

DİFENİLHİDANTOİN'İN CİVCİV EMBRYOLARI ÜZERİNDE TERATOJENİK ETKİSİ

THE TERATOGENICITY OF DIPHENYLHYDANTOIN IN CHICK EMBRYOS

Dr.Abdullah EKMEKÇİ, Ferda ALPARSLAN, Hilal İMANCI, Buket ÜÇER

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye
Gazi Tıp Dergisi 3 : 53-56, 1992

ÖZET : Bu çalışmada antiepileptik ilaç difenilhidantoin 5, 25, 125 ve 250 µg dozlarında civciv embriolarına enjekte edildi ve teratojenik etkisi incelendi. Uygulamanın 19. gününde açılan embrioların vücut ağırlıklarında azalma ve çeşitli malformasyonlar görüldü.

Anahtar Kelimeler : Difenilhidantoin, Civciv Embrioları, Teratojenik Etki.

SUMMARY : In this study, an antiepileptic agent, diphenylhydantoin, was injected into chick embryos in the doses of 5, 25, 125, and 250 µg and its teratogenicity was determined. The embryos, which were sacrificed on the 19th day of incubation showed a generalized decrease in body weight together with a wide range of malformations.

Key Words : Diphenylhydantoin, Chick Embryos, Teratogenic Effect.

GİRİŞ

Difenilhidantoin (DPH, fenitoin, dilantin), 1938 yılından bu yana grand mal epilepsi tedavisinde kullanılmaktadır. Bu ilacı kullanan epileptik annelerin çocuklarında beklenenden daha fazla konjenital anomali görülmesi, gebelik öncesi ya da gebelik sırasında DPH'in veya metabolitlerinin fetus üzerinde teratojenik etki potansiyeli taşıdığını ortaya koymuştur (Speidel ve Meadow, 1972). Çocuklarda "fetal hidantoin sendromu" olarak da tanımlanan malformasyonlar, kranofasiyal anomaliler, kalp, iskelet ve göz anomalileri, turnak ve dijital hipoplazi, gelişimle ilgili ve mental gerilikler ile karakterize edilmektedir (Hanson ve ark. 1976; Meadow, 1968).

DPH'in teratojenik etkisi, pek çok hayvan embryo modelinde gösterilmiş ve bazı mekanizmalar

önerilmiştir (Lum ve Wells, 1986; Mirkin, 1971). Bu çalışma, anne etkisinin olmadığı bir deneysel model olarak civciv embriolarında DPH'in teratojenik etkisini belirlemek amacıyla yürütülmüştür.

MATERYAL METOD

Deneyde, Etlik Veteriner Araştırma Enstitüsü'nden sağlanan yeni döllenmiş beyaz legorn tavuk yumurtaları kullanıldı. Temiz, kırık ve çatlağı olmayan döllenmiş yumurtalar ışıklandırılarak seçildi.

Stok test bileşiği olarak 25 mg DPH (Sigma) 1.5 ml % 99'luk etil alkol içinde çözüldü. Her biri 0.025 ml çözeltide 5, 25, 125 ve 250 µg DPH olacak şekilde distile su ile seyreltme yapıldı. Kontrol ve her bir doz grubu için 25'er döllenmiş yumurta kullanıldı.

Kontrol grubuna 0.025 ml volümde, en yüksek

uygulama dozundaki etil alkol konsantrasyonu uygulandı. Test bileşiği ve çözücü enjeksiyonu, yumurtanın hava kesesinin bulunduğu bölümden 2-3 mm girilerek yapıldı. Kabuktaki delikler eritilmiş parafinle kapatıldı. Hem kontrol hem de uygulama grupları aynı anda, % 60-70 nemlilik ve 37°C sıcaklığa ayarlanmış inkübatöre konuldu. Hava keseleri yukarıda olacak şekilde yumurtaların eğimleri günde üç kez değiştirildi.

İnkübasyonun 19. gününde yumurtalar açıldı. Embryolar yıkandı ve kurulandı, ağırlıkları belirlendi. Vücut dış ve iç morfolojileri kontrol grupları ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Aynı embryoda birden fazla malformasyon görülse bile istatistiksel değerlendirme için etkilenmiş bir tek embryo olarak kabul edildi.

Kontrol ve doz uygulama grupları arasındaki farkın istatistiksel analizi, ortalama ağırlıklar için "t testi" malformasyonlar için "oranların farklarına ilişkin hipotez testi (Z testi)" uygulanarak yapıldı (Akdeniz, 1984).

BULGULAR

DPH uygulanan embryoların vücut ağırlıkları ve büyüklükleri gelişimi normal kabul edilen kontrol grupları ile karşılaştırıldığında 25, 125 ve 250 µg dozlarda azaldığı görülmüştür (Tablo 1). Bu azalma özellikle 25 µg uygulama grubunda çok belirgindir (p < 0.001).

Teratojenik etkiler, embryoların dış ve iç organlarında görülen malformasyonların kontrollerle karşılaştırılması şeklinde değerlendirildi. DPH'dan etkilenen embryo sayısında doza bağlı bir artış gözlemlendi (p < 0.001) (Tablo 2).

Kontrol grubunda hiç bir malformasyona rastlanmadı. Ancak 5, 25, 125 ve 250 µg DPH uygulanan grupların sırasıyla, % 18, % 60, % 77, ve % 52 oranda etkilendikleri bulundu. Etkilenen toplam 32 embryonun 6 tanesi (% 18.7) fleksiyon, brakidaktili ve ektrodaktili şeklinde extremitte anomalileri gösterirken (Resim 1, 2, 3), 11 tanesinde (% 32) ön karın duvarının füzyon gecikmesine bağlı olarak iç organların dışarıda geliştiği (Ectopia viscera) görüldü (Resim 3, 4). Embryoların en çok etkilenmiş organı karaciğerdi (% 40.6). DPH'nın karaciğerdeki toksik etkisi lob büyüklüğünde değişkenlik ve en çok da tüm organın yeşil renkte görülmesi şeklindeydi.

Tablo 2'de görüldüğü gibi 25 µg DPH uygulanan embryolar; extremitte anomalisi, ectopia viscera, incelmış ön karın duvarı bilateral anoftalmi, exencephaly ve meningosel Tablo 2'de "diğer" sütununda - benzeri pek çok teratojenik karakterleri içeren bir grup olarak dikkati çekti (Resim 1, 4, 5).

Bu çalışma, aynı doz ve aynı denek sayısı ile iki kez tekrarlanarak yapıldı. Sunduğumuz bulgular ikinci kez yapılan çalışmanın sonuçlarıdır. Her iki çalışmada da doza bağlı ve birbirine benzer malfor-

| Doz (DPH) | Yumurta Sayısı | Embryo Sayısı | Ortalama Embryo (g) | Embryo S.E | Ağırlığı Aralık (g) | t testi ist. önemi |
|-----------|----------------|---------------|---------------------|------------|---------------------|--------------------|
| KONTROL | 25 | 13 | 18.76 ± 0.536 | | 16 - 21 | - |
| 5 µg | 25 | 11 | 19.14 ± 0.700 | | 17 - 20 | p > 0.05 |
| 25 µg | 25 | 10 | 14.77 ± 0.835 | | 13 - 19 | p < 0.001 |
| 125 µg | 25 | 18 | 17.22 ± 0.565 | | 12 - 19 | p < 0.05 |
| 250 µg | 25 | 19 | 16.45 ± 0.544 | | 12 - 19 | p < 0.05 |

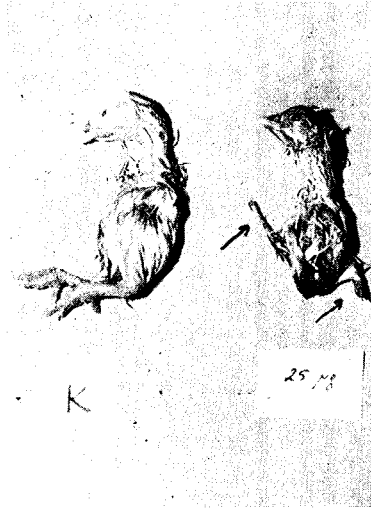
Tablo - 1 : Difenilhidantoin'in civciv embryo gelişimine etkisi.

| Doz | Embryo Sayısı | Etkilenmiş Embr. | Extremitte Anomalisi | Ectopia Viscera | Ön Karın Duvarı İncelmesi | Unilateral Açık göz | Bilateral Anoftalmi | Exen** cephalı | Karaciğer Malformasyonu | Diğer |
|---------|---------------|------------------|----------------------|-----------------|---------------------------|---------------------|---------------------|----------------|-------------------------|-------|
| KONTROL | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 5 µg | 11 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 25 µg | 10 | 6* | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 125 µg | 18 | 14* | 3 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 | 0 |
| 250 µg | 19 | 10* | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 0 | 6 | 0 |

Tablo - 2 : Difenilhidantoinin civciv embryoları üzerindeki teratojenik etkisi.

* Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fark önemli (p < 0.001).

** Kafatasının tamamlanamaması nedeniyle dışa uzanan beyin.



Resim - 1 : Ektrodaktili



Resim - 4 : Ön karın duvarı incilmesi



Resim - 2 : Fleksiyon



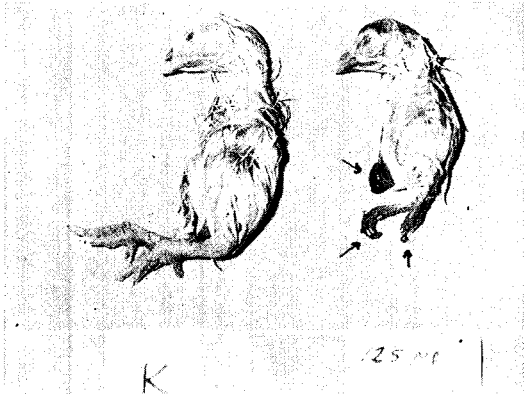
Resim - 5 : Exencephaly

masyonların ve özellikle 25 µg DPH uygulanan grupta aynı çeşitliliğin gözlenmesi, sonuçlarımızın tesadüf olmadığını göstermektedir.

TARTIŞMA

Bu çalışmanın hedefi her ne kadar etki mekanizmasının belirlenmesine yönelik olmasa da, anti-konvulsant ilaç DPH'in maternal etki olmaksızın embryolarda güçlü bir teratojenik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Antikonvulsant ilaçların çeşitli memeli hayvan modellerinde embryotoksik (Finnel ve ark. 1987), genotoksik (Barcellona ve ark. 1987) ve teratojenik etkileri belirlenmiştir (Brown ve ark. 1982; Chang ve Glazko, 1982; Harbison ve Becker, 1972).Epidemiyolojik çalışmalarla gebeliği sırasında difenil-



Resim - 3 : Ectopia viscera ve brakidaktili

hidantoin kullanan annelerin çocuklarında çeşitli konjenital anomaliler (Hasnon ve ark. 1976; Meadow, 1968; Speidel ve Meadow, 1972) ve belirli tümör sıklığında artışların görülmesi (Albenngres ve Tillement, 1983; IARC, 1977) bu ilacın insanlarda da teratojenik ve karsinojenik potansiyelli olduğunu ortaya koymaktadır.

Bulgularımız, DPH'ı daha yüksek dozlarda (3, 4 ve 5 mg) ve inkübasyonun 2, 3 ve 4. günlerindeki civciv embriolarına uygulayan bir diğer araştırmanın sonuçlarıyla da uyumlu bulunmuştur (Singh ve Shah, 1989).

Sonuç olarak DPH'ın maternal etki olmaksızın civciv embriolarında nispeten doza bağlı olarak oluşturduğu malformasyonlar, "fetal hidantoin sendromu"nun karakterlerinde olduğu gibi gelişim gerilikleri, iskelet bozuklukları ve organogenezis anomalileri şeklinde özetlenebilir.

**Bu çalışmada olanakları ölçüsünde katkıda bulunan Etlik Veteriner Araştırma Enstitüsü Müdürü Metin KERMAN, Müdür Yardımcısı Musa YÜRÜSÜN ve Uzman İsmet YÖRÜK'e teşekkür ederiz.*

KAYNAKLAR

1. Akdeniz F : Bioistatistik (Çukurova Üniversitesi Fen Ed. Fak. Adana). 1984
2. Albengres E, Tillement JP : Phenytoin in pregnancy. a review of reported risks. Biol Res Preg 4 : 71-74, 1983
3. Barcellona PS, Barale R, Campana A, Zucconi D, Rossi V, Caranti S : Correlations between embryotoxic and genotoxic effects of phenytoin in mice. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 7 : 159-168, 1987
4. Brown NA, Shull G, Kao J, Goulding EH, Fabro S : Teratogenicity and lethality of hydantoin derivatives in the mouse : Structure - toxicity relationships. Toxicol Appl Pharmacol 64 : 271-288, 1982
5. Chang T, Glazko AJ : Phenytoin iotransformation in : Antiepileptic Drugs, Woodbury DM, Penry JK, Pippenger CE, (New York, Raven Press). 1982, pp. 209-226
6. Finnell RH, Shields HE, Chemoff GF : Variable patterns in anticonvulsant drug-induced malformations in mice : Comparisons of phenytoin and phenobarbital. Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 7 : 541-549, 1987
7. Hanson JW, Myriantopoulos NC, Sedgwick-Harvey MA, Smith DW : Risks to the offspring of women treated with hydantoin anticonvulsants with emphasis on the fetal hydantoin syndrome. J Pediatr 89 : 662-668, 1976
8. Harbison RD, Becker BA : Diphenylhydantoin teratogenicity in rats. Toxicol Appl Pharmacol 22 : 193-200, 1972
9. International Agency for Research in Cancer, in : IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to man, 13, I A R C Lyon, France. 1977, pp. 201-225
10. Lum JT, Wells PG : Pharmacological studies on the potentiation of phenytoin teratogenicity by acetaminophen. Teratology 33 : 53-72, 1986
11. Meadow SR : Anticonvulsant drugs and congenital abnormalities. Lancet 2 : 1296, 1968
12. Mirkin BL : Diphenylhydantoin : Placental transport, fetal localization, neonatal metabolism and possible teratogenic effects. J Pediatr 78 : 329-337, 1971
13. Singh M, Shah GL : Teratogenic effects of phenytoin on chick embryos. Teratology 40 : 453-458, 1989
14. Speidel BD, Meadow SR : Maternal epilepsy and abnormalities of the fetus and newborn. Lancet 2 : 839-843, 1972

Yazışma Adresi :

Dr. Abdullah EKMEKÇİ
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı
Beşevler
06510 ANKARA - TÜRKİYE
Tel : 4 - 212 81 28 / 312