



T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

ERKEN TAVUK EMBRİYOLARINDA
METİLPREDNİZOLON’UN
ORTA HAT KAPANMASINA ETKİSİ

DR.NECMETTİN ÇOBAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

AFYONKARAHİSAR
OCAK 2021

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

ERKEN TAVUK EMBRİYOLARINDA
METİLPREDNİZOLON’UN
ORTA HAT KAPANMASINA ETKİSİ

DR.NECMETTİN ÇOBAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
DR.ÖĞR.ÜYESİ SERHAT YILDIZHAN

KABUL VE ONAY

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Tıp Fakóltesi Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim/Bilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütölmüş olan "Erken Tavuk Embriyolarında Metilprednizolon'un Orta Hat Kapanmasına Etkisi" başlıklı, Arş. Gör.Dr.Necmettin Çoban'a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:07.01.2021

Prof.Dr. Adem ASLAN

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakóltesi

Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı

Jüri Başkanı

Dr .Öğr.Üyesi Serhat YILDIZHAN

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakóltesi

Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Öğr.Üyesi

Tez Danışmanı

Dr.Öğr.Üyesi İlker KİRAZ

Denizli Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi

Beyin ve Sinir Cerrahisi Anabilim Dalı Öğr.Üyesi

Üye

I. İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
I. İÇİNDEKİLER.....	I
II.ÖNSÖZ.....	III
III. ÖZET.....	IV
IV. ABSTRACT.....	V
V. SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	VI
VI. TABLO LİSTESİ.....	VII
VII. ŞEKİL LİSTESİ.....	VIII
VIII. RESİM LİSTESİ.....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. NÖRAL TÜP DEFEKTİ.....	4
2.2. NÖRAL TÜP KAPANMASI.....	4
2.2.1.PRİMER NÖRÜLASYON.....	7
2.2.2. SEKONDER NÖRULASYON.....	8
2.3. NÖRAL TÜP KAPANMA DEFEKTLERİ.....	8
2.3.1. ANENSEFALİ.....	9
2.3.2. ENSEFALOSEL.....	9
2.3.3.SPİNA BİFİDA.....	10
2.3.3.1.SPİNA BİFİDA APERTA (AÇIK SPİNAL DİSTRAFİZM).....	11
2.3.3.2.SPİNA BİFİDA OKÜLTA (KAPALI SPİNAL DİSTRAFİZM).....	12
2.4.TANI.....	12
2.5.NÖRAL TÜP DEFEKTLERİNİN ETİYOLOJİSİ.....	12
2.5.1.FOLİK ASİT EKSİKLİĞİ.....	13
2.5.2.ANNEDE YÜKSEK ATEŞ.....	14
2.5.3.ANNEDE DİABETES MELLİTUS.....	14
2.5.4.ANNEDE OBEZİTE.....	14
2.5.5. ÇEVRESEL KİRLETİCİLERLE TEMAS.....	14

2.6. NTD’NİN GENETİĞİ.....	15
2.7. CİVCİV EMBRİYOSUNDA EMBRİYOGENEZ.....	16
2.8.METİLPREDNİZOLON.....	19
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1. DENEY SIRASINDA KULLANILAN KİMYASALLAR.....	22
3.2. DENEY HAYVANI.....	22
3.3. LABORATUVAR KOŞULLARI.....	23
3.4. İNKÜBATÖR.....	24
3.5. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	24
3.6. EMBRİYOLARIN ELDE EDİLMESİ.....	26
3.7. HİSTOLOJİK DOKU TAKİP YÖNTEMİ.....	28
3.8 AGNOR BOYAMA PROSEDÜRÜ.....	32
4.BULGULAR.....	34
4.1.KONTROL GRUBU.....	35
4.2.GRUP 1.....	36
4.3.GRUP 2.....	38
4.4.GRUP 3.....	40
5.TARTIŞMA.....	44
6.SONUÇ.....	49
7. KAYNAKLAR.....	50

II. ÖNSÖZ

Afyon Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Nöroşirürji Kliniğinde bilgi ve tecrübelerinden sonsuz yararlandığım eğitim sorumlumuz, Prof. Dr. Adem ASLAN'a, eğitim sürecimde her zaman yanımda hissettiğim, bilgi ve tecrübelerinden sonsuz yararlandığım Dr. Öğr. Üyesi M. Gazi BOYACI'ya, Dr. Öğr. Üyesi Serhat KORKMAZ'a, Dr. Öğr. Üyesi Usame RAKİP'e ve Dr. Öğr. Üyesi İhsan CANBEK'e teşekkür ederim.

Bu tezin oluşmasında ve eğitim sürecimde klinik bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen hocam ve tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Serhat YILDIZHAN'a teşekkür ederim.

Tezime yön veren Anatomi A.B.D. Dr. Öğr. Üyesi Emre ATAY'a teşekkür ederim. Tez çalışmamda katkıları olan Anatomi A.B.D. Dr. Öğr. Üyesi Abdulkadir BİLİR'e teşekkür ederim.

Bu tezin histopatolojik değerlendirmelerine, yoğun çalışma temposuna rağmen özveri ile katkıda bulunan Dr. Öğr. Üyesi Fatma FIRAT'a teşekkür ederim.

Asistan arkadaşlarım; Lokman KIRAN'a, Emrah YILMAZ'a, Akın CENGİZ'e, Kamil Anıl KILINÇ'a, Turan ÇAYIR'a, Mehmet Çağlar KARACA'ya servis ve ameliyathane hemşirelerine, teşekkür ederim.

Beyin ve Sinir Cerrahisini öğrenirken ve hayatımın her aşamasında maddi ve manevi varlıklarını her zaman hissettiğim anneme, babama, tüm aileme teşekkür ederim.

Hayatımın anlamı ve hayatın tüm zorluklarını sevgisiyle aştığım değerli eşim Zerrin ÇOBAN'a ve enerji kaynağı oğlum Ayaz Demir ÇOBAN'a teşekkür ederim.

Dr. Necmettin ÇOBAN
Afyonkarahisar, 2020

III. ÖZET

ERKEN TAVUK EMBRİYOLARINDA METİLPREDNİZOLON’UN ORTA HAT KAPANMASINA ETKİSİ

Dr.Necmettin ÇOBAN

Amaç: Bu çalışmada nöroşirürji kliniklerinde kortikosteroid bir ajan olarak geniş endikasyon alanı olan metilprednizolon’un farklı dozlarda civciv embriyolarında orta hat kapanmasına etkisini göstermeyi amaçladık.

Yöntem: Bu çalışma Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hastanesi Anatomi ve Histoloji laboratuvarında yapılmıştır. Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu’nun 06.05.2020 tarihli 49533702/257 sayılı kararı ile gerçekleştirildi. 100 adet White Leghorn cinsi yumurtalar kullanılarak 4 grup oluşturuldu (n=25). Farklı dozlarda metilprednizolon, subblastodermik alana enjekte edildi. Kontrol grubuna herhangi bir ajan verilmedi. Embriyolar 72 saat tespit solüsyonunda bekletildikten sonra polilizin kaplı lamlara alındı. Uygun prosedürde hazırlanan kesitler AgNOR boyamasına tabi tutuldu. Numuneler, bir görüntü analiz sistemi kullanılarak ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Örnek başına 25 nükleer AgNOR protein görüntüsü değerlendirildi. Çıkan sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Gruplar değerlendirildiğinde metilprednizolon’un artan dozlarda uygulanması ile embriyolarda orta hat kapanma defektinin arttığı gözlemlendi.

Sonuç: Metilprednizolon’un civciv embriyolarında orta hat kusurlarına yol açtığı düşünülmektedir. Ancak ileri araştırma önerilir

Anahtar Kelimeler: Metilprednizolon, Nöral Tüp Defekti, Civciv Embriyosu

İletişim: drnecmettincoban@gmail.com

IV. ABSTRACT

EFFECT OF METILPREDNISOLONE ON MIDDLE LINE CLOSURE IN EARLY CHICKEN EMBRYOS

Dr. Necmettin COBAN

Objective: In this study, we aimed to show the effect of methylprednisolone, which has a wide indication as a corticosteroid agent in neurosurgery clinics, on midline closure in chick embryos at different doses.

Method: This study was conducted in the Anatomy and Histology Laboratory of Afyonkarahisar Health Sciences University Hospital. It was carried out with the decision of Afyon Kocatepe University Animal Ethics Committee dated 06.05.2020 and numbered 49533702/257. 4 groups were formed by using 100 White Leghorn eggs (n = 25). Different doses of methylprednisolone were injected into the subblastodermic area. No agent was given to the control group. Embryos were kept in fixation solution for 72 hours and then placed on polylysine coated slides. Sections prepared in the appropriate procedure were subjected to AgNOR staining. The samples were evaluated under a light microscope using an image analysis system. 25 nuclear AgNOR protein images were evaluated per sample. The results were evaluated statistically.

Results: When the groups were evaluated, it was observed that the midline closure defect increased in embryos with increasing doses of methylprednisolone.

Conclusion: Methylprednisolone is thought to cause midline defects in chick embryos. However, further research is recommended

Keywords: Methylprednisolone, Neural Tube Defect, Chick Embryo

Contact: drnecmettincoban@gmail.com

V. SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
HE	: Hematoksilen-Eozin
NTD	: Nöral Tüp Defekti
SPF	: Özel Patojen Bulunmayan (specific patogen free)
SSS	: Santral Sinir Sistemi
MPL	: Metil Prednizolon
GR	: Glukokortikoid Reseptörü
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences
AgNOR	: Silver stained nucleolar organizer region
TAA	: Toplam AgNOR Alanı
NA	: Nükleer Alan
ACTH	: Adrenokortikotropik hormon
PCP	: Planar Cell Polarity
BMP	: Bone Morphogenic Protein
DLHP	: Dorsolateral Hinge Points
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
GABA	: Gamma Amino Butirik asit
µm	: Mikrometre
MMP	: Matriks Metalloproteinaz

VI. TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Nöral Tüp Kapanma Defektleri(Disrafizm)

Tablo 2.2. Nöral Tüp Yapısal Defekti

Tablo 3.1. Deneyde kullanılacak kimyasal/biyolojik maddeler ve farmakolojik ajanlar

Tablo 3.2 Doku hazırlama metodu

Tablo 3.3 H&E Boyama Yöntemi

Tablo 3.4 Ajan Doz Veriliş yolu, Hacim, Veriliş sıklığı ve Etki süresi

Tablo 4.1 İstatistiksel Analiz

VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. 18 Günlük embriyonun arkadan görünüşü B. 20. Günde dorsal görünüm

Şekil 2.2. Nrlasyonun elektron mikroskopisindeki görünümü

Şekil 2.3. İnsan embriyosunun nöral katlantılarının birleşimi

Şekil 2.4. Metilprednizolon Sodyum Süksinat kimyasal yapısı



VIII. RESİM LİSTESİ

- Resim 2.1.** Anensefali
- Resim 2.2** Ensefalosel
- Resim 2.3** Spina Bifida
- Resim 2.4** Hamburger ve Hamilton civciv embriyo gelişim evrelemesi
- Resim 3.1** Hamilton Enjektörü
- Resim 3.2** Çalışmada Kullanılan El Aletleri
- Resim 3.3** İnkübatör
- Resim 3.4** Numunelerin İnkübatöre Yerleştirilmesi
- Resim 3.5** Sterilizasyonda Kullanılan Maddeler
- Resim 3.6** Hamilton mikroenjektör yardımı ile subblastoderm alana enjeksiyon işlemi
- Resim 3.7** Mikroskop
- Resim 4.1** Kontrol Grubundan Embriyo Görüntüsü
- Resim 4.2.A** Düşük Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü
- Resim 4.2.B** Düşük Doz Grubundan Embriyo (NT Açık H&E Görüntüsü)
- Resim 4.2.C** Düşük Doz Grubundan Embriyo (NT Kapalı H&E Görüntüsü)
- Resim 4.3.A** Orta Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü
- Resim 4.3.B** Orta Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü (NT Açık H&E Görüntüsü)
- Resim 4.3.C** Orta Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü (NT Kapalı H&E Görüntüsü)
- Resim 4.4.A** Yüksek Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü
- Resim 4.4.B** Yüksek Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü (NT Açık H&E Görüntüsü)
- Resim 4.4.C** Yüksek Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü (NT Kapalı H&E Görüntüsü)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nöral Tüp Defekti (NTD) embriyonun gelişim sürecinde nöroaksisin herhangi bir bölümünün kapanmasında oluşan yetersizliktir. Embriyonal dönemde kayıplara, fetal, intrauterin veya doğum sonrası dönemlerde ölümlere neden olabilen, canlı doğan bebeklerde ise ekonomik, medikal ve sosyokültürel olarak ciddi sorunlara yol açan konjenital bir hastalıktır(1).

Genetik zeminde yatkınlığın olması ve çeşitli çevresel etkilere maruz kalma nöral tüp gelişiminde ciddi rol oynamaktadır. Nöral tüp defekti ortalama 6/10000 gebelikte görülür. Nöral tüp defektlerinden en yaygın görülenleri spina bifida ve anensefalidir (2). Nöral tüp defektine yenidoğanlarda yaklaşık %3-5 oranında rastlanılmaktadır ve nöral tüp defektleri (NTD) yenidoğan defektlerine bağlı ölümlerinin %7 sine neden olmaktadır (3).

Metilprednizolon (MPL), plazma yarılanma ömrüne göre orta etkili kortikosteroidtir. Kortikosteroidler, antienflamatuvar, antiallerjik ve immunsupresif etkileri nedeniyle oldukça yaygın kullanılan, adrenal bezin korteksi tarafından salgılanan steroid yapılı hormonlar ve sentezle elde edilen aynı yapıdaki analoglardır (4),(5).

Kortikosteroidlerin salınımını adrenokortikotropik hormon (ACTH) düzenlemektedir (4),(5). Metilprednizolon'un FDA'ya (Food and Drug Administration) göre gebelik kategorisi C (5) olmasına karşın literatür araştırmalarında gelişimsel anomalilerin gözlemlendiği bilgisine ulaşılmamıştır. C kategorisindeki ilaçlarda, yapılan deney hayvanları çalışmalarıyla fetüs üzerinde bir yan etki olduğu gösterilmiş ve insanlarda yeterli, iyi ve kontrollü çalışmalar yapılmamıştır. Bu doğrultuda çalışma teratojen etkenlerin norulasyon sürecine etkilerinin kolayca incelenemediği, ilaçların rahatlıkla verilebildiği, ucuz ve uygun bir model olan civciv embriyo modeli üzerinde yapılacaktır.

Bu çalışmada metilprednizolon'un cıvcıv embriolarında nöral tüp orta hat kapanmasına olan etkilerini morfolojik ve histolojik olarak inceleyerek ortaya koymayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nöral Tüp Defekti

Nöral tüp defekti (NTD), yaklaşık olarak 6/10000 sıklıkta görülen konjenital bir hastalıktır. Nöral tüp, embriyo gelişiminin ilk 28 gününde oluşur ve kapanması tamamlanır (2). Emriyogenez sürecinde nöroaksisin herhangi bir bölümünün kapanmasında oluşan yetersizlik, nöral tüp defekti olarak karşımıza çıkar. Kraniumdan sakral bölgeye kadar herhangi bir segmentte oluşabilir. Lezyonun seviyesine göre de bazı durumlarda mortal seyrederken bazen de kalıcı defisitlere ve çok farklı nörolojik disfonksiyonlara neden olabilir. Nöral tüp defektinin etiyolojisinde genetik faktörlerden ve ileri anne yaşı, multiparite, düşük sosyoekonomik düzey gibi çok çeşitli çevresel faktörler vardır (6).

Tablo 2.1. Nöral Tüp Kapanma Defektleri(Disrafizm) (6).

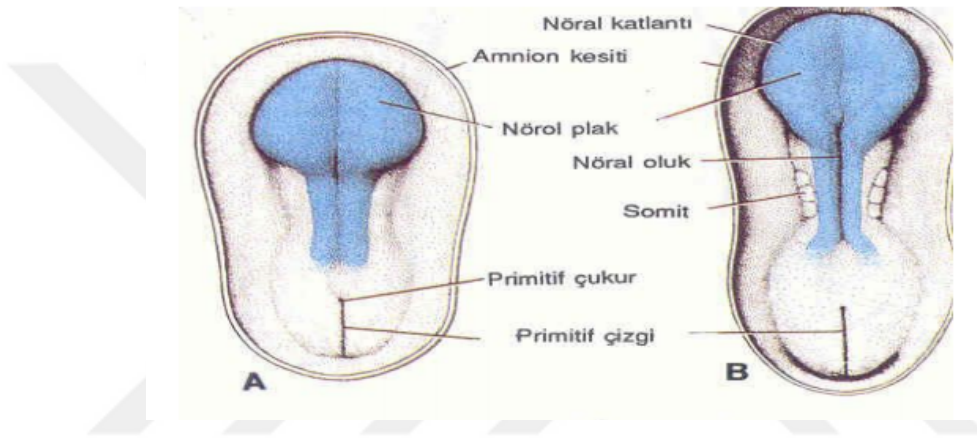
1.Nöral Tüp Kapanma Defekti
Anensefali
Ensefalosel
Spina Bifida Aperta
Meningosel, Meningomiyelosel, Lipomeningomiyelosel, Miyeloşizis...
Spina Bifida Okkulta
Nöroenterik kist, Lumbosakral lipom, Spinal dermal sinüs

Tablo 2.2 Nöral Tüp Yapısal Defekti (6).

2.Nöral Tüp Yapısal Defekti
Chiari Tip 1 malformasyonu
Ensefalosel (Anterior, posterior ve bazal)
İnensefali
Ayrık Omurilik sendromu

2.2. Nöral Tüpün Kapanması

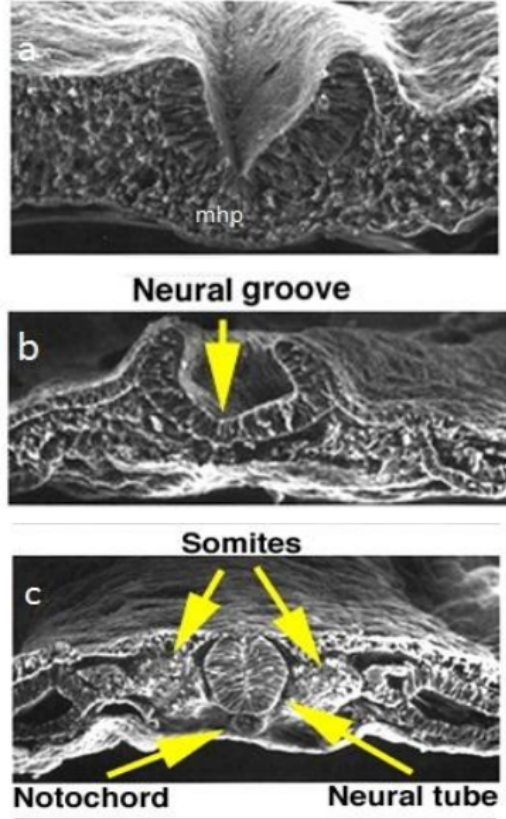
Santral sinir sistemi embriyogenezinin 21. günün başlarında, terlik şeklinde nöral plak halinde belirir. Oluşan bu plak primitif çukurun önündeki mid-dorsal alanda yer almaktadır. Nöral plağın lateral kenarları yukarı doğru kabarır ve nöral katlantıları oluşturur (6).



Şekil 2.1. 18 Günlük embriyonun arkadan görünüşü A. 20. Günde dorsal görünüm B. (6).

Gelişim devam eder ve nöral katlantılar belirginleştikten sonra orta hatta doğru yaklaşarak kaudal ve kranial yönde ilerler ve sonrasında nöral tüpü oluştururlar. Kranial oluk anterior nöropor ismini alır ve 25. günde kapanır. Kaudal nöropor ise 2 gün sonrasında kapanır. Her iki kapanma nöral tüpte vasküler ağın kurulmasıyla tamamlanmış olur. Nöral tüpün belirginleşmesi ile beyin ve omurilik oluşur. Nöral tüpün lümeni beyinde ventikül sistemine omurilikte ise santal kanala dönüşür (7). Nöral oluğun lateralindeki bölümler ise nöral kristayı oluşturan bir hücre grubu şeklinde migrasyon yaparak periferik sinir sisteminin büyük bir kısmını yaparlar (8).

Kapanmış olan nöral tüpün duvarları, nöroepitelyal hücrelerden meydana gelirler ve bu hücreler duvan boyunca uzanarak birbirleriyle lümendeki bağlantı birimleri ile bağlantı kurarlar ve hızla bölünmeye başlarlar. Bu bölünme ve çoğalma sonrasında nöroepitelyal katmanı oluştururlar (6).

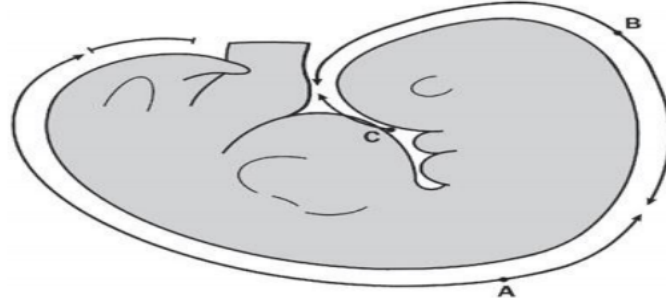


Şekil 2.2 Nörülasyonun elektron mikroskopisindeki görünümü (9).

Nöral tüpün kapanması için gerekli olan bir takım sinyal yolakaları vardır. Bu yolaklardan; kapanmanın başlama sinyalini oluşturan planar cell polarity sinyali (PCP), dorsolateral hinge points (DLHP) oluşumunu engelleme yoluyla oluşan sonic hedgehog sinyali (Shh), DLHP'lerin önlenmesi için gereken bone morfojenic protein(BMP) sinyali, nörogenezisin düzenlenmesi yoluyla notch sinyali, retinoid sinyali ve protein-kinaz C yoluyla proteinlerin fosforilasyonu ile oluşan inozitol metabolizmasıdır (10).

Nöral tüpün kapanması, nöral katlantının dorsal kenarlardan birbirlerine yaklaşması ve temas bölgelerinde apoptozla birlikte epitelyal çökme ve nöroepitelyumun birleşmesini içermektedir. Shh ve nöral plak orta hat hücrelerinden eksprese olarak Gli1, Gli2, Gli3 ün nöral katlantının füzyon sürecini kontrol eden mekanizmalardır. Gli1 hücrelerin birleşmesini sağlar, ön beynin nöronal farklılaşmasını uyarır ve Shh sinyalinde görev alır. Shh Gli2 transkripsiyonunu baskılar. Gli 3 ve Shh de diğerlerini engeller. Ventral spinal nöronların oluşumu Gli1 ve Gli2 tarafından indüklenir. Bu mekanizmalar ile Gli proteinler hem pozisyonel bilgiyi hem de santral sinir sistemindeki nöronal farklılaşmayı gerçekleştirmiş olurlar (11). Ayrıca nöral tüpün kapanması için sitoskeletal proteinler, nörogenezis ile ilgili proteinler, hücre dışı ve hücre içi matrik geçiş gibi kritik fonksiyonları olan proteinler de vardır (10).

Nöral tüpün kapanmasına dair geçerliliği halen devam eden teorilerden birisi olarak Kyoto toplantısında, nöral katlantıların birleşiminin 3 farklı başlangıç noktası olduğu belirtilmiştir (11).



Şekil 2.3. İnsan embriyosunun nöral katlantılarının birleşimi (11).

2.2.1 Primer Nörulasyon

Primer nörulasyon süreci, nöral plağın düz yapıdan silindirik bir şekildeki nöral tüpe dönüşmesini içeren süreç olarak tanımlanmaktadır. Santral sinir sistemini oluşturan yapılar, embriyonun dorsal kısmında bulunan ektodermin orta kısmındaki amorf yapıda olan hücrelerin farklılaşarak plak şeklini alan bir dokudan oluşurlar (12). Altta yatan notokord ve prekordal mezodermin indüklemesiyle nöral plak oluşur (13),(14). Nöral plak oluşumu esnasında ilkin oluşan alanlardan önbeyin, orta beyin ile arka beyin rostral kısmı oluşur. Diğer kısımdan ise arka beyin geri kalan kısmı ve spinal kord gelişir. Daha sonra nöral plak şekillenmeye başlar ve konfigürasyonu değişerek longitudinal ekseninde uzar, transvers ekseninde ise daralma meydana gelir (12). Epitel hücrelerin sayısında ve boylarında artış meydana gelir (15),(16). Daha sonraki aşamada ise dayanak noktalarının şekillenmesi, nöral duvarların yükselmesi ve nöral katlantıların birleşmesi ile nöral plağın bükülme süreci başlar. Nöral plağın V şeklinde çökmesi sonrası dayanak noktaları şekillenir. Medyal nöral plak hücreler kısalır ve altta yatan notokord reaksiyonel olarak kama şekli alır (17),(18),(19). Sonraki aşamada lateral nöral plak nöral yarığın duvarlarını oluşturur ve bu aşama emplyasyon aşaması olarak tariflenir (16),(20). Nöral duvarın altında uzanan mezodermin genişlemesi emplyasyonda etkilir (21),(22). Sonrasında nöral katlantı medyal olarak bükülür. Nöral yarık nöral duvarların dorsal uzantılarını kaplar. Beyin ve kaudal spinal kordun gelişeceği bölgede dayanak noktaları, her iki nöral duvar dorsolateral pozisyonunda yükselmeye başlar. Dorsolateral dayanak noktalarının şekillenmesi sonucunda nöral yarığın mediale bükülmesi sağlanmış (23),(24). Nöral tüpün çatısı, nöral krest ve üzerindeki epitelyumun şekillenmesiyle primer nörulasyonun son aşaması olan nöral yarığın kapanması sağlanmış olur. Nöroepitelyal hücrelerden salgılanan adhezyon molekülleri sayesinde nöral katlantıların birbirine yaklaştığında yapışması sağlanır ve ardından füzyon olur. Nöral duvarlar paralel olarak dizilir, yapışır ventrale doğru devam ederek lümen oluşumuna izin verirken adhezyon ise dorsalde kalarak füzyon gelişir (25).

2.2.2 Sekonder Nörulasyon

Lomber 1 vertebranın distalinde kalan amorf hücreler, santral sinir sistemi taslağının üst bölümünün füzyonunu primer nörulasyon evresinde tamamlamış olur. Eş zamanlı olarak 28-32. günlerde hücreler şekil kazanmaya başlar ve bu hücre topluluğun içerisinde vakuoller oluşur. Bu vakuoller sonrasında büyüyerek bir araya gelirler ve santral kanalı oluşturarak tamamlanmış üst bölümle birleşirler. Bu kanal oluşum süreci 49. güne kadar devam eder. Meydana gelebilecek sekonder nörulasyon bozuklukları sonucu meningoel, lipomeningoel, diastomiyeli, miyelosistoseel, lipom, dermal sinüs, dermoid veya epidermoid kist gibi kaudal nöral tüp defektleri meydana gelir (26).

2.3. Nöral Tüp Kapanma Defektleri

Nöral tüp gestasyonun 21-28. günlerinde kapanmaya başlar. Bu kapanma süresinde herhangi bir gecikme meydana gelirse, sonucunda nöral tüp kapanma defektleri oluşur. Bu kapanma anomalilerini morfolojik olarak SSS'nin hipoplazisi, agenezisi, hiperplazisi ve sekonder dejenrasyon gibi veya birden çok anomalinin bir arada olması gibi farklı şekillerde ortaya çıkabilir. Sıklık olarak ise yaklaşık 1000 (ölü+canlı doğum) doğumda 12,7 olarak bildirilmektedir (1).

En sık olarak spina bifida oküta, meningoel, miyelomeningoel, ensefaloseel, anensefali, dermal sinüs, gergin kord, sringomiyeli, diastomiyeli ve lipomalardır (1).

2.3.1. Anensefali

Kapanma defekti nöral tüp anteriorunun üst bölgesinde oluşmuştur. Anensefali gestasyonun 2. ve 3. trimesterlerinde ultrasonografik takiplerde defektif kranial

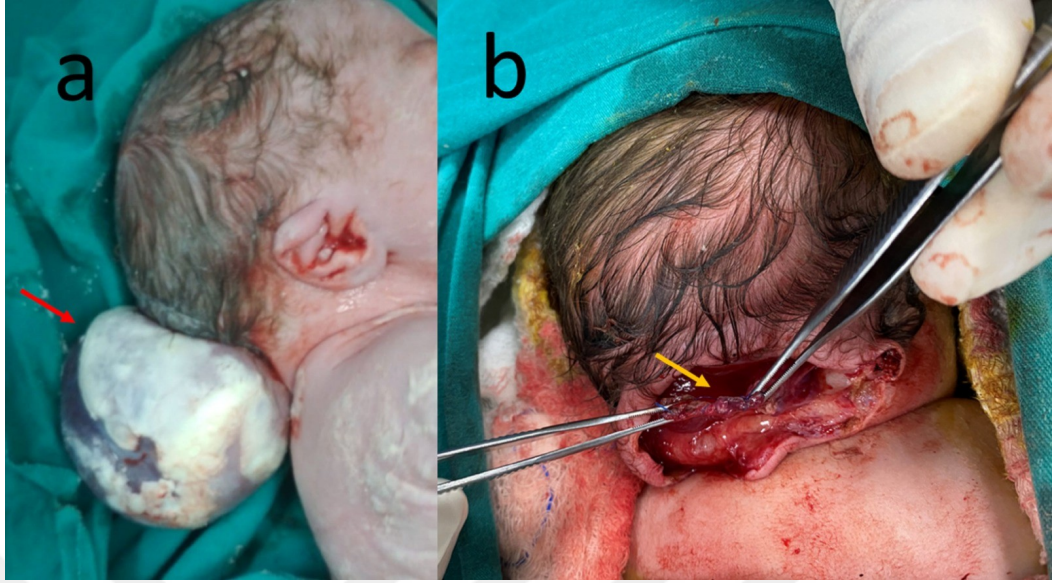
kemikler ve her iki hemisferlerin olmayışı ve gözlerin protrüze olması ile birlikte "kurbağa görüntüsü" olarak tanımlanmaktadır. Nöral tüp defektleri içerisinde prognostik olarak en ağır formunu oluşturur ve ortalama yarısı abortus ile sonuçlanır. Bebeklerin çoğunluğu doğum sonrası günler içerisinde kaybedilir (27).



Resim 2.1.Anensefali (28).

2.3.2. Ensefalosel

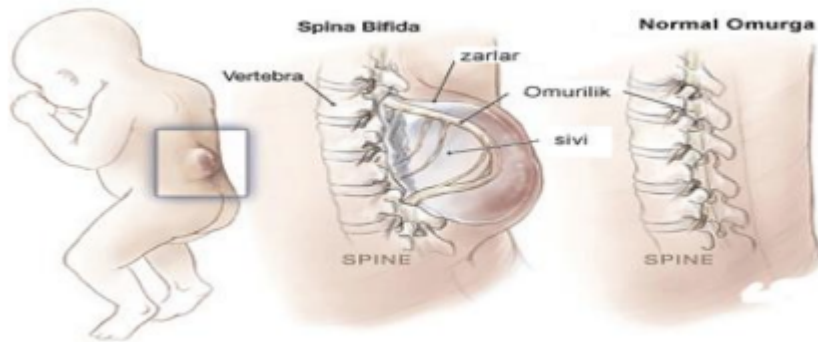
İntrakranial ventriküler yapıların veya subaraknoid boşluktan serbest bağlantılı meninksler ile örtülü beyin dokusunun kraniumdaki kemik defektten dışarıya doğru herniye olmasıdır. Nöral tüp defektleri içerisinde en nadir görülen formdur. Kranial meningeselde sadece meninkslerin herniyasyonu olurken ensefaloselde ise meningeal yapılar ve nöral dokular herniyedir. Sıklıkla oksipital bölgede görülürler. Kese üzerinde yaygın epitelizasyon varsa elektif cerrahi düşünülebilir. Ancak epitelizasyon yoksa, kesede defekt varsa veya BOS sızıntısı varsa, acil cerrahi endikasyon oluşur (29).



Resim 2.2. Ensefalosel (AFSÜ Beyin ve Sinir Cerrahi Kliniği arşivinden alınmıştır.)

2.3.3. Spina Bifida

Orta hat boyunca vertebral arkusların olması gereken füzyonunda yetersizlik olması durumudur. Defektin üzerindeki yumuşak dokularda da spina bifidaya eşlik edebilen malformasyonlar olabileceği gibi nöral veya meningeal yapıların da kanal dışarısında olabildiği anomalilerdir (29).



Resim 2.3. Spina Bifida Oluşumu (<http://www.sbawi.org/what-is-spina-bifida.html>)

Spina bifida anomalileri açık ve kapalı olarak iki grupta değerlendirilir. Dışarıda gözlenebilen bir kese olmaması durumu kapalı spina bifida olarak tarif edilmektedir. Bazen bebeğin cildinde orta hatta izlenen renk değişikliği, nevüs ve lokalize bir alanda kıllanma olabilir. Altta yatan füzyon anomalisi genellikle asemptomatiktir, nadiren de gergin omurilik sendromuna neden olabilir ve değişik şiddette nörolojik defisitlere yol açabilir. Dışarıda gözlenebilen bir kese olması durumuna açık spina bifida denilmektedir (29).

2.3.3.1. Spina Bifida Aperta (Açık Spinal Distrafizm)

Açık spina bifidada dışarıdan gözlenebilen ve içerisinde meningeal yapılar bazen de nöral yapılar bulunan kese mevcuttur. Kese içerisinde sadece meningeal yapılar var ise meningosel, zarla birlikte spinal kord dokusu da var ise meningomiyelosel denilmektedir (29).

a.Meningosel: Meninkslerin, defektif kemik içerisinden kistik herniasyonudur ve içerisinde nöral doku bulunmaz. Meninkslerin duvarını epidermis ve araknoid tabaka oluşturmuştur. Açık spinal distrafizmlerinin yaklaşık %10'unu oluştururlar (1).

b.Meningomiyelosel: Spinal korda ait nöral yapıların ve meninkslerin, defektli kemik arkuslardan dışarıya doğru kistik şekilde protrüze olması halidir. Meningomiyelosel, spina bifidanın en sık gözlenen ve nörolojik defisitlerin en sık gözlendiği çeşididir.

Açık ve kapalı iki tipe ayrılır. Kapalı tipte protrüze olan kistik yapı cilt ile kapalı iken açık tipte ise ciltte de açıklık vardır. Bu nedenle açık tipte kesenin dışarı ile teması olması nedeniyle enfeksiyona zemin hazırlamaktadır (30).

c.Lipomeningomiyelosel: Anormal yağ dokusu spinal distrafizm ile birlikte olabilir ve kemik defektten geçerek nöral dokular etrafınca seyreder (31).

d.Myeloşizis: Nöral yapıların yassılaşmış bir kitlesi şeklinde görülür (7).

2.3.3.2. Spina Bifida Okulta(Kapalı Spinal Distrafizm)

Posterior vertebral arkusların hatalı bir şekilde kapanmasıyla oluşur. Sadece spinöz proçesteki defekkten, her iki pedikül arasındaki kemiğin total yokluğuna kadar geniş bir yelpazede karşımıza çıkabilir. Populasyonda görülme oranı yaklaşık olarak %5-10 oranındadır. Bunların %80 gibi büyük bir kısmı lumbosakral bölgede görülmektedir. Büyük bir kısmı insidental olarak tanı alırlar. Nörolojik defisitler nadir görülürler ve cilt üzerinde anormal kıllanma, nevüs, lipom ve telenjektazi gibi renk değişiklikleri olabilir. Nörolojik defisit olması halinde cerrahi yapılabilir ancak nörolojik defisit yok ise cerrahi tedaviye gerek duyulmaz ve takip edilirler (32).

2.4. Tanı

Gestasyonun 16-18. haftalarında maternal kanda bakılan alfa-fetoprotein düzeyinde anormal artış olması nöral tüp defekti göstergesi olabilir. Ayrıca amniyon sıvısında bakılan alfa-fetoprotein ve asetilkolinesteraz düzeylerinin artmış olması da önemli bir belirteçtir. Ayrıca gestasyonun 12. haftalarında ultrasonografik görüntüleme ile açık spina tanınabilirken kapalı spina bifidada belirgin klinik bulgu görülemeyebilir. Bazı vakalarda orta hatta kıllanma ve gamze oluşumu gözlenebilir. Bu tür vakalarda ise manyetik rezonans görüntülemeler çok yardımcı olmaktadır. Açık spina bifida da kese gözlenebilir ve lezyonun altında paralizi olabilir ve bu vakaların yaklaşık %80'inde hidrosefali ve chiari malformasyonu ile doğar (30).

2.5. Nöral Tüp Defektlerinin Etiyolojisi

Nöral tüp defekti etiyolojisi halen tam olarak aydınlatılmış değildir ve çok farklı etkenlerin rol alabildiği heterojen bir etiyolojiye sahiptir. Nöral tüp içerisindeki kapanma bölgelerinin her birinin farklı bir gen tarafından kontrol edilebileceği öne sürülmüştür. Annenin beslenmesinde yetersizlik, diabetes mellitus, hipertansiyon,

yüksek ateş, obezite, kullandığı bazı farklı ilaçlar ve maruz kaldığı çevresel teratojen faktörlerin nöral tüpün kapanmasında defektlere neden olduğu bilinmektedir (33).

2.5.1. Folik Asit Eksikliği

Bir aminoasit çeşidi olan metiyonin nöral tüpün kapanmasında rol oynar ve NTD oluşumunda metiyonin eksikliği sorumlu tutulmaktadır. Metiyonin ise homosisteinin metiyonin sentetaz enzimi ile tepkimesi sonrası oluşmaktadır. Bu enzimatik reaksiyonda metiltetrahidrofolat ve kofaktör olarak da metil kobalamin rol alır. Bu aşamada folik asit kullanılmasıyla homosisteinin, metiyonine dönüşümünde metil vericisi olarak görev yapan 5-metiltetrahidrofolat sağlanarak anomali oluşumu engellenmektedir (34). Folik asit eksikliği NTD oluşmasına zemin hazırlamaktadır (35).

Folik asit metabolizmasında rol alan MTHFR genindeki polimorfizmlerin, maternal obezite, yetersiz multivitamin alımı, akraba evliliği gibi faktörlerin nöral tüp defekti etyolojisinde etkili olduğu gösterilmiştir (36). İngiltere Tıbbi Araştırmalar Birliği'nin 1991'de yapmış olduğu deneysel çalışmada daha öncesinde NTD'li bebek doğuran kadınlara, perikonsepsiyonel dönemde günde 4 mg. folik asit verilmiş ve tekrar NTD'li gebelik geçirme riskinin %60-72, gebelik öncesi dönemde günde 0,4 mg folik asit verildiğinde, ilk kez ortaya çıkacak NTD'li gebelik geçirme riskinin %50 azaldığı ortaya çıkmıştır. Eritrositlerdeki folat düzeyinin yüksek olması ile NTD riskinde önemli düzeyde azalma olduğu, benzer çalışmalarda %60'ın altına düşmeyen risk azalması olduğu saptanmıştır. Erken gebelik döneminde folik asit verilmesinin nöral tüp defekti prevalansını azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (37).

2.5.2. Annede Yüksek Ateş

Gebeliğin erken dönemlerinde annenin yüksek ısıya maruz kalmasının teratojenik etki oluşturması ve NTD için artan bir risk faktörü olduğu ifade edilmiştir (33).

2.5.3. Annede Diabetes Mellitus

Diabetik annelerde diyabete bağlı konjenital doğum defekti ilişkisi kesin olarak belgelenmiştir. Diabetik annelerin diabet olmayan annelere göre NTD'li bebek doğurma riski 15 kat daha fazla olduğu belirtilmektedir. Bu nedenle diabetik annelerin özellikle ilk trimestırda kan glukoz düzeyi ne kadar iyi kontrol altına alınabilirse konjenital defekt oluşuma riskinin o oranda azalabileceği vurgulanmaktadır (33).

2.5.4. Obezite

Annenin kilosu ile NTD'li bebek sahibi olma riski arasında bir ilişki saptanmıştır. 50-59 kg.ağırlığındaki bir gebenin NTD'li bebek sahibi olma riskine oranla,80-89 kg. ağırlığındaki bir annenin NTD'li bebek sahibi olma riski iki kat daha fazla olduğu, bu oranın 110 kg'ın üstündeki gebelerde ise 4 kat daha fazla risk olduğu saptanmıştır. 79 kg'dan daha az kiloya sahip kadınlara günde 0,4 mg folik asit verildiğinde NTD riski %40 oranında azalırken, aynı miktarda folik asitin 79 kg. ve üzerindeki kadınlarda verildiğinde NTD riskinin herhangi bir oranda azalmadığı görülmüştür (33).

2.5.5. Çevresel Kirleticilerle Temas

Çevresel kirleticilere maruz kalınması durumunda konjenital anomalili bebek sahibi olma riskinin arttığı, özellikle kloroform ve bromodiklormetan gibi maddelerin NTD etyolojisinde rol alabileceği çalışmalarla gösterilmiştir (38). Valproik asit gibi antikonvulsant ilaçların ise gelişmenin dördüncü haftasında gebelere verildiğinde %1-2 oranında nöral tüp defektine neden olduğu bildirimiştir (7).

2.6. NTD'nin Genetiği

Brown ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda insanda NTD'ne neden olabilecek 13q32'de bir kritik bölge tanımlamışlardır.(39). Luo ve arkadaşları ise 13q33-q34'teki delesyonun NTD'ne neden olduğunu göstermişlerdir. Buna rağmen bu genlerde hastalıkla ilişkili bir mutasyon tanımlanmamıştır (40).

13q ve r(13) delesyonunun spina bifida, ensefalosel, anensefali, atelensefali, eksensefali ve aprosencefali ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Schmid ve arkadaşları, 33 haftalık gebelikte amniyosentezde anensefali, limb deformiteleri olan bir fetüste halkasal koromozom 13'ün prenatal tanısını göstermişlerdir (41).

Rudelli ve arkadaşları da yine 18 haftalık gebelikte anensefali, ekzensefali, limb deformiteleri ve ürogenital defektleri olan fetüslerin 13.koromozomlarında delesyon olduğunu belirtmişlerdir (40).

Benn ve arkadaşları,20 haftalık gebelikte anensefali, kapalı anüs, sindaktili ve kalp defektleri olan bir fetüste halkasal kromozom 13 ün prenatal teşhisini yapmışlardır. Palmer ve arkadaşları 18 haftalık gebelikte anensefalisi olan bir fetüste halkasal koromozom 13 tesbit etmişlerdir. Brown ve arkadaşları,25 haftalık gebelikte ensefalosel, mikrosefali ve bilateral başparmak yokluğu olan fetüste amniosentezde 13q kromozom delesyonunu göstermişlerdir. Chen ve arkadaşları 20 haftalık gebelikte ciddi gelişme geriliği, oksipital anensefali ve kardiomegali olan bir fetüste 13q delesyonunu göstermişler (42).

GR sinyali ile bone morphogenetic protein (BMP) ve matriks metalloproteinaz-13 (MMP-13) ekspresyonunun bağlantısının; zigotik kortikosteroidlerin embriyogenezi etkileyebileceğini göstermişlerdir. (43).

Yine Chen ve arkadaşları 23 haftalık gebelikte gelişim geriliği, ve anensefalisi olan bir fetüste mozaik halka kromozom 13'ü rapor etmişler ve moleküler genetik analizlerin temelinde 13q32 üzerinde ZIC2 geninin NTD ile ilişkili oluşunu göstermişlerdir. ZIC2 geninin insan holoprosensefaliden sorumlu olduğu bilinmektedir. ZIC2 ile NTD'nin riskleri arasında bir ilişki için destekleyici bulgular gösterilememiştir. 13q32 üzerindeki insan ZIC5 geninin NTD'den sorumlu olası gen olabileceği söylenmiştir (42).

Inoue ve arkadaşları, ZIC5 geninin farelerde nöral tüp dokusunun gelişimi için gerekli olduğu belirtilmiştir (44). İnsanlarda ZIC genlerindeki mutasyonlar Dandy-Walker malformasyonları, holoprosensefali, NTD ve heterotaksiyi de içeren farklı konjenital malformasyonlara neden olur (45).

ZIC gen ailesinin fenotipik etkileri santral sinir sistemi dışında bazı sistemlerde de karşımıza çıkmaktadır. ZIC3 genindeki mutasyonlar ölümcül defektlere, konjenital kalp hastalıklarına ve nöral tüp defektlerine neden olmaktadır. İnsanda ZIC3'teki mutasyonlar da NTD' neden olurken yine bu gendeki mutasyonlar heterotaksiye de neden olmaktadır (45). ZIC5 geninin ise nöral tüp kapanmasında ve nöral krest ayrımının oluşmasında rol oynadığı mutant fare deneylerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Yine ZIC5 geninin Xenopus türlerinde nöral krest oluşumunu uyardığı belirtilmiştir ZIC5 yetersizliği farelerde nöral tüp defektlerini içeren pek çok anomalilere ve hipoplazi gibi kraniofasial anomalilere neden olur (46).

2.7. Cıvciv Embriyosunda Embriyogenez

Embriyo döneminden cıvciv gelişimine kadar 46 evre bulunur ve embriyo gelişimi çeşitli evreleri içerir (47).

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

Evre-2 (Başlangıç çizgisi): İnkubasyondan yaklaşık 6-7 saat sonra elde edilir ve geçici bir evredir.

Evre-3 (Ara çizgi): (12-13 saat) İlkel çizgi görülür ve posterior kenardan pellusid merkezine doğru uzanmış, boyuna göre daha geniştir. İlkel oluk henüz oluşmamıştır.

Evre-4 (Tam çizgi): (18-19 saat) İlkel çizgi maksimum uzunluğa ulaşmış, ilkel oluk, ilkel çekirdek ve Hensen's nodu oluşmuştur. Pellusida alanı ve uzunluğu artmış ve armut şeklini almıştır.

Evre-5: (19-22 saat) Hensen's nodunun ön köşesinden öne doğru uzanan, yoğunlaşan mezodermin bir çubuğu şeklinde notokord veya baş oluşumu görülmeye başlar, ancak başa ait katlantı henüz görülmemektedir.

Evre-6: (22-25 saat) Notokorda doğru olan blastodermin katlantısı embriyonun ön ucunda belirginleşmiştir. Somitler görülmeye başlamamıştır. Baş oluğu ve ilk somit çiftinin oluşumu yakın zaman aralığındadır.

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

Evre-8 (Dört somit): (26-29 saat) Nöral katlantılar orta beyin seviyesinde birleşirler. 4 somit vardır ve blastodermin posterior yarısında kan adacıkları görülmeye başlar.

Evre-9 (Yedi somit): (29-33 saat) Primer optik keseler oluşmaya başlar. Kalbin odacıkları birleşmeye başlar. Ortalama 7 somit vardır.

Evre-10 (On somit): (33-38 saat) Somit sayısı 10 dur. 1. Somit dağınık yerleşim gösterir. Bu evreden sonraki diğer evrelerde sayıya dahil edilmez. Kranial katlantının ilk

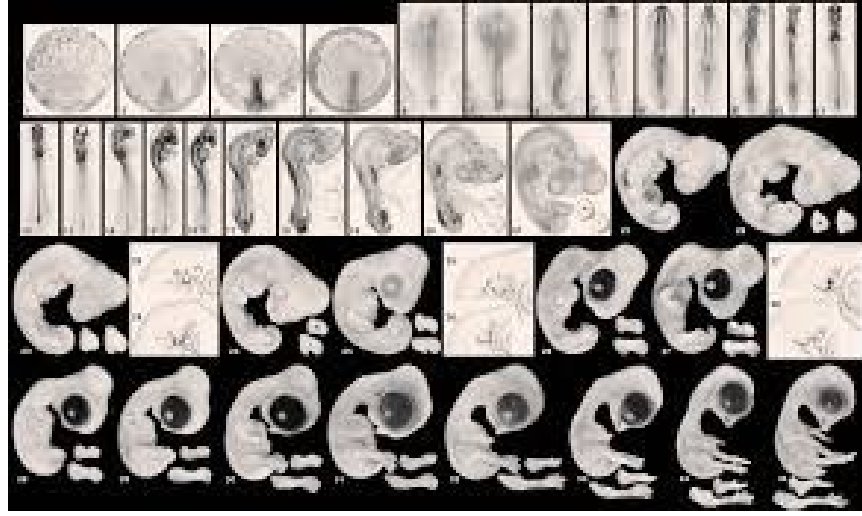
işareti olan üç adet ilk beyin keseciği açık şekilde görülür. Optik kesecikler net değildir. Kalp hafif sağa doğru yerleşimlidir.

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

Evre-12 (Onaltı somit): (45-49 saat) Kafa sola doğru dönmüştür. Ön nöropor kapanmıştır. Telensefalon görülmeye başlar. Primer optik kesecikler ve optik sak iyi şekilde görülür. Kulak çekirdeği derindedir ve geniş şekilde açıktadır. Kalp hafif bir S şeklini alır. Amniyonun baştaki katlantısı ön beyin bölgesinin girişini kaplamıştır. Somit sayısı 16 dır.

Evre-13 (Ondokuz somit): (48-52 saat) Kafa tamamen sola dönmüştür. Kranial ve servikal katlantı geniş bir eğim yapar. Telensefalonun genişlemesi belirgindir. Derindeki kulak çekirdeğinin açıklığı daralır. Hipofize ait bir belirti yoktur. Atrioventriküler kanal daralarak belirginleşir. Amniyonun baştaki katlantısı ön beyni, orta beyni ve arka beynin ön kısmını kaplar. 19 somit vardır.

Evre-14 (Yirmi iki somit): (50-53 saat): Fleksiyon ve rotasyon. Kranial fleksiyon: Ön beyin ve arka beyin aksları bir dik açı oluştururlar. Servikal fleksiyon geniş bir eğim oluşturur. Vücut rotasyonu arkaya doğru 7-9 somit seviyesine kadar devam eder ve bu seviyenin arkasında hafif gövde fleksiyonu oluşur. Visseral ark ayırd edilebilir. Posterior arklar henüz görülmez. Primer optik kesecikler içeriye doğru girer. Lens oluşmaya başlamıştır. Kulak çekirdeğindeki açıklık sınırlanır. Rathke kesesi tanımlanabilir haldedir. Kalbin ventriküler boşlukları oluşur ve atmaya başlar. Amniyon 7-10 somite kadar uzanır. 22 somit vardır.



Resim 2.4. Hamburger ve Hamilton civciv embriyo gelişim evrelemesi (47).

2.8. Metilprednizolon

Kortikosteroidler; antienflamatuvar, antiallerjik ve immunsupresif etkileri nedeniyle oldukça yaygın kullanılan, adrenal korteks tarafından salgılanan steroid yapılı hormonlar ve sentezle elde edilen aynı yapıdaki analoglardır. Gastrointestinal sistemden tam olarak emilirler. Yaklaşık 2-8 saat arasında ise maximum kan düzeylerine ulaşırlar. Karaciğerde aktif metabolitlerine ayrılır ve atılımı böbreklerden sağlanır (4).

Kortikosteroidler ısı şok proteini 90 ile birleşik olan sitoplazma içerisindeki glukokortikoid reseptörüne (GR) bağlanmaktadır. Reseptör aktive olduktan sonra ısı şok proteini 90 ayrılır ve hücre çekirdeğinde özel DNA sekansları ile etkileşir. Enzim ve proteinleri kodlayan mRNA üretimi ve hormonal etkileşimler meydana gelir (4). Metilprednizolon (MPL), plazma yarılanma ömrüne göre orta etkili kortikosteroidtir (4), (5). Diğer bir prototip minerelokortikoid olan hidrokortizon metilprednizolona göre daha az potenttir. Metilprednizolon hidrokortizon'a göre daha uzun etkilidir. Metilprednizolon'un plazma yarı ömrü 2,5 saat iken hidrokortizonun plazma yarı ömrü ise 1,5 saattir (5).

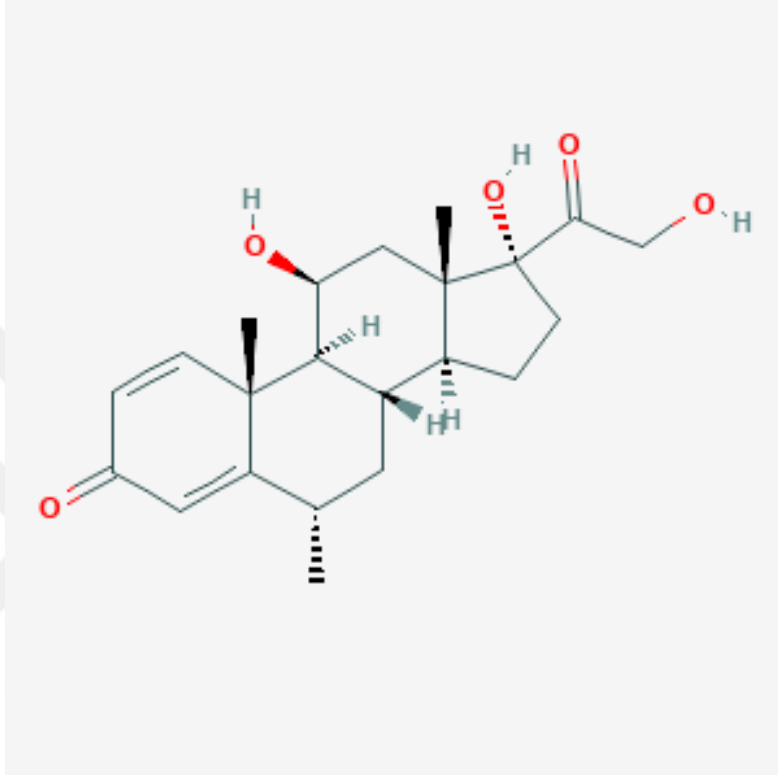
Metilprednizolon %40-60 oranında plazma proteinlerine bağlanarak etki etmektedir. Metilprednizolon'un santral sinir sistem içerisine girişı p-glukopretinler ile kapiller endotel hücrelerden aktif transport ile sağlanır. Plazmada bulunan p-glukopretinlerin taşıma kapasitesi ile metilprednizolonun geniş sistemik etkisi arasında doğru orantı vardır. P-glukopretinlerin taşıma kapasitesi ne kadar fazla ise verilen metilprednizolon'un sistemik geçişı o kadar artar (48),(49),(50).

Metilprednizolon, steroid hormon grubundandır ve çinko içeren nükleer hormon reseptörlerinin süper ailesinin üyelerine bağlanarak etki gösterir. Bu reseptör proteinleri, hedef genlerin promoter bölgesindeki spesifik DNA tanıma sekanslarına direk bağlanır ve bu da transkripsiyon başlama oranını değiştirir (51).

Metilprednizolon'un çeşitli kliniklerde farklı sistemik etkilerinden dolayı yaygın kullanım alanları mevcuttur. Beyin cerrahi ve nöroloji kliniklerinde de özellikle antiödem etkilerinden dolayı peritümöral ödem tedavisinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Son zamanlarda geniş yan etki profilinden dolayı bazı kliniklerde kullanımı azalsa da; sekonder iyileşmeye katkı sağladığı görüşü hakim olan kliniklerde özellikle spinal kord yaralanmalarında kullanılmaya devam edilmektedir. Özellikle spinal kord yaralanmalarında, ilk 8 saatte başlanan yüksek doz metilprednizolon'un antioksidan etkileri, serbest radikallerin inhibisyonu sağlayarak sekonder iyileşmede katkısı olduğu gösterilmiş ve spinal kord ödeminin azaltılması amacıyla yüksek dozlarda kullanılmaktadır. Mevcut tıbbi uygulamalarda Metilprednizolon Suksinat formu kullanılmaktadır (52).

Bazı araştırmacılar glukokortikoid reseptörlerinin (G.R), matriks metaloproteinazlar (MMP'ler) ve kemik morfogenetik proteinler (BMP'ler) olmak üzere çeşitli anahtar gelişim faktörleriyle bağlantılı olduğunu belirtmişler. BMP'ler, bir dizi BMP reseptörüne bağlanarak sinyal veren, hücre içi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olan ve daha sonra hedef gen ekspresyonunu modüle edebilen bir gelişim morfojen grubudur. BMP sinyalleri, dorsoventral modelleme, mezodermal modelleme, somitogenez,

miyogenez, organogenez ve kraniyofasiyal gelişim dahil olmak üzere çok sayıda ana gelişimsel olayla ilişkilendirilmiştir (53).



Şekil 2.4. Metilpredniolon (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 06.05.2020 tarih ve 49533702/257 sayılı onay kararı gerçekleştirildi. Çalışmanın her aşamasında yapılan tüm işlemler etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun olarak gerçekleştirildi. Ayrıca çalışmamız Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 20.TUS.006 Nolu projesi ile desteklendi.

Çalışmanın deney aşaması ve morfolojik analizleri Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda, histopatolojik değerlendirme aşamaları ise Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

3.1. Deney Sırasında Kullanılan Kimyasallar

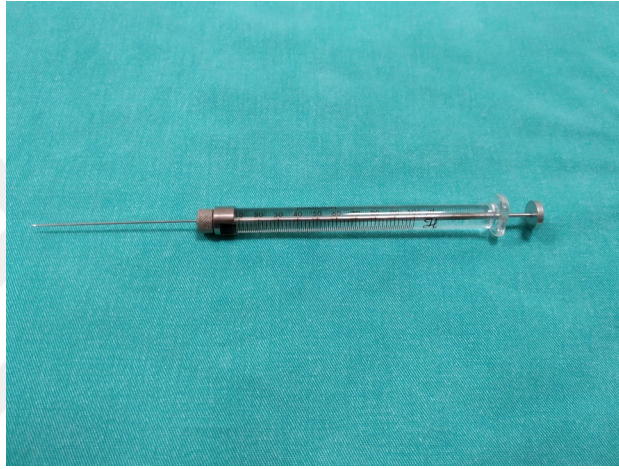
- Ksilen
- Hematoksilen
- Eosin (1 lt'lik ambalaj/şişe/bidon)
- Parafin
- Entellan
- Ethanol %96'lık
- Methanol
- Aseton %99.5
- Metilprednizolon ($C_{22}H_{30}O_5$)

3.2. Deney Hayvanı

Ağırlıkları 65 ± 5 gr arasında 100 adet White Leghorn cinsi, fertil ve 0 günlük SPF (specific patogen free) yumurtalar kullanıldı. Bu özel patojen bulunmayan yumurtalar, İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edildi.

3.3. Laboratuvar Koşulları

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan inkübatör ve diğer belirtilen malzemeler kullanıldı. İnkübatör dışındaki malzemeler 100 adet 0 günlük – beyaz – fertil, 65 ± 5 gr ağırlığında SPF yumurta, büyük cam kap, petri kutusu, steril şeffaf kaşık, penset, doku makası, gaz tampon, Hamilton enjektörü, flaster ve elde edilen embriyoların saklanması için %10'luk formol dolu cam şişe olarak sıralandı.



Resim 3.1. Hamilton Enjektörü



Resim 3.2 Çalışmada Kullanılan El Aletleri

3.4. İnkübatör

Çalışmamızda Anatomi Laboratuvarındaki mevcut olan ve önceki çalışmalarda da kullanılan, standardizasyonu yapılmış otomatik inkübatör kullanıldı. İnkübatör standardizasyonu $37,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ sabit ortam sıcaklığı ve $\%60 \pm 5$ bağıl nem oranı olarak belirlendi.



Resim 3.3 İnkübatör

3.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

SPF yumurtalar aşağıda belirtilen 4 gruba ayrıldı. Her grupta 25 SPF yumurta yer aldı. SPF yumurtalar için uygun ısı ve nem ($37,5^\circ\text{C}$ 'de $\%70$ nem oranında) koşulları sağlandı ve takip edildi. Çalışmanın 28 ile 30. saatleri arasında döllenen yumurtalar cihazdan çıkarıldı ve steril şartlar altında (Yumurta kabuğu üzerine povidon iyodür ve sonrasında $\%70$ etil alkol dökülerek sterilizasyon sağlandı) steril forcepsler yardımı ile yaklaşık 0,5 cm'lik pencereler açıldı ve embriyo görüldü. Açılan kabuk pencereden Hamilton enjektörü ile yaklaşık 45 derece açı verilerek daha önce hazırlanmış, çalışma prosedüründe belirtilen dozlardaki teratojen ajan Prednol 250 mg/4 ml ampul (Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş.) steril şartlarda serum fizyolojikte çözülerek tüm gruplara 30

mikrolitre subblastodermik enjeksiyon yapıldı. Kontrol grubuna ise herhangi bir ajan enjekte edilmedi. Enjeksiyon sonrası tüm yumurtalardaki delikler steril drape ile kapatıldı ve kapatılan yumurta 180 derece çevrilerek kuluçka makinesine tekrar yerleştirildi.



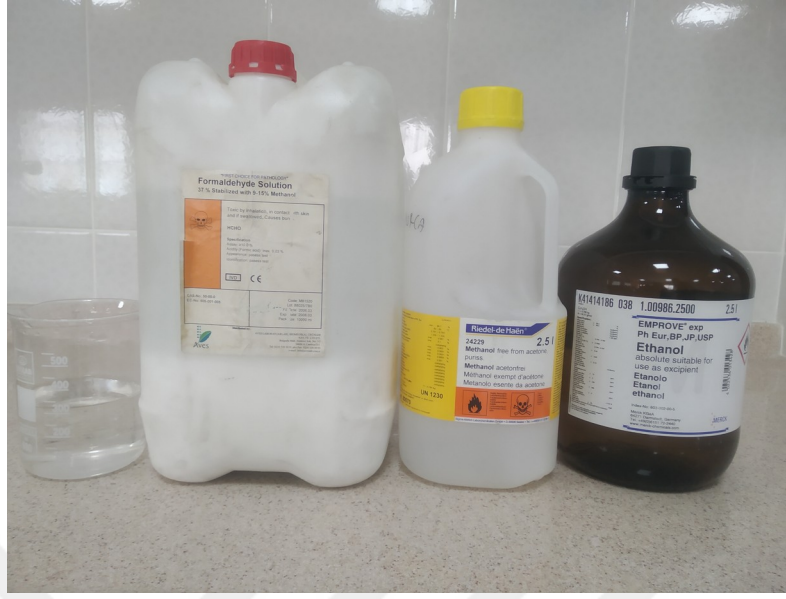
Resim 3.4 Numunelerin İnkübatöre Yerleştirilmesi

Tablo 3.1. Deneyde kullanılacak kimyasal/biyolojik maddeler ve farmakolojik ajanlar

Ajan	Doz	Veriliş yolu	Hacim	Veriliş sıklığı	Etki süresi
Kontrol grubu	-	-	-	-	-
Metilprednizolon	0,3 mg/kg (0,015 mg/yumurta başı)	Hamilton enjektörü ile subblastodermik alana	30 mikrolitre	1 defa	24 saat
Metilprednizolon	3 mg/kg (0,15 mg/yumurta başı)	Hamilton enjektörü ile subblastodermik alana	30 mikrolitre	1 defa	24 saat
Metilprednizolon	30 mg/kg (1,5 mg/yumurta başı)	Hamilton enjektörü ile subblastodermik alana	30 mikrolitre	1 defa	24 saat

3.6. Embriyoların Elde Edilmesi

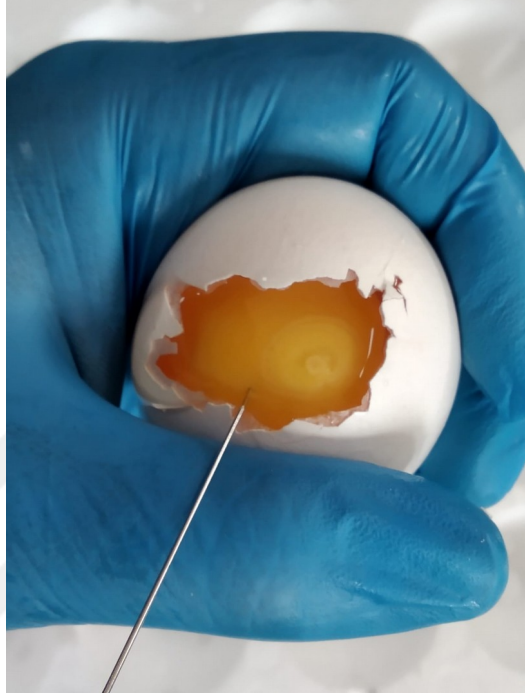
28. saatte gruplara uygun dozlarda metilprednizolon enjekte ettiğimiz döllenmiş yumurtalar, 48. saatte istenilen gelişim düzeyinde en son duruş pozisyonları korunarak inkübatörden alınıp, oda ısısında soğutuldu. Yumurta kabuğu üzerine povidon iyodür ve sonrasında %70 etil alkol dökülerek girişim alanı steril edildi.



Resim 3.5 Sterilizasyonda Kullanılan Maddeler (Formaldehyde Solution CAS No:50-00-0, Methanol free from acetone CAS No:67-56-1, Ethanol CAS No:64-17-5)

Daha sonra inkubatörden alınma pozisyonu korunarak steril alan bozulmadan yumurta kabuğu % 70 lik etil alkol ile dezenfekte ettiğimiz forcepsler yardımı ile yumurtanın tepesinden kırılarak büyük bir pencere açıldı. Açılan pencerenin ardından yumurta zarı (koryoallantoik membran) kaldırıldı. Kaldırılan zarın altında embriyonal disk tesbit edildi. Embriyonal diskin yaklaşık 0,5 cm lateral çevresinden diseksiyon makasıyla farklı kesiler atıldı. Daha sonra tek kullanımlık steril şeffaf kaşık yardımı ile embriyonun altına girilerek embriyonal disk vitellin membrandan ayrıldı. Ayrılan embriyo daha önceden hazırlamış olduğumuz, içerisinde % 0,9'luk NaCl bulunan petri kabına alındı. Petri kabının içerisinde steril forcepsler yardımı ile artık maddeler embriyo etrafından uzaklaştırıldı. Sonrasında embriyo forcepsler yardımı ile bir lam üzerine deforme edilmeden dikkatlice alındı. Lam üzerinde kalmış olan serum fizyolojik ve diğer kalıntılar kulak çubuğu kullanılarak temizlendi. Hamburger-Hamilton Tavuk Embriyo Sınıflandırma Sistemi temel alınarak, ışık mikroskobu yardımıyla 40 büyütme altında embriyolar değerlendirildi. Nöral tüpün açık veya kapalı olması, kranio-kaudal uzunluğu, embriyolojik gelişim olup olmaması ve somit sayıları belirlendi ve herbir grup ayrı ayrı olacak şekilde embriyolar sınıflandırıldı.

Sınıflandırması yapılan embriyolar bekletilmeden histopatolojik inceleme için % 5'lik formol içerisine alınarak tesbit edildi.



Resim 3.6 Hamilton mikroenjektör yardımı ile subblastoderm alana injeksiyon işlemi

3.7. Histolojik Doku Takip Yöntemi

İmmünohistokimyasal boyama için %5 formol içerisine ayrılan embriyolar, 72 saat tespit solüsyonunda bekletildikten sonra fiksatiflerin uzaklaştırılması için distile su ile yıkandı. Yıkandıktan sonra dehidratasyon yapılmak için %50'den %100'e kadar olan dereceli alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra ksilol ile şeffaflandırılarak parafine gömüldü ve bloklama yapıldı.

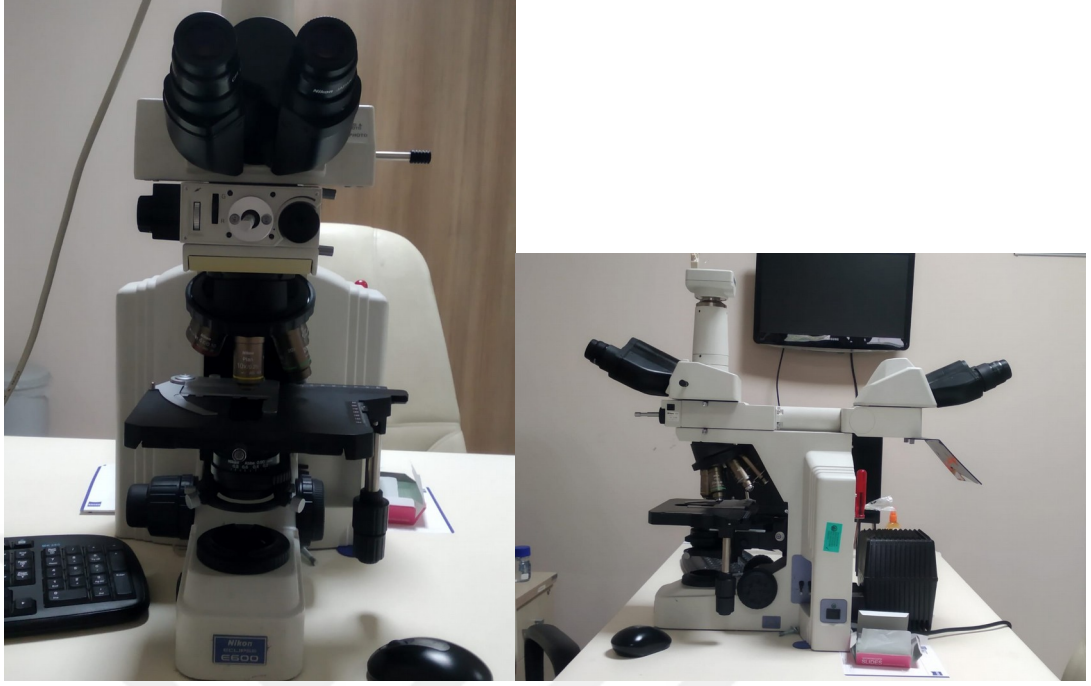
Tablo 3.2. Doku hazırlama metodu

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	%10 Formaldehit	72 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
2	Musluk suyu	1 gece	9	Absolü Alkol	1 saat
3	%50 Alkol	1 saat	10	Ksilen	20 dakika
4	%70 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dakika
5	%80 Alkol	1 saat	12	Ksilen	20 dakika
6	%96 Alkol	1 saat	13	Sıvı parafin (60°C)	1 gece
7	Absolü Alkol	1 saat	14	Bloklama	

Çalışmada kullanılan embriyolar polilizin kaplı lamlara alındı. Hazırlanan lamaların, standart histolojik doku takip yöntemi kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı. Daha sonra lamalar dereceli alkol (%100, %96, %80, %70, %50) serilerinden geçirilip musluk suyunda yıkandı. Genel histolojik yapının belirlenmesi amacıyla kesitler Hematoksilen-Eosin (H&E) ile boyanarak önce artan alkol serilerinden daha sonra şeffaflaştırmak amacıyla 2 kez 30 dakika süreyle ksilolden geçirildi ve sonrasında entellan kullanılarak lamel yardımıyla kapatıldı. Uygulanan H&E boyama teknikleri ayrıntılı şekilde aşağıda verilmiştir.

Tablo 3.3 H&E Boyama Yöntemi

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Ksilen-I	15 dk	12	Akarsu	10 dk
2	Ksilen-II	15 dk	13	%50 Alkol	10 dk
3	Absolü Alkol	10 dk	14	%70 Alkol	10 dk
4	%96 Alkol	10 dk	15	%80 Alkol	10 dk
5	%80 Alkol	10 dk	16	%96 Alkol	10 dk
6	%70 Alkol	10 dk	17	Absolü Alkol	10 dk
7	%50 Alkol	10 dk	18	Absolü Alkol	10 dk
8	Akarsu	10 dk	19	Ksilen-I	15 dk
9	Hematoksilen	7 dk	20	Ksilen-II	15 dk
10	Akarsu	5 dk	21	Kapatma	
11	Eozin	5 dk			



Resim 3.7 Mikroskop (Eclipse E-600, Nikon, Japonya)

Tablo 3.4 Ajan Doz Veriliş yolu, Hacim, Veriliş sıklığı ve Etki süresi

	Ajan-Doz	Veriliş Yolu	Hacim (mikrolitre)	Veriliş Sıklığı	Etki Süresi
Kontrol Grubu	-	-	-	-	48 saat
Grup 1	Metilprednizolon 0,3mg/kg(0,015 mg/yumurta başı)	Subblasto- dermik alan	30 µl	1 defa	24 saat
Grup 2	Metilprednizolon 3 mg/kg(0,15 mg/yumurta başı)	Subblasto- dermik alan	30 µl	1 defa	24 saat
Grup 3	Metilprednizolon 30 mg/kg(1,5 mg/yumurta başı)	Subblasto- dermik alan	30 µl	1 defa	24 saat

3.8 Agnor Boyama Prosedürü

Nükleolus, hücre içindeki ana bileşenlerden birisidir ve nükleusun komponentidir. Nükleus hücrenin çoğalması ve diğer tüm fonksiyonlarda sorumlu olan yapıdır. Nükleolus hücre bölünmesi esnasında kaybolur ve hücre bölündükten sonra 13, 14, 15, 21 ve 22 no'lu kromozomların nükleolus organizatör (satellit sapı) bölgesinden (NOR) tekrar oluşur. Bu bölge ribozomal RNA genlerini içeren DNA sarmallarının bulunduğu bölgedir. Akrosentrik yapıdaki bu kromozomlar non-histon özellik gösterirler. NOR bölgelerinde bulunan proteinler, gümüşle boyanabilir ve AgNOR proteinleri olarak adlandırılmaktadır. AgNOR proteinleri argirofilik yapıda olmaları nedeniyle gümüş boyama işlemi sonrasında siyah renkli noktalar şeklinde görülürler. Proteinlerin dağılımı ve sayılarındaki değişiklikler hücrelerin transkripsiyonel, nükleolar ve proliferatif aktivite derecelerini gösterirler. Yapılan bu çalışmamızda, farklı kliniklerde farklı dozlarda yaygın olarak kullanılabilen ve farklı etki ve yan etkileri olabilen metilprednisolonun nöral tüpün kapanması ve somitler üzerinde yapabileceği etkilerini incelemeyi amaçladık. Kanatlı embriyolarının ilk gelişim evrelerinin, memeli embriyo gelişim evrelerine benzerlik göstermesi nedeniyle çalışmamızda deney hayvanı olarak kanatlı embriyoları seçildi (54),(55),(56).

Elde ettiğimiz embriyo örnekleri %10 nötral formal içinde fikse edildi ve sonrasında histolojik doku takibine alındı. 5 dakika distile suda yıkandıktan sonra artan alkol serisinden geçirildi. 500, 600, 700, 800, 900 ve 2 defa 1000'lik alkollerde 3'er dakika bekletildi. 900'lik alkole 1 damla eozin damlatılarak embriyonun görünür hale gelmesi sağlandı. Ksilenden geçirilen embriyolar parafin içine gömüldü. Somitler ve nöral tüpü içeren 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinize edilip, rehidrate edilen kesitler AgNOR boyamasına tabi tutuldu.

NOR gümüş boyamasının hazırlanması;

İki çözelti gereklidir:

- 1.Çözelti (çözelti A), ultra saf su içinde çözülmüş % 2'lik jelatin çözeltisidir. Daha sonra formik asit ilave edilerek % 1lik jelatin çözeltisi elde edilir
- 2.Çözelti (çözelti B), ultra saf suda % 50 gümüş nitrat çözeltisidir.

Boyama çözeltisi, taze olarak hazırlanır. A çözeltisinden bir hacim, B çözeltisinden iki hacimle birleştirilir ve oda sıcaklığında kesitlerin üzerini tamamen kaplayacak şekilde damlatılarak direk güneş ışığı almayacak şekilde 15-30 dk boyanır. Boyama sonrası çözelti dökülerek kesitler distile suyla yıkanır, 10 dakika% 5 tiyosülfat çözeltisinde tutulduktan sonra kapatılır (57).

Gümüş boyalı numuneler, bir görüntü analiz sistemi (NIS Elements Nikon, Japonya) kullanılarak ışık mikroskobu (Eclipse E-600, Nikon, Japonya) altında değerlendirildi. Örnek başına 25 nükleer AgNOR protein görüntüsü değerlendirildi. Her çekirdek için ortalama AgNOR sayısı ve toplam AgNOR alanı / toplam nükleer alan (TAA / TNA) oranı hesaplandı (57).

4. BULGULAR

Yapılan bu çalışmada toplamda 4 farklı grup oluşturuldu. Artan miktarlarda düşük, orta ve yüksek doz metilprednizolon, subblastodermik alana Hamilton enjektörü ile enjekte edilerek 3 grup, son olarak da kontrol grubu belirlendi. Kontrol grubuna herhangi bir ajan verilmedi. Yumurtaların inkübatöre yerleştirilmesi ve çıkarılması, pencere açma yöntemi, enjeksiyon işlemi, embriyo alınma işlemi ve histolojik incelemeler sırasında oluşan kayıplar nedeniyle düşük doz grubunda 8, orta doz grubunda 9, yüksek doz grubunda 11 ve kontrol grubunda 9 adet yumurta çalışmaya dahil edilememiştir.

AgNOR boyama sonrasında numuneler ışık mikroskobu altında her örnek başına 25 nükleer AgNOR protein görüntüsü değerlendirildi. Her çekirdek için ortalama AgNOR sayısı ve toplam AgNOR alanı / toplam nükleer alan (TAA / NA) oranı hesaplanarak veriler excel programına girildi.

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılarak yapıldı. Nöral tüpün açık/kapalı oluşu, baş-kıç uzunluğu, somit sayısı, ortalama AgNOR sayısı ve TAA/NA oranı parametrik olmayan Kruskal-Wallis ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak analiz edildi. Nöral tüp (açık veya kapalı) ile ilgili veriler ki kare testi ile analiz edildi. Dunn testi post-hoc test olarak kullanıldı ve $p < 0,05$ anlamlı kabul edildi.

Deney gruplarına ait nöral tüp pozisyonlarının, kranio-kaudal uzunluklarının, somit sayılarının, TAA/NA oranlarının, AgNOR sayılarının ortalaması aşağıda alt başlıklar altında gösterilmiştir.

4.1.Kontrol Grubu: Kontrol grubuna herhangi bir ajan enjekte edilmedi. Çalışmaya dahil edilebilen 16 embriyonun tamamında nöral tüpün kapalı olduğu görüldü ve gelişim geriliğine rastlanmadı. Kontrol grubu embriyoları ışık mikroskobu altında makroskobik olarak değerlendirildiğinde kranio-kaudal uzunluğu ortalaması $843,15 \pm 112$ bulundu. Somit sayıları ortalaması $18,87 \pm 1,82$ olarak bulundu. Kontrol grubundaki embriyoların histolojik kesitleri AgNOR boyama yöntemiyle hücre proliferasyonu değerlendirildiğinde TAA/NA oranının ortalaması $0,44 \pm 0,06$ iken AgNOR sayısı ortalaması $5,19 \pm 1,14$ olarak tesbit edildi

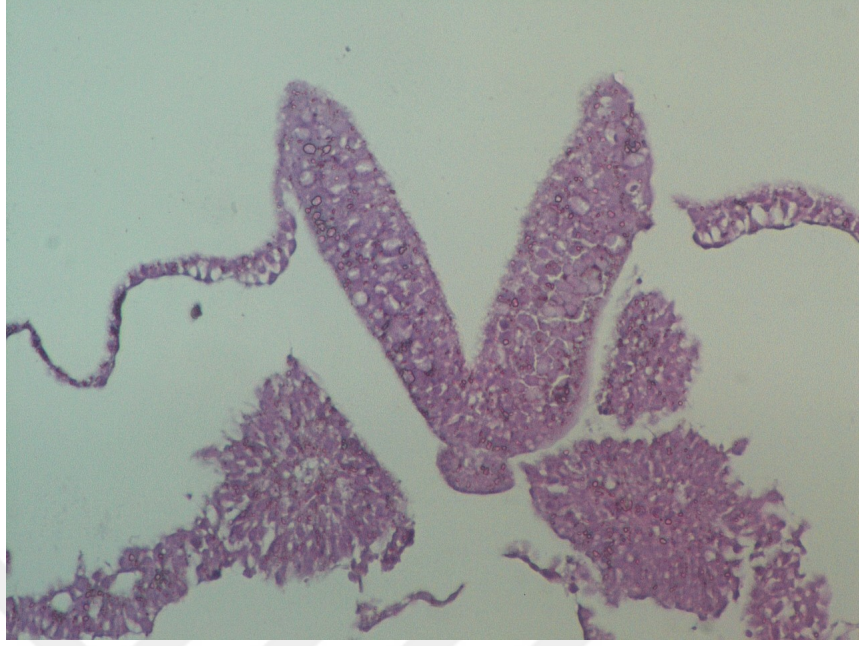
Resim 4.1 Kontrol Grubundan Embriyo Görüntüsü



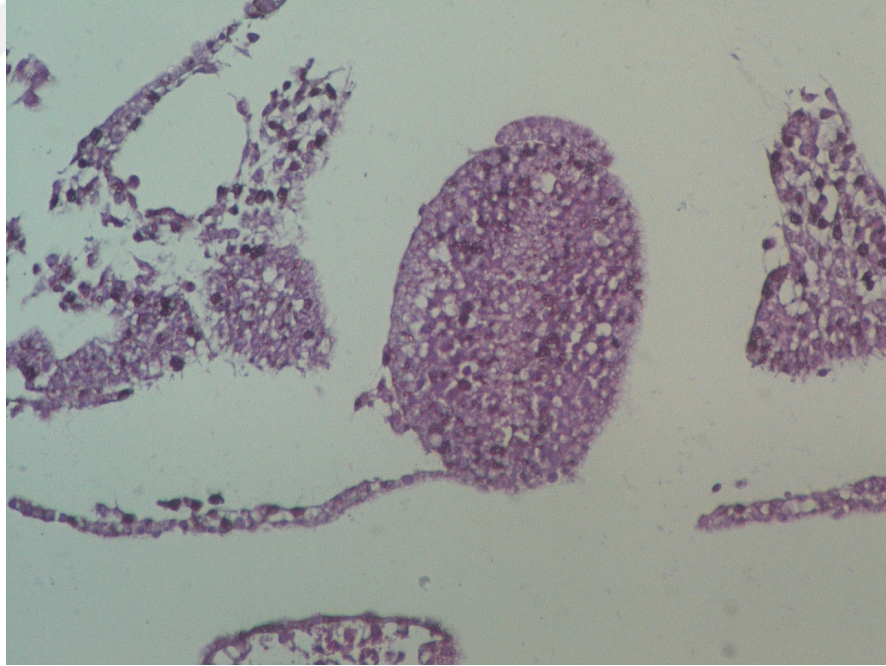
4.2.Grup 1: Düşük doz grupta 0,015 mg/30 mikrolitre metilprednizolon enjeksiyonu sonrasında çalışmaya dahil edilebilen 17 embriyonun 15'inde nöral tüpün açık olduğu (%88,2), 2 embriyoda ise kapalı olduğu görüldü. Düşük doz grubu embriyoları ışık mikroskobu altında makroskobik olarak değerlendirildiğinde kranio-kaudal uzunluğu ortalaması $710,35 \pm 119,17$ bulundu. Somit sayıları ortalaması $17,35 \pm 1,73$ olarak bulundu. Düşük doz grubundaki embriyoların histolojik kesitleri AgNOR boyama yöntemiyle hücre proliferasyonu değerlendirildiğinde TAA/NA oranının ortalaması $0,36 \pm 0,07$ iken AgNOR sayısı ortalaması $4,94 \pm 0,60$ olarak tesbit edildi



Resim 4.2.A. Düşük Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü



Resim 4.2.B. Düşük Doz Grubundan Embriyo (NT Açık H&E Görüntüsü)

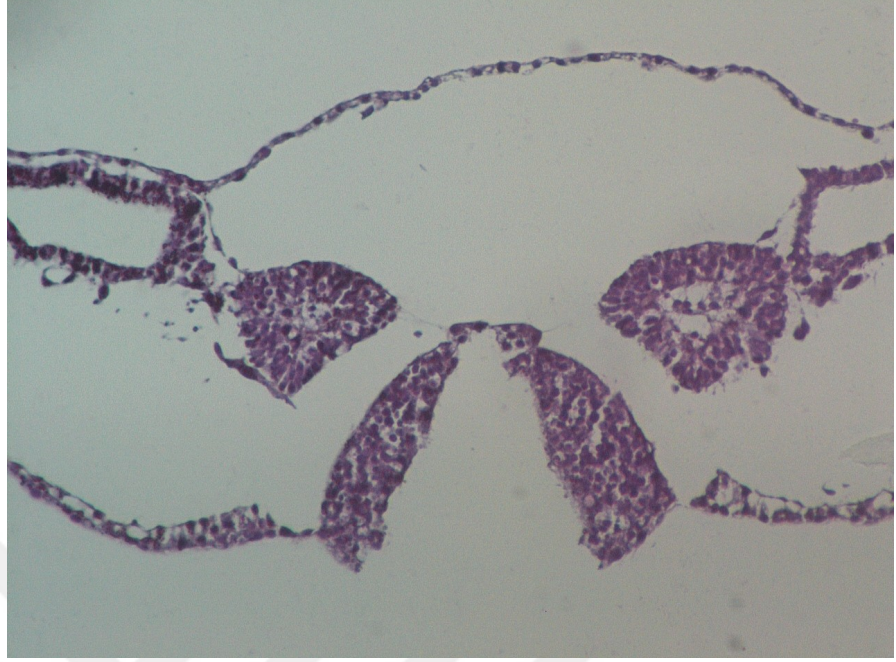


Resim 4.2.C. Düşük Doz Grubundan Embriyo (NT Kapalı H&E Görüntüsü)

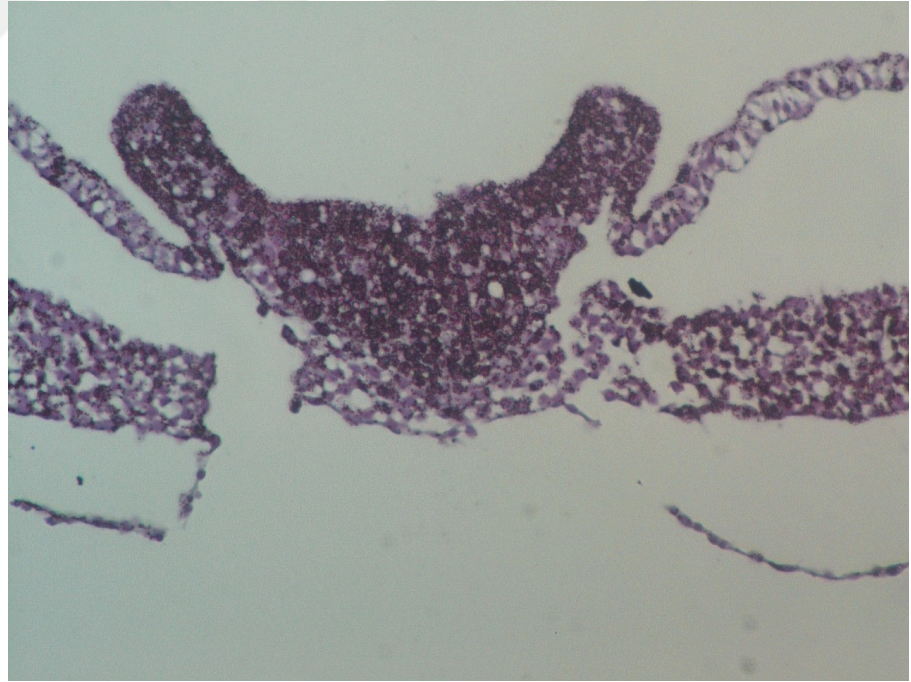
4.3.Grup 2: Orta doz grubunda 0.15 mg/30 mikrolitre metilprednizolon enjeksiyonu sonrasında çalışmaya dahil edilebilen 14 adet embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%87,5), 2 embriyoda ise kapalı olduğu görüldü. Nöral tüpün açık olduğu 1 embriyoda ise gelişim geriliği görüldü. Orta doz grubu embriyoları ışık mikroskobu altında makroskobik olarak değerlendirildiğinde kranio-kaudal uzunluğu ortalaması $673,37 \pm 103,74$ bulundu. Somit sayıları ortalaması $16,87 \pm 2,58$ olarak bulundu. Orta doz grubundaki embriyoların histolojik kesitleri AgNOR boyama yöntemiyle hücre proliferasyonu değerlendirildiğinde TAA/NA oranının ortalaması $0,33 \pm 0,0$ iken AgNOR sayısı ortalaması $4,68 \pm 0,78$ olarak tesbit edildi.



Resim 4.3.A. Orta Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü



Resim 4.3.B. Orta Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü (NT Açık H&E Görüntüsü)

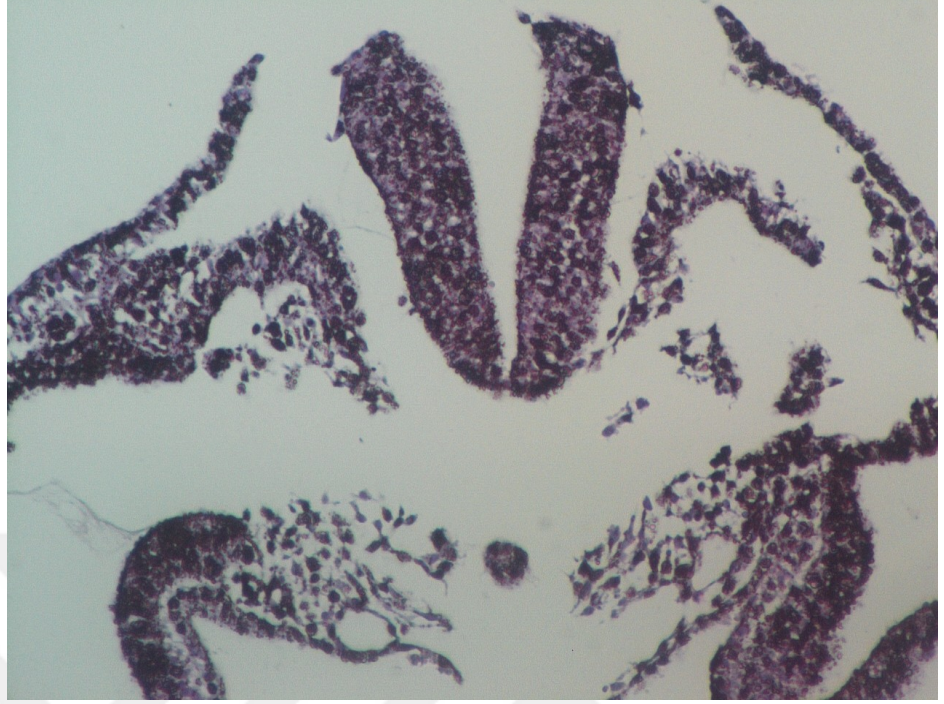


Resim 4.3.C. Orta Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü (NT Kapalı H&E Görüntüsü)

4.4.Grup 3: Yüksek doz grubunda 1,5 mg/30 mikrolitre metilprednizolon enjeksiyonu sonrasında çalışmaya dahil edilebilen 11 adet embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%78,5), 3 embriyoda ise kapalı olduğu görüldü. Nöral tüpün açık olduğu bir embriyoda ise gelişim geriliği olduğu görüldü. Yüksek doz grubu embriyoları ışık mikroskobu altında makroskopik olarak değerlendirildiğinde kranio-kaudal uzunluğu ortalaması $601,37 \pm 94,86$ bulundu. Somit sayıları ortalaması $16,57 \pm 1,34$ olarak bulundu. Yüksek doz grubundaki embriyoların histolojik kesitleri AgNOR boyama yöntemiyle hücre proliferasyonu değerlendirildiğinde TAA/NA oranının ortalaması $0,32 \pm 0,03$ iken AgNOR sayısı ortalaması $4,0 \pm 0,47$ olarak tesbit edildi.



Resim 4.4.A. Yüksek Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü



Resim 4.4.B. Yüksek Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü (NT Açık H&E Görüntüsü)



Resim 4.4.C. Yüksek Doz Grubundan Embriyo Görüntüsü (NT Kapalı H&E Görüntüsü)

İstatistiksel değerlendirme sonucunda kontrol grubu ile diğer gruplar arasında n6ral t6p6n pozisyonu(açık veya kapalı) açısından istatistiksel olarak 6nemli bir farklılık belirlendi ($p<0,001$).

Deney grupları arasında embriyoların kranio-kaudal uzunlukları ortalaması değerlendirildiğinde; kontrol grubu ile d6ř6k doz, orta doz ve y6ksek doz grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar tesbit edildi. Bu farklılıklar doza bağlı olarak kontrol grubundan y6ksek doz grubuna doğru azalan bir eğilim şeklindeydi.

Deney grupları arasındaki embriyoların somit sayıları değerlendirildiğinde kontrol grubu ile y6ksek doz grubu arasında, istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tesbit edildi.

Deney grupları arasındaki embriyoların kesitsel g6r6nt6lemelerinde TAA/NA oranı değerlendirildiğinde kontrol grubu ile orta ve y6ksek doz grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. Bu farklılıklar Agnor TAA/NA ortalamasının kontrol grubundan y6ksek doza doğru azalma eğilimindedir.

Deney grupları arasındaki embriyoların kesitsel g6r6nt6lemelerinde AgNOR sayılarının ortalaması değerlendirildiğinde, kontrol grubu ile y6ksek doz grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma g6r6ld6.

Tablo 4.1. İstatistiksel Analiz

Parametre	Kontrol (n=16)	Grup 1 (n=17)	Grup 2 (n=16)	Grup 3 (n=14)
NT Açık/NT Kapalı/Gelişim Geriliği	0/16/0	15/2/0	13/2/1	10/3/1
Kranio-Kaudal Uzunluğu (μm)	843,15 $\pm$ 112,6	710,35 $\pm$ 119,17 ^a	673,37 $\pm$ 103,74 ^a	601,37 $\pm$ 94,86 ^a
Somit Sayısı	18,87 $\pm$ 1,82	17,35 $\pm$ 1,73	16,87 $\pm$ 2,58	16,57 $\pm$ 1,34 ^a
TAA/NA Oranı	0,44 $\pm$ 0,06	0,36 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,0 ^a	0,32 $\pm$ 0,03 ^a
AgNOR Sayısı	5,19 $\pm$ 1,14	4,94 $\pm$ 0,60	4,68 $\pm$ 0,18	4,0 $\pm$ 0,47 ^a

a; Kruskal Wallis Testi ve Post Hoc Dunn Testi, Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlıdır. p<0,05.

5. TARTIŞMA

Nöral Tüp Defekti embriyonun gelişim sürecinde nöroaksisin herhangi bir bölümünün kapanmasında oluşan yetersizliktir (1).

Embriyonal dönemde kayıplara, fetal, intrauterin veya doğum sonrası dönemlerde ölümlere neden olabilen, canlı doğan bebeklerde ise ekonomik, medikal ve sosyokültürel olarak ciddi sorunlara yol açan konjenital bir hastalıktır. Yaklaşık olarak 6/10000 sıklıkta görülür (2). Lezyonun seviyesine göre bazı durumlarda mortal seyrederken bazen de kalıcı defisitlere ve çok farklı nörolojik fonksiyon bozukluklarına neden olabilir. Nöral yapının herhangi bir segmentinde oluşabileceği için kraniumdan kaudale kadar uzanan geniş bir yelpazesi vardır. Bu nedenle de anensefali gibi mortal durumdan, sakral renk değişikliğine kadar subklinik seyredebilen çok çeşitli ağır ve hafif formları vardır (2).

Nöral tüp defekti etiyolojisi halen tam olarak aydınlatılmış değildir ve çok farklı etkenlerin rol alabildiği heterojen bir etiyolojiye sahiptir. Genetik faktörlerden ve ileri anne yaşı, multiparite, düşük sosyoekonomik düzey gibi çok çeşitli çevresel faktörler etiyolojide rol alırlar. Nöral tüp, embriyo gelişim sürecinin ilk 28 gününde oluşur ve kapanması tamamlanır (3).

Nöral tüp içerisindeki kapanma bölgelerinin her birinin farklı bir gen tarafından kontrol edilebileceği öne sürülmüştür. Nöral tüpün kapanmasının tamamlandığı gebeliğin ilk bir ayı olan kritik dönemde; özellikle folik asit alımındaki yetersizlik, annenin beslenmesinde yetersizlik, diabetes mellitus, hipertansiyon, yüksek ateş, obezite, kullandığı bazı farklı ilaçlar ve maruz kaldığı çevresel teratojen faktörlerin, nöral tüpün kapanmasında defektlere neden olduğu bilinmektedir (33).

Perikonsepsiyonel dönemde folik asit kullanımı, obez anne adayının beden kitle indeksinde azalma, yüksek ateşe maruz kalmama, hipertansiyonun kontrol edilmesinin

nöral tüp defektli çocuk sahibi olma riskini azalttığı birçok çalışmada gösterilmiştir. Yine klorofom ve bromodiklormetan gibi çevresel kirleticilerden korunmanın özellikle valproik asit gibi antikonvulsant ilaçlardan kaçınmanın da çok önemli olduğu çalışmalarda açıkça belirtilmiştir (33).

Nöral tüp defekti genetiğinde ise birçok çalışmada 13. Kromozomda oluşabilecek delesyonu sorumlu tutmuşlardır. Chen ve arkadaşları 13q32 üzerindeki insan ZIC5 geninin NTD'den sorumlu olası gen olabileceği söylenmiştir (42).

Nöral tüp defekti çalışmalarında yıllar içerisinde çok farklı modellemeler kullanılmıştır. Örnek olarak memeli hayvanlar, kanatlı hayvanlar, amfibiler ve bilgisayar ile yapılan modellemeler kullanılmıştır. Tüm bu modellemelerin kendi arasında avantajları ve dezavantajları vardır. Memeli modellerden olan ratlar, komplike ve deney sonucu almak için uzun zaman gerektirirken; amfibi ve kanatlı embriyo modelleri daha basit pratik ve maliyet olarak uygundur. Kanatlı embriyo modelleri, embriyonal gelişimin ilk 28 gününe uyan ve çalışmada kullanılacak ajanların embriyonal gelişim üzerindeki etkilerinin incelenebildiği uygun bir modeldir (58).

Kanatlı embriyolarındaki nörolasyon, diğer canlılardakine benzer şekilde primer nörolasyon ve sekonder nörolasyon olarak iki aşamada gerçekleşir. Primer nörolasyonda beyin ve lomber 1 seviyesinden üst servikale kadar olan nöronal seviyeler oluşur. Kaudal seviyedeki nöropor kapanırken aynı esnada sekonder nörolasyon ortaya çıkar ve medulla spinalisin en uç seviyeleri oluşur. Yine bu evrede nöroepitelyal hücreler grubu belirir ve yapı değiştirerek kanal oluştururlar (26).

Nörolasyondan sonraki önemli basamaklar ise nöral plak oluşması, şekillenmesi sonrasında katlanması ve son olarak büyüme plağının kapanmasıdır. Eğer bu basamaklardan herhangi birinde defekt olursa nöral tüp defekti ile karşımıza çıkabilir. Cıvcıv embriyolarında yapılan çalışmalarda apoptozisin nöral tüp kapanması sürecinde önemli rol aldığı gösterilmiştir (59).

Kortikosteroidler; antiinflamatuvar, antiallerjik ve immunsupresif etkileri gibi geniş etki profilleri olması nedeniyle oldukça yaygın kullanılan, adrenal bezin korteksinden salgılanan steroid yapılı hormonlar ve sentezle elde edilen aynı yapıdaki analoglardır (5).

Büyük oranda karaciğerde az miktarda da diğer dokularda metabolize edilirler. Hücre zarını geçip stoplazmada ve çekirdekte kendilerine özgü resptörlere (GR) bağlanırlar. Glukokortikoidler ve minerolokortikoidler hedef haldıkları hücrelerde proteinlerin kodlanmasında rolü olan genlerin transkripsiyonunu çoğunlukla artırırılar. Parenteral glukokortikoidler suda çözünemedikleri için; süksinat esterlerinin sodyum tuzları suda çözünür özelliği nedeniyle esterleştirilerek kullanılırlar. Çalışmamızda kullandığımız ajan olan metilprednizolon sodyum süksinat da bir sentetik parenteral glukokortikoiddir (5).

Glukokortikoidler merkezi sinir sisteminde genellikle eksitator etki göstermektedirler (5).

Beyin cerrahi ve nöroloji ve medikal onkoloji kliniklerinde de özellikle antiödem etkilerinden dolayı peritümöral ödem tedavisinde, kafa içi basınç artışı tedavisinde yaygın olarak tercih edilmektedir. Son zamanlarda geniş yan etki profilinden dolayı bazı kliniklerde kullanımı terkedilse de; sitotoksik serbest oksijen radikallerinin inhibisyonunu sağlayarak sekonder iyileşmeye katkı sağladığı görüşü hakim olan kliniklerde özellikle spinal kord yaralanmalarında kullanılmaya devam edilmektedir. Subaraknoid kanamalara bağlı iskemi ve akabinde oluşan reperfüzyona bağlı nörolojik sekelleri kısmen önlediği gösterilmiştir (52).

Yan etkileri doza, kullanım şekline ve kullanım süresine göre değişiklik göstermektedir. Peptik ülser, ciltte atrofi, miyopati, diyabet oluşumu, hipokalemi, hiperkoagulopati, intrakranial basınç artışı, osteoporoz, endokrin bozukluklar gibi multisistemik çok farklı yan etkileri olabilir (4).

Emziren kadınlarda ise günde 40 mg'a kadar kullanılmasına izin verilebileceği söylenmiş ancak kullanımdan sonra en az 4 saat süreyle emzirmemeleri tavsiye edilmiştir. Gebelikte metilprednizolon kullanımına bağlı teratojenik etki oluşmasına dair çalışmalar nadirdir. Deney hayvanlarında farklı sonuçlar bildirilmesine rağmen gebe kadınlarda teratojen etki oluşturduğu net olarak saptanamamıştır (5).

Özellikle bizim de üzerinde çalıştığımız, organogenez evresinde MPL kullanımı sonrasında nöral tüp defekti oluşumu ile ilgili bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Austal ve arkadaşları yine bir glukokortikoid olan dexametazon ile yaptıkları civciv çalışmasında cerebellumun normal gelişmesini bozduğu, proliferasyonu azalttığı ve hızlı olgunlaşmaya neden olduğunu göstermişlerdir (60) .

Andrew FD yine bir kortikosteroid olan medroxyprogesterone kullanarak tavşan embriyolarında yaptığı çalışmada teratojenik etki olan yarık damak oluşturduğunu göstermiştir. Çalışmamızda nöral tüp defekti genetiğinde 13. Koromozom delesyonlarında NTD ile eşlik edebilen yarık damaklı bebekler olabildiği söylendiği için anlamlı görüldü (61).

Ganesh Elumalai ve Sushma Chodisetty 2016 da yaptığı çalışmada glukokortikoid ailesinden ve GABA-A reseptör agonist görevi olan progesteron ile yüksek doz çalışmasında civciv embriyolarında nöral tüp defektini artırdığını göstermiştir. Bu nedenle de NTD oluşumunda GABA-A reseptörünün önemli rolü olduğunu önemle belirtmemiz gerekmektedir (62). Ancak MPL'nin GABA-A reseptörü ile ilişkisini açıklayabilecek bir çalışmaya rastlanmadı.

Boğa kurbağalarında doz yanıt eğrileri ile yapılan bir analiz, glukokortikoidlerin yarışmasız bir şekilde GABAA reseptörünün duyarlılığını azalttığını ortaya konulmuş. Glukokortikoidlerin, muhtemelen fonksiyonel GABA-A reseptörü iyonik kanal

komplekslerinin sayısını azaltarak, birincil aferent nöronlar üzerinde GABA-A reseptörünün bir antagonisti olarak hareket ettiği ileri sürülmüş. Bu çalışma doğrultusunda MPL nin, nöral tüp defekti oluşumunda rol alabileceğini düşündüğümüz GABA-A reseptörleri ile etkileşimi üzerinde ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiğini düşündürmektedir (63).

Metilprednizolon, steroid hormon grubundandır ve çinko içeren nükleer hormon reseptörlerinin süper ailesinin üyelerine bağlanarak etki gösterir. Bu reseptör proteinleri, hedef genlerin promoter bölgesindeki spesifik DNA tanıma sekanslarına direk bağlanır ve bu da transkripsiyon başlama oranını değiştirir (51).

Perikonsepsiyonel dönemde kortikosteroid kullanan gebelerden doğan bebekleri inceleyen diğer bir çalışmada yarık damaklı çocuk sayısında anlamlı veriler görülmüş. Ancak nöral tüp defekti açısından anlamlı sonuç alınmamıştır (64).

MPL'nin santral sinir sistemi hücre siklusunda rol alan düzenleyici faktörleri etkileyerek; hücre proliferasyonunu baskıladığı, nöronal kök hücrelerinin nörona doğru olan farklılaşmalarını kısıtladığı ve bu nedenle MPL'nin embriyolojik süreçte gelişim ve farklılaşma üzerinde bazı olumsuz etkilerinin olduğunu düşünmekteyiz.

Bazı araştırmacılar glukokortikoid reseptörlerinin (G.R), matriks metaloproteinazlar (MMP'ler) ve kemik morfogenetik proteinler (BMP'ler) olmak üzere çeşitli anahtar gelişim faktörleriyle bağlantılı olduğunu belirtmişler. BMP'ler, bir dizi BMP reseptörüne bağlanarak sinyal veren, hücre içi transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonuna neden olan ve daha sonra hedef gen ekspresyonunu modüle edebilen bir gelişim morfojen grubudur. BMP sinyalleri, dorsoventral modelleme, mezodermal modelleme, somitogenez, miyogenez, organogenez ve kraniyofasiyal gelişim dahil olmak üzere çok sayıda ana gelişimsel olayla ilişkilendirilmiştir (53).

Bu alışmalar ışığında araştırmacılar erken zebra balıklarında kortizol ile yaptıkları yaptıkları çalışmada; gelişimin erken evrelerinde GR'ye yanıt veren genleri ve yolları belirlemişler ve zebra balıklarında önemli bir gelişim düzenleyicisi olarak GR'nin anahtar rol aldığını belirtmişlerdir. GR sinyali ile BMP ve MMP ekspresyonunun bağlantısının; zigotik kortikosteroidlerin embriyogenezi etkileyebileceğini göstermişlerdir. (43). Bu alışmalar ışığında kullandığımız ajanın BMP ekspresyonu sağlayarak embriyonezde rol alan genetik bilgilerin formasyonunda değişiklik yapabileceği ve bu değişikliklerin nörulasyonda olumsuz katkısının olabileceğini düşünmekteyiz ve ileri bir çalışma yapılması gereklidir. Santral sinir sistemini oluşturan yapılar, embriyonun dorsal kısmında bulunan ektodermin orta kısmındaki amorf yapıda olan hücrelerin farklılaşarak plak şeklini alan bir dokudan oluşurlar. Dolayısıyla bu reseptör-gen sinyalizasyonun ektodermin farklılaşmasında nasıl bir rol alabileceği merak konusudur.

Nesan ve arkadaşları zebra balıkları üzerinde yaptıkları diğer bir çalışmada GR morfantlarının, gecikmiş somitogenez, somit ve kuyruk morfogenezinde kusurlar ve embriyo boyutunda azalma yaptığını göstermişler. Bu alışma da GR reseptörlerinin embriyonezde özellikle mezodermden kaynak alan yapıların gelişmesinde rol aldığı söylenmiş. Yine mezodermin oluşum mekanizması gözönüne alındığında ektodermin de bu reaksiyonlardan etkielenebileceği ve sonucunda nöral tüp oluşumunda rol alabileceği şüpesi doğmaktadır. Gelişimin kritik dönemlerinde MMP-13'ün düzensizliğinin somitogenez, organ gelişimi ve doku mimarisi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Ek olarak, bu genin glukokortikoidler tarafından düzenlenmesi, hücre modellerinin önerdiğinden daha karmaşık görünmektedir, bu da MMP'lerin dinamik bir bütün hayvan modelinde incelenmesinin, teratogenezdeki rollerini anlamamıza katkıda bulunacağını göstermektedir (65).

6. SONUÇ

Sonuç olarak; yaptığımız deneysel çalışmada civciv embriyolarında MPL'nin doza bağı olarak nöral tüp oluşumu üzerine direkt teratojenik etki gösterdiği belirlendi.

Hayvan çalışmalarından elde edilen sonuçlar her ne kadar insanlardaki koşulları tamamlamıyla yansıtmasa da metilprednizolon'un tam teratojenik mekanizması açık değildir, dolayısıyla metilprednizolon'un embriyonik gelişim üzerindeki teratojenik etkilerini göstermek ve konjenital defektleri en az seviyeye indirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- 1-Neyzi, O., Ertuğrul, T. Pediatri 2, Nobel Tıp Kitabevleri, (2002). 3. Baskı, s.1338-1341.
- 2- Mark S. Y. Clinical care of pregnant women with epilepsy: Neural tube defects and folic acid supplementation; Yerby North Pacific Epilepsy Research, Portland, Oregon, USA; Epilepsia 44 (2003). (Suppl. 3): 33-40.
- 3- Cragan JD, Roberts HE, Edmonds LD, Khoury MJ, Kirby RS, Shaw GM, Velie EM, Merz RD, Forrester MB, Williamson RA, Krishnamurti DS, Stevenson RE, Dean JH. Surveillance for anencephaly and spina bifida and the impact of prenatal diagnosis: United states. Surveill Summ. (1995) 44 (4):1-13
- 4- Gilman Goodman A, Hardman JG, Limbird LE. The Pharmacological basis of theurapeutics 9th ed. (1998). 59:1465-85.
- 5- Kayaalp SO. Glukokortikoidler. Tıbbi farmakoloji. (2000). 2:1301-16. 10.Baskı.
- 6- Sadler, TW. Langman"s Medikal Embriyoloji, çeviri editörü: Can BaÇaklar, Palme Yayıncılık, Ankara, (1993). 6.Baskı, s:386.
- 7- Şeftalioğlu, A. Genel & Özel Ğnsan Embriyolojisi, Tıp & Teknik Yayıncılık, Ankara, (1998). 3. Baskı, s:620.
- 8- Çimen, V. Fizyoloji Histoloji & Embriyoloji, Tusem Eğitim Sağlık LTD. şti, Ankara, (2008) 5. Baskı. s. 341.
- 9- Tosney KW. Kuş embriyosunun gövde bölgesinde nöral krest hücrelerinin erken göçü: elektron mikroskopik bir çalışma. (1978). Dev. Biol. 62: 317-333.
- development in broiler chickens. British Poultry Science. (2014). 55(5); 684-692.

- 10- Copp, AJ. and Greene, ND Genetics and development of neural tube defects, *Journal of Pathology*, (2009). 220:217-230.
- 11- Padmanabhan R. Etiology, pathogenesis and prevention of neural tube defects. *Congenit Anom (Kyoto)*; (2006). 46: 55 – 67.
- 12- Nathalie M.J. van der Put, Henny W.M. van Straaten, Frans J.M. Trijbels and Henk J. Blom Folate, Homocysteine and Neural Tube Defects: An Overview *Experimental Biology and Medicine*, (2001). 226:243-270.
- 13- Nieuwkoop PD. The neural induction process: Its morphogenetic aspects. *Int J Dev Biol* (1999). 43 SI:615–623. 37.
- 14- Bachiller D, Klingensmith J, Kemp C, Belo JA, Anderson RM, May SR, McMahon JA, McMahon AP, Harland RM, Rossant J, De Robertis EM. The organizer factors Chordin and Noggin are required for mouse forebrain development. (2000). *Nature* 403:658–661,
- 15- Jacobson AG, Gordon R. Changes in the shape of the developing vertebrate nervous system analyzed experimentally, mathematically and by computer simulation. *J Exp Zool* (1976). 197:191–246.
- 16- Schoenwolf GC. Cell movements driving neurulation in avian embryos. *Development* 2: (1991). (Suppl)157–168,
- 17- Van Straaten HW, Hekking JW, Wiertz Hoessels EJ, Thors F, Drukker J. Effect of the notochord on the differentiation of a floor plate area in the neural tube of the chick embryo. *Anat Embryol Berl* (1988). 177:317–324,

- 18- Smith JL, Schoenwolf GC. Notochordal induction of cell wedging in the chick neural plate and its role in neural tube formation. *J Exp Zool* (1989). 250: 49–62,
- 19- Placzek M, Dodd J, Jessell TM. The case for floor plate induction by the notochord. *Curr Opin Neurobiol* (2000). 10: 15–22.
- 20- Jacobson AG. Some forces that shape the nervous system. *Zoon* (1978). 6:13–21.
- 21- Hildebrand JD, Soriano P. Shroom PDZ domain-containing actinbinding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. (1999). *Cell* 99:485–497.
- 22- Van Straaten HWM, Janssen HCJP, Peeters MCE, Copp AJ, Hekking JWM. Neural tube closure in the chick embryo is multiphasic. *Dev Dynamics* (1996). 207:309–318, 38.
- 23- Alvarez IS, Schoenwolf GC. Expansion of surface epithelium provides the major extrinsic force for bending of the neural plate. *J Exp Zool* (1992). 261:340–348.
- 24- Hackett DA, Smith JL, Schoenwolf GC. Epidermal ectoderm is required for full elevation and for convergence during bending of the avian neural plate. *Dev Dynamics* (1997). 210:397–406.
- 25- Van Straaten HWM, Peeters MCE, Szpak KWF, Hekking JWM. Initial closure of the mesencephalic neural groove in the chick embryo involves a releasing zipping-up mechanism. *Dev Dynamics* (1997). 209:333–341,
- 26- Ulukutlu, L. ve Aydın, A. *Pediatric Ders Notları 2. Cilt, İstanbul Üniversitesi Basımevi, İstanbul, (1991). s: 900-901.*

- 27- Ergül, Y., Şahiner, ÜM. , Velibeyoğlu, F. Pediatri, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, (2004) 2. Baskı. s.333.
- 28- Onrat, S.T, Seyman, H., Konuk, M. Incidence of neural tube defects in Afyonkarahisar, Western Turkey, Genetics and Molecular Research (2009). 8 (1): 154-161.
- 29- Binatlı, AÖ. Bağkan, F., Bagarır, M., Demirhan, MF., Özdamar, N. Nazofrontal Ensefalosel: Bir Vaka Sunumu, Türk Nöroşirürji Dergisi, (2007). Cilt: 17, Sayı: 2, 91-93
- 30- Göksoy, T. Nörolojik Rehabilitasyon Sinir Sistemi Hastalıklarında Tanı-Tedavi ve Rehabilitasyon, Nobel Tıp Kitabevleri, (2009). 1.Baskı. s:496.
- 31- Lindsay, KW. , Bone, I. Callander, R. Resimli açıklamaları ile nöroloji ve nöroşirürji, Çev.Ed. Mustafa Bozbuğa, Nobel Tıp Kitabevleri, 2. Baskı. Ankara, (2000). s:410.
- 32- Gökalp, HZ., Erongun, U. Nöroşirürji Ders Kitabı, (1988). 1. Baskı. s.295.
- 33- Tinkle, MB. and Sterling, BS. Neural tube defects: A primary prevention role for nurses, J Obstet Gynecol Neonatal Nurs, (1997). 26: 503-523.
- 34- Steven E, Evrovski J, Cole D. Clinic chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism: an update. Clin Biochem, (1997). 30: 189-201.
- 35- Budak, N. Folik Asidin kadın ve Çocuk Sağlığında Önemi, Erciyes Tıp Dergisi (2002). 24 (4): 209-214.

- 36- Karaca, NE. , Karaca, E., Onay, H., Gündüz, C., Egemen, A., Özkinay, F.Nöral tüp defektlerinde annelerde MTHFR gen polimorfizmleri ve diğer risk faktörlerinin değerlendirilmesi, Ege Tıp Dergisi, (2012). 51(1): 37-42.
- 37- 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, JAMA, (1989). 262:2847-2852.
- 38- Dodds, L and King, WD. Relation between trihalomethane compounds and birth defects, Occup Environ Med. (2001). 58: 443-446
- 39- Brown, L.Y. Kottmann, A.H., Brown, S. Immunolocalization of ZIC2 expression in the developing Mouse forebrain, Gene Expression Patterns 3, (2003). 361-367.
- 40- Tyshchenko, N. , Lurie, I. Schinzel, A. Chrosomal Map of Human Brain Malformations, Hum Genet. (2008). 124: 73-80.
- 41- Schmid W, Muhlethaler JP, Briner J, Knechtli H. Ring chromosome 13 in a polymalformed anencephalic. Humangenetik (1975). 27: 63-6.
- 42- Chen, C. Chrosomal Abnormalities Associated With Neural Tube Defects (II): Partial Aneuploidy, Taiwan J Obstet Gynecol. (2007). 46 (4): 336-351.
- 43- Nesan D, Vijayan M.M. The Transcriptomics of Glucocorticoid Receptor Signaling in Developing Zebrafish (2013). [10.1371 / journal. pone.0080726](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080726).
- 44- Inoue, T.Ota, M. Mikoshiba, K., Aruga, J. Zic2 and Zic3 synergistically control neurulation and segmentation of paraxial mesoderm in mouse embryo, Dev Biol. (2007). 15;306(2):669-84.

- 45- Gringberg, J. , Millen, KJ. The ZIC Gene Family in Development and Disease, Clin. Genet. (2005). 67: 290-296
- 46- Ishiguro, A. Inoue, T., Mikoshiba, K., Aruga, J. Molecular Properties of Zic4 and Zic5 Proteins: Functional Diversity Within Zic Family, Biochemical and Biophysical Research Communications (2004). 324:302-307.
- 47- Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph. (1951) ; 88; 49–92.
- 48- Koszdin KL, Shen DD, Bernards CM. Spinal cord bioavailability of methylprednisolone after intravenous and intrathecal administration: the role of P-glycoprotein. Anesthesiology (2000). 92: 156–163.
- 49- Potschka H, Fedrowitz M, Loscher W. Multidrug resistance protein MRP2 contributes to blood–brain barrier function and restricts antiepileptic drug activity. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, (2003). 306 (1) 124-131.
- 50- Zong J, Pollack GM. Modulation of P-glycoprotein transport activity in the mouse blood–brain barrier by rifampin. Pharmacol Exp Ther. 306: 124–131 J Pharmacol Exp Ther; (2003). 306: 556–562.
- 51- Meier C.A. Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors J. Recept. Signal Transduct. Res. (1997). 17 p. 319.
- 52- Bracken MB, Collins WF, Freeman DF, et al. Efficacy of methylprednisolone in acute spinal cord injury. JAMA (1984). 251:45–52.
- 53- Kondo M. Zebra balıklarının erken gelişiminde kemik morfogenetik proteinleri . FEBS J (2007). 274 :2960–2967. doi:10.1111 / j.1742-4658.2007.05838.x.

54- Akar S, Sur E. The development of chicken cerebellar cortex and the determination of AgNOR activity of the Purkinje cell nuclei Belg. J. Zool. (2010) 140 (2)

55- Gündüz N, Oznurlu Y. Adverse effects of aflatoxin B1 on skeletal muscle

56- Köksal M., Eröz R., Doğan S., Öztürk F., Öztürk A., Cücer N. Memeden İİAB Yapılmış Kansere Hastalarında AgNOR Değerlerinin Karşılaştırması., Abdullah Gül Üniversitesi, Kayseri 1. Yaşam Bilimleri Sempozyumu Bildiri kitabı, (2016). P107.

57- Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. Histochem J; (1986). 18(1): 5–14.

58- Barutçuoğlu, M., Selçuki, M., Vatansever, S. Erken dönem tavuk embriyonal tüp gelişiminde etanolün etkisi, Türk Nöroşirürji Dergisi. (2001) 11:32-36

59- Colas, J.F. ve Schoenwolf, G.C. Towards a cellular and molecular understanding of neurulation, Dev. Dyn, (2001).221, 117-145.

60- Austdal L. P. E. , S. Bjørnstad, G. H. Mathisen, P. K. Aden, I. Mikkolaş, R. E. Paulsen and K. E. Rakkestad Glucocorticoid Effects on Cerebellar Development in a Chicken Embryo Model: Exploring Changes in PAX6 and Metalloproteinase-9 After Exposure to Dexamethasone cerebellum, glucocorticoid, maturation, MMP-9, (2016). PAX6 doi: 10.1111 / jne.12438.

61- Andrew FD, Staples RE. Prenatal toxicity of medroxyprogesterone acetate in rabbits, rats and mice. Teratology. (1977). 5:25-32.

- 62- Elumalai G and Chodisetty S. Teratological Effects of High Dose Progesterone on Neural Tube Development in Chick Embryos Elixir Gynaecology (2016) 97 42085-42089
- 63- Ariyoshi M., T. Akasu Glucocorticoid modulates the sensitivity of the GABA_A receptor on primary afferent neurons of bullfrogs [Volume 367, \(1986\). Issues 1-2, 5 March, Pages 332-336](#)
- 64- Carmicheal S. L., G. M. Shaw Maternal corticosteroid use and risk of selected congenital anomalies (1999). doi: 10.1002 / (sici) 1096-8628 (19990917) 86: 3 <242 aid-ajmg9> 3.0.co; 2-u.
- 65- Nesan D. , Kamkar M., Burrows j, Scott L.C, Marsdan M, Vojagan M.M. Glucocorticoid receptor signaling is essential for mesoderm formation and muscle development in zebrafish (2012) Mar;153(3):1288-300. doi: 10.1210/en.2011-1559. Epub.