TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TENOKSİKAMIN ORTA HAT KAPANMASINA ETKİSİ: ERKEN DÖNEM TAVUK EMBRİYO MODELİ

Dr. Burak BAHADIR

BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ
ANA BİLİM DALI UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Ağahan ÜNLÜ

ANKARA
2018

Düzenleme tarihi: 24/12/2014

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: BURAK BAHADIR	**Sınav tarihi:** 19 / 12 / 2018
Anabilim/Bilim Dalı	: BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI	
Tez Danışmanı	: PROF.DR.M.AĞAHAN ÜNLÜ	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER			
Tezin Başlığı: TENOKSİKAMIN ORTA HAT KAPANMASINA ETKİSİ: ERKEN DÖNEM TAVUK EMBRİYO MODELİ			
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi	☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1	☐ 2	☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☒ Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Jüri Başkanı
Prof.Dr.Y.Şükrü ÇAĞLAR
Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof.Dr.M.Ağahan ÜNLÜ
Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof.Dr.Hakan EMMEZ
Anabilim/Bilim Dalı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bizlere bilgi, beceri, deneyimleriyle yol gösteren başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Y. Şükrü Çağlar ve engin tecrübelerinden istifade ettiğimiz Prof. Dr. Atilla Erdem olmak üzere, tez danışmanım Prof. Dr. Ağahan ÜNLÜ'ye, Prof. Dr. Esra ERDEMLİ ve tüm Nöroşirürji A. D. öğretim üyelerine,

Cerrahi bilgi ve yeteneklerimin gelişmesine eşsiz katkıları olan çok değerli ağabeylerim Uzm. Dr. İhsan Doğan, Uzm. Dr. Onur Özgüral ve Uzm. Dr. Ümit Eroğlu'na,

Ayrıca, tez çalışmalarım sırasında benden hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Dr. Eda Aslanbaba, Dr. Derya Özdemir ve İnt. Dr. Eray Serhat Aktan'a,

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım ve eğitimim süresince bilgi ve becerilerinden yararlandığım başta ağabeylerim olmak üzere, tüm asistan arkadaşlarım, hemşireler ve hastane personeline,

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

Teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Burak BAHADIR

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR ii
İÇİNDEKİLER iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ iv
TABLOLAR DİZİNİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. NÖRAL TÜP DEFEKTİ 2
2.2. NÖRAL TÜP DEFEKTLERİNİN ETYOLOJİSİ 3
2.3. NÖRÜLASYON 3
2.3.1. Primer Nörülasyon 3
2.3.2. Sekonder Nörülasyon 6
2.4. CİVCİV EMBRİYOSUNDA EMBRİYOGENEZ 6
2.5. TENOKSİKAM (*Tenoxicam*) 9
2.6. LABORATUAR TEKNİKLERİ 11
2.6.1. Pencere Açma Tekniği 11
2.6.2. New Tekniği 13
3. GEREÇ VE YÖNTEM 14
3.1. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME 16
4. BULGULAR 17
4.1. İSTATİKSEL ANALİZ 21
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 23
ÖZET 31
ABSTRACT 33
6. KAYNAKLAR 35

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BOS	:	Beyin Omurilik Sıvısı
COX	:	Siklooksijenaz
LT	:	Lökotrien
NSAII	:	Non-steroid Antiinflamatuvar
NTD	:	Nöral Tüp Defekti
PG	:	Prostoglandin
PGI	:	PG Sentez İnhibitörü
TEN	:	Tenoksikam

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 1. Nöral Tüp Kapanma Defektleri (Disrafizm) 1

Tablo 2. Tenoksikam'ın çeşitli dozlardaki grup çalışması 19

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 1. Nörülasyonun elektron mikroskobisindeki görünümü 4

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

Şekil 3. Hamburger ve Hamilton civciv embriyo gelişim evrelemesi 9

Şekil 4. Tenoksikamın kimyasal yapısı 10

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

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

Şekil 7. Hamilton mikroşırınga ve iğnesi 12

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

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

Şekil 10. Embriyoda orta hat kapanma kusuru (Evre 12/48. saat) (x40).....18

Şekil 11. Gelişim geriliği olan embriyo (Evre 12/48. saat) (x40).....18

Şekil 12. Ansefalosel izlenen embriyo (Evre 12/48. saat) (x40) 19

Şekil 13. a. Kesit alınan normal embriyo b. Kapalı olan nöral tüp (TBx200) (Evre 12/48. saat).....20

Şekil 14. a. Kesit alınan NTD olan embriyo b. Açık olan nöral tüp (TB X 200) (Evre 12/48. saat).....20

Şekil 15. PG sentez yolu ve TEN'in COX inhibisyonu.....26

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöral tüp adı verilen yapı beyin dokusundan başlayıp, boylu boyunca omuriliği de içine alacak şekilde aşağı doğru uzanan bir yapıdır. Bu yapı, döllenmeden sonraki 3. ile 4. hafta arasında (bazı kaynaklarda 2. ile 3. hafta) gelişimini tamamlar. Gelişimin her hangi bir nedenle (genetik veya çevresel) sorunlu olması, tüpün herhangi bir bölgesinin açık kalmasına neden olur ki bu sorun nöral tüpün kapanmasındaki kritik günler olan döllenmeden sonraki 23 ve 28. günler arasında meydana gelir ve bu durumda nöral tüp defekti oluşumuna yol açar. Nöral tüp defektleri merkezi sinir sisteminin kompleks konjenital anomalileridir. Nöral tüp defekti yaklaşık olarak 6/10000 gebelikte görülür (2). En sık görülen nöral tüp defekti anensefali ve spina bifidadır (1). Yenidoğanlarda %3–5 oranında doğum defektine rastlanmaktadır ve nöral tüp defektleri (NTD) doğum defektine bağlı yenidoğan ölümlerinin %7'sini oluşturmaktadır (3).

Tenoksikam (TEN), son dönemde yaygın olarak kullanılan; analjezik, antipiretik, antienflamatuar ve antiromatizmal etkisi olan bir prostaglandin sentez inhibitörüdür. Diğer non-steroid antienflamatuar ilaçların aksine gebelikteki teratojenik etkisi üzerine yapılmış net bir çalışma yoktur. Biz bu çalışmada gebelik kategorisi halen net olarak belirlenememiş olan tenoksikamın civciv embriyolarında orta hat kapanmasına etkisi ve NTD oluşturma mekanizmasını incelemeyi amaçladık.

Tablo 1. Nöral Tüp Kapanma Defektleri (Disrafizm)

1. Kranial Nöral Tüp Kapanma Defektleri
Anensefali
Kranioraşizis
Ensefalosel: *Anterior, Posterior, Bazal*
İnensefali
2. Spinal Nöral Tüp Kapanma Defektleri
Myelomeningosel
Syringomyeli
Tethered kord sendromu
Spina bifida okkulta: *Nöroenterik kist, Lumbosakral lipom, Spinal dermal sinüs*
Ayrık omurilik sendromu

2. GENEL BİLGİLER

2.1. NÖRAL TÜP DEFEKTİ

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

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

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

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

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

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

Ansefalosel, beyin ve zarının kalvariumdaki bir defekten herniye olmasıdır. Daha çok oksipital bölgede gelişir. Sadece meninks ve BOS bulunması haline kranial meningosel, beyin dokusunun içeriğe eklenmesine ansefalomeningosel ve ventriküler

sistemin de olaya katılması ile hidransefalomeningosel adı verilmektedir. Foramen magnum seviyesinde görülen tipine iniansefali denir.

2.2. NÖRAL TÜP DEFEKTLERİNİN ETYOLOJİSİ

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

2.3. NÖRÜLASYON

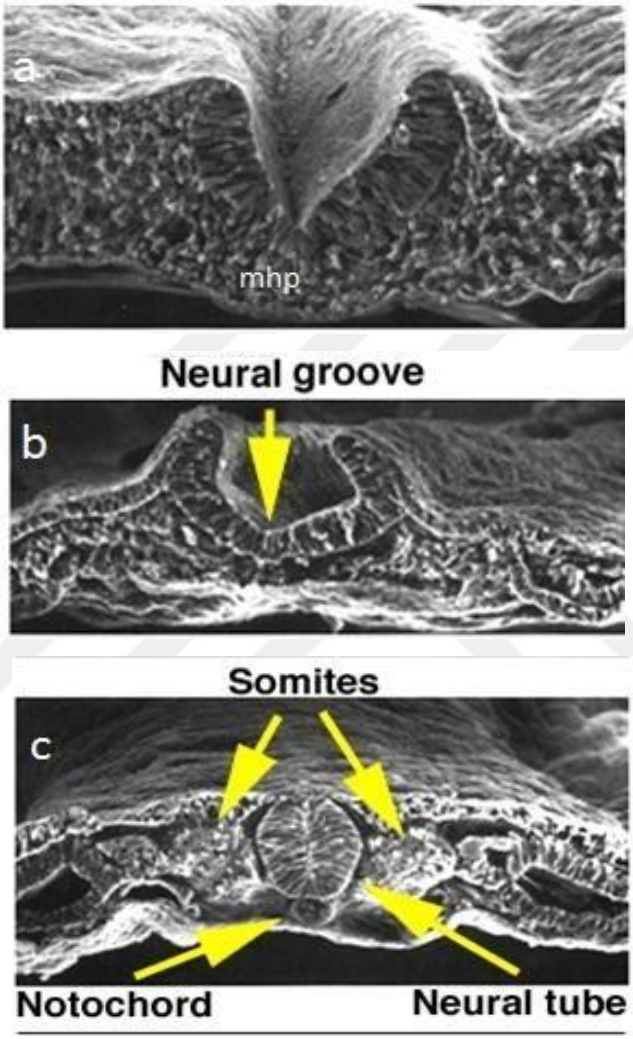
Nöral tüpün gelişme sürecini içerir. Merkezi sinir sisteminin tümü ve periferik sinir sisteminin bir kısmı başlangıçta bu tek tabakalı tüpten gelişir. İnsanlarda nörülasyon primer ve sekonder olmak üzere iki fazda gerçekleşir.

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

2.3.1. Primer Nörülasyon

Nöroektodermin katlanmasıyla tubulus nöralisin gelişmesi olayına primer nörulasyon denir. Düz nöral plağın silindirik nöral tüpe değişimini içeren bir süreçtir. Embriyogenezisin 3. haftasında, embriyonun dorsal (sırt kısmı) orta hattında bulunan

ektoderm kalınlaşmaya başlar ve nöral tabakayı oluşturur. Bu tabakanın her iki lateral sınırı yükselti yaparak ortalarında boylu boyunca uzanan çukurumsu oluk oluşumuna neden olurlar. İşte bu tabaka lateralinde oluşan yükseltiler nöral katlantı, ortadaki oluk ise nöral oluk (neural groove) olarak adlandırılır (Şekil 1).



Şekil 1. Nörülasyonun elektron mikroskobisindeki görünümü

(Dr. K. Tosney, univercity of Michigan)

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

Oluşan nöral oluk, lateralinde yükselti olarak bulunan nöral katlantıların mediale doğru yaklaşarak birleşmesi ile silindir şeklinde kapanır ve nöral tüpü (neural tube) oluşturur (Şekil 1). Böylece nöral tüp şekillenmesi nöral katlanma ile başlayıp kanal halini

alarak tamamlanacaktır. Sinir sistemi, embriyonun dorsal tarafında yerleşmiş ektodermin orta kısmından farklılaşan plak şeklinde bir dokudan köken alır (16). Altta yatan notokord ve prekordal mezodermin indüklemesiyle nöral plak oluşur (17,18).

Nöral plağın en erken oluşan parçasından önbeyin, orta beyin ile arka beynin en rostral kısmı oluşurken kalan parçasından arka beynin geri kalan kısmı ve spinal kord gelişir. Daha sonraki aşama nöral plağın şekillenmesidir. Plağın konfigürasyonu değişmeye başlar. Bu değişim özellikle plağın aynı anda longitudinal uzaması ve transvers yönde daralmasıyla olur (16). Bunun sonucu olarak epitelyal hücreler hem sayıca hem de boyca artarlar (19,20). Bir sonraki aşama nöral plağın bükülmesidir. Dayanak noktalarının şekillenmesi, nöral duvarların yükselmesi ve nöral katlantıların birleşmesini içerir.

Medyal dayanak noktasının şekillenmesi nöral plağın V biçiminde çökmesiyle oluşur. Medyal nöral plak hücrelerinin uzunluğu kısalır ve altta yatan notokorda reaksiyonel olarak kama şeklini alır (21,22,23). Bir sonraki aşama lateral nöral plağın nöral yarığın duvarlarını oluşturduğu elevasyon aşamasıdır. Birçok faktör bu basamağı kolaylaştırmaktadır: “a” medyal dayanak noktalarının orta hatta nöral plağı bükmesi en az etkili faktör olduğu düşünülmektedir; “b” yukarda bahsedilen lateral nöral plağın mikrofilamen iğciklerinin kontraksiyonuyla yukarı doğru bükülmesi sayılabilir (24,25). Nöral duvarın altında uzanan mezodermin genişlemesi, elevasyonda etkilidir (26,27). Daha sonraki aşama nöral katlantının konverjansı veya medyal bükülmesidir. Nöral yarık nöral duvarların dorsal ekstensiyonunu kaplar. İlerde beynin ve kaudal spinal kordun gelişeceği bölgede dayanak noktaları her iki nöral duvar dorsolateral pozisyonunda yükselmeye başlar. Dayanak noktalarının yükselmesi artan apikal mikrofilaman kontraksiyonuyla birlikte nöral duvar ve ilişkili ektodermin etkileşimi sonucu oluşur. Dorsolateral dayanak noktalarının şekillenmesiyle nöral yarığın medyale bükülmesine izin verilir. Nöral yarıktaki bu birleşme muhtemelen ektodermin genişlemesiyle kolaylaşmaktadır (28,29).

Primer nörülasyonun son aşaması nöral tüpün çatısı, nöral krest ve üzerindeki epitelyumun şekillenmesiyle nöral yarığın kapanmasıdır. Nöral katlantılar birbirine yaklaştığında yapışır ve ardından füzyon olur. Bu kapanma nöroepitelyal hücre

yüzeyinden salgılanan hücre adezyon molekülleri tarafından gerçekleştirilir. Başlangıç kapanması somitler arasındaki sürece benzer. Nöral duvarlar paralel olarak dizilir, yapışır ve bu yapışma sonrası ventrale devam ederek lümen oluşumuna izin verirken adezyon dorsalde kalarak füzyon gelişir (30).

2.3.2. Sekonder Nörülasyon

Gelişmekte olan embriyonun sakral ve kaudal bölgelerindeki tubulus nöralis, sekonder nörulasyon denen bir olayla şekillenir. Primer nörülasyonda bahsedilen olaylar 4. haftada tamamlanırken, sonrasında başlayan spinal kordun distal kısımları olan kauda equina ve liflerinin oluşumu sekonder nörülasyon evresini oluşturur. Sekonder nörilasyon evresinde nöral tüpün kaudale doğru uzaması sekonder nörülasyonun ilk evresi olan kanalizasyonu oluşturur. Nöral tüpün distalindeki kaudal hücre kütlesi kuyruk şeklinde uzanır. Bu oluşum gerçekleşirken çok sayıda lümen ve epandimal topluluklar filum terminale içinde organize olurlar ve distal konus medullaris meydana gelir. Bu kabaca oluşan distal spinal kord, 38. günde kaudal nöral tüpün lümeninde azalma yani retrogresif diferensiasyon ile, distal konus medüllarisi, filum terminaleyi ve santral kanalın son halini almasını sağlar. Primer ve sekonder nöral tüpün birleşimi embriyoda sakral bölgede oluşur (31,32,33). Kaudalde önceki posterior nöropor kaudal yükselti şeklini alır. Bu yükselti farklılaşmamış mezenşimal hücre kitlesi olarak yükselmeye devam eder. Bu sırada arka bağırsak, somitler, nöral krest hücreleri ve nöral kord gelişir. Nöral kord nöral plak aşamasına girmeden nöral tüpe dönüşür ve primer nöral tüple birleşir. Kanal oluşum süreci gebe kaldıktan sonra 7. Haftaya kadar devam eder. Embriyonik periodun sonunda nöral kord vertebral kolonun sonuna yaklaşsa da fetal dönemde yükselerek lomber bölgeye kadar geriler (16).

2.4. CİVCİV EMBRİYOSUNDA EMBRİYOGENEZ

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

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

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

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

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

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

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

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

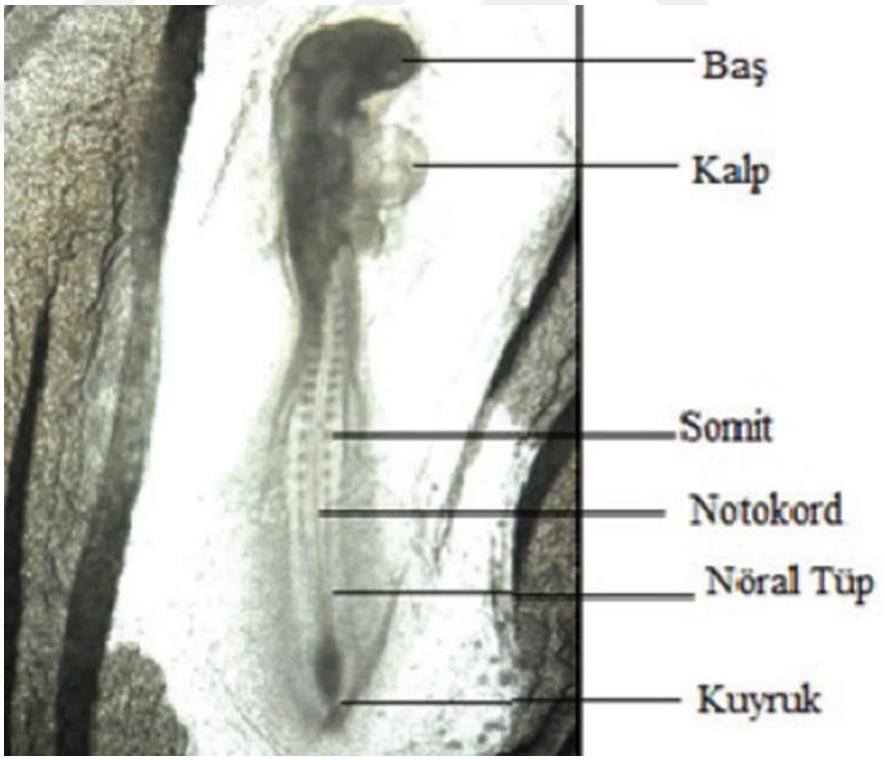
Evre 8 (Dört somit): (26–29 saat) Nöral katlantılar orta beyin seviyesinde birleşirler. Bu dönemde 4 somit vardır. Blastodermin posterior yarısında kan adacıkları görülmeye başlar.

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

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

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

Evre 12 (Onaltı somit): (45–49 saat) Kafa sola doğru dönmüştür. Ön nöropor kapanmıştır. Telensefalon görülmeye başlamıştır. Primer optik kesecikler ve optik sak oldukça iyi şekilde görülür. Kulak çekirdeği derindedir ve geniş şekilde açıktadır. Kalp hafif bir S şekli alır. Amnionun baştaki katlantısı ön beyin bölgesinin girişini kaplar. Somit sayısı 16 olmuştur (Şekil 2).

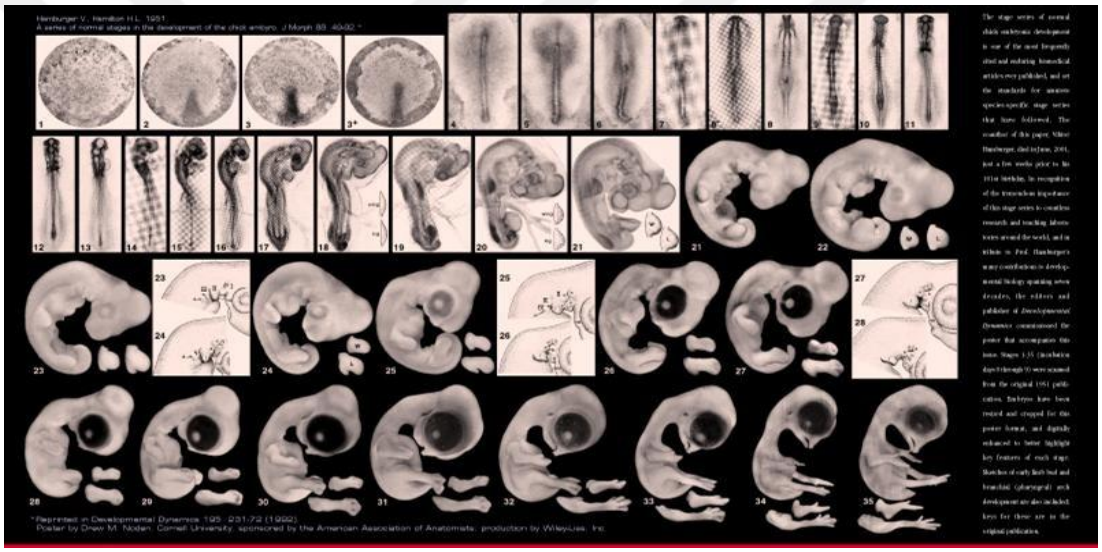


Şekil 2. Evre 12 embriyonun ışık mikroskopik görüntüsü (x40)

Evre 13 (Ondokuz somit): (48–52 saat) Kafa tamamıyla sola dönmüştür. Kranial ve servikal katlantı geniş bir eğim yapar. Telensefalonun genişlemesi belirgindir. Derindeki kulak çekirdeğinin açıklığı daralır. Hipofize ait bir belirti

yoktur. Atrioventriküler kanal daralarak belirginleşir. Amnionun baştaki katlantısı ön beyni, orta beyni ve arka beynin ön kısmını kaplar. 19 somit vardır.

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

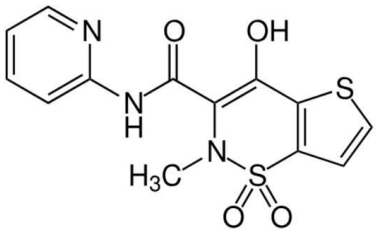


Şekil 3. Hamburger ve Hamilton civciv embriyo gelişim evrelemesi (41)

2.5. TENOKSİKAM (*Tenoxicam*)

TEN, oksikam grubundan tienotiazin türevi non-steroid antiinflamatuar ve analjezik bir ilaçtır. TEN'in siklooksijenazı inhibe ederek prostaglandin sentezini baskılaması yanında, inflamasyon gelişimindeki rolleri son yıllarda daha iyi anlaşılan lökotrienleri de baskıladığı saptanmıştır (4, 5). Ortalama eliminasyon yarı ömrü 70–72 saattir (6).

Tenoksikam, 4-hidroksi-2-metil-N-2-piridinil 2H-tieno I2.3-eI-1,2- tiazin-3-karboksamit 1,1 dioksit yapısındadır. Kapalı formülü C13H11N3O4S2 şeklinde olup, açık formülü önceki sayfada gösterilmektedir (34) (Şekil 4).



Şekil 4. Tenoksikamın kimyasal yapısı

Oksikam türevi, steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar (non steroid antiinflamatuvar ilaçlar-NSAİİ) olarak adlandırılan bir kimyasal grubuna ait olan tenoksikam, bir tienotiazin türevidir. Oksikam grubundan piroksikam, tenoksikam ile biyolojik etkinlik ve yapı açısından çok benzerlik gösterir. Piroksikamdaki benzo halkası, tenoksikamda tiyofen halkası ile yer değiştirmiştir. Bu bileşiklerde antiinflamatuvar etki ülserojenik etki ile paralellik gösterir (35).

Tenoksikamın molekül ağırlığı 337,37 g/mol, erime derecesi 209–213 °C' dir (36). Tenoksikam'ın zayıf enolik asit yapıda bir madde olduğu saptanmıştır (37).

Güçlü bir siklooksijenaz enzimi inhibitörüdür. Tenoksikam analjezik ve antiinflamatuvar olarak kullanılan oksikam türevi bir ilaçtır. Oral yoldan günlük 10 ve 20 mg' lık dozlarda, akut durumlarda ise 40 mg dozlarda verilir (38, 39, 58).

Tenoksikamın analjezik ve antiinflamatuvar aktivitesi en az, diğer NSAİİ' ler kadar etkin olmakla beraber antipiretik etkisi çok güçlü değildir. NSAİİ' ler içinde lipofilitesi en düşük olandır. Yapısındaki tionetazin halkası piroksikam ve diklofenaktan daha hidrofilik bir özellik sağlar. Zayıf asidik olması ve enterohepatik dolaşıma girmemesi nedeniyle gastrointestinal sistemde iyi tolere edilir ve zayıf asidik özelliğiyle inflamasyonlu dokuya penetre olur (59).

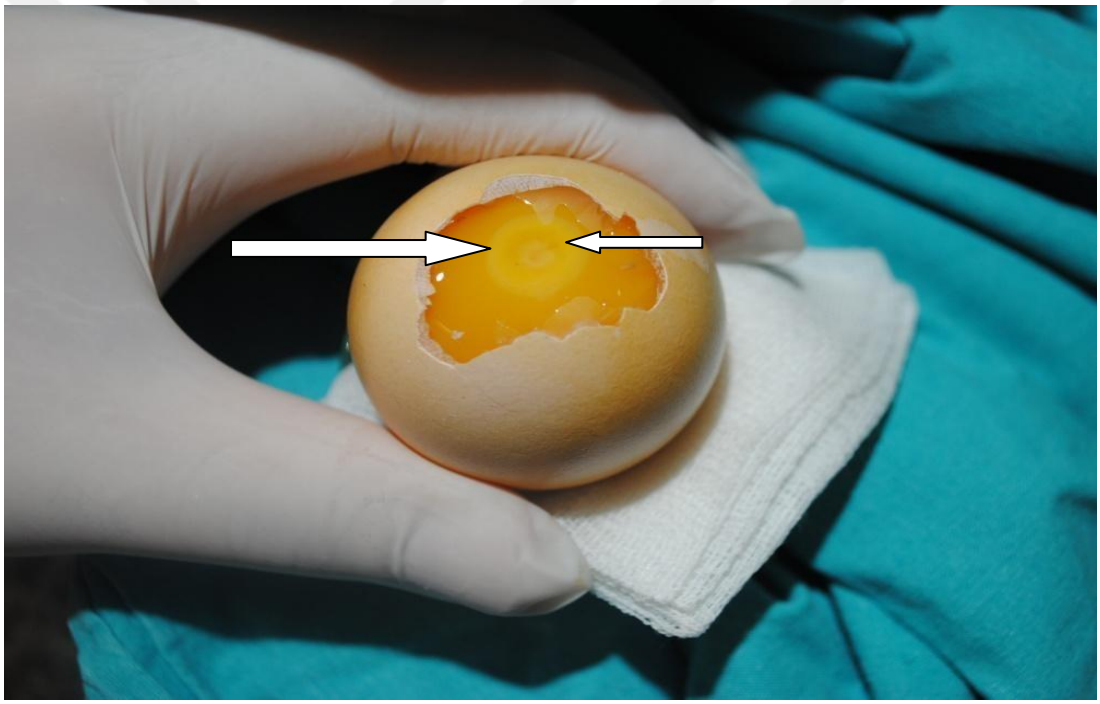
Sıçanlarda antiinflamatuvar doz ile ülserojenik dozların oranından hesaplanan terapötik indeks diğer NSAİİ'lerden üstündür (39). Tenoksikamın araşidonik asitten siklik endoperoksidazın oluşumunu katalizleyen siklooksijenazı inhibe ederek

prostoglandin sentezini inhibe ettiği, ayrıca aktif oksijen radikallerini tutarak ve lökosit kemotaksis ve fagositozunu inhibe ederek etki gösterdiği kayıtlıdır (39).

2.6. LABORATUAR TEKNİKLERİ

2.6.1. Pencere Açma Tekniği

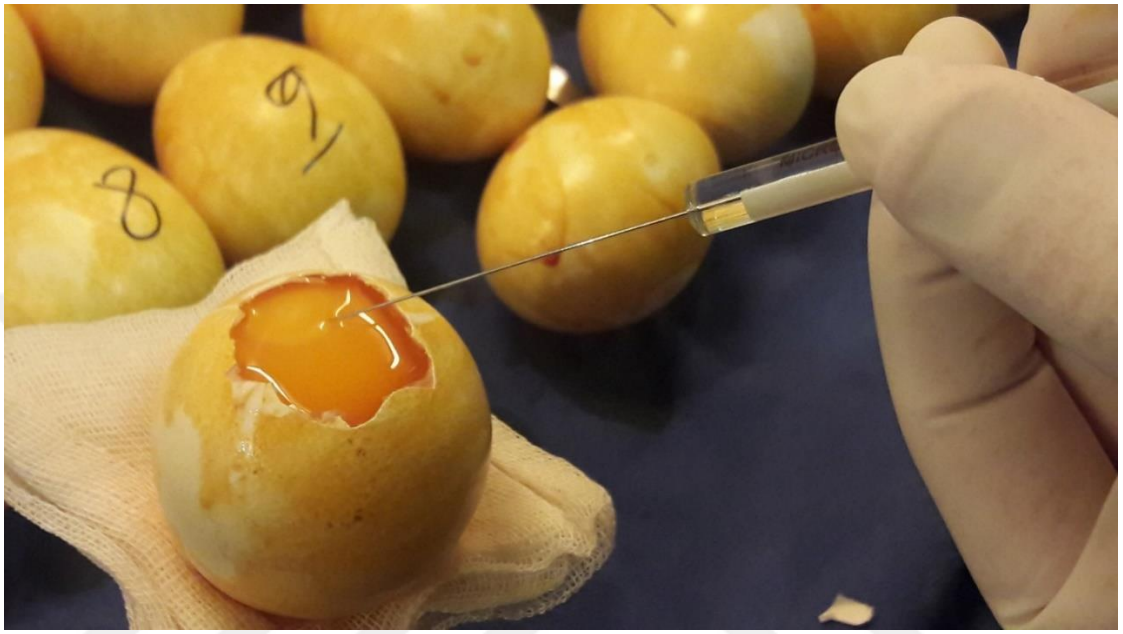
Bu modifiye teknikte, döllenmiş yumurta istenilen gelişim düzeyinde inkübatörden alınıp oda ısısında soğutulur. Yumurta kabuğu üzerine povidon iyodür ve sonrasında %70 etil alkol dökülerek sterilizasyon sağlanır.



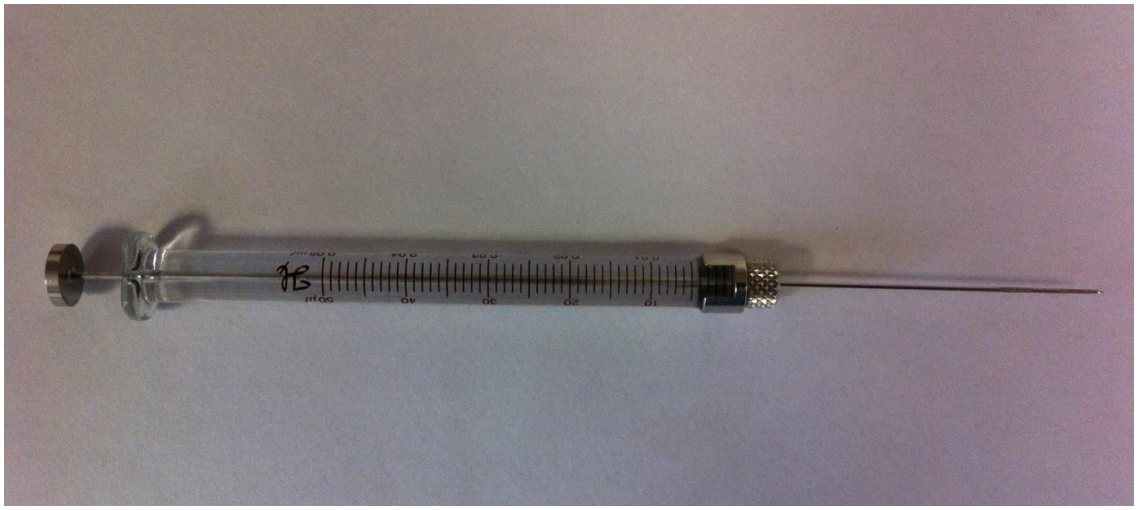
Şekil 5. Kabuk kaldırıldıktan sonra embriyoner disk (küçük ok) ve blastoderm (büyük ok)

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

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



Şekil 6. Hamilton mikroşırınga yardımı ile blastoderm altına enjeksiyon işlemi



Şekil 7. Hamilton mikroşırınga ve iğnesi

2.6.2. New Tekniği

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

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji Anabilim Dalı Nöroembriyoloji Laboratuarı'nda yapıldı. Patojen içermeyen, fertil, sıfırıncı gün beyaz Süper Nick cinsi yumurtalar Ankara, Akyurt CP Tavukçuluk Enstitüsü'nden temin edildi. Çalışma için toplam 100 adet yumurta, ağırlıkları ölçülüp (ortalama ağırlık 65+-2), 37,8+-0,2 °C 'de ve %65–75 nem ortamında 2 saatte bir otomatik çevirim yapan kuluçka makinesinde 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonun 24. saatinde tüm yumurtalar pencereleme tekniği kullanılarak açıldı. Yumurtalar dört temel gruba ayrıldı (n=25). Tenoksikam suda steril şartlarda çözülerek uygun solüsyonlar hazırlandı. Hamilton mikroşırıngası kullanılarak tüm gruplara 20 mikrolitre subblastodermik injeksiyon yapıldı. Kontrol grubuna %0,9 steril serum fizyolojik uygulandı.



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



Şekil 9. Mikroskop (Nikon ZMS 20)

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

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

Grup 3: 10mg/2ml (20 mikrolitre)

Grup 4: %0,9 SF (20 mikrolitre)

Enjeksiyon sonrası açılmış pencereler steril drape ile kapatıldı. Daha sonra yumurtalar 180 derece çevrilerek yeniden inkübatöre konuldu ve inkübasyon süresi 48 saate tamamlandı. Yumurtalar, inkübasyonun 48. saatinde embriyolojik gelişimin değerlendirilmesi için, new tekniği kullanılarak açıldı. Hamburger- Hamilton Tavuk

Embriyo Sınıflandırma Sistemi temel alınarak, Nikon ZMS–20 marka ışık mikroskobu yardımıyla 40 büyütme altında embriyolar değerlendirildi.

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

3.1. HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

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

4. BULGULAR

Yapılan çalışma sonucunda 1 kontrol grubu olmak üzere 4 temel gruba artan dozlarda tenoksikam (0.01/0.02/0.10 mikrogram) ve kontrol grubuna %0,9 serum fizyolojik hamilton şırıngasıyla 20 mikrolitre subblastodermik enjekte edildi.

1. Grupta 0.01 mikrogram/20mikrolitre tenoksikam enjeksiyonu sonrası 23 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%92), 2 embriyoda gelişimin olmadığı (%8), görüldü. Hiçbir embriyoda nöral tüp açıklığı gözlenmedi (%0).

2. Grupta 0.02 mikrogram/20mikrolitre tenoksikam enjeksiyonu sonrası 20 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%80), 2 embriyoda gelişimin olmadığı (%8), 3 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%12) görüldü.

3. Grupta 0.1 mikrogram/20mikrolitre tenoksikam enjeksiyonu sonrası 16 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%64), 3 embriyoda gelişimin olmadığı (%12), 6 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%24) görüldü.

4. Grupta %0,9/20 mikrolitre serum fizyolojik enjeksiyonu sonrası 24 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%96), 1 embriyoda gelişimin olmadığı (%4) görüldü. Hiçbir embriyoda nöral tüp açıklığı gözlenmedi (%0).



Şekil 10. Embriyoda orta hat kapanma kusuru (Evre 12/48. saat) (x40)



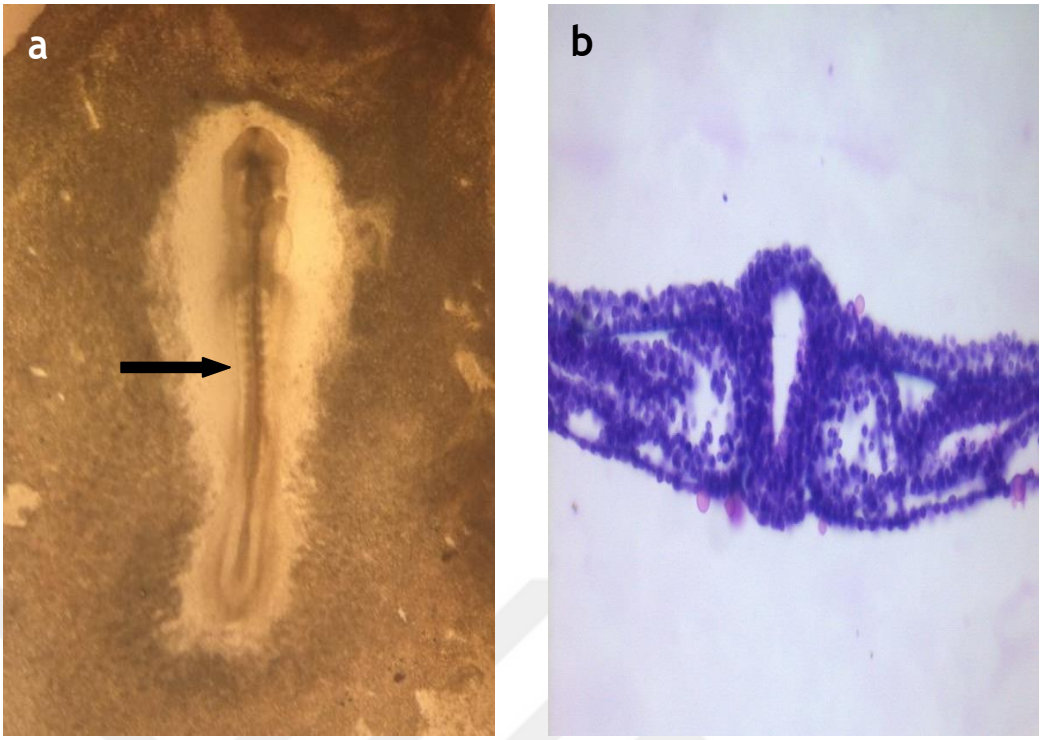
Şekil 11. Gelişim geriliği olan embriyo (Evre 12/48. saat) (x40)



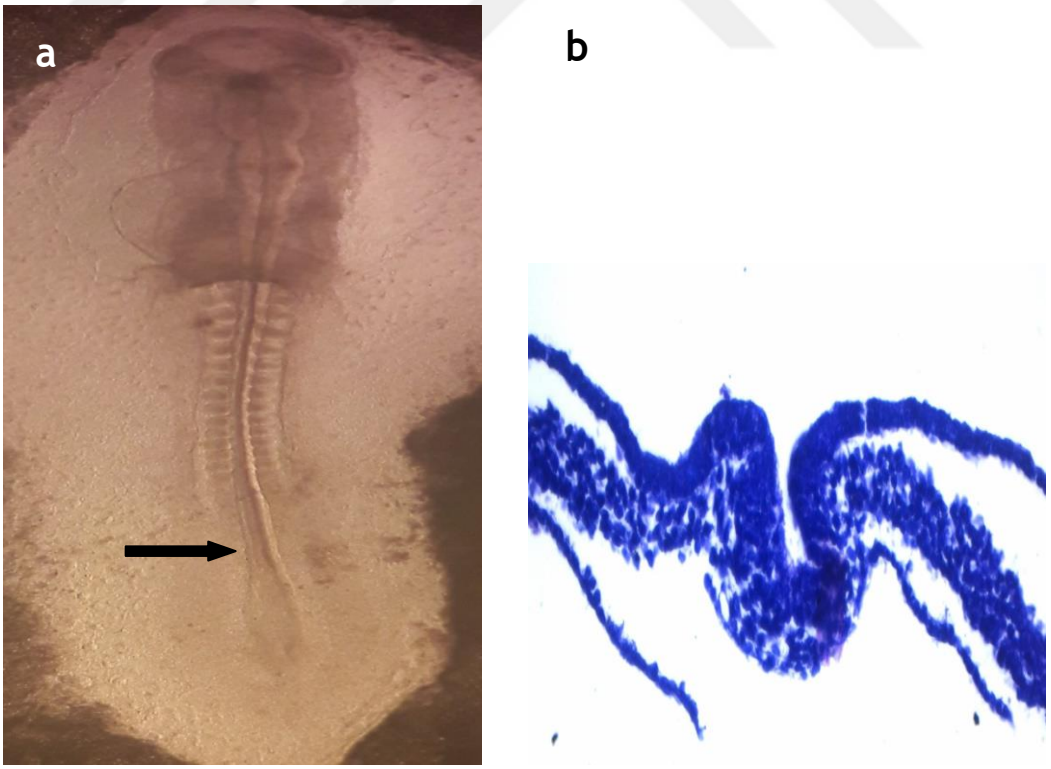
Şekil 12. Ansefalosel izlenen embriyo (Evre 12/48. saat) (x40)

Tablo 2. Tenoksikam'ın çeşitli dozlardaki grup çalışması

Embriyo Gözlemi	0.01mikgr	0.02mikgr	0.1mikgr	Kontrol
Gelişim yok	2 (%8)	2 (%8)	3 (%12)	1 (%4)
Nöral tüp açık	0 (%0)	3 (%12)	6 (%24)	0 (%0)
Nöral tüp kapalı	23 (%92)	20 (%80)	16 (%64)	24 (%96)



Şekil 13. a. Kesit alınan normal embriyo b. Kapalı olan nöral tüp (TBx200) (Evre 12/48. saat)



Şekil 14. a. Kesit alınan NTD olan embriyo b**.** Açık olan nöral tüp (TB X 200) (Evre 12/48. saat)

4.1. İSTATİKSEL ANALİZ

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

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

Grup 2 ve Grup 4 arasında nöral tüp defekti açısından oluşan fark istatiksel olarak anlamlı bulunmadı (p>0.05).

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

Gelişimin olmadığı embriyolar da anomalili kabul edilip istatiksel olarak incelendiğinde;

Grup 1 de 2 embriyoda (%8) gelişimin olmadığı,

Grup 2 de 2 embriyoda (%8) gelişimin olmadığı,

Grup 3 de 3 embriyoda (%12) gelişimin olmadığı,

Grup 4 de 1 embriyoda (%4) gelişimin olmadığı görüldü.

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

Grup 2 ve Grup 4 arasında anomali açısından istatiksel olarak anlamlı fark olmadığı (p>0.05) bulundu.

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

Bu elde edilen sonuçlar neticesinde son dönemde yaygın olarak kullanılan; analjezik, antipiretik, antienflamatuar ve antiromatizmal etkisi olan tenoksikamın erken tavuk embriyolarında doz bağımlı olarak (özellikle yüksek dozlarda) orta hat kapanma kusurlarına neden olduğu ve aynı zamanda doz arttıkça anomaliye yol açabileceği sonucuna varıldı.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

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

Bu çalışmalara katkı sağlamak amacıyla gebelik kategorisi halen net olarak belirlenememiş olan tenoksikamın erken dönem tavuk embriyolarında orta hat kapanmasına etkisini araştırdık. Yaptığımız çalışma sonunda tenoksikamın yüksek dozlarda nöral tüp defektine yol açtığını saptadık. Sık kullanılan bir non-steroid antienflamatuar olan tenoksikamla ilgili çalışmaların az olması; etkisini siklooksijenaz enzim inhibisyonuyla, araşidonik asitten prostaglandin sentezini engelleyerek gösteren bir ilaç olmasına rağmen, teratojenik etkisinin net olarak bilinmemesi nedeniyle, defekt oluşturma mekanizmasını ortaya koymaya çalıştık.

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

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

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

1. Ektodermin kalınlaşmasıyla nöral plağın oluşumu
2. Nöral plağın şekillenmesi
3. Nöral plağın bükülmesi
4. Nöral yarığın kapanması.

Kaudal nöroporun kapanmasının ardından spinal kordun en kaudal kısmının (Kaudal eminens) kapanmasıyla sonuçlanan sekonder nörülasyon görülür. Kaudal eminens, regrese olan primitif streakten köken alan pluripotent hücrelerden oluşur.

Bu hücreleden nöral kord, arka barsağın bir kısmı, kaudal somit ve kaudal notokord gelişir. Daha sonra mezenşimal kord, epitelyal korda dönüşüp primer nöral tüple birleşerek spinal kordun geri kalan sakral ve koksigeal segmentlerini oluşturur (1).

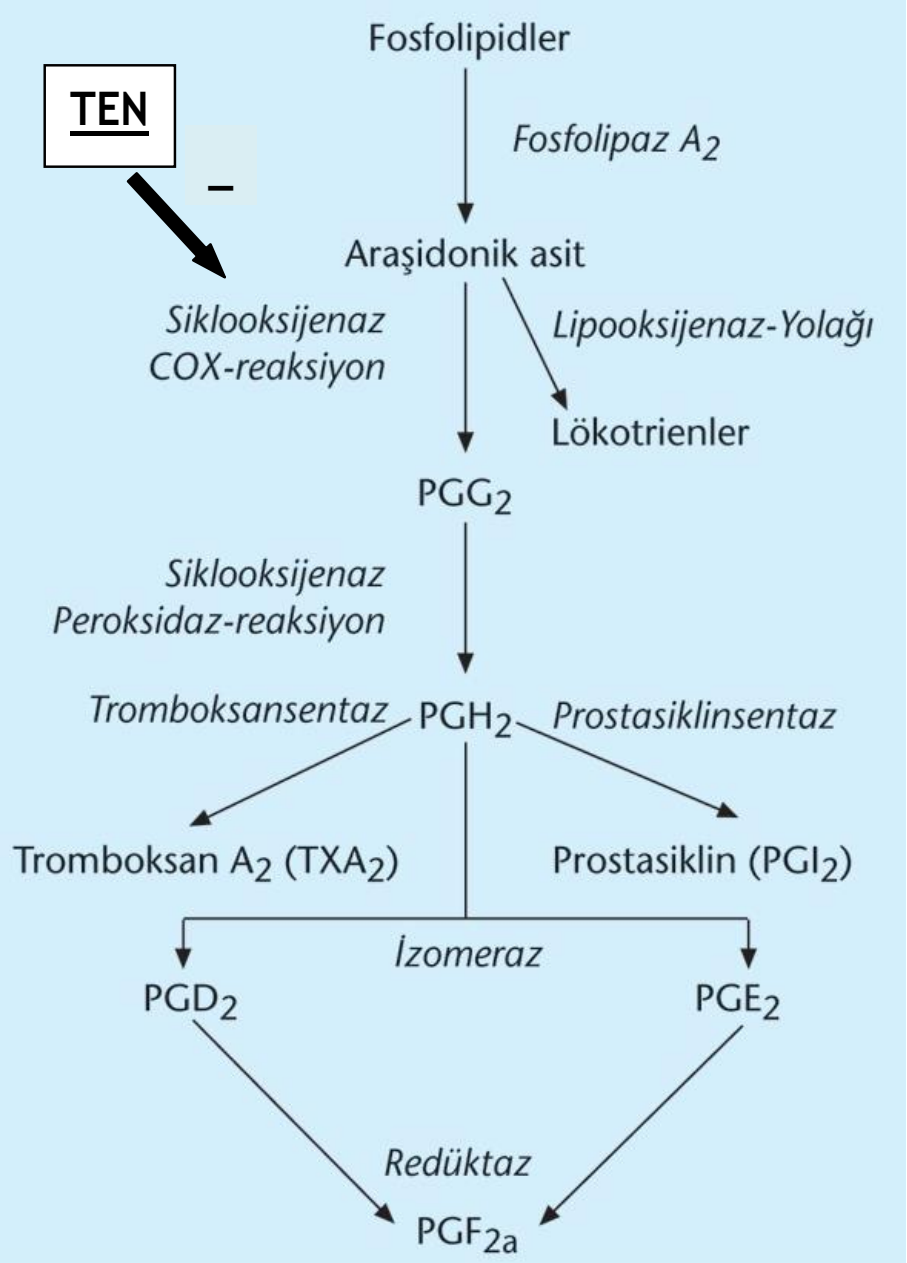
Embriyonun büyümesinde ve gelişmesinde anomalilere yol acan ilac ve çevresel ajanlara teratojen denir (55). Gebelik sırasında ilac kullanımı planlanırken bu ilacların teratojenite potansiyeli, oluşum halindeki fetal organlara etkisi, fetal buyumeye etkisi, yeni doğana etkisi ve son olarak da çocukta gozlenebilecek uzun vadeli etkileri goz onune alınmalıdır (56), cunku ilac ve metabolitleri plasenta yoluyla fetusa gecebilmektedir. Plasenta, anne ile fetus arasında besin maddeleri, gazlar ve ceşitli atıkların değişimini sağlayan bir organdır (57). Duşuk molekul ağırlıklı, yağda cozunen, nonpolar ve proteine bağlanmayan bir madde plasentayı kolaylıkla gecebilmektedir (58). NSAİİ coğunlukla analjezik, antipiretik, antiinflamatuvar etkileri nedeni ile kullanılırlar. Ana etki mekanizmaları siklooksijenaz (COX) inhibisyonu sonucu prostaglandin (PG) biyosentezini azaltmaktır (59). Bu ilaclar plasentayı gecerek fetal dolaşıma girebilir ve toksik etkilerini çeşitli doku ve organlarda gosterebilir. Bu bağlamda fetus ve yeni doğanlarda önemli yan etkilere ve hatta malformasyonlara neden olabilirler. NSAİİ kadın hastalıkları ve doğum uzmanlarınca sıklıkla recete edilen ilaclar olduğundan kullanımları sırasında dikkatli olunmalıdır (60).

Opioid analjezik ilaclar dışında kalan analjezikler, farmakolojik etki profillerine uygun olarak NSAİİ veya kısaca “antiinflamatuvar analjezikler”dir. İlac bağımlılığı yapmadıklarından, uyuşukluk ve bilinc bulanıklığı şeklinde nitelendirilen narkoz hali oluşturmadıklarından ağrılı hastalarda tercihen kullanılırlar (61). Bu ilaçlar antiinflamatuvar etkileri nedeniyle inflamasyonun 4 ana belirtisi olan ağrı, odem, kızarıklık ve sıcaklık artışını giderebilir (62). Oksikam türevi, steroid olmayan bir antiinflamatuvar ilaç olan **TENOKSİKAM** da güçlü bir siklooksijenaz enzimi inhibitörüdür.

TEN’ler COX enzim inhibisyonu ile prostoglandin sentezini bloke eder (Şekil 15). İnflamasyonda COX ve lipoksijenaz olmak uzere iki enzim yolağı aktive olmaktadır. COX enzim aktivitesi ile prostoglandin sentezine giden yol kontrol edilmekte olup bu enzimin TEN ile inhibisyonu yoluyla prostoglandin sentezi,

lipoksijenaz yoluyla lokotrienlerin sentezi inhibe edilmektedir. COX enziminin iki izo formu vardır: yapısal (COX-1) ve induklenebilir (COX-2). Son yıllarda COX-3 formundan da bahsedilmektedir. COX-1 damar endoteli, gastrik mukoza, santral sinir sistemi, trombositler ve renal tubuluslar gibi birçok hucrede bulunmaktadır. Fizyolojik koşullarda COX-1 aktif durumdadır ve vaskuler hemostazis, santral sinir sistemi ve gastrik sekresyonlar, trombosit aktivitesi ve renal fonksiyonlar gibi fizyolojik yanıtları düzenleyen prostaglandinlerin uretimini sağlar. Ancak herhangi bir inflamasyon durumunda dokularda induklenir, inflamasyona yanıt olarak ortaya cıkar. COX- 2 inflamasyon, ağrı ve ateş oluşturan prostaglandinlerin uretiminde rol oynar. TEN, etkilerini ve yan etkilerini bu enzimlerin inhibisyonuyla gösterir.

PGler ve LTler lipid kökenli otakoidler arasında olup "eikozanoidler" olarak isimlendirilmektedir. Vücutta "lokal hormon" olarak etki gösteren bu yağ asidi türevlerin biyosentezi, araşidonik asidin **hücre membranındaki** fosfolipidlerden fosfolipaz A2 gibi eikozanoid sentez enzimleri aracılığı ile mobilize edilmesine veya salınımına bağımlıdır. Araşidonik asidin siklooksijenaz yolağına girmesi ile PGler, lipooksijenaz yolağına girmesi ile de LTler oluşur. Bu eikozanoidler **vücutta tüm doku ve sıvılarda** yaygın olarak bulunur ve hücrede depo edilmezler. Bu lipidler inflamasyon, **düz kas tonusu**, hemostazis, trombosit fonksiyonu, böbrek su-tuz dengesi, uterus aktivitesi, endokrin, **santral sinir sistemi** ve gastrointestinal sekresyon gibi bir dizi fizyolojik ve patolojik olaylarda rol alırlar.



Şekil 15. PG sentez yolu ve TEN'in COX inhibisyonu

Daha önce de belirtildiği üzere PG sentezinin kontrolü COX ile sağlanmaktadır. COX-1 ile COX-2 arasındaki en önemli fark COX-1 in esas olarak **konstitütif (yapısal)** olması yani üretildiği hücrelerde sürekli sentez edilmesi nedeniyle daima var olmasıdır. Bu iki izoenzimin %60 yapısal benzerliği vardır. Siklooksijenaz enzimatik reaksiyonu, nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçlar tarafından inhibe edilir. Nonsteroidal antiinflamatuvar ajanlar eikozanoidler oluşumunu bloke ederek terapötik etkilerini gösterirler.

Sonuç itibariyle COX enzimleri hücrelerin en temel fizyolojik hareketlerinde görev almakta; TEN ise bu enzimleri inhibe ederek, düz kas tonusundan santral sinir sistemine kadar birçok temel fizyopatalojik olaylarda rol alan ve vücutta tüm doku ve sıvılarda yaygın olarak bulunan eikozanoidlerden PG'nin üretimini bloke etmektedir.

Yukarıda sunulan bilgiler ışığında; son yıllarda sıklıkla reçete edilen, antiinflamatuvar ve analjezik etkili ilaç olan, etkisini prostoglandin biyosentezini inhibe ederek gösterdiği düşünülen tenoksikamın nöral tüp defekti oluşturabileceği hipotezini öne sürüp daha önce yapılan çalışmalarla tezimizi desteklemeyi amaçladık.

Özeren ve arkadaşları, 2014'te tavuk embriyoları üzerine yaptığı çalışmalarda; analjezik, antipiretik ve antienflamatuar etkilere sahip fenilalkanoik asit türevi bir nonsteroidal antienflamatuar ilaç olan Flurbiprofen'in normal terapötik dozlarda bile NTD yaptığını, hatta anensefaliye neden olduğunu göstermişlerdir (44). Flurbiprofen'in de analjezik etkisini siklooksijenaz enzimini bloke ederek prostaglandin sentezini inhibe etmesiyle gösterdiği düşünülürse; bizim çalışmamızdaki tenoksikamın etki mekanizmasıyla paralellik gösterdiğini ve benzer sonuçlar elde edildiğini görmüş oluruz.

Bir başka çalışmada, Çetinkal ve arkadaşları, 2010 yılında Meloksikam'ın yüksek dozlarda erken dönem tavuk embriyosunda nöral tüp defekti insidansını arttırdığını ve embriyolojik gelişimi yavaşlattığını gözlemlemiştir. Ancak düşük dozlarda kullanımı ile ilgili net bir sonuç belirtilmemiştir (45). Meloksikam da özellikle ağrı semptomlarını azaltmak için kullanılan bir non-steroidal antienflamatuar ilaç etken maddesidir ve yapısal olarak tenoksikamla çok benzeşmektedir. Bir COX inhibitörü olan Meloksikam, PG sentezini inhibe etmesiyle bizim tezimizdeki NTD mekanizmasını desteklemektedir.

Güvenç ve arkadaşları, 2016 yılındaki çalışmalarında, toplumda çok sık kullanılan ve novalgin olarak bilinen metamizol sodyum etken maddesini tavuk embriyolarına verdiler. Analjezik ve antipiretik etkisi olan, etkisini yine prostoglandin biyosentezini bloke ederek gösteren metamizol sodyum'un özellikle yüksek dozlarda nöral tüp kapanma kusuruna ve gelişim geriliğine neden olduğunu

gösterdiler (46). Çalışmamızda kullandığımız ilaç ile benzer enzim blokajı ve yapısal sentez inhibisyonu oluşturan metamizol sodyum çalışması da tezimizi destekler niteliktedir.

Canan ve arkadaşlarının 2008 yılında yaptığı çalışma gebe ratlar üzerinde non steroidal antiinflamatuar ilaçların toksik etkilerini ortaya koymuştu. Yine diklofenak sodyum kullanılarak yapılan çalışmada embriyo ratların periferik sinir sisteminin gelişiminin olumsuz yönde etkilendiğini gözlemlediler (48). Her ne kadar santral sinir sistemi merkezli bir çalışma olmasa da PG sentezini bloke eden bir ilaç olarak teratojen etkisinin nöronal hücreleri etkileyerek göstermesi dolaylı da olsa tezimize katkıda bulunmaktadır.

2002 yılında, Chan ve arkadaşları rat embriyolarına verdikleri diklofenak sodyum ile embriyotoksititeyi net bir şekilde vurguladılar. Diklofenak verilen rat embriyolarında fizyolojik PG sentez yolunun inhibe olmasıyla artan 8-isoprostaglandin F2 alpha'nın serbest oksijen radikali hasarı oluşturduğu ve bu sebeple patolojik embriyolar geliştiğini belirttiler (49). Nöral tüp gelişimiyle ilgili net bir vurgu yapılmasa da gebelikte NSAİİ kullanımı neticesinde oluşan oksidatif stres'in, embriyo gelişimine olan olumsuz etkisinin anlatılması açısından önemli bir çalışma olduğu açıktır.

NSAİİ'lerin, blokaj mekanizması sırasında meydana getirdiği oksidatif stresin de embriyo gelişimine olumsuz etkisi tartışmalıdır. Ancak; Şimşek ve arkadaşlarının 2012 de erken dönem tavuk embriyolarında yaptığı çalışmada dizel egzos parçacıklarının hücresel düzeyde oksidatif stresi artırarak nöral tüp kapanmasını engellediğini göstermişlerdir (50). 104 embriyonun 16 adedinde nöral tüp defekti saptanan çalışma; oksidatif stres ile nöral tüp defekti gelişmesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bağ bulunduğunu ortaya koymuştur.

Arsenik plasentayı geçer ve nöroepitelde birikerek nöral tüp defektine yol açar. Kolin ise metil grup metabolizmasında metil donorü olarak görev alır. Arsenik metilasyonu bir detoksifikasyon işlemidir. Song ve arkadaşlarının 2012 de yaptığı civciv embriyolu çalışmada sodyum arsenik verilen embriyolara aynı anda düşük doz kolin (25 mikrogr/mikrolt) verildiğinde arseniğin nöral tüp defekti oluşturma etkisini

önlediğini göstermiştir (51). Arsenikin farelerle yapılan çalışmalarda nöroepitele girerek özellikle nöral yarığın apikal kısımlarında nekroz yaptığı ve böylece nöral tüp defektine neden olduğu belirtilmiştir (52). Tezimizden farklı olarak nöroepitelde ve kontraktil yapılarda morfolojik yapı bozukluğuna yol açarak nöral tüp defekti yapmaktadır.

Yine tezimizden farklı ancak, nörotoksik bir ajanın embriyotoksitite oluşturmadığı iddia edilen ilginç bir çalışmayı Eser ve arkadaşları 2007 yılında yapmıştır. Botulinium nörotoksini hücre membranındaki reseptöre SV2 proteinleri aracılığıyla bağlanmaktadır. SV2 protein eksikliğinde presinaptik geçiş azalacağından toksik etki gösterme gücü azalacaktır (53). Bu çalışmada; erken tavuk embriyolarında potent bir nörotoksin olan, Botulinium toksinin etkisi araştırılmış, evre 8'deki toplam 40 civciv embriyosu çalışılmış ve dört gruba (n=10) ayrılmıştır. Kontrol grubu dışındaki 30 embriyoya artan dozlarda Botulinium toksini verilmiş ve sonuçta; nörülasyon aşamasında orta hat kapanma defekti oluşturmadığı gözlenmiştir (54). Bu çalışmada, bir nörotoksin olan Botulinium toksininin SV2 proteini aracılığıyla reseptöre bağlanmasına rağmen nöral tüp defektine yol açmadığı bulunmuştur.

Bir diğer çalışma, 2018'de yayınlanan Ertekin ve arkadaşlarının çalışmasıdır. Diklofenak Sodyum'un tavuk embriyoları üzerindeki etkilerini araştırmayı hedefleyen çalışma neticesinde; diklofenak sodyum etken maddesinin doz bağımlı olarak tavuk embriyolarında teratojen etkisinin bulunduğunu saptadılar. Özellikle yüksek doz diklofenak verilen embriyolarda, düşük dozdakilere ve kontrol grubuna oranla somit sayısında azalma, gelişim geriliği ve nöral tüp kapanma kusurları gözlemlediler (47). Piyasa ismi voltaren olan bu asetik astit türevi NSAİİ de COX enzimini inhibe ederek antiinflamatuar ve antiromatizmal etki gösterir. PG sentezini engelleyen bu ilaçla ilgili çalışmada elde edilen sonuçlar bizim çalışmamızla örtüşmektedir.

Benzer olarak yapılmış çalışmalar da göz önünde bulunduğunda etkisini -çok net bilinmese de- daha çok COX enzim inhibisyonu yapıp PG sentezini bloke ederek gösteren tenoksikamın nöral tüp gelişimi üzerinde nasıl rol oynadığı şu anki şartlarda bir soru işaretidir. İlerleyen zamanlarda yapılacak daha ayrıntılı çalışmalarla bu mekanizmaların da ortaya çıkarılacağını amaçlamaktayız.

Sonuç olarak; COX enzimini inhibe ederek **düz kas tonusundan santral sinir sistemine kadar birçok temel fizyopatalojik olaylarda rol alan ve vücutta tüm doku ve sıvılarda yaygın olarak bulunan PG'nin üretimini bloke ettiği** düşünülen tenoksikamın doz bağımlı olarak erken dönem tavuk embriyolarında orta hat kapanma defektine yol açtığını tespit ettik. Özellikle gebeliğin erken dönemlerinde olan hastalarda bu ilacın etkisi göz önünde tutulmalı ve farklı tedavi yöntemleri araştırılmalıdır.

ÖZET

Giriş ve Amaç: Nöral tüp adı verilen yapı beyin dokusundan başlayıp, boylu boyunca omuriliği de içine alacak şekilde aşağı doğru uzanan bir yapıdır. Gelişimin her hangi bir nedenle (genetik veya çevresel) sorunlu olması, tüpün herhangi bir bölgesinin açık kalmasına neden olur ki bu duruma Nöral Tüp Defekti adı verilir. Nöral tüp defekti yaklaşık olarak 6/10000 gebelikte görülür. En sık görülen nöral tüp defekti anensefali ve spina bifidadır. Yenidoğanlarda %3–5 oranında doğum defektine rastlanmaktadır ve nöral tüp defektleri (NTD) doğum defektine bağlı yenidoğan ölümlerinin %7'sini oluşturmaktadır.

Tenoksikam (TEN), oksikam grubundan tienotiazin türevi non-steroid antiinflamatuar ve analjezik bir ilaçtır. TEN'in siklooksijenazı inhibe ederek prostaglandin sentezini baskılaması yanında, inflamasyon gelişimindeki rolleri son yıllarda daha iyi anlaşılmasına rağmen diğer NSAİ ilaçların aksine gebelikteki teratojenik etkisi net olarak bilinmemektedir.

Biz bu çalışmada sık kullanılan antiinflamatuar ve analjezik ilaç olan tenoksikamın civciv embriyolarında orta hat kapanmasına etkisi ve NTD oluşturma mekanizmasını incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp FakültesiNöroşirürji Anabilim Dalı Nöroembriyoloji Laboratuarı'nda gerçekleştirildi. 160 fertil yumurta, 24 saatlik inkübasyon sonrası pencereleme yöntemi ile açıldı.

Tenoksikam, 20 µL volümde subblastodermik olarak uygulanarak dört grup oluşturuldu. Bu dört gruba artan TEN dozları (0,01mikgr, 0,02mikgr, 0,10 mikgr) ve kontrol grubuna (%0,9 SF) enjekte edildi. Yumurtalar steril drape ile kapatıldıktan sonra 24 saat daha inkübe edildi. Tüm yumurtalar 48. saate açılarak, embriyolar morfolojik ve histopatolojik olarak değerlendirildi.

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

bulgular eşliğinde tenoksikam kullanımının, artan konsantrasyonlarda erken tavuk embriyolarında orta hat kapanma kusurlarına yol açtığı anlaşıldı.

Tartışma: Sık kullanılan antiinflamatuar ve analjezik bir ilaç olan, etkisini daha çok prostoglandin sentezini bloke ederek gösteren tenoksikam, doz bağımlı olarak embriyolarda orta hat kapanma kusurlarına neden olmaktadır. Yapılacak daha ileri çalışmalarla, embriyonik hasarlanmanın mekanizması ile genetik ve çevresel etmenlere bağlı teratojen etkiler arasındaki mekanizmaları ortaya koymak ve konjenital defektlerin oluşumunu en aza indirmek mümkün olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Tenoksikam, Siklooksijenaz, Prostoglandin, Nöral tüp defekti, Tavuk embriyosu

ABSTRACT

Introduction and Purpose: The structure called a neural tube is a structure that starts in the brain tissue and extends downward incorporating the spinal cord. Whenever there is a problem in development caused by any reasons (genetic or environmental) and any part of the tube remains open, this condition is called the Neural Tube Defect. NTD occurs in approximately 6/10000 pregnancies. The most common neural tube defects are anencephaly and spina bifida. Neural tube defects (NTD) constitute 3-5% of overall defects in new-borns and cause 7% of neonatal deaths due to birth defects.

Tenoxicam (TEN) is a tienotiazin derivative non-steroidal anti-inflammatory and analgesic drug of oxicam group. Besides suppressing prostaglandin synthesis by inhibiting cyclooxygenase, although the role of TEN in inflammation development is better understood in recent years, the teratogenic effect on pregnancy against other NSAI drugs has not been clearly investigated.

In this study, our aim was to investigate the effects of tenoxicam, a common anti-inflammatory and analgesic drug, on the midline fusion in chick embryos and the mechanism of NTD formation.

Materials and Methods: This study was carried out in Ankara University, Faculty of Medicine, Department of Neurosurgery, the Laboratory of Neuro Embryology. 160 fertile eggs were opened using windowing method after 24 hours of incubation.

Tenoxicam was administered subblastodermically at a volume of 20 μL and four groups were established. Increased TEN doses (0.01 mcg, 0.02 mcg, 0.10 mcg) were injected into these four groups and the control group (0.9% SF). After the eggs were closed with sterile drape, they were incubated for another 24 hours. All eggs were opened on the 48th hour and embryos were evaluated morphologically and histopathologically.

Results: As a result of the study, it was concluded that there was a correlation between tenoxicam dose and effect on embryos. These findings show that the use of increased concentration of tenoxicam caused midline fusion defects in early chicken embryos.

Discussion: Tenoxicam, which is commonly used as an anti-inflammatory and analgesic drug, has the effect of blocking prostaglandin synthesis, causing dose-dependent midline fusion defects in embryos. With further studies, it will be possible to demonstrate the mechanisms of embryonic damage and the mechanisms between teratogenic effects related to genetic and environmental factors to minimize the occurrence of congenital defects.

Keywords: Tenoxicam, Cyclooxygenase, Prostoglandin, Neural Tube Defect, Chicken embryo

6. KAYNAKLAR

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

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

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

4. König, W., Brom, J,, Schönfeld, W., Knöller, J., Stüning, M.: Effect of tenoxJcam an d indometaci n on th e releas e of histamine, prostag - landi n E2, an d leukotriens from various cells. Drug s Res., 37: 296-299, 1987.

5. Laurence, D.R., Bennett. P.N.: Clinical pharmacology. 7th ed., Long - m a n Singapor e Publishers (Ptc) Ltd.. Singapore, p. 213-221, 1992.

6. Gonzales J.P., Todd P.A., Tenoxicam: A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficiacy, Drugs 34. (3) 289 (1987)

7. GEBELİK VE NÖRAL TÜP DEFEKTLERİ Emine COŞAR, Gülengül KÖKEN, Reşit KÖKEN, Figen Kır ŞAHİN, Evren YEŞİLDAĞER, Dağıstan

T. ARIÖZ, Hamide MELEK, Mehmet YILMAZER; Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi, (TJOD Derg), 2009; Cilt: 6 Say›: 3 Sayfa: 193- 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

34. www.scielo.br/img/fbpe/acb/v17n2/a07fig03.gif, 02.05.2007

35. Binder D, Hromatka O, Geissler F, Schmied K, Noe CR, Burri K, Pfister R, Strub K,Zeller P. Analogues and derivatives of tenoxicam. 1. Synthesis and antiinflammatory activity of analogues with different residues on the ring nitrogen and the amide nitrogen.J Med Chem. 1987 Apr;30 (4): 678–82

36. The Merck index, 11th Edition, Merck and Co. Inc., Rahway, 1989

37. Bernhard E, Zimmermann F. Contribution to the understanding of oxicam ionization constants. Arzneimittelforschung. 1984; 34 (6): 647–8

38. Kayaalp S.O. Rasyonel tedavi yönünden Tıbbi farmakoloji Ankara: Feryal matbaası 1998

39. Gonzales J.P., Todd P.A., Tenoxicam perliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficiacy, Drugs34.289 (1987)

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

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

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

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

44. Ozeren E, Er U, Guvenc Y, Demirci A, Arıkök AT, Şenveli E, Ergün RB (2015) The effect of flurbiprofen on the development of anencephaly in early stage chicken embryos. Br J Neurosurg 29:265-271.

45. Cetinkal A, Colak A, Topuz K, Demircan MN, Simsek H, Berber U, Umur AS, Selcuki M, Vatansever HS (2010) The effects of meloxicam on neural tube development in the early stage of chick embryos. Turk Neurosurg 20:111-116.

46. Guvenc Y,.Billur D, Aydin S, Ozeren E, Demirci A, Alagoz F, Dalgic A, Belen D (2016) Metamizole sodium induces neural tube defects in a chick embryo model. Turk Neurosurg 26:445-448

47. Ertekin T, Bilir A, Aslan E, Koca B, Turamanlar O, Ertekin A, Albay S. The effect of diclofenac sodium on neural tube development in the early stage of chick embryos. Folia Morphol (Warsz). 2018 Sep 4. doi: 10.5603/FM.a2018.0080.

48. Canan S, Aktas A, Ulkay MB, Colakoglu S, et al. Prenatal exposure to a nonsteroidal anti-inflammatory drug or saline solution impairs sciatic nerve morphology: a stereological and histological study. Int J Devl Neuroscience. 2008; 26 (7): 733–738, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2008.07.005

49. Chan LY, Chiu PY, Siu NS et al. Diclofenac-induced embryotoxicity is associated with increased embryonic 8-isoprostaglandin F2 alpha level in rat whole embryoculture. Reprod Toxicol. 2002; 16 (6): 841-844

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

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

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

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

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

55. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yonunden Tıbbi Farmakoloji.Pelikan Yayıncılık, Ankara. 2012

56. Duman M, Kalyoncu Nİ. Gebelikte ilac secimi ve teratojenite bilgi servisleri. Turkiye Klinikleri J Surg Med Sci 2006; 2: 62- 8.

57. Nagi AH. Placenta examination and pathology. Biomedica 2011; 27: 81-9.

58. Conley JM, Richards SM. Teratogenesis. In: Ecotoxicology. Editors: S. Jorgensen, Academic Press. San Diego. 2008, pp. 3528.

59. Samavi MS, McKenna F. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. In: Clinical Immunology. Editors: Robert R. Rich, Thomas A. Fleisher, William T. Shearer, Harry W. Schroeder, Jr., Anthony J. Frew, Cornelia M. Weyand, Elsevier. Stanford. 2008, pp. 1307-316.

60. Gokcimen A, Malas MA. Nonsteroidal anti-inflamatuvar ilacların gebelikteki toksisiteleri ile ilgili literaturlerin gözden gecirilmesi. SDU Tıp Fakultesi Derg 2003; 10: 50-2.

61. Meek IL, Mart AF, Vonkeman HE. Non-steroidal antiinflammatory drugs: an overview of cardiovascular risks. Pharmaceuticals 2010; 3: 2146-62.

62. Akıncı Tan A. Antiinflamatuvar ilacların akılcı kullanımı. Dahili Tıp Bilimleri Dergisi 2005; 12: 38-46.