

**T. C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ**

**ERKEN TAVUK EMBRİYOSUNDA VALPROİK ASİT'İN NÖRAL TÜP GELİŞİMİNDEKİ OLUMSUZ
ETİKİSİ ÜZERİNE
FOLİK ASİT ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Araş. Gör. Dr. Adem BURSALI

**Tıp Fakültesi
Nöroşirurji Anabilim Dalı
UZMANLIK TEZİ**

Danışman: Prof. Dr. Mehmet SELÇUKİ

Manisa - 2010

İÇİNDEKİLER

Teşekkür	
Özet	
Summury	
1.Giriş	
2.Genel Bilgiler	
2.1.İnsanda Nöral Dokunun Embriyolojik Gelişimi	
2.2.Nöral Tüp Defekti	
2.3.Tavuk Embriyosu Gelişimi	
2.3.1.Yumurtlama Öncesi Embriyonun Gelişimi	
2.3.2.Yumurtlama Sonrası Oda Koşullarında Embriyonun Gelişimi	
2.3.3.Kuluçka Makinesi Koşullarında Embriyonun Gelişimi	
2.4.Hamburger Hamilton Sınıflaması	
2.5. Valproik Asit	
2.5.1.Çalışmamızda Neden Valproik Asit Seçildi	
2.5.2.Valproik Asit İle İlgili Farmakolojik Bilgiler	
2.6.Folik Asit İle İlgili Farmakolojik Bilgiler	
3.Gereç ve Yöntem	
3.1.Gereç	
3.1.1.Deney Hayvanı	
3.1.2.Laboratuar Koşulları	
3.1.3. İnkübatör	
3.2.Yöntem	
3.2.1.Tavuk Embriolarına Etken Madde Enjeksiyonu (30'ncu saat çalışması)	
3.2.2.Tavuk Embriolarının Elde Edilmesi (72'nci saat çalışması)	
3.2.3.Tavuk Embriolarının Işık Mikroskopik İncelenmesi	
3.2.4.Histopatolojik Takip	
3.2.4.1.Parafin Doku Takibi	
3.2.4.2.Hematoksilen Eosin Boyama	
3.2.4.3.İndirek İmmünohistokimyasal Boyama	
3.2.4.4.TUNEL Boyaması	
3.2.4.5.İmmunohistokimyasal Değerlendirme	
3.2.5.İstatistiksel Analiz	
4.Bulgular	
4.1.Makroskopik Bulgular	
4.2.Embriyonun Bütününün Işık Mikroskobu Altında İncelenmesi	
4.3.Histopatolojik Bulgular	
4.3.1.Hematoksilen Eosin Boyama	
4.3.2.TUNEL Boyaması Sonuçları	
4.3.3.İmmünohistokimyasal Boyama Sonuçları	
4.4.İstatistiksel Değerlendirme	
5.Tartışma	
6.Sonuç ve Öneriler	
7.Kaynaklar	

TEŞEKKÜR

Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirürji Anabilim Dalı'nda aldığım uzmanlık eğitimim süresince, engin bilgisini ve cerrahi tekniklerini bana aktaran, her türlü desteğini sevgi, sabır ve alçak gönüllülükle gösteren, bilim insanlığının yanısıra hayata dair çok güzel davranışlarını örnek aldığım, değerli hocam, tez danışmanım ve bölüm başkanımız Prof. Dr. Mehmet SELÇUKİ'ye,

Bilimsel öğretilerini, cerrahi deneyimlerini ve aydın hayat görüşlerini benimle paylaşan, iyi niyetlerini ve özverilerini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli hocalarım Doç. Dr. Cüneyt TEMİZ' e, Yard. Doç. Dr. Ahmet Şükrü UMUR' a, Yard. Doç. Dr. Mustafa BARUTÇUOĞLU'na ve asistanlığımın son döneminde birlikte çalışma imkanı bulduğum, yaşam ve nöroşirürji adına bana birçok şey katan sevgili ağabeyim Yard. Doç. Dr. Yusuf Kurtuluş DURANSOY'a,

Zor ve çetin geçen asistanlık eğitimimde bir kardeşesine omuz omuza çalıştığımız, birbirimize dayanak olduğumuz, mutlulukları ve güçlükleri paylaştığımız, şu an mezun olan arkadaşlarım Op. Dr. Murat SAYIN, Op. Dr. Onur YAMAN, Op. Dr. Can YALDIZ, Op. Dr. Emin Mehmet EMİNOĞLU'na ve halen asistanlık süreleri devam eden tüm kardeşlerime,

Amaç insana hizmet olduğunda adeta birbirleriyle yarışan, tüm olanaksızlıklara rağmen harikalar yaratan kliniğimiz ve ameliyathanemiz hemşireleri ve sağlık çalışanlarına,

Ne olursam olayım, yaptığım işin en iyisini yapmam gerekliliğini bana öğreten, eğitim hayatımın lokomotifini, ilk ustam, rahmetle andığım babama, hiçbir zaman şefkatini ve emeğini esirgemeyen sevgili annem, canım ablalarım Gürbil, Gülcan ve ailelerine,

Yaşam kaynaklarım ikizlerimin annesi, her türlü zorlukta karşılıksız desteği ve şefkati ile beni düzlüğe çıkaran, ailemizin olmazsa olmazı biricik eşim Yeliz' e,

Sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Adem BURŞALI

ÖZET

Anormal nörulasyon aşaması sonucu oluşan nöral tüp defektleri, embriyonel ve fetal dönemde ölümle sonuçlanabildiği gibi, doğum sonrası dönemde medikal, finansal ve sosyal içerikli sorunları da beraberinde barındıran, uzun süreli rehabilitasyon ihtiyacı gösteren konjenital anomalilerdir.

Bu çalışmanın amacı **valproik asitin (VPA) oluşturduğu orta hat kapanma defektinin folik asit (FA) ile önlenabilirliği olasılığını** erken dönem civciv embriyosu nöral tüp gelişiminde araştırmaktır. Nörulasyonu incelemek için 150 adet özel patojen bulunmayan (SPF) yumurta kullanıldı. SPF yumurtalar 5 grupta incelendi (n:30). Tüm gruplar 30 saat boyunca $37,2 \pm 0,1$ °C sıcaklık ve % 60 ± 5 nem oranında inkübe edildi ve Hamburger – Hamilton sınıflamasına göre 9. evrede bir embriyolojik gelişme elde edildi. 30ncu saat çalışmasında A grubu kontrol grubu olarak, inovo B grubuna 0,2 ml serum fizyolojik (SF), C grubuna – VPA grubu (120mg/1000ml-tedavi edici plazma seviyesi) 0,72 miligram / 0,2 mililitre valproik asit , D grubuna – FA grubu (400mcg günlük doz) 0,342 mikrogram / 0,2 ml folik asit, E grubuna - VPA+FA grubu 0,72 miligram + 0,342 mikrogram / 0,2 ml valproik asit + folik asit enjekte edildi. 72. saatin sonunda tüm embriyolar yumurtadan çıkartıldı ve hematoksilen eozin ile histolojik, P53, bcl2, Tunnel, Caspase 3 ile immünohistopatolojik olarak incelendi. A, B, D, gruplarında nöral tüp defekti saptanmazken, C grubunda ölen 8 embriyonun tümünde NTD gözlemlendi, 12 embriyoda gelişme geriliği izlendi. E grubunda ölen embriyo saptanmazken, sadece 8 embriyoda gelişme geriliğine rastlandı.

Bu bulgular, tavuk embriyosunda nörulasyon aşamasında valproik asitin yaratmış olduğu teratojenitenin, folik asit etkisiyle önlenbilir olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR SÖZCÜKLER: Nöral tüp kapanma kusuru, Erken dönem civciv embriyosu, Nörulasyon, Folik asit, Valproik asit.

SUMMARY

Neural tube defect (NTD) which is a consequence of abnormal neurulation can cause serious medical problems in the prenatal and postnatal periods, can even lead to death. Besides, this congenital malformation has financial and social negative effects.

The aim of this study is to elucidate the preventive effect of folic acid on teratogenic effects of VPA in early stage chick embryos on neural tube development. Hundred and fifty specific pathogen-free (SPF) chick eggs were used to investigate the neurulation. SPF eggs were investigated in five groups (n:30). All of the groups were incubated at $37,2 \pm 0,1$ °C and 60 ± 5 % relative humidity for 30 hours and the ninth stage of the embryonic development as defined by Hamburger and Hamilton, was reached. At the 30th hour A group - control group, B group - saline injected group(0.02 ml), C group - VPA group(120mg/1000ml- therapeutic plasma level was given for each egg 0.72mg in 0.02ml saline solution), D group - FA group(400mcg was given for each egg 0.342mcg in 0.02ml saline solution) and E group - VPA-FA group(0.72mg VPA-0.342mcg FA). At the end of 72 hours all of embryos were extracted from eggs and they underwent pathological examination with hematoxylin eosin with pathological and immunohistopathological examinations with P53, bcl2, Tunnel, Caspase 3. A, B, D, groups, showed no neural tube defects. 8 embryos were died in group C while there were 12 embryos with retarded embryological development. No death was noticed in E group. Only 8 embryos were detected with reduced development stage in group E.

These findings showed that folic acid effectively prevents the teratogenic influence of VPA on chick embryo at neurulation stages.

KEYWORDS: Neural tube defect, Early chick embryo, Neurulation, Valproic acid, Folic acid.

1.GİRİŞ

İnsan gelişimi birbirini takip eden dinamik bir süreçtir. Hücre bölünmeleri sonrası gelişen ve farklılaşan embriyo daha sonra fetus halini alır. Gelişim ve farklılaşma, doğum sonrasında ergenliğin sonuna kadar devam eder.

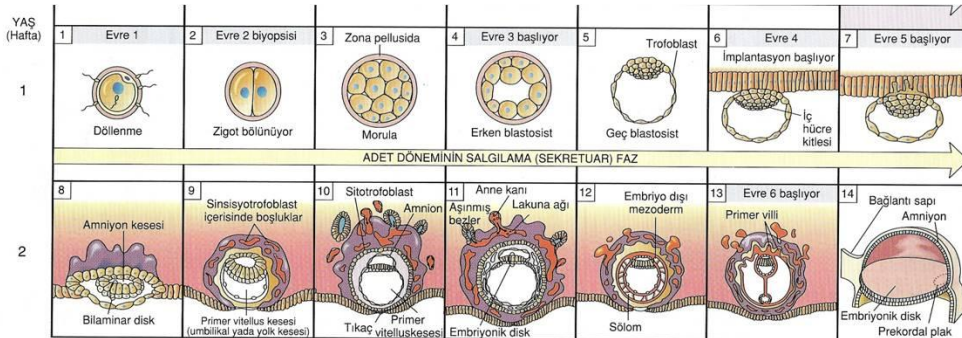
Anormal nörolasyon sonucu oluşan nöral tüp defektleri (NTD), doğum öncesi ve doğum sonrası dönemde ölüme sonuçlanabilen ya da önemli tıbbi sorunlara yol açabilen, gözardı edilemeyecek düzeyde finansal ve sosyal boyutları da beraberinde getiren doğumsal anomalilerdir. Bu nedenlerle NTD' leri her zaman araştırmacıların ilgisini çekmiş ve konu ile ilgili çeşitli deneysel modeller geliştirilmiştir.

Tavuk embriyosunda nöral tüp gelişiminde valproik asitin yaratmış olduğu olumsuz etkilerin folik asit yardımı ile önlenilirliliğini histopatolojik ve immünohistopatolojik yöntemlerle yapılan araştırmalardaki doku kesitlerinde incelemeyi amaçladığımız bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Nöroşirurji, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dallarınca ortaklaşa yapılmıştır. Ayrıca C.B.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri (2010-058 tarih-sayılı proje başvurusu) destek fonuyla da desteklenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İnsanda Nöral Dokunun Embriyolojik Gelişimi

İnsan gelişimi birbirini takip eden bir süreçtir. Dışiden gelen oositin erkekten gelen sperm ile döllenmesi sonucu başlar. Döllenme sonucu oluşan son derece özelleşmiş ve totipotent bir hücre olan zigot, hücre bölünmesi, hücre göçü, programlı hücre ölümü (apoptozis) ve büyüme sonucu çok hücreli insan yapısına dönüşür. İnsan gelişimi, “prenatal (doğum öncesi) dönem” ve “postnatal (doğum sonrası) dönem” olarak ikiye ayrılır. Prenatal dönem de kendi içinde ilk 8 haftayı kapsayan “embriyonik dönem” ve 57. günden itibaren fetusun anneyi terk etmesine kadar devam eden “fetal dönem” olarak ikiye ayrılır (1). İlk 2 haftalık prenatal dönemde gözlenen önemli değişiklikler Şekil 2.1' de özetlenmiştir (Şekil 2.1).

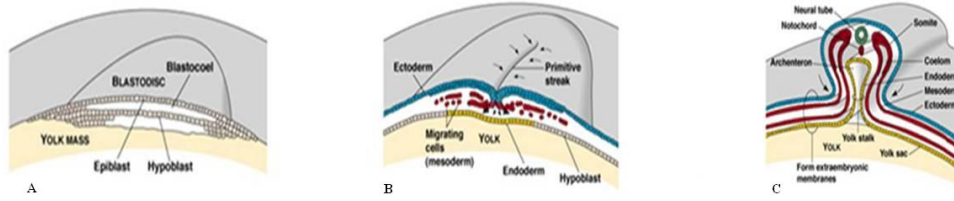


Şekil 2.1: İlk 2 haftalık prenatal dönemi (1).

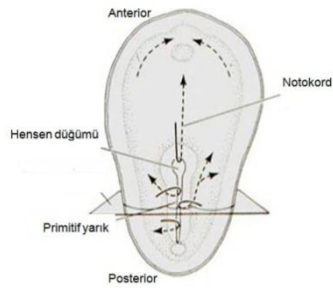
Embriyolojik evreler sırasıyla; germ hücrelerinin olgunlaşması ve fertilizasyonu takiben, segmentasyon, blastokist, gastrulasyon, embriyonik dönem ve fetal dönem olarak sınıflandırılır (2, 3) .

Ovulasyonu takiben fertilizasyon olduğu takdirde, oluşan zigot hızla bölünmeye başlar. Bu dönemde birbirini izleyen bir seri mitotik bölünme ile daha küçük hale gelen ve sayısı artan blastomerler oluşur. Üç bölünmeden sonra blastomerler iç ve dış tabakaları olan, birbirine sıkıca tutunan bir hücre topu haline gelmek üzere bir araya gelirler. Embriyo yeniden bölünerek 16 hücreli “morula (dut)” şekline gelir. Morulada içteki hücreler iç hücre kitlesini, dıştaki hücreler dış hücre kitlesini oluşturur (3). Fertilizasyondan 3 veya 4 gün sonra morula uterus boşluğuna ilerlerken içinde bir kavite görülmeye başlar. Bu kavitenin içerisine sıvı dolar ve blastokist boşluğu oluşur. Bu evredeki embriyoya “blastokist”, boşluğa da “blastosel” adı verilir. Blastokistin dış kısmındaki hücreler daha sonra trofoblastları oluştururken iç kısmındaki hücreler bir kenara itilip embriyoblastı yani iç hücre kitlesini oluşturur (3, 4). İntrauterin hayatın 14. gününde implantasyon ile birlikte iç hücre kitlesi farklılaşmasına devam ederken, blastoselin içinde de embriyonal disk farklılaşır ve diskin dış kısmındaki hücreler “epiblast”, iç kısmındaki hücreler “hipoblast” olarak ayrılır (Şekil 2.1, Şekil 2.2 A). Embriyoblastta başlangıçta epiblastlar ile trofoblastlar arasında sıkı bağlantı varken zaman içerisinde epiblast hücrelerinde farklılaşan hücreler amnioblast hücrelerini oluşturarak iki hücre grubu arasında “amnion boşluğu” oluşur (3, 4, 5).

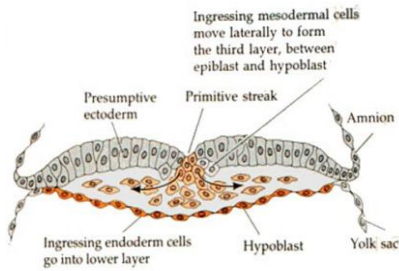
Üçüncü haftanın en belirleyici olayı gastrulasyondur. Gastrulasyon, primitif çizginin belirmesi ile başlar. Primitif çizginin sefalik ucu genişleyerek primitif düğümü (Hensen düğümü) yapar (Şekil 2.3). Epiblast hücreleri, primitif çizgi ve düğüm boyunca invajine olarak iki yeni hücre tabakasını yani “endoderm” ve “mezodermi” oluştururlar. İntraembriyonik mezodermal germ tabakasının hücreleri *yolk sac* ve amnionu örten ekstraembriyonik mezodermlle ilişki kurana kadar diğer iki germ tabakasının arasına göç ederler (4, 5, 6) (Şekil 2.4, Şekil 2.2 B).



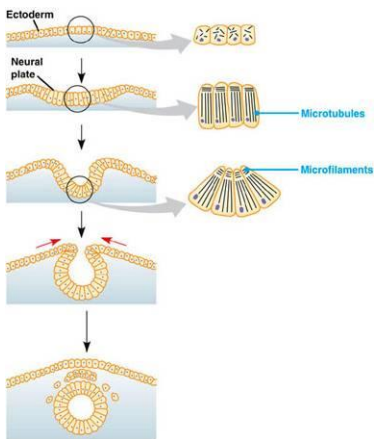
Şekil 2.2:A) Yarıklanma, B) Gastrulasyon, C) Erken organogenez (www.seattlecentral.edu).



Şekil 2.3: 16 günlük bir embriyoda germ diskinin dorsal yüzünün şematik görünümü (www.geocities.com).

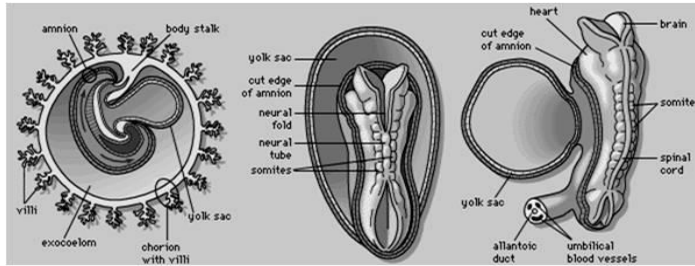


Şekil 2.4: 15. günde primitif çizginin kranial bölgesinden geçen transvers kesit. Epiblast hücrelerin invajinasyonu (www.geocities.com).



Şekil 2.5: Nöral tabakanın şekillenmesinde etkili olan mikrotübül ve mikrofilamentler (www.faculty.valencia.cc.fl.us/g lindbeck).

Primitif çukurda, invajine olan prenatal hücreler ise prokordal plağa ulaşana kadar ilerler. Bu hücreler, notokordal plak halinde endoderme karışırlar. Gelişimin daha ileri evrelerinde, notokordal plak endodermden ayrılır ve solid bir kordon görünümüne sahip “notokord” oluşur (Şekil 2.2 C). Embriyonun orta hat eksenini oluşturan notokord aksiyal iskeletin ana çatısıdır. Üçüncü haftanın sonunda üç esas germ yaprağı olan ektoderm, mezoderm ve endoderm oluşur. Bundan sonra doku ve organların farklılaşması başlar (3, 4, 5, 6) (Şekil 2.2 C, Şekil 2.6).



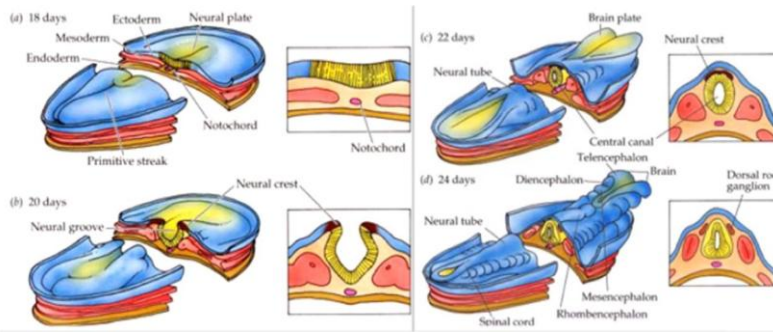
Şekil 2.6: Gastrulasyon dönemi. (www.becomehealthynow.com).

Üçüncü haftanın başında ektoderm germ yaprağı sefalik bölgede geniş, kaudalde daha dar, yassı bir disk biçimindedir. Notokordun gelişmesi ve indüktif etkisi ile notokordun üzerinde bulunan kısımda ektoderm kalınlaşıp “nöral plağı” oluşturur. Plağın hücreleri nöroektodermi oluşturur ve bu hücrelerin indüksiyonu nöralasyon sürecinin başlangıcını temsil eder (3, 4).

Ektodermin indüksiyonunda özellikle dönüştürücü büyüme faktörü (*transforming growth factor - TGF*) ailesi içinde yer alan aktivin, fibroblast büyüme faktörü, bunun dışında retinoik asit ve çeşitli nörotransmitterler gibi sinyal molekülleri görev almaktadır (3, 7, 8).

İndüksiyon gerçekleşir gerçekleşmez terlik biçimli nöral plak zamanla genişleyip, primitif çizgiye doğru uzanır. Nöral plak başlangıçta çok sıra oluşturan nöroepitel hücrelerinden ibarettir. Farklı görünüşteki bu hücreler nöroektodermin izoprizmatik biçimli diğer hücrelerinden daha yukarıya doğru yükselir. Tabaka halindeki bu oluşum, embriyonun dorsalinde gebeliğin 15. ve 16. gününde belirir ve 17. günde kenarlarında hücre proliferasyonu olarak nöral oluk haline gelmektedir. Her iki kenarda bulunan paraaksiyal mezoderm ve epitel dokusunun itme etkisi ile kıvrılmakta ve nöral kanalı oluşturmak üzere hazırlanmaktadır. Burada, aktin ve miyozin benzeri kontraktıl proteinlerin, kıvrılmış olan tabakanın sürekliliğine yardımcı olduğu düşünülmektedir (4, 8) (Şekil 2.5). Nöral plağın nöral tüp haline gelmesi dört adımda gerçekleşmektedir (9, 10). Gelişim sırasında ilk olarak 3 menteşe noktası belirir (Şekil 2.7 A).

Bunlardan ilki orta hat boyunca, diğer ikisi ise yanlarda ve dorsal kısımda yerleşmiştir. İkinci adımda (nöral tabakanın şekillenmesi), yanlardan ve orta hattan kıvrılma meydana gelmektedir (Şekil 2.7 B). Üçüncü adım (nöral tabakanın katlanması), yandaki hücre gruplarının her iki taraftan yükselerek katlanması ile oluşmaktadır (Şekil 2.7 C). Kaynaşma gelecekte boynun oluşacağı 4. somit bölgesinden başlar sefalik ve kaudal yönde devam eder (Şekil 2.6). Bu olayların sonucunda nöral tüp oluşur (Şekil 2.7 D). Kaynaşma tamamlanana kadar nöral tüpün kaudal ve sefalik uçları, amnion boşluğu ile sırasıyla kranial ve kaudal nöroporlar yoluyla ilişkidir. Kranial nöropor 25. gün (18 - 20 somitli evre) ve posterior nöropor 27. gün dolaylarında (25 somitli evre) kapanır. Nöroporların kapanmasıyla nörolasyon artık tamamlanmıştır. Sinir sistemi, kaudal bölgesi dar ve sefalik bölgesi daha geniş, içinde spinal kord, birkaç dilatasyon ve beyin keseciklerinin yer aldığı kapalı bir tübüler yapı haline gelmiştir. Bu evrede embriyo yaklaşık 3 - 5 mm boyundadır (4).



Şekil 2.7: A) Nöral tabakanın oluşması, B) Nöral tabakanın şekillenmesi, C) Nöral tabakanın katlanması, D) Nöral tüpün oluşması (spinwarp.ucsd.edu).

Artık 3 germ yaprağına da sahip olan embriyoda nöral tüp gelişimi, 28.günde tamamlanan “**primer nörolasyon**”, 29. ve 52. günler arasında oluşan “**kuyruk tomurcuğunun kanalizasyonu**” veya “**sekonder nörolasyon**” ve 52. günden başlayarak tüm intrauterin hayat boyunca devam eden “**dedifferansiyasyon**” olarak 3 bölüme ayrılabilir (4, 6, 7).

Kaudal nöropor kapandığında tüm nöral tüpün üzeri, yüzey ektodermi ile kapanmış durumdadır. Intrauterin hayatın 30. gününde oluşan bu hücre grubunda vakuolizasyon gelişir. Bunların birbirleri ile birleşmesi sonucu hücre grubu içinde tek bir kavite oluşur. Bu olaya “**kanalizasyon**” adı verilmektedir. 38. günde bu hücre grubu, nörolasyon sonucu oluşmuş olan üst medulla spinalis ile L1-2 hizasında birleşir ve füzyon oluşur (5). Birleşmeden sonra gelişen, kontrollü ve planlı hücre ölümü ile kuyruk tomurcuğunun regresyonu başlar. En kaudal kısımda olan hücre grubu 6. ve 7. haftada regresyona uğrar ve ileride filum terminale olacak olan fibröz bir bant oluşur (4, 11).

Bu dönemde nörülasyon ve nöral dokunun üzerinin cilt ile kapanması tamamlanmıştır. Posterior nöroporun bulunduğu bölge, gelişmiş fetüste T11-L4 segmentleri arasına uymaktadır ve burası myelodisplazinin en sık karşılaştığı bölge olarak bilinmektedir (9). Posterior nöroporun kapanması ile birlikte pia, araknoid ve duramater gelişmeye başlar. Santral sinir sistemini (SSS) 40. gününde ventral yüzde belirmeye başlayan dura mater, 52. günde tüm sistemi sarar (4, 9).

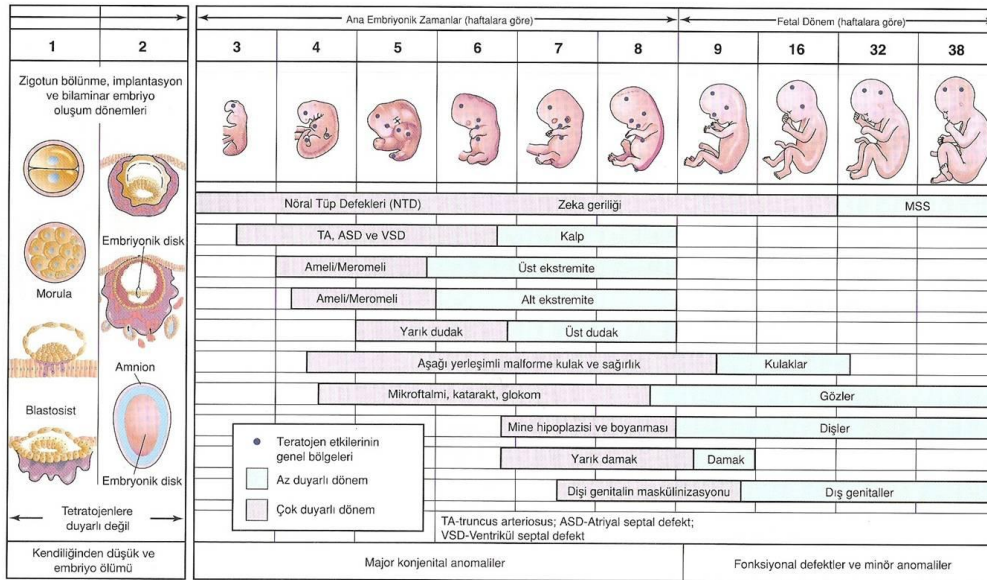
2.2. Nöral Tüp Defekti (NTD)

Konjenital anatomik anomaliler, doğum defektleri ve konjenital malformasyonlar, doğumda var olan gelişim bozukluklarını ifade etmek için kullanılan terimlerdir. Bebek ölümlerine neden olan doğum defektleri yapısal, fonksiyonel, metabolik, davranışsal ya da kalıtsal olabilir (1). İnsan konjenital anomalileri ya da doğum defektlerinin, %50 – 60' ı bilinmeyen faktörler, % 20 – 25' i multifaktöriyel kalıtım, % 7 – 10' u çevresel ajanlar, % 7 – 8' i mutant genler ve % 6 – 7' si de kromozom anomalilerine bağlı gelişir. Doğumsal anomalilerin %2' sinden daha az miktarı ilaç ve kimyasal maddelerle oluşmaktadır (1).

Anatomik anomaliler, tekli veya çoklu, küçük veya büyük, klinik açıdan önemli olabilir. İnsanda organ sistemlerine göre doğumda izlenen büyük anomali sıklıkları sırasıyla; beyin 10:1000, kalp 8:1000, böbrekler 4:1000, ekstremiteler 2:1000, diğerleri 6:1000' dir. Tek minör anomaliler, yenidoğanların yaklaşık %14' ünde vardır. Bu minör anomali eşlik eden başka minör veya majör anomalilerin varlığına işaret edebilir. Yenidoğanların %90' ı 3 veya daha fazla minör, 1 veya daha fazla majör anomaliye sahiptir. %3' ü klinik olarak önemli konjenital anomaliyle, %0,7' si de çoklu majör anomaliyle doğar. Majör gelişim defektleri, erken dönem embriyolarda daha yaygındır (%10 - 15), fakat çoğu ilk 6 haftada kendiliğinden düşükle sonlanır. Spontan düşüklerin %50 – 60' ında kromozom anomalileri vardır (1).

Kuzey Amerika' da yenidoğan ölümlerinin %20' sinden fazlası doğum defektlerine bağlıdır. Yenidoğanlarda nöral tüpün bir bölümünün kapanmaması sonucu ağır bir vertebral defekt tipi olan spina bifida sistika gibi büyük yapısal anomalilerin görülme sıklığı yaklaşık %3' dür. Doğumdan sonra ek anomalilerin fark edilebilme sıklığı 2 yaşında %6, 5 yaşında %8' dir (1).

Embriyo, uterus içerisinde iyi korunduğu halde, annenin teratojenler olarak bilinen bazı çevresel ajanlardan etkilenmesi gelişim bozukluklarına yol açabilir. Teratojen, konjenital anomali oluşumuna neden olan veya anomali insidansını arttıran herhangi bir ajandır. Hızlı farklılaşma dönemi sırasında, organlar ve embriyonun bazı bölümleri teratojenlere daha duyarlıdır (1) (Şekil 2.8). Biyokimyasal farklılaşma, morfolojik farklılaşmadan önce olaylanır ve bu sırada yapılar teratojenlere daha duyarlıdır. Hücresel farklılaşma başlayıncaya kadar, teratojenler anomali oluşmasına neden olacak şekilde etkili değildir. Ancak bunların erken dönem etkileri embriyonun ölümüne neden olabilir. Bir teratojen, hücrelerin hepsini ya da çoğunu hasarlayabilir, bu da embriyonun ölümü ya da sadece birkaç hücrenin ölümü ile sonuçlanabilir. Bu durumda *konseptus* (zigottan itibaren gelişen, embriyo ile birlikte plasentanın embriyolojik bölümü ve ilişkili tüm membranlarını kapsayan iç ve dış yapılar) kendini yenileyebilir ve embriyo doğum defekti oluşmadan gelişebilir.



Şekil 2.8: İnsan prenatal gelişiminin kritik dönemlerinin şematik görünümü. (Koyu renkli bölge yüksek düzeyde duyarlı zamanı gösterirken bu dönemde majör defektler oluşabilir. Açık renkli bölge ise az duyarlı dönemi gösterir ve minör anomaliler oluşabilir) (1).

İlaçların, kimyasal ajanların ve diğer çevresel faktörlerin embriyolojik gelişimi bozmalarının ve anomali oluşumunu uyarmalarının gerçek mekanizması halen belirsizdir. Örneğin; erken gebelik esnasında bir sedatif olan talidomid tüketen annelerin bebeklerinde, birçok gelişimsel anomaliler ve ekstremité anomalileri gözlenmiştir. Yaklaşık 60 yıl kadar önceki bu keşif sonucu araştırmacılar, geniş çaplı olarak ilaçların insan doğum defektlerinin etiyolojisindeki rolüne odaklanmıştır.

Bugün talidomidin anomali oluşturma mekanizması hala gizemlidir ve hipnotik olan bu ajanın embriyonik gelişimi nasıl etkilediğini açıklamak için yirmiden fazla hipotez üretilmiştir (1).

Birçok çalışma, bazı kalıtsal ve çevresel etkilerin embriyonik gelişimi, ekstrasellüler matriks, intrasellüler çevre, hücre yüzeyini ve fetal çevreyi değiştirerek etkilediğini göstermiştir. İlk hücresel yanıtın birden fazla şekilde (genetik, moleküler, biyokimyasal ve biyofiziksel) gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu da hücresel döngüde farklı sıralanmanın oluşmasına neden olur. Bu farklı lezyonlar, intrauterin ölüm, gelişme geriliği, fetal büyüme geriliği veya fonksiyon bozuklukları gibi çeşitli şekillerde en son defektin şekillenmesine neden olur. En sık bilinen teratojen ajanlar Tablo 2.1' de özetlenmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: En sık karşılaşılan teratojen ajan grupları.

Gruplar	Ajanlar
Çevresel	sigara, kafein, alkol, organik civa, kurşun, poliklorlanmış bifeniller, iyonizan radyasyon
İlaçlar	
Androjen ve progesteronlar	etisteron, noretisteron, DES (dietilstilbestrol)
Antibiyotikler	tetrasiklin, streptomisin
Antikoagülanlar	warfarin
Antiepileptikler	trimetadon, fenitoin, valproik asit
Antineoplastikler	aminopterin, metotreksat
Kortikosteroidler	kortizon, hidrokortizon
ACE inhibitörleri	
İnsülin ve hipoglisemik ilaçlar	tolbutamid
Retinoik asit (vitamin A)	
Tiroid ilaçları	
Ca kanal blokerleri	verapamil
Lokal anestetikler	
Salisilatlar	
Sedatif ilaçlar	talidomid
Psikotrop ilaçlar	lityum, diazepam, oksezepam, SSRI' lar
Yasak ilaçlar	kokain, metadon
Enfeksiyon etkenleri	kızamıkçık, CMV, HSV, varisella, HIV, toksoplazma, treponoma pallidum

Embriyo diskinin ortasında oluşan çizgisel kabarıklık, embriyonun orta hattını belirleyen ilk oluşumdur. Orta hattaki kabarıklığı yapan hücreler daha sonra orta hat çizgisinden ve ilkel delikten içeriye girerek epiblast ve hipoblast adı verilen alt ve üst tabakaların arasına yerleşerek mezodermi oluşturmaya başlar. Üç tabakalı embriyonun olduğu gastrulasyon dönemi sonrası önce SSS gelişmeye başlar. SSS gelişimi de 3 aşamada incelenir.

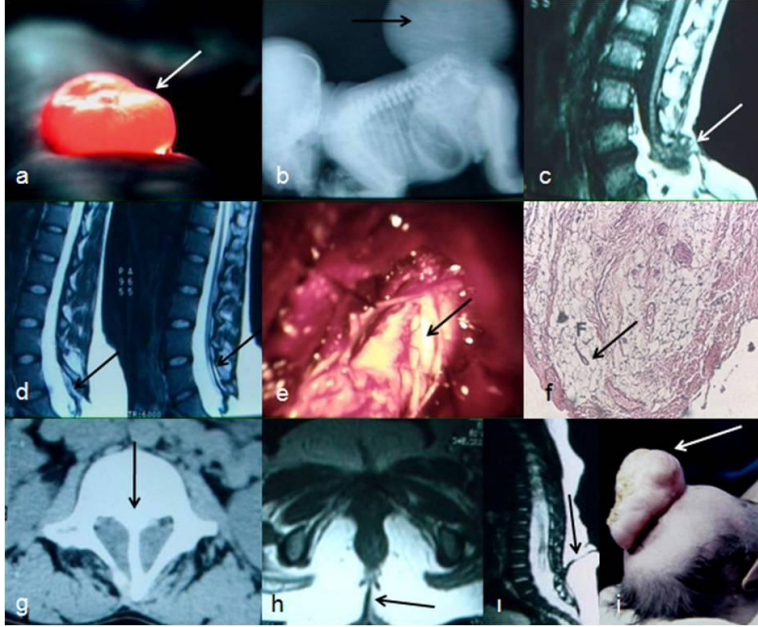
1. Nörülasyon (16 - 28. günler): Orta hattın iki yanından çoğalan hücrelerin yaptıkları yükseltinin daha sonra orta hatta birleşerek nöral tüpü oluşturması. 2. Kuyruk tomurcuğunun kanalizasyonu (29 - 52. günler): torakal 12' ye ulaşan nörülasyondan sonra kuyruk bölümünde çoğalan hücrelerin oluşturdukları tomurcuğun kanalizasyonu ve apoptozis ile bazı hücrelerin ortamdaki çekilmesi sonucu konus medullaris ve filum terminalenin oluşumu. 3. Farklılaşma (dedifferansiyasyon): 52. günden sonraki gelişmeler.

SSS' nin primordiyumunu oluşturan nöral plak, 3. haftada ortaya çıktığı ve nöral kıvrımlar ile nöral tüpün oluşumunu başlattığı için nörülasyondaki bozukluklar, beyin ve medulla spinaliste ciddi anomalilerle sonuçlanabilir. NTD' leri en sık görülen konjenital anomalilerdendir. Anensefali (daha doğrusu meroanensefali, ekzansefali) SSS' ni etkileyen en ciddi ve aynı zamanda en sık görülen nöral tüp defektidir (1).

Embriyolojik gelişimin ilk 28. gününde SSS' ni oluşturacak olan primitif notokord kendi üzerine kıvrılıp rostral kapanmasını tamamlar. Dolayısıyla gestasyonun bu ilk ayı içerisinde oluşabilecek duraklamalar NTD' lerine neden olur. Geri kalan embriyolojik dönemde, nöronların çoğalarak tabakalar oluşturması ve bu tabakalara doğru göçü gerçekleştiğinden, bu aşamada oluşabilecek patolojilere de "migrasyon anomalileri" denir.

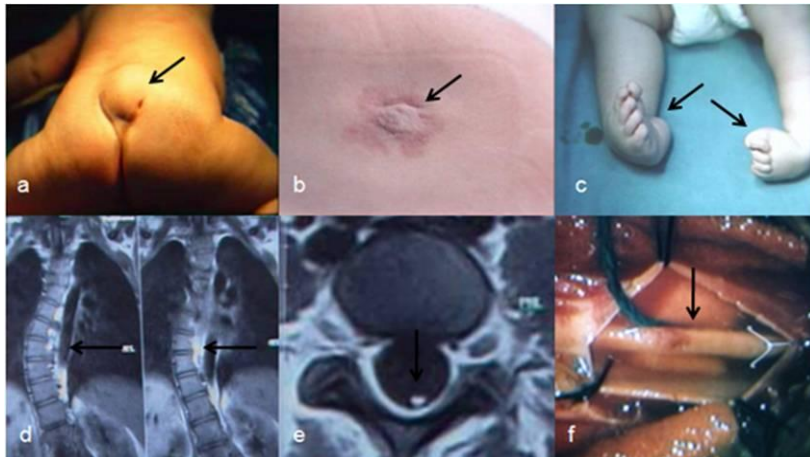
Malformasyonlar, herhangi bir bozukluğa neden olmayacak kadar basit ya da ağır nörolojik hasara yol açabilecek veya yaşamla bağdaşmayacak kadar ağır ve karmaşık da olabilir. Bu spektrum içerisinde kraniosizis, anensefali, meningoensefalosel, gergin omurilik, Chiari malformasyonları, Dandy-Walker malformasyonu, akuaduktus Sylvii stenozu, araknoid kistler ve kraniosinostozlar yer almaktadır (1).

Nörülasyon defekti sonucu oluşan orta hat kapanma kusurları arasında myelomeningosel, lipomyelomeningosel, ayırık omurilik anomalisi, dermal sinus traktı ve ansefalosel sayılabilir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: Nörülasyon kusuru sonucu oluşan nöral tüp defektlerine örnekler, **a.** myelomeningosel , **b.** myelomeningosel olgusunun radyografik görünümü, **c.** myelomeningoselin T1 ağırlıklı sagittal MR görüntüsü, **d.** lipomyelomeningoselin T2 ağırlıklı sagittal MR görüntüleri, **e.** aynı olgunun yağlı filum terminalesinin izlendiği intraoperatif görünümü, **f.** aynı olgunun HE ile boyanmış patolojik kesitinin görünümü, **g.** ayrı omurilik anomalisinin BT aksiyel kesit görüntüsü, **h.** dermal sinüs traktının T1 ağırlıklı aksiyel kesit MR görüntüsü, **i.** aynı olgunun T2 ağırlıklı sagittal kesit MR görüntüsü.

Kuyruk tomurcuğunun kanalizasyonu hatası sonucu oluşan orta hat kapanma defektleri, kuyruk tomurcuğunu oluşturan hücre grubunun kanalizasyon ile ayrışması ve apoptozis ile fazla hücrelerin ortamdaki çekilerek konus medullaris ve filum terminalenin oluşumunun gerçekleşmesi gereken bu aşamadaki defektler nedeni ile oluşur. Bunlar arasında; terminal myelosistol, sakral lipom ve kalın filum terminale sayılabilir (**Şekil 2.10**). Bu gruptaki anomaliler daha önceden “spina bifida okkulta” olarak bilinmektedir. Defektin üzeri ciltle kaplı olduğundan böyle bir lezyon görüldüğünde şüphe uyandırmalı ve eşlik edebilecek konjenital anomaliler açısından tarama yapılmalıdır. Bu olgulara eşlik edebilecek nörolojik, kutanöz, ortopedik ve ürolojik bir takım bulgular olabilir.



Şekil 2.10: **a.** Bir spina bifida okkulta olgusu, **b.** spina bifida okkultada bir cilt lezyonu, **c.** ekin deformiteli olgu, **d.** eşlik eden skolyoz deformitesinin T1 ağırlıklı koronal kesit MR görünümü, **e.** kalın filum terminale olgusunun T1 ağırlıklı sagittal kesit MR görünümü, **f.** kalın filum terminalenin intraoperatif görünümü.

2.3. Tavuk Embriyosu Gelişimi

Memeli hayvanlarda, embriyonal gelişim anne karnında gözlenirken, avianlarda (kanatlılar) ve dolayısıyla tavuklarda, tamamen vücut dışında gerçekleşir. Cıvciv embriyonal gelişimini, oluşumu için gerekli bütün besin maddelerinin depolandığı yumurta içinde tamamlar. Yumurtadan cıvciv gelişimi için bazı çevre koşullarına ihtiyaç duyulur. Günümüzde bu işlem yumurtaların kuluçka makinalarına konması ile de sağlanabilmektedir (12, 13, 14).

Tavuk embriyosunun gelişmesi üç bölüm altında incelenebilir:

1. Yumurtlama öncesi embriyonun gelişimi.
2. Yumurtlama sonrası oda koşullarında embriyonun gelişimi.
3. Kuluçka makinesi koşullarında embriyonun gelişimi.

2.3.1. Yumurtlama Öncesi Embriyonun Gelişimi

Dölllenmiş yumurtalar, tavuk ve horozların bulunduğu kümeslerde çiftleşmesi ile elde edilir. Çiftleşme sırasında sperm yumurta kanalında hızla yol alarak 30 dakikada infundibulumu ulaşır. Ovulasyondan 15 dakika sonra yumurta sperm tarafından döllenir ve zigot denilen fertilize yumurta meydana gelir (13).

Zigot oluşumundan sonra embriyonik yapı gelişmeye başlar. Yaklaşık 4 saat sonra ilk hücre bölünmesi meydana gelir. Yumurta, istmusa girdikten 1 saat sonra embriyo 16 hücreden ibarettir. Uterusa eriştikten 4 saat sonra ise 256 hücreye bölünür.

Yumurtada embriyo, ovipozisyon olayı ile yumurtlamadan kısa bir süre öncesine kadar "blastoderm" adı verilen tek katlı bir hücre kümesinden ibarettir. Hücre farklılaşmasının görüldüğü bu aşamaya "gastrulasyon" adı verilir. Yumurta sarısının yüzeyinde bulunan bu hücre tabakasına paralel olarak daha altta, yani yumurta sarısının içine doğru diğer bir hücre tabakası oluşmaya başlar. Bunlardan yüzeyde ve dışta olana "ektoderm", içte olana "endoderm" adı verilir. Dölllenmiş yumurta, yumurtlandığı zaman bu iki tabakadan oluşmaktadır (14).

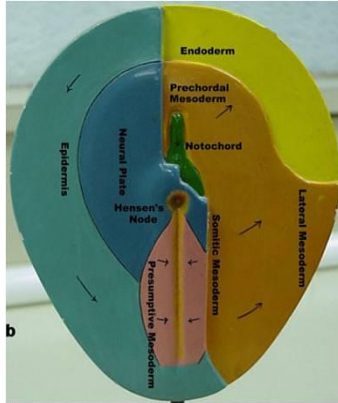
2.3.2. Yumurtlama Sonrası Oda Koşullarında Embriyonun Gelişimi

Yumurta, kuluçka makinesine konuncaya kadar embriyo, uyku evresindedir. Embriyonal gelişimin kuluçka makinesinde ihtiyaç duyduğu optimum sıcaklık, $37,5\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'dir. Ancak 24°C üzerindeki sıcaklıklarda da embriyo gelişebilecektir.

Yumurtlama sonrasında embriyonal gelişmeyi tam olarak durdurmak için 15-18°C arasında bir çevre sıcaklığı sağlanmalıdır. Bu amaçla kuluçkalık yumurtaların kuluçka makinesine konmadan önce muhafaza edildikleri yerin sıcaklığının bu optimum sınırlar içerisinde olmasına dikkat edilmelidir (13).

2.3.3. Kuluçka Makinesi Koşullarında Embriyonun Gelişimi

Dölleniş yumurta 37,5°C sıcaklıktaki kuluçkaya konduğunda embriyonal gelişme kaldığı yerden devam eder. Hücre bölünmesi hızla meydana gelirken farklılaşmanın da devam ettiği ve ektoderm ile endoderm tabakalarından 3. tabaka olan “mezoderm” oluşur (Şekil 2.11). Embriyonal gelişmenin daha ileri aşamalarında her tabakadan farklı doku ve organ sistemlerinin meydana geldiği görülür (13).



Şekil 2.11: Erken dönem tavuk embriyosu (chickscope.beckman.uiuc.edu).

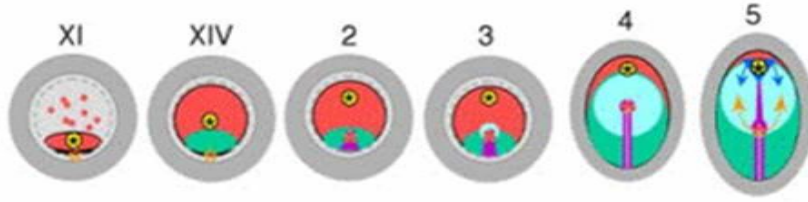
Embriyonun 21 günlük kuluçka periyodu boyunca bu üç tabakadan oluşan doku ve organ sistemleri meydana gelir (12, 13).

2.4. Hamburger - Hamilton Sınıflaması

Dölleniş yumurtadan tavuk oluşumu 21 günlük inkübasyon süresi ile tamamlanır. Bu inkübasyon süreci boyunca embriyonun gelişimi üzerine çeşitli sınıflamalar yapılmıştır. 1900' lü yılların başlarında Keibel ve Abraham tavuk embriyolarının morfolojik karakterlerine göre bir evreleme tanımlamışlardır (14). Ancak 1951 yılında Hamburger ve Hamilton tarafından tarif edilen gelişimsel evreleme kabul edilmiş olup günümüzde geçerliliğini korumaktadır (15).

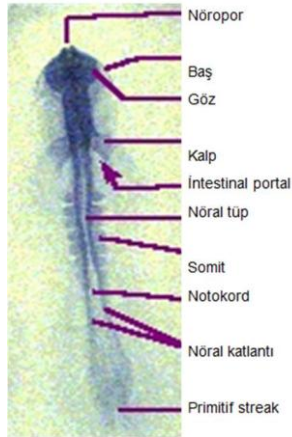
Hamburger-Hamilton'a göre tavuk gelişimi 45 seri kronolojik sınıflamadan oluşmaktadır (15). Bu sınıflamaya göre;

1) Embriyonun inkübasyon periyodunun çok erken dönemleri olan ve primitif çizginin (*primitif streak*) gelişimin gerçekleştiği evrede embriyonun eksen ve kenarları görülebilir hale gelmektedir. Bu süreç 1 - 6 dönemlerine (0. - 25. saatler) uyar (14, 15) (Şekil 2.12).



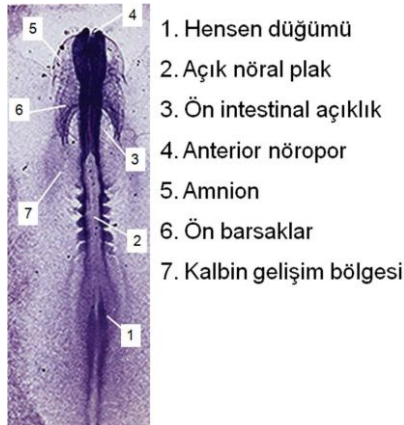
Şekil 2.12: Erken dönem tavuk embriyosu gelişimi ve primitif çizginin oluşumu (www.anat.ucl.ac.uk).

2) Evre 5 – 8' deki (19. - 26. saatler) embriyolar, nörolasyon evresindedir. Kranial formasyon, nöral katlantı, nöral tüp, notokord oluşumu bu dönemde gerçekleşmektedir (14, 15) (Şekil 2.13).

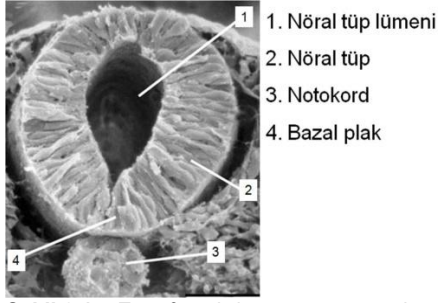


Şekil 2.13: Evre 8' de 6 somitli tavuk embriyosu (www.uoguelph.ca/zoology).

3) Evre 6 - 14 dönemlerde (23. - 54. saat) paraksiyal mezodermin segmentasyonu ile somitler gelişir. Somitlerin oluşumu düzenli olarak her 90 dakikada bir görülür. Hamburger - Hamilton' a göre 10. evrede embriyo 10 somite sahiptir. Bu dönemden sonra embriyoda her dönemde 3 somit belirir. Fakat 14. dönemdeki embriyo 22, somite sahiptir (14, 15). Deneysel çalışmalarda ve özellikle nöral tüp gelişimi araştırmalarında 30'ncu saat çok önemlidir. Bu aşamada etkisi araştırılan ajan enjekte edilmektedir. Ayrıca deneklerin istenilen evrede olup olmadıkların kontrolü yapılmaktadır. 30'ncu saat embriyolar, çoğu kez Hamburger – Hamilton sınıflamasına göre evre 9' dadır (Şekil 2.14, 2.15)



Şekil 2.14: Evre 9 embriyonun koronel kesit ışık mikroskopik görünümü (X10) (15).

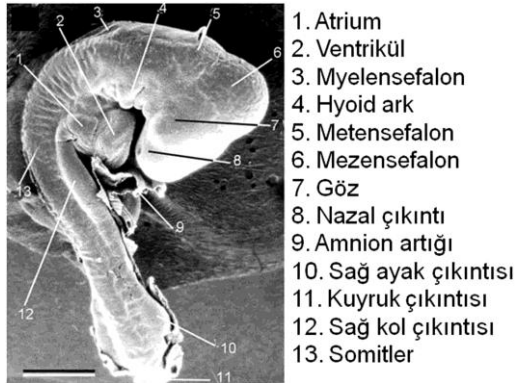


1. Nöral tüp lümeni
2. Nöral tüp
3. Notokord
4. Bazal plak

Şekil 2.15: Evre 9 embriyonun transvers kesit elektron mikroskopik görünümü (15).

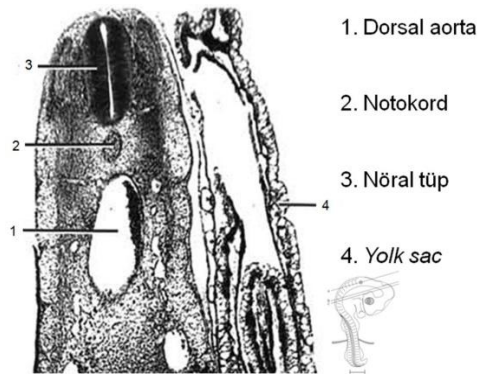
4) Evre 8 - 14 sürecinde (24. - 48. saat) aynı zamanda sindirim sistemi, kan adacıkları, göz ve kalp şekillenmeye başlar. 44. saatte ilk kalp atımı başlar (14, 15).

5) Evre 18 - 23 (54. - 72. saat) sonunda embriyonun kanat ve ekstermiteleri gelişmeye başlar. Sonraki dönemlerde embriyo dönme ve kıvrılma hareketleri ile 21 günlük gelişimine devam eder (14, 15). İn ovo deneysel tavuk embriyosu modellerinde, özellikle nöral tüp gelişimi araştırmalarında bir diğer önemli dönem 72'nci saattir. Bu aşamada etkisi araştırılan ajanın nöral tüp üzerindeki etkileri histopatolojik olarak incelenmektedir. 72'nci saat embriyolar çoğu kez Hamburger – Hamilton sınıflamasına göre evre 18' dir (Şekil 2.16).



1. Atrium
2. Ventrikül
3. Myelensefalon
4. Hyoid ark
5. Metensefalon
6. Mezensefalon
7. Göz
8. Nazal çıkıntı
9. Amnion artığı
10. Sağ ayak çıkıntısı
11. Kuyruk çıkıntısı
12. Sağ kol çıkıntısı
13. Somitler

Şekil 2.16: Evre 18 embriyonun sagittal planda elektron mikroskopik görünümü (15).



1. Dorsal aorta
2. Notokord
3. Nöral tüp
4. Yolk sac

Şekil 2.17: Evre 18 embriyonun kranial uçtan geçen bir kesitteki ışık mikroskopik görünümü (X10) (15).

2.5. Valproik asit

2.5.1. Çalışmamızda Neden Valproik Asit Seçildi?

Günümüz tıbbi ilaç sanayisinde antiepileptikler önemli bir yer tutmaktadır. Poliklinik ve yatan hasta takiplerinde primer ve sekonder (inrakranial kitle, intraserebral hemoraji, abse, SAK, epidural, subdural hematoma, kafa travması, menenjit sonrası görülen nöbet) epilepsinin uygun antiepileptiklerle medikal tedavisi, profilaksisi veya takibi, migren profilaksisi, bipolar bozuklukların tedavisinde nöroşirurji, nöroloji ve psikiyatri pratiğinde yoğun mesai harcanan rahatsızlıklardır. Potansiyel medikal ve sosyoekonomik sorunlara yol açabilme ihtimali nedeni ile tüm ilaçlarda olduğu gibi antiepileptik ilaçların da hamile bir hastada kullanımı her zaman önemli sorun oluşturmaktadır. Bunun için ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) 1979 yılında, ilaçları hamilelikte kullanımları ve olası fetal riskler açısından Tablo 2.2' de belirtildiği gibi sınıflandırmıştır (Tablo 2.2). Bu sınıflamada farmakolojik maddenin gebelik kategorisi, o maddenin gebe anne tarafından kullanılması halinde fetüste ortaya çıkacak hasar oluşturma riskinin bir belirteçidir. Gebelik kategorileri, anne sütüne geçen farmakolojik maddeler ya da metabolitlerinin oluşturduğu riskleri içermez.

Tablo 2.2: FDA tarafından yapılan hamilelikte ilaç kullanımları ve olası riskleri.

Kategori	Açıklaması
A	Yeterli ve iyi kontrollü çalışmalarla, ilacın gebeliğin ilk trimesterindeki fetüs için bir risk oluşturduğu gösterilememiştir ve diğer iki trimestere ilişkin veri de yoktur.
B	Hayvan üreme çalışmalarında ilacın fetüs için bir risk oluşturduğu gösterilememiştir ve gebe kadınlarda yeterli ve iyi kontrollü çalışmalar yapılmamıştır. YA DA Hayvan çalışmalarında bir yan etki ortaya çıkmamıştır ama gebe kadınlarda yapılan yeterli ve iyi kontrollü çalışmalarla herhangi bir trimesterde fetüs için bir risk olduğu gösterilememiştir.
C	Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda istenmeyen etkiler saptanan ancak insanlarda kontrollü çalışma yapılmamış olan ilaçlar ya da hayvan ve insanlar üzerinde hiç çalışılmamış ilaçlar. (Bu kategorideki ilaçlar gebelikte sadece gerçekten gerekli olduğunda yani potansiyel yararın potansiyel zararından fazla olduğu durumlarda verilmelidir).
D	Araştırma veya pazarlama deneyimlerinden ya da insanlardaki çalışmalardan elde edilen yan etki verilerine göre ilacın insan fetüsü için risk oluşturduğu yönünde kanıtlar vardır ama olası yararlar, olası risklere rağmen, ilacın gebe kadınlarda kullanılmasını haklı kılabilir.
X	Hayvan ya da insanlardaki çalışmalar fetal anormallikler göstermiştir ve/veya araştırma ya da pazarlama deneyimlerinden elde edilen yan etki verilerine göre ilacın insan fetüsü için risk oluşturduğu yönünde kanıtlar vardır ve söz konusu riskler, ilacın gebe kadınlarda kullanılmasının olası yararlarından açıkça daha fazladır.

Hamilelikte kullanılacak ilaçlar mümkün olduğunca A ve B kategorisinden seçilmelidir. Bu tabloya göre valproik asit gebelikte kullanımı açısından (D) kategorisinde sınıflandırılır. Yani kısaca risk içerir. Biz bu çalışmamızda, valproik asitin D grubu bir antiepileptik ilaç olması nedeni ile in ovo tavuk embriyosu modelini de kullanarak nöral tüp gelişimi üzerine gelişebilecek olumsuz etkilerinin suda eriyen B kompleks vitaminler başlığı altında incelenen folik asit tarafından önlenebilirliğini araştırmayı planladık.

2.5.2. Valproik asit ile İlgili Farmakolojik Bilgiler

Valproik asit ilk kez Burton tarafından 1882'de sentez edilmiştir fakat klinik olarak kullanılmamıştır (16). Antikonvulzan etkisi ise 1962 yılında Eymard tarafından tesadüfen bulunmuştur. VPA ile ilgili ilk klinik çalışmalar ise 1964 yılında Garruz ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (17). 1967 yılında ilk kez Fransa'da piyasaya sürülmüş, ardından yüzlerce ülkede epilepsi tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır. Amerika'da ise ancak 1978 yılından sonra kullanım alanı bulmuştur. VPA değişik tip epileptik nöbetlerde kullanılan major bir ilaç konumuna gelmiştir. Takip eden yıllarda VPA ile yapılan çok çeşitli klinik çalışmalarda epilepsi haricinde bipolar bozukluklarda ve migrende de etkili olduğu gözlemlenmiştir. Çok çeşitli hayvan deneylerinde VPA'nin anksiyolitik, antiagresif, antidiştonik, antinosiseptif, sedatif, hipnotik, immun stimulan, antihipertansif etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Antinosiseptif etkisi diğer klinik çalışmalarda da belirtilmiştir (18,19). Şiddetli refrakter ağrılarda, trigeminal nevralkjide, batıcı-saplanıcı ağrılarda ve nöropatik ağrılarda yararlı olduğuna dair sonuçlar elde edilmiştir. Bipolar ve şizoafektif hastalıklardaki rolünün ise antidopaminejik etkisine bağlı olduğu düşünülmektedir.

Valproat kimyasal yapısı sodyum dipropilasetattır. Yapısı santral sinir sisteminin ana inhibitör nöromedyatörü olan Gama amino bütirik asit'e (GABA) benzer. Yüksek dozda verildiğinde deney hayvanlarında beyinde GABA transaminaz (GABA-T) enzimi inhibe ederek GABA transaminaz yıkımını azaltır ve düzeyini yükseltir. Ayrıca VPA GABA'nın nöronal ve glial uptake'ini inhibe ettiği de gösterilmiştir, bu etki sonucu GABA'ın postsnaptik etkinliğini artırabilir. Nöron membranındaki potasyum kanallarını direkt etkisi ile açarak hiperpolarizasyon yaptığı da gösterilmiştir (20).

Valproatın kullanılmakta olan üç kimyasal formu vardır. 1. Serbest asitler, 2. Sodyum tuzu, 3. VPA kompleksinin ve valproik asidin 1:1 oranında bileşiminden elde edilen divalproex sodyum.

İlacın yaklaşık %20'si valproatın direkt konjugatı olarak atılır. Kalanı beta ve omega oksidasyonu ile birkaç bileşiğe metabolize olur, bunlar da daha sonra konjuge olur ve atılırlar.

Valproik asit ağız yolundan başlangıçta günde 10-15 mg/kg dozunda uygulanır. Günlük doz giderek 30 mg/kg düzeyine çıkarılır. Bazı hastalarda 60 mg/kg gibi oldukça yüksek bir doz düzeyine çıkmak gerektiği bildirilmiştir. VPA başlangıçtan itibaren yüksek dozda uygulanırsa belirgin sedasyon, somnolans ve hatta koma oluşturabilir. İlacın sedasyon yapıcı etkisine karşın birkaç haftada tolerans geliştiğinden dozun giderek yükseltilmesi halinde söz konusu etkiler genellikle önemli bir sorun oluşturmazlar (20).

VPA çalışmaları gebelik sırasında ilaç alan kadınların bebeklerinde spina bifida insidansının arttığını göstermektedir. Stauntan ve arkadaşları, yaptıkları bir çalışmada tek başına VPA alan 31 gebe kadından 3'ünde spontan düşük olduğu ve doğan bebeklerin 3'ünde dismorfik, spina bifida, belirgin immatürite ve diğer malformasyonlar bulunduğunu bildirilmiştir (21). Valproik asit, farmakokinetik ve toksik etkisi iyi bilinen, çoğunlukla antiepileptik ajan olarak kullanılan aynı zamanda histon deasetilaz enzim inhibitörüdür (22). Yapılarındaki mevcut aminoasit diziliminin gösterdiği bazı özellikler nedeniyle asidik karakterdeki DNA'ya sıkı şekilde bağlanan Histonlar hücrede DNA depolanmasını sağlayan proteinlerdir. Histonların asetilasyon ve deasetilasyon işlemleri enzim kontrolünde (asetilaz, deasetilaz) gerçekleşen, protein sentezinde önem arz eden aşamalarıdır. Histon deasetilaz enzim inhibitörleri histonların aşırı asetilasyonu sonucunda hücre siklusunun durdurulmasına ve apoptozisin indüklenmesine neden olarak hücre ölümüne yol açmaktadır (23-24).

2.6. Folik Asit İle İlgili Farmakolojik Bilgiler

Adını Latince yaprak anlamına gelen "folium" dan alan folik asit, suda eriyen B grubu vitaminlerden birisi olup, ilk olarak 1943 yılında doğal besinlerden ayrıştırılmıştır (25).

Kimyaca pteroylmonoglutamik asit (PteGlu1); İki halkalı pteridin çekirdeği ile PABA' dan oluşan pteroyik asidin, glutamik asit ile yaptığı amid türevidir. Besinler içinde daha çok pteroylpoliglutamalar halinde bulunur. Bunların folik asitten farkları moleküllerinde birden fazla glutamik asit içermeleridir.

En fazla bulunduğu besinler, yeşil yaprak şeklindeki sebzeler, meyveler, karaciğer, böbrek, bira mayası, et, balık, süt ve süttten yapılmış ürünler. Isıya dayanıklılığı fazla değildir. Bayatlamış ve dondurulmuş besinlerdeki miktarı zamanla azalır (26).

En önemli fizyolojik işlevi tek karbon transferi reaksiyonlarında koenzim rolü oynamalarıdır. Bu özellikleri nedeniyle DNA, RNA, aminoasit ve lipid sentezinde önemli rol oynarlar (25).

Vücutta yeterli miktarda folik asit ve dolayısıyla terahidrofolat türevi koenzimler bulunmadığı takdirde, bu durumda en fazla etkilenen hücreler, bölünme ve yenilenme hızı en fazla olan hücrelerdir.

Besinler içinde bulunan ve folik asit içeriğinin büyük bir kısmını oluşturan pteroylpoliglutamatların oral alım sonrası barsak epitel hücreleri apikal membranında bulunan pteroyl - gama - glutamiltkarboksipeptidaz enzimi tarafından glutamik asid rezidüleri kaybedilerek serbest folik asit deriveleri oluşturulur.

Duodenum ve jejunumun yukarı kısmındaki epitelyum hücrelerinde bulunan dihidrofolat redüktaz enzimi ile metiltetrahidrofolat haline getirilerek dolaşımına dokulara sunulur.

Plazmadaki folatın %80 kadarı metiltetrahidrofolat şeklinde kısmen proteinlere bağlanmış olarak taşınır. Folat türevlerinin hücre içinde tutulması için, değişik sayıda glutamil residülerinin moleküle gama - peptit bağı ile bağlanması sonucu poliglutamat şekline dönmeleri esastır. Bu dönüşümü folil - poli - gama - glutamat sentetaz enzimi katalize eder.

Eksiklik durumunda günde üç defa 5 -10 mg, gebelerde artan gereksinimi karşılamak maksadıyla döllenmeden en az dört hafta önce 400 mikrogram/gün dozunda ağızdan verilir.

Etil alkol ve fenitoin, bazen fenobarbital, pirimidon folik asidin barsak absorpsiyonunu azaltır. Metotreksat ve daha zayıf derecede olmak üzere primetamin, trimetoprim, kotrimoksazol ve triamteren, dihidrofolat redüktazı inhibe ederek folik asidin vücutta etkin şekline dönüşmesini engeller (26).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Fonu Saymanlığı tarafından 2010-058 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Çalışmamızda tavuk embriyolarının devamlılığının sağlanması ve istenilen saatlerde elde edilmesi için bölümümüz Tavuk Embriyosu deney laboratuvarında bulunan kuluçka makinesi kullanıldı (Şekil 3.1 B).

Ağırlıkları 65 ± 5 gr arasında 150 adet beyaz Leghorn tipi, fertil ve günlük SPF yumurtalar kullanıldı (Şekil 3.1 B). Bu özel patojen bulunmayan (SPF – *specific patogen free*) yumurtalar, Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne bağlı SPF Ünitesi / MANİSA' dan sağlanmıştır.

Çalışmanın histopatolojik değerlendirme aşamaları CBÜTF Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Elde edilen veriler, gruplar arasındaki farklılıklar Ki Kare (*Chi-Square Test*) ile analiz edildi.

3.1. Gereç

3.1.1. Deney Hayvanı

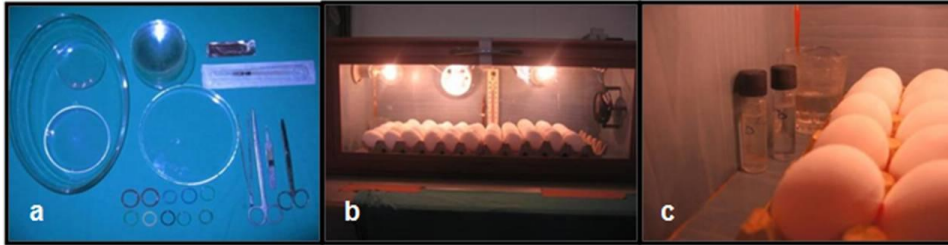
SPF; “listesi yapılmış patojenlerden arındırılmış hayvan; uygun kullanımı, spesifiye edilmiş antijenlerin yokluğunun o anda kullanılan testlerle doğrulanmasını gerektirir” olarak tanımlanmaktadır (27).

Canlı tavuk yumurtalarının doğal gelişimi, embriyolojide oldukça gelenekselleşmiştir. Evcil kümes hayvanlarından elde edildikleri için istenilen dönemlere ait embriyoların rahatlıkla elde edilebilmesi ve inkübasyon periyotlarının kısa olması açısından vertebralıların, özellikle memelilerin gelişimi için tavuk embriyosu çok iyi bir model olmaktadır.

DeneySEL araştırma konusu, insanda nörolasyon olduğunda; tavuk embriyoları, insan nörolasyon paterni ile benzer özellikler göstermesi nedeniyle bu tip çalışmalarda tercih edilen bir denek grubudur (28-31).

3.1.2. Laboratuvar Koşulları

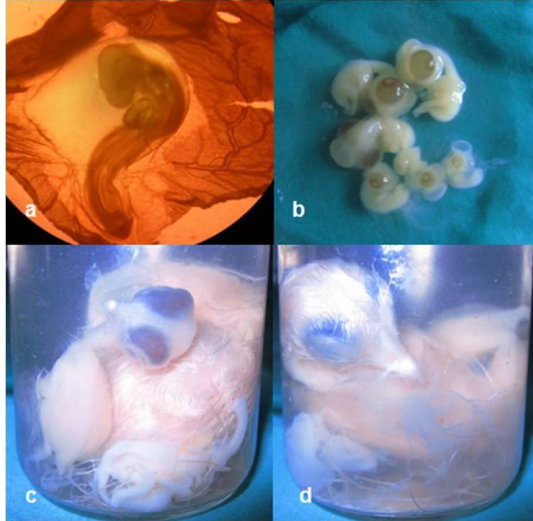
Bu deneysel çalışma için tavuk embriyosu NTD modelleme çalışmamızda Anabilim Dalı Tavuk Embriyolojisi Deney Laboratuvarında, aşağıdaki malzemeler kullanılmıştır. İnkübatör, 150 adet günlük – beyaz – fertil, 65 ± 5 gr ağırlığında SPF yumurta, büyük cam kap, değişik boyutlarda petri kutuları, saat camları ve pensetler, doku makası, gaz tampon, insülin enjektörü, 10 cc ve 20 cc enjektör, flaster, steril lateks eldiven, batikon, bistüri, lup, araştırılan etken maddenin istenilen dilüsyon oranının sağlanması için hassas otomatik pipet ve elde edilen embriyoların saklanması için %4' lik formol dolu cam şişe ile ependorf kapları (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: a. Başlıca kullanılan malzemeler, b. İnkübatörde SPF yumurtalar, c. İnkübatörde çalışmada kullanılan gruplara ait etken madde dilüsyon kapları.

3.1.3. İnkübatör

Çalışmamızda Anabilim Dalımız Tavuk Embriyolojisi Deney Laboratuvarında mevcut ve daha önceki tavuk embriyo çalışmalarında da kullanılmış olan, standardizasyonu yapılmış inkübatör kullanıldı (Şekil 3.1 B - C). Bu inkübatörün standardizasyonuna ait örnekler Şekil 3.2' de sunulmuştur (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: Hamburger - Hamilton sınıflamasına göre çeşitli evrelerdeki civcivler, a. 18. evre, b. 22 – 28. evreler, c. 35. evre, d. 42. evre.

Bu inkübatörde, $37,2 \pm 0,1$ °C sabit ortam sıcaklığını sağlamak için 60W gücünde toplam 3 adet ampul ve bunların kesintisiz güç kaynağına takılı olduğu elektrik bir devre ile bağlı, hassas 0,5 °C ısıya duyarlı, dijital ekran göstergeli ENKA marka termostat sensörü, ortam sıcaklığını homojenize etmek için bir fan, havalandırma deliği ile 50 adet kapasiteli yumurta kabı mevcuttur (Şekil 3.1 B).

3.2. Yöntem

Çalışmamızda 150 adet Leghorn tipi, günlük, beyaz tavuk yumurtası kullanıldı. 30' ar denek içeren 5 grupta çalışma planlandı. **A grubu (kontrol grubu, n: 30)** olarak; **B grubu (salin grubu, n:30)** olarak 0,2 ml serum fizyolojik (SF) enjekte edilen grup, **C grubu (Valproik asit grubu, n: 30)** olarak; 0,72 miligram / 0,2 mililitre valproik asit enjekte edilen grup, **D grubu (Folik Asit grubu, n: 30)** olarak; 0,342 mikrogram / 0,2 ml folik asit enjekte edilen grup, **E grubu (Valproik Asit – Folik Asit grubu, n: 30)** olarak; 0,72 miligram + 0,342 mikrogram / 0,2 ml valproik asit + folik asit enjekte edilen grup.

Bu planlamada, valproik asitin nöbet önleyici terapötik etki (minimum serum konsantrasyonu 40 miligram / 1000 mililitre, maksimum serum konsantrasyonu 200 miligram / 1000 mililitre) için gerekli olan ortalama serum konsantrasyonunun 120 miligram / 1000 mililitre pozolojisinin, folik asitin 400 mikrogram / gün dozu ve bunların ortalama 70 kg'lık bir insanda olduğu göz önünde bulundurularak, 65 ± 5 gr ağırlığındaki yumurtaya uyarlandı. Çalışmada günlük yumurta kullanılacağı için, inkübatörde de 50 adet yumurta kapasitesi olması nedeni ile her grup için ayrı ayrı çalışıldı.

İnkübatör, istenen ideal ortam sıcaklığı olan $37,2 \pm 0,1$ °C ve nem oranı $\% 60 \pm 5$ oluncaya kadar 1 saat süreyle boş olarak çalıştırıldı. Daha sonra yumurtalar dikey düzleme 45° açı ile hepsi aynı yönde yerleştirilerek çalışma başlatıldı. Her 2 saatte bir yumurtaların hepsi sırayla ve hızla, bu dikey düzlemdeki açıları karşı yöne 45° olacak şekilde çevrildi.

3.2.1. Tavuk Embriyolarına Etken Madde Enjeksiyonu (30'ncü Saat Çalışması)

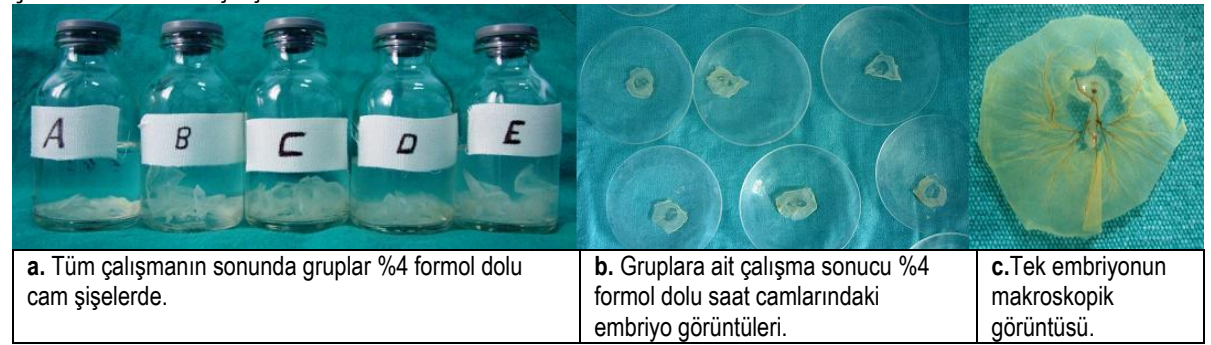
Yumurtalar, 30'ncü saatin sonunda tek tek inkübatörden çıkarılarak çalışma masası üzerinde uygulama başlatıldı. Daha önceden hassas otomatik pipet yardımı ile yapılan ölçümlerle gruplara göre uygun dozajda hazırlanmış etken maddelere (SF, valproik asit, folik asit, valproik asit + folik asit) sahip olan ve inkübatörde bekletilen solüsyonlar, insülin enjektörlerine çekildi. Künt kısmı yukarı gelecek şekilde eğimli bir şekilde ele alınan yumurtaların ekvatorlarına yakın bir kısımdan küçük bir delik açılarak lup altında embriyo diski görülünceye kadar hafifçe genişletildi. Embriyo diskinin altına, 0,2 ml'lik solüsyonlar insülin enjektörü ile enjekte edildi. Bu aşamada enjektörde hiç hava kabarcığının olmamasına ve tüm deneklere eşit miktarda enjeksiyonlar yapılmasına özellikle dikkat edildi. Olası bir hava kabarcığı, embriyo diskini yumurtanın sarısından ayırarak embriyonun beslenmesini bozabilmektedir (bkz. Şekil 4.1 B). Yumurtanın kabuğundaki açıklık, flaster ile sızdırmaz bir şekilde kapatıldı ve bu kısım aşağı gelecek şekilde yine dikey düzlemde 45° açı ile inkübatördeki yumurta kabına yerleştirildi (Şekil 3.1 B).

3.2.2. Tavuk Embriyolarının Elde Edilmesi (72'nci Saat Çalışması)

Yumurtalar, 72'nci saatin sonunda tek tek inkübatörden çıkarılarak çalışma masası üzerinde embriyoların elde edilmesi işlemine başlandı. Yine künt ucu yukarıda ve eğimli bir şekilde elde tutulan yumurtanın kabuğu dikkatlice kırılarak yumurtanın akından bir miktar akıtıldı. İçinde petri kabı ve saat

camı bulunan, su ile doldurulmuş büyük cam kap içerisine yumurta sokuldu. Yumurtanın sarısının polar uçlardaki şalazların tutucu etkisi ile yumurta kabuğunun kenarında yaralanmamasına dikkat edilerek suda yüzdürüldü. Petri kabına alınan yumurtanın sarısındaki embriyo diski vaskülarizasyonu, embriyonun büyüklüğü ve kardiyak aktivitesi gözlemlendi. Lup altında doku makası ile 360° lik çepçevre bir kesim yapılarak embriyo diski yumurtanın sarısından ayrıldı. Su içerisinde yüzdürülerek saat camı üzerine alındı. Suyun kohezyon gücüne dikkat edilerek saat camı yavaşça kaptan çıkartıldı. Elde edilen embriyo, %4' lük formol dolu olan ve aynı gruba ait cam şişelere konuldu (Şekil 3.3).

Şekil 3.3: 72nci saat çalışması



3.2.3. Tavuk Embriolarının Işık Mikroskopik İncelemesi

Elde edilen tüm embriolar, saat camları üzerine alınarak ışık mikroskobu altında X10 büyütme ile gelişimi ve nöral tüp defekti açısından, diğer histopatolojik inceleme aşamasından önce tarandı.

3.2.4. Histopatolojik Takip

Tüm histopatolojik doku incelemesi aşamaları, fakültemiz Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı.

3.2.4.1. Parafin Doku Takibi

Parafin doku takibine alınacak embriolar elde edildikten sonra %4'lük formalin solüsyonu içerisinde 24-48 saat tespit edildi. Fiksatiflerin uzaklaştırılması amacı ile 5 dakika distile su ile yıkandı. Dehidratasyon amacı ile 3'er dakika %50'den %100'e kadar artan etil alkol serilerinden geçirildi. %90'lık alkolde embrioların parafin bloklar içinde ve kesit aşamasında görünürlüğünü sağlamak için bir damla eozin boyası ilave edildi.

Takip işlemleri sırasında embriyoların diseksiyon mikroskopunda makroskopik görüntüleri incelendi. Ardından 2'şer dakika şeffaflaştırma amacı ile iki değişim ksilene tabi tutuldu. 60 °C'lik etüv içerisinde 10 dakika ksilen-parafin uygulandıktan sonra baş-kuyruk doğrultuları belirlenerek dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Bloklardan mikrotom aracılığı ile 5µ luk seri kesitler hem histokimyasal hem de immünohistokimyasal inceleme amacı için alındı (Tablo 3.1) .

Tablo 3.1: Parafin Doku Takibi

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%4 Formalin	24-48 saat
Fiksatifin Uzaklaştırılması	Distile su	5 dakika
Dehidratasyon	%50 Etil Alkol	3 dakika
	%60 Etil Alkol	3 dakika
	%70 Etil Alkol	3 dakika
	%80 Etil Alkol	3 dakika
	%90 Etil Alkol + eosin	3 dakika
	%100 Etil Alkol	3 dakika
	%100 Etil Alkol	3 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	2 dakika
	Ksilen	2 dakika
Emdirme 60 °C Etüvde	Ksilen-Parafin	10 dakika
Gömme	Parafin	

3.2.4.2. Hematoksilen – Eozin Boyaması

Kesitler, deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60 C° 'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika 2 değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton) ile 2 dakika boyandıktan sonra boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akar suda yıkandı. Diferansiyasyon için 2 - 3 saniye asit alkol' de tutulup 30 saniye eozin (01602, Surgipath, Bretton) boyası ile boyandı ve akar su altında 5 dakika yıkandı. Daha sonra %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip şeffaflaştırma amacı ile 30'ar dakika iki değişim ksilende tutuldu ve entellan (UN 1866, Merck) ile kapatıldı (Tablo 3.2)

Tablo 3.2: Hematoksilen-Eozin Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C Etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	%95 Alkol	2 dakika
	%80 Alkol	2 dakika
	%70 Alkol	2 dakika
	%60 Alkol	2 dakika
Yıkama	Akar Su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	2 dakika
Yıkama	Akar Su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit Alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	1 dakika
Yıkama	Akar Su	5 dakika
	%80 Alkol	1dakika
	%95 Alkol	1dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapatma	Entellan	

3.2.4.3. İndirekt İmmünohistokimya Boyaması

72. saatlerde alınan embriyoların 5µ'luk seri parafin kesitleri, immünohistokimyasal boyama için bir gece 60 °C' lik etüvde tutulduktan sonra 30' ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95 'ten %60' a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. İmmünohistokimya kalemi ile (PAP pen, K039, DBS) ile sınırlandırılan %0.5'lik tripsin (T 7168, Sigma) solusyonu içinde 37 °C' de 10 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidadını inhibe etmek amacı ile 5 dakika %3'lük H₂O₂ uygulandı (K-033, DBS). 3 defa 5' er dakika fosfat tampon solusyonu (PBS: Posphate Buffered Saline, P-4417, Sigma) ile yıkanan kesitler, 1 saat bloklama solusyonu (Blocking solution 85-9043, Zymed) ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolarlar anti-bcl-2, anti-p53 ve anti-kaspaz-3 ile bir gece +4 °C de inkübe edildi. Ertesi gün tampon solusyonu ile 3 defa yıkanan kesitler biotinlenmiş anti-mouse ve anti-rabbit, conjugated streptavidin-horsedish peroxidase solüsyonları ile (SensiTek HRP Anti-Polyvalent sekonder kit) 30 'ar dakika boyandı. Yine 3 defa 5' er dakika PBS tampon solusyonu ile yıkanan kesitler oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacı ile diaminobenzidine (DAB) (1718096, Roche) ile 5 dakika boyandı. Mayer's hematoksilen (UN-2810, JTBaker) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dakika yıkanan kesitler %80 ve 90'lık alkol serilerinden 1'er dakika geçirildi. Ksilende 30 dakika bekletilip kapatma mediyumu ile (SCY AML030) ile kapatıldı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: İndirekt İmmünohistokimya Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	%95 Alkol	2dakika
	%80 Alkol	2dakika
	%70 Alkol	2dakika
	%60 Alkol	2dakika
Yıkama	Distile Su	10dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3X5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3X5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
	Primer antikor inkübasyonu	1 gece 4° Cde
Yıkama	PBS	3X5 dakika
İkincil antikor inkübasyon	Biotin	30 dakika
	Streptavidin	30 dakika
Yıkama	PBS	3X5 dakika
Boyama	DAB	5 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zit Boyama	Mayer Hemotoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3X5 dakika
Kapatma	Kapatma mediumu	

3.2.4.4. TUNEL Boyaması

Bu teknik için TACS 2 Tdt-DAB In situ Apoptosis Detection kiti (Calbiochem, Apoptag) kullanıldı. Kesitler boyama için bir gece 60 °C' lik etüvde tutulduktan sonra, 30' ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika ve PBS de 10 dakika yıkandı. Proteinaz K solüsyonu ile 30 dakika oda sıcaklığında bekletilen kesitler, 3 defa 5' er dakika tampon solusyonu ile yıkandı. Equilibration solüsyonu ile 10 dakika inkübe edilen kesitler daha sonra yıkama işlemi yapılmadan Tdt-enzim solüsyonu ile 37 °C' de 1 saat inkübe edilen örnekler bir kez 5 dakika stop-wash tampon solüsyonu ile yıkandı. Distile su ile 2 defa yıkanan kesitler streptavidin HRP solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. PBS solüsyonu ile 2 defa yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilen ile 5 dakika boyandıktan sonra kesitler distile su ile 10 dakika yıkandı. Kesitler daha sonra %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon ve 30 dakika ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4: TUNEL boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Proteinaz K solüsyonu	30 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Tamponlama	Equilibration solüsyonu	10 dk
	Tdt Labelling solüsyonu	5 dk
	Tdt Enzim solusyonu	37°De 1 saat
	Stop-wash solusyonu	5 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
	Streptavidin HRP	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB boyası	10 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt boyama	Mayres's Hematoksilen	5 dakika
Rehidratasyon		
Kapama		

3.2.4.5. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

Farklı zamanlarda iki farklı araştırmacı tarafından incelenen kesitler, DAB kromojenin kahverengi boyanma şiddetine göre immunoreaktivite şiddeti negatif (-), zayıf (+), orta (++) ve kuvvetli pozitif (+++) olarak değerlendirildi.

3.2.5. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki farklılıklar KiKare (Chi-Square) Test ile test edildi. Nöral Tüp Defekti ve mortalite, somit sayıları açısından karşılaştırıldığında Valproik asit grubu ve diğer dört grup arasındaki fark istatistiksel olarak ($P < 0,005$) anlamlı bulunmuştur.

4. BULGULAR

4.1. Makroskopik Bulgular

Servisimiz Tavuk Embriyoloji Laboratuvarında gerçekleştirilen bu deneysel araştırma 30'uncu saat çalışmalarında, daha önceden hazırladığımız kontrol ve diğer denek grupları için SF, valproik asit, folik asit, valproik asit + folik asit etken maddelerinden yine önceden tarif edildiği gibi uygun teknikle embriyo diski altına 0,2 ml' lik enjeksiyonlar yapıldı. İnkübatöre her grup için otuzar adet yumurta kondu.

Tablo 4.1: Gruplara göre denekler.

Gruplar	Çalışılan Denek Sayısı (n)	Mortal Embriyo Sayısı (NTD +) (x)	Gelişme Geriliği Olan Embriyo Sayısı (y)	Normal Gelişimini Tamamlayan Embriyo Sayısı (z)
A Kontrol	30	0	0	30
B Salin	30	0	0	30
C Valproik Asit	30	8	12	10
D Folik Asit	30	0	0	30
E Valproik Asit+Folik Asit	30	0	8	22
Toplam	150	8	20	122

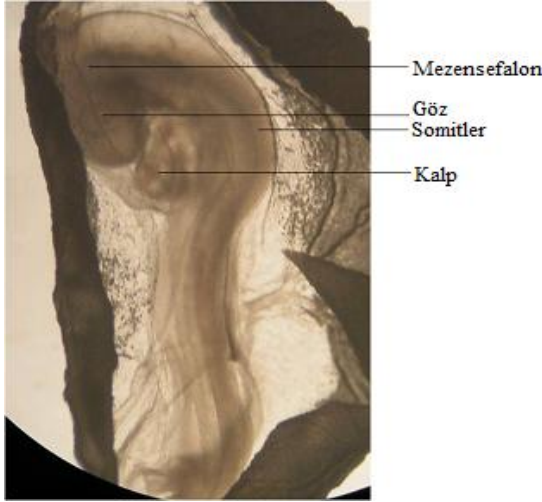
72'nci saat çalışmasında ise; Tüm gruplar ayrı ayrı çalışıldı (Tablo:4.1). Makroskopik değerlendirmede, A, B ve D grubundaki embriyoların gelişimlerinin genel olarak iyi olduğu ve lup altındaki incelemede de evre 18 ile uyumlu oldukları saptandı. Ancak C grubunda n (Deneye katılan toplam embriyo sayısı) : 30 adetten, 8 tanesinde mortalite geliştiği ($x = V_m$ = valproat mortal embriyo sayısı: 8), tüm mortal embriyolarda NTD mevcut idi, 12 tanesinde ise gelişme geriliği ($y = V_{gg}$ = valproat gelişme geriliği olan embriyo sayısı: 12) olduğu saptandı. E grubunda n (Deneye katılan toplam embriyo sayısı) : 30 adetten hiçbirinde mortalite gelişmediği ($x = V_{Fm}$ = valproat-folat mortal embriyo sayısı: 0), 8 tanesinde ise gelişme geriliği ($y = V_{Fgg}$ = valproat-folat gelişme geriliği olan embriyo sayısı: 8) olduğu saptandı. Tabloda verilen denek sayılarındaki embriyonel gelişimin somit sayıları açısından dağılımı tablo 4.2 de gösterilmiştir. Somit sayıları açısından da değerlendirildiğinde valproik asit verilen grubun somit sayıları ile valproik asit+folik asit grubunun somit sayıları karşılaştırıldığında anlamlı derecede farklı olduğu görülmektedir.

Tablo 4.2: Denek sayılarındaki embriyonel gelişimin somit sayıları açısından dağılımı.

Grup A		Grup B		Grup C		Grup D		Grup E	
Kontrol	Somit Sayısı	Serum Fizyolojik	Somit Sayısı	Valproik Asit	Somit Sayısı	Folik asit	Somit Sayısı	Folik + Valproik	Somit Sayısı
K	40	SF	42	V	13	F	43	FV	36
K	41	SF	41	V	11	F	41	FV	37
K	43	SF	43	V	14	F	43	FV	35
K	42	SF	42	V	10	F	42	FV	35
K	40	SF	40	V	14	F	40	FV	37
K	41	SF	41	V	12	F	41	FV	36
K	42	SF	42	V	11	F	42	FV	36
K	43	SF	43	V	13	F	43	FV	35
K	42	SF	42	V	29	F	42	FV	42
K	42	SF	42	V	30	F	42	FV	42
K	40	SF	43	V	30	F	43	FV	43
K	41	SF	41	V	32	F	41	FV	41
K	43	SF	43	V	33	F	41	FV	43
K	42	SF	42	V	32	F	42	FV	42
K	40	SF	40	V	33	F	40	FV	40
K	41	SF	43	V	31	F	43	FV	43
K	42	SF	42	V	32	F	42	FV	42
K	43	SF	43	V	30	F	43	FV	43
K	42	SF	42	V	30	F	42	FV	42
K	42	SF	41	V	30	F	41	FV	41
K	40	SF	40	V	37	F	43	FV	40
K	41	SF	41	V	36	F	41	FV	41
K	43	SF	43	V	36	F	43	FV	43
K	42	SF	42	V	35	F	42	FV	42
K	40	SF	41	V	36	F	41	FV	41
K	41	SF	41	V	37	F	41	FV	41
K	42	SF	42	V	35	F	42	FV	42
K	43	SF	43	V	35	F	43	FV	43
K	42	SF	42	V	37	F	42	FV	42
K	42	SF	40	V	36	F	41	FV	40

4.2. Embriyonun Bütününe Işık Mikroskobu Altında İncelenmesi

Elde edilen tüm embriyolar histopatolojik inceleme aşaması öncesinde, saat camları üzerine alınarak ışık mikroskobu altında X10 büyütme ile gelişimi ve nöral tüp defekti açısından tarandı. Bu mikroskopik çalışmamızda A,B ve D gruplarının hiçbir embriyosunda mortalite, gelişme geriliği ve NTD saptanmadı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: 72 saatlik normal gelişimini tamamlamış embriyoda ışık mikroskopik görünüm.

C grubunda:

V m (Valproik asit mortal = x): 10 - 14 somitli 30. saat ve sonraki 1-2 saat içinde ölen embriyo sayısı 8 adet. Hepsinde de NTD gözlemlendi (**Şekil 4.2.a**).

V gg (Valproik asit gelişme geriliği = y): 72. saatte olmayan fakat 48. saate kadar ve bir miktar 50 - 55. saate kadar, 30 > < 72 embriyo sayısı 12 adet. Fakat hiç birinde NTD saptanmamıştır (**Şekil 4.2.b**).



Şekil 4.2a: V m olan embriyoda ışık mikroskopik görünüm.



Şekil 4.2b: V gg olan embriyoda ışık mikroskopik görünüm.

E grubunda:

VF m (Valproik asit + Folik asit mortal = x): 0

VF gg (Valproik asit + Folik asit gelişme geriliği = y): 72. saatte olmayan fakat 48. saate kadar ve bir miktar 50 - 55. saate kadar, 30 > < 72 embriyo sayısı 8 adet. Fakat hiç birinde NTD saptanmamıştır (**Şekil 4.3**).



Şekil 4.3: VF gg olan embriyoda ışık mikroskopik görünüm.

4.3. Histopatolojik Bulgular

4.3.1. Hematoksilen – Eozin Boyama Bulguları:

Tüm embriyolardan kuyruk kısmından başlayarak seri kesitler alındı. İncelemeler baş, gövde ve kuyruk kısmından geçen kesitler üzerinde yapıldı.

Valporik asit uygulanan gruptan alınan kesitlerde valporik asit uygulaması sonrasında ölen embriyolarda, embriyoların embriyonik gelişim evresinden daha geride olduğu ve özellikle de nöral tüpün açık olduğu gözlemlendi. Bununla beraber mezodermal gelişiminde geri olduğu yer yer somitlerin gözlenmediği saptandı.

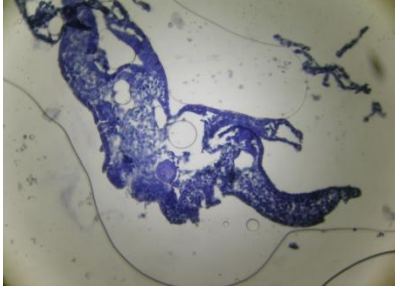
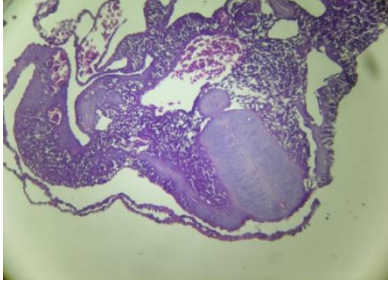

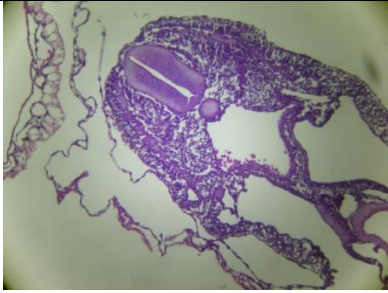

Valporik asit uygulandıktan sonra defekt saptanan grupta, embriyonik gelişimin geri olduğu, nöral tüpün kapanması ile birlikte cilt ektoderminin gelişmediği ve yüzeyel ektodermin nöral tüpü kapatacak şekilde devam etmediği gözlemlendi.

Valproik asit uygulanan ve gelişim geriliği saptanan embriyolarda, embriyonik gelişimin normal gelişim evresine göre daha geri olduğu, nöral tüpün kapalı olduğu fakat kapanma sırasında her iki taraftaki nöroektoderm tabakasının kalınlığının aynı olmadığı, bununla beraber nöral tüp kapanmasının uca doğru incelen bir şekilde (armut şeklinde) olduğu izlenmesi üzerine bu tür embriyolarda da kapanmanın olması yanısıra defektif olarak kapandığı izlendi.

Valporik asit ile birlikte folik asit uygulanan grupta, embriyoların embriyonik gelişim evresine uyumlu olduğu, nöral tüpün normal olarak kapandığı, nöroektoderm hücre tabakasının her iki tarafta eşit olduğu ve yüzey ektodermin nöral tüp üzerini örttüğü, nöral krest hücrelerinin de varlığı saptandı. Bununla beraber somitlerin ileri gelişimlerini sağladıkları ve dermatom, miyotom ve sklerotoma farklılaştıkları izlendi.

Folik asit uygulanan grupta ise embriyoların normal embriyonik gelişim evresine uygun olarak geliştiği, nöral tüpün kapalı olduğu, bununla beraber somitlerin ileri gelişimlerini sağladıkları ve dermatom, miyotom ve sklerotoma farklılaştıkları gözlemlendi (Tablo 4.3).

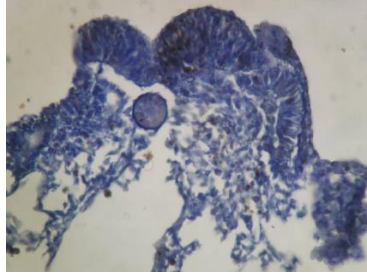
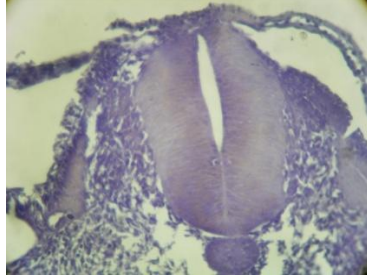
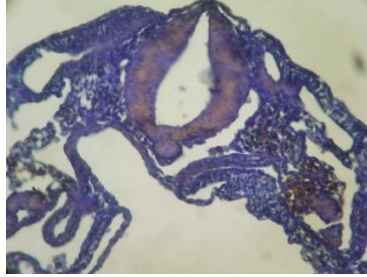
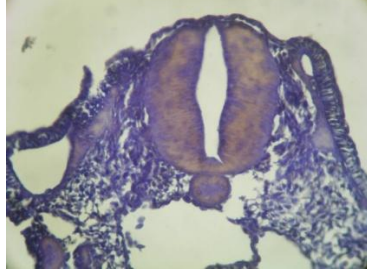
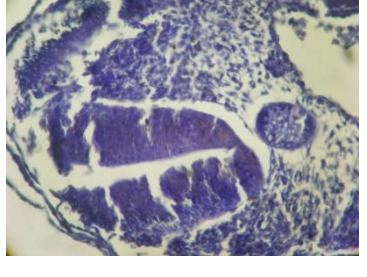
Tablo 4.3: 72. saatlerdeki tüm gruplara ait kesitlerde hematoxilen eozin incelemesi görüntüleri. X200.

H-E	72. Saat	
Vm		Gelişim evresinden daha geride, nöral tüpün açık olduğu gözlenen, beraberinde mezodermal gelişimin de geri kaldığı, yer yer somitlerin oluşmadığı saptanan valproat mortal 72. saat embriyonun HE boyanmış kesit görüntüsü.
Vd		Embriyonel gelişimin geri olduğu ve nöral tüpün kapanması ile birlikte cilt ektoderminin gelişmediği ve yüzeyel ektodermin nöral tüpü kapatacak şekilde devam ettiği gözlenen valproat defektif 72. saat embriyonun HE boyama kesit görüntüsü.
Vgg		Gelişim evresinden daha geride, nöral tüpün kapalı olduğu fakat kapanma sırasında her iki taraftaki nöroektoderm tabakasının kalınlığının aynı olmadığı, bununla beraber nöral tüp kapanmasının uca doğru incelen bir şekilde (armut şeklinde) olduğu defektif kapanmanın izlendiği valproat gelişme geriliği olan 72. saat embriyonun HE boyama kesit görüntüsü.
Vf		Embriyonel gelişim evresi ile uyumlu, nöral tüpün normal olarak kapandığı, nöroektoderm hücre tabakası her iki tarafta eşit gözlenen ve yüzey ektodermin nöral tüp üzerini örttüğü, nöral krest hücrelerinin de varlığı saptanan, somitlerin ileri gelişimlerini sağladıkları valproat-folat uygulanan 72. saat embriyonun HE boyama kesit görüntüsü.
Folik		Embriyonel gelişim evresi ile uyumlu, nöral tüpün kapalı olduğu, beraberinde somitlerin ileri gelişimini tamamladığı gözlenen folik asit uygulanmış 72. saat embriyonun HE boyama kesit görüntüsü.

4.3.2. TUNEL Sonuçları:

Tavuk embriyolarının 72. saatte tüm grulardan alınan örneklerinde, Vm grubunda nöral tüpün açık olduğu alanlarda nöroektoderm hücrelerinde ve mezenėimal hücrelerde TUNEL pozitif hücrelerin olduğu izlendi. Vd ve Vf gurubunda nöral tüpün kapalı olduğu ve TUNEL pozitif hücrelerin ise sadece mezenėimal hücrelerde tek tük pozitif olduğu saptandı. Vgg grubunda nöral tüpün kapalı olmasına rağmen, kapanma sırasında defekt olduğu izlenen alanlarda mezenėimal hücrelerde çok sayıda TUNEL hücreye rastlanır iken, nöroektoderm hücrelerinde TUNEL pozitif hücrelere rastlanmadı. Folik asit uygulanan grupta ise nöral tüpün kapalı olduğu, nöroektoderm hücrelerinin normal yapıda olduğu ve mezenėimal hücrelerde yer yer tek tük TUNEL pozitif hücreye rastlandı. Vd, Vf ve Folik asit gruplarında mezenėimal alanlarda gözlenen az sayıdaki TUNEL pozitif hücrelerin normal embriyolojik geliğim sırasında beklenen apoptotik hücreler olduğu dğnld. Bununla beraber Vgg grubunda embriyolarda gözlenen geliğim geriliğine bağlı mezenėimal hücrelerde TUNEL pozitif hücrelerin sayısının arttığı, mortalite saptanan ve nöral tüpün açık olduğu embriyolarda ise TUNEL pozitif hücrelerin nroektodermde de gözlendiği izlenmesi üzerine, valporik asitin bazı embriyolarda hem geliğim geriliği hem de mortalite ile sonuçlanan embriyolarda apoptotik mekanizmaların tetiklendiği dğnld (Tablo 4.4).

Tablo 4.4: 72. saatlerdeki tüm gruplara ait kesitlerde TUNEL boyaması ile apoptotik hücrelerin incelemesi. X400.

TUNEL	72. Saat	
Vm		Nöral tüpün açık olduğu alanlarda nöroektoderm hücrelerinde ve mezenşimal hücrelerde TUNEL pozitif hücrelerin izlendiği valproat mortal 72. saat embriyonun TUNEL boyama kesit görüntüsü.
Vd		Nöral tüpün kapalı olduğu ve TUNEL pozitif hücrelerin ise sadece mezenşimal hücrelerde tek tük pozitif olduğu saptanan valproat defektif 72. saat embriyonun TUNEL boyama kesit görüntüsü.
Vgg		Nöral tüpün kapalı olmasına rağmen, kapanma sırasında defekt olduğu izlenen alanlarda mezenşimal hücrelerde çok sayıda TUNEL hücreye rastlanır iken, nöroektoderm hücrelerinde TUNEL pozitif hücrelere rastlanılmayan valproat gelişme geriliği olan 72. saat embriyonun TUNEL boyama kesit görüntüsü.
Vf		Nöral tüpün kapalı olduğu ve TUNEL pozitif hücrelerin ise sadece mezenşimal hücrelerde tek tük pozitif olduğu saptanan valproat-folat uygulanan 72. saat embriyonun TUNEL boyama kesit görüntüsü.
Folik		Nöral tüpün kapalı olduğu, nöroektoderm hücrelerinin normal yapıda gözlemlendiği ve mezenşimal hücrelerde yer yer tek tük TUNEL pozitif hücreye rastlanan folik asit uygulanan 72. saat embriyonun TUNEL boyama kesit görüntüsü.

4.3.3.İmmünohistokimyasal Boyama sonuçları:

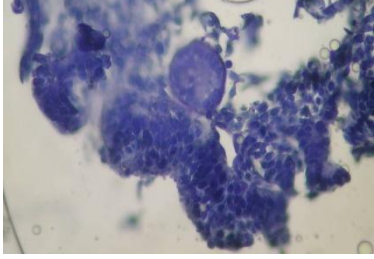
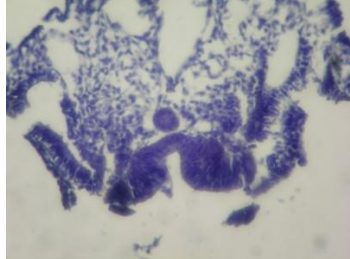
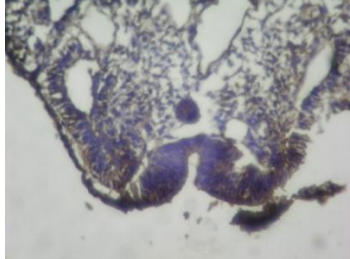


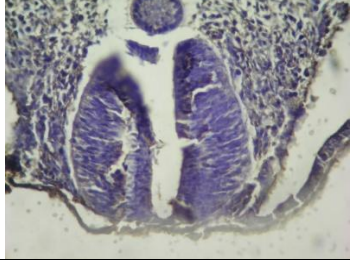
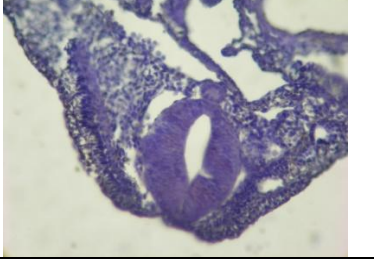
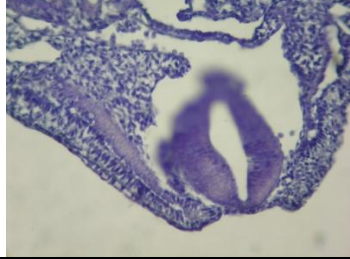
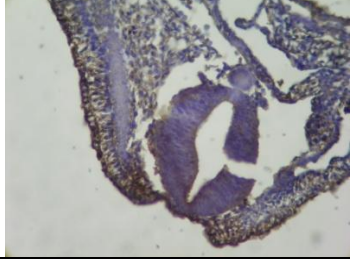


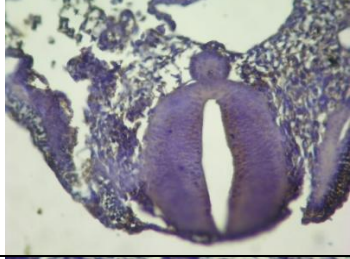
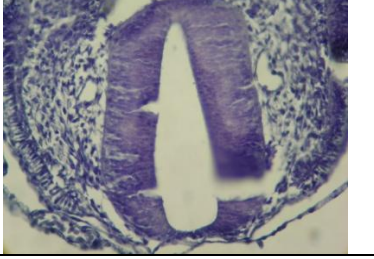
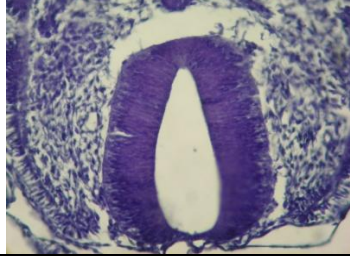
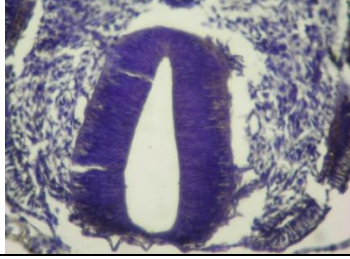
Tavuk embriyolarının 72. saatteki incelemesi sonucunda Bcl-2 immunoreaktivitesinin vgg dışındaki tüm gruplarda negatif olduğu gözlemlendi. Vgg grubunda nöroektoderm yüzeyinde bulunan ektoderm hücrelerinde zayıf şiddette pozitif immunoreaktivitenin gözlenmesi, nöral tüpün kapanması bir şekilde sağlanmış ki kapanma normal olarak gözlenmemektedir. Bu nedenle embriyoda canlı kalma sinyalinin en önemli faktörlerinden olan Bcl-2 ninde ekspresyonundaki hafifte olsa artış ile buradaki apoptotik mekanizmaların durdurulmaya çalışıldığı düşünüldü.

P53 immunoreaktivitesi ise tüm gruplarda negatif olarak saptandı. Buda valporik asitin uygulanması ile tetiklenen apoptotik mekanizmalarda p53 yolağı üzerinden olmadığını düşündürdü.

Caspaz 3 immunoreaktivitesi tüm gruplarda pozitif olarak saptanın iken, vm grubunda immunoreaktivitenin hem nöroektoderm, hem de mezensefimal hücrelerde kuvvetli pozitif (++++) olduğu saptandı. Vgg grubunda ise immunoreaktivitenin orta şiddette (++), Vd grubunda zayıf şiddette (+), Vf grubunda ise yer yer zayıf şiddette iken (+), yer yer çok zayıf şiddette (+/-) olduğu izlendi. Folik asit grubunda kaspaz 3 immunoreaktivitesinin çok zayıf şiddette (+/) olduğu saptandı (Tablo 4.5).

Bu sonuçlar göstermektedir ki, nöral tüpün açık kaldığı ve gelişimin geri olduğu embriyolarda TUNEL pozitif hücrelerin pozitifliği ile birlikte kaspaz 3 immunoreaktivitesinin de arttığı ve apoptotik mekanizmaların tetiklendiği, bununla beraber nöral tüpün hatalı da olsa kapalı olduğu vgg veya tamamen kapalı olduğu vd, vf ve folik asit gruplarında ise TUNEL pozitif hücrelerdeki azalma ile birlikte caspaz 3 immunoreaktivitesinin de azaldığı gözlenmesi üzerine, embriyonik gelişim sırasında normale yakın gelişim görülmesi ile birlikte normal apoptotik mekanizmalar çalışır iken, defetkle birlikte apoptotik mekanizmaların da tetiklenmesi hücre ölümlerinin artışına neden olmuştur.

Tablo 4.5: 72. saateki tüm gruplara ait immünohistokimyasal incelemesi görüntüleri.

İmmünohistokimya	Bcl-2 Embriyoda canlı kalma sinyalinin en önemli faktörlerinden olan Bcl-2 immunoreaktivitesinin vgg dışındaki tüm gruplarda negatif olduğu gözlemlendi.	P53 İmmünoaktivitesi tüm gruplarda negatif olarak saptandı. Buda valporik asitin uygulanması ile tetiklenen apoptotik mekanizmaların p53 yolağı üzerinden olmadığını düşündürdü.	Caspaz 3 Nöral tüpün açık kaldığı ve gelişimin geri olduğu embriyolarda kaspoz 3 immunoreaktivitesi artmış, apoptotik mekanizmalar tetiklenmiştir, bununla beraber nöral tüpün hatalı da olsa kapalı olduğu vgg veya tamamen kapalı olduğu vd, vf ve folik asit gruplarındaki embriyolarda ise kaspoz 3 immunoreaktivitesi azalmış, apoptozis mekanizmaları gerilemiştir.
Vm			
Vd			
Vgg			
Vf			
Folik asit			

4.4. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmamızdaki denekler Tablo 4.1'de özetlenmiştir (Tablo 4.1). A,B ,D ve E gruplarında NTD'ne rastlanmadı. Dolayısıyla A, B, D ve E gruplarının istatistiksel olarak karşılaştırılmasına gerek yoktu. C grubunda 8 denekte (%26) NTD olduğu histopatolojik olarak saptandı. C grubunun diğer tüm gruplar ile yapılan kıkare (**Chi-Square**) karşılaştırılmalı analizinde p değeri < 0,005 olarak saptandı.

Nöral Tüp Defekti ve mortalite açısından karşılaştırıldığında C grubu ile diğer A,B,D ve E grupları arasındaki fark istatistiksel olarak ($p<0,005$) anlamlı bulunmuştur. (Tablo 4.5).

Tablo 4.5: Grupların istatistiksel analiz sonuç tablosu.

GRUPLAR	NÖRAL TÜP DEFEKTİ		TOPLAM	İSTATİSTİKSEL ANALİZ (p değeri) [Gruplar]
	(+)	(-)		
A	0	30	30	
B	0	30	30	
C	8	22	30	
D	0	30	30	
E	0	30	30	
TOPLAM	8	142	150	P<0,005 [A -B - C - D -E]

5. TARTIŞMA

Anormal nörolasyon aşaması sonucu oluşan NTD'leri, embriyonal veya fetal dönemde ölümlerle sonuçlanabildiği gibi, doğum sonrası dönemde medikal, finansal ve sosyal içerikli sorunları da beraberinde barındıran, uzun süreli rehabilitasyon ihtiyacı gösteren konjenital malformasyonlardır. Spina Bifida' dan Anensefali'ye kadar her hangi bir kapanma defekti aşamasında incelenen NTD' leri, ABD istatistik verilerine göre 1/1000 sıklığında görülmektedir (30). "Türkiye'de Konjenital Malformasyon Sıklığı, Dağılımı, Risk Faktörleri ve Yeni doğanların Antropometrik Değerlendirmesi Arastırması-1993" sonucunda ülkemizde 3/1000 sıklığında görüldüğü saptanmış ve NTD' nin Türkiye'de sık görülen konjenital anomaliler olduğu belirtilmiştir. (32)

NTD modeli oluşturma yöntemleri arasında; memeli, avian, amfibiler ve bilgisayar modellemeleri oluşturma seçenekleri sayılabilir. Bu rneklerinin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Memeli modellemeleri olan rat ve fareler daha karmaşık ve uzun süreli çalışma gerektirirken, avian ve amfibilerdeki modellemeler ise daha kolay ve pratik yöntemlerdir. Erken dönem tavuk embriyosu modellemesi (ilk 48 saat) memelilerde embriyonel gelişimin ilk ayına uyan ve kimyasalların embriyonel gelişim üzerine etkilerinin incelendiği uygun bir modelleme örneğidir (28).

Deneysel modelleme çalışmaları öncelikle "in vivo" ve "in vitro" olarak yapılmaktadır. Olası teratojenite nedenlerinin araştırılmasında farklı faktörlerin mevcut olması anlaşılabilirliği zorlaştırabilmektedir. Bu faktörlerden bir tanesi de in vitro çalışmaların in vivo metabolizma ile her koşulda uyum sağlamamasıdır. Örneğin; Kao ve arkadaşları, valproik asiti eř zamanlı hem in vivo fare embriyolarında hem de in vitro kültür ortamında çalışmışlardır (33, 34). Çalışma sonucunda her iki grupta da benzer veriler elde edilmiştir.

Embriyonel farklılaşmanın kritik basamaklarında maruz kalınan kimyasal ajanlar organizmada gelişim kusurlarına yol açmaktadır (14, 28, 35-43). Bu basamaklar, hamileliğin ilk otuz gününde gastrulasyon olarak bilinen ve insanda embriyonun blastokist haline geçtiği, endometriuma implantasyonunun gerçekleşmesi ile başlayan (7 – 8. günler) 2. hafta sonuna doğru birbirini izleyen iki evreden oluşur. Bu periyot, üç germ yaprağının farklılaşması sonucu dokuların organları oluşturmak üzere geliştiği kritik dönemdir.

Embriyodaki defektlerin oluşum mekanizmalarını anlayabilmek maksadıyla nörülasyon ile ilgili bazı konular açıklanmalıdır. Nörülasyon ektoderm, mezoderm ve endoderm denilen üç germ yaprağının oluştuğu gastrulasyon evresinin önemli olaylarındandır. Nörülasyon, nöral düzlemde mevcut nöroepitelyal hücrelerdeki değişikliklerden, hem de bu düzlemi çevreleyen hücre gruplarının yapısal ve buldukları konumsal değişikliklerinden etkilenmektedir (44). Nöroepitelyal hücreler bu basamaklar içerisinde yapısal farklılıklar meydana getirirken, bir yandan da çoğalmaya devam ederler (45). Bu dinamiklerin ve çevresel faktörlerin meydana getirdiği etkilerle konumsal değişikliklere uğrar ve hem transvers hem de kraniokaudal düzlemde yeniden şekillenirler (44, 46, 47). İki farklı yönde bulunan yerleşim değişikliklerine etkiyen faktörler de farklıdır. Nöral planın kapanması için gerekli ilk basamak katlanma aşamasıdır. Bu esnada hücrelerin bazal yüzlerinde kalınlaşma, çaplarında daralma

ve uzunluklarında artma gibi değişiklikler oluşur (44, 48-50). Yine bu aşamada hücreler, uygun olan konum değişikliklerini gerçekleştirirler. Katlanma basamağında nöroepitelyal hücrelere has değişiklikler ve etkileşmeleri önem arzettiği gibi çevre ektoderm, ekstrasellüler matris, notokord gibi dış faktörler de gereklidir. Özellikle menteşe yerleri olarak bilinen bölgelerde bu düzenlemeler ve etkileşmeler daha da belirgin olarak gözlenir. Hücre dışı ortam, hem hidrostatik içerik, hem de hücreler arası etkileşimlere neden olarak katlanma ve oluklanmaya katkıda bulunur. Katlanma ve oluklanmadan sonra karşı karşıya gelen hücrelerin birbirlerini tanıyıp yapışması aşamaları ile kapanma gerçekleşir ve nöral tüp oluşur. Kapanma olayı hücre yüzeyindeki glikokonjugatların eşleşmeleri ile gerçekleşir (50). Avianlar (kanatlılar) daki nörolasyon aşamaları da diğer canlılarla benzer özellikte iki aşamada incelenebilir. Primer nörolasyonda beynin tümü ve spinal kordun üst lumbosakral seviyelerine kadar ki nöral yapılar oluşur. Kaudal nöroporun kapanması ile birlikte sekonder nörolasyon gelişir. Bu dönemde de spinal kordun en uç bölümleri meydana gelir. Kuyruk tomurcuğu ile ilgili nöroepitelyal hücre gruplarının ortaya çıkması ve kanal geliştirecek şekilde yapı değiştirilmesi bu aşamada meydana gelen önemli olaylardır (51).

Genel anlamda genetik faktörler (trizomi 13, 18, 21), coğrafi özellikler, annenin yaşı ve sosyoekonomik düzeyi, çinko ve folat metabolizması ile ilgili rahatsızlıklar, kontrolsüz diabet, ilk trimesterde anne vücut ısısının yüksek olması, annenin alkol kullanım öyküsü ve valproik asitin toksik etkileri nöral tüpün açık kalmasında başlıca nedenler arasında bilinmektedir (35, 36, 52, 53).

Erken dönem tavuk embriyolarında, sitokalazinler, ionofor A23187, papaverin, diazepam, verapamil, kafein, etanol, metotreksat ve aminopterin gibi folat antagonistleri, fenitoin ve valproik asit gibi anti epileptikler ve lokal anestetiklerin, yüksek dozda kullanıldığında meloksikam gibi analjezik antienflamatuarların, TGF-B İnhibitör ve Aktivatör Sistemindeki eksikliklerin (Smad's Proteinleri) nöral tüp kapanma defektlerine neden oldukları deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (28-31, 33, 39-42, 51, 54-61).

Lee ve ark., 500 µg/ml kafein maddesinin erken dönem tavuk embriyolarında NTD gelişme sıklığını belirgin şekilde arttırdığını belirtmişlerdir (42).

Yine Lee ve ark., lokal anestetiklerle tavuk embriyosunda bulunan nöral katlantıların artmasında nedenin, organizasyonda ve nöroepitelyal hücrelerdeki mikroflamanların kalsiyuma bağlı fonksiyonlarında kesintiye uğraması sonucu oluştuğunu bildirmişlerdir (62).

Nagele ve ark., 400 µg/ml diazepam dozu ile in vitro kültür ortamında yaptıkları çalışmalarında, tavuk embriolarının yaklaşık %80' inin elektron mikroskopik görüntülerinde özellikle orta beyin bölgesinde NTD geliştiğini saptamışlardır (63). İlaçların mikrofilamanlar üzerindeki etkisini daha önceden saptayabilmek pek mümkün olmasa da diazepamın kültür ortamında kas ve diğer hücrelerde myozinin sentez ve birikimini spesifik olarak durdurduğu gösterilmiştir (63-66). Böylece diazepamın myozin üzerinden, nöroepitelyal hücrelerde apikal mikrofilamanlardaki kontraktil aktiviteyi ve gelişen nöroepitelyal hücrelerdeki apikal konstriksiyonu inhibe ederek NTD oluşturduğu anlaşılmıştır (53, 58).

Erken dönem tavuk embriyosunda çalışılmış bir diğer teratojen olan etanolün uygulandığı embriyonel gelişim basamağı önem arz eder. Nöral tüpün kapandığı, ileri dönem embriyolara verilen aynı miktardaki etanolün embriyonun nöral tüpü gelişimi üzerine olumsuz etkisi gözlenmemiştir. Enhart ve ark., doza bağımlı olarak, embriyolarda gelişen defekt insidansının arttığını belirtmişlerdir (37). Pennigton ve ark., in ovo verilen 1 gr/kg tek doz etanolün, tavuk embriolarında gelişimlerinin yedinci gününde total embriyo ve beyin dokusu ağırlığını yarı yarıya düşürdüğünü bildirmişlerdir (67). Yapılan çalışmalarda, tavuk embriolarının inkübasyon periyotlarının dokuzuncu gününden önce, embriyonel karaciğer dokusunda klas I alkol dehidrojenaz enzim sentezi ve aktivitesi başlamadan verilen etanolün metabolize olmadığı saptanmıştır. İn ovo verilen 42 mg/dl etanol, 80 – 100 mg/dl olan ortalama intoksikasyon dozunun çok altındadır. Bu da etanolün, metabolitleri olan asetaldehit ve asetattan daha fazla teratojen olduğunu düşündürmektedir (43). Etanolün embriyoya major etkisi, gastrulasyon dönemindeki nöral krest hücre popülasyonu gelişimini engellemesi ve hücre topluluğunda kayıp oluşturmasıdır. Bu etkinin hangi yoldan olduğu tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Nöral doku gelişiminde kritik olan hücreler arasındaki sinyalin kaybına neden olabileceği gibi, tetikleyebileceği kontrolsüz apoptozisin nöral tüp kapanma defekti gelişiminden sorumlu olabileceği de düşünülmektedir. Barutçuoğlu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, verilen düşük doz etanol konsantrasyonlarının bile embriyoda kontrol grubuna göre gelişimsel olarak belirgin bir şekilde gerilik yarattığını ve NTD oluşumuna neden olduğunu göstermişlerdir (28).

Kalsiyum kanal blokörü olan verapamil-HCL' ün nöral krista hücrelerinde migrasyonunu engellediği gösterilmiştir. Bu olayın hücre içi kalsiyumun belirli bir seviyesinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Ependimal hücrelerde, hücre içine kalsiyum girişinin engellenmesi durumunda füzyon olmadığı görülmüştür (68). Nöral katlantı gerçekleşmesinde etkili olan dış menteşe noktaları

çevresinde yerleşmiş ve lateral yüzey ektodermine bağlı hücrelerin yapısal değişikliğinde etkili olan hücre apikal kısmının kalsiyuma bağlı olarak daralması, kontraktıl aşamalar ile birlikte gerçekleşmektedir (69). Kalsiyum hücre fonksiyonunda birçok aşamada gereklidir. Hücre farklılaşması, yapısal elemanların düzenlenmesi ve bu amaçla gerekli genlerin sentezi olaylar sayılabilir (70, 71). Hücredeki kalsiyum miktarı ve kalsiyumun hücre içine giriş şekli hücrenin yaşaması veya ölümü üzerine etkilidir (72). Herhangi bir nedenle oluşabilen yüksek ya da düşük konsantrasyonlar hücre ölümüne neden olabilir. Kontraksiyon oluşumunda, kalmodulin ile düzenlenen kalsiyuma bağlı sitoplazmik aktin ve myozin etkilidir. (73, 74). Aktin polimerizasyonu için de kalsiyumun gerekli olduğuna inanılmaktadır (75). Kalsiyum agonistlerine bağlı uyarılan hücre içine kalsiyum girişi sonucu menteşe noktalarında elevasyon ve katlanma olduğu gösterilmiştir. Kalmodulin inhibitörleri kullanıldığında ise katlanmanın olmayışı bu olayda kalmodulinin düzenleyici faktör olduğunu düşündürmektedir. Kalmodulin, hafif zinciri kalsiyuma bağlı olarak fosforile edip myozin ATPaz aktivitesini uyarmaktadır (73). Kaldesmonun aktine bağlanması gibi olaylar yine kalsiyum / kalmodulin kompleksi ile kontrol edilmektedir. Kapanma işlemi hücre dışı ortamındaki kalsiyuma gerek duymaktadır (76, 77). Kapanma işleminde ikincil mesajcı olarak cAMP' nin gerekli olduğu Desmond tarafından gösterilmiştir (68). Kalsiyuma bağlı hücre adhezyon molekülleri de nöral tüpün bazal ve apikal yüzünde daha fazla olmak üzere gösterilmiştir (68).

Fenitoin, deneysel hayvan çalışmalarında çeşitli defektlere yol açtığı kanıtlanmış, infantlarda doğumsal anomalilere neden olabilen çok yaygın kullanılan bir antiepileptik ilaçtır (78). Epoksid hidrolaz ve glutatyon S transferaz gibi detoksifikasyon enzimlerindeki inhibisyon, glukokortikoid reseptörleri ile interaksiyonlar ve folat metabolizmasındaki inhibisyon fenitoinin teratojenitesi ile ilişkili olarak ortaya atılan hipotezlerden bazılarıdır. (79). Fenitoin alınmasına ikincil gelişen NTD' lerinde serum folat düzeylerinin düşük olduğu saptanmıştır. (80). Fenitoinin folik asit metabolizmasını hızlandırıp, mikrozomal enzimleri indükleyerek gebelerde serum folat düzeyini düşürdüğü ortaya konmuştur. Kortizonla benzer mekanizmalar üzerinden damak anomalileri, prostoglandin sentez inhibisyonu yaparak teratojeniteye yol açtığı hakkında yayınlar da mevcuttur (80). Güney ve arkadaşları tavuk embriyolarında erken dönemde yaptıkları bir çalışmada, folik asitin fenitoin ile gelişen NTD insidansını azalttığını ortaya koymuşlardır. (29).

Folat antagonistlerinin (metotreksat, aminopterin vb.) insanlarda ve deneysel çalışmalarda teratojen olduğu kanıtlanmıştır. (81). Folatın doğumsal anomalilerle olan bağlantısı son elli yıldır bilinen bir gerçektir. (52, 53). Deneysel ve insan çalışmalarında, gebeliğin nörolasyon ve somitasyon aşamalarında yapılan folat desteğinin doğumsal defektlerin görülme sıklığını azalttığı saptanmıştır. (82, 83).

Erken dönem tavuk embriyoları üzerinde yapılan çalışmalarla, apoptozisin nöral tüpün kapanması aşamasında çok önemli bir rolünün olduğu daha önceden bildirilmiştir. (31). Nörolasyon, santral sinir sistemi ana yapılarının oluşması aşamalarında ilk ve en önemli basamaktır. Daha sonraki; nöral plak oluşumu, nöral plağın şekillenmesi, nöral plağın katlanması ve nöral büyüme plağının kapanması diğer dört önemli gelişimsel basamaktır (7). Bu aşamalardan herhangi birinde gelişebilecek bir defekt değişik tiplerde NTD oluşumuna neden olacaktır. Nöral büyüme plağının kapanması aşaması önemli iki alt basamaktan oluşur. Birincisi nöral katlantıların birbirini tanması ve füzyonu, İkincisi ise nöral ve yüzey ektoderminin birbirinden ayrışması ve yüzey ektoderminin gelecekteki cilt tabakasını oluşturmak için şekillenmesidir. Yüzey ektodermi ile nöral tabaka arasında kalan hücreler nöral krista hücreleri halini alarak gelecekte periferik sinir sistemini oluşturmak üzere şekillenirler. Nörolasyonun sonunda, nöral ve yüzey ektodermi arasında ayrışma olması gerekmektedir. Weil ve arkadaşları, nöral tüpün kapanması aşamalarında apoptozisin (programlanmış hücre ölümü) gerekli olduğunu bildirmişlerdir (84). Nöral ve yüzey ektoderminin ayrışmaması durumunda yüzey ektoderminin içeri migrasyonu ve nöral tüpün mezenkimal hücrelerle kaplanmasına neden olabilir. Bu da dermal sinüs traktının, medulla spinaliste subaraknoid mesafeden cilt yüzeyine kadar epidermal hücrelerce kaplı olmasını embriyolojik bir hata olarak açıklamaktadır.

1978 yılında ABD'de valproik asit kullanımına izin verilmesinin ardından 2 yıl sonra valproat ve fetal anomalilerle ilgili yayınların arttığını görmekteyiz (85-89). İn ovo tavuk embriyosuna valproik asit enjekte edilerek yapılan çalışmalarda daha önceden diğer embriyolarda da gösterilen nöral tüp defekti, kraniofasyal, kardiyovasküler, ekstremiteler, omurga ve gelişim anomalileri ve büyüme geriliği ile artmış mortaliteyi içeren sonuçlar gösterilmiştir. Valproat ile ilişkili insan ve diğer embriyolarda nöral tüp defekti gelişim mekanizmaları hakkında bir çok bildiri mevcuttur (90-92). Somit olarak bilinen paraaksiyel mezoderm hücreleri nöral tüp gelişimi sırasında simetrik bir şekilde bilateral nöral tüp etrafında dizilir. Somitler, omurgalıların segmental bir yapıda şekillenebilmesi için gereklidir. Tavuk embriyolarına

Valproik asitin enjeksiyonu sonrasında somitlerde genişleme, düzensizlik, dizilimi bozukluğu saptanmıştır. (93, 94). Ayrıca diğer bazı deney hayvanı embriyolarında yapılan çalışmalarda somit anomalileri ile ilgili benzer sonuçlar elde edilmiştir (34, 90, 95, 96). Valproatla ilgili kardiyak anomaliler kültüre edilmiş tavuk embriyolarında da gösterilmiştir (94, 97, 98). İnsan fetal valproat sendromu ile bağlantılı olarak, %26 çocukta konjenital kardiyak defektin saptandığı bir literatür çalışması da mevcuttur (99). Valproatla ilişkili aniridi, koroid fissürün inkomplet kapanması, mikroftalmi, pigment anomalileri, lens yerleşim bozuklukları ve kataraktı içeren göz anomalileri ve bununla ilgili *Pax-2* ve *Pax-6* gen mutasyonları bildirilmiştir (99-101). Kas – iskelet sistemi ile bağlantılı olarak da tavuk embriyosu ve diğer deney hayvanlarında gelişebilecek anomaliler hakkında çalışmalar mevcuttur (92, 95, 97, 102). Valproat embriyo farklılaşmasında önem arz eden Hox genlerinin ekspresyonlarında karakter değişikliğine yol açabilmektedir (103). İnsanda in utero valproatla etkileşime bağlı kas - iskelet sistemi anomalileri gelişme sıklığı %63 oranında bildirilmiştir (99). Valproatın neden olduğu gelişimsel defekt mekanizmaları ile bağlantılı olarak birçok teori öne sürülmüştür. “Embriyonik folat metabolizmasındaki değişim teorisi” de bunlardan bir tanesi dir (104). Folat, aminoasitlerin, proteinlerin, pürin ve pirimidin metabolizmalarında metilasyon basamağında kofaktör olarak görev yapan önemli bir B kompleks vitamindir. Aminoasit, protein, pürin ve pirimidin metabolizmaları embriyogenezin farklılaşma ve çoğalma aşamalarında çok önem arz eden basamaklardır. Diğer bir teori de bradikardiye ikincil olarak kan akımında yavaşlama ve hipoksi gelişmesi sonucu oluşabileceği düşünülen “hipoksi teorisi” dir (105). Embriyoda büyüme, farklılaşma ve organogenezde etkili olan vitamin A ve bunun oksidatif metaboliti *all-trans-retinoik asit* eksikliği ve fazlalığında gelişen embriyotoksisite ve konjenital anomali spektrumu valproat ile benzerdir (106-108). Valproik asit, farmakokinetik ve toksik etkisi iyi bilinen, çoğunlukla antiepileptik ajan olarak kullanılan aynı zamanda histon deasetilaz enzim inhibitörüdür (22). Yapılarındaki mevcut aminoasit diziliminin gösterdiği bazı özellikler nedeniyle asidik karakterdeki DNA ya sıkı şekilde bağlanan Histonlar hücrede DNA depolanmasını sağlayan proteinlerdir. Histonların asetilasyon ve deasetilasyon işlemleri enzim kontrolünde (asetilaz, deasetilaz) gerçekleşen, protein sentezinde önem arz eden aşamalarıdır. Histondeasetiaz enzim inhibitörleri histonların aşırı asetilasyonu sonucunda hücre siklusunun durdurulmasına ve apoptozisin indüklenmesine neden olarak hücre ölümüne yol açmaktadır (23-24). Yapılan birçok çalışmayla histondeasetilaz enzim inhibitörlerinin tetiklediği apoptozis sayesinde tümör

hücrelerinde azalma olduğu gösterilmiştir (22-109). Embriyogenez aşamasında verilen, aynı zamanda histondeasetilaz enzim inhibitörü olan valproik asitin apoptozisi indükleyerek orta hat kapanma defektine yol açması olasıdır.

Tüm bu çalışmalar ve sonuçları incelendiğinde, günümüzde sıklıkla epilepsi ve bipolar bozuklukların tedavisinde, migren profilaksisinde kullanılan valproik asitin erken dönem tavuk embriyolarında nöral tüp gelişimi üzerine yaratmış olduğu olumsuz etkilerinin folik asit ile önlenabilirliğinin araştırılmadığını saptadık. İlacın gebelikte kullanımının D grubunda olması araştırmanın gerekçesini daha da arttırmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Valproik asit başlıca epilepsinin tedavisinde olmak üzere, bipolar bozuklukların tedavisinde, migren profilaksisinde kullanılan antiepileptik bir ilaçtır. Valproik asit gebelikte kullanımı halinde D kategorisindedir.

Kliniğimiz Tavuk Embriyosu laboratuvarında erken dönem tavuk embriyosu üzerinde yaptığımız bu çalışmamızda, valproik asitin yüksek sıklıkta görülen NTD oluşturma etkisinin kullanılan folik asit yardımı ile önlenebildiği gözlemlenmiştir.

Bu deneysel çalışmadan valproik asitin terapötik dozlarda gebe bir epilepsi hastasında kullanılması durumunda yenidoğanda oluşturacağı NTD geliştirme ihtimalinin, yine terapötik dozlarda kullanılan folik asit yardımı ile önlenebileceği sonucuna varılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Moore KL, The developing human: Clinically Oriented Embryology, 8th Ed, T.V.N. Persaud, Saunders Elsevier, 2008.
2. Petorak İ, Medikal Embriyoloji, Beta Yayıncılık, İstanbul: 244-250, 1984.
3. Sadler TW, Langman's Medikal Embriyoloji; (Dr. Başaklar) Yedinci Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara: 39-88, 1996.
4. Larsen WJ, Human Embryology; second edition, Churchill Livingstone, New York: 19-106, 1997.
5. Persaud M, (Ed), İnsan Embriyolojisi (Dr. Yıldırım, Dr. Okar, Dr. Dalçık) 6. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul:17-47,2002.
6. Schoenwolf GC, Smith JL, Mechanism of neurolation, Tradional viewpoint and recent advences, Development, 109: 243-270,1990.
7. Colas JF, Schoenwolf GC, Towards a cellular and molecular understanding of neurulation, Developmental Dynamics, 221: 117-145, 2001.
8. Ronald J, Lemire RJ, Joseph R, Siebert JR. Neuroembryology. (in) Neurosurgery. Wilkins R.H., Rengachary S.S (eds). McGraw-Hill Bok Company, NewYork, second edition,3411-3444,1996.
9. Aksoy K, Temel Nörojirürji, Cilt II, TND Yayınları, Ankara: 1335-1337, 2005.
10. Monk CS, Webb SJ, Nelson CA, Prenatal neurobiological development, Molecular mechanisms and anatomical change. Developmental Neurophycholgy, 19: 211-236, 2001.
11. Sapunar D, Vilovic K, England M, Saraga-Babic M, Morphological diversty of dying cells during regression of the human tail, Annals of Anatomy, 183: 217-222, 2001.
12. Aksoy T, Tavuk Yetiştiriciliği, 3. baskı, Şahin Matbaa, Ankara: 101-128,1999.
13. Şenköylü N, Modern Tavuk Üretimi, 3. baskı, Anadolu Matbaa, İstanbul, 109-131, 2001.
14. Hamburger V, Hamilton HL, A series of normal stages in the development of the chick embryo, J Morph, 88; 49-92, 1951.
15. Bellairs R, Osmond M, The Atlas of Chick Development, Sec. Ed, Elsevier, Academic Press, California, USA, 2005.
16. Burton BS (1882) on the propyl derivates and decomposition products of ethylacetate. Am Chem J 3:385-395.
17. Meunier H, Carraz G, Neunier Y, Eymard P, Aimard M. Pharmacodynamic properties of N-dipropylacetic acid. Therapie,18:435-8, 1963.
18. Parnham MJ. Bruinvels J. Valproate ; Birkhauser Verlag, Germany p:1-3,1999.
19. Rotiroti D, Palella B, Losi E, Nistico G, Caputi AP. Evidence that a GABAergic mechanism influences the development of DOCA-salt hypertension in the rat. Eur J Pharmacol: 10;83(1-2):153-154,1982.
20. Kayaalp SO, Rasyonel Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji, 6.Baskı. Ankara: Cilt2. 2132-2133, 1992.
21. Staunton H, Valproate, spina bifida, and birth defect registries. Lancet: 18;1(8634):381, 1989.
22. Ziauddin MF, Yeow WS, Maxhaimer JB, Baras A, ChuaA, Reddy RM, Cole Jr GW, Schrupp DS, Nguyen DM, Valproik asit, an antiepileptic drug with histone deasetylase inhibitory activity, potentiates the cytotoxic effect of apo2L/TRAIL on cultured thoracic cancer cells through mitochondria-depent caspase activation, Neoplasia, 8: 446-457, 2006.

23. Goodsell DS, The molecular perspective: Histon deasetylase, *The oncologist*, 8: 389-391, 2003.
24. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA, Histon deasetylase inhibitors: Inducer of differentiation or apoptosis of transformed cells, *Journal of the national cancer institute*, vol. 92, no. 15; 1210-1216, 2000.
25. Jacob AR. Folate, DNA methylation, and gene expression: factors of nature and nurture. *Am J Clin Nutr*: 72:903-904,2000.
26. Kayaalp, S.O.(Editör): Rasyonel Tedavi Yönünden TIBBİ FARMAKOLOJİ, 6. Baskı, Ankara: Cilt3. 3134-3141, 1993.
27. TIBDAM. Hayvan seçimini belirleyenler. <http://lokman.cu.edu.tr/tibdam/hayvansecimi.html> [08/04/2009].
28. Barutçuoğlu M, Selçuki M, Vatanserver S, Umur AŞ, İnan S, Erken dönem tavuk embryonal tüp gelişiminde etanolün etkisi, *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 11:32-36, 2001.
29. Güney Ö, Canbilen A, Konak A, Acar O, The effects of folic acid in the prevention of neural tube development defects caused by phenytoin in early chick embryos, *Spine*, 28: 442-445, 2003.
30. Temiz C, Temiz P, Demirel A, Sayın M, Umur AŞ, Özer FD, Effect of sodium phenytoin concentration on neural tube development in the early stages of chicken embryo development, *Journal of Clinical Neuroscience*, 16(2): 307-311, 2009.
31. Selçuki M, Vatanserver S, Umur AŞ, Temiz C, Sayın M, Apoptosis seems to be the major process while surface and neural ectodermal layers detach during neurulation, *Child Nerv Syst*, 24(5): 577-580, 2008.
32. Tunçbilek E. ve ark. Türkiye’de konjenital malformasyon sıklığı, dağılımı, risk faktörleri ve yenidoğanların antropometrik değerlendirmesi. TÜBİTAK Matbaası, Ankara 1996.
33. Whitsel AI, Johnson CB, Forehand CJ, An in ovo chicken model to study the systemic and localized teratogenic effects of valproic acid, *Teratology*, 66: 153-163, 2002.
34. Kao J, Brown NA, Schmid B, Goulding EH, Fabro S, Teratogenicity of valproic acid: in vivo and in vitro investigations, *Teratog Carcinog Mutagen* 1: 367-382, 1981.
35. Bupp B, Shibley A, Teratogenicity of ethanol in different chicken strains, *Alcohol Alcoholism*, 33 (5), 457-464, 1998.
36. Cartwright MM, Smith SM, Stage dependent effects of ethanol on cranial neural crest cell development: partial basis for the phenotypic variations observed in fetal alcohol syndrome, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 19 (6): 1454-62, 1995.
37. Ernhart CB, Jokol RI, Martier S, Moron P, Nadler O, Ager JW, Alcohol teratogenicity in the human; A detailed assessment of specificity, critical period and threshold, *Am J Obstet Gynecol*, 156; 33-39, 1987.
38. Gilani S, Persaud TV, Embryonic development in the chick following exposure to ethanol, acetaldehyde and cyanamide, *Annals of Anatomy*, 174 (4); 305-308,1992.
39. Lee H, Bush KT, Nagele RG, Time-lapse photographic study of neural tube closure defects caused by xylocaine in the chick, *Teratology*, 37; 203-209, 1988.
40. Lee H, Nagele RG, Neural tube closure defects caused by papaverine on explanted early chick embryos, *Teratology*, 20; 321-331, 1979.
41. Lee H, Nagele RG, Toxic and teratologic effects of verapamil on early chick embryos. Evidence for the involvement of calcium in neural tube closure, *Teratology*, 33; 203-211, 1986.

42. Lee H, Nagele RG, Pietrolungo JF, Toxic and teratologic effects of caffeine on explanted early chick embryos, *Teratology*, 25; 19-25, 1982.
43. Martina MC, Susan MS, Increased cell death and reduced neural crest cell numbers in ethanol exposed embryos; partial basis for the fetal alcohol syndrome phenotype, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 119 (2); 378-386, 1995.
44. Schoenwolf, G.C., Formation and patterning of the avian neuraxis: one dozen hypotheses, *Ciba Found Symp*, 181: 25-38, 1994.
45. Schoenwolf GC, Franks MV, Quantitative analyses of changes in cell shapes during bending of the avian neural plate, *Dev Biol*, 105: 257-272, 1984.
46. Schoenwolf GC, Cell movements driving neurulation in avian embryos, *Development Suppl*(2): 157-168, 1991.
47. Shimamura K, Hartigan DJ, Martinez S, Puelles L, Rubenstein JL, Longitudinal organization of the anterior neural plate and neural tube. *Development* 121: 3923-3933, 1995.
48. Copp AJ, Neural tube defects, *Trends Neurosci*, 16: 381-383, 1993.
49. Schoenwolf GC, Smith JL, Mechanisms of neurulation: traditional viewpoint and recent advances, *Development*, 109: 243-270, 1990.
50. Smith JL, Schoenwolf GC, Neurulation: coming to closure, *Trends Neurosci*, 20: 510-517, 1997.
51. Ünlü A, Bağdatoğlu C, Silav G, Aydın V, Güney Ö, Selçuki M, Orta hat kapanma kusurlarında kalsiyumun önemi, *Türk Nöroşirürji Dergisi*, 11:111-116, 2001.
52. Eskes TKAB, From anemia to spina bifida - the story of folic acid, *Obst. Gyn. Reprod. Biol.*, 90: 119-123, 2000.
53. Kalter H, Folic acid and human malformations: a summary and evaluation. *Reprod. Toxicol.*, 14: 463-476, 2000.
54. Güney Ö, Selçuki M, Ünlü A, Bağdatoğlu C, The effect of diazepam on the development of neural tube defects in early chick embryos, *Turkish Neurosurgery*, 9:44-47, 1999.
55. Karfiuikel P, The role of microtubules and microfilaments in neurulation in *Xenopus*, *Dev Biol*, 25: 30- 56, 1971.
56. Lee H, Nagele RG, Karasanyi N, Inhibition of neural tube closure by ionophore A23187 in chick embryos, *Experientia*, 34: 518- 520, 1978.
57. Lee H, Keresztury MF, Kosciuk MC, Nagele RG, Roisen FJ, Diazepam inhibits neurulation through its action on myosin-containing microfilaments in early chick embryos, *Comp Biochem Physiol*, 77: 331- 334, 1984.
58. Nagele RG, Pietrolungo JF, Lee H, Roisen FJ, Diazepam-induced neural tube closure defects in explanted early chick embryos, *Teratology*, 23: 343-349, 1981.
59. Vatansever HS, Umur AŞ, İnan VS, Selçuki M, The effects of methotrexate on the development of neural tube defects in the chick embryo, *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 27 (5): 1119-1125, 2003.
60. Çetinkal A, Çolak A, Topuz K, Demircan MN, Şimşek H, Berber U, Umur AŞ, Selçuki M, Vatansever HS, The Effects of Meoxicam on Neural Tube Development in the Early Stage of Chick Embryos, *Turkish Neurosurgery*, 20(2): 111-116, 2010.
61. Umur N, Vatansever S, Umur AŞ, Özbilgin K, Selçuki M., Analysis of the Effects of Inhibitor and Activator Systems (Smad's Proteins) of TGF-Bs on Chick Neural Tube Closure, *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16 (3): 437-442, 2010
62. Lee H, Nagele RG, Neural tube defects caused by local anesthetics in early chick embryos, *Teratology*, 31: 119-127, 1985.

63. Nagele RG, Bush KT, Hunter ET, Koseiuk MC, Lee H, Biomechanical basis of Diazepam-induced neural tube defects in early chick embryos: A morphometric study, *Teratology*, 40: 29- 36, 1989.
64. Bandman E, Walker CR, Strohman RC, Diazepam inhibits myoblast fusion and expression of muscle specific protein synthesis, *Science*, 200: 559-561, 1978.
65. Nagele RG, Pietrolungo JF, Kosciuk MC, Roisen FJ, Lee H, Diazepam inhibits the spreading of chick embryo fibroblasts, *Exp Cell Res*, 143: 153 - 162, 1983.
66. Walker CR, Bandman E, Strohman RC, Diazepam induces relaxation of chick embryo muscle fibers in vitro and inhibits myosin synthesis, *Exp Cell Res*, 123: 285- 291, 1979.
67. Pennigton S, Kalmus G, Brain growth during ethanol induced hypoplasia, *Drug and Alcohol Dependence*, 20; 279-286, 1987.
68. Desmond ME, Duzy MJ, Federici BD, Second messenger regulation of occlusion of the spinal neurocoel in the chick embryo, *Dev Dyn*, 197: 291-306, 1993.
69. Ferreira MC, Hilfer SR, Calcium regulation of neural fold formation: visualization of the actin cytoskeleton in living chick embryos, *Dev Biol*, 159: 427-440, 1993.
70. Desarmenien MG, Clendening B, Spitzer NC, In vivo development of voltage-dependent ionic currents in embryonic *Xenopus* spinal neurons, *J Neurosci*, 13: 2575-2581, 1993.
71. Ohbayashi K, Fukura H, Inoue HK, Komiya Y, Igarashi M, Stimulation of L-type Ca^{2+} channel in growth cones activates two independent signaling pathways, *J Neurosci Res*, 51: 682-696, 1998.
72. Ghosh A, Greenberg ME, Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences, *Science*, 268(5208): 239-247, 1995.
73. Hathaway DR, Adelstein RS, Human platelet myosin light chain kinase requires the calcium-binding protein calmodulin for activity, *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 1653-1657, 1979.
74. Lee H, Nagele RG, Possible involvement of calmodulin in apical constriction of neuroepithelial cells and elevation of neural folds in the chick, *Experientia*, 41: 1186-1188, 1985.
75. Nagele RG, Bush KT, Lynch FJ, Lee HY, A morphometric and computer-assisted three dimensional reconstruction study of neural tube formation in chick embryos, *Anat Rec*, 231: 425-436, 1991.
76. Desmond ME, Schoenwolf GC, Evaluation of the roles of intrinsic and extrinsic factors in occlusion of the spinal neurocoel during rapid brain enlargement in the chick embryo, *J Embryol Exp Morphol*, 97: 25-46, 1986.
77. Smedley MJ, Stanisstreet M, Calcium and neurulation in mammalian embryos. II. Effects of cytoskeletal inhibitors and calcium antagonists on the neural folds of rat embryos, *J Embryol Exp Morphol*, 93: 167-178, 1986.
78. Bennett GD, Lau F, Calvin JA, Phenytoin-induced teratogenesis: a molecular basis for the observed developmental delay during neurulation, *Epilepsia*, 38:415-23, 1997.
79. Malpas JS, Spray GH, Witts L, Serum folic acid and vitamin B12 levels in anticonvulsant therapy, *Br Med J*, 1:955-7, 1966.
80. McDavitt JM, Gautieri RF, Mann DE, Comparative teratogenicity of cortisone and phenytoin in mice, *J Pharmaceutical Sci*, 70:631- 4, 1981.

81. Biale Y, Lewenthal H, Aderet B, Congenital malformations due to anticonvulsive drugs, *Obstet Gynecol*, 45:439–42, 1975.
82. Milunsky A, Jick H, Jick SS, Bruell CL, MacLaughlin DS, Rothman KJ, Willett W, Multivitamin/folic acid supplementation in early pregnancy reduces the prevalence of neural tube defects, *J. Am. Med. Assoc.*, 262: 2847-2852, 1989.
83. Eskes TK, Steegers-Theunissen RP, Primary prevention of neural-tube defects with folic acid, *Eur. J. Obstet. Gynecol., Reprod. Biol.*, 53: 147-152, 1994.
84. Weil M, Jacobson MD, Raff MC, Is programmed cell death required for neural tube closure, *Current Biol*, 7(4):281, 1997.
85. Brown NA, Kao J, Fabro S, Teratogenic potential of valproic acid, *Lancet*, 1:660–661, 1980.
86. Dalens B, Raynaud EJ, Gaulme J, Teratogenicity of valproic acid, *J Pediatr*, 97:332–333, 1980.
87. Di Liberti JH, Farndon PA, Dennis NR, Curry CJ, The fetal valproate syndrome, *Am J Med Genet*, 19:473–481, 1984.
88. Tein I, MacGregor DL, Possible valproate teratogenicity, *Arch Neurol*, 42:291–293, 1985.
89. Ardinger HH et al, Verification of the fetal valproate syndrome phenotype, *Am J Med Genet*, 29:171–185, 1988.
90. Padmanabhan R, Hameed MS, Exencephaly and axial skeletal malformations induced by maternal administration of sodium valproate in the MF1 mouse, *J Craniofac Genet Dev Biol*, 14:192–205, 1994.
91. Malone FD, D'Alton ME, Drugs in pregnancy: anticonvulsants, *Semin Perinatol*, 21:114–123, 1997.
92. Schardein JL, Chemically induced birth defects, New York: Marcel Dekker, p 179–235, 2000.
93. Barnes GL, Mariani BD, Tuan RS, Valproic acid-induced somite teratogenesis in the chick embryo: relationship with Pax-1 gene expression, *Teratology*, 54:93–102, 1996.
94. Kelly PG, Regan CM, Studies on valproate-induced perturbations of neurulation in the explanted chick embryo, *Toxicology*, 71:137–144, 1992.
95. Menegola E, Broccia ML, Prati M, Giavini E. Stage-dependent skeletal malformations induced by valproic acid in rat, *Int J Dev Biol*, 42:99–102, 1998.
96. Pennati R, Gropelli S, de Bernardi F, Sotgia C, Action of valproic acid on *Xenopus laevis* development: teratogenic effects on Eyes, *Teratogen Carcinogen Mutagen*, 21:121–133, 2001.
97. Vorhees CV, Teratogenicity and developmental toxicity of valproic acid in rats, *Teratology*, 35:195–202, 1987.
98. Sonoda T, Ohdo S, Ohba K, Okishima T, Hayakawa K, Sodium valproate-induced cardiovascular abnormalities in the Jcl:ICR mouse fetus: peak sensitivity of gestational day and dose-dependent effect, *Teratology*, 48:127–132, 1993.
99. Kozma C, Valproic acid embryopathy: report of two siblings with further expansion of the phenotypic abnormalities and a review of the literature, *Am J Med Genet*, 98:168–175, 2001.
100. Tremblay P, Gruss P, Pax: genes for mice and men, *Pharmacol Ther*, 61:205–226, 1994.
101. Dahl E, Koseki H, Balling R, Pax genes and organogenesis, *Bioessays*, 19:755–765, 1997.
102. Petrere JA, Anderson JA, Sakowski R, Fitzgerald JE, de la Iglesia FA, Teratogenesis of calcium valproate in rabbits, *Teratology*, 34:263–269, 1986.

103. Faiella A, Wernig M, Consalez GG, Hostick U, Hofmann C, Hustert E, Boncinelli E, Balling R, Nadeau JH, A mouse model for valproate teratogenicity: parental effects, homeotic transformations, and altered HOX expression, *Hum Mol Genet*, 9:227–236, 2000.
104. Wegner C, Nau H, Alteration of embryonic folate metabolism by valproic acid during organogenesis: implications for mechanism of teratogenesis, *Neurology*, 42:17–24, 1992.
105. Azarbayjani F, Danielsson BR, Pharmacologically induced embryonic dysrhythmia and episodes of hypoxia followed by reoxygenation: a common teratogenic mechanism for antiepileptic drugs?, *Teratology*, 57:117–126, 1998.
106. Nau H, Tzimas G, Mondry M, Plum C, Spohr HL, Antiepileptic drugs alter endogenous retinoid concentrations: a possible mechanism of teratogenesis of anticonvulsant therapy, *Life Sci*, 57:53–60, 1995.
107. Wolf G, A history of vitamin A and retinoids, *FASEB J*, 10:1102–1107, 1996.
108. Maden M, Gale E, Kostetskii I, Zile M, Vitamin A-deficient quail embryos have half a hindbrain and other neural defects, *Curr Biol*, 6:417–426, 1996.
109. Walkinshaw DR, Yang XJ, Histone deacetylase inhibitors as novel anticancer therapeutics, *Current oncology*, vol.15, no.5; 237-243, 2008.

