

Orta Hat Kapanma Kusurlarında Kalsiyumun Önemi

The Importance Of Calcium in Midline Fusion Defects

AĞAHAN ÜNLÜ, CELAL BAĞDATOĞLU, GÖKALP SİLAV,
VAROL AYDIN, ÖNDER GÜNEY, MEHMET SELÇUKİ

Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı (AÜ, GS), Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı (CB), Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı (VA), Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı (ÖG), Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nöroşirürji Anabilim Dalı (MS)

Geliş Tarihi: 28.11.2000 ⇔ Kabul Tarihi: 11.01.2001

Özet: Tıp alanındaki gelişmelere eş olarak, orta hat kapanma defektlerinin nasıl ortaya çıktığı konusunda yapılan çalışmalar ile bir çok bilgi edinilse de tüm mekanizma tam olarak ortaya konamamıştır. Mekanizma hakkında bir çok deneyde değişik metodlar kullanılmıştır. Bazı deneylerde toksik olduğu sanılan maddeler kullanılarak defektlerin nedenlerinin mekanizmaları üzerindeki düşüncelere katkıda bulunulmuştur. Bizim çalışmamızın amacı bir çok hücrenel göreve sahip kalsiyumun hücre içerisine girşinin engellenmesi sonucunda orta hat defektlerinin olup olmayacağı ve olursa bunun mekanizmaları hakkında ipuçları aramaktır. Bu amaçla bir L-tip voltaj duyarlı kalsiyum kanal antagonisti olan ve günümüzde de bazı kalp hastalıklarında ilaç olarak kullanılan Verapamil-HCl denenmiştir. 71 adet Hubbard Broil türü fertil yumurta, albumen ve albumen/Verapamil karışımları ile 24 saat inkube edilmiş ve orta hat kapanma defekti açısından incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Avian, embriyo, nöral tüp defekti

Abstract: Many information about the mechanism of midline fusion defects have been obtained, parallel with the advancement in medicine, but unfortunately there have been some unclear points. Different methods have been used to investigate the mechanism. In some of the experiments, toxic materials have been used to investigate the underlying causes. The main purpose of our experiment, is to search the possibility of inducing midline fusion defects with Verapamil-HCl and if so, to comment on the mechanism. The effects of Verapamil - HCl, calcium channel antagonist, which has been also used in human in some forms of cardiac problems, has been searched in avian embryos. 71 Hubbard Broil, fertile eggs were incubated with albumen and albumen/Verapamil-HCl mixture for 24 hours, and the embryos were checked for midline fusion defect.

Key words: Avian, embryo, neural tube defect

GİRİŞ

Orta Hat Kapanma Defektleri günümüzde de önemini koruyan, ekonomik ve sosyal sorunları da beraberinde taşıyan konjenital hastalıklardır. Her ne kadar önlenilmesi amacı ile bazı önlemler alınabilirse de tamamen ortadan kaldırılamamıştır.

Ortadan kaldırılabilmesi için oluşum mekanizmaları hakkında hem civciv hem de fare ve sıçanlarda bir çok çalışma yapılmıştır.

Schoenwolf, Desmond ve Copp'un öncülük ettiği çalışmalarda nörolasyona ışık tutulmaya çalışılmış, nörolasyonun temel mekanizmaları ve

basamakları hakkında bilgi edinilmiştir (2,3,5,8,19,29,33). Hücrel seviyede de gelişimin basamaklarındaki yapı ve konum değişiklikleri, hücrelerin birbirleri ile etkileşimleri ortaya çıkarılmıştır. Diğer yandan toksikoloji çalışmalarında da bazı kimyasallar yada ilaçlar kullanılarak, olası mekanizmalar ışığında defektlerin uyarılmasına ve bu durumun engellenmesine çalışılmıştır (10,14,15,17,18,21,26,27, 31).

Kalsiyum, bir çok hücrel görevin yapılmasında etkili bir katyondur. Yapılan çalışmalarda kalsiyumun hücrenin farklılaşması, yenilenmesi, yapısal değişim göstermesi ve hatta ölümü gibi bir çok olayda etkin olduğu gösterilmiştir (11). Kalsiyumun bu etkileri hücre içindeki konsantrasyonuna bağlıdır. Hücrenin değişik yerlerindeki farklı konsantrasyonlar da gene bu görevlere katkıda bulunmaktadır.

Nörülasyon aşamaları sırasında özellikle menteşe noktaları olarak tanımlanmış yerlerde hücrelerde yapısal değişiklikler olmaktadır, bunlardan en önemlisi hücre tepe kısımlarında sitoplazmik aktin ve myosinin etkisiyle olan daralmadır(1). Daralmanda kalsiyum aktif rol oynamaktadır (16). Bu daralma ile hücreler kamalaşmakta ve tabanları geniş iken tepe kısımları incelmektedir, bu yapısal değişiklikte diğer olaylar ile birlikte nöral yapının katlanmasına etki etmektedir (28).

Bizim çalışmamızda da bir L-tipi voltaj duyarlı kalsiyum kanal engelleyicisi olan Verapamil-HCl kullanılmıştır. Verapamil-HCl aynı zamanda bazı kalp hastalıklarında da kullanılmaktadır. Amaç kalsiyum ile ortaya çıkacak olan hücre yapısal değişikliklerinin engellenmesi ile gerçekten orta hat defekti oluşturulup oluşturulamayacağını araştırılması ve kalsiyumun olası etkilerinin değerlendirilmesidir.

MATERYAL VE METOD

71 adet fertil Hubbard Broil yumurtası, inkubator içinde, 37.5°C de %50-60 nemli ortamda 30 saat inkube edilmiştir. Bu zaman sonunda yumurtalar grüplara ayrılmıştır.

Yumurtalar New tekniği kullanılarak kabuklarından çıkarılmış (22), Hamburger – Hamilton evreleme sistemi ile evrelenmiş (12), kültür ortamına alınmış ve 24 saat daha inkube edilmiştir. Bu embriyolar iki gruba ayrılmış, ilk

gruba (19 yumurta) 1 ml besleyici solusyon (thin albumen) verilmiş ve 24 saat daha inkube edilmiştir. İkinci gruba (52 yumurta) 1 ml thin albumen-Verapamil 1/10 oranındaki karışımları uygulanmıştır. Verapamil-HCl, 2.27 mg/ml solusyondan 100mgr/ml olacak şekilde Ringer solusyonu ile hazırlanmış ve %10 NaHCO₃ ile pH'sı 7.2 ye ayarlanmıştır.

Tüm grüplardaki embriyolar inkubasyon periyodları sonunda incelenmiş, evre gelişimleri (12) kaydedilmiş ve seri kesitler için hazırlanmıştır. 7 mm lik seri aksiyal kesitler Delafield'in hematoksilen ve eosin boya ile boyanmıştır. Embriyolardaki orta hat defektlerinin varlığı ışık mikroskopisinde incelenmiştir.

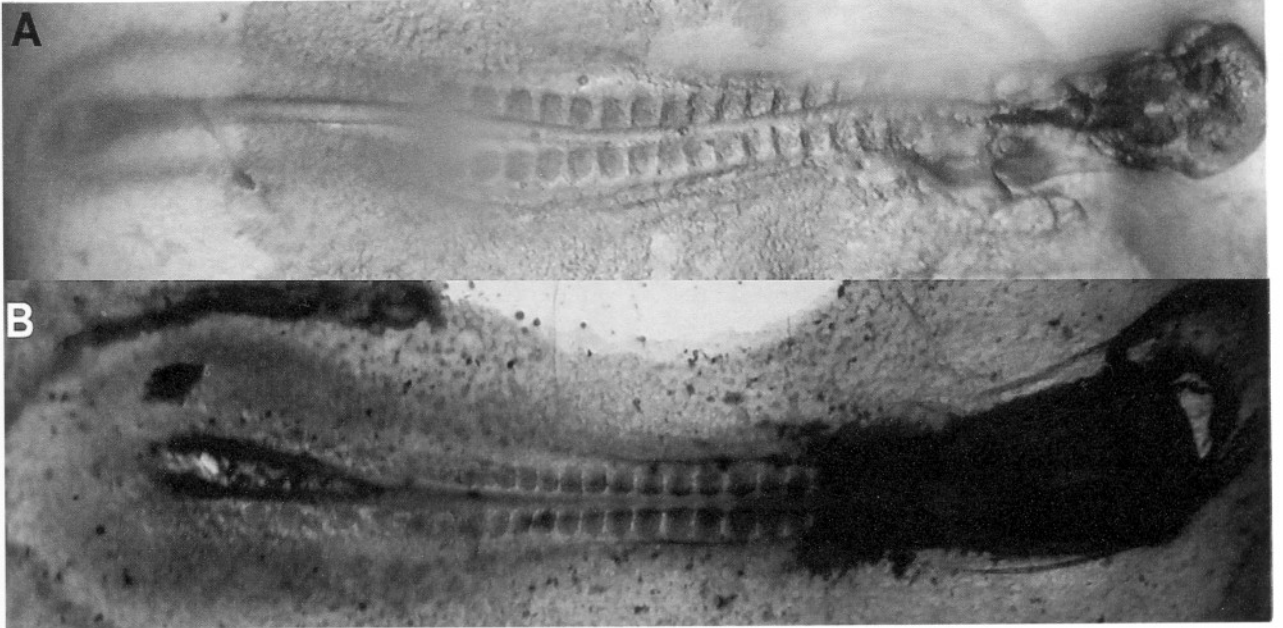
SONUÇLAR

İncelenen embriyolar orta hat defekti olup olmadığına, gelişmenin devam edip etmediğine ve embriyoda lizis olup olmadığına göre gruplandırılmıştır.

Sadece Thin albumen ile 24 saat daha inkube edilen 19 yumurtadan 15 tanesinde gelişme normal olarak devam etmiş ve 54 saatlik embriyo özellikleri (stage 14+, 23 somit ve fazlası) gözlemlenmiştir. 1 adet yumurtada gelişme devam etmiş ancak özellikle spinal kord alt kısımlarında orta hat defekti tespit edilmiştir. 2 adet embriyoda değişik derecelerde gelişme geriliği saptanmıştır. 1 adet embriyoda ise inkubasyon periyodu sonunda tamamen lizis olmuştur.

Albumen ve 10mgr. Verapamil HCl ile inkube edilen 52 embriyodan 25 tanesinde, embriyonal gelişme ile birlikte orta hat kapanma defekti görülmüştür. 19 adet embriyoda inkubasyon periyodu sonunda lizis saptanmıştır. Sonuçta 44 adet embriyonun bu dozdaki Verapamilden etkilendiği düşünülmüştür. 2 adet embriyoda gelişme olmadığı saptanmıştır. 6 adet embriyo ise normal gelişimini tamamlayarak 14+ stage evresine (23+ somit) ulaşabilmiştir.

Bu bulguların ışığında, 10 mgr/ml dozundaki Verapamil-HCl'ün, embriyoları etkilediği, %48 embriyoda defekt oluştururken (Şekil-1), %36.5 embriyoda lizis oluşturduğu saptanmıştır. Verapamil-HCl den etkilenen embriyolar %84.6 lık bir grubu oluşturmuşlardır. Embriyoların sadece %11.5'i normal olarak gözlenmiştir. Albumen verilen grup ile karşılaştırıldığında, bu grupta embriyoların



Şekil 1: A) Normal tüm embriyonun dorsal yüzden görünümü (X20)
B) Orta hat defekti olan bir tüm embriyonun dorsal yüzden görünümü (X20, Hematoksilen-Eozin)

%5'inde orta hat defekti gözlenmiştir. Yine lizis görülen kısımda, embriyoların sadece %5'ini oluşturmuştur. Bu gruptaki normal embriyolar, tüm embriyoların %79'unu oluşturmuştur. Albumen verilen grup ile Albumen ile birlikte Verapamil verilen gruplar defekt oluşturma açısından değerlendirildiğinde arada istatistiksel anlam saptanmıştır. ($p=0.006$) (Mann-Whitney testi ve t-testi, Sigma Stat 1.0)

Sonuçta Verapamil-HCl ün embriyolarda orta hat defekti oluşturduğu ve bazı embriyolarda da lizis oluşturduğu düşünülmüştür (Tablo 1).

TARTIŞMA

Defektlerin oluşum mekanizmasının anlaşılabilmesi için nörolasyon ile ilgili bazı konulara değinilmesi gereklidir.

Nörolasyon

Nörolasyon ektoderm, mezoderm ve endodermin olduğu gastrulasyon devresinin olaylarından biridir. Bu devreye ait çevre hücre farklılaşmalarından ve hareketlerinden etkilenmektedir. Nörolasyon hem nöral düzlemdeki nöroepitel hücrelerindeki değişikliklerden hem de bu düzlemi çevreleyen hücre gruplarının yapısal ve konumsal değişikliklerinden etkilenmektedir (25). Nöroepitel hücreler bu devre içerisinde yapısal farklılıklar gösterirken çoğalmaya da devam ederler (28). Bu hareketlerin ve çevresel faktörlerin etkisiyle konumsal değişikliklere uğrayarak hem transvers düzlemde hem de kraniokaudal düzlemde düzenlenirler (24,25,30). İki farklı yöndeki yerleşim değişikliklerine etki eden faktörler de farklıdır.

Nöral düzlemin kapanması için gerekli ilk aşama katlanma aşamasıdır. Bu sırada hücrelerin

Tablo1: Verapamil-HCl verilen ve verilmeyen grupların sonuçlarının gösterimi.

Yöntem	Embriyo sayısı	Verilen	Miktar	Konsantrasyon	Orta hat defekti	Lizis	Gelişme azlığı	Normal
İn vitro kültür	19	Albumen	1 ml	1/1	1	1	2	15
	52	Albumen+ Verapamil	1 ml	1/10 (10µgr/ml)	25 ^a	19	2	6

^aİstatistiksel olarak anlamlı ($p=0.006$)

bazal yüzlerinde kalınlaşma, çaplarında azalma ve uzunluklarında artma gibi değişiklikler ortaya çıkar (2,25,29,33). Gene bu aşamada hücreler, gerekli konum değişikliklerini yaparlar. Katlanmada nöropeitelial hücrelerin kendilerine ait değişiklikler ve etkileşimleri önemli olduğu gibi çevre ektoderm, ekstrasellüler matriks, notokord gibi dış faktörler de gereklidir. Özellikle menteşe yerleri olarak nitelendirilen yerlerde bu düzenlemeler ve etkileşimler daha da belirgin haldedir. Çevre ekstrasellüler matriks de hem hidrostatik içerik olarak, hem de hücre etkileşimlerine katkı ile katlanma ve oluklanmaya etki eder. Katlanma ve oluklanmadan sonra karşı karşıya gelen hücrelerin birbirlerini tanıyıp yapışması ile kapanma oluşur. Bu olay hücre yüzeyindeki glikokonjugatlar ile düzenlenir(33).

Avianlardaki nörolasyon da diğer canlılara benzer şekilde iki devrede incelenebilir. Primer nörolasyon devresinde beyinin tamamı ve spinal kordun üst lumbosakral seviyelerine kadar, nöral yapılar oluşur. Kaudal nöroporun kapanması ile eş zamanlı olarak sekonder nörolasyon ortaya çıkar. Bu devrede de spinal kordun en uç kısımları oluşur. Kuyruk tomurcuğu ile ilgili nöroepitel hücre grubunun ortaya çıkması ve kanal oluşturacak şekilde yapı değiştirmesi bu devrede görülen olaylardır.

Çalışmamızda avian embriyoları, 30 saat civarında yumurtadan çıkarılmış ve somitleri sayılmıştır. Somit sayıları 4-8 somit arasında değişmiştir. Bu evrede daha fazla sayıda somit sayılmamıştır. Bu nedenle embriyoların daha kapanma öncesi evrede oldukları desteklenmiştir. Daha sonra 24 saat süren kültürleri ile nörolasyon aşamalarından kapanma aşamasının tamamlanmış olması gereken zamana kadar beklenmiş ve daha sonra somitleri sayılmıştır. Bu evrede sayılan en az somit 22 dir. Embriyolarda somit sayılarında artış, gelişme aşamalarına devam ettiklerini göstermiştir. Bu embriyolar daha sonra mikroskop altında incelendiklerinde orta hatta kapanmaya ait defektlerin olduğu gösterilmiştir.

Kalsiyum ve nörolasyon ilişkisi

Nöral katlantı oluşumunda etkili olan dış menteşe noktaları çevresinde yerleşmiş ve lateral yüzey ektodermine bağlı hücrelerin yapısal değişikliğinde etkili olan hücre apikal kısmının kalsiyuma bağlı olarak daralması, kontraktıl işlemler ile birlikte oluşmaktadır (9).

Bu kontraksiyon oluşumunda, kalsiyuma bağlı olarak sitoplazmik aktin ve myosin etkilidir. Bu etki kalmodulin ile düzenlenir (13,16). Aktinin polimerizasyonu için de kalsiyumun gerekli olduğu iddia edilmektedir (20). Kalsiyum agonistleri ile uyarılan kalsiyumun hücreye girişi ile menteşe noktalarında elevasyon ve katlanma olduğu gösterilmiştir. Kalmodulin inhibitörleri kullanıldığında ise katlanmanın olmaması bu olayda kalmodulinin düzenleyici etkisi olduğunu düşündürmüştür. Kalmodulin, hafif zinciri kalsiyuma bağlı olarak fosforile ederek myosinATPaz aktivitesini uyarmaktadır (13). Kaldesmonun aktine bağlanması gibi olaylar da gene kalsiyum/kalmodulin kompleksi ile kontrol edilmektedir. Kapanma işlemi hücre içerisindeki kalsiyuma değil, dış ortamdaki kalsiyuma gerek duymaktadır (7,32).

Kapanma için sekonder mesajcı sisteminden cAMP'nin gerekli olduğu Desmond tarafından gösterilmiştir (6). Kalsiyuma bağlı hücre adhezyon molekülleri de nöral tüpün bazal ve apikal yüzünde daha fazla olmak üzere gösterilmiştir (6).

Verapamil-HCl'ün nöral krest hücrelerinin migrasyonunu engellediği de gösterilmiştir (6), bu olayın belirli bir hücre içi kalsiyum seviyesinde gerçekleştiği sanılmaktadır. Ependimal hücrelerde, içeriye kalsiyum girişinin engellendiği durumlarda füzyon olmamıştır (6).

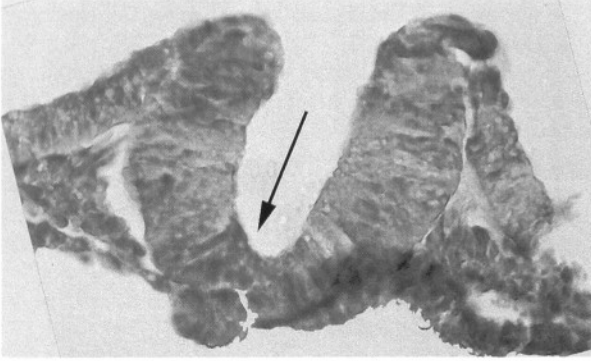
Bu çalışmalardan elde edilen bulguların ışığında, hücrenin özellikle yapısal elemanlarının görevlerinin yerine getirilebilmesi için kalsiyumun oldukça gerekli olduğu fikri desteklenmiştir. Bu etkinin engellenmesi sonucunda embriyolarda orta hat kapanma defektleri oluşabileceği düşünülmüştür.

Bizim çalışmamızda da Verapamil-HCl verilen embriyolarda orta hat defekti olduğu gösterilmiştir. Morfolojik olarak özellikle menteşe noktaları seviyesinde normalde olması gereken (Şekil-2), tepe bölgesinde daralma bu defektif embriyolarda görülmemiştir. Bu embriyolarda bu bölgelerde kamalaşma olmaması ve buna bağlı olarak bükülme ve yükselmenin olmamasının (Şekil-3) defektin ortaya çıkma nedeni olabileceği sonucuna varılmıştır.

Kalsiyum hücrede bir çok olay için gereklidir. Bunlar arasında hücre farklılaşması, yapısal elemanların düzenlenmesi ve bu amaçla gerekli



Şekil 2: Embriyo parafin aksiyal kesitinde, kapanmış orta hat (siyah ok) görülmektedir (X400. Hematoksilen-Eozin).



Şekil 3: Embriyo parafin aksiyal kesitinde, orta hat kapanma defekti (siyah ok) gösterilmektedir. (X400 Hematoksilen-Eozin)

genlerin yapılması sayılabilir (4,23). Hücredeki kalsiyum konsantrasyonu ya da kalsiyumun hücreye giriş şekli hücrenin yaşaması yada ölümü üzerinde etkilidir (11). Hem yüksek konsantrasyonlar hem de düşük konsantrasyonlar hücre ölümüne neden olabilir. Bizim sonuçlarımızda, embriyoların yaklaşık %36 sında lizis görülmesinin nedeninin hücre ölümü olduğu düşünülmüştür. Masif hücre ölümünün ardından embriyoda lizis olduğu sanılmaktadır.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, canlı hücre içi kalsiyum konsantrasyon değişikliklerinin hücre yaşayabilirliğine, morfolojik yapıya ve dolayısı ile defekt oluşumuna etkilerinin araştırılması yerinde olacaktır.

Yazışma adresi: Dr. Ağahan Ünlü
Tusso Blokları N-1 Blok No: 14
10.Cadde Emek / Ankara 06510
Tel: 312- 223 6042
533- 253 4557
E-mail: aghahan@hotmail.com

KAYNAKLAR

1. Bush KT, Lynch FJ, DeNittis AS, Steinberg AB, Lee HY, Nagele RG : Neural tube formation in the mouse: a morphometric and computerized three-dimensional reconstruction study of the relationship between apical constriction of neuroepithelial cells and the shape of the neuroepithelium. *Anat Embryol* 181: 49-58, 1990
2. Copp AJ : Neural tube defects. *Trends Neurosci* 16: 381-383, 1993
3. Copp AJ, Checiu I, Henson JN : Developmental basis of severe neural tube defects in the loop-tail (Lp) mutant mouse: use of microsatellite DNA markers to identify embryonic genotype. *Dev Biol* 165: 20-29, 1994
4. Desarmenien MG, Clendening B, Spitzer NC : In vivo development of voltage-dependent ionic currents in embryonic *Xenopus* spinal neurons. *J Neurosci* 13: 2575-2581, 1993
5. Desmond ME: Description of the occlusion of the spinal cord lumen in early human embryos. *Anat Rec* 204: 89-93, 1982
6. Desmond ME, Duzy MJ, Federici BD: Second messenger regulation of occlusion of the spinal neurocoel in the chick embryo. *Dev Dyn* 197: 291-306, 1993
7. Desmond ME, Schoenwolf GC: Evaluation of the roles of intrinsic and extrinsic factors in occlusion of the spinal neurocoel during rapid brain enlargement in the chick embryo. *J Embryol Exp Morphol* 97: 25-46, 1986
8. Desmond ME, Schoenwolf GC: Timing and positioning of occlusion of the spinal neurocele in the chick embryo. *J Comp Neurol* 235: 479-487, 1985
9. Ferreira MC, Hilfer SR: Calcium regulation of neural fold formation: visualization of the actin cytoskeleton in living chick embryos. *Dev Biol* 159: 427-440, 1993
10. Fisher M, Schoenwolf GC: The use of early chick embryos in experimental embryology and teratology: improvements in standard procedures. *Teratology* 27: 65-72, 1983
11. Ghosh A, Greenberg ME: Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science* 268(5208): 239-247, 1995
12. Hamburger V, Hamilton HL: A series of normal stages in the development of the chick embryo. 1951. *Dev Dyn* 195(4): 231-272, 1992
13. Hathaway DR, Adelstein RS: Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1653-1657, 1979
14. Lee H, Nagele RG: Neural tube closure defects caused by papaverine in explanted early chick embryos. *Teratology* 20: 321-331, 1979
15. Lee H, Nagele RG: Neural tube defects caused by local anesthetics in early chick embryos. *Teratology* 31: 119-127, 1985
16. Lee H, Nagele RG: Possible involvement of calmodulin in apical constriction of neuroepithelial cells and elevation of neural folds in the chick. *Experientia* 41:

- 1186-1188, 1985
17. 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
 18. Lee H, Nagele RG, Pietrolungo JF: Toxic and teratologic effects of caffeine on explanted early chick embryos. *Teratology* 25: 19-25, 1982
 19. Lee HY, Kosciuk MC, Nagele RG, Roisen FJ: Studies on the mechanisms of neurulation in the chick: possible involvement of myosin in elevation of neural folds. *J Exp Zool* 225: 449-457, 1983
 20. Nagele RG, Bush KT, Lynch FJ, Lee HY: A morphometric and computer-assisted three-dimensional reconstruction study of neural tube formation in chick embryos. *Anat Rec* 231: 425-436, 1991
 21. Nagele RG, Pietrolungo JF, Lee H, Roisen F: Diazepam-induced neural tube closure defects in explanted early chick embryos. *Teratology* 23: 343-349, 1981
 22. New DAT: A new technique for the cultivation of the chick embryo in vitro. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 3: 326-331, 1955
 23. Ohbayashi K, Fukura H, Inoue HK, Komiya Y, Igarashi M: Stimulation of L-type Ca²⁺ channel in growth cones activates two independent signaling pathways. *J Neurosci Res* 51: 682-696, 1998
 24. Schoenwolf GC: Cell movements driving neurulation in avian embryos. *Development Suppl*(2): 157-168, 1991
 25. Schoenwolf GC: Formation and patterning of the avian neuraxis: one dozen hypotheses. *Ciba Found Symp* 181: 25-38, 1994
 26. Schoenwolf GC, Fisher M: Analysis of the effects of *Streptomyces hyaluronidase* on formation of the neural tube. *J Embryol Exp Morphol* 73: 1-15, 1983
 27. Schoenwolf GC, Folsom D, Moe A: A reexamination of the role of microfilaments in neurulation in the chick embryo. *Anat Rec* 220: 87-102, 1988
 28. Schoenwolf GC, Franks MV: Quantitative analyses of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate. *Dev Biol* 105: 257-272, 1984
 29. Schoenwolf GC, Smith JL: Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances. *Development* 109: 243-270, 1990
 30. Shimamura K, Hartigan DJ, Martinez S, Puelles L, Rubenstein JL: Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121: 3923-3933, 1995
 31. Smedley MJ, Stanisstreet M: Calcium and neurulation in mammalian embryos. *J Embryol Exp Morphol* 89: 1-14, 1985
 32. Smedley MJ, Stanisstreet M: Calcium and neurulation in mammalian embryos. II. Effects of cytoskeletal inhibitors and calcium antagonists on the neural folds of rat embryos. *J Embryol Exp Morphol* 93: 167-178, 1986
 33. Smith JL, Schoenwolf GC: Neurulation: coming to closure. *Trends Neurosci* 20: 510-517, 1997