



**T.C. SAğLIK BAKANLIğI HAYDARPAşA NUMUNE
SAğLIK UYGULAMA VE ARAşTIRMA MERKEZİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ KLİNİğİ**

**TAVUK EMBRİYOLARINDA SODYUM FLORÜR BİLEşİMİNİN
NÖRAL TÜP GELİşİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr Mazhar Mammadov

TIPTA UZMANLIK TEZİ



**T.C. SAğLIK BAKANLIğI HAYDARPAŞA NUMUNE
SAğLIK UYGULAMA VE ARAşTIRMA MERKEZİ
BEYİN VE SİNİR CERRAHİSİ KLİNİğİ**

**TAVUK EMBRİYOLARINDA SODYUM FLORÜR BİLEşİMİNİN
NÖRAL TÜP GELİşİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr Mazhar Mammadov

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Selin Tural Emon

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
KISALTMALAR.....	iii
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
ÖZET	viii
ABSTRACT.....	x
GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
GENEL BİLGİLER	2
GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
BULGULAR.....	27
TARTIŞMA	37
SONUÇ	42
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	52
EKLER.....	53

TEŞEKKÜR

Beyin ve sinir cerrahisi asistanlığım sürecindeki emeklerinden ötürü başta eğitim ve idari sorumlumuz Prof. Dr. Arif Tarkan Çalışaneller ve değerli tez danışmanım Doç. Dr. Selin Tural Emon olmak üzere; uzmanlarımız Doç. Dr. Ezgi Akar'a, Op. Dr. Cem Akkurt'a, Op. Dr. Ali Erhan Kayalar'a, Op. Dr. Eylem Burcu Kahraman Özlü'ye, Doç. Dr. Mustafa Efendioğlu'na, Op. Dr. Sarper Kocaoğlu'na, Op. Dr. Tuncay Demirbilek'e, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan doktor arkadaşlarım Dr. Abdullah Yolcu'ya, Dr. Fatih Toprak'a, Dr. Evren Duran'a, Dr. Yunus Emre Aydıngöz'e ve Dr. Şerif Aytekin'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez yazım sürecimdeki yardımlarından ötürü Prof. Dr. Dilek Akakın'na, Dr. Öğr Üyesi Dila Şener'e, Onur Akar'a, Safiye Çoltuoğlu'na, arkadaşlarım Gizem Aşık ve Şahriyar Gadimov'a teşekkür ederim.

Hayat boyu her zaman yanımda olan sevgili aileme şükran ve sevgilerimle.

KISALTMALAR

F-Florür

SD-Spinal Disrafizmler

NTD-Nöral Tüp Defekti

PAX3-Paired Box Gene 3

TFAP2-Transcription Factor AP-2 Alpha

MSR-Metiyonin Sentaz Redüktaz

MS-Metiyonin Sentaz

SBS-Sistasyon β -Sentaz

SOX-Sry-related HMG box

TBX6-T-box6

BOS-Beyin Omurilik Sıvısı

CAS NO- Chemical Abstracts Service

PET- Pozitron Emisyon Tomografisi

HF-Hidrojen Florür

SPF- Spesific Patogen Free

NaF-Sodyum Florür

IQ-Intelligence Quotient

DNA-Deoksiribo Nükleik Asit

BN- bifentrin

EC NO- Enzyme commission number

DWM-Dandy-Walker Malformasyonu

SCM-Split Kord Malformasyonları

HH-Hamburger Hamilton



TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Açık ve kapalı spinal disrafizmler

Tablo 2:Nöral tüp defekti gözlemlenmiş tavuk embriyolarının gruplara göre dağılımı görülmektedir.

Tablo 3: Gruplar arası istatistiksel değerlendirme.*:p <0.05



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Tespit edilen ilk spina bifida olgu örneği (9).

Şekil 2. Nöral tüp gelişimi sürecinde etkin nöral plakta N-cadherin ve öncül epidermiste E-cadherin reseptörleri görülmektedir.

Şekil 3. Hamburger-Hamilton(HH) evre 16'da civciv embriyosu görülmektedir.

Şekil 4. Kullanılan laboratuvar aletleri ve uygulanan sodyum florür preparatı.

Şekil 5. Kuluçka makinesi (Cimuka, CT60 S, Ankara).

Şekil 6. Civciv embriolarına enjeksiyon uygulaması görülmektedir.

Şekil 7. Üç günlük yumurta embriyosu gözlenmektedir.

Şekil 8. Kontrol grubunda ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp (NT), notokord ($\Rightarrow$), somit ($\star$) ve yüzey ektodermi ($\rightarrow$) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 μ m).

Şekil 9. Kontrol grubunda ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp (NT) ve somitler ($\star$) sagittal düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 μ m).

Şekil 10. Kontrol grubunda ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp (NT), notokord ($\Rightarrow$), somit ($\star$) ve yüzey ektodermi ($\rightarrow$) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 μ m).

Şekil 11. Kontrol grubunda ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp (NT), notokord ($\Rightarrow$), somit ($\star$) ve yüzey ektodermi ($\rightarrow$) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 μ m).

Şekil 12. Flor (0.003 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 μ m). **Şekil 13.** Flor (0.003 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 μ m).

Şekil 14. Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) ve vakuolize notokord ($\blacktriangledown$) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 μ m).

Şekil 15. Flor (0.003 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 μ m).

Şekil 16. Flor (0.003 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 μ m).

Şekil 17. Flor (0.003 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp, notokord, somit ve yüzey ektodermi transvers düzlemde normal yapıda izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 µm).

Şekil 18. Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 µm)

Şekil 19 .Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).

Şekil120 .Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).

Şekil 21. Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) sagittal düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X100 µm).

Şekil22. Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöroepitel proliferasyonu (⇒) sagittal düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).

Şekil 23. Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp, notokord, somit ve yüzey ektodermi transvers düzlemde normal yapıda izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).

ÖZET

Amaç: Nöral tüp defektleri (NTD) her 1000 doğumdan 1 ila 5'inde ve konjenital kalp-damar malformasyonlarından sonra ikinci sıklıkta görülmektedir. Yüksek morbite ve mortaliteye sebep olan ciddi bir sağlık sorunudur. Multifaktöryel etiyojisinden dolayı çeşitli araştırmalara konu olmuştur. Çalışmalarda insan embriyonal gelişimine benzerlik, kısa zaman diliminde sonuç alabilme nedeniyle civciv embriyosu önemli yere sahiptir. Günlük hayatımızda yaygın olarak kullanılmış olmasına rağmen, florürün embriyonal gelişim üzerine etkileri az bilinmektedir. Çalışmamızda florürün civciv embriyolarında nöral tüp gelişimi üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışma Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahi Kliniğinde yapılmıştır. Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bornova-İzmir bünyesindeki Deney Hayvanları bölümünden temin edilen 60 adet spesifik patojen içermeyen, fertil, sıfırncı gün Leghorn tipli yumurtaları ve sodyum florür maddesi kullanılmıştır. Preparatların histolojik değerlendirilmesi Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı histoloji laboratuvarında yapılmıştır. Altmış adet yumurta ile her grupta 20 adet olmak üzere 3 grup oluşturulmuş. National Academy of Sciences Institute of Medicine'in önermiş olduğu günlük doza göre (0.05 mg/kg) hesaplamalar yapıldı. Gruplardan biri kontrol idi ve yalnızca serum fizyolojik verildi. Diğer gruplara ise düşük doz (0.003 mg) ve yüksek doz (0.006 mg) NaF maddesi enjekte edildi. Elde edilen veriler MATLAB R2021A Statistics and Machine Learning Toolbox Version 12.1 programında saklanarak analiz edilmiştir. Chi-Square testi uygulandı.

Bulgular: Kontrol grubunda bulunan 20 tavuk embriyosuna ait kesitlerin incelenmesi sonucunda nöral tüp transvers ve sagittal düzlemlerde izlenmiştir. Kesitlerin tamamında yüzey ektoderminin bütün olduğu, nöral tüpün kapalı olduğu, nöroepitelin, nöroepiteli çevreleyen bazal membranın, somitlerin ve notokordun normal yapıda olduğu gözlenmiştir. 0.003 mg dozda flor uygulanan gruba ait 20 tavuk embriyosunda yapılan değerlendirmede iki örnekte tüp defekti, bir örnekte ise nöral

tüpte minimal açıklık/defekt izlenmiştir. Aynı gruba ait diğer 17 embriyoda nöral tüp yapısının kontrol grubuna benzer olduğu saptanmıştır. 0.006 mg dozda flor uygulanan gruptaki 20 tavuk embriyosuna ait kesitlerde yapılan değerlendirmede üç örnekte NTD gözlenmiş ve bir embriyoda lümeneye doğru anormal nöroepitel proliferasyonu dikkat çekmiştir. Yüksek doz NaF verilen grupta NTD gelişiminin istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu tespit edilmiştir ($p=0.035$).

Sonuç: Florürün kemik doku üzerine tesirleri iyi bilinmesine karşın embriyonel dönem etkileri araştırmaya açıktır. Florür plasental ve kan beyin baryerinden geçiş yapabilmektedir ve farklı çalışmalarda sinir sistemi ve embriyonel dokulara hasar verdiği gözlemlenmiştir. Çalışmamızda National Academy of Sciences Institute of Medicine'ın belirlemiş olduğu günlük doz verilen embriyolarda istatistiksel olarak nöral tüp gelişimi tespit edilememiştir. Ancak 0,5 mg/kg/gün verilen grupta 3, 0.10 mg/kg/gün verilen grupta 4 embriyoda patolojik bulgular tespit edilmiştir. Birbirine yakın elde edilmiş olan bu değerler bizlere çalışma grubumuzun sayılarını arttırmamız durumunda 0,5 mg/kg/gün doz alan embriyolarda da etkilenme olasılığı olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle gündelik hayatta florür kullanımına dikkat edilmesi gerektiğini ve daha geniş gruplarla yeni çalışmalar yapılmasının uygun olabileceğini göstermiştir.

EFFECTS OF SODIUM FLURIDE COMPOUND ON NERAL TUB DEVELOPMENT IN CHICKEN EMBRYO

ABSTRACT

Aim: Neural tube defects (NTD) are seen in 1 to 5 out of every 1000 births and the second most common after congenital cardiovascular malformations. It is a serious health problem that causes high morbidity and mortality. Due to its multifactorial etiology, it has been the subject of various studies. The chick embryo has an important place in studies because of its similarity to human embryonal development and to obtain results in a short time period. Although it is widely used in our daily lives, the effects of fluoride on embryonic development are little known. In our study, the effects of fluoride on neural tube development in chick embryos were investigated.

Materials and Methods: The study was carried out in Haydarpaşa Numune Training and Research Hospital, Brain and Nerve Surgery Clinic. 60 specific pathogen-free, fertile, zero-day Leghorn type eggs obtained from the Experimental Animals department of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the Republic of Turkey, Directorate of Veterinary Control and Research Institute, Bornova-İzmir and sodium fluoride were used. Histological evaluation of the preparations was carried out in the histology laboratory of Bahçeşehir University Medical Faculty Histology Embryology Department and Marmara University Medical Faculty Histology-Embryology Department. With sixty eggs, 3 groups were formed, with 20 eggs in each group. Calculations were made according to the daily dose (0.05 mg/kg) recommended by the National Academy of Sciences Institute of Medicine. One of the groups was a control and only saline was given. Other groups were injected with low dose (0.003 mg) and high dose (0.006 mg) NaF. The obtained data were stored and analyzed in the MATLAB R2021A Statistics and Machine Learning Toolbox Version 12.1 program. Chi-Square test was applied.

Results: As a result of the examination of the sections of 20 chicken embryos in the control group, the neural tube was observed in the transverse and sagittal planes. In all of the sections, it was observed that the surface ectoderm was intact, the neural tube was closed, the neuroepithelium, the basement membrane surrounding the

neuroepithelium, the somites and the notochord were in normal structure. In the evaluation made in 20 chicken embryos belonging to the group that received fluoride at a dose of 0.003 mg, tube defects were observed in two samples and minimal opening/defect in the neural tube in one sample. Neural tube structure was found to be similar to the control group in 17 other embryos belonging to the same group. In the evaluation of the sections of 20 chicken embryos in the 0.006 mg dose of fluoride administered group, NTD was observed in three samples and abnormal neuroepithelial proliferation towards the lumen was noted in one embryo. NTD development was found to be statistically significantly higher in the group given high-dose NaF ($p=0.035$).

Conclusion: Although the effects of fluoride on bone tissue are well known, the effects of the embryonic period are open to research. Fluoride can cross the placental and blood-brain barrier, and it has been observed in different studies that it damages the nervous system and embryonal tissues. In our study, neural tube development could not be detected statistically in embryos given the daily dose determined by the National Academy of Sciences Institute of Medicine. However, pathological findings were detected in 3 embryos in the group given 0.5 mg/kg/day and in 4 embryos in the group given 0.10 mg/kg/day. These values, which were obtained close to each other, made us think that if we increase the number of our study group, there may be a possibility to be affected in embryos receiving 0.5 mg/kg/day dose. For this reason, it has shown that attention should be paid to the use of fluoride in daily life and it may be appropriate to conduct new studies with larger groups.

Keywords: fluoride, neural tube defects, chick embryo

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Doğumsal spinal anomaliler prenatal ve postnatal dönemde önemli tıbbi patolojilere yol açan, hatta ölümlle sonuçlanabilen ciddi sosyo-ekonomik etkileri olan hastalık bir grubudur. Embriyonel nöral dokunun kusurlu gelişimi konjenital kalp ve damar hastalıklarından sonra ikinci sıklıkta gelen gelişimsel anomalilerdir.

Son yıllarda görüntüleme yöntemleri ve nutrisyon programlarındaki gelişmelerden dolayı nöral tüp defekti (NTD) olgularının sayısı azalmakla beraber halen ciddi bir sağlık sorunudur. Nöral tüp defektleri santral sinir sisteminin zarlarını vertebraları kasları ve bu bölgedeki ilt dokusunu etkilemektedir. Etiyolojik nedenler multifaktöriyeldir; nütrisyonel bozukluklar, genetik özellikler ve ilaç kullanımı başlıca etkenlerdir.

Nöral tüp defektlerinde cerrahi tedavinin planlanması için normal ve patolojik embriyonel gelişim evrelerine hakim olmak gereklidir. Literatürde NTD veya spinal disrafizmler (SD) olarak isimlendirilen bu malformasyonların ortak özellikleri olmasına yanısıra epidemiyolojik, doğal seyir, morfolojik farklılıkları da mevcuttur. Geniş bir hastalık grubu olup açık ve kapalı disrafizmler olmak üzere iki ana grupta toplanmaktadır.

Mevcut çalışmamızda günlük hayatımızda yaygın olarak maruz kaldığımız florürün nöral tüp gelişimi üzerine etkisini civciv embriyolarında değerlendirmeyi planladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 TARİHÇE

İlk olarak arkeolojik kalıntılarda MÖ 10000'de spinal disrafizm olgularına ait bulgular rastlanılmıştır. Ancak ölümcül bir hastalık olduğu için uzun zaman tedaviye yönelik gelişmelere ait tarihi belgelere rastlanmamıştır (Resim 1) (1,2).

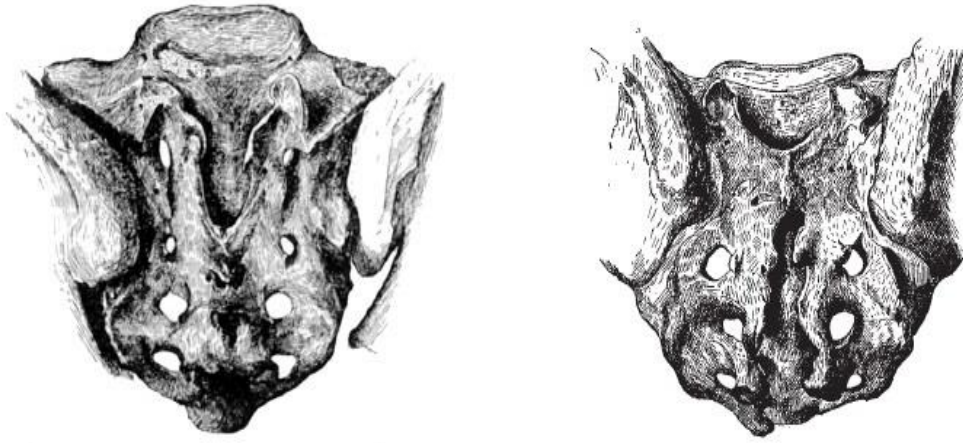
Hollandalı anatomist Pieter Van Forest 1620'de 2 yaşında hastada servikal bölgede kapanma defektleriyle uyumlu bir lezyon tanımlamıştır. Bu tanımlanan lezyon ligasyonla tedavi edilmeye çalışılmıştır(2-4).

Spina bifida terimi ise ilk defa 1641 senesinde Nicolaes Tulp tarafından Observetional Medicae isimli kitabında tanımlanmıştır(5). Fransız anatomist ve patolog olan Jean Cruveilhier(1791-1874) patolojinin doğumsal gelişim bozukluğuna bağlı olduğunu hipotezinde bulunmuştur(6).

Günümüzde kullanılan spina bifida occulta terimi ilk olarak Alman patoloğu Rudolf Virchow (1821-1902) tarafından kullanılmıştır(7) Erken dönemlerde cerrahi girişimler yüksek mortalite ile yapılmıştır. 19-20. yüzyılda asepsi ve antisepsiyle birlikte başarılı cerrahi müdahaleler mümkün olmuştur. Teknik olarak da büyük gelişmeler elde edilmiştir.

İlk defa Athol Johnson tarafından 1857 senesinde lipomiyelomeningoselli 10 aylık bir bebek opere edilmiştir (8). Postoperatif dönemde 6. haftada peritonit nedeniyle hasta kaybedilmiştir.

Miyelografinin kullanılmaya başlamasıyla filum terminalede görülen anatomik varyasyonların tespit edilmesi sağlanmıştır. Bu gelişmeler sonucunda da tethered cord tanımlanmış ve literatüre girmiştir. Zaman içerisinde görüntüleme yöntemlerinde ve cerrahi yöntemlerdeki ilerlemeler ile prenatal teşhis konulabilir ve cerrahi tedavi yapılabilir hale gelmiştir.



Şekil 1: Tespit edilen ilk spina bifida olgu örneği (9).

2.2 EPİDEMİYOLOJİ

Nöral tüp kapanma defektleri konjenital kalp hastalıklarından sonra ikinci sıklıkta görülmektedir. Prenatal tanı yöntemlerinin gelişimi ile prenatal teşhisleri konulabilmektedir. Böylelikle planlı düşük sayılarını artmıştır (10,11).

Spinal disrafizmlerin gerçek prevalansı hesaplamak için SD ile doğan çocuklar ve planlı spontan düşükleride göz önünde bulundurmak gerekir. Olgular etnik köken ırk coğrafi ve zamana göre farklılık göstermektedir(12).

Coğrafi farklılıklara bakıldığında Avrupa'da en fazla olgu Britanya adalarında rastlanmıştır. Vaka sayısı her 1000 doğumda 2.4-3.8 olarak saptanmıştır. İrlanda'da 1000 doğumdan 5'e kadar çıkmıştır(13). Amerika Birleşik Devletleri'nde her 1000 doğumda 0.3-0.4 hasta sayısı belirlenmiştir ve doğuda batıya göre daha fazla olgu olduğu tespit edilmiştir (14). Etnik kökene bakıldığında yine ABD'de Hispanik ırkında en fazla, Afrika, Amerika ve Asya kökenlilerde en az olduğu bulunmuştur.

Ülkemizde de epidemiyolojik prevalans demografik ve bölgesel özelliklere göre farklılık göstermektedir. Türkiye'de illere göre dağılıma bakıldığında nöral tüp defekti sayıları binde 3 ila 5.8 arasında değişmektedir(15). Zamana göre de farklılık göstererek yapılan çalışmalarda İzmir'de 8.9, Bursa'da 1000hastada 20'ye kadar çıktığı gözlenmiştir (15).

2.3 GENETİK VE ÇEVRESEL ETKENLER

Genetik ve çevresel sebepler nöral tüpün kapanmasında önemli yere sahiptir. Tüm NTD prevalansının güçlü bir genetik katkının lehinde epeyce kanıt vardır(16). Akraba evliliği ile NTD gelişimine katkıda bulunan genlerin kümelenerek olguların artan sayılarla karşımıza çıkmasına neden olduğu düşünülmektedir (17).

Yapılan epidemiyolojik ve deneysel çalışmalar, bir dizi;

- fiziksel ajanın (X-ışınları, hipertermi, stres),
- ilaçların (talidomid, folat antagonistleri, androjenik hormonlar, valproat ve karbamazepin gibi antiepileptikler ve hipervitaminoz A),
- madde suistimalinin (alkol),
- kimyasal ajanların (civa, kurşun),
- maternal enfeksiyonların (kızamıkçık, sitomegalovirüs, Toxoplasma gondii, sifiliz),
- maternal metabolik durumların (fenilketonüri, diyabetes mellitus, endemik kretinizm) merkezi sinir sistemi yapılarında konjenital malformasyonların gelişimine katkıda bulunduklarını gösterilmiştir.(18–22).

Ayrıca Pax3 Sonic hedgehog Tfp2 Openbrain Grainyhead genlerindeki mutasyonların memeli nöral tüp gelişiminde patolojilere yol açtığı tespit edilmiştir (23–26). İkiyüzden fazla genin NTD gelişimi üzerine etkileri olduğu gözlenmiştir(16).

Çinko eksiklinin de NTD üzerine etkileri olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (27,28).Çinko eksikliğinde p53 proteinin stabilize edilerek hücrelerde apoptoza neden olduğu ve bu yolla nöral tüp kapanma defektine yol açtığı tespit edilmiştir (29).

Yapılan araştırmalarda, gebelik sırasındaki maternal hiperterminin, artan nöral tüp kusurları insidansı ile ilişkili olduğunu, ayrıca nöral tüpün insan embriyolarında da ısıya duyarlı olduğu tespit edilmiştir(30).

Maternal beslenmenin normal fetal gelişim ve büyüme üzerindeki rolü iyi bilinmektedir. Ebeveynlerin beslenme durumu gametlerin kalitesini ve döllenme kapasitesini etkileyebilir. Embriyonun genotipi ve annenin besin ortamı embriyonun büyüme ve gelişmesinde belirleyici rol oynar.

Folat takviyesinin NTD oluşumunda %50-70 oranında azalma açısından faydalı etkilerinin bulunmuştur(31,32). Bu nedenle folatın etkilerini daha iyi değerlendirebilmek için sorumlu olduğu düşünülen bir dizi gen ayrıntılı olarak incelenmiştir;

- metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR)
- metiyonin sentaz redüktaz (MSR)
- folat reseptör α and β
- metiyonin sentaz (MS)
- sistasyon β -sentaz (SBS)

2.4 NÖRAL TÜP GELİŞİMİ

2.4.1 Nöral plağın nöral tüpe dönüşümü

Nöral plakta Sry-related HMG box(Sox) ailesi transkripsiyon faktörleri eksprese edilir. Bu faktörler nöral plak oluşumunu desteklerken epidermis ve nöral krest oluşumunun engeller(33). Nöral plak embriyonun dış katmanında yerleşmişken yetişkin vücutta beyin ve omurilik vücut dâhilindedir. Nöral plak nörolasyonla gelişim aşamalarınıgeçirerek son halini bulmaktadır.

Nörolasyon iki aşamalıdır. Primer nörolasyonda nöral plak çevresindeki hücreler nöral bir plan gelişmesini sağlar ve içine kıvrılmasını böylelikle de yüzey ektodermden ayrılması elde edilmiş olur. Sekonder nörolasyonda nöral tüp mezenkim hücrelerin birikmesinden oluşur. İleri evrelerde oluşan bu solid yapının merkezi hücrelerin kaybolması sonucunda da tam gelişmiş nöral tüp formunu alır(34).

Bileşke bölgesi nörolasyonu türlere göre farklılık göstermektedir.Kuşlarda primer nörolasyon nöral tüpün arka bacaklara kadar olan kısmını oluşturur. Memelilerde sekonder nörolasyon sakral vertebra civarında başlar. Balık ve amfibilerde ise sekonder nörolasyon kuyruk kısmında gerçekleşmektedir. Daha primitif kordalılarıdaysa yalnız primer nörolasyonun görülmektedir. Bu da bizlere primer nörolasyonun sekonder nörolasyona göre daha eski olduğunu kanıtlamaktadır (35). Nöral tüp iki nörolasyon evreleri sonucu son şeklini bulmuş olur.

2.4.1.1 Primer nörulasyon

Primer nörulasyon dört aşamada gerçekleşmektedir:

- **Uzama ve nöral katlantı oluşumu:**

Gastrulasyon esnasında gerçekleşen hücre bölünmesi sayesinde nöral plan ön arka çapı genişlemektedir. Nöral plak diğer embriyo kısımlarından ayrı tutulduğu zaman bile uzama gerçekleşir. Ancak katlantıların oluşması için öncül epidermis gerekmektedir.

- **Nöral oluk oluşumu:**

Nöral plağın altında yerleşen notokortla birleşmiş olan medial menteşe noktasının çökmesi sonucu nöral oluk oluşur.

- **Nöral kıvrımların yaklaşması:**

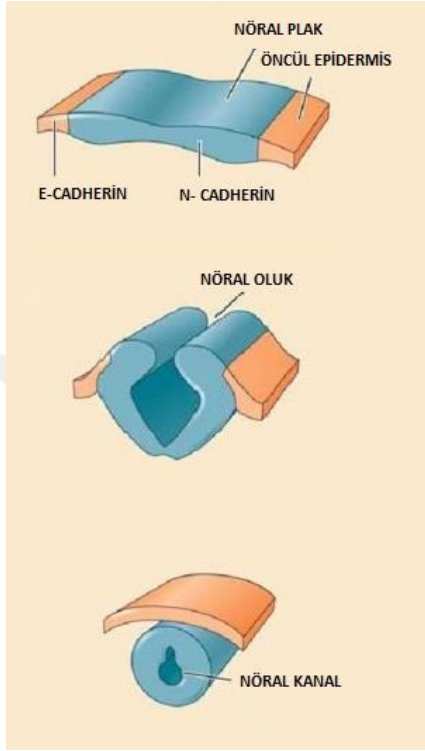
Yanlarda oluşan torso bilateral menteşe noktaları üzerinde yerleşen epidermisin yaklaşması sonucu nöral kıvrımlar orta hatta doğru hareketini ilerletir.

- **Kapanma aşaması:**

Orta hatta yaklaşan nöral kıvrımlar birleşip nöral tüp ve epidermisi oluşturur. Bu birleşme sonucu arada kalan hücreler nöral krest hücrelerinin gelişimini sağlar. Menteşe noktaları, hücrelerin apikal uçlarında kontraksiyon, bazal uçlarda kalınlaşma ve çekirdeğin bazal uca doğru yer değiştirmesiyle oluşur. Nöral plakta hücre bölünmesi dorsolateral bölgede ventral bölgeye göre daha hızlı olur. Bu sayede lateral hücre yoğunluğu daha fazla olur ve oluşan ek kuvvet ile katlantılar yaklaşarak birleşir(36).

Nöral ektoderm boyunca nörulasyon her yerde aynı zamanda olmamaktadır. Örneğin 24 saatlik tavuk embriyosunda kranyal bölgede nörulasyon gerçekleşirken kaudal bölge halen gastrulasyon safhasındadır. Tavuk embriyosunda nörulasyon orta beyin bölgesinden başlayarak yukarı ve aşağı doğru hareket eder. Memelilerde ise başlangıcını farklı odaklardan alır. İnsanlarda ise bu şekilde 5 farklı odak bulunmaktadır. Nöral tüpün kapanıp ektodermden ayrılması adhezyon molekülleri sayesinde gerçekleşir. Ektodermden e-cadherin ekspresyonu yapılırken Oluşan nöral

tüpte n-cadherin görülür (Şekil 2). Greanyhead transkripsiyon faktörü bu gelişme sürecinde önemli bir rol oynar. Yapılan çalışmalarda Grainyhead like 2 fare nöral kıvrımlarında e-cadherin ekspresyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir (24,37).

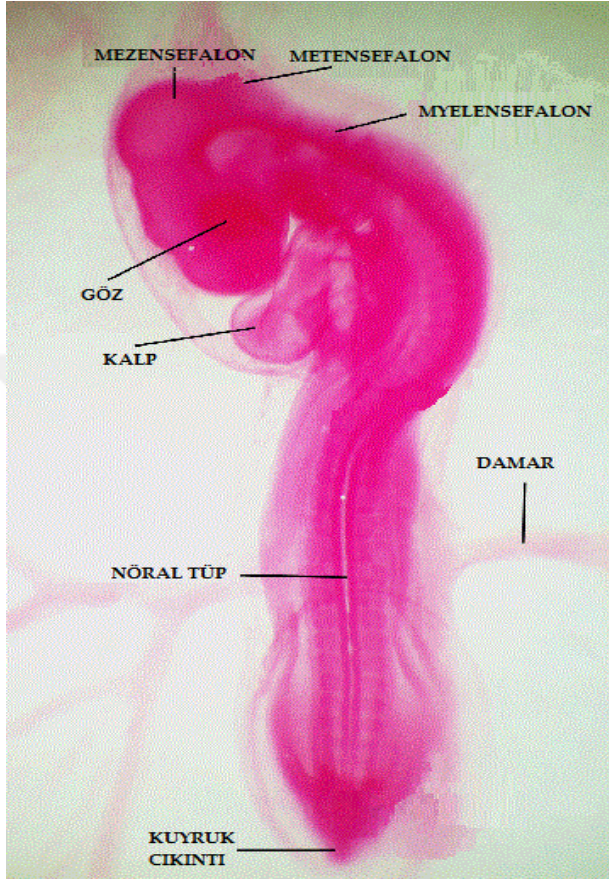


Şekil 2: Nöral tüp gelişimi sürecinde etkin nöral plakta N-cadherin ve öncül epidermiste E-cadherin reseptörleri görülmektedir.

2.4.1.2 Sekonder nörolasyon

Sekonder nörolasyon embriyonun kuyruk kısmında, kuyruk çıkıntısının uzama döneminde gerçekleşir (Şekil 3). Burada ektoderm ve mezodermden oluşan mezenkim hücrelerinin birikmesi sonucu ektoderm altında nöral kord oluşmaktadır. Bu hücre birikiminin merkezinde gerçekleşen apoptoz ile oluşan kanalcıklar birleşerek lümeni oluşturur ve primer nörolasyonla oluşmuş olan nöral kordla birleşir. Embriyo büyümeye başladığında Hanse düğümü posteriora doğru çekilir, kaudal epiblastan nöral ektoderm ve paraksiyal mezoderm oluşur(38). Posterior nöral tüpü oluşturacak ektoderm SRY-box transcription factor(Sox2), mezoderm öncülleri T-box6(tbx6)genini eksprese eder(39,40). Tbx6 geninin transkripsiyonu Sox2 geninin

ekspresyonunu inhibe etmesi ile homozigot Tbx6 mutant farelerde 3 adet nöral tüp geliştiği gözlenmiştir(40,41).



Şekil 3: Hamburger-Hamilton(HH) evre 16'da civciv embriyosu görülmektedir.

2.5. NÖRAL TÜP KAPANMA DEFEKTLERİ

İnsanlarda her 1000 doğumdan 1-5'inde nöral tüp kapanma defekti görülmektedir (42). Posterior nöroporun 27. günde kapanmamasından dolayı spina bifida oluşabilir. Ağırlık derecesi spinal kordun etkilenmesine bağlı olarak değişir. Rostral kısımda 2. ve 3. bağlantı bölgesinde oluşacak patolojiden dolayı anensefali gelişebilmektedir. Tüm vücut boyunca nöral tüpün kapanmamasından dolayı da kraniorakişizis gelişir (Tablo 1).

Tablo 1: Açık ve kapalı spinal disrafizmler

AÇIK SPİNAL DİSRAFİZMLER	KAPALI SPİNAL DİSRAFİZMLER		
MENİNGOSEL	SUBKUTAN KİTLE MEVCUT	SUBKUTAN KİTLE YOK	
MİYELOMENİNGOSEL	LİPOMİYELOSEL	1-BASİT DİSRAFİK MALFARMASYONLAR	2-KOMPLEKS DİSRAFİK MALFARMASYONLAR
HEMİMİYELOMENİNGOSEL	LİPOMENİNGO MİYELOSEL	POSTERİYOR SPİNA BİFİDA	DORSAL ENTERİK FİSTÜL
HEMİMİYELOSEL	MENİNGOSEL	LİPOM • İNTRADURAL • İNTRAMEDULLAR • FİLUM TERMİNALE	NÖROENTERİK SİST
	TERMİNAL MİYELOSİSTOSEL		SPLİT KORT MALFARMASYONLAR • DİASTOME TAMİYELİ • DİPLOMİYELİ
		ANORMAL UZUN SPİNAL KORT	DERMAN SİNUS
		PERSİSTAN TERMİNAL VENTRİKÜL	KAUDAL REGRESYON SENDROMU
			SEGMENTAL SPİNAL DİSGENESİS

2.5.1 Miyeloşizis

Embriyonun gelişiminin erken döneminin anomalisidir. Sıklıkla torakal ve lomber bölgelerde görülür. Nörülasyon gerçekleşmediği için nöral doku plak halinde kalır. Nöral yapının amnion sıvısıyla teması dejenerasyonuna neden olur(43).

2.5.2. Meningomyelosel

Nörülasyon başlamış olmasına rağmen nöral kıvrımlar da kapanmama halidir. Lomber ve sakral bölgelerde daha sık görülür. Nöral elemanlar içerir. Myelomeningosel, en yaygın nöral tüp defektidir. Chiari II malformasyonu ve sıklıkla hidrocefali ile ilişkilidir. Anensefalinin aksine, myelomeningoselli bireylerin çoğu, yeterli tıbbi destekle uzun sağkalım oranlarına sahiptir. Lezyonun rostral seviyesinde

başlayan omurilik disfonksiyonu, hidrosefali ve Chiari II malformasyonuna bağlı beyin sapı disfonksiyonu görülmektedir.

Etkilenen bireyler ayrıca bilişsel becerilerde bozulma ve üst ekstremitelerde koordinasyonunda zorluklar yaşayabilir. Nörülasyon aksama tek taraflı olarak gelisecek spinal kord aynı tarafta daha fazla etkilenmiş olduğunda hemimeningomyelosel olarak önümüze çıkar ve açık spinal disrafizmlerin %10'nunu oluşturur. Siringomyelomeningoselde ise santral kanal genişleyerek kese içine herniye olur. Nadir görülen bu patoloji genellikle torakal ve servikal bölgeyi etkiler.

2.5.3. Myelosistosel

Terminal myelosistosellerin spinal kanalın genişlemesi sonucu olduğu düşünülür. Genellikle ekstradural dorsal kist ile sonlanır ve konus medullaris alçak yerleşimlidir. Bazı lezyonlar da yağ içerir. Myelosistoseller beyin malformasyonu ile ilişkili değildir ve ikincil nörülasyondaki bir kusurdan kaynaklandığı öne sürülmüştür. Terminal myelosistoseller genellikle kloakal ekstrofisi (omfalosel, mesane ekstrofisi, deliksiz anüs ve spinal anomali) gibi daha karmaşık doğum kusurlarının bir parçasıdır.

Servikal myelosistoseller, dorsal kemik defekt yoluyla merkezi kanal da dahil olmak üzere omuriliğin çıkıntılarıdır. Her iki tip myelosistosel, her zaman doğumda mevcut olmayan nörolojik defisitler için yüksek risk ile ilişkilidir. Herhangi bir genetik veya çevresel neden bildirilmemiştir. Tedavi nörolojik bozulmayı önlemek için erken onarımı içerir. Bilişsel bozukluk istisnaidir ve motor olmayan gelişim genellikle normaldir(44).

2.5.4 Lipomeningomyelosel

Lipomyelomeningoseller, alt omurganın sinirleri, meninksleri ve/veya intra ve ekstradural yağ dokusunu içeren, ikincil nörülasyondaki kusurlardan kaynaklandığı düşünülen deri kaplı lezyonlardır. Üstte yatan kutanöz anormallikler yaygındır. Başvuru anında birçok hasta asemptomatiktir; bununla birlikte, ilerleyici nörolojik defisitler sıklıkla, yağlı doku büyüdükçe omurilik bağı veya omurilik sıkışması

nedeniyle ortaya çıkar. Tipik olarak, genetik nedenler tanımlanmaz ve nüksler nadirdir(45,46).

2.5.5. Meningosel

Basit bir meningesel, bir spinal defekt yoluyla deri altı dokuya çıkıntı yapan meninksler ve BOS'tan oluşur. Nöral eleman içermez. Meningosel üzerindeki deri genellikle sağlamdır. Daha çok lomber gölgede olduğu bildirilmiştir. Nadiren, meningeseller karın içi veya pelvik kitle oluşturarak ventralden ortaya çıkabilirler. İlerleyen evrelerde nöral dokuyu çevreleyecek olan mezodermal dokunun anormal gelişimine bağlı olduğu bilinmektedir. Cinsiyet farkı görülmez.

Diğer nöral tüp defektleriyle karşılaştırıldığında, meningeseller nörolojik defisitlerle çok daha az ilişkilidir. Meningoseli olan bebekler nörolojik defisitler, bağırsak/mesane disfonksiyonu ve gergin veya bölünmüş kord malformasyonu gibi gizli disrafik anomaliler açısından değerlendirilmelidir. Üstteki cilt sağlam olduğunda elektif olarak cerrahi onarım yapılabilir, ancak omurilik sıvısı kaçağı olan hastalarda acil onarım yapılmalıdır(47,48).

2.5.6. Chiari malformasyonu

Chiari malformasyonu, beyin sapı ve beyinciğin aşağı doğru yer değiştirmesini ve serebellar vermis, tonsiller, pons, medulla ve dördüncü ventrikülün foramen magnumdan fıtıklaşmasını içeren bir kusurdur. Etkilenen bebekler arasında semptomatik komorbiditeleri olanlar önemli ölçüde daha yüksek morbidite ve mortalite riskine maruz kalır. Chiari malformasyonun hızlı tanımlanması, erken cerrahi müdahale, eş zamanlı spina bifida aperta varlığı durumunda bu patolojinin onarılması ve beyin omurilik sıvısı dolaşımını sağlanması hastalarda yaşam kalitesini önemli ölçüde artırır(49,50).

2.5.7. Dandy Walker Malformasyonu

Dandy-Walker malformasyonu (DWM), posterior fossa ve serebellumu içeren karmaşık bir malformasyondur. İnsidansı 10.000 ila 30.000 doğumda 1 olan nadir bir durumdur. DWM'nin “klasik üçlüsü” (1) vermisin tam veya kısmi agenezisi; (2) tentorium, transvers sinüs ve torkların yukarı doğru yer değiştirmesi ile posterior fossanın genişlemesi; ve (3) dördüncü ventrikülün kistik genişlemesidir. DWM'nin patogenezi, dördüncü ventrikülün kapanmamasına neden olan serebellar vermisin karmaşık gelişimsel anomalisini içerir. Genişleyen dördüncü ventrikül serebellar vermisi yukarı doğru iter. Bu sürecin bir sonucu olarak tentorium, düz sinüs ve torkuların gelişimi engellenir ve bu da posterior fossanın genişlemesine neden olur(51,52).

2.5.8. Ensefalosel

Ensefalosel, genellikle bir kemik defekti nedeniyle kafatasının dışında beyin/meninks/beyin omurilik sıvısı içeren bir kesenin oluştuğu, doğuştan gelen bir nöral tüp defekti türüdür. Kese, meninkslerin ve BOStan oluşmuşsa kraniyal meningosel, beyin dokusu içerdiğinde ise ensefalosel olarak adlandırılır. Ensefalosellerin çoğu doğuştandır. Konjenital ensefaloselin kökeni için en çok kabul gören teorilerden biri, nöral kıvrımların kapanmasından sonra yüzey ektodermine nöroektoderminden eksik ayrılmasıdır (53). Ensefalosel tedavisi cerrahidir. Amaç, su geçirmez dural kapama ile kemik defektini onarmak, fazla deriyi gidermek ve işlevsiz beyin dokusunu çıkarmaktır(54).

2.5.9. Split Kord Malformasyonu

Split kord malformasyonları (SCM), kapalı spinal disrafizm ve gergin spinal kord sendromunun nispeten nadir formlarıdır. Spinal kort kemik, kartilaj şpur veya fibroz bant ikiye ayrılır. SCM iki tiptir, tip I, her biri kendi dural kılıfı içinde yer alan ve bir medyan kemik veya kartilaj çıkıntı ile ayrılmış iki hemikordan oluşur ve tip II, fibröz bir medyan septum ile ayrılmış tek bir dural tüp içine yerleştirilmiş iki hemikordan oluşur. Fizik muayene bulguları arasında doğumsal skolyoz, kifoz, bacak uzunluk farklılığı, ayak deformiteleri, nörojenik mesane ve alt ekstremitelerde

güçsüzlük/duyu kaybı sayılabilir. Diğer cilt kaplı defektlere benzer şekilde, üstte bulunan kutanöz anormallikler sıklıkla mevcuttur. Lezyonların çoğu, düşük torasik ve sakral seviyeler arasında meydana gelir ve kadınlarda biraz daha yaygındır (55,56).

2.5.10. Nöroenterik Kist

Nöroenterik kist, heterotopik endodermal dokudan oluşan spinal aksın nadir görülen bir lezyonudur. İnsan embriyogenezinin üçüncü haftasında, nöroenterik kanal yolk kesesini ve amniyotik boşluğu birleştirir. Normalde geçici nöroenterik kanalın kalıcılığı, endoderm ve notokord'un uygun şekilde ayrılmasını önler. Yaklaşık %90'ı intradural/ekstramedüller kompartmanda bulunurken, kalan %10'luk kısım intradural/intramedüller veya ekstradural yerleşim arasında bölünmüştür. Nöral doku basısı ve fistuloz yolla menenjit yaptığı için operasyon tamamının çıkarılması hedeflenir(57).

2.5.11. Dermal Sinus

Konjenital bir dermal sinüs yoludur. Embriyonel ektodermin bir bölgesininorijinal nöroektodermden ayrılamamasıyla ortaya çıkan nadir bir spinal disrafizm şeklidir, bu fenomen ayrılma defekti olarak da adlandırılır. Dermal sinüs yolları orta hat lumbosakral bölgede ortaya çıkar ve sıklıkla diğer kutanöz ve intradural patolojilere eşlik eder (58)

2.6 HAMBURGER HAMILTON (HH) EVRELEMESİ

Her birinde önemli sayıda embriyo karşılaştırarak standart oluşturulmuştur(59). Çizimler için tipik embriyolar seçilmiştir. Gelişimin farklı aşamalarında, farklı karakterler öne çıkar ve bu özellikle teşhis için yararlıdır. Kuluçkanın ikinci günü için embriyoların geleneksel tanımını somit çiftine dayanmaktadır.

Evreler üç somit aralığı seklindedir. Somitler tam olarak oluşmadıkça ve bitişik mezodermden yarıklar ile tamamen ayrılmadıkça değerlendirmeye alınmamaktadır. Kuluçkanın üçüncü gününde, yani embriyonun 22 somit aşaması olduğunda (evre 14), uzuvların gelişimindeki ilerleme, en uygun tanı kriterlerini sağlar. 4 ila 9 günlük kuluçka arasındaki gelişim evresi kanatlarda, bacaklarda ve iç organlarda hızlı değişikliklerle karakterizedir. 8. günden 12. güne kadar tüy folikülleri ve göz kapakları gelişir. Embriyo büyümesiyle evreleme açısından zorluklar olur; pratikte hiçbir yeni yapı oluşturulmaz ve esas olarak sadece zaten var olanın büyümesi gerçekleşir. Bu nedenle, gaga ve ayak parmakları uzunluklarının ölçümlerinden yararlanılmıştır(59).

Evre 1: Primitif çizgi ortaya çıkmadan önce blastodermin hücre kümeleşmesi görülür.

Evre 2: İlk çizgi inkubasyonun 6. saatlerinde görülmeye başlar.

Evre 3: Ara çizgi inkubasyonun 12- 13. Saatlerine tekabül eder. Ara çizgi pellusidal bölgenin arkasında merkezine doğru devamlılık gösterir. Henüz primitif oluk yoktur.

Evre 4: Tam çizgi.(18- 19 saat) Primitif çizgi tam uzunluğunu(ortalama uzunluk=1,88 mm) elde eder. Pellusidal bölgenin üçte iki ile dörtte üçünü kaplıyor. Primitif oluk, Hense düğümü görülür.

Evre 5: Kafa çıkıntısı veya notokord hense (19-22 saatler) düğümünün önünden boru şeklinde uzama gösterir.

Evre 6: Kafa kıvrımı(23-25 saatler) embriyonun önönünde bariz bir şekilde seçilir. Somitler henüz farklılaşmamıştır.

7'den 14'e kadar olan evreler somit çiftlerinde uygun olarak geliştirilmiştir. Her üç çift somit bir evreye tekabül ediyor. Üç çift aralarında olan somitleri belirtmek için + ve – işaretleri kullanılır. Örnek verecek olursak evre 7 bir çift, evre 7+ iki çift, evre 8- üç çift ve evre 8 dört çift somit bulundurmaktadır.

Evre 7: Bir somit(23-26 saatler) mevcut. Gerçekten bu somit ikinci somittir ilki henüz tam seçilememektedir. Nöral kıvrımlar kafa bölgesinde görünür hale gelir.

Evre 8: Dört somit(26-29 saatler).Nöral kıvrımlar midbrain seviyesinde karşı karşıya dayanmaktadır. Blastodermin arka yarısında kan adacıkları seçilir.

Evre 9: Yedi somit(29-33 saatler). İlk optik veziküller oluşuyor. Çift olan kalp primordisi birleşmeye başlar.

Evre 10: On somit(33-38 saatler). İlk somit kaybolmaya başlıyor. Kranial bükülme görülmeye başlar. Kalp sağa doğru yönelmiş durumdadır ve üç beyin kesesi oluşmuştur.

Evre 11:On üç somit(40-45 saatler). Arka beyinde beş nöromer seçiliyor. Ön nöropor kapanır.

Evre 12:On altı somit(45-49 saatler). Kafa sola yönelmiş durumda. Ön nöropor kapanmıştır. Telensefalon mevcut. Primer optik kesecikler ve optik sak oldukça iyi şekilde görülür. Kulak çekirdeği derindedir ve geniş şekilde açıktadır. Kalp S şekli alır. Amnionun baştaki katlantısı ön beyin bölgesinin girişini kaplar.

Evre 13: On dokuz somit(48-52 saatler). Kafa tam sola dönmüş durumda. Kranial ve servikal bükülmeler büyük eğimleri oluşturuyor. Telensefalonun hacimce büyümesi görülür. Kulak çekirdeği ağzının küçüldüğü gözlenir.

Evre 14: Yirmi iki somit(50-53 saatler). Önbeyin ve arkabeyin doksan derecelik açı oluşturur. Servikal eğrilik geniştir. Bir ve ikinci farengeal arklar ve yarıklar belli olur. Primer optik vezikül çökmeye başlar. Lens oluşmuştur. Kulak yolu açıklığı kapalıdır. Amniyon 7-10. somitlere kadar uzanır.Evre 14'ten sonra somitlerin tespit edilmesi giderek zorlaşır.

Evre 15:50-55. Saatlerdir. Yan vücut kıvrımları kanatları oluşturmaya başlar.S Gelecekteki uzuv bölgelerinde önemsiz mezoderm birikintileri görülüyor. Amniyon 7-14 somitlere kadar ulaşmaktadır.Üçüncü viseral ark ve cleft ayırt ediliyor. Optik çukur tam olarak oluşmuştur.

Evre 16:Yan vücut kıvrımları 17-20 somitlere kadar yani kanat ve bacak arasında yerleşmektedir. Kanatlar yan vücut kıvrımlarından oluşmaya başlar. Bacak primordiyumları halen daha gelişmemiştir. 26-28 somit mevcuttur. Amniyon 10-18

somitlere kadar uzanmaktadır. Rotasyon 10-14 somitlere kadar uzanmaktadır. Cleft halen oval sekildedir. Epifiz oluşmamıştır.

Evre 17: Bu evre 52-64 saatlere tekabül etmektedir. Alt ve üst ekstremité çıkıntıları görünür hale gelir. 29-32 arası somit mevcuttur. Kranyal bükülme aynıdır. Servikal bükülme açısı 90 derecenin üzerindedir. Rotasyon 17-18 somitlere kadar uzanmaktadır. Kuyruk çıkıntısı öne bükülmüş vaziyettedir. Mezodermi segmentasyonu uğramamıştır. Allantois daha oluşmamıştır.

Evre 18: 65-69 saatlere tekabül etmektedir. Ekstremité çıkıntılarının büyümesi ile beraber alt ekstremité çıkıntısı üst ekstremité çıkıntısına göre biraz daha hacimce büyüktür. 30-36 arası somit mevcuttur ve bunlar alt ekstremité çıkıntısının hizasını geçmektedir. Amniyon kesesi genellikle kapalıdır daha az olguda lomber bölge hizasında ufak bir delikle açık kalmaktadır. Servikal bükümde medulla ile gövde birbirileri ile dikey açı oluşturur. Gövde bükümü lomber bölgeye doğru kaymıştır. Rotasyon vücudun arka kısmına doğrudur. Kuyruk çıkıntısı sağa doğru bakar ve gövde ile dikey açı oluşturur. Maksiller proçes görünmez. Visseral cleft seçilmiyor veya yoktur. Allantois kalın duvarlı cep şeklindedir.

Evre 19: 68-72 saatlere tekabül etmektedir. Ekstremité çıkıntıları büyük ve simetrikler. 37-40 arası somit mevcuttur ve kuyruğa kadar uzanmaktadırlar. Öne doğru kıvrılmış kuyruk segmente olmamıştır. Medulla ve gövde arasındaki açı 90 derecenin altındadır. Vücudun rotasyonuna bağlı olarak gövde tam görülmemektedir. Maksiller ve mandibular proçesler görülmektedir. Gözde pigmentasyon oluşmamıştır.

Evre 20: 70-72 saatleri kapsamaktadır. Alt ekstremité çıkıntıları üst ekstremité çıkıntıları arasında hacimce fark büyümüştür. Üst ekstremité simetrik olmasına bakmayarak alt ekstremité asimetric olabilir. 40-43 somit bulunmaktadır, kuyruk ucu halen daha segmentasyona uğramamıştır. Servikal bükülme açısı daha da küçülmüştür. Kuyruktaki öne bükülme lumbosakral bölgeye doğru kaymıştır. Rotasyon sonlanıyor. Maksiller çıkıntı sıkıntıdan büyük veya aynı boyuttadır. İkinci ark çıkıntısı oluşur. Dördüncü ark, üçüncü arkdan dördüncü kleft, üçüncü kleftten boyut olarak küçüktür. Bu evreler boyunca primer ve sekonder nörolasyonla nöral tüp oluşmuş olur. Totalde

46 evreden oluşan bu sınıflandırmada geri kalan evrelerde embriyonun organogenezinin tamamlanması ve gelişimi yer almaktadır(59).

2.7 FLORÜR

Florür, periyodik cetvelde 7A halojenler grubunda bulunan Flor atomunun anyon formudur. Element formunda diatomik molekül olarak bulunmaktadır. Florrür elementler arasında en fazla elektronegativiteye sahiptir. Oda sıcaklığında nitrojen, oksijen ve asal gazlar dışında diğer maddelerle tepkimeye girebilmektedir. Doğada bileşikler halinde bulunan florürün tuzları termal ve içme sularında toprakta yiyeceklerde bulunabilmektedir. İnsan tüketimi için gerekli olan tuzları kalsiyum florür (CaF_2) diğer adıyla florit, florapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) ve kriolit (Na_3AlF_6) gibi bileşiklerdir.

Nükleer enerji endüstrisinin uranyum izotoplarını ayırmak için ihtiyaç duyulan uranyum heksaflorürü yapmak için de kullanılır. Florürler olarak bilinen flor tuzları, uzun süre kaynak yapmak ve camı buzlamak için kullanılmıştır. Aynı zamanda, yüksek güçlü elektrik transformatörleri için yalıtkan gaz olan sülfür heksaflorür yapımında da kullanılır. Aslında flor, solventler ve teflon gibi yüksek sıcaklıklı plastikler de dâhil olmak üzere birçok florokimyasal alanda görülür.

Ayrıca, kızartma tavaralarında,kablo izolasyonunda, su geçirmez ayakkabı ve giysilerde üretiminde rol alır. Hidroflorik asit, ampullerin camını aşındırmak ve benzeri uygulamalarda kullanılır.Pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi tıbbi görüntülemelerde, temizlik maddesi olarak, pestisitlerde kullanımı mevcuttur. Kloroflorokarbonlar, klimalarda ve buzdolaplarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Daha yaygın olarak ise ağız ve diş sağlığı alanında üretilen ürünlerde ve suyun florlaştırılmasında önemli yere sahiptir. Yapılan araştırmalara göre doğal flor kaynakları yetersiz olan bölgelerde kemik hastalıkları ve diş çürüklerinde artma olduğu tespit edilmiştir(60–62)Bu nedenle 20. yüzyılın sonlarına doğru bazı ülkelerde içme sularına florür tuzları eklenmeye başlanmıştır(63,64)

Gereğinden fazla maruz kalma durumunda dental floroze neden olmaktadır. Ayrıca laboratuvar deney hayvanlarında öğrenme ve hafıza üzerine olumsuz etkileri

de saptamıştır (65,66)Çeşitli çalışmalarda günlük alım için 0,46-5,40 mg/gün arasında değişen değerler bildirilmiştir(67).Ancak ABD National Academy of Sciences Institute of Medicine, günlük 0.05 mg/kg florür alımını tavsiye etmiştir. Bu değerinorta derecede diş florozu dâhil istenmeyen yan etkilere neden olmadan diş çürüğü oluşumunu maksimum düzeyde azalttığı gösterdi (68).

Fare hipokampal nöronları üzerinde invitro yapılan deneylerde çeşitli dozlarda (20 mg/L, 40 mg/L, ve 80 mg/L) uygulanan sodyum florürün nörotoksik etkiye sahip olabileceği görülmüştür (69). İnsan vücudunda total florür miktarı 2.6 gramdır. Başlıca alım oral yoldur.İnhalasyon yoluyla da vücuda girebilir. Örneğin florlu anestezi maddeler akciğerden emilir ancak bu vücuda alım yolu yaygın değildir. Deriden emilimi ise yalnızca hidroklorik asit yanıkları sonucu olduğu görülmüştür(70). Florün oral yoldan alındıktan sonra pH değerine bağlı olarak ilk öncemideden pasif diffüzyonla hücrelere taşınmaktadır. Hücre zarı hidrojen florür(HF) için geçirgenliği F iyonuna göre 1 milyon keredaha fazladır. O yüzden düşük pH'lı ortamda HF olarak membrandan geçişi daha kolay ve hızlı olmaktadır(71).Gastrik boşalmada emilim hızını büyük ölçüde etkilemektedir. Mideden emilemeyen florün büyük bir kısmı ince bağırsaktan emilerek pH'ın emilim üzerine olan negatif etkisini dengelemektedir. Burada gerçekleşen emilim pH ile bağlantılı değildir. İyonik florür hücreler arası thight junction dan ve kanallardan geçerek dolaşıma katılır. Kanda bulunan florürün %70-75'i ince bağırsaktan emilmektedir (70). Emilemeyen son kısım feçesle atılmaktadır.

Beraberinde alınan alüminyum, kalsiyum, magnezyum gibi metaller florür ile tepkimeye girerek çözünemeyen tuzlar oluşturup emilimi engellemektedir. Bu nedenle metaller akut zehirlenmelerde yaygın olarak kullanılır. Plazma konsantrasyonu alındıktan 20-90 dakika sonra pike ulaşmaktadır(72). Vücutta florürün kan konsantrasyonu kemik, yumuşak dokular tarafından kullanılarak ve idrarla atılarak kontrol altında tutulur. Bu dengeyi etkileyen durumlar metabolizmanın ne yönde gideceğini belirler.

Akut ve kronik asit-baz dengesizliği, yüksek irtifa, fiziki aktivite, hormonlar, yeme alışkanlıkları florür metabolizmasını etkileyen durumlardır. Florür emildikten sonra hızlı bir şekilde vücutta dağılımı gerçekleşir. Diyetle alınan florürün 14 dakika sonra kanda konsantrasyonu artmaya başlarken 20 ila 60 dakika sonra tepe noktasına

ulaşır ve 3 ila 11 saat arasında bazal kan değerlerine geri dner. Sağlıklı bireylerde florürün %35 kadarı kalsifiye dokular tarafından tutulmaktadır. Kan düzeyinde düşüş yaşandığı takdirde tekrar dolaşıma verilmektedir (72). Yüzde birden az kısmı yumuşak dokularda birirmektedir.

Florür kanda 2 formda bulunmaktadır. Biri flor iyonu plazmada mevcut olan proteinlere bağlanmadan serbest bir şekilde hücre ve plazmada dolaşır. Plazmada bulunan bu iyon hücrelerde bulunan miktarın 2 katıdır (73). Diğer formu da iyonik olmayan florürdür. Kanda büyük çoğunlukla lipidlerle bileşikler şeklinde bulur ve plazma proteinlerine bağlı şekildedir. Kandaki miktarı iyonik florür göre daha fazla olmasına rağmen görevi tam olarak anlaşılamamıştır. İyonik ve iyonik olmayan florür plazmanın total florür fraksiyonunu oluşturmaktadır. Genel olarak hızlı dağılım gösteren florür, dokulardaki farklı kan akım hızından da etkilenmektedir. Yumuşak doku dağılımında pH'ı alkalın olan dokularda birikimi dikkat çekmektedir (74). Başka bir deyişle florür asidik ortamdan alkalın ortama geçiş yapmaktadır. Memeli hücresi sitozol hücre dışına göre asidik olduğu gözönünde bulundurulursa hücre içinde daha az miktarda bulunur. Florür zehirlenmelerinde hücre dışı sıvının alkalileştirilmesi florürün hücre içinden çıkarılması için byknem taşır(75).

Florürün bazı vücut sıvısındaki konsantrasyonları plazmadaki konsantrasyona göre farklılık göstermektedir.örneğin beyin omurilik sıvısı ve anne sütünde plazmaya göre %50 kadar düşük olabilmektedir. Dişeti oluğu sıvısında plazmaya göre hafif yüksek olmasına rağmen parotis ve submandibular sıvılarda plazmaya göre hafif düşük olduğu gözlenmiştir(70).Duktal tükrük florürün plazma florrne oranı 0.8-0.9 olarak bulunmuştur (73). Modern yöntemler de vücut florür maruziyeti plazmaya göre değil de duktal florr bakılarak tayin edilmektedir(76–78).Ağız içine salgılanmış olan tkrkten alınanrnekte bulunan florür içeren besinlerden dolayı yanıtıcı olabilmektedir(79).

Vücutta bulunan florun %99'u mineralize dokuda birirmektedir. Başlıca kemik doku olmakzere dentin ve enamelde bulunmaktadır(80). Kemiklerde olan dağılımı farklıdır. Uzun kemiklerde periosteumda endosteuma göre daha fazla yerleşmektedir. Süngerimsi kemikte ekstrasellüler sıvı fazlalığından dolayı flor içeriği sert kemiğe göre daha fazladır.Yaşam boyu devam eden florür alımına göre kemikteki bu maddenin konsantrasyonları yaşla düz orantılıdır(81–83). Sağlıklı yetişkin tarafından

günlük alınan florürün %36 kadarı iskelet sistemine yerleşmektedir geri kalan kısmı ise idrar yoluyla vücuttan atılmaktadır. Bu oran çocuklarda %55'e kadar çıkmaktadır (80).

Florürün vücuttan eliminasyonunun 3 yolu vardır; böbrek, feces, terdir. Sağlıklı yetişkinlerde günlük renal atılım %60, çocuklarda %45 civarındadır. Yaşlılığa bağlı olarak glomerül filtrasyon hızında düşüş kanda florürün miktarının yükselmesine sebep olur (84). Florürün renal klirensi (35 ml/dak) diğer halejenlerin renal klirensine(1-2ml/dak)göre yüksek olduğu bilinmektedir(80). Renal tübülerden geri emilim midedeki geri emilime benzemektedir. İdrar pH'daki oynamalar florürün geri emilimini etkilemektedir.Feçeste bulunan florürün büyük çoğunluğu emilimi gerçekleşmemiş olanlarının birikimine bağlıdır. Oral yoldan alınan florürün %90 kana geçerken geri kalan %10'u feçes ile vücuttan atılır.

Çalışmamızda günlük hayatımızda geniş bir kullanım alanı olan florürün etkilerini araştırmayı planladık. Cıvciv embriyolarında sodyum florürün spinal kapanma defekti gelişimi üzerine etkileri değerlendirilmiştir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Beyin ve Sinir Cerrahi Kliniğinde yapılmıştır. Bunun için Türkiye Cumhuriyeti Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bornova-İzmir bünyesindeki Deney Hayvanları bölümünden temin edilen; spesifik patojen içermeyen, fertil, sıfırncı gün Leghorn tipli yumurtaları kullanılmıştır. Preparatların histolojik değerlendirilmesi Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı histoloji laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. GEREÇLER

3.1.2Deney Hayvanları

İnsan nörolasyon sürecine benzerliği, takip kolaylığı, embriyonun kısa zaman diliminde gelişiminden dolayı kümes hayvanları yumurtaları benzer çalışmalarda deney olarak kullanımı yaygındır. Bu çalışmada ağırlıkları 65 ± 5 gr arasında değişen 60 adet Leghorn tipi, fertil **Spesifik Patogen Free(SPF)** yumurtalar kullanıldı. Yumurtalar T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Bornova-İzmir bünyesindeki Deney Hayvanları bölümünden elde edilmiştir.

3.1.3 Laboratuvar Koşulları

Deney Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Eğitim Araştırma hastanesi Beyin ve Sinir cerrahi laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma için inkubator, steril eldiven, cam şişe, flaster, insulin enjektörü, steril mavi örtü, steril penset, steril mikromakas, elde edilen embryoların histolojik inceleme öncesinde saklanması için %5 formaldehid içeren steril plastikeppendorf tüpler kullanılmıştır.NaF % 99.9 saflıkta EC No 231-667-8 Cas No 7681-49-4(Aromel Kimyamedicala A.Ş.).

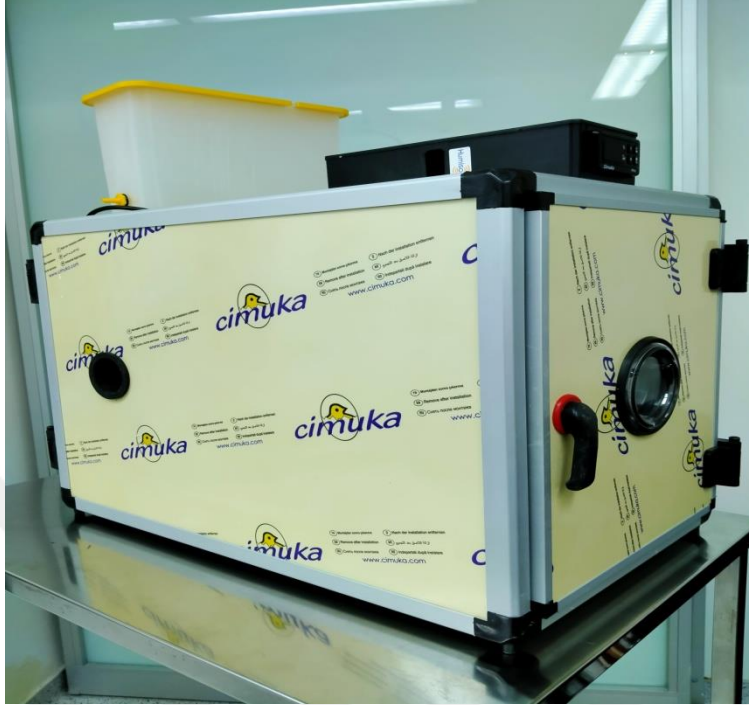


Şekil 4: Kullanılan laboratuvar aletleri ve uygulanan sodyum florür preparatı.

3.1.4. İnkübatör

Çalışmamızda 60 adet yumurta tutumu olan standardize inkübatör kullanılmıştır. Cihaz yumurtaların gelişimini sağlamak için termostat ve ısının homojen şekilde dağılımını yapan fan içermektedir. Sıcaklık $37.8^{\circ} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ olacak şekilde ayarlandı. Nem oranı yumurta gelişiminde gaz alış verişini optimumda tutmak amacıyla 60 ± 5 olarak ayarlandı. Bunun için distille su kullanılmıştır. Kuluçka

makinesi (Cimuka, CT60 S, Ankara) nem ve sıcaklık dağılım kontrolünü ve yumurtaların pozisyon değişimini sağlamaktadır.



Şekil 5: Kuluçka makinesi (Cimuka, CT60 S, Ankara).

3.2. YÖNTEM

Kuluçka makinesine 60 adet SPF yumurta sivri uçları aşağıda olacak şekilde yerleştirildi ve 24 saat sonunda (HH evre 6) sodyum florür(NaF) enjeksiyonu için uzun süre makine dışında bekletilmeden işleme alındı. National Academy of Sciences Institute of Medicine’ın önermiş olduğu günlük doza göre (0.05 mg/kg) hesaplamalar yapıldı (68). Ortalama 60 gr olan yumurta için hesaplandığında 0.003 mg F gerekli olduğu görüldü. Sodyumunda moleküler kitlesi eklendi. hassas terazi yardımı ile NaF’ün yetişkin dozu 0,0066 mg ve bunun iki katı olan dozu 0,0132 mg olarak hesaplanıldı. 0.1 cc serum fizyolojik içinde çözünmesi sağlandı. NaCl’ün 0.1cc serum fizyolojik içinde miktarı 0.9 mg vardır.Eklenecek NaF çözeltinin konsantrasyonunu etkilemeyerek osmotik basınçta dengesizliği sebep olmadığı görüldü. Ayrıca benzer araştırmalar incelendiğinde florürürün, NaF olarak uygulandığı tespit edilmiştir (85–87). Buşekilde 3 adet grup oluşturuldu:

Grup 1 (n=20): kontrol grubu: 0.1 cc serum fizyolojik

Grup 2(n=20): düşük doz grubu(0.003 mg F):

0.0066 mg NaF + serum fizyolojik: 0.1 cc

Grup 3(n=20): yüksek doz grubu(0.006 mg F):

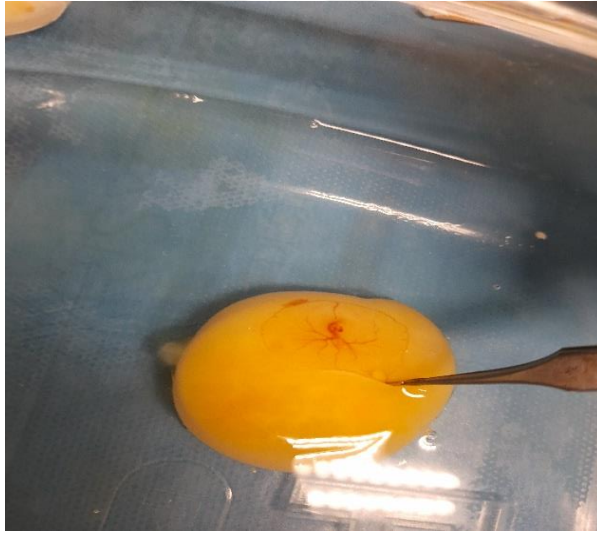
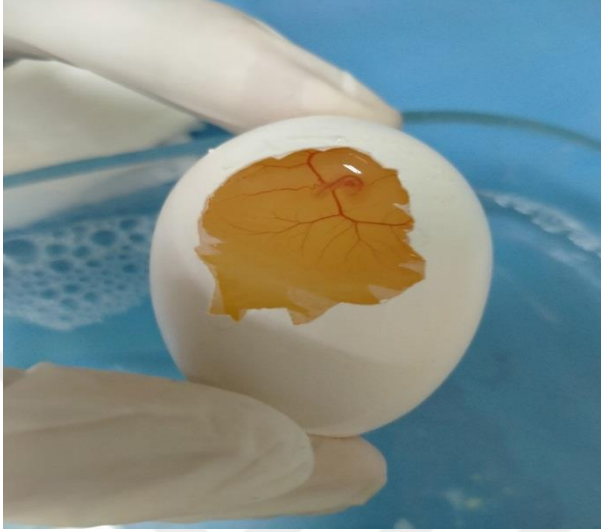
0.0132 mg NaF +serum fizyolojik: 0.1 cc

Steril şartlarda yumurtalarda blastoderme yakın kısımdan çapı 5 mm olacak şekilde delik oluşturuldu. Embriyonel disk saptanarak altına insulin iğnesine önceden hazırlanmış olan solüsyonlar verildi. Üzeri steril flaster yardımı ile sıkı bir şekilde kapatıldıktan sonra yeniden kuluçka makinesine yerleştirildi.



Şekil 6:Civciv embriyolarına enjeksiyon uygulaması görülmektedir.

Hamburger ve Hamilton evre 20’de (72 saat sonunda) işleme alınan yumurtalar 35°C ye kadar ısıtılmış distille su içinde embryonik dokunun zarar görmeyeceği kadar geniş ekstraembryonel dokuların histolojik süreci zorlaştırmayacak şekilde küçük olarak mikromakas ve mikropenset yardımı ile eksizyonu yapıldı.



Şekil 7: Üç günlük yumurta embriyosu gözlenmektedir.

Tüm gruplardan 72. saatte diseke edilen embriyolar ışık mikroskopik inceleme için %10’ luk nötral tamponlu formalinde 72 saat süreyle tespit edildi. Embriyolar %70 etil alkolde 20 dk, %80 etil alkolde 20 dk, %90 etil alkolde 30 dk, %96 etil alkolde 40 dk süreyle dehidrate edildi. Örnekler daha sonra ksilen ile 5 dakikalık 2 aşamada şeffaflaştırıldı, sıvı parafine alındı ve ardından parafine gömülerek blok haline getirildi. Parafin bloklardan döner mikrotom (Medite M530) kullanılarak 4 µm

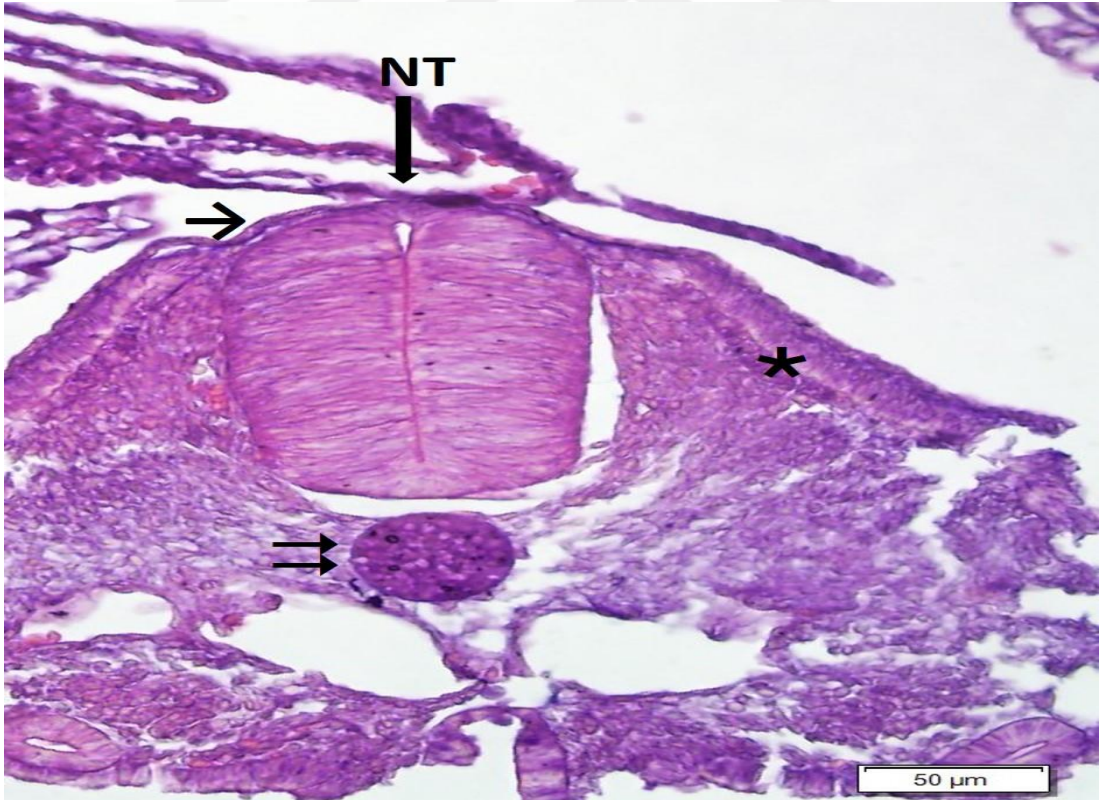
kalınlığında alınan kesitler lamlara yerleştirildi ve histomorfolojik inceleme için Hematoksilen-Eozin boyası ile boyandı, entellan ile kapatıldı. Embriyolarda nöral tüp, notokord ve nöroepiteldeki morfolojik değişiklikler bilgisayar donanımlı, CCD kamera (Olympus DP 72, Tokyo, Japonya) ataçmanlı foto-ışık mikroskopta (Olympus BX51, Tokyo, Japonya) değerlendirilerek kesitlerden fotoğraflar alındı.

3.3. İSTATİSTİK

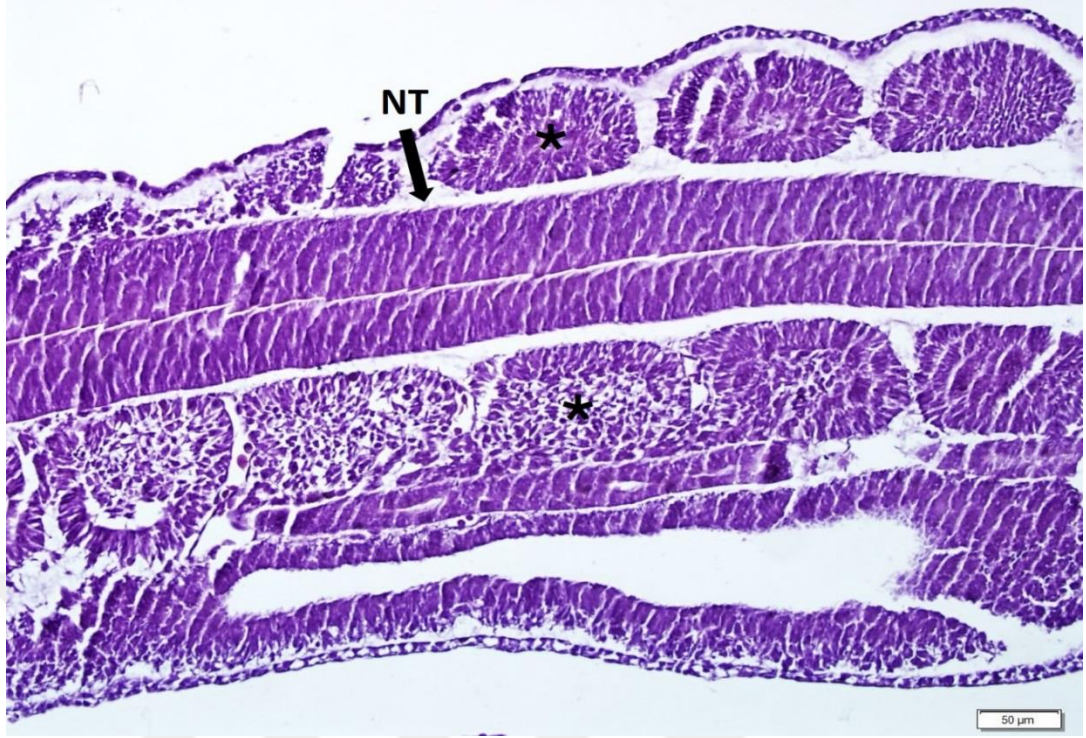
Elde edilen veriler MATLAB R2021A Statistics and Machine Learning Toolbox Version 12.1 programında saklanarak analiz edilmiştir. 0.003 mg dozda flor uygulanan tavuk embriyoları ve 0.006 mg dozda flor uygulanan tavuk embriyoları, flor uygulanmamış kontrol grupları aralarında anlamlı bir fark olup olmadığının tespiti için Chi-Square testi uygulanmıştır. Test sonucu elde edilen p değerinde testin istatistiki olarak anlamlı olup olmadığı değerlendirilmiştir. $p < 0.05$ değeri elde edilmesi durumunda gruplar arasında anlamlı bir fark anlamına geldiği kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

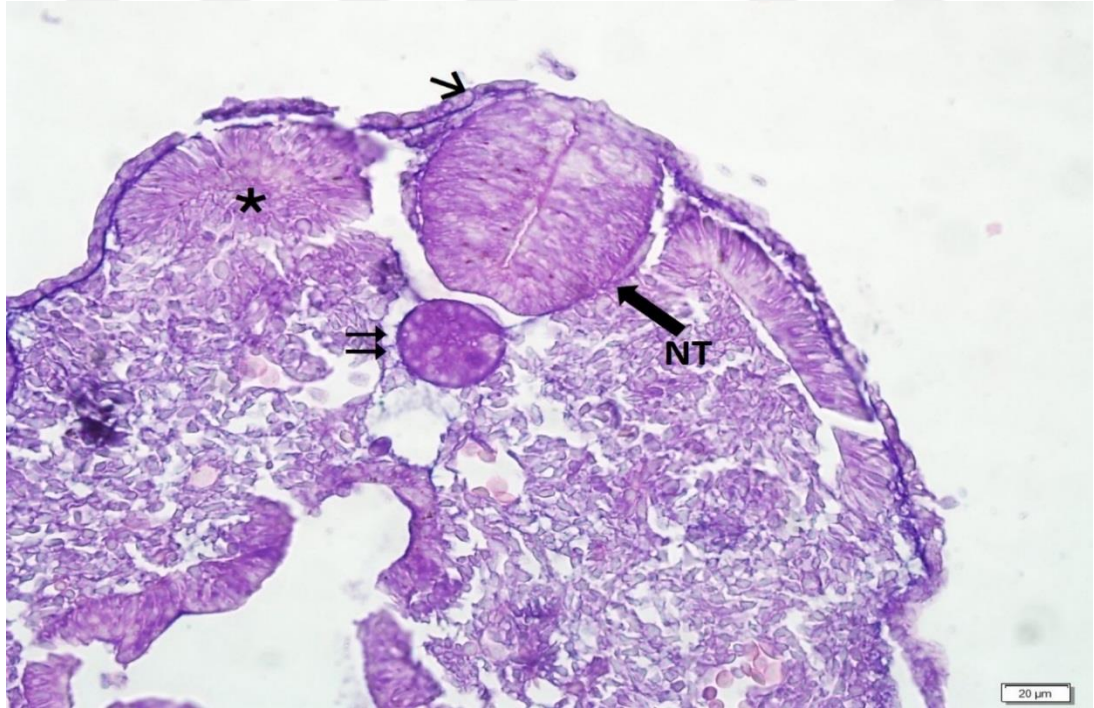
Kontrol grubunda bulunan 20 tavuk embriyosuna ait kesitlerin incelenmesi sonucunda nöral tüp transvers ve sagittal düzlemlerde izlenmiştir. Kesitlerin tamamında yüzey ektoderminin bütün olduğu, nöral tüpün kapalı olduğu, nöroepitelin, nöroepiteli çevreleyen bazal membranın, somitlerin ve notokordun normal yapıda olduğu gözlenmiştir (Şekil 1-4). 0.003 mg dozda flor uygulanan gruba ait 20 tavuk embriyosunda yapılan değerlendirmede iki örnekte tüp defekti , bir örnekte ise nöral tüpte minimal açıklık/defekt izlenmiştir (Şekil 5-9). Aynı gruba ait diğer 17 embriyoda nöral tüp yapısının kontrol grubuna benzer olduğu saptanmıştır (Şekil 10). 0.006 mg dozda flor uygulanan gruptaki 20 tavuk embriyosuna ait kesitlerde yapılan değerlendirmede üç örnekte NTD gözlenmiş ve bir embriyoda lümene doğru anormal nöroepitel proliferasyonu dikkat çekmiştir (Şekil 11-15). Aynı gruba ait diğer embriyolarda nöral tüp yapısı intakt olarak izlenmiştir.



Şekil 8. Kontrol grubunda ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp (NT), notokord (⇔), somit (*) ve yüzey ektodermi (→) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).



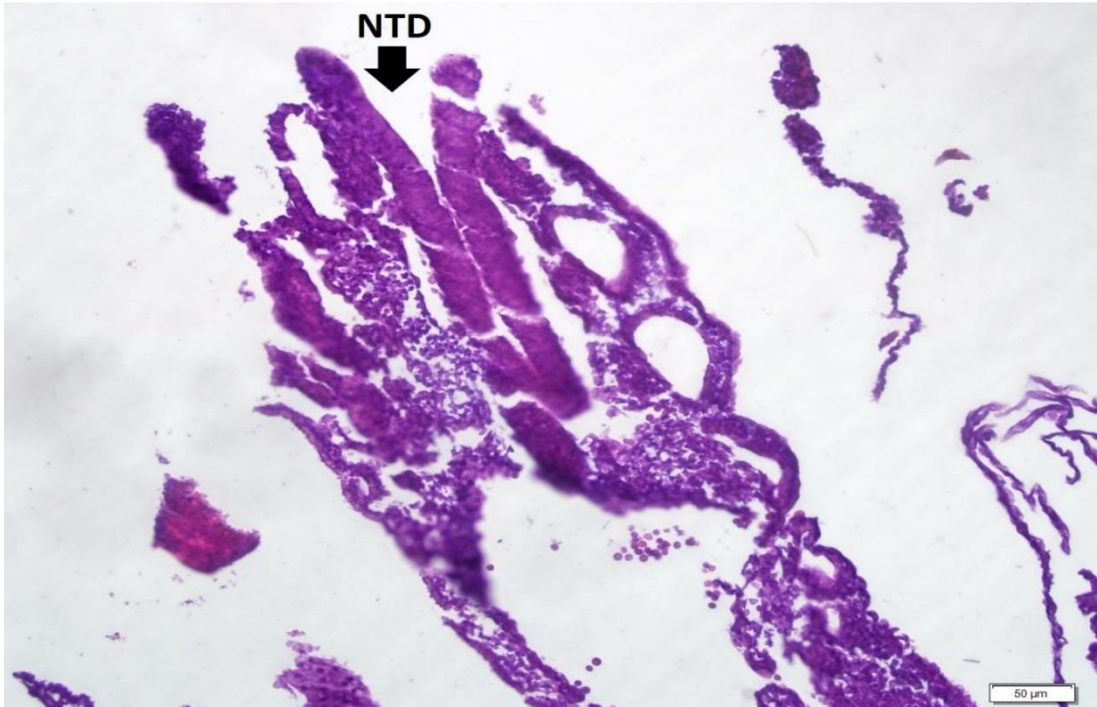
Şekil 9. Kontrol grubunda ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp (NT) ve somitler (*) sagittal düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).



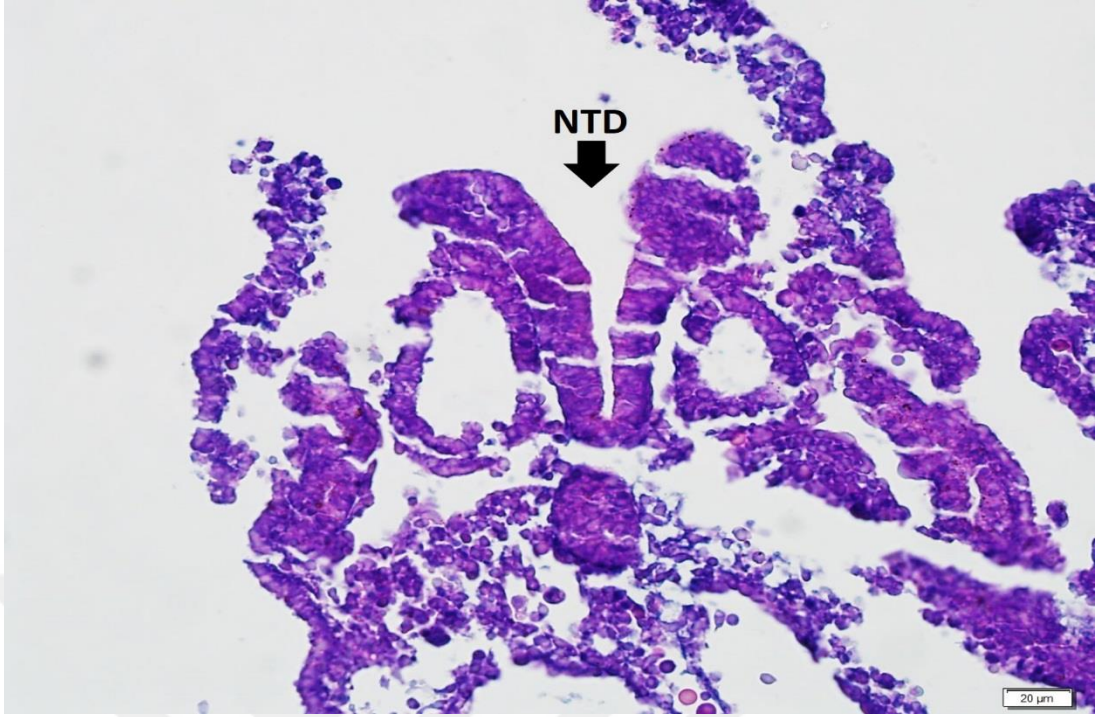
Şekil 10. Kontrol grubunda ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp (NT), notokord (⇔), somit (*) ve yüzey ektodermi (→) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 µm).



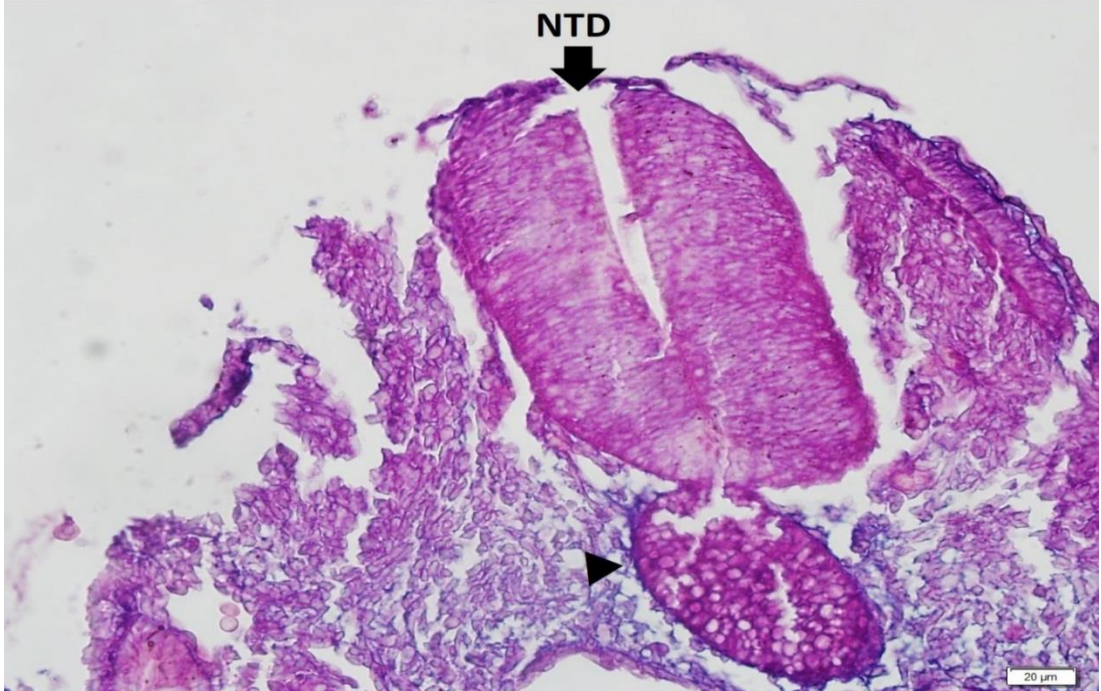
Şekil 11. Kontrol grubunda ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp (NT), notokord (⇔), somit (*) ve yüzey ektodermi (→) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 µm).



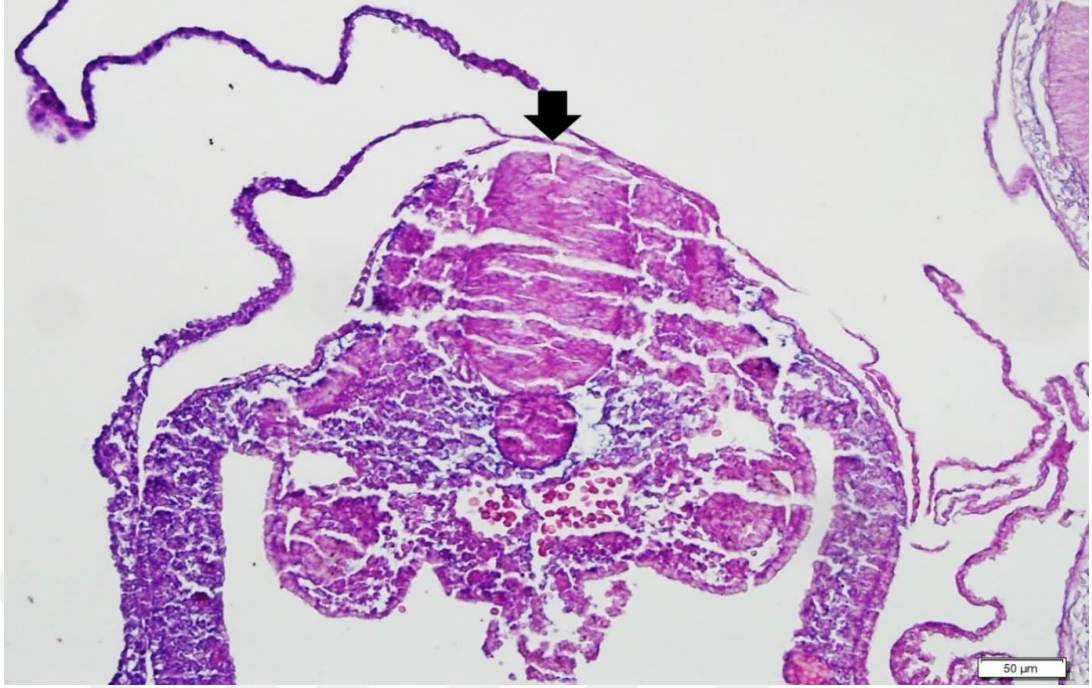
Şekil 12. Flor (0.003 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).



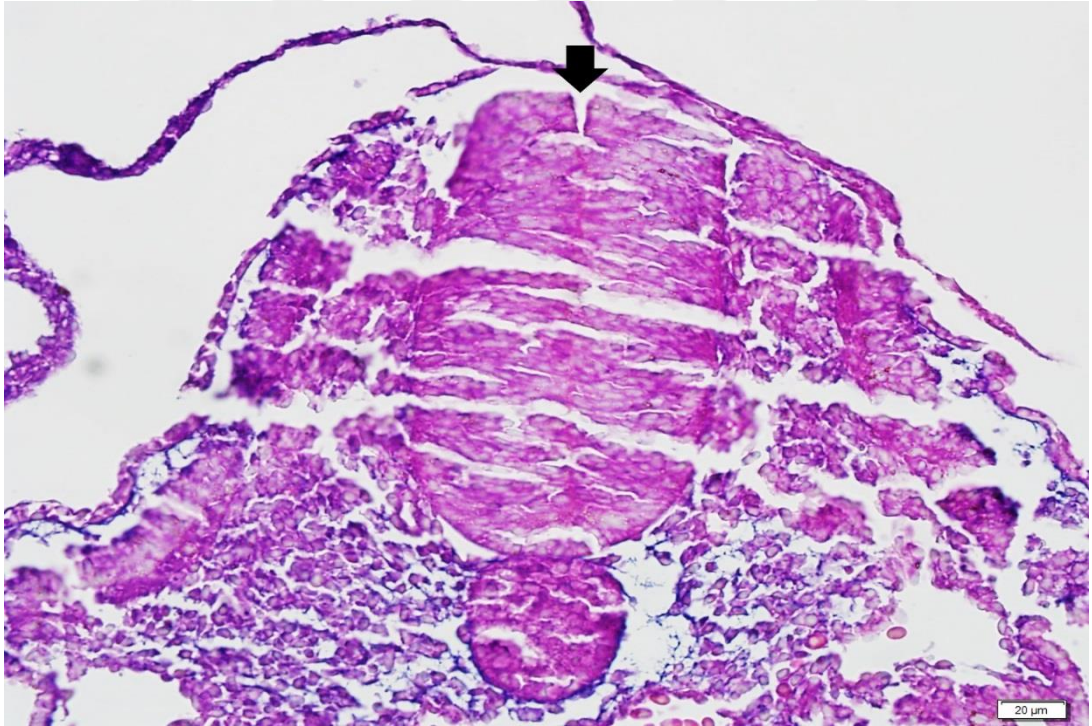
Şekil 13. Flor (0.003 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 µm).



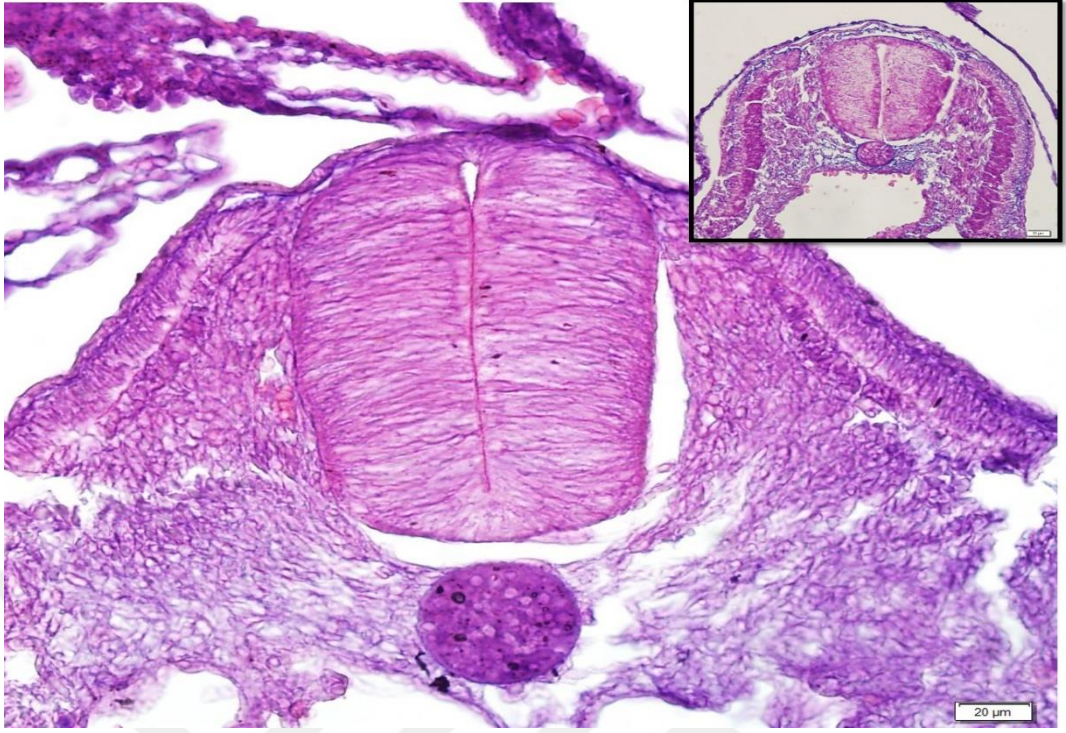
Şekil 14. Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) ve vakuolize notokord (▼) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 µm).



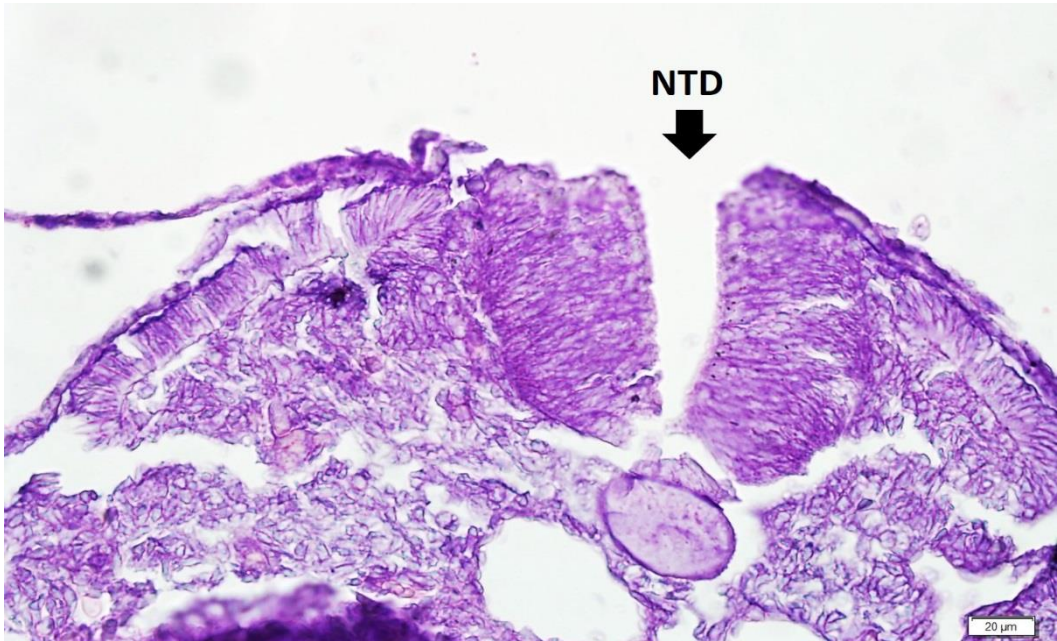
Şekil 15. Flor (0.003 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).



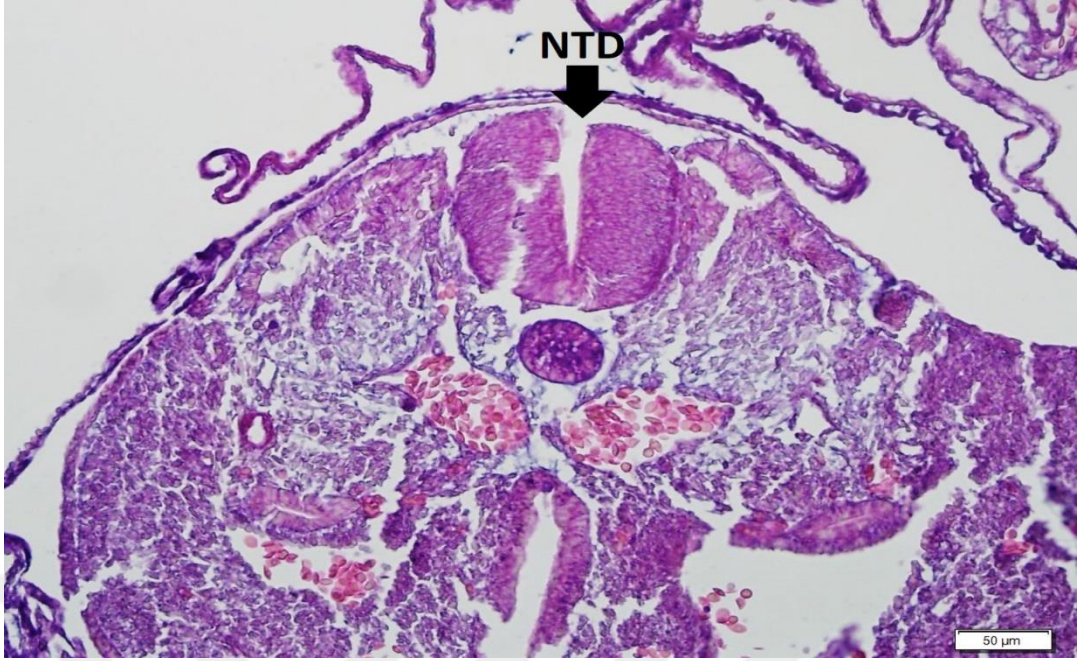
Şekil 16. Flor (0.003 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 µm).



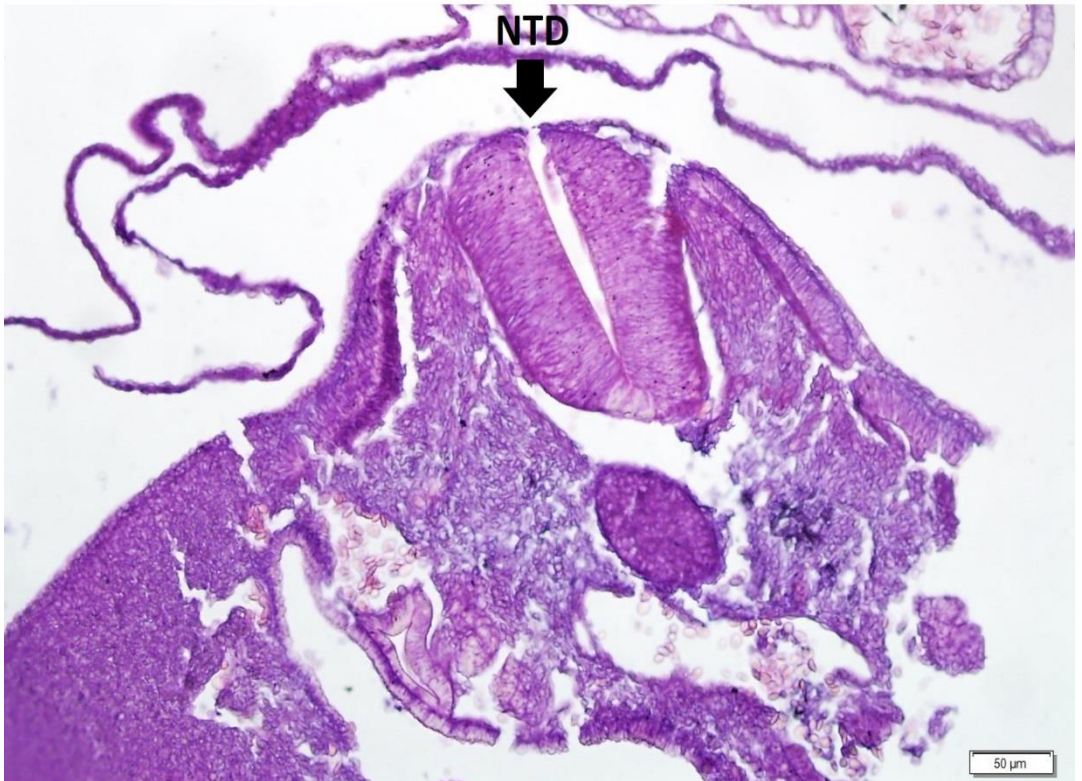
Şekil 17. Flor (0.003 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp, notokord, somit ve yüzey ektodermi transvers düzlemde normal yapıda izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 µm).



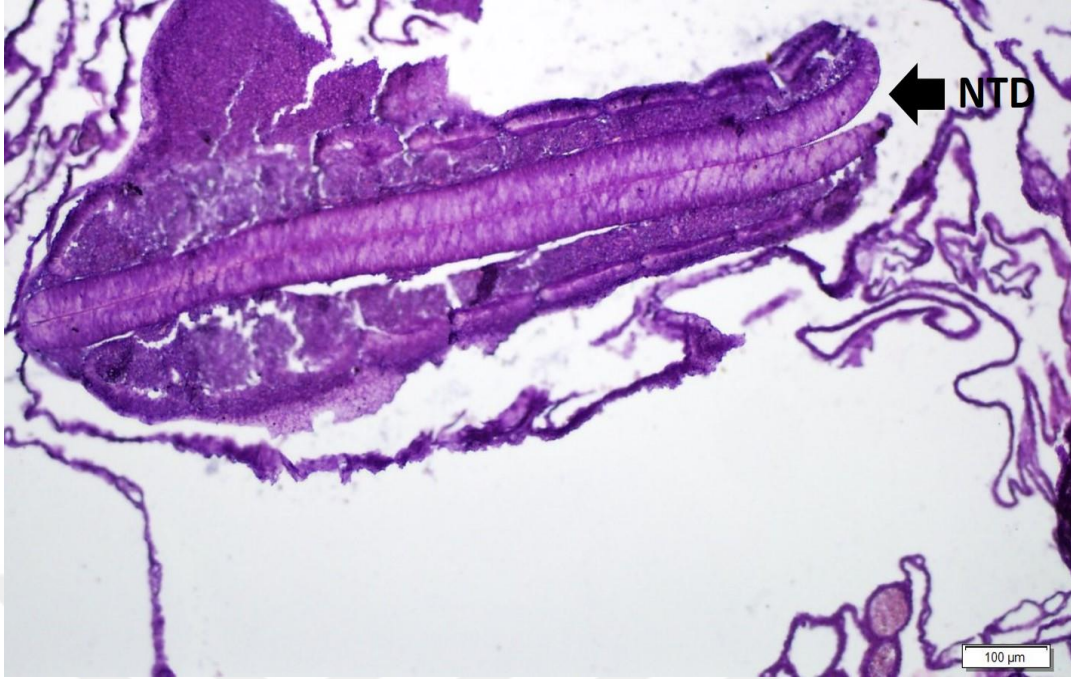
Şekil 18. Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X20 µm)



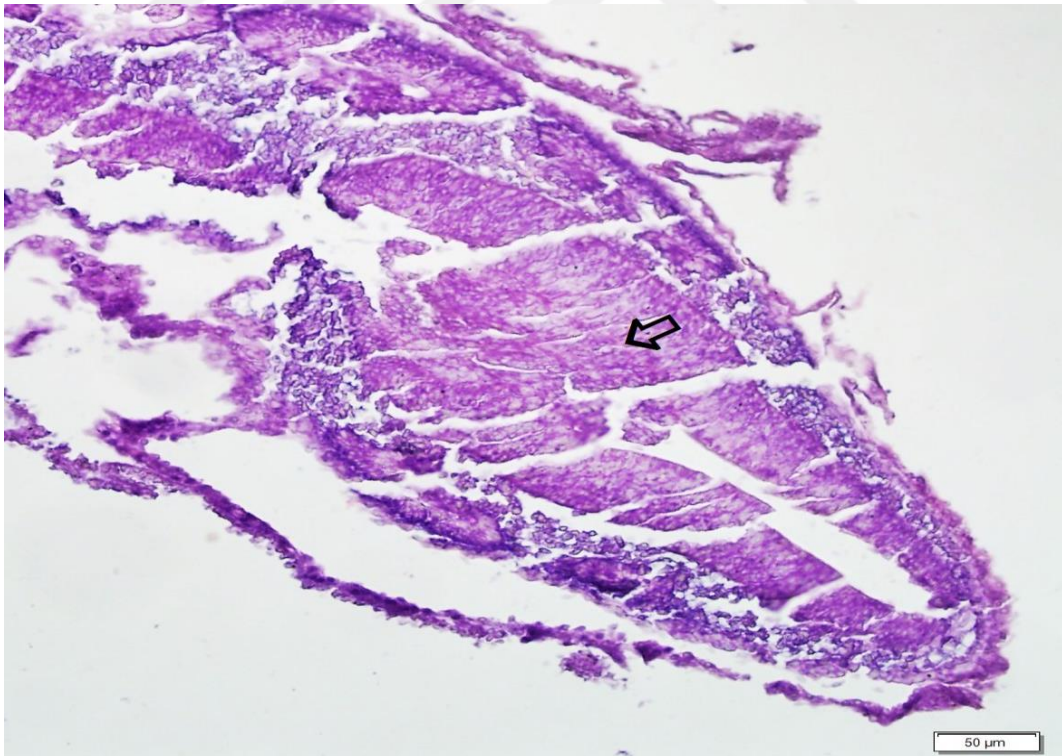
Şekil 19 .Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).



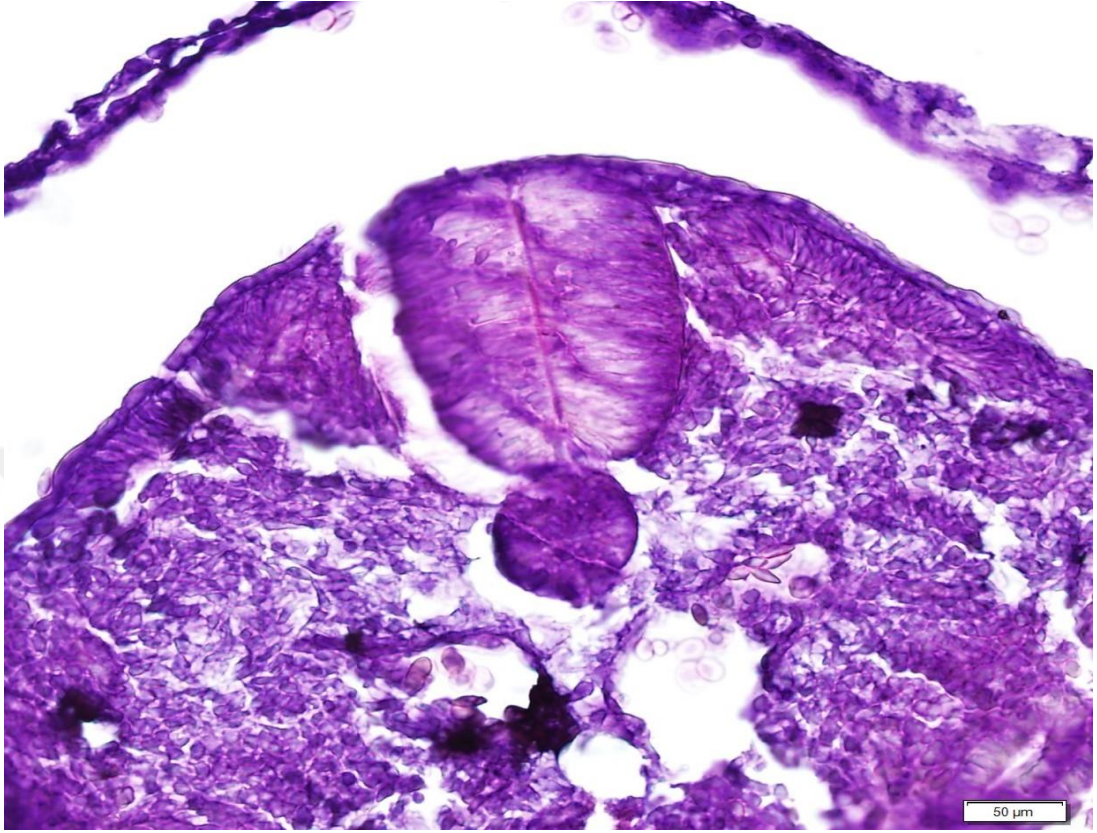
Şekil120 .Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) transvers düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).



Şekil 21. Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp defekti (NTD) sagittal düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X100 µm).



Şekil22. Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöroepitel proliferasyonu (⇨) sagittal düzlemde izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).



Şekil 23. Flor (0.006 mg doz) uygulanan grupta ışık mikroskobu ile yapılan değerlendirmede nöral tüp, notokord, somit ve yüzey ektodermi transvers düzlemde normal yapıda izlenmektedir (Hematoksilen ve eozin, X50 µm).

Farklı dozda florür uygulanmış iki farklı denek grubunun kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık içerip içermediği incelenmiştir (Tablo 2). Elde edilen sonuçlara göre düşük dozda (0.003 mg) florür uygulanan tavuk embriolarında, flor uygulanmamış kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0.072$). Yüksek doz florür(0.006 mg) florür uygulanan grupta nöral tüp yapısı defekti tespit edilen embriyo sayısının daha fazla olduğu gözlemlenmiş $p < 0.035$ tespit edilmiştir. Sonuç olarak 0.006 mg flor doz uygulanan grupta kontrol grubuna göre nöral tüp defektinin istatistiksel olarak anlamlı daha fazla geliştiği tespit edilmiştir (Tablo 3).

Tablo 2: Nöral tüp defekti gözlemlenmiş tavuk embriyolarının gruplara göre dağılımı görülmektedir.

Gruplar	Nöral tüp defekti olan embriyo sayısı	Normal embriyo sayısı
Kontrol grubu (n=20)	0	20
0.003 doz (n=20)	3	17
0.006 doz (n=20)	4	16

Tablo 3: Gruplar arası istatistiksel değerlendirme.*:p <0.05

Karşılaştırılan Gruplar	Ki-kare değeri	p değeri
0.003 mg vs Kontrol Grup	3.24	0.072
0.006 mg vs Kontrol Grup	4.44	0.035*

5.TARTIŞMA

Nöral tüpün gelişimi sürecinde oluşan patolojiler embriyonal veya fetal dönemde letal olabilmekle beraber postpartum dönemde de medikal, sosyo-ekonomik sorunları içinde ihtiva eden uzun dönem rehabilitasyon gerektiren doğumsal hastalıklardır. Amerika Birleşik Devletlerinde görülme insidansı 1/1000 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde ise 3/1000 sıklığında görülmektedir. Sık görülen konjenital malformasyonlar içinde yer alır (15).

Florür doğal olarak oluşan bir mineraldir. Genellikle diş çürümesini önlemek için kullanılır. Bu nedenle diş macunlarına ve bazı bölgelerde florlama adı verilen bir işlemle su kaynaklarına eklenir. Florür canlı organizma için önemli doğal maddelerden olmakla beraber fazlalığı beyin, kemik, dişler, böbrekler üzerine olumsuz etkileri olduğu gözlenmiştir(80,88–90). Yirminci yüzyıl ortalarından başlayan ve bazı devletlerde halen daha sürdürülen suyun florlaştırılması günlük ek florür maruziyetini arttırarak kronik florür toksisitesi oluşturabilir(64,91).

Hastalıkların gelişimini, etiyolojik nedenlerinin araştırılması için farklı canlılarda (sıçan, tavşan,zebrafish, kurbağa) embriyo çalışmaları yapılmaktadır(92–95).Civciv embriyosunun kısa zaman diliminde gelişimi araştırmacıların in ovo çalışmalara yönelmesinde etkili olmuştur(96,97). Kapanma defekti gelişimi, güncel medikal tedavilerde kullanılan ilaçlar, maruz kaldığımız fiziksel ve kimyasal etmenler benzer civciv embriyo çalışmalarıyla değerlendirilmiştir. Bu gerekçeler nedeniyle araştırmamızda civciv embriyolarını kullanmayı tercih ettik.Böylelikle güncel hayatımızda yoğun olarak karşılaştığımız florürün civciv embriyolarında nöral tüp defekti gelişimiüzerine etkilerini değerlendirmeyi planladık.

Yapılan çalışmalarda maternal serum ve kordon kanındaki florür konsantrasyonu karşılaştırılmış ve florürün plasentayı kolayca geçtiğini gösterilmiştir. Genel olarak, ortalama kordon kanı konsantrasyonları, maternal serum konsantrasyonlarının yaklaşık %60'ı kadardır ve bu değer doğru orantılı olarak olarak değişir (98–100). Ayrıca kan beyin bariyerini geçebildiği içinde nörotoksik etki oluşturabilme olasılığı endişe vericidir.

Colins ve arkadaşları (101)sodyum florürün sıçanların fetal gelişimleri üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Gebe sıçanlara boyunca günlük 0, 10, 25, 100,

175 veya 250 ppm olmak üzere farklı dozlarda NaF verilmiştir. Doza bağlı davranış değişiklikleri kaydedilmiştir. Maruz kaldıkları florüre göre; 24.7 ve 25.1 mg/kgalanlarda sıvı tüketiminde azalma ve 25.1 mg'da yem tüketiminde ve vücut ağırlığı artışında azalma göstermiştir. 1.4-24,7 mg/kg doz seviyelerinde fetal gelişim etkilenmemiştir. 25.1 mg/kg alanlarda ise üç veya daha fazla iskelet anomalisi olan fetüslerin ortalama sayısında bir artış tespit edilmiştir

Heindel ve arkadaşları (102)yaptıkları çalışmada içme sularında NaF'ü 6-15. gebelik günlerinde 0, 50, 150, 300 ppm seviyelerinde ve tavşanlara 6-19. gebelik günlerinde 0, 100, 200 veya 400 ppm olarak verilmiştir. Sıçanlarda 27 mg/kg/gün(300ppm)'e veya tavşanlarda 29 mg/kg/gün(400ppm)'e kadar dozlarda içme suyunda majör organogenez boyunca NaF'ün gelişimsel toksisiteye neden olmadığı görülmüştür.

Çin'de yapılan bazı araştırmalarda içme suyundaki florürün zeka(intelligence quotient -IQ)üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir(103–107). Xiang ve arkadaşları (106) içme suyunda farklı florür konsantrasyonlarına sahip iki köyde yaşayan 512 çocuğun (8-13 yaş) zekâlarını karşılaştırmışlardır. İncelenen popülasyonlar benzer gelirlerle, aile eğitim seviyesine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca endüstriyel kirlilik gibi diğer önemli florür kaynaklarına maruz kalmayan gruplar seçilmiştir. Böylece, florür maruziyetindeki fark, içme suyundaki miktarla ilişkilendirilmiştir. Florür oranı yüksek olan köyde yaşayan çocukların IQ ölçümlerinin florüre daha az maruz kalan köy çocuklarına göre önemli ölçüde düşük olduğu bulunmuştur(107). Benzer sonuçları elde edilen çeşitli çalışmalar yapılmıştır (103,108)

Kömür ocaklarından çıkan kurum ve dumanın solunması nedeniyle, emaye mutfak malzemelerinin kullanılmasıyla da florüre maruz kalınabilir. Bununla ilgili yapılan araştırmalarda da IQ üzerine olumsuz etkileri olduğu tespit edilmiştir (105)

Qin-qing Tang ve ark(109) 20 yıl içerisinde yapılan benzer araştırmanın metaanalizini yapmışlardır. Florozisli bir bölgede yaşayan çocukların, hafif florozisli veya hiç florozis bulunmayan bir bölgede yaşayanlara göre düşük IQ geliştirme ihtimalinin beş kat daha yüksek olduğunu gösterdiler.

Ancak florürün IQ'yu düşürmedeki etkisinin mekanizması net değildir. Guan ve arkadaşları (110) kronik florozdan etkilenen sıçanların beyinde fosfolipid ve ubikinon içeriğinin değiştiğini ve bu nedenle membran lipidlerindeki değişikliklerin

bu bozukluğun bir nedeni olabileceğini göstermişlerdirZhao ve arkadaşları (104)yüksek florürlü bölgedeki çocuklarla yaptığı benzer bir çalışmadacinsiyet farkı olmadan ortalama IQ'sunun düşük florürlü bölgedeki çocuklara göre önemli ölçüde düşük olduğunu bulmuşlardır. Ancak IQ seviyelerini ebeveynlerin eğitimi ile ilişkili olduğu tespit etmişlerdir.

Gupta ve arkadaşlarının(111) yaptıkları çalışmada rastgele seçilen 50 çocuktan oluşan iki grup oluşturuldu. Çalışma grubu, 5 ila 12 yaş arası, 15 ila 30 kg ağırlığında, florür bakımından zengin içme suyu (4.5 ve 8.5 ppm florür) tüketen ve klinik diş ve/veya iskelet florozu gösteren çocuklardan oluşuyordu. Kontrol grubu, içme suyunda 1.5 ppm'ye eşit veya daha az florür tüketen ve herhangi bir florür toksisitesi kanıtı göstermeyen, yaş ve kilo uyumlu çocuklardan oluşuyordu. Çalışma grubundaki 50 çocuktan 22'sinde (%44), kontrol grubundaki 50 çocuktan 6'sında (%12) lumbosakral bölgede spina bifida occulta tespit etmişlerdir. Biz de çalışmamızda 5mg/kg florüre maruz kalan civciv embriyolarında kapanma defekti gelişme olasılığının daha yüksek olduğunu istatistiksel anlamlı olduğunu tespit ettik.

Li Du ve arkadaşları (112) endemik florozis bölgesinde 5-8. ayda kürtaj yapılan 15 fetüs, endemik olmayan bir bölgeden olan 16 fetüs ile karşılaştırmışlardır. Çalışma, sinir dokusu hücrelerinin zayıf morfolojisinin işaretleri olan beyin korteksi, hipokampus konileri, Purkinje hücreleri ve farklılaşmamış nöroblastların sayısal yoğunluğunun ve nükleus-sitoplazma oranının daha yüksek olduğunu göstermiştir.Hücre döngüsü ilerlemesinde florür aracılı bozulma, çeşitli hücre tiplerinde kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (88,113–116) F'nin kültürlenmiş sıçan hipokampal nöronlarında S-fazı hücre döngüsü durmasını ve DNA hasarını indüklediğini gösterdi.

Bai ve arkadaşları (117), yüksek F konsantrasyonlarında tavuk böbrek hücrelerinde G0/G1 fazında tutuklandığını bildirmiştir. Jothiramajayam (118)çalışmasında düşük dozlarda F'un sitotoksik ve genotoksik etki göstermese bile reaktif oksijen radikalleri ürettiğini ve düşük dozda yine hücre döngüsünün G0/G1 fazında tutulma yapacağını yüksek dozda ise apoptozu indükleyebileceğini belirtiyor.

Yapılan araştırmalarda kan-beyin bariyerinde de bozukluklara neden olduğu gözlemlenmiştir. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde kan-beyin bariyerinin mikro yapısında, astrosit ödemi, mitokondriyal dejenerasyon ve mikrovasküler endotel hücre işlev bozukluğu gösterilmiştir.Evans mavisinin kantitatif analizi ile omuriliğin

kan-beyin bariyeri işlevinin florozdan sonra ciddi bir şekilde hasar gördüğü tespit edilmiştir.Yapılan çalışmalar florürün santral sinir sistemi gelişimi üzerine olumsuz etkileri olduğunu bizlere göstermektedir (119).

Khanum ve arkadaşları (120) bir gruba döllenmiş yumurtalara ağırlığına göre 0.01 µg F/g florürve diğer gruba florür içeren bir pestisid olan 0.01 µg/g bifentrin(BN) vermişlerdir.Embriyonik gelişim sırasında F'e maruz kalma, BN'e kıyasla daha yüksek embriyonik mortaliteye neden olurken, BN'ye maruz kalan embriyolar, F'ye maruz kalanlara kıyasla daha yüksek teratojenite sergilemiştir. Bifentrine maruziyet sonucukulak çevresinde şişme ve katarakt gibi ek deformitelerin eşlik ettiği gözlenmiştir. Florür grubunda ise embriyoda gözlenen patoloji mikroftalmi, mikrognati, az tüy görünümü ve gelişmemiş gaga tespit etmişlerdir. Mevcut çalışmamızda nöral tüp kapanma defekti dışında anormal nöroepitel proliferasyonu da tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalarflorürün alkalen fosfataz aktivitesinin artmasına neden olabileceğini gösterilmiştir (121–123). Sodyum florür ile tedavi edilen olgularda trabeküler kemik yoğunluğunda bir artışa neden olduğu ve bu da serum alkalın fosfatazda bir artışa yol açtığı görülmüştür(124). Hem osteoblastlarda hem de osteositlerde florür kaynaklı hücre hasarı, bir onarım yanıtı başlatır ve bu hücre popülasyonlarının her ikisinde de artan alkalın fosfataz üretimi ile sonuçlanır. Osteoblastlardaki onarım yanıtı, artan proliferasyon, matris üretimi ve alkalın fosfataz üretimi ile sonuçlanır(121,123). Çalışmamızda osteoblastik bir proliferasyon tespit edilmemiş olup anormal epitel hipertrofisi tespit edilmiştir. Somit gelişimleri Hamburger Hamilton evrelemesine uygun şekilde gelişim göstermiştir.

Çeşitli yazarlar, florür ve serbest radikal reaksiyonları arasındaki ilişkileri araştırmıştır (125–128) İnsanlarda kronik florür toksisitesi ile artan oksidatif stres arasında yakın bir ilişki bildirilmiştir (129). Florürün insan eritrositlerinde ve deney hayvanlarının kan ve dokularında lipid peroksidasyonunun artmasına neden olduğu in vivo ve in vitro olarak gösterilmiştir (130,131).

Beyin ve omurilik dokusu çoklu doymamış lipidler açısından zengindir, yüksek demir içeriğine sahiptir ve kritik olarak aerobik metabolizmaya bağlıdır. Bu nedenle reaktif oksijen radikallerinin gerçekleştirdiği oksidatif hasara karşı oldukça savunmasızdır. Shivarajashankara ve arkadaşları (132) 100 ppm florür maruz

kalansıçanlarda azalaskorbik asit ve glutatyon seviyelerinin azaldığını tespit etmişlerdir. Gelişen oksidatif stresle mücadelede, organizma tarafından serbest radikal antagonistlerinin kullanımının arttığı tespit edilmiştir.

Ayrıca in-vitro insan lenfositlerinin düşük konsantrasyonlarda florürün DNA hasarı üretebileceği saptanmıştır(133). Florürün (F) kemik iliği hücreleri üzerindeki etkisinin in vivo genotoksisite araştırmasında düşük konsantrasyonlarda yüksek konsantrasyonlardan daha fazla genotoksik olduğunu görülmüş (134). Klastojenite, kromozomal aberasyonlar, kardeş kromatid değişimleri tespit edilmiştir(135–141). Ancak yapılan diğer çalışmalarda NaF'ün DNA hasarına katkıda bulunmadığı işaret edilmiştir(142,143).



6-SONUÇ

Literatür bilgileri ışığı altında florürün nöral doku hücre gelişimini bozduğu, apoptoza neden olduğu yüksek beyin işlevlerini olumsuz yönde etkilediği görülmektedir. Anomalilere, metabolik işleyişlerde neden olmaktadır. Çalışmamızda National Academy of Sciences Institute of Medicine'ın belirlemiş olduğu günlük doz verilen embriyolarda istatistiksel olarak nöral tüp gelişimini tespit edilememiştir. Ancak 0,5 mg/kg/gün verilen grupta 3, 0.10 mg/kg/gün verilen grupta 3 embriyoda patolojik bulgular tespit edilmiştir. Birbirine yakın elde edilmiş olan bu değerler bizlere çalışma grubumuzun sayılarını arttırmamız durumunda 0,5 mg/kg/gün doz alan embriyolarda da etkilenme olasılığı olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle gündelik hayatta florür kullanımına dikkat edilmesi gerektiğini ve daha geniş gruplarla yeni çalışmalar yapılmasının uygun olabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Smith Gk. The history of spina bifida, hydrocephalus, paraplegia, and incontinence. *Pediatr Surg Int* . 2001;
2. Goodrich JT. A Historical Review of the Surgical Treatment of Spina Bifida. In: *The Spina Bifida: Management and Outcome* [Internet]. Milano: Springer Milan; 2008. p. 3–17. Available from: https://doi.org/10.1007/978-88-470-0651-5_1
3. Cohen-Gadol AA, Nahed B V, Voorhees JR, Maher CO, Spencer DD. Cushing's experience with the surgical treatment of spinal dysraphism. *J Neurosurg Pediatr* [Internet]. 2005;102(4):441–4. Available from: <https://thejns.org/pediatrics/view/journals/j-neurosurg-pediatr/102/4/article-p441.xml>
4. McClugage SG, Watanabe K, Shoja MM, Loukas M, Tubbs RS, Oakes WJ. The history of the surgical repair of spina bifida. *Child's Nerv Syst* [Internet]. 2012;28(10):1693–700. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00381-012-1829-2>
5. Furukawa T. First description of spina bifida by Nicolas Tulp. *Neurology* [Internet]. 1987 Nov 1;37(11):1816 LP – 1816. Available from: <http://n.neurology.org/content/37/11/1816.abstract>
6. Berhouma M, Dubourg J, Messerer M. Cruveilhier's legacy to skull base surgery: Premise of an evidence-based neuropathology in the 19th century. *Clin Neurol Neurosurg* [Internet]. 2013;115(6):702–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0303846712004301>
7. Virchow R. Ein Fall von Hypertrichosis circumscripta mediana, kombiniert mit Spina Bifida occulta. *Ztschr f Ethnol*. 1875;7:280–90.
8. Safavi-Abbasi S, Mapstone TB, Archer JB, Wilson C, Theodore N, Spetzler RF, et al. History of the current understanding and management of tethered spinal cord. *J Neurosurg Spine SPI* [Internet]. 2016;25(1):78–87. Available from: <https://thejns.org/spine/view/journals/j-neurosurg-spine/25/1/article-p78.xml>
9. FEREMBACH D. FREQUENCY OF SPINA BIFIDA OCCULTA IN PREHISTORIC HUMAN SKELETONS. *Nature*. 1963 Jul;199:100–1.
10. Nikkilä A, Rydhström H, Källén B. The incidence of spina bifida in Sweden 1973–2003: the effect of prenatal diagnosis. *Eur J Public Health*. 2006 Dec 1;16(6):660–2.
11. Bower C, Raymond M, Lumley J, Bury G. Trends in neural tube defects 1980–1989. *Med J Aust*. 1993 Feb;158(3):152–4.
12. M. Memet Özek , Giuseppe Cinalli WJM. Epidemiology and Aetiological Factors. In: *spina bifida management and outcome*. 2008. p. 59–67.
13. Dolk H. Prevalence of neural tube defects in 20 regions of Europe and the impact of prenatal diagnosis, 1980-1986. EUROCAT Working Group. *J Epidemiol Community Heal*. 1991 Mar 1;45(1):52–8.
14. Canfield MA, Annegers JF, Brender JD, Cooper SP, Greenberg F. Hispanic Origin and Neural

- Tube Defects in Houston/Harris County, Texas: I. Descriptive Epidemiology. *Am J Epidemiol.* 1996 Jan 1;143(1):1–11.
15. Tunçbilek E, Üniversitesi H, Fakültesi T, Profesörü P. Türkiye’deki yüksek nöral tüp defekti sýklýđý ve önlemek için yapılabilecekler. Vol. 47, Çocuk Sađlýđý ve Hastalýkları Dergisi. 2004.
 16. Greene NDE, Stanier P, Copp AJ. Genetics of human neural tube defects. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2009 Oct 15;18(R2):R113–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19808787>
 17. Carter CO, David PA, Laurence KM. A family study of major central nervous system malformations in South Wales. *J Med Genet.* 1968 Jun;5(2):81–106.
 18. Shenefelt RE. Morphogenesis of malformations in hamsters caused by retinoic acid: relation to dose and stage at treatment. *Teratology.* 1972;5 1:103–18.
 19. Wilson JG. Environment and birth defectsenvironment and birth defects. Academic Press Location New York, NY; 1973.
 20. Shepard TH, Brent RL, Friedman JM, Jones KL, Miller RK, Moore CA, et al. Update on new developments in the study of human teratogens. *Teratology.* 2002 Apr;65(4):153–61.
 21. Ray JG, Vermeulen MJ, Meier C, Wyatt PR. Risk of congenital anomalies detected during antenatal serum screening in women with pregestational diabetes. *QJM An Int J Med* [Internet]. 2004 Oct 1;97(10):651–3. Available from: <https://doi.org/10.1093/qjmed/hch107>
 22. Council NR. Committee on Developmental Toxicology, National Research Council (US) Commission on Life Sciences (2000) Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment. Washington, DC: National Academy Press; 2000.
 23. Nye JS, Balkin N, Lucas H, Knepper PA, McLone DG, Charrow J. Myelomeningocele and Waardenburg syndrome (type 3) in patients with interstitial deletions of 2q35 and the PAX3 gene: possible digenic inheritance of a neural tube defect. *Am J Med Genet.* 1998 Feb;75(4):401–8.
 24. Pyrgaki C, Liu A, Niswander L. Grainyhead-like 2 regulates neural tube closure and adhesion molecule expression during neural fold fusion. *Dev Biol.* 2011;353(1):38–49.
 25. Patten I, Placzek M. The role of Sonic hedgehog in neural tube patterning. *Cell Mol Life Sci.* 2000 Nov;57(12):1695–708.
 26. Zhang J, Hagopian-Donaldson S, Serbedzija G, Elsemore J, Plehn-Dujowich D, McMahon AP, et al. Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2. *Nature.* 1996 May;381(6579):238–41.
 27. Dey AC, Shahidullah M, Mannan MA, Noor MK, Saha L, Rahman SA. Maternal and neonatal serum zinc level and its relationship with neural tube defects. *J Health Popul Nutr* [Internet]. 2010 Aug;28(4):343–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20824977>
 28. Karatas F, Aygun D, Gursu F. Serum zinc and selenium levels in mothers and their newborn infants with neural tube defects. *COCUK SAGLIGI VE Hast Derg.* 2001;44(2):115–21.
 29. Li H, Zhang J, Niswander L. Zinc deficiency causes neural tube defects through attenuation of

- p53 ubiquitylation. *Development*. 2018 Dec;145(24).
30. Moretti ME, Bar-Oz B, Fried S, Koren G. Maternal hyperthermia and the risk for neural tube defects in offspring: systematic review and meta-analysis. *Epidemiology*. 2005 Mar;16(2):216–9.
 31. Group MRCVSR. Prevention of neural tube defects: results of the Medical Research Council Vitamin Study. *Lancet*. 1991;338(8760):131–7.
 32. Czeizel AE, Dudás I. Prevention of the first occurrence of neural-tube defects by periconceptional vitamin supplementation. *N Engl J Med*. 1992 Dec;327(26):1832–5.
 33. Lee H-K, Lee H-S, Moody SA. Neural transcription factors: from embryos to neural stem cells. *Mol Cells* [Internet]. 2014/09/18. 2014 Oct 31;37(10):705–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25234468>
 34. Catala M. Overview of Secondary Neurulation. *J Korean Neurosurg Soc* [Internet]. 2021/04/29. 2021 May;64(3):346–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33906344>
 35. Hashimoto H, Robin FB, Sherrard KM, Munro EM. Sequential Contraction and Exchange of Apical Junctions Drives Zippering and Neural Tube Closure in a Simple Chordate. *Dev Cell*. 2015 Jan;32(2):241–55.
 36. Yuskaitis CJ, Pomeroy SL. 131 - Development of the Nervous System. In: Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WWB-T-F and NP (Fifth E, editors. Elsevier; 2017. p. 1294-1313.e2. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323352147001311>
 37. Copp AJ, Greene NDE, Murdoch JN. The genetic basis of mammalian neurulation. *Nat Rev Genet*. 2003 Oct;4(10):784–93.
 38. Tzouanacou E, Wegener A, Wymeersch FJ, Wilson V, Nicolas J-F. Redefining the Progression of Lineage Segregations during Mammalian Embryogenesis by Clonal Analysis. *Dev Cell* [Internet]. 2009;17(3):365–76. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580709003396>
 39. Shimokita E, Takahashi Y. P88. Secondary neurulation: The neural tube directly formed from mesenchymal cells in the posterior region of body. *Differentiation* [Internet]. 2010;80:S46–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301468110001878>
 40. Takemoto T, Uchikawa M, Yoshida M, Bell DM, Lovell-Badge R, Papaioannou VE, et al. Tbx6-dependent Sox2 regulation determines neural or mesodermal fate in axial stem cells. *Nature*. 2011;470(7334):394–8.
 41. Chapman DL, Papaioannou VE. Three neural tubes in mouse embryos with mutations in the T-box gene Tbx6. *Nature*. 1998;391(6668):695–7.
 42. Hans J, Lammens M, Hori A. Clinical neuroembryology: development and developmental disorders of the human central nervous system. Springer; 2014.
 43. Jeelani Y, McComb JG. Congenital hydrocephalus associated with myeloschisis. *Child's Nerv Syst ChNS Off J Int Soc Pediatr Neurosurg*. 2011 Oct;27(10):1585–8.

44. Tandon V, Garg K, Mahapatra AK. Terminal myelocystocele: A series of 30 cases and review of the literature. *Pediatr Neurosurg*. 2013;48(4):229–35.
45. Sarris CE, Tomei KL, Carmel PW, Gandhi CD. Lipomyelomeningocele: Pathology, treatment, and outcomes: A review. *Neurosurg Focus*. 2012;33(4):E3.
46. Sutton LN. Lipomyelomeningocele. *Neurosurg Clin N Am*. 1995;6(2):325–38.
47. Erşahin Y, Barçın E, Mutluer S. Is meningocele really an isolated lesion? *Child's Nerv Syst*. 2001;17(8):487–90.
48. Danzer E, Rintoul NE, Crombleholme TM, Adzick NS. Chapter 172 - Pathophysiology of Neural Tube Defects. In: Polin RA, Fox WW, Abman SHBT-F and NP (Third E, editors. *W.B. Saunders*; 2004. p. 1772–85. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780721696546501752>
49. Hidalgo JA, Tork CA, Varacallo M. Arnold Chiari Malformation. In *Treasure Island (FL)*; 2022.
50. Abd-El-Barr MM, Strong CI, Groff MW. Chiari malformations: diagnosis, treatments and failures. *J Neurosurg Sci*. 2014 Dec;58(4):215–21.
51. Reith W, Haussmann A. [Dandy-Walker malformation]. *Radiologe*. 2018 Jul;58(7):629–35.
52. Zamora EA, Ahmad T. Dandy Walker Malformation. In *Treasure Island (FL)*; 2022.
53. Hoving EW, Vermeij-Keers C. Frontoethmoidal Encephaloceles, a Study of Their Pathogenesis. *Pediatr Neurosurg* [Internet]. 1997;27(5):246–56. Available from: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000121262>
54. Jandial RBT-CT in ON (Second E, editor. 49 - Encephalocele Repair. In *Philadelphia: Elsevier*; 2020. p. 281–4. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780323523813000496>
55. Alnefaie N, Alharbi A, Alamer O Bin, Khairy I, Khairy S, Saeed MA, et al. Split Cord Malformation: Presentation, Management, and Surgical Outcome. *World Neurosurg* [Internet]. 2020;136:e601–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878875020301108>
56. Ozturk E, Sonmez G, Mutlu H, Sildiroglu HO, Velioglu M, Basekim CC, et al. Split-cord malformation and accompanying anomalies. *J Neuroradiol* [Internet]. 2008;35(3):150–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0150986107003264>
57. Lippman CR, Arginteanu M, Purohit D, Naidich TP, Camins MB. Intramedullary neurenteric cysts of the spine. *J Neurosurg*. 2001;94(2 SUPPL.):305–9.
58. Mattar MAB, Kassem M, Sabry AM. Complicated congenital dermal sinus: Diagnosis and management. *Interdiscip Neurosurg Adv Tech Case Manag* [Internet]. 2020;21(April):100739. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.inat.2020.100739>
59. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev Dyn*. 1992 Dec;195(4):231–72.
60. Mayer J, Hegsted DM. Osteoporosis and Fluoride Deficiency. *Postgrad Med* [Internet]. 1967 Jan 1;41(1):A-49-A-53. Available from: <https://doi.org/10.1080/00325481.1967.11696115>

61. Petersen PE, Lennon MA. Effective use of fluorides for the prevention of dental caries in the 21st century: the WHO approach. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2004;32(5):319–21.
62. Griffin SO, Regnier E, Griffin PM, Huntley V. Effectiveness of fluoride in preventing caries in adults. *J Dent Res.* 2007 May;86(5):410–5.
63. Mullen J. History of water fluoridation. *Br Dent J.* 2005;199(7):1–4.
64. Mcdonagh MS, Whiting PF, Wilson PM, Sutton AJ, Chestnutt I, Cooper J, et al. Systematic review of water fluoridation [Internet]. Available from: www.york.ac.uk/inst/crd/fluorid.htm
65. Chioca LR, Raupp IM, Da Cunha C, Losso EM, Andreatini R. Subchronic fluoride intake induces impairment in habituation and active avoidance tasks in rats. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jan 28;579(1–3):196–201.
66. Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, Kernan WJ. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1995 Mar 1;17(2):169–77.
67. who. Fluoride in Drinking Water. Washington, D.C.: National Academies Press; 2006.
68. Monarca S, Zerbini I, Donato F. Rolling Revision of the WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. In 2004.
69. Zhang M, Wang A, Xia T, He P. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF- κ B in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett.* 2008;179(1):1–5.
70. Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci.* 1996;16 Rev 2:1–153.
71. Gutknecht J, Walter A. Hydrofluoric and nitric acid transport through lipid bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1981 Jun;644(1):153–6.
72. Buzalaf MAR, Whitford GM. Fluoride metabolism. *Fluoride oral Environ.* 2011;22:20–36.
73. Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res.* 1994;8(1):5–14.
74. Monsour PA, Kruger BJ. Effect of Fluoride On Soft-Tissues in Vertebrates. *Fluoride.* 1985;18(1):53–61.
75. Greenwood DA. Fluoride intoxication. *Physiol Rev.* 1940;20(4):582–616.
76. Zero DT, Raubertas RF, Fu J, Pedersen AM, Hayes AL, Featherstone JDB. Fluoride Concentrations in Plaque, Whole Saliva, and Ductal Saliva After Application of Home-use Topical Fluorides. *J Dent Res.* 1992 Nov 20;71(11):1768–75.
77. Olympio KPK, Bardal PAP, da S. Cardoso VE, Oliveira RC, de M. Bastos JR, Buzalaf MAR. Low-Fluoride Dentifrices with Reduced pH: Fluoride Concentration in Whole Saliva and Bioavailability. *Caries Res.* 2007;41(5):365–70.
78. Wilson AC, Bawden JW. Salivary fluoride concentrations in children with various systemic fluoride exposures. *Pediatr Dent.* 13(2):103–5.
79. Whitford GM, Thomas JE, Adair SM. Fluoride in whole saliva, parotid ductal saliva and plasma in children. *Arch Oral Biol.* 1999 Oct;44(10):785–8.
80. Whitford GM. Intake and Metabolism of Fluoride. *Adv Dent Res.* 1994 Jun 1;8(1):5–14.
81. WEIDMANN SM, WEATHERELL JA. The uptake and distribution of fluorine in bones. *J*

- Pathol Bacteriol. 1959 Jul;78:243–55.
82. Parkins FM, Tinanoff N, Moutinho M, Anstey MB, Waziri MH. Relationships of human plasma fluoride and bone fluoride to age. *Calcif Tissue Res*. 1974 Dec;16(1):335–8.
 83. Richards A, Mosekilde L, Sogaard CH. Normal age-related changes in fluoride content of vertebral trabecular bone—Relation to bone quality. *Bone*. 1994 Jan;15(1):21–6.
 84. Schiffl HH, Binswanger U. Human Urinary Fluoride Excretion as Influenced by Renal Functional Impairment. *Nephron*. 1980;26(2):69–72.
 85. Jones CA, Callaham MF, Huberman E. Sodium fluoride promotes morphological transformation of Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*. 1988 Dec;9(12):2279–84.
 86. Goh EH, Neff AW. Effects of fluoride on *Xenopus* embryo development. *Food Chem Toxicol an Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. 2003 Nov;41(11):1501–8.
 87. Zhu J-Q, Si Y-J, Cheng L-Y, Xu B-Z, Wang Q-W, Zhang X, et al. Sodium fluoride disrupts DNA methylation of H19 and Peg3 imprinted genes during the early development of mouse embryo. *Arch Toxicol*. 2014 Feb;88(2):241–8.
 88. Choi AL, Sun G, Zhang Y, Grandjean P. Developmental fluoride neurotoxicity: A systematic review and meta-analysis. Vol. 120, *Environmental Health Perspectives*. 2012. p. 1362–8.
 89. Mazze RI. Methoxyflurane nephropathy. *Environ Health Perspect*. 1976 Jun;15:111–9.
 90. Wong MC, Glenny A-M, Tsang BW, Lo EC, Worthington H V, Marinho VC. Topical fluoride as a cause of dental fluorosis in children. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Jan 20;
 91. Singhal S. Evidence Review for Adverse Health Effects of Drinking Optimally Fluoridated Water (2010-2017). *Public Heal Ontario*. 2018;(November).
 92. Yang L, Ho NY, Alshut R, Legradi J, Weiss C, Reischl M, et al. Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemicals. *Reprod Toxicol [Internet]*. 2009;28(2):245–53. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623809001002>
 93. Kawaharada K, Kawamata M, Ochiya T. Rat embryonic stem cells create new era in development of genetically manipulated rat models. *World J Stem Cells [Internet]*. 2015 Aug 26;7(7):1054–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26328021>
 94. Blum M, Ott T. ***Xenopus***: An Undervalued Model Organism to Study and Model Human Genetic Disease. *Cells Tissues Organs [Internet]*. 2018;205(5–6):303–13. Available from: <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000490898>
 95. Payan-Carreira M-LGE-R. Embryo Manipulation Techniques in the Rabbit. In *Rijeka: IntechOpen*; 2018. p. Ch. 7. Available from: <https://doi.org/10.5772/intechopen.81089>
 96. Bednarczyk M, Dunislawska A, Stadnicka K, Grochowska E. Chicken embryo as a model in epigenetic research. *Poult Sci*. 2021 Jul;100(7):101164.
 97. Korn MJ, Cramer KS. Windowing chicken eggs for developmental studies. *J Vis Exp*. 2007;(8):306.
 98. Gupta S, Seth AK, Gupta A, Gavane AG. Transplacental passage of fluorides. *J Pediatr*. 1993 Jul;123(1):139–41.

99. Malhotra A, Tewari A, Chawla HS, Gauba K, Dhall K. Placental transfer of fluoride in pregnant women consuming optimum fluoride in drinking water. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 1993 Mar;11(1):1–3.
100. Shimonovitz S, Patz D, Ever-Hadani P, Singer L, Zacut D, Kidroni G, et al. Umbilical cord fluoride serum levels may not reflect fetal fluoride status. *J Perinat Med*. 1995 Jan;23(4):279–82.
101. Collins TFX, Sprando RL, Shackelford ME, Black TN, Ames MJ, Welsh JJ, et al. Developmental toxicity of sodium fluoride in rats. *Food Chem Toxicol*. 1995 Nov;33(11):951–60.
102. Heindel J. Developmental Toxicity Evaluation of Sodium Fluoride Administered to Rats and Rabbits in Drinking Water. *Fundam Appl Toxicol*. 1996 Apr;30(2):162–77.
103. Lu Y, Sun ZR, Wu LN, Wang X, Lu W, Liu SS. Effect of high-fluoride water on intelligence in children. *Fluoride*. 2000;33(2):74–8.
104. Zhao LB, Liang GH, Zhang DN, Wu XR. Effect of a high fluoride water supply on children's intelligence. *Fluoride*. 1996;29(4):190–2.
105. Li XS, Zhi JL, Gao RO. Effect of fluoride exposure on intelligence in children. *Fluoride*, 28 (4): 189-192. 1995.
106. Xiang Q, Liang Y, Chen L, Wang C, Chen B, Chen X, et al. Effect of fluoride in drinking water on children's intelligence. *Fluoride*. 2003;36(2):84–94.
107. Xiang Q, Liang Y, Zhou M, Zang H. Blood lead of children in Wamiao-Xinhuai intelligence study. 2003 Aug 1;36:198–9.
108. Qin LS, Cui SY. The influence of drinking water fluoride on pupils' IQ as measured by Rui Wen's standard. *Chinese J Control Epid Dis*. 1990;5:203–4.
109. Tang QQ, Du J, Ma HH, Jiang SJ, Zhou XJ. Fluoride and children's intelligence: A meta-analysis. *Biol Trace Elem Res*. 2008;126(1–3):115–20.
110. Guan Z-Z, Wang Y-N, Xiao K-Q, Dai D-Y, Chen Y-H, Liu J-L, et al. Influence of Chronic Fluorosis on Membrane Lipids in Rat Brain. *Neurotoxicol Teratol*. 1998 Sep;20(5):537–42.
111. GUPTA SK, GUPTA RC, SETH AK, CHATURVEDI CS. Increased incidence of spina bifida occulta in fluorosis prone areas. *Pediatr Int*. 1995 Aug;37(4):503–6.
112. Du L, Wan C, Cao X, Liu J. The effect of fluorine on the developing human brain. *Fluoride*. 2008;41(4):327–30.
113. Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact*. 2010;188(2):319–33.
114. Li H, Huang H, Xu Y, Gao Y, Liu Z. [Toxic effects of fluoride on rat cerebral cortex astrocytes in vitro]. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2010 Jan;39(1):86–8.
115. Zhang M, Wang A, Xia T, He P. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett*. 2008 Jun;179(1):1–5.
116. Zeng Q, Cui Y-S, Zhang L, Fu G, Hou C-C, Zhao L, et al. [Studies of fluoride on the thyroid

- cell apoptosis and mechanism]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* [Internet]. 2012;46(3):233–6. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/22800594>
117. Bai C, Chen T, Cui Y, Gong T, Peng X, Cui H. Effect of high fluorine on the cell cycle and apoptosis of renal cells in chickens. *Biol Trace Elem Res*. 2010;138(1):173–80.
 118. Jothiramajayam M, Sinha S, Ghosh M, Nag A, Jana A, Mukherjee A. Sodium fluoride promotes apoptosis by generation of reactive oxygen species in human lymphocytes. *J Toxicol Environ Heal Part A*. 2014;77(21):1269–80.
 119. Abo El-Khair DM, El-Safty FENA, El-Habeby MM, El-Kholy WB, El-Sherif NM. Effect of sodium fluoride on the grey matter of spinal cord in the albino rat and the protective role of green tea extract. *Anatomy*. 2016;10(2):114–33.
 120. Khanum Z, Suleman S, Mustanser A, Hassan MW, Raees K, Ali M, et al. Comparative teratological outcomes of fluoride ions and a fluoridated insecticide (Bifenthrin) in chick embryos. *Fluoride*. 2019 Jan 1;52:59–65.
 121. Marie PJ, Hott M. Short-term effects of fluoride and strontium on bone formation and resorption in the mouse. *Metabolism*. 1986 Jun;35(6):547–51.
 122. Teotia SPS, Teotia M. Endemic fluoride: bones and teeth—update. *Ind J Env Toxicol*. 1991;1(1):1–16.
 123. Farley JR, Wergedal JE, Baylink DJ. Fluoride directly stimulates proliferation and alkaline phosphatase activity of bone-forming cells. *Science* (80-). 1983;222(4621):330–2.
 124. Haber P, Willvonseder R. [Therapy of senile osteoporosis using sodium fluoride--continuous and intermittent long-term therapy]. *Schweiz Med Wochenschr*. 1979 May;109(18):688–92.
 125. Vani M, Reddy K. Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice. *Fluoride*. 2000 Feb 1;33.
 126. Guan ZZ. [An experimental study of blood biochemical diagnostic indices for chronic fluorosis]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*. 1991 Jan;25(1):33–5.
 127. Kumari DS, Rao PR. Red cell membrane alterations in human chronic fluoride toxicity. *Biochem Int*. 1991;23(4):639–48.
 128. Patel T, Chinoy N. .Effects of Sodium Fluoride And Aluminum Chloride On Ovary And Uterus Of Mice And Their Reversal By Some Antidotes. *CNJ Patel TN Fluoride* 34 (1), 9-20. *Fluoride*. 2001 Jan 1;37:9.
 129. Jeji J, Sharma R, Jolly SS, Pamnani S. Implication of glutathione in endemic fluorosis. *Fluoride*. 1985;18(2):117–9.
 130. Chinoy NJ, Sharma A. Amelioration of fluoride toxicity by vitamins E and D in reproductive functions of male mice. *Fluoride*. 1998;31(4):203–16.
 131. Zhi-Zhong G. Synergistic action of iodine-deficiency and fluorine-intoxication on the thyroid in rats. *Chinese J Pathophysiol*. 1989;
 132. Shivarajashankara YM, Arnadi Ramachandrayya S, Bhat P, Hanumanth Rao S. Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant systems in rats. *Fluoride*. 2001 May 1;34:108.

133. Rao M V., Tiwari H. Amelioration by melatonin of chromosomal anomalies induced by arsenic and/or fluoride in human blood lymphocyte cultures. *Fluoride*. 2006;39(4):255–60.
134. Podder S, Chattopadhyay A, Bhattacharya S, Ray MR. Differential in vivo genotoxic effects of lower and higher concentrations of fluoride in mouse bone marrow cells. *Fluoride*. 2008;41(4):301–7.
135. Albanese R. Sodium fluoride and chromosome damage (in vitro human lymphocyte and in vivo micronucleus assays). *Mutagenesis*. 1987;2(6):497–9.
136. Chen J, Chen X, Yang K. Effects of selenium and zinc on the DNA damage caused by fluoride in pallium neural cells of rats. *Wei Sheng yan jiu= J Hyg Res*. 2000;29(4):216–7.
137. Khalil N, Leach JSL. The anodic oxidation of valve metals—III Transport processes and their correlation with film contamination by fluoride as measured by XPS. *Electrochim Acta*. 1995;40(11):1769–72.
138. Kleinsasser NH, Weissacher H, Wallner BC, Kastenbauer ER, Harreus UA. Cytotoxicity and genotoxicity of fluorides in human mucosa and lymphocytes. *Laryngo-Rhino-Otologie*. 2001;80(4):187–90.
139. Kishi K, Tonomura A. Cytogenetic effects of sodium fluoride. *Mutat Res Mutagen Relat Subj* [Internet]. 1984;130(5):367. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165116184900414>
140. Mihashi M, Tsutsui T. Clastogenic activity of sodium fluoride to rat vertebral body-derived cells in culture. *Mutat Res Toxicol*. 1996;368(1):7–13.
141. Suzuki Y. The genotoxic effect of fluoride. *Fluoride Res*. 1991;12:1–13.
142. Ribeiro DA, Esther M, Marques A. Lack of DNA Damage Induced by Fluoride on Mouse Lymphoma and Human Fibroblast Cells by Single Cell Gel (Comet) Assay. 2006;17:91–4.
143. Li Y, Dunipace AJ, Stookey GK. Lack of Genotoxic Effects of Fluoride. 1987;

