



**GLUKAGON BENZERİ PEPTİD-1 ANALOĞU
LİRAGLUTİD'İN CİVCİV EMBRİYO MODELİNDE
NÖRAL TÖP GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Hava AÇAR KAYA
Yüksek Lisans Tezi
Danışman: Prof. Dr. İsmail TÜRKMENOĞLU
Temmuz, 2021

Tez No: 2021-030
Afyonkarahisar

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

GLUKAGON BENZERİ PEPTİD-1 ANALOĞU LİRAGLUTİD'İN
CİVCİV EMBRİYO MODELİNDE NÖRAL TÜP GELİŞİMİ
ÜZERİNE ETKİSİ

Hazırlayan

Hava AÇAR KAYA

Danışman

Prof. Dr. İsmail TÜRK MENOĞLU

Tez No: 2021-030

AFYONKARAHİSAR

Bu tez çalışması; Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Proje
Araştırmaları Koordinasyon Birimi (BAPK) Tarafından
Desteklenmiştir. Proje No: "20.SAĞ.BİL.33"

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Veteriner Anatomi Anabilim Dalı'nda** Hava AÇAR KAYA tarafından hazırlanan “Glukagon Benzeri Peptid-1 Analogu Liraglutid'in Cıvciv Embriyo Modelinde Nöral Tüp Gelişimi Üzerine Etkisi” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 13/07/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği / oy çokluğu** ile **YÜKSEK LİSANS TEZİ / DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir

Başkan

Prof. Dr. İsmail TÜRK MENOĞLU

Üye

Doç. Dr. Murat Sırrı AKOSMAN

Üye

Dr.Öğr.Üyesi Abdülkadir BİLİR

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... / / tarih ve
..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Esmâ KOZAN
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bilimsel Yayın Etiği İlkeleri ve Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Afyon Kocatepe Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

13/07/2021

İmza

Hava AÇAR KAYA

ÖZET

GLUKAGON BENZERİ PEPTİD-1 ANALOĞU LİRAGLUTİD'İN CİVCİV EMBRİYO MODELİNDE NÖRAL TÜP GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİ

İnkretin bazlı glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) reseptör agonistleri tip 2 diyabet ve obezite tedavisinde kullanılır. Pankreasın beta hücrelerinden insülinin salgılanmasını kan şekereye bağımlı bir mekanizma ile artırır, glukagon sekresyonunu inhibe eder, beta hücrelerini apoptozisten korur. Gıda alımını ve iştahı azaltırken gastrik boşalmayı geciktirir, kilo verdirir ve sinir sistemi üzerinde koruyucu etki oluşturur. Tez çalışmamızın amacı memelilerde ilk ay gelişimine benzerlik gösteren civciv embriyo modelinde farklı Liraglutid dozlarının nöral tüpe etkilerini araştırmaktır.

İzmir Bornova Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü'nden temin edilen 100 adet 61 ± 5 gr ağırlıkta, spesifik patojen içermeyen 0. gün beyaz, döllenmiş tavuk yumurtaları kullanıldı. Sunulan tez çalışmamız bölümümüz ile Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi kürsüsü ile ortak yapıldı. 28 saatlik inkübasyon sabit bir sıcaklık $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, nem oranı % 60 - 68 aralığında tutulması ve her 2 saatte bir 45° açıyla otomatik olarak döndürülmesi sağlandı. Her biri 25 yumurtadan oluşan 4 gruba ayrıldı. Liraglutid subblastodermik olarak Hamilton mikro enjektörü ile 3 farklı dozda uygulandı. 48. saatin sonunda tüm yumurtalar açılıp embriyolar çıkarılarak makroskopik, mikroskopik ve histopatolojik olarak değerlendirildi. Çalışmada düşük doz $1.5 \mu\text{g}$, orta doz $7.5 \mu\text{g}$, yüksek doz $15 \mu\text{g}$ liraglutid yumurta başı kullanıldı. Kontrol grubu ise sham olarak çalışıldı. Hematoksilen-Eosin ve May-Grünland Giemsa solüsyonu ile boyama yapıldı.

1. grupta $30 \mu\text{g}/\text{kg}/1.5 \mu\text{g}/\text{yumurta başı}$ Liraglutid enjeksiyonu sonrası 20 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%80), 1 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%4), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı (%4) ve 2 embriyoda ise açma hatası olduğu (%8) baş-kıç ölçümü $660.37 \pm 20.98 \mu\text{m}$, somit sayısı 15.95 ± 1.43 , Hamburger Hamilton skalasına göre 11-12 evre aralığında olduğu,

2. grupta $150 \mu\text{g}/\text{kg}/7.5 \mu\text{g}/\text{yumurta başı}$ Liraglutid enjeksiyonu sonrası 19 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%76), 3 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%12), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı

(%4) ve 1 embriyoda ise açma hatası olduğu (%4) baş-kıç ölçümü 660.20 ± 30.39 μm , somit sayısı 15.45 ± 1.37 , Hamburger Hamilton skalasına göre 11-12 evre aralığında olduğu,

3. grupta $300 \mu\text{g/kg}/15 \mu\text{g/yumurta}$ başı Liraglutid enjeksiyonu sonrası 19 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%76), 3 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%12), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı (%4) ve 1 embriyoda ise açma hatası olduğu (%4) baş-kıç ölçümü 631.62 ± 31.05 μm , somit sayısı 15.50 ± 1.43 Hamburger Hamilton skalasına göre 11-12 evre aralığında olduğu,

4. grup olan sham ise hiçbir işlem yapılmamış olup 21 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%84), 1 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%4), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 2 embriyoda diskin oluşmadığı (%8) baş-kıç ölçümü 670.50 ± 30.14 μm , somit sayısı 16.27 ± 1.24 , Hamburger Hamilton skalasına göre 11-12 evre aralığında olduğu saptandı.

Nöral tüp açıklığı, somit sayıları, Hamburger Hamilton evreleri incelenmesinde kontrol grubu ile deney grupları arasındaki doza bağlı farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p > 0.05$). Baş-kıç uzunlukları ortalaması kontrol grubu ($670.50 \mu\text{m}$) ile düşük doz ($660.37 \mu\text{m}$) ve orta doz ($660.20 \mu\text{m}$) gruplarında benzer iken yüksek doz grubunda $631.62 \mu\text{m}$ 'ye düştüğü ve yüksek doz grubu ile diğer gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($P < 0.05$).

Sonuç olarak, Liraglutid'in dozları ile nöral tüp açıklığı ve somit sayıları arasında anlamlı bir ilişki saptanmazken baş-kıç ölçümleri arasında farklılıklar saptandı. Liraglutid teratojenik mekanizması net değildir; bu nedenle, daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Cıvcıv Embriyo Modeli, İnkretinler, Liraglutid, Nöral Tüp, Obezite.

SUMMARY

EFFECT OF GLUKAGON-LIKE PEPTIDE-1 ANALOG LİRAGLUTİDEE ON NEURAL TUBE DEVELOPMENT IN CHICK EMBRYO MODEL

Incretin-based glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptor agonists are used in the treatment of type 2 diabetes and obesity. From the presence of beta in the pancreas, a blood-dependent mechanism for the purpose of insulin develops, inhibits glucagon secretion, and protects the beta cell from apoptosis. While reducing food intake, it delays gastric reduction, causes weight loss and provides protection on the nervous system. The aim of the thesis study is to scan different doses of Liraglutid on the neural tube in a chick embryo model, which is similar to first month development in mammals.

100 eggs of 61 ± 5 gr, specific pathogen-free 0 day white fertilized chicken eggs obtained from İzmir Bornova Veterinary Control and Research Institute were used. Our thesis study presented was done jointly with our department and Afyonkarahisar Health Sciences University, Faculty of Medicine, Department of Anatomy. Incubation of 28 hours was maintained at a constant temperature of $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, humidity in the range of 60 – 68% and automatically rotated at an angle of 45° every 2 hours. They were divided into 4 groups of 25 eggs each. Liraglutid was administered subblastodermically with a Hamilton micro-injector in 3 different doses. At the end of the 48th hour, all eggs were opened and embryos were removed and evaluated macroscopically, microscopically and histopathologically. In the study, 1.5 micrograms for low doses, 7.5 micrograms for medium doses, and 15 micrograms for high doses of Liraglutid injected eggs were used. The control group was studied as sham. Staining was done with Hematoxylin-Eosin and May-Grünland-Giemsa solution.

In group 1, after the injection of Liraglutid 30 microgram/kg/1.5 microgram/per egg, the neural tube was closed in 20 embryos (80%), the neural tube was open in 1 embryo (4%), 1 embryo had developmental delay (4%), 1 no disc was formed in the embryo (4%) and there was an opening error in 2 embryos (8%), the fore-aft

measurement was $660.37 \pm 20.98 \mu\text{m}$, the somite number was between 11 - 12 stages according to the Hamburger Hamilton scale,

In group 2, after the injection of Liraglutid 150 micrograms/kg/7.5 micrograms/per egg, the neural tube was closed in 19 embryos (76%), the neural tube was open in 3 embryos (12%), there was a developmental delay in 1 embryo (4%), 1 no disc was formed in the embryo (4%) and there was an opening error in one embryo (4%), the fore-aft measurement was $660.20 \pm 30.39 \mu\text{m}$, the number of somites was between 11 - 12 stages according to the Hamburger Hamilton scale,

In group 3, after the injection of 300 microgram/kg/15 microgram/ per egg Liraglutid, the neural tube was closed in 19 embryos (76%), the neural tube was open in 3 embryos (12%), there was developmental delay in 1 embryo (4%), and the disc in 1 embryo. (4%) and one embryo had a defect in opening (4%). The fore-aft measurement was $631.62 \pm 31.05 \mu\text{m}$, the number of somites was between 11 - 12 stages according to the Hamburger-Hamilton scale,

In group 4, sham, no procedure was performed and the neural tube was closed in 21 embryos (84%), the neural tube was open in 1 embryo (4%), there was developmental delay in 1 embryo (4%), and in 2 embryos no disc was formed (8%) fore-aft measurement was $670.50 \pm 30.14 \mu\text{m}$, somite number was 16.27 ± 1.24 , according to Hamburger-Hamilton scale, in the 11-12 stage range.

In the examination of neural tube patency, somite counts, and Hamburger-Hamilton stages, it was determined that the dose-related difference between the control and experimental groups was not statistically significant ($p > 0.05$). While the mean fore-and-aft lengths were similar in the control group ($670.50 \mu\text{m}$) and low dose ($660.37 \mu\text{m}$) and medium dose ($660.20 \mu\text{m}$) groups, it decreased to $631.62 \mu\text{m}$ in the high dose group and in the high dose group and other groups. The difference between the two was found to be statistically significant ($P < 0.05$).

As a result, there was no significant relationship between the doses of Liraglutid and neural tube patency and somite counts, but differences were found between fore-aft measurements. The Liraglutid teratogenic mechanism is not clear; therefore, more research needs to be done.

Keywords: Chick Embryo Model, Incretins, Liraglutid, Neural Tube, Obesity.

ÖNSÖZ

Tez çalışması ile ilgili yardımları, bilimselliği, etik değerleri ve insanlığı için saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. İsmail TÜRKMENOĞLU'na, Dr. Mehmet Aydın AKALAN'a, ilaç solüsyonu embriyo açılması ilaç verilmesi ve deney çalışmalarına katkı ve destekleri için Dr. Abdülkadir BİLİR'e, Dr. Emre ATAY'a, Halkla İlişkiler Sorumlu Müdürü Emrah ERYILMAZ'a, araştırmayı mali yönden destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına, (Proje No: 20.SAĞ.BİL.33) tez savunmamda yazım bilimsel düzenleme desteği asil jüri üyesi sayın Doç. Dr. Murat Sırrı AKOSMAN'a ve yazım-şekil düzenlemelerini yapan kardeşime ve yeğenime, bu dönemde beni destekleriyle onurlandıran sevgili kızım ve eşime teşekkür ederim.

İyi insan olma bilinci ve okuma hevesi aşılayan canım annem ve canım ablama ithaf edilmiştir.

Hava AÇAR KAYA

Afyonkarahisar

2021

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİMİ	III
ÖZET	IV
SUMMARY	VI
ÖNSÖZ	VIII
İÇİNDEKİLER	IX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XI
TABLOLAR DİZİNİ	XII
RESİMLER DİZİNİ	XIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIV
1. GİRİŞ	1
1.1. İnsanda Nöral Dokunun Embriyolojik Gelişimi	3
1.2. Tavuk Embriyosu Gelişimi	8
1.3. Nöral Tüp Defektleri	12
1.4. Liraglutid.....	14
1.4.1. Tiroid kanseri	15
1.4.2. Pankreatit.....	15
1.4.3. Liraglutid Kimyasal Formül ve Gebelikte kullanımı	15
1.4.4. Liraglutid Dozu	16
2. MATERYAL ve METOT	17
2.1. Deney Sırasında Kullanılan Kimyasallar	17
2.2. Deney Hayvanı.....	17
2.3. Laboratuvar Koşulları	18
2.4. İnkübatör	18
2.5. Deney Gruplarının Oluşturulması	19
2.6. Embrioların Elde Edilmesi	20
2.7. Embrioların Makroskopik ve Mikroskopik İncelenmesi	21
2.8. Verilerin Değerlendirilmesi	24
3. BULGULAR	25
4. TARTIŞMA	28
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	30

6. KAYNAKLAR	31
7. EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
Ek 1. Etik Kurul İzni	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFSÜ	: Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
AKÜ	: Afyon Kocatepe Üniversitesi
GLP	: Glukagon-like peptid 1
H&H	: Hamburger ve Hamilton Skalası (1951)
NTD	: Nöral tüp defekti
SPF	: Specific pathogen free (içermeyen)
µm	: mikrometre
SSS	: Santral sinir sistemi
FDA	: Food and Drug Administration
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
µg	: mikrogram
ml	: mililitre
mg	: miligram
kg	: kilogram
mm	: milimetre

TABLolar DİZİNİ

	SAYFA
Tablo 2.1: Deney grupları ve uygulanan ilaçların dozları.....	19
Tablo 2.2: Şeffalaştırma prosedürü	23
Tablo 2.3: Hematoksilen ve Eosin boyama prosedürü.....	23
Tablo 3.1: Gruplar arası nöral tüp açık-kapalılık durumu.....	25
Tablo 3.2: Gruplara göre somit sayısı ve baş-kıç ölçümlerinin dağılımı	26



RESİMLER DİZİNİ

SAYFA

Resim 1.1: Nörülasyon ve nöral tüpün oluşumu	4
Resim 1.2: 45 saatlik bir civciv embriyosunda otokord ve somit gelişimi	5
Resim 1.3: Hamburger Hamilton evrelemesine göre Evre 1- arası embriyolar	9
Resim 1.4: Hamburger Hamilton evrelemesine göre Evre 5-10 arası embriyolar	10
Resim 1.5: Hamburger Hamilton evrelemesine göre Evre 11-13 arası embriyolar ..	11
Resim 1.6: NTD alt tipleri kapanış aşama görseli	13
Resim 2.1: (A) Fertil 0. gün SPF yumurtalar ve tartılması (B)	18
Resim 2.2: Yumurtaların yerleştirildiği inkübatör (A,B)	19
Resim 2.3: Yumurta işaretlenmesi, pencere açılması(A) ve H&H enjektörü ile Liraglutid verilmesi(B) , Parafilm ve ipek flaster (C), Enjeksiyon sonrası inkübatöre yerleştirme(D)	20
Resim 2.4: (A) Steril malzemeler, (B) Embriyonal diskin kesimi , (C) Embriyonun petri kutusuna alınması , (D) Embriyonun lama alınması.....	21
Resim 2.5: Petri kutusundanFormaldehit solüsyonuna alınan embriyolar	21
Resim 2.6: Açık nöral tüplü civciv embriyosunun ışık mikroskobu görüntüsü H, kalp; N, notokord; NT, nöral tüp; S, somit. (A), Açık nöral tüplü civciv embriyosunun (H&E) ile boyanması (B), Civciv embriyosu (C)	24

ŞEKİLLER DİZİNİ

SAYFA

Şekil 3.1: Gruplar arası araştırılan tüm parametrelerin durumu 26



1. GİRİŞ

Merkezi sinir sistemi, omurilik ve beyin saran sinir dokulardan oluşan bir vücut sistemidir. Vücudun çevre ile yaşamasını sağlayan organların istemli ve istemsiz hareketlerinin koordinasyonunu sağlar. Canlının tek ve tüm olarak idaresini sağlayan sistemdir. Sinir sistemini oluşturan tüm yapılar ektoderm'den köken alır. İnsandaki nöral tüp adı verilen yapı beyin dokusundan başlayıp boylu boyunca omuriliği de içine alacak şekilde aşağı doğru uzanır. Bu yapı, döllenmeden sonraki 2. ile 4. hafta arasında gelişimini tamamlar. Nörojenez hayat boyu sürer. Tüpün oluşumu embriyonun orta katmanı (mezoderm) içerisinde notokord adlı yapının oluşması ile başlar. Sonuç olarak dış katmanda nöral tüp oluşumu gözlenir ve beyin, bu tüpün ucundaki bir tomurcuk olarak oluşur ve sonrasında giderek büyür (Kürtül, 2018; Akosman, 2020).

Nöral tüp defektleri konjenital malformasyonlar olup daha çok çevresel, genetik ile gebelikte ilaç ve kimyasallara maruziyet durumuyla ilişkilidir. Nöral tüp defektlerinin kliniğinde parapleji, ciddi parezi ve idrar-gaita inkontinansı ön plandadır. Tedavisi genellikle cerrahi olup, tedavinin kliniğine ciddi bir katkısı yoktur. Koruyucu önlemler daha ön plana çıkmaktadır (Kürtül, 2018; Akosman, 2020).

Dünya'da canlı doğumlarda bebeklerin yaklaşık olarak % 2'sinde ciddi doğumsal anomaliler saptanmaktadır. Anomalilerin de yaklaşık olarak % 60'ını santral sinir sistemi anomalileri oluşturmaktadır (Baker, 1994). Nöral tüp defekti (NTD) yenidoğan döneminde en sık rastlanan doğumsal anomalilerden birisidir (Robert, 2000). Nöral kanalın erken dönemde kapanmaması ile anensefali ve ensefalosel gelişirken, kapanmanın geç döneminde olmasıyla meningomyelosel, meningosel, miyeloşizis, spina bifida okülta, sirengomiyeli, dermal sinüs ve gerginspinalkord gelişmektedir (Rowland, 2006).

Epidemiyolojisine bakıldığında nöral tüp defektleri farklı coğrafik yayılımlar gösterir. NTD, Avrupa ülkelerinde % 0.1 sıklıkta görülürken Türkiye'de bu oran, çeşitli çalışmalardan elde edilen verilere göre %0.3 - 0.5 arasında değişmektedir. Ülkemizde her yıl yaklaşık 5000 çocuk bu hastalıkla doğmaktadır (Tunçbilek vd., 1999). En yüksek insidans %0.8 ile İngiltere'nin kuzey ve batısında görülürken,

güney ve doğusunda insidans % 0.2 ile % 0.3 arasındadır (Milunsky, 1986). Amerika ve Kanada'da insidans çok daha düşüktür bu ülkelerde nöral tüp defekti binde bir oranında görülür. Siyah ırkta beyazlara göre daha az görülür ve kız bebeklerde erkeklere göre iki kat daha fazla rastlanır (Brocklehurst, 1976). NTD gelişmesinde rolü olduğu belirtilen pek çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasında; yetersiz beslenme, yüksek ateş, hipertansiyon, diabetes mellitus, obezite, kullanılan bazı ilaçlar, çevresel kirlenmeler, geçmişte NTD öyküsü olması, annenin 20 yaşından küçük 35 yaşından büyük olması, primipar olma, dört ve daha fazla çocuk doğurma, doğum öncesi bakım alamama veya yetersiz alma, düşük sosyoekonomik düzeye sahip olma ve folik asit eksikliği sayılabilir (Daly vd., 1997; Akan, 2002; Yıldız vd., 2008). Gebelikte bazen zorunlu olarak kullanılması gereken ilaçlar bu tip konjenital malformasyonlara neden olmakta fakat özellikle günümüzde yeni geliştirilen ilaçların gebelik kategorisi ve ne tür malformasyonlara neden olabileceği yapılan çalışmaların azlığı nedeniyle tam olarak bilinmemektedir (Tureci vd., 2011; Song vd., 2012).

Liraglutid; genel olarak kandaki glukoz seviyesini düşüren metabolik hormonlar ailesinin bir üyesi olan Glukagon Benzeri Peptit-1 ile aynı reseptöre bağlanarak daha uzun süreli etki sağlayan bir analogu (GLP-1), endojen bir inkretindir. Bağırsak L hücreleri tarafından üretilen 30 amino asit hormonu (Baggio ve Drucker, 2007), uzun yarı ömre sahip bir GLP-1 analogu olan Liraglutid (Saxsenda) tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (Lovshin ve Drucker, 2009). Deri altı liraglutid enjeksiyonları, normoglisemik bireylerde kan glukoz düzeylerini etkiler (Vella vd., 2002). Nöronal aktivitenin kontrolünde santral rol oynadığı ve beyin dokusunda koruyucu etkili olabileceğini öne sürülmüştür (İnt. Kay. 5, 2021).

Günümüzde kullanılan özellikle son dönemlerde bulunan birçok ilacın gebelik üzerine etkisi bilinmemektedir. İnsanlar için toksik olduğu düşünülen ilaçların teratojenik etkilerini belirlemek için öncelikle hayvan modeline ihtiyaç vardır. İnsanlar üzerinde direkt deney çalışması yapılamadığından hayvan çalışmaları ile test edilmeleri gerekmektedir (Ertekin vd., 2019).

Yapılan çalışmalardaki verilere göre tip 2 diyabet ve böbrek yetmezliği olan hastalarda insülinde liraglutid tedavisine geçişin başarılı ve güvenilir bir şekilde

olduğuna dair temel bilgi bulunmamasına karşın, klinik bulgular dikkate alınarak geçişin sağlanması önerilmektedir (Araki vd., 2014). Bbbrek (Araki vd., 2014; Zavattaro vd., 2015), kalp (Inoue vd., 2015), mide (Jelssing vd., 2012), bağırsak (Candeias vd., 2015), beyin (Briyal vd., 2014), pankreas (Garber vd., 2015; Kimura vd., 2015), ovaryum (Rasmussen vd., 2014), karaciğer (Gao vd., 2015) ve adipoz doku (Cantini vd., 2015) gibi çeşitli organlarda da çalışılan liraglutid'in, nral tp gelişimi üzerine etkisini gösteren literatürde çok çok az çalışma bulnmaktadır. Deneysel ve klinik çalışmalarda antidiyabetik etkisi yaygın olarak kabul edilen liraglutid aynı zamanda antioksidatif ve antiapoptotik etkilerinin varlığı da rapor edilmiştir (Inoue vd., 2015; Briyal vd., 2014).

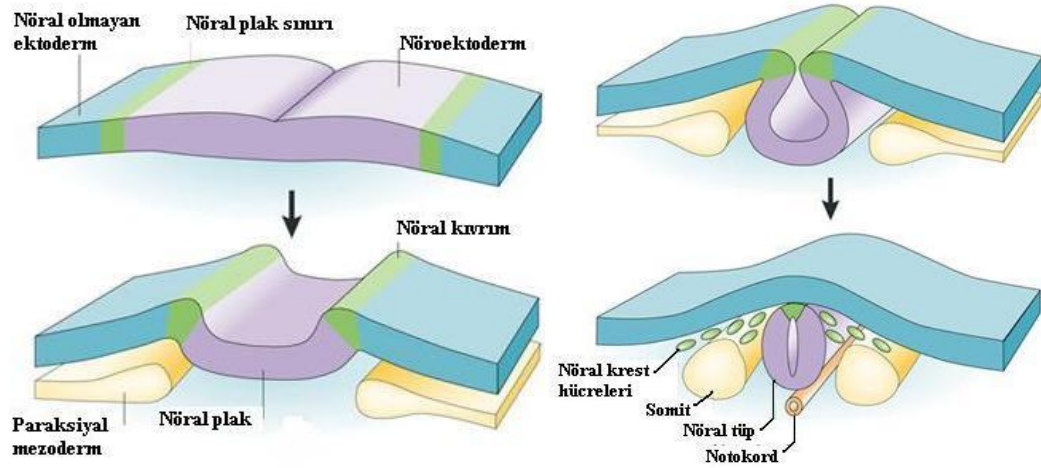
Tez alışması kapsamında Liraglutid'in olası sinir sistemi etkilerini değerlendirmek için civciv embriyo modeli kullanıldı. Bu model üzerinde çalışma planı oluşturulmasının sebebi, civciv embriyosunun erken dönemde gösterdiği gelişimin (zellikle ilk 48 saatlik süre) memeli omurgasının embriyonal gelişiminin ilk ayına benzerlik göstermesindedir. Döllenmiş bir yumurtanın ortalama olarak kuluçka süresi 22 gündür; bunun bir günü tavuk vücudunda, 21 günü kuluçkada geçmektedir. Bu 21 günlük sredeki civciv embriyosunun gelişim basamakları Hamburger ve Hamilton tarafından 46 evreye ayrılmıştır. Hamburger ve Hamilton'un 1951 yılında belirlediği gelişim safhalarına göre 8. evrede nral plak gelişmiş ancak açıktır; 13. evreye gelindiğinde nrlasyona denk düşecek şekilde nral tp kapanmaktadır (Hamburger vd., 1951).

Çalışma teratojen faktörlerin nörülasyon sürecine etkilerinin kolaylıkla incelenebildiği, ilaçların rahatlıkla verilebildiği, ucuz ve uygun bir model olan civciv embriyo modeli üzerinde yapıldı. Bu tez çalışmasında liraglutid'in civciv embriyolarında nral tp (orta hat) kapanmasına olan etkilerini makroskobik, mikroskobik ve histolojik olarak inceleyerek ortaya koymayı amaçladık.

1.1. İnsanda Nral Dokunun Embriyolojik Gelişimi

Dişi reme hcreti olan ovum ile erkek üreme hcreti spermiumun fertilizasyonu sonucu oluşan zigot, hücre bölünmesi, hücre g, hücrenin programlı ölümü ve hücre büyümesi sonucu çok hücreli insan yapısına dönüşür. Prenatal dönem kendi

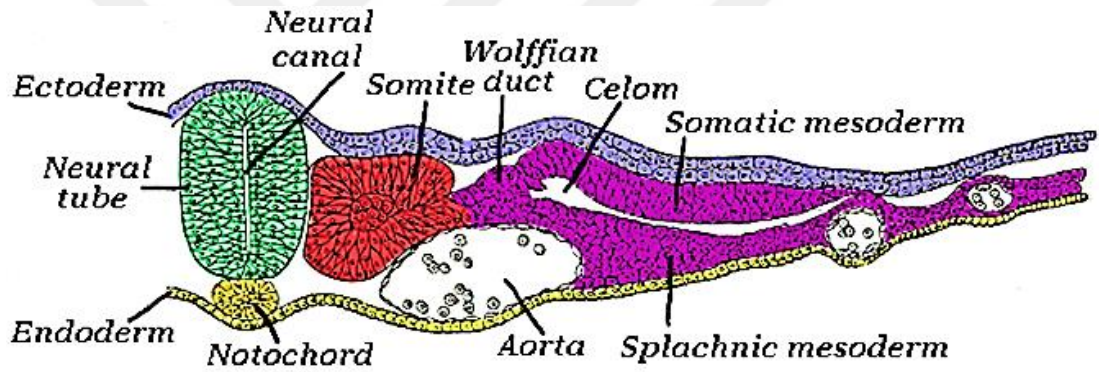
içinde ikiye ayrılır. Embriyonik dönem ilk 8 haftadır, 57. günden itibaren fetüsün doğumuna kadar geçen süre ise fetal dönem olarak adlandırılır (Moore vd., 2019; Petorak vd., 1984). Fertilizasyonu takiben totipotent bir hücre olan zigot bölünmeye başlar. Bu dönemde birbirini izleyen bir seri mitoz bölünme ile daha küçük hale gelen ve sayısı artan blastomerler oluşur. Arka arkaya üç bölünme sonrasında 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 (Sadler, 1996). Fertilizasyondan ortalama 4 gün sonra morula uterus boşluğuna ilerlerken içinde bir kavite oluşmaya başlar. Bu kavitenin içerisine sıvı dolar ve blastokist boşluğu oluşur. Bu evredeki embriyoya “blastokist”, boşluğa da “blastosel” adı verilir. Üçüncü haftanın en belirleyici olayı gastrulasyondur. Gastrulasyon, primitif çizginin belirmesi ile başlar. Primitif çizginin sefalik ucu genişleyerek primitif düğümü (Hensen düğümü) yapar. 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 mezodermle ilişki kuruncaya kadar diğer iki germ tabakasının arasına göç ederler (Resim 1.1) (Schoenwolf vd., 2014; Schoenwolf vd., 1990).



Resim 1.1: Nörolasyon ve nöral tüpün oluşumu (İnt. Kay. 6, 2021).

Primitif çukurda, invajine olan prenotokordal 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” meydana gelir. Embriyonun orta hat eksenini oluşturan notokord aksiyal iskeletin ana çatısıdır (Sadler, 1996; Schoenwolf vd., 2014). Notokord oluşuktan sonra ektodermden nöral tüp gelişimini sağlarken, her iki yanında bulunan mezodermi de etkileyerek, segmentlere ayrılmaya zorlar. Önce mezodermin dorsalinde yarıklanma olur. Bunun sonucunda oluşan ufak mezoderm parçalarından somitler gelişir. Somitler, ilk olarak embriyonun gelecekteki oksipital bölgesinde ortaya çıkar. Somitlerin oluşması, henüz primitif çizginin arka ucuna gelmeden sona erdiğinden embriyonun kaudal kısmında mezoderm yarıklanmadan kalır (Resim 1.2). Yarıklanma, mezodermin yalnızca dorsal bölümünde sınırlıdır. İlk segmentin önündeki mezoderm de yarıklanma göstermez. İnsanda ilk somit çifti gelişimin 20. gününde embriyonun servikal bölgesinde belirir (Sadler, 1996; Schoenwolf vd., 2014).



Resim 1.2: 45 saatlik bir civciv embriyosunda notokord ve somit gelişimi (İnt. Kay. 7, 2021).

Üçüncü embriyolojik hafta içerisinde, embriyonun dorsal orta hattında bulunan ektoderm kalınlaşmaya başlar ve nöral tabakayı oluşturur. Ektodermin indüksiyonunda özellikle TGF (transforming growth factor - dönüştürücü büyüme faktörü) ailesi içinde yer alan aktivin, fibroblast büyüme faktörü, bunun dışında retinoik asit ve çeşitli nörotransmitterler gibi sinyal molekülleri görev almaktadır (Sadler, 1996; Colas vd., 2001; Ronald vd., 1996). Bu tabakanın her iki lateral sınırı yükselti yaparak ortalarında boylu boyunca uzanan çukura benzer oluk oluşturur. Bu tabaka lateralinde oluşan yükselti nöral katlantı, ortadaki oluk ise nöral oluk olarak adlandırılır. Meydana gelen nöral oluk, lateralinde yükselti olarak bulunan nöral katlantıların mediale doğru yaklaşarak birleşmesi ile silindirik şekilde kapanır ve nöral tüpü oluşturur. Kaynaşma gelecekte boyunun oluşacağı 4. somit bölgesinden

başlar. Sefalik ve kaudal yönde devam eder. Kaynaşma tamamlanincaya 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 (Schoenwolf vd., 2014).

Üç tabakalı embriyonun oluştuğu gastrulasyon dönemi sonrası embriyoda SSS (santral sinir sistemi) gelişimi, 28. günde tamamlanan “primer nörolasyon” olarak adlandırılır. Bu hafta içerisinde başlayan spinal kordun distal kısımları olan cauda equina ve liflerinin oluşumu başlayacak ve bu evre sekonder nörolasyon evresini oluşturacaktır. Sekonder nörolasyon evresinde tüm nöral tüpün üzeri, yüzey ektodermi ile kapanmış durumdadır. İntrauterin hayatın 30. gününde oluşan bu hücre grubunda vakuolizasyon gelişir. Vakuollerin birbirleri ile birleşmesi sonucu hücre grubu içinde tek bir kavite oluşur. Bu olaya “kanalizasyon” adı verilmektedir. 38. günde bu hücre grubu ile nörolasyon sonucu oluşmuş olan üst medulla spinalis ile L1-2 hizasında birleşir ve füzyon oluşur (Moore vd, 2019). Nöral tüpün distalindeki kaudal hücre kütleleri kuyruk şeklinde uzanır. Bu oluşum gerçekleşirken çok sayıda lümen ve epandimal topluluklar filum terminale içinde organize olurlar ve distal konus medullaris meydana gelir. Bu kabaca oluşan distal spinal kord, 38. günde kaudal nöral tüpün lümeninde azalma yani retrogresif diferensiasyon 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 (Schoenwolf vd., 2014).

Birleşmeden sonra gelişen, kontrollü ve planlı hücre ölümü ile bu dönemde nörolasyon ve nöral dokunun üzerinin cilt ile kapanması tamamlanmıştır. Nörolasyon, nöral plağın nöral tüpe dönüşme sürecidir (İnt. Kyn. 1).

Basit bir hücre külesiyken (blastula) embriyonun katmanlardan oluşan oldukça organize bir yapıya dönüşme süreç olarak tanımlanmaktadır. Üç germ tabakası ektoderm, mezoderm ve endoderm gelişir. Notokord embriyonun ilkel eksenini

oluşturur ve ona diklik sağlar. Başlangıçta nöral plak servikalde dar, sefalik bölgede ise daha geniş olarak gözlenir.

Gastrülasyon süreci boyunca, gelişimin daha sonraki aşamalarında embriyonun bütün doku ve organlarının geliyeceği üç germ yaprağının kaynağı epiblasttır. Prenekordal hücrelerin hipoblastın içine karışmasıyla, embriyonun orta hattı kısa bir süre için iki hücre tabakasından meydana gelen notokordal plaktan oluşur. Hipoblast yerini primitif çizgi boyunca içe doğru hareket eden endoderm hücrelerine bırakırken, notokordal plağın hücreleri de çoğalarak endodermden ayrılırlar. Bunlar daha sonra, nöral tüpün altını döşeyen ve aksiyel iskeletin kaidesini oluşturacak olan içi dolu bir hücre kordonunu nihai notokordu oluştururlar. Notokordun uzaması dinamik bir süreçtir. Önce kranial uç oluşur ve kaudal bölgeler de primitif çizgi daha kaudal bir pozisyon kazandıkça yapıya eklenmektedir

Posterior nöroporun bulunduğu bölge, gelişmiş fetüste T11-L4 segmentleri arasında uymaktadır ve burası myelodisplazinin en sık karşılaştığı bölge olarak bilinmektedir (Aksoy, 2005). Posterior nöroporun kapanması ile birlikte piamater, araknoid ve duramater gelişmeye başlar. Santral sinir sistemi (SSS) 40. gününde ventral yüzde belirmeye başlayan duramater, 52. günde tüm sistemi sarar (Schoenwolf vd., 2014; Aksoy, 2005). Vertebral kanalın oluşumu ise 3 evrede tamamlanır. İlk evrede membranöz yapıda olan ventral subkordal ve dorsal subkordal zonlar nöral tüpün lateralinden göç eden mezenkim hücreleri tarafından oluşturulur. Bu süreç 25. günde başlar. Bu ventral ve dorsal subkordal zonların her ikisi de medial ve lateral gruplara ayrılıp, medial gruplar vertebra oluşumunu, lateral gruplar ise paraspinal kas gruplarının oluşumuna yol açarlar. Ayrıca bir grup mezenkim topluluğu hemen sonra nöral tüpün posterioruna uzanarak posterior nöral ark ve meninkslerin oluşumunda da etkindir. Vertebral kolon oluşumunun diğer evreleri, yukarıda bahsettiğimiz zonların bilateral ve simetrik olarak çalışması ile vertebral kolonun ve disk aralıklarının farklılaşması yani kondrifikasyon evresi ve vertebra oluşumunun tamamlanmasını içeren ossifikasyon evreleridir. Vertebral kolonun kaudal oluşum evresi ileri derecede organize olmayıp gerek sakrum gerek koksiks oluşumu bir seri regresyonu da içerir. Bu aşamalardaki disorganizasyon lipomlar,

teratomlar gibi kaudal regresyon anomalilerinin oluşumuna yol açabilirler (Moore vd., 2019; Schoenwolf vd., 2014; Botto vd., 1999).

1.2. Tavuk Embriyosu Gelişimi

Memeli hayvanlarda, embriyonal gelişim anne karnında gözlenirken, kanatlılarda, dolayısıyla tavuklarda, tamamen vücut dışında gerçekleşir. Cıvciv, embriyo gelişimi için gerekli bütün besin maddelerini yumurta içinde tamamlar. Yumurtadan cıvciv gelişimi için bazı çevre koşullarına ihtiyaç duyulur. Günümüzde bu işlem yumurtaların kuluçka makinelerine konması ile de sağlanabilmektedir (Aksoy, 1999; Şenköylü, 2001). Embriyo döneminden cıvciv gelişimine kadar 46 evre bulunur ve embriyo gelişimi çeşitli evreleri içerir (Hamburger vd., 1951). Çalışma kapsamında cıvciv embriyolarının 44-48 saatlik dönemi incelendiği için burada Evre-13'e kadar olan bölüm anlatılmıştır.

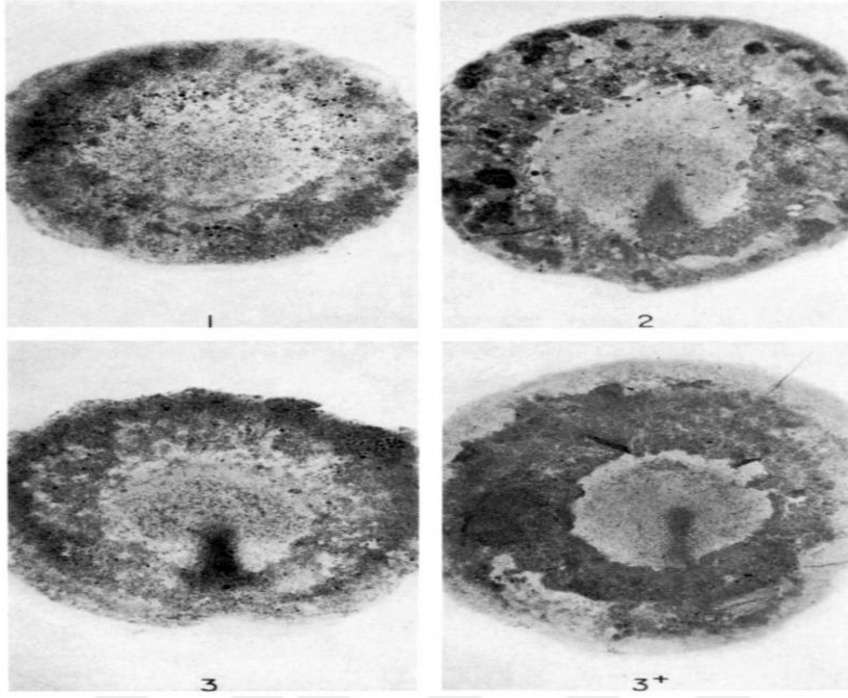
Evre-1 (İlk çizgi): İlkel çizginin oluşumu gerçekleşir. Blastodermin arka yarısına doğru hücrelerin toplanması sonucu oluşan embriyonik katlantı görülebilir.

Evre-2 (Başlangıç çizgisi): İnkübasyondan yaklaşık 6-7 saat sonraki dönemdir ve geçici bir evredir.

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

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

İlk dört evreye ait görüntü Resim 1.3'te gösterilmiştir.



Resim 1.3: Hamburger Hamilton evrelemesine göre Evre 1- arası embriyolar (Petorak, 1984).

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 henüz görülmemektedir. Baş oluğu ve ilk somit çiftinin oluşumu için embriyo gelişimi devam etmektedir.

Evre-7 (Bir somit): (23-26 saat) Nöral katlantılar baş bölgesinde görünür hale gelmiştir. Bu dönemde 2 somit vardır.

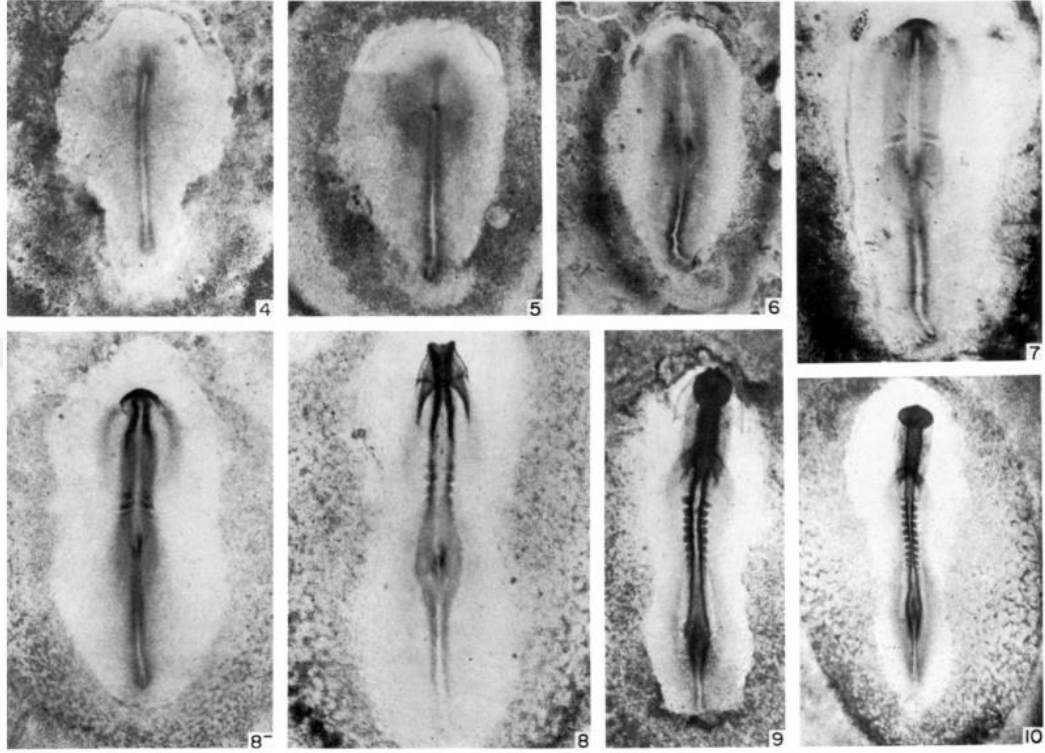
Evre-8 (Dört somit): (26-29 saat) Nöral katlantılar orta beyin seviyesinde birleşirler. 4 somit vardır ve blastodermin posterior yarısında kan adacıkları görülmeye başlar.

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 saatlik embriyoda 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 5-10 arasına ait görüntü Resim 1.4'te gösterilmiştir.



Resim 1.4: Hamburger Hamilton evrelemesine göre Evre 5-10 arası embriyolar (İnt. Kay. 15, 2021).

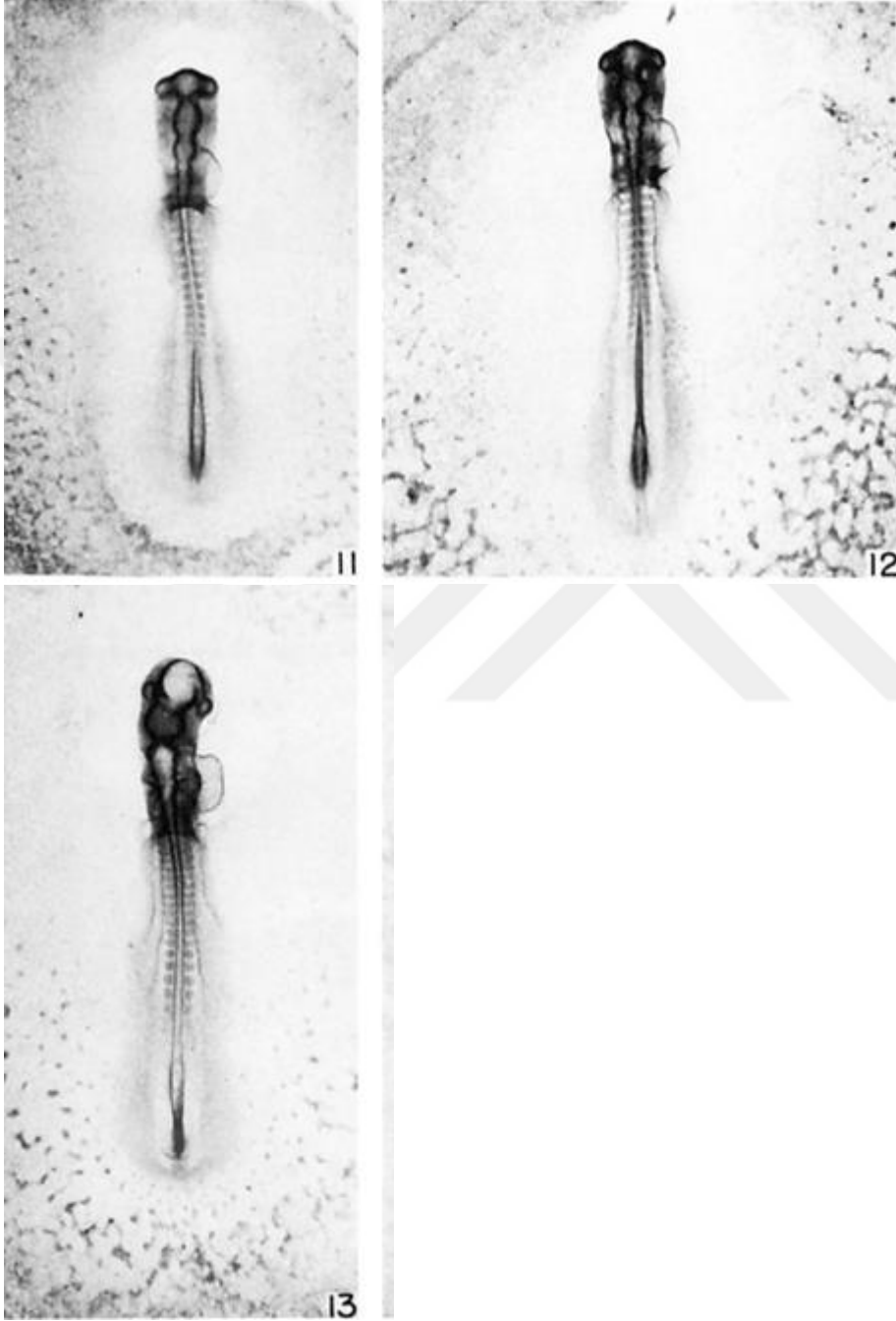
Evre-11 (On üç somit): (40-45 saat) Hafif bir kranial katlantı vardır. Arka beyin 5 nöromere ayrılmıştır. Ön nöropor kapanmaya başlamıştır. Optik kesecikler belirginleşir. Kalp sağa yerleşmiştir. Bu evrede somit sayısı 13'tür.

Evre-12 (On altı 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 açıktır. Kalp hafif bir S şeklini alır. Amniyonun baştaki katlantısı ön beyin bölgesinin girişini kaplamıştır. Somit sayısı 16'dır.

Evre-13 (On dokuz 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 11-13 arası ait görüntü Resim 1.5'te gösterilmiştir.



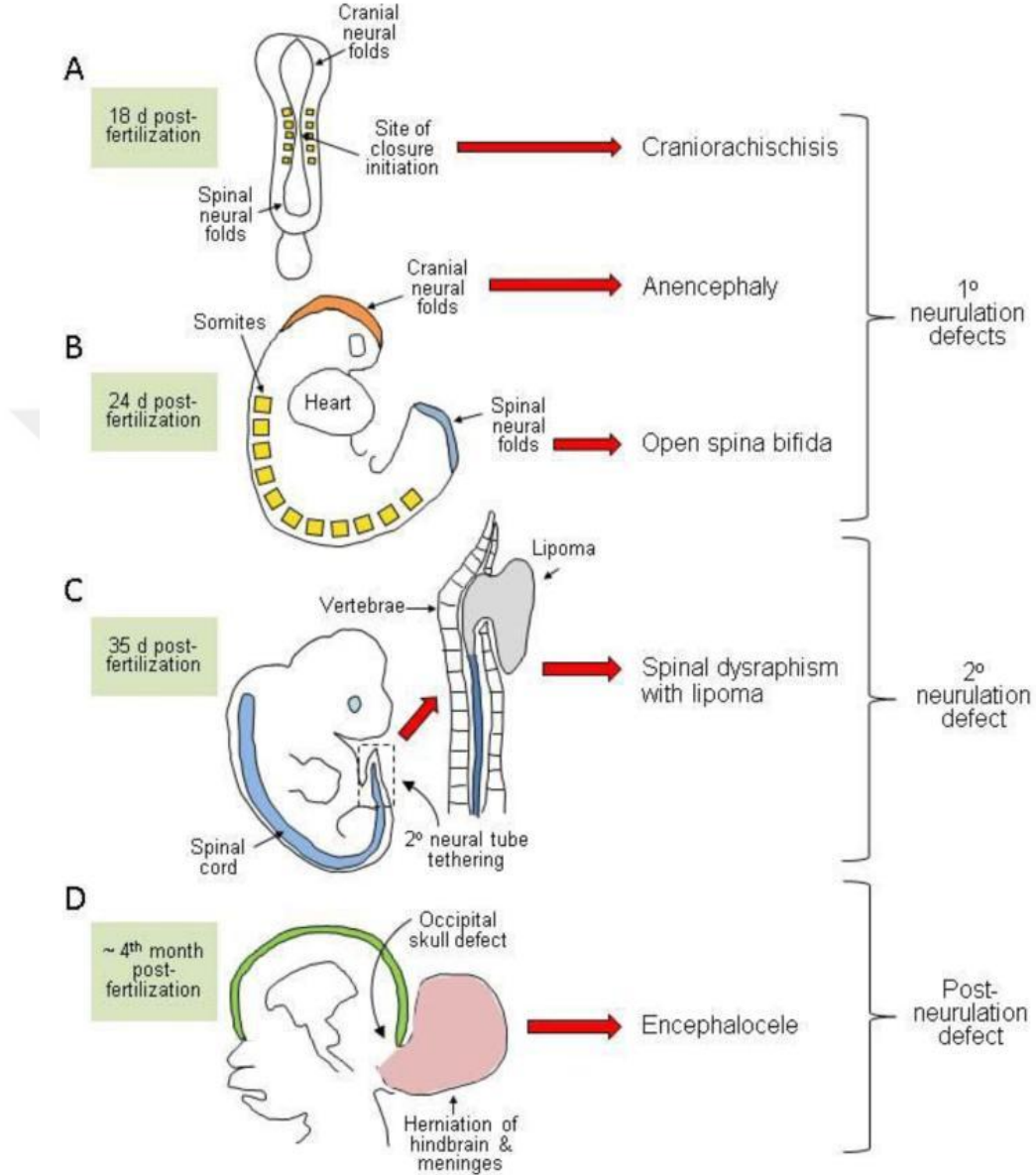
Resim 1.5: Hamburger Hamilton evrelemesine göre Evre 11-13 arası embriyolar (İnt. Kay. 15, 2021).

1.3. Nöral Tüp Defektleri

Nöral tüpün oluşumu ve kapanma dönemini kapsayan embriyolojik yaşamın ilk dört haftasında, embriyoyu etkileyen faktörler sonucu nöral tüpün çeşitli kısımlarının kapanmasındaki yetersizliktir. Kapanmanın ne zaman ve ne kadar kesintiye uğradığına bağlı olarak hem kranial hem de kaudal uçlarında defektler oluşabilir (Ermiş ve Erdoğan, 2001). Bu sorun insanda nöral tüpün kapanmasındaki kritik günler olan döllenmeden sonraki 23 ve 28. günler arasında meydana gelir ve bu durumda nöral tüp defekti oluşumuna yol açar. Nöral tüp defektleri merkezi sinir sisteminin heterojen ve kompleks konjenital anomalileridir. Nöral tüp defektleri embriyoda nöral tüpün kapanmasındaki hatalar sonucu oluşmaktadır. Nedeni tam olarak bilinmemekle beraber çevresel ve genetik faktörlerin bir arada rol oynadığı düşünülmektedir. Nöral tüp defektleri (NTD) embriyoda nöral tüpün kapanmasındaki hatalar sonucu oluşmaktadır. Tüm dünyada NTD'lerin bütün formlarının insidansı 1000 canlı doğumda 1,4-2 arasındadır. NTD, herhangi bir bozukluğa neden olmayacak kadar basit ya da ağır nörolojik hasara yol açabilecek veya yaşamla bağdaşmayacak kadar ağır ve karmaşık olabilir. Bu defektler tipine ve bulunduğu bölgeye göre ciddiyet olarak farklılık göstermektedir. Konjenital malformasyonlar tedavi ve rehabilitasyonları zor ve masraflı olan, aile ve topluma büyük maddi ve manevi yükler getiren halk sağlığı sorunlarıdır. Prekonsepsiyonel dönemde konjenital malformasyonlara yol açan faktörlerin belirlenmesi ve gebelik takiplerinde erken tanı ile gerekli önlemlerin alınmasının önemini artırır (Copp vd., 2010; Liu vd., 2017). Nöral tüp defektlerinin beraberinde görülen ortopedik, ürolojik ve nöroşirujik patolojiler sebebiyle oluşturulan multidisipliner tedavi yaklaşımlarında dahi morbidite ve mortalite oranları yüksektir (Blencowe vd., 2010; Yi vd., 2011). Kranial defektler, anensefali, eksensefali, ensefalosel, İniensefali, spinal defektler açık kapalı, meningosel, meningomiyelosel olarak tanımlanmaktadır (Resim 1.6).

Ülkemizde her yıl yaklaşık 5000 çocuk bu hastalıkla doğmaktadır. Risk faktörleri araştırıldığında annenin yaşı, eğitim düzeyi ve yaşadığı bölgeye göre farklılık gösterdiği, eğitim düzeyi düşük, üç ve üzeri doğum yapmış ve küçük yaştaki kadınlarda daha sık görüldüğü bildirilmektedir. Ayrıca NTD sıklığı başta beslenme,

coğrafi bölge, ırk ve çevresel etkenlere bağlı olarak farklılık göstermektedir (Tunçbilek vd., 1999).



Resim 1.6: NTD alt tipleri kapanış aşama görseli (Greene ve Copp, 2014)

İnsanlarda yaygın olarak nöral tüp defektleri olarak sınıflandırılan malformasyonların gelişimsel kökeni Resim 1.6'da gösterilmiştir. Resim 1.6'ya göre A ve B primer nörolasyon bozuklukları arasında, nöral tüpün kapanmayı başlatamadığı durumu göstermektedir. Beynin çoğu ve tüm omurganın açık kaldığı duruma kraniorakşizis (A) adı verilir. Kapatma başarılı bir şekilde başlatılırsa, kranial ve / veya spinal nöral kıvrımlar (B) kapanamaz. (C) İkincil nörolasyon

bozuklukları, nöral tüpün bitişik dokulardan tamamen ayrılmaması, böylece bağlama ve hareketliliğin azalmasını içerir. Omurilik cilt tarafından kaplanır ve genellikle henüz bilinmeyen mekanizmalar yoluyla yağ dokusu birikimi (lipoma) ile ilişkilidir. (D) İskelet sonrası kemik yapısı tam olarak gelişmediğinde, postnörülasyon sonrası kusurlar ortaya çıkabilir. Beyin dokusu olsun olmasın, meninkslerin bir kafatası defekti yoluyla fıtıklaşması (burada oksipital olarak fakat bazen paryetal veya fronto-etmodiyal olarak gösterilmiştir) ensefalosel üretirken, spinal bölgedeki benzer bir kusur meningosel üretir (Greene ve Copp, 2014).

1.4. Liraglutid

Liraglutid, genel olarak kandaki glukoz seviyesini düşüren metabolik hormonlar ailesinin bir üyesi olan Glukagon Benzeri Peptit-1 (GLP-1) ile aynı reseptöre bağlanarak daha uzun süreli etki sağlayan bir GLP-1 analogudur. Liraglutid tıpkı insan GLP-1 hormonunun yaptığı gibi endojen insülin salgılanmasını artırır. Novo Nordisk Firması tarafından geliştirilen bu ürün 3 Temmuz 2009 tarihinde Avrupa İlaç Kurumu ve 25 Ocak 2010 yılında da Food and Drug Administration (FDA) tarafından tip 2 diyabetin tedavisi için uygulanan enjekte edilebilir bir ilaç olarak onaylamıştır. FDA 23 Aralık 2014 tarihinde Avrupa İlaç Ajansı 23 Ocak 2015 tarihinde, vücut kitle indeksi 30'dan fazla olan obez kişiler tarafından, ya da, yine Vücut Kitle İndeksi 27 ya da daha fazla olan aşırı kilolu ve aşırı kiloya bağlı olarak gelişen en az bir tane komplikasyon yaşayan kişilerin tedavisi için onaylanmıştır. Bu etken maddenin 2015 yılında farklı bir dozaj formu Amerika ve Avrupa'da obez olan ya da aşırı kilolu olup, bu aşırı kilolara bağlı olarak en azından bir komplikasyon yaşayan hastaların tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır (İnt. Kay. 8, 2021; Goldstein vd., 2007).

Liraglutid, kan şekeri yükseldiğinde pankreatik beta hücrelerinden insülin salınımına yol açar. Bu insülin salınımı kandaki glukoz konsantrasyonları azalınca kadar devam eder ve öglisemiye (normal kan şekeri seviyesi) yaklaşıncaya kadar devam eder. Aynı zamanda glukoz bağımlı bir şekilde glukagon salgılanmasını azaltır ve gastrik boşalmayı geciktirir. Endojen GLP-1'in aksine, Liraglutid, 13 saatlik bir plazma yarı ömrü ile peptidazlar tarafından metabolik degradasyona (kendini

oluşturan basit parçalara ayrılması, bozulma, yıkılma) karşı stabildir (İnt. Kay. 8, 2021).

Endojen GLP-1, vücutta yaygın olarak bulunan enzimler olan, dipeptidil peptidaz-4 (DPP4) ve nötr endopeptidazlar (NEP) ile bozunmasına bağlı olarak 1,5–2 dakikalık bir plazma yarı ömrüne sahiptir. Kas içine enjeksiyondan sonraki yarı ömrü yaklaşık yarım saattir, bu şekilde uygulandığında bile, terapötik bir ajan olarak sınırlı bir kullanımı vardır. GLP-1'in metabolik olarak aktif formları, endojen GLP-1-(7-36) NH₂ ve daha nadir olan GLP-1-(7-37)'dir. Liraglutid'in etki süresinin uzatılması, bir yağ asidi molekülünün, GLP-1-(7-37) molekülünün bir pozisyonuna bağlanmasıyla elde edilir, böylece hem kendiliğinden birleşir hem de cilt altı dokusu ve kan akımı içinde albümine bağlanır. Aktif GLP-1 daha sonra albümin'den yavaş ve sabit bir oranda salınır. Liraglutid'in albümine bağlanması, GLP-1-(7-37) ile karşılaştırıldığında, daha yavaş bir enzimatik yıkıma uğraması ve ilacın renal eliminasyonunun azalması ile sonuçlanır (Goldstein vd., 2007).

1.4.1.Tiroid kanseri

İnsanlarda rutin olarak kullanılan sekiz kat daha fazla dozlara maruz bırakılan sıçanlarda, Liraglutid, tiroid tümörlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmuştur. Bu bulgunun klinik önemi bilinmemektedir (İnt. Kay. 13, 2021).

1.4.2.Pankreatit

2013 yılında, Johns Hopkins'deki bir grup araştırmacı akut pankreatit için hastaneye yatış yapan hastalar ile GLP-1 türevleri (exenatid gibi) ve DPP-4 inhibitörleri (sitagliptin gibi) ile önceden tedavi gören hastalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğunu bildirmiştir (Singh vd., 2013).

1.4.3. Liraglutid Kimyasal Formül ve Gebelikte kullanımı

Kimyasal formülü $C_{172}H_{265}N_{43}O_{51}$ olan liraglutid'in gebelik durumu kullanımı Amerika Birleşik Devletlerinde C, Avustralya'da ise B3 olarak, uygulama yolu ise cilt altına enjeksiyon olarak tanımlanmıştır (İnt. Kay. 14, 2021).

1.4.4. Liraglutid Dozu

Liraglutid yetişkinler için bir hafta boyunca günde bir kez alınması gereken doz 0.6 mg'dir. Bir hafta sonra, dozaj günde bir kez deri altından 1.2 mg olarak ayarlanabilir, günde 1.8 mg'a kadar artırılabilir. Liraglutid bakım dozu günde 1.2 ve 1.8 mg arasında olmalıdır. Bununla birlikte, maksimum doz günde 1.8 mg'dir (İnt. Kyn.4).

1942 yılında Metropolitan Hayat Sigortası Şirketi vücut ağırlığı ve ölüm oranı arasındaki ilişkiye bakarak “ideal” kiloyu (Akt. Komaroff, 2016), ardından 1959 yılında “arzu edilen” kiloyu (Metropolitan Hayat Sigortası Şirketi, 1959; Society of Actuaries, 1959) ve sonunda 1983 yılında “boya göre kilo” tablosunu oluşturmuştur (Metropolitan Hayat Sigortası Şirketi, 1983). Bu standart tablolar DSÖ tarafından belirlenen ve tüm yetişkinler için geçerli olan sınıflandırmanın temelini olmuştur. Obezite, hem yetişkinleri hem de çocukları etkileyen, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde yaygın olan, yağ dokusunun aşırı büyümesi olarak tanımlanan, kronik bir hastalıktır (DSÖ, 2000). “Aşırı kilo” ve “obezite” terimleri bilimsel literatürde ve günlük dilde birbirinin yerine kullanılsa da bu iki kavram farklıdır. “Aşırı kilo” boy ve yaşa göre standarttan daha kilolu olanları belirtir, “obezite” ise aşırı vücut yağını ifade eder (Field vd., 2003).

Obez kelimesi Latince “şişman, tumbul” anlamına gelen “obesus” dan türetilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) obeziteyi “vücut yağ miktarının sağlığı bozacak şekilde aşırı veya anormal birikmesi” olarak tanımlanmaktadır. Obezite tek bir şekilde açıklanamayan, tıbbi, sosyal ve psikolojik pek çok komplikasyonu olan karmaşık bir sağlık sorunudur (İnt. Kyn. 2).

NTD anne obezitesi ile olan ilişki özellikle dikkat çekicidir ve dünya çapında çeşitli popülasyondaki çalışmalarda tutarlı bir şekilde rapor edilmiştir. Obezite ile ilişkili riskler spina bifida için anensefali ile karşılaştırıldığında daha kuvvetlidir. Obezite (vücut kitle indeksi > 35) ile spina bifidayı birbirine bağlayan "doz yanıt" ilişkisini gösteren daha büyük risklerle ilişkilendirilmiştir (Stothard vd., 2009; Carmichael vd., 2010).

2. MATERYAL ve METOT

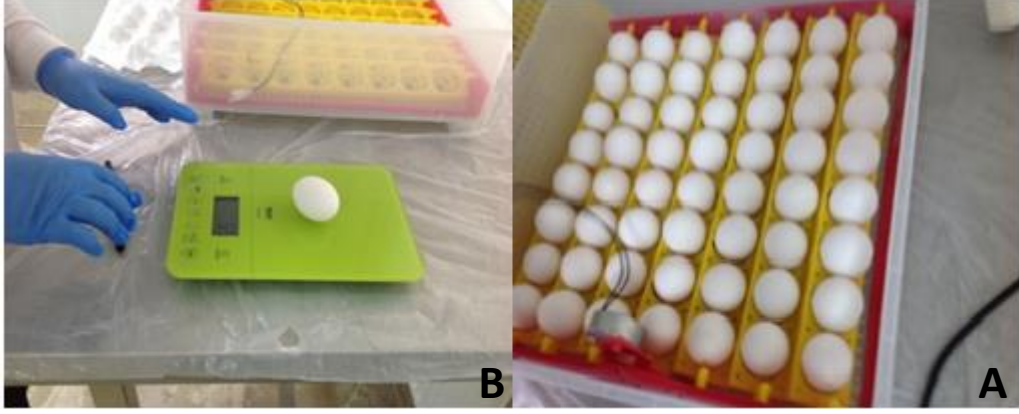
Bu çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneylei Yerele Etik Kurulu'ndan (AKUHADYEK) 24/02/2020 tarih ve 49533702/216 sayılı kararı ile etik kurul izni alındı (EK-1). Çalışmanın her aşamasında yapılan tüm işlemler etik kurul yönergesinde belirtilen kurallara uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışmanın deney aşaması Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda makroskobik ve mikroskobik incelemeleri ise Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

2.1. Deney Sırasında Kullanılan Kimyasallar

- Liraglutid ($C_{172}H_{265}N_{43}O_{51}$)
- Hematoksilen
- Eosin
- May-Grünland Giemsa
- Parafin
- Baticon
- Ethanol %99
- Methanol
- Ksilen
- Formaldehit
- Entellan

2.2. Deney Hayvanı

Ağırlıkları 61 ± 5 gr arasında; 100 adet, beyaz, fertil ve 0 günlük SPF (specific pathogen free) (EK-2) yumurtalar kullanıldı. Bu özel patojen bulunmayan yumurtalar İzmir Bornova Veteriner Kontrol Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edildi. (Resim 2.1)



Resim 2.1:(A) Fertil 0. gün SPFYumurtalar ve tartılması (B)

2.3.Laboratuvar Koşulları

Deneyde Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Laboratuvarında bulunan inkübatör ve yukarıda belirtilen malzemeler ilave olarak, büyük cam kap, petri kutusu, steril şeffaf kaşık, penset, forceps, makas, gaz tampon, Hamilton mikroenjektörü, ipek flaster, parafilm, distile su, plastik kapaklı kap, hassas terazi, baticon, alkol, mikropipet, enjektör ve elde edilen embriyoların saklanması için %10'luk formaldehit solüsyonu olarak sıralandı.

2.4.İnkübatör

Deneyde AFSÜ Anatomi Laboratuvarındaki mevcut olan ve önceki çalışmalarda da kullanılan, standardizasyonu yapılmış otomatik inkübatör kullanıldı. İnkübatör standardizasyonu $37.5\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ sabit ortam sıcaklığı ve $\%60\pm 5$ bağıl nem oranı olarak belirlendi (Resim 2.2). İnkübatör, istenen ideal ortam sıcaklığına bağıl nem oranına ulaşınca kadar 1 saat süreyle boş olarak çalıştırıldı. Yumurtalar kuluçka makinesine dar kısmı aşağıya gelecek şekilde yerleştirildi. Her 2 saatte bir 45° açıyla otomatik olarak döndürülmesi otomatik olarak ayarlandı.



Resim 2.2: Yumurtaların yerleştirildiği inkübatör (A, B)

2.5. Deney Gruplarının Oluşturulması

SPF yumurtalar aşağıda belirtilen üç deney ve bir kontrol olmak üzere dört gruba ayrıldı (Tablo 2.1). Her grupta 25 SPF yumurta yer aldı. SPF yumurtalar için uygun ısı ve nem ($37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ ısı ve $\%60 \pm 5$ nem) koşulları sağlandı ve 48 saat boyunca takip edildi.

Tablo 2.1: Deney grupları ve uygulanan ilaçların dozları

Gruplar	Kullanılan Etken Madde ve Dozları	Veriliş Yolu ve Hacmi
Grup 1	Liraglutid 30 mg/kg	Subblastodermik alana 0.03 ml
Grup 2	Liraglutid 150 mg/kg	Subblastodermik alana 0.03 ml
Grup 3	Liraglutid 300 mg/kg	Subblastodermik alana 0.03 ml
Grup 4	Kontrol	Sham

Çalışmanın 24 ile 28. saatleri arasında döllenmiş yumurtalar inkübatörden çıkarıldı. Steril şartlar altında (Yumurta kabuğunun batıkon ve $\%70$ etil alkol ile dezenfeksiyonu sağlandı) steril forcepsler yardımı ile yaklaşık 0.5 cm'lik pencereler açıldı ve embriyo görüldü. Açılan kabuk pencereden Hamilton mikroenjektörü ile yaklaşık 45° açı verilerek daha önce hazırlanmış, çalışma prosedüründe belirtilen dozlardaki teratojen ajan Liraglutid (Saxenda 6 mg/3 ml pre-filled-pen, novo nordisk) steril şartlarda serum fizyolojikte çözülerek tüm gruplara 30 μl subblastodermik enjekte edildi (Resim 3.4). Kontrol grubuna ise herhangi bir ajan enjekte edilmedi. Enjeksiyon sonrası tüm yumurtalardaki delikler steril drape ile

kapatıldı ve kapatılan yumurta 180⁰ derece çevrilerek kuluçka makinesine tekrar yerleştirildi.

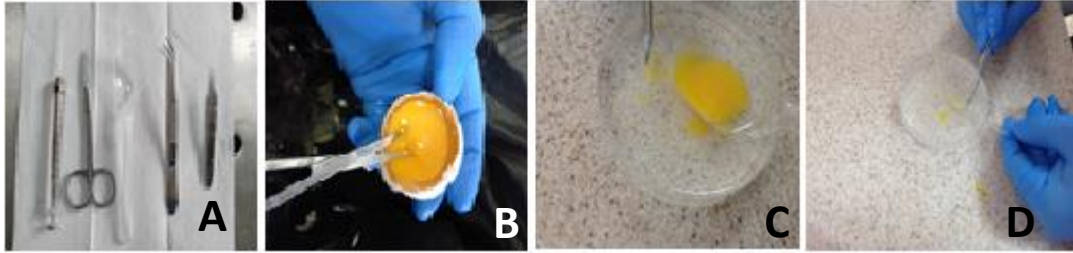


Resim 2.3: Yumurta işaretlenmesi, pencere açılması(A) ve H&H enjektörü ile Liraglutid verilmesi(B) , Parafilm ve ipek flaster (C), Enjeksiyon sonrası inkübatöre yerleştirme(D)

2.6.Embriyoların Elde Edilmesi

İnkübasyonun 44-48. saatinde SPF yumurtalar en son duruş pozisyonları korunarak inkübatörden alınıp, oda ısısında soğutuldu. Yumurta kabuğu üzerine povidon iyodür ve sonrasında %70 etil alkol dökülerek dezenfeksiyonu sağlandı. Yumurtalar forceps yardımı ile tepesinden kırılarak büyük bir pencere açıldı. Açılan pencerenin ardından yumurta zarı (koryoallantoik membran) kaldırıldı. Kaldırılan zarın altında embriyonal disk tespit 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 hazırlanmış olduğumuz, içerisinde distile su bulunan petri kabına alındı.(Resim 2.4)



Resim 2.4: (A) Steril malzemeler, (B) Embriyonal diskin kesimi, (C) Embriyonun petri kutusuna alınması, (D) Embriyonun lama alınması

Petri kabındaki distile su içindeki embriyolar % 10 formaldehit çözeltisi içerisine alındı.



Resim 2.5: Petri kutusundan formaldehit solüsyonuna alınan embriyolar

2.7.Embriyoların Makroskopik ve Mikroskopik İncelenmesi

% 10 formaldehit içindeki örnekler 48 saat sonunda % 5 formaldehit solüsyonuna alındı ve 48 saat bekletildi. Daha sonra lama alınan embriyolar pipet yardımıyla distile su ile yıkanıp Hamburger-Hamilton Tavuk Embriyo Sınıflandırma Sistemi temel alınarak, ışık mikroskobu yardımıyla 40'luk büyütme altında değerlendirildi. Nöral tüpün açık veya kapalı olması, krano-kaudal uzunluğu, embriyolojik gelişim olup olmaması ve somit sayıları belirlendi ve embriyolar sınıflandırıldı. Dört embriyoda açma hatası, beş embriyoda ise boş olması nedeniyle çalışma dışı kalmıştır.

Mikroskopik inceleme için embriyolar lamlara alınarak öncelikle şeffaflaştırma işlemine tabi tutuldu (Tablo 2.2). Şeffaflaştırma işleminin ardından Tablo 2.3'deki

prosedüre göre Hematoksilen ve Eosin boyaları ile boyama yapılarak lamalar entellan vasıtasıyla kapatıldı.

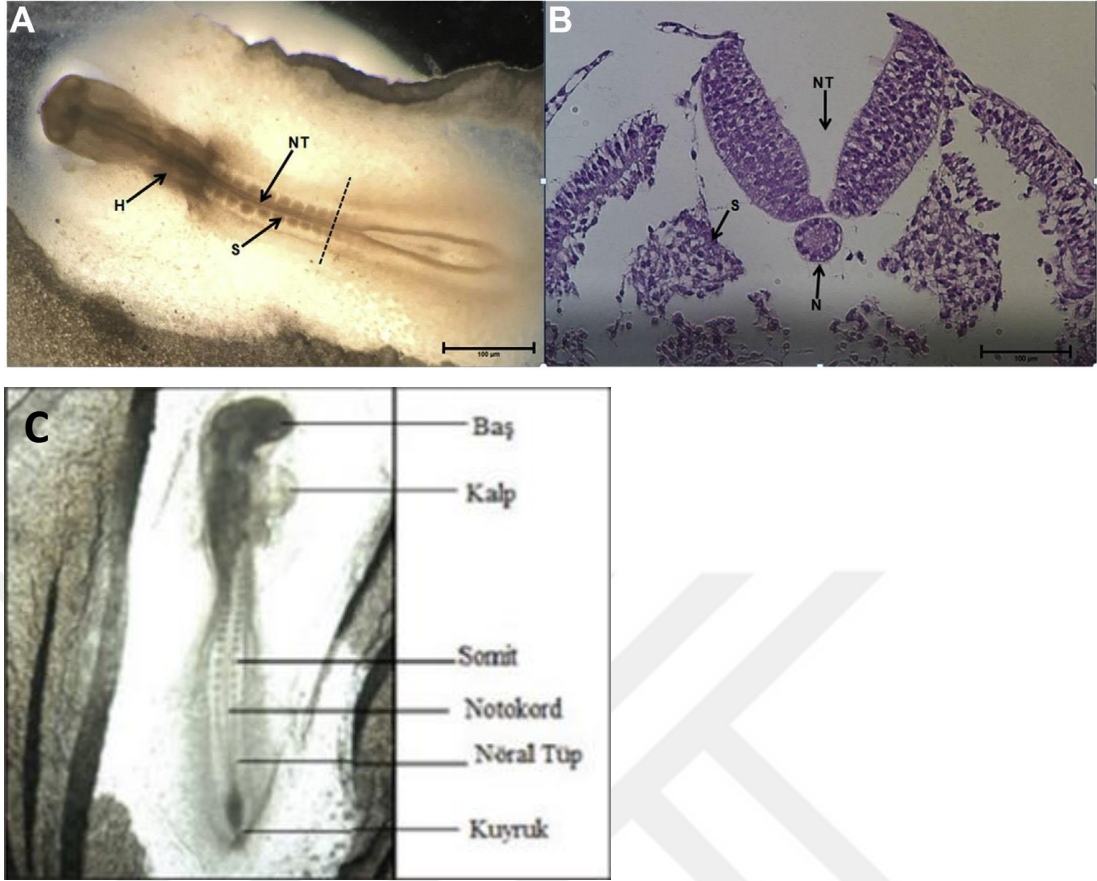


Tablo 2.2: Şeffaştırma Prosedürü

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 Formalin	48 saat
Tespit	%5 Formalin	48 saat
Fiksatifin Uzaklaştırılması	Distile su	5 dakika
Dehidratasyon	%50 Etil Alkol	3 dakika
Dehidratasyon	%60 Etil Alkol	3 dakika
Dehidratasyon	%70 Etil Alkol	3 dakika
Dehidratasyon	%80 Etil Alkol	3 dakika
Dehidratasyon	%90 Etil Alkol	3 dakika
Dehidratasyon	%100 Etil Alkol	3 dakika
Dehidratasyon	%100 Etil Alkol	3 dakika
Şeffaştırma	Ksilen	2 dakika

Tablo 2.3: Hematoksilen ve Eosin Boyama Prosedürü

İşlem	Madde	Süre
Rehidratasyon	%95 Alkol	2 dakika
Rehidratasyon	%80 Alkol	2 dakika
Rehidratasyon	%70 Alkol	2 dakika
Rehidratasyon	%60 Alkol	2 dakika
Yıkama	Pipetle distile	3 saniye
Kurulama	Lamda kalan distile suyu	½ dakika
Boyama	Hematoksilen	45 saniye
Yıkama	Pipetle distile	1 dakika
Kurulama	Lamda kalan distile suyu	½ dakika
Boyama	Eosin	45 saniye
Yıkama	Pipetle distile	3 saniye
Kurulama	Lamda kalan distile suyu	½ dakika
Şeffaştırma	Ksilen	1 saat
Kapatma	Entellan	(Lamel)



Resim 2.6: Açık nöral tüplü civciv embriyosunun ışık mikroskobu görüntüsü H, kalp; N, notokord; NT, nöral tüp; S, somit. (A), Açık nöral tüplü civciv embriyosunun (H&E) ile boyanması (B), Civciv embriyosu (Güvenç, 2013). (C)

2.8.Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 20 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılarak yapıldı. Veriler nöral tüp pozisyonu (açık/kapalı) ki-kare testi kullanılarak analiz edildi. Embriyoların baş-kıç uzunluğu, somit sayısı, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney U, One Sample Custom ve Simirnowtestleri kullanılarak analiz edildi. $P < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veriler ortalama \pm standart sapma şeklinde gösterildi.

3. BULGULAR

Çalışmamızda değişik dozlarda liraglutid'in nöral tüp gelişimi üzerine etkisi araştırıldı ve liraglutid verilen gruplarla kontrol grubuna ait bulgular ayrı başlıklar halinde sunuldu. Kontrol grubunda 22, düşük doz grubunda 21, orta doz grubunda 22 ve yüksek doz grubunda 22 embriyo incelendi. Morfolojik değerlendirmede nöral tüpün açık veya kapalı olması, baş-kıç uzunluğu, embriyolojik gelişim olup olmaması ve somit sayıları ışık ve stereo mikroskop ile değerlendirildi. Mikroskoik incelemelerde Hematoksilen – Eozin ve May-Grünwald Giemsa Boyama yöntemleri uygulandı. Ortalama değerler ve istatistiksel analizler tablo halinde ifade edildi.

Yapılan çalışma sonucunda gruplar arası nöral tüp açık-kapalılık durumu Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1: Gruplar arası nöral tüp açık-kapalılık durumu

Parametreler	Kontrol	Düşük Doz	Orta Doz	Yüksek Doz
Nöral Tüp_Açık	1	1	3	3
Nöral Tüp_Kapalı	21	20	19	19

Tablo 3.1.'e göre Düşük doz (30 µg/ kg /1,5 µg/yumurta başı) liraglutid enjeksiyonu sonrası 20 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%80), 1 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%4), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı (%4) ve 2 embriyoda ise açma hatası olduğu (%8) görüldü. Orta doz (150 µg/kg/7,5 µg/yumurta başı) liraglutid enjeksiyonu sonrası 19 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%76), 3 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%12), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı (%4) ve 1 embriyoda ise açma hatası olduğu (%4) görüldü. Yüksek doz (300 µg/kg/15 µg/yumurta başı) liraglutid enjeksiyonu sonrası 19 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%76), 3 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%12), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı (%4) ve 1 embriyoda ise açma hatası olduğu (%4) görüldü. Kontrol grubunda ise 21 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%84), 1 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%4), 1 embriyoda gelişim

geriliği olduğu (%4), 2 embriyoda diskin oluşmadığı (%8) ve açma hatası olmadığı (%0) gözlemlendi.

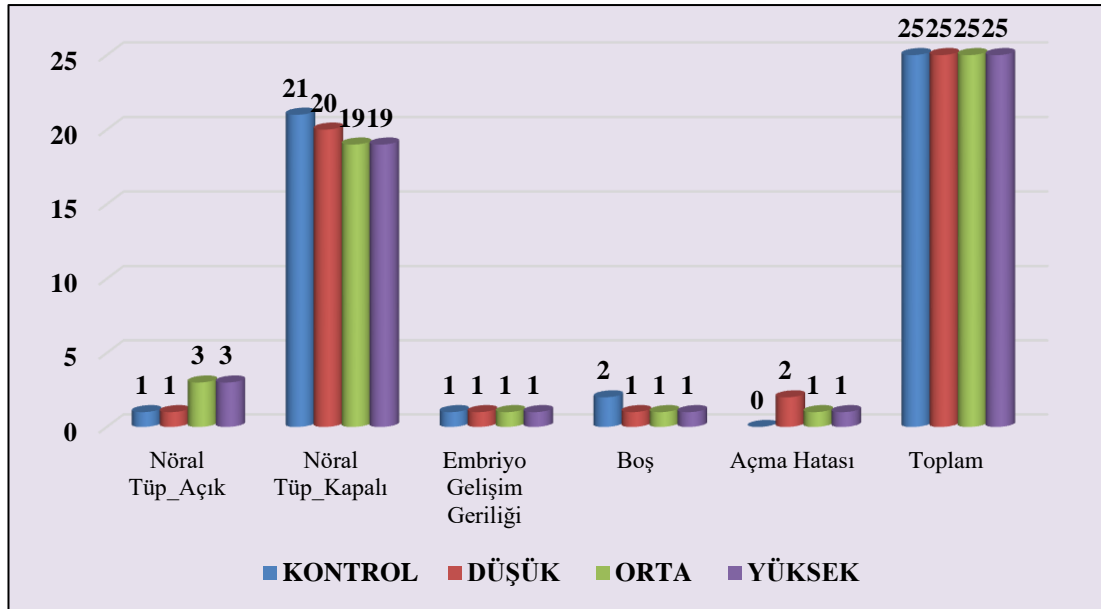
Tablo 3.2:Gruplara göre somit sayısı ve baş-kıç ölçümlerinin dağılımı

Gruplar	Somit Sayısı MEANS ±SE	Baş-Kıç(μm) MEANS ±SE
Kontrol	16,27 ± 0,26	670,50 ± 6,43 ^a
Düşük Doz	15,95 ± 0,31	660,37 ± 4,58 ^a
Orta Doz	15,45 ± 0,29	660,20 ± 6,48 ^a
Yüksek Doz	15,50 ± 0,31	631,62 ± 6,65 ^b
P Değeri	0,159	0,000

a,b : Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası farklılık önemlidir.

p<0,05 : Kontrol grubuna nazaran anlamlı olarak farklıdır

Tablo 3.2. incelendiğinde somit sayısı bakımından kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi (p>0.05). Aynı tabloya göre baş-kıç uzunlukları ortalaması kontrol grubu (670.50 μm) ile düşük doz (660.37 μm) ve orta doz (660.20 μm) gruplarında benzer iken yüksek doz grubunda 631.62 μm'ye düştüğü ve yüksek doz grubu ile diğer gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (P<0.05). Bu bulgu Liraglutid'in yüksek dozunun embriyoda gelişim geriliğine neden olabileceğini düşündürdü.



Şekil 3.1:Gruplar arası araştırılan tüm parametrelerin durumu

İncelenen tüm parametrelerin gruplara göre dağılımı gösteren çizelge Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.

1. grupta 30 µg/kg/1.5 µg/yumurta başı liraglutid enjeksiyonu sonrası 20 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%80), 1 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%4), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı (%4) ve 2 embriyoda ise açma hatası olduğu (%8) baş-kıç uzunluğunun 660.37 ± 20.98 µm olduğu, somit sayısının 15.95 ± 1.43 olduğu, embriyoların Hamburger Hamilton skalasına göre 11-12 evre aralığında olduğu,

2. grupta 150 µg/kg/7.5 µg/yumurta başı liraglutid enjeksiyonu sonrası 19 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%76), 3 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%12), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı (%4) ve 1 embriyoda ise açma hatası olduğu (%4), baş-kıç uzunluğunun 660.20 ± 30.39 µm olduğu, somit sayısının 15.45 ± 1.37 olduğu, embriyoların Hamburger Hamilton skalasına göre 11-12 evre aralığında olduğu,

3. grupta 300 µg/kg/15 µg/yumurta başı liraglutid enjeksiyonu sonrası 19 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%76), 3 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%12), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı (%4) ve 1 embriyoda ise açma hatası olduğu (%4), baş-kıç uzunluğunun 631.62 ± 31.05 µm olduğu, somit sayısının 15.50 ± 1.43 olduğu, embriyonun Hamburger Hamilton skalasına göre 11-12 evre aralığında olduğu,

4. grupta (sham grubu) 21 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%84), 1 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%4), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 2 embriyoda diskin oluşmadığı (%8), baş-kıç uzunluğunun 670.50 ± 30.14 µm, somit sayısının 16.27 ± 1.24 olduğu, embriyoların Hamburger Hamilton skalasına göre 11-12 evre aralığında olduğu saptandı.

4. TARTIŞMA

Merkezi sinir sistemi embriyolojik hayatta ilk fonksiyon göstermeye başlayan yapılardan biridir. Nöral tüp defektleri oluşumu multifaktöriyeldir. NTD'de birçok genetik ve çevresel faktör kranial ya da spinal disrafizm (bitişim bozukluğu) gelişiminde ortak rol alırlar. Oluşma ya da tekrarlama riski yalnızca anensefali, egzensefali, ensefalosel ve açık spina bifida gibi major anomalilerde gösterilmiştir. Nöral tüp defekti olan bir bebeğe sahip olma riski, o toplumdaki genel insidansa, ailede daha önce tanı alan hasta sayısına, hastaların yakınlık durumuna ve birçok başka faktöre bağlıdır. NTD, oluşmakta olan sinir dokusunun tüm ya da parçalı olarak kapanamaması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. NTD modeli oluşturma yöntemleri arasında; memeli, kanatlı, amfibiler ve bilgisayar modellemeleri oluşturma seçenekleri sayılabilir. Bu örneklerin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Memeli modellemeleri olan rat ve fareler daha karmaşık ve uzun süreli çalışma gerektirirken, kanatlı 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 (Tureci vd., 2011).

Embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin sıçan veya fare gibi kemirgenler ya da tavşanlar üzerinde ayrıntılı olarak test edilmesi gerekmektedir. İncelenen çalışmalarda ortalama 8-10 yumurta kullanılırken deneyimizde 25 yumurta kullanılmıştır. Kanatlı yumurtalarının kullanıldığı çalışmalarda test maddesinin uygun çözücüde çözünmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle en uygun steril bidistile su çözücü olarak kullanılmıştır. Literatür taramalarında da görüldüğü gibi deneyde önceki deneyler ile paralellik göstermektedir.

Nöral tüp kusurları merkezi sinir sisteminin en yaygın doğumsal anomalisi olup embriyonik gelişimin 3. ve 4. haftalarında nöral tüpün uygunsuz veya eksik kapanmasının bir sonucu olarak ortaya çıkar (Wang vd., 2019). Tavuk embriyo modelinin kullanıldığı NT'nin gelişimi üzerine birçok çalışma vardır (Yerby, 2003;Ertekin vd., 2019; Dady ve Duband, 2017; Mete vd., 2016). Tavuk

embriyosunun özellikle ilk 48 saatlik gelişimi memeli omurgasının embriyonik gelişiminin ilk ayına benzer. Bu nedenle civciv embriyolarının kullanımını nöral tüp bozukluğuna neden olabileceği düşünülen maddeler için için oldukça uygundur (Atay vd., 2020; Emon vd., 2015). Bazı çalışmalarda, en sık kullanılan teratojenik maddelerin NT'nin açık veya kapalı durumuna etkisi incelenmiştir (Yıldız ve Akbayrak, 2008; Song vd., 2012).

Erken civciv embriyo modelinde sitokalazinler, ionofor, papaverin, diazepam, verapamil, lokal anestetikler, etanol, metotreksat ve aminopterin gibi folat antagonistleri, fenitoin ve valproik asit gibi anti epileptikler, meloksikam benzeri non steroidal antiinflamatuar ilaç etken maddesine sahip ağrı kesicilerin nöral oluk birleşme kusurlarına yol açtığı raporlanmıştır. (Özer vd., 2012). Cetinkal (2010) çalışmasında yüksek doz meloksikamın erken civciv embriyo modelinde nöral tüp defekti tanısını arttırdığını saptamıştır. Vatansever vd. (2003) civciv embriyo modeli deneyinde metotreksatın 48-72 saatlik inkübasyondan sonra embriyolarda nöral tüpün kapanmasında kusurlara neden olduğunu bildirmiştir. Lee vd. (1982) erken dönem tavuk embriyolarında 500 µg/ml kafein maddesinin nöral tüp defekti gelişme sıklığını belirgin şekilde arttırdığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda liraglutid'in civciv embriyolarında nöral tüp açıklık / kapalılık durumuna etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Whitsel vd. (2002), epilepsi tedavisinde kullanılan valproik asitin teratojenik etkilerini incelemek için embriyoya 24. saatinde blastositin altına farklı dozlarda enjeksiyonunu yapmış, makroskopik olarak büyümede gerileme, göz dokusu ve iskelet sisteminde ait anomaliler tespit etmişlerdir. Ertekin vd. (2019) çalışmalarında Non Steroid Antioksidan bir ilaç olan diklofenak sodyumun, civciv embriyosunda nöral tüp kusurlarının yanında baş-kıç uzunluğu ve somit sayısını önemli ölçüde azalttığını ve nöron gelişiminin etkilendiğini göstermiştir. Çalışmamızda sadece yüksek doz liraglutid'in baş-kıç uzunluğunu düşürdüğü ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P<0.05$) belirlenmiştir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sunulan bu çalışma sonucunda genel olarak kandaki glikoz seviyesini düşüren ve kilo vermek için kullanılan ve liraglutid etken maddesini içeren ilacın civciv embriyolarında nöral tüp defektine sebep olmadığı tespit edilmiştir. Ancak hamileliklerine obezite ve tip 2 diyabetin eşlik ettiği durumlarda liraglutid kullanımı ile ilgili yapılacak çalışmalarda sinir dokusuna ait histokimya ve immünohistokimyasal boyamalarda daha nitelikli sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte yüksek doz verilen grupta baş-kıç uzunluğunda saptadığımız düşüşün, ileriki çalışmalarda liraglutid'in gelişim geriliğine olan etkilerinin daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdullayeve, N. (2020). Yenidoğanlarda Nöral Tüp Defektlerinde Risk Faktörlerinin Araştırılması, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık,103s, İzmir.
- Akan, N. (2002). Nöral tüp defektli bebek doğurma riski azaltılabilir, CÜ Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi, 6:42-48.
- Akosman, M.S. (2020). Kanatlı Anatomisi. Medipres Yayıncılık, Malatya, s: 64-67.
- Aksoy, F.T. (1999): Tavuk Yetiştiriciliği. 3.Baskı, Şahin Matbaası, Ankara.
- Aksoy, K. (2005).Temel Nöroşirürji (2. cilt), 1. Baskı, Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları, Ankara.
- Aksoy, T. (1999). Tavuk Yetiştiriciliği, 3. baskı, Şahin Matbaacılık, Ankara.
- Araki, H., Tanaka, Y., Yoshida, S., Morita, Y., Kume, S., Isshiki, K., Araki, S., Uzu, T., Kashiwagi, A., Maegawa, H. (2014).Oral glucose-stimulated serum C-peptide predicts successful switching from insulin therapy to Liraglutid monotherapy in Japanese patients with type 2 diabetes and renal impairment, J Diabetes Invest, 5(4): 435-441.
- Arkaç Toyran, A. (2019). Bir Aylık Ve Beş Aylık Erkek Ratlarda Medulla Spinalis'in Thoracal Segment'i Üzerine Yapılan Morfolojik Ve Stereolojik Bir Çalışma, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi / Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 97s, Van.
- Atay, E., Ayekin, S., Hatipoğlu, R. Z., Kural, M. C., Kuseyri, M., Taçyıldız, Y., ... & Ertekin, T. (2020). The Effect of Temperature on Angiogenesis in Chicken Embryos. *Kocatepe Veteriner Dergisi*, 13(1), 60-68.
- Atay, E., Ertekin, A., Bozkurt, E., Aslan, E. (2020). Impact of bisphenol A on neural tube development in 48-hr chicken embryos. *Birth Defects Res*, 112(4): 1386-1396.
- Baggio, L. L., Drucker, D. J. (2007). Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132(6): 2131-2157
- Baker, S. (1994). Neural tube defects, Greenberg MS, Handbook of Neurosurgery 3rd ed., Florida, Greenberg, 157-168.
- Bao, Y., Jiang, L., Chen, H., Zou, J., Liu, Z., & Shi, Y. (2015). The neuroprotective effect of Liraglutid is mediated by glucagon-like peptide 1 receptor-mediated activation of cAMP/PKA/CREB pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 36(6), 2366-2378.

- Batchuluun, B., Inoguchi, T., Sonoda, N., Sasaki, S., Inoue, T., Fujimura, Y., Miura, D., Takayanagi, R.. (2014). Metformin and Liraglutid ameliorate high glucose-induced oxidative stress via inhibition of PKCNAD(P)H oxidase pathway in human aortic endothelial cells, *Atherosclerosis*, 232: 156–164.
- Blencowe, H., Cousens, S., Modell, B., Lawn, J. (2010). Folic acid to reduce neonatal mortality from neural tube disorders. *International Journal of Epidemiology*, 39(suppl. 1): i110-i121
- Botto, L.D., Moore, C.A., Khoury, M.J., Erickson, J.D. (1999). Neural-Tube Defects, *NEnglJMed*, 341:1509–1519.
- Briyal, S., Shah, S., Gulati, A. (2014). Neuroprotective and anti-apoptotic effects of Liraglutid in the rat brain following focal cerebral ischemia, *Neuroscience*, 281: 269–281.
- Brocklehurst, G. (1976). Spina bifida for the clinician (Clinics in Developmental Medicine, No. 57). London: Spastics International Medical Publications, with Heinemann; and Philadelphia: Lippincott.
- Bursalı, A. (2010). Erken Tavuk Embriyosunda Valproik Asitin Nöral Tüp Gelişimindeki Olumsuz Etkisi Üzerine Folik Asit Etkinliğinin Değerlendirilmesi, Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık, 55s, Manisa.
- Calsolaro, V., Edison, P. (2015). Novel GLP-1 (Glucagon-Like Peptide-1) Analogues and Insulin in the Treatment for Alzheimer’s Disease and Other Neurodegenerative Diseases, *CNS Drugs*,; 29(12):1023-1039.
- Candeias, E.M., Sebastião, I.C., Cardoso, S.M., Correia, S.C., Carvalho, C.I., Plácido, A.I., Santos, M.S., Oliveira, C.R., Moreira, P.I., Duarte, A.I. (2015). Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug Liraglutid, *World J Diabetes*, 6(6): 807-827.
- Cantini, G., Di Franco, A., Samavat, J., Forti, G., Mannucci, E., Luconi, M. (2015). Effect of Liraglutid on proliferation and differentiation of human adipose stem cells, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 402:43–50.
- Carmichael, S. L., Rasmussen, S. A., Shaw, G. M. (2010). Prepregnancy obesity: a complex risk factor for selected birth defects. *Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology*, 88(10): 804-810.
- Cetinkal, A., Colak, A., Topuz, K., Demircan, M.N., Simsek, H., Berber, U., Umur, A.S., Selcuki M., Vatansever, S.(2010). The effects of meloxicam on neural tube development in the early stage of chick embryos, *Turkish neurosurgery*, 20(2):111-116.

- Cheng, X., Wang, X., Teng, X. (2015). Liraglutid attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury possibly through reducing cardiomyocytes apoptosis and oxidation in rats, *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, 43(3):259–263.
- Colas, J.F., Schoenwolf, G.C. (2001). Towards a cellular and molecular understanding of neurulation, *Dev Dyn*, 221:117–145.
- Copp, A. J. and Greene, N. D. (2010). Genetics and development of neural tube defects. *J. Pathol.*, 220 (2): 217-230.
- Çalığışu, A. (2018). Fossa Cubitalis'in Anatomik Özellikleri Ve Klinik Önemi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 100s, İzmir.
- Çolak, R. (2012). Tip 2 diabetes mellitus tedavisinde inkretinler. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 29(1s), 30-38.
- Dady, A., Duband, J.L. (2017). Cadherin interplay during neural crest segregation from the non-neural ectoderm and neural tube in the early chick embryo. *Dev Dyn*, 246(7): 550-565.
- Daly, S., Mills, J.L., Molloy, A.M., Conley, M., Lee, Y.J., Kirke, P.N. (1997). Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects, *Lancet*, London, 350:1666-1669.
- Darsalia, V., Larsson, M., Nathanson, D., Klein, T., Nyström, T., Patrone, C. (2015). Glucagon-like receptor 1 agonists and DPP-4 inhibitors: potential therapies for the treatment of stroke, *J Cereb Blood Flow Metab*, 35(5):718-23.
- Diz-Chaves, Y., Toba, L., Fandiño, J., González-Matías, L. C., Garcia-Segura, L. M., & Mallo, F. (2018). The GLP-1 analog, Liraglutid prevents the increase of proinflammatory mediators in the hippocampus of male rat pups submitted to maternal perinatal food restriction. *Journal of Neuroinflammation*, 15(1), 1-16.
- Dong, W., Miao, Y., Chen, A., Cheng, M., Ye, X., Song, F., Zheng, G. (2017). Delayed administration of the GLP-1 receptor agonist Liraglutid improves metabolic and functional recovery after cerebral ischemia in rats, *Neurosci Lett*, 641:1-7.
- Emon, S.T., Orakdogan, M., Uslu, S., Somay, H. (2015). Effects of the popular food additive sodium benzoate on neural tube development in chicken embryo. *Turk Neurosurg*, 25(2): 294-297.
- Ermiş, B.H., Erdoğan, C. (2001). Merkezi Sinir Sistemi Anomalileri. İçinde: *Obstetrik Maternal-Fetal tıp & Perinataloji*. Eds: Bektaş, M.S., Demir, N., Koç, A., Yüksel, A., MN Medikal ve Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, s: 283-299.
- Ertekin, T., Bilir, A., Aslan, E., Koca, B., Turamanlar, O., Ertekin, A., & Albay, S. (2019). The effect of diclofenac sodium on neural tube development in the early stage of chick embryos. *Folia morphologica*, 78(2): 307-313.

- Fernandes, L. S., Dos Santos, N. A. G., Emerick, G. L., Dos Santos, A. C. (2019). The antidiabetic drug Liraglutid minimizes the non-cholinergic neurotoxicity of the pesticide mipafox in SH-SY5Y cells. *Neurotoxicity Research*, 35(1): 150-159.
- Field, A. E., Bornoa, J., & Colditz, G. A. (2003). Obezitenin epidemiyolojisi, sağlık ve ekonomi üzerine etkileri. İçinde: Obezite Tedavisi El Kitabı Eds: Thomas, A. Wadden, Albert J. Stunkard. Çeviren: Saçıkara, A., Yılmaz, A.M., ,3-18.
- Gao, H., Zeng, Z., Zhang, H., Zhou, X., Guan, L., Deng, W., Xu, L. (2015).The Glucagon Like Peptide-1 Analogue Liraglutid Inhibits Oxidative Stress and Inflammatory Response in the Liver of Rats with Diet-Induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease, *Biol Pharm Bull* 38(5): 694-702.
- Garber, A., Henry, R., Ratner, R., Garcia-Hernandez, P.A., Rodriguez-Pattzi, H.,Olvera-Alvarez, I., Hale, P.M., Zdravkovic, M., Bode, B., LEAD-3 (Mono) Study Group.(2009).Liraglutid versus glimepiride monotherapy for type 2 diabetes (LEAD-3 Mono): arandomised, 52-week, phase III, double-blind, parallel-treatment trial, *Lancet*, 373: 473-481.
- Goldstein, B.J., Mueller-Wieland,D. (2007). Type 2 Diabetes: Principles and Practice, 2nd ed.,CRC Press, London.
- Goldstein, B.J., Mueller-Wieland,D. (2007). Type 2 Diabetes: Principles and Practice, 2nd ed.,CRC Press, London.
- Greene, N. D.,& Copp, A. J. (2014). Neural tube defects. *Annual review of neuroscience*, 37: 221-242.
- Güner, N. (2017). Kadavralardan Elde Edilen Beyinlerde Kortekse Ait Sulcus Ve Gyrus'ların Morfolojisinin İncelenmesi, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 123s, Bursa.
- Güvenç, Y., Dalgıç, A. (2014). Cıvciv Embriyolarında Omurilik Gelişim Modeli, Türk Nöroşirurji Derneği Spinal Cerrahi Grubu Bülteni , no.63, s: 11-15.
- Hamburger, V., Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88(1): 49-92.
- Hamburger, V., Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo, In: *Dev Dyn* (1992), 195:231–272.
- Han, L., Hölscher, C., Xue, G.F., Li, G., Li, D. (2016). A novel dualglucagon-like peptide-1 and glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor agonist is neuroprotective in transient focal cerebral ischemia in the rat, *Neuroreport* 27(1):23-32.

Hansen, H.H., Fabricius, K., Barkholt, P., Niehoff, M.L., Morley, J.E., Jelsing, J., Pyke, C., Knudsen, L.B., Farr, S.A., Vrang, N. (2015). The GLP-1 Receptor Agonist Liraglutid Improves Memory Function and Increases Hippocampal CA1 Neuronal Numbers in a Senescence-Accelerated Mouse Model of Alzheimer's Disease, *J Alzheimers Dis* , 6(4):877-888.

İlgaz, H.B. (2018). Temel Nöroanatomi Eğitiminde Fibril Diseksiyon, Traktografi, Mikroskopik Anatomi Ve Plastinasyon Tekniklerinin Birlikte Kullanım Modeli Oluşturulması, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 124s, Ankara.

Inoue, T., Inoguchi, T., Sonoda, N., Hendarto, H., Makimura, H., Sasaki, S., Yokomizo, H., Fujimura, Y., Miura, D., Takayanagi, R. (2015). GLP-1 analog Liraglutid protects against cardiac steatosis, oxidative stress and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats, *Atherosclerosis* 240(1):250-259.

İnt. Kay. 11, <https://wayback.archive-it.org/7993/20170111160832/http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm427913.htm/>, 18.3.2021

İnt. Kay. 12, <https://www.ema.europa.eu/en/news/saxenda-recommended-approval-weight-management-adults/>, 3.4.2021

İnt. Kay. 13, https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/022341lbl.pdf, 30.4.2021

İnt. Kay. 14, https://tr.wikipedia.org/wiki/Liraglutide#Tiroid_kanseri_kaygıları/, 28.5.2021

İnt. Kay. 15, https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Hamburger_Hamilton_Stages, 24.4.2021

İnt. Kay. 5, <https://dergipark.org.tr/article-file/396700>, 5.4.2021

İnt. Kay. 6, https://tr.wikipedia.org/wiki/Nöral_tüp/, 12.5.2021

İnt. Kay. 7, <https://tr.wikipedia.org/wiki/Notokorda/>, 22.4.2021

İnt. Kay. 8, https://www.drugs.com/nda/Liraglutid_080530.html/, 14.4.2021

İnt. Kay. 9, <https://www.clinicaltrialsarena.com/projects/Liraglutid/>, 18.5.2021

İnt.Kay.1, <https://acikders.ankara.edu.tr/course/view.php?id=>, 04.06.2021

İnt.Kay.10, <https://wayback.archive-it.org/7993/20170112033157/http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2010/ucm198638.htm/>, 13.4.2021

İnt.Kay.2, https://tuikweb.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1095, 26.04.2021

İnt.Kay.3,[http://www.echickatlas.org/ecap/hamburger_hamilton_stages/Stage Definition/ hh08definition.html](http://www.echickatlas.org/ecap/hamburger_hamilton_stages/Stage%20Definition/hh08definition.html), 15.02. 2021

İnt.Kay.4, <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/saxenda>, 09.04.2021

Jelsing, J., Vrang, N., Hansen, G., Raun, K., Tang-Christensen, M., Knudsen, L.B. (2012). Liraglutid: short-lived effect on gastric emptying—long lasting effects on body weight, *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 14(6): 531–538.

Kırar, F. (2017). Kas Gevşetici Olarak Feniramidolün Erken Dönem Tavuk Embriyolarında Nöral Tüp Gelişimi Üzerine Etkileri, Sağlık Bilimleri Üniversitesi / İstanbul Bakırköy Prof. Dr. Mazhar Osman Ruh Sağlığı ve Sinir Has. Eğt. ve Arş. Hastanesi, Tıpta Uzmanlık, 71s, İstanbul.

Kimura, T., Kaneto, H., Shimoda, M., Hirukawa, H., Okauchi, S., Kohara, K., Hamamoto, S., Tawaramoto, K., Hashiramoto, M., Kaku, K. (2015). Protective effects of pioglitazone and/or Liraglutid on pancreatic β -cells in db/db mice: Comparison of their effects between in an early and advanced stage of diabetes, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 400 :78–89.

Komaroff, M. (2016). For researchers on obesity: historical review of extra body weight definitions. *Journal of Obesity*, Vol. 2016, DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/2460285>

Kürtül, İ. (2018). Veteriner Anatomi. İçinde: Sinir Sistemi. Eds: Türkmenoğlu, İ., Demirkan, Ç.A., Özdemir, V., Akosman, M.S. Medipres Yayıncılık, Malatya, s: 495-498.

Lee, H., Nagele, R. G., & Pietrolungo, J. F. (1982). Toxic and teratologic effects of caffeine on explanted early chick embryos. *Teratology*, 25(1), 19-25.

Li, M., Li, S., Li, Y. (2015). Liraglutid promotes cortical neurite outgrowth via the MEK–ERK pathway. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(7): 987-993.

Liu, J., Li, Z., Greene, N. D., Li, H., Ren, A. (2017). The recurrence risk of neural tube defects (NTDs) in a population with high prevalence of NTDs in northern China. *Oncotarget*, 8(42): 72577.

Lovshin J.A., Drucker D.J. (2009) Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*, 5: 262–269.

Mete, M., Gurcu, B., Collu, F., Unlu Unsal, U., Duransoy, Y.K., Tuglu, M.I., Selcuki, M. (2016). Effects of lacosamide “a novel antiepileptic drug” in the early stages of chicken embryo development. *Childs Nerv Syst*, 32(9): 1715-1719.

- Metropolitan Life Insurance Company . (1983). Metropolitan height and weight tables. *Statistical Bulletin*, 64: 2-9.
- Metropolitan Life Insurance Company. (1959). New weight standards for men and women. *Statistical Bulletin*, 40, 1-4.
- Milunsky, A. (1986). The prenatal diagnosis of neural tube and other congenital defects. In *Genetic disorders and the fetus* (pp. 453-519). Springer, Boston, MA.
- Moore, K.L., Persaud, T., Torchia, M.G. (2019). *The Developing Human - Clinically Oriented Embryology*, 11th ed., Elsevier, Chennai.
- Muscogiuri, G., DeFronzo, R.A., Gastaldelli, A., Holst, J.J. (2017). Glucagon-like Peptide-1 and the Central/Peripheral Nervous System: Crosstalk in Diabetes, *Trends Endocrinol Metab*, 28(2):88-103.
- Noyan-Ashraf, M.H., Shikatani, E.A., Schuiki, I., Mukovozov, I., Wu, J., Li, R.K., Volchuk, A., Robinson, L.A., Billia, F., Drucker, D.J., Husain, M.A.(2013). A glucagon-like peptide-1 analog reverses the molecular pathology and cardiac dysfunction of a mouse model of obesity, *Circulation*, 127: 74–85.
- Okada, K., Kotani, K., Yagyu, H., Ando, A., Osuga, J.I., Ishibashi, S. (2014). Effects of treatment with Liraglutid on oxidative stress and cardiac natriuretic peptide levels in patients with type 2 diabetes mellitus, *Endocrine*, 47: 962–964.
- Özbek, H., Keskin, S. (2007). Standart sapma mı yoksa standart hata mı?.*Van Tıp Dergisi*, 14(2), 64-67.
- Özdemir, D. (2001). Kobaylarda Ovarium ve Oviduct'un Morfolojik Ve Ultrastruktural Postnatal Gelişimi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 67s, Elazığ.
- Özer, F., Demirel, A., Dilsiz, Ö., Aydın, M., Özdemir, N., Uyanıkgil, Y., Baka, M.(2012). Effects of Levetiracetam on neural tube development and closure of the chick embryos in ovo, *Childs Nerv Syst*, 28:969–976.
- Öznurlu, M. (2016). Erken Dönemde Yumurtaya Enjekte Edilen Flunixin Meglumin'in Embriyotoksik Ve Teratojenik Etkilerinin Belirlenmesi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 47s, Konya.
- Özparlak, H. (2006). Yumurtaya Verilen Organik İnsektisit Fipronil'in Tavukların Embriyonik Ve Kuluçka Sonu Erken Dönem Gelişimi Üzerindeki Zararlı Etkilerinin Belirlenmesi, Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 147s, Konya.
- Parthasarathy, V., Holscher, C. (2013). The type 2 diabetes drug Liraglutid reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain. *Eur.J.Pharmacol.*, 2013: 700, 42– 50.

- Parthasarathy, V., Hölscher, C. (2013). Chronic treatment with the GLP1 analogue Liraglutid increases cell proliferation and differentiation into neurons in an AD mouse model. *PloS one*, 8(3): e58784, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058784>
- Petorak, İ. (1984). *Medikal Embriyoloji*, Beta Yayınları, İstanbul.
- Qi, L., Ke, L., Liu, X., Liao, L., Ke, S., Liu, X., Wang, Y., Lin, X., Zhou, Y., Wu, L., Chen, Z., Liu, L. (2016). Subcutaneous administration of Liraglutid ameliorates learning and memory impairment by modulating tau hyperphosphorylation via the glycogen synthase kinase-3 β pathway in an amyloid β protein induced alzheimer disease mouse model, *Eur J Pharmacol*, 783:23-32.
- Rasmussen, C.B.,Lindenberg, S. (2014).The effect of Liraglutid on weight loss in women with polycystic ovary syndrome: an observational study. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 5:140.
- Robert, H.A. (2000). Congenital anomalies of the central nervous system. Eds: Behrman, R.M., Arvin, A.M., Nelson Textbook of Pediatrics 16th ed., Philadelphia, Saunders, p:1803-1813.
- Ronald , J.L. , Joseph, R. (1996). Neuroembryolgy, In: Neurosurgery, Eds: Wilkins, R., Rengachary, S., Hill, M.G., p: 3411–3444.
- Rowland, C.A., Correa, A., Cragan, J.D., Alverson, C.J. (2006). Are encephaloceles neural tube defects, *Pediatrics*, Georgia, 118: 916–923.
- Sadler, T.W. (1996). *Langman Medikal Embriyoloji*,7. Baskı, Ed: Başaklar, C., Palmiye Yayınları, Ankara.
- Schoenwolf, G.C., Bleyl, S., Brauer, P., West, F. (2014).Larsen’s Human Embryology, 5th Ed., Churchill Livingstone, New York.
- Schoenwolf, G.C., Smith, J.L. (1990). Mechanisms of neurulation: Traditional viewpoint and recent advances, *Development*, 109:243–270.
- Shiraki, A., Oyama, J., Komoda, H., Asaka, M., Komatsu, A., Sakuma, M., Kodama, K., Sakamoto, Y., Kotooka, N., Hirase, T., Node, K. (2012). The glucagon-like peptide 1 analog Liraglutid reduces TNF-alpha-induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells, *Atherosclerosis*, 221: 375–382.
- Singh, S., Hsien-Yen, C., Richards, T.M., Weiner J.P., Clark, J.M., Segal, J.B. (2013). Glucagonlike peptide 1-based therapies and risk of hospitalization for acute pancreatitis in type 2 diabetes mellitus: a population-based matched case-control study, *JamaInternMed.*, 173(7):534-539.
- Society of Actuaries. (1959). *Build and blood pressure study*, Vol 1. Chicago, IL: Society of Actuaries.

- Song, G., Cui, Y., Ji-Han, Z., Fei-Xia, H., Ma, X. (2012). Effects of choline on sodium arsenite-induced neural tube defects in chick embryos, *Food Chem Toxicol*, Beijing, 50:4364–4374.
- Stothard, K. J., Tennant, P. W., Bell, R., Rankin, J. (2009). Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *Jama*, 301(6): 636-650.
- Şenköylü, N. (2001). *Modern Tavuk Üretimi*, 3. baskı, Anadolu Matbaacılık, İstanbul.
- Şenköylü, N.(2001). *Modern Tavuk Üretimi*. 3.Baskı, Anadolu Matbaası, İstanbul.
- Teramoto, S., Miyamoto, N., Yatomi, K., Tanaka, Y., Oishi, H., Arai, H., Hattori, N., Urabe, T. (2011). Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 receptor agonist provides neuroprotection in mice transient focal cerebral ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab*, 31(8):1696-16705.
- Tufan, N. (2019). *Fitalat Maruziyetinin Embriyonal Gelişime Etkisinin Araştırılması*, Sakarya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 68s, Sakarya.
- Tunçbilek, E., Boduroğlu, K., Alikışıfoğlu, M. (1999). Neural tube defects in Turkey: prevalence, distribution and risk factors. *The Turkish Journal of Pediatrics*, 41(3): 299-305.
- Tureci, E., Asan, Z., Eser, M., Tanriverdi, T., Alkan, F., & Erdinçler, P. (2011). The effects of valproic acid and levetiracetam on chicken embryos. *Journal of Clinical Neuroscience*, 18(6), 816-820.
- Tureci, E., Asan, Z., Eser, M., Tanriverdi, T., Alkan, F., Erdinçler, P. (2011). The effects of valproic acid and levetiracetam on chicken embryos, *Cerrahpasa Medical Faculty, Istanbul University, Department of Anesthesiology, Section of Neuroanesthesiology, Istanbul*, 18:816–820.
- Türkdoğan, B.Z. (2010).*Nöral Tüp Defektlerinin Ultrason Ve Maternal Serumda Alfa Feto Protein İle Prenatal Olarak Tanınması Ve Bu Bebeklerin Uzun Dönem Sonuçları*,Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıpta Uzmanlık, 56S, İstanbul.
- Vatansever, H. S., UMUR, A. Ş., Inan, V. S., & Selçuki, M. (2003). The Effects of Methotrexate on the Development of Neural Tube Defects in the Chick Embryo. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 27(5), 1119-1125.
- Vella, A., Shah, P., Reed, A., Adkins, A., Basu, R., Rizza, R. (2002). Lack of effect of exendin-4 and glucagon-like peptide-1-(7, 36)-amide on insulin action in non-diabetic humans. *Diabetologia*, 45(10): 1410-1415.

- Wang, R., Sun, D.G., Song, G., Guan, C.Y., Cui, Y., Ma, X., Xia, H.F. (2019). Choline, not folate, can attenuate the teratogenic effects of dibutylphthalate (DBP) during early chick embryo development. *Environ Sci Pollut Res*, 26(29): 29763-29779.
- Wang, X., Ding, Z., Yang, F., Dai, Y., Chen, P., Theus, S., Singh, S., Budhiraja, M., Mehta, J.L. (2016). Modulation of myocardial injury and collagen deposition following ischaemiareperfusion by linagliptin and Liraglutid, both together, *Clin Sci*, 130(15):1353–1362.
- Whitsel, A. I., Johnson, C. B., & Forehand, C. J. (2002). An in ovo chicken model to study the systemic and localized teratogenic effects of valproic acid. *Teratology*, 66(4), 153-163.
- World Health Organization. (2000). Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organ Tech Rep Ser.*, 894:i–xii, 1–253.
- Yerby, M.S. (2003). Clinical care of pregnant women with epilepsy: neural tube defects and folic acid supplementation. *Epilepsia*, 44(3): 33-40.
- Yıldız, D., Akbayrak, N. (2008). Nöral tüp defektleri ve önlemede hemşirelik yaklaşımları, *Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi*, 11:102–111.
- Yi, Y., Lindemann, M., Colligs, A., Snowball, C. (2011). Economic burden of neural tube defects and impact of prevention with folic acid: a literature review. *European Journal of Pediatrics*, 170(11): 1391-1400.
- Zavattaro, M., Caputo, M., Sama, M.T., Mele, C., Chasseur, L., Marzullo, P., Pagano, L., Mauri, M.G., Ponziani, M.C., Aimaretti, G., Prodám, F. (2015). One-year treatment with Liraglutid improved renal function in patients with type 2 diabetes: a pilot prospective study, *Endocrine*, 50(3):620-626.