

## DENEY NO: 11

### KİMYASAL BİLEŞİKLERİN TERATOJENİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİNDE DÖLLENMİŞ TAVUK EMBRİYOSUNUN KULLANILMASI

#### A) Genel Bilgi:

**Teratojenezis**, gereğinden fazla veya eksik, yeri değişmiş organlara sahip ve fena halde biçimsizleşmiş anormal yavruların dünyaya gelmesi olarak tanımlanabilir. Bazı ksenobiyotikler, hamile kadınlar tarafından alındıklarında plasentadan geçerek fetusta malformasyonlara neden olurlar. Teratojenezise neden olan etkenlere (kimyasal maddeler, mikroorganizmalar ve fiziksel etkenler) **teratojen** adı verilir.

► Dış etkenlerin, malformasyonlara (konjenital defekt: Doğumdan önce ve sonra görülen her türlü morfolojik, biyokimyasal ve fonksiyonel anormallikler) neden olabileceği gerçeği, ilk kez 1929'da, X-ışınlarına maruz kalan hamile kadınların mikrosefali çocukları olduğunun gözlenmesiyle ortaya konmuştur.

► 1941'de, Almanya'da kızamıkçık virüsünün, fetusun ölmesine veya kör ve sağır bebeklerin doğmasına neden olduğu gösterilmiştir.

► 1961'de ise, hamilelik döneminde talidomit kullanmış annelerden doğan en az 10.000 bebeğin malformasyonlu olduğu bildirilmiştir. "Talidomit faciası" olarak isimlendirilen bu olay, konjenital malformasyonların etkenleri üzerinde dikkatle durulmasını sağlamıştır.

#### Teratojenik Risklerine göre İlaçların Sınıflandırılması:

**A Kategorisi:** Kadınlarda yapılan kontrollü incelemelere göre, hamileliğin ilk trimestrinde ilacın zararlı olduğu hakkında kanıt yoktur; daha sonraki trimestrlerde de zararlı olduğu hakkında kanıt bulunmamaktadır. Bunlar, hamilelerde en güvenilir ilaçlardır.

**B Kategorisi:** Bu ilaçlar, aşağıdaki iki durumdan birine uyar:

a) Deneysel hayvanlardaki incelemeler, ilacın fetotoksik etkisi olmadığını göstermiştir; ancak, ilaç hakkında hamile kadınlarda yapılmış kontrollü incelemeler yoktur.

b) Deneysel hayvanlarda yapılan incelemeler, ilacın fertilité azalması dışında fetotoksik etkisi olduğunu da göstermiştir; ancak, hamile kadınlarda ilk trimesterde yapılan kontrollü incelemeler, fetotoksik etkiyi doğrulamamıştır ve daha sonraki trimestrlerde ilacın zararlı olduğuna ilişkin kanıt yoktur.

Böyle bir ilaç, gerekiyorsa hamilelerde kullanılabilir.

**C Kategorisi:** Bu ilaçlar, aşağıdaki durumlardan birine uyar:

a) Deneysel hayvanlarda yapılan incelemeler, ilacın teratojenik ve embriyöletal etkisinin olduğunu göstermiştir; ancak, hamile kadınlarda yapılmış olan kontrollü incelemeler bulunmamaktadır.

b) Hamile kadınlarda veya hayvanlarda ilaç incelenmemiştir. Hekim, yarar-zarar ilişkisini dikkate alarak ilacı hastasına verebilir.

**D Kategorisi:** İlacın insanda fetus üzerindeki zararlı etkisi kanıtlanmıştır; ancak, hamile kadında kullanılmasının yararının, fetusa zararına göre daha fazla olması söz konusudur. Hamile kadında, yaşamı tehdit eden bir durumun tedavisi gerekli olduğundan veya ciddi bir hastalık halinde daha güvenilir ilaçlar kullanılamıyorsa ya da etkisiz kalmış olduğundan D kategorisindeki ilaç kullanılır. Bu kategorideki ilacın prospektusuna fetotoksik etkisini belirten uygun bir uyarı mutlaka konulmalıdır.

**X Kategorisi:** Bu ilaçlar, aşağıdaki durumlardan birine uyar:

a) Hayvanlarda ve hamile kadınlardaki incelemeler, ilacın fetotoksik olduğunu göstermiştir ve insanlar üzerindeki deneyimlere göre fetusa zararlı olduğunu gösteren kanıtlar vardır.

b) Hamile kadında kullanılmasının yararı, fetusa olan zararı yanında önemsiz kalır. Böyle bir ilaç, hamile kadında veya hamile kalma olasılığı bulunanlarda kontrendikedir. Bu kontrendikasyon, ilacın prospektusuna açıkça yazılmalıdır.

**Tablo 1. Teratojenik risklerine göre sınıflandırılan ilaçlara bazı örnekler:**

A- Kategorisi	B- Kategorisi	C- Kategorisi	D- Kategorisi	X- Kategorisi	
<b>Elektrolitler</b> Potasyum klorür Potasyum sitrat Potasyum glukonat	<b>Antihistaminikler</b> Klorfeniramin Simetidin Meklizin Ranitidin	<b>Antihistaminikler</b> Antazolin Deksbromfeniramin Trimeprazin	<b>Antibakteriyel Aminoglikozitler</b> Streptomisin Kanamisin Tobramisin	<b>Hormonlar</b> Östradiol Etil östradiol Östrojen türevi Oral kontraseptif	
<b>Antiemetikler</b> Proklorperazin	<b>Antihelmintik</b> Piperazin	<b>Antihelmintik</b> Pirental pomat	<b>Plasmosidler</b> Kinin	<b>Aşılar</b> Rubella aşısı	
<b>Hipotiroid için</b> Tiroid, Levotiroksin	<b>Sefalosporinler</b> Sefaklor, Sefosidin, Sefradin	<b>Aminoglikozitler</b> Amikasin, Neomisin, Gentamisin	<b>Tetrasiklinler</b> Klortetrasiklin, Doksisiklin, Metasiklin	<b>Diagnostikler</b> Sodyum iyodür	
<b>Vitaminler</b> Folik asit, Ergokalsiferol Niasinamid Pantotenik asit Piridoksin, Riboflavin Tiamin, Vitamin A Vitamin C, Vitamin D Vitamin E, Vitamin B <sub>12</sub> Multivitaminler	<b>Antifungal</b> Mikonazol	<b>Antifungal</b> Griseofulvin	<b>Üriner antiseptik</b> Metilen mavisi	<b>Antineoplastikler</b> Aminopterin	
	<b>Penisiliner</b> Amoksilin, Oksasilin Penisilin G	<b>Sefalosporinler</b> Moksalaklam	<b>Sempatomimetikler</b> Metaraminol Methoksamin	<b>Vitaminler</b> Vitamin A	
	<b>Antienfeksiyöz etkili diğer ilaçlar</b> Klindamisin, Eritromisin, Linkomisin	<b>Antienfeksiyöz etkili diğer ilaçlar</b> Kloramfenikol, Oleandomisin, Trimethoprim	<b>Antineoplastikler</b> Azotiyopürin, Bleomisin, Sisplatin Metotreksat, Vinblastin, Vinkristin	<b>Plasmosidler</b> Kinin	
	<b>Antitüberküloz</b> Ethambutol	<b>Antitüberküloz</b> İzoniazid	<b>Antihipertansifler</b> Rezerpin		
	<b>Sülfonamidler</b> Metronidazol	<b>Antiviral</b> Amantadin	<b>Analjezikler</b> Aspirin, Propoksifen		
	<b>Üriner antiseptikler</b> Nalidiksik asit Nitrofurantion	<b>Parasempatolitikler</b> Atropin, Belladon Skopolamin	<b>Antikoagülanlar</b> Kumarin türevleri Warfarin		
	<b>Asidik bileşikler</b> Amonyum klorür	<b>Plazmisid</b> Primakin	<b>Narkotik antagonist</b> Nalorfin		
	<b>Parasempatolitikler (Antikolinergik)</b> Disiklomin	<b>Antineoplastikler</b> Daktinomisin Setril	<b>Narkotik analjezik</b> Meperidin, Eroin Kodein, Morfin, Opium		
	<b>Sempatomimetikler (Adrenerjik)</b> Fenoterol, Terbutalin	<b>Parasempatomimetikler</b> Asetilkolin, KARBAKLOR, Neostigmin, Fizostigmin	<b>Non-steroidal antiinflamatuvarlar</b> İbuprofen, Naproksen İndometazin, Oksifenbütazon		
	<b>Antidiyareik</b> Loperemid	<b>Üriner antiseptikler</b> Mandelik asit	<b>Trankilizan Etkililer</b> Lityum		
	<b>Sempatolitikler</b> Asebutol	<b>Sempatolitikler</b> Labetalol, Timolol	<b>Ağır Metaller</b> Penisilamin		
	<b>Trombolitikler</b> Ürokinaz	<b>Antikoagülan</b> Heparin	<b>Hormonlar</b> Kortizon		
	<b>Kardiyak etkililer</b> Okubain	<b>Antiheparinler</b> Protamin, Trombolitik	<b>Progesteronlar</b> Hidroksiprogesteron		
	<b>Antihipertansifler</b> Asebutolol	<b>Antihipertansifler</b> Kaptopril, Metil dopa	<b>Antidiyabetikler</b> Tolbutamid		
	<b>Analjezikler</b> Asetaminofen, Fenasetin	<b>Analjezikler</b> Aspirin, Propoksifen	<b>Antidepresifler</b> Amitriptilin, İmipramin		
	<b>Narkotik analjezik</b> Dihidrokodein, Eroin, Meperidin Morfin, Opium, Bitartarad	<b>Kardiyak bileşikler</b> Dijitalis, Nifedipin, Dijitoksin, Digoksin Kinidin, Verapamil	<b>Antikonvülanlar</b> Fenobarbital, Fenitoin, Primidon Valproik asit, Aminoglutetimid		
		<b>Narkotik antagonist</b> Naloksan	<b>Vazodilatörler</b> Amilnitrat, Nitroglicerlin	<b>Diüretikler</b> Spironolakton, Benzotiyazid	
		<b>Nonsteroidal antiinflamatuvar</b> İbuprofen Naproksen	<b>Sempatomimetikler</b> Kokain, Dopamin Efedrin, Psödoefedrin	<b>Sedatif hipnotikler</b> Dekstroamfetamin, Diazepam Meprobamat, Klordiazepoksit	
		<b>Hipotiroid için kullanılan bileşikler</b> Kalsitonin	<b>Trankilizanlar</b> Asetofenazin, Promazin Klorpromazin, Haloperidol	Antitiroid Methimazol, Karbimazol Propiltiourasil	
		<b>Antikonvülan</b> Magnezyum sülfat	<b>Stimülanlar</b> Fentemrin		
<b>Stimülanlar</b> Kafein, Dietilpropion		<b>Narkotik Analjezik ve antitüssüfler</b> Kodein			
<b>Sedatif-hipnotik</b> Amobarbital		<b>Antidiyareik</b> Difeoksalat			
<b>Antiemetikler</b> Siklizin, Meklizin		<b>Antidepresifler</b> Karbamazepin, Despramin, Klonazepam			
<b>Antidiyabetikler</b> İnsülin		<b>Sedatif hipnotikler</b> Lorazepam, Oksazepam			
<b>Hormonlar</b> Prednizolon		<b>Hormonlar</b> Deksametazon			
		<b>Diüretikler</b> Furosemid, Gliserin, İzosorbit, Mannitol			
		<b>Antidiyabetik</b> Tolbutamid			
		<b>Spazmolitikler</b> Aminofilin, Tiyofilin			
		<b>Aşılar</b> B.C.G., Hepatit B, Kolera			
		<b>Vitaminler</b> B-karoten, Folik asit, Niasinamid, Tiyamin Riboflavin, Piridoksin, Vitamin B <sub>12</sub> , Vitamin C, Vitamin D, Vitamin E, Pantotenik asit			

### Teratojenik Etkiyi Deęiřtiren Faktörler:

- Kritik periyod
- Etkenin dozu, maruziyet sıklığı ve süresi
- Tür
- Genetik faktörler
- Çevresel faktörler
- Hormonal durum
- Diyet
- Anne ile ilgili diğer durumlar

Embriyo, teratojenik etkiye en çok **farklılaşma ve organojenezis döneminde** duyarlıdır. Teratojenik etkene maruz kalma, hangi organ için kritik günse, en çok o organ deformasyona uğrar. Kimyasal teratojenizde, kimyasal madde ile teratojenik etki arasında kesin bir neden-etki ilişkisi kurulabiliyorsa, bu tip maddelere “sert teratojen” denilmektedir.

Embriyotoksik doz aralığında uygulanan madde,

- a) Deney hayvanlarının bazılarında normal fetus dünyaya gelmesi,
- b) Bazılarında embriyoletalite (embriyonun ölümü),
- c) Bazılarında malformasyonlar,
- d) Bazılarında gelişme eksikliğine neden olabilir.

Gelişme eksikliği, fetusun tartılması ve belirli organ gelişmelerinin ölçülmesi ile saptanır. Malformasyonun tipi ve sıklığı ise fetusun gözle incelenmesi, iskelet ve yumuşak doku analizi ile incelenir. Doz yükseldikçe, embriyoletalite sıklığı artar; daha düşük dozlarda ise malformasyon oranında artış gözlenir.

Canlılar, her gün sayısı giderek artan kimyasal maddelere maruz kalmaktadır; bu maddelerin teratojenik potansiyelinin belirlenmesi amacıyla, geçerliliği kabul edilmiş bir kontrol sistemine ihtiyaç vardır. Dolayısıyla da, teratojenik potansiyeli doğru, duyarlı, hızlı ve ucuz olarak kontrol eden testlerin geliştirilmesi ve kullanılması zorunlu hale gelmektedir.

Teratojenite testlerinde, kimyasal madde en az 2 hayvan türünde ve değişik gruplara en az 3 doz aralığında uygulanır. Deney hayvanı olarak sıçan ve fareler kullanıldığında, teratojenik etkisi araştırılacak kimyasal madde, hamileliğin 7-15. günleri arasında verilir. Hayvanlar, hamilelik dönemi sonunda öldürülerek anne ve fetus incelemeye tabi tutulur. Karşılaşılan birtakım güçlükler, kedi, köpek ve primatların teratojenite testlerinde kullanılmasını kısıtlamaktadır. İnsana benzer şekilde plasentaları olması sebebiyle fare, sıçan, tavşan ve primatlarla yapılan çalışmalarda, üzerinde çalışılan kimyasal madde anneye uygulanır; böylece, annede metabolizmaya uğrayan maddenin embriyo veya fetusa ulaşarak gösterdiği etki araştırılır. Fare ve sıçan gibi kemiricilerde deneysel teratojeniz çalışmalarının, ucuzluk, hamilelik döneminin kısa oluşu gibi tercih edilen özellikleri olmasına karşın, plasentalarının yapısal olarak farklılık göstermesi bir dezavantajdır. Diğer taraftan maymunlar, birçok açıdan insana en yakın türler olarak uygun deney hayvanlarıdır.

Ksenobiyotiklerin sayıları, oldukça pahalı olan teratojeniz testlerinin kapasitesini aşmaktadır; bu nedenle, tavuk embriyosu, hücre ve doku kültüründen yararlanılan *in vitro* yöntemler de kullanılmaktadır. Tavuk embriyosu yöntemi, kimyasal bileşiklerin maternal ve plasental metabolik etkiler dikkate alınmadan, embriyo üzerine direkt etkisini kontrol etmede hızlı ve ucuz bir yoldur. Kemiricilerle elde edilen sonuçlar, tavuk embriyosuyla elde edilene uyum göstermektedir; bu iki grupta da yumurta kesesinin var oluşu, bazı kimyasal maddelerin (örneğin tripan mavisi) kemirici ve civcivde teratojenik etki göstermesine karşılık, primatlarda daha az etkin olmasını açıklayıcı niteliktedir.

## **Deneysel Teratojenoziste Önemli Faktörler**

Teratojenoziste test yöntemlerinin uygulanmasında aşağıdaki faktörlerin dikkate alınması önerilmektedir:

- 1) Deneysel hayvanının türü
- 2) Yavru sayısı
- 3) Uygulama yolu, dozu, uygulama sıklığı
- 4) Uygulama dönemleri
- 5) Belirli bir süre sonra yapılan sezaryandan sonra fetusların incelenmesi
  - a) Malformasyon oranı, b)Gelişimdeki gecikmeler, c)Rezorpsiyon oranı
- 6) Normal doğumdan sonra fetusların incelenmesi
  - a) Büyüme, b)Davranış, c)Biyokimyasal ve fizyolojik gelişim
- 7) Fetus ve anneye ait ilaç metabolizması,
- 8) Plasental geçiş,
- 9) Etki mekanizmasının tayini,
- 10) Kontrol grubu.

**Deneysel hayvanının türü:** Teratojen maddelere karşı, teratojenik etki yönünden, türlerde eşit duyarlılık bulunmamaktadır. Deneysel teratojenoziste kullanılacak türler şu şekilde sınıflandırılabilir:

- 1) **Memeliler:** fare, sıçan, kobay, tavşan, kedi, köpek, domuz vb
- 2) **Memeli olmayanlar:** tavuk embriyosu, sirke sineği, çekirge, karides, hidra vb

**Ksenobiyotiğin Dozu:** Doz, embriyoletaliteye neden olan doz ile hiçbir etki gözlenmeyen doz aralığında olmalıdır.

**Veriliş Yolu:** Bileşiğin, deneysel hayvanına veriliş yolu, testin sonucunu etkiler. Bu nedenle, ksenobiyotiklere maruziyet yolları dikkate alınarak, veriliş yolunun buna göre seçilmesi gerekir.

**Dozun veriliş zamanı:** Bileşiğin teratojenik etkiyi indüklemesi için organojenezis aşamasında verilmesi gereklidir. Organojenezisin kritik periyodu, türlere göre değişir.

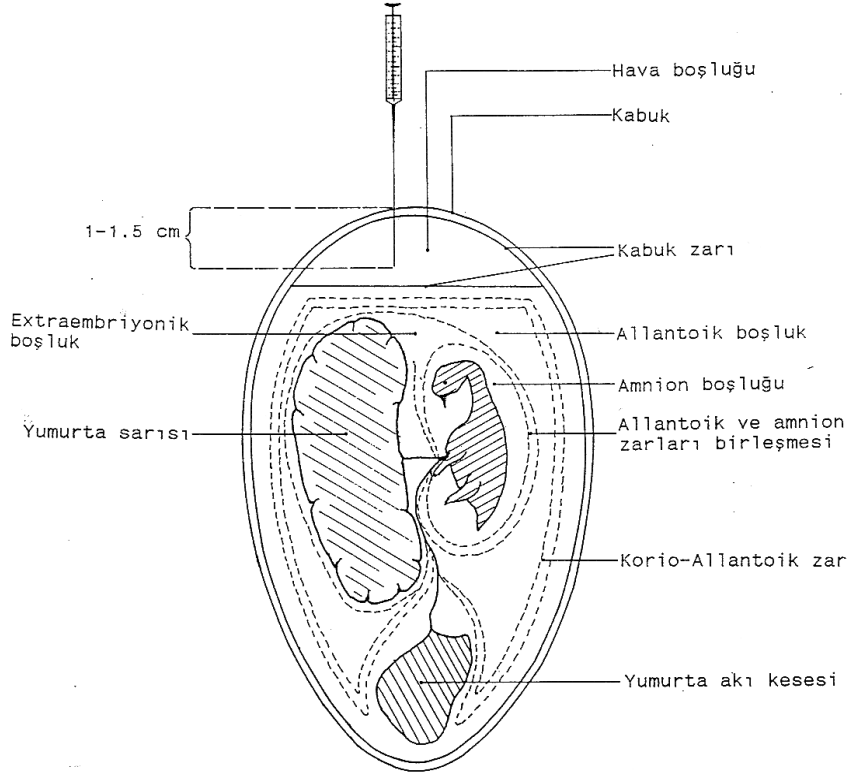
### **Tavuk Embriyosu Testi'nin Avantajları:**

- 1) Çok sayıda tavuk embriyosu kullanılabilmesi, toksisitenin istatistiksel değerlendirilmesinde önemlidir.
- 2) Ekonomik ve hızlı bir yöntemdir.
- 3) Tavuk embriyosunun gelişim safhaları çok iyi incelenmiştir.
- 4) Tavuk embriyosu, Talidomit'e hassastır; insanlardaki bulgularla benzerlik göstermektedir.
- 5) Enjeksiyon tekniği değiştirilerek, yapay olarak in vitro sistemde oluşturulabilmektedir.
- 6) Selektif bir yöntemdir ve genellikle, gelişme süresince değişik kimyasal maddelere verdiği cevap farklıdır. **Bu nedenle, tavuk embriyosu testi, daha kritik teratojenoziste çalışmalarının yapılıp yapılmayacağını belirlemek için çok sayıda kimyasal bileşiğin teratojenik potansiyel açısından taranmasında yararlı bir sistemdir.**
- 7) Yüksek omurgalıların embriyoları arasında, tavuk embriyoları deneysel amaçlar için en kolay bulunanıdır.

### **Tavuk Embriyosu Testi'nin Dezavantajları:**

- 1) Tavuk embriyosu plasentasız olması nedeniyle, hamile olan memeli-döllenen yapı arasındaki anatomik ve fizyolojik ilişki açısından bir paralellik göstermez.
- 2) Oldukça fazla sayıda bileşiğe non-spesifik hassasiyet gösterirler; hatalı pozitif sonuç alınmasına neden olabilirler.
- 3) Enjekte edilen maddeler konusunda, kuş yumurtalarının doğası gereği farmakokinetik farklılıklar bulunmaktadır.

### Hava boşluğuna enjeksiyon tekniği



Tavuk yumurtasına enjeksiyon iki yöntemle yapılabilir:

1) **İnkübasyondan önce hava kesesi veya yumurta kesesine enjeksiyon yöntemi:** Bu yöntem yardımıyla, Talidomit, çeşitli gıda katkı maddeleri ve pestisitlerin teratojenik etkisi araştırılmıştır.

2) **Bileşiğin inkübasyon sırasında embriyoya verilmesi:** Bu yöntemde, teratojenik etkisi incelenecek olan bileşik, ortamda 48 saat veya 72-74 saat inkübasyona bırakılmış embriyolara, yumurta kesesi, hava kesesi ya da amniyon kesesi içine enjeksiyon yoluyla verilebilir.

Tavuk embriyosunda ilaçların teratojenik etkilerini araştırmak için **optimum enjeksiyon zamanı**, gelişimin 3. ve 4. günleridir. Enjeksiyondan sonra, inkübasyonun 14., 15. ve 17. günlerinde yumurtalar açılarak incelenir. Bileşiklerin teratojenik potansiyeli, erken ölümlere, malformasyon görülen ve görülmeyen geç ölümlere ve malformasyonlu olarak doğup yaşayanlara göre değerlendirilir.

**B) Deneyin amacı;** organojenezin aktif fazında (gelişimin 2. ve 4. günleri arası) tavuk embriyosuna değişik doz aralıklarında organik fosforlu bir pestisit olan Diazinon uygulanması sonucu, gelişimde gecikme, malformasyon ve ölüm gibi embriyotoksik etkilerin gözlenmesidir.

**Deneyde Gerekli Alet, Malzeme ve Çözeltiler:**

Döllenmiş tavuk yumurtası (40 adet)	Petri kutusu
Metanol	Makas
Diazinon çözeltisi	Pens
Enjektör	Cetvel
Toplu iğne	Terazi
Flaster	Etüv (37.5-38 °C, %80 nem)
Işık kaynağı	Süzgeç kağıdı

**Deneyin Yapılışı:**

- 1) Hava kesesine enjeksiyon tekniği uygulanacağı için, ışık kaynağından yararlanılarak her bir yumurtanın hava kesesi, titizlikle işaretlenir. Bu bölgeye, iğne ile delik açılır.
- 3) Yumurtalar, kontrol grubu ve metanol verilecek grupta 4'er, diğer gruplarda 8'er yumurta olacak şekilde, 5 gruba ayrılır. 1. gruba hiçbir uygulama yapılmaz, 2. gruba ise Diazinon çözeltisinin hazırlanmasında çözücü olarak kullanılan metanol verilir. (3-5) arasındaki gruplara Diazinon'un farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış çözeltileri, yumurtalara çok yavaş olarak, 50µL hacimde enjekte edilir.

<b><u>Grup</u></b>	<b><u>Yumurta adedi (n)</u></b>	<b><u>Enjekte edilecek çözelti</u></b>
1 (Kontrol)	4	-
2	4	Metanol
3	8	100 µg/mL Diazinon çözeltisi
4	8	200 µg/mL Diazinon çözeltisi
5	8	400 µg/mL Diazinon çözeltisi

- 4) Yumurtalar, 37.5-38°C, %80 nem ortamı sağlanan bir etüvde gelişimin 16-17. gününe kadar (enjeksiyondan itibaren 14-15 gün) inkübe edilirler.
- 5) Yumurtalar, her gün sivri uçları eksen kabul edilerek dikey doğrultuda çevrilir.
- 6)İnkübasyon süresinin sonunda, yumurtalar uzun eksenleri boyunca makas ile dikkatlice kesilir ve embriyo, yavaşça petri kutusuna boşaltılır.
- 7) Embriyoların canlı ya da ölü olup olmadığı, ağırlıkları ve uzunlukları saptanır.
- 8)Canlı embriyolarda malformasyonlar incelenir. Gözlenebilecek değişiklikler arasında tüylenmede bozukluklar, amniyotik kesede malformasyonlar, kafa yapısı malformasyonları ve gros gelişim geriliği yer almaktadır.