TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ERKEN TAVUK EMBRİYOLARINDA LEVETİRASETAMIN ORTA HAT KAPANMASINA ETKİSİ

Dr. Onur ÖZGÜRAL

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

ANKARA
2012

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ERKEN TAVUK EMBRİYOLARINDA LEVETİRASETAMIN ORTA HAT KAPANMASINA ETKİSİ

Dr. Onur ÖZGÜRAL

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Ağahan ÜNLÜ

ANKARA
2012

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim / Bilim Dalı
Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

"Erken Tavuk Embriyolarında Levetirasetamın Orta Hat Kapanmasına Etkisi " başlıklı, Dr. Onur Özgüral'a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **Tıpta Uzmanlık Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19/10/2012

Prof.Dr.Cumhur DİNÇER
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim / Bilim Dalı Başkanı
Jüri Başkanı

Prof.Dr.Ahmet ERDOGAN
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim/
Bilim Dalı
Üye

Prof.Dr.Ağahan ÜNLÜ
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim /
Bilim Dalı
Tez Danışmanı

TEŞEKKÜR YAZISI

Uzmanlık eğitimim süresince bizlere bilgi, beceri, deneyimleriyle yol gösteren başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Cumhur DİNÇER olmak üzere, tez danışmanım Prof. Dr.Ağahan ÜNLÜ'ye, Prof. Dr. Tanver DOĞANAY'a, Prof. Dr. Esra ERDEMLİ ve Doç.Dr. Sevim AYDIN'a ve tüm Nöroşirürji A. D. öğretim üyelerine,

Cerrahi bilgi ve yeteneklerimin gelişmesine eşsiz katkıları olan çok değerli ağabeylerim Uzm.Dr. Gökmen KAHİLOĞULLARI ve Uzm.Dr.Melih Bozkurt'a

Ayrıca, tez çalışmalarım sırasında benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Uzm.Dr. Ercan ARMAĞAN, Veteriner Hekim Fatih ÇELİK'e,

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım ve eğitimim süresince bilgi ve becerilerinden yararlandığım başta ağabeylerim Uzm.Dr. İhsan DOĞAN ve Uzm.Dr. Recep BROHİ olmak tüm asistan arkadaşlarım, hemşireler ve hastane personeline,

Tanıdığım ilk günden itibaren sürekli yanımda olan kardeşim, dostum, kader ortağım Dr.Ümit EROĞLU'na

Tüm hayatım boyunca büyük bir çaba ve sevgiyle beni bugünlere getiren, benim için vazgeçilmez olan aileme,

Teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY i
TEŞEKKÜR YAZISI ii
İÇİNDEKİLER iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. NÖRAL TÜP DEFEKTİ 2
2.2. NÖRAL TÜP DEFEKTLERİNİN ETYOLOJİSİ 3
2.3. NÖRÜLASYON 3
2.3.1. Primer Nörülasyon 4
2.3.2. Sekonder Nörülasyon 6
2.3.3. Nöral Tüp Oluşumunda Kalsiyum Etkisi 6
2.4. CİVCİV EMBRİYOSUNDA EMBRİYOGENEZ 6
2.6. LEVETİRASETAM (*Levetiracetam*) 9
2.7. LABORATUAR TEKNİKLERİ 11
2.7.1. Pencere Açma Tekniği 11
2.7.2. New Tekniği 13
3. GEREÇ VE YÖNTEM 14
3.1. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME 16
4. BULGULAR 17
4.1. İSTATİKSEL ANALİZ 21
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 23
ÖZET 31
ABSTRACT 33
KAYNAKLAR 35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

NTD : Nöral Tüp Defekti

LEV : Levetirasetam

BOS : Beyin Omurilik Sıvısı

GABA : Gamma Amino Bütirik Asit

Ca^{+2} : Kalsiyum

K^{+} : Potasyum

Na^{+} : Sodyum

SV : Sinaptik Vezikül Protein

RyR : Riyanodin Reseptörü

IP3 : İnositol 3 Fosfat

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Nöral Tüp Kapanma Defektleri (Disrafizm) 1

Tablo 2. Levetirasetam'ın çeşitli dozlardaki grup çalışması 19

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Nörülasyonun elektron mikroskobisindeki görünümü 4

Şekil 2. Evre 12 embriyonun ışık mikroskopik görüntüsü (x40)..... 8

Şekil 3. Hamburger ve Hamilton civciv embriyo gelişim evrelemesi..... 9

Şekil 4. Levetirasetamın kimyasal yapısı (Harbin 2009)..... 9

Şekil 5. Kabuk kaldırıldıktan sonra embriyoner disk (küçük ok) ve blastoderm (büyük ok)..... 11

Şekil 6. Hamilton mikroşırınga yardımı ile blastoderm altına enjeksiyon işlemi 12

Şekil 7. Hamilton mikroşırınga ve iğnesi 13

Şekil 8. Kuluçka Makinesi (Her iki saate bir otomatik çevrim yapmaktadır) 14

Şekil 9. Mikroskop (Nikon ZMS 20)..... 15

Şekil 10. Embriyoda orta hat kapanma kusuru (x40) 18

Şekil 12. Ansefalosel izlenen embriyo (x40)..... 19

Şekil 13. a. Kesit alınan normal embriyo, b. Kapalı olan nöral tüp (alt ok) ve komşuluğundaki notokord (üst ok) (TBx200)..... 20

Şekil 14 a. Kesit alınan nöral tüp defekti olan embriyo, b**.** Açık olan nöral tüp (üst ok) ve komşuluğundaki notokord (alt ok) (TB X 200)..... 20

Şekil 15. Kalsiyumun hücre içi salınımında IP3 etkisi..... 25

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Genetik yatkınlık ve bazı çevresel faktörler nöral tüp gelişiminde önemli rol oynar. Nöral tüp defekti yaklaşık olarak 6/10000 gebelikte görülür (2). En sık görülen nöral tüp defekti anensefali ve spina bifidadır (1). Yenidoğanlarda %3–5 oranında doğum defektine rastlanmaktadır ve nöral tüp defektleri (NTD) doğum defektine bağlı yenidoğan ölümlerinin %7'sini oluşturmaktadır (3).

Levetirasetam (LEV), parsiyel epilepsilerin tedavisinde etkinliği kanıtlanmış yeni bir antiepileptik ilaçtır. Bu etki kendine özgü olmakla birlikte henüz tam anlaşılamamış mekanizmalar üzerinden etki ettiği ve santral sinir sistemine selektif membranlar aracılığıyla bağlandığı düşünülmektedir (4). Diğer antiepileptik ilaçların aksine gebelikteki teratojenik etkisi net olarak bilinmemektedir (5,6).

Biz bu çalışmada yeni bir antiepileptik ilaç olan levetirasetamın civciv embriyolarında orta hat kapanmasına etkisi ve NTD oluşturma mekanizmasını incelemeyi amaçladık.

Tablo 1. Nöral Tüp Kapanma Defektleri (Disrafizm)

1.	Nöral Tüp Kapanma Defekti
	Anensefali
	Kranioraşizis
	Myelomeningosel
	Chiari Tip 2 malformasyonu
	Tethered kord sendromu
	Spina bifida okkulta: Nöroenterik kist, Lumbosakral lipom, Spinal dermal sinüs
2.	Nöral Tüp Yapısal Defekti
	Chiari Tip 1 malformasyonu
	Ensefalosel (Anterior, posterior ve bazal)
	İnensefali
	Ayrık omurilik sendromu

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NÖRAL TÜP DEFEKTİ

Nöral tüp gebeliğin ilk 4 haftalık periyodunda gelişir ve kapanmasını tamamlar. Bu süreçte nöroaksis boyunca herhangi bir yerde kapanmada yetersizlik nöral tüp defekti olarak adlandırılır. Nöral tüp defektleri bazı durumlarda mortal seyretmekle birlikte genellikle kalıcı defisitlere yol açan konjenital malformasyonlardır (7). Risk faktörlerine bakıldığında ileri anne yaşı, düşük sosyoekonomik düzey, multipl gebelik önde gelmektedir (8,9).

Anensefali, anterior nöroporun kapanmasında yetersizlik sonucu gelişir. Beynin büyük bir kısmı ve kranium yokluğu ile karakterizedir (10). Genellikle yaşamla bağdaşmaz.

Kranioraşizis, beyin ve omuriliğin tamamen açıkta kalmasıdır. Bu malformasyona sahip fetus genellikle spontan abortusla kaybedilir.

Myelomeningoselde belirli bir segmentte nöral tüp kapanamaması sonucu plakod denilen nöral katlantılar oluşur. Plakod, dura, arkus vertebra ve cilt oluşumunu engeller. Plakod altında normal BOS bulunduğundan bu yapı bir kese gibi cilt dışına hernie olur (11). Bu kesenin içinde nöral doku bulunmaması halinde meningosel olarak adlandırılır. Genellikle lumbosakral bölgede gelişir.

Chiari malformasyonu, serebellumun kaudale doğru yer değiştirip serebellar tonsillerin foramen magnumdan spinal kanala doğru çeşitli derecelerde hernie olmasıdır. 4 tipi vardır. En sık Tip 1 ve 2 görülür.

Tethered kord sendromu, konus medullarisin L2 seviyesinin altında sonlanması ve nörolojik defisitlerin izlenebileceği bir malformasyondur (11).

Ansefalosel, beyin ve zarının kalvariumdaki bir defekten hernie olmasıdır. Daha çok oksipital bölgede gelişir. Sadece meninks ve BOS bulunması haline kranial meningosel, beyin dokusunun içeriğe eklenmesine ansefalomeningosel ve ventriküler sistemin de olaya katılması ile hidransefalomeningosel adı verilmektedir. Foramen magnum seviyesinde görülen tipine iniansefali denir.

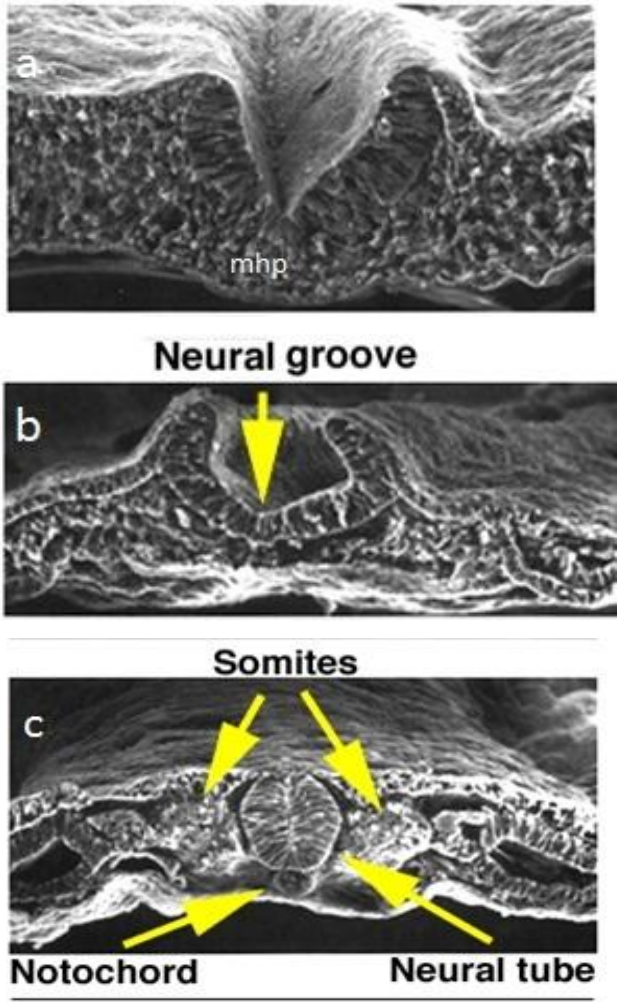
2.2. NÖRAL TÜP DEFEKTLERİNİN ETYOLOJİSİ

Nöral tüp defekti, genetik ve çevresel faktörlerin etkilediği çok basamaklı bir olaydır. Bu durum gen-gen, gen-çevre, gen-beslenme faktörlerini içerir. Uzun yıllardır yapılan araştırmalara rağmen kesin neden hala net olarak anlaşılamamaktadır (1). Genetik olarak Meckel Gruber Sendromu veya Waardenburg Sendromu gibi tek gen veya Trizomi 13-18 gibi kromozomal bozukluklar görülebilir. Çevresel faktörler olarak maternal diabetes mellitus, obezite, antiepileptik ilaç kullanımı, alkol tüketimi, anne yaşı, beslenme alışkanlığı sayılabilir (12,13,14). Folik asit eksikliğinin de nöral tüp defektine yol açtığı bilinmektedir. Gebelik öncesi ve sırasında folik asit alımı nöral tüp defektini önlemede etkilidir (15).

2.3. NÖRÜLASYON

Nöral tüpün gelişme sürecini içerir. Merkezi sinir sisteminin tümü ve periferik sinir sisteminin bir kısmı başlangıçta bu tek tabakalı tüpten gelişir. İnsanlarda nörülasyon primer ve sekonder olmak üzere iki fazda gerçekleşir.

Primer nörülasyonda embriyonun dorsal kısmını oluşturmak üzere indüklenmiş nöral plağın katlanması ve sonucunda beyin ve spinal kordun gelişimi gözlenir. Sekonder nörülasyonda nöral kordun farklılaşması ve kanal halini alması sonucu spinal kordun en kaudal kısımları gelişir. Böylece nöral tüp şekillenmesi nöral katlanma ile başlayıp kanal halini almasıyla tamamlanır (16).



Şekil 1. Nörülasyonun elektron mikroskobisindeki görünümü (Dr.K.Tosney, univercity of Michigan)

a. Medyan dayanak noktasından nöral plağın bükülmesi
b. Nöral yarığın oluşması
c. Nöral tüpün kapanması, somitlerin oluşumu ve bitişiğinde notokord oluşumu

2.3.1. Primer Nörülasyon

Düz nöral plağın silindirik nöral tüpe değişimini içeren bir süreçtir. Sinir sistemi, embriyonun dorsal tarafında yerleşmiş ektodermin orta kısmından farklılaşan plak şeklinde bir dokudan köken alır (16). Altta yatan notokord ve prekordal mezodermin indüklemesiyle nöral plak oluşur (17,18). Nöral plağın en erken oluşan parçasından önbeyin, orta beyin ile arka beynin en rostral kısmı oluşurken kalan parçasından arka beynin geri kalan kısmı ve spinal kord gelişir. Daha sonraki aşama

nöral plağın şekillenmesidir. Plağın konfigürasyonu değişmeye başlar. Bu değişim özellikle plağın aynı anda longitudinal uzaması ve transvers yönde daralmasıyla olur (16). Bunun sonucu olarak epitelyal hücreler hem sayıca hem de boyca artarlar (19,20). Bir sonraki aşama nöral plağın bükülmesidir. Dayanak noktalarının şekillenmesi, nöral duvarların yükselmesi ve nöral katlantıların birleşmesini içerir. Medyal dayanak noktasının şekillenmesi nöral plağın V biçiminde çökmesiyle oluşur. Medyal nöral plak hücrelerinin uzunluğu kısalır ve altta yatan notokorda reaksiyonel olarak kama şeklini alır (21,22,23). Bir sonraki aşama lateral nöral plağın nöral yarığın duvarlarını oluşturduğu elevasyon aşamasıdır. Birçok faktör bu basamağı kolaylaştırmaktadır: i medyal dayanak noktalarının orta hatta nöral plağı bükmesi en az etkili faktör olduğu düşünülmektedir; ii yukarda bahsedilen lateral nöral plağın mikrofilamen iğciklerinin kontraksiyonuyla yukarı doğru bükülmesi sayılabilir (24,25). Nöral duvarın altında uzanan mezodermin genişlemesi, elevasyonda etkilidir (26,27). Daha sonraki aşama nöral katlantının konverjansı veya medyal bükülmesidir. Nöral yarık nöral duvarların dorsal ekstensiyonunu kaplar. İlerde beynin ve kaudal spinal kordun gelişeceği bölgede dayanak noktaları her iki nöral duvar dorsolateral pozisyonunda yükselmeye başlar. Dayanak noktalarının yükselmesi artan apikal mikrofilaman kontraksiyonuyla birlikte nöral duvar ve ilişkili ektodermin etkileşimi sonucu oluşur. Dorsolateral dayanak noktalarının şekillenmesiyle nöral yarığın medyale bükülmesine izin verilir. Nöral yarıktaki bu birleşme muhtemelen ektodermin genişlemesiyle kolaylaşmaktadır (28,29). Primer nörülasyonun son aşaması nöral tüpün çatısı, nöral krest ve üzerindeki epitelyumun şekillenmesiyle nöral yarığın kapanmasıdır. Nöral katlantılar birbirine yaklaştığında yapışır ve ardından füzyon olur. Bu kapanma nöroepitelyal hücre yüzeyinden salgılanan hücre adezyon molekülleri tarafından gerçekleştirilir. Başlangıç kapanması somitler arasındaki sürece benzer. Nöral duvarlar paralel olarak dizilir, yapışır ve bu yapışma sonrası ventrale devam ederek lümen oluşumuna izin verirken adezyon dorsalde kalarak füzyon gelişir (30).

2.3.2. Sekonder Nörülasyon

Nöral tüpün kapanmasını spinal kordun en kaudal kısmını oluşturmak üzere sekonder nörülasyon izler. Primer ve sekonder nöral tüpün birleşimi embriyoda sakral bölgede oluşur (31,32,33). Kaudalde önceki posterior nöropor kaudal yükselti şeklini alır. Bu yükselti farklılaşmamış mezenşimal hücre kitlesi olarak yükselmeye devam eder. Bu sırada arka bağırsak, somitler, nöral krest hücreleri ve nöral kord gelişir. Nöral kord nöral plak aşamasına girmeden nöral tüpe dönüşür ve primer nöral tüple birleşir. Kanal oluşum süreci gebe kaldıktan sonra 7. Haftaya kafadar devam eder. Embriyonik periodun sonunda nöral kord vertebral kolonun sonuna yaklaşsa da fetal dönemde yükselerek lomber bölgeye kadar geriler (16).

2.3.3. Nöral Tüp Oluşumunda Kalsiyum Etkisi

Kalsiyum, hücresel süreçlere birçok yerde katılan önemli bir katyondur. Nörülasyon sırasında nöroepitelyel hücreleri mikrofilamanların kontraksiyonu sonucu kamalaşır. Aynı zamanda spektrin ve miyozin gibi proteinlerin kontraktil etkisiyle nöral plakta yükselme ve kıvrılma meydana gelir. Bu süreçlerde kalsiyum önemli görev almaktadır (40).

2.4. CİVCİV EMBRİYOSUNDA EMBRİYOGENEZ

Embriyo döneminden civciv gelişim aşamasına kadar toplam 46 evre bulunmaktadır. Civciv embriyosunun gelişimi çeşitli evreleri içerir (41).

Evre–1 (İlk çizgi): ilkel çizginin oluşumuna aracılık eder. Blastodermin arka yarısına doğru hücrelerin toplanması sonucu oluşan embriyonik katlantı görülebilir.

Evre–2 (Başlangıç çizgisi): Geçici bir evre olup genellikle inkübasyondan 6–7 saat sonra elde edilir.

Evre 3 (Ara çizgi): (12–13 saat) İlkel çizgi, posterior kenardan pellusid alanının merkezine doğru uzanmıştır. Çizgi boyuna göre göreceli olarak daha geniştir. İlkel oluk oluşmamıştır.

Evre 4 (Tam çizgi): (18–19 saat) İlkel çizgi maksimal uzunluğa ulaşmıştır. İlkel oluk, ilkel çekirdek ve Hensen's nodu oluşmuştur. Pellusida alanı, uzunluğu daha da artmış olup armut şeklini almıştır.

Evre 5: (19–22 saat) Hensen's Nodu'nun ön köşesinden öne doğru uzanan, yoğunlaşan mezodermin bir çubuğu şeklinde notokord veya baş oluşumu görülmeye başlar. Başa ait katlantı henüz görünmemektedir.

Evre 6: (23–25 saat) Notokorda doğru olan blastodermin kesin katlantısı embriyonun ön ucunda belirginleşmiştir. Henüz somitler görülmeye başlamamıştır. Bu bir geçiş dönemidir, baş oluğu ve ilk somit çiftinin oluşumu yakın zaman aralığı içindedir. 7 ve 14. evreler primer olarak net görülebilen 13 somit çiftine dayanır. Gelişimin bu döneminde evrelemede en basit kriter görünen somitlerin sayısıdır.

Evre 7 (Bir somit): (23–26 saat) Bu dönemde gerçekte 2 somitlidir. 1.somit henüz açık bir biçimde görülmez. Nöral katlantılar baş bölgesinde görülür hale gelmiştir.

Evre 8 (Dört somit): (26–29 saat) Nöral katlantılar orta beyin seviyesinde birleşirler. Bu dönemde 4 somit vardır. Blastodermin posterior yarısında kan adacıkları görülmeye başlar.

Evre 9 (Yedi somit): (29–33 saat) Primer optik kesecikler oluşmaya başlar. Kalbin odacıkları birleşmeye başlar. Somit sayısı ortalama 7'dir.

Evre 10 (On somit): (33–38 saat) Somit sayısı 10'a ulaşmıştır. 1. somit dağınık olarak yerleşim gösterir ve bundan sonraki evrelerde sayıya dahil edilmeyecektir. Kraniyal katlantının ilk işareti olan üç adet ilk beyin keseciği, açık şekilde görülür hale gelir. Optik kesecikler net değildir. Kalp hafif sağa doğru yerleşimlidir.

Evre 11 (Onüç somit): (40–45 saat) Hafif bir kranial katlantı vardır. Arka beyin 5 nöromere ayrılmıştır. Ön nöropor kapanmaya başlamıştır. Optik kesecikler belirginleşir. Kalp sağa yerleşmiştir. Bu evrede somit sayısı 13 olmuştur.

Evre 12 (Onaltı somit): (45–49 saat) Kafa sola doğru dönmüştür. Ön nöropor kapanmıştır. Telensefalon görülmeye başlamıştır. Primer optik kesecikler ve optik sak oldukça iyi şekilde görülür. Kulak çekirdeği derindedir ve geniş şekilde açıktadır. Kalp hafif bir S şekli alır. Amnionun baştaki katlantısı ön beyin bölgesinin girişini kaplar. Somit sayısı 16 olmuştur.



Şekil 2. Evre 12 embriyonun ışık mikroskopik görüntüsü (x40)

Evre 13 (Ondokuz somit): (48–52 saat) Kafa tamamıyla sola dönmüştür. Kranial ve servikal katlantı geniş bir eğim yapar. Telensefalonun genişlemesi belirgindir. Derindeki kulak çekirdeğinin açıklığı daralır. Hipofize ait bir belirti yoktur. Atrioventriküler kanal daralarak belirginleşir. Amnionun baştaki katlantısı ön beyni, orta beyni ve arka beynin ön kısmını kaplar. 19 somit vardır.

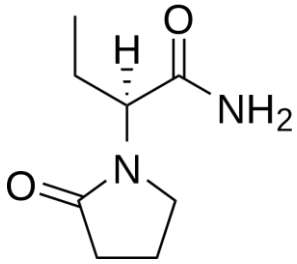
Evre 14 (Yirmi iki somit): (50–53 saat) Fleksiyon ve rotasyon. Kranial fleksiyon: ön beyin ve arka beyin aksları bir dik açı oluştururlar. Servikal fleksiyon geniş bir eğim oluşturur. Vücut rotasyonu arkaya doğru 7–9 somit seviyesine kadar devam eder. Bu seviyenin arkasında hafif gövde fleksiyonu oluşur. Visseral ark 1 ve 2, yarık 1 ve 2 ayırt edilir. Posterior arklar oluşmamıştır. Primer optik kesecikler içeriye doğru girer. Lens oluşmaya başlar. Kulak çekirdeğindeki açıklık sınırlanır. Rathke kesesi tanımlanabilir hale gelir. Kalbin ventriküler boşlukları oluşur ve atmaya başlar. Amnion 7–10. somite kadar uzanır. 22 somit oluşmuştur.



Şekil 3. Hamburger ve Hamilton civciv embriyo gelişim evrelemesi (41)

2.6. LEVETİRASETAM (*Levetiracetam*)

LEV suda çözülen ve diğer antiepilektiklerden farklı olarak pridolinden (S)- _ -ethyl-2-oxo-pyrrolidine acetamide) köken almıştır.



Şekil 4. Levetirasetamın kimyasal yapısı (Harbin 2009)

2002'de piyasaya çıktığından beri tüm dünyada parsiyel ve jeneralize nöbetlerde geniş bir kullanım alanına ulaşmıştır. Normal ilaç plazma konsantrasyonu 5.95–17 mg/ml, pik konsantrasyonu ise 15.3–42.5 mg/ml arasındadır. Serum LEV konsantrasyonu beyindeki konsantrasyonuyla cok benzerdir. Akut ataklarda etkisi yoksa da kronik epilepside hayvan modellerinde nöbeti modifiye edici etkisi bulunmuştur. Beyinde epileptik dokuda belirli konsantrasyonlarda sadece GABAa reseptörlerini etkilemekteyken normal beyin dokusunda bu reseptörlere bağlanmaz. Bu bilgi her ne kadar kronik epilepside kullanımını önerse de yapılan çalışmalar akut ataktaki hücresel etkisini araştırmaya yöneliktir. Status epileptikusu sonlandırmak için intravenöz formu vardır (34).

Voltaj kapılı iyon kanalı: Bazı hücre preparatlarında (striatal, neokortikal ve hippokampal CA1 nöronları) bulunan yüksek voltajlı (YV) kalsiyum kanallarına LEV değişik konsantrasyonlarda akut olarak uygulandığında ortalama %18-40 oranında inhibe etmektedir (35). Farmakolojik olarak bakıldığında başlıca N-tip daha az olarak da P/Q tip kanallar etkilenmektedir. Bu etkilenme sonucunda nörotransmitter salınımını içeren kalsiyum bağımlı presinaptik geçiş azalmaktadır. T-tip kalsiyum geçişini etkilememektedir.

LEV akut uygulandığında, CA1 nöronlarında gecikmiş K geçişinde %30 azalma olurken; A-tipi K geçişi etkilenmemektedir. Bu gecikmiş K geçişinde azalma, tekrarlayıcı aksiyon potansiyelinde azalma ve aksiyon potansiyelinin süresinde uzamaya yol açar. Bu etkinin antiepileptik etkisi net olarak bilinmese de nöral ateşlemeyi azalttığı düşünülmektedir (36).

Akut veya kronik uygulamada Na geçişi üzerine herhangi bir etkisi bulunmamaktadır (35-37).

İntranöral Kalsiyum depoları: Hücre içi kalsiyum depoları nöronal eksitabilitede önemli rol oynamaktadır. Birçok nöronda kalsiyum, inositol trifosfat ve ryanodin reseptörleri kontrolünde bu depolardan salınır. Hipokampal hücre kültürlerinde kafeinle riyanodin reseptörlerinin aktivasyonu hücre içinde geçici kalsiyum artışına yol açar. LEV uygulandıktan 5 dakika sonra bu salınanların %50 si azalır (38). Bununla birlikte ratlarda feokromasitoma hücrelerinde IP3 bağımlı

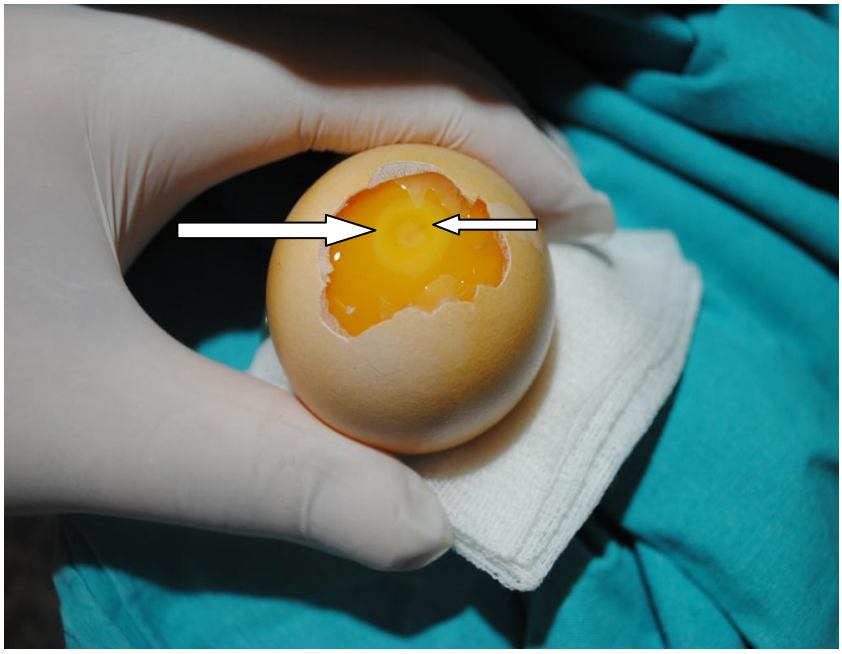
kalsiyum salınımı LEV in 5 dakikalık inkübasyonu sonrası %25-50 azalmaktadır (39). Böylelikle LEV intranöral kalsiyum depolarından kalsiyum salınımını inhibe ederek antiepileptik etkiye katkı sağlar.

Presinaptik geçiş: Levetirasetam SV2 nin 3 izoformundan (A,B,C) spesifik olarak SV2A ya bağlanarak antiepileptik etkisini başlatır (58). SV2 12 adet transmembran bağlanma bölgesi olan major bir proteindir. Levetirasetamın tam olarak nereye bağlandığı bilinmemektedir (59).

2.7. LABORATUAR TEKNİKLERİ

2.7.1. Pencere Açma Tekniği

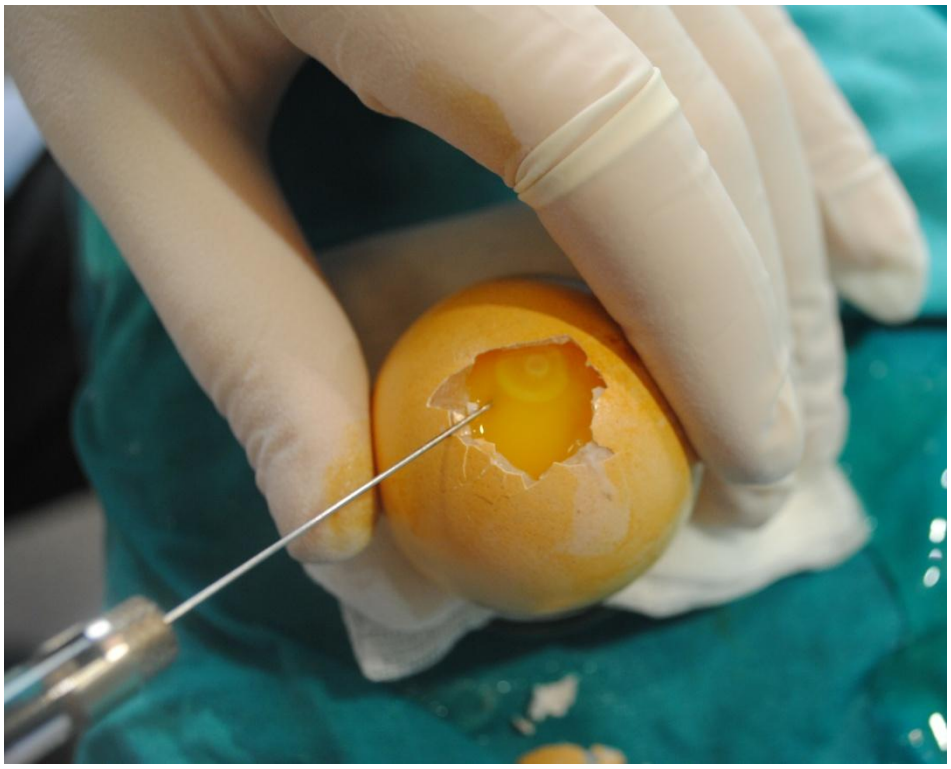
Bu modifiye teknikte, döllenmiş yumurta istenilen gelişim düzeyinde inkübatörden alınıp oda ısısında soğutulur. Yumurta kabuğu üzerine povidon iyodür ve sonrasında %70 etil alkol dökülerek sterilizasyon sağlanır.



Şekil 5. Kabuk kaldırıldıktan sonra embriyoner disk (küçük ok) ve blastoderm (büyük ok)

Daha sonra steril şartlar altında yumurta kabuğu kırılarak 0.5–1 cm yarıçaplı bir pencere açılır. İlk olarak korunan kabuk membranı açılır. Halka şeklindeki embriyoner disk izlenir.

İstenilen teratojen ajanlar, subblastodermik olarak hamilton mikroşırınga yardımı ile 20 mikrolitre solüsyon şeklinde enjekte edilir. Enjeksiyon sonrası yumurta üzerindeki açık pencere steril plastik band veya drape ile kapatılır. Daha sonra yumurta 180 derece çevrilerek inkübatöre konur (42,43).



Şekil 6. Hamilton mikroşırınga yardımı ile blastoderm altına enjeksiyon işlemi



Şekil 7. Hamilton mikroşırınga ve iğnesi

2.7.2. New Tekniği

Bu teknikte; inkübe edilen yumurtalar, istenilen evrede inkübatörden alınarak oda ısısında soğutulur. Yumurta kabuğu üzerine povidon iyodür ve sonrasında %70 etil alkol dökülerek sterilizasyon sağlanır. Yumurta kabuğu kırılarak geniş bir pencere açılır. Albümin künt bir forseps yardımıyla boşaltılır. Steril ve yeterli büyüklükteki bir cam kaba yolk'un üzerini tamamen kaplayacak şekilde steril %0,9 serum fizyolojik konulur. Bu esnada vitelline membrana yapışık olan albumin forsepsle temizlenir. Saat camı, blastodermi almak üzere hazır şekilde kaba yerleştirilir. Sonrasında ince forsepsler ve ince uçlu makaslar kullanılarak vitellin membran yolk'tan yuvarlak bir kesiyle ayrılır. Vitellin membran her iki uçtan dikkatlice tutularak yolk'tan ayrılır ve membrana yapışık olan blastoderm, serum fizyolojik içinde ilerletilerek saat camı içerisine yerleştirilir. Sonrasında etrafına camdan yapılan halka yerleştirilerek blastodermin sabit kalması sağlanır. Bu aşamadan sonra, embriyolar ışık mikroskobu altında morfolojik olarak incelenebilir veya daha ileri çalışmalar için, in-vitro kültür ortamına alınabilir (42,43).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı Nöroembriyoloji Laboratuarı'nda yapıldı. Patojen içermeyen, fertil, sıfırıncı gün beyaz Süper Nick cinsi yumurtalar Ankara, Akyurt CP Tavukçuluk Enstitüsü'nden temin edildi. Çalışma için toplam 160 adet yumurta, ağırlıkları ölçülüp (ortalama ağırlık 65+-2), 37,8+-0,2 oC 'de ve %65–75 nem ortamında 2 saatte bir otomatik çevirim yapan kuluçka makinesinde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun 24. saatinde tüm yumurtalar pencereleme tekniği kullanılarak açıldı. Yumurtalar dört temel gruba ayrıldı (n=40). Levetirasetam suda steril şartlarda çözülerek uygun solüsyonlar hazırlandı. Hamilton mikroşırıngası kullanılarak tüm gruplara 20 mikrolitre subblastodermik injeksiyon yapıldı. Kontrol grubuna %0.9 steril serum fizyolojik uygulandı.



Şekil 8. Kuluçka Makinesi (Her iki saate bir otomatik çevrim yapmaktadır)



Şekil 9. Mikroskop (Nikon ZMS 20)

Grup 1: 120mg/2ml (20 mikrolitre)

Grup 2: 360mg/2ml (20 mikrolitre)

Grup 3: 720mg/2ml (20 mikrolitre)

Grup 4: %0.9 SF (20 mikrolitre)

Enjeksiyon sonrası açılmış pencereler steril drape ile kapatıldı. Daha sonra yumurtalar 180 derece çevrilerek yeniden inkübatöre konuldu ve inkübasyon süresi 48 saate tamamlandı. Yumurtalar, inkübasyonun 48. saatinde embriyolojik gelişimin değerlendirilmesi için açıldı. New tekniği kullanılarak yumurtalar açıldı. Hamburger-Hamilton Tavuk Embriyo Sınıflandırma Sistemi temel alınarak, Nikon ZMS–20 marka ışık mikroskobu yardımıyla 40 büyütme altında embriyolar değerlendirildi.

Nöral tüpün kapalı olması, açık olması ve embriyolojik gelişim olmaması parametreleri göz önünde tutularak, her bir grup ayrı olacak şekilde embriyolar sınıflandırıldı.

3.1. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Embriyoların histopatojik incelemesi için, ışık mikroskobu inceleme tekniği kullanıldı. Işık mikroskobunda incelemek amacıyla embriyolar önce %10 tamponlu formaldehit içinde 24 saat bekletildikten sonra tespit solüsyonuna (0,1M Fosfat tampon içerisinde; %2,5'luk glutaraldehit, %2'lik paraformaldehit) alınarak 2–4 saat bekletilerek fiksasyonları sağlandı. Fiksasyon işlemini takiben 0,1M Fosfat tampon içerisinde 15'er dakika boyunca toplam iki kez yıkama işlemi yapıldı. Sonrasında ikinci tespit solüsyonuna (0,1M Fosfat tampon içerisinde %1'lik osmiyum tetraoksit) konularak iki saat bekletildi. İkinci fiksasyon işlemini takiben tekrar 0,1M Fosfat tampon içerisinde 15'er dakika boyunca toplam iki kez yıkama işlemi yapıldı. Daha sonra her biri için ayrı ayrı olacak şekilde 15'er dakika boyunca toplam iki kez, %75, %96 ve %100 etil alkol solüsyonlarından sırayla geçirilerek dehidratasyon sağlandı. Dehidratasyon işlemi sonrası 15'er dakika boyunca toplam iki kez propilen oksit solüsyonundan geçirildi. Takiben Propilen araldite karışımına (1:1oranında) konularak 1 saat bekletildi. Daha sonra Araldite 6005 karışımına konularak iki saat bekletildi. Daha sonra Araldite 6005'e gömüldü ve 8–16 saat etüvde bekletildi. Ultracut R ultratomuyla, 700–1000 nm kesitler alındı. Alınan kesitler Toluidin blue ile boyandıktan sonra ışık mikroskobunda incelemeye alındı.

4. BULGULAR

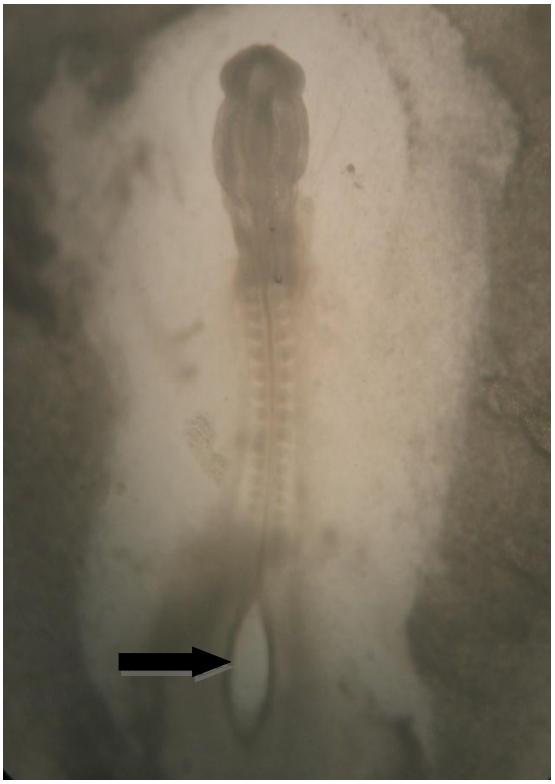
Yapılan çalışma sonucunda 1 kontrol grubu olmak üzere 4 temel gruba artan dozlarda levetirasetam (1.2,3.6,7.2 mikrogram) ve kontrol grubuna %0.9 serum fizyolojik hamilton şırıngasıyla 20 mikrolitre subblastodermik enjekte edildi.

1. grupta 1.2 mikrogram/20mikrolitre levetirasetam enjeksiyonu sonrası 36 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%90), 3 embriyoda gelişimin olmadığı (%7.5), 1 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%2.5) görüldü.

2. grupta 3.6 mikrogram/20mikrolitre levetirasetam enjeksiyonu sonrası 30 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%75), 5 embriyoda gelişimin olmadığı (%12.5), 5 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%12.5) görüldü.

3. grupta 7.2 mikrogram/20mikrolitre levetirasetam enjeksiyonu sonrası 24 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%60), 7 embriyoda gelişimin olmadığı (%17.5), 9 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%22.5) görüldü.

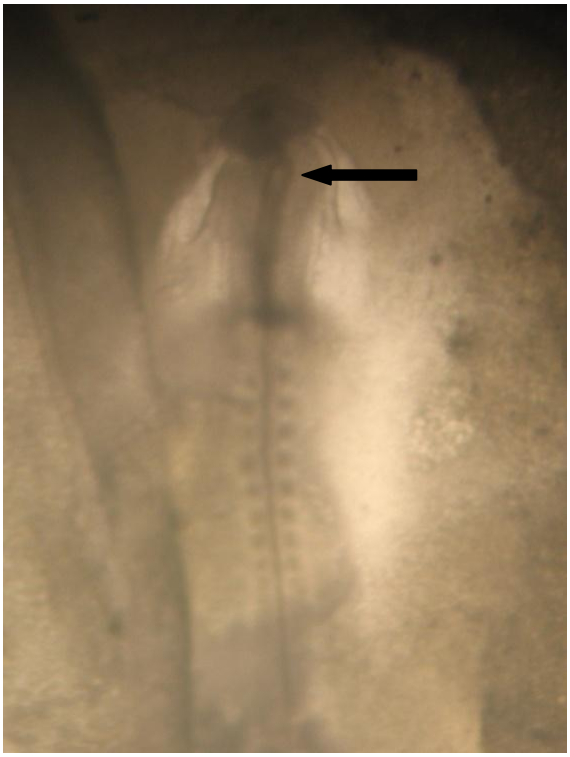
4. grupta %0.9/20mikrolitre serum fizyolojik enjeksiyonu sonrası 38 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%95), 2 embriyoda gelişimin olmadığı (%5), hiçbir embriyoda nöral tüp açıklığı gözlenmedi (%0).



Şekil 10. Embriyoda orta hat kapanma kusuru (x40)



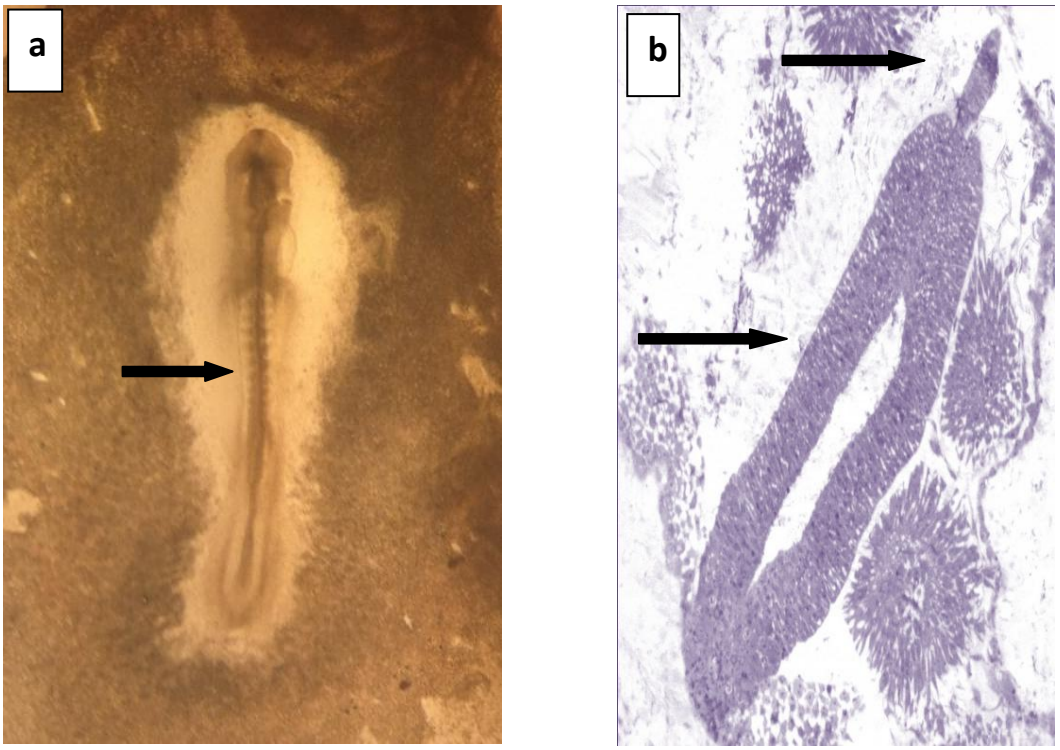
Şekil 11. Gelişim geriliği olan embriyo (x40)



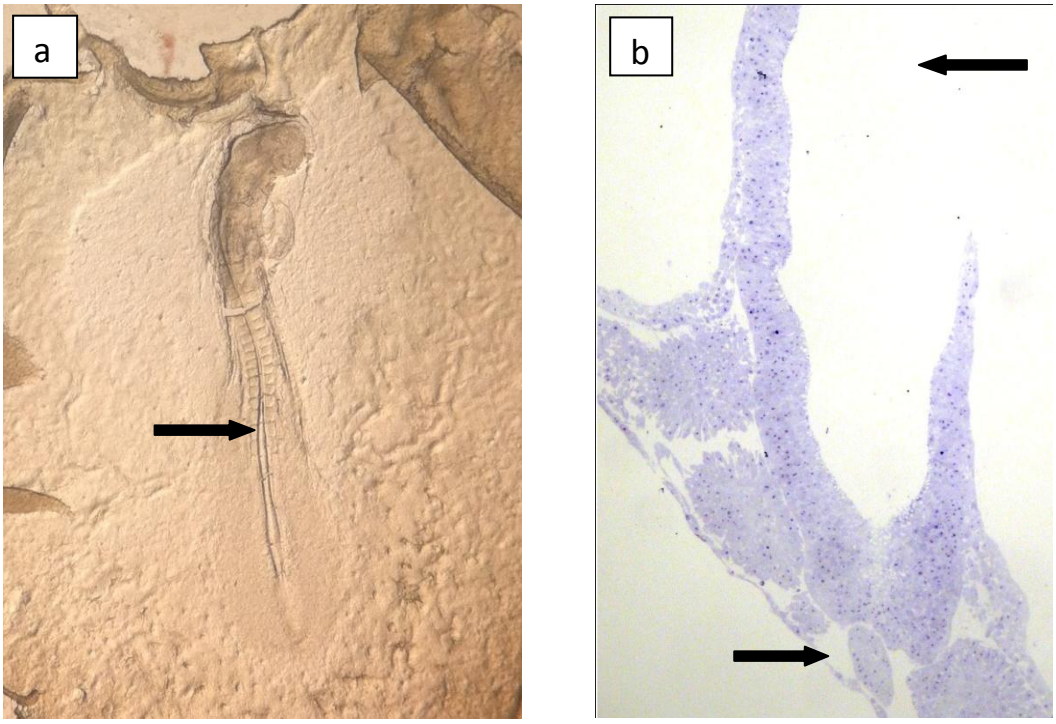
Şekil 12. Ansefalosel izlenen embriyo (x40)

Tablo 2. Levetirasetam'ın çeşitli dozlardaki grup çalışması

Embriyo Gözlemi	**1.2mikgr**	**3.6mikgr**	**7.2mikgr**	**Kontrol**
Gelişim yok	3 (%7.5)	5 (%12.5)	7 (%17.5)	2 (%5)
Nöral tüp açık	1 (%2.5)	5 (%12.5)	9 (%22.5)	0 (%0)
Nöral tüp kapalı	36 (%90)	30 (%75)	24 (%60)	38 (%95)



Şekil 13. a.Kesit alınan normal embriyo, b. Kapalı olan nöral tüp (alt ok) ve komşuluğundaki notokord (üst ok) (TBx200)



Şekil 14. a. Kesit alınan nöral tüp defekti olan embriyo, b**.** Açık olan nöral tüp (üst ok) ve komşuluğundaki notokord (alt ok) (TB X 200)

4.1. İSTATİKSEL ANALİZ

Elde edilen sonuçların analizi SPSS 17.0 istatistik paket programı kullanılarak yapıldı. Sonuçlar gözlem sayısı ve % şeklinde ifade edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı Fisher's exact chi-square testi uygulanarak değerlendirildi. P<0,05 için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Grup 1ve Grup 4 arasında nöral tüp defekti açısından oluşan fark istatiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$).

Grup 2 ve Grup 4 arasında nöral tüp defekti açısından oluşan fark istatiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Grup 3 ve Grup 4 arasında nöral tüp defekti açısından oluşan fark istatiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$).

Gelişimin olmadığı embriyolar da anomalili kabul edilip istatiksel olarak incelendiğinde;

Grup 1 de 3 embriyoda (%7.5) gelişimin olmadığı,

Grup 2 de 5 embriyoda (%12.5) gelişimin olmadığı,

Grup 3 de 7 embriyoda (%17.5) gelişimin olmadığı,

Grup 4 de 2 embriyoda (%5) gelişimin olmadığı görüldü.

Grup 1 ve Grup 4 arasında anomali açısından istatiksel olarak anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) bulundu.

Grup 2 ve Grup 4 arasında anomali açısından istatiksel olarak anlamlı fark olduğu ($p<0.05$) bulundu.

Grup 3 ve Grup 4 arasında anomali açısından istatiksel olarak anlamlı fark olduğu ($p<0.05$) bulundu.

Bu elde edilen sonuçlar neticesinde yeni bir antiepileptik ilaç olan levetirasetamın erken tavuk embriyolarında doz bağımlı olarak orta hat kapanma kusurlarına neden olduğu ve aynı zamanda doz arttıkça anomaliye yol açabileceği sonucuna varıldı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Nöral tüp defekti, topluma getirdiği sıkıntıların yanı sıra önlenebilir olması nedeniyle ciddi araştırma konusu olmuştur.

Bu çalışmalara katkı sağlamak amacıyla yeni bir antiepileptik ilaç olan ve parsiyel epilepsilerin tedavisinde kullanılan levetirasetamın erken dönem tavuk embriyolarında orta hat kapanmasına etkisini araştırdık. Yaptığımız çalışma sonunda levetirasetamın artan dozlarda nöral tüp defektine yol açtığını saptadık. Levetirasetamla ilgili çalışmaların az olması ve etki mekanizmasının hücre içi ve dışı iyonlardaki değişime bağlı olduğu düşünülse de net olarak bilinmemesi nedeniyle defekt oluşturma mekanizmasını ortaya koymaya çalıştık.

Etyolojisi daha önce de bahsedildiği gibi genetik ve çevresel faktörler (anne yaşı, ilaç kullanımı, folat eksikliği, obezite v.b) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. NTD nin oluşum mekanizmasını anlamak için nörülasyonun bütün basamaklarını bilmek gerekir.

Nöral tüp gelişimi ekstrinsik ve intrinsik faktörler tarafından düzenlenen multifaktöryel bir süreçtir (16). Yüksek vertebralı canlılarda nörülasyon iki fazda gerçekleşir: primer ve sekonder.

Primer nörülasyon sırasında daha önce de bahsedildiği gibi yassı ektodermal nöral plak nöral tüpe dönüşür. Bu süreç ise birbiri ardına girmiş 4 bölümden oluşur:

1. Ektodermin kalınlaşmasıyla nöral plağın oluşumu

2. Nöral plağın şekillenmesi

3. Nöral plağın bükülmesi

4. Nöral yarığın kapanması.

Kaudal nöroporun kapanmasının ardından spinal kordun en kaudal kısmının (Kaudal eminens) kapanmasıyla sonuçlanan sekonder nörülasyon görülür. Kaudal eminens, regrese olan primitif streakten köken alan pluripotent hücrelerden oluşur. Bu hücreleden nöral kord, arka barsağın bir kısmı, kaudal somit ve kaudal notokord gelişir. Daha sonra mezenşimal kord, epitelyal korda dönüşüp primer nöral tüple birleşerek spinal kordun geri kalan sakral ve koksigeal segmentlerini oluşturur (1).

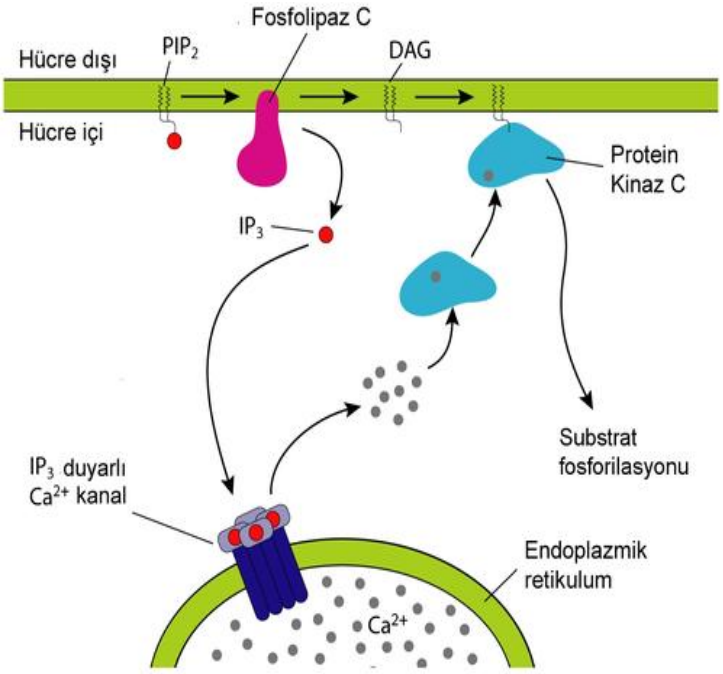
Nöral plaktan nöral tüpe dönüşüm başlıca nöral ektoderm hücrelerinin şekillerinde değişme olmasıyla sağlanır. Bu hücrelerin apikal kısımlarında mikrofilamanların belirmesi ve kontraksiyonuyla hücre şeklinde değişme de başlamış olur (44). Mikrotübüller hücre yüksekliklerinin artması ve kübik hücrelerin prizmatik yapı kazanmasında etkilidir. Mikrofilamanlar ve aktin bağlayıcı proteinler ise nöral plağın yükselmesi, bükülmesinde etkilidirler. Sonuç olarak nörülasyonun başlangıcından tamamlanmasına kadar geçen süreçte yukarda da bahsedildiği gibi mikrotübüler ve mikrofilaman yapılar ana görev üstlenmektedir. Bu süreçte temel rol alan kimyasal kalsiyumdur (40,44,45).

Kalsiyumun bu etkiyi sağlayabilmesi için hücre içinde belirli bir konsantrasyonda olması gerekir. Bu ise daha önce de bahsedildiği gibi hücre yüzeyinde ve hücre içinde bulunan reseptörler aracılığıyla olmaktadır.

Hücre dışından sitoplazmaya kalsiyum girişi sağlayan kanal tipleri şunlardır:

Voltaj Bağımlı Kalsiyum Kanalları: Bu kanallar, membran depolarizasyonu sonucunda aktive olur. Bu aktivasyon kanalları kalsiyuma geçirgen hale getirir. Bu sayede hücre zarındaki elektriksel olaylar, hücre içindeki fizyolojik olaylarla çiftlenir. Yaklaşık 10 farklı voltaj bağımlı kalsiyum kanalı alttipi bilinmektedir (61).

Ligand Bağımlı Kalsiyum Kanalları: Bu kanallar, hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve kalsiyuma geçirgen hale gelirler. Bu yüzden bu kanallar aynı zamanda birer reseptördür. Bu kanallardan bazıları, kalsiyum dışındaki katyonlara da geçirgendirler, bu kanallar seçici olmayan katyon kanalları olarak adlandırılırlar (62).



Şekil 15. Kalsiyumun hücre içi salınımında IP3 etkisi (67)

Kalsiyum Depo Boşalması ile Aktive olan Kanalları: Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre içi kalsiyum depoları, kalsiyum sinyali sonucu, ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman, bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya kalsiyum girişine sebep olurlar. Bu kanallar, depo boşalması ile aktive olup hem kalsiyum sinyalini, hem de hücre içi kalsiyum homeostazını düzenlerler (63).

Hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyum çıkışını sağlayan yapılar ise şunlardır:

Ryanodin Reseptörleri (RyR): Endoplazmik Retikulum (ER)'dan kalsiyum salımını sağlayan kanal ise, ryanodin reseptörüdür (RyR). RyR'lerin aktivasyonu kalsiyumun öncelikle voltaj bağımlı kanallarından hücre içine giren tarafından olmakta, bu reseptörler kalsiyum ile zaman içerisinde önce aktive, ardından inhibe olmakta, aktif halde iken kalsiyum kanalı özelliği göstermektedirler.

İnositol 1,4,5trisfosfat Reseptörleri (IP3): Hücre içi sinyal iletiminde en yaygın ikincil habercilerden biri olan inositol 1,4,5trisfosfat (IP3) etkisi ile aktive olup kanal özellikleri ile Endoplazmik Retikulum (ER)'dan kalsiyum salımına yol açan reseptörler, inositol 1,4,5trisfosfat reseptörü (IP3R) olarak adlandırılmaktadır. Reseptörlerin protein yapısı, RyR'ler ile belirgin şekilde benzerlik taşımaktadır. IP3R'ler, IP3, ve RyR'ler gibi kalsiyum ile aktive olmakta, yine RyR benzeri şekilde, fakat özellikle yüksek derişimdeki kalsiyum ile inaktif hale gelmektedir (65).

Nöronal motilite, hücre içi kalsiyum konsantrasyonunda geçici artış ve sonucunda sitoskeletal yapıda değişiklikle gerçekleşir. Bu sitoskeletal yapıyı oluşturan elemanların (daha önce de bahsedildiği gibi mikrofilaman ve aktomiyozin) kontraksiyonu kalsiyum bağımlı bir olaydır. Hücre içinde yukarda bahsedilen reseptörler aracılığıyla kalsiyumun geçici birikmesi aktinin yeniden düzenlenmesinde ve kontraksiyonunda kilit rol oynar (66).

Yukarıda sunulan bilgiler ışığı altında yeni bir antiepileptik ilaç olan ve etkisini daha çok kalsiyum iyonu üzerinden gösterdiği düşünülen levetirasetamın nöral tüp defekti oluşturabileceği hipotezini öne sürüp daha önce yapılan çalışmalarla tezimizi desteklemeyi amaçladık.

Breckenridge'in 1982'de amfibilerde yaptığı çalışmalarda kardiyak glikozidlerin sodyum pompasını inhibe etmesiyle azalan ekstrasellüler potasyum miktarlarının nöral plakta diferensiyasyonu önlediğini bulmuşlardır (46). Bizim çalışmamızda levetirasetamın sodyum pompası üzerine herhangi bir etkisi bulunmadığından nörülasyonu bu açıdan etkilemediği düşünülmektedir.

Amfibian doku kültürlerinde yapılan bir başka çalışmada ise strontiumun beklenmedik bir şekilde kalsiyum hareketlerini engellediği, bu etkisini de Na^{+}-Ca^{+2} pompası üzerinden yaparak kalsiyumla yarışıp hücre içine girdiği, hücre içi kalsiyumun azaldığı ve dolayısıyla nörülasyona etki ettiği saptanmıştır (46). Sonuçta hücre içi serbest kalsiyum miktarında azalma olması nöral tüp defekti açısından tezimizle paralellik göstermektedir.

Chapman ve arkadaşlarının 1977 de yaptığı bir başka çalışmada mangan iyonunun kalsiyumun rol aldığı bir çok olayda inhibitör etki gösterdiğini rapor etmişlerdir. Normal ya da yüksek ekstrasellüler kalsiyum konsantrasyonlu doku kültürlerinde mangan ile yapılan uzun süreli tedavilerde hücre içi serbest kalsiyum miktarının artabileceğini öne sürmüşlerdir (52). Levetirasetam ise daha önce bahsedildiği üzere hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunu azaltarak etki gösterdiğinden bu çalışmadan farklı özellik taşımaktadır.

Matsuda ve arkadaşlarının 1994 fare embriyolarında yaptığı çalışmalarda aktin polimerizayonunu engelleyen böylece mikrofilaman yapısını bozarak kontraktiliteyi inhibe eden sitokalazinlerin kranial nöral tüp kapanmasını engellediğini göstermişlerdir (47). Levetirasetamın aktin polimerizasyonuna etkisi bulunmasa da bu çalışma bizim çalışmamıza benzer olarak mikrofilaman yapısının bozularak da nöral tüp defekti oluşabileceği fikrini destekler niteliktedir.

O'Shea, 1982 de fare embriyolarında yaptığı çalışmada kolşisinin mikrotübüllerin bir araya gelmesi ve uzamasını inhibe etiği dolayısıyla nöral katlantıların oluşamadığını belirtmiştir (40). Yine bu etki yukardaki çalışmada da belirtildiği gibi çalışmamıza paralel olarak mikrotübül fonksiyonunda bozulmanın da nöral tüp defekti oluşturabileceği fikrini desteklemektedir.

Şimşek ve arkadaşlarının 2012 de erken dönem embriyolarında yaptığı çalışmada dizel egzos parçacıklarının hücresel düzeyde oksidatif stresi artırarak nöral tüp kapanmasını engellediğini göstermişlerdir (48). Bizim çalışmamızda levetirasetamın böyle bir etki yaptığı görülememiştir.

Lee ve arkadaşlarının 1979 da erken dönem tavuk embriyolarında yaptığı bir çalışmada 50mg/ml papaverinin intranöral serbest kalsiyum miktarını azalttığı ve nöroepitelyal hücrelerde apikal mikrofilamanlarda gevşemeye neden olarak nöral tüp defekti oluşturduğunu bulmuştur (49). Dolayısıyla bu çalışma özellikle hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonuna etki açısından tezimizle uyuşmaktadır.

Smedley ve arkadaşlarının 1985 de rat embriyolarında yaptığı çalışmada kalsiyumun bağlanma yerleriyle yarışa giren lanthanumun yükselmekte olan nöral

katlantının açık kalmasına neden olduğunu göstermiştir (40). Sonuçta hücre içi kalsiyum miktarında artış inhibe edildiğinden yine bu çalışma da tezimizi desteklemektedir.

Charo ve arkadaşlarının 1976 da rat embriyolarında yaptığı çalışmada bir kalsiyum antagonisti olan TMB-8 8- (Diethylamino octyl 3,4,5 trimethoxybenzoate hydrochloride) in intrasellüler kalsiyumun fonksiyonlarını inhibe ettiğini göstermiştir (50). Bu etki bize levetirasetamın hücre içi serbest kalsiyum miktarını azaltmasıyla benzerlik gösterdiğini düşündürmektedir.

Başka bir çalışmada ise Schroeder ve arkadaşları 1978 de civciv embriyolarına fungal bir metabolit olan sitokalazin B enjekte etmiştir. Sonuçta mikrofilaman fonksiyonunun bozulduğu ve bunun da nöral tüpün oluşumunu etkilediğini belirtmiştir (51). Her ne kadar levetirasetam mikrofilaman fonksiyonunu direk olarak etkilemese de kalsiyum üzerinden indirek olarak kontraktiliteyi engellemektedir. Bu nedenle tezimize dolaylı yoldan katkı sağladığını düşünmekteyiz.

Arsenik plasentayı geçer ve nöroepitelde birikerek nöral tüp defektine yol açar. Kolin ise metil grup metabolizmasında metil donorü olarak görev alır. Arsenik metilasyonu bir detoksifikasyon işlemidir. Song ve arkadaşlarının 2012 de yaptığı civciv embriyolu çalışmada sodyum arsenik verilen embriyolara aynı anda düşük doz kolin (25 mikrogr/mikrolt) verildiğinde arseniğin nöral tüp defekti oluşturma etkisini önlediğini göstermiştir (53). Arsenikin farelerle yapılan çalışmalarda nöroepitele girerek özellikle nöral yarığın apikal kısımlarında nekroz yaptığı ve böylece nöral tüp defektine neden olduğu belirtilmiştir (54). Tezimizden farklı olarak nöroepitelde ve kontraktil yapılarda morfolojik yapı bozukluğuna yol açarak nöral tüp defekti yapmaktadır.

Briner'in 2001 de gebe ratlara değişik dozlarda GABA a agonist muskimol, GABA b agonist baklofen, GABA a antagonist bikukulin ve GABA b antagonist hidroksisaklofen vererek yaptığı çalışmada GABA a agonist ve antagonistiyle GABA b agonistinin vertebral arkta genişlemeye yol açarak nöral tüp defekti oluşturabileceğini belirtmiştir (55). Bizim çalışmamızda levetirasetam beyinde

GABA a reseptörlerine bağlanarak etkisine başladığından tezimizle paralellik göstermektedir.

Botulinium nörotoksini hücre membranındaki reseptöre SV2 proteinleri aracılığıyla bağlanmaktadır.SV2 protein eksikliğinde presinaptik geçiş azalacağından toksik etki gösterme gücü azalacaktır (56). Eser ve arkadaşları 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada; erken tavuk embriyolarında potent bir nörotoksin olan, Botulinium toksinin etkisi araştırılmış, evre 8'deki toplam 40 civciv embriyosu çalışılmış ve dört gruba (n=10) ayrılmıştır. Kontrol grubu dışındaki 30 embriyoya artan dozlarda Botulinium toksini verilmiş ve sonuçta; nörülasyon aşamasında orta hat kapanma defekti oluşturmadığı gözlenmiştir (57). Bu çalışmada, bir nörotoksin olan Botulinium toksininin levetirasetama benzer olarak SV2 proteini aracılığıyla reseptöre bağlanmasına rağmen nöral tüp defektine yol açmadığı bulunmuştur.

Lee ve arkadaşlarının 1982 de yaptığı çalışmada erken dönem tavuk embriyolarına değişen dozlarda kafein enjekte etmiş ve artan dozlarda nöral tüp defekti yaptığını saptamıştır. Bu etkiyi ise aktin mikrofilamanların sayısında ve kontraktilitesinde azalmaya neden olarak yaptığını belirtmiştir (60). Çalışmamızda kullandığımız ilacın niceliksel olarak mikrofilamanlara etkisi bulunmamaktadır.

Özer ve arkadaşlarının 2012 de yayımlanan çalışmasında 40 adet erken dönem tavuk embriyosu iki gruba ayrılmış (n=20) bir gruba 4.5miklt levetirasetam kontrol grubuna ise 0.045 ml serum fizyolojik subblastodermik olarak verilip 48. saatte pencere tekniğiyle açılıp değerlendirilmiştir. Sonuç olarak LEV uygulanan grupta hücre migrasyonunda azalma ve nöral tüp kapanmasında defekt gözlenmiştir (68).

Benzer olarak yapılmış çalışmalar da göz önünde bulunduğunda etkisini -çok net bilinmese de- daha çok kalsiyum iyonu üzerinden gösteren levetirasetamın mikrofilaman ve mikrotübüller üzerinde nasıl rol oynadığı şu anki şartlarda bir soru işaretidir. İlerleyen zamanlarda yapılacak daha ayrıntılı çalışmalarla bu mekanizmaların da ortaya çıkarılacağını amaçlamaktayız.

Sonuç olarak; SV2a proteinine bağlanarak GABA a reseptörleri üzerinden etki gösteren ve bu etkisini özellikle kalsiyum iyonu üzerinden yaptığı düşünülen levetirasetamın doz bağımlı olarak erken dönem tavuk embriyolarında orta hat kapanma defektine yol açtığını tespit ettik. Özellikle gebeliğin erken dönemlerinde olan epileptik hastalarda bu ilacın etkisi göz önünde tutulmalı ve farklı tedavi yöntemleri araştırılmalıdır.

ÖZET

Giriş ve Amaç: Genetik yatkınlık ve bazı çevresel faktörler nöral tüp gelişiminde önemli rol oynar. Nöral tüp defekti yaklaşık olarak 6/10000 gebelikte görülür. En sık görülen nöral tüp defekti anensefali ve spina bifidadır. Yenidoğanlarda %3–5 oranında doğum defektine rastlanmaktadır ve nöral tüp defektleri (NTD) doğum defektine bağlı yenidoğan ölümlerinin %7'sini oluşturmaktadır.

Levetirasetam (LEV), parsiyel epilepsilerin tedavisinde etkinliği kanıtlanmış yeni bir antiepileptik ilaçtır. Bu etki kendine özgü olmakla birlikte henüz tam anlaşılamamış mekanizmalar üzerinden etki ettiği ve santral sinir sistemine selektif membranlar aracılığıyla bağlandığı düşünülmektedir. Diğer antiepileptik ilaçların aksine gebelikteki teratojenik etkisi net olarak bilinmemektedir.

Biz bu çalışmada yeni bir antiepileptik ilaç olan levetirasetamın civciv embriyolarında orta hat kapanmasına etkisi ve NTD oluşturma mekanizmasını incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Nöroşirürji Anabilim Dalı Nöroembriyoloji Laboratuarı'nda gerçekleştirildi. 160 fertil yumurta, 24 saatlik inkübasyon sonrası pencereleme yöntemi ile açıldı.

Levetirasetam, 20 µL volümde subblastodermik olarak uygulanarak dört grup oluşturuldu. Bu dört grup artan LEV dozları (1.2mikgr, 3.6mikgr, 7.2mikgr) ve kontrol grubuna (%0.9 SF) enjekte edildi. Yumurtalar steril drape ile kapatıldıktan sonra 24 saat daha inkübe edildi. Tüm yumurtalar 48. saate açılarak, embriyolar morfolojik ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

Sonuçlar: Çalışma sonucunda veriler değerlendirildiğinde, levetirasetam dozu ile embriyo etkilenimi arasında bir korelasyon olduğu sonucuna varıldı. Bu

bulgular eşliğinde levetirasetam kullanımının, artan konsantrasyonlarda erken tavuk embriyolarında orta hat kapanma kusurlarına yol açtığı sonucuna varıldı.

Tartışma: Yeni bir antiepileptik olan ve etkisini daha çok kalsiyum iyonu üzerinden gösteren levetirasetam, doz bağımlı olarak embriyolarda orta hat kapanma kusurlarına neden olmaktadır. Yapılacak daha ileri çalışmalarla, embriyonik hasarlanmanın mekanizması ile genetik ve çevresel etmenlere bağlı teratojen etkiler arasındaki mekanizmaları ortaya koymak ve konjenital defektlerin oluşumunu en aza indirmek mümkün olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Levetirasetam, Kalsiyum, Nöral tüp defekti, Tavuk embriyosu

ABSTRACT

THE EFFECT OF LEVETIRACETAM ON CLOSURE OF THE MIDLINE IN EARLY CHICKEN EMBRYOS

Introduction and objective: Genetic predisposition and some environmental factors play an important role for developing neural tube defect. Neural tube defects account approximately 6/10000 in newborns. Most account of neural tube defects are anencephalus and spina bifidus. In tne newborns, the incidence of birth defect is 3-5%, and neural tube defects (NTD) account for 7% of newborn mortality associated birth defects.

Levetiracetam is a new drug that approved for partial seizures. Although mechanism of effect is uncertain, its thought of levetiracetam bind some selective membranes on central nervous system. Despite the other antiepileptics, there is no certain evidence for teratogenity on pregnants.

Materials and Method: The study was conducted in the Neuroembryology Laboratory of Neurosurgery Department At AnkaraUniversity Medical School. One hundred and sixty fertile eggs were opened through window procedure after 24-hour incubation. Levetiracetam was administered via subblastodermic route at volumes of 20 μL thus, four groups were formed. Each of these four groups were as increasing doses of LEV (1.2micgr, 3.6micgr, 7.2micgr) and control group (0.9%NaCI). After the eggs were covered with sterile drapes, they were, incubated for another 24 hours. All the eggs were opened at the 48th hour and the embryos were evaluated morphologically and histopathologically.

Results: The effects of levetiracetam on the embryo were correlated with the dose of levetiracetam. In the light of the results, it was determined that the use of increasing doses of levetiracetam led to defects of midline closure in early chicken embryos.

Discussion: Levetiracetam, a new antiepileptic drug that make the effect especially on calcium ion, leads to defects of midline closure in embryos in a dose dependent manner. Further studies reneeded to show the meachanism of embryonic damage and the mechanismsof teratogenous effects associated with genetic and environmental factors and to minimize the rate of congenital defects.

Key Words: Levetiracetam, Calcium, Neural tube defect, chicken embryo

KAYNAKLAR

1. Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects, Rengasamy Padmanabhan Department of Anatomy, Faculty of Medicine and Health Sciences, UAE University, Al Ain, United Arab Emirates; *Congenital Anomalies* 2006; 46, 55–67

2. Clinical care of pregnant women with epilepsy: Neural tube defects and folic acid supplementation; Mark S. Yerby North Pacific Epilepsy Research, Portland, Oregon, USA; Epilepsia 44 (Suppl. 3): 33-40, 2003

3. Cragan JD, Roberts HE, Edmonds LD, Khoury MJ, Kirby RS, Shaw GM, Velie EM, Merz RD, Forrester MB, Williamson RA, Krishnamurti DS, Stevenson RE, Dean JH. Surveillance for anencephaly and spina bifida and the impact of prenatal diagnosis: United states. Surveill Summ. 1995;44 (4):1-13

4. Developmental Outcome of levetiracetam, its major metabolite in humans, 2-pyrrolidinone N-Butyric acid and its enantiomer ®-alfa-ethyl-oxo-pyrrolidine acetamide in a Mouse model of teratogenity: Nina Isoherranen, Ofer Spiegelstein, Meir Bialer, Jing Zhang, Michelle Merriweather, Boris Yagen, Michael Roeder, Aleata A. Triplett, Volker Schurig and Richard H. Finnell; Epilepsia 44 (10):1280-1288, 2003

5. French J. Use of levetiracetam in special populations. Epilepsia 2001;42 (suppl 4): 40-3

6. Harden C. Safety profile of levetiracetam. Epilepsia 2001; 42 (suppl 4): 36-9

7. GEBELİK VE NÖRAL TÜP DEFEKTLERİ Emine COŞAR, Gülengül KÖKEN, Reşit KÖKEN, Figen Kır ŞAHİN, Evren YEŞİLDAĞER, Dağıstan T. ARIÖZ, Hamide MELEK, Mehmet YILMAZER; *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, (TJOD Derg), 2009; Cilt: 6 Say›: 3 Sayfa: 193-* 6

8. Tunçbilek E, Alikaflifoğlu M, Akadlı B, Hancıoğlu A, Boduroğlu K. Türkiye'de konjenital malformasyon sıklığı, dağılımı, risk faktörleri ve yenidoğanların antropometrik değerlendirilmesi. Ankara: TUBİTAK Matbaası 1996: 945.

9. Mortimer EA. The puzzling epidemiology of neural tube defects. Pediatrics 1980; 65: 63640.

10. Mark S. Greenberg seventh edition developmental anomalies pp 243, 2010

11. Temel Nöroşirurji, Türk Nöroşirurji Derneği cilt 2; sy 1365-6, 2005

12. Becerra JE, Khoury MJ, Cordero JF, Erickson JD. Diabetes mellitus during pregnancy and the risks for specific birth defects: a populationbased case-control study. Pediatrics 1990;85:1–9.

13. Edwards MJ, Shiota K, Smith MSR, Walsh DA. Hyperthermia and birth defects. Reprod Toxicol 1995;9:411–425.43

14. Graham JM Jr, Edwards MJ, Edwards MJ. Teratogen update: gestational effects of maternal hyperthermia due to febrile illnesses and resultant patterns of defects in humans. Teratology 1998;58:209–221.

15. Socioeconomic Status, Neighborhood Social Conditions, and Neural Tube Defects; Cathy R. Wasserman, PhD, Gary M. Shaw, DrPH, Steve Selvin, PhD, Jeffrey B. Gould, MD, MPH, and S. Leonard Syme, PhD; November 1998, Vol. 88, No. 11

16. Nathalie M.J. van der Put, Henny W.M. van Straaten, Frans J.M. Trijbels and Henk J. Blom Folate, Homocysteine and Neural Tube Defects: An Overview *Experimental Biology and Medicine* 2001, 226:243-270.

17. Nieuwkoop PD. The neural induction process: Its morphogenetic aspects. Int J Dev Biol 43 SI:615–623, 1999.

18. Bachiller D, Klingensmith J, Kemp C, Belo JA, Anderson RM, May SR, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM, Rossant J, De Robertis EM. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. Nature 403:658–661, 2000.

19. Jacobson AG, Gordon R. Changes in the shape of the developing vertebrate nervous system analyzed experimentally, mathematically and by computer simulation. J Exp Zool 197:191–246, 1976.

20. Schoenwolf GC. Cell movements driving neurulation in avian embryos. Development 2: (Suppl)157–168, 1991.

21. Van Straaten HW, Hekking JW, Wiertz Hoessels EJ, Thors F, Drukker J. Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo. Anat Embryol Berl 177:317–324, 1988.

22. Smith JL, Schoenwolf GC. Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation. J Exp Zool 250:49–62, 1989.

23. Placzek M, Dodd J, Jessell TM. The case for floor plate induction by the notochord. Curr Opin Neurobiol 10:15–22, 2000.

24. Schoenwolf GC, Smith JL. Mechanisms of neurulation: Traditional viewpoint and recent advances. Development 109:243–270, 1990.

25. Jacobson AG. Some forces that shape the nervous system. Zoon 6:13–21, 1978.

26. Hildebrand JD, Soriano P. Shroom, a PDZ domain-containing actinbinding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. Cell 99:485–497, 1999.

27. Van Straaten HWM, Janssen HCJP, Peeters MCE, Copp AJ, Hekking JWM. Neural tube closure in the chick embryo is multiphasic. Dev Dynamics 207:309–318, 1996.

28. Alvarez IS, Schoenwolf GC. Expansion of surface epithelium provides the major extrinsic force for bending of the neural plate. J Exp Zool 261:340–348, 1992.

29. Hackett DA, Smith JL, Schoenwolf GC. Epidermal ectoderm is required for full elevation and for convergence during bending of the avian neural plate. Dev Dynamics 210:397–406, 1997.

30. Van Straaten HWM, Peeters MCE, Szpak KWF, Hekking JWM. Initial closure of the mesencephalic neural groove in the chick embryo involves a releasing zipping-up mechanism. Dev Dynamics 209:333–341, 1997.

31. Tam PP. A study of the pattern of prospective somites in the presomitic mesoderm of mouse embryos. J Embryol Exp Morphol 92:269–285, 1986.

32. Mu¨ller F, O'Rahilly R. The development of the human brain, the closure of the caudal neuropore, and the beginning of the secondary neurulation at stage 12. Anat Embryol 176:413–430, 1987.

33. Copp AJ, Brook FA. Does lumbosacral spina bifida arise by failure of neural folding or by defective canalization? J Med Genet 26:160– 166, 1989.

34. Rainer Surges, Kirill E. Volynski and Matthew C. Walker: Is levetiracetam different from other antiepileptic drugs? Levetiracetam and its cellular mechanism of action in epilepsy revisited: Therapeutic Advances in Neurological Disorders (2008) 1 (1) 13–24

35. Costa, C., Martella, G., Picconi, B., Prosperetti, C., Pisani, A., Di Filippo, M. et al. (2006) Multiple mechanisms underlying the neuroprotective effects of antiepileptic drugs against in vitro ischemia. Stroke 37: 1319–1326.

36. Madeja, M., Margineanu, D.G., Gorji, A., Siep, E., Boerrigter, P., Klitgaard, H. et al. (2003) Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? Neuropharmacology 45: 661–671.

37. Zona, C., Niespodziany, I., Marchetti, C., Klitgaard, H., Bernardi, G. and Margineanu, D.G. (2001) Levetiracetam does not modulate neuronal voltage-gated Na and T-type Ca2 currents. Seizure 10: 279–286.

38. Angehagen, M., Margineanu, D.G., Ben-Menachem, E., Ro¨nnba¨ck, L., Hansson, E. And Klitgaard, H. (2003) Levetiracetam reduces caffeineinduced Ca2 transients and epileptiform potentials in hippocampal neurons. Neuroreport 14: 471–475.

39. Cataldi, M., Lariccia, V., Secondo, A., di Renzo, G. and Annunziato, L. (2005) The antiepileptic drug levetiracetam decreases the inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent [Ca2]I increase induced by ATP and bradykinin in PC12 cells. J Pharmacol Exp Ther 313: 720–730.

40. Smedley MJ, Stanisstreet M. Calcium and neurulation in mammalian embryos. J. Embryol. exp. Morph. 1985;89:1–14.

41. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph. 1951; 88; 49–92.

42. Ünlü A. Methods of developmental research. Acta Neurochir Suppl.2002;83:71-8.

43. Andacht T, Hu W, Ivarie R. Rapid and improved method for windowing eggs accessing the stage X chicken embryo. Mol Reprod Dev. 2004; 69 (1):31- 4.

44. Smedley MJ, Stanisstreet M. Calcium and neurulation in mammalian embryos. II. Effects of cytoskeletal inhibitors and calcium antagonists on the neural folds of rat embryos J. Embryol. exp. Morph. *93, 167-178 (1986)*

45. Ferreira MC, Hilfer SR. Calcium Regulation of Neural Fold Formation: Visualization of the Actin Cytoskeleton in Living Chick Embryos. Developmental Biology. 1993;159:427–440.

46. LORNA J. BRECKENRIDGE AND ANNE E. WARNER; INTRACELLULAR SODIUM AND THE DIFFERENTIATION OF

AMPHIBIAN EMBRYONIC NEURONES; J. Phy8iol. (1982), 332, pp.393-413

47. PATRICIA YBOT-GONZALEZ AND ANDREW J. COPP, Bending of the Neural Plate During Mouse Spinal Neurulation Is Independent of Actin Microfilaments; DEVELOPMENTAL DYNAMICS 215:273–283 (1999)

48. Hakan SImSEK, Ahmet COLAK, Serdar KAYA, murat KUTLAY, Ahmet CETINKAL, Aptullah HAHOlU, mehmet N dEmIrCAN; The Effects of Diesel Exhaust Particles on Neural Tube Development in the Early Stage Chicken Embryo: Turkish Neurosurgery 2012, Vol: 22, No: 1, 77-82

49. Lee H, Nagele RG. Neural tube closure defects caused by papaverine in explanted early chick embryos: Teratology. 1979 Oct;20 (2):321-31.

50. Charo IF, Feinman RD, Detwiler TC.; Inhibition of platelet secretion by an antagonist of intracellular calcium; Biochem Biophys Res Commun. 1976 Oct 18;72 (4):1462-7.

51. Schroeder TE. Cytochalasin B, cytokinesis, and the contractile ring. Front Biol. 1978;46:91-112.

52. Chapman RA, Ellis D: The effects of manganese ions on the contraction of the frog's heart. J Physiol. 1977 Nov;272 (2):331-54.

53. Song G, Cui Y, Han ZJ, Xia HF, Ma X. Effects of choline on sodium arsenite-induced neural tube defects in chick embryos. Food Chem Toxicol. 2011 Jun 24.

54. Morrissey RE, Mottet NK. Arsenic-induced exencephaly in the mouse and associated lesions occurring during neurulation. Teratology. 1983 Dec;28 (3):399-411.

55. Briner W. The effect of GABA receptor ligands in experimental spina bifida occulta. BMC Pharmacol. 2001;1:2.

56. Peng L, Tepp WH, Johnson EA, Dong M. Botulinum neurotoxin D uses synaptic vesicle protein SV2 and gangliosides as receptors. PLoS Pathog. 2011 Mar;7 (3)

57. Eser O, Yaman M, Coşar E, Konak A, Coşar M, Şahin Ö, Güney Ö. Does Bottox effect neural tube development in early chick embryos?.Euro Spine J. 2007;16:235–238.

58. Kensel-Hammes, P., Bajjalieh, S.M., Matagne, A. et al. (2004) The synaptic vesicle protein SV2A is the binding site for the antiepileptic drug levetiracetam. Proc Natl Acad Sci USA 101: 9861–9866.

59. Janz, R., Goda, Y., Geppert, M., Missler, M. And Su¨dhof, T.C. (1999) SV2A and SV2B function as redundant Ca2þ regulators in neurotransmitter release. Neuron 24: 1003–1016.

60. Lee H, Nagele RG, Pietrolungo JF. Toxic and teratologic effects of caffeine on explanted early chick embryos. Teratology. 1982 Feb;25 (1):19–25.

61. CATTERALL, W.A., PEREZREYES, E., SNUTCH, T.P., STRIESSNIG, J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure Function Relationships of VoltageGated Calcium Channels. Pharmacol Rev. 57 (4): 411-25.

62. MCKAY, B.E., PLACZEK, A.N., DANI, J.A. (2007). Regulation of Synaptic Transmission and Plasticity by Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors. Biochem. Pharmacol. 74 (8): 1120-33.

63. PUTNEY, J.W., BROAD, L.M., BRAUN, F.J., LIEVREMONT, J.P., BIRD, G.S. (2001). Mechanisms of Capacitative Calcium Entry. J. Cell Sci. 114 (Pt 12): 222-39.

64. KEIZER, J., LEVINE, L. (1996). Ryanodine Receptor Adaptation and Ca2+-lnduced Ca2+ ReleaseDependent Ca2+ Oscillations. Biophys. J. 71:3477-87.

65. PATEL, S., JOSEPH, S.K., THOMAS, A.P. (1999). Molecular Properties of Inositol 1,4,5 trisphosphate Receptors. Cell Calcium. 25 (3): 247-64.

66. Actomyosin Contraction at the Cell Rear Drives Nuclear Translocation in Migrating Cortical Interneurons Francisco J. Martini and Miguel Valdeolmillos • The Journal of Neuroscience, June 23, 2010 • 30 (25):8660 – 8670

67. The triacylglycerol structure of olive oil determined by silver ion high-performance liquid chromatography in combination with stereospecific analysis F. Santinelli, P. Damiani, W. W. Christie: JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY Volume 69, Number 6 (1992), 552-556,

68. Füsun Demirçivi Özer, Adıgüzel Demirel, Özlem Yılmaz Dilsiz, Murat Aydın, Nail Özdemir, Yiğit Uyanıkgil and Meral Baka: Effects of Levetiracetam on neural tube development and closure of the chick embryos in ovo: CHILD'S NERVOUS SYSTEM Volume 28, Number 7 (2012), 969-976