2008;37(5):369-75.

74. Karaca M, Onus AN. Array Gen Ekspresyon Teknolojisi ve Bitkisel Üretimde Kullanımı. Alatarım. 2004;3(1):5-10.

75. Kayaalp SO. Tıbbi Farmakoloji. Ed. Kayaalp SO. İlaçların toksik tesirleri ve toksikolojinin temel kavramları. 12. Baskı, Ankara, Pelikan Yayıncılık, 2009;129-51.

76. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea JR, Krajewski S, Reed JC, Dietrich WD. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. J Neuropathol Exp Neurol 2001;60: 422-9.

77. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;26(4): 239-57.

78. Kesby GJ. Toxicity of heparin in postimplantation whole-embryo culture. Toxicol Appl Pharmacol. 2000;163(1):60-6.

79. King CT. Teratogenic effects of meclizine hydrochloride on the rat. Science. 1963;141:353-5.

80. Kousen M. Treatment of nausea and vomiting in pregnancy. Am Fam Physician. 1993;48(7):1279-84.

81. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ. 2009;16(1):3-11.

82. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. Methods. 2008;44(3):205-21.

83. Kurzawa R, Głabowski W, Baczkowski T, Brelik P. Evaluation of mouse preimplantation embryos exposed to oxidative stress cultured with insulin-like growth factor I and II, epidermal growth factor, insulin, transferrin and selenium. Reprod Biol. 2002;2(2):143-62.

84. Lane CA. Nausea and vomiting of pregnancy: a tailored approach to treatment. Clin Obstet Gynecol. 2007;50(1):100-11.

85. Law R, Bozzo P, Koren G, Einarson A. FDA pregnancy risk categories and the CPS: do they help or are they a hindrance? Can Fam Physician. 2010;56(3):239-41.

86. Leathem AM. Safety and efficacy of antiemetics used to treat nausea and vomiting in pregnancy. Clin Pharm. 1986;5(8):660-8.

87. Liebsch M, Spielmann H. Currently available in vitro methods used in the regulatory toxicology. Toxicol Lett. 2002;127(1-3):127-34.

88. Magee LA, Mazzotta P, Koren G. Evidence-based view of safety and effectiveness of pharmacologic therapy for nausea and vomiting of pregnancy (NVP). Am J Obstet Gynecol. 2002;186(5 Suppl Understanding):256-61.

89. Mainwaring P N, P A Ellis, S Detre, I E Smith, M Dowsett. Comparison of in situ methods to assess DNA cleavage in apoptotic cells in patients with breast cancer. J Clin Pathol. 1998;51:34-7.

90. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. Am J Pathol. 1995;146(1):3-15.

91. Martins CF, Dode MN, Bao SE, Rumpf R. The use of the acridine orange test and the TUNEL assay to assess the integrity of freeze-dried bovine spermatozoa DNA. Genet Mol Res. 2007;6(1):94-104.

92. Matok I, Gorodischer R, Koren G, Sheiner E, Wiznitzer A, and Levy A. The Safety of Metoclopramide Use in the First Trimester of Pregnancy. N Engl J Med. 2009;360:2528-35.

93. McBride WG. Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet. 1961;16:1358.

94. McColl JD. Dimenhydrinate in Pregnancy. Can Med Assoc J. 1963;88(16):861.

95. McGarrity C, Samani N, Beck F, Gulamhusein A. The effect of sodium salicylate on the rat embryo in culture: an in vitro model for the morphological assessment of teratogenicity. J. Anat. 1981;133(2):257-69.

96. Medicalook.com. Dimenhydrinate - drug review, Review published on: 21 April 2008. http://www.medicalook.com/reviews/Dimenhydrinate.html. Erişim tarihi Mayıs 2010.

97. Medicalook.com. Metoclopramide- drug review, Review published on: 13 November 2007. http://www.medicalook.com/reviews/Metoclopramide.html. Erişim tarihi Mayıs 2010.

98. Menegola E, Broccia ML, Di Renzo F, Giavini E. Acetaldehyde in vitro exposure and apoptosis: a possible mechanism of teratogenesis. Alcohol. 2001;23(1):35-9.

99. Miklovich L, Van Den Berg BJ. An evaluation of the teratogenicity of certain antinauseant drugs. Am J Obstet Gynecol. 1976 May 15;125(2):244-8.

100. Microbiologybytes.com. Microbiologybytes, Virology, Baculoviruses, Updated: 28 January 2007. http://www.microbiologybytes.com/virology/kalmakoff/baculo/pics/Apoptosis.gif. Erişim tarihi Haziran 2010.

101. Minta M, Wilk I, Żmudzki J. Embryotoxicity of carbendazim in rat and hamster micromass cultures. Bull Vet Inst Pulawy. 2004;48:481- 4.

102. Moallem SA, Ahmadi A, Niapour M, Hosseini T, Habibi G. Role of apoptosis in HESA--a teratogenicity in mouse fetus. Drug Chem Toxicol. 2009;32(3):186-90.

103. Moore KL, Persaud TVN . The developing human: Clinically oriented embryology, 8th edition, Saunders Elsevier, 2008, 457-86.

104. Mountz JD, Zhou T. Apoptosis and Autoimmunity. In: Koopman WJ ed. A Textbook of Rheumatology: Arthritis and Allied Conditions. Lippincott Williams & Wilkins 2001.

105. Mycek MJ, Harvey RA. Champe PC Lippincott's İllustrated Reviews Farmakloloji, Ed. Zergeroğlu S ve Zergeroğlu AM, Ankara, Güneş Kitabevi, 2001, 419-25.

106. New DAT. Development of rat embryos cultured in blood sera. J. Reprod. Fertil. 1966;12:509-24.

107. New DAT. Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. Biol. 1978;53:81-122.

108. New DAT, Coppola PT, Cockroft DL. Comparison of growth in vitro and in vivo of post-implantation rat embriyos. J Embriyol Exp Morphol. 1976a;36(1):133-44.

109. New DAT, Coppola PT, Cockroft DL. Improved development of head fold rat embryos in culture resulting from low oxygen and modifications of the culture serum. J. Reprod. Fert. 1976b;48:219-22.

110. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Haanen C. Early features of poptosis detected by four different flow cytometry assays. Apoptosis. 1998;3(2):115-21.

111. Peters AK, Steemans M, Mesens N, Hansen E, Verheyen GR, Spanhaak S, Coussement W, Vanparys P. A higher throughput method to the embryonic stem cell test (EST), to detect embryotoxicity in early development. In: Proceedings of the Sixth World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences. 2007;673-77.

112. Piersma AH. Alternative methods for developmental toxicity testing. Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2006;98(5):427-31.

113. Pole RJ, Qi BQ, Beasley SW. Patterns of apoptosis during degeneration of the pronephros and mesonephros. J Urol 2002;167(1):269-71.

114. Poortinga E, Rosenthal D, Bagri S. Metocloprainide-induced akathisia during the second trimester of a 37-year-old woman's first pregnancy. Psychosomatics. 2001;42:153-6.

115. Quinlan JD and Hill DA. Nausea and vomiting of pregnancy. Am Fam Physician. 2003;68:121-8.

116. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Pharmacology, 4. Baskı, Edinburgh, Churchill Livingstone,1999, 379.

117. Ratajska A, Torry RJ, Kitten GT, Kolker SJ, Tomanek RJ. Modulation of cell migration and vessel formation by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in cultured embryonic heart. Dev Dyn. 1995;203(4):399-407.

118. Ripple MO, Abajian M, Springett R. Cytochrome *c* is rapidly reduced in the cytosol after mitochondrial outer membrane permeabilization. Apoptosis. 2010;15:563–73.

119. Ross JA, Xie Y, Davies SM, Shu XO, Pendergrass TW, Robison LL. Prescription medication use during pregnancy and risk of infant leukemia (United States). Cancer Causes Control. 2003;14(5):447-51.

120. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Benser A, Lefebvre C, et al. The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. Cell. 1995;80:167-78.

121. Ruedy J. Teratogenic risk of drugs used in early pregnancy. Can Fam Physician, 1984;30:2133-6.

122. Saillenfait AM, Sabaté JP, Gallissot F. Comparative embryotoxicities of butyl benzyl phthalate, ono-n-butyl phthalate and mono-benzyl phthalate in mice and rats: in vivo and in vitro observations. Reprod Toxicol. 2003;17(5):575-83.

123. Salvesen, GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002;3:401-10.

124. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res. 2000;45(3):528-37.

125. Sato A, Hiramoto A, Uchikubo Y, Miyazaki E. Gene expression profiles of necrosis and apoptosis. Genomics. 2008;92(1):9-17.

126. Schulte C and Nagel R. Testing acute toxicity in embryo of Zebrafish, Brachydanio rerio as alternative to the acute fish test — preliminary results. ATLA 22. 1994;12–19.

127. Seiler AE, Buesen R, Visan A, Spielmann H. Use of murine embryonic stem cells in embryotoxicity assays: the embryonic stem cell test. Methods Mol Biol. 2006;329:371-95.

128. Sever LE, Mortensen ME. Teratology and the epidemiology of birth defects: Occupational and enviromental perspectives. J Gen Intern Med 1996**;**11:229-36.

129. Shepard TH, Tanimura T, Robkin MA. Energy metabolism in early mammalian embryos. Symp Soc Dev Biol. 1970;29:42-58.

130. Singh G, Sinha N, Mahipag G SN. Role of apoptosis in mediating salicylic acid-induced teratogenesis in vitro. Toxicol Mech Methods. 2009;19(2):161-8.

131. Singh G, Sinha N. Involvement of apoptosis in mediating mitomycin C-induced teratogenesis in vitro. Toxicol Mech Methods. 2010;20(4):190-6.

132. Sonkusare S. Hyperemesis gravidarum: a review. Med J Malaysia. 2008;63(3):272-6.

133. Sørensen HT, Nielsen GL, Christensen K, Tage-jensen U, Ekbom A, Baron J. Birth outcome following maternal use of metoclopramide. Br J Clin Pharmacol. 2000;49(3):264–8.

134. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E, van den Heuvel FA, Koornstra JJ, Wesseling J, Hollema H, de Jong S.Tissue distribution of the death ligand TRAİL and its receptors. J Histochem Cytochem. 2004;52(6):821-31.

135. SPSS version 15.0 Inc, Chicago, Illinois, USA (Deneme sürümü).

136. Stadelmann C, Lassmann H. Detection of apoptosis in tissue sections. Cell Tissue Res 2000;301:19-31.

137. Steven DH, Morris G. Comparative Placentation. In: Steven Dh, ed. Essays in Structure and Function. London, Academic Press, 1975;75-81.

138. Suda T, Nagata S. Purification and characterisation of the Fasligand that Induces Apoptosis J. Exp. Med. 1994;179:873-9.

139. Sutton VR, Davis JE, Cancilla M, Johnstone RW, Puefli AA, Sedelies K. Initiation of apoptosis by granzyme B requires direct cleavage of bid, but not direct granzme mediated caspase activation. J Exp Med 2000;192:1403-14.

140. Tagoe CNB, Adjei DO. Effects of chloroquine and its enantiomers on the development of rat embryos in vitro. Teratology. 1995;52:137-142.

141. Taha TA, Mullen TD, Obeid LM. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. Biochim Biophys Acta. 1758(12):2027-36.

142. Tebbs C, Pratten MK, Broughton Pipkin F. Angiotensin II is a growth factor in the peri-implantation rat embryo. J Anat. 199l;195(Pt 1):75-86.

143. Theiler K. The House Mouse: Atlas of Embryonic Development. New York: Springer-Verlag, 1989;1-21.

144. Torchinsky A, Brokhman I, Shepshelovich J, Orenstein H, Savion S, Zaslavsky Z, Koifman M, Dierenfeld H, Fein A, Toder V. Increased TNF-alpha expression in cultured mouse embryos exposed to teratogenic concentrations of glucose. Reproduction. 2003;125(4):527-34.

145. Trevor AJ, Katzung BG, Masters SB. Antiemetikler. Ed. Altan M, Katzung ve Trevor Farmakoloji, 8. Baskı, Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri; 2010, 496.

146. Tsuchiya T, Ikarashi Y, Nakamura A. Methods for Evaluating Teratogenic Activities of Chemicals and serum fluids using micromass culture system. AATEX. 1992;1: 165-171.

147. Tüzün A, Karaaslan M. Gebelik ve emzirme döneminde ilaç kullanımı. Turkiye Klinikleri J Med Sci. 1997;17(3):175-83.

148. Ulger H, Karabulut AK, Pratten MK. The growth promoting effects of bFGF, PD-ECGF and VEGF on cultured postimplantation rat embryos deprived of serum fractions. J Anat. 2000;197 (Pt 2):207-19.

149. Ulger H, Ozdamar S, Unur E, Pratten MK. The effect of vascular endothelial growth factor on in vitro embryonic heart development in rats. Anat Histol Embryol. 2004;33(6):334-8.

150. Ulukaya E. M30 Antijen: Kemoterapiye Yanıtı Belirlemede Ümit Verici Yeni Bir Biyobelirteç. Turk J Biochem. 2009;34:24.

151. Unur E, Ulger H, Ekinci N, Hacialiogullari M, Ertekin T, Kilic E. Effect of anti-basic fibroblast growth factor (anti-bFGF) on in vitro embryonic development in rat. Anat Histol Embryol. 2009;38(4):241-5.

152. Uphill PF, Wilkins SR and Allen JA. In vitro micromass teratogen test: Results from a blind trial of 25 compounds Toxicology in Vitro. 1990;4(4-5):623-26.

153. Uysal II, Karabulut AK, Ozdemir K, Aksoy M, Altunkeser BB, Acar H. Investigation of direct toxic and teratogenic effects of anticoagulants on rat embryonic development using in vitro culture method and genotoxicity assay. Anat Histol Embryol. 2006;35.2:84-92.

154. Van Maele-Fabry G, Delhaise F, Picard JJ Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos. Toxicol In Vitro. 1990;4(2):149-56.

155. Vlastarakos PV, Nikolopoulos TP, Manolopoulos L, Ferekidis E, Kreatsas G. Treating common ear problems in pregnancy: what is safe? Eur Arch Otorhinolaryngol. 2008;265(2):139-45.

156. Vural N. Toksikoloji, Ankara, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 1996;1-20.

157. Webster WS, Brown-Woodman PD, Ritchie HE.A review of the contribution of whole embryo culture to the determination of hazard and risk in teratogenicity testing. Int J Dev Biol. 1997 Apr; 41(2):329-35.

158. Wikimedia.org. Dimenhydrinate complet formula.svg - Wikimedia Commons, modified on 11 August 2009. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dimenhydrinate_complet_formula.svg. Erişim tarihi Mayıs 2010.

159. Wikipedia.org. Metoclopramide.svg - Wikipedia, updated 13 January 2009. http://en.wikipedia.org/wiki/Metoclopramide. Erişim tarihi Mayıs 2010.

160. Wikipedia.org. Trimethobenzamide.svg - Wikipedia, updated 6 April 2007. http://en.wikipedia.org/wiki/Trimethobenzamide. Erişim tarihi Mayıs 2010.

161. Woehrmann T, Volland J, Tuch K, Bode G, Hübel U, Teratogenic effects of nitroimidazopyridazine on the CNS in fetal Wistar (WU) rats. Arch Toxicol. 2006;80:458-64.

162. Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stres: cell life and death decisions. J Clin Invest. 2005;115(10):2656-64.

163. Yokoyama A, Takakubo F, Eto K, Ueno K, Igarashi T, Satoh T, Kitagawa H. Teratogenicity of aspirin and its metabolite, salicylic acid, in cultured rat embryos. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1984;46(1):77-91

10. ÖZGEÇMİŞ

1975 yılında Ilgaz'da doğdu. 1990-1993 yılları arasında Ankara Mamak Lisesi'nde orta öğrenimini tamamladıktan sonra, yüksek öğrenimini 1995-1999 yılları arasında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde bitirmiştir. 1999-2002 yılları arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D. İmmünoloji Araştırma Laboratuvarı'nda biyolog olarak görev yaptı. 2002 yılı sonunda Selçuk Üniversitesi'nde açılan sınavı kazanarak Fen Bilimleri Enstitüsü (AR-GE)'ne Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2005 yılında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı. 2005-2006 yılı güz döneminde yine aynı bölümde Doktora eğitimine başladı. Evli ve bir kız çocuk annesidir.