

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**İNTERFERON BETA-1a VE İNTERFERON BETA 1-b'NİN IN
VITRO EMBRİYONİK GELİŞİM ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Hazırlayan
İlyas UÇAR**

**Danışman
Doç.Dr.Tolga ERTEKİN**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2014
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Anatomi Anabilim Dalı**

**İNTERFERON BETA-1a VE İNTERFERON BETA 1-b'NİN
IN VITRO EMBRİYONİK GELİŞİM ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Hazırlayan
İlyas UÇAR**

**Danışman
Doç.Dr.Tolga ERTEKİN**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2013-4426 nolu proje ile desteklenmiştir.**

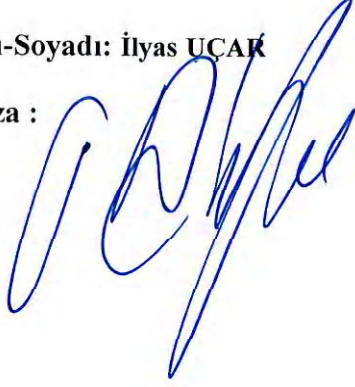
**Ağustos 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Adı-Soyadı: İlyas UCAR

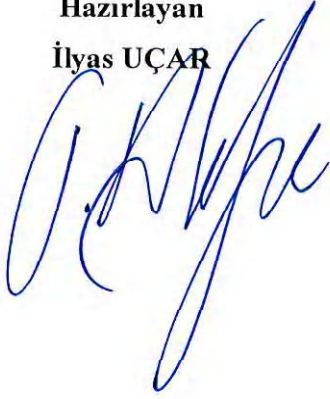
İmza :



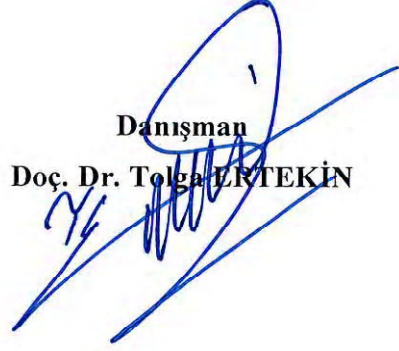
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“İnterferon Beta-1a ve İnterferon Beta-1b'nin In Vitro Embriyonik Gelişim Üzerine Etkileri” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan
İlyas UÇAR

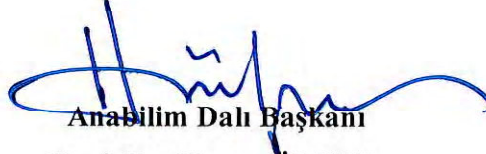


Danışman
Doç. Dr. Tolga ERTEKİN



Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Harun ÜLGER



Doç.Dr.Tolga ERTEKİN danışmanlığında **İlyas UÇAR** tarafından hazırlanan **“İnterferon Beta-1a ve İnterferon Beta-1b'nin In Vitro Embriyonik Gelişim Üzerine Etkileri”** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Anatomi** Anabilim Dalı **Yüksek Tezi** olarak kabul edilmiştir.

05/08/2014

JÜRİ

Danışman : Doç. Dr. Tolga ERTEKİN (Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi)

İmza

Üye : Prof. Dr. Harun ÜLGER (Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Anatomi)

Üye : Doç. Dr. Ayhan DÜZLER (Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi)

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve.....sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Anatomi Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrenciliğim boyunca desteğini her zaman hissettiğim, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Harun ÜLGER'e, çalışmamda bana göstermiş olduğu sabır, vermiş olduğu her türlü destek ve emekten dolayı tez danışmanım, hocam Doç. Dr. Tolga ERTEKİN'e, çalışmamın her aşamasındaki yardımlarından ve katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Mehtap NİSARİ'ye, bilgilerinden faydalandığım Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyeleri; Prof. Dr. Kenan AYCAN, Prof. Dr. Erdoğan UNUR, Doç. Dr. Niyazi ACER'e, Araş. Gör. Özge AL'a ve Anatomi Anabilim Dalı asistanlarına ayrıca her zaman yanımda olan biricik eşim Dilek Uçar ve sevgili kızım Zeynep Tusem UÇAR'a en içten teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

İlyas UÇAR

Kayseri, Ağustos 2014

İNTERFERON BETA-1a (IFN β -1a) VE İNTERFERON BETA-1b (IFN β -1b)'NİN İN VITRO EMBRİYONİK GELİŞİM ÜZERİNE ETKİLERİ

İlyas UÇAR

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Anatomi Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi, Ağustos 2014

Danışman: Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

ÖZET

Multipl Skleroz (MS) merkezi sinir sisteminin kronik, inflamatuvar, ilerleyici ve nörodejeneratif bir hastalığı olup, demiyelinizasyon ve aksonal hasar ile karakterizedir. MS sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde çoğu genç yetişkin ve kadın olan yarım milyon insanı etkilemektedir. MS tanısı kadınlarda çoğu kez 20'li 30'lu yaşlarda yani doğurganlık çağında konmaktadır. Bu nedenle gebelik, MS'ten etkilenmiş pek çok kadın için endişeli bir süreçtir. İnterferon Beta (IFN β), 1993 yılında MS tedavisi için onaylanan ilk ilaç olmuştur. Deneysel ve klinik çalışmalar IFN β 'nın MS'in atak şiddetini ve sıklığını azaltarak hastalığın ilerleyişini yavaşlattığını göstermektedir. Gebeliği esnasında IFN β 'yı kullanan insanlara ait bilgiler de sınırlıdır. Gebeliği kesinleşen kadınlara IFN β tedavisini bırakmaları doktorları tarafından tavsiye edilmektedir. Bu nedenle çalışmamızın amacı IFN β 'nın embriyo gelişimi üzerinde teratojenik etkisinin olup olmadığını in vitro embriyo kültürü tekniğini kullanarak araştırmaktır. Günümüzde bu teknik, hastalıkların tedavisinde kullanılan farmakolojik ajanların ve potansiyel teratojenlerin embriyo gelişimi üzerindeki etkilerinin incelenip belirlenmesi amacıyla sıkça kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada, kültür ortamına IFN β ilave edildi ve embriyonik gelişim üzerine olan etkileri araştırıldı. 48 saatlik kültür periyodu sonunda IFN β 'ların (1000 IU/IFN β 1-a ve 1000 IU/IFN β 1-b) embriyolar üzerine olan etkileri morfolojik olarak değerlendirildi. Morfolojik skorlama sistemine göre, toplam morfolojik skor ve somit sayıları kontrol grubu ve deney gruplarında birbirine yakın olduğu tespit edildi ($p>0.05$). Diğer yandan vitellüs kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu ve baş uzunluğu karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre deney gruplarında istatistiksel olarak anlamlı bir gerilemenin olduğu saptandı ($p<0.05$). Sonuç olarak kültür ortamına ilave edilen IFN β -1a ve IFN β -1b'nin embriyoların gelişimi üzerinde makroskobik olarak teratojenik etki göstermediği belirlendi. Ancak yapılan morfometrik ölçümler IFN β -1a ve IFN β -1b'nin büyüme geriliğine neden olduğunu göstermektedir. Bu araştırmanın in vitro embriyo kültürü tekniği ile yapılan ilk çalışma olması nedeniyle, farklı dozlarda IFN β ile yapılacak olan yeni çalışmaların literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Multipl Skleroz, İnterferon Beta-1a, İnterferon Beta-1b, İn Vitro, Embriyo Kültürü

THE EFFECTS OF INTERFERON BETA-1a (IFN β -1a) AND INTERFERON BETA-1b (IFN β -1b) ON IN VITRO EMBRYONIC DEVELOPMENT

İlyas UÇAR

Erciyes University, Department of Anatomy

MS. Thesis, August 2013

Advisor: Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory, progressive and neurodegenerative disease of central nervous system and it is characterized by demyelization and axonal damage. MS effects almost half million people in the United States alone, most of them being young adults and female. Also, the diagnosis of MS frequently occurs when patients are in their 20's and 30's, namely at childbearing age. Therefore the pregnancy process is major concern for many women who affected from MS. Interferon Beta (IFN β) was the first proven drug for the treatment of MS in 1993. Experimental and clinical studies have shown that IFN β decrease the progression of MS by reducing relapse rate and frequency. Data on women who exposed IFN β during pregnancy are limited. When pregnancy to become definite, women are advised to discontinue IFN β by their doctors. Because of this, the aim of our study investigate the teratogenic risk of IFN β on embryonic development using with embryo culture technique. Recently, this technique has been often used for determined teratogenity effect of pharmacologic drug and potential teratogens on embryonic development. In this study, IFN β was applied to the culture medium and its effects on embryonic developments were investigated. After 48 hours cultured period, effects of IFN β 's (1000 IU/IFN β 1-a and 1000 IU/IFN β 1-b) were appreciated morphologically. According to morphologic scoring system, total morphologic score and somite number were similar among control group and all experimental groups ($p>0.05$). On the other hand, yolk sac diameter, crown rump length and head length were statically significant retarded in all experimental groups when we compared to control group ($p<0.05$). Consequently IFN β -1a and IFN β -1b, which were applied to the culture medium, have no macroscopic teratogenity effect on embryonic development. However, in respect of mophometric measurements IFN β -1a and IFN β -1b have caused growth retardation in embryo. This research related to interferon is the first study which is used vitro embryo culture technique, so we think that new studies which will be performed by using different doses of IFN will contribute to literature.

Keywords: Multiple Sclerosis, Interferon Beta-1a, Interferon Beta-1b, In Vitro, Embryo Culture

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK SAYFASI.....	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
TABLO VE RESİM LİSTESİ	x
KISALTMALAR.....	xi
 1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	 1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. MULTİPL SKLEROZ.....	3
2.1.1. Multipl Sklerozun Tanımı ve Patogenezi	3
2.1.2. Multipl Sklerozun Prevelansı.....	4
2.1.3. Multipl Skleroz'da İnterferonların Kullanımı	4
2.1.4. Multipl Skleroz ve Gebelik.....	5
2.2. İNTERFERONLAR.....	6
2.2.1. İnterferonların Keşfi ve Yapısı	6
2.2.2. İnterferon Çeşitleri.....	7
2.2.3. İnterferonların Etki Mekanizmaları.....	8
2.3. IN VITRO SIÇAN EMBRİYO KÜLTÜRÜ VE EMBRİYONİK GELİŞİM	9
2.3.1. In Vitro Kültür Sistemlerinin Tarihçesi.....	9
2.3.2. In Vitro Kültür Sistemlerinin Önemi	9
2.3.3. In Vitro Ortamda Büyütülen Embriyolarda Büyüme ve Gelişmenin Değerlendirilmesi	10
2.3.4. Sıçanlarda Erken Dönem Embriyonik Gelişim.....	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3.1. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ	15
3.2. EMBRİYO KÜLTÜRÜ.....	16
3.2.1. Kültür Ortamının (serum) Hazırlanması.....	16
3.2.2. Embriyoların Anne Karnından Çıkarılması	19
3.2.3. Embriyoların Kültüre Edilmesi.....	23
3.2.4. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	24
3.2.5. Kültüre Edilen Embriyoların Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	24
4. BULGULAR.....	26

5. TARTIŞMA VE SONUÇ	34
6.KAYNAKLAR	39
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO VE RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4. 1: Sıçan serumu ve IFN β 'nın toplam embriyonik gelişim üzerine etkisi	28
Tablo 4. 2: Kontrol grubu ve 1000 IU/ml IFN β -1a grubuna ait Vitellüs Kesesi Çapı, Baş-Kıç Uzunluğu ve Baş Uzunluğu değerleri	28
Tablo 4. 3: Kontrol grubu ve 1000 IU/ml IFN β -1b grubuna ait Vitellüs Kesesi Çapı, Baş-Kıç Uzunluğu ve Baş Uzunluğu değerleri	28
Tablo 4. 4: Kontrol grubu ile deney gruplarının kaudal nöral tüplerinin gelişimi	29
Tablo 4. 5: Kontrol grubu ile deney gruplarının arka beyinlerinin gelişimi	30
Tablo 4. 6: Kontrol grubu ile deney gruplarının orta beyinlerinin gelişimi	31
Tablo 4. 7: Kontrol grubu ile deney gruplarının ön beyinlerinin gelişimi	32
Tablo 4. 8: Kontrol grubu ile deney gruplarının olfaktör sistemlerinin gelişimi	33
Resim 3.1: Dişi sıçanların kafesteki görünümü	16
Resim 3.2: Bayıltma kutusunda anestezi edilen sıçanın görünümü	17
Resim 3.3: Anestezi edilen sıçanın sırt üstü yatırılmış görünümü	17
Resim 3.4: Karın ön duvarı derisi ve kasları 'V' şeklinde baş hizasına katlanmış sıçanın görünümü	18
Resim 3.5: Aorta abdominalis' in çatallanma yerinden alınan kanın görünümü	18
Resim 3.6: Karın içinde embriyoların görünümü	19
Resim 3.7: Uterus boynuzunda bulunan embriyoların görünümü	20
Resim 3.8: Embriyoların uterus boynuzundan çıkarıldıktan sonra HBSS'ye transferi	20
Resim 3.9: HBSS içindeki embriyoların görünümü	21
Resim 3.10: İçerisinde embriyo bulunan uterus	21
Resim 3.11: Desidual kitle ve bir yüzüne yerleşmiş olan embriyonun görünümü	22
Resim 3.12: Reicherts membranlı embriyo	22
Resim 3.13: Reicherts membranı çıkartılmış embriyo	23
Resim 3.14: ImageJ programı kullanılarak embriyoda kalibrasyon yapılma aşaması ve ölçümü	25
Resim 4.1: Sıçan serumunda büyüyen 11.5 günlük sıçan embriyoları A- Vitellüs kesesi çıkartılmamış embriyo B-Vitellüs kesesi çıkartılmış embriyonun yandan görünüşü	27
Resim 4.2: Kültür ortamına 1000 IU/ml IFN β -1a ilave edildikten sonraki 11.5 günlük sıçan embriyoları A-Vitellüs kesesi çıkartılmamış embriyo B-Vitellüs kesesi çıkartılmış embriyonun yandan görünüşü	27
Resim 4.3: Kültür ortamına 1000 IU/ml IFN β -1b ilave edildikten sonraki 11.5 günlük sıçan embriyoları A-Vitellüs kesesi çıkartılmamış embriyo B-Vitellüs kesesi çıkartılmış embriyonun yandan görünüşü	27

KISALTMALAR

IFN	: İnterferon
RNA	: Ribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
MS	: Multipl Skleroz
IFN β	: İnterferon Beta
FDA	: American Food and Drug Administration
RRMS	: Relapsing-Remitting Multiple Scleros
SPMS	: Seconder Progressive Multiple Scleros
IFN α	: İnterferon Alfa
IFN γ	: İnterferon Gama
TH1	: Proinflamatuvar T hücreleri
TH2	: Antiinflamatuvar T hücreleri
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
MHC	: Major Histocompatibility Complex
Ig	: İmmünglobülin
HBSS	: Hank's Balanced Salt Solution
WRS	: Whole Rat Serum
EKD	: En Küçük Değer
EBD	: En Büyük Değer
SS	: Standart Sapma
IU	: İnternational Unites
rpm	: Revolution per minute=Dakikadaki devir sayısı
kDa	: Kilodalton

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnterferonlar (IFN), alyuvar, fibroblast, doğal öldürücü hücreler ve epitel hücreleri gibi immün sistem hücreleri tarafından doğal olarak üretilen proteinler sınıfında yer almaktadır. Vücuda giren virüs, bakteri, kanser hücreleri ve diğer zararlı ajanlara karşı immün sistemin cevabını düzenlemektedir. Virüsler vücuda girdikten 12-48 saat sonra çoğalarak en yüksek sayısal değerlerine ulaşırlar. Bu esnada virüslerle karşılaşan hücreler interferon üretirler. İnterferonlar, virüslerin çoğalmaları için sentezledikleri viral RNA'ları ve viral proteinleri, hücre içerisinde sentezini başlattıkları hücresel enzimler aracılığıyla yıkar veya inaktive ederler. Böylece virüslerin konak içerisinde çoğalmaları engellenmiş olur. Ayrıca immünolojik reaksiyonları ve T lenfositlerin sitotoksik etkilerini güçlendirirler (1). Ticari olarak mevcut olan insan interferonları, DNA teknolojisi kullanılarak üretilmektedir.

İnterferonlar antiviral bir ajan olarak 1957 yılında Isaacs ve Lindenmann tarafından belirtilmiştir (2). Daha sonra Jacobs ve ark. (3) Multipl Skleroz (MS)'da İnterferon Beta (IFN β)'nın yararlı etkilerini gösteren ilk klinik tedavi çalışmasını yapmıştır. İnterferon Beta-1b (IFN β -1b) 1993 yılında MS tedavisi için Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (American Food and Drug Administration=FDA) tarafından onaylanan ilk ilaç olmuştur (3, 4, 5). Daha sonra İnterferon Beta-1a (IFN β -1a) tekrarlayan-düzelen MS (Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis=RRMS) tedavisi için onaylanmıştır. IFN β bazı ülkelerde

ikincil ilerleyen MS'i (Seconder Progressive Multiple Scleros=SPMS) tedavi etmek üzere de onay almıştır (6).

MS semptomları hastaların 2\3'ünde 20-40 yaş arasında başlamaktadır. Semptomlar 15 yaşından önce ve 50 yaşından sonra nadir olarak görülmektedir (7). Kadınlarda görülme olasılığı erkeklerin hemen hemen 2 katıdır (8). Daha çok kadınlarda ve genç yetişkinlerde görülmesi, kadınların gebelik için en verimli dönemlerine denk gelmektedir. IFN'lerin gebelikte kullanımı FDA tarafından C kategorisine (C Kategorisi:İhtimalen zararlı) alınmıştır (9). Dolayısıyla MS hastalarının merak ettikleri arasında 'Çocuk sahibi olabilir miyim?', 'Tedavi gebeliğimi etkiler mi?' ve 'Kullandığım ilaçlar bebeğimin gelişimini etkiler mi?' gibi sorular bulunmaktadır. IFN'lerin C kategorisinde olması hekimleri konuya temkinli yaklaşmaya itmekte ve gebelik kesinleştiğinde IFN tedavisinin bırakılması tavsiye edilmektedir.

Sıçan embriyolarının in vitro kültürü tekniği 1964 yılında New ve Stein tarafından başarılı bir şekilde uygulanmıştır (10). Günümüzde ise bu teknik, hastalıkların tedavisinde kullanılan farmakolojik ajanların ve potansiyel teratojenlerin embriyo gelişimi üzerindeki etkilerinin incelenip belirlenmesi amacıyla sıkça kullanılan bir yöntemdir (11).

Yapılan literatür taramasında in vitro ortamda IFN β -1a ve IFN β -1b'nin embriyonik gelişim üzerine etkileri ile ilgili çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmadaki amacımız sıçanlarda organ ana taslaklarının oluştuğu 9.5-11.5 günlük embriyonik dönemde IFN β -1a ve IFN β -1b'nin gelişim üzerine etkilerini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MULTİPL SKLEROZ

2.1.1. Multipl Sklerozun Tanımı ve Patogenezi

MS, merkezi sinir sistemindeki ak maddenin yineleyici ya da ilerleyici, inflamatuvar, demiyalizan, nöroimmün bir hastalığıdır (12). Erişkinlerde travmaya bağlı olmaksızın nörolojik fonksiyon kaybına yol açan hastalıklar arasında MS ilk sırada yer almaktadır (13, 14). 19. yüzyıl ortalarında vaka bildirimleri olarak tarif edilmeye başlanmış ve 20. yüzyıl başlarında sık görülen bir klinik nörolojik tablo haline gelmiştir (15). Hastalığa ait esas klinik ve nöropatolojik tanımlama ilk kez 1868 yılında Charcot tarafından yapılmıştır (16). O günden bu güne yaklaşık yüz elli yıl geçmesine rağmen hastalığa ait sırt tam olarak çözülememiştir. Etiyolojisi çok iyi aydınlatılamasa da genetik ve çevresel faktörlerle kısmen ilişkili, otoimmün kökenli bir hastalık olduğu kabul edilmektedir (17).

MS nöropatolojisinin çok farklı etkenler sonucu ortaya çıktığı kabul edilmektedir. MS'de inflamasyon ağırlıklı akut sürece ilaveten aksonal kayıp ve gliozisle sonuçlanan kronik değişiklikler ya birlikte ya da ayrı ayrı izlenmektedir (16). MS olgularında intratekal immünglobülin (lg) üretiminin ve B lenfosit hücresi klonlarının bulunduğunu düşündüren çalışmalar 1940'lı yıllara dayanmaktadır (18). Bununla birlikte MS patogenezinin ağırlıklı olarak T lenfositlerin patojenik özelliklerinden kaynaklandığı bildirilmiştir (19). T lenfositlerin miyeline karşı reaksiyon gösterdikleri ve mikroglialar ve makrofajları aktive edip miyelin kılıfa karşı inflamatuvar cevap başlattığı tespit

edilmiştir (20). Miyelin kılıfın hasarı ile sinir iletimi blokaja uğramakta ve etkilenen bölgeye göre motor ve duyuşsal klinik belirtiler ortaya çıkmaktadır. Hastalık süreci ilerledikçe aksonun da hasara uğramasıyla klinik durum ağırlaşmakta ve farklı derecelerde fonksiyon kayıpları görülmektedir (13, 14). Bu süreçte beyaz cevher zedelenmekte ve var olan Proinflamatuvar (TH1), Antiinflamatuvar (TH2) hücreleri ile araçlar sistemi arasındaki denge TH1 yönünde iltihabi gelişmelere doğru bozulmaktadır. Ancak MS patogenezinin sürdürülmesinde otoreaktif T hücrelerinin muhtemel etkisinin varlığı bilinmesine rağmen bunların merkezi sinir sistemine (MSS) göçlerini ve sonraki aktivasyonlarını hangi faktörün ya da faktörlerin tetiklediği açık değildir (21).

2.1.2. Multipl Sklerozun Prevelansı

Hastalığın prevelansı 0.5-1/1000'dir (16). Hastalık genç erişkinlerde görülür. MS semptomları hastaların 2/3'ünde 20-40 yaşları arasında başlar, 15 yaşından önce ve 50 yaşından sonra görülmesi oldukça nadirdir (7). Kadınlarda erkeklerden daha sık görülmekte olup kadın/erkek oranı 2/1 olarak belirlenmiştir (8). MS hastalığı dünyanın her yerinde aynı sıklıkla görülmeyip coğrafi varyasyon gösterir. Hastaların %90'dan fazlası beyaz ırktandır. Asyalı yada Afrika kökenli Amerikalılarda seyrek görülür. Afrika yerlileri, Macar Çingeneleri, Eskimolar, Kızılderililer ve Avustralya aborjinlerinde nadirdir (16). Kuzey ve orta Avrupa, Amerika'nın kuzeyi, Kanada, Avustralya'nın güneyi, Yeni Zelanda ve İsrail ise yüksek riskli bölgelerdir (22). Ülkemizde ise prevelansı ve insidansı ile ilgili kapsamlı bir çalışma yapılmamış olup ancak son yıllarda hasta sayısının giderek arttığı gözlenmektedir (8).

2.1.3. Multipl Skleroz'da İnterferonların Kullanımı

IFN'ler antiviral bir ajan olarak 1957 yılında Isaacs ve Lindenmann (2) tarafından belirlenmiştir. Daha sonra Jacobs ve ark. (3) MS tedavisinde IFNβ'nın yararlı etkilerini gösteren ilk klinik çalışmayı yapmıştır. IFNβ-1b (Betaferon, Betaseron) 1993 yılında MS tedavisi için FDA tarafından onaylanan ilk ilaç olmuştur (3, 4, 5). Daha sonra IFNβ-1a (Avonex, Rebif) RRMS'nin tedavisi için onaylanmıştır. IFNβ bazı ülkelerde SPMS'i tedavi etmek üzere de onay almıştır (6).

MS sürecinde IFNβ'nın klinik atak sayısını %30 oranında azalttığı, atak şiddetini hafiflettiği ve manyetik rezonans görüntüleme (MRG)'de iltihabi göstergeleri azaltan anlamlı etkilerinin olduğu yapılan klinik çalışmalarda gösterilmiştir (23). Ancak

IFN β 'nın MS tedavisindeki etki mekanizması henüz net değildir (24). Tedavi edici olarak IFN'lerin kullanıldığı ilk çalışmalar antiviral etkilerine dayanır (2). Son zamanlarda yapılan çalışmalar ise immunmodülatör ve antiproliferatif etkilerine odaklanmıştır (17). IFN β 'nın hastalık üzerine yararlı etkisinin azalmış Büyük Doku Uygunluk Kompleksi (Major histocompatibility complex=MHC) sınıf II ekspresyonundan, TH1-TH2 hücre ve araçlar sistemi dengesinin TH2'ye kaymasından ve kan-beyin bariyerinin bütünlüğünün korunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (6).

2.1.4. Multipl Skleroz ve Gebelik

Multipl Skleroz tipik olarak 20-40 yaş arasındaki insanları etkiler ve kadınlarda erkeklerden 2 kat daha fazla görülür (25). Son epidemiyolojik çalışmalar kadın/erkek oranının giderek arttığını göstermektedir. Bu durum MS'li kadınlarda gebelik sürecini, doğumayı, emzirme dönemini ve genetik geçişi önemli bir sorun haline getirmektedir (9). Ayrıca farklı derecelerde görülen spastisite, kaslarda kuvvetsizlik, çabuk yorulma, ağrı ve yürüme bozukluğu gibi MS semptomları, gebe kadınları olumsuz yönde etkilemekte olup embriyonun hastalıktan etkilenme durumu, ilaç tedavilerinin ne şekilde sürdürüleceği, kullanılan ilaçların doğum ve emzirme süreçlerindeki etki mekanizmalarındaki belirsizlikler MS hastası gebeleri tedirgin etmektedir.

Gebeliğin MS üzerine olumsuz bir etkisi gösterilmemiştir (26, 27, 28). MS'li hastalarda düşük, ölü doğum, malformasyon ve doğum komplikasyonlarında artış gözlenmemektedir (27, 29). Atakların sayısı ve şiddeti gebeliğin her döneminde, özellikle de son 3 ayda azalır. Ancak doğumdan sonraki ilk 6 ayda atakların görülme sıklığı ve hastalığın kötüye gitme riski yüksektir (25, 27, 30, 31). Hastaların yaklaşık % 20-40'ı doğum sonrası ilk 3 ayda, klinik atak ve kötüleşme gösterir (31).

Gebelik sürecinde ortaya çıkan hormonal ve immünolojik değişikliklerin hamilelik döneminde MS ataklarından hastayı koruduğu, doğumdan sonra bu değişikliklerin geriye dönüşü ile hastaların MS atak risklerinde artış olduğu düşünülmektedir (32). Doğal bağışıklık sisteminin zayıflaması ayrıca östrojen ve progesteron seviyesindeki yükselme ve düşmelerin inflamasyonu baskıladığı düşünülür (33).

MS'li bir gebede özellikle alt ekstremitelerde etkili spastisite ve patolojik yorgunluk nedeniyle doğum sorun olabilmektedir. Perineal güçsüzlük ve spastisite gibi nedenlerle müdahaleli (vakum, forseps) doğum veya sezaryan oranlarında artış bildirilmiştir (34).

Doğum için analjezi ya da obstetrik nedenlerle müdahaleli doğum gerekli ise anestezi yapılabilir, ancak yapılan çalışmalar spinal anestezinin doğum sonrası atakları artırdığını düşündürmektedir (35).

Doğumdan sonraki dönemde bebeğini emziren kadınlardaki atak oranı emzirmeyenlere göre daha düşüktür. Yapılan bir çalışmada doğumdan sonra ilk 2 ay bebeklerini emziren anneler ve bebeklerini hiç emzirmeyen ya da 2 aydan kısa süre emziren MS'li annelerin atak oranları arasında anlamlı bir fark bulunduğu bildirilmiştir. Emziren grupta atak oranı emzirmeyen gruba göre 1/5 oranında daha az saptanmıştır (36).

MS'li kadınlar çoğu zaman hastalığı modifiye edici ya da semptomatik ilaçları kullandıkları dönemde plansız olarak gebe kalırlar (25). IFN β kullanan hastalara gebelikten şüphelenildiğinde ya da gebelikleri kesinleştiğinde ilaç alımını durdurmaları tavsiye edilir. Planlı gebelik düşünceleri durumunda ise 3 ay öncesinden ilaç tedavisine ara vermeleri önerilir (37). Yapılan bazı çalışmalarda IFN β 'nin gebeliğin ilk 3 ayında kullanılmasının ölü doğum ve düşük doğum ağırlığı riskini artırabileceği gösterilmiştir (38, 39). Ancak IFN β 'nin teratojenik etkisinin olup olmadığı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu nedenle FDA, IFN β -1a ve IFN β -1b'nin gebelikte kullanımını C kategorisine almıştır (37).

2.2. İNTERFERONLAR

2.2.1. İnterferonların Keşfi ve Yapısı

IFN'ler 1957 yılında bir dizi deney esnasında tesadüfen bulunmuştur. Isaacs ve Lindenman (2), influenza virüsü ile enfekte olan tavuk hücrelerinin bir başka virüsle enfekte olmadığını görmüşler ve bu durumdan viral replikasyonu engelleyen bir inhibitör molekülün sorumlu olduğunu saptamışlardır. Bu molekül İngilizce olan 'interference on' teriminden türetilen 'interferon' kelimesiyle tanımlanmıştır. Antiviral bir ajan olarak günümüzde birçok hastalığın tedavisinde kullanılan insan interferonları in vivo ve in vitro üretilbildikleri gibi DNA teknolojisi kullanılarak da üretilmektedir.

IFN'ler sitokinler olarak bilinen glikoprotein ailesinin içinde yer alır. İnsan ve diğer memeli türlerinin hücreleri tarafından üretilen, 17-25 kilodalton (kDa) molekül ağırlığında, suda çözünen endojen maddelerdir (1). IFN'ler asitlere ve ısıya karşı çok dayanıklıdır. Asidite derecesi pH=2 olan asitlerde inaktive olmazlar. 56 °C'de 30

dakikada hiç etkilenmezken, 70 °C'de 10 dakika içerisinde %30-40 oranında inaktive olurlar (40). Bakteri, virüs, parazit, tümör hücrelerine karşı cevap olarak alyuvar, fibroblast, doğal öldürücü hücreler ve epitel hücreleri gibi immün sistem hücreleri tarafından doğal olarak üretilirler. Böylece viral replikasyonu inhibe ederek ve diğer hücrelerin enfekte olmalarını engelleyerek immün cevaba yardımcı olurlar. Virüslerden başka bakteriler ve hücre içine giren diğer mikroorganizmalar da interferon sentezine neden olur. İnterferonlar hücreye giren virüs için özgül olmayıp, diğer virüslerin de gelişme ve çoğalmasını durdurur. Bu nedenle antiviral spektrumları oldukça geniştir. Ancak interferon belirli bir türe özgü olduğundan insanların tedavisinde kullanımı için gene insan hücrelerinden elde edilme zorunluluğu vardır (1).

2.2.2. İnterferon Çeşitleri

İnsan hücrelerinde birçok farklı IFN molekülü saptanmıştır. IFN'ler bağlandıkları reseptör alt tipine göre iki kategoride sınıflandırılır; Tip I IFN ve Tip II IFN. Tip I IFN 'nin α (alfa), β (beta), τ (tau) ve ω (omega) olmak üzere dört alt tipi bulunmaktadır; Tip II IFN kategorisinde ise sadece γ (gama) alt kategorisi bulunmaktadır. Tip I IFN insanın 9. kromozomunda bulunan genlerden üretilmiştir (41). İnterferon- α ve interferon- β klinik açıdan en önemli interferonlardır (42).

IFN-alfa (IFN α) çoğunlukla monositler ve transforme B hücreleri tarafından bazı antijen ve virüslerin uyarısı ile sentezlenir ve olgun bir IFN α proteini 143 aminoasit içerir. IFN α glikoz molekülü taşımamasına karşın diğerleri glikoprotein yapısındadır (43). Birbirine benzer en az 15 IFN α tipi vardır. Bazı türler arasında sadece bir aminoasit farklılığı mevcuttur (44). IFN α 'nın çok sayıda alt tipinin olmasının biyolojik anlam ve öneminin ne olduğu henüz bilinmemektedir, ancak insan vücudunda en yüksek oranda meydana gelen interferon IFN-alfa 2'dir. IFN α 'nın hücre çekirdeğinde kodlanmasının en az 24 farklı gen tarafından yapıldığı tespit edilmiştir (1).

IFN β için insanın 9. kromozomunda tek bir gen mevcuttur ve IFN α 'dan farklı olarak glikozillenmiş olarak bulunur. Olgun bir IFN β proteini 145 aminoasit içerir (44). Öncelikle fibroblastlardan salgılanırlar. IFN β -1a ve IFN β -1b olmak üzere iki alt tipi vardır. Günümüzde her ikisi de klinikte sık kullanılan interferonlardır. IFN α ile benzer etki gösterir. IFN α ve IFN β üretimi virüslere maruz kalan hücrelerin hemen hemen hepsi tarafından yapılır (1).

Tip II IFN kategorisinde bulunan IFN-gama (IFN γ) ise insanın 12. kromozomunda tek bir gen olarak mevcuttur. Olgun bir IFN γ proteini glikozillenmiş olup 146 aminoasit içerir (44). T lenfositlerinden salgılanır. Antijenler, mitojenler ve belirli özgül sitokinler tarafından indüklenir (1). IFN γ immün sistem hücrelerini uyardığı gibi hücrelerin yeni yüzey molekülleri kazanmasında da rol alır. İmmünomodülatör etkisi diğer iki IFN'ye göre daha fazla olmasına karşın antiviral etkisi daha azdır (43).

2.2.3. İnterferonların Etki Mekanizmaları

IFN'lerin antiviral, antiproliferatif, immünomodülatör ve anti-apoptotik aktivitelerinin olduğu bildirilmektedir (45). IFN'lerin bu özelliklerinin yanında hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenleyen etkilere de sahip olduğu tespit edilmiştir (46).

IFN molekülleri reseptör aracılı endositozla hedef hücrelerin içine girdikten sonra belirli protein kinazların ve 2'-5' oligoadenilat sentaz gibi özgül proteinlerin sentezini indükler. Bu enzimler, virüslerin konak hücrede çoğalmak için sentezini tetikledikleri viral RNA'ları ve onların çeviri ürünleri olan viral proteinleri inaktive ederek, virüslerin hücre içindeki yaşam döngüsünü viral proteinlerin çevirimi veya virion komponentlerinin montajı basamaklarında keser (1). Böylece enfekte olan hücreden üretilen IFN molekülleri bitişik hücrelerde antiviral etkinlik göstermiş olur. IFN'ler, kendilerinin sentezini indükleyen etkenden ziyade kendisini üreten hücre türüne özeldir. Yani bir virüs tarafından indüklenen IFN sadece o virüse değil diğer virüslere karşı da etkili olmaktadır (43). Bu da IFN'lerin herhangi bir virüsün replikasyonunda bloklayıcı reaksiyonu meydana getirdiğini göstermektedir (47).

IFN'ler ayrıca konak hücrenin viral enfeksiyonlara karşı immünolojik reaksiyonunu güçlendirerek indirekt antiviral etki de gösterirler. Bu arada virüsün yol açtığı immünolojik doku zedelenmesini engeller; major histokompatibilite antijenlerinin üretimini indükleyerek onlar aracılığı ile sitotoksik T lenfositlerin sitotoksik etkilerini güçlendirirler (1).

2.3. IN VITRO SIÇAN EMBRİYO KÜLTÜRÜ VE EMBRİYONİK GELİŞİM

2.3.1. In Vitro Kültür Sistemlerinin Tarihçesi

Günümüzde oldukça yaygın olarak kullanılan in vitro embriyo kültürü tekniğinin temeli 1930'lu yıllara dayanmaktadır. Waddington ve Waterman (48) 1933 yılında yaptıkları çalışmada tavşan embriyolarını plazma pıhtısında 6-9 somit aşamasına kadar büyütülmüştür. Daha sonra Nicholas ve Rudnick (49) heparinize edilmiş sıçan plazmasında sıçan embriyolarını kültüre etmiştir. 1960 yılındaki Talidomit faciasına kadar geçen 25 yıl boyunca kayda değer bir çalışma yapılmamıştır. 1964 yılında New ve Stein (10) 9-10 günlük sıçan embriyolarını plazma pıhtısında kültüre etmiştir. Bunu takiben yine New (50) 1978 yılında sıçan embriyolarını sıçan serumunda kültüre etmeyi başarmış ve diğer araştırmacıların da dikkatini çeken bu çalışma birçok alanda sıkça kullanılan bir metot haline gelmiştir.

Günümüzde in vitro embriyo kültürü tekniği, embriyonik gelişim üzerine etkili olan farmakolojik ajanların, hormonların, fiziksel ve kimyasal etkenlerin incelenmesi ve potansiyel teratojenlerin saptamasında yaygın olarak kullanılmaktadır (11).

2.3.2. In Vitro Kültür Sistemlerinin Önemi

Canlıların yaşamını her alanda doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyen teknoloji, tıp ve sanayi alanlarında artan bir ivmeyle rol almaktadır. Teknolojik gelişmeler sağladığı kolaylıkların yanında, çevreye bıraktığı yan ürünler, biyolojik ve kimyasal atıklar, zehirli gazlar ve diğer zararlı etkenler ile insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen yeni ekolojik şartları da beraberinde getirmektedir. Bu olumsuzluklar sadece o ortamda yaşayan canlılara değil aynı zamanda anne karnında gelişmekte olan embriyo ve fetus üzerinde de zararlı etkiler göstererek hasta ya da sakat doğumlara veya ölü doğumlara neden olabilmektedir (11).

Konjenital anomaliler geçen yüzyılın başlarında daha çok genetik nedenlere bağlanmaktaydı. Embriyonun anne karın duvarı, uterus, embriyonal ve fetal zarlar tarafından dışarıdan gelebilecek tehditlere karşı korunduğu fikri hakimdi (11). Ancak Gregg, 1941 yılında Rubella virüsünün embriyo gelişiminin kritik döneminde konjenital anomalilere neden olabileceğini göstermiş (51), 1950'lerde ise Thalidomit faciasıyla birlikte diğer çevresel etkenler ve farmakolojik ajanların da benzer durumlara neden olabileceği gösterilmiştir. Bu gelişmeler 'Teratoloji Bilimi'nin doğmasına neden

olmuştur. Yapılan çalışmalar insan anomalilerinin %7-10'unun ilaçlar, toksik ajanlar, iyonize radyasyon ve kimyasal ajanlar gibi çevresel etkenlere bağlı olduğunu göstermektedir. Teratojenlerin saptanmasında insan embriyolarının kullanılması etik olmadığı için hayvan modellerinin kullanılması önem kazanmıştır (52).

Teratojenlerin anomalilere yol açtığı en kritik dönem insanda 15-60'ıncı, sıçanlarda ise 9.5-11.5'inci günler arasına denk gelmektedir. Bu dönem embriyolarda organ taslaklarının geliştiği organogenez dönemine karşılık gelmektedir. Embriyo bu dönemden önce teratojene maruz kalırsa embriyonun yaşaması tehlikeye girerken daha geç dönemde teratojene maruz kaldığında ise embriyoda fizyolojik anomaliler ya da organlarda fonksiyon bozuklukları görülmektedir. Farmakolojik ajanların teratojenik olup olmadığının saptanabilmesi ve doğumsal anomalilerin nedenlerinin belirlenebilmesi için in vivo (canlıda) ve in vitro (organizma dışında) çalışmalar eş zamanlı olarak yapılmaktadır (11).

Memeli gelişimi sürecinde ana organ taslakları, embriyonun uterus duvarına tutunmasını takip eden süreçte şekillenmeye başladığı için embriyo üzerindeki gelişme safhalarını gözlemlemek in vivo çalışmalarda oldukça sınırlıdır. Ayrıca teratojenlerin türe özgü değişiklikler sergilemesi ve in vivo çalışmalarda anne metabolizmasındaki farklılıklar hayvan deneylerinden elde edilen sonuçların insanlar için yorumlanabilmesini zorlaştırır (11). In vitro çalışmalarda ise embriyonun gelişim süreci sürekli gözlenebilmekte ve gebelik sürecinde ortaya çıkan iç ve dış etkenler izole edilebilmektedir. Bu durum normal büyüme mekanizmasının araştırılmasına ve anormal gelişimin etiolojisinin anlaşılabilmesine olanak sağlamaktadır.

2.3.3. In Vitro Ortamda Büyütülen Embriyolarda Büyüme ve Gelişimin Değerlendirilmesi

Kemirgen embriyo kültürü tekniklerindeki gelişmeler sayesinde, embriyoların in vivo şartlarda olduğu kadar in vitro şartlarda da büyütülüyor olması teratolojistlerin dikkatini çekmiş ve ajanların toksisitesinin doğrudan embriyo üzerinde araştırılmasına olanak sağlamıştır (53).

In vitro ortamda büyütülen embriyoların gelişiminin kantitatif olarak değerlendirilmesinde tanımlayıcı parametreler kullanılmaktadır. Van Maele-Fabry ve ark. tarafından geliştirilen 'objektif skorlama sistemi' morfolojik gelişimi ölçmek için tasarlanmış olup en kabul gören ve en sık kullanılan skorlama yöntemidir. Bu sistem

kullanılarak sıçan gebeliğinin 10, 11, 12 ve 13'üncü günlerinde in vitro olarak yaşatılan embriyolarda 17 morfolojik özelliğe bakılmaktadır. Her bir parametre 6 safhaya ayrılmakta ve bu safhalara 0 ile 5 arasında değişen puanlar verilmektedir (54).

Bu parametreler şunlardır:

Vitellüs kesesi damarlanması; damar oluşmaz veya kan adacıkları oluşursa 0 puan, ekto plasental kon etrafında kan adacıkları oluşursa 1 puan, vitellüs kesesi üzerinde birkaç ince damar oluşursa 2 puan, vitellüs kesesinde damar ağı oluşursa 3 puan, ana damardan çok sayıda ince dallar çıkıyorsa 4 puan, vitellüs kesesi sapı oblitere olup vitellin arter ve ven ayrılıyorsa 5 puan verilir.

Allantois; eksosölomda allantois serbest olarak görülürse 0 puan, allantois koryon ile kaynaşmış ise 1 puan, umblikal dolaşım oluşursa 2 puan, umblikal ve vitellin damarların aorttan ayrıldığı görülürse 3 puan verilir.

Fleksiyon; ventral olarak konveks ise 0 puan, 1/4 oranında rotasyon varsa 1 puan, 1/2' lik bir rotasyon varsa 2 puan, 3/4 oranında rotasyon varsa 3 puan, dorsal olarak konveks ise 4 puan, tamamen katlanırsa 5 puan verilir.

Kalp; endokardial yapı görülürse 0 puan, kalp görünüyorsa 1 puan, kalp S harfine benzer tüp şeklinde ise 2 puan, atrium ve ventrikül arasında bir bölme oluşmuş ise 3 puan, kalp üç bölmeye ayrılmış ise 4 puan ve kalp dört bölmeye ayrılmış ise 5 puan verilir.

Kaudal nöral tüp; nöral tabaka veya nöral katlantı oluşmuş ise 0 puan, nöral tabaka kapanmış ancak nöral katlantı ile birleşmiş ise 1 puan, nöral katlantı 4-5 somit seviyesinde birleşmiş ise 2 puan, arka nöropor şekillenir ancak açık ise 3 puan, arka nöroporda küçük bir açıklık varsa 4 puan, arka nöropor kapalı ise 5 puan verilir.

Arka beyin; nöral tabaka oluşmuş ise 0 puan, 'V' şeklinde nöral katlantı var ise 1 puan, nöral katlantı 'U' şeklinde ise 2 puan, ön nöropor oluşmuş ancak açık ise 3 puan, ön nöropor kapalı, rhombencephalon şekillenmiş ise 4 puan, dördüncü ventrikülün açık üst kenarıyla pons birleşmişse 5 puan verilir.

Orta beyin; nöral tabaka veya mesensefalik beyin katlantısı varsa 0 puan, 'V' şeklinde nöral katlantı var ise 1 puan, 'U' şeklinde nöral katlantı var ise 2 puan, kısmen mesensefalik katlantı birleşmişse 3 puan, tamamıyla mesensefalon birleşmişse 4 puan, mesensefalon ve rhinensefalon arasında bir bölme varsa 5 puan verilir.

Ön beyin; nöral tabaka oluşmuş ise 0 puan, 'V' şeklinde nöral katlantı varsa 1 puan, 'U' şeklinde nöral katlantı varsa 2 puan, prosensefalik katlantı kısmen birleşmiş ise 3 puan, prosensefalon tamamen birleşmişse 4 puan, telensefalik evaginasyon görünüyorsa 5 puan verilir.

Otik sistem; herhangi bir belirti yoksa 0 puan, düz bir otik primordium varsa 1 puan, otik çukur varsa 2 puan, otik vezikül kapalı ancak epidermisten ayrılmamış ise 3 puan, otik vezikül epidermisten ayrılmış ise 4 puan, otosit dorsale yerleşmiş ise 5 puan verilir.

Optik sistem; herhangi bir belirti yoksa 0 puan, sulcus opticus varsa 1 puan, optik primordium uzamış ise 2 puan, optik primordium oval şekilli ise 3 puan, primer optik vezikül oluşmuş ve optik sap açık ise 4 puan, lens tabakası oluşmaya başlamış ise 5 puan verilir.

Olfaktör sistem; herhangi bir belirti yoksa 0 puan, olfaktör tabaka var ise 1 puan, olfaktör tabaka çevrelenmiş ise 2 puan, olfaktör çıkıntı belirgin ise 3 puan verilir.

Branşiyal bar; branşiyal bar görünmüyorsa 0 puan, bir tane branşiyal bar varsa 1 puan, iki tane branşiyal bar varsa 2 puan, üç tane branşiyal bar varsa 3 puan verilir.

Maksiller çıkıntı; rudimental bar kafanın ön kısmıyla birleşmiş olarak görünüyorsa 0 puan, rudimental bar kafanın ön tarafından ayrılmış ise 1 puan, branşiyal bar ile maksiller çıkıntı arasında içeriye doğru bir çıkıntı olursa 2 puan, mandibular çıkıntı ile ön beyin arasında bir tabaka oluşmuşsa 3 puan verilir.

Mandibular çıkıntı; herhangi bir şey görünmüyorsa 0 puan, mandibular çıkıntı ventral kenar boyunca ayrılmış ise 1 puan, ventral kenarlar birbirine temas ediyorsa 2 puan, bu kenarlar birleşmiş ise 3 puan verilir.

Ön ayak; herhangi bir oluşum görünmüyorsa 0 puan, 9-13 somit seviyesinde dışarıya doğru bombeleşme varsa 1 puan, ön ayak tomurcuklanmış ise 2 puan, ön ayak tomurcuğu kürek şeklinde ise 3 puan verilir.

Arka ayak; herhangi bir oluşum görünmüyorsa 0 puan, 26-30 somit seviyesinde dışarıya doğru bombeleşme varsa 1 puan, arka ayak tomurcuklanmış ise 2 puan, arka ayak tomurcuğu kürek şeklinde ise 3 puan verilir.

Somitler; somit sayısı 0-5 arasında ise 0 puan, 6-10 arasında ise 1 puan, 11-15 arasında ise 2 puan, 16-20 arasında ise 3 puan, 21-25 arasında ise 4 puan, 26-30 arasında ise 5 puan verilir (54).

Morfolojik skor her bir embriyo için skorların toplam sayısal değerini ifade eder ve sadece embriyonik yaşı belli embriyolar için kullanılır. Morfolojik skorlama in vitro kültür ortamında büyütülen embriyoların gelişiminin ayrıntılı indeksini verir. Spesifik primordia'nın yavaşlamasının ve dismorfogenezin bulunmasına, büyüme ve gelişmenin kantitatif olarak karşılaştırılmasına olanak sağlar (53). Ayrıca vitellüs kesesinin çapı, embriyonun baş-kıç uzunluğu ve baş uzunluğu ölçülerek büyümenin sayısal olarak karşılaştırılmasına yardımcı olur.

2.3.4. Sıçanlarda Erken Dönem Embriyonik Gelişim

Sıçan ve insanın embriyonik gelişimi arasındaki en önemli fark gebelik süresidir. Bu süre sıçanlarda 21-22 gün iken, insanlarda 267 gündür (53). Embriyonun gelişimi sürecinde cleavage ve blastula evreleri insanda ve sıçanda benzerlik gösterir. Blastosist evresinden sonra sıçan embriyo gelişiminin bazı yerlerinde farklılıklar gözlenir (55).

Sıçanlarda cinsel birleşmeden 10 dakika sonra uterus duvarında kasılmalar meydana gelir. Bu kasılmalar sayesinde semen, uterus ile tuba uterinanın birleşim yerine birkaç saniyede ulaşır ve hareketli olan spermiler buradan geçerek ovaryuma doğru ilerler. Ejakulasyondan 1-4 saat sonra ovumun etrafı spermle kuşatılır ve penetrasyon gerçekleşir (56).

Sıçanlarda, spermin ovum içerisine penetrasyonunu takiben 21.-25. saatler arasında ilk yarıklanma görülür. İkinci yarıklanma ise 40.-70. saatler arasında görülür. Takip eden yarıklanma 65.-90. saatler arasında gerçekleşir. Fertilizasyonu takiben 80.-110. saatlerde blastosist dönemine girilir. Bu sürecin tamamı tuba uterina içerisinde gerçekleşir. Zona pellucida 4. günde kaybolmaya başlar ve 5. günün sonunda zona pellucidasını tamamen kaybeden blastosist uterusu girerek uterus duvarına yerleşir (57).

Blastosist, iç hücre kitlesi (embriyoblast) ve blastoselin çevre sınırını oluşturan trofoblast hücreler şeklinde iki hücre grubundan meydana gelir. Mural trofoblast, trofoblastik büyük hücrelerden oluşur ve maternal doku ile bağlantıyı kurar. Ektoplasental kon ise polar trofoblastların çoğalmasıyla oluşur. İç hücre kitlesinin farklılaşmasıyla gelişen endodermal hücrelerin bir kısmı embriyonal diskin alt

bölümünü oluştururken bir kısmı da visseral endodermi şekillendirir. Endoderm hücrelerinin bir kısmı ise mural trofoblastın iç yüzünü kaplayarak parietal endodermi oluşturur. Bu zamanda embriyo 6-7 günlüktür ve embriyonik ektodermin merkezinde, proamniotik boşlukta ve ekstraembriyonik ektoderimde boşluklar görülür. Bu boşluklar birleşerek embriyonik silindirin (egg cylinder) içinde dar bir lümen oluşturur (55).

Reichert's membranı, ilk olarak hamileliğin 6. gününde trofektoderm ve parietal endoderm arasında amorf salgı olarak görülür ve 8. günde kalın hyalin membran haline gelir. Aynı zaman periyodunda primitif çizgi oluşur ve buradan göç eden hücreler ektoderm ile endoderm arasına girerek mezodermi oluşturur. Mezodermal doku çoğalırken iç kısmında bir aralık görülür. Çoğalan bu mezodermal hücre kitlesi embriyonik silindirin lümenini bloke eder ve hamileliğin 8.5'inci gününde embriyonik silindir üç boşluğa bölünür. Bunlar ektoplasental boşluk, eksosölom boşluk ve amniotik boşluk olup bunların etrafında vitellüs boşluğu bulunur. Bu üç boşluk amniotik boşluğun, sıklıkla da eksosölomun genişlemesiyle ikiye düşer ve ektoplasental boşluk oblitere olur. Ektoplasental boşluğun zeminini oluşturan korion, ektoplasental zonun dokusuyla birleşir. Aynı zamanda allantois, eksosölom içindeki primitif çizginin olduğu yerden gelişir (55).

Embriyo 10.5 günlükken fark edilebilir yapıdadır. Nöral krest, kas-iskelet sistemi, kalp, ön barsak, karaciğer tomurcukları ve somitler belirginleşmiştir. Buna ek olarak allantois eksosölom karşısında gelişerek ektoplasental kon ile birleşir. Aynı zamanda embriyo ventral olarak konveks olup hemen dönmeye başlar ve kuyruğu kıvrılır. Dönme olayı embriyo 11.5 günlükken tamamlanarak dorsal olarak konveks hale gelir. Embriyo, amniyon kesesi içinde dönerek etrafı amniyon tarafından çevrelenir, aynı zamanda vitellüs kesesi gelişir. Böylece hem amniyon hem de embriyo vitellüs kesesi içinde gelişir. Sıçan embriyosu yaklaşık 12.5 günlükken bütün organlar belirgindir. Bu durum insanlarla karşılaştırıldığında 8. haftaya denk gelmektedir (58). Aynı zamanda embriyo, korio-allantoik plasenta ve damarlanmış yolk sac plasenta olmak üzere iki plasentaya sahiptir. Allantoik plasenta gebeliğin son evresinde önemli iken, damarlanmış vitellüs kesesi erken embriyonik gelişim esnasında esas besleyici organ olarak görev yapar (56).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) bulunan Embriyo Kültürü Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmamız Erciyes Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurallarına uygun olarak yapılmıştır. (Etik Kurul No:12/101) Çalışmada DEKAM' da yetiştirilen Wistar Albino türü sıçanlar kullanıldı. Kafeslere alınan sıçanlar günün normal düzeninde, 21 °C sıcaklıktaki 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamda tutuldu. Su, besin ihtiyaçları ve kafes içi temizlikleri sağlandı (Resim 3.1).

Çalışmamızda kullanacağımız embriyoları elde etmek üzere döllenme yeteneği olan erkek sıçanlarla, 150-250 gr ağırlığındaki (4-10 aylık) dişi sıçanlar saat 17:00'de aynı kafese alındı. Her bir kafese 3 adet dişi sıçan, 1 adet erkek sıçan konuldu. Sıçanlar karanlık periyodun ortalarında çiftleşmeye meyilli olduğu için ertesi sabah saat 08:30'da dişi sıçanlardan Pasteur pipeti ile smear alınarak mikroskop altında incelendi. Vajinal smearında sperm görülen dişiler 0.5 günlük gebe kabul edilerek ayrı bir kafese alındı ve normal diyetle beslenerek 9 gün bekletildi.



Resim 3.1 Dişi sıçanların kafesteki görünümü

3.2. EMBRİYO KÜLTÜRÜ

3.2.1. Kültür Ortamının (serum) Hazırlanması

Sıçan embriyolarını büyütmek için kullanılan kültür ortamı dişi veya erkek sıçanların kanlarından elde edilen serumla oluşturuldu. Serum eldesi için ilk önce sıçanlar eter ile anestezi edildi (Resim 3.2). Anestezinin gerçekleşip gerçekleşmediği göz kapağı refleksine bakılarak kontrol edildi. Göz kapağı refleksi kaybolan sıçanlar anestezi kutusundan alınarak düz satıh üzerine sırtüstü yatırıldı (Resim 3.3) ve sabitlendi. Anestezinin devamı eterle ıslatılmış pamuğun hayvanın baş kısmına yerleştirilmesi ile sağlandı. Karın ön duvarı %70'lik alkol ile temizlenerek tüylerin kontaminasyonu önlendi. Daha sonra pens ve makas kullanılarak pubis üzerinden her iki kaburga yayına doğru iki insizyon yapılarak karın ön duvarı derisi ve kasları 'V' şeklinde baş hizasına katlandı (Resim 3.4). Aort orta hattın solunda bulunduğu için karın içi organları steril spanç yardımıyla sağ tarafa yatırılarak aorta abdominalis görünür hale getirildi. Aorta abdominalisin çatallanma yerinden steril 10 ml'lik enjektör yardımıyla kan alındı (Resim 3.5). Alınan kan miktarı her hayvanın ağırlığına göre değişmekte olup yaklaşık 6-10 ml kadardı. Alınan kan 3500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan serum 'Lamin-air flow' altında steril Pasteur pipeti yardımıyla başka bir tüpe alınarak, 56 °C'lik su banyosunda 30 dakika bekletildi ve protein inaktivasyonu sağlandı. Su banyosunda

bekletilen serum olası partiküllerden izole etmek amacıyla 0.22 μ m'lik filtreden geçirildi. Daha sonra serum içerisine 100 IU/ml penisilin ve 100 ug/ml streptomisin karışımından (Her ml serum için 10 μ l olacak şekilde) ilave edildi. Elde edilen serum - 20 °C dondurularak kullanılacağı zaman 37 °C su banyosunda bekletilip kullanıma hazır hale getirildi.



Resim 3.2 Bayıltma kutusunda anestezi edilen sıçanın görünümü



Resim 3.3 Anestezi edilen sıçanın sırt üstü yatırılmış görünümü



Resim 3.4 Karın ön duvarı derisi ve kasları 'V' şeklinde baş hizasına katlanmış sıçanın görünümü



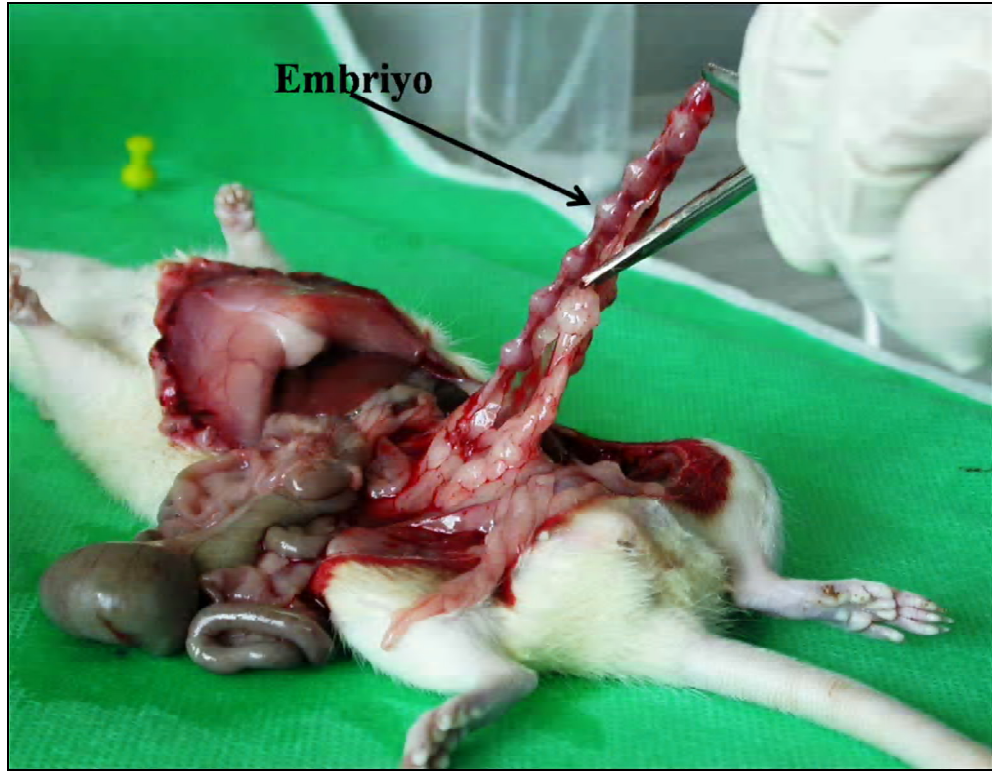
Resim 3.5 Aorta abdominalisin çatallanma yerinden alınan kanın görünümü

3.2.2. Embriyoların Anne Karnından Çıkarılması

Gebeliğin 9.5'inci gününde sıçanların 3.2.1'de tarif edildiği üzere, eter anestezi altında karın ön duvarları açıldı ve kanları alınarak serum elde etmek için kullanıldı. Sayıları 8-15 arası değişen ve içerisinde embriyo bulunan keselerin dizili olduğu uterus (Resim 3.6), steril bir pens ve makas yardımıyla diseke edildi (Resim 3.7). Daha sonra bu keseler tek tek kesilerek içerisinde Hanks dengeli tuz çözeltisi (Hank's Balanced Salt Solution =HBSS) bulunan steril petri kabına alındı (Resim 3.8, 3.9). Bu aşamadan sonra bütün işlemler 'Lamin-air flow' kabin içerisinde yarı steril şartlarda ve stero mikroskop kullanılarak yapıldı. Steril bir çift forceps yardımıyla uterus kası antimezometrial kenar boyunca dikkatlice açılarak desidual doku açığa çıkarıldı (Resim 3.10). Desidual kitle ikiye ayrıldı ve bir yüzüne yerleşmiş olan embriyoya zarar verilmeden dikkatli bir şekilde desidüadan ayrıldı (Resim 3.11). Daha sonra kemirgenlere has ve embriyoyu çepeçevre saran Reicherts membranı pens yardımıyla embriyonal kutuptan parçalanarak çıkartıldı (Resim 3.12). Çıkartılan embriyolar HBSS bulunan steril küçük petri kabına alındı (Resim 3.13).



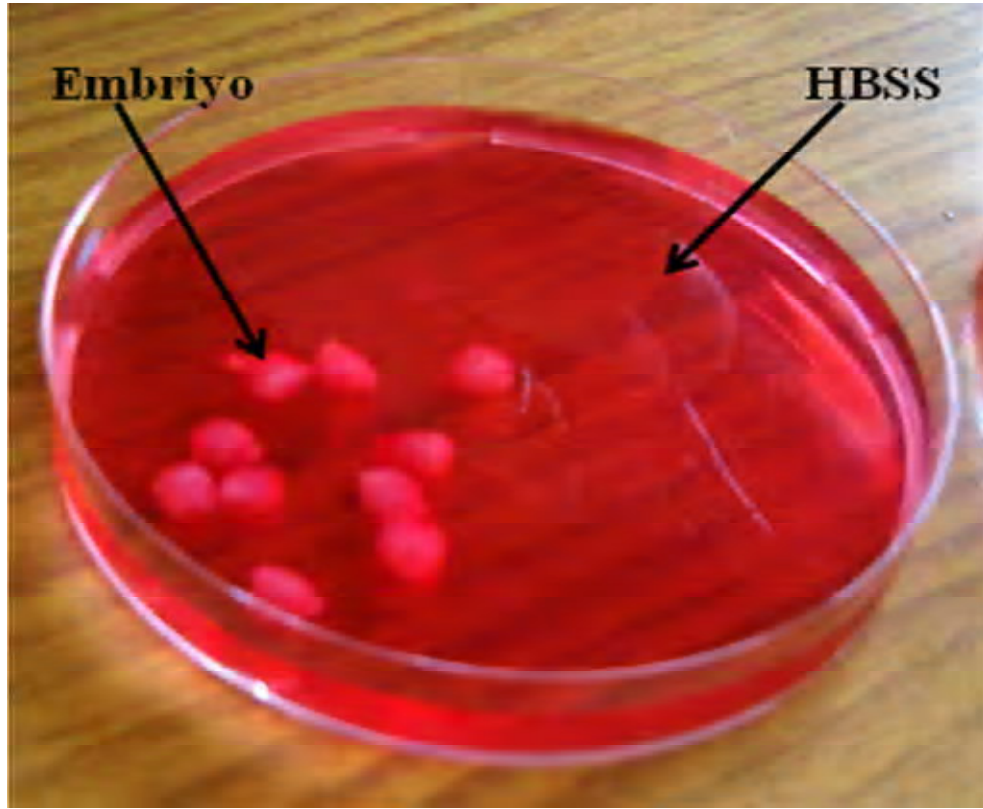
Resim 3.6 Karın içinde embriyoların görünümü



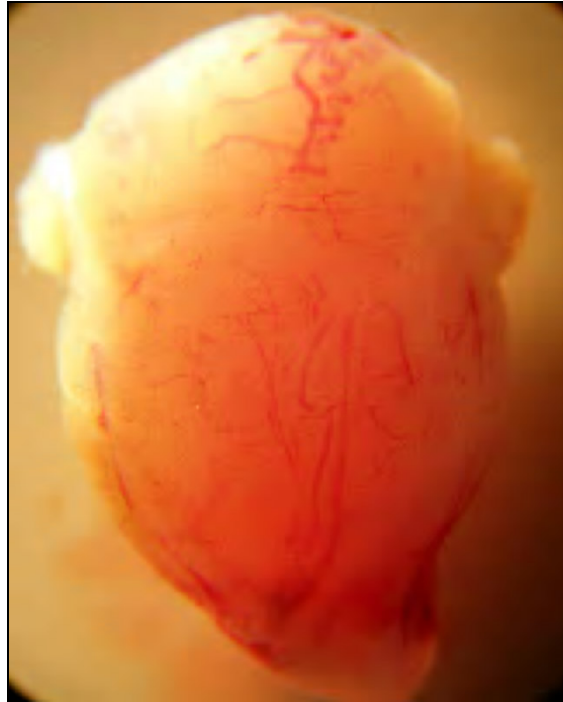
Resim 3.7 Uterus boynuzunda bulunan embriyoların görünümü



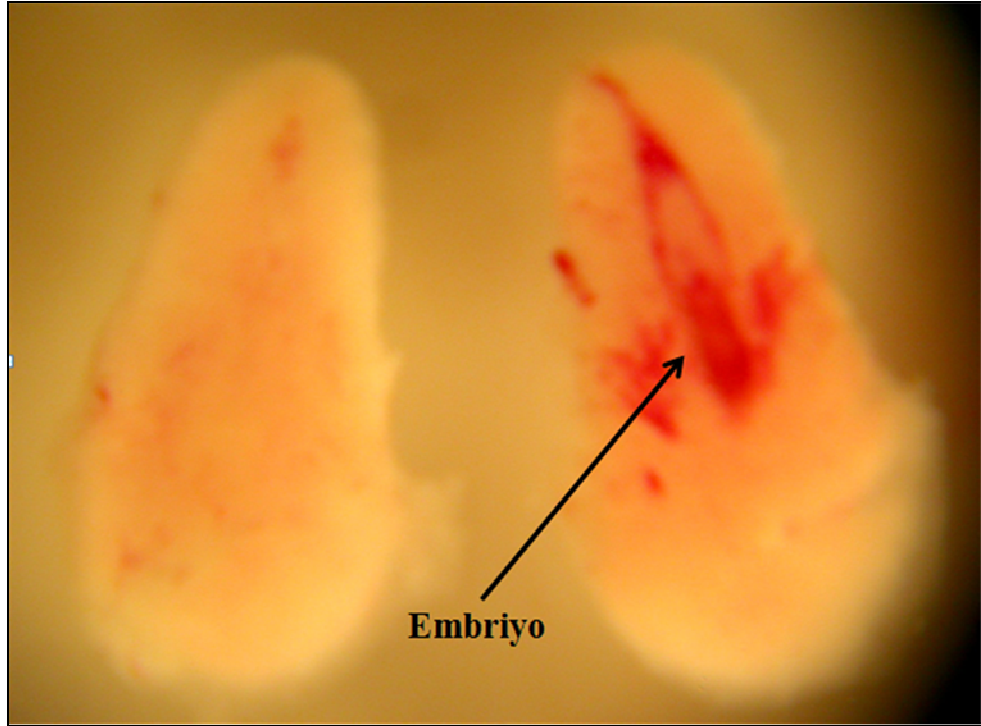
Resim 3.8 Embriyoların uterus boynuzundan çıkarıldıktan sonra HBSS'ye transferi



Resim 3.9 HBSS içindeki embriyoların görünümü



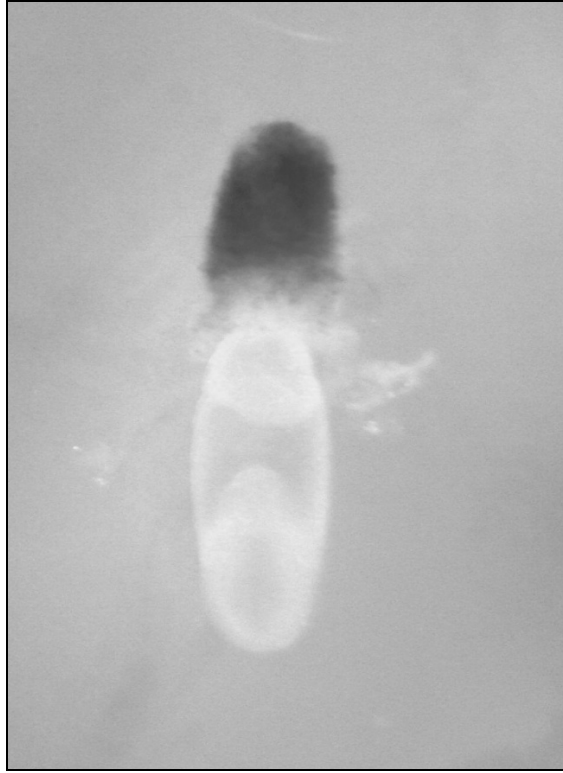
Resim 3.10 İçerisinde embriyo bulunan uterus



Resim 3.11 Desidual kitle ve bir yüzüne yerleşmiş olan embriyonun görünümü



Resim 3.12 Reicherts membranlı embriyo



Resim 3.13 Reicherts membranı çıkartılmış embriyo

3.2.3. Embriyoların Kültüre Edilmesi

Embriyoların çıkarılmasını takiben (3.2.2'de tarif edildiği gibi) sağlam embriyolar beşerli gruplara ayrıldı. Steril cam Pasteur pipet yardımıyla içerisinde 5 ml normal sıçan serumu bulunan 50 ml'lik steril cam kültür şişelerine (1 embriyo/1 ml serum) konuldu. Zarar görmüş ya da gelişimi geri olan embriyolar kültür ortamına alınmadı. Embriyo bulunan şişelere %5'lik O₂, %5'lik CO₂, %90'lık N₂ (1. gaz karışımı) gaz karışımı 1 dakika süreyle verilerek embriyoların oksijen ihtiyacı karşılanmış oldu. Daha sonra şişenin ağzı steril mantar tıpa ile sıkıca kapatılarak 37 °C'lik inkübatöre konuldu. Kültür şişeleri dakikada yaklaşık 30 devirle (30 rpm/dk) dönen rollara yerleştirildi. 24 saat sonra kültür şişeleri inkübatörden çıkarılarak mantar tıpaları açıldı ve içerisine 1 dakika süreyle %20 O₂, %5 CO₂, %75 N₂ içeren (2. gaz karışımı) gaz karışımı verildi. Kültür şişeleri tekrar kapatılarak inkübatöre konuldu. Embriyoların morfolojik skorlamalarını yapmadan 4 saat önce %40 O₂, %5 CO₂, %55 N₂ içeren (3. gaz karışımı) gaz karışımı yine 1 dakika süreyle verildi. 48 saat boyunca kültür ortamında tutulan embriyolar içerisinde HBSS bulunan steril petri kaplarına alındı. Embriyolar Van Maele-Fabry ve

ark. (18) tarafından geliştirilen morfolojik skrolama yöntemine göre tek tek stero mikroskop altında değerdendirildi.

3.2.4 Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamız biri kontrol ikisi deney grubu olmak üzere toplam 3 gruptan oluşmaktadır. Kontrol grubunda sadece sıçan serumu (Whole Rat Serum=WRS) kullanılırken deney gruplarından birine her bir embriyo başına 1000 IU IFN β -1a (Avonex) diğerine ise yine her embriyo başına 1000 IU IFN β -1b (Betaferon) ilaveli WRS kullanıldı. Bu üç grup için toplam 28 embriyo kullanıldı. Çalışmamız iki aşamalı gerçekleştirildi. İlk aşamada her grup için 5'er embriyo olmak üzere toplam 15 embriyo kullanıldı. İkinci aşama ise bir hafta sonra kontrol grubu için 5 embriyo, deney grupları için 4'er embriyo kullanılarak tamamlandı. Böylece kontrol grubunda 10 embriyo, deney gruplarında ise 9'ar embriyo kullanıldı.

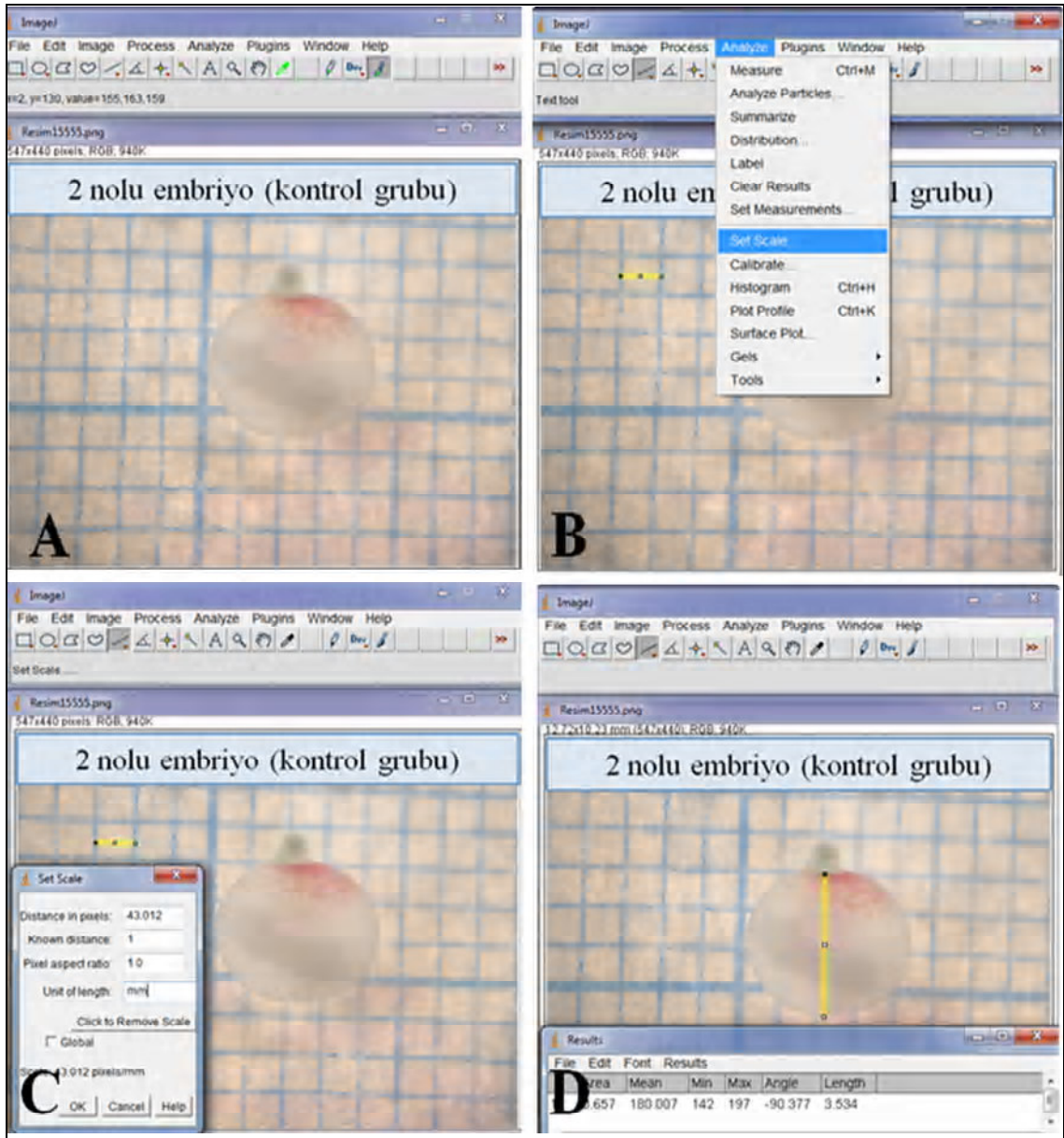
3.2.5 Kültüre Edilen Embriyoların Sonuçlarının Değerdendirilmesi

48 saat kültür ortamında büyütölen kontrol grubu ve deney gruplarına ait embriyoların morfolojik skorlarına, somit sayılarına, vitellüs kesesi çaplarına, embriyo baş-kıç uzunluklarına ve baş uzunluklarına tek tek bakılarak sayısal veriler elde edildi.

Kültüre edilen embriyoların morfolojik skorları ve somit sayıları 2.1.3'de belirtildiğı gibi Van Maele-Fabry ve ark. (18) tarafından geliştirilen 'objektif skrolama sistemi' kullanılarak belirlendi.

11.5 günlük embriyoların vitellüs kesesi çaplarını, baş-kıç uzunluklarını ve baş uzunluklarını ölçmek için vitellüs kesesi çıkarılmadan önce ve sonrasında içerisinde embriyo bulunan petri kabı, milimetrik kağıt üzerine konarak stero mikroskop altında fotoğrafları çekildi. Elde edilen fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarıldı. Aktarılan fotoğraflardaki embriyoların vitellüs kesesi çapı, embriyo baş-kıç uzunlukları ve baş uzunlukları ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>) programı kullanılarak ölçöldü (Resim 3.14A). Önce fotoğraflardaki milimetrik kağıt üzerindeki eş aralıklar baz alınıp ImageJ programının analyze-set scala bölümü kullanılarak uygun kalibrasyon yapıldı (Resim 3.14B). Kalibrasyon yapıldıktan sonra ImageJ programının 'straight' özelliğı ile ölçümü yapılacak olan mesafe manuel olarak belirlendi (Resim 3.14C) ve değeri mm cinsinden hesaplandı (Resim 3.14D).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sayısal verilerin normal dağılımına Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. Değişkenlerin gruplar arası karşılaştırılmaları Tek Yönlü Varyans Analizi ile yapıldı. Varyasyonların homojenliği Levene Testi ile kontrol edildi. Çoklu karşılaştırmaları için Tukey HDS Testi uygulandı. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

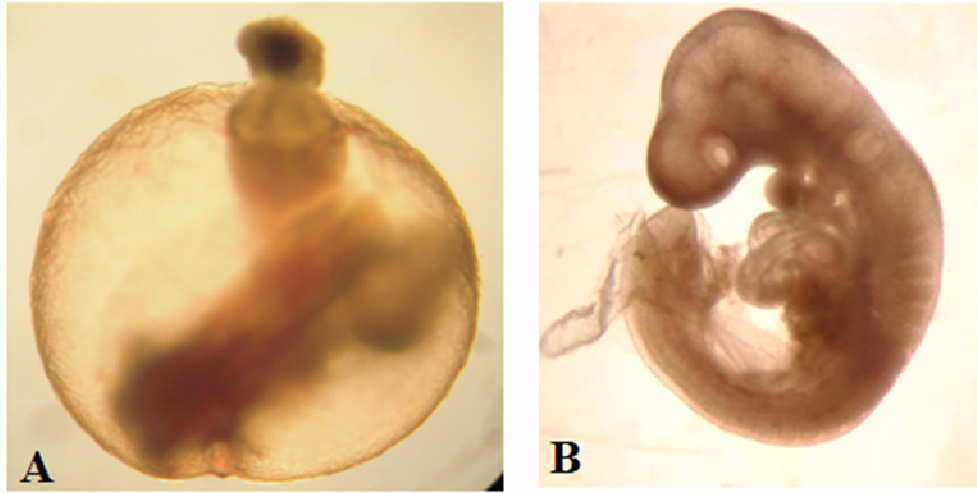


Resim 3.14 ImageJ programı kullanılarak embriyo'da kalibrasyon yapılma aşaması ve ölçümü A-Bilgisayar ortamına aktarılmış fotoğrafların ImageJ programında açılması. B,C-Fotoğraflardaki milimetrik kağıt üzerindeki eş aralıklar baz alınıp ImageJ programının analyze-set scala bölümü kullanılarak uygun kalibrasyon yapılması. D-Kalibrasyon yapıldıktan sonra ImageJ programının 'straight' özelliği ile ölçümü yapılacak olan mesafenin manuel olarak belirlenip, uzunluğunun ölçülmesi

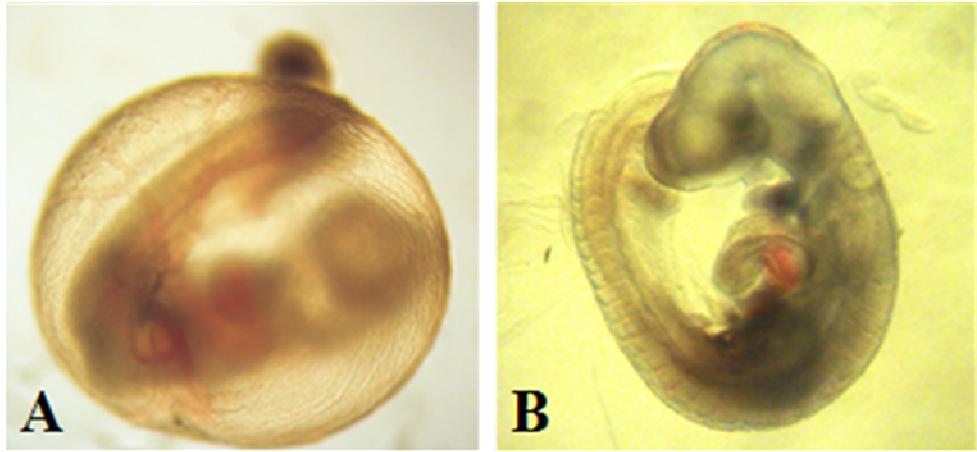
4. BULGULAR

Toplam 3 gruptan (kontrol ve 2 deney grubu) oluşan çalışmamızda, 48 saatlik kültür periyodunun sonunda kontrol grubuna ait embriyoların gelişiminin normal olduğu ve morfolojik skora sonuçlarının 11.5 günlük embriyoların gelişimine yakın bir gelişim gösterdiği belirlendi (Resim 4.1). IFN β -1a ve IFN β -1b ilave ettiğimiz deney gruplarındaki embriyoların gelişimi toplam morfolojik skor ve somit sayısı parametrelerine göre kontrol grubundaki embriyolar ile karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$), (Resim 4.2, 4.3). Ancak gruplar arasında vitellüs kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu ve baş uzunluğu parametreleri karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre deney gruplarında elde edilen değerlerin daha düşük olduğu ve farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$), (Tablo 4.1).

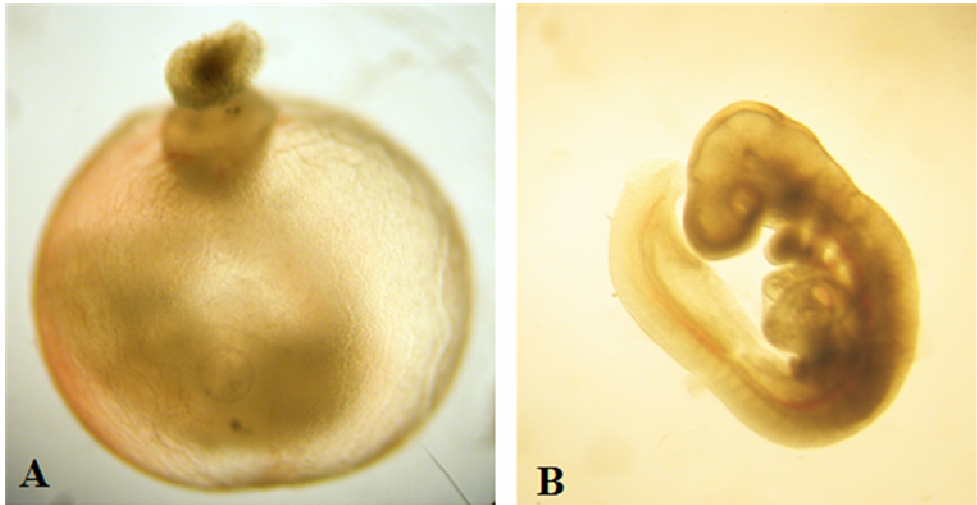
Farklılık belirlenen parametreler için kontrol grubu ile deney gruplarında elde edilen değerler Tablo 4.2 ve 4.3’de verildi.



Resim 4.1 Sıçan serumunda büyüyen 11.5 günlük sıçan embriyoları A- Vitellüs kesesi çıkartılmamış embriyo B- Vitellüs kesesi çıkartılmış embriyonun yandan görünüşü



Resim 4.2 Kültür ortamına 1000 IU/ml IFN β -1a ilave edildikten sonraki 11.5 günlük sıçan embriyoları A- Vitellüs kesesi çıkartılmamış embriyo B- Vitellüs kesesi çıkartılmış embriyonun yandan görünüşü



Resim 4.3 Kültür ortamına 1000 IU/ml IFN β -1b ilave edildikten sonraki 11.5 günlük sıçan embriyoları A- Vitellüs kesesi çıkartılmamış embriyo B- Vitellüs kesesi çıkartılmış embriyonun yandan görünüşü

Tablo 4.1. Sıçan serumu ve IFN β 'nın toplam embriyonik gelişim üzerine etkisi

Kültür Ortamı	Embriyo Sayısı (N)	Toplam Morfolojik Skor	Somit Sayısı	Vitellüs Kesesi Çapı	Baş-Kıç Uzunluğu	Baş Uzunluğu
Sıçan Serumu	10	56.25 $\pm$ 3.04	22.0 $\pm$ 2.45	4.79 $\pm$ 0.37	3.78 $\pm$ 0.43	1.59 $\pm$ 0.10
1000 IU/ml IFN β -1a	9	56.17 $\pm$ 1.32	22.44 $\pm$ 1.13	4.08 $\pm$ 0.32**	3.34 $\pm$ 0.10*	1.44 $\pm$ 0.03**
1000 IU/ml IFN β -1b	9	53.56 $\pm$ 2.46	21.66 $\pm$ 0.86	4.12 $\pm$ 0.32*	3.29 $\pm$ 0.19*	1.47 $\pm$ 0.04*

Sonuçlar ortalama değer olarak ifade edildi. * p<0.05, ** p<0.001

Tablo 4.2. Kontrol grubu ve 1000 IU/ml IFN β -1a grubuna ait Vitellüs Kesesi Çapı, Baş-Kıç Uzunluğu ve Baş Uzunluğu değerleri

Parametre	Sıçan Serumu (Kontrol grubu)				1000 IU/ml IFN β -1a (Deney grubu)				p Değeri
	EKD	EBD	Ortalama	SS	EKD	EBD	Ortalama	SS	
Vitellüs Kesesi Çapı	4.26	5.58	4.795	0.377	3.59	4.43	4.084	0.320	000**
Baş-Kıç Uzunluğu	3.07	4.35	3.781	0.432	3.21	3.57	3.348	0.108	008*
Baş Uzunluğu	1.46	1.74	1.597	0.103	1.40	1.50	1.448	0.033	000**

EKD: En küçük değer, EBD: En büyük değer, SS: Standart sapma. * p<0.05, ** p<0.001

Tablo 4.3. Kontrol grubu ve 1000 IU/ml IFN β -1b grubuna ait Vitellüs Kesesi Çapı, Baş-Kıç Uzunluğu ve Baş Uzunluğu değerleri

Parametre	Sıçan Serumu (Kontrol grubu)				1000 IU/ml IFN β -1b (Deney grubu)				p Değeri
	EKD	EBD	Ortalama	SS	EKD	EBD	Ortalama	SS	
Vitellüs Kesesi Çapı	4.26	5.58	4.795	0.377	3.49	4.54	4.129	0.326	001*
Baş-Kıç Uzunluğu	3.07	4.35	3.781	0.432	3.02	3.58	3.298	0.194	003*
Baş Uzunluğu	1.46	1.74	1.597	0.103	1.40	1.55	1.471	0.048	002*

EKD: En küçük değer, EBD: En büyük değer, SS: Standart sapma. * p<0.05, ** p<0.001

Kontrol grubunda büyüyen embriyoların kaudal nöral tüp gelişimleri değerlendirildiğinde 5 embriyonun arka nöroporunun şekillendiği ancak nöral açıklığın

devam ettiği diğer 5 embriyoda ise arka nöroporlarında sadece küçük bir açıklığın olduğu belirlendi. Deney gruplarında; 1000 IU/ml IFN β -1a ilave edilen grupta 7 embriyonun arka nöroporunun şekillendiği ancak açık pozisyonda olduğu, 2 tanesinin ise arka nöroporunda küçük bir açıklığın devam ettiği görüldü. 1000 IU/ml IFN β -1b varlığında ise embriyoların hepsinin arka nöroporunun şekillendiği ancak kapanmanın gerçekleşmediği ve açıklığın devam ettiği tespit edildi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Kontrol grubu ile deney gruplarının kaudal nöral tüplerinin gelişimi

Kültür Ortamı	Embriyo sayısı (N)	Morfolojik Skor					
		0	1	2	3	4	5
		Nöral tabaka veya nöral katlantı oluşmuş	Nöral tabaka kapanmış ancak nöral katlantı ile birleşmiş	Nöral katlantı 4-5 somit seviyesinde birleşmiş	Arka nöropor şekillenir ancak açık	Arka nöroporda küçük bir açıklık var	Arka nöropor kapalı
Sıçan Serumu (Kontrol grubu)	10	-	-	-	5	5	-
1000 IU/ml IFN β -1a (Deney grubu)	9	-	-	-	7	2	-
1000 IU/ml IFN β -1b (Deney grubu)	9	-	-	-	9	-	-

Embriyoların arka beyinlerinin gelişim süreci morfolojik skorlamaya göre değerlendirildiğinde; kontrol grubuna ait embriyoların 5 tanesinde dördüncü ventrikülün açık üst kenarıyla pons'un birleştiği, 4 tanesinde ön nöroporun kapalı ve rhombencephalonun şekillenmiş olduğu belirlendi. 1 tanesinde ise ön nöroporun oluştuğu ancak kapanmadığı gözlemlendi. Deney gruplarında ise 1000 IU/ml IFN β -1a ilave edilen grupta 7 embriyoda, 1000 IU/ml IFN β -1b kullanılan grupta ise 6 embriyoda ön nöroporun kapalı, rhombencephalonun şekillenmiş olduğu belirlendi. Deney gruplarında geri kalan embriyolar değerlendirildiğinde ise IFN β -1a grubunda 2 embriyoda, IFN β -1b grubunda ise 3 embriyoda arka beyin gelişimlerinde ön nöroporun oluştuğu ancak açıklığın devam ettiği saptandı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Kontrol grubu ile deney gruplarının arka beyinlerinin gelişimi

Kültür Ortamı	Embriyo sayısı (N)	Morfolojik Skor					
		0	1	2	3	4	5
		Nöral tabaka oluşmuş	'V' şeklinde nöral katlantı var	Nöral katlantı 'U' şeklinde	Ön nöropor oluşmuş ancak açık	Ön nöropor kapalı, rhombencephalon şekillenmiş	Dördüncü ventrikülün açık üst kenarıyla pons birleşmiş
Sıçan Serumu (Kontrol grubu)	10	-	-	-	1	4	5
1000 IU/ml IFN β -1a (Deney grubu)	9	-	-	-	2	7	-
1000 IU/ml IFN β -1b (Deney grubu)	9	-	-	-	3	6	-

Gruplara ait embriyoların orta beyinlerinin gelişimi morfolojik skorlamaya göre değerlendirildiğinde kontrol grubunda 4 embriyonun mesensefalonu ile rhinensefalonu arasında bir bölmenin olduğu, 5 embriyoda mesensefalonun tamamıyla birleşmiş olduğu 1 embriyoda ise mesensefalik katlantının kısmen birleştiği görüldü. 1000 IU/ml IFN β -1a ilave edilen gruptaki embriyoların hepsinde mesensefalonun tamamıyla birleşmiş olduğu belirlenirken 1000 IU/ml IFN β -1b bulunan grupta 6 embriyoda mesensefalonun tamamıyla, 3 embriyoda ise mesensefalik katlantının kısmen birleştiği görüldü (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Kontrol grubu ile deney gruplarının orta beyinlerinin gelişimi

Kültür Ortamı	Embriyo sayısı (N)	Morfolojik Skor					
		0	1	2	3	4	5
		Nöral tabaka veya mesensefalik beyin katlantısı var	'V' şeklinde nöral katlantı var	'U' şeklinde nöral katlantı var	Kısmen mesensefalik katlantı birleşmiş	Tamamıyla mesensefalon birleşmiş	Mesensefalon ve rhinensefalon arasında bir bölme var
Sıçan Serumu (Kontrol grubu)	10	-	-	-	1	5	4
1000 IU/ml IFN β -1a (Deney grubu)	9	-	-	-	-	9	-
1000 IU/ml IFN β -1b (Deney grubu)	9	-	-	-	3	6	-

Gruplardaki embriyoların ön beyin gelişimlerini kıyasladığımızda, kontrol grubundaki embriyoların 4 tanesinde telensefalik evaginasyon görülürken 6 tanesinde ise prosensefalon tamamen birleşmiş olarak belirlendi. 1000 IU/ml IFN β -1a ilave edilen grupta embriyoların sadece 1 tanesinde telensefalik evaginasyon görülürken 7 tanesinde prosensefalon tamamen birleşmiş olarak, 1 tanesinde de prosensefalik katlantı kısmen birleşmiş olarak tespit edildi. 1000 IU/ml IFN β -1b içeren grupta embriyoların 6 tanesinde prosensefalon tamamen birleşmiş olarak, 3 tanesinde ise prosensefalik katlantı kısmen birleşmiş olarak görüldü (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Kontrol grubu ile deney gruplarının ön beyinlerinin gelişimi

Kültür Ortamı	Embriyo sayısı (N)	Morfolojik Skor					
		0	1	2	3	4	5
		Nöral tabaka oluşmuş	'V' şeklinde nöral katlantı var	'U' şeklinde nöral katlantı var	Prosensefalik katlantı kısmen birleşmiş	Prosensefalon tamamen birleşmiş	Telensefalik evaginasyon görüntüyör
Sıçan Serumu (Kontrol grubu)	10	-	-	-	-	6	4
1000 IU/ml IFN β -1a (Deney grubu)	9	-	-	-	1	7	1
1000 IU/ml IFN β -1b (Deney grubu)	9	-	-	-	3	6	-

Morfolojik skortlama sistemine göre embriyoların olfaktör sistemlerinin gelişimi değerlendirildiğinde, kontrol grubunda 6 embriyonun olfaktör çıkıntısının belirgin olduğu, diğer 4 embriyoda ise olfaktör tabakanın çevrenmiş olduğu görüldü. 1000 IU/ml IFN β -1a ilave edilen gruptaki embriyoların 7 tanesinde olfaktör tabakanın oluştuğu ve etrafının çevrenmiş olduğu, 2 tanesinde ise sadece olfaktör tabakanın oluştuğu belirlendi. Kültür ortamına 1000 IU/ml IFN β -1b konulduğunda ise embriyoların hepsinde olfaktör tabakanın geliştiği görüldü. Ancak hiç birinde olfaktör tabakanın etrafının çevrenmediği belirlendi (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Kontrol grubu ile deney gruplarının olfaktör sistemlerinin gelişimi

Kültür Ortamı	Embriyo sayısı (N)	Morfolojik Skor			
		0	1	2	3
		Herhangi bir belirti yok	Olfaktör tabaka var	Olfaktör tabaka çevrelenmiş	Olfaktör çıkıntı belirgin
Sıçan Serumu (Kontrol grubu)	10	-	-	4	6
1000 IU/ml IFN β -1a (Deney grubu)	9	-	2	7	-
1000 IU/ml IFN β -1b (Deney grubu)	9	-	9	-	-

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sitokinler olarak bilinen, glikoprotein ailesinin içinde yer alan, insan ve diğer memeli türlerinin hücreleri tarafından üretilen IFN'ler, 1957 yılında Isaacs ve Lindenman tarafından bir dizi deney esnasında tesadüfen bulunmuştur (2). O günden beri yaklaşık 55 yıldır interferonlarla ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve hala devam eden çalışmalar mevcuttur. Söz konusu çalışmaların büyük bir çoğunluğu IFN'lerin biyolojik yapılarının belirlenmesi ve hastalıklar üzerine etkilerini araştırmaya yönelik olmuştur (28, 29). Ancak interferonların gebelikte kullanımının embriyo üzerine olası etkilerini araştıran çalışmalar sınırlıdır (37, 38).

Günümüzde insan hücrelerinde birçok farklı IFN molekülü saptanmıştır. IFN'ler bağlandıkları reseptör alt tipine göre Tip I IFN ve Tip II IFN olmak üzere iki kategoride sınıflandırılır (24). İnsanın 9. kromozomunda bulunan genlerden üretilen Tip I IFN'nin dört alt tipi bulunur ve bunlardan IFN α ve IFN β klinik açıdan en önemli interferonlardır (25). IFN'ler alyuvar, fibroblast, doğal öldürücü hücreler ve epitel hücreleri gibi immün sistem hücreleri tarafından bakteri, virüs, parazit, tümör hücrelerine karşı cevap olarak doğal olarak üretilir. Böylece viral replikasyonu inhibe ederler ve diğer hücrelerin enfekte olmalarını engelleyerek immün cevaba yardımcı olurlar. IFN'ler hücreye giren virüs için özgül olmadığından diğer virüslerin de gelişme ve çoğalmasını durdurur. Bu nedenle antiviral spektrumları oldukça geniştir (1).

MS, merkezi sinir sistemini etkileyen kronik ve otoimmün bir hastalık olup patolojik bulguları inflamasyon, demiyalizasyon ve akson harabiyeti olarak sıralanabilir (35). Erişkinlerde travmaya bağlı olmaksızın nörolojik fonksiyon kaybına yol açan hastalıklar arasında MS ilk sırada yer almaktadır (32, 33). MS semptomları hastaların 2/3'ünde 20-40 yaşları arasında başlar (7) ve hastaların günlük yaşam aktivitelerini, mesleki başarılarını, toplumsal ilişkilerini ileri derecede etkileyen ciddi sakatlıklara yol açabilir. Bu yönüyle MS'in tıbbi boyutunun yanı sıra ekonomik ve sosyal boyutu da bulunmaktadır. Günümüzde MS'nin medikal tedavi seçenekleri arasında FDA tarafından onaylanan IFN β -1a ve IFN β -1b en sık tercih edilen ilaçlardır. Hastalık sürecinde IFN β 'nın klinik atak sayısını %30 oranında azalttığı, atak şiddetini hafiflettiği ve MRG'de iltihabi göstergeleri azaltan anlamlı etkilerinin olduğu yapılan klinik çalışmalarda gösterilmiştir (42). Hastalığın genç erişkin kadınlarda aynı yaş erkeklerle oranla 2 kat daha fazla görülmesi kadınlarda gebelik sürecinde ve emzirme döneminde kullanılan ilaçların teratojenik etkilerinin bilinmesini önemli kılar. Ancak IFN β 'nın teratojenik etkisinin olup olmadığı ile ilgili sınırlı sayıda çalışma vardır. Bu nedenle IFN β -1a ve IFN β -1b'nin gebelikte kullanımını FDA tarafından C kategorisine alınmıştır (56).

In vitro embriyo kültürü tekniği günümüzde, embriyonik gelişim üzerine etkili olan farmakolojik ajanların, hormonların, fiziksel ve kimyasal etkenlerin incelenmesi ve potansiyel teratojenlerin saptamasında yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir (11).

Bu çalışmada, kültüre ettiğimiz embriyoların gelişim düzeylerini saptayabilmek için Van Maele-Fabry ve ark. (18) tarafından geliştirilmiş ve 17 parametreden oluşan toplam morfolojik skora yöntemi kullanıldı. Elde ettiğimiz veriler, normal sıçan serumunda kültüre edilen embriyoların gelişmişlik düzeyleri ile in vivo şartlarda büyüyen embriyoların gelişmişlik düzeyleri arasında benzerlik olduğunu göstermektedir. IFN β -1a ve IFN β -1b ilave ettiğimiz kültür ortamında büyütülen embriyolar toplam morfolojik skor ve somit sayıları açısından değerlendirildiğinde kontrol grubundaki embriyolar ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık belirlenmedi. Kontrol grubuna ait morfolojik skor değeri 56.25 ± 3.04 olup, deney gruplarına (1000 IU IFN β -1a/ml ve 1000 IU IFN β -1b/ml) ait değerler ise sırasıyla 56.17 ± 1.32 , 53.56 ± 2.46 'dir.

Yaptığımız literatür taramasında IFN β -1a ve IFN β -1b'nin teratojitesini araştıran sıçan embriyo kültürü çalışmalarına rastlanılmadı. Ancak embriyo kültürü ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda kontrol grubuna ait toplam morfolojik skor değerleri 58.45 ± 0.47 (17), 59.6 ± 0.51 (59), 55.30 ± 7.22 (60), 57.7 ± 0.87 (19) olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda ise kontrol grubuna ait toplam morfolojik skor değeri 56.25 ± 3.04 olarak tespit edildi ve bu değer daha önce yapılmış çalışmaların sonucu ile paralellik göstermekteydi.

Yapılan kültür çalışmalarında kontrol grubuna ait somit sayıları 24.20 ± 0.68 (17), 21.20 ± 2 (59), 22.10 ± 3.78 (60), 26.5 ± 0.47 (19) olarak bildirilmiş olup, bizim çalışmamızda ise kontrol, IFN β -1a ve IFN β -1b gruplarına ait somit sayıları sırasıyla 22.0 ± 2.45 , 22.44 ± 1.13 , 21.66 ± 0.86 olarak belirlendi. Literatürde kontrol grubuna ait 11,5 günlük embriyoların vitellüs kesesi çaplarının ölçümleri 3.17 ± 0.14 mm (17), 5.0 ± 0 mm (59), 5.70 ± 0.38 mm (60) olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise Vitellüs kesesi çapı kontrol grubunda 4.79 ± 0.37 mm hesaplanırken IFN β -1a ve IFN β -1b gruplarında ise sırasıyla 4.08 ± 0.32 mm, 4.12 ± 0.32 mm olarak ölçüldü. Araştırmalarda kontrol grubuna ait 11,5 günlük sıçan embriyolarının baş-kıç uzunlukları 2.80 ± 0.11 mm (17), 5.4 ± 0.18 mm (59), 4.84 ± 0.63 mm (60), 3.0 ± 0.07 mm arasında değişen değerlerde hesaplanmıştır. Çalışmamızda ise kontrol grubuna, IFN β -1a ve IFN β -1b gruplarına ait embriyoların ortalama baş-kıç uzunlukları sırasıyla 3.78 ± 0.43 mm, 3.34 ± 0.10 mm, 3.29 ± 0.19 mm olarak ölçüldü. Yine yapılan bir başka çalışmada kontrol grubuna ait embriyoların baş uzunlukları 2.0 mm (61) olarak bildirilmiş, bizim çalışmamızda ise kontrol grubuna ait embriyoların baş uzunlukları 1.59 ± 0.10 mm olarak ölçüldü. Yapılan çalışmaların kontrol grupları arasında elde edilen sonuçların farklı oluşu çalışma ortamının farklılığından, çalışmayı ve skorlamayı yapan araştırmacıların farklılığından ve kullanılan sıçan türlerinin farklılığından kaynaklanabilir.

Amato ve ark. (58) gebelik sürecinde IFN β kullanan 88 MS'li hasta ile yaptıkları çalışmada IFN β kullanımının spontan düşük riskini artırmadığını ancak düşük bebek ağırlığı ve kısa boy uzunluğu ile ilgili olduğunu saptamışlardır. Boskovic ve ark. (57) ilaç kullanan gebe MS'li grup (N=16), ilaç kullanmayan gebe MS'li grup (N=12) ve sağlıklı gebe grubunu (N=18) dahil ettikleri çalışmada bebeklerin doğum ağırlıklarını sırasıyla 3.189 ± 486 kg, 3.498 ± 470 kg ve 3.783 ± 412 kg olarak rapor etmişlerdir. Gebeliğin ilk üç ayında IFN β kullanımının fetal kayıplara ve ilaç kullanmayan gebe

MS'li grup ve sağlıklı gebe grubu ile kıyaslandığında düşük doğum ağırlığına neden olduğunu göstermişlerdir.

Ancak Hellwig ve ark. (62), IFN β kullanan 78 MS'li gebe, glatiramer asetat kullanan 41 MS'li gebe ve hiçbir ilaç kullanmayan 216 gebe ile yaptıkları çalışmada ilaç kullananlarda konjenital anomalilerin normal oranda görüldüğünü, IFN β ve glatiramer asetatın major teratojenik risk oluşturmadığını belirtmişlerdir. Sandberg-Wollheim ve ark. (63) gebelikleri sürecinde en az 45 gün deri altına enjeksiyon yoluyla IFN β -1a tedavisi gören 425 MS'li hasta ile yaptıkları çalışmada 49 spontan düşük, 4 konjenital anomalisi olan çocuk ve 4 ölü doğum rapor etmişler; spontan düşük ve konjenital anomali görülme oranının normal sınırlar içerisinde olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise kontrol ve deney grupları arasında toplam morfolojik skor değeri ve somit sayıları açısından istatistiksel anlamlı bir farklılığın olmadığı belirlendi. Ancak vitellüs kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu ve baş uzunluğuna baktığımızda kontrol grubuna ait değerlerin deney gruplarına ait değerlerden daha yüksek olduğu ve aralarındaki sayısal farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi.

Toplam morfolojik skor ve somit sayılarında gruplar arasında farklılığın olmaması çalışmamızda kullanılan dozlarda IFN β -1a ve IFN β -1b'nin embriyolar üzerinde teratojenik etki göstermediğini ve bu sonucun Hellwig ve ark. (62) gebeler üzerinde yapmış olduğu ve IFN β 'nin gebeler üzerinde teratojenik risk oluşturmadığı sonucu ile paralellik göstermektedir. Çalışmamızda vitellüs kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu ve baş uzunluğuna ait verilerde gruplar arasında istatistiksel farklılığın görülmesi IFN β -1a ve IFN β -1b uygulanan embriyoların vücut boyutlarının daha düşük olduğunu göstermektedir. Elde etmiş olduğumuz bu sonuç, Amato ve ark. (58) gebe insanlarda yapmış olduğu ve IFN β kullanımı ile düşük bebek ağırlığı ve kısa boy uzunluğu arasında bulmuş olduğu ilişkiyi ve ayrıca Boskovic ve ark. (57) gebeliğin ilk üç ayında IFN β kullanımının sağlıklı gruba göre düşük doğum ağırlığına neden olduğunu belirttiği çalışmayı destekler niteliktedir.

MS tedavisinde kullanılan ilaçlardan olan IFN β -1a ve IFN β -1b hamilelik döneminde alınması durumunda gelişen embriyolar üzerindeki etkilerinin tam olarak bilinmemesi ve plasentadan embriyoya geçmesi durumunda muhtemel etkilerinin belirlenmesi amacıyla bu çalışma planlanmıştır. Ayrıca bir sinir sistemi hastalığı olan MS üzerindeki etkilerin yine sinir sistemi üzerinden ortaya koyacağı varsayımından yola çıkarak kültür ortamına IFN β -1a ve IFN β -1b ilave edilen embriyolarda toplam morfolojik skorlamanın yanında sinir sistemi gelişimini gösteren kaudal nöral tüp, arka beyin, orta beyin, ön beyin ve olfaktör sistem gibi parametreler ayrıca değerlendirilmiştir. Söz konusu parametrelerde deney gruplarına ait embriyoların gelişim düzeylerinin kontrol grubundaki embriyolara göre daha düşük olduğunun tespit edilmiş olması bu gelişim geriliğinin ileriki çalışmalarda dikkate alınması gerektiğini ve bu konu ile ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur.

Sonuç olarak kültür ortamına ilave edilen 1000 IU/ml IFN β -1a ve IFN β -1b'nin embriyoların gelişimi üzerinde makroskobik olarak teratojenik etki göstermediği ancak deney gruplarındaki embriyolarda vitellüs kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu ve baş uzunluğuna ait sayısal değerlerin düşük çıkması belirtilen dozlardaki IFN β -1a ve IFN β -1b'nin embriyolarda büyüme geriliğine neden olduğunu göstermektedir. Bu araştırmanın in vitro embriyo kültürü tekniği ile yapılan ilk çalışma olması nedeniyle, farklı dozlarda IFN β ile yapılacak olan yeni çalışmaların literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Kayaalp S. Oğuz, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt 1 Hacettepe-Taş, 2005:303-305
2. Isaacs A, Lindenmann J. Virus Interference: the Interferon. Proc R Soc Med 1957;147:258-267
3. Jacobs L, Malley JA, Freeman A, et al. Intratechal interferon reduces exacerbations of multiple sclerosis. Science 1982;214:1026-1028
4. Jacobs L, Johnson KP. A brief history of the use of interferons as treatment of multiple sclerosis. Arch Neurol 1994;51:1245-1252
5. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. Neurology 1995;7:1277-1285
6. Khan OA, Tselis AC, Kamholz JA, et al. A prospective, open-label treatment trial to compare the effect of IFN beta-1a (Avonex), IFNbeta-1b (Betaseron), and glatiramer acetate (Copaxone) on the relapse rate in relapsing-remitting multiple sclerosis. Eur J Neurol 2001;8:141-148
7. Sadiq SA, Miller JR, Demyelinating Disease. Rowland LP (edt.) Merritt's Textbook of Neurology. Philadelphia, Hong Kong, 1995:805-829
8. Tunalı G. Multipl Skleroz'da Tanı Kriterleri, Türkiye Klinikleri Nöroloji Dergisi 2004;2:205-209

9. Ferro S, Pretta S, Ragni N. Multiple Sclerosis: Management Issues During Pregnancy. *Eur J Obster Gynecol Reprod Biol* 2004;115:3-9
10. New DAT, Stein KF, Cultivation of Post-Implantation Mause and Rat Embriyos on Plasma Clots. *J Embryol Exp Morphol* 1964;12:101-111
11. Karabulut AK, 'In Vitro Embriyo Kùltürü ve Uygulama Alanları', XVIII. Gevher Nesibe Tıp Günleri III. Deneyisel ve Klinik Araştırma Kongresi ve 'Workshop'u, Kongre Kitabı, Kayseri 2000:16-24
12. Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, et al. Multiple Sclerosis And Other Demyelinating Diseases (16th Ed). *Harrison's Principles of Internal Medicine*. Mcgraw ñHill Company, New York, 2005:2461-2470
13. Jonhanson S, Ytterberg C, Gottberg K, Widen Holmqvist L, Von Koch L. Use of Healt Services in People With Multiple Sclerosis With and Without Fatigue, *Mult Scler* 2009;15:88-95
14. Wynia K, Middel B, Dijk van JP, et al. The Impact of Disabilities on Quality of life in People With Multiple Sclerosis, *Mult Scler* 2008;14:972-980
15. Mutlu ve ark. Multipl Skleroz Tanısında Tarihsel Gelişim ve Son Durum, *Nöropsikiyatri Arşivi* 2008;45:1-5
16. Yılmaz N.Ç. Multipl Skleroz ve Otoimmünite, Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune ve Araştırma Hastanesi II.Nöroloji Kliniği, İstanbul 2006:5-8
17. Meral M. Multipl Sklerozun Etyoloji ve Epidemiyolojisi: Derlemeler. *Erciyes Tıp Dergisi* 2002;24:40-47
18. Kabat EA, Glusman M, Kanaub V. Quantitative Estimation of the Albumin and Gamma Globulin in Normal and Pathologic Cerebrospinal Fluid by Immunochemical Methods, *Am J Med* 1948;4:653-662
19. Tüzün E. Multipl Skleroz Patogenezinde B Hücrelerinin Rolü ve B Hücre Karşıtı Monoklonal Antikor Tedavileri, *Noropsikiyatri Arşivi* 2011;48:73-78
20. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis, *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747

21. Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8 T Cells in Multiple Sclerosis, *Ann Neural* 2009;66:132-141
22. Oksenberg JR, Barcellos LF. The Complex Genetic Etiology of Multiple Sclerosis, *Neuro Virol* 2000;6:10-14
23. Lublin FD, Reingold SC. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 1996;46:907-911
24. Ingrid L, Heyman R. Multiple Sclerosis: Pathogenesis and Treatment, *Current Neuropharmacology*, 2011;9:409-416
25. Dahl J. Multiple Sclerosis and Pregnancy, Phd Thesis, University of Bergen, Bergen 2008:18-30
26. Tilman A. The effect of pregnancy on MS and its management. *Res Publ Ass Res Nerv Ment Dis* 1950;28:548
27. Poser S, Poser W. MS and gestation. *Neurol* 1983;33:1422-1429
28. Damek DM, Shuster EA. Pregnancy and multiple Sclerosis, *Mayo Clin Proc* 1997;72:977-989
29. Sadovnick AD, Boird PA. Reproductive counselling for MS patients. *Am J Med Genet* 1985;20:349-357
30. Confavreux C, Hutchinson M, Haurs MM, et al. Rate of Pregnancy Related Relapse in Multiple Sclerosis. *N Engl JJ Med* 1998;339:285-291
31. Saraç E, Önderoğlu L. Multiple Skleroz ve Gebelik, *Perinatoloji Dergisi* 1994;2:240-242
32. Vukusic S, Ionescu I, El-Etr M, et al. The Prevention of Postpartum Relapses with Progestin and Estradiol in Multiple Sclerosis. *J Neurol Sci* 2009;286:114-118
33. Koch M, Uyttenboogaart M, Heersema D, et al. Parity and Secondary Progression in Multiple Sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2009;80:676-678
34. Jalkanen A, Alanen A, Airas L. Finnish Multiple Sclerosis and Pregnancy Study Group. Pregnancy Outcome in Women with Multiple Sclerosis: Results From a Prospective Nationwide Study in Finland. *Mult Scler* 2010;16:950-955

35. Dorotta IR, Schubert A. Multiple sclerosis and Anesthetic Implications. *Curr Opin Anaesthesiol* 2002;15:365-370
36. Langer-Gould A, Huang SM, Gupta R, et al. Exclusive Breastfeeding and the Risk of postpartum Relapses in Women with Multiple Sclerosis. *Arch Neurol* 2009;66:958-963
37. Ferro S, Esposito F, Pretta S, Ragni N. Fetal Risks Related to the Treatment of Multiple Sclerosis During Pregnancy and Breastfeeding. *Expert Review of Neurotherapeutics* 2006;6:1823-1831
38. Boskovic R, Wide R, Wolpin J, Bauer J, Koren G. The Reproductive Effects of Beta Interferon Therapy in Pregnancy. *Neurology* 2005;65:807-811
39. Amato MP, Portaccio E, Ghezzi A et al. Pregnancy and fetal outcomes after interferon-beta exposure in multiple sclerosis. *Neurology* 2010;75:1794-1802
40. Soysal T, Önder E, Arı Z, Akkuş İ. İnterferon. *EAJM* 1981;13:133-136
41. Çaynak Z.C. Kutanöz Malin Melanom'da Yüksek Doz İnterferon Tedavisi, Uzmanlık Tezi, Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi 5. Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul 2006:31-37
42. Diaz MO, Bohlander S, Allen G. Nomenclature of the human interferon genes. *J Interferon Cytokine Res* 1996;16:179-180
43. Arda M. Temel Mikrobiyoloji (2. Baskı), Medisan Yayın Serisi:46, Ankara, 2000:423-424
44. Ustaçelebi Ş. Antiviral İlaçlar ve Etki Mekanizmaları, *ANKEM Derg* 1999;13:284-288
45. Eraksoy M. Dünden Bugüne Multipl Skleroz'da Hastalık Sürecini Kontrol Eden Tedaviler, *Nöropsikiyatri Arşivi* 2011;48:46-55
46. Tanrıöver M.D, Sözen T. İnterferon-alfa Tedavisi ve Otoimmünite, *Hacettepe Tıp Dergisi* 2007;38:39-44
47. Conway M, Chappel S. Biyokimya, Altıncı Baskıdan Çeviri, Çeviri Editörü: Altan N. Palme Yayıncılık, Ankara, 2000:516-517

48. Waddington CH, Waterman AJ. The Development in Vitro of Young Rabbit Embryos J Anat 1933;7:355-370
49. Nicholas JS, Rudnick D. Development of Rat Embryos of Egg-Cylinder to Head-Flod Stages in Plasma Cultures. J Exp Zool 1938;78:205-232
50. New DAT, Whole Embryo Culture and the Study of Mammalian Embryos During Organogenesis. Biol Rev 1978;53:81-125
51. Gregg NM. Congenital Cataract Following German Measles in Mothers. Trans Ophtalmol Soc Aust 1941;3:35-45
52. Moore KL, Persaud TVN. Human Birth Defects. The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. 2 nd ed. WB Saunders Company, USA, 1993;7:355-370
53. Hacıaloğulları M. Interleukin-12'nin Embriyonik Vitellüs Kesesi Damarlanması Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2005:5-9
54. Van Maele-Fabry G, Delhaise F, Picard JJ. Morphogenesis and Qualification of the Development of Post-implantation Mause Embryos in vitro. Toxicol 1990;4:149-156
55. Ulger H. The Growth Promoting Effects of bFGF, VEGF and PD-ECGF on Embriyonic Development and Yolk Sac Vascularisation, Phd Thesis, Department of Human Anatomy and Cell Biology University of Nottingham, England 1997:5-23
56. Ertekin T, Ulger H, Nisari M, et al. Effects of Angiostatin on in vitro Embryonic Rat Development. Kafkas Univ Vet Fak Derg 2011;17:843-847
57. Unur E, Ulger H, Ekinci N, et al. Effect of Anti-Basic Fibroblast Growth Factor (Anti-bFGF) on In Vitro Embryonic Development in Rat. Anat Histol Embryol 2009;38:241-245
58. Moore KL. The Developing Human. (4th Edition) W.B. Saunders Co. Harcourt Brace Jovanovich Inc. 1998:148-210

59. Tekinarslan İİ. Anti FGF-9'un In Vitro Embriyonik Gelişim Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2007:15-17
60. Torun YA, Ozdemir MA, Ulger H, et al. Erythropoietin improves brain development in short-term hypoxia in rat embryo cultures. Brain and Development 2014; 10.1016/j.braindev.2014.01.005. [baskıda]
61. Robinson JF, Verhoef A, van Beelen VA, et al. Dose-response analysis of phthalate effects on gene expression in rat whole embryo culture. Toxicology and Applied Pharmacology 2012;264:32-41
62. Hellwig K, Haghikia A, Rockhoff M, et al. Multiple sclerosis and pregnancy: experience from a nationwide database in Germany. Ther Adv Neurol Disord 2012;5:247-53
63. Sandberg-Wollheim M, Alteri E, Moraga MS, Kornmann G. Pregnancy outcomes in multiple sclerosis following subcutaneous interferon beta-1a therapy. Multiple Sclerosis Journal 2011;17:423-430

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

ETİK KURULUN ADI : Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

ETİK KURULUN ADRESİ : Erc.Üni. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

Tarih: 12.09.2012

Toplantı Sayısı: 09

Karar No: 12/101

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul

12.09.2012

tarihinde

Prof. Dr. Abdullah İNCİ

Başkanlığı'nda toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Unvanı	Bölümü	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	Katılmadı
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	İmza
Özlem Canöz	Prof. Dr	Tıp Fakültesi	İmza
Hatice Özbilge	Prof. Dr.	Ecz. Fakültesi	Katılmadı
Coşkun Tez	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	Katılmadı
Fusun F. Erdoğan	Doç. Dr	Tıp Fakültesi	Katılmadı
Serpil Sarıözkan	Doç. Dr.	DEKAM	SS Sarıözkan
M. Betül Aycan	Yrd. Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	İmza
Servet Kesim	Yrd. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	İmza
Ahmet Öztürk	Yrd. Doç. Dr	Tıp Fakültesi	İmza
Asiye Gökbelen	Yar. Sevenler Der. Baş.	Sivil top. kuruluşu temsilcisi	İmza
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	Katılmadı

Üniversitemiz Tıp Fakültesinden **Prof. Dr. Harun ÜLGER** tarafından sunulan "**Interferon Beta -1a ve Interferon Beta-1b'nin embriyonik gelişim üzerine etkileri**" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına **oy birliğiyle** karar verildi.

Tarih : 12.09.2012

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Abdullah İNCİ

İmzası :

İmza

ASLININ AYNIĞI

İmza
Prof. Dr. Harun ÜLGER
Erciyes Üniversitesi
Hayvan Deneyleri
Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: İlyas UÇAR

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 3 Eylül 1984, Kayseri

Medeni Durumu: Evli

Tel: 0544 203 67 11

Mail: fzt.iducar@hotmail.com

Yazışma Adresi: Yenidoğan Mahallesi, Ertuğrul Gazi Caddesi, Defne Sokak, Çamlıca Apartmanı, Kat:12, Daire:23 Talas/KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	EÜ, Anatomi Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	AİBÜ, KD Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	2007
Lise	Mustafa Özkan Anadolu Lisesi, Kayseri	2003

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2007-2008	Özel BİL-SE Özel Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezi	Fizyoterapist
2008-2009	Özel Kapadokya Hastanesi	Fizyoterapist
2009-2010	Kayseri Asker Hastanesi	Fizyoterapist
2010-2014	Acıbadem Kayseri Hastanesi	Fizyoterapist
2014-Halen	Karabük Üniversitesi, Salık Yüksekokulu	Araştırma Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce