

SIÇAN FETUSLARINDA FENİTOİN, FOLİK ASİT VE VİTAMİN E'NİN KEMİK GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

ÖZET

Bu çalışmada, Fenitoin'in (PHT) sıçan embriyonal gelişim sürecinde oluşturduğu iskelet sistemi malformasyonlarını önlemede Folik asit (FA) ile Vitamin E (Vit E)'nin koruyucu rolünün belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu amaçla 25 adet erişkin dişi Wistar-albino türü sıçan kullanıldı. 3 dişi ve 1 erkek sıçan aynı kafese konuldu. Gebe olan sıçanlar tespit edildi. Sıçanlar birinci grup kontrol, ikinci grup PHT, üçüncü grup PHT+FA ve dördüncü grup PHT+Vit E olarak dört gruba ayrıldı. Gebe sıçanlara gebeliklerinin 8., 9. ve 10. günlerinde kontrol grubuna 0.3 ml serum fizyolojik (intraperitoneal), ikinci gruba 25 mg/kg dozunda fenitoin (intraperitoneal) verildi. Üçüncü gruptaki dişi sıçanların içme suyuna gebeliğin ilk gününden itibaren her gün 400 µg/kg folik asit katıldı. Ayrıca bu gruptaki gebe sıçanlara gebeliğin 8., 9., ve 10. günlerinde, 25 mg/kg dozunda fenitoin (intraperitoneal) enjekte edildi. Dördüncü gruptaki gebe sıçanlara gebeliğin 8., 9., ve 10. günlerinde 25 mg/kg dozunda fenitoin (intraperitoneal) verildi. Ayrıca bu gruptaki gebe sıçanlara PHT enjeksiyonundan 1 saat önce Vitamin E (α-Tocopherol) zeytinyağında çözelti olarak 250 mg/kg dozunda gastrik intübasyonla verildi. Tüm gruplarda gebeliklerinin 20. gününde sezeryanla fetuslar alındı. Elde edilen fetusların boyları ve ağırlıkları tespit edildi. İskelet sistemi gelişimi ikili iskelet boyama yöntemi ile incelendi.

PHT uygulamasından sonra fetusların kafatası kemiklerinde belirgin bir kemikleşme geriliği, son iki kaburgada şekil bozuklukları (dalgalanma) ve özellikle son altı kaburgadan sonraki interkostal aralıklarda geniş açılanmalar, ön ayak kemik ve kıkırdak gelişiminde gerilikler izlenmiştir. Gebelik sırasında PHT+FA ve PHT+Vit E verilen gruptaki iskelet sistemi ve özellikle de kosta anomalileri PHT grubuyla kıyaslandığında nispeten azalma olduğu görüldü.

Ağırlık yönünden gruplar arasında bir fark olduğu tespit edildi ($P<0.001$). Kontrol grubu ile PHT grubu, kontrol grubu ile PHT+Vit E grubu ve PHT grubu ile PHT+FA grubu arasında istatistiksel olarak fark bulundu, diğer gruplar arasında bir fark gözlenmedi.

Boy değerlerinde, gruplar arasında bir fark olduğu bulundu ($P<0.001$). Kontrol grubu diğer üç deney grubundan (PHT, PHT+FA, PHT+Vit E) istatistiksel olarak farklı bulundu, deney gruplarının kendi aralarında bir fark gözlenmedi.

Bu verilere göre, gebelik döneminde kullanılan PHT'nin iskelet sisteminde çeşitli malformasyonlara neden olduğu, PHT'nin teratojenik etkisini azaltmak için tedavi süresince vitamin E ve özellikle folik asit gibi maddelerle desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Sıçan, iskelet sistemi, Fenitoin, folik asit, vitamin E.

THE EFFECTS OF PHENYTOIN, FOLIC ACID AND VITAMIN E ON BONE DEVELOPMENT IN RAT FOETUSES

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine whether Phenytoin (PHT) forms skeletal malformations during rat embryonic development and determine the role of preventing these malformations with folic acid (FA) and vitamin E (Vit E).

With this aim, 25 number of adult pregnant female Wistar Albino rats were used. 3 female and 1 male rats be placed in the same cage. Pregnant rats were determined. These rats were divided into four groups being the first control group, the second group PHT, the third group PHT+FA and the forth group PHT+Vit E. Pregnant rats 8th, 9th and 10th on gestation days control group 0.3 ml distilled water (intraperitoneal) were administrated, the second group was administrated 25 mg/kg phenytoin (intraperitoneal). Female rats in the third group on each gestation day were administrated 400 µg/kg folic acid into the drinking water. Besides in this group pregnant rats 8th, 9th and 10th on gestation days were given 25mg/kg phenytoin (intraperitoneal). Pregnants rats in the forth group 8th, 9th and 10th on gestation days were administrated 25 mg/kg phenytoin (intraperitoneal). Besides in this group pregnant rats were administration 1 hour before of PHT injection vitamin E (α -Tocopherol) dissolved in the olive oil 250 mg/kg with the gartric intübasyon. On the twentyth day of the gestation, cesarean was performed to all groups. The foetuses which had been taken were examined for size and weight. Skeletal system development was examined with double skeleton staining method.

After administration of PHT; the evident retardion of ossification at cranium bones, the andulation at last two ribs and especially wide andulation after than at last six ribs in the intercostal interval, the andulation to were observed of the front foot bone and cartilage development. At the time of pregnancy given to PHT + FA and PHT+Vit E group skeleton system and especially ribs anomalies on the analogy that of the PHT group in comparison to decrease as to observed.

For weight difference was found among groups ($P < 0.001$). Between the group control and the group PHT, group control and group PHT+Vit E, group PHT and group PHT+FA statistical difference was found, among other groups weren't observed difference.

For size, difference was found between groups ($P < 0.001$). Group control was found statistically difference the than there experiment groups (PHT, PHT+FA, PHT+Vit E), experiment groups weren't different observed between itself.

According to these datas, we found that used on the pregnancy of PHT causes varying malformations on rat skeletal system, for decrease the teratogenic effect of the PHT the substances like vitamin E and especially folic acid must be supported during the period of the treatment.

Key Words: Rat, skeletal system, phenytoin, folic acid, vitamin E.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO, ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ	VIII
RESİM LİSTESİ	IX
KISALTMALAR	X
 1. GİRİŞ VE AMAÇ	 1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İSKELET SİSTEMİ GELİŞİMİ	4
2.1.1. Kıkırdak histogenezisi	5
2.1.2. Kemik histogenezisi	6
2.1.2.1. İntramembranöz kemikleşme (Desmal kemikleşme)	6
2.1.2.2. Enkondral kemikleşme	7
2.2. SIÇANLARDA İSKELET SİSTEMİ GELİŞİMİ	9
2.3. SIÇANLARIN İSKELET SİSTEMİ	13
2.4. İLAÇLARIN TERATOJENİK ETKİSİ	16
2.5. EPİLEPSİ (SARA NÖBETLERİ)	20
2.6. ANTİEPİLEPTİK İLAÇLAR	20
2.6.1. Antiepileptik ilaçların (AEDs) gebelikte kullanılması ve doğum defektlerindeki Rolü	22
2.7. FENİTOİN (PHT- Phenytoin - Diphenylhydantoin Sodium Salt- DPH):	25
2.7.1. Farmakolojik Özellikleri	25
2.7.1.1. Farmakodinamik Özellikleri	25
2.7.1.2. Farmakokinetik Özellikleri	26
2.7.2. Fenitoinin gebelikte kullanımı	27

	<u>Sayfa No</u>
2.8. FOLİK ASİT (FA)	28
2.9. VİTAMİN E (VİT E, ALFA - TOKOFEROL)	31
2.10. FETAL İSKELET SİSTEMİNİN BOYANMASI	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ	36
3.2. İLAÇ UYGULAMASI.....	37
3.3. FETUSLARIN EXPLANTASYONU.....	38
3.4. FETUSLARIN BOYANMASI.....	40
3.5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM	41
4. BULGULAR.....	42
4.1. İSTATİSTİKSEL BULGULAR	44
4.2. MİKROSKOPİK BULGULAR.....	46
4.2.1. Kontrol grubunun mikroskopik bulguları	48
4.2.2. Fenitoin grubunun mikroskopik bulguları	51
4.2.3. Fenitoin + Folik Asit grubunun mikroskopik bulguları	59
4.2.4. Fenitoin + Vitamin E grubunun mikroskopik bulguları.....	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	69
6. KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO, ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 2.1. Sıçan embriyolarında gelişimsel sınıflama	10
Tablo 2.2. Sık görülen epilepsi türlerinde ilaçların genel tercih sıraları	21
Tablo 2.3. Hamilelik sırasında kullanılan antikonvulsan ilaçların insanlarda oluşturduğu konjenital defektler	25
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan sıçan fetuslarına ait ağırlık ve boy ölçümleri	42
Tablo 4.2. Kontrol ve deney gruplarına ait fetusların boy ve ağırlık değerlerinin karşılaştırılması	45
Tablo 4.3. Kontrol ve deney gruplarına ait fetuslarda kemikleşme durumu	47
Tablo 4.4. Fenitoin grubuna ait fetuslarda görülen kaburga ayrılma anomalisi.....	52
 Şekil 2.1. İntramembranöz kemikleşmenin aşamaları.....	 7
Şekil 2.2. Endokondral kemikleşme: Primer kemikleşme merkezi.....	8
Şekil 2.3. Endokondral kemikleşme.....	9
Şekil 2.4. Rat iskelet sistemi görünümü	15
 Grafik 4.1. Gruplar arasındaki boy ortalamalarının karşılaştırılması	 45
Grafik 4.2. Gruplar arasındaki ağırlık ortalamalarının karşılaştırılması	46

RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Resim 3.1. Çiftleştirilen sıçanların ve vaginal smear'ın görünümü	37
Resim 3.2. Fetüslara eter uygulaması	38
Resim 3.3. Anne sıçanlara sezeryan uygulama aşamaları	39
Resim 3.4. Anne sıçandan elde edilen fetusun yakından görünümü	39
Resim 3.5. Derileri soyularak iç organları ve gözleri çıkarılmış fetus	40
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait ikili iskelet boyaması uygulanmış bir sıçan fetusunun kafatası ve boyun vertebralarının yakından görünümü.....	49
Resim 4.2. Kontrol grubuna ait fetusta vertebraların görünümü.....	50
Resim 4.3. Kontrol grubunda ön ekstremitenin görünümü.....	50
Resim 4.4. İkili boyama uygulanmış kontrol grubu fetusun arka ekstremitte görünümü	51
Resim 4.5. Fenitoin grubu fetüslerin ikili iskelet boyaması. Kafa kemikleri kemikleşmesi.....	54
Resim 4.6. Fenitoin grubundan vertebralar ve kostaların görünümü	55
Resim 4.7. Fenitoin grubundan vertebralar ve kostaların görünümü	55
Resim 4.8. Fenitoin grubundan vertebralar ve kostaların görünümü	56
Resim 4.9. Fenitoin grubundan ön ekstremitte görünümü.....	56
Resim 4.10. Fenitoin grubundan ön ekstremitte görünümü.....	57
Resim 4.11. Fenitoin grubu ön ayak iskeleti görünümü.....	57
Resim 4.12. Fenitoin grubu arka ekstremitte görünümü	58
Resim 4.13. Femur'un kemikleşme miktarının karşılaştırılması	58
Resim 4.14. Fenitoin grubuna ait arka ekstremitte görünümü.....	59
Resim 4.15. PHT+FA grubunun kafatası kemiklerinin görünümü	62
Resim 4.16. Fenitoin+Folik asit grubuna ait fetüslarda kafatası kemikleşmesi	62
Resim 4.17. PHT+FA grubunda vertebraların ve kostaların görünümü.....	63
Resim 4.18. PHT+FA grubunda vertebraların görünümü	63
Resim 4.19. PHT+FA grubuna ait fetusta arka ekstremitte görünümü	64
Resim 4.20. PHT+FA grubuna ait fetusta ön ekstremitte görünümü	64
Resim 4.21. Fenitoin+Vit E grubundan kafatası ve ön ekstremitte görünümü	66
Resim 4.22. PHT+Vit E grubuna ait fetusta vertebralar (Lumbal, Sakral, Caudal) ve arka ekstremiteden görünüm.....	67
Resim 4.23. PHT+Vit E grubu fetusta kostaların görünümü. 13. kostada gelişim geriliği.....	67
Resim 4.24. PHT+Vit E grubunda ön ayak iskeleti.....	68
Resim 4.25. PHT+Vit E grubu fetusta arka ekstremitte.....	68

KISALTMALAR

ART	: Articulatio
POM	: Primer ossifikasyon merkezi
SOM	: Sekonder ossifikasyon merkezleri
FDA	: Food and Drug Administration
AEDs	: Antiepileptik ilaçlar
AFP	: Alfa fetoprotein
PHT	: Fenitoin
SSS	: Santral sinir sistemi
IM	: Intramusküler
CBZ	: Karbamazepin
VPA	: Valproik asit,
DPH	: Difenilhidantoin,
PB	: Fenobarbital
FHS	: Fetal hidantoin sendromu
FA	: Folik asit
PteGlul	: Folik asitin kimyasal adının kısaltması
NTD	: Nöral Tüp Defektleri
VİT E	: Vitamin E

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kongenital malformasyonlar, çocuk doğar doğmaz saptanan ve yaşamla ilgili işlevleri bozan, ölüme veya ciddi sakatlığa yol açan prenatal kökenli yapısal anomalilerdir.

Gebelikte kullanılan çeşitli ilaçlar, anneye önemli bir zarar vermeden, toksisite derecelerine ve seçici etkilerine göre embriyonal ve fetal dokularda direkt veya indirekt şekilde zararlı etkiler yapabilir. Embriyonal organogenezisi, fetal metabolizmayı, fetal hormonal dengeyi veya fetal doku fonksiyonlarını bozarak, intrauterin mortaliteye, spontan düşüklere, erken doğuma, konjenital anomalilere, yeni doğanlarda morfolojik malformasyonlara veya eksiklik ve deviasyonlar şeklinde ortaya çıkan işlevsel bozukluklara neden olabilirler. Ayrıca, postnatal dönemdeki büyüme ve mental gelişimde gecikme veya geç görülen bozukluklar ortaya çıkabilir.

Organogenezisin geliştiği ve embriyonun teratojenik etkilere çok hassas olduğu dönem embriyonal dönemdir. Belirli ve güçlü teratojenler dışında pek çok ilaçların bu dönemde özellikle major morfolojik malformasyonlara, konjenital anomalilere ve işlevsel bozukluklara neden olan teratojenik etkiler yapabileceği bilinmektedir.

İnsanlarda güçlü teratojenik etkiye sahip olarak bilinen ilaçlar, difenilhidantoin (fenitoin), trimetadion, folik asit antagonistleri, antikoagulan ilaçlar, talidomid, tetrasiklinler, streptomisin, lityum, androjenik hormonlar, dietil stilnoestrol, antineoplastik ilaçlar, antitiroid ilaçlar, isotretininoin (Vit. A ve analogları) ve valproik asit olarak sınıflandırılmıştır.

Antiepileptik ilaçlar kimyasal yapılarına göre çeşitli gruplara ayrılarak kullanılırlar. Bu ilaçların hepsi epilepside epilepsi nöbetlerini önlemek için (profilaktik olarak) sürekli kullanılırlar.

Günümüzde hamileliği sırasında epilepsi nöbeti geçirme riski olan anne adaylarına tedavi amacıyla çeşitli antiepileptik ilaçlar verilmektedir.

Antiepileptik ilaçların gebelikte kullanımı ile ortaya çıkan fetal malformasyonlar, ilk olarak 1968'de tanımlanmıştır. Major malformasyonlar, bütün antiepileptik ilaçlarla bağlantılıdır. Ancak bunlar içinde teratojenik etki potansiyeli en yüksek olanlar, trimetadion, fenitoin, valproik asit, karpamazepin ve fenobarbital'dir.

Fenitoin absans epilepsi dışında bütün epilepsi tiplerinde primer antiepileptik ajandır. Status epileptikusta diğer hızlı etkili antiepileptiklerle beraber kullanılır. Fenitoin aynı zamanda kafa travması, alkol çekilme sendromu ve aşırı ilaç alımları gibi durumlarda profilaktik olarak kullanılmaktadır; fakat sadece kafa travmasında kullanımının yararlı olduğu kanıtlanmıştır.

Fenitoin'in gebelikte kullanılması durumunda insanlarda ve hayvanlarda morfolojik ve davranışsal anomaliler oluşturduğu saptanmıştır. Fenitoin, fare ve sıçan gibi rodentlerde (kemiriciler) teratojeniktir. Gebelik sırasında fenitoin ile tedavi edilmiş rodentlerde en yaygın defektler, yarı dudak ve/veya damak, hidrocefali (beyin ventriküllerinde aşırı BOS birikimi) hidronefroz (böbrek, pelvis renalis ve kalikslerde idrar birikimi sonucu organın şişmesi ve üreteri tıkanması), uzun kemiklerde kısalma ve ekterodaktili (el ve ayak parmaklarından bir bölümünün ya da hepsinin doğuştan eksikliği) içine alan iskelet anomalileridir.

Hamilelik sırasında kullanılan antikonvulsan ilaçlar kandaki folik asit konsantrasyonunu azaltır. Folik asit seviyesindeki düşüş, ilacın toksisitesini artırır. Bu yüzden teratojenik etkiler folik asidin birlikte kullanımı ile azaltılabilir. Hamilelere E vitamini verilmesi gebeliğin daha güvenli geçmesine katkı sağlar.

Hayvan deneylerinde, doğumdan sonra ortaya çıkan iskelet malformasyonlarını inceleyebilmek için farklı yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan çalışmamızda kullanılan yöntem yumuşak

dokuların klasik diseksiyon tekniği ile uzaklaştırıldıktan sonra fetus iskeletinin boyanarak incelenmesidir. Fetus iskeletinin kıkırdak parçalarının boyanmasında alcian blue, kemik parçalarının boyanmasında alizarin Red S yaygın olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, fenitoin'in sıçan embriyonal gelişim süresince oluşturduğu iskelet sistemi malformasyonlarını önlemede folik asit ve vitamin E'nin koruyucu rolünün belirlenmesi ve sonuçların ikili iskelet sistemi boyama yöntemi ile ortaya konması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İSKELET SİSTEMİ GELİŞİMİ

İskelet sistemi, paraksiyal mezoderm, lateral plak mezoderminin somatik plağı ve nöral krestten gelişir. Paraksiyal mezoderm, nöral tüpün her iki yanında segmentler halinde uzanan ve baş bölgesinde **somitomer**, oksipital bölgeden kaudale doğru da **somit** adı verilen doku blokları oluşturur. Somitler daha sonra, sklerotom olarak adlandırılan bir ventromedial ve dermomyotom denilen bir dorsolateral bölümü oluşturmak üzere farklılaşırlar. Daha sonra sklerotom hücreleri mezenşim veya embriyonik bağ dokusu olarak adlandırılan gevşek doku örgüsünü meydana getirirler. Mezenşimal hücreler fibroblast, kondroblast veya osteoblast haline dönüşürler (1).

Mezenşimin kemik oluşturma kapasitesi sadece sklerotom hücreleri ile sınırlı değildir. Somatik mezoderm plağı, pelvis, omuz ve ekstremiteler kemiklerinin oluşmasına katkıda bulunur. Baş bölgesindeki nöral krest hücrelerinin mezenşimal farklılaşma göstererek yüz kemiklerinin oluşumuna katıldıkları, buna karşın oksipital somitler ve somitomerlerin kafatası kubbesi ve tabanının büyük bir kısmını oluşturdukları gösterilmiştir (1).

2.1.1. Kıkırdak histogenezi

Kıkırdak dokusu, embriyonun mezenşimal yapılarından gelişir. Kıkırdağın gelişeceği bölgelerde meydana gelen ilk değişiklik, mezenşimal hücrelerin bir araya toplanması ve uzantılarını geri çekerek yuvarlak hale gelmesidir. Kıkırdaklaşma merkezlerini oluşturan mezenşimal hücreler farklılaşarak doğrudan ara maddeyi ve matriks fibrillerini sentezleyen **kondroblastlara** dönüşürler. Kıkırdak hücrelerinin farklılaşması merkezden periferine doğru olur. Kondroblastlar yeterli miktarda matriksi salgıladıktan sonra **kondrositlere** dönüşür. Kıkırdak dokusu gelişirken yüzeydeki mezenşim dokusu da farklılaşarak fibroblast ve kondroblastlardan oluşan perikondriumu oluşturur (2,3).

Kıkırdak dokusu, hücrelerarası esas maddede bulunan fibrillerin karakterine ve kıkırdak hücrelerinin dizilimine göre üç tipe ayrılır. Bunlar, hyalin, fibröz ve elastik kıkırdaklardır (3-5).

Hyalin kıkırdak, fetusta ilk iskeleti oluşturan tip olup en geniş dağılım alanına sahiptir. Endokondral kemikleşme sırasında epifiz plağı olarak adlandırılan bölgede bulunur ve kemiğin uzunlamasına büyümesinden sorumludur. Ayrıca yetişkinlerde uzun kemiklerin eklem yüzeyini örter, kaburgaların sternuma tutunma yerindeki kıkırdaklar, burun kıkırdakları, larinks, trakea ve bronşlardaki kıkırdaklar hyalin kıkırdaktan yapılmıştır.

Fibröz kıkırdak, sıkı bağ dokusu ile hyalin kıkırdak arasında bulunur; bu özelliği ile bir geçiş dokusu olarak görev yapar. Vücutta art. intervertebralis'lerde discus intervertebralis olarak, symphysis pubis, art. sternoclavicularis, art. radiocarpalis ve art. temporomandibularis'te discus articularis olarak bulunur. Ayrıca art. genu'da bulunan meniscus'lar ve tendonların kemiğe tutunma bölgeleri fibröz kıkırdak özelliğindedir.

Elastik kıkırdak, genel olarak hyalin kıkırdağa benzer ancak hyalin kıkırdak kadar dirençli değildir. Organizmada, kulak kepçesi kıkırdağı, dış kulak yolu kıkırdağı, Eustachi (Ostaki) borusu kıkırdağı, larinkste bulunan cartilago epiglottica, cartilago corniculata, cartilago cuneiformis, cartilago arytenoidea'nın processus vocalis'i ile cartilago alaris major elastik kıkırdak özelliğindedir (3-5).

2.1.2. Kemik histogenezi

Kemik dokusunun şekillenmesi karmaşık bir süreçtir. Kemik dokusu embriyoda ve ileriki hayat devresinde bağ dokusunun farklılaşması ile meydana gelir. Gerek embriyonal gerekse postnatal hayatta ilk kemikleşme merkezleri küçük sahalarda şeklinde ortaya çıkmaktadır (2, 4, 5).

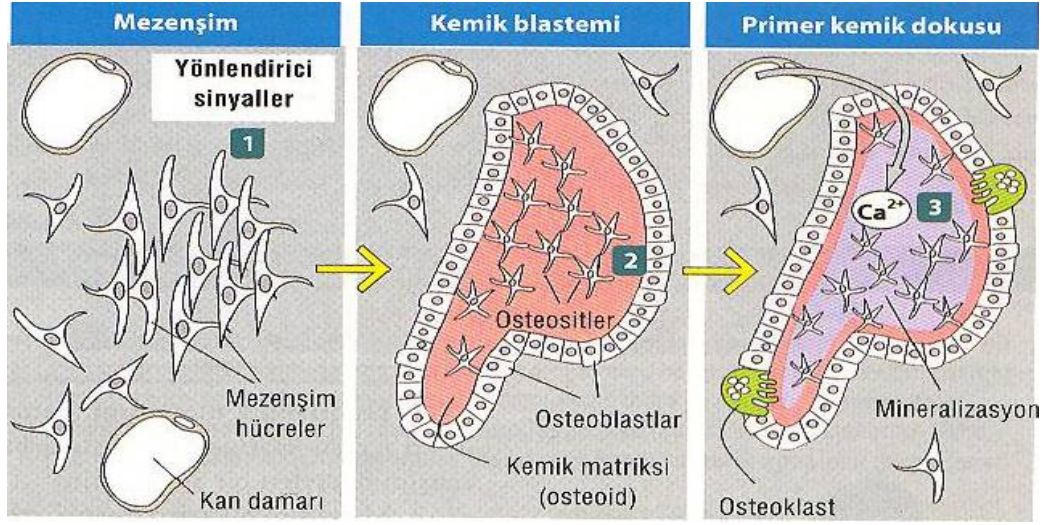
Bir kemiğin fetal dönemdeki gelişimi genel olarak iki tipte (intramembranöz ve endokondral kemikleşme) ortaya çıkar. Her iki yolla da oluşan ilk kemik primer kemik özelliğindedir. Ortaya çıkan primer kemik hızla yıkılarak yerine sekonder kemik dokusu konur. Daha sonra kemik dokusu periosteal ve epifizial plak aktivitesi ile büyümeye devam eder (2, 5-9).

2.1.2.1. İntramembranöz kemikleşme (Desmal kemikleşme)

Embriyonal hayatta en basit kemikleşme, bağ dokularının veya mezenşim dokunun kemikleşmesidir. Bu kemikleşme sırasında bağ dokusu, kıkırdak dokuya dönüşmeden direkt olarak kemik dokuya dönüşür. İnsanda ilk intramembranöz kemikleşme gebeliğin yaklaşık olarak 8. haftasında ortaya çıkar ve ilk olarak clavicula'da görülür. Neurocranium kemikleri, viscerocranium'a ait yassı kemikler, maxilla ve mandibula'nın büyük kısmı bu yolla kemikleşir (2-5, 7, 10, 11).

İntramembranöz kemikleşme gevşek mezenşimal doku içerisindeki mezenşimal hücrelerin göç ederek belirli bölgelerde yığılmaları (mezenşimal kondensasyon) sonucunda başlar. Mezenşimal yoğunlaşmanın olduğu bölgelerde damarlanma artar ve mezenşimal hücreler hem büyürler ve hemde şekillerini değiştirerek yuvarlak görünüm kazanırlar. Bu değişikliklerin sonucunda mezenşimal hücreler osteoblastlara farklılaşırlar. Osteoblastlar da kemik matriksini üretmeye başlarlar. Kemikleşmenin başladığı bu ilk bölgelere ilk kemikleşme noktası veya primer ossifikasyon merkezi (POM) adı verilir (2, 4, 10, 11) (Şekil 2.1.).

İlk kemikleşme noktasında oluşan küçük kemik tabakası spongiöz karakterde olup süngerimsi bir yapı gösterir. Bu yapı periosteumun periferden sürekli yeni kemik doku oluşturmasıyla büyür ve gelişir. Sonunda iki tabaka halinde kompakt kemik dokusu (lamina externa ve lamina interna) ile bunlar arasında süngerimsi kemik dokusu (diploe) bulunan yassı kafatası kemikleri meydana gelmiş olur.



Şekil 2.1. İntramembranöz kemikleşmenin aşamaları

- 1- Mezenşimal hücreler osteoblastlara farklılaşırlar.
- 2- Osteoblastlar kemik matriksini üretmeye başlarlar.
- 3- Primer kemik dokusu oluşur (11).

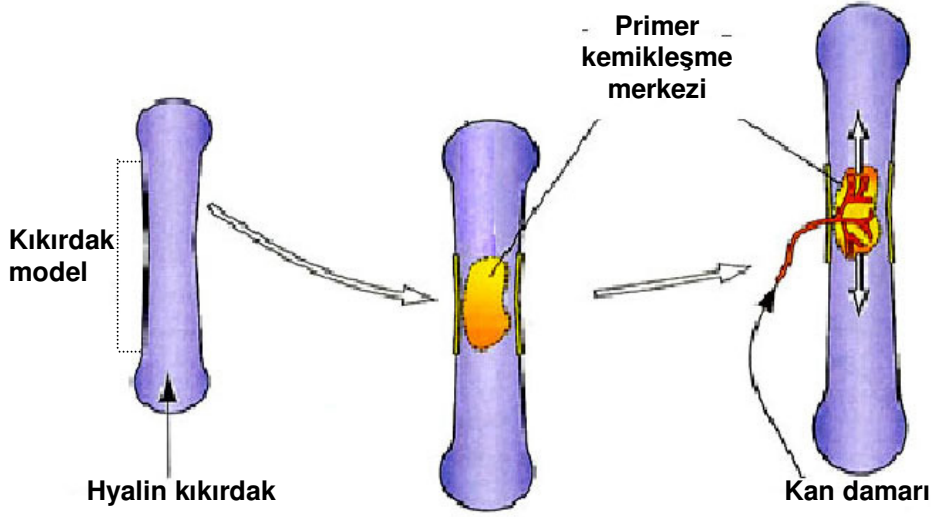
2.1.2.2. Endokondral kemikleşme

Bu yolla kemikleşmede kemiğin oluşacağı alanda öncelikle bir kıkırdak model oluşur. Daha sonra bu kıkırdak model ortadan kalkarak yerini kemik dokuya bırakır (11). Ekstremitelerdeki kemikleri ve aksiyal iskelet parçaları uzun kemikler, omurlar, pelvis iskeleti ve kafatası tabanını oluşturan kemikler endokondral kemikleşme ile gelişir (2, 3, 7, 11).

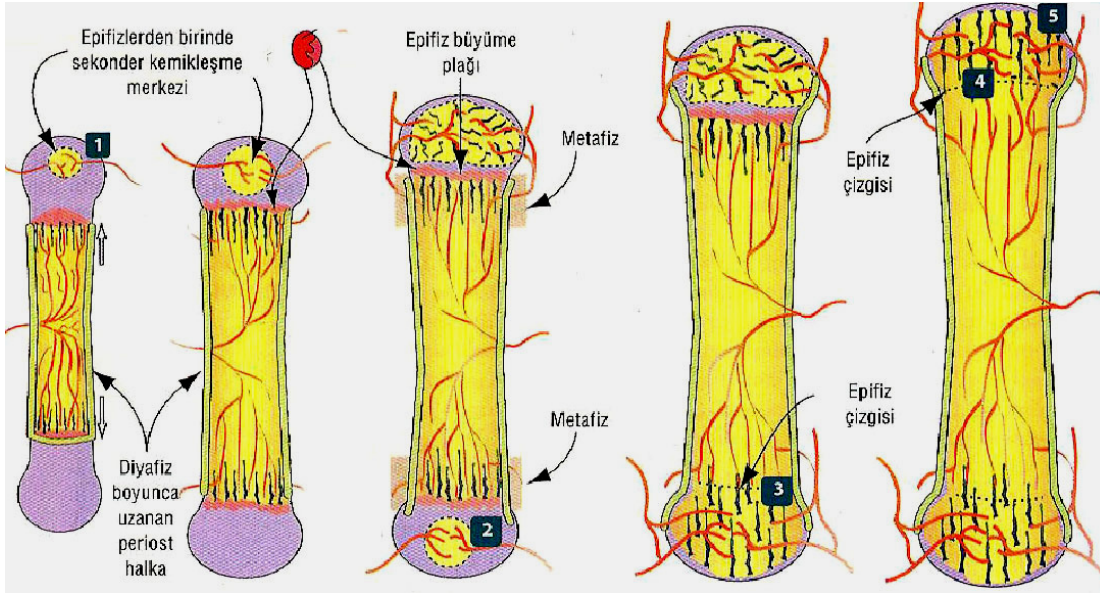
İntramembranöz kemikleşmede olduğu gibi, endokondral kemikleşme sürecinde de primer kemikleşme merkezi (POM) oluşur. Primer kemikleşme merkezi diyafizin merkezinde bulunur (Şekil 2.2.). Fötal hayatın sonuna kadar var olan primer kemikleşme merkezinin oluşması endokondral kemikleşmenin ilk aşamasını oluştururken, ikinci aşama doğumdan sonra epifizlerde gelişen sekonder kemikleşme merkezleri (SOM) ile başlar (2, 3, 7, 11) (Şekil 2.3).

Endokondral kemikleşmede, öncelikle ileride kemiğin oluşacağı bölgede mezenşimal hücrelerde proliferasyon ve yığılma başlar. Daha sonra mezenşimal hücreler farklılaşarak kondroblastlara dönüşürler. Kondroblastlar da oluşacak kemiğin genel şekli ve görünümüne sahip bir hyalin kıkırdak oluşturur. Kıkırdak model intertisiyel büyümeyle uzunlamasına ve perikondrium aktivitesiyle enine büyüme gösterir (2, 3, 7, 11).

Bebek doğduğunda uzun kemiklerin gövde ve diyafizleri büyük oranda kemikleşmiştir, fakat epifizleri hala kıkırdak yapıdadır ve kemikleşme oldukça geç başlar. Sadece femurun distal epifizinde doğumdan az önce başlar. Sekonder kemikleşme merkezlerinin çoğu doğumdan sonraki birkaç yıl içinde epifizlerde belirir. Epifizlerde meydana gelen kemikleşme merkezlerinin büyümesiyle kıkırdak taslak epifiz ile diyafiz arasında kemiğin her iki ucunda da epifiz kıkırdağı olarak kalır. Epifiz kıkırdağı uzun kemiklerin uzunluğuna büyümesinde asıl rolü oynar ve puberteye kadar kıkırdak halinde kalır. Kemik tüm uzunluğuna ulaştığında epifiz plakları kaybolarak, epifiz bölgeleri kemik bölgesi ile birleşir. Epifiz plağı uzun kemiklerde uç kısımlarda bulunurken kısa kemiklerde tek ucta bulunur. Omurlar gibi düzensiz kemiklerde ise bir veya birkaç primer kemikleşme merkezinin yanı sıra, genellikle çok sayıda sekonder merkeze de rastlanır (12).



Şekil 2.2. Endokondral kemikleşme: Primer kemikleşme merkezi, Kıkırdak model üzerinde oluşan bir uzun kemik (11).



Şekil 2.3. Endokondral kemikleşme

1 ve 2- Sekonder kemikleşme merkezi 3 ve 4-Epifiz çizgisi 5- Epifiz (11).

2.2. SIÇANLARDA İSKELET SİSTEMİ GELİŞİMİ

Sıçanlarda gebelik 21-22 gün sürer. İntrauterin hayatın 9. ve 10. günleri organogenezis dönemidir. Sıçanlarda somit oluşumu 9. günün sonunda ve 10. günde başlar. Her gün yeni somitlerin ilave olmasıyla artarak (10. günde 0-4 somit, 11. günde 4-13 somit, 12. günde 13-28 somit, 13. günde 28-40 somit, 14. günde 40-48 somit, 15. günde 48-58 somit, 16. günde 58-65 somit gelişir) devam eder ve 16. günde somit gelişimi tamamlanır. Yaklaşık 65 somitin, 4'ü oksipital, 8'i servikal, 13'ü torakal, 6'sı lumbal, 4'ü sakral, 30'u kaudal bölgede bulunur (13, 14, 17).

Sıçan embriyosu 10,5 günlük iken embriyoda, nöral krest, kas-iskelet sistemi, kalp, ön bağırsak ve karaciğer tomurcukları ile somitler (7-9 arasında) belirginleşmiştir. Sıçan embriyosu 12,5 günlükken bütün organlar belirgindir. Sıçan embriyosunun bu dönemi insan embriyosunda 8. haftaya denk gelir (13, 15,16).

İlk kemikleşme merkezleri somit oluşumunun bittiği gün olan 16. günden itibaren görülmeye başlar. Bu merkezler ilk olarak klavikula, kaburgalar ve kafatasının bazı kemiklerinde görülür. 16. günde kalça, diz, omuz ve dirsek eklemlerine ait boşluklar belirginleşmeye başlar.

Kemikleşme, 17. günde ekstremitte tomurcuklarına ve kafatasının diğer kemiklerine yayılırken, el bileği ve ayak bileği eklemlerine ait boşluklar belirginleşir. 18. günde kafa hızla büyür ve damak taslakları kaynaşır. 19. ve 20. günlerde ön ve arka ekstremitelerin parmak eklemlerine ait boşluklar ortaya çıkar (13, 14).

Sıçanların embriyolojik gelişimleri Witschi evrelendirmesine göre Tablo 2.1’de özetlenmiştir (14, 18).

Tablo 2.1. Sıçan embriolarında gelişimsel sınıflama

Standart evreler (Witschi)	Yaş (gün)	Boyut (en x boy) (mm)	Evrelerin özellikleri
Yarıklanma ve Blastula			
1	1	0.07	Ovidukt (tuba uterina) içinde tek hücreli evre
2	2	(0.08 X 0.06)	Ovidukt içinde 2 hücreli evre
3	3	(0.08 X 0.05)	Ovidukt içinde 4 hücreli evre
4	3.5		Ovidukt içinde 8-12 hücreli evre
5	3.25	(0.08 X 0.04)	Uterus içinde morula
6	4	(0.08 X 0.03)	Uterus içinde erken blastosist dönemi
7	5	(0.12 X 0.05)	Uterus içinde serbest blastosist dönemi
Gastrula			
8	6	(0.28 X 0.07)	Blastosist, embriyonal kutup ve iç hücre kitlesiyle implante olmaya ve endoderm (hipoblast) gelişmeye başlar.
9	6.75		İki sıralı trofoblastlar, iç hücre kitlesini ve endodermi çevrelemeye başlar.
10	7.25	(0.3 X 0.1)	İmplantasyon bitimine yakın dönemde iç hücre kitlesi embriyo ve ekstraembriyonik oluşumlara farklılaşmaya başlar.
11	7.75	(0.5 X 0.1)	İmplantasyon tamamlanır. Embriyonal kutupta primer amniyotik kese ortaya çıkar.
Primitif çizgi			
12	8.5	(1.04 X 0.26)	Bağlantı sapı ve amniyon boşluğu şekillenir. Ayrıca primitif çizgi, üçüncü germ yaprağı, kalp ve perikard taslakları şekillenmeye başlar.

Tablo 2.1. Sıçan embriyolarında gelişimsel sınıflama (devamı)

Standart evreler (Witschi)	Yaş (gün)	Boyut (en x boy) (mm)	Evrelerin özellikleri
Nörula			
13	9	1.0	Presomit nörulasyon; amniyokoryonik katlantıların birleşmesi, nöral plak, embriyo kıvrımları ve allantois kesesinin tomurcuğu şekillenir.
14	9.5	1.5	1-4 oksipital somitler şekillenir. Amnion boşluğu, eksosölom ve ektokoryonik kese ihtiva eden bir embriyo şekillenir. Ektokoryonik kese kollapse olur, allantois sapı ekzosölom boşluğuna doğru uzanır ve embriyonun dorsal kıvrımı artar.
15	10	2	5-12 servikal somitler, 1. visseral arkus şekillenir. Ektokoryonik kese, ektoplasenta ve allantoik sap ile kaynaşır. Vitellus kesesinin alt bölümü ve trofoektoderm geriler. Reichart membranı ve endoderm içinde primordial germ hücreleri görülür.
16	10.5	2.4	13-20 no'lu üst torakal somitler, 2. visseral arkus, kol ve bacak tomurcukları görülür. Embriyonun ventrale doğru katlanması artar.
17	11	3.3	21-25 no'lu alt torakal somitler şekillenir. Vitellus kesesi 15 no'lu somite yaklaşır. Mezenterium içindeki primordiyal germ hücreleri şekillenir. Primitif çizgi kaybolur. Kuyruk tomurcuğu şekillenir, kol ve bacak tomurcukları belirginleşir.
Embriyonun arka bölgesi			
18	11.5	3.8	26-28 no'lu üst lumbal somitler, 3. visseral arkus ile kol tomurcukları iyice belirginleşir.
19	11.75	4.2	29-31 no'lu alt lumbal somitler, I-IV visseral arkuslar, servikal kıvrımlar görülür.
20	11.875	5	32-33 somitli evre olup ilk kez sakral somitler ortaya çıkar.
21	12	5.1	34-35 somitli evre olup alt sakral somitler ve derin servikal sinüsler ortaya çıkar.
22	12.125	5.2	36 somit sayısına ulaşılır. Birinci kaudal somit ile burun çukurlukları görülür.
23	12.25	5.6	37-38 somitli evre olup göbek fıtığı başlangıcı görülebilir.
24	12.375	6	39. ve 40. somitler gelişir.
Embriyo gelişiminin tamamlanması			
25	12.5	6	41 ve 42. kaudal somitler şekillenir, oksipital somitler kaybolur ve 4 tane visseral arkus ile derin servikal sinüsler gelişimine devam eder. 8-14. somitler seviyesinde kol tomurcukları uzayıp belirginleşir. Ayak tomurcukları ise 28-31. somitler seviyesinde gelişir fakat daha küçüktürler. Embriyo gövdesi 1.5 turluk bir dönüş yaparak sol yüz ve gövde, vitellus kesesine bakar, sağ taraf ise plasentaya doğru yönelir. Kuyruk ve allantoik sap plasentaya doğru uzar.

Tablo 2.1. Sıçan embriyolarında gelişimsel sınıflama (devamı)

Standart evreler (Witschi)	Yaş (gün)	Boyut (en x boy) (mm)	Evrelerin özellikleri
Embriyonun metamorfozu			
26	12.75	7	43-45 somitli evre. Bu evrede kaudal somitler; mandibula, maksilla ve frontonazal kemikler uzar, servikal sinüsler kapanmaya başlar. Meme taslakları, el plaklarının farklılaşması hızlanır. El tomurcukları damarlanır ve brakiyal sinirleri alır. Göbek fıtığı başlar.
27	13	8	46-48 somitli evre. Yüzdeki çıkıntılar ve yarıklar, burun uzantısı şekillenir ve servikal sinüsler kapanır. Primer meme bezleri, el ve ayak plaklarının yuvarlaklaşması görülür. Göbek fıtığı belirginleşir.
28	13.5	8.5	49-51 somitli evre olup kaudal somitler şekillenir. I. visseral yarık dış kulak yoluna dönüşür ve el plaklarında kıkırdak taslakları yoğunlaşır.
29	14	9.5	52-55 somitli evredir. Kaudal somitler şekillenir. I. ve II. visseral arkuslarda kulak kepçesinin çıkıntıları görülür.
30	14.5	10.5	56-60 somitli evre. Kaudal somitler şekillenir. Mandibula'da kıkırdak taslakları görülür. Dış kulak yolunun açıklığı hemen hemen yuvarlaklaşmıştır. Pleura-periton arasında dar bir kanal şekillenir.
31	15	12	61-63 somitli evre. Kaudal somitler şekillenir. Yüz yarıkları, pleura-periton kanalı kapanır ve diyafragma oluşur.
32	15.5	14.2	64. kaudal somit şekillenir. Kulak kepçesi çıkıntısı belirginleşir. Göbek fıtığı maksimum büyüklüğüne ulaşır.
33	16	15.5	En son kaudal somit olan 65. somit şekillenir. Metamorfozun son evresidir.
Fetus			
34	17-18	16-20	Fetusun 1. evresi: Göz kapakları hızla gelişir (18. günün sonunda gözler tamamen kapanır). Damak şekillenir, auricula dış kulak yolunu çevreler ve göbek fıtığı ortadan kalkar.
35 doğum öncesi	19-22	20-40	Fetusun 2. evresi: Göz kapakları birbirine tam yaklaşır. Fötal membranlar ve plasentanın gelişimi maksimum seviyededir, kuyruk uzunluğu 10 mm'ye kadar ulaşır. Doğum oluşur (Sıçanlar 22. ve fareler 19. günde doğar).
35 doğum sonrası	1-16 doğum sonrası	40-100 ¹	Doğumdan sonra fetus solumaya başlar. 1. ile 16. günler arasında göz kapakları ve dış kulak yolu halen kapalıdır.
36 doğum sonrası	17 + doğum sonrası	100+ ¹	Dış kulak yolu kapalıdır, göz kapakları ise açılır. 17. günden sonraki 3 gün içinde aktif olarak beslenmeye başlar ve 1 hafta sonra da süttten kesilir.

Yaş (gün): fertilizasyondan sonra**Boy (mm):** en küçük ve en büyük boyutlar.

2.3. SIÇANLARIN İSKELET SİSTEMİ

İskelet gelişimi ana hatlarıyla bütün memelilerde benzerlikler gösterir. Ancak detaylar oldukça farklıdır. İskelet sistemi skeleton axiale ve skeleton appendiculare olmak üzere iki kısma ayrılarak incelenir.

1-Skeleton axiale (aksiyal iskelet); kafatası, omurga ve göğüs kafesi kemiklerinden oluşur.

Kafatası kemikleri: Sıçan kafatası bir kısmı tek, bir kısmı çift olmak üzere toplam 28 kemikten meydana gelmiştir.

Tek olanlar: Os occipitale, os ethmoidale, os hyoideum, vomer, os interparietale, os palatinum'dur.

Çift olanlar: Os parietale, os temporale, os nasale, maxilla, os lacrimale, os zygomaticum, os pterygoideum, os frontale, os sphenoidale, os incisivum ve mandibula'dır. Kulak kemikçikleri 4 çifttir. Bunlar; stapes, incus, os lenticulare ve malleus'tur.

Omurga: Sıçan omurgası toplam 57-61 vertebradan oluşmuştur. Bunların 7'si servikal, 13'ü torakal, 6'sı lumbal, 4'ü sakral ve 27-31'i kaudal bölgeye aittir. Servikal vertebraların en büyüğü atlas ve axistir. Axisin spinal çıkıntısı kısadır. Vertebral kanal servikal 4. vertebra seviyesinde en geniş olup yaklaşık 5 mm'dir. Torakal vertebraların boyları kuyruk kısmına doğru 2 mm'den 7 mm'ye kadar doğrusal olarak artar. Torakal bölgede vertebral kanalın çapı servikal bölgeye oranla daha dar olup burada yaklaşık olarak 3.3 mm kadardır. Torakal vertebraların spinöz çıkıntıları uzun ve sivridir. Tüm torakal vertebraların gövdelerinde kaburgalar ile eklem yapmaya yarayan eklem yüzleri bulunur. Bununla birlikte ön torakal vertebraların transvers çıkıntıları üzerinde de kaburgalarla eklem yapmaya yarayan eklem yüzleri vardır. Lumbal vertebraların, büyük gövdeleri, geniş ve belirgin çıkıntıları vardır. Sakral vertebraların transvers çıkıntıları ve eklem çıkıntıları oldukça belirgindir. Transvers çıkıntıları pelvik kemer yapısının oluşumuna katılır. Sakrumun toplam uzunluğu 20-23 mm'dir. Kaudal bölgede bulunan vertebraların ilk dördü son sakral vertebraya benzer. Kaudal bölgede bulunan omurların sadece ilk ikisinde arkus vertebralis tam olarak gelişir. Daha sonraki omurların arkus vertebralis'i tam olarak kapanmaz ve arka kısımları U şeklinde açık kalır. Bu kısım özellikle kuyruğun sonuna doğru yassılaşarak uzamıştır (13).

Göğüs kafesi kemikleri: Sıçanlarda 13 çift kaburga ve 1 adet sternum olmak üzere toplam 27 adet kemik bulunur. Kaburgalar her iki tarafta dorsalde göğüs omurları ile ventralde de sternum ile eklem yaparlar. 13 çift kaburganın ilk 7 çifti sternum ile direkt olarak eklem yaparlar (costae verae), 6 çifti sternum ile direkt eklem yapmaz (costae spuriae). Son 6 çift kaburganın ilk 3 çifti 7. kaburgaya tutunarak sternumla bağlantı kurarlar, son 3 çifti ise serbest olarak sonlanırlar (costae fluctuantes). Sternum göğüs kafesinin önünde ve orta hatta bulunan bir kemiktir.

2- Skeleton appendiculare (appendiküler iskelet); ön ve arka taraf kemiklerinden oluşur.

1- Ön taraf kemikleri: Clavicula, scapula, humerus, radius ve ulna ile ön ayak kemiklerinden oluşur. Sağ ve sol tarafta toplam 64 adettir.

Ön ayak iskeleti 27 adet kemikten oluşur. Bunlar; ossa carpi (8 adet), ossa metacarpi (5 adet) ve ossa digitorum manus (14 adet) olarak dizilirler.

Ossa carpi: İki sıra halinde dizilmişlerdir. Proksimal sırada 2 adet kemik bulunur. Medialde os carpi intermedioradiale (os carpi radiale ve os carpi intermedium'un birleşmesinden oluşur), lateralde ise os carpi ulnare bulunur. Distal sırada ise 6 adet kemik bulunur. Bunlar, os carpale I, os carpale II, os carpale III, os carpale IV, os carpale V ve os carpi centrale olarak adlandırılırlar.

Ossa metacarpale: 5 adet metakarpal kemik vardır. Bunların en kısısı I. Metakarpal, en uzununu ise III. metakarpal'dir.

Ossa digitorum manus: Birinci parmakta 2, diğer 4 parmakta 3'er tane falanks olmak üzere toplam 14 adet kemikten oluşur (19).

2- Arka taraf kemikleri: Os coxae, femur, tibia, fibula ve arka ayak kemiklerinden oluşur. Sağ ve sol tarafta toplam 64 adettir. Ayrıca sağ ve solda olmak üzere 2 adet patella bulunur.

Arka ayak iskeleti 27 adet kemikten oluşur. Bunlar; ossa tarsi (8 adet), ossa metatarsi (5 adet) ve ossa digitorum pedis (14 adet) olarak dizilirler.

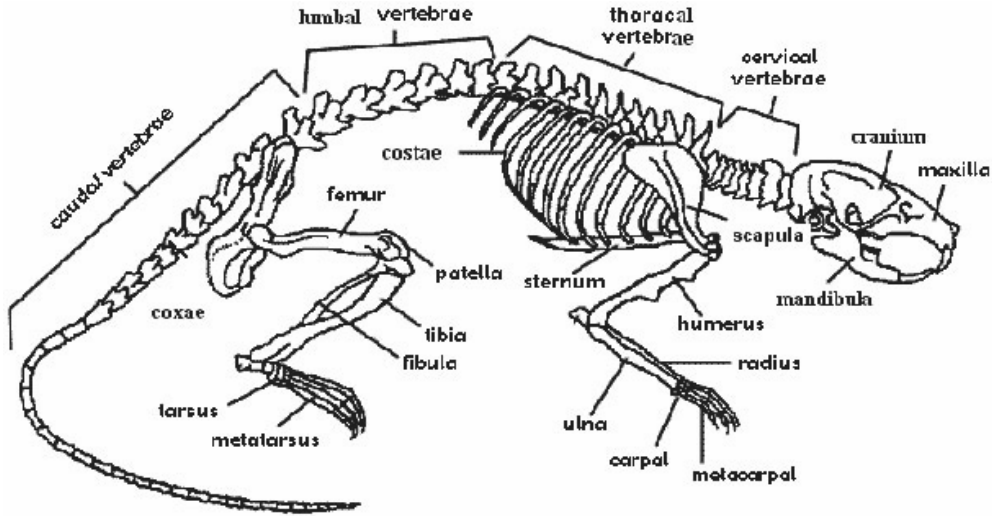
Ossa tarsi: 8 adet kemikten oluşur. Bu kemikler iki sıra halinde dizilmişlerdir. Proksimal sırada medialden laterale doğru, os tibiale mediale tarsi s. prehallux, talus ve calcaneus bulunur. Distal sırada medialden laterale doğru os tarsale I, os tarsale II, os tarsale III, os tarsale IV bulunur.

Distal sıra ile proksimal sıra arasında os tarsi centrale vardır. Os tarsale IV distal sıra kemiklerinin en büyüğüdür.

Ossa metatarsi: 5 adet metatarsal kemik vardır. En kısası metatarsal I, en uzununu ise metatarsal III'tür.

Ossa digitorum pedis: Birinci parmakta 2, diğer 4 parmakta 3'er tane olmak üzere toplam 14 adet falanks vardır (20) (Şekil 2.4).

Sıçanda tibia ve fibula kemiklerinin anatomik yapısı insandakinden biraz farklıdır. Aslında anatomik olarak tibia ve fibulayı sıçanda tek bir kemik olarak ele almak da mümkündür. Çünkü tibia ve fibula distalde ve proksimalde birleşen tek bir kemik halindedir. Çok genç hayvanlarda bile en azından kısmi bir kemikleşme ile olan bu birleşme yaş ilerledikçe tam bir kemikleşme ile tek bir yapıya dönüşür. Ancak dikkatle incelenirse iki kemik arasındaki demarkasyon (birleşme) çizgisi yaşlı hayvanlarda bile görülebilir. Birleşme kraniyalde fibröz eklemleşme tipinde iken kaudalde tam füzyon mevcuttur. Sıçan fibulası 400-500 gr'lık hayvanlarda 27-30 mm uzunluğundadır (21).



Şekil 2.4. Rat iskelet sistemi görünümü (22)

2.4. İLAÇLARIN TERATOJENİK ETKİSİ

Konjenital malformasyonlar, embriyogenezis aşmasında oluşan ancak doğumdan sonra görülebilen anatomik ya da yapısal anomalilerdir.

Bazı ilaçlar ve kimyasal maddeler gebe kadınlar tarafından alındıklarında plasentadan fetal dolaşıma geçerek fetusta malformasyonlara veya ölüme kadar gidebilen kalıcı bozukluklara neden olurlar. Bu duruma **teratogenezis** adı verilir. Teratogenezis oluşturan ilaç ve diğer etkenlere **teratogen** veya **teratogenic maddeler** denilir. Bu maddelerin yaptığı konjenital malformasyonları inceleyen bilim dalına **teratoloji** adı verilmiştir (23, 24).

Bazı maddeler ön-teratojen sayılırlar; bunların kendileri değil, fakat vücutta oluşan metabolitlerinden biri veya birkaçı teratojenik etki yaparlar. Teratogen metabolit genellikle anne vücudunda oluşur ve plasentayı geçerek fetusa ulaşır. Ancak bazen teratojen metabolitin, anne tarafından alınan ilacın plasentayı aşip fetus dolaşımına geçtikten sonra, fetus dokusundaki enzimler tarafından oluşturulması da mümkündür. Teratogenik etki, daha kapsamlı bir deyimle **fetotoksik etki** olarak da adlandırılır (23, 25).

Plasenta, ilaçların pasif difüzyonla geçmesine çok elverişli olan bir yapı olup gerçekte bir engel sayılmaz. Sanıldığından çok sayıdaki ilaç veya onlar tarafından oluşturulan metabolitler plasentadan fetusa geçer fakat teratojenik etki göstermez (23).

İnsanlarda güçlü teratojenik etkiye sahip olarak bilinen ilaçlar, difenilhidantoin (PHT, fenitoin), trimetadion, folik asit antagonistleri, antikoagulan ilaçlar, talidomid, tetrasiklinler, streptomisin, lityum, androjenik hormonlar, dietil stilnoestrol, antineoplastik ilaçlar, antithyroid ilaçlar, isotretinoin (Vit. A ve analogları) ve valproik asit olarak sınıflandırılmıştır. Buna göre valproik asit bir antikonvülsan ajan olup hayvanlarda teratojenik olarak bilinmektedir (26).

Talidomid adlı ilaç, 1950'lerin sonunda Batı Almanya'da piyasaya çıkarılmış, gebelerde aşerme, bulantı ve kusmalara karşı da kullanılan hipnosedatif ilaçtır. 1960'lı yılların başlarında adı geçen ülkede malformasyonlu doğum oranının birden yükselme gösterdiğinin saptanması, talidomid'in teratojenik etkisinin fark edilmesini sağlamıştır. Bunun üzerine talidomid'in kullanılması yasaklanmış ise de Almanya ve İngiltere gibi ilacın kullanıldığı ülkelerde malformasyonlu çocukların doğmasının önüne geçilememiştir. Talidomid 10.000'den fazla bebeğin malforme doğmasına neden olmuştur. Bu olay **talidomid faciası** olarak tıp tarihine geçmiştir. Bu durum

daha doğmamış canlılarda ilaç teratojenitesinine ve ilaçların potansiyel tehlikelerine dikkat çekmiştir (24, 27).

Embriyo gelişimi, teratogenlerden en çok organogenez döneminde etkilenmektedir. Bu organogenezis dönemi boyunca, teratojenik ajanlar büyük kongenital anomalilere neden olabilmektedirler. Fizyolojik defektler, dış kulaktaki minör yapısal anomaliler ve zekâ geriliği gibi fonksiyonel bozukluklar fetal dönem boyunca fetusun etkilenmesinden kaynaklanmaktadır. Bu evrede; organogenezisin çok yoğun olması nedeniyle nükleik asitlerin, sitoplazmik proteinlerin, hücre zarı proteinlerinin ve lipidlerin sentezi de içinde olmak üzere, yoğun biyosentez aktiviteleri mevcuttur. Bunun yanı sıra hücre ve hücre toplulukları arasında son derece karmaşık göçler ve şekillenmeler de söz konusudur (24-26).

Gebelik süresi canlılar arasında farklılıklar göstermektedir. Bu süre insanlarda 267 gün iken sıçanlarda 21-22 gündür. Fetal dönemlere **embriyonik dönem** adı verilir (insanlarda ortalama 56 gün); bu dönemin büyük kısmını organogenez dönemi oluşturur. Gebelik süresince embriyonun teratogeniteye en duyarlı olduğu dönemler şunlardır.

Blastosist oluşumu (periimplantasyon dönemi): İnsanda döllenmeyi izleyen 5.-8. günü kapsar, sıçan ve diğer rodentlerde 3.-4. gündür.

Implantasyon: İnsanda döllenmeden sonraki 8.-13. günler arasındır; sıçanlarda 5.ve 6. günlere tekabül eder.

Erken postimplantasyon dönemi: İmplantasyondan sonra nöral plağın görülmesine kadar olan dönemdir.

Organogenez: İzafi olarak nöral plağın görülmesinden damağın kapanmasına kadar geçen süre olarak kabul edilir. İnsanlarda genellikle 18. ve 21. günler arasında başlar, 55.-60. günlere kadar ortalama 36 günlük süreyi kapsar. Sıçanlarda ise 6. günden 15. güne kadar olan 10 günlük süreyi kapsar.

Fetal dönem: Organogenezden sonra gelen ve doğuma kadar olan dönemdir; bu sırada organlar gelişme gösterirler ve fonksiyonel bakımdan olgunlaşırlar.

Fetusun teratogenlere duyarlılığının en fazla olduğu dönem organogenez dönemidir. Gebeliğin bu döneminde alınan belirli bir ilaç, alındığı güne göre farklı yerlerde farklı bozukluklara yol

açar. Gebe sıçanlarda kritik devre özellikle gebeliğin 7.-9. günleridir. İnsan embriyosu gebeliğin ilk üç ayı zarfında ilaç ve diğer teratojenik etkenlere fazla duyarlıdır. Bu dönemin ötesinde gerek kimyasal etkenler gerekse diğer etkenler, genellikle önemli bir malformasyon yapmaksızın, sadece embriyonun intrauterin dönemdeki genel gelişiminde veya embriyonun herhangi bir organının gelişmesinde gerilik ya da görev bozuklukları oluşturabilirler (27).

Food Drugs Administration (FDA) gebelik risk kategorilerine göre ilaçların teratojenik risklerinin sınıflandırılması: Sistemik absorpsiyona uğrayan ve böylece fetusa zarar verme ihtimali bulunan ilaçlar, teratojenik etki yönünden incelenme derecelerine ve böyle bir etki oluşturma risklerinin boyutuna göre 5 kategoriye ayrılırlar. A'dan X'e doğru risk artar.

A kategorisi: Bu kategorideki ilaçlarla ilgili olarak kadınlarda yapılan kontrollü incelemeler, gebeliğin ilk trimestrinde ilacın embriyoya zararının olduğunu göstermemiştir.

B kategorisi: Bu kategorideki ilaçlarla ilgili olarak deney hayvanlarındaki üreme ile ilgili incelemeler, ilacın fetotoksik etkisinin bulunmadığını göstermiştir. Fakat ilaç hakkında gebe kadınlarda yapılmış çalışma yoktur. Yine deney hayvanlarında yapılan bazı araştırmalar ilacın fertilité azalmasının yanında fetotoksik etkisi olduğunu da göstermiştir. Ancak gebe kadınlar üzerinde ilk trimesterde yapılan kontrollü çalışmalar fetotoksik etkiyi doğrulamamıştır. Bu nedenle bu tip ilaçlar gebelerde gerekiyorsa rahatlıkla kullanılabilir.

C kategorisi: Bu kategorideki ilaçlar hayvan incelemelerinde, ya teratojenik veya embriyosid (embriyo öldürücü) etkiye sahiptir. Ya da üreme ile ilgili her hangi bir olumsuz etkiye sahiptir.

D kategorisi: Bu kategorideki ilacın insanda fetus üzerinde zararlı etkisi olduğu kanıtlanmıştır. Ancak bu tip ilaçların kullanılması için anneye yararının, fetusa zararına göre fazla olması gerekir. Gebe kadında yaşamı tehdit eden bir durumun tedavisi için gerekiyorsa veya ciddi bir hastalık halinde daha güvenilir ilaçlar kullanılamıyorsa ya da etkisiz kalmışsa D kategorisindeki ilaç kullanılır. Bu kategorideki ilacın prospektusuna ilacın fetotoksik etkisini açıkça belirten uygun bir uyarı mutlaka konulmalıdır.

X kategorisi: Deney hayvanları veya gebe kadınlar üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda bu gruptaki ilaçların fetotoksik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu gruba dahil olan bir ilaç gebe kadında veya gebe kalma olasılığı bulunan kadınlarda kontrendikedir. İlacın prospektusuna sözü edilen kontrendikasyon açıkça yazılmalıdır.

İlaçlara maruz kalan gebelerde ortaya çıkan malformasyonlu doğum oranları arasında, antiepileptik ilaçların tümünün teratojenik etkisi ortalama %6 iken antiepileptik bir ilaç olan ve D kategorisinde bulunan fenitoin tek başına teratogenik etkisi %10'dur (27).

Deney hayvanları üzerinde yapılan teratojenite çalışmalarında iskelet yapılarında eksiklik ve çeşitli organ defektleri en çok sıçan fetuslarında gözlenir. Ancak bunlar maddenin yüksek dozda uygulanmasının olası teratojenik etkisinin bir belirtisi olabilir. Retinoidler ve çeşitli kimyasallar, malformasyonlara yol açan en düşük dozda bile, sıçanlarda ondördüncü kostanın görülme sıklığını arttırmırlar (28).

Teratojenite çalışmalarında, malformasyonları saptamak için uygulanan standart testler; hayvan fetusunun iç organları ve iskeletinin analizini içerir. Spesifik tekniklerin uygulanmasıyla *in-vitro* şartlarda yetiştirilen sıçan embriyolarının morfolojik analizleri; gövde ve ekstremitelerdeki kıkırdak oluşumu değerlendirilmektedir. Ancak son zamanlarda embriyonik kök hücreleri ile yapılan çalışmalarda bu yöntemler içine dahil edilebilir. 1966'daki Talidomid faciasının ardından ABD'de FDA (Food and Drug Administration); ilaç lisanslarının alımı rehberine, *in-vivo* testleri içeren intrauterin gelişim formları değerlendirmesini eklemiştir. Bu rehberlere göre test maddesi; organogenez adı verilen embriyonik gelişimin en duyarlı dönemi sırasında, gebe dişi hayvanlara uygulanır. Sıçan ve farelerde bu süreç 6. günden 17. güne kadardır. Hayvanların vücut ağırlığı, gıda alımı ve bazı vakalarda su alımı çalışma boyunca kaydedilir. Hayvanların genel durumları yakından gözlemlenir ve yavruların uterusda ölüp ölmediğine dair kanıtlar (kanama, düşük) kaydedilir. Malformasyonlar açısından değerlendirilmesi için fetuslar, beklenen doğum tarihinden yaklaşık bir gün önce sezeryan yapılarak çıkartılır (28).

Teratojenitenin mekanizması: Defektlerin nasıl oluştuğunu açıklayan birkaç hipotez vardır. Bunlardan birincisi; Antiepileptik drug (AED) metabolizmasının epoksidleri ve AED kaynaklı serbest radikaller defektlere neden olabilir. İkincisi; risk altındaki fetusların epoksid hidrolazında veya serbest radikal enzimlerinde genetik eksikliğe neden olabilir. Üçüncüsü; AEDs folik asit metabolizmasında eksikliğe neden olarak teratojeniteye yol açabilir. Diğer faktörler, major fetal malformasyonlara katkıda bulunan polypharmacy (birçok ilacın bir arada kullanılması) ve yüksek serum konsantrasyonları sayılabilir. AEDs ve metabolitleri doğum defektlerinde önemli rol oynarken diğer şartları da değerlendirebiliriz. Annenin aile genetiği, genel sağlık durumu, beslenme ve alkol ile başka ilaçlar kullanıp kullanmadığı örnek gösterilebilir (29).

Fenitoin ve karpamazepin'in teratojenik etkinliğinin vücutta bunlardan oluşan **epoksid metabolitlerine** bağlı olduğuna inanılmaktadır. Dokularında epoksid hidroksilaz aktivitesi az olan fetuslarda bu ilaçların daha sık malformasyon yaptığı saptanmıştır. Adı geçen enzim, epoksidleri inaktive eder (27).

2.5. EPİLEPSİ (SARA NÖBETLERİ)

Epilepsi, santral sinir sisteminde bir nöron grubunun eř zamanlı, aşırı ve anormal deşarjlarına bağlı olarak ortaya çıkan ve klinikte gelip geçici motor, duyuşsal, bilişsel (zekânın işleyişiyle ilgili, kognitif) ve otonom belirtilerle şekillenen nöbetlerin izlendiği ve tekrarlayıcı nitelikte bir klinik tablodur (30, 31).

Epilepsi krizlerine nöbet adı verilir. Epilepsi tek bir hastalık değildir; aynı temele dayanan hastalıkların oluşturduğu bir hastalık grubudur. Epileptik nöbetler, **jeneralize** (genel) ve **parşiyel** (kısmi) olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Jeneralize nöbetler de kendi içinde konvulsif nöbetler ve konvulsif olmayan nöbetler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Absans epilepsi, çocukluk çağında veya erken adölesan dönemde başlayan, bilinç kaybıyla beraber seyreden jeneralize, konvulsif olmayan nöbetlerle karakterize bir epilepsi tipidir. Fenitoin antikonvülsan etkisini birincil olarak parşiyel ve jeneralize konvulsif epilepsilerde etkili bir ilaçtır. Bununla birlikte fenitoin jeneralize konvulsif olmayan epilepside etkisiz görünmektedir; ayrıca hem sıçanlarda hem de insanda diken ve yavaş dalga deşarjlarını arttırdığı bildirilmiştir (30, 31).

2.6. ANTİEPİLEPTİK İLAÇLAR

Antiepileptik ilaçlar kimyasal yapılarına göre çeşitli gruplara ayrılarak kullanılırlar. Bu ilaçlardan 1., 2., 3. ve 7. gruptakiler, genellikle kısmi nöbetlere veya jeneralize nöbetlerden sadece jeneralize tonik-klonik nöbetlere (Grand mal'a) karşı etkilidirler. 4., 5. ve 6. gruptaki ilaçlar ise genellikle jeneralize nöbetlere karşı etkilidirler. 8. gruptaki ilaçlar diğer ilaçlara dirençli, sekonder olarak jeneralize olan veya olmayan kısmi nöbetlere karşı kullanılır. Bu ilaçların çeşitli epilepsi türlerinde tercih sıraları tablo 2.2'de gösterilmiştir (31).

Bu ilaçların hepsi epilepside epilepsi nöbetlerini önlemek için (profilaktik olarak) sürekli kullanılırlar. Epilepsi tedavisi denilince profilaktik tedavi anlaşılmalıdır. Nöbet sırasında

antiepileptik ilaç verilmez; zaten nöbetler kısa sürdüğü için kendiliğinden geçer. Ancak, status epilepticus adı verilen uzun süren konvulsif nöbetin ilaçla tedavisi yapılmaktadır (31).

Tablo 2.2. Sık görülen epilepsi türlerinde ilaçların genel tercih sıraları

Epilepsi Türü	En çok tercih edilenler	Seyrek kullanılanlar
I. Kısmi Nöbetler Basit kısmi nöbetler Karmaşık kısmi nöbetler Sekonder jeneralize kısmi nöbetler	Fenitoin Karpamazepin Lamotrigin ³ Fenobarbital Sodyum valproat Primidon	Mefenitoin Levetirasetam Vigabatrin ³ , felbamat, gabapentin ³ , tiagabin ³ Asetazolamid
II. Jeneralize Nöbetler 1. Absans (petit mal)	Etosüksimid Sodyum valproat	Lamotrigin ³ Klonazepam, klorazepat Diazepam Trimetadion Asetazolamid
2. Jeneralize tonik-klonik nöbetler (grand mal)	Fenitoin Karpamazepin Lamotrigin ³ Fenobarbital Sodyum valproat	Klonazepam Primidon Mefenitoin Asetazolamid
3. Myoklonik nöbetler a) İnfanıl myoklonik nöbetler (infantil spazm)	Kortikotropin (ACTH) Kortikosteroidler Klonazepam Vigabatrin ³	Karpamazepin Fenitoin Fenobarbital, primidon
b) Diğerleri	Sodyum valproat Klonazepam L-5-hidroksitriptofan	Karpamazepin Fenobarbital Diazepam
4. Atipik absans, atonik ve tonik nöbetler	Fenitoin Lamotrigin ³ Sodyum valproat Klonazepam	Diazepam Etosüksimid Trimetadion Kortikosteroid

2.6.1. Antiepileptik ilaçların (AEDs) gebelikte kullanılması ve doğum defektlerindeki rolü

Günümüzde hamileliği sırasında epilepsi nöbeti geçirme riski olan anne adaylarına tedavi amacıyla çeşitli antiepileptik ilaçlar verilmektedir. Bu ilaçların konjenital anomaliler üzerindeki etkileri hakkında farklı görüşler vardır. Günümüzde yapılan retrospektif ve prospektif epidemiyolojik çalışmalarda, gebelik sırasında antiepileptik tedavi alan epilepsi hastası kadınların %90'ından fazlasının normal doğum yoluyla sağlıklı çocuklar doğurduğu rapor edilse

de, intrauterin yaşamlarında fenobarbital, difenilhidantoin (fenitoin), karbamazepin, valproik asit gibi antiepileptik ilaçlara maruz kalan fetuslarda izlenen minor anomaliler ve major malformasyonlarda azda olsa bir artış saptanmıştır. Bu malformasyonların hastalıkla ya da hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar nedeniyle artıp artmadığını belirlemek zordur. Ancak yapılan incelemelerin hepsinde malformasyonların insidansı, gebelik sırasında ilaç tedavisi alan epileptik annelerde hiç tedavi almayan annelerden daha yüksektir (32-35).

Fenitoin, karbamazepin gibi antiepileptik ilaçların gebelikte kullanımı ile ortaya çıkan fetal malformasyonlar, ilk olarak 1968'de tanımlanmıştır (36). Epidemiyolojik incelemelerde farklı araştırmacı gruplarının bulduğu malformasyon insidansı değişiktir. AED tedavisi alan epilepsi hastası kadınlardan doğan bebeklerin doğum defektli olma riski %4-6'dır. Görülen malformasyonlar sinir sistemi, yüz, damak, kalp ve genital organlar ile ilgilidir. Fetal alkol sendromunda görülenlere benzeyen mental bozukluklar da mevcuttur (29).

Major malformasyonlar, AEDs'in hepsi ile bağlantılıdır. Antiepileptikler içinde teratojenik etki potansiyeli en yüksek olanlar, en başta trimetadion olmak üzere fenitoin, valproik asit, karbamazepin ve fenobarbital'dir. Bunlardan trimetadion, bu ilaca maruz kalan fetusların %50'sinde malformasyonlara neden olan en teratojenik ajandır. Bu nedenle artık epilepsi tedavisinde kullanılmamaktadır. Sodyum valproat (valproik asit) kullanan gebelerin yaklaşık %1-2'sinde nöral tüp defektleri ve özellikle spina bifida, karbamazepin tedavisinde ise yaklaşık %0.5 oranında spina bifida görüldüğü bildirilmiştir (27, 29, 37).

Antiepileptik ilaçlara bağlı olduğu ileri sürülen malformasyonlar genel olarak iki kategoriye ayrılır. Birincisi ve en önemlisi major malformasyonlar olup; gebeliğin ilk üç ayında organ ya da bir sistemin gelişimi sırasında oluşan, tüm yaşam boyunca süren girişim gerektirecek kadar ciddi ve önemli fonksiyon bozukluklarına veya ölüme neden olabilen yapısal defektlerdir. Bunlar genellikle, nöral tüp defektleri, fetal bradikardi, büyük arter transpozisyonu, yarı damak/dudak gibi oro-fasiyal yarıklar, doğuştan kalp defekti (atrioventriküler septal defekt), bağırsak atrezisi, böbrek ve üreter deformiteleri, meningomyelosel, mikrosefali ve spina bifida gibi defektlerdir. İkincisi ise gebeliğin daha geç evrelerinde, embriyonik gelişimde, bir organ veya ekstremitenin gelişmesinde oluşan küçük yapısal defektleri içine alan minor anomalilerdir. Bunlar; düşük ayak, hipospadias, tırnak hipoplazisi gibi defektler olup bu bozuklukların ülkemizde görülme oranı %14'tür (29, 36- 39).

Bu malformasyonlardan başka bazı araştırmacılar tarafından tanımlanan minör dismorfik anomaliler adı altında, hastaya ciddi tıbbi sorunlar yaratmayan, alışılmamış yapısal defektler de bildirilmiştir (29, 39, 40). Bu yapısal değişiklikler, yüz ve ekstremitelerin yüzeyel kısımlarında oluşur ancak fonksiyonel olarak bir eksiklik ortaya çıkarmaz. Örneğin; iki organ arasındaki (gözler arası açıklık ve burun kökü yaygınlığı) açıklığın normalden fazla oluşuyla (hipertelorizm) belirgin kranio-fasiyal malformasyonlar, epikantus, geniş ve yassı burun kemiği, göz kenarlarında kıvrılma, kalkık burun, el ve ayak parmakları ile tırnaklarda hipoplazi olup yaşamın ilk birkaç yılı içinde kendiliğinden düzelebilirler (27, 29, 39).

Malformasyonları incelemede gestasyonel yaşı bilmek ve nöral tüp defektlerini belirlemek için 16-18 haftalıkken ultrason çekilmesi önerilir. Yine aynı zamanlarda serumda alfa fetoprotein (AFP) bakılır. Serumda alfa fetoprotein tespiti %80 ve uzman elemanlar tarafından çekilen ultrasonagrafi ile teşhiste %90 oranında başarı sağlar (29).

Yukarıda zikredilen görüşlerin aksine az da olsa, konjenital olarak görülen major malformasyonların ortaya çıkmasında, annenin geçirdiği epilepsi nöbetlerinin etkisinin olmadığını öne süren bazı çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda hamilelik sırasında epilepsi tedavisi gören ve görmeyen (kontrol grubu epilepsisi olmayan) anneler arasında malformasyonlu bebek doğurma oranlarında fark olmadığı bildirilmektedir (35). Epilepsi nöbetinin kendisi de fetusta malformasyon oluşumunu arttırabildiğinden teratogenez riskine karşın gebelik sırasında antiepileptik ilaç tedavisinin kesilmesi tavsiye edilmez. Status epilepticusun neden olduğu hipoksi ve yaşamı tehdit etme ihtimalinin yüksek olması sebebiyle antiepileptik ilaçların major konvülsiyonları önlemek için uygulandığı hastalarda antikonvülsan ilaçların kesilmemesi önem taşır (27).

Japonya’da 1980 yılında yapılan bir incelemede aşağıdaki malformasyon oranlarının bulunduğu bildirilmektedir.

Gebe ilaç almadı ve nöbet geçirmedi ise % 1.8

İlaç almadı, fakat nöbet geçirdi ise % 2.6

İlaç aldı, fakat nöbet geçirmedi ise % 11.5

İlaç aldı ve nöbet geçirdi ise % 12.7 (41).

Bir başka problem ise hamilelik sırasında uygulanan ilaçın tek veya birden fazla olup olmadığıyla ilgili olarak ortaya çıkmaktadır. Çoklu tedavi tekli tedaviye göre daha yüksek oranda malformasyonlu bebek doğumuna sebep olmaktadır. Farklı AEDs kombinasyonları farklı teratojenik potansiyele sahiptir. Özellikle karpamapezin, fenobarbital ve valproik asit, diğer genel AEDs'den daha yüksek malformasyon oranına sahiptir (37).

Araştırmacılar epileptik kadınların gebelikte kullandıkları antiepileptik ilaçlara göre, doğan bebeklerinde izlenen konjenital defektlerin tipi ve özellikleri değiştiğinden, bunları genel olarak “Fetal Antiepileptik ilaç sendromu” adı altında toplamışlardır (42). Antiepileptik ilaçlar ile ilgili toplam 6 sendrom vardır. Bunlar:

1. Fetal Fenobarbital Sendromu
2. Fetal Trimetadion Sendromu
3. Fetal Hidantoin Sendromu
4. Fetal Valproat Sendromu
5. Fetal Karbamazepin Sendromu
6. Pimidon Embriyopatisi

Literatürdeki verilerin çoğu olgu sunumları olduğundan, sendromların prevalansları hakkında kesin veriler elde etmek güçtür (42-44) (Tablo 2.3).

Tablo 2. 3. Hamilelik sırasında kullanılan antikonvulsan ilaçların insanlarda oluşturduğu konjenital defektler

İlaç	Oluşturduğu defekt
Dilantin (Fenitoin)	Kraniyofasiyal defektler, prenatal ve postnatal büyüme geriliği, mikrosefali, tırnak hipoplazisi, hipospadias, yarık damak/dudak, kalp defektleri, mental retardasyon
Tridione (Trimetadion)	Spontan düşükler, prenatal ve postnatal büyüme geriliği, mikrosefali, kraniyofasiyal defektler, oküler defektler, kalp defektleri, hipospadias, trako-özofajial fistül, herni, mental retardasyon.
Depakene (Valproik asit)	Spina bifida (%1), kraniyofasiyal defektler, kalp defektleri, oküler defektler, akciğer defektleri, genitoüriner anomaliler
Tegretol (Carpamazepin)	Meningomyelosel (%1), prenatal büyüme geriliği, mikrosefali, kraniyofasiyal defektler, tırnak hipoplazisi, kalp defektleri

2.7. FENİTOİN (PHT- Phenytoin - Diphenylhydantoin sodium salt- DPH):

Fenitoin, sedasyon oluşturmaksızın status epileptikusun tonik-klonik (grand mal) tipinin kontrol altına alınmasında, nöroşirürji ve ağır kafa travması sırasında ya da sonrasında konvülsiyonların önlenmesi ve tedavisinde kullanılan antiepileptik bir ilaçtır. Fenitoin ayrıca migren, trigeminal nevralji ve belirli psikozların tedavisinde de kullanılmaktadır. Bunlardan başka kardiyak aritmiler, dijital entoksikasyon ve miyokard enfarktüsü sonrası olayların tedavisinde de kullanılmaktadır (31, 45, 46).

Ayrıca fenitoin, nörolojik hastalıkların tedavisinde major farmakolojik avantajlara sahip olması ve epilepsi hastaları için uygun bir ilaç olması nedeniyle en başarılı antiepileptik ilaçtır (46).

Okul çağındaki çocuklarda ve erişkinliklerde jeneralize epilepsinin konvulsif nöbetlerinin ve sekonder olarak jeneralize olsun veya olmasın bütün kısmi epilepsilerin profilaktik tedavisinde kullanılır (31).

2.7.1. Farmakolojik Özellikleri

2.7.1.1. Farmakodinamik Özellikleri

Fenitoin, belirgin derecede sedasyon yapmaksızın antiepileptik etki oluşturan oldukça selektif bir ilaçtır. Antiepileptik etkisinin selektif olmasına rağmen, nöron düzeyindeki etkisi selektiflik göstermez. Fenitoin, olasılıkla nöronlardan sodyum çıkışını artırarak, aşırı uyarılma ya da membran sodyum gradyanını azaltabilecek çevresel değişikliklerin neden olduğu hipereksitabiliteye karşı eşiği stabilize etme eğilimindedir. Santral sinir sistemi (SSS) ve periferdeki bütün nöronlarda membran stabilizasyonu yapar, böylece stimülasyon eşiğini yükseltir, refrakter periyodu uzatır, sinaptik aşırımı inhibe eder ve post-tetanik potansiyalizasyonu güçlü bir şekilde baskılar. Post-tetanik potansiyalizasyon baskılanması kortekste konvülsiyon odaklarının komşu korteks alanlarını etkilemesini engeller. Ayrıca tonik-klonik konvülsiyonların tonik safhasından sorumlu beyin sapı mekezlerinin maksimal aktivitesini de azaltarak deşarjların primer odaktan SSS'nin diğer bölgelere yayılmasını inhibe etmek suretiyle epileptik nöbetleri önlediği kabul edilmektedir (31, 45).

2.7.1.2. Farmakokinetik Özellikleri

Fenitoinin farmakokinetik özellikleri, belirgin olarak suda çözünübilirliğinin sınırlı oluşundan ve doza bağlı eliminasyonundan (vücuttan dışarı atılması) etkilenir. Epilepside nöbetlerin seyrekliği nedeniyle, kullanılan dozun yeterli olup olmadığı nöbetleri önleme derecesine bakarak pek saptanamaz; bu amaçla ilacın plazmadaki konsantrasyonuna göre değerlendirme yapılması bu hastalıkta önem kazanır. Fenitoinin antiepileptik etkinlik gösterebilmesi için, plazmadaki konsantrasyonunun 10µg/ml'nin üstünde olması gerekir. Ancak plazmadaki ilaç konsantrasyonu 8µg/ml'nin üstüne çıktığında nistagmus gelişebilir, 20µg/ml'nin üstünde ise bu yan etki çok sık görülür. Konsantrasyon yaklaşık olarak 30µg/ml'ye eriştiğinde ataksi ve dizartri 40µg/ml'nin üzerinde ise mental bozukluklar ortaya çıkar (31, 45).

İntravenöz uygulamadan sonra fenitoin hızla dokulara yayılır. Serbest fenitoin bütün trans-selüler sıvılara dağılır. BOS, safra, tükürük, meni, gastrointestinal sıvı ve anne sütündeki fenitoin konsantrasyonu kandaki serbest fenitoin düzeyiyle aynıdır. Ağız yoluyla alındığında; mide-bağırsak kanalından absorpsiyon hızı nispeten yavaştır ve kişiler arasında farklılık gösterir. Ağız yoluyla alındıktan 8 saat sonra plazmadaki konsantrasyonu doruğa erişir. Fenitoin plazma proteinlerine yüksek oranda (yaklaşık %90'ı albümine) bağlanır. Ancak bu oran yenidoğanlarda, hipoalbuminemili hastalarda ve üremili hastalarda daha düşüktür. Serumda fenitoinin proteinlere bağlanması hızlı ve geri dönüşümlüdür.

Beyin korteksinde, beyaz cevherden daha fazla toplanır. Hastalarda oral uygulamadan intramüsküler (IM) uygulamaya geçerken serum düzeylerinde düşüş meydana gelebilir. Bunun nedeni fenitoinin suda iyi çözünmemesi sonucunda, oral uygulamayla karşılaştırıldığında emilimin daha yavaş olmasıdır. Hızlı terapötik serum düzeyleri sağlamak için intravenöz uygulama tercih edilir. İntramüsküler uygulamanın gerekebileceği durumlarda (ameliyat sonrasında, komadaki hastalarda) serum düzeyini terapötik aralık içinde tutabilmek için yeterli doz intramüsküler olarak uygulanmalıdır. Fenitoin emildikten sonra vücutta serbestçe dağılır ve hızla maksimum dağılım hacmine erişir (45).

Fenitoinin emilimi ya da metabolizmasının değişmesi nedeniyle hastaların büyük bir bölümünde gebelik sırasında konvülsiyon sıklığında artış görülür. Epilepsili gebe bir hastanın tedavisinde

gereken doz ayarlamasına yol gösterebilmesi için serum fenitoin düzeylerinin periyodik olarak ölçülmesi özellikle önem taşır (45).

Fenitoinin insanda eliminasyon yarılanma ömrü, metabolizma hızındaki bireysel değişkinlik nedeniyle 7 ile 42 saat (çocuklarda 20 saat) arasında olup, ortalama 22 saattir. Fenitoin'i metabolize eden enzim sistemi ilacın terapötik aralıktaki konsantrasyonlarıyla doygunluğa ulaşır; bu nedenle eliminasyon yarılanma süresi doza bağımlıdır ve fenitoin dozunun artmasıyla artar. Bazen beklenmeyen toksisite meydana gelebilir. Fenitoinin yarılanma süresini etkileyen başka bir faktör de birlikte kullanılan ilaçlardır (31, 45).

Fenitoin'in %5'inden azı değişmeden idrarla atılır, sadece çok az bir miktarı değişmeden dışkıyla atılır. Geri kalanı primer olarak karaciğerde hidroksilasyon ile metabolize edilir. Metabolizma nispeten yavaştır ve karaciğer kan akımındaki değişikliklerden önemli ölçüde etkilenmez (31, 45).

2.7.2. Fenitoin'in gebelikte kullanımı

Fenitoin'in gebelikte kullanılması durumunda hem insanlarda (Tablo 2. 3) hem de hayvanlarda morfolojik ve davranışsal anomaliler oluşturduğu saptanmıştır. İnsanlarda fetal hidantoin sendromu (FHS) olarak bilinen, prenatal ve postnatal büyüme-gelişme geriliği, konjenital kalp hastalığı, major malformasyonlar ve mental eksikliği içine alan kraniyofasiyal defektler oluşturur. FHS'nin kraniyofasiyal özellikleri mikrosefali/trigonsefali, basık burun kökü, gözün iç tabakasında kıvrım, Orta hat hipoplazisi, kısa burun ve yukarı kalkık burun delikleri epikantus, uzun filtrum, yay gibi veya yarık üst dudak, yarık dudak/damak, hipospadias, pes ekinovarus, hipoplastik parmak gibi birçok doğumsal defektleri içine alır (36, 37, 44 - 47). Fenobarbital ve/veya fenitoin verilen epilepsili annelerin doğurduğu bebeklerde ilk 24 saat içinde yenidoğan pıhtılaşma defektleri bildirilmiştir. Vitamin K'nın bu defekti önlediği ya da düzelttiği gösterilmiştir. Doğumdan önce anneye ve doğumdan sonra yenidoğana verilmesi tavsiye edilmektedir (45).

Hayvanlarda ise, fetal trimetadion sendromuna paralel olarak ratlarda fetal hidantoin sendromu tanımlanmıştır. Fetal barbitürat sendromu farelerde, fetal valproat sendromu ratlarda ve fetal karpamazepin sendromu ratlarda tespit edilmiştir. Yine fare ve sıçan gibi hayvanlarda henüz fetal primidone sendromu bildirilen veri yoktur (44).

Fenitoin, fare ve sıçan gibi rodentlerde (kemiriciler) teratojeniktir. Gebelik sırasında fenitoin ile tedavi edilmiş rodentlerde en yaygın defektler, yarık dudak ve/veya damak, hidrosefali (beyin ventriküllerinde aşırı BOS birikimi) hidronefroz (böbrek, pelvis renalis ve kalikslerde idrar birikimi sonucu organın şişmesi ve üreteri tıkanması), uzun kemiklerde kısalma ve ekterodaktili (el ve ayak parmaklarından bir bölümünün ya da hepsinin doğuştan eksikliği) içine alan iskelet anomalileridir. Ayrıca ratlarda fenobarbital kullanımının iskelet defektlerine ve yüksek neonatal ölüm oranına, tavşanlarda da yüksek neonatal ölüm oranı ve kardiyak defektlere neden olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte bazı araştırmacılar ise adı geçen ilaçların malformasyonlara neden olmaksızın direkt olarak embriyosid etkisini gözlemlemişlerdir (32, 48, 49).

2.8. FOLİK ASİT (FA)

Folik asitin kimyasal adı pteroylmonoglutamik asit (PteGlu1)'tir. Folik asit, metabolik olarak folicinic asitin bir şeklidir. Bu asit nukleoprotein sentezi, mitoz bölünme ve antikonvulsanların metabolizmasını içine alan ilaç hydroxylation (hidroksillenme) etkileşimleri gibi birçok metabolik süreç için önemli bir kofaktör (kofaktör: koenzim: diğer aktif bir maddenin etkisini güçlendirici) olarak görev yapar (31, 32).

Folik asit en fazla, yeşil yapraklı sebzeler (ıspanak ve marul gibi), meyveler, karaciğer, böbrek, bira mayası, et, balık, süt ve süten yapılmış ürünlerde bulunur. Isıya dayanıklılığı az olduğundan pişirilmiş gıdalardaki miktarında azalma olur. Ayrıca havayla temas ettiğinde de bozulduğundan, soyulmuş, doğranmış, bayatlamış veya dondurulmuş besinlerdeki miktarı azalır. Günlük folik asit gereksinimi, normal erişkinler için en az 50µg kadardır. Gebelikte, folik asit yıkımının (katabolizmasının) hızlanması ve fetusun gelişmesine bağlı hızlı DNA sentezi nedeniyle günlük gereksinim artar. Bu nedenle gebelik süresince hamilelere dışarıdan günlük 300–400µg arasında folik asit takviyesi yapılır. Gebelik öncesi dönemde yeterli miktarda folik asit almanın nöral tüp defekti gelişmesini önlemedeki yararı nedeniyle gebeler için tavsiye edilen günlük miktarın doğurganlık çağında olupta gebe kalma olasılığı olan bütün kadınlar tarafından da alınması gerekmektedir (31).

Folik asit destek tedavisinin zamanlaması tam olarak bilinmiyor. Ancak döllenmeden dört hafta önce veya gebe kadının en son menstural periyodunun ilk gününden 6 hafta önce verilmesi

gerekir. Kadınlara, gebe kalmaya karar verdikleri günden itibaren folik asit almaları genel olarak önerilir (50).

Gebelikteki folik asit eksikliği, çeşitli gelişme bozukluklarına yol açar. Folik asit eksikliğinin antiepileptik ilaçların teratojenik etkisinde de tetik çekici rolü olduğu ileri sürülür. Folik asitin aktif deriveleri, nükleik asit ve protein sentezinde rol aldıklarından, gebelikte folik asit eksikliği hızla büyüyen embriyonik dokuları etkiler. Etkilenen sistemler, anomalinin tipi ve insidansı, eksikliğin zamanı, süresi ve ciddiyetine göre değişir (51).

Folik asitin hamilelik süresindeki etkisini anlamak için çeşitli hayvan (hamster, sıçan ve fare) modelleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Bu hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaların hiçbirinde folik asit eksikliği ile NTD arasında kesin bir ilişki ortaya konmamıştır. Fare modelleriyle yapılan çalışmalar ise nöral tüpün kapanma zamanı, mekanizması ve bozukluğu hakkındaki bilgilerimizi arttırmaya yardımcı olmuş ve bu mekanizmalar üzerinde etkili olan genlerin ve metabolitlerin rolü hakkında daha fazla ipuçları sağlamıştır. NTD'li fare modelleri insanınkiyle birçok benzerlik gösterir (52). Diyet eksikliği olgusu, aynı zamanda *in vitro* olarak tüm embriyo kültür sisteminde de çalışılmıştır. Kültür ortamı olarak kullanılan serumdan özellikle folik asiti eksik tutarak yapılan çalışmalarda embriyonik gelişimde gerileme olduğunu fakat NTD'ye bir eğilim olmadığı gösterilmiştir (52).

Hamilelik sırasında antikonvulsan ilaçlar kandaki folik asit konsantrasyonunu azaltır. İlaçların inaktivasyon oranında azalmaya neden olabilecek şekilde folik asit seviyesindeki düşüş, antikonvulsanların kan konsantrasyonlarının yükselmesine neden olur ve bu durum ilacın toksisitesini artırır. Bu yüzden teratogenic etkiler folik asidin birlikte kullanımı ile azaltılabilir. Diğer taraftan serumdaki yüksek folik asit konsantrasyonu ilacın hızlı inaktivasyonuna neden olur (32).

İnsanlarda ortaya çıkan konjenital malformasyonlar ile ilgili olarak yapılan epidemiyolojik çalışmalarda NTD'nin 0.58/1000 oranında canlı doğumları etkileyen kongenital malformasyonların en yaygın şekli olduğunu ortaya koymuştur. NTD terimi santral sinir sistemi içindeki bütün defektleri kapsayan bir dizi konjenital malformasyonları kapsar. NTD'lerinin nöral tüpün hem kranial ve hem de kaudal tarafında ortaya çıktığı bildirilmiştir. Cranial defektler, anensefali, servikal ve torasik spina bifidayı kapsar. Caudal defektler ise lumbal ve

sakral spina bifidayı kapsar. Cranial defektlerin diğer konjenital malformasyonlarla birlikte görülme eğilimi daha fazladır. Caudal lezyonlar, genelde izole malformasyonlar şeklinde görülür ve bunların görülme sıklığı daha azdır. Cranial lezyonların primer nörolasyondaki eksiklikten, caudal lezyonların ise sekonder nörolasyondaki bir kusurdan meydana geldiğine inanılmaktadır. Klinikte karşılaşılan durumlar, multivitaminlerin özellikle de folik asidin NTD ile sonuçlanmış gebeliklerin tekrarını önleyebileceğine dair kanıtlar ortaya koymuştur. Bu ve buna benzer gözlem ve bulgular anne adaylarının perikonsepsiyonel (doğum öncesi) periyotta ve gebelik süresince folik asit takviyesi almaları gerektiği kanaatini ortaya koymuştur. Perikonsepsiyonel folik asit destek tedavisi NTD'lerinin meydana gelmesini önleyebilmesine rağmen bunun hangi mekanizmayla oluştuğu bilinmemektedir (51).

Folik asit ilavesinin iki yoldan biriyle etki edebileceği hipotezi öne sürülmektedir. Bunlardan birincisi annenin folik asit eksikliğinin giderilmesi, ikincisi ise intrinsik folik asit metabolizmasındaki eksikliğin giderilmesidir. Bu destek tedavisi aynı zamanda folik asitin anneden embriyoya transferindeki eksikliğini de kapatır. Önemli bir konu da, folik asit uygulamasının NTD'li doğumların sayısında azalmayla korelasyon göstermesine rağmen acaba destek tedavisi gerçekten defektleri mi önüyor yoksa etkilenen embriyoların kaybedilmesine mi neden oluyor. Çünkü destek tedavisi yapılmış gebeliklerde spontan düşük artışı da vardır (51).

Dışarıdan folik asit alınımı ile ilgili problemlerden biri de folik asidin dozu ile bağlantılıdır. Biyolojik olarak aktif maddeler çok fazla veya çok az verildiğinde zarara neden olabilir. Folik asidin yaklaşık 5 mg ve daha fazla alınması durumunda bir takım komplikasyonlar oluşabilir. Folik asit persiniyöz aneminin nörolojik belirtilerini maskeleyebilir. Folik asit megaloplastik ilik değişikliklerini etkileyebilir. Şunu bilmek gerekir ki folik asit persiniyöz anemiye neden olmaz. Ancak folik asit ile birlikte persiniyöz aneminin nörolojik belirtileri şiddetlenebilir (50).

Bir başka komplikasyon ise grandmal epilepsili hastalarda antikonvulsan ilaçların etkisini kontrol etmek amacıyla verilen yüksek doz folik asit destek tedavisinde ortaya çıkabilir. Böyle hastalarda antikonvulsan ilaçlar folik asit ile reaksiyona girer onun tedavi edici etkisini ortadan kaldırır. Bu nedenle grandmal epilepsili hamile hastalar, tıbbi denetim altında folik asit alabilirler (50).

Sonuç olarak denilebilir ki gebelik planlayan kadınlar için günlük 4 mg dozunda folik asit tıbbi denetim altında güvenli ve etkili olabilir. Ancak tıbbi denetim olmaksızın genel kullanım için de günde 0.4 - 0.8 mg dozunda folik asit güvenlidir (50).

2.9. VİTAMİN E (Vit E, ALFA - TOKOFEROL)

Tokoferol'lar, kimyaca izoprenoid zinciri ile substitüe edilmiş 6- hidroksikroman (tokol) türevleridir. Düşük derecede olmak üzere, besinler içindeki tokotrienollar da E vitamini etkinliği gösterirler. Tokoferol besinler içinde, alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta türevleri şeklinde bulunur. Bunlardan besinler içinde en fazla bulunan ve en güçlü E vitamini etkinliği gösteren türev α -tokoferoldur. Bu madde doğal olarak D izomeri halinde bulunur; sentetik olarak rasemik şekli yapılır ve ilaç olarak bu şekli kullanılır. Fiziksel özellikleri bakımından bir sıvı yağdır. Kural olarak besinler içindeki E vitamini etkinliğinin yaklaşık %80'inin α -tokoferola bağlı olduğu, geri kalan %20'sinin diğer tokoferol türevlerinden ve tokotrienollardan ileri geldiği kabul edilmektedir (31).

E vitamini hububat tanelerinde, mısır, pamuk ve soya yağlarında ve diğer bitkisel sıvı yağlarda ve bunlardan yapılan margarinlerde, hayvansal yağlarda, ette ve balıkta, karaciğer ve yumurtada bulunur. Kızartma, kaynatma ve saklama sırasında önemli ölçüde parçalanır. Anne sütünde oldukça fazladır (31).

Emilimi ve karaciğere taşınması yağda çözünen diğer vitaminlerinkine benzer. Vücutta karaciğerden ziyade yağ dokusunda toplanır; depolanan miktarı fazla değildir. Plasentayı zor geçer. Emziren kadınlarda meme bezleri tarafından süt içine fazla miktarda atılır. Normal durumda plazmadaki konsantrasyonu bireyler arasında değişkenlik gösterir ve ortalama 0.4-0.5 mg/dl kadardır.

Eskiden beri sıçanlarda E vitamini eksikliğinin çeşitli bozukluklara yol açtığı bilinmesine rağmen, yakın zamana kadar E vitaminin insan organizmasında fizyolojik bir öneminin bulunmadığı ve eksikliğinde belirgin bir patolojik bozukluğun gelişmediği sanılırdı. Yeni verilerin ışığı altında E vitamininin, insanda fizyolojik öneminin olduğu ve eksikliği halinde belirgin patolojik bozukluklar oluşturduğu saptanmıştır. Günlük E vitamini gereksinimi kesin olarak belirlenmemiştir. Günlük tavsiye edilen doz çocuklarda 3-7 mg, erişkinlerde 10-12 mg'dır (31).

E vitamininin günlük ihtyaçtan fazla miktarda alınmasının kardiyovasküler hastalıklar, kanser, kronik iltihap, alzheimer ve parkinson hastalıkları için faydalı olduğu bildirilmiştir. Oksidatif stres, preeklamsi, intrauterin hipoksi, perinatal asfiksi gibi hastalıkların gelişmesinde ve gebelikteki antioksidan tedavi uygulanmasında önemli bir rol oynar. Hamilelere E vitamini verilmesi gebeliğin daha güvenli geçmesine katkı sağlar (48).

Hayvan deneyleri sonuçları, diyabetik gebelerde vit E ve vit C'nin kullanılması fetal malformasyonları geriletliğini ve fetal karaciğerdeki oksijen radikallerinin seviyesini azalttığını göstermektedir. Fenitoin ile kombine kullanımında dış kulağın katlanmasını, alt kesici dişlerin çıkmasını geciktirdiğini, ancak gözün açılmasını hızlandırdığı bildirilmektedir. Bu değişiklikler de E vitamininin gelişimsel süreçte yüksek dozda kullanılmaması gerektiğine işaret eder (48).

E vitamini eksik diyetle beslenen dişi sıçanlarda gebelik sırasında fetusun rezorbsiyona uğradığı, erkek sıçanlarda ise spermatojenezle ilgili hücrelerin atrofiye olduğu ve böylece kısırlık oluştuğu gözlenmiştir. Bu hayvanlarda E vitamini eksikliği yaygın olarak çizgili kaslarda ve seyrek olarak da kalp kasında distrofiye neden olmaktadır. Ayrıca yapılan bir çalışmada diyabetli gebe sıçanlara gebeliğinin 11. gününde oral yolla E vitamini verilmesinin embriyonik gelişimi düzelttiği gösterilmiştir. E vitamini yağda çözünen diğer antioksidanlara göre daha düşük toksisiteye sahiptir. Bu durum diyabetik gebeliğin gelecekteki tedavisinde E vitaminin önemli bir ajan olarak kullanılacağını gösterir (31, 53).

E vitamini eksikliğinde karaciğer hücrelerinde oksijen utilizasyonu azalır. E vitamini ile birlikte selenyumdan da yoksun diyetle beslenen sıçanlarda bu kombine eksikliğin, karaciğer nekrozuna neden olduğu gösterilmiştir. Deneysel olarak meydana getirilen bu bozuklukların E vitamini eksikliğinde insanda da meydana gelip gelmediğine dair kanıt yoktur (31).

2.10. FETAL İSKELET SİSTEMİNİN BOYANMASI

Yenidoğanlarda ortaya çıkan iskelet malformasyonlarını inceleyebilmek için farklı yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan en basit olanı gözleme yoluylaadır. Ancak bu yöntemle sadece major malformasyonlar belirlenebilir.

Bir diğer yöntem yumuşak dokuların klasik diseksiyon tekniği ile uzaklaştırıldıktan sonra incelenmesidir. Ancak bu yöntemle de kemik gelişimini takip etmek oldukça zordur. Sonuçları ayrıntılı olmamakla birlikte, epifiz kıkırdığının ve kemik-kıkırdak birleşimlerindeki tam

sınırların belirlenmesinde yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle bu sorunu çözebilmek için araştırmacılar iskelet boyama yöntemleri geliştirilmesine çaba harcamışlardır.

Canlılarda kemik gelişimi sırasında meydana gelen kıkırdak ve bağ dokusu taslakları zamanla kalsifiye olarak anatomik kemik yapıları şekillendirirler. Bu kemikleşmenin kıkırdak model üzerinde hangi yaşta ne düzeyde olduğunun bilinmesi, pek çok kemik ve gelişim bozukluklarının tanısında, hastalıkların takibinde, sağlıklı büyüme periyodunun belirlenmesinde kullanılabilir (54).

Fetus iskeletinin kıkırdak parçalarının boyanmasında alcian blue, toluidin blue ve metilen blue kullanılmaktadır. Kıkırdak boyama ile ilgili çalışmaların en eskisi 1941 (Williams) (55) yılında yapılan toluidin blue ile kıkırdak boyama yöntemidir. Daha sonraki yıllarda fare fetuslarının kıkırdaklarının boyanmasında Inouye (1976) (56) ve Dingerkus ve Uhler (1977) (57) tarafından alcian blue kullanılmıştır. 1972 yılında ise Love ve Vickers (58) tarafından sıçan fetuslarının kıkırdakları metilen mavisiyle boyanmıştır.

Teratolojik çalışmalarda, fetusların iskeletinin sadece kemik parçalarının boyanarak incelenmesinde alizarin Red S ile fetus kemik boyama metodu yaygın olarak kullanılmaktadır. Alizarin red S ile kemikleri boyama metodu ilk olarak 1926 yılında Dawson (59) tarafından gerçekleştirilmiştir. Günümüzde halen iskeleti görünür hale getirmek için Dawson metodunun modifiye şekilleri kullanılmaktadır. Bu teknikte yumuşak dokular kostik soda ile massere edilir ve iskeletin kalsifiye bölümleri alizarin red S ile boyanarak gliserinle temizlenir. Daha sonraki yıllarda Crary (1962) (60) ve Staples ve Schnell (1964) (61) yöntem üzerinde küçük değişiklikler yaparak geliştirmişlerdir. Jensh ve Brent (62) 1966 yılında alizarin red S ile fetal sıçan kemik boyama prosedurunda küçük değişiklikler yaparak uygulamıştır. Bunu takiben 1984'te Boardman ve arkadaşları (63) ethanolde tespit ettikleri sıçan fetuslarının kemik yapılarını alizarin red S ile boyadıktan sonra, örnekleri %3 asetik asit solüsyonuna bırakmışlardır. Bilinmeyen bir mekanizma ile kemik yapılarıdaki boya, komşu kıkırdak dokulara geçerek, bu yapıların pembe renkte boyanmasına neden olmuş ve kıkırdak yapıların kemik yapılardan ayrımını sağlamıştır. Yamada (64) ise 1991 yılında alizarin red S ile kemik yapılarını boyadığı fetal sıçan örneklerine çok çeşitli boyalar ile kıkırdak boyaması yöntemleri denemiştir (63, 65, 66).

İskelet sistemi kemik ve kıkırdak olmak üzere iki yapıdan oluşmuştur. Embriyonal ve fetal gelişim sırasında henüz tam kemikleşme olmadığından, tüm iskelet yapının gösterilebilmesi için kemik ve kıkırdağın birlikte boyanması gerekmektedir. Bu şekilde hazırlanan örnekler, osteogenezis çalışmalarının gelişim serilerinin incelenmesinde karşılaştırılmasında ve teratojenik çalışmalarda başarılı sonuçlar vermektedir (54, 56, 63, 67).

Fare fetusunun kıkırdak ve kemiğinin birlikte boyamasıyla ilgili metod 1976 yılında Inouye (56) tarafından ortaya konmuştur. Bu metotta alsıyan mavisi ile kıkırdaklar, alizarin red S ile kemikler basit ve başarılı bir boyanmıştır. Bu yöntem 1979 (Whitaker ve Dix) (68) yılında sıçan fetusları için kullanılmıştır. Daha sonra 1981 (Kimmel ve Trammel) (69) yılında taze örneklerin soyulmasında hızlı ve basit bir işlem geliştirilerek ikili boyama işlemi düzeltilmiş ve alsıyan mavisi ile kıkırdak boyama, alizarin res S ile kemik boyama proseduru uygulanmıştır. 1983 yılında (Kelly ve Bryden,) (70) ve 1995 yılında (Erdoğan D) (65, 66) yine alsıyan mavisi ile kıkırdak boyama ve alizarin res S ile kemik boyama proseduru uygulanmıştır.

2000 yılında (Young ve arkadaşları) (67) rat fetal iskelet boyamada fazla sayıdaki fetuslarda ikili boyama yöntemi tanımlanmıştır. Bu yöntem kemirgen fetuslarına ait iskelet boyamada en verimli ve etkili yöntem olarak düşünülmektedir. Bu yöntem 2002 yılında Düzler A. tarafından (10) tavşan ön ekstremite kemiklerinin kıkırdak ve kemik yapılarının boyanmasında ve incelenmesinde kullanılmıştır. Bu yöntem iskelet gelişimi üzerindeki problemleri tespit etmede oldukça etkili bir yöntemdir.

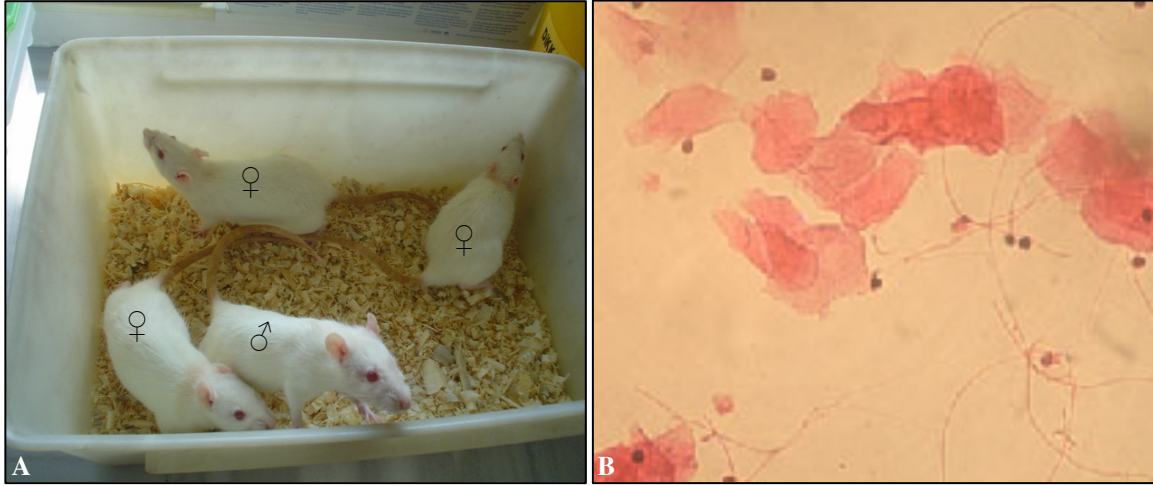
3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ

Çalışmamız Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu çalışmada, DEKAM'dan elde edilen, daha önce herhangi bir çalışmada kullanılmamış 170-250 gr ağırlığında 25 adet erişkin 4 aylık dişi Wistar-albino türü sıçan kullanıldı.

Çalışmada kullanılacak dişi sıçanlar 20 gün süreyle, erkek sıçanlardan ayrı olarak bekletildi. Bu sürenin sonunda gebe olmadıkları kesin olarak anlaşılan dişi sıçanlar gebe kalmaları için erkek sıçanlarla çiftleştirildi. Çiftleşmenin gerçekleşmesi için üç dişiye bir erkek damızlık düşecek şekilde akşam saat 17'de sıçanlar özel kafeslere alındılar. Ertesi sabah saat 08'e kadar aynı kafeste tutuldular (Resim 3.1A). Bu sürenin bitiminde erkekler dişilerin yanından ayrıldılar. Dişi sıçanlardan vaginal smear alınarak mikroskop altında incelendi ve smearda spermium görülen dişiler (Resim 3.1B) 0,5 günlük gebe olarak kabul edildi. Gebe sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı ve sıçanların her biri ayrı kafese yerleştirildi. Kontrol grubuna (1. grup) 6 gebe sıçan konurken deney gruplarına (2., 3., 4. gruplar) 7'şer adet gebe sıçan konuldu. Gebe sıçanlar, DEKAM'da, 20 gün (gebelik dönemi) süreyle 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamın sağlandığı ve

aspiratörlerle sürekli havalandırılan $21 \pm 2^\circ\text{C}$ 'lik odalarda tutuldular. Her biri ayrı kafeste olmak üzere, rutin olarak standart sıçan besi yemi (ad-libitum %21 ham protein içeren granüle pelip) ile beslendiler. Sıçanların su gereksinimleri için günlük olarak değiştirilen musluk suyu kullanıldı ve kontrolleri yapıldı. Bu 20 günlük sürenin sonunda ratlara sezeryan işlemi uygulanarak fetuslar izole edildi.



Resim 3.1. Çiftleştirilen sıçanların ve vaginal smear'in görünümü

A. Üç dişi sıçan ve bir damızlık erkek sıçanla birlikte görünümü

B. Hematoksilen+Eosin ile boyanmış estrus evresindeki vaginal smearda görülen sperm.

3. 2. İLAÇ UYGULAMASI

Grup-1: Kontrol grubu: Bu gruptaki sıçanlara gebeliğin 8., 9., ve 10. günlerinde sabah saat 09.00'da, 0.3 ml serum fizyolojik intraperitoenal (IP) olarak enjekte edildi.

Grup-2: Fenitoin (Phenytoin=PHT-difenilhidantoin=DPH) grubu: Bu gruptaki dişi sıçanlara gebeliğin 8., 9., ve 10. günlerinde sabah saat 09.00'da, serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra 25mg/kg dozunda PHT intraperitoenal olarak enjekte edildi.

Grup-3: Fenitoin + Folik asit (Phenytoin=PHT-difenilhidantoin + FA) grubu: Bu gruptaki dişi sıçanların içme suyuna gebeliğin ilk gününden itibaren her gün 400µg/kg folik asit (Pteryoglutamic acid vit M) katıldı. Ayrıca bu gruptaki gebe sıçanlara gebeliğin 8., 9., ve 10. günlerinde sabah saat 09.00'da, serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra 25mg/kg dozunda PHT intraperitoenal olarak enjekte edildi.

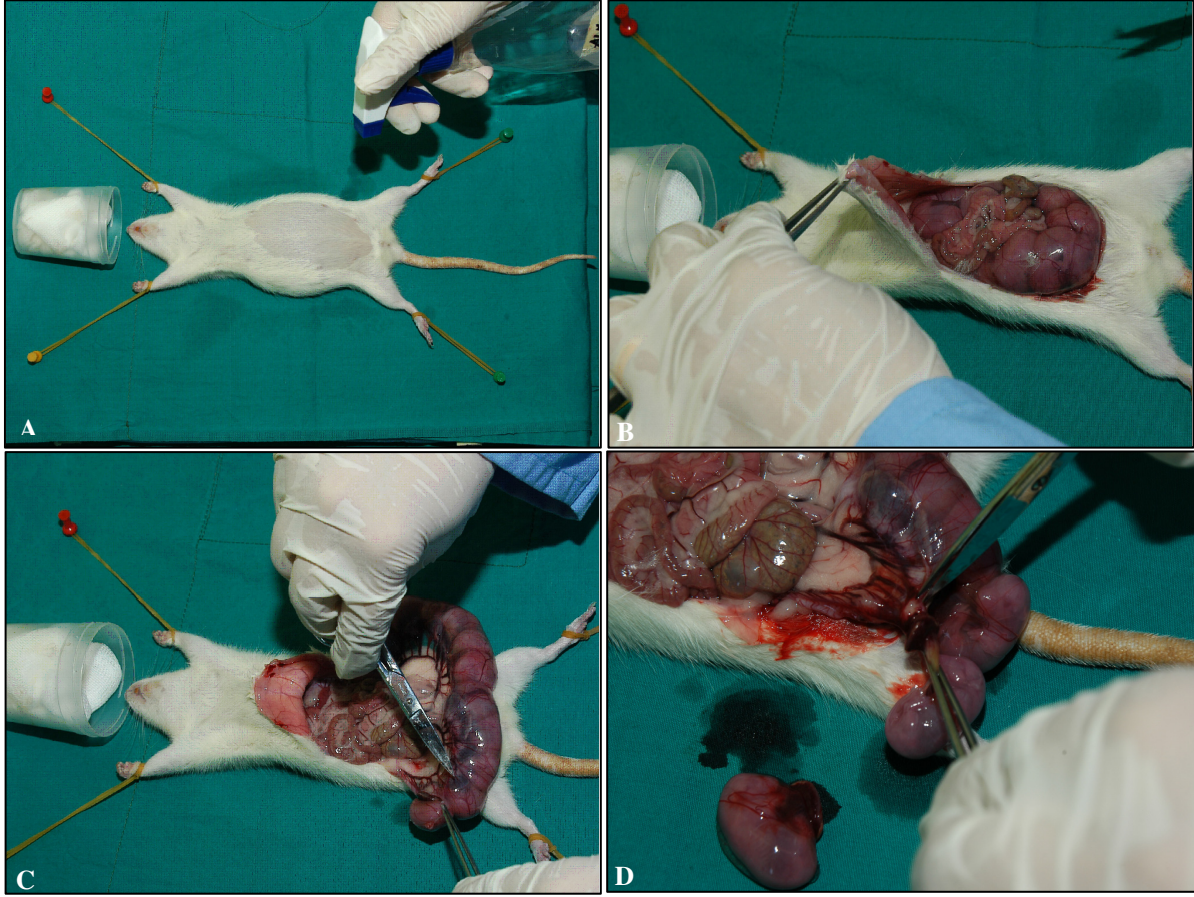
Grup-4: Fenitoin + E Vitamini (Phenytoin=PHT-difenilhidantoin + Vit. E) grubu: Bu gruptaki gebe sıçanlara gebeliğin 8., 9., ve 10. günlerinde sabah saat 09.00'da, PHT serum fizyolojik ile sulandırıldıktan sonra 25mg/kg dozunda intraperitoenal olarak enjekte edildi. Ayrıca bu gruptaki gebe sıçanlara PHT enjeksiyonundan 1 saat önce Vitamin E (α -Tocopherol) zeytinyağında çözülerek 250mg/kg dozunda olacak şekilde gastrik intübasyonla verildi.

3. 3. FETUSLARIN EKSPANTASYONU

Gebeliğin 20. gününde 4 gruptaki bütün sıçanlara, eter inhalasyonu uygulanarak anestezi yapıldı (Resim 3.2). Anestezi sonrası hamile sıçanların karın ön duvarı alkol ile temizlendikten (Resim 3.3A) sonra transvers kesi ile açılarak batına girildi (Resim 3.3B). Uterus ve içindeki fetuslar çıkarılarak (Resim 3.3C) plesantaları ile birlikte tek tek disseke edildi (Resim 3.3D.). Her anne sıçandan elde edilen fetuslar ayrı ayrı kaydedildi (Resim 3.4) ve bu fetusların boy ve ağırlıkları ölçüldü. İşlem bitiminde anne sıçanlar, göğüs boşluğuna girilip kalbe kesi atılarak sakrifiye edildi. Fetuslar makroskopik olarak incelendikten sonra önceden hazırlanmış anestezi eter içeren cam kavanozlarda 5dk kadar bekletilerek sakrifiye edildi.



Resim 3.2. Fetuslara eter uygulaması



Resim 3.3. Anne sıçanlara sezeryan uygulama aşamaları

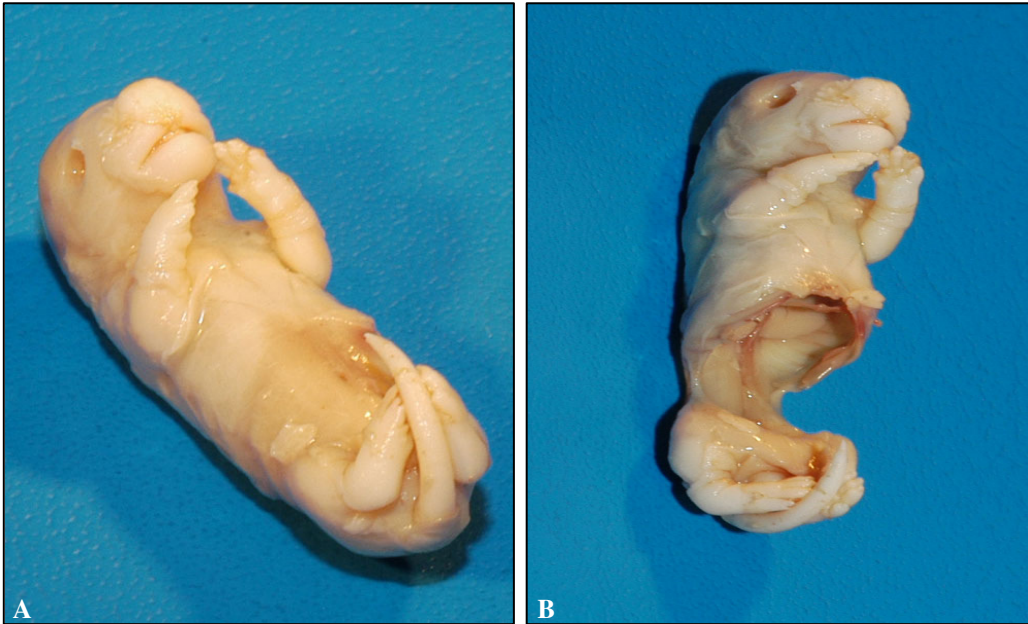
A. Karın ön duvarının alkol ile temizlenmesi, **B.** Karın ön duvarının açılması, **C.** Uterus ve içindeki fetusların çıkarılması, **D.** Fetusların plesantaları ile birlikte tek tek disseke edilmesi



Resim 3.4. Anne sıçandan elde edilen fetusun yakından görünümü.

3. 4. FETUSLARIN BOYANMASI

Ağırlıkları ve boyları ölçülen fetuslar, deney ve kontrol grupları ayrı ayrı kavanozlarda olmak üzere %95'lik etil alkol içinde tespit işlemi için 7 gün süreyle bekletildiler. Daha sonra yağdan arındırma işlemi için 3 gün süreyle saf aseton içinde bekletildiler. Bu aşamadan sonra boyanın iskelet sistemine daha iyi işleyebilmesi için fetusların derileri soyuldu (Resim 3.5A), iç organları ve gözleri çıkarıldı. Deri soyma işlemi sonrası sivri uçlu penset yardımıyla göğüs kafesi ve batin tamamen boşaltıldı (Resim 3.5B). Bu işlemler yapılırken bazı sıçanlarda (4 fetus) ekstremitte kopmaları ve kemik doku zedelenmeleri oluştu. Bu durumdaki fetuslar denek sayısının fazlalığı ve boyama işleminin güçlüğü göz önüne alınarak çalışma dışı bırakıldılar. Sezeryan sonrası elde edilen toplam 176 fetustan sağlam olan 172 fetus (1. grupta 40 fetus, 2. grupta 42 fetus, 3. grupta 44 fetus, 4. grupta 46 fetus) boyama işlemine tabi tutuldu.



Resim 3.5. Derileri soyularak iç organları ve gözleri çıkarılmış fetus.
A. Derisi soyulmuş fetus, B. İç organları ve gözleri çıkarılmış fetus.

Fetuslar aşağıda açıklanmış olan yöntemle göre hazırlanan boya solüsyonu içinde, etüvde 38-40 C°'de 7 gün süreyle bekletilerek dokuların boyanması sağlandı. Bu sürenin bitiminden sonra, fetuslar akan musluk suyu altında 2 saat süre ile yıkanarak su ile tepkimeye girmesi sağlandı. Sonrasında şeffaflaştırma aşamasına geçildi. Yaklaşık 16 gün süre ile aşağıda yöntemi açıklanmış olan şeffaflaştırma aşamasından sonra iskelet sistemi tamamen görünür hale gelen fetuslar stereomikroskopta ekstremiteleri başta olmak üzere bütün vücut bölgeleri incelenerek

malformasyonları saptandı ve resimleri çekildi. Fetusların resimleri, Nikon D100 marka fotoğraf makinası ile micro objektifinde ve 60 milim açısında çekildi. Daha sonra fetuslar uzun süreli saklanabilmesi için saf gliserine kondular.

Boya solüsyonunun hazırlanması: Boya solüsyonu ayrı ayrı hazırlanan dört solüsyonun karıştırılması ile elde edilmektedir. Bu solüsyonlar şunlardır:

1. solüsyon: 300mg alcian blue'nun 100ml %70'lik etil alkol içerisinde sürekli karıştırılarak eritilmesi ile elde edilir.

2. solüsyon: 100mg alizarin red-S'in 100ml %95'lik etil alkol içerisinde sürekli karıştırılarak eritilmesi ile elde edilir.

3. solüsyon: daha önce hazırlanmış olan birinci solüsyonun içine azar azar ikinci solüsyon katıldı. Bu iki solüsyonun tamamen karıştırılmasından sonra bu karışımın içine 100ml glacial asetik asit ilave edildi.

4. solüsyon: Hazırlanan üçüncü solüsyonun içerisine 1700ml %70'lik etil alkol ilave edilerek hazırlandı.

Şeffaflaştırma aşaması: Toplam 4 aşamadan oluşmaktadır.

1. aşama: Boyanmış olan fetuslar 1 gün süreyle %1'lik KOH içerisinde bekletilir.

2. aşama: 5 gün süreyle 80cc %1'lik KOH ve 20cc %20'lik gliserinden oluşan karışım içinde bekletilir.

3. aşama: 5 gün süreyle 50cc %1'lik KOH ve 50cc %50'lik gliserinden oluşan karışımda bekletilir.

4.aşama: 20cc %1'lik KOH ve 80cc %80'lik gliserinden oluşan solüsyon içinde 5 gün süreyle bekletilir (56, 66, 67).

3. 5. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Sıçanların boyları onda bir hassasiyeti olan kumpas yardımıyla, ağırlıkları ise 1/100gr hassasiyeti olan terazi ile ölçüldü. Çalışmamızdaki kontrol grubu, PHT, PHT+FA ve PHT+Vit E gruplarına ait farklı annelerden elde edilen sıçan fetuslarının boy ve ağırlık değerlerinin karşılaştırılmasında, SSPS 15.0 paket programı kullanıldı ve One-Way anova (varyans analizi)

testi yapıldı. Çoklu karşılaştırma için (multiple comparision) Tukey ve Dunnet testi yapıldı (47, 49, 60).

4. BULGULAR

Kontrol grubu (1.grup), fenitoin grubu (2.grup), fenitoin+folik asit grubu (3.grup) ve fenitoin+vit.E (4.grup) grubu sıçanlardan sezeryan ile alınan fetusların boy ve ağırlıkları ölçüldü. Belirlenen ağırlık ve boy ölçüleri Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan sıçan fetuslarına ait ağırlık ve boy ölçümleri

Fetus no	BOY (cm)				AĞIRLIK (gr)			
	Kontrol grubu	PHT grubu	PHT+FA grubu	PHT+Vit E grubu	Kontrol grubu	PHT grubu	PHT+FA grubu	PHT+Vit E grubu
1	3.2	2.8	3	3.1	3.44	3.3	3.29	3.52
2	3.1	2.7	3.2	3.2	3.04	3.46	3.77	3.43
3	2.9	2.9	3	3.2	3.65	3.11	3.25	3.44
4	2.9	2.6	3.1	3.5	3.9	2.51	3.47	3.52
5	3.1	2.7	3.2	3	3.42	2.88	3.31	3.87
6	3.2	2.6	3.1	2.8	3.3	2.08	3.56	3.65
7	3	2.5	3.2	2.9	2.91	3.14	3.23	3.41
8	2.9	2.8	3.1	2.7	2.92	3.37	3.29	3.63
9	2.9	2.9	3	2.7	3.98	3.1	3.37	3.54
10	3	2.5	2.5	2.4	3.99	3.55	3.23	3.2
11	3.4	2.9	2.6	2.3	3.59	3.59	3.05	3.27

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan sıçan fetuslarına ait ağırlık ve boy ölçümleri (devamı)

Fetus no	BOY (cm)				AĞIRLIK (gr)			
	Kontrol grubu	PHT grubu	PHT+FA grubu	PHT+VitE grubu	Kontrol grubu	PHT grubu	PHT+FA grubu	PHT+VitE grubu
12	3.3	3.1	2.7	2.7	3.47	3	3.38	3.59
13	3.3	2.7	2.8	2.8	3.38	3.04	3.27	3.16
14	2.8	2.5	2.8	2.7	3.12	2.12	3.44	3.06
15	3.2	3.1	2.6	3.1	3.34	2.81	3.37	3.08
16	2.8	3	2.4	2.9	3.21	2.77	3.53	3.57
17	2.9	3	2.9	3.2	3.53	2.95	3.13	3.3
18	3.3	3.2	2.3	3.2	3.44	3.12	3.19	3.16
19	3.2	3	3.1	2.8	3.48	2.42	3.63	2.94
20	3	3	2.8	2.3	2.84	2.7	3.53	2.84
21	2.9	3.1	2.9	2.4	2.91	2.64	3.17	2.72
22	3.1	2.2	2.8	2.6	3.31	2.71	3.5	2.87
23	3.1	2.4	3	2.8	3.33	2.71	3.65	2.9
24	3.2	2.4	3.2	2.5	4.22	3.27	2.94	2.6
25	3.4	2.6	3.1	2.6	3.51	2.47	3.17	2.66
26	3.4	3.1	3	2.4	3.77	3.5	4.47	2.92
27	3.4	3	3	2.2	3.75	3.3	2.65	2.86
28	3.2	2.9	3.1	2.6	3.48	3.36	2.78	2.53
29	3	3	3.1	2.7	3.39	2.77	2.95	3.27
30	3.3	2.9	2.4	2.7	3.6	3.24	2.99	3.25
31	3.2	3.1	2.5	3.1	3.68	3.49	3.91	3.19
32	3.1	3	2.7	3.2	3.32	3.6	3.72	3.29
33	3.2	2.9	2.3	3	3.31	3.85	3.64	3.34
34	3.9	2.7	3	2.8	3.72	3.19	3.83	3.27
35	3.7	2.4	2.9	2.7	3.84	3.32	3.78	3.38
36	3.5	2.7	2.8	2.4	3.91	3.39	3.26	2.93
37	3.4	2.9	2.5	2.4	4.17	3.21	3.24	3.33
38	3.7	2.5	2.6	3.2	4.11	3.5	2.97	3.61
39	3.6	2.3	2.3	3.2	3.71	3	3.12	3.43
40	3.8	2.2	2.7	3.2	3.47	2.94	3.14	3.64
41		2.2	2.7	3		2.32	3.07	3.82
42		2.4	2.9	3.1		2.67	2.78	3.26

Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan sıçan fetuslarına ait ağırlık ve boy ölçümleri (devamı)

Fetus no	BOY (cm)				AĞIRLIK (gr)			
	Kontrol grubu	PHT grubu	PHT+FA grubu	PHT+VitE grubu	Kontrol grubu	PHT grubu	PHT+FA grubu	PHT+VitE grubu
43			2.5	2.6			2.99	3.25
44			2.4	3			2.92	3.29
45				2.2				3.04
46				2.4				2.68

4.1. İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Bütün gruplara ait farklı annelerden elde edilen sıçan fetuslarının boy ve ağırlık değerlerinin karşılaştırılmasında kullanılan varyans analizi (One-Way Anova) testinin sonuçlarına göre; boy değerlerinde, gruplar arasında bir fark olduğu bulundu ($P<0.001$). Bu farkın nereden çıktığının tespiti için Tukey testi yapıldı ve kontrol grubu diğer üç deney grubundan (PHT, PHT+FA, PHT+Vit E) istatistiksel olarak farklı bulundu ve deney grupları arasında bir fark gözlenmedi.

Ağırlık değerlerinde, gruplar arasında bir fark olduğu bulundu ($P<0.001$). Bu farkın nereden çıktığının tespiti için Tukey testi yapıldı ve kontrol grubu-PHT, kontrol grubu- PHT+Vit E, PHT-PHT+FA ikili grupları arasında istatistiksel olarak fark bulundu ve diğer gruplar arasında bir fark gözlenmedi.

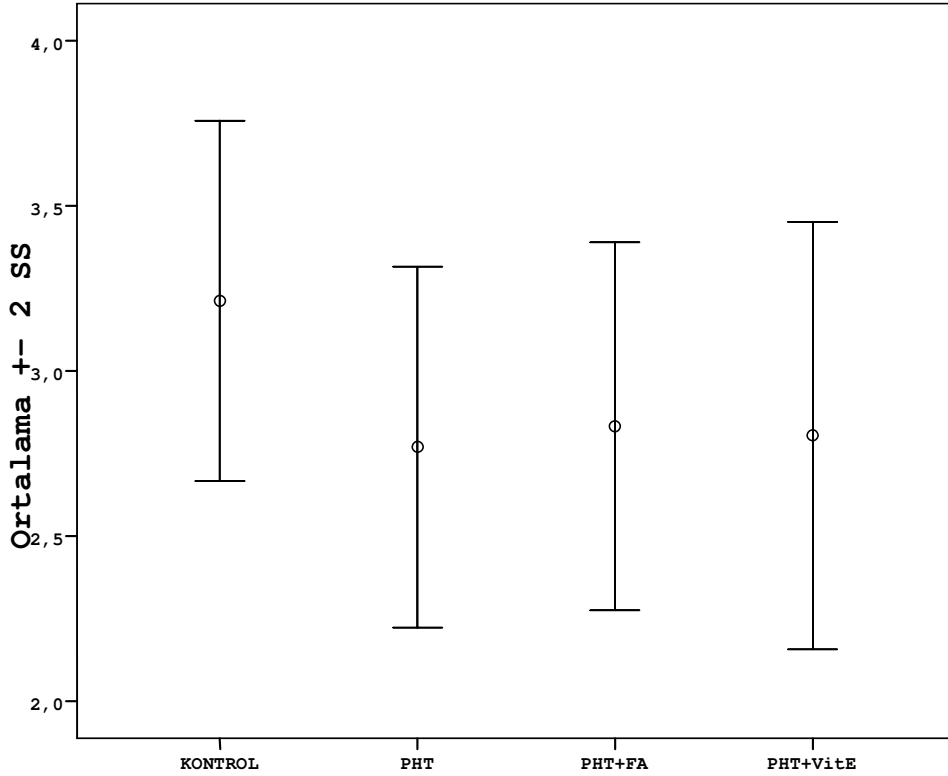
Gruplar arasındaki boy ve ağırlık değerlerinin karşılaştırılması Tablo 4.2.de ve Grafik 1 ve Grafik 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Kontrol ve deney gruplarına ait fetusların boy ve ağırlık değerlerinin karşılaştırılması

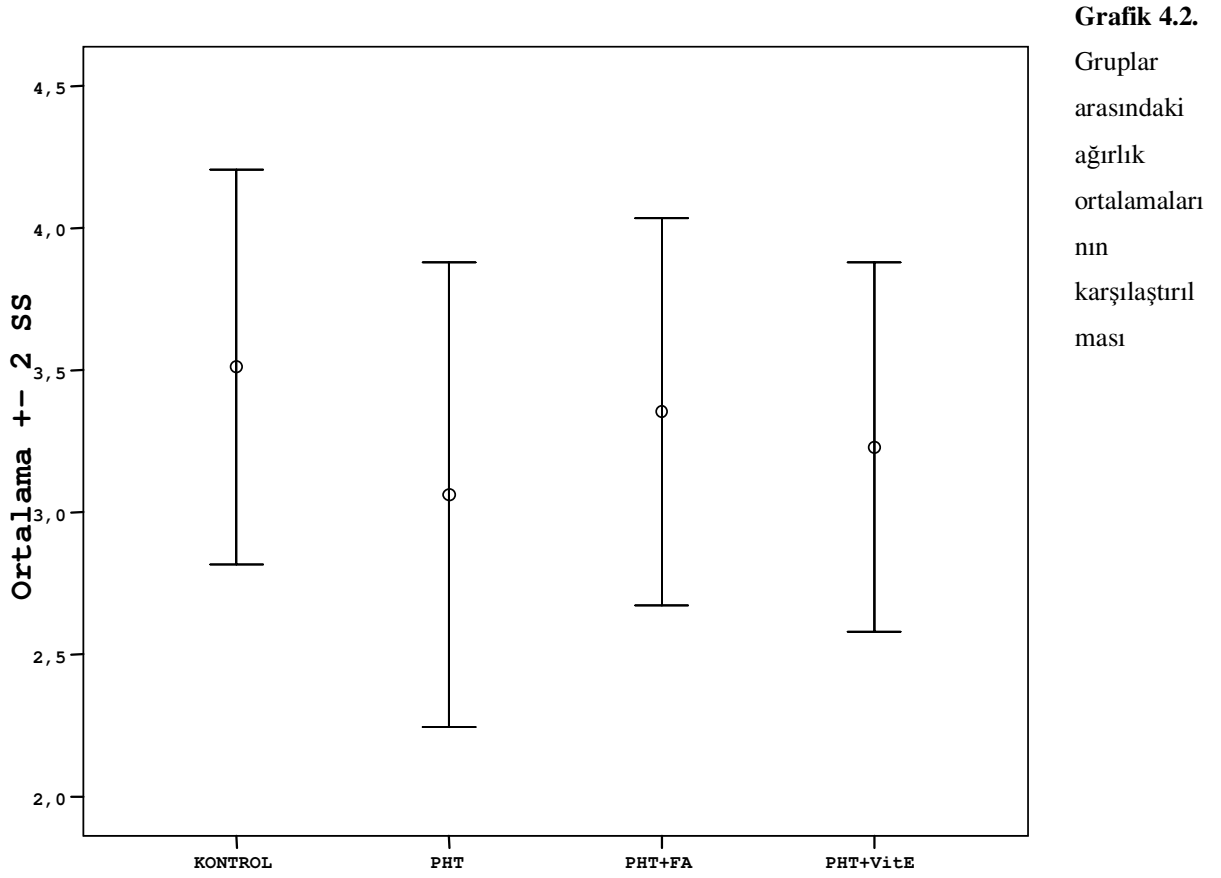
Gruplar	n	Ağırlık (gr) ($\bar{x} \pm SS$)	Boy (cm) ($\bar{x} \pm SS$)
Kontrol	40	3,51 $\pm$ 0,35 ^a	3,21 $\pm$ 0,27 ^a
PHT	42	3,04 $\pm$ 0,42 ^b	2,75 $\pm$ 0,29 ^b
PHT+FA	44	3,32 $\pm$ 0,35 ^{ca}	2,81 $\pm$ 0,28 ^b
PHT+Vit E	46	3,23 $\pm$ 0,33 ^{bc}	2,79 $\pm$ 0,33 ^b
P		< 0,001	< 0,001

^{abc}: Alfabetik üst simgeler çoklu karşılaştırma testleri Tukey'e göre aynı harfler grupların benzerliğini, farklı harfler ise gruplar arasındaki istatistiksel olarak farklılığı ifade eder.

Varyans analizi sonucu kontrol grubu ile deney gruplarının karşılaştırılması için yapılan çoklu karşılaştırma testlerinden Dunnet testine göre kontrol grubu ile deney gruplarına ait fetusların hem boy hem de ağırlık ölçüleri arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.



Grafik 4.1. Gruplar arasındaki boy ortalamalarının karşılaştırılması.



4.2. MİKROSKOBİK BULGULAR

İkili iskelet boyama yöntemi ile boyanan fetuslarda iskeleti oluşturan kemik ve kıkırdak yapıları incelendi. Kemikleşme merkezleri alizarin red S ile boyandığı için kırmızı, kıkırdak yapılar (kemiklerin epifiz ve eklem kıkırdakları, diskus intervertebralis'ler, burun kıkırdakları, kıkırdak kaburgalar) alcian blue ile boyandıkları için mavi renkte görüldü. Elde edilen veriler dikkate alınarak kontrol grubu ve deney gruplarındaki gelişim farkları incelenerek değerlendirildi. İncelenen sıçan fetuslarının kemikleşme durumunu üç farklı derecede sınıflandırıldı. Derecelendirilen gelişme durumları ve gözlemlendiği fetus sayısı tablo 4. 3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Kontrol ve deney gruplarına ait fetuslarda kemikleşme durumu.

Kemik	Yok				Az				İyi			
	Kontrol	PHT	PHT+ FA	PHT+ Vit E	Kontrol	PHT	PHT+ FA	PHT+ Vit E	Kontrol	PHT	PHT+ FA	PHT+ Vit E
Maxilla	-	10	-	-	-	1	2		40	31	42	46
Mandibula	-	1	-	-	-	10	2		40	31	42	46
Os nasale	-	28	1	-	-	2	5	-	40	12	38	46
Os frontale	-	10	1		-	16	6	46	40	16	37	-
Os parietale	-	26	5	46	-	2	22	-	40	14	17	-
Os occipitale	-	4	-	-	40	27	5	-	-	11	39	46
Cervical vertebralar	-	-	-	-	-	-	-	-	40	42	44	46
Thoracal vertebralar	-	25	-	-	-	4	-	-	40	13	44	46
Lumbal vertebralar	-	42	-	-	-	-	-	-	40	-	44	46
Sacral vertebralar	-	42	-	-	-	-	-	-	40	-	44	46
Caudal vertebralar	40	42	44	46	-	-	-	-	-	-	-	-
Costalar	-	-	-	-	-	11	4	1	40	31	40	45
Os scapulae	-	-	-	-	-	-	-	-	40	42	44	46
Os humerus	-	3	-	-	-	3	2	-	40	36	42	46
Os radius	-	7	-	-	-	9	3	-	40	26	41	46
Os ulna	-	5	-	-	-	9	3	-	40	28	41	46
Ossa carpi	40	42	44	46	-	-	-	-	-	-	-	-
Ossa metacarpi	-	28	-	-	-	5	-	-	40	9	44	46
Ossa digitorum	40	42	41	24	-	-	-	-	-	-	3	22
Os coxae	-	9		-	-	-			40	33	42	46
Os femoris	-	16	-	-	-	9	2	-	40	17	42	46
Os fibula	-	6	-	-	-	13	2	1	40	23	42	45
Os tibia	-	8	-	-	-	27	2	-	40	7	42	46
Ossa tarsi	40	42	44	46	-	-	-		40	-	-	
Ossa metatarsi	-	28	2	-	-	14	-	-	40	-	42	46
Ossa digitorum	40	42	44	24	-	-	-	-	-	-	-	22

Yok: Hiç kemikleşme görülmeyen, **Az:** Noktasal ya da dar bir alanda kemikleşme görülen, **İyi:** Diafizal kemikleşmesini tamamlamış, geniş çaplı kemikleşme görülen.

4.2.1. Kontrol grubunun mikroskopik bulguları

Kontrol grubu sıçanlarda baş bölgesi incelendiğinde, maxilla, mandibula, frontal ve parietal kemiklerin kemikleştikleri ve kırmızı renkte boyandıkları görüldü. Ancak kafatasının arka kısmında bulunan oksipital kemikte kemikleşmenin tamamlanmamış olduğu görüldü. Kafatasının ön bölümlerindeki burun kıkırdaklarının alcian blue ile boyanarak mavi renkte olduğu dikkati çekmektedir (Resim 4.1).

Atlas'ın oksipital kemik ile eklem yapan eklem yüzlerine ait kıkırdaklar belirgin olup mavi renkte boyanmış olarak görüldü Atlas, axis ve diğer boyun omurlarına ait corpus vertebrae kemikleşmiş olarak izlenirken, korpuslar arasında bulunan discus intervertebralis'ler mavi renkte görülmektedir (Resim 4.1, 4.2). Ancak omurlar arasında bulunan mesafenin omur gövdesinin kalınlığından daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum bize korpus ile diskusların eklem yaptığı yüzeylerin tam kemikleşmediğini ve kıkırdak özelliğini koruduğunu göstermektedir (Resim 4.2). Caudal vertebrae dışında columna vertebralis boyunca processus spinosus'ların uç kısımları kıkırdak özelliğini korumaktadır. Ancak arkusa yakın kısımları kemikleştiği için kırmızı renkli gözükmektedir. Caudal vertebrae tamamen kıkırdak yapıda olup mavi renkte görülmüştür (Resim 4.2).

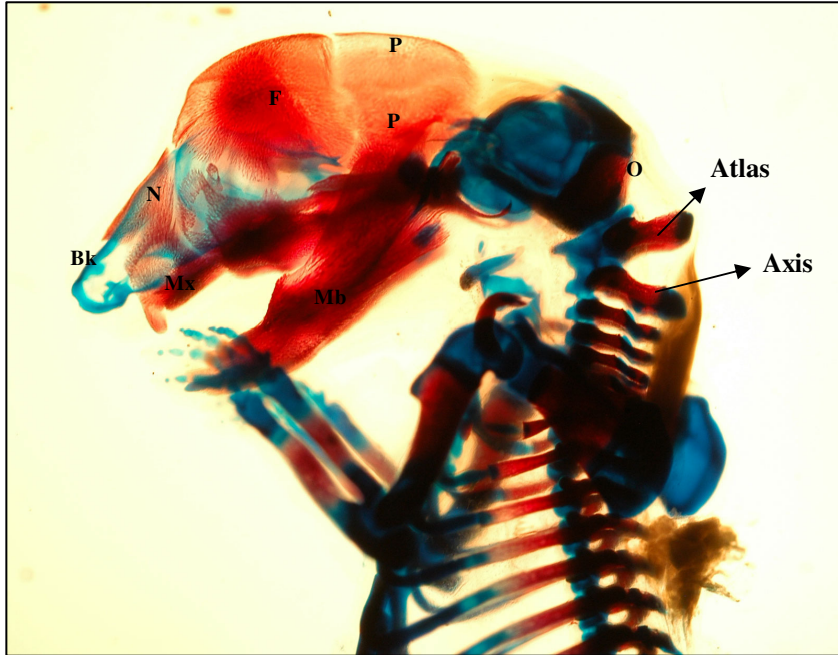
Kostalar, torakal vertebrae ile eklem yapan arka kısımlarda kemikleşmiş ve kırmızı renkte iken sternuma yakın yerlerde mavi renkte ve kıkırdak yapıda idi. Ancak 13 kosta sırasıyla incelendiğinde önden arkaya doğru gidildikçe kemikleşme miktarı azalmakta, kıkırdak kısımlar ise artmaktadır (Resim 4.1, 4.2, 4.3).

Ön ekstremité incelemesinde, omuz eklemi, dirsek eklemi ve el bileği eklemi normal yapıda olup mavi renkte görünmekteydi. Scapula'nın kemikleşmiş olduğu ve kırmızı renkte boyandığı görülmüştür. Ancak scapula'nın margo dorsalis'i ve cavitas glenoidalis'i örten bölümlerinin kıkırdak yapıda ve mavi renkte olduğu gözlenmiştir. Humerus'un proksimal ve distal ucunda bulunan tüm yapılar kıkırdak özelliğini korurken corpus humeri'nin (diyafiz) kırmızı renkte boyandığı yani kemikleştiği görülmektedir. Radius ve ulna'nın gövdelerinin (diyafizler) kemikleşmiş olduğu halde her iki kemiğe ait uç kısımların (epifizler) kıkırdak özelliğini koruduğu belirgin olarak görülmektedir (Resim 4.3).

Karpal kemiklerde kemikleşme belirtisi gözlenmezken mavi renkte kıkırdak taslakların varlığı izlenmektedir. Metakarpal kemiklerden 1. ve 5. si hariç hepsinin diyafizlerinin kemikleşmeye başlamış oldukları belirlenmiştir (Resim 4.3). Falankslarda ise hiçbir kemikleşme belirtisi mevcut değildi (Resim 4.1).

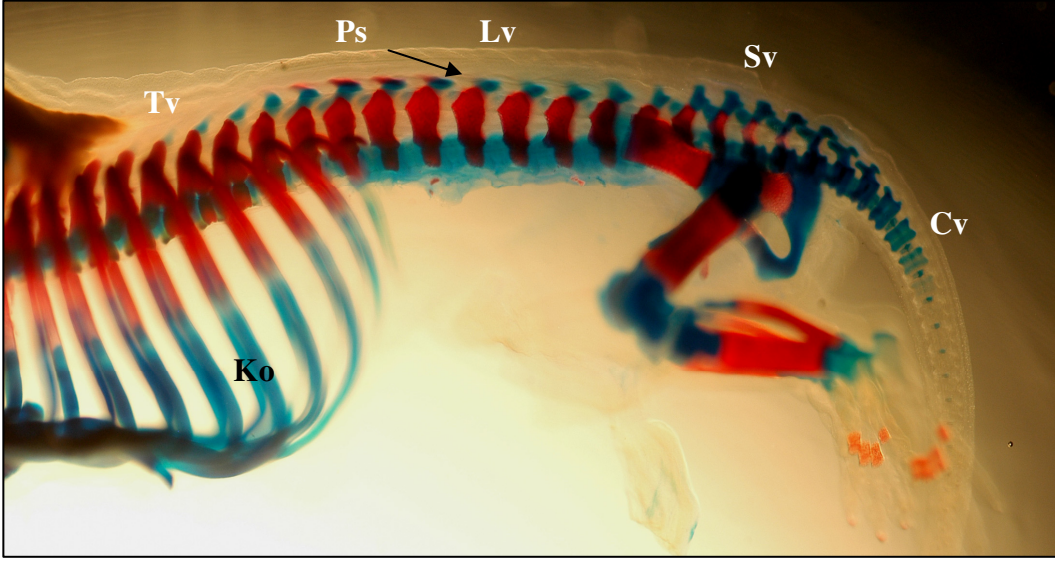
Arka ekstremité incelemesinde, kalça eklemi, diz eklemi, ayak bileği eklemi ve patella mavi renkte olup normal yapıda idi. Os coxae'nın orta kısımlarında görülen kırmızı renkler kemikleşmenin başladığını ancak, uç kısımlarında bulunan mavi renkli kıkırdak alanlar ise kemikleşmenin tamamlanmadığını göstermektedir. Femur, tibia ve fibula'nın korpusları alizarin red S ile kırmızıya boyanmış olduğu halde, uç kısımlarının kıkırdak taslakları mavi renkli olarak varlıklarını devam ettirdiği görülmektedir (Resim 4.4A).

Arka ayak iskeletine ait kemiklerden tarsal kemiklerde mavi renkte boyanan kıkırdak taslaklar dikkati çekerken, metatarsal kemiklerin korpuslarında kırmızı renkte boyanan kemikleşme merkezleri belirgin olarak izlenmektedir (Resim 4.4B). Phalanx'larda her hangi bir kemikleşme odağı izlenmemektedir (Resim 4.2., 4.4B).



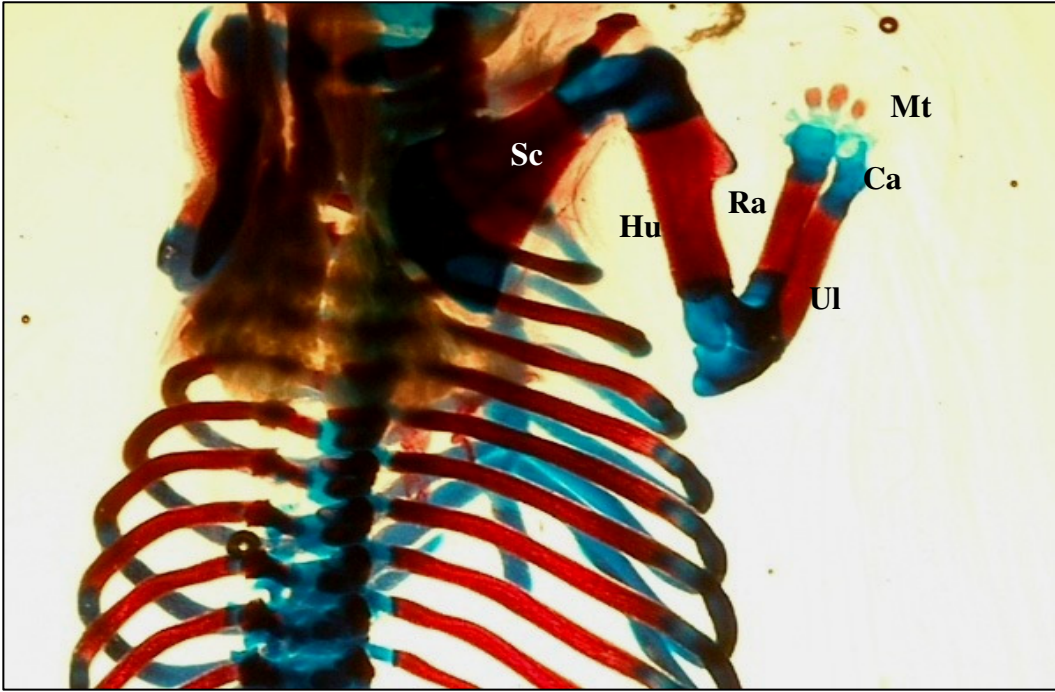
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait ikili iskelet boyaması uygulanmış bir sıçan fetusunun kafatası ve boyun vertebralarının yakından görünümü.

Mx: maxilla, **Mb:** mandibula, **N:** nasal, **F:** frontal, **P:** pariyetal kemik, **O:** oksipital kemik, **Bk:** burun kıkırdağı.



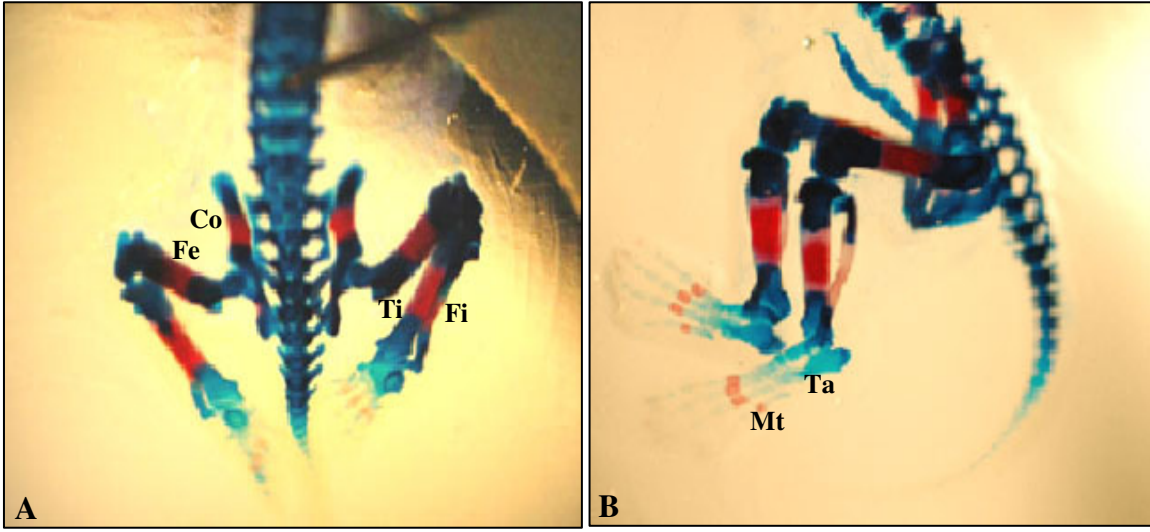
Resim 4.2. Kontrol grubuna ait fetusta vertebraların görünümü.

Tv: Torakal vertebralar, **Lv:** Lumbal vertebralar, **Sv:** Sakral vertebralar, **Cv:** Caudal vertebralar
Ps: Processus spinosus, **Ko:** Kosta.



Resim 4.3. Kontrol grubunda ön ekstremitenin görünümü.

Sc: Scapula, **Hu:** Humerus, **Ra:** Radius, **Ul:** Ulna, **Ca:** Karpal kemikler, **Mt:** Metakarpal kemikler.



Resim 4.4. İkili boyama uygulanmış kontrol grubu fetusun arka ekstremitte görünümü.

Co: Coxa, **Fe:** Femur, **Ti:** Tibia, **Fi:** Fibula, **Ta:** Tarsal kemikler, **Mt:** Metarasal kemikler.

A. Koksa, femur, tibia ve fibula kemikleşmesi,

B. Arka ayak iskeleti kemikleşmesi

4.2.2. Fenitoin grubunun mikroskobik bulguları

Bu gruptaki fetuslara ait kafa kemikleri incelendiğinde 31 kafatasında maksilla ve mandibula'nın tamamen kemikleşmiş olduğu (Resim 4.5A), geriye kalanlarda ise farklı derecelerde olmak üzere kemikleşme belirtileri görüldü (Resim 4.5B). 27 fetusta oksipital kemikte, 16 fetusta frontal kemikte kırmızı renkte boyanan iki küçük bölgede kemikleşmeler mevcutken (Resim 4.5A), 10 fetusa ait frontal kemikte ve 4 fetusa ait oksipital kemikte hiçbir kemikleşme belirtisi mevcut değildi (Resim 4.5B). 14 fetusun nasal ve 16 fetusun parietal kemiklerinin sadece bir kısmında kemikleşme merkezleri görülür iken, nasal ve parietal kemikler ile hiçbir maxilla ve mandibula'da kemikleşme belirtileri yoktu.

Columna vertebralis'i incelediğimizde atlas, aksis ve diğer boyun omurlarında kemikleşme merkezleri kırmızı renkleriyle oldukça belirgindi (Resim 4.6). Ancak thorakal vertebraların ön yarısında kemikleşme görülür iken arka yarısında kemikleşmenin azaldığı, spinoz çıkıntılarının kısaldığı ve spinoz çıkıntılar arasındaki açıklıkların genişlediği görüldü (Resim 4.6., 4.7.,4.8). Lumbal, sacral ve caudal omurlarda kemikleşme belirtisi görülmedi. Hatta kuyruğun sonuna

doğru yaklaştıkça caudal vertebraların kıkırdak yapılarının bile oluşmadığı görüldü (Resim 4.13A-B, 4.14).

Kaburgalar incelendiğinde kontrol grubunda olduğu gibi torakal vertebralar ile eklem yapan (caput costae) kısımlarının kemikleşmiş olduğu, sternum'a yakın kısımlarının ise kıkırdak yapıda olduğu görüldü. Bununla birlikte 13 kaburga sırasıyla incelendiğinde önden arkaya doğru ilerledikçe kaburgalardaki kemikleşme miktarında azalma buna karşılık kıkırdak kısımlarda artış olduğu görüldü. Ayrıca arka kısımdaki kaburgaların sternum'a yakın kısımları bağ dokusu özelliğini korumaktadır (Resim 4.6., 4.7., 4.8.).

Bu grupta farklı annelere ait toplam 11 fetusta değişik tipte ayrılma anomalileri tespit edilmiştir (Tablo 4.2). Bu fetuslarda tek taraflı (5 sağ ve 5 sol) ve çift taraflı (1 fetus) ayrılma anomalisi mevcuttu (Resim 4.6., 4.7., 4.8.). Bu tip anomalide sağ veya sol tarafta farklı seviyedeki iki kaburga arasındaki interkostal aralığın aşırı derecede arttığı ve bundan sonra gelen kaburgaların seyrinin ayrılma anomalisi gösteren kaburgayı takip ettiği görüldü (Resim 4.6., 4.7., 4.8.). Aynı zamanda bu kostalarda kemikleşme oldukça düzensiz olup özellikle son üç kaburganın kıkırdak gelişimi de tamamlanmamıştır (Resim 4.8.).

Tablo 4.4. Fenitoin grubuna ait fetuslarda görülen kaburga ayrılma anomalisi

Taraf	Fetus sayısı	Kosta aralığı
Sağ	1	7. intercostal aralık
Sağ	1	9. intercostal aralık
Sağ	3	10. intercostal aralık
Sol	2	7. intercostal aralık
Sol	1	8. intercostal aralık
Sol	2	11. intercostal aralık
Sağ-sol	1	11. intercostal aralık
Toplam	11	

Ön ekstremiteye ait incelemede kontrol grubuna benzer şekilde omuz eklemi, dirsek eklemi ve el bileği eklemi normal yapıda olup mavi renkte görülmekteydi. Scapula'nın bu gruba ait 42 fetusta

da kemikleşmiş olduğu ve kırmızı renkte boyandığı medial kenarı ve cavitas glenoidalis'i örten bölümlerinin ise kıkırdak yapıda ve mavi renkte olduğu görüldü (Resim 4.9).

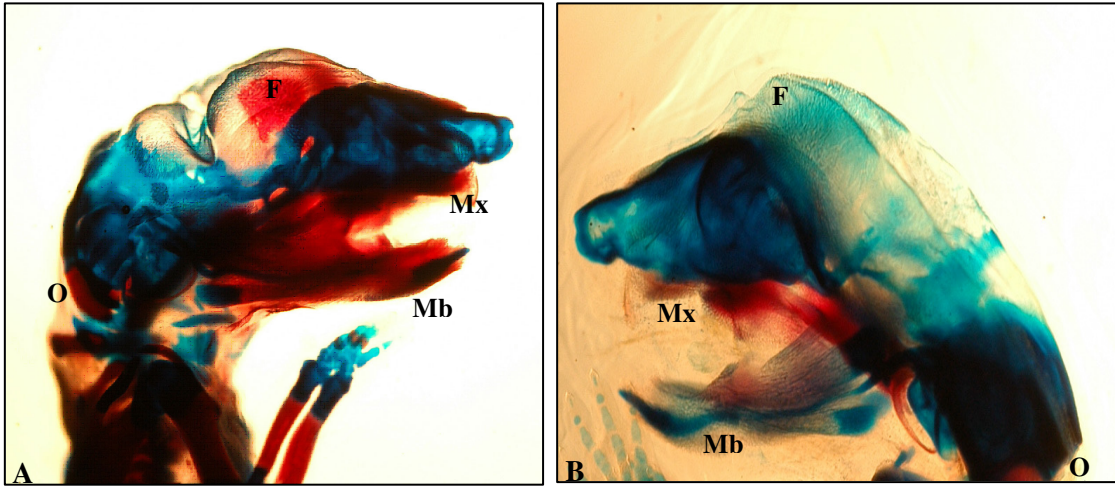
36 fetusta humerus'un proksimal ve distal uçlarında bulunan tüm yapılar kıkırdak özelliğini korurken corpus humeri'nin (diyafiz) kırmızı renkte boyandığı yani kemikleştiği görülmektedir (Resim 4.9). Geriye kalan 6 humerus'un üçünde çok az kemikleşme mevcut iken (Resim 4.10A), diğer 3'ünde hiç kemikleşmeye rastlanmadı (Resim 4.10B). 26 fetusta radius ve 28 fetusta ulna'nın gövdelerinin kemikleşmiş olduğu dikkati çekmektedir (Resim 4.9). Bunun dışında 7 radius ve 5 ulna'nın hiçbir kemikleşme belirtisi göstermediği, kemikleşmesi gereken kısımların (diyafiz) tamamen bağ dokusu özelliğinde kaldığı ancak her iki kemiğe ait uç kısımların kıkırdak özelliğini koruduğu belirgin olarak görülmektedir (Resim 4.10). Geriye kalanlarda farklı seviyelerde kemikleşme belirtileri mevcuttu.

Ön ayak iskeleti incelendiğinde karpal kemiklerin hiçbirinde kemikleşme belirtisi gözlenmezken mavi renkte kıkırdak taslakların varlığı izlenmektedir (Resim 4.10A., 4.11). Ancak bu kıkırdak taslaklarında gelişim bozuklukları mevcut olup kıkırdak gelişiminin tamamlanmadığı görüldü (Resim 4.9., 4.10B). Metakarpal kemiklerde de benzer şekilde kıkırdak taslaklarının tam gelişmediği özellikle 1. metakarpal kemiğin kıkırdak taslağının 5 fetusta çok az olarak geliştiği (Resim 4.10 A), bazılarında (28) ise hiç gelişmediği (Resim 4.10 B) de görüldü. Sadece bir fetusta ise el iskeletinin kıkırdak taslağının tamamıyla gelişmiş olduğu ancak herhangi bir kemikleşme belirtisinin olmadığı tespit edilmiştir (Resim 4.11).

Fenitoin grubuna ait fetusların arka ekstremiteleri incelendiğinde, kalça eklemi, diz eklemi, ayak bileği eklemi ve patella'nın mavi renkte olduğu ve kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği tespit edildi. 33 fetusta os coxae'nın merkezi kısımlarında görülen kırmızı renkler kemikleşmenin başladığını, ancak periferik kısımlarında görülen mavi renkler ise kıkırdak taslakların varlığını ve kemikleşmenin tamamlanmadığını (Resim 4.12 A.) gösterirken 9 fetusta tamamen kemikleşmeden yoksun durumdaydı (Resim 4.12 B.). 17 femur ve 23 tibia ve 7 fibula'nın gövdelerinde kemikleşme görülürken uç kısımlarında ise kıkırdak taslaklar mavi renkli olarak görülmektedir (Resim 4.12A). Buna karşın 16 femur, 6 tibia ve 8 fibula'nın hiç kemikleşmediği ve bağ dokusu özelliğini koruduğu da gözlenmiştir (Resim 4.12B).

Bu gruba ait bazı fetuslarda (9) femurun gövdesinde gözlenen kemikleşme merkezinin boyu kontrol grubuna göre daha kısaydı (Resim 4.13). Tibia ve fibula'ya ait kemikleşme merkezleri 23 fetusta her iki tarafın gövdesinde de açıkça izlenirken, 1 fetusta fibula sol tarafta kemikleşme görülürken sağ tarafta çok az kemikleşme belirtisi görülmektedir (Resim 4.14).

PHT grubuna ait arka ayak iskeleti kemikleri incelendiğinde bu gruba ait 42 fetusta tarsal kemiklerde soluk mavi renkte boyanan kıkırdak taslaklar dikkati çekerken kemikleşmeye ait hiçbir belirti görülmemiştir (Resim 4.14). 28 fetusa ait metatarsal kemiklerde kemikleşme belirtisi görülmezken (Resim 4.13B), 14 fetusta soluk kırmızı renkte boyanan kemikleşme merkezleri görüldü (Resim 4.14). Falankslara ait hiçbir kemikleşme belirtisi yokken kıkırdak taslakların varlığı dikkati çekmiştir (Resim 4.13B, 4.14).



Resim 4.5. Fenitoin grubu fetusların ikili iskelet boyaması. Kafa kemikleri kemikleşmesi.

Mx: Maxilla, **Mb:** Mandibula, **O:** Oksipital kemik, **F:** Frontal kemik.

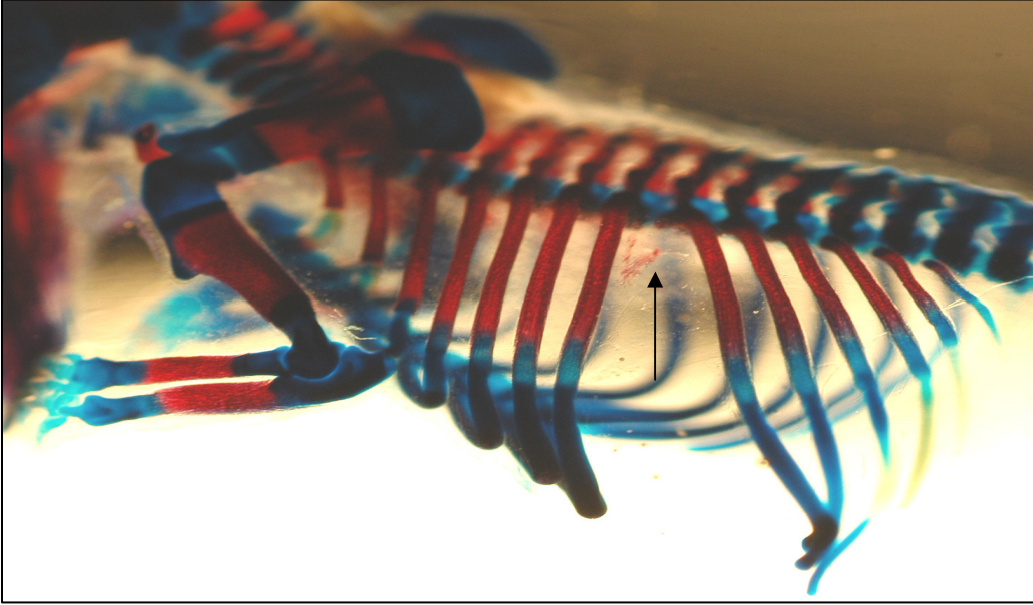
A. Küçük bölgelerde kemikleşme

B. Farklı derecelerde kemikleşme



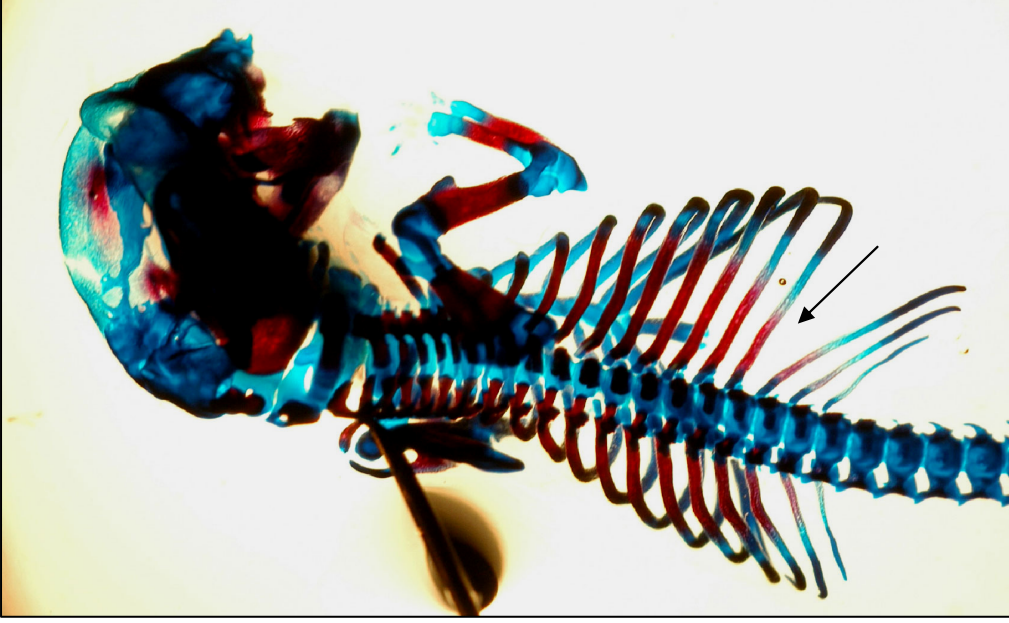
Resim 4.6. Fenitoin grubundan vertebralar ve kostaların görünümü.

Ok (→) 11. interkostal aralık



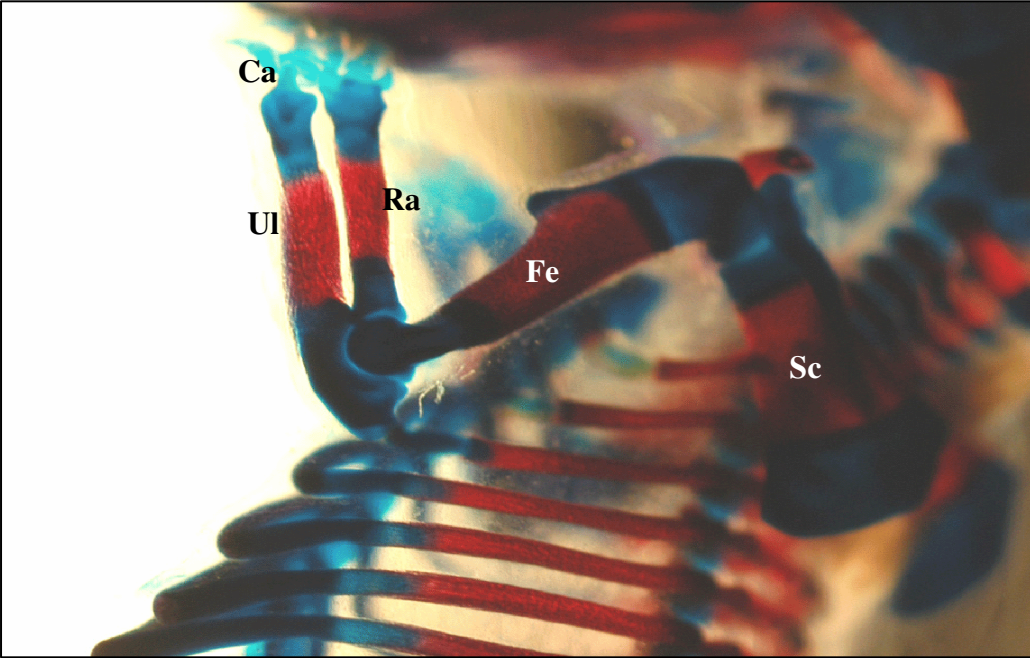
Resim 4.7. Fenitoin grubundan vertebralar ve kostaların görünümü.

Ok (→) 7. interkostal aralık



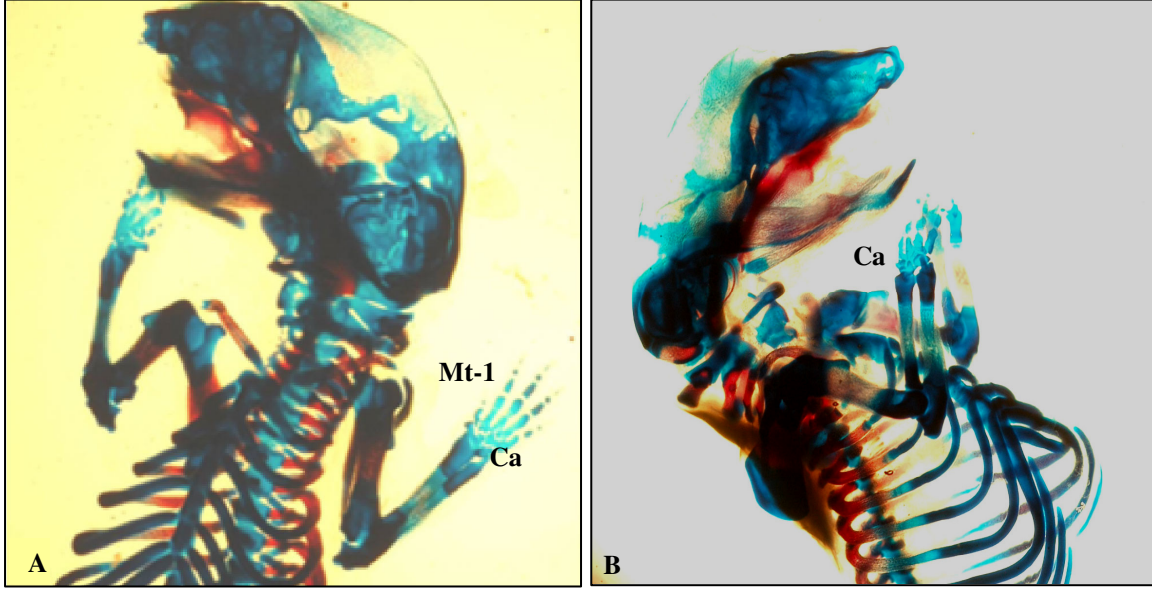
Resim 4.8. Fenitoin grubundan vertebralar ve kostaların görünümü.

Ok (→) 10. interkostal aralık



Resim 4.9. Fenitoin grubundan ön ekstremité görünümü.

Sc: Scapula, Fe: Femur, Ra: Radius, Ul: Ulna, Ca: Karpal kemikler.



Resim 4.10. Fenitoin grubundan ön ekstremitte görünümü.

Ca: Karpal kemikler, **Mt-1:** 1. metakarpal kemik.

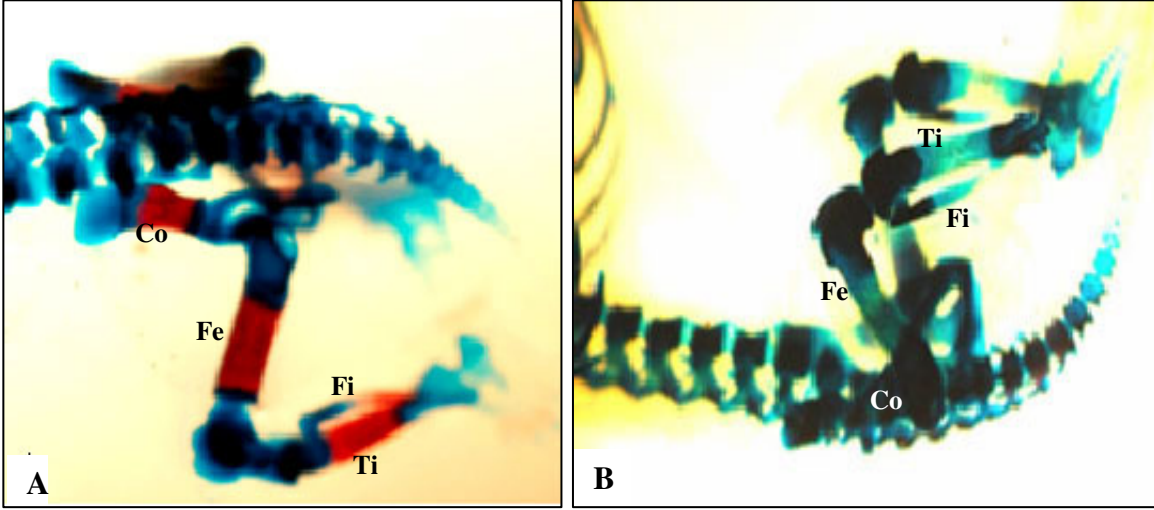
A. Radius ve ulnanın kemik gelişimi, karpal kemiklerin kıkırdak gelişimi,

B. Karpal, metakarpal kemiklerin kıkırdak gelişimi,



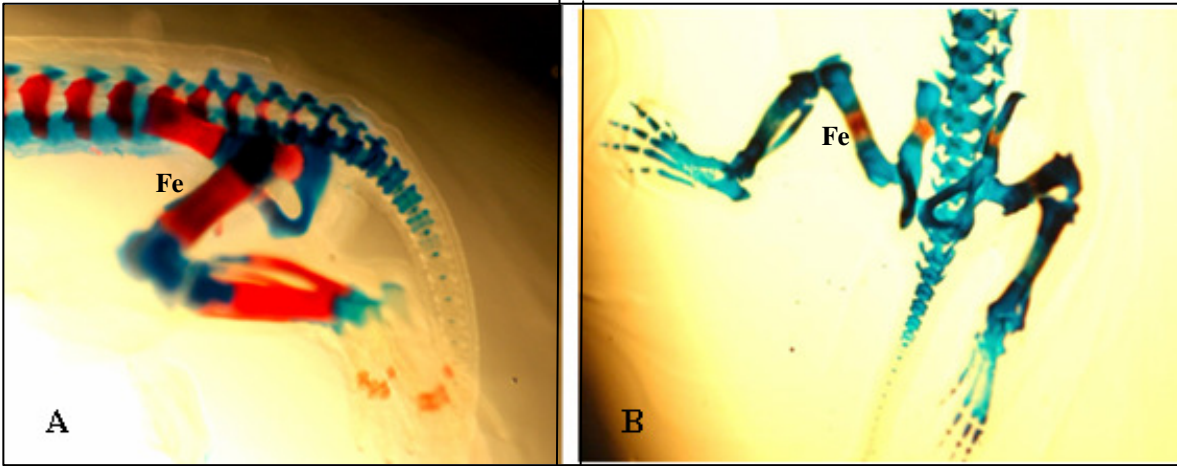
Resim 4.11. Fenitoin grubu ön ayak iskeleti görünümü.

Ca: Karpal kemikler, **Mt:** Metakarpal kemikler **Fl:** Falankslar



Resim 4.12. Fenitoin grubu arka ekstremite görünümü.

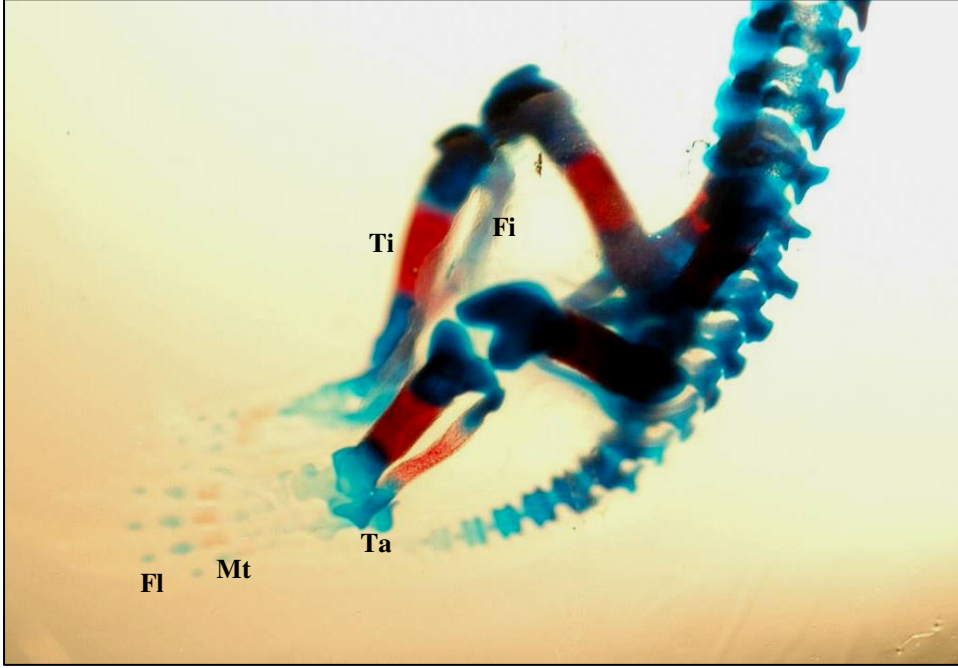
Co: Coxa, **Fe:** Femur, **Ti:** Tibia, **Fi:** Fibula.



Resim 4.13. Femur'un kemikleşme miktarının karşılaştırılması. **Fe:** Femur

A. Kontrol grubuna ait femur'un kemikleşmesi.

B. Fenitoin grubuna ait femur'un kemikleşmesi.



Resim 4.14. Fenitoin grubuna ait arka ekstremité görünümü.

Ti: Tibia, **Fi:** Fibula, **Ta:** Tarsal kemikler, **Mt:** Metatarsal kemikler, **Fl:** Falanksılar.

4.2.3. Fenitoin + Folik Asit grubunun mikroskopik bulguları

Bu grubun ikili iskelet boyamasında, tüm vücuda ait kemikleşmenin genel olarak kontrol grubuna yakın şekilde olduğu görüldü. Fakat tek tek incelediğimizde bazı fetuslarda belirli bölgelerdeki kemikleşmenin kontrol grubundan bile daha iyi durumda olduğu gözlenirken bazılarında ise kontrol grubuna göre daha geride olduğu dikkati çekmiştir.

Kafatası kemiklerine genel olarak baktığımızda, 3 fetusun kafatasında kemikleşme merkezleri kontrol grubundan daha iyi gözlenirken (Resim 4.15A), 5 fetusa ait kafatasında ise kontrol grubundan geride olduğu dikkati çekiyordu (Resim 4.15B).

Kafatası kemiklerini tek tek incelediğimizde, bu gruba ait 39 fetusta oksipital kemik kontrol grubuna benzer şekilde kemikleşmiş (tamamlanmamış kemikleşme) olduğu gözlenirken kalan 5 kemikte daha az kemikleşme görüldü (Resim 4.15A-B).

Kafatasının ön bölümlerindeki burun kıkırdakları alcian blue ile boyanarak tamamen mavi renkte gözlenmiştir (Resim 4.16A).

38 fetusta nasal kemik, 37 fetusta frontal kemik, 42 fetusta maxilla ve mandibula tamamen kemikleşmiş olup kırmızı renkte boyanmış olarak izlenmektedir. Buna karşın 5 fetusta nasal kemikte, 6 fetusta frontal kemikte ve 2 fetusta maxilla ve mandibula'da kemikleşmenin farklı derecelerde ve daha az olarak geliştiği gözlemlendi (Resim 4.16B).

Parietal kemikte kemikleşme daha farklı olup 17 fetusta kemikleşme tamamlanmış gözlenirken (Resim 4.16A), 22 fetusta sadece çok küçük bir kısmında kemikleşme görülmüştür. 5 fetusta ise parietal kemikte hiç kemikleşme belirtisi olmayıp bağ dokusu özelliğindedir (Resim 4.15B).

Omurgayı incelediğimizde, 41 fetusta atlas, axis ve diğer boyun omurlarının kemikleşme belirtileri kontrol grubunda olduğu gibi kırmızı renkleriyle oldukça belirgindi (Resim 4.17). Geriye kalan 3 fetusta, kontrol grubundan daha iyi kemikleşme mevcuttu (Resim 4.15A)

Bu gruba ait fetusların tümünde kaudal vertebralar dışında vertebraların bütün bölümlerinde (torakal, lumbal, sakral) kemikleşme kırmızı renkli boyanmış olarak belirgindi (Resim 4.17, 4.18). Ancak kontrol grubundan farklı olarak 4 fetusa ait sakral vertebraların kemikleşmelerini tamamlamış olduğu dikkati çekmiştir (Resim 4.17, 18). Kaudal vertebralar bu gruba ait bütün fetuslarda kıkırdak oluşumunu tamamlamış ve mavi renkli olarak belirgindi (Resim 4.18).

Kaburgalar 40 fetusta kontrol grubunda olduğu gibi torakal vertebralar ile eklem yapan kısımlarının (caput costae) kemikleşmiş olduğu, sternuma yakın kısımlarının ise mavi renkte olup kıkırdak yapıda olduğu görüldü (Resim 4.17, 4.18). Ancak PHT grubuna ait fetuslarda karşılaştığımız kostalarda kemikleşme eksiklikleri ve ayrılma anomalisi burada da karşımıza çıkmıştır. Buna göre sadece 4 fetusta son iki kostada olmak üzere kemikleşme belirtisi gözlenmezken bu iki kaburganın diğerlerinden ayrıldığı gözlenmiştir (Resim 4.19).

Ön ekstremiteye ait incelemede kontrol grubuna benzer şekildeydi. Omuz eklemi, dirsek eklemi ve el bileği eklemi normal yapıda olup mavi renkte görünmekteydi. Scapula'nın 44 fetusta da kemikleşmiş olduğu ve kırmızı renkte boyandığı dorsal kenarı ile cavitas glenoidalis'i örten bölümlerinin kıkırdak yapıda ve mavi renkte olduğu gözlenmiştir (Resim 4.15, 4.16).

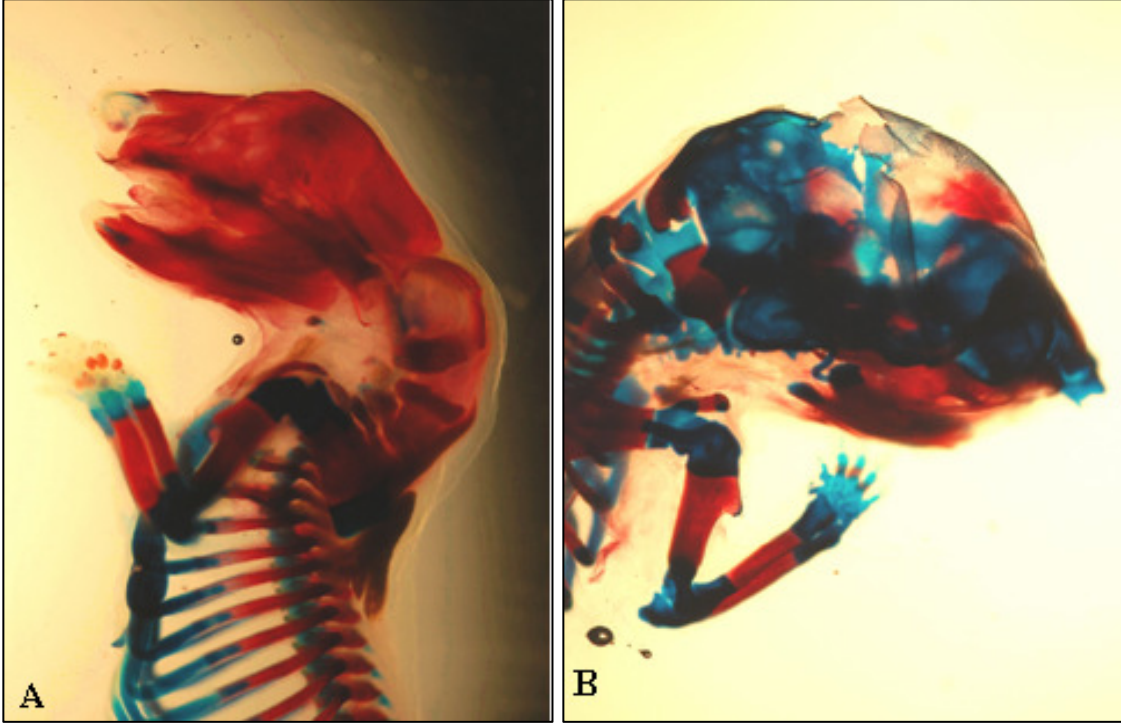
Humerus'un (42 fetusta) proksimal ve distal ucunda bulunan tüm yapılar kıkırdak özelliğini korurken corpus humeri'nin (diyafiz) kırmızı renkte boyandığı yani kemikleştiği görülmektedir

(Resim 4.15A-B). Kalan 2 fetusta ise çok az kemikleşme mevcuttu (Resim 4.20). Kemikleşmenin olmadığı hiçbir fetus saptanmamıştır. 41 fetusta radius ve ulna'nın gövdelerinin kemikleşmiş olduğu (Resim 4.15A-B), 3 fetusta kemikleşme miktarında çok az gerilik görüldü (Resim 4.20).

Ön ayak iskeletinden karpal kemiklerin hiçbirinde kemikleşme belirtisi gözlenmezken mavi renkte kıkırdak taslakların varlığı izlenmiştir (Resim 4.15.,4.20). Metakarpal kemiklerde ise kontrol grubuna ve PHT grubuna benzer şekilde 1. metakarpal kemik dışında hepsinde kemikleşme mevcuttur (Resim 4.15B., 4.20). Bundan başka hiçbir grupta gözlenmemiş olan 2 fetusta sol elde başparmağın kıkırdak taslağının bile oluşmamış olduğu görülürken (Resim 4.20), beşinci parmağa ait metakarpal kemikte kemikleşme belirtisi izlenmedi (Resim 4.20). Falankslardan distal falankslarda, kafatası kemikleri kontrol grubundan daha iyi kemikleşmiş olan 3 fetusta kemikleşme belirtisi gözlenirken (Resim 4.15A), phalanx proksimalis ve phalanx media'da kemikleşmeye ait iz görülmedi (Resim 4.20).

Arka ekstremitte incelemesinde, kalça eklemi, diz eklemi, ayak bileği eklemi ve patella mavi renkte olup kontrol grubu ile benzerdi. 42 fetusta os coxae'nın femur, tibia ve fibula'nın korpusları alizarin red S ile kırmızıya boyanmış olup, uç kısımlarının kıkırdak taslakları mavi renkli olarak varlıklarını devam ettirdiği görülmektedir (Resim 4.17, 4.18). Kalan 2 fetusta ise bu kemiklerde kemikleşme geride kalmıştır (Resim 4.19).

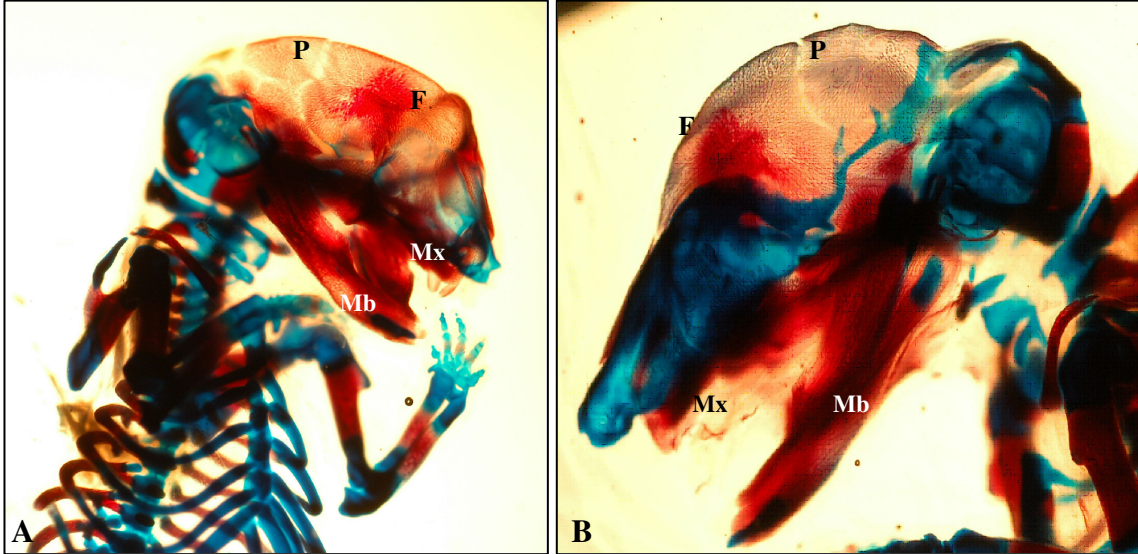
Arka ayak iskeletine ait kemiklerden tarsal kemiklerin hepsinde mavi renkte boyanan kıkırdak taslaklar dikkati çekerken, metatarsal kemikler 44 fetusun 42'sinde korpuslarının kırmızı renkte boyanan kemikleşme merkezleri belirgin olarak izlenirken (Resim 4.18.). 2 fetusta kemikleşme hiç yoktu (Resim 4.19).



Resim 4.15. PHT+FA grubunun kafatası kemiklerinin görünümü.

A. Kemikleşme merkezleri kontrol grubundan daha iyi.

B. Kemikleşme merkezleri kontrol grubundan geride.

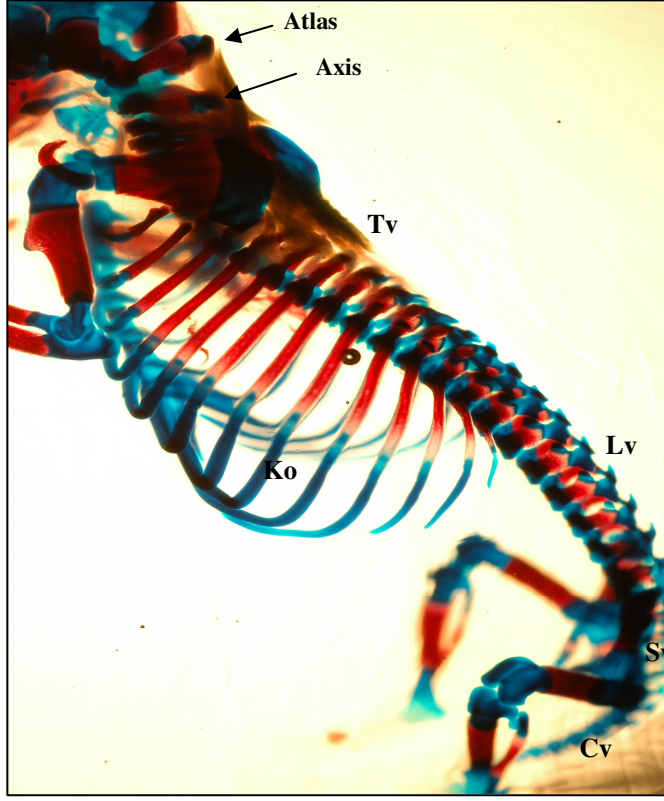


Resim 4.16. Fenitoin+Folik asit grubuna ait fetuslarda kafatası kemikleşmesi

N: Nasal kemik **F:** Frontal kemik **P:** Parietal kemik **Mx:** Maxilla **Mb:** Mandibula

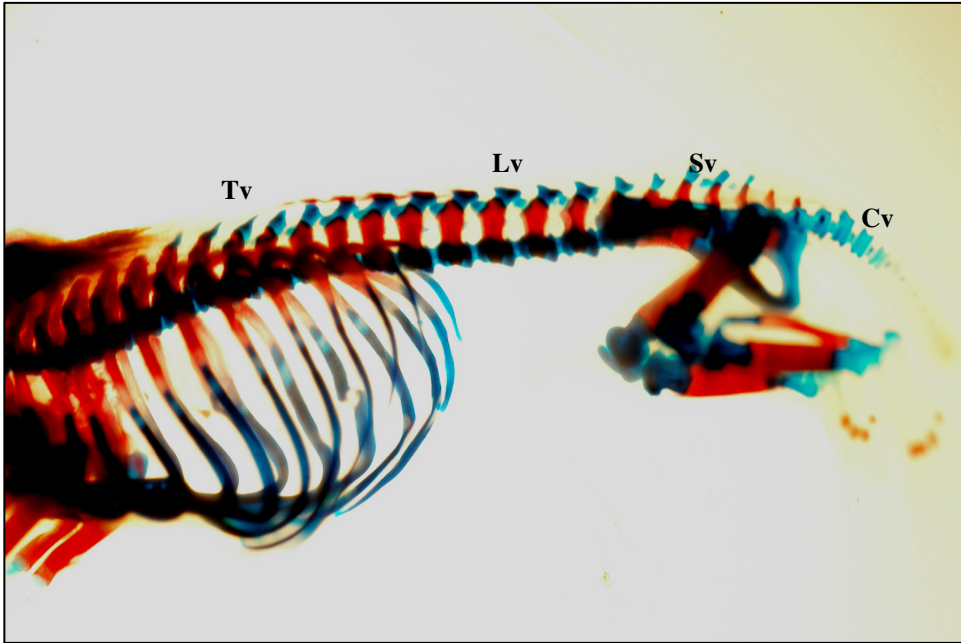
A. Parietal kemikte kemikleşme durumu ve burun kıkırdağı görünümü.

B. Kafa kemiklerinde farklı derecelerde kemikleşme.

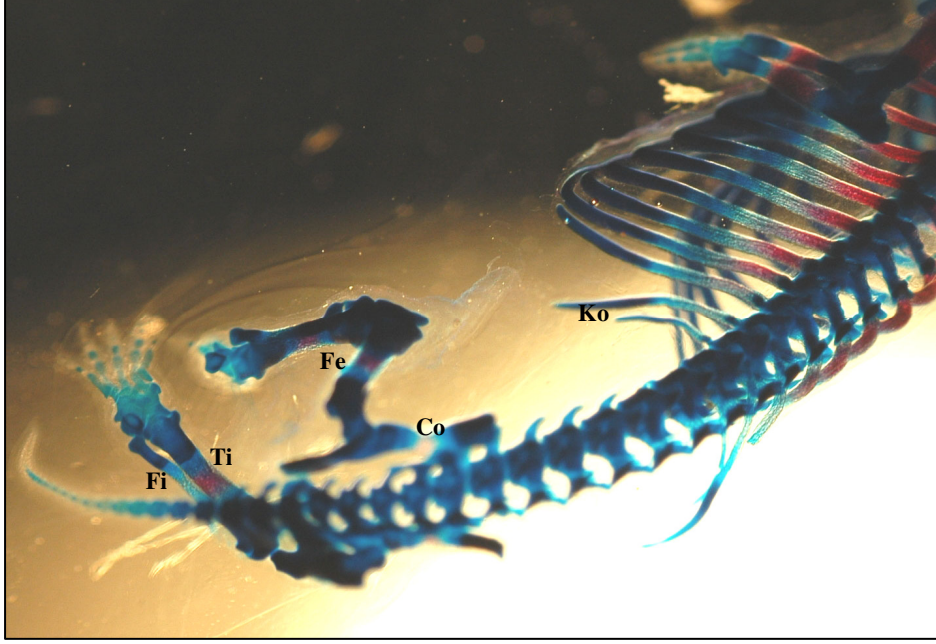


Resim 4.17. PHT+FA grubunda vertebraların ve kostaların görünümü.

Tv: Torakal vertebralar, **Lv:** Lumbal vertebralar, **Sv:** Sakral vertebralar
Cv: Kaudal vertebralar, **Ko:** Kostalar.

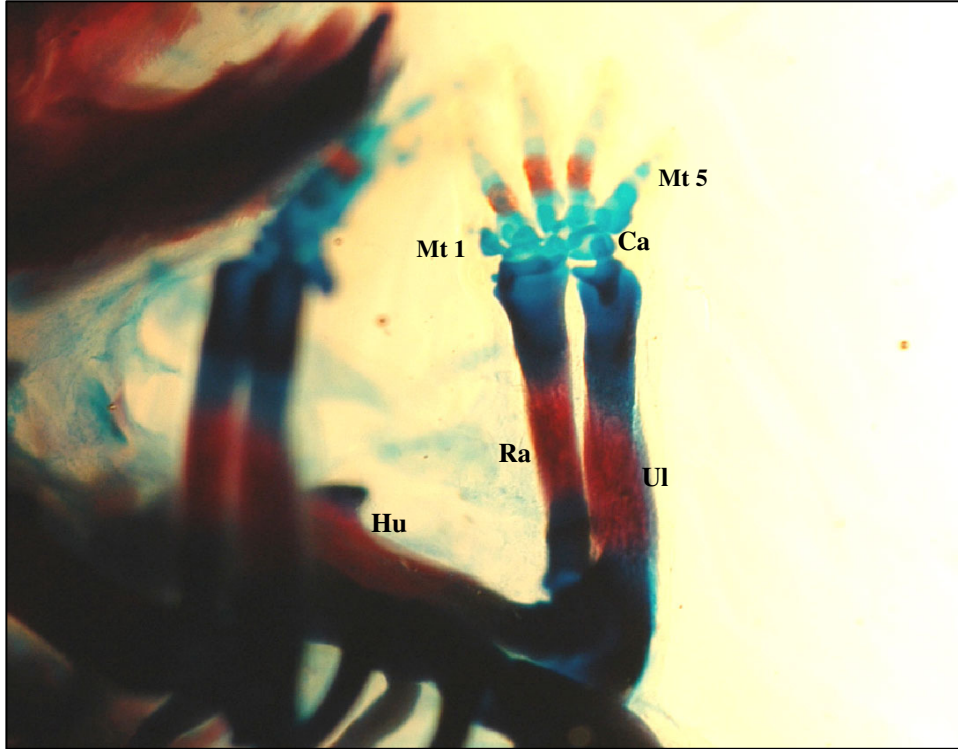


Resim 4.18. PHT+FA grubunda vertebraların görünümü. **Tv:** Torakal vertebralar, **Lv:** Lumbal vertebralar, **Sv:** Sakral vertebralar, **Cv:** Kaudal vertebralar.



Resim 4.19. PHT+FA grubuna ait fetusta arka ekstremite görünümü.

Co: Os coxae, **Fe:** Femur, **Ti:** Tibia, **Fi:** Fibula, **Ko:** Kosta.



Resim 4.20. PHT+FA grubuna ait fetusta ön ekstremite görünümü.

Hu: Humerus **Ra:** Radius **Ul:** Ulna **Ca:** Karpal kemikler **Mt - 1:** 1. metakarpal kemik

Mt - 5: 5. metakarpal kemik

4.2.4. Fenitoin + Vitamin E grubunun mikroskopik bulguları

Bu gruba ait fetusların incelemesinde bütün fetusların (46 fetus) kafa bölgesinde maxilla, mandibula, nasal ve oksipital kemiklerde kemikleşmenin tamamlandığı, 46 fetusta frontal kemikte kemikleşmenin geride kaldığı gözlenmiştir. Ayrıca bütün fetuslarda parietal kemiklerde bağ dokusu kemikleşmeye başlamış olduğu halde kemikleşmeye ait belirtiler çok azdı (Resim 4.21).

PHT+ Vit. E grubundaki fetusların vertebraları incelendiğinde, kontrol grubunda olduğu gibi atlas, axis ve diğer boyun omurları, torakal, sakral ve lumbal omurlara ait corpus vertebralar kemikleşmiş olarak izlenirken, korpuslar arasında bulunan discus intervertebralis'ler mavi renkte görülmektedir. Caudal vertebralar tamamen kıkırdak yapıda olup mavi renkte görülmüştür (Resim 4.21, 4.22, 4.25).

Bu gruba ait 45 fetusta kostalar, torakal vertebralar ile eklem yapan arka kısımlarda kemikleşmiş ve kırmızı renkte iken sternuma yakın yerlerde mavi renkte ve kıkırdak yapıda idi. Ancak 13 kosta sırasıyla incelendiğinde sadece 1 fetusta iki tarafın son kostalarında (13. kosta) düzensizlik, incelme ve kemikleşme eksikliği görüldü (Resim 4.23).

Ön ekstremitte incelemesinde, omuz eklemi, dirsek eklemi ve el bileği eklemi normal yapıda olup mavi renkte görülmekteydi. Scapula, humerus, radius ve ulna'nın kontrol grubuna benzer şekilde kemikleşmesini tamamlamış olduğu tespit edildi (Resim 4.21).

Karpal kemiklerde kemikleşme belirtisi gözlenmezken metakarpal kemiklerin hepsinin diyafizlerinin kemikleşmiş oldukları belirlendi (Resim 4.21). Kontrol ve diğer deney gruplarından farklı olarak distal falankslara ait kemikleşme 46 fetusun 22'sinde mevcuttu (Resim 4.24).

Arka ekstremitte incelemesinde, kalça eklemi, diz eklemi, ayak bileği eklemi ve patella mavi renkte olup kontrol grubu ile aynı idi. Yine kontrol grubunda olduğu gibi os coxae, femur ve tibia'nın korpusları alizarin red S ile kırmızıya boyanmış olup kemikleştikleri, uç kısımlarının kıkırdak taslakları mavi renkli olarak varlıklarını devam ettirdiği görülmektedir (Resim 4.25). Ancak fibula'nın proksimal bölümünde kemikleşme izlenmedi (Resim 4.22).

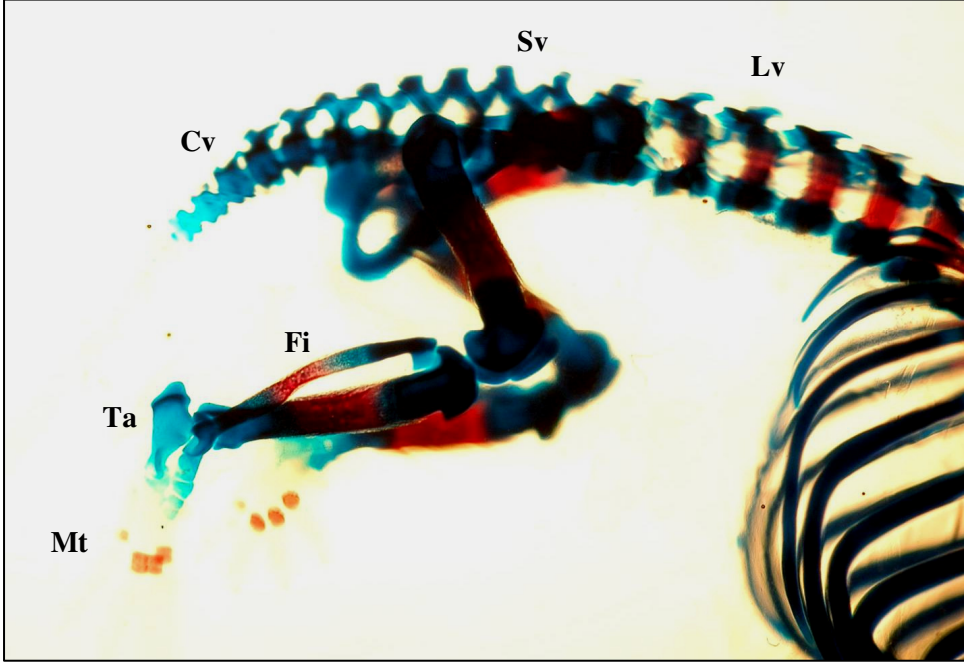
46 fetusun 45'inde arka ayak iskeletine ait kemiklerden tarsal kemiklerde mavi renkte boyanan kıkırdak taslaklar mevcut olup, metatarsal kemiklerin korpuslarında kırmızı renkte boyanan

kemikleşme merkezleri oldukça belirgin olarak izlenmiştir (Resim 4.22). Ancak sadece 1 fetusta tarsal kemiklerde kıkırdak gelişimi geride ve metatarsal kemiklerde kemikleşme oldukça ileride idi. Hatta bu 1 fetusla birlikte toplam 22 fetusta distal phalanx'larda kemikleşme odaklarının varlığı soluk kırmızı rengiyle görülmekte iken kalan 24 fetusta phalanx media ve phalanx proksimalis'lerde her hangi bir kemikleşme odağı izlenmedi (Resim 4.25).

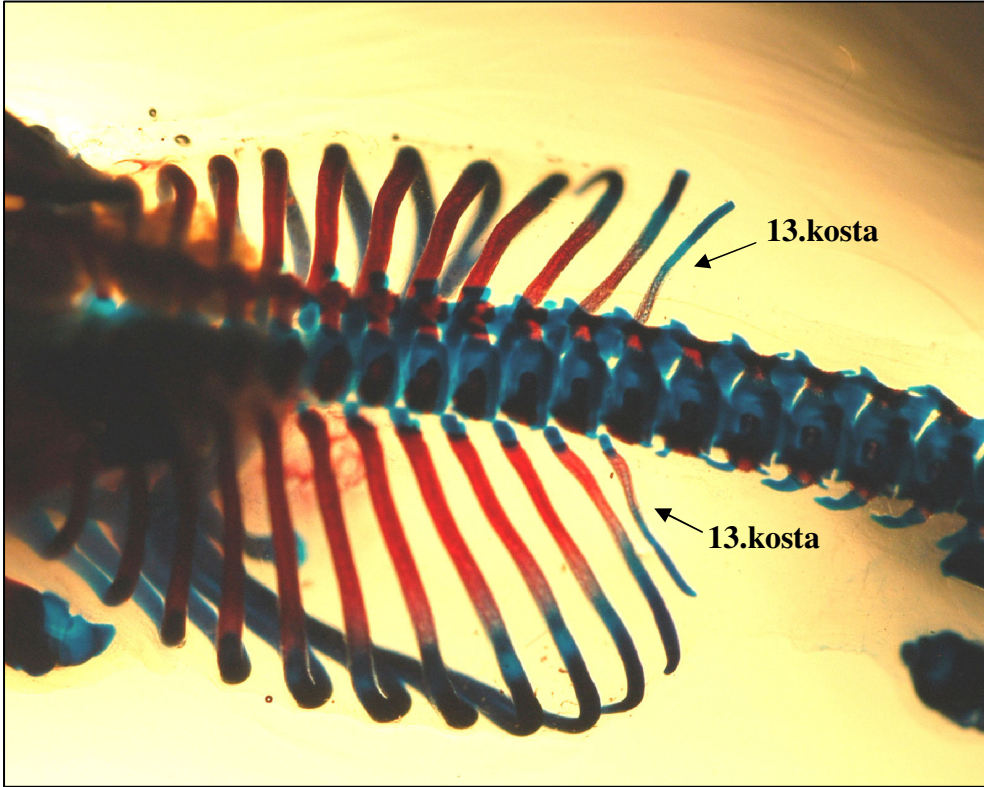


Resim 4.21. Fenitoin+Vit E grubundan kafatası ve ön ekstremité görünümü.

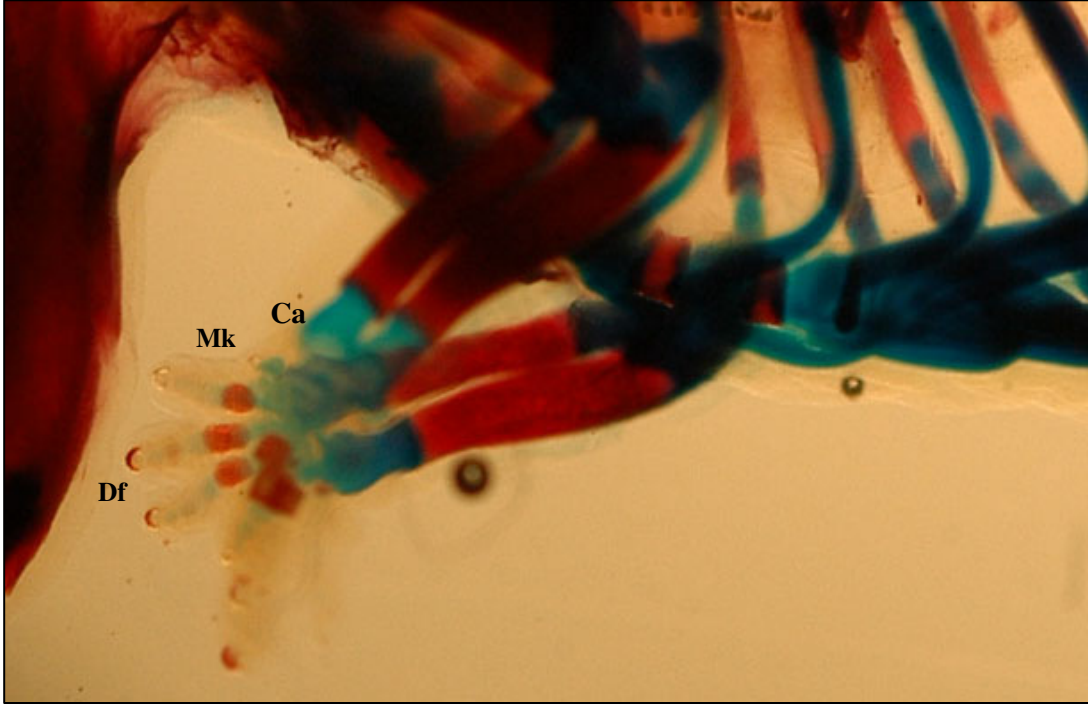
Mx: Maxilla, **Mb:** Mandibula, **F:** Frontal kemik, **P:** Parietal kemik.



Resim 4.22. PHT+Vit E grubuna ait fetusta vertebralar (Lumbal, Sakral, Caudal) ve arka ekstremiteden görünümü. Lv: Lumbal vertebralar, Sv: Sakral vertebralar, Cv: Kaudal vertebralar, Fi: Fibula, Ta: Tarsal kemikler Mt: Metatarsal kemikler

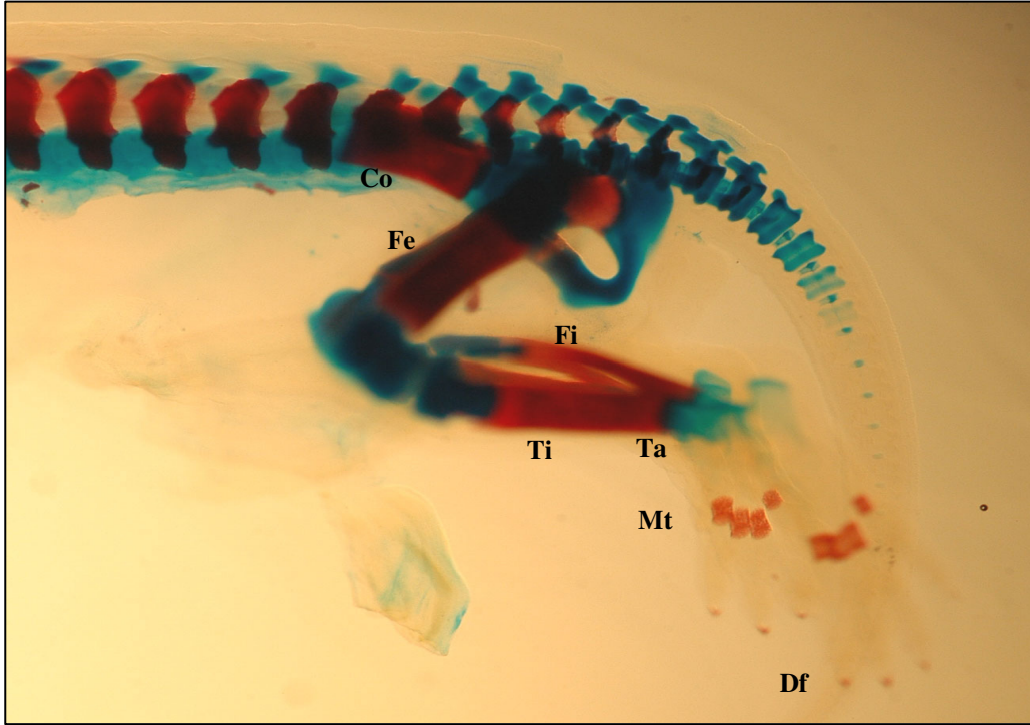


Resim 4.23. PHT+Vit E grubu fetusta kostaların görünümü. 13. kostada gelişim geriliği.



Resim 4.24. PHT+Vit E grubunda ön ayak iskeleti.

Ca: Karpal kemikler, **Mk:** Metakarpal kemikler, **Df:** Distal falanks.



Resim 4.25. PHT+Vit E grubu fetusta arka ekstremité görünümü.

Co: Os coxae, **Fe:** Femur, **Ti:** Tibia, **Fi:** Fibula, **Ta:** Tarsal kemikler, **Mt:** Metatarsal kemikler, **Df:** Distal falanks.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemik gelişimi ve şekillenmesi oldukça karmaşık bir olaydır. İlaçlar, viral hastalıklar, bakteriyel enfeksiyonlar ve radyasyon, normal insan embriyonik gelişimine olumsuz yönde etki ederler. Gebelik sırasında kullanılan ilaçların toksik etkileri iskelet sistemi gelişiminde gerilikler oluşturabilir. Antineoplastik ilaçlar, talidomid, bazı antiepileptik ilaçlar, seks hormonları ve benzeri ilaçlar ve antagonistleri bu tür ilaçlardandır. Antiepileptik ilaçların kemik gelişimi üzerine etkilerini inceleyen birçok çalışma vardır. Yapılan bu çalışmalarda düşük ayak, hipospadias, el ve ayak parmakları ile tırnaklarda hipoplazi, sakral ve lumbosakral defektleri içine alan nöral tüp defektleri, radius defektleri, yarık damak/dudak gibi anomaliler bildirilmiştir (1, 23, 24, 72).

İntrauterin dönemde embriyogenez aşamasında olduğu halde ancak doğumdan sonra varlığı tespit edilen anatomik ya da yapısal bozukluklara konjenital malformasyonlar ismi verilmektedir. Bu durumun temel sebepleri arasında genetik faktörler ve teratojenik ajanlar en önemli yeri işgal eder. Bu açıdan bakıldığında bütün antiepileptik ilaçların teratojenik etki potansiyeli olduğu kabul edilir. Ancak antiepileptik ilaçlar içinde teratojenik etki potansiyeli en

yüksek olanlar, en başta trimetadion olmak üzere fenitoin, valproik asit ve karbamazepin'dir (24).

Bir maddenin teratojenik etkisinin olup olmadığını anlamak için başvurulmuş ilk yöntem hayvan deneyleridir. Ancak bir maddenin insanlar için teratogenik etki gösterip göstermeyeceğini hayvan deneyleri temel alınarak tahmin etmek güçtür. Örneğin, metabolizmadaki ve plasentadaki bir maddenin biyo-yararlılığındaki türe özel farklılıklar, güvenilir bir tahmin yapmayı zorlaştırır. Bununla birlikte ilaçları üretenler açısından bir maddenin insan hayatı için teratojenik potansiyeli olup olmadığını belirlemede, hayvan deneylerini esas almanın dışında başka bir yol da yoktur (28).

Ancak bir ilacın insanlar üzerinde teratojenik etkisinin olup olmadığını anlamak için son zamanlarda embriyonik dokudan alınan kök hücreler kullanılmaktadır. Bunun için kök hücrelerin arzu edilen dokuya doğru farklılaşmaları sağlanır. Elde edilen doku üzerinde ilaç denenmektedir. Ancak bu yöntemde de sonuç test edilen dokularla sınırlı kalmaktadır. Bu yöntem özellikle iskelet üzerindeki teratojeniteyi ortaya koymada etkilidir (28).

Günümüzde çok sayıda sitotoksik ajan bilinmektedir ve bunların çoğu deney hayvanları (özellikle kemirgenler) üzerinde deneysel teratojenler olarak kullanılmaktadır. Bu teratojenlerin bazıları (antimetabolitler, aminoasit antagonistleri, anti-purinler ya da toksinler) çok seçici etkilere sahiptirler. Bu yüzden embriyonik gelişim sürecinin belirli dönemlerinde ve belirli dozlarda üretilirler. Wilson ve Warkany 1965 yılında hayvanlar üzerinde teratojeniteye sahip olan ilaçlar için yöntem geliştirdiler. 1975 yılında ise Connors bir ajanın teratojen olup olmadığını belirlemeye yarayan tüm değişken parametreleri ortaya koydu. Bunlar; embriyonik yaş, ajanın miktarı, ajanın uygulanma şekli, plasental ve embriyonik geçirgenlik, embriyonun ya da annenin teratojenik ajanı inaktive etme yeteneği, hedef hücrelerin farklılaşma durumu ve iyileşme yetenekleridir (72).

Sullivan 1975 yılında gebe kadınlar tarafından kullanılan teratojenik ilaçları kapsayan literatürü tekrar gözden geçirmiş ve bunları; embriyo üzerine direkt etki edenler (talidomid, tetrasiklin), embriyonik endokrin dengeye etki edenler (östrojenler, androjenler) üçüncü olarak da plasentada veya anneye ait dokularda etki edenler diye sınıflandırmıştır (32). Bu sınıflandırma büyük klinik

öneme sahiptir. Ancak bunların teratojenik mekanizmaların açıklanmasına katkısı sınırlı olsa da bazı ilaçların gelişimin spesifik evrelerinde teratojenik olduğu bilinmektedir (72).

Gebeliği sırasında antiepileptik ilaç kullanan kadınlardan doğan bebeklerde malformasyon oranı araştırmacı gruplarına göre %0 ile %30'un arasında değişir (24).

Konvülsiyon şiddeti ve sıklığının ilacın kesilmesinde hasta açısından ciddi bir tehdit yaratmayacağı bazı vakalarda gebelikten önce ve gebelik sırasında ilacın kesilmesi düşünülebilir. Ancak minor konvülsiyonların bile gelişmekte olan embriyo ya da fetus açısından tehlike yaratmayacağını söylemek mümkün değildir. İlacı yazan hekimin, gebe kalabilecek epilepsili kadınların tedavisinde ya da bu kadınlara tavsiyelerde bulunurken bu noktaları değerlendirmesi gerekir (45).

Günümüzde kullanılan antiepileptik ilaçların teratojenik olduğu, deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda kesinlik kazanmıştır. Ancak 4 ana epileptik ilaçtan (CBZ=karbamazepin, VPA=valproik asit, DPH=difenilhidantoin, PB= fenobarbital) hangisinin daha teratojenik olup, daha fazla major malformasyona neden olduğu hakkında elde edilmiş kesin veriler yoktur. Araştırmacılar, gebelikte uygulanan monoterapilerde VPA'nın önemli derecede teratojenik, DPH ve PB'nin zayıf teratojenik olduğunu ileri sürmüşlerdir. Özellikle bu son iki ilacın bebeklerde orofasial, kalp ve ürogenital yapı bozukluklarına neden oldukları bilinmektedir (33, 73). Ancak halen veriler arasında çelişkiler bulunduğundan hangi epileptik ilacın daha teratojenik olduğu hakkında kesin bir sonuca varılamamıştır. Bilinen tek şey gebelik sırasında monoterapinin tercih edilmesi gerektiğidir (37, 42).

Fenitoinin gebelerde kongenital malformasyonlara yol açtığı uzun yıllardan beri bilinmektedir (74). Bununla ilgili olarak yapılan deneysel çalışmalar 1966 yılında başlamış ve fenitoin'in hem sıçanlarda, hem de farelerde teratojenik olduğunu göstermiştir (49, 74-79). Bu çalışmalarda gebelik sırasında fenitoin ile tedavi edilmiş rodentler (kemiriciler) de en yaygın defektler, yarı dudak ve/veya yarı damak, hidrosefali, hidronefroz, uzun kemiklerde kısalma ve ekterodaktili'yi içine alan iskelet anomalileri olduğu bildirilmiştir (32).

Yapılan deneysel çalışmalar fenitoinin vasküler hasara yol açtığını göstermiştir. Bu çalışmalarda voltaj kanallarını inhibe ederek, membran stabilizatörü görevi görüp antikonvülzan etki gösteren fenitoinin, düzeltici potasyum kanallarını bloke ettiği saptanmıştır. Hayvan deneyleri sonucu bu

mekanizma ile fenitoinin serbest radikal oluşumu ile endotel hasarı ve bradikardiye, hipoksiye, genetik defektlere, çeşitli dismorfizmlere yol açtığı ileri sürülmüştür. Ayrıca fenitoin, valproik asit, vigabatrin gibi antiepileptiklerin fetusta karnitin eksikliğine yol açtığı, bunun da kardiyomyopati, ventrikül septum defektleri gibi malformasyonlarla sonuçlanabileceği deneysel olarak gösterilmiştir (36).

Fenitoin teratojenitesinin oluşması ve teratojenitenin şiddeti ilacın uygulama şekline, dozuna ve uygulandığı gebelik günlerine bağlıdır. Hansen ve arkadaşları, difenilhidantoin teratojenitesinin saptanmasında ilacın uygulama şeklinin önemini vurgulamak amacıyla farelere, ortalama 60 ve 75 mg/kg dozlarda difenilhidantoin'i gebelikten 3 hafta öncesi ve gebelik boyunca diyet yoluyla ve gebeliğin 10. gününde intraperitoneal (IP) tek doz olarak iki farklı şekilde uygulamışlardır. Diyet ile kronik uygulama yapılan deney grubunda sedasyon ve ataksi gibi toksik etkiler ile embriyotoksik ve teratojenik etkiler gözlenmemiştir. Kontrol grubunda açık göz kapağı saptanmasına rağmen, deney grubunda bunun sıklığında belirgin bir artış saptanmamıştır. Yaşayan fetusların hemen hepsinde konjenital malformasyonlara rastlanmıştır. Malformasyonların çoğu yarık damak/dudak iken, bazı hayvanlarda parmak eksikliği saptanmıştır (80).

Aynı şekilde Sullivan farelere, gebeliğin palatal gelişimi kapsayan (16. gün) 12-16. günleri arasında, 250 mg/kg dozunda diyetle, 40mg/kg ve 120 mg/kg gastrik intübasyon ile fenitoin vermiş ve fenitoinin embriyotoksik etkisi, düşüklere ve fetal ölümlere neden olmaksızın teratojenik olduğunu, intübasyonla verilen grupta %11.1 oranında, diyetle 250 mg/kg dozunda, diyetle verilen grupta %10.2 oranında yarık damak insidansında artış oluşturduğunu bulmuşlardır. Buna karşın gastrik intübasyonla 40mg/kg ve 120mg/kg dozunda fenitoin verilen grupta hiçbir toksisite belirtilmemiştir (32).

Hansen (80) ve Sullivan (32)'ın çalışmalarına benzer şekilde, çalışmamızda uygulama zamanı ve dozu farklı olmakla beraber intraperitoneal uygulama yöntemi kullanılmıştır. Kontrol ve deney gruplarımızın hiçbirinde yarık dudak/damak bulgusuna rastlanmazken, PHT+Folik asit grubunda parmak yokluğu, kostalarda dalgalanma ve açılanmalar dikkati çekmiştir.

Harbison ve Becker (1972), yaptıkları çalışmada fenitoinin sıçanlar üzerinde teratojenik özelliklerini saptamak amacıyla gebeliklerinin 7. gününden 15. gününe kadar 150mg/kg

dozunda, 7.-10. günlerde ise 100mg/kg dozunda ve 13-15. günlerde ise ilaveten 200 mg/kg dozunda, gebeliğin 7., 8., 9. ve 10. günlerde ise 100 mg/kg ve 150 mg/kg dozunda fenitoin verilen grupta uterus içinde ölümlerde artış olduğu bildirilmiştir. 200 mg/kg uygulanan sıçanlarda ise mortalitenin %60 arttığı ve bu artışın doza bağlı olduğu vurgulanmıştır. 10. günden 15. güne kadar 150mg/kg dozunda fenitoin verilen sıçan fetuslarında hidrocefali, hidronefroz, yarık damak insidansında artış olduğunu bildirilmiştir. Ayrıca bütün gruplarda hidronefroz, organ oluşumunda gerilik, yarık damak görüldüğünü bildirmişlerdir. Keza aynı çalışmada fenitoin tedavisi alan sıçanların fetuslarının ağırlık değerleri incelenmiş olup doza bağlı olarak gerilik oluştuğuna işaret etmişlerdir (49).

Bizim çalışmamızda ise deneklerle kontrol grubu kıyaslandığında kilo kaybı ($P<0.001$) ile boy ölçümlerinde düşüş ($P<0.001$) Harbison ve Becker'in çalışmasına paralellik arz etmekteydi. Aynı araştırmada iskelet malformasyonları yönünden yapılan incelemede Fenitoin'in gebeliğin 9. ve 10. günlerde uygulanmasının 7. ve 8. günlerindeki göre çok daha fazla etkili olmak üzere fetusların uzun kemiklerinde kemikleşmede gerilik oluşturduğunu bildirilmiştir. Bizde çalışmamızda gebeliğin 8.-10. günlerde 25mg/kg dozunda fenitoin uyguladık ve bu doz fetuslarda kemikleşme gerilikleri ve kosta anomalileri oluşturduğunu saptadık.

Benzer şekilde Ata ve arkadaşları gebe sıçanlara gebeliğin 7.-19. günleri arasında oral yolla 100 mg/kg dozunda, Abela sıçanlara gebeliğin 11. gününde 180 mg/kg dozunda intraperitoneal yolla, Eluma farelere gebeliğin 8.-16. günlerinde gastrik intübasyon yolu ile 50-125 mg/kg dozunda, Gibson farelere gebeliğin 7.- 9. günlerinde ve 11.-13. günlerinde subkutan olarak 50 mg/kg dozunda, Beck yaptığı çalışmada, gebe farelere, gebeliğin 11.-13. günleri arasında günde 6-50 mg/kg dozlarında fenitoin vermişler ve bu dozların hepsinde teratojenik etkiler olduğunu tespit etmişlerdir. Doz ve zaman faktörleri uygulanan tüm gruplarda, prenatal fenitoin tedavisinin yavru sayısını azalttığını, kulak kepçesi ve dişlerde varyasyonlar, hidrocefali, tek ve çift taraflı yarık damak/dudak, küçük alt dudak, maxillar hipoplazi ve fetal ağırlık azalması ve kemikleşme geriliği oluşturduğunu ancak kosta sayısında artış oluşturmadığı bildirmiştir. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlarda fenitoin verilmiş gruptaki fetuslarla kontrol grubu fetusların boy ve ağırlık ortalaması karşılaştırmasında deney grubuna ait rat fetuslarının ağırlığında yaklaşık olarak %4.7 oranında, boy değerlerinde ise %4.6 oranında düşüş olduğu görülmüştür. Adı geçen diğer

bozukluklar gözlenmemiş olup, fetal ağırlık azalması ve kemikleşme geriliği tespit edilmiştir (47, 81-84).

Jane adams 1990 sıçanlarda fetal ve postnatal gelişimi incelemiş, 100-200 mg/kg dozunda fenitoini gebeliğin 7-18. günleri arasında vermiştir. Bu dozlardan sadece yüksek doz fenitoin uygulamasında fetal hidantoin sendromu oluştuğunu vurgulamıştır (44).

Antiepileptik ilaçların teratojenitesini incelemek için insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda valproik asitin (VPA) major malformasyonlara neden olduğunu, intra-uterin hayatta fenobarbital ve fenitoine maruz kalan çocuklarda “tipik anomaliler” olarak kabul edilebilecek 3 minor anomali bildirilmiştir. Bunlar fenitoinde tırnak ve parmak hipoplazisi, fenobarbital’de kranio-fasial hipoplazidir. Özellikle fenitoin ve fenobarbitalin bebeklerde orofasial, kalp ve ürogenital yapı bozukluklarına neden oldukları da bildirilmektedir. Ayrıca prenatal ve postnatal büyüme geriliği, ekstremitte defektleri (distal falankslarda ve tırnaklarda hipoplazi), major malformasyonlar ve mental gerilik bildirilmiştir (33, 35, 44).

Tavlı, Hanson, Yerby (36, 39, 42) insanlarda yaptığı çalışmalarda Fetal hidantoin sendromu’nda görülen kısa burun ve yukarı kalkık burun delikleri, basık burun kökü, parmaklarda hipoplazi, yay gibi veya yarık üst dudak, kardiyak septum defektleri oluştuğunu bildirmişlerdir.

İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda gestasyonal folik asit eksikliği büyüme ve gelişme anomalileri yarattığı bildirilmiştir (73).

Antiepileptik ilaçların teratojenitesine karşı folik asitin (FA) koruyucu etkisini test etmek amacıyla Hernandez ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışma sonucunda trimethoprim, triamterene, carbamazepine, phenytoin, phenobarbital ve primidone’u içine alan FA antagonistlerinin gebeliğin başlarında kullanılması durumunda özellikle de FA içeren multivitamin kullanmayan kadınların çocuklarında kardiyovasküler defektlerin, ağız defektleri, ve üriner defektlerde artış olabileceğini bildirmişler ve FA içeren multivitaminlerin kullanımının hem nöral tüp defektlerini hem de kardiyovasküler defektleri, ağız defektlerini ve üriner defektlerini kapsayan diğer malformasyonları geriletebileceğini belirtmişlerdir (85).

Çalışmamızın PHT grubu fetusları ile PHT+FA grubu fetuslar kıyaslandığında fenitoin grubunda görülen kemikleşme geriliklerine FA grubunda rastlanmadı, hatta kontrol grubundan bile daha iyi kemikleşme gözlemlendi. Kostalarda görülen ağır defektler ise FA grubunda daha az olarak

karşımıza çıkmıştır. Bu bulgular fenitoin teratojenitesine karşı folik asitin koruyucu etkisine işaret etmektedir.

Mach sıçanlarda yaptığı çalışmada fenitoin ile vit E'yi birlikte uygulamıştır. Sıçanlara, gebeliğin 7-18. günleri arasında 150 mg/kg dozunda fenitoin, 500 mg/kg dozunda oral yolla vit E vermiş ve tekrar aynı günlerde fenitoin ve vit E'yi birlikte kombine uygulamış. Doğum sonrası incelenen fetuslarda PHT ve PHT+Vit E gruplarında yavru mortalitesini artırdığını bulmuşlardır. Aynı zamanda vit E'nin yüksek doz uygulamasından sonra somatik (vücutla ilgili ya da ona ait olan) olgunlaşmayı önemsiz bir şekilde etkilediğini belirtmişlerdir. Fenitoin vit E ile kombine kullanıldığında dış kulağın katlanmasını ertelemiştir. Vit E yalnız ve fenitoin ile kombine kullanıldığında alt kesici dişlerin çıkmasını ertelediği, ancak gözün açılmasını hızlandırdığı bildirilmiştir. Bu değişiklikler gelişimsel süreçte vit E'nin yüksek dozda kullanımının uygun olmadığı sonucunu doğurmaktadır. Vit E'nin gebelikte yüksek dozda kullanımı doğum sonrası süreçte vücut ağırlığında azalmalara neden olmaktadır (48).

Biz çalışmamızda fenitoin ile vit E'yi kombine kullandık. Sıçanlara gebeliğin 8.-10. günlerinde fenitoin enjeksiyonundan 1 saat önce gastrik intübasyonla 250 mg/kg dozunda vitamin E verdik. Sonuçta PHT+Vit E grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında hem ağırlık hem de boy değerlerinde düşüş olduğu tespit edildi. PHT+Vit E fenitoin grubu ile karşılaştırıldığında ise vitamin E'nin belli oranda fenitoin toksisitesine karşı koruduğu gözlemlendi.

United States Public Health service, toplumdaki nöral tüp defektlerini önlemede en etkili yöntem olarak yiyeceklerin folik asit takviyesi ile desteklenmesi gerektiğini ileri sürmektedir. Gebelik planlayan kadınlara vitamin ilaveleri tavsiye edilmeli, folik asit yönünden zengin yiyeceklerin tüketimine teşvik edilmelidir. Genellikle ortalama günde 0.4 mg folik asit yeterli olabilir. Ancak NTD'nin önlenbilmesinde günde 0,4 mg ve 4 mg dozunda alınmalıdır (50).

Sonuç olarak fenitoin'in, deney hayvanlarında kemik gelişimi üzerinde teratojenik etkili olduğunu ve iskelet sistemine ait defektler oluşturduğunu bulduk. Folik asit ile vitamin E'nin ise fenitoin'in teratojenik etkisinin oluşmasını önlemede etkili olduğunu tespit ettik. Bununla birlikte klinikte de epileptik hastalarda kullanılan antiepileptik ilaçların gebelik döneminde dikkatli kullanılması ve kullanılan fenitoin (PHT)'nin teratojenik etkisini azaltmak için tedavi

süresince vitamin E ve özellikle folik asit gibi maddelerle desteklenerek kullanılması gerektiği görüşündeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Sadler T.W: Langman's Medical Embryology. Sixth Edition. Williams&Warwick, Baltimore. 1993; 134-135.
2. Özdamar S, Yakan B, Kutlubay R: Genel histoloji. Erciyes üniversitesi Tıp fakültesi yayınları. Kayseri. 2000; 47-74.
3. Koca Y.B: Genel Histoloji atlası. Birinci baskı. Marmara iletişim basın yayın dağıtım. İstanbul. 2003; 55-61.
4. Cireli E. Genel histoloji. 2. baskı, Beta basım yayım dağıtım. İzmir. 1983; 229-252.
5. Getty R. The Anatomy of the Domestic Animals. W.B. Saunders Company. London. 1975, 271-296.
6. Miller E.M. Anatomy of the dog. WB. Saunders Company. London.1965;1-6.
7. Çolakoğlu N, Aydın A, Özel H, Ozan E, Kükner A. Retinoik asidin prenatal dönemdeki endokondral kemikleşme üzerine etkileri, Erciyes Tıp dergisi, 2007;29(4):280-284.

8. Fakhry A, Ratisoontorn C, Vedhachalam C, et al. Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin and enhancement of osteogenic potential. *Bone* 2005; 36:254-266.
9. Govindarajan V, Overbeek PA. FGF9 can induce endochondral ossification in cranial mesenchyme. *BMC Developmental Biology* 2006; 6(7): 1-14.
10. Düzler A. Yeni Zelanda tavşanında ön ekstremitelerin postnatal osteolojik gelişimi, Doktora tezi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara 2002.
11. Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Palme yayıncılık; Ankara, 2006; 132-135.
12. Üveis M. Embryoloji. Dördüncü Baskı, Sermet matbaası. İstanbul. 1969:117-118.
13. Hebel R, Stromberg MW. Anatomy and embryology of the laboratory rat. BioMed Verlag 1986; pp 9-21., 231-251.
14. Evans H.E, Sack W.O. Prenatal Development of Domestic and Laboratory Mammals: Growth Curves. External Features and Selected References. *Anat. Histol., Embryol.*, 1973; 2; 11-45.
15. Ülger H, The Growth Promoting Effects Of bFGF, VEGF and PD-ECGF On Embryonic Development and Yolk Sac Vascularisation, PhD Thesis, Department of Human Anatomy and Cell Biology University of Nottingham, England 1997.
16. Hacıaloğulları M. Interleukin-12'nin Embriyonik Vitellus Kesesi Damarlanması Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri. Ağustos 2005.
17. Butcher E.O. The development of the somites in the white rat and the fate of the myotomes, neural tube and gut. *American journal of anatomy*, 1929;44:381-439.
18. UNSW Embryology; rat development
([http:// anatomy.med.unsw.edu.au/cbl/embryo/otherEmb/Rat.htm](http://anatomy.med.unsw.edu.au/cbl/embryo/otherEmb/Rat.htm)).
19. Özkan Z.E. Makro-anatomical investigations on the forelimb skeleton of mole-rat (*spalax leucodon Nordmann*). *Veternarski archiv*. 2002, 72(2):91-99.
20. Özkan Z.E. Makro-anatomical investigations on the hind limb skeleton of mole-rat (*spalax leucodon Nordmann*). *Veternarski archiv*. 2002, 72(3):159-166.
21. Aydoğdu E. Sıçanlarda vaskularize serbest fibula kemik grefti modelinde kritik venöz iskemi süresinin farklı parametrelerle değerlendirilmesi, Uzmanlık tezi, Dr.Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği, İstanbul. 2005.

22. (<http://www.biologycorner.com/resources>)
23. Kayaalp S.O, Dalkara T.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmokoloji. Hacettepe T.A.Ş, Ankara, 1.cilt Onbirinci baskı: 2005: 37-115.
24. Brendel R. Duhamel K.C.,Shepard, T.H. Embryotoxic drugs. Biological research in pregnancy. 1989;6(1):1-54.
25. Vickers M, Brackley K. Drugs in pregnancy. Current Obstetrics & Gynaecology, 2002: 12; 131-137.
26. Stanley F.C, Bower, C. Teratogenic drugs in pregnancy. Medical journal of australia 1986, 11-12 (145):596-599.
27. Kayaalp S.O, Dalkara T.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmokoloji. Hacettepe T.A.Ş, Ankara, Onuncu baskı: 2002: 133-141., 1024.
28. Bürgin H. PRNS, Roche. (<http://www.roche.com/pages/facets/15/reprotox.htm>)
29. Lannon S.L. Epilepsy, pregnancy and parenting-an American perspective. W.B.Saunders Company. 1994; 3: 85-93.
30. Aker RG. Sistemik ve intrakortikal fenitoin uygulamasının iki farklı genetik absans epilepsi modelinde diken ve yavaş dalga deşarj oluşumuna etkisi. Marmara Üniv. Tıp Fak. Farmokoloji ve klinik Farmokoloji ABD, İstanbul, 2000.
31. Kayaalp S.O, Dalkara T.: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmokoloji. Hacettepe T.A.Ş, Ankara, 2.cilt Onbirinci baskı: 2005: 884-901, 1317-1356.
32. Sullivan F.M, Mcelhatton P.R. Teratogenic Activity of the Antiepileptic Drugs Phenobarbital, Phenytoin and Primidone in mice. Toxicology and Applied Pharmacology. 1975: 34; 271-282.
33. Koch S, Losche, G,Jager-Roman, F, Jakob, S, Rating, D. De. Major and minor birth malformations and antiepileptic drugs. Neurology 1992, 4(42):83-88.
34. Tanganelli P, Regesta G. Epilepsy, pregnancy and major birth anomalies: an Italian prospective, controlled study.".Neurology 1992, 4(42):89-93.
35. Fried S, Kozar E, Nulman I, Einarson TR, Koren G. Malformation rates in children of women with untreated epilepsy. a meta-analysis. Drug Safety2004, 27:197-202.
36. Tavlı V, Ağın H, Sarıtaş T, Çevik B. Fetal Hidantoin Sendromu. Türkiye Klinikleri J. Gynecol Obst. 2006: 16; 156-158.

37. Tomson T, Battino D. Teratogenic effects of antiepileptic drugs. *Seizure: Eur J Epil*, 2007: 1-6.
38. Gaily E, Granstrom M.L. Minor anomalies in children of mothers with epilepsy. *Neurology* 1992, 42(4): 128-131.
39. Hanson J.W.. ``Teratojen update: Fetal hydantoin effects.". *Teratology* 1986; 33:349-353.
40. Delgado-Escueta, A.V., Janz, D. Consensus guidelines: preconception counselling, management and care of the pregnant woman with epilepsy. *Neurology* 1992; 42(4): 149-160.
41. Nakane Y. Multi-institutional study on the teratogenicity and fetal toxicity of antiepileptic drugs: a report". *Epilepsia* 1980; 21(6): 663-680.
42. Yerby M.S, Leavitt A, Erickson D.M, McCormick K.B. Lo. Antiepileptics and the development of congenital anomalies. *Neurology*. 1992; 4(42): 132-140.
43. Lindhout D, Omtzigt J.G.C., Cornel M.C. Spectrum of neural-tube defects in 34 infants prenatally exposed to antiepileptic drugs.". *Neurology* 1992; 42(4): 111-118.
44. Jane Adams, Charles V. Vorhees, Lawrence D. Middaugh. Developmental neurotoxicity of anticonvulsants: Human and animal evidence on phenytoin.". *Neurobehavioral Toxicology and Teratology* 1990; 3(12): 203-214.
45. Pfizer, (<http://www.pfizer.com.tr/pfizer/tr/UploadedPdf/42.pdf>)
46. Okada M, Kavata Y, Kiryu K, Mizuno K, Wada K, et al. Effect of non-toxic and toxic concentrations of phenytoin on monoamines levels in rat brain. *Epilepsy Research*. 1997; 28; 155-163.
47. Abela D., Howe AM, Oakes DA, Webster WS. Maternal antioxidant supplementation does not reduce the incidence of Phenytoin-Induced Cleft Lip and Related Malformations in Rats. *Birth Defects Research (part B)*, 2005;74; 201-206.
48. Mach M, Dubovicky M, Navarova J, Ujhazy, K&E. Vitamin E supplementation in phenytoin induced developmental toxicity in rats: postnatal study. *Neuro Endocrinol Lett* 2006; 27: 69-73.
49. Harbison RD, Becker BA. Diphenylhydantoin teratogenicity in rats. *Toxicology and applied pharmacology*. 1972, 22 (2):193-200.
50. Wald N. Folic acid and Prevention of Neural Tube Defects. *Annals New York Academy of Sciences*. 1993;678:112-129.

51. Fleming A, Mutchinic O, Romero G. The role of folate in the prevention of neural tube defects: Human and animal studies. *Nutrition Reviews*. 2001;59:13-23.
52. Cockroft D.L. Changes with gestational age in the nutritional requirements of postimplantation rat embryos in culture. *Teratology* 1988;38:281-290.
53. Martin Siman, C Eriksson Ulf J. Vitamin E Decreases the occurrence of malformations in the offspring of diabetic rats. *Diabetes*., 1997, 46:1054-1061.
54. Düzler A., Çakır A. Yeni Zelanda tavşanında ön ekstremitelerin postnatal osteolojik gelişimi. *Ankara üniversitesi Veteriner fakültesi dergisi*. 2003; 50(3);165-172.
55. Williams T.W. Alizarin red S and Toluidine blue for differentiating adult and embryonic bone and cartilage. *Stain Techn.*, 1941; 16:23-25.
56. Inouye M. Differential staining of cartilage and bone in fetal mouse skeleton by alcian blue and Alizarin Red. *Congenital anomalies*., 1976, 16:171-173.
57. Dingerkus G, L.D. Uhler. Enzyme clearing of alcian blue stained whole small vertebrates for demonstration of cartilage. *Stain Techn.*, 1977, 52: 229-232.
58. Love, A.M., Vickers, T. H. Durable staining of cartilage in foetal rat skeleton by methylene blue. *Stain Techn.*, 1972; 47: 7-11.
59. Dawson A.B. Note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S. *Stain Techn.*, 1926; 1: 123-124.
60. Crary D.D. Modified benzyl alcohol clearing of alizarin-stained specimens without loss of flexibility. *Stain Techn.* 1962; 37: 124-125.
61. Staples R. E., Schnell, Viola L. Refinements in rapid clearing technique in the KOH-alizarin red S method for fetal bone. *Stain Techn.*, 1964; 39: 61-63.
62. Jensch R. P., Brent, R. L. Rapid schedules for KOH clearing and alizarin red S staining of fetal rat bone. *Stain Techn.*, 1966; 41:179-182.9
63. Boardman J.P., Mitala, J.J., Carrano, R.A., Lulucci, J.D. Cartilage- staining Technique for the Examination of unskinned Fetal Rat Specimens Previously Processed with Alizarin Red S. *Teratology*. 1984;30:383-384.
64. Yamada T. Selective staining methods for cartilage of rat fetal specimens previously Treated with alizarin red S. *Teratology*, 1991: 43;615-619.

65. Erdoğan D.,Kadioğlu D, Peker T. Visualisation of the fetal skeletal system by double staining with alizarin re and alcian blue. Gazi Medical Journal, 1995; 6; 55-58.
66. Erdoğan D, Kadioğlu D, Peker T. Demonstration of Congenital Anomalies in the Joints of the Forelimbs and Hindlimbs Caused by Several Pharmacological Agents. Anat. Histol. Embryol, 1996; 25: 263-267.
67. Young AD, Phipps DE, Astroff AB. Large-scale Double staining of rat Fetal Skeletons Using Alizarin red S and Alcian blue.Teratology, 2000; 61: 273-276).
68. Whitaker J, Kathleen M, Dix. Double staining technique for rat foetus skeleton in teratological studies. Laboratory Animals, 1979; 13, 309-310.
69. Kimmel C.A, C. Trammel. Rapid procedure for routine double staining of cartilage and bone fetal and adult animals. Stain.Techn., 1981, 56: 271-273.
70. Kelly W.L, Bryden, M.M. A modified differential stain for cartilage and bone in whole mount preparations of mammalian fetuse., Stain Techn., 1983, 58:131-134.
71. Aliverti V.,L.Bonanomi, E.Gavini,V.G.Leone,and L.Mariani. The extend of fetal ossification as an index of delayed development in teratogenic studies on the rat. Teratology 1979;20: 237-248.
72. Williams P.L. Gray's Anatomy. Thirty-eighth edition. Chuchill livingstone. 1995; 333.
73. Dansky L.V, Rosenblatt D.S, Andermann E. Mechanism of teratogenesis: folic acid and antiepileptic therapy. Neurology 1992;4(42): 32-42.
74. Massey K.M. Teratogenic effects of diphenylhydantoin sodium. J.Oral Ther. Pharmacol. 2: 380-385.
75. Elshove J. Cleft palate in the offspring of female mice treated with phenytoin. Lancet, 1969: 1074-1075.
76. Harbison RD, Becker BA. Relation of dosage and time of administration of diphenylhydantoin to its teratogenic effect in mice. Teratology 1969; 2: 305-311.
77. Schardein JL, Dresner AJ, Hentz DL, Petrere JA, Fitzgerald J. The modifying effect of folinic acid on diphenylhydantoin-induced teratogenicity in mice. Toxicology And Applied Pharmacology. 1973; 24(1):150-158.
78. Loughnan P.M, Gold H, Vance J.C. Phenytoin teratogenicity in man. Lancet: 1973:70-72.
79. Monson R.R, Rosenberg, L, Hrtz S.C, Shapiro S, Heinonen. Diphenylhydantoin and selected congeniatal malformations. 1973;289;1049-1052.

80. Hansen D.K., Billings R.E. Effect of route of administration on phenytoin teratogenicity in A/J mice. *Journal of craniofacial genetics and developmental biology*. 1986;6:131-138.
81. Ata MM, Sullivan FM. Effect of prenatal phenytoin treatment on postnatal development. *British journal of pharmacology*. 1977; 59(3);494.
82. Eluma F.O, Sucheston M.E, Hayes T.G., Paulson, R.B. Teratogenic effects of dosage levels and time of administration of carbamazepine, sodium valproate and diphenylhydantoin on craniofacial development in the CD-1 mouse fetus. *Journal of craniofacial genetics and developmental biology*. 1984; 4: 191-210.
83. Beck SL. Prenatal ossification as an indicator of exposure to toxic agents. *Teratology*. 1989; 4(40); 365-374.
84. Gibson J.E, Becker B.A. Teratogenic effects of diphenylhydantoin in Swiss-Webster and A/J mice. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*. 1968; 128: 905-909.
85. Hernandez-Diaz S, Werler M. M, Walker M. A and Mitchel A. Folic acid antagonists during pregnancy and the risk of birth defects. *New England Journal of Medicine* 2000;343:1608 -1614.