

Meningomyelosele Anomalili Yenidoğanların ve Annelerinin Serumlarında Bulunan Olası Embriyotoksik Faktörlerin Tavuk Embryosunda Oluşturduğu Malformasyonlar

MALFORMATIONS IN CHICK EMBRYO CAUSED BY PROBABLE EMBRYOTOXIC FACTORS IN THE SERA OF NEONATES WITH MENINGOMYELOCELE AND THEIR MOTHERS

Ali Altan GÜNAYDIN*, Şaban SEZEN**, Ömer COŞKUN**, Mehmet CİNCİK***, Emin ÖZTAŞ***, Selçuk DUMAN****

* Dr., GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD,

** Uzm.Dr., GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD,

*** Yrd.Doç.Dr., GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD, ANKARA

**** Prof.Dr., Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD, KONYA

Özet

Meningomyelosele etiyolojisi tam olarak bilinmemektedir. Çalışmamızda, etiyolojiye katkıda bulunmak için embriyotoksik faktör araştırması yapıldı. Yaşları 1-3 gün arasında değişen meningomyeloseleli 6 yenidoğan ile bunların annelerinden aseptik şartlarda serum alındı. Döllenmiş, embriyo oluşumunun sıfırncı saatindeki beyaz yumurtalara ayrı ayrı 20 µl'lik serum enjekte edildi. Toplam 114 deney ve 111 kontrol yumurtaları kullanıldı.

Deney serumuna maruz bırakılan tavuk embriyolarında kontrol grubuna kıyasla embriyo ölümü ve büyük anomali sıklığının arttığı gözlemlendi. Saptanan anomaliler nöral tüp, gastrointestinal sistem anomalileri, göğüs defektleri ile kas iskelet sistemi defekti ve anoftalmustur. Ayrıca deney embriyoları arasında genel bir büyüme yavaşlaması görüldü. Bu malformasyonların meningomyeloseleli bebeklerin serumlarında var olan ve anneden plasenta yoluyla geçen embriyotoksik faktör ya da faktörler yüzünden olduğu düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Meningomyelosele, Serum, Embriyotoksik faktör

T Klin Tıp Bilimleri 2001, 21:25-30

Summary

The etiology of meningomyelosele is not clear. In our study, we investigated embryotoxic factor in order to contribute to the etiology. Serum; from six newborns aged 1-3 days; with meningomyelosele and from their mothers were collected under aseptic conditions. 20 µl of serum samples were injected to fertilized, 0. hour white eggs. Totally 114 experimental and 111 control eggs were used.

It was observed that in the experimental group, eggs showed a higher rate of embryo death and anomaly percentage. The observed anomalies were neural tube defect, gastrointestinal anomalies, chest and musculoskeletal defects and anophthalmus. In the experimental group also a slow development rate was observed. It is suggested that the possible cause of these anomalies may be a possible factor in the serum of meningomyelosele neonates or embryotoxic factor or factors transported from the mothers via placenta.

Key Words: Meningomyelosele, Serum, Embryotoxic factor

T Klin J Med Sci 2001, 21:25-30

Embryonal germ disklerinden biri olan ektodermden gelişen santral sinir sistemi; insanda intrauterin gelişimin 3. haftasında beliren nöral plağın nöral katlantıları meydana getirmesi ve bun-

ların da kaynaşarak nöral tüp oluşturması sonucu, sefalik ve kaudal parçası olan tübüler bir yapı halini alır. Nöral tüpün kapanmamasına ya da sonradan rüptürüne bağlı olarak meydana gelen gelişim kusurlarına, nöral tüp defekti ya da defektleri (NTD) denir. NTD, kafatası ve medulla spinalis üzerinde değişik yapı ve karakterde birçok konjenital malformasyonu içine alır. Malformasyonun seviyesine ve ağırlığına göre klinik bulgular ortaya çıkar. NTD'de genetik, çevresel ve anneye ait etiyolojik

Geliş Tarihi: 22.02.2000

Yazışma Adresi: Dr.Ali Altan GÜNAYDIN
GATA Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji AD
Etlik, ANKARA

faktörler suçlansa da, bazılarında tam neden açıklanamamakta ve böyle defektleri olan embriyoların yüksek bir oranı da doğal olarak tahliye olmaktadır (1).

Canlı doğumların yaklaşık %2'sinde ciddi konjenital anomaliler vardır. Bu anomalilerin %60'ı, santral sinir sistemine aittir. Santral sinir sistemini ilgilendiren anomalilerin önemli bir bölümü de nöral tüp kapanma kusuru sonucu ortaya çıkar. Meningomyelose, vertebral kolon boyunca, orta hatta spinal kanaldan dışarıya herniye olan meninks, serebrospinal sıvı, medulla spinalis ve spinal sinirleri içeren üzeri membranla örtülü kistik yapı görünümünde bir nöral tüp defektidir (2). Birçok teratojene rağmen sebep olan asıl faktör bilinmemektedir. Çevresel faktörler, ailesel yatkınlık gibi özellikler çok faktörlü bir geçişi desteklemektedir (3). Laurence'a göre nöral tüp defektlerinin %64'ünde sebep bilinmemektedir. Bu bilinmeyen kategoride embriyotoksik faktörün etkisi olabilir (4).

NTD; ultrasonografi, maternal serumda alfa fetoprotein ve amniyon sıvısında alfa fetoprotein ile asetilkolinesteraz bakılmasıyla hamileliğin ileri dönemlerinde teşhis ve tahmin edilebilmektedir (5). Amacımız, hamilelikten önce veya hamileliğin ilk haftalarında anne adayının kan serumundaki muhtemel embriyotoksik faktör ya da faktörlerin taranmasıyla NTD'nin tahmin veya teşhis edilebilmesidir.

Materyel ve Metod

Yaşları 1-3 gün arasında değişen meningo-myelose'li (Şekil 1) 6 yenidoğan ile bunların annelerinden, aseptik şartlarda 3-5 ml'lik periferik kan alındı. Her bir numunenin serumu ayrılarak -20°C'de saklandı. Annelerin yaşları 18-35 arasındaydı. Aynı yaşlar arasındaki sağlam 6 yenidoğan ile bunların annelerinden temin edilen serumlar ise kontrol amacıyla alınarak yine -20 °C'de muhafaza edildi. Bütün serumlar daha önceden malformasyonlu çocuğu olmayan, herhangi bir teratojenle karşılaşmadığı anamnezle tespit edilen, yakın akraba evliliği yapmayan annelerin ve bebeklerinin serumlarıdır.

Çalışmada ticari bir işletmeden temin edilen 225 adet döllü, kuluçkalık tavuk yumurtası kul-



Şekil 1. Bir günlük yenidoğanda hidrosefali ve torakolomber bölgede meningomyelose.

lanıldı. Yumurtalar aşağıda bildirilen 6 gruba ayrıldı:

1. grup: Meningomyelose'li yenidoğanların serumlarının verildiği grup (HÇ grubu)
2. grup: Meningomyelose'li yenidoğanların annelerinin serumlarının verildiği grup (HA grubu)
3. grup: Sağlam yenidoğanların serumlarının verildiği grup (SÇ grubu)
4. grup: Sağlam yenidoğanların annelerinin serumlarının verildiği grup (SA grubu)
5. grup: Hava verilen grup (HV grubu)
6. grup: Hiçbir işlem uygulanmayan grup (IU grubu)

Birinci grupta 56, ikinci grupta 58, üçüncü grupta 27 yumurta; dördüncü, beşinci ve altıncı grupta ise 28'er adet yumurta bulunmaktaydı. Yumurtanın enjeksiyon bölgesinin %70'lik alkolle dezenfeksiyonunu takiben delikler açıldı. Serum verilen gruptaki her bir yumurtaya 20 µl serum; hava verilen gruptaki her bir yumurtaya da 20 µl hava enjekte edildi. Enjeksiyonlar yumurtanın hava kamerasına yapıldı (6). Açılan delikler, enjeksiyondan hemen sonra sıvı parafinle kapatıldı. Tüm enjeksiyonlar yumurtalar inkübatöre yerleştirilmeden hemen önce gerçekleştirildi. İnkübasyon işlemleri standart koşullarda; 38°C'de ve %70-80'lik nispi nemde yapıldı. İnkübasyonun 6, 8, 9, 10, 12, 15 ve 21. günlerinde yumurtalar açıldı.

Embriyoyu görmek için dış kabuk kesilerek geniş bir delik meydana getirildi. Embriyonun can-

Tablo 1. Deney (1. ve 2. grup) ve kontrol (3, 4, 5, 6. grup) gruplarının karşılaştırılması

| Gruplar | Normal | | Ölü | | Malformasyonlu | | İnfertil | Toplam |
|--------------|--------|----|------|----|----------------|----|----------|--------|
| | Adet | % | Adet | % | Adet | % | | |
| 1. Grup (HÇ) | 37 | 69 | 16 | 30 | 7 | 13 | 3 | 56 |
| 2. Grup (HA) | 32 | 61 | 20 | 38 | 9 | 17 | 6 | 58 |
| 3. Grup (SÇ) | 23 | 90 | 2 | 12 | 1 | 4 | 2 | 27 |
| 4. Grup (SA) | 25 | 89 | 3 | 10 | 1 | 3 | 0 | 28 |
| 5. Grup (HV) | 24 | 89 | 3 | 11 | 1 | 4 | 1 | 28 |
| 6. Grup (İU) | 21 | 84 | 4 | 16 | 0 | 0 | 3 | 28 |
| Toplam | | | | | | | 15 | 225 |

Tablo 2. Ortalama tepe-oturma noktası uzunluğu (cm.) ve Ortalama ağırlıklar (g)

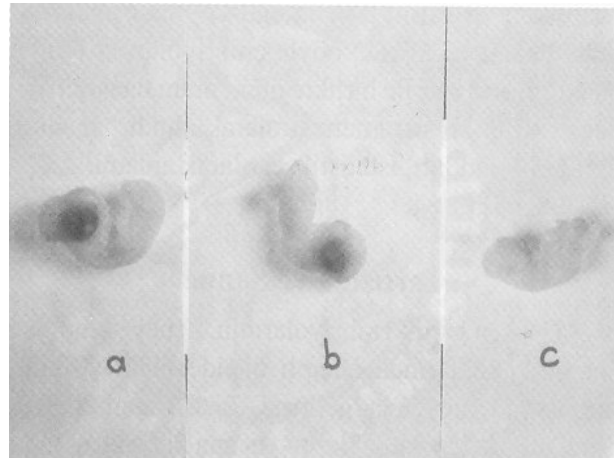
| Enjeksiyon sonrası günler | Ortalama tepe-oturma noktası uzunluğu (cm.) | | | Ortalama ağırlıklar (g) | | |
|---------------------------|---|---------|---------------|-------------------------|---------|---------------|
| | Deney | Kontrol | Uzunluk farkı | Deney | Kontrol | Ağırlık farkı |
| 6 | 1.32 | 1.41 | 0.09 | 0.32 | 0.33 | 0,01 |
| 8 | 2.07 | 2.07 | 0.00 | 1.11 | 1.17 | 0,06 |
| 9 | 2.15 | 2.21 | 0.06 | 1.59 | 1.60 | 0,01 |
| 10 | 2.38 | 2.39 | 0.01 | 2.37 | 2.42 | 0,05 |
| 12 | 3.19 | 3.33 | 0.14 | 4.18 | 4.63 | 0,45 |
| 15 | 4.35 | 4.40 | 0.05 | 11.55 | 11.90 | 0,35 |

lılığı kalp atışı, ekstremiteler hareketleri ve dokunulduğunda uzuv refleksi alınarak değerlendirildi. Embriyo zarlarından ayrılıp hassas terazide tartıldı. Tepe-oturma noktası uzunluğu (C-RL) ölçüldü. Çıplak gözle ve stereomikroskop altında incelenerek, embriyonal gelişme bozuklukları belirlendi. Embriyonal gelişme evreleri Hamburger-Hamilton skalasına göre değerlendirildi (7). Gerekli görülen embriyolar yakın çekim ile fotoğraflandı.

Bulgular

Çalışmada mortalite ve malformasyon oranları ile infertilite konusunda elde edilen sayısal veriler Tablo 1'de verilmiştir.

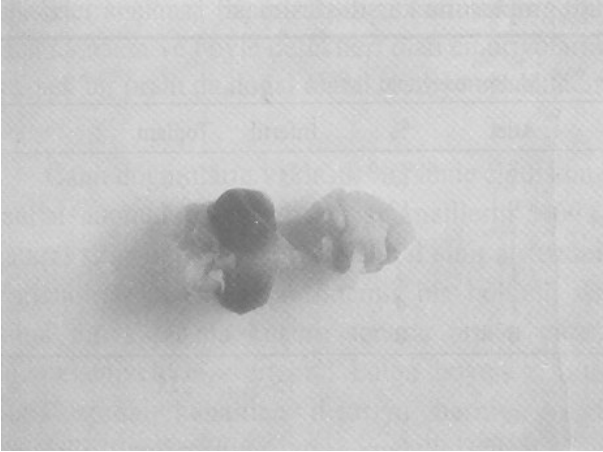
Tablo 1, deney ve kontrol gruplarında anormal civcivlerin yanında, normalin de sıklığını göstermektedir. 1. ve 2. grup birbiriyle kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli bir fark göstermedi ($P>0.05$). Bu yüzden onlar bir havuzda toplandı. Benzer şekilde 3, 4, 5, 6. gruplar birbiriyle kıyaslandığında anomalilerdeki fark istatistiksel olarak önemli değildi ($P>0.05$). Deney grubunda, kontroller ile kıyaslandığında daha yüksek anormal sıklığı görülmekte idi ($X^2= 11.29$; $P<0.05$).



Şekil 2. (a) Kontrol grubunda 6. Gündeki normal tavuk embriyosunun görünümü. (b) Deney grubunda 6. Gündeki tavuk embriyosu. Anensefali. (c) 6 günlük tavuk embriyosu. Anoftalmus.

Ayrıca ölü embriyo oranı deney grubunda daha yüksekti (Tablo 2).

Deney grubunda; anensefali (Şekil 2b), nöral tüpün anterior bölümünün kapanmaması (Şekil 3), anoftalmus (Şekil 2c), ekstremiteler defektleri ile karın ve göğüs duvarı defektleri (Şekil 4) gibi anomali veya malformasyonlar görüldü.



Şekil 3. Deney grubunda 9 günlük tavuk embriyosu. Kranial defekte bağlı eksensefali.



Şekil 4. 12 günlük tavuk embriyosu. Göğüs, karın defekti ile sağ arka ekstremitede ayak yokluğu ve sol arka ekstremitede ayak parmaklarında defektler.

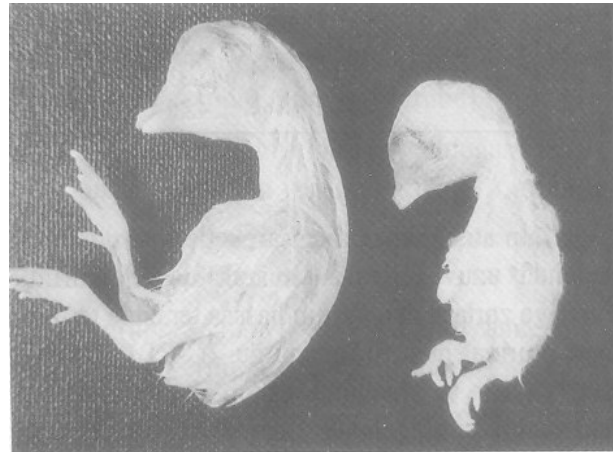
Tablo 2'de görüldüğü gibi, deney embriyolarının tepe-oturma noktası (C-RL) uzunluğu ve ağırlığı kontrollerle karşılaştırıldığında, fark 12. günde en yüksek bulundu. Uzunluk ve ağırlık ölçümleri, deney embriyolarında büyüme geriliğini göstermekte idi (Şekil 5). Erken dejenerasyon gösteren embriyoların ağırlığı, uzunluğu ve malformasyonları alınamadı. Ancak, böyle embriyolar ölü idi ve malformasyonlar ile birlikte ölüm oranı da embriyotoksitenin bir parametresi olarak alındı. Uzunluk ve ağırlık farkları, istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$).

Tartışma ve Sonuç

Gelişen tavuk embriyolarının, deney serumuna maruz kaldıklarında önemli ölçüde ölüm ve malformasyon meydana gelmesi, bize meningo-myelosele ile doğan bebeklerin ve annelerinin serumlarında embriyotoksik faktör ya da faktörlerin (ETF) varlığını düşündürmektedir.

Rohatgi ve ark (1) meningo-myelosele'li yenidoğanların serumlarını, Kumar ve ark (8) çok sayıda düşük yapmış ve konjenital malformasyonlu çocuk doğurmuş annelerden alınan serumları, gelişmekte olan tavuk embriyosuna enjekte ederek çalışmalar yapmışlar, civcivlerin mortalite ve malformasyon sıklığında artış gözlemişler ve bunları da annelerin serumlarındaki embriyotoksik faktöre bağlamışlardır.

NTD'de genetik, çevresel ve anneye ait faktörler suçlanmaktadır. NTD, nöral tüpün primer olarak



Şekil 5. Sağda deney grubundaki, solda kontrol grubundaki yumurtadan çıkan 15 günlük tavuk embriyoları. Deney grubundaki embriyoda büyüme geriliği dikkati çekmektedir.

kapanamaması ve önceden kapanan nöral tüpün aşırı şişip gerilmesi sonucu rüptüre olmasından kaynaklanabilir (9,10). Folik asit eksikliği (11,13), çinko eksikliği (14,15) ve alkol sendromları da (16) NTD'nin etiyojisinde rapor edilmiştir. Laurence'a göre gelişim kusuru olan vakaların %64'ünde sebep daima bilinmemektedir. Embriyotoksik faktörün etkisinin olabileceği işte bu bilinmeyen kategoridir (4).

Annenin serumunda var olduğu kabul edilen ve plenta ile fetuse geçen teratojenik ajanların mekanizması konusunda kesin ve net bilgilerle sahip değiliz. Ancak, Wilson (17) bu konuda şu görüşleri öne sürmüştür: Embriyogenezin her aş-

masında radikal basamaklar vardır. Bunlar DNA bağımlı şifrelerle kontrol altında tutulmaktadır. Belirli teratojenik ajanlar plesenta ya da anne organizması üzerinde hemen hemen hiçbir etki yapmadan, embriyo gelişimine bazı basamaklarda müdahale edebilmektedir. Malformasyonlu ya da malformasyonsuz düşüklere ve ölüm de dahil olmak üzere bir dizi toksisite belirtisine yol açar.

Deney serumu sadece NTD değil, diğer sistem defektlerini de ortaya çıkarmıştır. Örneğin; karın, göğüs defekti ve ekstremitte defektleri gibi. Bu gibi defektler serumları kullanılmış olan yenidoğanlarda mevcut değildi. Bu durum insanda ve tavukta farklı türdeki, farklı etkiye dayanarak açıklanabilir. Benzer bir gözlem, insanda amelia, fokomelia, sindaktili v.b.ne yol açan talidomid ilacı, farelerde başlangıçta aynı tip malformasyonlar meydana getirmemiştir (1).

Kontrollere kıyasla, deney grubundaki fazla fetüs ölümü ve daha yüksek anomali sıklığına ek olarak, tablo 2'de görüldüğü gibi vücut ağırlığı ve C-RL'de genel bir düşüş de gözlenmiştir. Kontrol grubunda bazı embriyolar ölü ve malformasyonlu bulundu. Bunun sebebi tam açıklanamadı. Bu ya NTD'nin genetik bölümüne yada Biggers (18) tarafından belirtildiği gibi embriyonun gelişimini etkileyen iç ya da dış faktörlere bağlanabilir.

Abir ve ark (19) düşük yapmış kadınlardan alınan serumu gelişmekte olan fare embriyolarına verip, etkilerini araştırmışlar, kontrol grubu ile kıyaslandığında, fare embriyolarındaki gelişmeme oranının deney grubunda daha yüksek olduğunu bildirmişler ve bunun da anne serumunda bulunan ETF'ce olabileceğini ifade etmişlerdir. Ancak açık ve net olarak embriyotoksik faktör ya da faktörleri ortaya koyamamışlardır. Chavez ve Mc Intyre (20) yaptıkları benzer çalışmalarda embriyotoksik faktörü IgG antikoru olarak tarif etmişlerdir. Ayrıca, rekurren abortus hikayesi olan kadınların lenfosit ve makrofajları üreme antijenlerince (sperm ve trofoblast) uyarıldığında, gelişmekte olan fare embriyolarına ve insan plesenta hücrelerine karşı toksik olan solubl faktörler ürettikleri gösterilmiştir. Ecker ve ark (21) bu faktörü embriyotoksik faktör olarak kabul etmişlerdir. Hill ve ark (22) ise bulunan toksik faktörlerin üretiminin üreme sistemindeki bir defekt nedeniyle de olabileceğini bildirmişlerdir.

Annenin hamileliği sırasında, maternal serumda alfa fetoprotein ve amniyon sıvısında alfa fetoprotein ile asetilkolinesteraz bakılması sonucu NTD'leri tahmin edilebilmektedir. Ancak, hamileliğin 13. haftasından önce bu tahlillerin yapılması anlam taşımamaktadır. Ayrıca amniyosentez invaziv bir yöntemdir. Ultrasonografi ile de aynı şekilde hamileliğin ileri dönemlerinde (12.haftadan sonra) tanı konulmaktadır.

protein ile asetilkolinesteraz bakılması sonucu NTD'leri tahmin edilebilmektedir. Ancak, hamileliğin 13. haftasından önce bu tahlillerin yapılması anlam taşımamaktadır. Ayrıca amniyosentez invaziv bir yöntemdir. Ultrasonografi ile de aynı şekilde hamileliğin ileri dönemlerinde (12.haftadan sonra) tanı konulmaktadır.

Bu aşamada hamilelikten önce veya hamileliğin ilk haftalarında anne adayının serumunda embriyotoksik faktörün teşhis edilmesi, meningomyeloselin ortaya çıkmasında önemli bir gelişme olarak görülmektedir. Böylece %0.3 ila %5 görülme sıklığı olan, tedavisi yüz güldürücü olmayan, kalıcı sakatlıklar yapan, psikolojik, ailevi, sosyal sorunlar ortaya çıkaran ve yıllarca uğraştıran bu konjenital malformasyonun önüne geçilmiş olunur. Çalışmalarımızın sonucu olarak, embriyotoksik faktör ya da faktörlerin kesin ve net olarak ortaya çıkarılması için çok daha fazla araştırmalara ihtiyaç olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Rohatgi M, Chandna S, Kumar R. Presence of embryotoxic factor in the sera of neonates affected by myelomeningocele: A study on chick embryo, Journal of Pediatric Surgery, 1991, 26, 75-8.
2. Greenberg MS. Handbook of Neurosurgery, 3rd ed. Florida: Greenberg Graphics Inc, 1994: 157-68.
3. Reigel DH. Spina bifida. In: McLaurin, Venes JL, Schut L, Epstein F, eds. "Pediatric Neurosurgery, Surgery of the Developing Nervous System". Philadelphia: WB Saunders, 1989: 35-52.
4. Laurence KM. Prevention and prenatal diagnosis of neural tube defects. In: Persaud TVN, ed. "Advances in Study of Birth Defects" Lancaster: MTP Press, 1982: 133-66.
5. Gremm B, Sohn C, Beldermann F, Bastert G. Increased maternal Serum-AFP as an indication for further steps in diagnosis. Zentralbl Gynakol, 1997; 119: 560-6.
6. Kemper FH, Luepke NP. Toxicity testing by the hen's egg test(HET), Fd Chem Toxic, 1986, 24 (6-7): 647-8.
7. Hamburger V and Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol, 1951; 88: 49-92.
8. Kumar R, Grewal MS, Singh V. Serum from women at high for fetal abnormalities causes malformations in developing chicks. Ind J Exp Biol 1986; 24:489-92.
9. McLone DG, Suva J, Collins JA, Poznanski S, Knepper PA. Neurolation: biochemical and morphological studies on primary and secondary neural tube defects. In: Humphreys RP, ed. "Concepts in Pediatric Neurosurgery". Basel: S Karger, 1983: 15-59.
10. McLone DG. Treatment of myelomeningocele and arguments against selection. Clin Neurosurg, 1986, 33,359.

11. Kennedy D, Pastuzsak A, Koren G. Taking folic acid during pregnancy Don't leave it too late. *Can Fam Physician*, 1997; 43: 21 13-21 14.
12. Laurence KM. Neural tube defects: a two pronged approach to primary prevention. *Pediatr* 1982; 70:648-50.
13. Smithels RW. Neural tube defects: prevention by vitamin supplements. *Pediatr* 1982; 69:498-9.
14. Soltan MH, Jenkins DM. Maternal and fetal plasma zinc concentration and fetal abnormality. *Br J Obstet Gynaecol* 1982; 89:56-8.
15. Steinbok P, Irvine B, Cochrane DD, Irvin BJ. Long-term outcome and complications of children born with myelomeningocele. *Child's Nerv Syst* 1992; 8:92-6.
16. Goldstein G, Arunalanthan K. NTD and renal anomalies in a child with fetal alcohol syndrome. *J Pediatr* 1978; 93:636-7.
17. Wilson JG. Current status of teratology. In: Wilson JG, Fraser FC, eds. "Handbook of Teratology". New York: Plenum, 1977: 47-74.
18. Biggers JD. Metabolism of mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1971; 14:41-54.
19. Abir R, Zusman I, Benhur H, Yaffe P, Ornoy A. The effects of serum from women with miscarriages on the in-vitro development of mouse preimplantation embryos. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1990; 69: 27-33.
20. Chavez DJ, McIntyre JA. Sera from women with histories of repeated pregnancy losses cause abnormalities in mouse peri-implantation blastocysts. *J Reproduct Immunol* 1984; 16: 273-81.
21. Ecker JL, Laufer, MR, Hill JA. Measurement of embryotoxic factors is predictive of pregnancy outcome in women with a history of recurrent abortion, *Obstetrics-Gynecology*, 1993; 81: 84-7.
22. Hill JA, Polgar K, Harlow BL, Anderson DJ. Evidence of embryo and trophoblast-toxic cellular immune response(s) in women with recurrent spontaneous abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 1044-52.