

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI**

**HİPOKSİK EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE FOLİK ASİTİN
EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Hazırlayan
Ertuğrul DAĞLI**

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehtap NİSARİ**

Yüksek Lisans Tezi

**Haziran 2018
KAYSERİ**

T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

HİPOKSİK EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE FOLİK ASİTİN
EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Ertuğrul DAĞLI

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehtap NİSARİ

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2016-6585 nolu proje ile desteklenmiştir.**

Haziran 2018
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

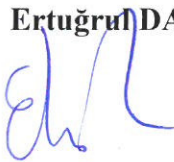
Adı-Soyadı: Ertuğrul DAĞLI

İmza:

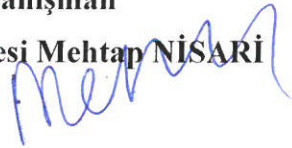
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Hipoksik Embriyo Kültüründe Folik Asitin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisi” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan
Ertuğrul DAĞLI



Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehtap NİSARİ



Anabilim Dalı Başkanı
Prof. Dr. Kenan AYCAN



Dr. Öğr. Üyesi Mehtap NİSARİ danışmanlığında **Ertuğrul DAĞLI** tarafından hazırlanan “**Hipoksik Embriyo Kültüründe Folik Asitin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Anatomi** Anabilim Dalı **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

../.../.....

JÜRİ

İmza

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehtap NİSARİ
(Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi)

Üye : Prof. Dr. Nihat EKİNCİ
(Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi)

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Halime TOZAK YILDIZ
(Ahi Evran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

....../.../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENELİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı yüksek lisans öğrenciliğim boyunca bilimsel destek sağlayan tezimin hazırlanmasından sonlandırılmasına kadar çalışmamın her aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeksizin beni yönlendiren danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Mehtap NİSARİ'ye Anatomi Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Kenan AYCAN'a, desteğini her zaman hissettiğim ve çalışmam süresince yardımlarını esirgemeyen hocam Prof. Dr. Harun ÜLGER'e, çalışmamın her aşamasındaki yardım ve katkılarından dolayı Doç. Dr. Tolga ERTEKİN'e, bilgilerinden faydalandığım Prof. Dr. Erdoğan UNUR, Prof. Dr. Nihat EKİNCİ, Prof. Dr. Niyazi ACER'e, Anatomi Anabilim Dalı asistanları, doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, Anatomi Anabilim Dalı bölüm sekreteri Hüseyin ÇELEBİ ve tüm çalışanlarına sonsuz teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca zor anlarımda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Dilara PATAT'a, Öğr. Gör. Dicle ÇAYAN'a, Dr. Öğr. Üyesi Seher Yılmaz'a, Dr. Öğr. Üyesi Hatice GÜLER'e, Öğr. Gör. Eylem YALMAN'a, Öğr. Gör. İlyas Uçar'a, Arş. Gör. Özge ÖZTÜRK'e, Arş. Gör. Sümeyye UÇAR'a, Arş. Gör. Adem TOKPINAR'a, Muhammed DEĞERMENCİ'ye, Özlem BOZKURT'a sonsuz teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca ilgisini üzerimde esirgemeyen rahmetli babam İsmet ve annem Elif DAĞLI'ya, varlığını hep yanımda hissettiğim canım eşim Merve DAĞLI'ya, Ablalarım ve Abilerime ve de Kimya Öğretmenim Alime ARI'ya sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışmaya maddi destek veren Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna (TYL-2016-6585) teşekkür ederim.

Ertuğrul DAĞLI
Haziran Kayseri, 2018

HIPOKSİK EMBRİYO KÜLTÜRÜNDE FOLİK ASİTİN EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

Ertuğrul DAĞLI

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Anatomi Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2018

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehtap NİSARİ

ÖZET

Canlı organizmalarda büyüme ve bölünmenin sorunsuz devam etmesi için yeterli miktarda oksijen olmalıdır. Oksijenin yetersiz olduğu durumda hipoksi ortaya çıkmaktadır. Erken embriyonik dönemde canlının hipoksiye maruz kalması birçok anomaliye veya canlının ölmesine neden olmaktadır. Hipoksi neticesinde serbest radikaller birikmesi ile oksidatif stres meydana gelmektedir. Serbest radikallerin ortamda birikmesini engelleyen maddeye antioksidan denilmektedir. Folik asit metabolizmada önemli görevleri olan bir antioksidan maddedir. Yapılan literatür taramasında folik asit kullanımının doğumsal sorunları ve Nöral tüp defektini azalttığı görülmektedir. Bu çalışmada hipoksik embriyo kültüründe folik asit'in embriyo gelişimi üzerine etkileri araştırıldı.

Bu çalışmada wistar albino (150-250 gr) türü gebe sıçanlar kullanıldı. Gebeliğin 9.5. gününde embriyolar anne karnından çıkarıldı. In vitro embriyo kültürü tekniği ile embriyolar büyütüldü. 48 saatlik kültür periyodu sonunda folik asit'in (1 mmol-2 mmol) hipoksik embriyolar üzerine etkisi morfolojik olarak değerlendirildi.

Kontrol grubu ile hipoksi grubu morfolojik parametreleri karşılaştırıldığında kontrol grubu gelişimini tamamladığı, hipoksi grubunun ise gelişiminin yeterli olmadığı görüldü. Kontrol grubu ile hipoksi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p<0.05$). Hipoksi grubu ile hipoksi düşük doz folik asit ve hipoksi yüksek doz folik asit grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p<0.05$). Ayrıca Hipoksi grubu ile hipoksi düşük doz folik asit ve hipoksi yüksek doz folik asit grubunda ise hipoksi grubuna oranla daha iyi gelişim gözlemlendi ($p<0.05$).

Sonuçlar, FA'nın hipoksik koşullara maruz bırakılan ve embriyonik gelişim geriliği gösteren embriyolar üzerinde olumlu etkileri olabileceğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Folik Asit, Embriyo Kültürü, Sıçan, Antioksidan Etki, Nöral Tüp

**EFFECT ON FOLIC ACID EMBRYO DEVELOPMENT IN HYPOXIC
EMBRYO CULTURE**

Ertuğrul DAĞLI

Erciyes University, Department of Anatomy

MS. Thesis, June 2018

Advisor: Dr. Öğr. Üyesi Mehtap NİSARİ

ABSTRACT

There must be enough oxygen in the living organisms to allow growth and division to proceed smoothly. Hypoxia occurs when oxygen is inadequate. In the early embryonic period, the exposure of the living organism to hypoxia causes many anomalies or live organisms to die. As a result of hypoxia, oxidative stress occurs due to accumulation of free radicals. Antioxidant is a substance that prevents free radicals from accumulating in the environment. Folic acid is an antioxidant that has important roles in metabolism. It is seen that the use of folic acid in the literature survey is congenital and the neural tube defect is reduced. In this study, the effects of folic acid on embryo development in hypoxic embryo culture were investigated.

Wistar albino (150-250 gr) pregnant rats were used in this study. Embryonal dissection was performed at 9.5. days of gestation. Embryos were grown by in vitro embryo culture technique. After 48 hours of culture period, the effect of folic acid (1mmol-2mmol) on hypoxic orders was evaluated morphologically.

The morphological parameters of the hypoxia group were compared with the control group. It was seen that the development of group control was complete, the development of group hypoxia was not enough. A statistically significant difference was observed between group control and group hypoxia ($p<0.05$). A statistically significant difference was observed between hypoxia group and hypoxic low-dose folic acid group and hypoxic high dose-folic acid group ($p<0.05$). Moreover, the hypoxic low-dose folic acid and the hypoxic high dose-folic acid A group showed better development than the hypoxia group ($p<0.05$).

The results suggest that folic acid may have positive effects on nerve development especially on embryos exposed to hypoxic conditions and showing embryonic developmental retardation.

Keywords: Folic acid, In Vitro Embryo Culture, Rat, Antioxidan Effect, Neural Tube

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	x
TABLolar VE ÇİZELGELER LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. HİPOKSİ	2
2.1.1. Hipoksinin Metabolizması	2
2.1.2. Hipoksinin Hücresele Etkileri.....	3
2.2. OKSİDATİF STRES	3
2.3. SERBEST RADİKALLER	3
2.4. ANTİOKSİDANLAR	4
2.4.1. Antioksidan Savunma Sistemleri	4
2.4.2. Antioksidanların Sınıflandırılması	4
2.5. FOLİK ASİT	6
2.5.1. Folik Asit'in Tarihçesi.....	6
2.5.2. Folik Asit'in Yapısı	6
2.5.3. Folik Asit Bulunan Gıdalar Ve Günlük Gereksinim	7

2.5.4. Folik Asit'in Görevi Ve Metabolizmaya Etkileri.....	8
2.5.5. Folik Asit Eksikliği Ve Tedavisi.....	9
2.6. EMBRİYO KÜLTÜRÜ	9
2.6.1. Embriyo Kültürü Tarihçesi	9
2.6.2. Kültür Ortamında Solunum ve Metabolizma.....	10
2.6.3. Embriyo Kültür Ve Teratoloji:.....	10
2.6.4. Embriyo Kültürünün Önemi:	10
2.6.5. In Vitro Embriyo Kültürü:	11
2.6.6. In Vitro Ortamda Büyütülen Embriyolarda Büyüme ve Gelişimin Değerlendirilmesi.....	12
2.7. SIÇANLARDA EMBRİYONİK GELİŞİM	16
2.7.1.Sıçan Visseral Vitellus Kese'sinin Yapısı ve Görevi.....	21
2.7.2. Anjiogenez	22
2.7.3. Vaskülogenez	22
2.7.4. Embriyoda Erken Dönem Damar Gelişimi.....	23
2.7.5. Nörolasyon (Nöral Tüpün Oluşumu).....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. DENEYDE KULLANILAN MALZEMELERİN LİSTESİ.....	28
3.1.1. Sarf Malzeme	28
3.1.2. Demirbaş Malzeme.....	29
3.2. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ.....	30
3.3. EMBRİYO KÜLTÜRÜ	32
3.3.1. Kültür Ortamının (Serum) Hazırlanması	32
3.3.2. Embriyoların Anne Karnından Çıkarılışı Ve Kültürü	34
3.3.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	39
3.3.4. Folik Asit Dozlarının Hazırlanması.....	40
3.3.5. Embriyoların Kültüre Edilmesi	42

3.3.6. Hipoksik Embriyo Kültürü Oluşturulması.....	39
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	42
4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	53
6.KAYNAKLAR	59
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	



KISALTMALAR ve SİMGELER

ATP	: Adenozin Trifosfat
PaO ₂	: Parsiyel Oksijen Basıncı
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
HIF	: Hipoksiyle İndüklenen Faktör
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)
HSP	: Heat Shock Proteins (Isı Şok Proteinleri)
ROAT	: Reaktif Oksijen Azot Türleri
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türevleri
SOD	: Süperoksit Dismutaz
GSHPx	: Glutatyon Peroksidaz
GST	: Glutatyon-S-Transferaz
CAT	: Chloramphenicol Acetyltransferase (Katalaz)
TNF	: Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekroz Faktör)
IL-1	: Interleukin-1 (İnterlökin-1)
IL-12	: Interleukin-12 (İnterlökün-12)
THF	: Tetrahidrofolat
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution
rpm	: Revolution per minute=Dakikadaki devir sayısı
IU/ml	: Ünite/mililitre
ml	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
gr	: Gram
mg	: Miligram
µm	: Mikromolar
ug/ml	: Mikrogram/mililitre
dk	: Dakika
FA	: Folik asit
K=WRS	: Kontrol grubu=Whole rat serum
H	: Hipoksi grubu= Hipoxia group
DDFA	: Düşük doz folik asit grubu

YDFA	: Yüksek Doz Folik Asit Grubu
HDDFA	: Hipoksik Düşük Doz Folik Asit Grubu
HYDFA	: Hipoksi Yüksek Doz Folik Asit Grubu
NTD	: Nöral tüp defekti
O ₂	: Oksijen
PABA	: p-aminobenzoik asit
CO ₂	: Karbondioksit
N ₂	: Azot
NTA	: Nöral tüp açıklığı
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
IFN β -1a	: İnterferon-1a
IFN β -1b	: İnterferon-1b

TABLULAR VE ÇİZELGELER LİSTESİ

Tablo 2.1. Endojen Antioksidanlar	5
Tablo 2.2 Ekzojen Antioksidanlar	5
Tablo 2.3. Besinlerin FA içerikleri	7
Tablo 2.4. Günlük Folik Asit Gereksinimleri.....	8
Tablo 4.1. Kontrol grubu ile diğer grupların morfolojik skorlama verileri.....	46
Tablo 4.2. Total skor korelasyon analizi	51
Tablo 4.3. Vitellus kesesi çapı korelasyon analizi	52
Tablo 4.4. Baş-kıç uzunluğu korelasyon analizi.....	52
Tablo 4.5. Somit sayıları korelasyon analizi	52
Çizelge 2.1 Morfolojik Skorlama Parametreleri	13

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Folik Asitin moleküler yapısı.....	6
Şekil 2.2.	Döllenme Sonrası İlk Evre.....	16
Şekil 2.3.	Blastula Evresi	17
Şekil 2.4.	Sıçanlarda fetal zarların gelişimi.....	18
Şekil 2.5.	Ektoplasental kon ve Reichert zarı.....	19
Şekil 2.6.	Sıçanlarda allantoik plasentanın gelişimi	20
Şekil 2.7.	Nöral tüp ve nöral krista hücrelerinin oluşumu.	26
Resim 3.1.	Smear alınması.....	31
Resim 3.2.	Mikroskop altında sperm görüntüsü.....	31
Resim 3.3.	Kan alınma işlemi.....	32
Resim 3.4.	Serum elde edilmesi	33
Resim 3.5.	Sıçan diseksiyonu	35
Resim 3.6.	Uterusun ayrılma işlemi.....	36
Resim 3.7.	Desiduanın ortaya çıkarılması.....	36
Resim 3.8.	Desidua	37
Resim 3.9.	Desiduada embriyonun görünümü	37
Resim 3.10.	Reicherts membranı çıkarılması.....	38
Resim 3.11.	Sıçan embriyosu	39
Resim 3.12.	A) Farklı konsantrasyondaki oksijen tüpleri, B) Embriyoların gazlanması, C) Embriyoların etüve yerleştirilmesi	41
Resim 4.1.	A) Kontrol Grubu, B) Hipoksi grubu	48
Resim 4.2.	A) Hipoksi Düşük Doz Folik Asit Grubu B) Hipoksi Yüksek Doz Folik Asit Grubu	49
Resim 4.3.	Vitellus kesesi	49
Grafik 4.1.	Morfolojik Skorum parametreleri (total skor, somit sayısı).....	48

Grafik 4.2. Morfolojik Skorlama parametreleri (vitellus kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu, kaudal nöral tüp)	50
Grafik 4.3. Morfolojik skorlama parametreleri (ön beyin, arka beyin, orta beyin, otik sistem, optik sistem)	50
Resim 4.4. Nöral tüp açıklığı.....	51



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Canlılar yaşamını devam ettirebilmeleri için enerjiye ihtiyaç duyar. Hücresel canlılığın sürekliliği için gerekli olan enerji kaynağına Adenozin Trifosfat (ATP) denilmektedir. ATP üretimi oksidatif fosforilasyon ile gerçekleşmektedir (1). Dolayısıyla dolaşımdaki oksijen oranında herhangi bir değişim hücre fizyolojisini etkilemektedir (2). Vücut içinde veya dışında oksijen basıncının azalması hipoksi olarak tanımlanmaktadır. Hipoksi neticesinde oksidatif stres meydana gelmekte ve serbest radikaller oluşmaktadır (3). Serbest radikalleri ve zararlı etkilerini azaltan sisteme antioksidan savunma sistemi denilmektedir (4).

Folik asit (FA) antioksidan etkisi olan ve çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahip bir maddedir (5). FA, folat'ın sentetik formu olup, kimyasal yollarla sentezlenmektedir. Biyolojik formu sentetik formuna göre daha dayanıksızdır. Besinlerde bulunan doğal FA, pişirme, dondurma ve saklama koşullarından olumsuz olarak etkilenmektedir (6). FA metionin, serin – glisin dönüşümü ve histidin metabolizmasında görev almaktadır (7). FA eksikliğinde iştahsızlık, ishal, kilo kaybı, güçsüzlük, dil ve baş ağrısı, çarpıntı, unutkanlık, huzursuzluk ve davranış bozuklukları gibi semptomlar görülmektedir (8, 9). Yapılan çalışmalar FA'nın nöral tüp defekti (NTD) gibi embriyonel gelişim bozukluklarını önleyici özelliği olduğunu ortaya koymaktadır (10). Sağlıklı bir insanın günlük minimum 200 µg alması gerekmektedir. FA'nın koruyuculuk özelliği nedeni ile gebelerin günlük minimum 400 µg alması gerekmektedir. Yetişkinlerde B₁₂ vitamini eksikliği semptomlarını tetiklememesi için alınan FA seviyesi günlük 1000 µg'dan fazla olmamalıdır (11).

Yapılan literatür taramasında FA'nın antioksidan etkisi bulunmaktadır (5) . FA ile ilgili birçok embriyo kültür çalışmaları bulunmaktadır (5, 12). FA'nın hipoksik koşullarda embriyo gelişimi üzerine etkileri hakkında çalışmalara rastlanmamaktadır. Buna bağlı olarak hipoksik embriyo kültüründe FA'nın embriyo gelişimi üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HIPOKSI

Canlılarda hayatın devamı için hücrelerin büyümesi ve bölünmesi gereklidir. Bu gereklilik sağlanırken hücresel düzeyde en öncelikli ihtiyaçlarından biri oksijenin yeterli sağlanmasıdır. Ortamın oksijensiz olduğu durumda hücre metabolizması yavaşlar ve 30 saniye içinde bazı hücreler canlılığını yitirir (13). Hipoksi, vücuttaki dokuların yeterince oksijen alamaması sonucunda oluşan oksijen yetersizliği olarak tanımlanmaktadır. Oksijen yetersizliğinin (hipoksi) sonucunda da, hücrelerin büyümesi ve canlılığı azalmaktadır (14). Dokuların oksijenlenmesini kandaki oksijen miktarı, havadaki oksijen yoğunluğu, kanın akış hızı, stres, ilaçlar, sigara, alkol, obezite, gebelik, metabolik bozukluklar, anatomik bozukluklar, travma ve bazı hastalıklar etkilemektedir (15).

2.1.1. Hipoksinin Metabolizması

Normal hücresel metabolizmada ve mitokondriyal solunumda oksijen, elektronların son alıcısıdır. Mitokondriyal solunum zincirinde oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi gerçekleştirilir. ATP hücresel canlılığın sürekliliği için gerekli olan enerji kaynağıdır (1). Oksijen yoğunluğundaki herhangi bir değişim hücre fizyolojisini etkiler. Başta sinir hücreleri olmak üzere vücuttaki tüm hücreler oksijen miktarına karşı oldukça duyarlıdır (2). Hipoksi, hücresel düzeyde oksijen azalması sonucunda oksidatif metabolizmadan anaerobik metabolizmaya (glikoliz) geçiş ile başlayan olaylar zincirine neden olur (16).

Hipoksinin fetal ve yetişkin dokularda oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir. Oksidatif stresle reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi sonucu hücresel hasar ortaya çıkmaktadır (17, 18). Hipokside özellikle doku düzeyinde oksijen seviyesi yetersizdir. Parsiyel oksijen basıncının (PaO_2) değeri doku özelliğine bağlı olmakla birlikte minimum 20 mm Hg'dir (19).

Hücresel düzeyde hipoksi, öncelikle hipoksiyle indüklenen faktörün (HIF) aktivitesi olmak üzere, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), ısı şok proteinleri (HSP) reaktif oksijen ve azot türlerinin (ROAT) artışına neden olmaktadır (20). Ayrıca hücre içine glukoz transportu ve anaerobik solunum için gerekli olan glikolitik enzimlerin üretimi de hipoksiyle artış göstermektedir (21-23).

2.1.2. Hipoksinin Hücresel Etkileri

Hipoksi, hücresel düzeyde oksijen azalması sonucunda başlayan olaylar zincirine neden olur. (16). Hipoksik strese maruz kalan hücreler adaptasyon göstererek glikoliz ve angiogenezi artırır. Adaptif cevaplar ile başarı sağlanamazsa hücre ölümü olur (24). Hipoksi durumunda özellikle dört hücre içi sistem etkilenir. Bunlar; hücre zarı bütünlüğü, ATP oluşumu, protein sentezi ve genetik yapının bozulmasıdır (2).

2.2. OKSİDATIF STRES

Oksidatif stres, antioksidanlar ile prooksidanların kendi içindeki dengenin, prooksidanlar lehine bozulması olarak tanımlanır. Oksidatif stres sonucu serbest radikal oluşumu artmaktadır (25). Hücreler düşük düzeyde oksidatif stresi tolere edebilirler fakat yinede antioksidan sistem aktifleşir (26). Fakat, hücre içi savunmanın yetersiz olduğu durumlarda, oksidatif stres, birçok kronik dejeneratif hastalığın seyrinde rol oynar (27). Organizmada yağlar, proteinler, karbohidratlar ve diğer organik maddelerin oksidasyona uğraması ile canlı organizma için zararlı metabolitler olan reaktif oksijen türleri (ROS) oluşabilmektedir (28).

2.3. SERBEST RADIKALLER

Serbest radikaller, güçlü bir şekilde hücresel hasara yol açabilen, son yörüngesinde bir veya daha çok eşlenmemiş elektrona sahip olan molekül, atom veya iyon olarak tanımlanmaktadır. Eşlenmemiş elektronlar serbest radikallerin kararsız yapıda olmasına neden olmaktadır. Bu yüzden serbest radikaller kararlı hale gelmeyi denemektedir. Serbest radikaller reaktif olduğu için ortamda bulunan moleküllerle reaksiyona girerek oksidatif hasar oluşturmaktadır (29, 30). Organizmada metabolik süreçlerde oluşan elektronların aktarılması sırasında elektron transfer zincirinden kopan elektronların meydana getirdiği oksiradikaller hücrelerin geçirgenlik ve bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır (31).

2.4. ANTIOKSIDANLAR

Organizma gerek iç (sindirim, solunum, hastalık, yaralanma vb.) ve gerekse dış (çevresel faktörler) etkenlerin uyarılarıyla sürekli baskı altındadır. Bu baskılar sırasında ve sonrasında oluşan oksidan moleküller hücrelere ve dokulara saldırarak tahribata neden olmaktadır. Organizmada, reaktif oksijen türlerini ve diğer prooksidanları, antioksidan enzimlerle sürekli etkisizleştiren bir sistem mevcuttur. Antioksidanlar, oksijenin tahrip edici reaksiyonuna (oksidasyon) karşı koruyucu özellik gösteren maddelerdir. (32).

2.4.1. Antioksidan Savunma Sistemleri

Vücutta serbest radikallerin normalin üzerinde oluşumunun engellenmesi ve bu radikaller nedeni ile oluşan hasarların önlenmesi amacı ile gelişmiş savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” veya “antioksidanlar” denir (33). Antioksidanlar meydana gelen oksidan moleküllerin sebep olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirmektedir (34). Antioksidanlar etkilerini başlıca dört şekilde gerçekleştirmektedir (35, 36).

1) Toplayıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek tutma ya da zayıf bir moleküle çevirme işlemidir.

2) Bastırıcı Etki: Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltarak veya inaktif hale dönüştürerek etki gösterir.

3) Zincir kırıcı Etki: Serbest oksijen radikallerini kendine bağlayarak zincir kırıp fonksiyonları engelleyici etkisidir.

4) Onarıcı Etki: Hasarlı molekülleri tamir etme ve temizleme etkisidir.

2.4.2. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı maddelerdir. Endojen antioksidanlar da enzimatik olan ve enzimatik olmayan olmak üzere kendi arasında ikiye ayrılmaktadır (Tablo 2.1). Eksojen antioksidanlar ilaç olarak kullanılan ve vitamin olan antioksidan olmak üzere 2 gruptan oluşmaktadır (Tablo 2.2). Antioksidanların sınıflandırılması aşağıda sıralanmaktadır (4).

Tablo 2.1. Endojen Antioksidanlar (4).

Enzimatik Olan Endojen Antioksidanlar	Enzimatik Olmayan Endojen Antioksidanlar
Glutasyon Peroksidaz (Gshpx)	Seruloplazmin
Sod (Süperoksit Dismutaz)	Transferrin
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz Sistemi	Miyoglobin
Katalaz (CAT)	Hemoglobin
Glutasyon-S-Transferaz (GST)	Ferritin
Hidroperoksidaz	Ürat
	Glutasyon
	Sistein
	Metiyonin
	Bilirubin
	Laktoferrin
	Albümin

Tablo 2.2. Ekzojen Antioksidanlar (37, 4)

İlaç Olarak Kullanılan Eksojen Antioksidanlar	Vitamin Eksojen Antioksidanlar
Ksantin Oksidaz İnhibitörleri (Allopürinol, Oksipürinol, Pterin Aldehit, Tungsten)	Folik Asit
Nonenzimatik Serbest Radikal Toplayıcılar (Mannitol, Albümin)	B ₁₂ Vitamini (Kobalamin)
Rekombinant Süperoksit Dismutaz	Askorbik Asit (Vitamin C)
Trolox-C (Vitamin E Analogu)	A-Tokoferol (Vitamin E)
GSH-Px Aktivitesini Artıran Ebselen Ve Asetilsistein	, B-Karoten
NADPH Oksidaz İnhibitörleri (Adenozin, Lokal Anestezikler, Kalsiyum Kanal Blokerleri, Nonsteroid Antiinflamatuvar İlaçlar)	
Demir Redoks Döngüsü İnhibitörleri (Desferroksamin)	
Nötrofil Adezyon İnhibitörleri	
Sitokinler (TNF: Tümör Nekroz Faktör Ve IL-1: İnterlökin-1)	
Barbitüratlar	
Demir Şelatörleri	

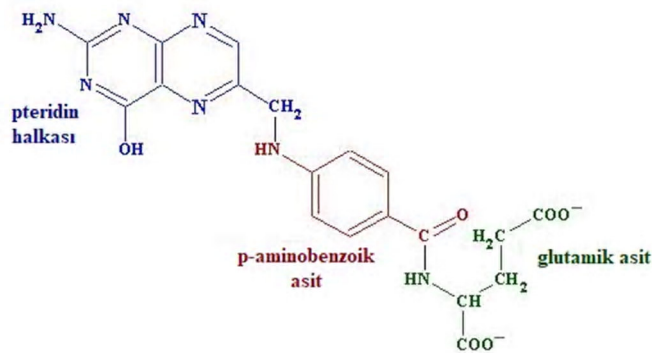
2.5. FOLİK ASIT

2.5.1. Folik Asit'in Tarihçesi

FA (Vitamin M, Folasin) suda çözünen vitamin B9 formlarıdır. FA Folat'ın sentetik formu olup, kimyasal olarak sentezlenmektedir. Sentetik formu, biyolojik formundan daha dayanıklıdır. Besinlerde bulunan doğal FA, pişirme, dondurma ve saklama koşullarından olumsuz olarak etkilenebilir (6). FA antioksidan etkisi olan ve çeşitli fizyolojik fonksiyonlara sahip bir besindir (5). İsmi Latince bir kelime olan folium (yaprak)" dan alır. İlk kez İngiliz Doktor Lucy Wills 1930'larda Bombay'da çalışırken, gebelerde anemi ve diğer defektleri önleyici besin maddesi olarak tanımlamıştır. Dr. Wills aneminin bira mayası ile tedavi edilebildiğini göstermiştir. İlk önceleri Wills faktörü olarak anılan madde daha sonraları FA ismini almıştır (38). 1930'lu yılların sonlarına doğru bira mayası içinde tespit edilen FA; ilk kez 1941 yılında Mitchell ve arkadaşları tarafından saf olarak ıspanak yapraklarından izole edilmiştir (39).

2.5.2. Folik Asit'in Yapısı

FA pteridin halkasına p-aminobenzoik asit (PABA) bağlanması sonucu oluşan pteroik aside ilave bir veya daha fazla glutamik asit kalıntısından oluşmaktadır (Şekil 2.1) Bundan dolayı pteroilmonoglutamik asit olarak da bilinir. FA çok çeşitli bakteriler ve bitkiler tarafından sentezlenebilirken; hayvanlar ve insanlar PABA sentezini yapamadıklarından ve glutamati pteroik aside bağlayamadıklarından diyetlerinde FA'ya gereksinim duyarlar (40).



Şekil 2.1. Folik Asitin moleküler yapısı (40)

2.5.3. Folik Asit Bulunan Gıdalar Ve Günlük Gereksinim

Vücutta FA sentez edilememesi nedeniyle insanlar bu ihtiyacı dışarıdan karşılamak zorundadır (41). FA yönünden zengin diyet kaynakları arasında; maya ekstraktı, karaciğer, dalak, böbrek, yeşil yapraklı sebzeler (ıspanak, lahana) ve turunçgiller bulunmaktadır. Daha az oranlarda da olsa ekmek, patates, süt ve süt ürünlerinde FA ihtiyacını karşılamaya katkıda bulunurlar (42, 43). Tablo (2.3) gösterildiği gibi her besinde farklı oranlarda FA bulunur (44).

Tablo 2.3. Besinlerin FA içerikleri ($\mu\text{g} / 100 \text{ g}$)(44)

Sebze	$\mu\text{g} / 100 \text{ g}$	Meyve	$\mu\text{g} / 100 \text{ g}$	Tahıl ve diğer besinler	$\mu\text{g} / 100 \text{ g}$
Brüksel lahanası (haşlanmış)	110	Portakal	30	Beyaz ekmek	30
Ispanak	90	Greyfurt	25	Kepekli ekmek	40
Brokoli	65	Portakal suyu	20	Spagetti,	4
Yeşil fasulye	55	Muz	15	Pirinç	4
Marul, çiğ	55			Karaciğer, pişmiş	270
Karnabahar	50			Ceviz	77
Bezelye	45				
Taze mısır	35				
Lahana	30				
Patates, taze	20				
Domates, çiğ	15				
Havuç	15				
Salatalık, çiğ	9				

Erişkinde günlük alınması gereken FA miktarı yaklaşık 400 $\mu\text{g}/\text{gün}$ 'dür. Bu miktar gebelerde ihtiyacın artması ile 600 $\mu\text{g}/\text{gün}$ 'e kadar çıkar (45). Günlük FA gereksinimleri aşağıda gösterilmiştir (Tablo 2.4) (11).

Tablo 2.4. Günlük Folik Asit İhtiyacı (11)

Günlük Önerilen Folik Asit Miktarı Yaş Aralıkları	Mikrogram
11-14 yaş	150
>15 yaş erkek	200
>15 yaş bayan	180
Gebeler	400
Emzirenler	280

2.5.4. Folik Asit'in Görevi Ve Metabolizmaya Etkileri

FA'in en önemli görevi tek karbon transferi reaksiyonlarında koenzim rolü oynamasıdır. Tetrahidrofolat (THF) biyosentetik reaksiyonlarda çeşitli tek karbonlu üniteleri (metil, metilen, formil veya formimino) taşımaktadır (46-48). FA hücre bölünmesi ve protein sentezi için kritik öneme sahiptir (45). FA; serin – glisin dönüşümü, pürin bazlarının sentezi, metionin sentezi, timidilat sentezi, bakteri protein sentezinde formil met oluşumu ve histidin metabolizmasında görev almaktadır (7).

Homosisteinden metionin sentezi sırasında B₁₂ vitaminine bağımlı bir enzim yanında kofaktör olarak FA de kullanılmaktadır. Bu nedenle FA eksikliğinde metionin sentezi azalmakta ve homosistein birikmektedir. Homosistein birikimi kalp hastalıkları açısından risk faktörüdür (48, 49). Homosistein nöron hücrelerine karşı toksik etkileri vardır (50). Vücutta yeterli miktarda FA ve dolayısıyla THF türevi koenzimler bulunmadığında, bundan en fazla etkilenen hücreler, bölünme ve yenilenme hızı en yüksek olanlardır. Bunlar arasında kemik iliğindeki normoblastlar, lökosit ve trombositlerin ana hücreleri ile sindirim kanalı epitel hücreleri sayılabilir (47, 51, 52). Nöral tüpün kapanmasında metiyonin adı verilen bir amino asit kullanılmakta ve nöral tüpün kapanmamasında ise yine bu amino asit eksikliği sorumlu tutulmaktadır. Vücutta normalde metiyonin sentetaz enziminin rol aldığı tepkimeyle homosistein, metiyonine dönüşmekte, bu enzimatik reaksiyon da ayrıca metiltetrahidrofolat ve kofaktör olarak da metil kobalamin gerekmektedir. Bu süreçte FA kullanılmasıyla homosisteinin, metiyonine dönüşümünde metil vericisi olarak görev yapan metiltetrahidrofolat sağlayarak anomalinin oluşması önlenmektedir (53, 54).

2.5.5. Folik Asit Eksikliği Ve Tedavisi

FA eksikliği; prematürite, adolesan, yaşlılık, fenilketonüri diyeti, malnutrisyon, keçi sütü ile beslenme gibi yetersiz alımlarda veya megaloblastik anemi, tropikal sprue, çölyak hastalığı, inflamatuvar bağırsak hastalığı, gastrektomi, divertikül, cerrahi rezeksiyon, ilaçlar, toksinler (sülfosalazin, alkol kullanımı, valproik asit, hidantoinler, oral kontraseptifler, primetamin, trimetoprim-sulfametaksazol), kemik iliği nakli sonrası gibi emilim bozukluklarında meydana gelmektedir. Ayrıca prematürite, kronik hemolitik anemi, hipermetabolik durumlar (hipertiroidi), siroz, diseritropoetik anemi, malign hastalıklar, kemik iliği nakli, kronik diyaliz, karaciğer hastalığı gibi metabolik durumlarda FA eksikliğine neden olmaktadır (55, 56)

FA eksikliğinde ishal, iştahsızlık, güçsüzlük, kilo kaybı, ağrılı dil, baş ağrısı, çarpıntı, huzursuzluk, davranış bozuklukları ve unutkanlık gibi semptomlar görülebilmektedir (8, 9). Yine bu FA eksikliğe bağlı homosistein seviyesi yükselir. Plazma homosistein seviyesinin yüksekliği, kalp hastalıkları ve inme yönünden önemli bir risk faktörü olduğuna dair kanıtlar vardır (57).

FA eksikliği diyetle tedavi edilmekle birlikte önleyici tedavi olarak NTD'ye etkisinden dolayı 1998'den sonra Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri başta olmak üzere dünya üzerinde 50'den fazla ülkede zorunlu FA zenginleştirme programı başladı (58).

2.6. EMBRİYO KÜLTÜRÜ

Sıçan embriyolarında ana organ taslaklarının şekillendiği kritik dönem 9,5 ve 11,5. günleri arasındadır. Yapılan çalışmalarda bu günler aralığında in vitro olarak homojen serum içerisinde 48 saat embriyo kültürü yapıldığında, embriyonun büyüme ve gelişmesinin in vivo ortamındaki büyüme ve gelişmesi ile aynı oranda olduğu tespit edilmiştir (59).

2.6.1. Embriyo Kültürü Tarihçesi

Embriyo kültürü çalışmalarında ilk denemeler tavşan embriyolarını plazma pıhtısı üzerinde 6-9 somit aşamasına kadar büyütülmeleri ile sonuçlanmıştır (60). Bunu heparinize edilmiş sıçan plazmasında sıçan embriyolarının kültür edilmesi izlemiştir (61). 1964'te yapılan çalışmalarda 9-10 günlük sıçan embriyolarının sıçan serumunda plazma pıhtısında olduğu kadar iyi büyüebildiğini tespit edilmiştir (62). Bu dönemden sonra, sıçan embriyo kültür tekniği birçok araştırmacı tarafından benimsenmiş ve

çalışmalarda kullanılmıştır (63). Günümüzde kullanılan bu tekniğin temeli New'in sıçan embriolarının sıçan serumunda plazma pıhtısında olduğu kadar iyi büyüebildiğini göstermesiyle atılmıştır (64). Daha sonra New ve arkadaşları tarafından bu yöntem geliştirilerek birçok araştırmada kullanılan sıçan embriyo kültür tekniği ile embrioların in vitro ortamda uterus içinde olduğu kadar iyi büyüdüğü gösterilmiştir (65).

2.6.2. Kültür Ortamında Solunum ve Metabolizma

New ve arkadaşları, in vitro sistemlerde iyi bir gelişmenin sağlanabilmesi için kültür süreci ilerledikçe artan oksijen konsantrasyonuna ihtiyaç olduğunu göstermişlerdir. Buna göre %5'lik oksijen konsantrasyonu ile başlayan kültürde, 24. saatte %20 ve 40. saatte de %40'lık oksijen konsantrasyonuna ihtiyaç olduğunu göstermişlerdir (66).

2.6.3. Embriyo Kültür Ve Teratoloji:

Geçen yüzyılın başlarında doğumsal anomaliler daha çok genetik nedenlerle ilişkilendirilmekteydi ve embrioyu korunmasında annenin karın duvarı, uterus, embriyonal ve fetal zarlar dışarıdan gelebilecek tehditlere karşı kalkan görevi gördüğü düşünülmekteydi (63). Bu durumun aksine Gregg, 1941 yılında Rubella virüsünün embriyo gelişiminin kritik döneminde konjenital malfomasyonlara neden olabildiğini göstermiştir (67). 1950 yıllarında ise Thalidomit faciasıyla birlikte diğer çevresel etkenler ve farmakolojik ajanların da doğumsal eksikliklere yol açabileceği gösterilmiştir. Bu gelişmeler ışığında 'Teratoloji Bilimi' doğmuştur. Yapılan çalışmalar doğumsal bozuklukların %7-10'unun toksik ajanlar, ilaçlar, iyonize radyasyon ve kimyasal ajanlar gibi çevresel etkenlere bağlı olduğunu göstermektedir (68).

2.6.4. Embriyo Kültürünün Önemi:

Teratojenite hakkında hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalar önemli bilgiler sağlamaktadır. Bu aşamada deneylerin in vivo mu yoksa in vitro mu olması daha avantaj sağlayacaktır sorusu gündeme gelmektedir. Daha ucuz ve hızlı olmasına rağmen in vivo testlerin yaşayan yetişkin hayvanlar üzerinde yapılması mümkün değildir. Alternatif olarak karşımıza in vitro kültür teknikleri çıkmaktadır. Çok sayıda teratojen ve kimyasal ajanların olası potansiyel teratojenik zararlarını araştırmak için in vitro embriyo kültürü uygun bir metoddur. 2000'den fazla kimyasal teratojen in vivo hayvan deneyleri sonucu belirlenerek rapor edilmiştir. Ancak bunlardan sadece 20 kadarı insanlarda gelişim bozukluklarına neden olmaktadır. In vitro embriyo kültür

sistemlerinde etkili ilaç dozları doğru belirlendiğinde herhangi bir yanlış sonuca meydan verilmemektedir (69). Teratojenlerin ve ilaçların etkilerinin önceden belirlenebilmesi ve doğumsal bozuklukların daha erken tespit edilmesi için, insan embriyolarının kullanılması etik olmadığından hayvan deneyleri önem kazanmıştır. Bu nedenle in vivo ve in vitro çalışmalar geliştirilmiştir (70, 71).

2.6.5. In Vitro Embriyo Kültürü:

In vitro embriyo kültürü araştırmacıya organ gelişimi sürecindeki embriyonun sürekli gözlemlenebilmesi imkanı sağlamaktadır. Bununla birlikte kültür ortamına ilave edilen potansiyel teratojenlerin ve bazı farmakolojik ajanların organ gelişimi döneminde embriyonik büyüme ve gelişme üzerine etkilerinin ve eş zamanlı takibine imkan vermesi açısından da önemlidir. Yüksek doğurganlığa sahip sıçanların kullanıldığı bu metodun bilimsel alanların dikkatini çekmek için oldukça değerli olduğu bildirilmiştir (72).

Sıçanlarda embriyonik gelişimin 9,5 ila 11,5'inci günleri organ taslaklarının geliştiği dönemi kapsamaktadır. Sıçan embriyo kültüründe nörogenez, gliogenez ve nöronal migrasyon değerlendirilmesinde en uygun gün 11. gündür. Ekstremiteler gelişiminin değerlendirilmesinde ise 14.-15. günlerdir. Teratojenlerin doğumsal bozukluklara yol açtığı en kritik dönem insanda 15 ila 60'ıncı, sıçanlarda ise 9,5 ila 11,5'inci günler arasına denk gelmektedir. Bu dönemden önce embriyo, teratojene maruz kalırsa embriyonun yaşaması tehlikeye girerken daha geç dönemde teratojene maruz kalması halinde ise embriyoda fizyolojik doğumsal eksiklikler ya da organlarda fonksiyon bozuklukları görülmektedir. Farmakolojik ajanların teratojenik olup olmadığının saptanabilmesi ve doğumsal bozuklukların nedenlerinin belirlenebilmesi için in vivo ve in vitro çalışmalar eş zamanlı olarak yapılmaktadır (63).

Memeli gelişimi sürecinde ana organ taslakları, embriyonun uterus duvarına tutunmasını takip eden süreçte şekillenmeye başladığından dolayı embriyo üzerindeki gelişme safhalarını gözlemlemek in vivo çalışmalarda oldukça kısıtlıdır. In vitro çalışmalar in vivo testler ile karşılaştırıldığında daha hızlı ve ucuzdur (69). Antioksidan maddelerin ve teratojenlerin türe özgü değişiklikler sergilemesi ve in vivo çalışmalarda anne metabolizmasındaki farklılıklar hayvan deneylerinden elde edilen sonuçların insanlar için yorumlanabilmesini zorlaştırmaktadır (73). Diğer yandan in vitro çalışmalarda embriyonun gelişim süreci devamlı olarak gözlenebilmekte ve gebelik





























sürecinde ortaya çıkan iç ve dış etkenler izole edilebilmektedir. Bu durum normal büyüme mekanizmasının araştırılmasına ve anormal gelişimin etiyojisinin anlaşılabilmesine de imkan sağlamaktadır. In vitro çalışmaların dezavantajları arasında embriyogenezin sınırlı bir dönemini içermesi, kısıtlı bir zaman dilimini göstermesi problem olmaktadır (74, 75).

2.6.6. In Vitro Ortamda Büyütülen Embriyolarda Büyüme ve Gelişimin Değerlendirilmesi















Son zamanlarda postimplante kemirgen embriyo kültürü tekniğindeki gelişmelerin akabinde, embriyoların in vivo şartlarda olduğu kadar in vitro şartlarda da büyütülebilir ve geliştirilebilir olması teratolojistlerin dikkatini çekmektedir. Antioksidan maddenin etkilerinin aynı zamanda da ajanların toksisitesinin doğrudan embriyo üzerinde araştırılmasına olanak sağlamaktadır (76).

Embriyoların in vitro ortamda büyütülerek gelişimlerinin kantitatif olarak değerlendirilmesinde tanımlayıcı parametreler kullanılmaktadır. Van Maele-Fabry ve arkadaşları tarafından geliştirilen 'Objektif Skorlama Sistemi' morfolojik gelişimi ölçmek için tasarlanmış sık kullanılan skorlama (Puanlama=Değerlendirme) yöntemidir. Bu yöntem kullanılarak sıçan gebeliğinin 10, 11, 12 ve 13. günlerinde in vitro olarak yaşatılan embriyolarda 17 morfolojik özelliğe bakılmaktadır. Her bir morfolojik özellik 6 evreye ayrılmaktadır. Bu evrelere de 0 ile 5 arasında değişen puanlar verilmektedir (Çizelge 2.1) (77, 78). Bu parametreler şunlardır:

Çizelge 2.1 Morfolojik Skorlama Parametreleri. (77, 78).

Embriyonik tomurcuk	0	1	2	3	4	5	6
Vitellus kesesi damarlanması	 damar oluşmaz veya kan adacıkları oluşursa	 ektoplazental kon etrafında kan adacıkları oluşursa	 vitellus kesesi üzerinde birkaç ince damar oluşursa	 vitellus kesesinde damar ağı oluşursa	 ana damardan çok sayıda ince dallar çıkıyorsa	 vitellus kesesi sapı oblitere olup vitellin arter ve ven ayrılıyorsa	
Allantois	 ekzosölomda allantois serbest olarak görülürse	 allantois koryon ile kaynaşmış ise	 umbliikal dolaşım oluşursa	 umbliikal ve vitellin damarlar aorttan ayrıldığı görülürse 3			
Fleksiyon	 ventral olarak konveks ise	 1/4 oranında rotasyon	 1/2'lik bir rotasyon varsa	 3/4'lük rotasyon varsa	 dorsal olarak konveks	 tamamen katlanırsa	
Kalp	 endokardial yapı görünür	 kalp görünüyorsa	 kalp S harfine benzer tüp	 atrium ve ventrikül	 kalp üç bölmeye ayrılır	 kalp dört bölmeye	
Arka beyin	 nöral tabaka oluşmuş ise	 V-şeklinde nöral katlantı varsa	 nöral katlantı U-şeklinde ise	 ön nöropor oluşmuş ancak açık ise	 ön nöropor kapalı, rhombencephalon şekillenmiş ise	 dördüncü ventrikülün açık üst kenarıyla pons birleşmiş ise	

Embriyonik tomurcuk	0	1	2	3	4	5	6
Orta beyin							
Ön beyin							
Otik sistem							
Optik sistem							
Olfaktör sistem							
Branşiyal bar							

Embriyonik tomurcuk	0	1	2	3	4	5	6
Maksiller çıkıntı							
	rudimental bar kafanın ön kısmıyla birleşmiş olarak görünüyorsa	rudimental bar kafanın ön tarafından ayrılmış ise	branşiyal bar ile maksiller çıkıntı arasında içeriye doğru bir çıkıntı olursa	mandibular çıkıntı ile ön beyin arasında bir tabaka oluşursa			
Mandibular çıkıntı							
	herhangi bir şey görünmüyorsa	mandibular çıkıntı ventral kenar boyunca ayrılmış ise	ventral kenarlar birbirine temas ediyorsa	bu kenarlar birleşmiş ise			
Ön ayak							
	herhangi bir şey oluşmamış ise	9 ila 13 somit seviyesinde dışarıya doğru bombeleşme varsa	ön ayak tomurcuklanmış ise	ön ayak tomurcuğu kürek şeklinde ise			
Arka ayak							
	herhangi bir şey oluşmamış ise	26 ila 30 somit seviyesinde dışarıya doğru bombeleşme varsa	arka ayak tomurcuklanmış ise	arka ayak tomurcuğu kürek şeklinde ise			
Somit sayısı	somit sayısı 0 ila 5 arasında ise	6 ila 10 arasında ise	11 ila 15 arasında ise	16 ila 20 arasında	21 ila 25 arasında ise	26 ila 30 arasında ise	



Vitellus kesesi çapı



Somit sayısı



Baş-kıç uzunluğu

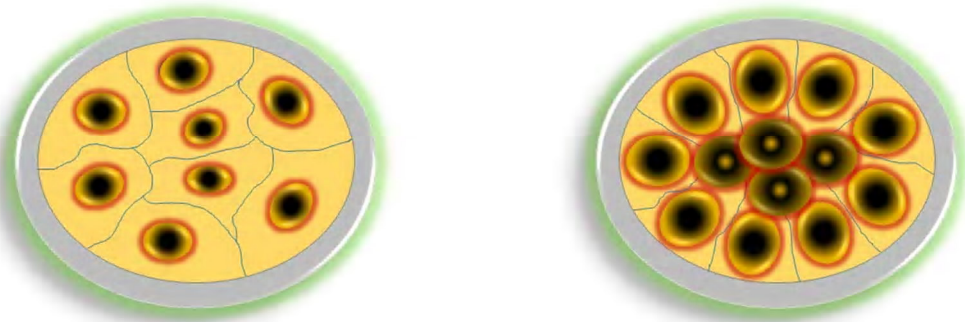


Baş uzunluğu

Sadece embriyonik yaşı belli embriyolar için kullanılan morfolojik skor bütün embriyolar için ayrı ayrı skorların toplam sayısal değerini ifade etmektedir. Morfolojik skorlama in vitro kültür ortamında büyütülen embriyoların gelişiminin ayrıntılı indeksini vermektedir. Spesifik primordianın yavaşlamasının ve dismorfogenezin bulunmasına, büyüme ve gelişmenin kantitatif olarak karşılaştırılmasına imkan sağlamaktadır (76). Bununla birlikte vitellus kesesinin çapı ile embriyonun baş-kıç uzunluğu ölçülerek büyüme ve gelişmenin sayısal olarak karşılaştırılmasına yardımcı olmaktadır (Çizelge 2.1) (77, 78).

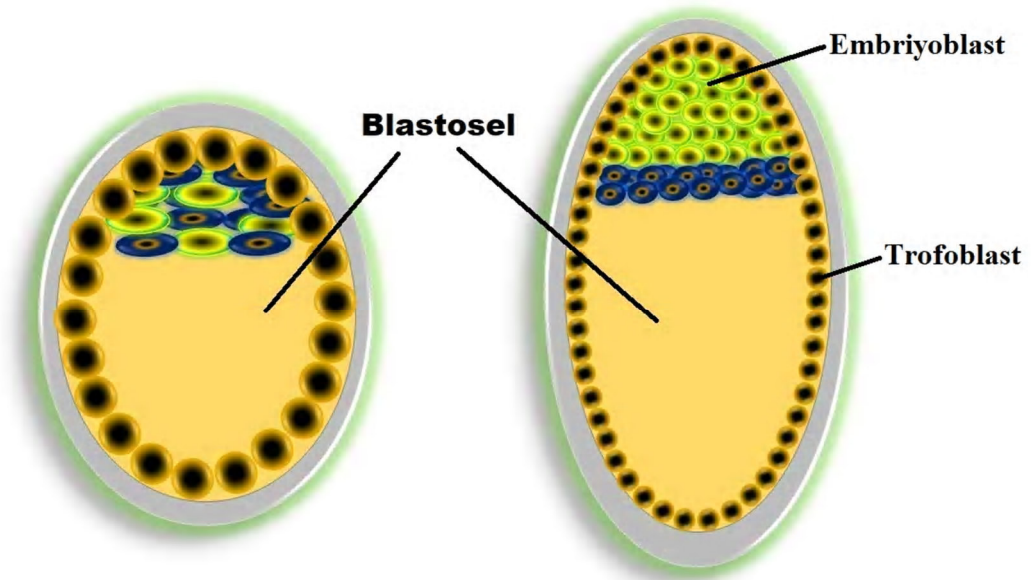
2.7. SIÇANLARDA EMBRİYONİK GELİŞİM

Sıçanlarda tuba uterina'nın ampulla kısmında meydana gelen döllenme sonucu oluşur. Oluşan zigot ampullada distale doğru ilerlemektedir (79). Döllenme sonrasında ilk 30 saat zigot 2 hücrelidir. Bu döneme blastomer denilmektedir. Zigot 4 hücreli olduğu zaman yaklaşık 40 saat dolmaktadır. Zigot 12-16 hücreli olduğunda yaklaşık 72 saati dolmakta ve erken morula dönemine girmektedir. Zigot 16-32 hücreli olduğu dönemde yaklaşık 96 saati tamamlamaktadır. Uterus boşluğuna indiği bu döneme geç morula evresi denilmektedir (Şekil 2.2) (80).



Şekil 2.2. Döllenme Sonrası İlk Evre

Uterus boşluğunda serbestçe yüzen zigot, daha sonra içerisinde sıvı dolu bir boşluk gözlenmekle (blastosel) birlikte blastosiste dönüşmektedir (Şekil 2.3) (81).

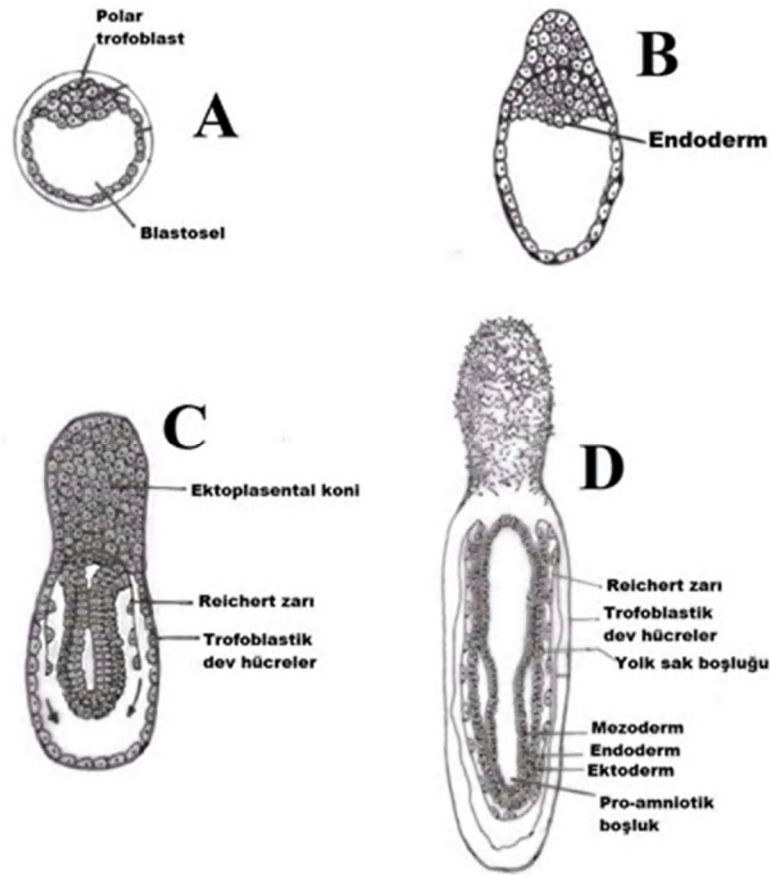


Şekil 2.3. Blastula Evresi

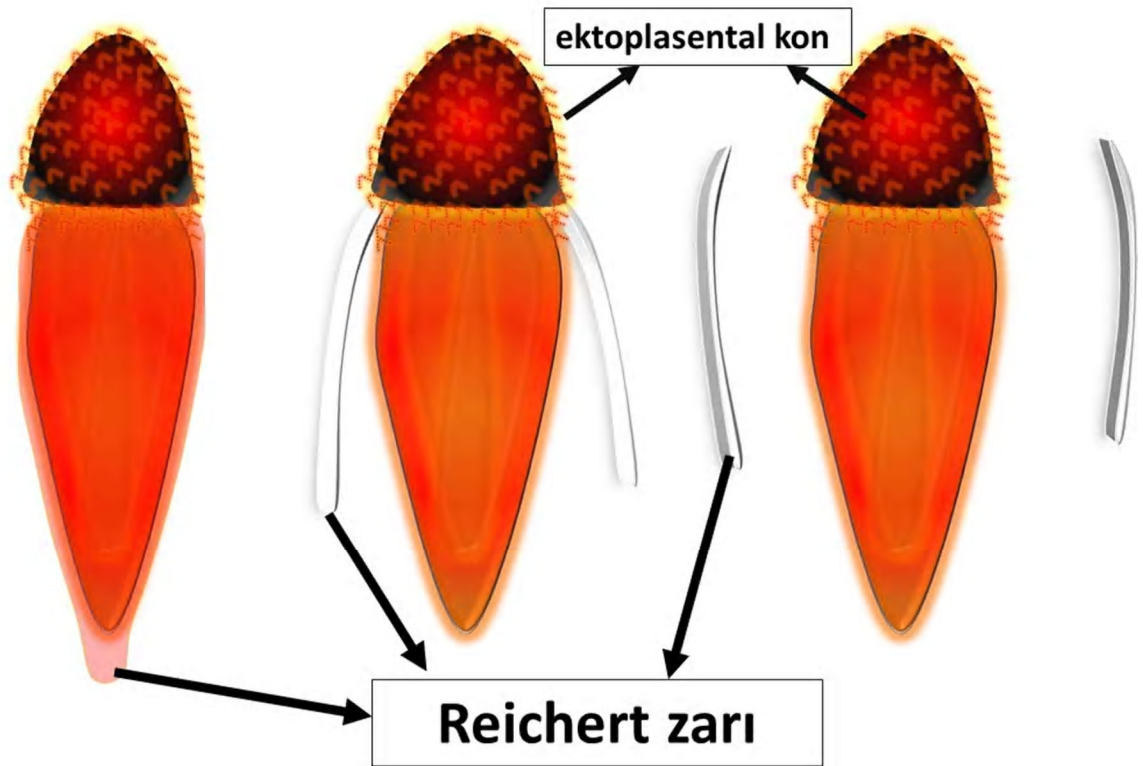
Blastosist, trofoblast ve iç hücre kitlesi (embriyoblast) olmak üzere iki grup hücreden oluşmaktadır. Trofoblast tabakadan plasenta, embriyoblast tabakadan embriyo, allantois, vitellus kesesi ve amniyon gelişmektedir. Tubae uterinae'ya yerleşmeyi engelleyen zona pellusida, gebeliğin 4-5. günlerinde erimekte ve implantasyon başlamaktadır. Sıçanlarda implantasyon uterusun antimezometriyal kısmındaki bir olukta gerçekleşmektedir (81).

Endoderm ve ektoderm tabakasının oluşması 5. ila 6. gün arasında iç hücre kitlesinin farklılaşması ile başlamaktadır. İç hücre kitlesi hızla çoğalmaya devam eder. Gelişen endodermal hücrelerin bir kısmı embriyonal diskin alt bölümünü oluştururken bir kısmı da visseral endodermi şekillendirir. Endoderm hücrelerinin bir kısmı mural trofoblastın iç yüzünü kaplayarak parietal endodermi oluşturur. Bu zamanda embriyo 6-7 günlüktür. Ektodermin içerisinde ilk amniyotik boşluk meydana gelmektedir. Embriyonik ektodermin merkezinde, proamniyotik boşluklar görülür. Bu boşluklar birleşerek embriyonik silindirin (egg cylinder) içinde dar bir lümen oluşturur (82-85).

Germ tabakasının inversiyonu ile embriyonik silindirin oluşması kemirgenlere özgü bir durum göstermektedir. Bu iki katmanlı silindir diğer memelilerdeki iki katmanlı germ diski ile aynıdır ve bu aşamada embriyoyu çevreleyen koryon bulunmamaktadır. Embriyo ile anne kanının ayrılması gerekmektedir. Reicherts membranı, silindir içindeki kapillerlerin primer dev hücrelere doğru geçmesini engelleyen ve sadece kemirgenlerle, böcek yiyenlerde bulunan bir zardır. Bu zar ilk defa Gine domuzlarında Reichert tarafından keşfedilmiş ve 'Reicherts Membranı' olarak isimlendirilmiştir. Reicherts membranı gestasyonun 6. gününde mural trofoblast ile ekto-plasental konun birleşme yerinden aşağıya ve blastosöl içine doğru trofoblastik dev hücreler ile pariyetal endoderm arasında ortaya çıkmaktadır (86). 8. Güne geldiğinde, kalın hiyalin bir zar olan Reichert zarı tüm embriyoyu çevreler (Şekil 2.4, Şekil 2.5) (87).



Şekil 2.4. Sıçanlarda fetal zarların gelişimi (86) A) İmplantasyon öncesi blastosist hali, B) Blastosistin implantasyonu, polar trofoblastın çoğalması ve iç hücre kitlesinin farklılaşması, C) Germ tabakalarının inversiyonu ve Reicherts membranının orijini, D) Mezodermin erken safhadaki görünümü.



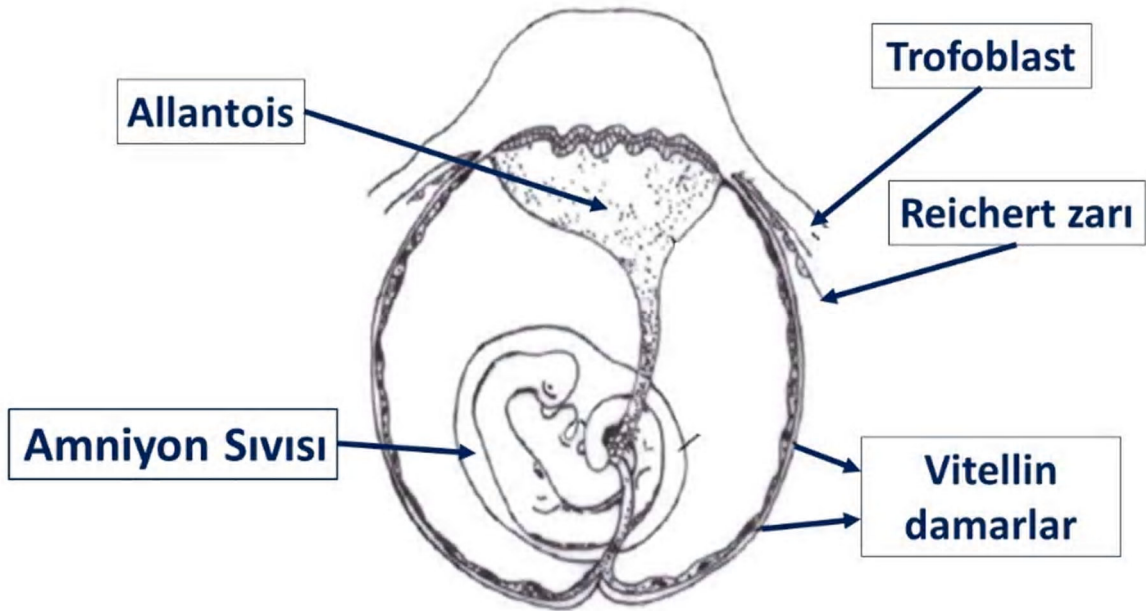
Şekil 2.5. Ektoplasental kon ve reichert zarı

Embriyonun erken dönem beslenmesinde ve korunmasında reichert zarı önemli görevler alır, embriyoyu anne kanından ayırır fakat, sızıntı şeklinde organik sıvı geçişine izin verir ve embriyo bu sıvı içinde yüzer. Besinler vitellus kesesi endoderminden pinositozla alınır (81).

Gebeliğin 8. gününde mezoderm oluşmaya başlamasıyla gastrulasyon evresi başlar. Mezoderm hücreleri, ektoderm ile endoderm arasında bir hat boyunca ilerler ve embriyo etrafını sarar. Mezoderm hücreleri çoğaldıkça ileride embriyonun posterior ucuna denk gelecek kısımda bir boşluk (pro-amniyotik boşluk) oluşmaya başlar ve bu boşluk büyüyerek çevresindeki hücrelerle beraber silindirik bir halka şeklini alır. Daha sonra mezoderm hücrelerinin sayıca artmasıyla beraber ektoderm ve mezoderm hücreleri silindirin orta kısmından içeriye doğru ilerlemeye başlar ve sonunda iki taraf birleşir. Boşluk etrafında horizontal seyirli iki membran oluşur. Biri ektoplasental koni yakınında olan koryon, diğeri de ileride embriyoyu oluşturacak olan ilkel hattın hemen üzerinde olan amniyondur. Böylece konseptus; ektoplasental boşluk, vitellus kesesi boşluğu (ekstra embriyonik çölm) ve amniyon boşluğu olmak üzere 3 odacığa ayrılır.

(87). Bu gelişim yaklaşık olarak, embriyoların in vitro kültür için alınıp hazırlandığı 9,5. günde gerçekleşir (81).

9-10. güne gelindiğinde embriyoda kuyruk kıvrımı ve baş oluşmaya başlar, bu aşamada embriyoda 5-12 somit vardır. Allantois, koryon ile birleşirken ekto plasental boşluk yok olmaya başlar. Allantoik damarlar, koryon ektodermi üzerinde dağılmaya başlar, böylece anne ile embriyonik dolaşım koryon ile birbirinden ayrılmış olur. Böylece koryoallantoik (hemokoryal) plasenta oluşur (Şekil 2.6). İki dolaşım arasındaki geçiş difüzyon, kolaylaştırılmış difüzyon, aktif transport ya da pinositoz aracılığıyla sağlanır.



Şekil 2.6. Sıçanlarda allantoik plasentanın ileri gelişimi ve bağırsak oluşumunun tamamlanmasıyla embriyonun dorsale doğru konveks olacak şekilde tamamen dönmesi (86)

Koryoallantoik plasenta 11-12. günlerde aktif hale gelir (81). Sıçanlarda intrauterin yaşamın 8-14. günleri organogenez dönemi olarak bildirilmiştir (88). Sıçanlarda somit oluşumu 9. günün sonunda ve 10. günde başlar ve her gün yeni somitlerin ilave olmasıyla artarak 16. günde tamamlanır. Yaklaşık 65 somitin, 4'ü oksipital, 8'i servikal, 13'ü torakal, 6'sı lumbal, 4'ü sakral, 30'u kaudal bölgede bulunur (89).

Embriyo 10,5 günlükken fark edilebilir yapıdadır. Nöral kabartı, ön barsak, karaciğer tomurcukları, kalp ve somitler belirginleşmiştir. Buna ek olarak allantois eksosölom karşısında gelişerek ekto plasental kon ile birleşir. Aynı zamanda embriyo ventral olarak

konveks olup hemen dönmeye başlar ve kuyruğu kıvrılır. Dönme olayı embriyo 11,5 günlükken tamamlanarak dorsal olarak konveks hale gelir. Embriyo, amniyon kesesi içinde dönerek etrafı amniyon tarafından çevrelenir, aynı zamanda vitellus kesesi gelişir. Böylece hem amniyon hem de embriyo vitellus kesesi içinde gelişir. Sıçan embriyosu yaklaşık 12,5 günlükken bütün organ tomurcukları belirgindir. Bu durum insanlarla karşılaştırıldığında 8. haftaya denk gelmektedir (90). Aynı zamanda embriyo, korio-allantoik plasenta ve damarlanmış vitellus keseli plasenta olmak üzere iki plasentaya sahiptir. Allantoik plasenta gebeliğin son evresinde önemli iken, damarlanmış vitellus kesesi erken embriyonik gelişim esnasında esas besleyici organ olarak görev yapar (91). Organogenezisin önemli kısmı 15. güne kadar devam eder. 16. günde pariyetal vitellus kesesi, trofoblast ve desidua kapsularis rezorbe olur (81).

Reichert zarı 18. güne kadar varlığını sürdürür ve daha sonra yırtılarak plasenta kenarına çekilir. Desidual doku içerisindeki kapiller kanallar, trofoblastlar ile reichert zarı arasındaki sinus benzeri boşluğa girdiği için, gebeliğin ilk aşamalarında vitellus kesesi ile embriyonik endodermi anne kanından ayıran tek yapı reichert zarıdır. Bu zarın bulunması germ tabakalarının inversiyonu kadar gereklidir, böylece koryon diğer türlerde olduğu gibi tüm embriyoyu çevrelemez (87).

2.7.1.Sıçan Visseral Vitellus Kese'sinin Yapısı ve Görevi

Vasküler membran visseral vitellus kesesinde endodermal hücreler tek tabakalı yapı şeklinde oluşturmaktadır. Embriyo ile ektoplasental konu visseral vitellus kesesi bağlamaktadır. Absortif ve mezotelyal olmak üzere iki epitelyum yüzeyden oluşmaktadır. Vitellus kesesi damarlanması mezenşime doğru yönelmektedir. Vitellus damarları ile emilimi yapılan maddeler ile visseral endoderme mezenşimal tabaka içinde iletilmektedir. 15. güne gelindiğinde vitellus kesesinin pariyetal duvarı zayıflamaktadır ve sonra uterinal boşluğun içeriği visseral endoderm ile karışmaktadır (92). Sıçan embriyolarının 10 gününde visseral vitellus kesesi olmadığı için kültürde büyümesi ve gelişmesinin devam edemediği bildirilmiştir (93). Erken organogenez esansında vitellus kesesi anne sıçan ile embriyo arasındaki en büyük taşıyıcıdır (86, 94). Visseral vitellus kesesinin, çevresindeki makromoleküller pinosite etme özelliği vardır. Endodermal hücrelerle makromoleküller lizozoma taşınarak ürün elde edilmektedir ve bu ürünler gelişmekte olan embriyoya gönderilmektedir (95). Bazı proteinler visseral vitellus kesesinin endodermal hücreleri sayesinde alınmakta ve embriyoya vitellus kesesi

damarlarından geçerek ulaşmaktadır. Taşıma fonksiyonunun yanı sıra visseral vitellus kesesi, aynı zamanda immünolojik, hematopoetik ve metabolik fonksiyonları da yerine getirmektedir (96).

2.7.2. Anjiogenez

Kılcal damarlardan tomurcuklanma şeklinde yeni kılcal damar oluşmasına anjiogenez denilmektedir. Büyüme ve gelişme ile yara iyileşmesi sırasında yeni kılcal damarların oluşmasını sağlamaktadır. Tümör oluşumu ve embriyonik gelişim gibi patolojik ve fizyolojik durumda ortaya çıkmaktadır. Doku hipoksisine karşı uyum cevabı olarak meydana gelmektedir. Anjiogenez, prematüre damar ağının düzeltilmesi aşamasında devam eden morfojenik değişimlerle, yeni damarsal dalların oluşmasıyla ve son aşamada damarların yerine oturmuş olmasıyla tanımlanmaktadır (97). Anjiogenez; hücre hipertrofisi veya proliferasyonu süresince oluşan oksijen desteği ve ihtiyacı için lokal doku perfüzyonunu sağlamakta önemli bir role sahiptir. Ayrıca anjiogenik tomurcuklanma ve kılcal bölünme olmak üzere iki yolla gerçekleşmektedir. Anjiogenezde kılcal bölünme, temel oluşum mekanizması olarak kabul edilmektedir. Kılcal damar oluşumunu temelde etkileyen yapı aktif endotel hücreleridir. Bu hücre kılcal damarın lümen kısmından bölünüp iki yeni kılcal damar meydana getirmektedir (98, 99). Aktif olan endotel hücrelerinin etrafındaki matriks dokusuna doğru endotel zinciri kurarak tomurcuklanmasıyla yeni damarların meydana getirilmesine anjiogenik tomurcuklanma denilmektedir (100, 101). Anjiogenezi engelleyen ve arttıran faktörler arasındaki denge bozulduğunda anjiogenezde artma veya azalma görülebilmektedir (102). Bazı koşullarda karşılaşılan yaralanmaların iyileşmesinde veya doku hasarlarında anjiogenez önemlidir. Ayrıca ovulasyon sırasında korpus luteum gelişimi, dişi üreme sisteminde folikül oluşumu ve plasenta gelişimi anjiogeneze bağlıdır. Ateroskleroz, diyabetik retinopati ve solid tümör gelişiminde ise kontrolsüz anjiogenez görülmektedir (103, 104). Fizyolojik koşullarda anjiogenez yaşlı dokular ve embriyonik organlarda farklı şartlarda (özellikle hipoksi, egzersiz vs) kılcal ağın çoğalmasını sağlamaktadır (101, 105, 106).

2.7.3. Vaskülogenez

Vaskülogenez embriyonal yaşamları sınırlanmış olup anjioblastların (endotel hücrelerinin prekürsörü) kan adacıklarına dönüşmesiyle vasküler yatağın meydana gelmesi anlamına gelmektedir (107, 108). Çok yönlü ana hücreler olan anjioblastlar

farklılaşarak primer pleksustan (ilk ağ) kılcak ağ oluşturur. Bu ilk oluşan ağ anjiogenez yoluyla organlar içinde yayılmakta ve böylelikle embriyonik dokuların primitif vaskülaritesini meydana getirmekle görevli olduğu bilinmektedir. Vaskülogenezin; embriyonal hayatın başlangıcından sonra damarların, organ ya da dokularda kendiliğinden oluşmasına karşılık geldiği bildirilmektedir. Embriyonal hayatta oluşan büyük venler, aort gibi damarların meydana gelmesi vaskülogenez yoluyla gerçekleştiği rapor edilmiştir (109). Vaskülogenezin sadece embriyonal dönemde olduğu bildirilmiştir fakat son yıllarda yapılan çalışmalar postnatal yaşam süresince gerek fizyolojik gerekse patolojik şartlarda devam ettiğini gösteren bilgiler mevcuttur (110). Arterler ve venlerin oluşması embriyonik dönemde ortaya çıkmakta ve bu süreç çoğu organda postnatal yaşam boyunca süregelmektedir (111, 112).

2.7.4. Embriyoda Erken Dönem Damar Gelişimi

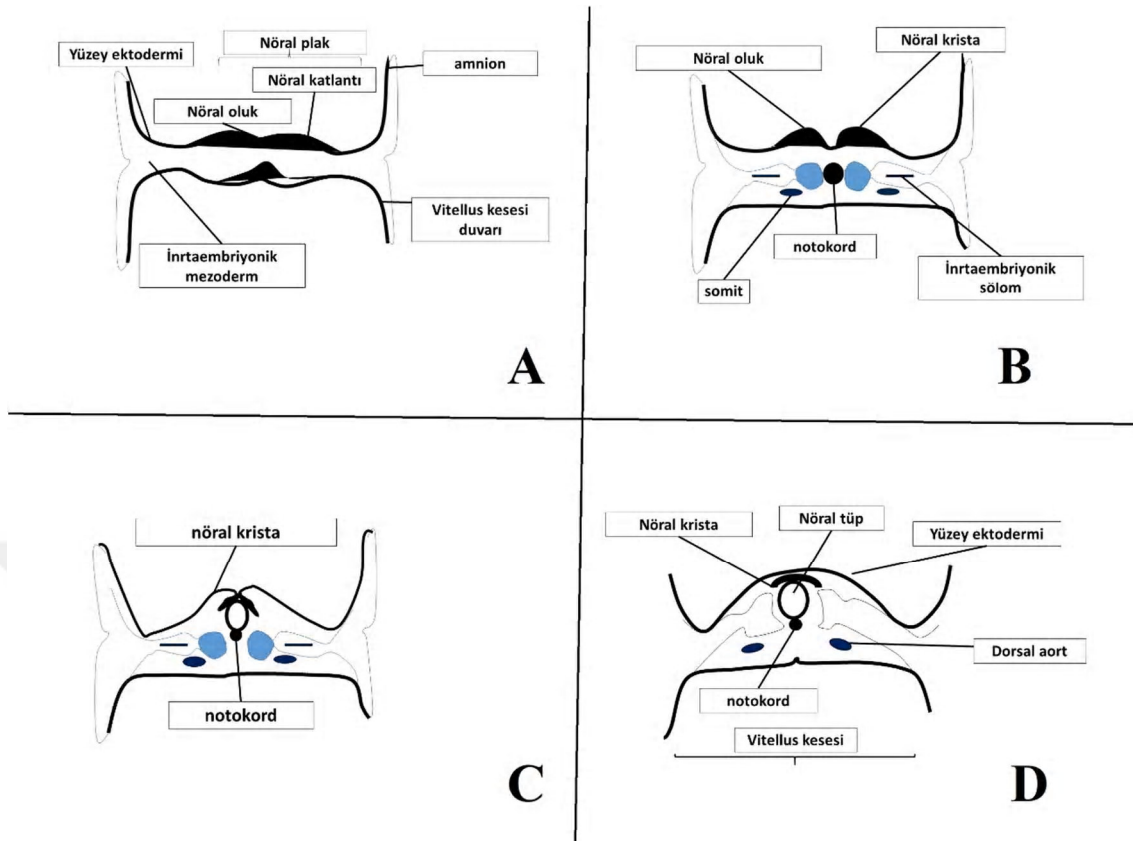
Embriyonik gelişimin ilk dönemlerinde, pek çok organ damarsız olarak gelişmeye başlamaktadır. Bu organların gelişiminin, damar kanallarının ve kılcak damar ağının şeklen ortaya çıkmasıyla aynı zamanda olduğu belirlenmiştir. Gelişimi devam eden pek çok organ için bu olay çok önemlidir (113). Kardiyovasküler sistem; embriyoda metabolik ihtiyaçların karşılanması için gelişen ilk aktif sistemdir (114, 115). Ekstraembriyonik damarlanma, embriyodaki damarlanmadan önce ve bağımsız olarak gelişerek dolaşımın sürekliliğini sağlamaktadır (116). Damar endoteli ve kan hücreleri embriyoda farklı bölgelerde yerleşmiş olan mezensefal hücre gruplarından meydana gelmektedir. Somitler gelişmeye başladığında, vitellus kesesi üzerinde kan adacıkları görülmeye başlamaktadır. Kan adacıklarının ortasında kalan hücreler kan adacıklarını meydana getirirken çevrede kalan hücreler ise farklılaşarak endotele dönüşmektedir. İlk damar ağ kan adacıkları birleşmesi ile oluşturur (117, 118). Endotel hücrelerinin değişime uğraması embriyo içinde de devam etmektedir. Embriyodaki kan damarları vaskülogenez ve anjiogenezle şekle bürünmektedir. Değişime uğrayan anjioblastlar mezoderm içinde ilk kılcak ağ oluşturur. Sonrasında büyük damarlar (dorsal aort ve aortik arklar) birleşerek yeni büyük damarları meydana getirmektedir. Endodermal organların damarlanması (örneğin; mide, akciğer, pankreas ve bağırsak gibi) endotel hücrelerin değişime uğraması ile oluşmaktadır (119). Sıçanlarda kan damarlarında gelişimi, mezodermal germ tabakası şekillenmesiyle (yaklaşık olarak gebeliğin 9,5. gününde) başlamaktadır (118). Somitler gelişmeye başladığında kan adacıkları vitellus

kesesinin duvarında gelişmeye devam etmektedir ve embriyoda gelişmekte olan damarlarla bağlantısı bulunmamaktadır. Kan damarları şekle büründükten sonra bu damarların birleşmesi sonucunda ilk damar ağı oluşmaktadır (120, 121). Rudimenter halde olan kalp, embriyo 6 somite ulaştığında hızlı bir şekilde gelişmeye ve değişmeye başlamaktadır. İlk olarak embriyonun ön kısmındaki mezoderm tabakasında kalınlaşma gözlemlendiği bildirilmektedir. Sadece mezodermal hücreler birleşerek endotel tüpü meydana getirmektedir. Bu tüp, dorsal aortaları oluşturacak olan birinci aortik arkusla devam etmektedir. 9. günde ortaya çıkan ön kardinal ven, nöral tüpün kapiller ağından gelen kanı almaktadır. Dorsal aort somit dizisinin ventralinde görüldüğü bildirilmektedir. Kalp bundan sonra kan dolaşımını devam ettirebilme yeteneğine kavuşmaktadır (122). Gebeliğin 11-12. gününde plasental dolaşımın oluşmasıyla besleyici molekülleri vitellus kesesinden embriyoya damarlar aracılığıyla iletilmektedir. (123).

2.7.5. Nörolasyon (Nöral Tüpün Oluşumu)

Gastrulasyonun sonunda gelişmekte olan embriyo dışta "ektoderm" ortada "mezoderm" ve içte "endoderm" olarak üzere üç temel hücre tabakasından farklılaşmaktadır. Endoderm tabakasından gastrointestinal kanal, akciğerler ve karaciğer gibi organlar gelişmektedir. Mezoderm tabakasından ileri dönemde kaslar, bağ doku ve vasküler sistem meydana gelmektedir ve ektoderm tabakasından ise sinir sistemi geliştiği bildirilmektedir. Ayrıca nöroektodermden göç eden nöral krista hücrelerinden; kranial (5. 7. 9. 10.) ve spinal hücreler, yutak kavisleri, otonomik ganglionlar, adrenal medulla, bağ dokusu ve kaslar, dermisin pigment hücreleri, beyin ve omuriliği kaplayan zarlar köken almaktadır (124, 125). Ektoderm tabakasının farklılaşması "nörolasyon" ve "nöral krista" olarak iki bölümde incelenmektedir. Gelişim süreci olarak tarif edilen "Nörolasyon" memeli embriyolarında dört aşamada meydana geldiği bilinmektedir. Bu aşamalar sırasıyla; nöral plak oluşumu, nöral plak şekillenmesi, nöral plak bükülmesi ve son olarak nöral oluk kapanması şeklindedir (Şekil 2.7) (124, 125). Notokord, embriyolojik gelişmenin üçüncü haftasının sonuna doğru kolumnar ektoderm hücrelerini nöroepitel hücrelere değişmeleri yönünde indükler ve bu hücreler kaşık biçimli, nöral plak olarak adlandırılan kalınlaşmayı oluşturmaktadır. Nöral plağın ön kısmından beyin taslağı gelişirken arka kısmından nöral tüp gelişmektedir. Nöral plağın yan sınırları nöral katlantıları şekillendirirken, plağın orta hattı çökerek nöral oluğu

oluşturur. Kolumnar nöroepitelde meydana gelen farklılaşma sonucu nöral plak kıvrılır. Notokordun üzerini örten hücreler bazal yüzleri bazal laminaya oturan kama, ya da takoz şeklini almaktadır. Bu değişiklikler nöral plağın, ventral eksenini orta hatta yerleşen “V” şeklinde bir yapıya (nöral oluk) farklılaşmasına yol açar. Yüzey ektoderm hücreleriyle temas halinde nöroepitel hücreleri de tepeleri bazal laminaya bakacak şekilde yerleşen kama biçimini kazanırlar. Nöral katlantıların iç taraflarındaki hücre çoğalması, bu yapıların orta hat boyunca tedrici olarak birbirlerine yaklaşarak kaynaşmaları ve nöral tüpün şekillenmesiyle sonuçlanmaktadır. Nöral tüpün kapanması 4. somit seviyesinde başlar ve bu noktadan itibaren ön (kranial) ve arka (kaudal) doğru bir fermuarın kapanması gibi ilerler. Nöral tüpün bir süre daha varlığını sürdüren ön (kranial) ve arka (kaudal) uçlarındaki delikler ön (rostral) nöropor ve arka (caudalis) nöropor olarak isimlendirilir. Nöroporların kapanmasına az bir zaman kala nöral kanal amniyon boşluğuyla direkt bağlantısı mevcuttur. Beyin ve medulla spinalis bu evrede sınırlı vasküler destek aldığından, bu yapıların besin maddelerini amniyon sıvısından nöroporlar yoluyla sağladıkları görülmektedir. Ön (rostral) nöropor embriyonik dönemin ortalarına doğru kapanırken, arka (caudalis) nöropor daha geç kapanır. Nöral oluğun kapanmasıyla oluşan nöral tüp yüzey ektodermiyle bağlantısını kaybederek yüzey ektodermin hemen altında yerleşir. Nöroektodermin katlanmasıyla nöral tüpün gelişmesi olayı olan “primer nörolasyon” ön (rostral) nöropordan arka (caudalis) nöropora doğru ilerlemektedir (126).



Şekil 2.7. Nöral tüp ve nöral krista hücrelerinin oluşumu. A) Embriyonun transvers görünümünde erken nöral oluk oluşumu. B) Embriyonun yaklaşık 22. günündeki dorsal görünümü. Nöral oluk karşıt somitler hizasında birleşir ve nörol oluğun her iki ucuna doğru birleşme ilerler. C) Nöral tüpün ilk kapanma bölgesi gelecekte beyin ve omiriliğin bağlantı noktasına denk gelir. D) Nöral tüpün oluşum evreleri ve yüzey ektoderminin ayrılması.

Gelişmekte olan embriyonun sakral ve kaudal bölgelerindeki nöral tüp, "sekonder nörolasyon" denen olayla şekillendiği bildirilmektedir. Gelişmekte olan embriyonun ön (kaudal) bölgesindeki primitif oluktan köken alan, ortasında boşluk bulunmayan solid bir mezenşimal hücre kordonu, nöral tüpün kapalı olan arka (kaudal) ucuyla kaynaşmaktadır. Bu hücre kordonunda kavitasyon olayı ile şekillenen merkezi boşluk, primer nörolasyon sırasında ortaya çıkmış olan nöral kanal ile devam etmektedir.

Sekonder nörolasyonla medulla spinalis'in oluştuğu bölümünün uzunluğu kaudal vertebraların sayısına bağlı olduğundan, uzun kuyruklu hayvanlarda uzun, yüksek yapılı primatlarda ise kısa olduğu bilinmektedir (126). Sıçanlarda intrauterin hayatın 8-14. günleri organogenez dönemi olduğu kabul edilmektedir (88). Sinir sisteminin başlangıcı

anlamına gelen nöral tüp oluşumu 7-7,5. günde gerçekleşirken tam anlamıyla nöral tüpün kapanması ise 10. günde gerçekleşmektedir (127). Sıçanlarda ayırt edici özellik olarak spinal cord, dorsal yarığın alt kısımlarında pyramidal şekilli kortikospinal iplikler içermektedir (89).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, ilgili projeye Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulunun 13.01.2016 tarih ve 16/001 nolu karar ile onay aldıktan sonra başlatılmış ve çalışma süresince yapılan tüm işlemler etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (TYL-2016-6585) tarafından desteklenmiştir.

Hayvanların bakımı Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel Araştırmalar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) ve laboratuvar çalışmaları Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmıştır.

3.1. DENEYDE KULLANILAN MALZEMELERİN LİSTESİ

3.1.1. Sarf Malzeme

Dietileter (5 lt) – (Sigma-Aldrich/Lot #SZBF0430V)

Hanks' Balanced Salt Solution (with sodi) – (Sigma-Aldrich/Lot RNBD7977)

Penicillin - Streptomycin (20ml) – (Sigma-Aldrich/Lot #046M4846V)

Folik Asit (5 gr) – (Merck KGaA Cas No 59-30-3 K46803884 609)

Steril Distile Su (500 ml)

0,22 µm'lik Filtre – (Minisart Syringe Filter/Lot 60747103)

Cam Kültür Şişesi (60 ml)

Çelik Forceps (0.2 mm - stainless - titanyum)

Pens (115 mm - sivri/düz, küt uçlu/düz - tırtıklı, küt uçlu/düz – tırtıklı)

Makas (160 mm - düz, 130 mm - küt/sivri, 130 mm - sivri/sivri)

Filtreli Pipet Ucu (0,1-10ul, 0,5-20ul - steril)

Falkon Tüpü (15 ml, 50 ml)

Pasteur Pipeti (3 ml - steril)

Enjektör (1, 10 ml)

Beher - Cam - Kısa Form (100 ml, 250 ml, 600 ml, 1000 ml)

Mikro Pipet Ucu (0,1-1 mikrolitrelik - filtresiz)

%70'lik Etil Alkol

Tüp Standı (kirpi model - 25 delikli - 50 ml tüp/90 tüp kapasiteli - 13 mm çaplı)

3.1.2. Demirbaş Malzeme

Stero Mikroskop - (Nikon SMZ 800)

Fiber Optik Ring Aydınlatma - (Nikon SMZ 800 Model Stereo Zoom Mikroskop Uyumlu 12v-150w)

Oküler Mikrometre - (Nikon SMZ 800)

Fotoğraf Makinesi – (Nikon 5.0 mega pixels 8xZoom ED)

Santrifüj Cihazı – (Gyrozen 1580)

Su Banyosu - Nuve NB 20

No-Frost Buzdolabı (-20°C,+4°C)-(Beko)

Lamin-air Flow – (Telstar AH-100)

Etüv İnkübatör – (N-Biotek NB-201L)

Roller İnkübatör – (Selectia Movil-ROD)

Oksijen tüpleri - (%5 O₂,%5 CO₂,%90 N₂ - %20 O₂,%5 CO₂,%75 N₂ - %40 O₂,%5 CO₂,%55 N₂)

Hassas Terazi – (Radwag WTB 3000)

Düz Satıh (40x60cm²)

3.2. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ

Bu çalışmada DEKAM'da yetiştirilen 4-10 aylık Wistar albino (150-250 gr) türü dişi sıçanlar kullanıldı. Kafesler içinde tutulan sıçanların 21°C sıcaklıkta ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamda su ve besin ihtiyaçları sağlanarak, kafes içi temizlikleri yapıldı. Dişi sıçanlar çiftleştirilerek embriyoları kültür ortamında kullanılırken, aynı zamanda dişi ve erkek sıçanların tamamı embriyoların yetiştirilmesinde gerekli olan serumun elde edilmesi için kullanıldı. Bu işlemler sırasıyla anlatıldı.

1.Aşama: 1 dişi sıçan ve 1 erkek sıçan çiftleştirilmek üzere bir gece boyunca (17.00 ile 08.00 arasında) aynı kafeste tutuldu.

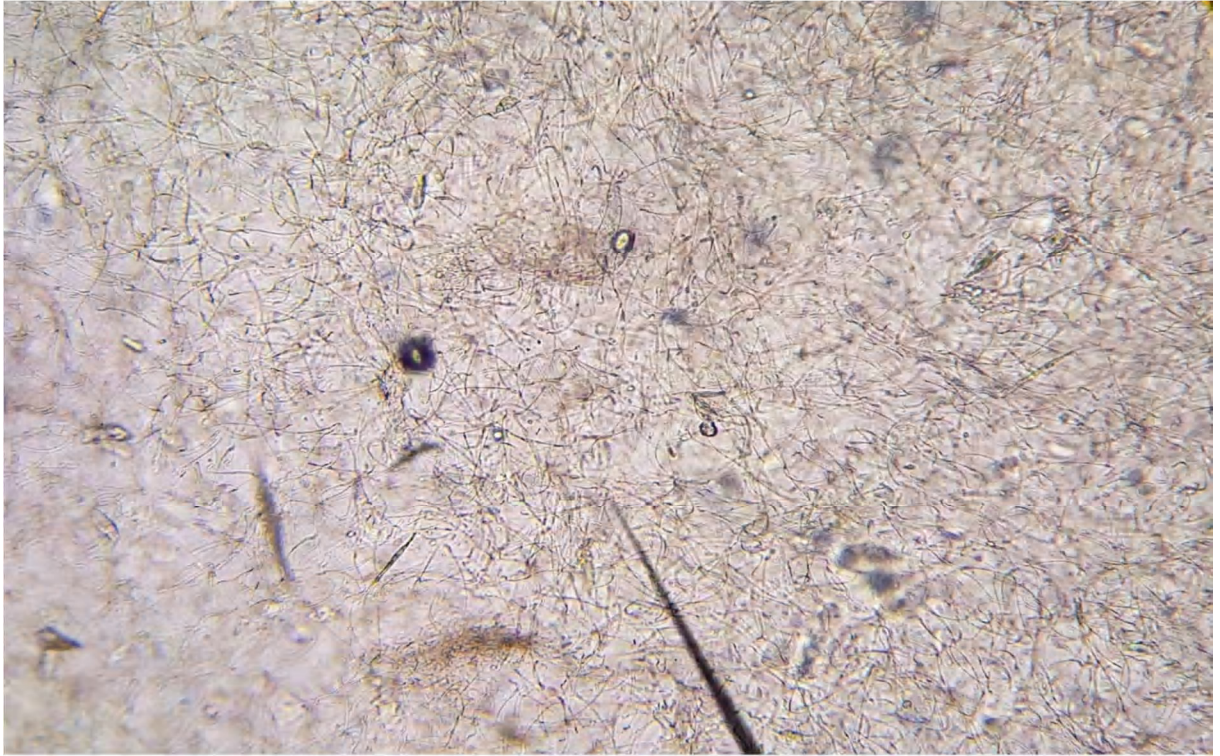
2.Aşama: Hayvanlar karanlık periyodun ortasında çiftleşmeye meyilli olduklarından ertesi sabah 08.00'de erkeklerden ayrılan dişi sıçanlardan vaginal smear bakıldı. Vaginal smear bakılırken bir yardımcı tarafından dişi rat sıkıca tutuldu. İşlem öncesinde bir kaba serum fizyolojik sıvısı eklendi. Her bir dişi rat için farklı bir pipet kullanıldı. Pipete bir miktar serum fizyolojik çekildikten sonra bu sıvı dişi rat'ın vaginasına boşaltılıp tekrar pipetin içine çekildi (Resim 3.1).

3.Aşama: Pipetin içine çekilen bu sıvı temiz bir lam (ince mikroskop camı) üzerine döküldü. Bu lamı mikroskop altına yerleştirilip sperm olup olmadığı kontrol edildi. Daha sonra bu lamı ve pipeti kullanılmışlar arasına atarak işleme yeni bir pipet ve yeni bir lam ile devam edildi (Resim 3.1,Resim 3.2).

4.Aşama: Vaginal smear'de sperm görülen dişi sıçanlar 0,5 günlük hamile kabul edilerek ayrı bir kafese alınıp normal diyet ile 9 gün beslenerek bekletildi.



Resim 3.1. Smear alınması A: Pipet ile vajinal örnek alınması, B: Alınan örneği lam üzerine damlatılıp sperm görme aşaması



Resim 3.2. Mikroskop altında sperm görüntüsü

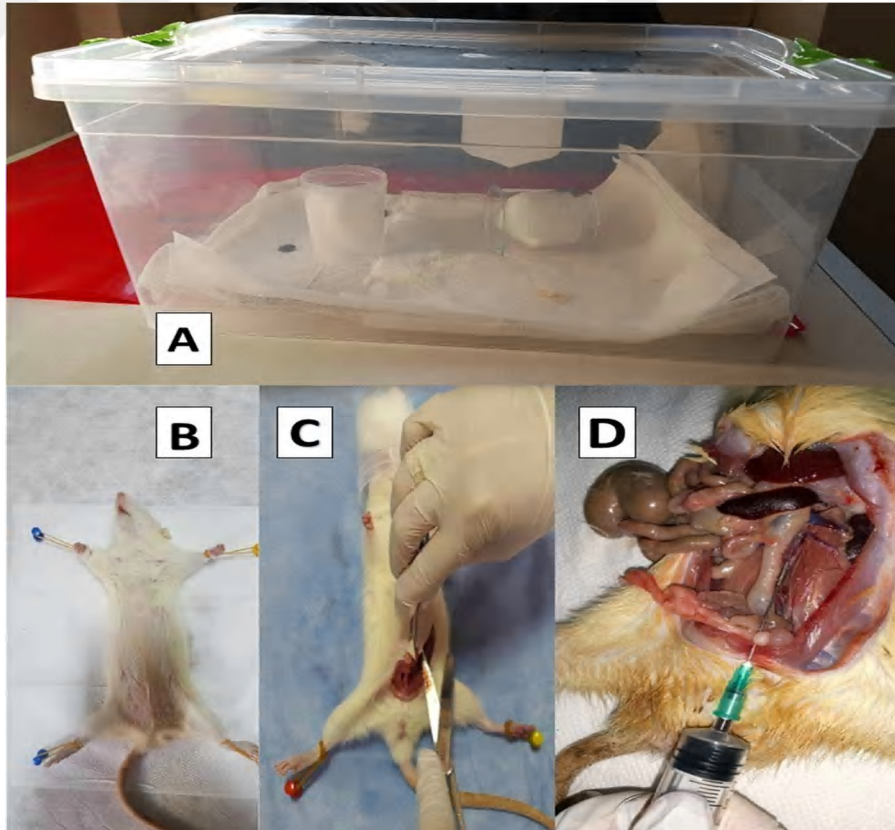
3.3. EMBRİYO KÜLTÜRÜ

3.3.1. Kültür Ortamının (Serum) Hazırlanması

1.Aşama: Embriyoların yetiştirilmesi için kültür mediyumu oluşturulması amacıyla 8-10 aylık erkek (300-350 gr) sıçanlara eter anestezi uygulandı. Anestezinin gerçekleşip gerçekleşmediği göz refleksi ile kontrol edildi. Göz refleksi kaybolan sıçanlar anestezi ortamından alındı (Resim 3.3).

2.Aşama: Anestezi ortamından alınan sıçanlar düz bir satıh üzerine sırt üstü yatırıldı ve ön ve arka ayakları gergin olacak şekilde düz satıh üzerine paket lastiği yardımıyla sabitlendi. Karın duvarı %70'lik etil alkol ile temizlendi (Resim 3.3).

3.Aşama: Sıçanın karın ön duvarı steril pens ve makas yardımıyla sıçanın pubis seviyesinden 'V' şeklinde kesilerek karın açıldı. Karın içi organlar sıçanın sağ tarafına itilerek aorta abdominalis görünür hale getirildi. Enjektör ile kan almak için bifurcatio aortadan giriş yapıldı. 10 ml'lik enjektör yardımıyla hayvanın yaşına ağırlığına göre değişim göstermesine rağmen alınabildiği kadar (yaklaşık 8-10 ml) kan alındı (Resim 3.3).



Resim 3.3. Kan alınma işlemi A) Sıçana anestezi verilmesi, B) Sıçanın kesime hazırlanması, C) Sıçanın kesilmesi, D) Kan alınma işlemi

4.Aşama: Kan alınır alınmaz 3000 rpm'de 5 dakika (dk) santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra serumlar görsel olarak değerlendirildi. Yağ oranı fazla olan, hemoliz olan serumlar veya gözle görülür şekilde renk bozukluğu olan serumlar embriyo gelişimini olumsuz etkileyeceği düşünüldüğü için deneye dahil edilmedi (Resim 3.4).

5.Aşama: Bu işlem bittikten sonra 'Lamin-air flow' altında serum steril pasteur pipeti ile çekildi. Çekilen serum 15 ml'lik falkon tüpüne konuldu. Sonrasında 56°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda içerisinde serum bulunan falkon tüpleri 30 dk bekletildi (Resim 3.4).



Resim 3.4. Serum elde edilmesi A) Santrifüj edilmesi, B) Serumların ayrılması, C) Proteinlerin çöktürülmesi, D) Lamin-air flow altında serumun filtreden geçirilmesi

6.Aşama: Bu süre dolduktan sonra serumlar 0,22 μm 'lik filtreden geçirildi. Serumun miktarına göre 100 IU/ml penisilin ve 100 ug/ml streptomisin karışımından (Her 1 ml'lik seruma 10 μl penicilin/streptomisin olacak şekilde) eklendi. Bu işlemler yine 'Lamin-air flow' altında gerçekleştirildi (Resim 3.4)

7.Aşama: Serum hazırlandıktan sonra ortalama -20°C 'ye kaldırıldı.

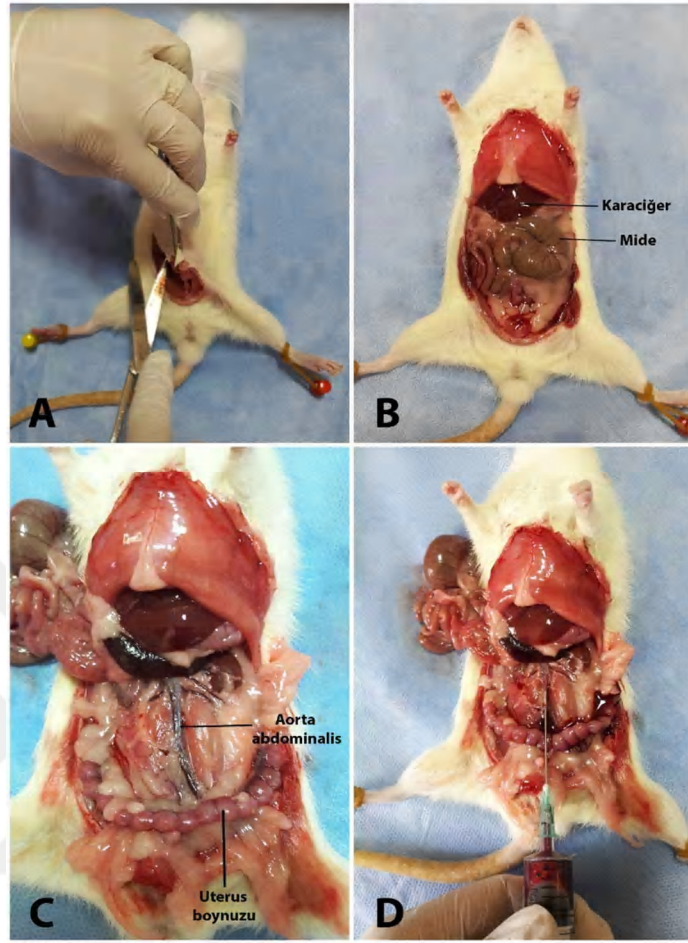
8.Aşama: Serum kullanılacağı zaman su banyosunda ya da etüvde 37°C 'de bekletildi ve kullanıma hazır hale getirildi. Kullanıma hazır sıcaklığa gelen serumlar 0,22 μm 'lik filtreden geçirildi.

3.3.2. Embriyoların Anne Karnından Çıkarılışı Ve Kültürü

1.Aşama: Daha önce smear bakılan ve gebe olduğu varsayılan dişi sıçanlara eter ile anestezi uygulandı. Anestezinin gerçekleşip gerçekleşmediği göz refleksi ile kontrol edildi. Göz refleksi kaybolan sıçanlar anestezi ortamından alındı (3.3).

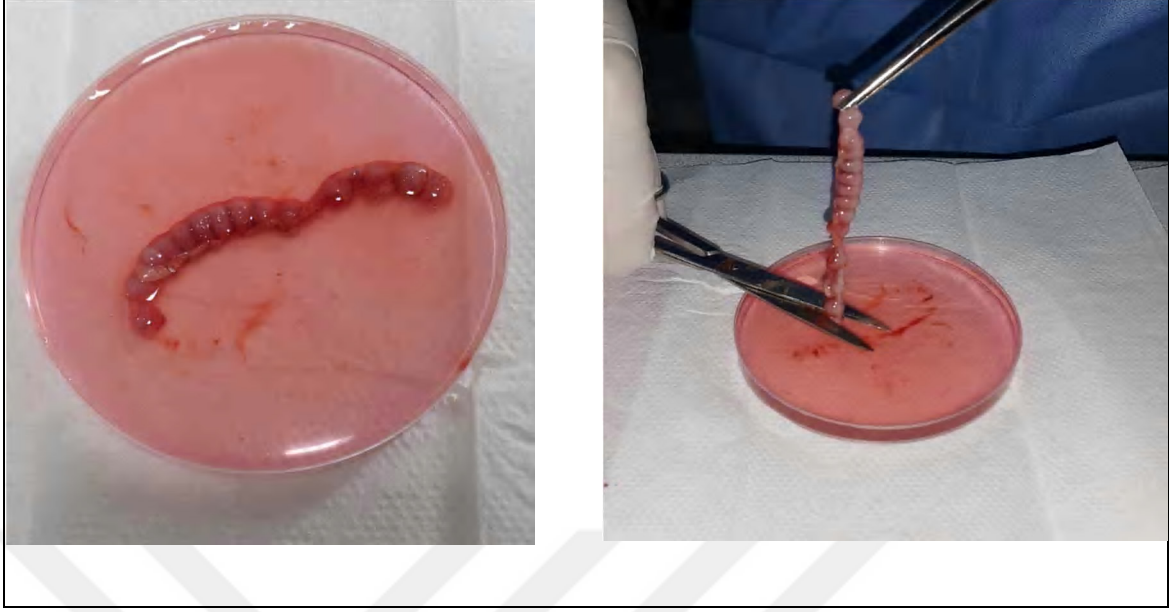
2.Aşama: Anestezi ortamından alınan sıçanlar düz bir satıh üzerine sırt üstü yatırıldı ve ön ve arka ayakları gergin olacak şekilde düz satıh üzerine paket lastiği yardımıyla sabitlendi. Karın duvarı %70'lik etil alkol ile temizlendi (Resim 3.3).

3.Aşama: Sıçanın karın ön duvarı steril pens ve makas yardımıyla sıçanın pubis seviyesinden 'V' şeklinde kesilerek karın açıldı. Karın içi organlar sıçanın sağ tarafına itilerek aorta abdominalis görünür hale getirildi. Enjektör ile kan almak için bifurcatio aortadan giriş yapıldı. 10 ml'lik enjektör yardımıyla hayvanın yaşına ağırlığına göre değişim göstermesine rağmen alınabildiği kadar (yaklaşık 8-10ml) kan alındı. Kan alım işlemi uygulandıktan sonra daha önce anlattığımız serum elde edilmesi aynı şekilde uygulandı. Daha sonra embriyo diseksiyonu ve kültüre edilme işlemine geçildi (Resim 3.3, Resim 3.5).



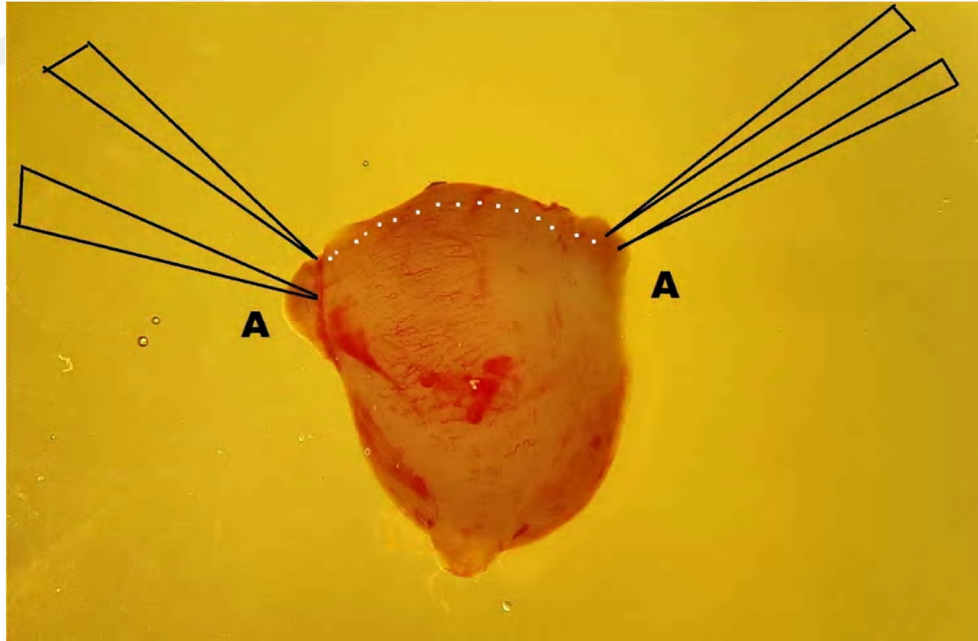
Resim 3.5. Sıçan diseksiyonu A) Karın ön duvarının kesilmesi, B) Karın ön duvarı kaldırılması, C) Aorta abdominalis ve embriyolar, D) Aorta abdominalisten kan alınması

4.Aşama: Uterus boynuzunda yerleşmiş embriyolar zarar verilmeden tutularak Hanks solüsyonu (Hank's Balanced Salt Solution =HBSS) bulunan steril bir petri kabı içerisine transfer) edildi. Sayıları 6-16 arasında değişen embriyolar steril bir makas ve pens yardımı ile tek tek birbirlerinden ayırt edildi. Bu aşamadan sonraki bütün işlemler 'Lamin-air flow' kabin içerisinde yarı steril olarak stero mikroskop altında gerçekleştirildi (Resim 3.6).



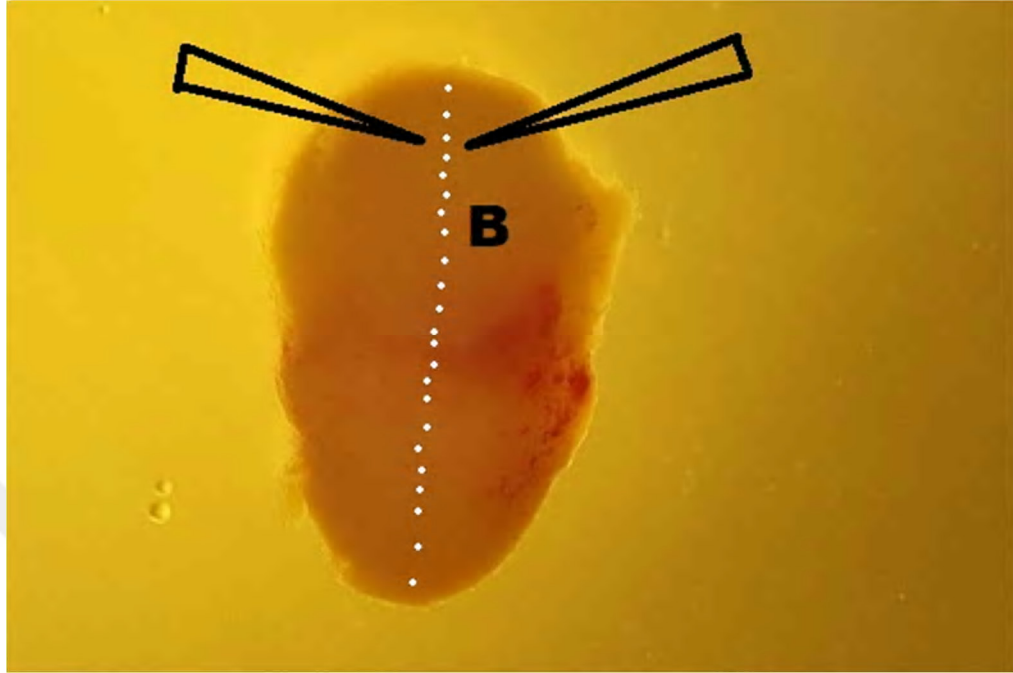
Resim 3. 6. Uterusun ayrılma işlemi

5.Aşama: Steril bir çift forceps yardımı ile uterus boynuzundan girilerek uterus kasi (endometriyum) antimezometrial kenar boyunca dikkatlice açıldı (Resim 3.7).



Resim 3.7. Desiduanın ortaya çıkarılması

6.Aşama: Desidual doku açığa çıkarılarak dar olan kutbundan tutuldu, diğer geniş olan kutbun ortasına girilerek uzunlamasına insizyon yapıldı (Resim 3.8).



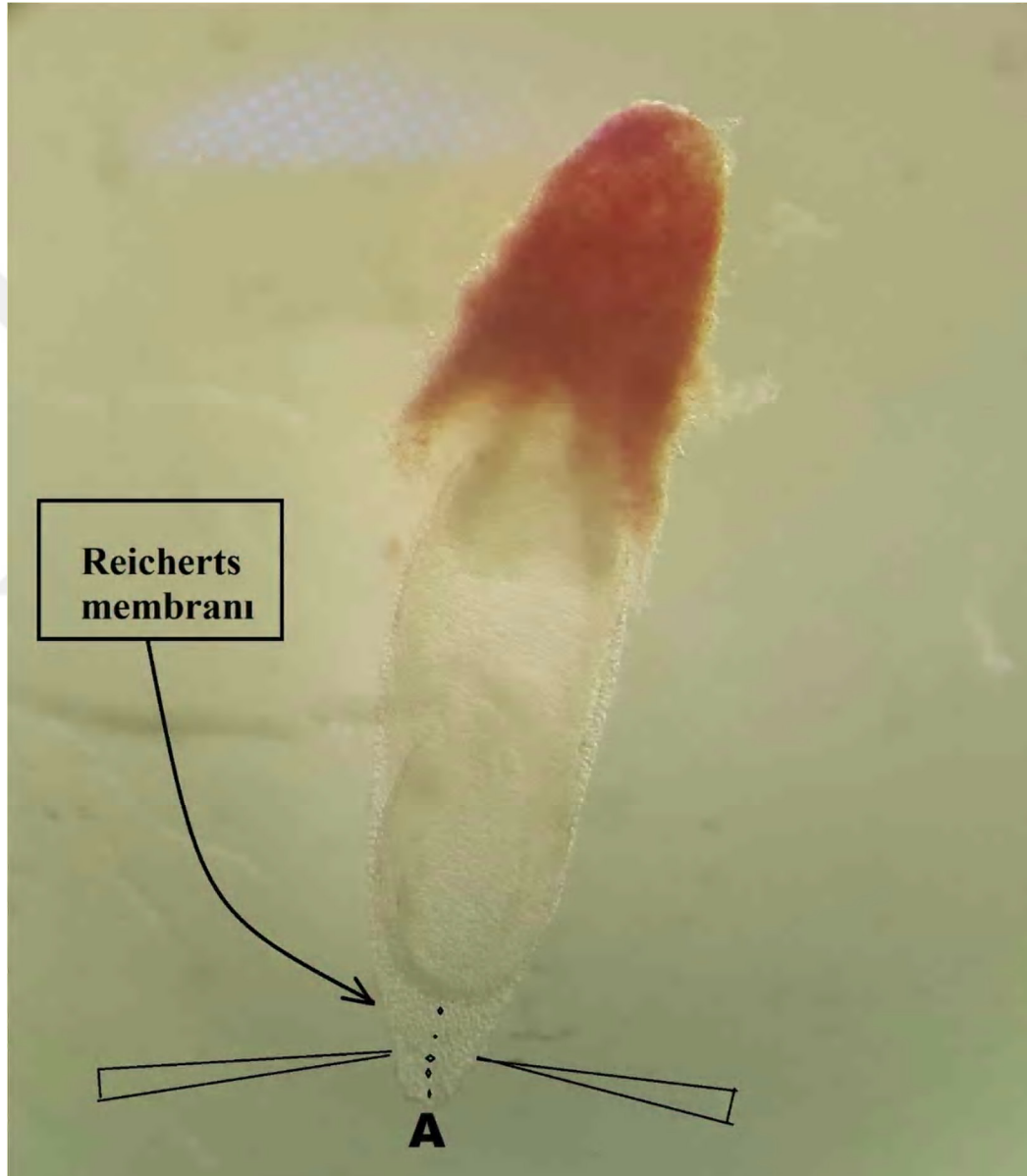
Resim 3.8. Desidua

7.Aşama: Daha sonra boyuna iki eşit parçaya ayrıldı ve desiduanın dar olan kutbuna yerleşmiş olarak bulunan embriyo, desidual dokudan forceps yardımıyla yavaş yavaş kazıma suretiyle embriyoya zarar vermeden uzaklaştırılarak görünür hale getirildi (Resim 3.9).



Resim 3.9 Desiduada embriyonun görünümü

8.Aşama: Kemirgenlerde bulunan embrioyu çepeçevre sarmış olan Reicherts membranı kültür ortamında embriyonun büyümesini engellediğinden embriyonal kutuptan steril forceps yardımıyla çıkarıldı. Bu işlem bütün embriyolara dikkatli bir şekilde uygulandı ve işlemin sonunda embriyolar içerisinde HBSS bulunan küçük steril petri kabına alındı (Resim 3.10, Resim 3.11).



Resim 3.10. A) Reicherts membranı çıkarılması



Resim 3.11. Sıçan embriyosu A) Reicherts membranı çıkarılmamış embriyo, B) Reicherts membranı çıkarılmış embriyo

3.3.3. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışma biri kontrol ve beşi deney grubu olmak üzere toplam 6 gruba ayrıldı. Her bir grupta 10 embriyo olacak şekilde toplam 60 embriyo kullanıldı.

- 1) **Kontrol Grubu (K):** 10 embriyo; (1. gün %5 O₂, 2. gün %20 O₂, 3. gün %40 O₂)
- 2) **Düşük Doz Folik Asit Grubu (DDFA):** 10 embriyo+1mmol FA; (1. gün %5 O₂, 2. gün %20 O₂, 3. gün %40 O₂)
- 3) **Yüksek Doz Folik Asit Grubu (YDFA):** 10 embriyo+2mmol FA; (1. gün %5 O₂, 2. gün %20 O₂, 3. gün %40 O₂)
- 4) **Hipoksi Grubu (H):** 10 embriyo; (1. gün %5 O₂, 2. gün %5 O₂, 3. gün %40 O₂)
- 5) **Hipoksi Düşük Doz Folik Asit (HDDFA):** 10 embriyo+1mmol FA; (1. gün %5 O₂, 2. gün %5 O₂, 3. gün %40 O₂)
- 6) **Hipoksi Yüksek Doz Folik Asit (HYDFA):** 10 embriyo+2mmol FA; (1. gün %5 O₂, 2. gün %5 O₂, 3. gün %40 O₂)

3.3.4. Folik Asit Dozlarının Hazırlanması

Bu çalışmada uygulanan FA dozu Parri Wentzel ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan embriyo kültürü çalışması referans alınarak 1 mmol-2 mmol olarak belirlendi (12). FA'nın molekül ağırlığı 441,40 gram/mol'dür (40). 500 ml steril distile su

içerisinde 2,207 gram FA çözüldü ve bu çözeltide belirli oranlarda alınarak içinde serum bulunan kültür şişelerine ilave edildi. 555,5 mikrolitre (μl) çözelti ile 5 ml'lik sıçan serumu karıştırıldığında son karışım içindeki FA oranı 1 mmol olarak hesaplandı. 1250 mikrolitre (μl) çözelti ile 5 ml'lik sıçan serumu karıştırıldığında son karışım içindeki FA oranı 2 mmol olarak hesaplandı. 1 mmol FA olan çalışma gruplarına 555,5 mikrolitre (μl) çözelti, 2 mmol FA olan çalışma gruplarına ise 1250 mikrolitre (μl) çözelti ilave edildi.

3.3.5. Embriyoların Kültüre Edilmesi

Zarar gören ya da gelişimi geri olan embriyolar kültür ortamına alınmadı. Daha önceden -20°C 'ye konulan serumlar embriyo diseksiyonu sırasında çıkarılarak çözüldü.

1.Aşama: Sağlam embriyolar beşerli gruplar halinde içerisinde her bir embriyo için 1 ml serum (1 embriyo/1 ml serum) olacak şekilde toplamda 5 embriyo 5 ml normal sıçan serumu bulunan 60 ml'lik steril şeffaf cam kültür şişelerine steril bir cam Pasteur pipeti yardımıyla konuldu.

2.Aşama: Çalışmamızda embriyolara Oksijen verilmesi aşamasında toplam 3 gaz karışımı uygulandı.

1.Gaz Karışımı: %5'lik O_2 , %5'lik CO_2 , % 90'lık N_2

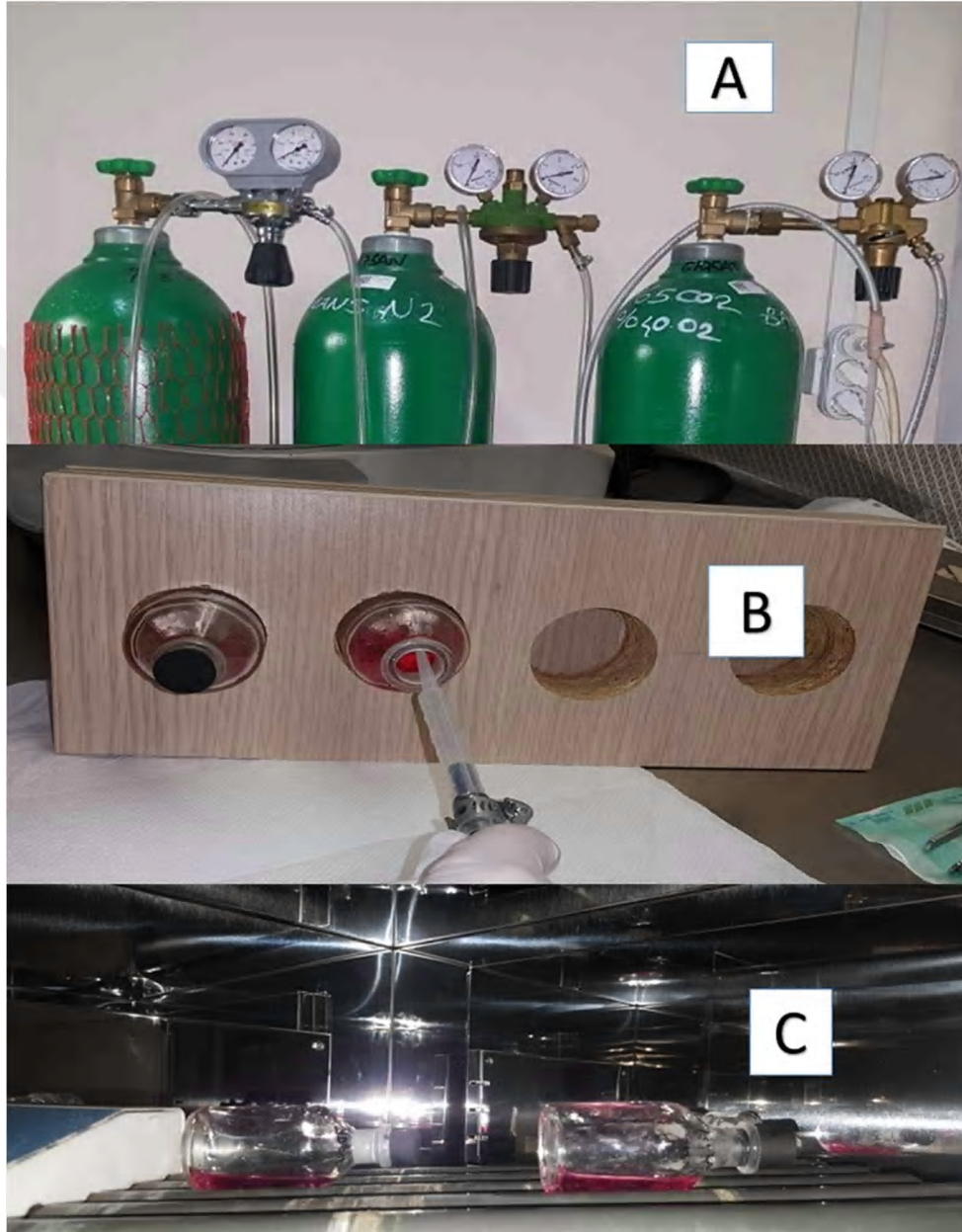
2. Gaz Karışımı: %20'lik O_2 %5'lik CO_2 , %75'lik N_2

3. Gaz Karışımı: %40'lık O_2 , %5'lik CO_2 , %55'lik N_2

Embriyolar kültür şişelerine alındıktan hemen sonra %5'lik O_2 , %5'lik CO_2 , % 90'lık N_2 içeren (1. gaz karışımı) gaz karışımı ile 1 dk gazlama yapıldı. Gazlama işlemi biter bitmez, şişelerin ağzı steril mantar tıpa ile sıkıca kapatıldı ve 37°C 'lik inkübatöre konuldu. Kültür şişeleri dakikada yaklaşık 30 devirle (30rpm/dk) dönen rollere yerleştirildi (Resim 3.12).

3.Aşama: Eksplantasyondan 24 saat sonra kültür şişeleri inkübatörden çıkarılarak mantar tıparları açıldı. İçerisine 1 dk süreyle %20'lik O_2 %5'lik CO_2 , %75'lik N_2 içeren (2. gaz karışımı) gaz karışımı verildi. Kültür şişeleri tekrar kapatılarak inkübatöre konuldu (Resim 3.12).

4.Aşama: Embriyoların morfolojik skorlamalarını yapmadan 4 saat önce %40'lık O₂, %5'lik CO₂, %55'lik N₂ içeren (3. gaz karışımı) gaz karışımı 1 dk süreyle verildi (Resim 3.12).



Resim 3.12. A) Farklı konsantrasyondaki oksijen tüpleri, B) Embriyoların gazlanması, C) Embriyoların etüve yerleştirilmesi

3.3.6. Hipoksik Embriyo Kültürü Oluşturulması

Sağlam embriyolar beşerli gruplar halinde içerisinde her bir embriyo için 1 ml serum (1 embriyo/1 ml serum) olacak şekilde toplamda 5 embriyo ve 5 ml normal sıçan serumu bulunan 60 ml'lik steril şeffaf cam kültür şişelerine steril bir cam pasteur pipeti yardımıyla konuldu. Embriyolar kültür şişelerine alındıktan hemen sonra %5'lik O₂, %5'lik CO₂, % 90'lık N₂ içeren (1. gaz karışımı) gaz karışımı ile 1 dk gazlama yapıldı. Gazlama işlemi biter bitmez, şişelerin ağzı steril mantar tıpa ile sıkıca kapatıldı ve 37°C'lik inkübatöre konuldu. Kültür şişeleri dakikada yaklaşık 30 devirle (30rpm/dk) dönen rollera yerleştirildi. Eksplantasyondan 24 saat sonra kültür şişeleri inkübatörden çıkarılarak mantar tıparları açıldı. Kontrol grubunda bu aşamada %20'lik O₂ %5'lik CO₂, %75'lik N₂ (2. Gaz karışımı) kullanılırken hipoksi oluşturmak için O₂ konsantrasyonu daha düşük olan %5'lik O₂, %5'lik CO₂, % 90'lık N₂ içeren (1. gaz karışımı) 24. Saat'de de 1 dk tekrar gazlama yapıldı. Gazlama işlemi biter bitmez, şişelerin ağzı steril mantar tıpa ile sıkıca kapatıldı ve 37°C'lik inkübatöre konuldu. Kültür şişeleri dakikada yaklaşık 30 devirle (30rpm/dk) dönen rollera tekrar yerleştirildi. Embriyoların morfolojik skorlamalarını yapmadan 4 saat önce %40'lık O₂, %5'lik CO₂, %55'lik N₂ içeren (3. gaz karışımı) gaz karışımı 1 dk süreyle verildi. Hipoksi oluşturulan gruplarımızda %20'lik O₂ %5'lik CO₂, %75'lik N₂ olan (2. gaz karışımı) uygulanmadı.

48 saat boyunca kültür ortamında tutulan embriyolar içerisinde HBSS bulunan steril petri kaplarına alındı. Embriyolar Van Maele-Fabry ve ark. tarafından geliştirilen morfolojik skorlama yöntemine göre tek tek stereo mikroskop altında değerlendirildi (77).

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin normal dağılıma uygunluğu histogram, q-q grafikleri ve Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi. İki den fazla gruplar arası karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi ve Kruskal Wallis testleri kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Dunn-Bonferroni testi uygulandı. Nicel veriler arasındaki ilişki Spearman ve Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi. Veriler R Studio 3.2.2 programı ile değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

48 saatlik kültür periyodunun sonunda tüm embriyolar morfolojik skorlama parametrelerine göre skorlandı. Morfolojik skorlama parametreleri vitellüs kesesi damarlanması, allantois, fleksiyon, kalp, kaudal nöral tüp, arka beyin, orta beyin, ön beyin, otik sistem, optik sistem, olfaktör sistem, yutak kavsi, maksillar çıkıntı, mandibular çıkıntı, ön uzuv, arka uzuv, somitler, total skor, vitellüs kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu, somit sayıları gibi parametrelerden oluşmaktadır (Tablo 4.1)

K grubu ile DDFA ve YDFA grubu karşılaştırılıp morfolojik skorlama parametre değerleri açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.1)

DDFA grubu ile YDFA grubu karşılaştırılıp morfolojik skorlama parametre değerleri açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.1)

K grubuna ait embriyolar gelişim gösterirken H grubu embriyolarının gelişiminin geride olduğu tespit edildi. Bu iki grup karşılaştırılıp morfolojik skorlama parametre değerleri dikkate alındığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 4.1).

K grubu ile HDDFA grup karşılaştırıldığında morfolojik skorlama parametre değerlerinden olan total skor değeri dikkate alındığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p <0,05$) (Tablo 4.1).

K grubu ile HYDFA grubu karşılaştırıldığında morfolojik skorlama parametrelerinden total skor, vitellüs kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu, somit sayıları değerleri dikkate alındığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 4.1)

H grubu ile HDDFA grubu karşılaştırıldığında morfolojik skorlama parametrelerinden vitellüs kesesi damarlanması, arka beyin, orta beyin, ön beyin, otik sistem, optik sistem, yutak kavsi, somitler, total skor, vitellüs kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu, somit sayıları

değerleri dikkate alındığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p<0.05$) (Tablo 4.1).

H grubu ile HYDFA grubu karşılaştırıldığında morfolojik skorlama parametrelerinden vitellüs kesesi damarlanması, ön beyin, değerleri dikkate alındığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi ($p<0.05$) (Tablo 4.1).

HDDFA grubu ile HYDFA grubu karşılaştırıldığında morfolojik skorlama parametre değerleri dikkate alındığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.1).



Tablo 4.1. Kontrol grubu ile diğer grupların morfolojik skorlama verileri

	Gruplar						P
	K (n=10)	DDFA (n=10)	YDFA (n=10)	H (n=10)	HDDFA (n=10)	HYDFA (n=10)	
Vitellus Kesesi Damarlanması	5.0(4.0-5.0) ^a	4.0(4.0-5.0) ^a	4.0(3.75-5.0) ^a	4.0(3.75-5.0) ^b	4.0(3.75-4.25) ^a	4.0(3.0-4.25) ^a	<0.001
Allantois	2.0(2.0-3.0) ^a	2.0(2.0-3.0) ^a	2.0(2.0-3.0) ^{a, c}	1.0 (1.0-2.0) ^{b, c}	2.0(1.75-3.0) ^{a, c}	2.0(1.0-3.0) ^{a, c}	<0.007
Fleksiyon	4.0(4.0-5.0) ^a	4.0(3.75-5.0) ^a	4.0(3.0-5.0) ^a	2.0(2.0-2.25) ^{b, c}	3.5(3.0-4.0) ^{a, c}	3.5(3.0-4.0) ^{a, c}	<0.001
Kalp	4.0(3.75-4.25) ^a	4.0(3.0-4.0) ^a	4.0(3.0-4.0) ^a	2.0(2.0-2.25) ^{b, c}	3.0(3.0-4.0) ^{a, c}	3.0(3.0-3.25) ^{a, c}	<0.001
Kaudal Nöral Tüp	4.0(3.75-5.0) ^a	4.0(3.0-5.0) ^a	4.0(3.0-4.0) ^a	2.0(2.0-3.0) ^{b, c}	3.0(3.0-3.25) ^{a, c}	3.0(3.0-3.25) ^{a, c}	<0.001
Arka Beyin	4.0(3.75-5.0) ^a	4.0(3.0-5.0) ^a	4.0(3.0-4.0) ^a	2.0(1.75-2.0) ^{b, c}	3.0(3.0-4.0) ^a	3.0(3.0-3.25) ^{a, c}	<0.001
Orta Beyin	4.0(3.75-5.0) ^a	4.0(3.0-5.0) ^a	4.0(3.0-4.0) ^a	2.0(1.75-2.0) ^{b, c}	3.0(3.0-4.0) ^a	3.0(3.0-3.25) ^{a, c}	<0.001
Ön Beyin	4.0(3.75-5.0) ^a	4.0(3.0-5.0) ^a	4.0(3.0-4.0) ^a	2.0(2.0-2.25) ^b	3.5(3.0-4.0) ^a	3.5(3.0-4.0) ^a	<0.001
Otik Sistem	4.5(4.0-5.0) ^a	4.0(3.75-5.0) ^a	4.0(3.0-5.0) ^a	2.0(1.0-2.0) ^{b, c}	3.0(3.0-4.0) ^a	3.0(3.0-4.0) ^{a, c}	<0.001
Optik Sistem	4.0(4.0-5.0) ^a	4.0(3.75-5.0) ^a	4.0(3.0-5.0) ^a	2.0(1.0-2.0) ^{b, c}	3.5(3.0-4.0) ^a	3.0(3.0-4.0) ^{a, c}	<0.001
Olfaktör Sistem	2.0(2.0-3.0) ^a	2.0(2.0-3.0) ^{a, c}	2.0(1.75-3.0) ^{a, c}	1.0(1.0-2.0) ^{b, c}	2.0(1.0-2.0) ^{a, c}	1.5(1.0-2.0) ^{a, c}	<0.010

Tablo 4.1. Kontrol grubu ile diğer grupların morfolojik skorlama verileri (Devamı)

	Gruplar						p
	K (n=10)	DDFA (n=10)	YDFA (n=10)	H (n=10)	HDDFA (n=10)	HYDFA (n=10)	
Yutak Kavsi	2.0(1.0-2.0) ^a	1.5(1.0-2.0) ^a	1.0(1.0-2.0) ^a	1.0(0.0-1.25) ^{b, c}	1.0(0.75-2.0) ^a	1.0(0.0-2.0) ^{a, c}	<0.242
Maxillar Çıkıntı	3.0(2.0-3.0) ^a	2.5(2.0-3.0) ^a	2.0(2.0-3.0) ^a	1.0(0.75-2.0) ^{b, c}	2.0(2.0-2.25) ^{a, c}	2.0(2.0-2.0) ^{a, c}	<0.001
Mandibular Çıkıntı	3.0(2.0-3.0) ^a	2.5(2.0-3.0) ^a	2.0(2.0-3.0) ^a	1.0(0.75-2.0) ^{b, c}	2.0(2.0-2.25) ^{a, c}	2.0(2.0-2.0) ^{a, c}	<0.001
Ön Uzuv	2.0(2.0-3.0) ^a	2.0(1.75-3.0) ^a	2.0(1.75-2.0) ^a	1.0(0.75-1.0) ^{b, c}	1.5(1.0-2.0) ^{a, c}	1.0(1.0-2.0) ^{a, c}	<0.001
Arka Uzuv	1.5(1.0-2.0) ^a	1.0(1.0-2.0) ^{a, c}	1.0(1.0-1.25) ^{a, c}	1.0(0.0-1.0) ^{b, c}	1.0(1.0-1.0) ^{a, c}	1.0(0.75-1.0) ^{a, c}	<0.007
Somitler	5.0(4.75-5.0) ^a	5.0(4.0-5.0) ^a	4.0(3.75-5.0) ^a	2.0(1.0-2.0) ^{b, c}	4.0(3.75-4.0) ^a	4.0(3.0-4.0) ^{a, c}	<0.001
Total Skor	58.0(55.5-61.5) ^a	56.5(53.75-57.5) ^{a, c}	54.5(49.5-56.0) ^{a, c}	27.0(21.0-30.25) ^b	46.5(43.25-51.25) ^{b, c}	44.5(39.25-50.25) ^{b, c}	<0.001
Vitellus Kesesi Çapı	3.30(3.300-3.425) ^a	3.30(3.275-3.425) ^{a, c}	3.20(3.075-3.40) ^{a, c}	2.30(2.175-2.400) ^b	3.10(3.00-3.40) ^{a, c}	2.95(2.90-3.15) ^{b, c}	<0.001
Baş-Kıç Uzunluğu	3.20(3.10-3.20) ^a	3.10(3.00-3.20) ^{a, c}	3.05(2.975-3.125) ^{a, c}	1.95(1.90-2.10) ^b	2.90(2.80-3.10) ^{a, c}	2.80(2.70-2.925) ^{b, c}	<0.001
Somit Sayısı	28.0(25.75-29.0) ^a	26.5(22.75-28.0) ^{a, c}	23.5(21.5-26.0) ^{a, c}	12.0(8.75-14.25) ^b	22.0(20.75-24.25) ^{a, b}	21.5(19.75-25.25) ^{b, c}	<0.001

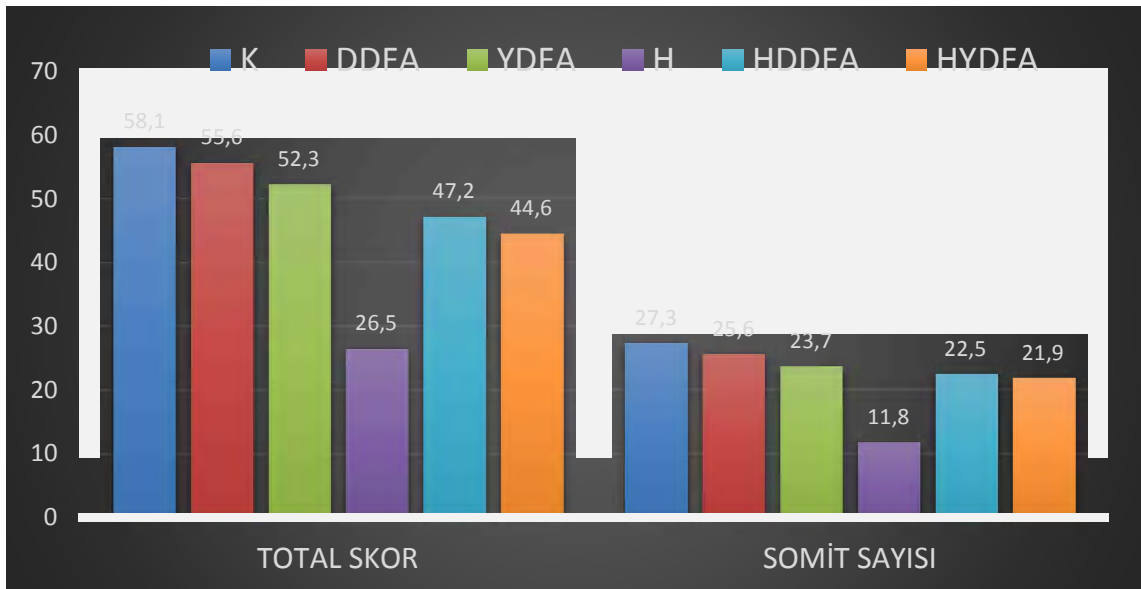
Veriler ortanca (1. çeyreklik - 3. çeyreklik) olarak ifade edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arası benzerliği, farklı harfler farklılığı ifade etmektedir. K: Kontrol Grubu, H: Hipoksi Grubu, DDFA: Düşük Doz Folik Asit Grubu, YDFA: Yüksek Doz Folik Asit Grubu, HDDFA: Hipoksi Düşük Doz Folik Asit Grubu, HYDFA: Hipoksi Yüksek Doz Folik Asit Grubu

Yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki bazı parametrelerin ortalamaları alındı. Gruplar arasındaki gelişim farklılığının anlaşılabilmesi için elde ettiğimiz değerler ile grafikler oluşturuldu.

Çalışmamızda morfolojik skorlama parametreleri dikkate alındığında total skor ve somit sayısının en yüksek olduğu grup K grubudur. Gruplar arasındaki en düşük total skor ve somit sayısı ise H grubundadır. DDFA ve YDFA grupları total skor ve somit sayıları bakımından K grubu hariç diğer gruplardan daha yüksek olduğu görülmektedir. HDDFA ve HYDFA grupları total skor ve somit sayısı bakımından H grubundan yüksek K grubundan düşüktür (Grafik 4.1) (Resim 4.1, Resim 4.2).



Resim 4.1. A) K grubu, B) H grubu

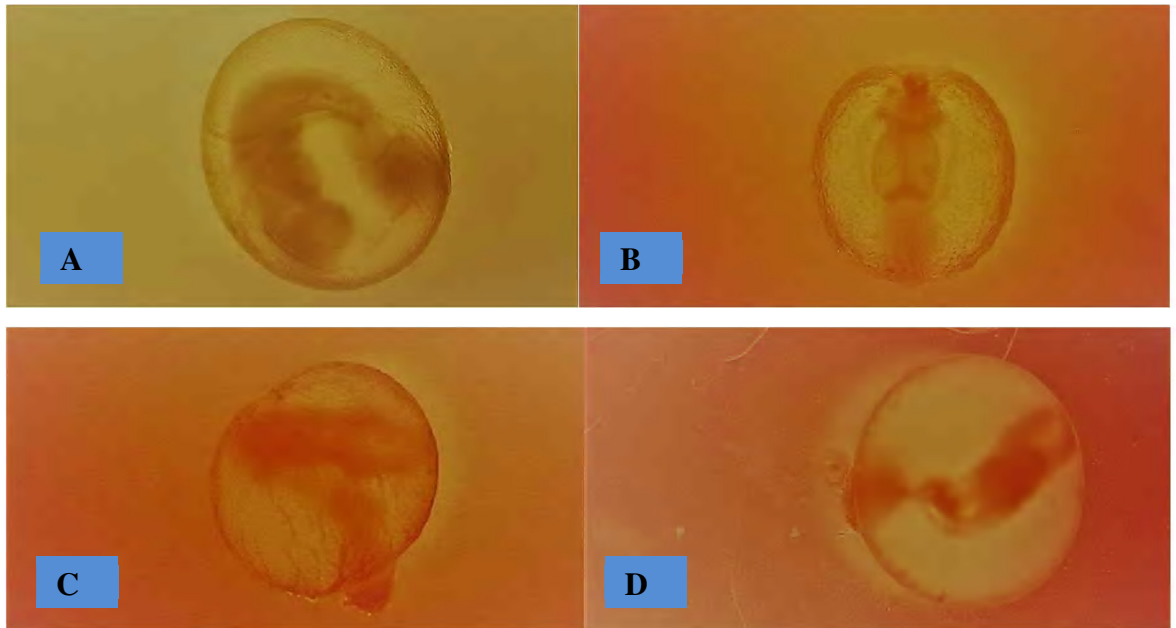


Grafik 4.1. Morfolojik Skorlama parametreleri (total skor, somit sayısı)

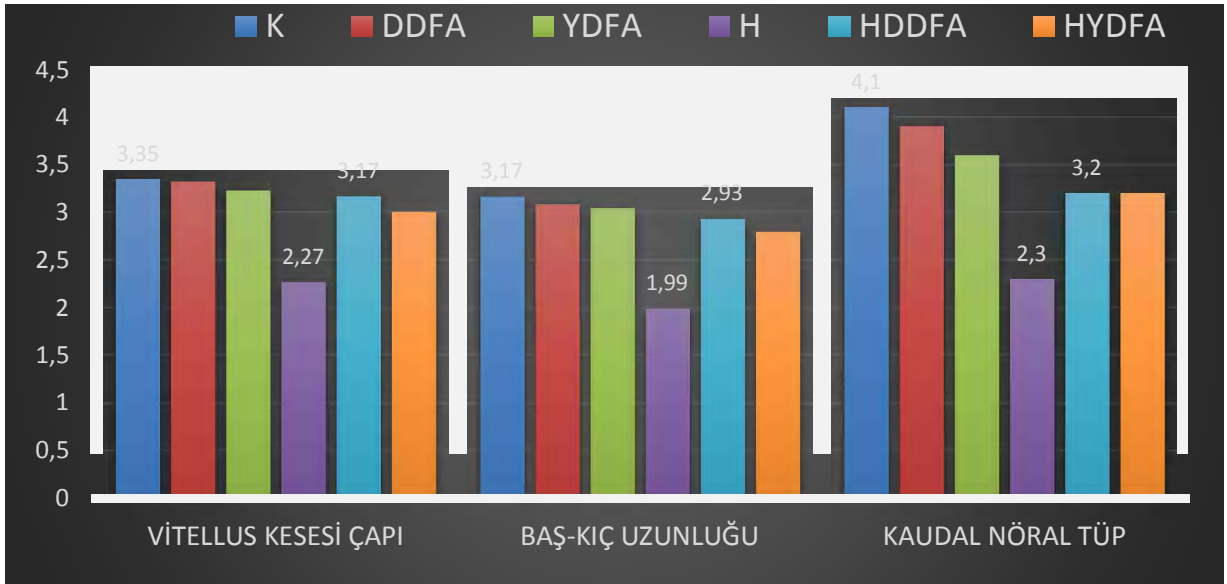


Resim 4.2. A) HDDFA grubu, B) HYDFA grubu

K grubu embriyolarının vitellus kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu ve kaudal nöral tüp gibi parametrelerde en iyi gelişim gösteren grup olduğu gibi, H grubu ise bu parametrelerde gelişimi en geride kalmış grup olduğu görülmektedir. HDDFA ve HYDFA grubu ise H grubuna göre gelişiminin daha iyi olduğu gözlemlendi (Grafik 4.2) (Resim 4.3).

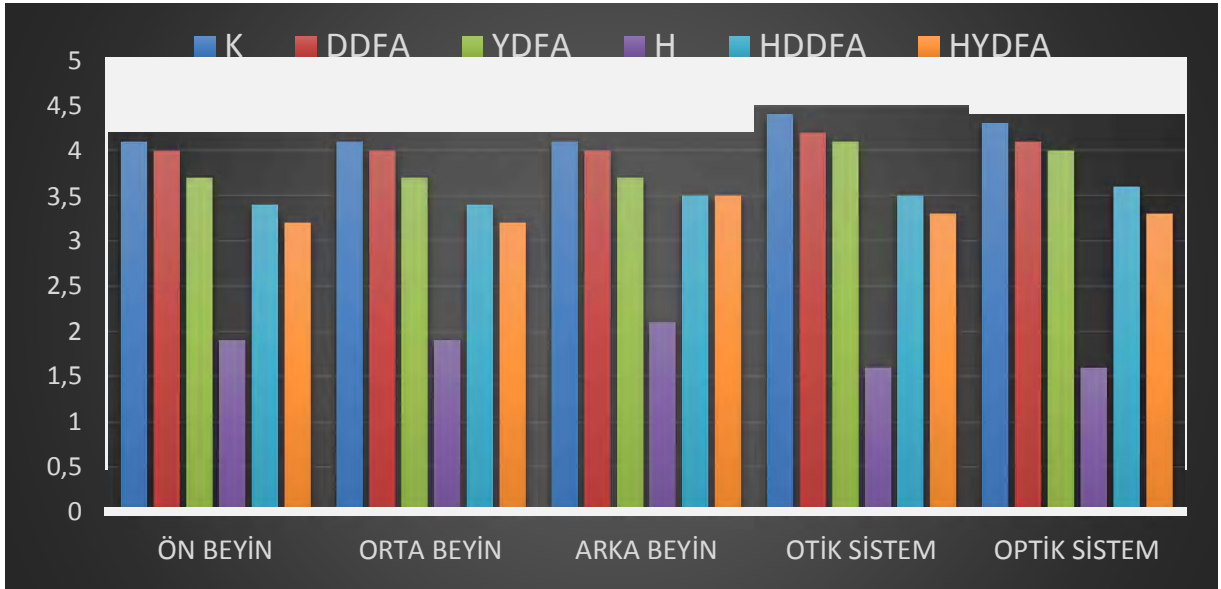


Resim 4.3. Vitellus kesesi A) K grubu, B) H grubu, C) HDDFA grubu, D) HYDFA grubu

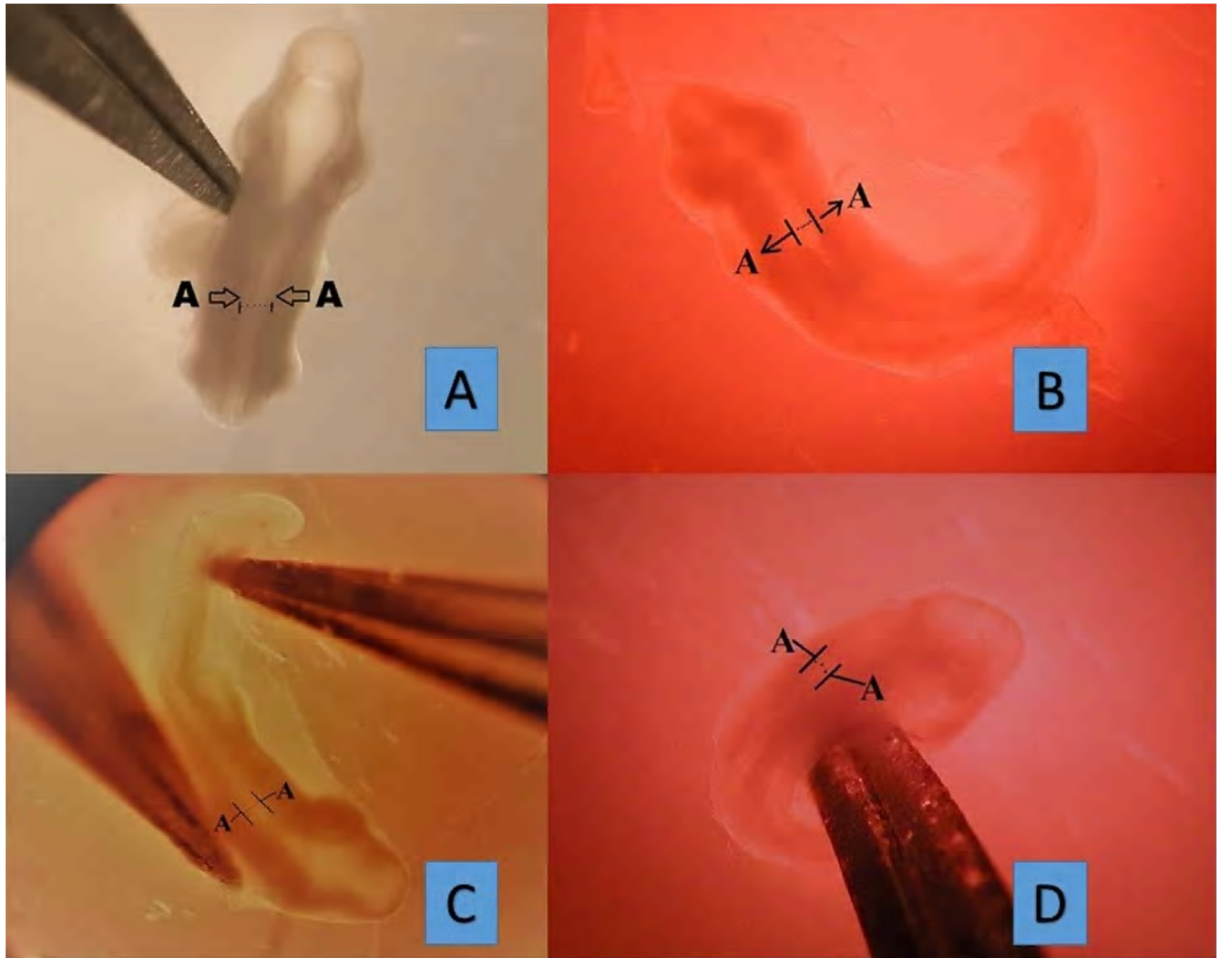


Grafik 4.2. Morfolojik Skorlama parametreleri (vitellus kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu, kaudal nöral tüp)

H grubunun sinir gelişiminin geride olduğu görüldü. K grubu gruplar arasındaki en iyi sinir gelişimine sahipken HDDFA ve HYDFA grupları ise H grubuna oranla sinir gelişiminin daha iyi olduğu görüldü (Grafik 4.3) (Resim 4.4).



Grafik 4.3. Morfolojik skorlama parametreleri (ön beyin, arka beyin, orta beyin, optik sistem, optik sistem)



Resim 4.4. Nöral tüp açıklığı A) K grubu, B) H grubu, C) HDDFA grubu, D) HYDFA grubu

Yapılan çalışmada, Van Maele-Fabry ve ark. tarafından geliştirilen parametrelerine bakıldığında total skor arttıkça vitellus kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu ve somit sayısı da artış göstermektedir. Bu parametreler arasında pozitif yönde güçlü korelasyon tespit edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Total skor korelasyon analizi

	Vitellus Kesesi Çapı	Baş-kıç Uzunluğu	Somit sayıları
Total Skor	0,871**	0,918**	0,962**

***<0.001 **<0.01 *<0.05

Vitellus kesesi çapı arttıkça, total skor, baş-kıç uzunluğu ve somit sayısı da artış göstermektedir. Bu parametreler arasında pozitif yönde güçlü korelasyon tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Vitellus kesesi çapı korelasyon analizi

	Baş-kıç Uzunluğu	Somit sayıları	Total Skor
Vitellus Kesesi Çapı	0,942**	0,868**	0,871**

***<0.001 **<0.01 *<0.05

Baş-kıç uzunluğu arttıkça, total skor, vitellus kesesi çapı ve somit sayısı da artış göstermektedir. Bu parametreler arasında pozitif yönde güçlü korelasyon tespit edilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Baş-kıç uzunluğu korelasyon analizi

	Vitellus Kesesi Çapı	Somit sayıları	Total Skor
Baş-kıç Uzunluğu	0,942**	0,912**	0,918**

***<0.001 **<0.01 *<0.05

Somit Sayısı arttıkça, total skor, baş-kıç uzunluğu ve vitellus kesesi çapı da artış göstermektedir. Bu parametreler arasında pozitif yönde güçlü korelasyon tespit edilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Somit sayıları korelasyon analizi

	Vitellus Kesesi Çapı	Baş-kıç Uzunluğu	Total Skor
Somit sayıları	0,868**	0,912**	0,962**

***<0.001 **<0.01 *<0.05

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Metabolizma faaliyetlerinde oksijen önemli bir substrattır. Oksijen yetersizliği canlı hücrelerde strese neden olmaktadır. Oksijen konsantrasyonunun kritik eşik değeri olan %6'nın altına düştüğü; organ, doku ve hücrelerin fonksiyonlarının duraksadığı ve hatta bozulduğu durumlar ise hipoksik koşullar olarak tanımlanmaktadır (20). Oksijen miktarının azalması olarak tanımlanan hipoksi, hücrelerin yaşamsal faaliyetlerinin azalmasına neden olmaktadır (3, 4). Düşük oksijen seviyelerinde yani hipoksik koşullarda yaşamlarını sürdürebilmek için hücreler bir çeşit uyum cevapları geliştirmektedir. Bu durumda hücreler anjiogenezi, glikoz metabolizmasını, demir metabolizmasını, hücre proliferasyon ve sağ kalımını kontrol eden bir seri genin transkripsiyonuna gerek duymaktadır (128). Hipoksinin yetişkin ve fetal dokularda oksidatif strese neden olduğu bildirilmiştir. Oksidatif stres, hücrenin doğuştan kazanmış olduğu oksidan ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması ve oksidan yönünde artış olması şeklinde tanımlanmaktadır (129). Oksidatif stresle reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi sonucu hücre hasar ortaya çıkmaktadır (17, 18). Oksidan molekülleri aynı zamanda serbest radikaller olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikallerin reaktif olması nükleotid yapısı, lipid, Deoksiribonükleik Asit (DNA) ve proteinler gibi birçok biyolojik materyale zarar vermelerine neden olmaktadır (130, 131). Hipoksi ile birlikte hücrede ilk olarak bir transkripsiyon faktörü olan HIF sentezinin arttığı bildirilmektedir (132). HIF proteinleri bu durumu atlatmak ve hayatta kalabilmek için hücrelerde, dokularda ve organizma boyutunda kritik uyum cevaplarını yönetmektedir (133). Günümüze kadar hipoksinin perinatal ve geç dönem etkileri bilinmesine rağmen, gebeliğin erken dönemindeki embriyonel etkileri hakkında fazla bilgiye ulaşılamamıştır. Sıçan embriyo kültüründe 9,5-11,5 günlük organogenez dönemi insan embriyosunda fertilizasyondan sonra 3-6. Hafta aralığına denk gelmektedir. In vitro sıçan embriyo kültürü tekniği hipoksinin erken dönem etkilerinin saptanması için uygun yöntemlerden biridir (70). Rosenzweig ve arkadaşları gebeliğin erken döneminde hipoksinin embriyo

kültürü üzerine olan etkisini araştırdıklarında organogenez süresince hipoksiye çok kısa dönemde olsa maruz kalmanın embriyonun büyüme ve gelişmesini bozabileceğini, hipoksinin hem büyüme hem de farklılaşma üzerinde etkisi olduğunu ve hipoksinin embriyo üzerindeki zarar verici etkilerinin arttığını ortaya çıkarmışlardır. Hipoksi periyoduna maruz kalan embriyoda belirgin bir şekilde beyin ventriküllerinde genişleme ve nöral tüp ödemi gözlemlenmiştir. Rosenzweig ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, hipoksinin tek başına nöral tüp ödeminde neden olduğunu ve oksijenlenmemeye periyodunda hipoksi etkisini arttırdığı belirtilmiştir (70). Hipokside özellikle doku düzeyinde oksijen eksikliği olduğu bildirilmiştir. Smith ve arkadaşları tavuk embriyosu üzerinde yaptıkları çalışmada erken embriyonik dönemde hipoksinin hücre çoğalmasını engellediğini, nöral hücrelerin ölümüne neden olduğunu ve aynı zamanda hipoksiye bağlı kraniofasiyal anomalileri elde ettikleri bulgularla göstermişlerdir (134). Aynı şekilde Scully ve arkadaşları yine erken dönem embriyo gelişiminde hipoksinin nöral progenitor hücrelerin üretimini geciktirdiğini hatta durdurduğunu bildirmişlerdir (135). Jauniaux ve arkadaşları, insanda da gebeliğin ilk trimestrinde embriyonun oksijen kullanımının oldukça düşük miktarda olduğunu göstermişlerdir. İnsanda bu dönemde eksoçöloomik boşlukta oksijen taşıma sistemleri yoktur. Oluşan serbest oksijen radikalleri fetal dokularda preeklempsi'ye neden olabileceği gibi erken düşüklere de sebebiyet verebilmektedir (136). Ritchie ve arkadaşları hipoksinin kalp atım hızını etkilediğini hatta kardiyovasküler sistemin gelişmesinde de zararlı etkisi olduğunu göstermişlerdir. Hipoksi ATP ve siklik adenozin monofosfat (cAMP) üretimini ve kalsiyum birikimini etkilediğinden embriyonun hayatı için kritik önem arz etmektedir (137).

Yapmış olduğumuz çalışmamızda H grubunda morfolojik skorlama parametreleri değerlendirildiğinde K grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edildi. Hipoksiye maruz bırakılan embriyolarda K grubuna oranla gelişim geriliğinin gözlenmesi önceki çalışmaları desteklemektedir. Yaptığımız araştırma sonuçlarına ilişkin olarak elde ettiğimiz bulgularda; H grubuna ait embriyoların vitellus kesesi damarlanması ve kalp gelişiminde K grubuna oranla gerileme tespit edildi ve hipoksinin nöral tüp gelişiminde etkili olduğu gibi damarlanma ve kalp gelişimi üzerine de etkisi olduğu görüldü. Çalışmamızda vitellus kesesi damarlanması incelendiğinde H grubu ile K grubu arasında gelişim farklılığı ve H grubunda en fazla damar ağı oluşması hipoksinin damarlanma üzerine olan etkisini göstermektedir.

Hızlı bir şekilde büyüyen embriyonun metabolik ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için ilk olarak dolaşım sistemleri gelişmeye başlamaktadır. Ekstraembriyonik dokuda ve gelişen embriyoda damarlanma birbirinden bağımsız olarak gelişmektedir. Sonrasında gelişen bu damarlar birleşerek dolaşımın devamlılığını sağlamaktadır (138). Yeni damar oluşumu anjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasında meydana gelen ikili denge ile sağlanmaktadır. Birçok araştırmacı damar gelişimi anlamına gelen vaskülojenesis ve anjiogenezi, farklı iki yol olarak tanımlamışlarsa da bu olaylar erken embriyogenez ve postnatal dönemde meydana gelmektedir (139, 140). Vaskülojenesisde mezenşimal hücreler ilk önce angioblastlara, angioblastlar endotel hücrelerine, endotel hücreleri ise primer kan damarına dönüşmektedir (139). Dolayısıyla vaskülojenesis erken embriyogenez sırasında gelişmekte ve erişkinlerde meydana gelmemektedir. Anjiogenezi ise önceden var olan kan damarlarından yeni kılcal damar meydana gelmesi demektir. Hem gelişen embriyo hem de postnatal hayatta oluşmaktadır (139, 140). In vitro embriyo kültür tekniği bu iki mekanizmanın anlaşılır olması için ideal bir yöntemdir (65, 70). Ayrıca embriyo kültür tekniği, embriyo gelişim süresinin belli dönemlerinde antioksidanların, embriyo gelişimi üzerine etkilerinin incelenmesine ve ortama konulacak maddelerin konsantrasyonunun belirlenebilmesine de imkân sağlamaktadır. Annenin metabolizması devre dışı bırakılarak birçok maddenin embriyonik gelişim üzerindeki direkt etkileri çalışılabilmektedir (70). Hacıoğulları ve arkadaşları IL-12'nin embriyonik vitellus kesesi damarlanması üzerine in vitro etkisini araştırdıkları çalışmada, IL-12'nin doza bağlı olarak vitellus kesesi damarlanması ve kalp gelişimini engellediğini bildirmişlerdir (76). Yine bu çalışmaya paralel olarak Uçar ve arkadaşları kültür ortamına ilave ettikleri 1000 IU/ml IFN β -1a ve IFN β -1b'nin embriyoların gelişimi üzerinde makroskopik olarak teratojenik etki göstermediğini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra deney gruplarındaki embriyolarda vitellüs kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu ve baş uzunluğuna ait sayısal değerler düşük bulunduğundan belirtilen dozlardaki IFN β -1a ve IFN β -1b'nin embriyolarda büyüme geriliğine sebep olduğunu tespit etmişlerdir (141). Yajun Xu ve arkadaşları farelere gebeliğin 6.-15. günleri arasında uygulanan etanolün yapmış olduğu toksite üzerine B₁₂ vitamini ve FA'nın etkisini incelemişlerdir. CD-1 farelerine etanolü intragastrik olarak uygulayarak beraberinde ayrı ayrı FA ile B₁₂ vitamini ve FA+B₁₂ vitaminini birlikte vermişlerdir. Çalışmanın sonunda tek başına uygulanan FA ve B₁₂ vitamininin etanolün etkisini azaltabildiği

fakat FA+B₁₂ vitamininin birlikte verilmesinin daha etkili olduğunu bildirmişlerdir (142).

Çalışmamızda FA dozları belirlenirken Parri Wentzel ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma referans alındı (12). Araştırmamız sonuçlarına ilişkin elde ettiğimiz bulgularda; K grubuna ait embriyoların DDFa ve YDFa embriyolarına oranla morfolojik skorlama parametreleri değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık görülmemektedir. Bu sonuçlar FA'nın teratojen olmadığını göstermektedir.

FA eksikliğinde önleyici tedavi olarak NTD'ye etkisinden dolayı 1998" den sonra Kanada ve Amerika Birleşik Devletleri başta olmak üzere dünya üzerinde 50" den fazla ülkede zorunlu FA zenginleştirme programı başlandı (58). İngiltere Tıbbi Araştırmalar Birliği'nin (10) 1991'de yaptığı deneysel araştırmada, daha önce NTD'li bebek doğuran kadınlara gebelik öncesi dönemden başlayarak günde 4 mg FA verildiğinde yeniden NTD'li gebelik geçirme riskinin %71 azaldığını bildirmiştir. Bu çalışma ayrıca NTD'lerin %29'unun da FA tarafından önlenemediğini ortaya koymuştur (143). Macaristan'da yapılan diğer bir çalışmada ise, daha önce NTD öyküsü olmayan kadınlara 800 µg FA içeren preparatlar verilmiştir. FA içeren preparatlar alan 2104 kadında hiç NTD'li gebelik görülmezken; hiçbir vitamin almayan 2052 kişilik K grubunda 6 vakada NTD görüldüğü bildirilmiştir (144). Doğurganlık dönemindeki kadınlara günde 0.4 mg. FA verildiğinde ortaya çıkacak NTD'li gebelik riskinin %50 azaldığı ortaya çıkmıştır (46, 145). NTD'nin görülme sıklığı Avrupa kıtasında bin doğumda 0.4-1.6 olup, en sık görüldüğü ülke İrlanda'dır. Yine Amerika Birleşik Devletleri'nde bin doğumda 0.7-1.0 ve Ortadoğu ülkelerinde (1955-1988 yılları arası Mısır, Beyrut, İran ve Türkiye) bin doğumda 2.9-5.2 arasındayken "Türkiye'de Konjenital Malformasyon Sıklığı, Dağılımı, Risk Faktörleri ve Yeni doğanların Antropometrik Değerlendirmesi Araştırması-1993" sonucunda ülkemizde bin doğumda 3 sıklığında görüldüğü saptanmıştır. NTD'nin Türkiye'de sık görülen doğumsal anomalilerden biri olduğu belirtilmiştir (146, 147). Wentzel ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada in vitro yöntemi ile sıçan embriyolarına yüksek doz glikoz verilmiştir. Wentzel ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada K grubu, glikoz verilen bir grup ve glikoz ile birlikte FA verilen bir çalışma grubu oluşturulmuştur. Wentzel ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma sonuçlarında sadece glikoz verilen sıçan embriyolarında nöral tüp açıklığı (NTA) insidansının K grubuna oranla arttığı

bildirilmiştir. Ayrıca sadece glikoz verilen sıçan embriyolarının somit sayısının K grubuna göre azaldığı, baş-kıç uzunluğunun önemli ölçüde kısaldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada glikoz+FA grubunun nöral tüp açıklığı insidansı glikoz grubuna oranla önemli ölçüde azaldığı bildirilmiştir. Yine glikoz+FA grubunun glikoz grubuna oranla somit sayısının çoğaldığı ve baş-kıç uzunluğunun arttığı gösterilmiştir. Glikoz+FA grubu K grubu ile kıyaslandığında ise nöral tüp açıklığı oranı, somit sayısı ve baş-kıç uzunluğu olarak skorlamaların K grubundan geri kaldığı bildirilmiştir (12).

Çalışmamız sonuçlarında elde ettiğimiz bulgularımızda; HDDFA ve HYDFA grubuna ait embriyoların morfolojik skorlama parametrelerinden olan kaudal nöral tüp, arka beyin, ön beyin ve orta beyin gelişiminin H grubu embriyolarına oranla daha iyi geliştiği görülmektedir. Elde ettiğimiz bulgular FA'nın NTD'yi önleyici rolüne yönelik yapılan çalışmaları desteklemektedir.

Koyama H ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada erken embriyolojik gelişim aşamasında sıçan embriyolarının blastosist gelişimi ve hücre çoğalması incelenmiştir (5). Koyama H ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada hücre yaşama koşulu bozulmayacak miktarda embriyolar ısıya maruz bırakılmıştır. Çalışmada K grubu ve ısıya maruz bırakılan grup hariç ısıya maruz bırakılan ve FA eklenen gruplar oluşturulmuştur. Isıya maruz bırakılan grupta ısı etkisi ile serbest radikallerin biriktiği bildirilmiştir. Isıya maruz bırakılan grup incelendiğinde K grubuna oranla blastosist gelişiminin yeterli olmadığı ve hücre sayısının K grubuna oranla daha az olduğu bildirilmiştir. Isıya maruz bırakılan embriyolardaki gelişim geriliğine serbest radikallerin birikmesi neden olarak gösterilmiştir. Isıya maruz bırakılarak FA eklenen çalışma grubu ise sadece ısıya maruz bırakılan çalışma grubu ile kıyaslandığında blastosist gelişiminin daha iyi olduğu ve hücre sayısının sadece ısıya maruz bırakılan çalışma grubundan fazla olduğu bildirilmiştir. Koyama H ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada FA'nın antioksidan özelliği olduğu ve bu nedenle ısıya maruz kalan embriyolardaki serbest radikalleri nötralize ederek embriyonel gelişime katkı sağladığı bildirilmiştir (5).

Patat ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada B₁₂ vitamininin hipoksiye maruz kalan embriyolardaki gelişim sürecine etkileri araştırılmıştır (148). Yapılan çalışmada B₁₂ vitamininin antioksidan özelliğinden bahsedilmektedir. Bu nedenle hipoksi+B₁₂ vitamini verilen embriyoların H grubu embriyolara kıyasla daha iyi geliştiği

gösterilmiştir (148). Araştırmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular Patat ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmayı desteklemektedir.

Araştırmamız sonucunda elde edilen bulgular; HDDFA ve HYDFA grubuna ait embriyoların morfolojik skorlama parametrelerinin (vitellüs kesesi damarlanması, allantois, fleksiyon, kalp, kaudal nöral tüp, arka beyin, orta beyin, ön beyin, otik sistem, optik sistem, olfaktör sistem, yutak kavsi, maksillar çıkıntı, mandibular çıkıntı, ön uzuv, arka uzuv, somitler, total skor, vitellüs kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu, somit sayıları) H grubu embriyolarına oranla daha iyi gelişim gösterdiği görüldü. Ayrıca HDFA grubu ile HYDFA grubu kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı olmamakla birlikte HDDFA grubu embriyoların gelişimlerinin daha iyi olduğu görülmektedir.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz bulgular FA'nın antioksidan özelliğine yönelik yapılan çalışmaları desteklemektedir. Hipoksik koşullarda FA'nın erken embriyonik gelişim bozukluklarına karşı önleyici ve koruyucu özelliği olduğu görülmektedir.

6.KAYNAKLAR

1. Toescu EC. Hypoxia sensing and pathways of cytosolic Ca²⁺ increases. *Cell Calcium* 2004; 36:187–199.
2. Randall AD, Tsien RW. Pharmacological dissection of multiple types of Ca²⁺ channel currents in rat cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 1995; 15: 2995–3012.
3. Lopez-Barneo J, Pardal R and Ortega-Saenz P. Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annu Rev Physiol* 2001; 63: 259-287.
4. Şener G, Yeğen B Ç. İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim* 2009; 22(3): 5-13.
5. Koyama H, Ikeda S, Sugimoto M et al. Effects of Folic Acid on the Development and Oxidative Stress of Mouse Embryos Exposed to Heat Stress. *Reprod Dom Anim* 2012; 47, 921–927.
6. Scott JM, Weir DG. Role of folic acid/folate in pregnancy: prevention is better than cure. *Recent Advances in Obstetrics and Gynecology* 2001; 20-21
7. Figures for: Chemoprevention of Colorectal Cancer *Aliment Pharmacol Ther.* Blackwell Publishing 2004; 19(1):1-24.
8. Botez MI, Peyronnard JM, Bachevalier J et al. Polyneuropathy and folate deficiency. *Arch Neurol* 1978; 35:581–584.
9. Haslam N and Probert CS. An audit of the investigation and treatment of folic acid deficiency. *J R Soc Med* 1998; 91:72-73.
10. Medical Research Council. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. MRC Vitamin Study Research Group. *Lancet* 1991 20; 338(8760):131-137.

11. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 16. Nutrient Data Laboratory Home Page. 2003. http://www.nal.usda.gov/fnic/cgi-bin/nut_search.pl Son Erişim Tarihi: 09.11.2017.
12. Wentzel P, Gaˆreskog M and Eriksson UJ. Folic Acid Supplementation Diminishes Diabetes- and Glucose-Induced Dymorphogenesis in Rat Embryos In Vivo and In Vitro. *Diabetes* 2005; 54: 546-553.
13. Clark JM. Pulmonary limits of oxygen tolerance in man. *Exp Lung Res* 1988; 14:897-910.
14. Arıcan G, Khalilia W, Serbes U et al. Effects of hypobaric conditions on apoptosis signalling pathways in HeLa cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 2014; 15(12), 5043–5047.
15. Chen W, Ostrowski RP, Obenaus A et al. Prodeath or Prosurvival: Two Facets of Hypoxia Inducible Factor-1 in Perinatal Brain Injury. *Exp Neurol* 2009; 216(1): 7–15.
16. Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J* 2002; 16: 1151–1162.
17. Sarkar S, Banerjee PK and Selvamurthy W. High altitude hypoxia: An intricate interplay of oxygen responsive macroevents and micromolecules. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2003; 253: 287-305.
18. Araneda OF. and Tuesta M. Lung Oxidative Damage by Hypoxia. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; 10-11.
19. Sherwood L. *Human Physiology: from Cell to Systems*. 4th ed. USA: Brooks/Cole 2001.
20. Semenza, GL. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: A chaperone escorts VEGF to the dance. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 108: 39-40.
21. Reyes JG, Farias JG, Olavarrieta-Henriquez S et al. The hypoxic testicle: Physiology and pathophysiology. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2012; <http://dx.doi.org/10.1155/2012/929285>, Son Erişim Tarihi: 16.04.2014.

22. Arrigo AP, Simon S, Gibert B et al. Hsp27 (HspB1) and α Bcrystallin (HspB5) as therapeutic targets. *FEBS Letters* 2007; 581: 3665-3674.
23. Richalet JP. Oxygen sensors in the organism: Examples of regulation under altitude hypoxia in mammals. *Comperative Biochemistry and Physiology* 1997; 118A(1): 9-14.
24. Chappey O, Wautier MP, Wautier JL. Endothelial cells in culture: a model to study in vitro vascular toxicity. *Toxicology in Vitro* 1995; 9(4):411-419.
25. Chapple IL, Brock GR, Milward MR et al. Compromised GCF total antioxidant capacity in periodontitis: cause or effect? *J Clin Periodontol* 2007; 34(2): p. 103-110.
26. Chapple IL and Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol* 2007; 43: p. 160-232.
27. D' Aiuto F, Nibali L, Parkar M et al. Oxidative stress, systemic inflammation, and severe periodontitis. *J Dent Res* 2010; 89(11): p.1241-1246.
28. Papas AM. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids* 1996; 31: 77-82.
29. Çakatay U, Telci A, Yılmaz GA et al. Yaşlanmanın plazma oksidatif protein hasarına etkisi. *Cerrahpaşa journal of Medicine* 2000; 31: 220-223.
30. Çakatay U, ve Kayalı R. Serbest radikal biyokimyasının tarihsel süreçteki gelişimi. *Cerrahpaşa Journal of Medicine* 2006; 37: 162-167.
31. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-879.
32. Quiles J, Huertas J, Batine M et al. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology* 2002; 180: 79-95.
33. Antmen ŞE. Beta talasemide oksidatif stres. Yüksek Lisans Tezi 2005, Adana.
34. Altan N, Dincel SA, Koca C. Diabetes mellitus ve oksidatif stres. *Turkish Journal of Biochemistry* 2006; 31: 51-56.
35. Onat T. İnsan Biyokimyası. Baskı. Palme Yayıncılık Ankara 2006; 519.
36. Gürdöl F, Ademoğlu E. Biyokimya, 1. Baskı, İstanbul 2006; 829-835.
37. Gözükara EM. Biyokimya, 5. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi 2011; 881-898.

38. Bastian H (2007), Lucy Wills (1888-1964): The life and research of an adventurous independent woman, The James Lind Library.
39. Mitchell HK, Snell EE, Williams RJ . The concentration of "folic acid". J Am Chem Soc 1941; 63 (8): 2284. <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01853a512>
Son Erişim Tarihi: 05.06.2018
40. Murray RK, Granner DK, Mayes PA. Harper's Biochemistry, 24th ed. Appletion & Lange 2003; 253: 313-318.
41. Çağatay Ü, Güvenç B. Megaloblastik Anemiler. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri, 15. Baskıdan Çeviri, Editör: Sağlık Y, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2004: 674-680.
42. Onat T. Vitaminler. Klinik Kimyada Temel İlkeler. Çeviri Editörü: Aslan D. Palme Yayıncılık, Ankara, 2005: 543-567.
43. Miller SM. In: Bishop ML, Duben-Engelkirk JL, Fody EP. Vitamins. Clinical Chemistry Principles. Procedures, Correlations. 3th Ed. Philadelphia:Lippincott 1996; 581-635.
44. Budak N. Folik Asitin Kadın Ve Çocuk Sağlığında Önemi. Erciyes Tıp Dergisi (Erciyes Medical Journal) 2002; 24(4) 209-214.
45. Miller SM, Mears M. Nutritional Status Assesment. Clinical Chemistry Concept and Applications, In: Anderson SC, Cockayne S, Mc Graw Hill, New York, 2003: 579-611.
46. Daly S, Scott JM. The prevention of neural tube defects. Cur Opin Obstetr Gynecol, 1998; 10:85-89.
47. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji: Antianemik ilaçlar II: Megaloblastik anemilere karşı kullanılan ilaçlar. 8.basım, Hacettepe Ankara, 1998; 1580-1588.
48. Reynolds E. Vitamin B 12, folic acid, and the nervous system. Lancet Neurol 2006; 5: 949-960.
49. Coşkun T. Folik Asit. Katkı Dergisi. Hacettepe Üniversitesi Ankara, 2003; 489-498.

50. Zhang XM, Huang GW, Tian ZH et al. Folate deficiency induces neural stem cell apoptosis by increasing homocysteine in vitro. *J Clin Biochem Nutr* 2009; 45: 14-19.
51. Wisniewska K, Wysocki J. The importance of folic acid in the primary prevention of congenital malformations. *Arch Perinatal Med* 2008; 14: 32-40.
52. Sayar EH. Yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde B12 vitamini, demir, folik asit eksikliğinin sıklığı ve maternal düzeylerle olan ilişkisi, Uzmanlık tezi, Trakya Üniversitesi Edirne Sağlık Bilimleri Enstitüsü 2010: 48-54.
53. Tunçbilek E, Boduroğlu K. Nöral tüp defektlerinin önlenmesi. *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi* 1998; 7:225-227.
54. Steven E, Evrovski J, Cole D. Clinic chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. *Clin Biochem* 1997; 30:189-201.
55. Harrison's Principles of Internal Medicine, 16.th Edition, Megaloblastic Anemias, 2005: 601-607.
56. Sipahi T. Nutrisyonel anemilerde yenilikler. *Pediyatrik Hematoloji Bilim Dalı 9. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu* sayfa: 50-51, 2003, Süleyman Demirel Üniversitesi.
57. Refsum H, Ueland PM, Nygard O et al. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annual Review of Medicine* 1998; 49 (1): 31-62.
58. Liu S, West R, Randell E et al. A comprehensive evaluation of food fortification with folic acid for the primary prevention of neural tube defects. *BMC Pregnancy Childbirth* 2004 27; 4(1):20.
59. New DAT, Coppola PT, Cockroft DL. Comparison of growth in vitro and in vivo of postimplantation rat embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1976a; 36(1):133-144.
60. Waddington CH, Waterman AJ. The development in vitro of young rabbit embryos. *J Anat* 1933; 7:355-370.
61. Nicholas JS, Rudnick D. Development of rat embryos of egg-cylinder to head-fold stages in plasma cultures. *J Exp Zool* 1938; 78(2):205- 232.

62. New DAT and Stein K F. Cultivation of postimplantation mouse and rat embryos on plasma clots. *J Embryol Exp Morphol* 1964; 12:101-111.
63. Karabulut AK. In Vitro Embriyo Kültürü ve Uygulama Alanları. XVIII. Gevher Nesibe Tıp Günleri III. Deneysel ve Klinik Araştırma Kongresi ve 'Workshop'u. Kongre Kitabı, Kayseri, 2000; 16-24.
64. New DAT. Development of rat embryos cultured in blood sera. *J Reprod Fertil* 1966; 12:509-524.
65. New DAT. Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol* 1978; 53:81-122.
66. New DAT, Coppola PT, Cockroft DL. Improved development of head fold rat embryos in culture resulting from low oxygen and modifications of the culture serum. *J Reprod. Fert* 1976b; 48:219-222.
67. Gregg NM. Congenital Cataract Following German Measles in Mothers. *Trans Ophthalmol Soc* 1941; 3: 35-45.
68. Moore KL, Persaud TVN. Human Birth Defects. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 2 nd ed. WB Saunders Company USA 1993; 7: 355-370.
69. Webster WS, Brown-Woodman PD, Ritchie HE. A review of the contribution of whole embryo culture to the determination of hazard and risk in teratogenicity testing. *Int J Dev Biol* 1997; 41: 329-335.
70. Rosenzweig I. Detrimental effects of hypoxia-reoxygenation injury on development of rat embryos during organogenesis in vitro. *Croat Med J* 2003; 44: 157-160.
71. Usami M, Mitsunaga K, Nakazawa K. Comparative proteome analysis of the embryo proper and yolk sac membrane of day 11.5 cultured rat embryos. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2007; 80: 383-395.
72. Flick B, Klug S. Whole embryo culture: an important tool in developmental toxicology today. *Curr Pharm Des* 2006; 12(12):1467-1488.
73. Danielsson BR, Azarbayjani F, Sköld AC, Webster WS. Initiation of phenytoin teratogenesis: pharmacologically induced embryonic bradycardia and arrhythmia

resulting in hypoxia and possible free radical damage at reoxygenation. *Teratology* 1997; 56: 271-281.

74. Calciu C, Kubow S, Chan HM. Interactive dysmorphogenic effects of toxaphene or toxaphene congeners and hyperglycemia on cultured whole rat embryos during organogenesis. *Toxicology* 2002; 175: 153-165.
75. Sameshima K, Kobae H, Fofana D et al. Effects of pure 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on cultured rat embryos. *Congenit Anom* 2004; 44: 93-96.
76. Nisari M, Ülger H, Unur E et al. Effect of interleukin 12 (IL-12) on embryonic development and yolk sac vascularisation. *Bratisl Lek Listy* 2014; 115(9): 532-539.
77. Van Maele-Fabry G, Delhaise F, Picard JJ. Morphogenesis and Qualification of the Development of Post-implantation Mouse Embryos in vitro. *Toxicol* 1990; 4: 149-156.
78. Nisari M, Ülger H. Embriyo Kültürü Tekniği. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal Of Health Sciences)* 2010; 19(3) 216-225.
79. Theiler K. *The House Mouse: Atlas of Embryonic Development*. New York: Springer-Verlag 1989; 1-21.
80. Steven NE, Jeffrey MB, Lawrence HM et al. Expression of phenylethanolamine N-methyltransferase in the embryonic rat heart. *Elsevier* 1996; 43-52.
81. Beck F, Lloyd JB. Comparative Placental Transfer. In: *A handbook of teratology*, Vol. III, Ed. Wilson JG and Fraser FC, New York, Plenum Press, 1977; 155-186.
82. McBride WG. Thalidomide and Congenital Abnormalities, Letter to the Editor. *The Lancet* 2 1961; 1358.
83. Ülger H, Özdamar S, Unur E et al. "The Effect of Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) on in vitro Embryonic Growth, Heart and Neural Tube Development in Rat". *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2009; 673-679.
84. Unur E, Ülger H, Ekinci N et al. Effect of Anti-Basic Fibroblast Growth Factor (Anti-bFGF) on In Vitro Embryonic Development in Rat. *Anat. Histol. Embryol* 2009; 38: 241-245.

85. Tekinarslan II, Unur E, Ulger H et al. FGF-9'un In Vitro Embriyonik Gelişim Üzerine Etkileri. *Balkan Med J* 2011; 28: 18-22.
86. Steven DH. The foetal membranes of the laboratory rat. *Comparative placentation- essay in structure and function*. Academic Press London 1975; 75-81.
87. Steven DH, Morris G. *Comparative Placentation*. In: Steven Dh, ed. *Essays in Structure and Function*. London, Academic Press, 1975; 75-81.
88. Skosyreva AM. Comparative evaluation of the embryotoxic effect of various antibiotics. *Antibiot Khimioter* 1989; 34: 779–782.
89. Soysal H. Sıçan fetuslarında fenitoin, folik asit ve vitamin E'nin kemik gelişimi üzerine etkileri, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Kayseri 2010: 57.
90. Moore KL. *The Developing Human*. (4th Edition) W.B. Saunders Co. Harcourt Brace Jovanovich Inc 1998; 148-210.
91. Ertekin T, Ulger H, Nisari M. Effects of Angiostatin on in vitro Embryonic Rat Development. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2011; 17: 843-847.
92. Padykula HA, Deren JJ. and Wilson TH. Development of structure and function in the mammalian yolk sac. I. Developmental morphology and vitamin B12 uptake of the rat yolk sac. *Dev Biol* 1966; 13: 311-348.
93. Payne GS. and Deuchar EM. An in vitro study of functions of embryonic membranes in the rat. *J Exp Morphol* 1972; 27(3): 533-542.
94. Beaudoin AR. Embryology and teratology. In: *The laboratory rat*. Baker HJ, Lindsey JR. and Weisbroth SH. (Eds.), Academic Press, New York 1980; 75-101.
95. Freeman SJ, Back F and Lloyd JB. The role of visceral yolk sac in mediating protein utilization by rat embryos cultured in vitro. *J Embryol Exp Morphol* 1981; 66: 223-234.
96. Jollie WP. Development, morphology and function of the yolk sac placenta of laboratory rodents. *Teratol* 1990; 41: 361-381.

97. Parham, Moftakhar. Cerebral arteriovenous malformations. Part 1: cellular and molecular biology *Neurosurgical Focus* 2009; 26: 5.
98. Djonov V, Baum O, Burri PH. Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res* 2003; 314: 107-117.
99. Hurz H, Burre PH, Djonov V. Angiogenesis and vascular remodeling by intussusception: from form to function. *News Physiol Sci* 2003; 18: 65-70.
100. Egginton S, Zhou AL, Brown MD et al. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc. Res* 2001; 49: 634-646.
101. Hansen-Smith FM, Hudlicka O, Egginton S. In vivo angiogenesis in adult rat skeletal muscle: early changes in capillary network architecture and ultrastructure. *Cell Tissue Res* 1996; 286: 123-136.
102. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9(6): 653-660.
103. Pepper MS, Mandriota SJ. Regulation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (flk-1) expression in endothelial cells. *Exp Cell Res* 1998; 241: 414-425.
104. Waggener JD, Beggs JL: Vasculature of neural neoplasms. *Adv Neurol* 1976; 15: 27-49.
105. Gustafsson T, Kraus WE. Exercise-induced angiogenesis-related growth and transcription factors in skeletal muscle, and their modification in muscle pathology. *Frontiers Biosci* 2001; 6: 75-89.
106. Deveci D, Marshall JM, Egginton S. Relationship between capillary angiogenesis, fiber type, and fiber size in chronic systemic hypoxia. *Am J Physiol* 2001; 281: 241-252.
107. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
108. Bussolino F, Mantovani A, Persico G. Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 1997; 22: 251-256.
109. Shimizu M, Pelisek J, Nikol S. Vasculogenesis and angiogenesis depend on the developmental origin in the arterial tree. *Curr Med Chem* 2002; 9: 1619-1630.

110. Asahara T, Masuda H, Takahashi T et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228.
111. Deindl E, Fernandez B, Höfer IE et al. Arteriogenesis, collateral blood vessels, and their development. In: Rubanyi GM, editor. *Angiogenesis in health and disease – basic mechanisms and clinical applications*. New York, Marcel Dekker INC 2000; 31-46.
112. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6: 389-395.
113. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 1994; 1;79(2): 315-328.
114. Fong GH. Mechanisms of adaptive angiogenesis of tissue hypoxia. *Angiogenesis* 2008; 11: 121-140.
115. Hamilton WJ, Boyd JD, Mossman HW. *Human embryology*. Baltimore: Williams & Wilkins 1962; 13-26.
116. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3): 353-364.
117. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 37(2): 97-114.
118. Harris AL. Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet* 1997; 349.
119. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285(21): 1182-1186.
120. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82(1): 4-6.
121. D'Amore PA, Smith SR. Growth factor effects on cells of the vascular wall: a survey 1993; 8(1): 61-75.

122. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB et al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14): 2474-2484.
123. Gasparini G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia *Drugs* 1999; 58(1): 17-38.
124. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. Tercüme: Başaklar AC. Langman Medikal Embriyoloji. Ankara. Palme Yayıncılık 2005; 85–113.
125. Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*. Pennsylvania. Elsevier Science 2003; 59–98.
126. Çelik İ, Öznurlu Y. *Veteriner Embriyoloji*. Malatya: Medipres Yayıncılık Eylül 2011; 160-161.
127. Gray J, Ross ME. Neural Tube Closure in Mouse Whole Embryo Culture. *J Vis Exp* 2011; 56: 31-32.
128. Wang GL, Jiang BH, Rue EA et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-5514.
129. Kopani M, Celec P, Danisovic L et al. Oxidative stress and electron spin resonance. *Clinica Chimica Acta* 2006; 364: 61–66.
130. Racz O, Sipulova A. Random postsynthetic changes of biological structures and the aging process. *Compendium of General Pathological Physiology*. Kosice: Medical Faculty, P.J. Šafárik University; 1995; 6: 174-216.
131. Gracy RW, Talent JM, Kang Y et al. Reactive oxygen species: The unavoidable environmental insult? *Mutat Res* 1999; 428(1-2): 17-22.
132. Lauzier M, Page EL, Michaud MD et al. Differential regulation of hypoxia-inducible factor-1 through receptor tyrosine kinase transactivation in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology* 2007; 148(8): 4023–4031.
133. Heyman SN, Rosen S and Rosenberger C. Hypoxia-inducible factors and the prevention of acute organ injury. *Critical Care* 2011; 15: 209. <http://ccforum.com/content/pdf/cc9991.pdf> Son Erişim Tarihi: 16.04.2014.

134. Francis S, Diane H, Nathan MY et al. The effect of hypoxia on facial shape variation and disease phenotypes in chicken embryos. *Disease Models & Mechanisms* 2013; 6(4): 915–924.
135. Scully D, Keane E, Batt E et al. Hypoxia promotes production of neural crest cells in the embryonic head. *The Company of Biologists* 2016 15; 143(10):1742-1752.
136. Jauniaux E, Gulbis B, Burton GJ. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the foetus-a review. *Placenta* 2003; 24(Suppl A):86-93.
137. Helen ER, Carolina R, Elin G et al. Control of the heart rate of rat embryos during the organogenic period. *Dove Press Journal Hypoxia*: 8; 2016.
138. Strasly M, Cavallo F, Geuna M et al. IL-12 inhibition of endothelial cell functions and angiogenesis depends on lymphocyte-endothelial cell cross-talk. *J Immunol* 2001; 166(6): 3890-3899.
139. Marmé D. Tumor angiogenesis: the pivotal role of vascular endothelial growth factor. *World J Urol* 1996; 14: 166-174.
140. Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA et al. Evaluation of VEGF mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J Cell Physiol* 2008; 214: 537-544.
141. Uçar I, Ertekin T, Nisari M et al. The potential teratogenic effects of interferon beta-1a (IFN β -1a) and interferon beta-1b (IFN β -1b) on in vitro embryonic development. *Folia Morphologica* 2015; 75: 257-263.
142. Yajun X, Yong L, Yunan T et al. The maternal combined supplementation of folic acid and Vitamin B12 suppresses ethanol-induced developmental toxicity in mouse fetuses. *Reproductive Toxicology* 22 2006; 56–61.
143. Mills JL, Rhoads GG, Simpson JL et al. The absence of a relation between the periconceptional use of vitamins and neural-tube defects. National Institute of Child Health and Human Development Neural Tube Defects Study Group. *N Engl J Med* 1989 17; 321(7):430-435.

144. Milunsky A, Jick H, Jick SS et al. Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects. JAMA 1989 24; 262(20):2847-2852.
145. Le MP. Clinical issues. JOGNN 1999; 28(5): 520-533.
146. Escamilla RP. Periconceptional folic acid and neural tube defects. Public health issues. Bulletin of PAHO 1995; 29: 250-263.
147. Tunçbilek E. Türkiye’de konjenital malformasyon sıklığı, dağılımı, risk faktörleri ve yenidoğanların antropometrik değerlendirilmesi. TÜBİTAK Matbaası, Ankara 1996: 53-61.
148. Patat D, Nisari M, Dağlı E, Çayan D. Kültür Ortamında Büyütülen Ve Hipoksi Oluşturulan Embriyolar Üzerine B₁₂ Vitamininin In Vitro Etkisi, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, s 10-13, 2018 Akdeniz Üniversitesi, Antalya.

KARARA ESAS OLAN EVRAKIN				GÜNDEM
KARAR NO	TARİHİ	NO.	NEREDEN GÖNDERİLDİĞİ	
25	07.12.2015			Yüksek Lisans Programı Öğrencisi Ertuğrul DAĞLI'nın Tez Projesi hk.
Tarih: 07 12 2015				
Başkan: Prof. Dr. Erdoğan UNUR				
Üyeler: Prof. Dr. Harun ÜLGER				
Prof. Dr. Kenan AYCAN				
Doç. Dr. Niyazi ACER				
Doç. Dr. Tolga ERTEKİN				
Yrd. Doç. Dr. Mehmet NISARI				
Yrd. Doç. Dr. Ayşe SAĞIROĞLU				

Anabilim dalımız yüksek lisans programı öğrencisi Ertuğrul DAĞLI'nın hazırlanmış olduğu yüksek lisans tez projesi "Hipoksik Embriyo Kültüründe Folik Asten Embriyo Gelişimi üzerine Etkisi" isimli tez konusu akademik kurulunda görüşülmüş araştırmanın yapılması uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Erdoğan UNUR

Prof. Dr. Kenan AYCAN

Prof. Dr. Harun ÜLGER

Doç. Dr. Niyazi ACER

Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

Yrd. Doç. Dr. Mehmet NISARI

Yrd. Doç. Dr. Ayşe SAĞIROĞLU



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



Enstitü Yönetim Kurulu

Sayı :42081359-050.02.04/8608

01/02/2016

Konu :Yönetim Kurulu Kararı(Ertuğrul
Dağlı Yüksek Lisans Teze Başlama)

ANATOMİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitü Yönetim Kurulunun 28.01.2016 tarih ve 714 sayılı toplantısında Yrd.Doç.Dr.Mehtap NİSARİ'nin danışmanlığını yürüttüğü Anabilim Dalımız Yüksek Lisans programı öğrencisi Ertuğrul DAĞLI'nın tez projesi Yönetmeliğin 40(1)maddesine göre kabul edilmiş ve tez çalışmalarına başlaması uygun görülmüştür.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü V.



T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 13.01.2016

Toplantı Sayısı: 01

Karar No:16/001

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 13.01.2016 tarihinde Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA'nın başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Fahri OĞUZKAYA	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Gültekin ATALAN	Prof. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
Çağrı ŞAKALAR	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	KATILMADI
M. Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Nühket KÜTÜK	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Serpil SARIÖZKAN	Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Çağrı Çağlar SİNMEZ	Yard.Doç. Dr.	Veteriner Fakültesi	
Hamiyet ÜNAL	Yard.Doç. Dr.	Eczacılık Fakültesi	
Osman İBİŞ	Yard.Doç. Dr.	Ziraat Fakültesi	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Avukat	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	KATILMADI
Asiye GÖKBELLEN	Yardım Sevenler Derneği Başkanı	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	KATILMADI

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi A.D.'dan Yard. Doç. Dr. Mehtap NİSARİ tarafından sunulan "Hipoksik Embriyo Kültüründe Folik Asitin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisi." başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 13.01.2016
Etik kurul Başkan Vekili : Prof. Dr. Fahri OĞUZKAYA
İmza :

tez

ORJINALLIK RAPORU

%**21**
BENZERLİK ENDEKSİ

%**20**
İNTERNET
KAYNAKLARI

%**6**
YAYINLAR

%
ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	% 5
2	sagens.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	istanbulsaglik.gov.tr İnternet Kaynağı	% 2
4	aos-vniimk.ru İnternet Kaynağı	% 1
5	www.erciyesmedj.com İnternet Kaynağı	% 1
6	www.math.yorku.ca İnternet Kaynağı	% 1
7	NİSARİ, Mehtap and ÜLGER, Harun. "Embriyo kültürü tekniği", Fırat Üniversitesi, 2010. Yayın	% 1
8	dergipark.ulakbim.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1

ÖZGEÇMİŞ:

8 Ağustos 1987 yılında Kırşehir’de doğdum. 1993 yılında Çadırılı Hacı Yusuf Köyü İlkokul’unda başlayan eğitim ve öğretim hayatıma 1998 Yılında Yeşilyurt Mustafa Bozkurt ilköğretim okulunda devam ettim. 2001 Yılında Kırşehir lisesine başlayıp 2004 yılında lise öğretimimi tamamladım. 2007 Yılında başladığım Bozok Üniversitesi Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik bölümün’den 2011 yılında mezun oldum. Üniversite öğretimim süresi içerisinde 2009 yılında 8. Ulusal & Uluslar arası Öğrenci Hemşirelik Kongresi GATA’ya iki poster bildirisi ile katıldım. 2010 yılında 9. Ulusal & Uluslar arası Öğrenci Hemşirelik Kongresi MUĞLA’ya beş poster bildirisi ile katıldım. 2011 Yılında Ankara Hacettepe Üniversitesi’ne atandım ilk görev yerim olan Beyin ve Sinir Cerrahi Yoğun Bakım servisinde çalışmaya başladım. Askerlik görevimi Yıldızeli/SİVAS 343.KSD. İlçe Jandarma Komutanlığında yaptım. 2012 yılında Sağlık Bakanlığı Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesinde çalışmaya başladım. 2013 yılında Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Tıp Bilimleri Anatomi Anabilim Dalı’nda yüksek lisansa başladım. Halen Sağlık Bakanlığı Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Eğitim Ve Araştırma Hastanesi’nde çalışmaktayım

Sertifika ve Bilimsel Yayınlar:

- 1- 8. Ulusal & Uluslar arası Öğrenci Hemşirelik Kongresi GATA 2009/ANKARA
- 2- 8. Ulusal & Uluslar arası Öğrenci Hemşirelik Kongresi GATA 2009/ANKARA
- 3- 9. Ulusal & Uluslar arası Öğrenci Hemşirelik Kongresi 2010/MUĞLA
- 4- 9. Ulusal & Uluslar arası Öğrenci Hemşirelik Kongresi 2010/MUĞLA
- 5- 9. Ulusal & Uluslar arası Öğrenci Hemşirelik Kongresi 2010/MUĞLA
- 6- 9. Ulusal & Uluslar arası Öğrenci Hemşirelik Kongresi 2010/MUĞLA
- 7- 9. Ulusal & Uluslar arası Öğrenci Hemşirelik Kongresi 2010/MUĞLA
- 8- CPR(Cardio Pulmoner Resüsitasyon) Sertifikası HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ 2011
- 9- Aile Danışmanlığı sertifikası GAZİKENT ÜNİVERSİTESİ 2012