

Erken Dönem Tavuk Embriyonal Tüp Gelişiminde Etanolün Etkisi

The Effects of Ethanol on Neural Tube Development in Early Stage Chick Embryos

MUSTAFA BARUTÇUOĞLU, MEHMET SELÇUKİ,
SEDA VATANSEVER, AHMET ŞÜKRÜ UMUR, SEVİNÇ İNAN

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı (MB, MS, AŞU),
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı (SV, Sİ) Manisa

Geliş Tarihi: 27.10.2000 ⇔ Kabul Tarihi: 10.12.2000

Özet: Bu araştırmada beyaz Leghorin tipi tavuk embriyolarında, nöral tüp kapanma defekti gelişimi üzerine etanolün etkisi ışık mikroskopu altında histopatolojik olarak araştırıldı. Çalışmamızda 40 adet (n: 40), spesifik patojen içermeyen (SPF), fertil, beyaz Leghorin tipi tavuk yumurtası iki eşit gruba ayrıldı (n: 20). Her iki grup 37,8°C ± 0,2°C'da 30 saat inkübe edilerek embriyonel gelişimlerinin 8. basamağına ulaştırıldılar. Birinci grup kontrol grubunu oluşturdu. İkinci grup çalışma grubu olup, in-ovo 42 mg/dl tek doz etanol verildi. Her iki gruptaki yumurtalar 48. ve 72. saatler sonunda açılarak ışık mikroskopu altında histopatolojik olarak değerlendirildi. 48. ve 72. saatlerde açılan yumurtalarda, kontrol grubunun tamamında normal embriyolojik gelişimin devam ettiği, plasental damarlanmanın olduğu, kalp aktivitesinin başladığı ve nöral tüpün kapandığı gözlemlendi. Ancak çalışma grubundaki embriyoların kontrol grubundakilere göre belirgin gelişme geriliği gösterdikleri, mikrosefali oldukları ve nöral tüp kapanma defekti olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Erken dönem tavuk embriyosu, etanol, nöral tüp defekti

Abstract: In this study, the effects of ethanol on the formation of the neural tube closure defects in White Leghorn chick embryos were investigated under the light microscope. Fertile specific pathogen free (SPF), White Leghorn eggs (n: 40) were divided into two groups (n: 20). Both of them were incubated at 37.8°C ± 0.2°C and 65-75 % relative humidity during 30 hours and the eighth stage of the embryonic development was reached (Hamburger and Hamilton). The first group was control group (n: 20). The second was the study group and it was given in-ovo a single dose, 42 mgr/100 cc of ethanol. The eggs in both groups were opened and investigated under the light microscope at the end of the 48th and 72nd hours. The embryos in the control group were developed normally according to Hamburger and Hamilton classification. The normal placental vessel development, cardiac activity and closure of the neural tube were seen. However in the study group, microcephaly, neural tube closure defect and significant developmental retardation were noticed as compared to the control group.

Key words: Early stage chick embryo, ethanol, neural tube defect,

GİRİŞ

Hamileliğin ilk ayında, embriyonal gelişimin kritik döneminde, alkol kullanımının fetal alkol

sendromuna (FAS) ve nöral tüp kapanma defektlerine neden olduğu bilinmektedir (12). Nöral tüp kapanma defektleri, kranioşizis totalis, anensefali, myelomeningosel ve ansefaloseli içeren

bir grup konjenital malformasyonlardır (7). Fetal alkol sendromu, gelişme geriliği, kraniyofasiyal malformasyonlar, kalp anomalileri ve nöral tüp defektleri ile karakterize olup ve tüm fetal alkol çalışma modellerinde en sık elde edilen defekt embriyonel gelişme geriliğidir (12, 13). Tavuk embriyolarında etanolün neden olduğu serebral hipoplazinin elde edildiği çalışmalarda, inkübasyon başlangıcında (0. gün) verilen tek doz etanolün, erken dönemde belirgin gelişme geriliğine neden olduğunu gösterilmiştir.(1, 13, 14). Ancak etanolün moleküler düzeydeki bu teratojenik etkisi tam olarak tanımlanamamış değildir. Kranial nöral krest hücre gelişiminde, kontrollü hücre ölümü normal ve beklenen bir süreçtir. Yapılan çalışmalar kranial nöral krest hücrelerinin, etanolün indüklediği apoptozis nedeniyle kontrol dışı elimine edildiğini düşündürmektedir (12). Diğer yandan, literatürde erken dönem embriyolarda radyoaktif timidin ve lösin kullanılarak, DNA ve protein sentezinin etanol tarafından inhibe edildiği gösteren çalışmalar da vardır (13). Bu sonuç, gelişim halindeki dokulardaki yoğun protein ve nükleik asit ihtiyacının karşılanamaması sonucu ortaya çıkan hipoplaziyi açıklamaktadır. Yapılan çalışmalar, gelişme geriliğinin kan etanol seviyesi ile yakından ilişkili olduğunu ve beyin dokusunda cAMP ve prostoglandin E2 (PGE2) seviyelerinin yükseldiğini göstermiştir.

Bu çalışmamızda erken dönem tavuk embriyolarına in-ovo verdiğimiz tek doz etanol ile, 48 ve 72 saat sonunda elde ettiğimiz histopatolojik sonuçlar literatür sonuçlarıyla uyumludur. Gebelikte erken dönemde kullanılan alkolün fetüs üzerine gelişimsel gerilik ve nöral tüp kapanma defekti oluşturma riski olduğu deneysel olarak tavuk embriyolarında gösterilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Manisa Tavuk Hastalıkları Araştırma ve Aşı Uygulama Enstitüsü'nden, fertil, spesifik patojen içermeyen (SPF), sıfırıncı gün beyaz Leghorin tipi yumurtalar alındı (n: 180 tüm çalışma için). Bu yumurtaların ağırlıkları ölçülüp verilecek olan 42 mg/dl alkol dozu mg/kg çevirilip, yumurta başına düşecek miktarı hesaplandı (» 0,5 g/kg/ yumurta) (2, 12, 13, 14). Daha sonra bu yumurtalar 37, 8 °C ± 0,2 °C' ta % 65-75 bağıl nemlilikte 30 saat enkübe edilerek, Hamburger ve Hamilton sınıflamasına göre embriyonel gelişimin sekizinci basamağına ulaştırıldı (6). Bu aşamada yumurtalar iki eşit gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki yumurtalar tekrar iki eşit kısma

ayrılıp (grup a,b) grup a'ya herhangi bir madde verilmeden inkübasyona devam edildi. Grup b'deki yumurtalara, üzerlerinde küçük bir delik açılarak, G27 iğne ile embriyo diskinin altına, çalışma grubuna verilen etanol ile eşit hacimde steril serum fizyolojik verildi. Çalışma grubu olan ikinci gruba yine G27 iğne kullanılarak embriyo diski altına 42 mg/dl konsantrasyondaki etanolden 0.05 cc verildi.

Her iki gruptaki yumurtalar 48. ve 72. saatler sonunda açıldı ve % 10 formolin ile 24 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra ışık mikroskopu altında, embriyolar bütün olarak değerlendirildi. Seçilen embriyoların, hemotoksilen ile boyanıp alkol ile tespit edildikten sonra, bütünsel preparatları hazırlandı. Diğer embriyolardan parafin bloklar hazırlandı. Bu bloklardan 7 mikron kalınlığında kesitler alınıp hematoksilin-eosin ile boyandı. Daha sonra ışık mikroskopu altında çalışma grubu ile kontrol grubu karşılaştırılarak incelendi.

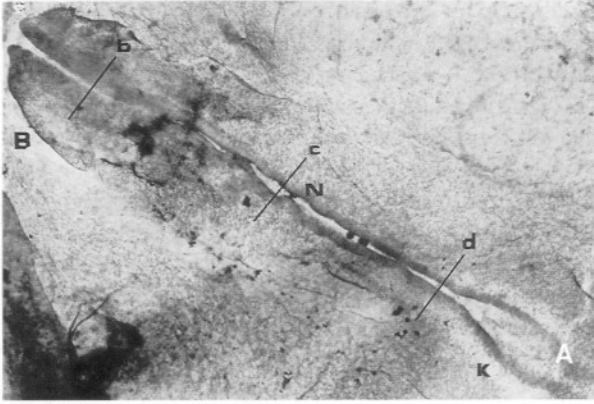
SONUÇLAR

Kontrol grubundaki embriyoların normal gelişimlerine devam ettikleri, Hamburger ve Hamilton sınıflamasına göre olmaları gereken embriyonel basamakta oldukları gözlemlendi. Bu embriyolarda plasental damarlanma, kalp kesesi oluşumu, kalp aktivitesi ve kapanmış nöral tüp gözlemlendi. Gelişimsel geriliğe ya da malformasyona rastlanmadı (Resim 1a, 1b).

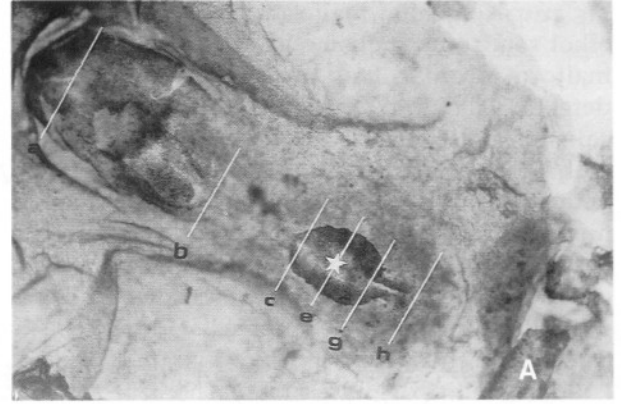
48 saatlik, alkol verilen tavuk embriyolarında makroskopik olarak gelişimsel gerilik, mikrosefali ve nöral tüpe uyan bölgede doku organizasyon bozukluğu görüldü (Resim 2a, 2b).

Seri olarak alınan parafin kesitler, sistematik rastgele örnekleme yöntemi kullanılarak seçildi ve Hematoksilin-Eozin ile boyandı. Işık mikroskopunda, Cavalieri yöntemi kullanılarak yapılan, gelişen beyin veziküllerinin hacim ölçümleri sonucunda alkol uygulanmış olgularda hacmin (0.070 mm³) normal gruba (0.165 mm³) göre yarı yarıya azalmış olduğu ve sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlemlendi (p< 0.05). Bu bulguların makroskopik olarak görülen mikrosefaliyi, mikroskopik olarak desteklediği görüldü.

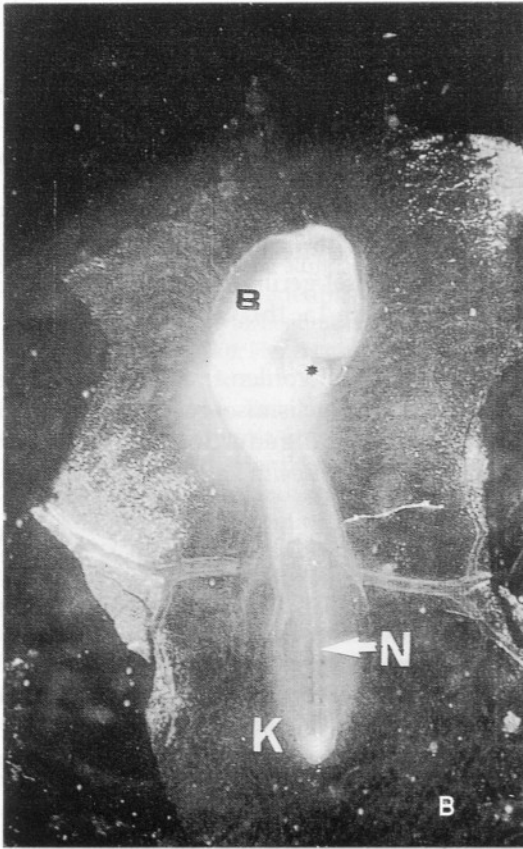
Seri alınan kesitlerin histolojik incelenmeleri sonucunda, nöral tübün baş bölgesinden itibaren kapanmaya başladığı fakat makroskopik olarak doku organizasyon bozukluğunun görüldüğü bölgede nöral tüp kapanma defekti olduğu saptandı. Nöral



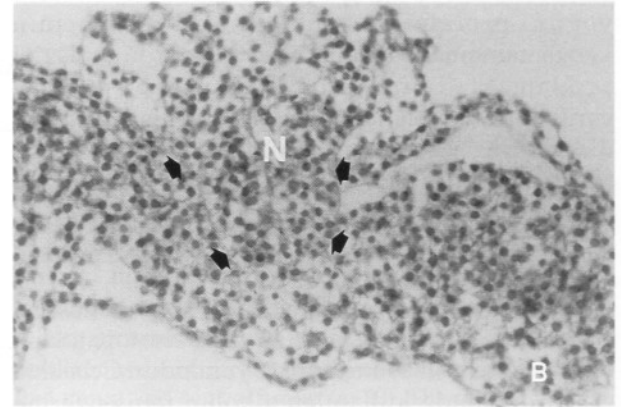
Şekil 1a: 30 saatlik normal gelişim gösteren, nöral tübü açık embriyonun hematoksilin ile boyanmış, bütün olarak görünümü. x 40, B: baş, K: kuyruk, N: nöral tüp, b: baş kısmından, c: gövde kısmından, d: kuyruk kısmından geçen kesitler.



Şekil 2a : 30. saatte etanol verilip, 48. saatte açılan, gelişme geriliği ve nöral tüp doku organizasyon bozukluğu gösteren embriyonun hematoksilin ile boyalı, bütün olarak görünümü. x40, (☆): nöral tüp üzerinde dezorganize kısım. a: baş kısmından, b: gövde kısmından, c,e,g : nöral tüp üzerindeki dezorganize kısımdan, h: kuyruk kısmından geçen kesitler.



Şekil 1b : 48 saatlik, normal gelişim gösteren, somit sayısı artmış, nöral tübü kapalı, plasental damarlanması oluşmuş, kardiyak aktivitesi başlamış embriyonun diseksiyon mikroskopu altında görünümü. x 10, B: baş, K: kuyruk, N: nöral tüp, (*) gelişen kalp.

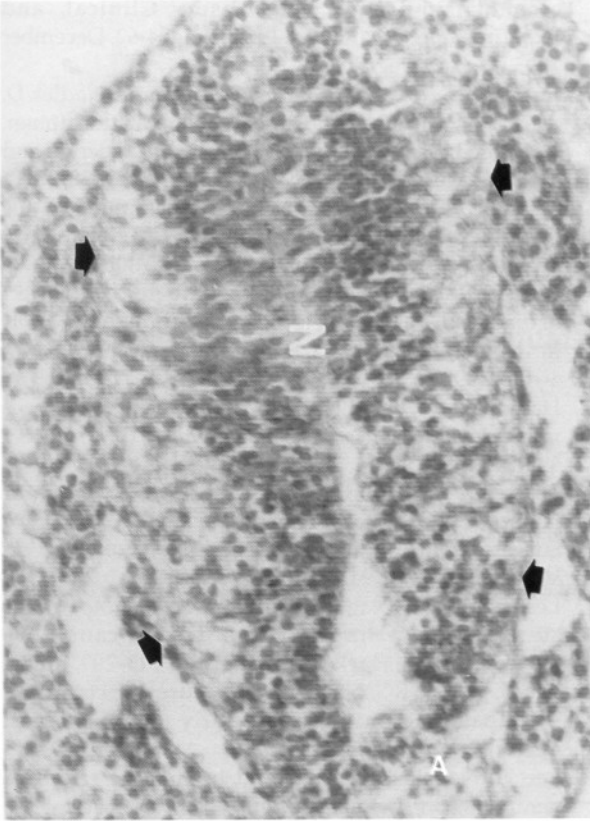


Resim 2b : 30. saatte etanol verilip, 48. saatte açılan, gelişme geriliği ve nöral tüp doku organizasyon bozukluğu gösteren embriyonun, dezorganize kısmından geçen kesitin, hematoksilin ile boyalı görünümü. x200, N: nöral tüp, (➡): bazal lamina.

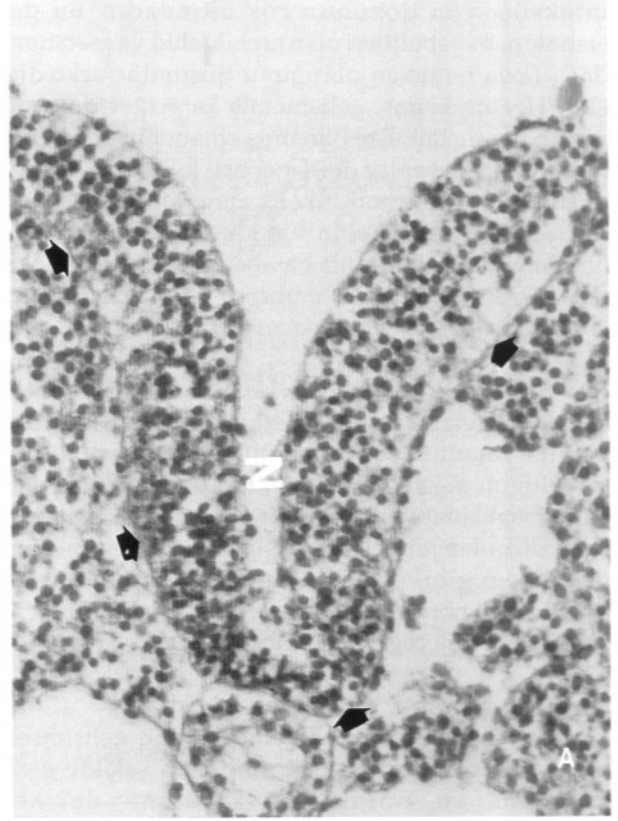
tüpü oluşturan ektodermal hücrelerin ilk kesitlerde normal görüldüğü ve bazal laminanın da korunduğu gözlenirken, bunu takip eden kesitlerde verilen etanolün etkisi ile normal gelişimin etkilendiği, nöral ektoderm hücrelerinin bütünlüğünün bozulduğu, bazal lamianın yer yer kaybolduğu ve nöral tüpün belirgin olarak açık olduğu görüldü (Resim 3a, 3b).

TARTIŞMA

Embriyonel gelişimin kritik periyodunda embriyonun maruz kaldığı kimyasalların gelişim



Şekil 3a : 72. saatte açılan, etanol verilmiş embriyo. Makroskopik olarak normal görülen kısımdan geçen kesitin, hematoksilin ile boyalı görünümü. x400, N: nöral tüp, (➡): bazal lamina.



Şekil 3b : 72. saatte açılan, etanol verilmiş embriyo. Makroskopik olarak doku organizasyon bozukluğunun görüldüğü kısımdan geçen kesitin, hematoksilin ile boyalı görünümü. x400, N: açık nöral tüp, (➡): bazal lamina.

kusurlarına neden oldukları bilinmektedir (1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 15). Bu kritik periyod, hamileliğin ilk ayı olup gastrulasyon olarak bilinen ve insanda embriyonun blastokist haline geçip implantasyonun gerçekleşmesiyle başlayıp (7 - 8. günler) 2. hafta sonuna doğru birbirini izleyen iki evredir. Bu dönem, üç germ yaprağının organizasyonu ile dokuların organları oluşturmak üzere farklılaştığı kritik dönemdir.

Erken dönem tavuk embriyosu modeli, memelilerde embriyonel gelişimin ilk ayına uyan ve kimyasalların embriyonel gelişim üzerine etkilerinin incelendiği ideal bir modeldir. Erken dönem tavuk embriyolarında, diazepam, verapamil, kafein, papaverin ve lokal anestetiklerin nöral tüp kapanma defektine neden oldukları deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (5, 8, 9, 10, 11). Bu model, etanolün nöral krest hücrelerinin gelişimleri üzerine etkilerinin incelenemediği, dolayısıyla hamileliğin ilk ayında maternal etanol tüketiminin fetal alkol sendromu

(FAS) olarak bilinen, gelişimsel gerilik, nöral tüp kapanma defektleri ve kraniofasiyal defektlere neden olabileceğini göstermektedir.

Etanolün uygulandığı embriyonel gelişim basamağının önemi vardır. Nöral tüpün kapandığı, ileri evre embriyolara verilen aynı miktar etanolün embriyo gelişiminde nöral tüp üzerinde etkisi gözlenmemiştir. Enhart ve ark. doza bağımlı olarak, embriyolarda gelişen defekt insidansının arttığını bildirmişlerdir (3). Pennigton ve ark. çalışmalarında in-ovo verilen tek doz 1 g/kg etanolün tavuk embriyolarının gelişimlerinin yedinci gününde total embriyo ağırlığının ve beyin dokusu ağırlığının yarı yarıya azaldığını bildirmişlerdir (13). Yapılan çalışmalar tavuk embriyolarının inkübasyonlarının dokuzuncu gününden önce yani embriyonel karaciğer dokusunda klas 1 alkol dehidrogenaz enzim üretimi ve aktivitesi başlamadan verilen etanolün metabolize olmadığını göstermiştir. İn-ovo verilen 42 mg/dl etanol 80-100 mg/dl olan ortalama

intoksikasyon dozunun çok altındadır. Bu da etanolün, metabolitleri olan asetaldehid ve asetattan daha fazla teratojen olduğunu düşündürmektedir (12). Her ne kadar, gelişmemiş karaciğer dokusu yüzünden metabolize olmamış etanolün etkisi, bu methodun insanlar için geçerli olamayacağını düşündürse de, kronik alkolik anne kanunda benzer miktarda serbest alkolün sürekli olarak bulunduğu hatırlanmalıdır. Bununla beraber, kritik dönemdeki tek doz etanolün dahi, embriyo üzerine olumsuz etkisi olabileceği dikkati çekmiştir.

Sonuç olarak gastrulasyon dönemindeki embriyoya etanolün major etkisi nöral krest hücre popülasyonunun gelişimini duraksatması ve hücre topluluğunun kaybıdır. Bu etkinin mekanizması net olarak açıklanabilmiş değildir. Nöral doku gelişimi için kritik olan hücreler arası sinyalin kaybına neden olabileceği gibi, etanolün indüklediği kontrolsüz apoptozisin nöral tüp kapanma defekti gelişiminden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamız düşük doz alkol konsantrasyonlarında bile embriyonun gelişimsel olarak kontrol grubuna göre belirgin şekilde geri kaldığını ve nöral tüp kapanma defekti oluşturduğunu göstermiştir.

Bu çalışma 2-6 Ekim 2000 tarihleri arasında İstanbulda yapılan, 28. International Society for Pediatric Neurosurgery Kongresi'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Yazışma Adresi: Prof. Dr.Mehmet Selçuki
1403 sokak No: 5 / 8
35220Alsancak / İzmir
Tel: (232) 422 0302
E-mail: mselcuki@yahoo.com

KAYNAKLAR

1. Bupp Becker SR, Shibley IA Jr: Teratogenicity of ethanol in different chicken strains. *Alcohol Alcoholism* Vol 33 No 5; 457-464, 1998
2. Cartwright MM, Smith SM: Stage dependent effects of ethanol on cranial neural crest cell development: partial basis for the phenotypic variations observed in fetal

- alcohol syndrome. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* Vol 19 No 6; 1454-62, December 1995
3. Ernhart CB, Jokol RJ, Martier S, Moron P, Nadler D, Ager JW, Wolf A: Alcohol teratogenicity in the human; A detailed assessment of specificity, critical period and threshold. *Am J Obstet Gynecol* 156; 33-39, 1987
4. Gilani S, Persaud TV: Embryonic development in the chick following exposure to ethanol, acetaldehyde and cyanamide. *Annals of Anatomy* 174 (4); 305-308, 1992
5. Güney Ö, Selçuki M, Ünlü A, Bağdatoğlu C: The effect of diazepam on the development of neural tube defects in the chick embryos. *Turkish Neurosurgery* 9 (1-2); 44-48, 1999
6. Hamburger V, Hamilton HL: A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morph* 88; 49 - 92, 1951.
7. Dirks PB and Rutka JT: The Genetic Basis of Neurosurgical Disorders. Youmans JR Neurological Surgery, Fourth Edition CD-ROM In. Volume II, Part VI, Chapter 31, 1994: Record : 9814-9832
8. Lee H, Bush KT, Nagele RG: Time-lapse photographic study of neural tube closure defects caused by xylocaine in the chick. *Teratology* 37; 203-209, 1988
9. Lee H, Nagele RG: Neural tube closure defects caused by papaverine on explanted early chick embryos. *Teratology* 20; 321-331, 1979
10. Lee H, Nagele RG: Toxic and teratologic effects of verapamil on early chick embryos. Evidence for the involvement of calcium in neural tube closure. *Teratology* 33; 203-211, 1986
11. Lee H, Nagele RG, Pietrolungo JF: Toxic and teratologic effects of caffeine on explanted early chick embryos. *Teratology* 25; 19-25, 1982
12. Martina M.Cartwright, Susan M. Smith: Increased cell death and reduced neural crest cell numbers in ethanol-exposed embryos; partial basis for the fetal alcohol syndrome phenotype. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* Vol 19 No 2; 378-386, April 1995
13. Pennigton S, Kalmus G: Brain growth during ethanol induced hypoplasia. *Drug and Alcohol Dependence* 20; 279-286, 1987
14. Pennington SN: Alcohol metabolism and fetal hypoplasia in chick brain. *Alcohol Mar-Apr; 5 (2): 91-94, 1988*
15. Susan E. Maier, Jennifer A. Miller, Jennifer M. Blackwell, James R. West: Fetal alcohol exposure and temporal vulnerability; regional differences in cell loss as a function of the timing of binge-like alcohol exposure during brain development. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research* 1999: Vol 23 No 4; 726-734