

Effect of Glukagon-Like Peptide-1 Analog Liraglutide On Neural Tube Development In Chick Embryo Model

Hava AÇAR KAYA¹, Mehmet Aydın AKALAN^{1*}, İsmail TÜRKMENÖĞLU¹

¹Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Anatomy, 03200, Afyonkarahisar, Turkey

ABSTRACT

The aim of this study is to scan different doses of Liraglutid on the neural tube in a chick embryo model, which is similar to first month development in mammals. 100 eggs of 61 ± 5 gr, specific pathogen-free 0 day white fertilized chicken eggs were used. Incubation of 28 hours was maintained at a constant temperature of $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$, humidity in the range of 60 – 68%. They were divided into 4 groups of 25 eggs each. Liraglutid was administered subblastodermically with a Hamilton micro-injector in 3 different doses. The control group was injected with 0.9% sterile saline, and the experimental groups were injected with liraglutide at doses of 1.5, 7.5 and 15 $\mu\text{g}/\text{egg}$. After the injection, the windows were closed with sterile drape and left for incubation. At the end of 48 hours of incubation, all eggs were hatched and evaluated on the basis of Hamburger-Hamilton scale. In the study, neural tube patency, somite numbers, and Hamburger-Hamilton stages were examined, it was determined that the dose-related difference between the control and experimental groups was not statistically significant ($p>0.05$). It was determined that the difference between the high dose group and the other groups in terms of fore-aft lengths was statistically significant ($P<0.05$). As a result, there was no significant relationship between the doses of Liraglutide and neural tube patency and somite counts, but differences were found between fore-aft measurements. Further research is recommended for a clearer understanding of the effects of liraglutide on embryo development.

Keywords: chick embryo model, incretins, liraglutide, neural tube, obesity.

Glukagon Benzeri Peptid-1 Analöğü Liraglutid'in Tavuk Embriyo Modelinde Nöral Tüp Gelişimi Üzerine Etkisi

ÖZ

Bu çalışmada tip 2 diyabet ve obezite tedavisinde kullanılan inkretin bazlı glukagon benzeri peptid-1 (GLP-1) reseptör agonistlerinden liraglutid'in tavuk embriyo modelinde nöral tüp üzerine etkilerinin incelenmesi amaçlandı. Çalışmada 100 adet 61 ± 5 gr ağırlıkta, spesifik patojen içermeyen fertil yumurta $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 'de ve % 60 - 68 nem ortamında 28 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda pencereleme tekniği ile açılan yumurtalar 4 gruba ($n=25$) ayrılarak subblastodermik olarak uygulama yapıldı. Kontrol grubuna % 0.9 steril serum fizyolojik, deney gruplarına ise 1.5, 7.5 ve 15 $\mu\text{g}/\text{yumurta}$ dozda liraglutid enjekte edildi. Enjeksiyon sonrası pencereler steril drape ile kapatılarak inkübasyona bırakıldı. 48 saat inkübasyon sonunda tüm yumurtalar açılıp Hamburger-Hamilton skalası temel alınarak değerlendirildi. Çalışmada nöral tüp açıklığı, somit sayıları, Hamburger Hamilton skalasına göre gelişim evreleri incelendiğinde kontrol grubu ile deney grupları arasındaki doza bağlı farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Baş-kıç uzunlukları bakımından yüksek doz grubu ile diğer gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($P<0.05$). Sonuç olarak Liraglutid'in dozları ile nöral tüp açıklığı ve somit sayıları arasında anlamlı bir ilişki saptanmazken baş-kıç ölçümleri arasında farklılıklar saptandı. Liraglutid'in embriyo gelişimi üzerine etkilerinin daha net anlaşılması için ileri araştırmalar önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: tavuk embriyo modeli, inkretinler, liraglutid, nöral tüp, obezite.

To cite this article: Açar Kaya H, Akalan M.A, Türkmenoğlu İ. Effect of Glukagon-Like Peptide-1 Analog Liraglutide On Neural Tube Development In Chick Embryo Model. Kocatepe Vet J. (2022) 15(3):269-274

Submission: 15.04.2022 Accepted: 07.07.2022 Published Online: 19.08.2022

ORCID ID: HAK: 0000-0002-7572-7525, MAA: 0000-0001-9924-2920, İT: 0000-0002-0775-2622

*Corresponding author e-mail: makalan@aku.edu.tr

GİRİŞ

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

Dünya'da canlı doğumlarda bebeklerin yaklaşık olarak % 2'sinde ciddi doğumsal anomaliler saptanmaktadır. Anomalilerin de yaklaşık olarak % 60'ını santral sinir sistemi anomalileri oluşturmaktadır (Baker, 1994). NTD yenidoğan döneminde en sık rastlanan doğumsal anomalilerden birisidir (Robert, 2000). Nöral tüp erken dönemde kapanmaz ise anensefali, ensefalosel, spina bifida okült, meningomyelose, meningosel, miyelosizis, sirengomiyeli, dermal sinüs ve gergin spinal kord gelişmektedir (Rowland ve ark., 2006).

NTD coğrafi açıdan farklı yayılımlar gösterir. Avrupa ülkelerinde % 0.1 sıklıkta görülürken Türkiye'de bu oran, çeşitli çalışmalardan elde edilen verilere göre %0.3 - 0.5 arasında değişmektedir. Ülkemizde her yıl yaklaşık 5000 çocuk NTD ile doğmaktadır (Tunçbilek ve ark., 1999). İngiltere'nin kuzey ve batı bölgelerinde yüksek insidans (% 0,8) görülürken, güney ve doğusunda düşük insidans (% 0,2 - % 0,3) görülmektedir (Milunsky, 1986). Amerika ve Kanada'da insidans oldukça düşüktür (% 0,1). Bölgesel faktörlerin yanında siyah ırkta beyaz ırka göre daha az, kız bebeklerde ise erkek bebeklere göre daha sık NTD'ye rastlandığı da bildirilmiştir (Brocklehurst, 1976). NTD oluşmasında yetersiz beslenme, yüksek ateş, hipertansiyon, diabetes mellitus, obezite, kullanılan ilaçlar, çevresel kirleticiler, geçmişte NTD öyküsü olması, annenin 20 yaşından küçük 35 yaşından büyük olması, primipar olma, dört ve daha fazla çocuk doğurma, düşük sosyoekonomik düzeye sahip olma ve folik asit eksikliği gibi birçok faktör rol oynamaktadır (Daly ve ark., 1997; Akan, 2002; Yıldız ve Akbayrak, 2008). Gebelikte bazen zorunlu olarak kullanılması gereken ilaçlar bu tip konjenital malformasyonlara neden olmakta fakat özellikle günümüzde yeni geliştirilen ilaçların gebelik kategorisi ve ne tür malformasyonlara neden olabileceği yapılan çalışmaların azlığı nedeniyle tam olarak bilinmemektedir (Tureci ve ark., 2011; Song ve ark., 2012).

Liraglutid; kandaki glukoz seviyesini düşüren metabolik hormonlar ailesinin bir üyesi olan

Glukagon Benzeri Peptit-1 analogu olarak tanımlanmaktadır (Baggio ve Drucker, 2007). Gıdanın alınımından sonra insülin salınımını stimüle ederken glukagon salınımını inhibe eder (Özaçmak ve Bayraktaroğlu, 2017). Deri altı uygulandığında normoglisemik bireylerde kan glukoz düzeylerini etkilediğinden tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmaktadır (Lovshin ve Drucker, 2009; Vella ve ark., 2002). Liraglutid'in antidiyabetik etkisinin yanında antioksidatif ve antiapoptotik etkilerinin varlığı da rapor edilmiştir (Inoue ve ark., 2015; Briyal ve ark., 2014).

Böbrek (Zavattaro ve ark., 2015), kalp (Inoue ve ark., 2015), mide (Jelssing ve ark., 2012), bağırsak (Candeias ve ark., 2015), beyin (Briyal ve ark., 2014), pankreas (Kimura ve ark., 2015), ovaryum (Rasmussen ve ark., 2014), karaciğer (Gao ve ark., 2015) ve adipoz doku (Cantini ve ark., 2015) gibi çeşitli organlarda da çalışılan liraglutid'in, nöral tüp gelişimi üzerine etkisini gösteren spesifik tavuk embriyo çalışmasına rastlanmamıştır. Bu çalışmada liraglutid'in tavuk embriyolarında nöral tüp (orta hat) kapanmasına olan etkilerini makroskobik, mikroskobik ve histolojik olarak inceleyerek ortaya koymayı amaçladık.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışma için Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (AKÜ HADYEK) 24/02/2020 tarih ve 49533702/216 sayılı kararı ile etik kurul izni alındı. Çalışmanın deney aşaması Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda makroskobik ve mikroskobik incelemeleri ise Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Çalışmada ağırlıkları 61 ± 5 gr arasında; 100 adet, beyaz, fertil ve 0 günlük SPF (specific patogen free) tavuk yumurtaları kullanıldı. Yumurtalar Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Laboratuvarındaki, standardizasyonu yapılmış otomatik inkübatörde $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ sabit ortam sıcaklığı ve $\%60 \pm 5$ bağıl nem oranında, her 2 saatte bir 45° açıyla otomatik olarak döndürülerek inkübe edildi. Liraglutide (Saxenda 6 mg/3 ml pre-filled-pen, novo nordisk), suda steril şartlarda çözülerek uygun solüsyonlar hazırlandı (Tablo 1).

Tablo 1. Deney grupları ve uygulanan ilaçların dozları

Gruplar	Kullanılan Etken Madde ve Dozları
Kontrol (n=25)	% 0.9 Serum Fizyolojik
Düşük Doz (n=25)	Liraglutid 30 mg/kg (1.5 µg/yumurta)
Orta Doz (n=25)	Liraglutid150 mg/kg (7.5 µg/yumurta)
Yüksek Doz (n=25)	Liraglutid 300 mg/kg (15 µg/yumurta)

Çalışmanın 24 ile 28. saatleri arasında döllu yumurtalara steril şartlar altında pencereler açılarak Hamilton mikroenjektörüyle yaklaşık 45° açı ile tüm gruplara 30 mikrolitre subblastodermik enjeksiyon yapıldı. Kontrol grubuna ise % 0.9 steril serum fizyolojik uygulandı. (Resim 3.4). Enjeksiyon sonrası tüm yumurtalardaki delikler steril drape ile kapatıldı ve kapatılan yumurta 180° çevrilerek kuluçka makinesine tekrar yerleştirildi. İnkübasyonun 44-48. saatinde SPF yumurtalar açıldı, elde edilen embriyoların gelişim evreleri Hamburger-Hamilton skalasına göre ışık mikroskobu altında değerlendirildi. Daha sonra nöral tüpün açık veya kapalı olması, somit sayıları, kranio-kaudal uzunlukları ve embriyolojik gelişim durumları belirlendi.

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 20 (Statistical Package for the Social Sciences) programı kullanılarak yapıldı. Ortalama değerleri arasındaki farklılıkların analizinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA), gruplar arası farkın önemlilik kontrolü için ise "Duncan" testi uygulandı. P<0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmada düşük, orta ve yüksek olmak üzere farklı dozlarda liraglutid ile % 0.9 serum fizyolojik uygulanan toplam dört temel grup bulunmaktaydı.

İncelenen tüm parametrelerin gruplara göre dağılımı gösteren çizelge Şekil 1'de gösterilmiştir. Kontrol grubunda 21 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%84), 1 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%4), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 2 embriyoda diskin oluşmadığı (%8) ve açma hatası olmadığı (%0) gözlemlendi (Tablo 2).

Düşük doz (1,5 µg/yumurta) grubunda 20 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%80), 1 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%4), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı (%4) ve 2 embriyoda ise açma hatası olduğu (%8) görüldü (Tablo 2).

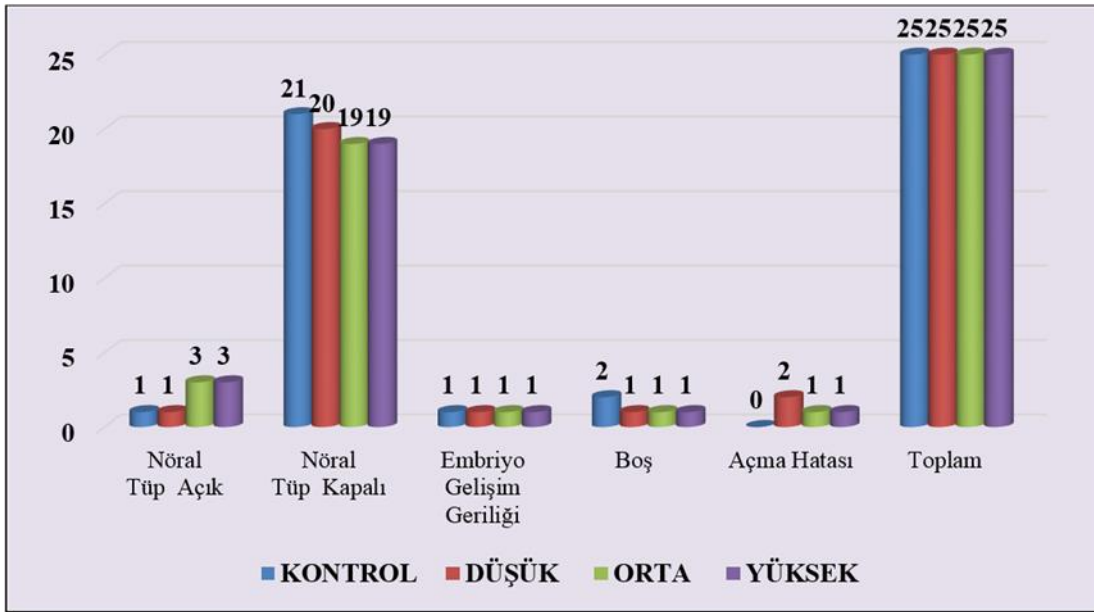
Orta doz (7,5 µg/yumurta) grubunda 19 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%76), 3 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%12), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı (%4) ve 1 embriyoda ise açma hatası olduğu (%4) görüldü (Tablo 2).

Yüksek doz (15 µg/yumurta başı) grubunda ise 19 embriyoda nöral tüpün kapalı olduğu (%76), 3 embriyoda nöral tüpün açık olduğu (%12), 1 embriyoda gelişim geriliği olduğu (%4), 1 embriyoda diskin oluşmadığı (%4) ve 1 embriyoda ise açma hatası olduğu (%4) görüldü (Tablo 2).

Tüm gruplarda embriyoların Hamburger Hamilton skalasına göre 11-12 evre aralığında olduğu saptandı.

Tablo 2. Gruplara göre embriyo gelişim geriliği ve nöral tüp açıklığı

Gruplar	Embriyo Gelişim Geriliği	NT Açık	NT Kapalı
Kontrol	1 (% 4)	1 (% 4)	21 (% 84)
Düşük Doz	1 (% 4)	1 (% 4)	20 (% 80)
Orta Doz	1 (% 4)	3 (% 12)	19 (% 76)
Yüksek Doz	1 (% 4)	3 (% 12)	19 (% 76)



Şekil 1: İncelenen tüm parametrelerin gruplar arasında dağılımı

Tablo 3 incelendiğinde somit sayısı bakımından kontrol grubu ile deney grupları arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ($p>0.05$). Aynı tabloya göre baş-kıç uzunlukları ortalaması kontrol grubu ($670.50 \mu\text{m}$) ile düşük doz ($660.37 \mu\text{m}$) ve orta doz ($660.20 \mu\text{m}$) gruplarında

benzer iken yüksek doz grubunda $631.62 \mu\text{m}$ 'ye düştüğü ve yüksek doz grubu ile diğer gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($P<0.05$).

Tablo 3. Gruplara göre somit sayısı ve baş-kıç ölçümlerinin dağılımı

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

TARTIŞMA ve SONUÇ

Merkezi sinir sistemi embriyolojik hayatta ilk fonksiyon göstermeye başlayan yapılardan biridir. NTD oluşumu multifaktöriyel olup, birçok genetik ve çevresel faktör rol alır. Oluşma ya da tekrarlama riski yalnızca anensefali, egzensefali, ensefalosel ve açık spina bifida gibi major anomalilerde gösterilmiştir. Bununla birlikte toplumdaki genel insidans, ailede daha önce NTD tanısı sayısına, hastaların yakınlık durumuna da bağlıdır. NTD, oluşmakta olan sinir dokusunun tüm ya da parçalı olarak kapanamaması nedeniyle ortaya çıkmaktadır. NTD modeli oluşturma yöntemleri arasında; memeli, kanatlı, amfibiler ve bilgisayar modellemeleri oluşturma seçenekleri sayılabilir. Bu örneklerin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları söz konusudur. Memeli modellemeleri olan rat ve fareler daha karmaşık ve uzun süreli çalışma gerektirirken, kanatlı ve amfibilerdeki modellemeler ise daha kolay ve pratik yöntemlerdir. Erken dönem tavuk embriyosu modellemesi (ilk 48

saat) memelilerde embriyonel gelişimin ilk ayına uyan ve kimyasalların embriyonel gelişim üzerine etkilerinin incelendiği uygun bir modelleme örneğidir (Tureci ve ark., 2011).

Yapılan çalışmalarda ortalama 8-10 yumurta kullanılırken deneyimizde 25 yumurta kullanılmıştır. Kanatlı yumurtalarının kullanıldığı çalışmalarda test maddesinin uygun çözücüde çözünmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle en uygun steril bidistile su çözücü olarak kullanılmıştır. Literatür taramalarında da görüldüğü gibi deneyde önceki deneyler ile paralellik göstermektedir.

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

2017; Mete ve ark., 2016). Tavuk embriyosunun özellikle ilk 48 saatlik gelişimi memeli omurgasının embriyonik gelişiminin ilk ayına benzer. Bu nedenle NTD'ye neden olabileceği düşünülen maddeler için tavuk embriyolarının kullanımı oldukça uygundur (Atay ve ark., 2020; Emon ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda teratojenik maddelerin nöral tüpün açık veya kapalılık durumlarına etkileri incelenmiştir (Yıldız ve Akbayrak, 2008; Song ve ark., 2012).

Erken tavuk embriyo modelinde sitokalazimler, ionofor, papaverin, diazepam, verapamil, lokal anestetikler, etanol, metotreksat ve aminopterin gibi folat antagonistleri, fenitoin ve valproik asit gibi antiepileptikler, meloksikam benzeri non steroid al antiinflamatuar ilaç etken maddesine sahip ağrı kesicilerin NTD'ye sebep olduğu rapor edilmiştir (Özer ve ark., 2012). Cetinkal (2010) çalışmasında yüksek doz meloksikamın erken tavuk embriyo modelinde NTD'yi arttırdığını saptamıştır. Vatansver ve ark. (2003) metotreksatın 48-72 saatlik inkübasyondan sonra embriyolarda nöral tüpün kapanmasında kusurlara neden olduğunu bildirmiştir. Lee ve ark. (1982) erken dönem tavuk embriyolarında 500 µg/ml kafein maddesinin NTD gelişme sıklığını belirgin şekilde arttırdığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda liraglutid'in tavuk embriyolarında nöral tüp açıklık / kapalılık durumuna etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Whitsel ve ark. (2002), epilepsi tedavisinde kullanılan valproik asitin teratojenik etkilerini incelemek için embriyoya 24. saatinde blastositin altına farklı dozlarda enjeksiyonunu yapmış, makroskobik olarak büyümede gerileme, göz dokusu ve iskelet sisteminde ait anomaliler tespit etmişlerdir. Ertekin ve ark. (2019) çalışmalarında non steroid antiinflamatuar bir ilaç olan diklofenak sodyumun, tavuk embriyosunda NTD'ye neden olmasının yanında baş-kıç uzunluğu ve somit sayısını önemli ölçüde azalttığını ve nöron gelişimini etkilediğini göstermişlerdir. Bu çalışmada sadece yüksek doz liraglutid'in baş-kıç uzunluğunu düşürdüğü ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu (P<0.05) belirlenmiştir. Bu bulgu Liraglutid'in yüksek dozunun embriyoda gelişim geriliğine neden olabileceğini düşündürmüştür.

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

Proje Destek Bilgileri : Bu çalışma, Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 20.SAĞ.BİL.33 proje numarası ile desteklenmiştir.

Etik Kurul Bilgileri : Bu çalışma AKU HADYEK 49533702/216 numara ve 24.02.2020 tarih ile izin almıştır.

Çıkar Çatışması: Yazarlar bu yazı için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan etmişlerdir.

Yazarların Katkı Oranı: Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan etmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Akan N.** Nöral tüp defektli bebek doğurma riski azaltılabilir. CÜ Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi. 2002; 6:42-48.
- Akosman, M.S.** Kanatlı Anatomisi. Medipres Yayıncılık, Malatya, Turkey. 2020; pp. 64-67.
- Atay E, Ayekin S, Hatipoğlu RZ, Kural MC, Kuseyri M, Taçyıldız Y, Başoğlu Y, Alkan AB, Bilir A, Ertekin T.** The effect of temperature on angiogenesis in chicken embryos. Kocatepe Vet J. 2020; 13(1): 60-68.
- Baggio LL, Drucker DJ.** Biology of incretins: GLP-1 and GIP. Gastroenterology, 2007; 132(6): 2131-2157.
- Baker S.** Neural tube defects, Greenberg MS, Handbook of Neurosurgery 3rd ed., Florida, Greenberg, 1994; pp. 157-168.
- Briyal S, Shah S, Gulati A.** Neuroprotective and anti-apoptotic effects of Liraglutid in the rat brain following focal cerebral ischemia, Neuroscience. 2014; 281: 269-281.
- Brocklehurst G.** Spina bifida for the clinician (Clinics in Developmental Medicine, No. 57). Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, USA. 1976.
- Candeias EM, Sebastião IC, Cardoso SM, Correia SC, Carvalho CI, Plácido AI, Santos MS, Oliveira CR, Moreira PI, Duarte AI.** Gut-brain connection: The neuroprotective effects of the anti-diabetic drug Liraglutid, World J Diabetes. 2015; 6(6): 807-827.
- Cantini G, Di Franco A, Samavat J, Forti G, Mannucci E, Luconi M.** Effect of liraglutid on proliferation and differentiation of human adipose stem cells. Mol Cell Endocrinol. 2015; 402: 43-50.
- Cetinkal A, Colak A, Topuz K, Demircan MN, Simsek H, Berber U, Umur AS, Selcuki M, Vatansver S.** The effects of meloxicam on neural tube development in the early stage of chick embryos, Turkish Neurosurgery, 2010; 20(2): 111-116.
- Dady A, Duband JL.** Cadherin interplay during neural crest segregation from the non-neural ectoderm and neural tube in the early chick embryo. Dev Dyn. 2017; 246(7): 550-565.

- Daly S, Mills, J.L., Molloy, A.M., Conley, M., Lee, Y.J., Kirke, P.N.** Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. *The Lancet*. 1997; 350: 1666-1669.
- Emon ST, Orakdogan M, Uslu S, Somay H.** Effects of the popular food additive sodium benzoate on neural tube development in chicken embryo. *Turk Neurosurg*. 2015; 25(2): 294-297.
- Ertekin, T., Bilir, A., Aslan, E., Koca, B., Turamanlar, O., Ertekin, A., & Albay, S.** The effect of diclofenac sodium on neural tube development in the early stage of chick embryos. *Folia morphol*. 2019; 78(2): 307-313.
- Gao H, Zeng Z, Zhang H, Zhou X, Guan L, Deng W, Xu L.** The glucagon like peptide-1 analogue liraglutid inhibits oxidative stress and inflammatory response in the liver of rats with diet-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Biol Pharm Bull*. 2015; 38(5): 694-702.
- Inoue T, Inoguchi T, Sonoda N, Hendaro H, Makimura H, Sasaki S, Yokomizo H, Fujimura Y, Miura D, Takayanagi R.** GLP-1 analog Liraglutid protects against cardiac steatosis, oxidative stress and apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats, *Atherosclerosis*. 2015; 240(1): 250-259.
- Jelsing J, Vrang N, Hansen G, Raun K, Tang-Christensen M, Knudsen LB.** Liraglutid: short-lived effect on gastric emptying—long lasting effects on body weight. *Diabetes Obes Metab*. 2012; 14(6): 531–538.
- Kimura T, Kaneto H, Shimoda M, Hirukawa H, Okauchi S, Kohara K, Hamamoto S, Tawaramoto K, Hashiramoto M, Kaku K.** Protective effects of pioglitazone and/or Liraglutid on pancreatic β -cells in db/db mice: Comparison of their effects between in an early and advanced stage of diabetes. *Mol Cell Endocrinol*. 2015; 400: 78–89.
- Kürtül İ.** Veteriner Anatomi. İçinde: Sinir Sistemi. Eds: Türkmenoğlu, İ., Demirkan, Ç.A., Özdemir, V., Akosman, M.S. Medipres Yayıncılık, Malatya, Turkey. 2018; pp. 495-498.
- Lee H, Nagele RG, Pietrolungo JF.** Toxic and teratologic effects of caffeine on explanted early chick embryos. *Teratology*. 1982; 25(1): 19-25.
- Lovshin JA, Drucker DJ.** Incretin-based therapies for type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol*. 2009; 5: 262–269.
- Mete M, Gurcu B, Collu F, Unlu Unsal U, Duransoy YK, Tuglu MI, Selcuki M.** Effects of lacosamide “a novel antiepileptic drug” in the early stages of chicken embryo development. *Childs Nerv Syst*, 2016; 32(9): 1715-1719.
- Milunsky A.** The prenatal diagnosis of neural tube and other congenital defects. In *Genetic disorders and the fetus*. Springer, Boston, USA. 1986; pp. 453-519.
- Özaçmak HS, Bayraktaroğlu T.** Glukagon Benzeri Peptid-1’in Sinir Sistemi ve İştah Kontrolü Üzerine Etkileri. *Turkish J Diabetes Obesity*, 2017; 1(1): 1-6.
- Özer F, Demirel A, Dilsiz Ö, Aydın M, Özdemir N, Uyanıkgil Y, Baka M.** Effects of Levetiracetam on neural tube development and closure of the chick embryos in ovo. *Childs Nerv Syst*. 2012; 28: 969–976.
- Rasmussen CB, Lindenberg S.** The effect of Liraglutid on weight loss in women with polycystic ovary syndrome: an observational study. *Front Endocrinol*. 2014; 5:140.
- Robert HA.** Congenital anomalies of the central nervous system. Eds: Behrman, R.M., Arvin, A.M., Nelson Textbook of Pediatrics 16th ed., Philadelphia, USA. 2000; pp. 1803-1813.
- Rowland CA, Correa A, Cragan JD, Alverson CJ.** Are encephalocoles neural tube defects, *Pediatrics*. 2006; 118: 916–923.
- Song G, Cui Y, Ji-Han Z, Fei-Xia H, Ma X.** Effects of choline on sodium arsenite-induced neural tube defects in chick embryos, *Food Chem Toxicol*. 2012; 50(12): 4364-4374.
- Tunçbilek E, Boduroğlu K, Alikışıoğlu M.** Neural tube defects in Turkey: prevalence, distribution and risk factors. *Turkish J Pediatrics*. 1999; 41(3): 299-305.
- Tureci E, Asan Z, Eser M, Tanriverdi T, Alkan F, Erdinçler P.** The effects of valproic acid and levetiracetam on chicken embryos. *J Clin Neurosci*. 2011; 18(6): 816-820.
- Vatansever HS, Umur AŞ, Inan VS, Selçuki M.** The Effects of Methotrexate on the Development of Neural Tube Defects in the Chick Embryo. *Turkish J Vet Anim Sci*. 2003; 27(5): 1119-1125.
- Vella A, Shah P, Reed A, Adkins A, Basu R, Rizza R.** Lack of effect of exendin-4 and glucagon-like peptide-1-(7, 36)-amide on insulin action in non-diabetic humans. *Diabetologia*. 2002; 45(10): 1410-1415.
- Wang R, Sun DG, Song G, Guan CY, Cui Y, Ma X, Xia HF.** Choline, not folate, can attenuate the teratogenic effects of dibutylphthalate (DBP) during early chick embryo development. *Environ Sci Pollut Res*. 2019; 26(29): 29763-29779.
- Whitsel AI, Johnson CB, Forehand CJ.** An in ovo chicken model to study the systemic and localized teratogenic effects of valproic acid. *Teratology*. 2002; 66(4): 153-163.
- Yerby MS.** Clinical care of pregnant women with epilepsy: neural tube defects and folic acid supplementation. *Epilepsia*. 2003; 44(3): 33-40.
- Yıldız D, Akbayrak N.** Nöral tüp defektleri ve önlemede hemşirelik yaklaşımları, Atatürk Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu Dergisi, 2008; 11: 102–111.
- Zavattaro M, Caputo M, Sama MT, Mele C, Chasseur L, Marzullo P, Pagano L, Mauri MG, Ponziani MC, Aimaretti G, Prodam F.** One-year treatment with Liraglutid improved renal function in patients with type 2 diabetes: a pilot prospective study. *Endocrine*. 2015; 50(3): 620-626.