

# In vitro rat embriyo kültürü ve uygulama alanları

Ahmet Kağan KARABULUT

S.Ü.T.F. Anatomi Anabilim Dalı, KONYA

## In vitro kültür sistemlerinin önemi

Geride bıraktığımız asrın bilhassa son 20-30 yılı iletişim ve uzay teknolojisi başta olmak üzere teknolojinin her alanında baş döndürücü hızdaki gelişmelere tanıklık ederken, tıp alanında da gerek klinik gerekse klinik öncesi branşlarda yapılan araştırmalar, mevcut bilgi birikimini her geçen yıl neredeyse iki katına çıkaracak bir hızda ilerledi.

Gelişen teknoloji insanların hayatını kolaylaştırırken, bu teknoloji üretilirken ortaya çıkan yan ürünler, biyolojik ve kimyasal atıklar, zehirli gazlar ve diğer zararlı çevresel etkenler insan sağlığını olumsuz yönde etkileyen yeni ekolojik şartları da beraberinde getirdi. Bu olumsuzluklar sadece o ortamda yaşayan bireylerin sağlığını tehdit etmekle kalmayıp aynı zamanda anne karnında gelişmekte olan embriyo veya fötüs üzerinde de istenmeyen etkiler yaparak ölümüne, hasta veya sakat doğmasına sebep olmaktadır.

Konjenital malformasyonlar olarak adlandırılan bu sakatlıklar geçen yüzyılın başlarında çoğunlukla genetik sebeplere bağlanıyordu. Embriyonik ve fetal zarlar (amnion ve koryon), anne karın duvarı ve uterusun embriyoyu dışarıdan gelecek zararlara karşı koruyan geçilmez bir bariyer oldukları inancı yaygındı. 1941'de Gregg'in rubella virüsünün insan embriyosu gelişiminin kritik döneminde konjenital malformasyonlara sebep olabileceğini göstermesi (1) ve bunu takiben diğer çevresel etkenler ve farmakolojik ajanların (Thalidomit vb) (2) doğumsal defektlere yol açabileceğinin gösterilmesi "Teratoloji Bilimi" nin doğmasına yol açtı. Teratoloji bilimi kısaca, doğum öncesi gelişmeye etki eden konjenital malformasyonların sebeplerinin ortaya çıkarılması olarak

tanımlanabilir. Teratojenler de konjenital malformasyonların oluşmasını sağlayan veya oluşma olasılığını artıran ajanlar olarak tarif edilebilir.

Daha önceki çalışmalar insan anomalilerinin % 7-10'unun çevresel faktörlere (ilaçlar, iyonize radyasyon, bazı endüstriyel kimyasallar ve toksik ajanlar vb) bağlı olduğunu göstermiştir (3). Aynı zamanda toxoplazma gondii, rubella virüsü ve sitomegalovirüs gibi bazı enfeksiyon ajanlarının da malformasyonlara sebep olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu tip teratojen ajanların veya potansiyel teratojenlerin etkilerinin insan gebeliği esnasında ve insan embriyosu üzerinde çalışılması etik açıdan kabul edilemez olduğu için, hayvan modellerinin farmakolojik maddeler ve diğer ajanların embriyo üzerindeki toksik etkilerinin araştırılmasında kullanılması çok önemli hale gelmiştir.

Embriyonik gelişmenin en kritik dönemi, teratojenlerin büyük olasılıkla malformasyona yol açtıkları dönem olan ana organ taslaklarının geliştiği dönemdir (insanda 15-60., ratlarda 9.5-11.5. günler arası). Daha erken dönemlerde bir teratojene maruz kalmak gebeliğin sonlanmasına sebep olurken, daha geç dönemlerde ana organ sistemleri şekillenmiş olduğu için teratojenlere maruz kalma; ya fizyolojik anomalilere veya organlarda fonksiyon bozukluğuna sebep olacaktır. İlaçların ve potansiyel teratojenlerin etkilerinin daha önceden saptanabilmesi ve doğumsal malformasyonların etiolojisinin aydınlatılabilmesi amacı ile uzun yıllar deneysel hayvan çalışmaları önem kazanmış ve bu amaçla in vivo (canlıda) ve in vitro (organizma dışında) çalışmalar eş zamanlı olarak yürütülmüştür.

Memeli gelişimi sürecinde bütün ana organ sistemleri embriyonun uterus duvarına imp-

Haberleşme Adresi: Yrd.Doç.Dr. Ahmet Kağan KARABULUT, S.Ü.T.F. Anatomi Anabilim Dalı, 42080 - KONYA

Geliş Tarihi : 17.07.2000

Yayına Kabul Tarihi : 16.11.2000



lantasyonundan sonra şekillenmeye başladığından dolayı embriyo üzerinde bu aşamada yapılabilecek in vivo çalışmalar oldukça sınırlı olmaktadır. Çünkü bu dönemde embriyo endometriyum içine implante olduğu için net olarak izlenememekte, amnioskopi, radyolojik metotlar ve ultrasonografi ile incelemek için çok küçük olmaktadır.

Diğer taraftan in vitro embriyo kültürü, erken dönem memeli embriyosu gelişiminin anneye ait faktörlerin çeşitliliğinin etkilerinden uzaklaştırılmış olarak incelenmesine, bilhassa ajanların direkt etkilerinin maternal sistem tarafından değiştirilenlerle ayırt edilerek çalışılabilmesine olanak vermektedir. Ayrıca in vitro embriyo kültürü araştırmacıya, organ gelişimi sürecindeki embriyonun büyümesi esnasındaki değişikliklerin sürekli gözlemlenebilmesine ve kültür ortamına ilave edilen potansiyel teratojenlerin ve bazı farmakolojik ajanların bu dönemde embriyonik büyüme ve gelişme üzerine etkilerinin eş zamanlı takibine olanak vermesi açısından da önemlidir. Buna ilave olarak, normal embriyonik büyüme ve gelişmeyi etkileyen hormonlar ve büyüme faktörleri ile bunlar arasındaki ilişkilerin moleküler ve reseptör etkileşimi düzeyinde incelenmesine olanak veren bu sistem ile normal büyümenin mekanizmasının da araştırılması sağlanabilmekte ve bu sayede anormal gelişmenin etiolojisinin anlaşılabilmesinde kolaylık sağlayacak veriler elde edilebilmektedir.

### **İn vitro kültür sistemlerinin tarihçesi**

İmplantasyon sonrası embriyo kültürü denemeleri 1930'larda başlamasına rağmen 1960 yılındaki talidomit faciasına kadar yaygın hale gelmemişti. İlk denemelerde Waddington ve Waterman (4) tavşan embriyolarını plazma pıhtısı üzerinde 6-9 somit aşamasına kadar büyütmüşler, bunu Nicholas ve Rudnick'in heparinize edilmiş rat plazmasında rat embriyolarını kültür etmeleri izlemiştir (5, 6). 1960'lara kadar kayda değer bir gelişme olmamış, 1964'te New ve Stein (7), 9-10 günlük rat embriyolarını plazma pıhtısında kültüre edip iyi bir embriyonik gelişme gözlemlenmeleri bu alandaki çalışmalara hız kazandırmıştır. 1966'da New (8), rat embriyolarının rat serumunda plazma pıhtısında olduğu kadar iyi büyüebildiğini göstermiş ve bunu takiben New ve arkadaşları Cambridge'de bu tekniği geliştirmişlerdir.

Diğer bir çok araştırmacının da benimsediği ve çalışmalarında kullandığı rat embriyosu kültürü tekniği (9), embriyoların in vitro ortamda uterus içinde olduğu kadar çabuk büyümesini sağlamaktadır (10).

Günümüzde bu teknik klinik, toksikolojik ve teratojenik araştırmalarda, embriyo gelişimini etkileyen hormonlar ile büyüme faktörlerinin etkilerinin ve etki mekanizmalarının incelenmesinde ve embriyo metabolizması ile ilgili araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Sadece bu konuya özel olarak 1997'de İsrail'de "Vertebraller'in Embriyo Kültürü" isimli uluslararası sempozyumların beşincisi düzenlenmiştir.

Yine index medicus'ta yaptığımız taramalarda embriyo kültürü ile ilgili karşımıza 20 binin üzerinde çalışma çıkmakta ve bunun yaklaşık 3 bininde rat embriyo kültürünün kullanıldığını görmekteyiz. Bu çalışmalarda da ağırlığın, embriyo büyüme ve gelişmesine etki eden hormonlar ile büyüme faktörlerinin araştırılması ve yine toksikoloji / teratoloji çalışmalarında olduğu görülmektedir. Dolayısıyla küresel kirlenmenin ve potansiyel teratojenlerin hızla arttığı dünyamızda, bilimsel popüleritesini arttırarak devam ettiren bir metot olan rat embriyo kültürünü kısaca tanımlamaya çalışacağız.

### **İN VİTRO RAT EMBRİYO KÜLTÜRÜ METODU**

#### **a) Deney hayvanlarının seçimi ve çiftleştirilmesi**

Ağırlığı 150-200 gr arasında değişen Wistar ratların (Rattus Norvegicus) 21°C ve 12 saatlik aydınlık / karanlık ortamında su ve besin gereksinimleri sağlanır.

Bir erkek ve bir dişi rat akşam saatlerinde çiftleşme kafesine konularak gece birarada bırakılır ve ertesi sabah kafesin altındaki tepside vajinal plak varlığı veya vajinal smearda sperm saptanırsa çiftleşmenin gece yarısı civarında olduğu düşünülüp o günün öğle saati dişinin 0.5 günlük gebe olduğu varsayılarak dişi ayrı bir kafese alınıp 9 gün burada tutulur.

#### **b) Serum hazırlanması**

Erkek veya dişi Wistar ratlar özel olarak hazırlanan anestezi kutusunda dietileter ile anestezi edildikten sonra göz kırpmaya refleksinin kaybolmasına bakılarak anestezinin tamamlandığına karar verilir. Daha sonra kutudan çıkartılıp sırt üstü yatırılan ratların karın ön duvarı % 70'lik etanol ile silinerek tüylerin kontaminasyonu önlenir. Bunu takiben pubis



üzerinden her iki kaburga yayına doğru iki insizyon yapılarak karın ön duvarı derisi ve kasları V şeklinde kaldırılır ve karın içi organlar sol tarafa yatırılarak abdominal aortadan steril bir şırınga ile maksimum düzeyde kan alınır (Şekil 1). Vakit geçirmeden dakikada 3000 devirle dönen santrifüjde 5 dakika süreyle dönderilmek suretiyle serum ayrılarak protein inaktivasyonu için (antijenik özelliklerini kaybettirmek amacıyla) 57°C lik su banyosunda 30 dakika bekletilir. Gelişebilecek olası enfeksiyonları önlemek amacıyla da bu kültür sıvısına penisilin 100 IU/ml ve streptomisin 100µg/ml eklenerek kültür ortamı hazırlanır. Hazırlanan serum -20°C de dondurulup bekletilerek kullanılacağı zaman çıkarılıp su banyosunda 37°C ye getirilir.

#### c) 9.5 günlük rat embriyolarının eksplantasyonu

Gebeliklerinin 9.5 uncu gününde dişi ratların karın ön duvarı anestezi altında açılıp daha önce tarif edildiği şekilde kanları alınarak serum hazırlanmasında kullanılır. Daha sonra içerisinde embriyo içeren ve sayıları 8-15 arasında değişen keselerin oluşturduğu uterus diseke edilerek (Şekil 2) bu keseler tek tek kesilip steril 37°C Hank dengeli tuz solüsyonu içeren petri kaplarına alınır. Daha sonraki işlemler "lamin-air flow" kabin içerisinde ve mikroskop altında gerçekleştirilir. Burada steril "Jewellers" forseps kullanılarak uterus kas tabakası ve desidua çıkartılıp, desidua ikiye ayrılarak bir yüzünde yerleşmiş olan ve bu aşamada sadece yaklaşık 1 mm boyundaki embriyo zarar vermemeye özen gösterilerek alınır (Şekil 3a, b). Kemirgenlere has bir yapı olan ve uterus içerisinde antijenlere karşı bir bariyer özelliği taşıyan

Reichart zarı da ayrılarak embriyo kültüre hazır hale getirilir (Şekil 4a, b). Bu aşamada rezorbe olmuş, gelişimi geri ya da anormal görümlü olduğu saptanan embriyolar çalışmalara dahil edilmez.

**d) 9.5 günlük rat embriyolarının kültürü:** Eksplantasyonu takiben embriyolar 50 ml lik steril cam şişelere 1 embriyo/1 ml serum olacak şekilde yerleştirilip şişenin ağzı plastik tıpa ile kapatılmadan önce %5 O<sub>2</sub>, %5 CO<sub>2</sub>, %90 N<sub>2</sub> gaz karışımı ile 1 dakika süre ile gaz verilir ve böylece embriyoların oksijen gereksinimleri karşılanmış olur. Ağzı kapatılan kültür şişeleri 37°C sabit kabin ısısına sahip bir inkübatörde dakikada 30-40 devirle dönen tüpler üzerine yatay olarak yerleştirilir (Şekil 5). 24 saat sonra embriyolara, oksijen konsantrasyonu %20'ye çıkarılıp azot içeriği %75'e düşürülen ve karbondioksit oranı sabit kalan gaz karışımıyla 1 dakika gaz verilerek yeniden inkübatöre konulur. Embriyoların morfolojik değerlendirmelerinin yapılacağı son gün ise 44. saatte embriyolara oksijen konsantrasyonu %40'a çıkarılıp azot içeriği %55'e düşürülen gaz karışımı verilir ve kültür süresi 48 saat olunca embriyolar morfolojik olarak değerlendirilir.

#### e) Morfolojik değerlendirme ve protein analizi

1981'de Brown ve Fabro tarafından yayınlanan (11) ve 1990'da Van Maele Fabry tarafından geliştirilen (12) bir sistem ile 11.5 günlük gebelik dönemine denk gelen 48 saat kültür sonrasında embriyolar Hank dengeli tuz solüsyonu içeren petri kabına alınarak morfolojik açıdan 17 parametre ile mikroskop altında değerlendirilir. Bu işlem esnasında yolk sak damarlanması, allantois gelişimi, emb-

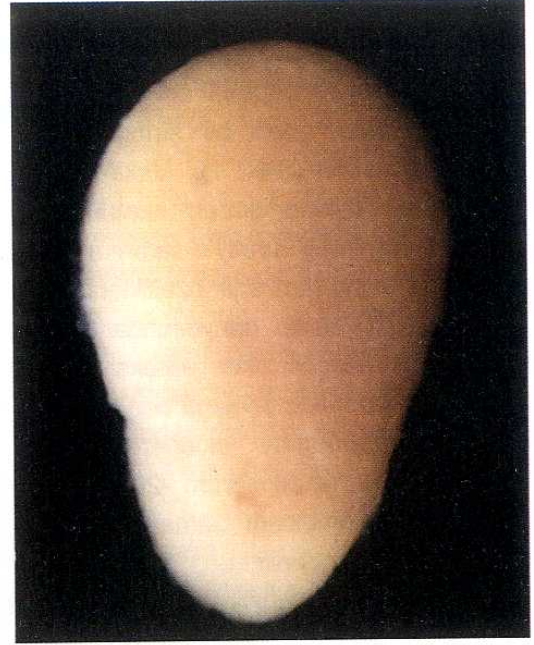


Şekil 1. Ratlardan serum hazırlanmak üzere abdominal aorta'dan kanın alınması.



Şekil 2. 9.5 günlük gebe ratlardan uterusun diseke edilmesi.





**Şekil 3.** 9.5 günlük gebe ratlardan diseke edilen; **a-** uterusun kas tabakası ile sarıltı, **b-** desidua içerisinde tek bir konseptusun görünüşü. X20 büyütme.

riyonun fleksiyonu, kalp gelişimi, nöral tüp kuyruk kısmının gelişimi, ön, orta ve arka beyin gelişimi, göz, kulak, burun ve yutak kavislerinin gelişimi, maxilla ve mandibula gelişimi, ön ve arka ekstremitelerinin gelişimi, somit sayısı, yolk sak çapı ve tepe-kıç mesafesi ölçülerek değerlendirilir (Şekil 6, 7). Daha sonra embriyo ve yolk saklar epindorf tüplerine konularak 1951'de Lowry (13) tarafından



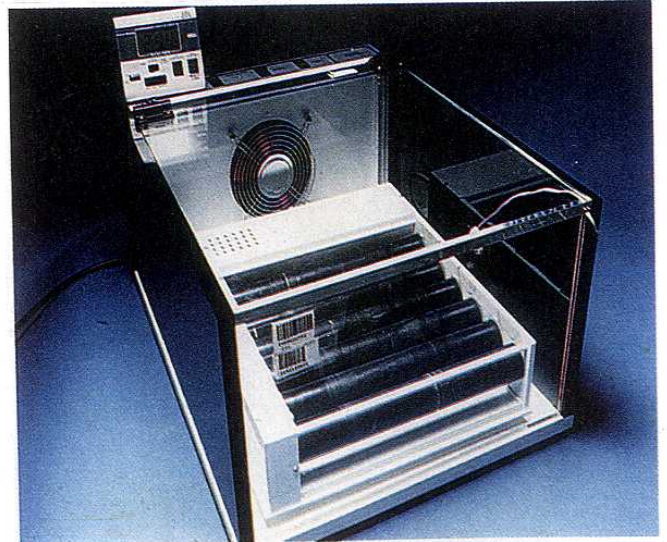
**Şekil 4.** 9.5 günlük gebe ratlardan diseke edilmiş embriyoların: **a-** Reichart zarından ayrılmış, **b-** bu zar ile çevrili görüntüsü. X60 büyütme

geliştirilen protein ölçüm metodu ile 750 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüm yapılır. Sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilir.

### İN VİTRO RAT EMBRİYO KÜLTÜRÜNÜN UYGULAMA ALANLARI

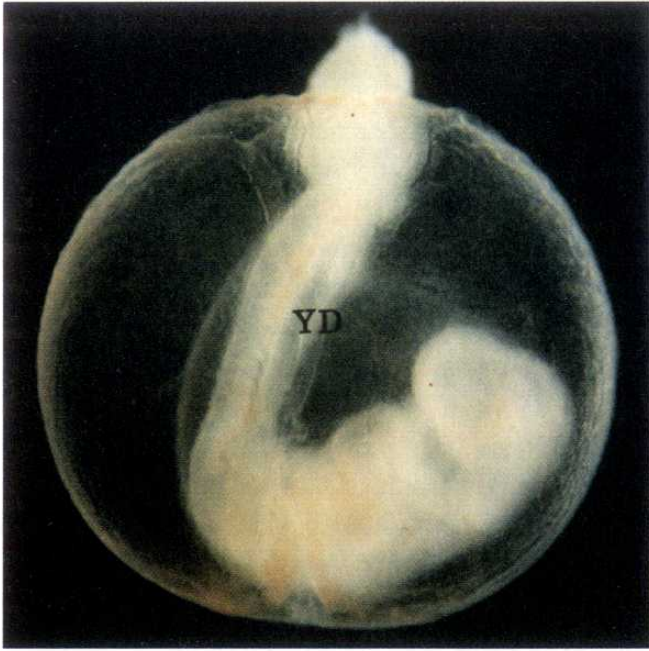
#### A) Normal embriyonik büyüme ve gelişme için gerekli faktörlerin tanımlanması

Bu konuda son yıllarda, büyüme ve gelişmeye etki eden hormonlar ve büyüme faktörleri ile bunların etki mekanizmaları ve reseptör düzeyindeki et-



**Şekil 5.** Şekil 5: Kabin ısı 37°C'ye ayarlanan ve dakikada 30-40 devirle dönen tüplerden oluşan bir embriyo kültür cihazı.

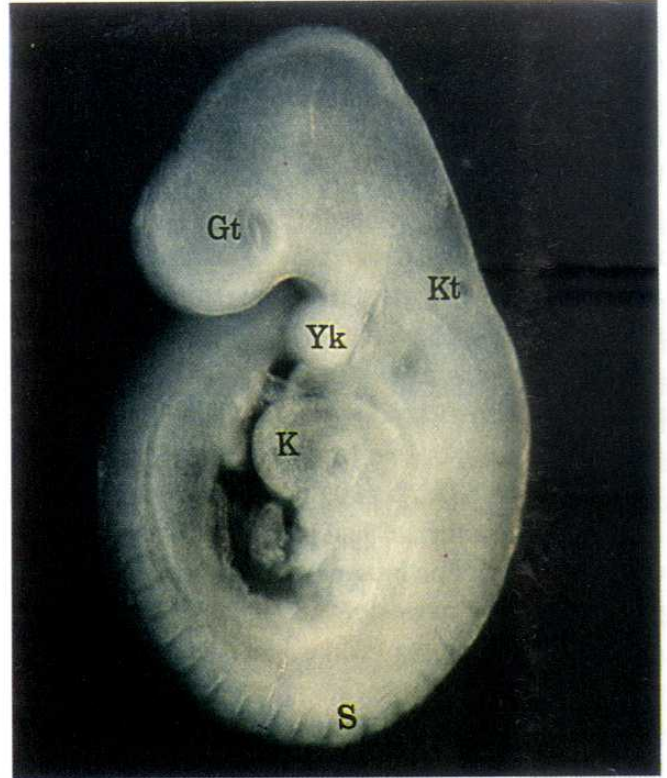




**Şekil 6.** Yolk sak ile çevrili 11.5 günlük bir rat embriyosunun 48 saat in vitro kültürü takiben görüntüsü. YD-Yolk sak damarları. X25 büyütme.

kileşimleri inceleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örnek verecek olursak; prolaktin (14-16), plasental laktojen (17), insülin (18), IGF-I ve II (19, 20), EGF (21-23), FGF, PD-ECGF ve VEGF (24, 25), anjiyotensin II (26) gibi hormon ve büyüme faktörlerinin in vitro kültür ortamında embriyo büyüme ve gelişmesi üzerindeki doz bağımlı etkileri gösterilmiştir.

Prolaktin hormonunun embriyoda organogenezis üzerine etkisini ölçmek için bizim yapmış olduğumuz bir çalışmada rat serumu 30 kDa üstü (retenate) ve 30 kDa altı (filtrate) fraksiyonlarına ayrıldı ve yüksek molekül ağırlıklı fraksiyona rat prolaktin hormonu ilave edilerek (0.4-25.6 ng/ml) gerek bu fraksiyonun tek başına ve gerekse prolaktin ilave edildiğinde embriyo büyüme ve gelişmesi üzerine etkileri incelendi. Retenate içerisinde kültürü yapılan embriyolarda, normal rat serumunda büyüyenlerle karşılaştırıldığında bütün parametrelerde (morfolojik skor, yolk sak çapı, tepe-kıç mesafesi, somit sayısı, embriyo ve yolk sak protein içerikleri) istatistiksel olarak anlamlı büyüme geriliği saptanırken, prolaktin hormonu ilavesi tüm parametrelerde büyümeyi arttırdı. Daha sonra insan ve koyun prolaktini ile aynı çalışma tekrarlandı ve türler arasında prolaktinin et-



**Şekil 7.** 11.5 günlük bir rat embriyosunun 48 saat in vitro kültürü takiben yolk sak kesesi ayrıldıktan sonra sol yan bakıdan görüntüsü. Kt- kulak tomurcuğu, Gt- Göz tomurcuğu, Yk- Yutak kavisleri, K- Kalp, S- Somitler. X25 büyütme.

kilerinde farklılıklar gözlemlendi (15). Bu çalışmanın devamı niteliğinde bir başka çalışmada ise prolaktinin bu etkisini IGF'ler üzerinden yaptığı gösterildi (16).

Ayrıca embriyo kültürü, hormonların ve büyüme faktörlerinin etki mekanizmalarının aydınlatılmasında reseptör etkileşimleri araştırılırken, immünohistokimya ile de birlikte çalışılabilen bir metottur. Cowley ve Pratten (20) insülinin ve IGF-I in, Andrews ve ark., (27) EGF in, Cumberland ve Pratten (28) transferrin'in, visseral yolk saktan alınımını ve taşınmasını immünohistokimyasal olarak göstermişlerdir.

Biz de prolaktinin embriyo gelişimi üzerine etkilerini gözlemledikten sonra, embriyoda erken organ gelişimi döneminde prolaktin reseptörleri varlığını incelemek üzere immünohistokimyasal metottan faydalandık. Bu çalışma için Wistar ratlar, gebeliklerinin prolaktinin anne serumunda arttığı 11.5 ve 18.5 uncu



günlerinde dekapite edilerek, hipofiz bezleri ve beyin dokuları çıkartıldı. Kullanacağımız metodun güvenilirliğini test etmek için yaptığımız immünohistokimyasal analizde kontrol olarak kullanılan beyin dokularında immunfloresan boyanma gözlenmezken, hipofiz kesitlerinde anti-prolaktin antikorları için yoğun boyanma gözlemlendi. Bu şekilde metodun güvenilirliği test edildikten sonra, rat embriyolarının prolaktin içeren ve içermeyen ortamlarda zaman ve sıcaklık farklılıklarının da etkisi araştırılacak şekilde kültürü yapıldı ve bunu takiben OCT içerisinde sıvı nitrojen yardımıyla dondurulan dokulardan Cryostat ile 6-8µm kalınlığında kesitler alındı. Standart immun floresan teknik uygulanarak, rat prolaktin hormonunun dokularda immun floresan ve konfokal mikroskoplarla görüntülenmesine çalışıldı. Prolaktin ile inkübe edilmeyen embriyonik dokularda ve yolk sakta immun floresan boyanma gözlenmezken, inkübe edilenlerde anti prolaktin antikorları için yoğun boyanma gözlemlendi. Prolaktinin yolk saktan alınarak embriyoya geçişinin zaman ve ısı bağımlı olduğu da bu çalışmada tesbit edildi (29).

### **B) Toksik, teratojen ajanlar ve ilaçların organogenezis döneminde embriyo büyüme ve gelişmesi üzerine etkileri**

Teratojenlerin, toksik maddelerin, çevresel ajanların ve ilaçların etki mekanizmalarının araştırılmasında in vitro embriyo kültürü oldukça önemli bir yere sahip olup, gerek bilinen teratojenlerin etki mekanizmalarının aydınlatılması, gerekse potansiyel teratojenlerin ortaya çıkarılması konularında çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmalara bir kaç örnek verecek olursak: etanolün etkileri (30), aspirin ve deriveleri ile (31-33), salisilik asit (34), valproat (35, 36), bromohidrokinon (37), retinoik asit ve vinkristin (38), kas gevşeticiler (39), beta blokörler (40), Edoferon (41) gibi ilaçların, nitroz oksit, halotan, isofloran ve enfloran gibi anestezi ajanlarının (42) etkileri incelenmiştir. Ayrıca son yıllarda, çevresel ajanlardan inorganik arsenikin (43), kafeinin (44), triklor etilen, tetraklor etilen ve metabolitlerinin (45), endüstride kullanılan kimyasallardan kurşun, kadmiyum, 1-, 2- dikloreten ve karbon disülfidin (46), klorakin ve derivelerinin (47), metanol ve formik asitin (48-50) embriyo gelişimini olumsuz etkiledikleri ve çeşitli malformasyonlara yol açtıkları gösterilmiştir. Bunlardan başka, spontan

düşük öyküsü olan kadınların serumlarından elde edilen teratojenik IgG'nin embriyo kültüründe embriyo gelişmesi üzerine olumsuz etkileri gözlenmiş ve mekanizmaları araştırılmıştır. Yine spontan düşük riski olan kadınların serumunda (51, 52) veya nöral tüp defektli fötüsü olan gebelerin serumlarında (53) kültürü yapılan embriyolarda gelişme gerilikleri ve bir takım malformasyonlar gözlenmiştir.

Teratoloji çalışmaları ile ilgili olarak yaptığımız bir çalışmada ülkemizde ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılan ve bazen de gebelikte bilinçsizce kullanılabilen aspirinin embriyo gelişimi üzerine etkisini inceledik. Bu çalışma için rat serumuna değişik konsantrasyonlarda (0.1-0.6 mg/ml) asetil salisilik asit ilave edildi ve bu embriyolarda 0.3 mg/ml dozdan itibaren tüm büyüme ve gelişme parametrelerinde gerileme ve buna ilave olarak değişik malformasyonlar gözlemlendi. Bu çalışma daha sonra genişletilerek sodyum salisilat ve salisilik asitin etkileri ve her üç ajanın etkilerinde serbest oksijen radikallerinin rolü araştırılarak karşılaştırıldı ve serbest oksijen radikallerinin aspirin ve derivelerinin embriyotoksik etkilerinde rolü olabileceği sonucuna varıldı (33).

### **C) Visseral yolk sak kültürü**

İngiltere Leicester Üniversitesi Anatomi bölümünde 1986 da geliştirilen bu metod (54, 55) normal 48 saat kültürü yapılan embriyoların kültür süresinin 7 gün daha uzatılarak 18.5 güne tamamlanması şeklinde kısaca tarif edilebilir. Bu periyotta her bir kültür şişesine 3 embriyo konulur ve kültür sıvısı iki günde bir yenilenerek 11.5 uncu gün ve takip eden günlerde embriyolara, her bir embriyo için 1.5 ml serum ve %40 oksijen konsantrasyonu içeren gaz karışımı verilir. Bu kültür periyodu sırasında embriyolar 12-13. günde kısmen rezorbe olurlarken yolk sak büyümeye devam ederek yaklaşık 2 cm çapa ulaşır ve kültür sonunda içerisinde yaklaşık 1 ml sıvı bulundurur (Şekil 8). Elde edilen yolk sak zarının gerek proteinlerin dış ortamdan alınarak transportu, gerekse amino asit sentezi gibi fonksiyonları radyoizotop işaretli moleküllerle veya immünohistokimyasal olarak çalışılabilmektedir. Bu metotla iyot 125 işaretli bovin serum albuminin (56), IGF-I in (20) ve prolaktinin (29) yolk sak tarafından alınması ve iletilmesi mekanizmaları çalışılmıştır.

Yolk sak sıvısının embriyo gelişimi üzerine etkilerini incelediğimiz bir çalışmada in vivo ortamda





**Şekil 8.** 17.5 günlük bir rat visseral yolk sak'ının normal rat serumu + M199 içerisinde 8 günlük kültürü takiben görüntüsü. X5 büyütme.

embriyoyu saran bu sıvının (özellikle 10-30 kDa molekül ağırlığına sahip fraksiyonunun) embriyonal gelişme üzerinde istatistiksel olarak anlamlı derecede etkisi olduğunu gözlemlenmiş (57) ve daha sonra bu etkiden sorumlu molekülleri tanımlamaya

çalışmıştı (58). Dolayısıyla embriyo kültürünün uzatılması ile ortaya çıkan yolk sak kültürü de ileride pek çok araştırmada bilim adamlarına model teşkil edebilecek bir metot olarak karşımıza çıkmaktadır.

### SONUÇ

New ve arkadaşları tarafından geliştirilen rat embriyo kültürü sistemi deneysel embriyoloji çalışmalarında çok önemli gelişmelere yol açmıştır. Bu sistem ile büyüme faktörleri ve hormonların embriyogenezis üzerine etkileri ve etki mekanizmaları, alkol, diyabetik gebelikler, folik asit eksikliği gibi durumların embriyo gelişimi üzerine etkileri çalışılabildiği gibi embriyotoksikite ve teratolojik çalışmalar için oldukça önemli bir metod olarak kabul edilmektedir.

### Teşekkür

Selçuk Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenen bir proje ile alt yapısı tamamlanarak Temmuz 1999 tarihinde kuruluşu gerçekleştirilen ve ülkemizde ilk olma özelliğini taşıyan Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Embriyo Kültür Laboratuvarı, Türk bilim adamlarının hizmetine sunulmuş olup, kuruluş aşamasındaki katkı ve teşviklerinden dolayı Tıp Fakültesi ve Selçuk Üniversitesi yöneticilerine teşekkür ederim.

### KAYNAKLAR

1. Gregg NM. Congenital cataract following German measles in mothers. Trans. Ophthalmol. Soc. Aust. 1941; 3: 35-45.
2. McBride WG. Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet 1961;16: 1358.
3. Moore KL, Persaud TVN. Human birth defects. In: 'The developing human: clinically oriented embryology'. WB Saunders Company, USA 1993; 142-73.
4. Waddington CH, Waterman AJ. The development in vitro of young rabbit embryos. J. Anat. 1933; 7: 355-70.
5. Nicholas JS, Rudnick D. Development of rat embryos in tissue culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1934; 20: 656-8.
6. Nicholas JS, Rudnick D. Development of rat embryos of egg-cylinder to head-fold stages in plasma cultures. J. Exp. Zool. 1938;78 (2): 205-32.
7. New DAT, Stein KF. Cultivation of post-implantation mouse and rat embryos in rotating tubes. J. Embryol. Exp. Morphol. 1964; 12 (1): 101-11.
8. New DAT. Development of rat embryos cultured in blood sera. J. Reprod. Fertil. 1966; 12: 509-24.
9. New DAT. Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. Biol. Review 1978; 53: 81-122.
10. New DAT, Coppola PT, Cockroft DL. Comparison of growth in vitro and in vivo of post-implantation rat embryos. J. Embryol. Exp. Morphol. 1976;36 (1): 133-44.
11. Brown NA, Fabro S. Quantitation of rat embryonic development in vitro: a morphological scoring system. Teratology 1981; 24: 65-78.
12. Maele GV, Delhaise FF, Picard JJ. Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos. Toxic. In Vitro 1990; 4 (2): 149-56.
13. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol. Chem. 1951; 193: 265-75.
14. Freemark M, Nagano M, Edery M, Kelly PA. Prolactin receptor gene expression in the fetal rat. J. Endocrinol. 1995; 144: 285-92.
15. Karabulut AK, Pratten MK. Species specificity of growth promoting effects of prolactin (PRL) during rat embryogenesis. J. Anat. 1998; 192: 1-12.
16. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. The mechanism of growth promoting effects of prolactin in embryogenesis- links to growth factors. Cells Tissues Organs (Acta Anatomica) 1999; 164: 2-13.



17. Karabulut AK, Pratten MK. The growth promoting effects of human placental lactogen and human prolactin in mammalian embryos during early organogenesis. *Acta Anatomica* 1995; 152 (4): 299.
18. Travers JP, Exell L, Huang B, Town E, Lammiman MJ, Pratten MK et al. Insulin and insulin like growth factors in embryonic development: effects of biologically inert insulin (guinea pig) on rat embryonic growth and development in vitro. *Diabetes* 1992; 41: 318-24.
19. Mercola M, Stiles CD. Growth factors superfamilies and mammalian embryogenesis. *Development* 1988; 102: 451-60.
20. Cowley EA, Pratten MK. Processing of fluorescently labelled insulin and insulin like growth factor-I by the rat visceral yolk sac. *Placenta* 1996; 17(5-6): 321-7.
21. Pratten MK, Brooke AM, Broome SC, Beck F. The effect of epidermal growth factor, insulin and transferrin on the growth-promoting properties of serum depleted by repeated culture of postimplantation rat embryos. *Development* 1988; 104: 137-45.
22. Tebbs CA, Cumberland PF, Pratten MK. The role of maternally derived epidermal growth factor and the epidermal growth factor receptor during organogenesis in the rat embryo. *J Anat.* 1997;190: 491-503.
23. Pratten MK. The role of exogenous growth-promoting factors and their receptors in organogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 1997; 41 (2): 319-28.
24. Ülger H., Karabulut AK., Pratten MK. The growth promoting effects of bFGF, PD-ECGF and VEGF on cultured postimplantation rat embryos deprived of serum fractions. *J Anat* 2000; 197:207-19.
25. Ülger H., Karabulut AK., Pratten MK. The growth promoting effects of platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) on early embryonic development and yolk sac vascularisation. *J. Anat.* 1997; 191 (1): 142.
26. Tebbs C, Pratten MK, Broughton Pipkin F. Angiotensin II is a growth factor in the peri-implantation rat embryo. *J Anat.* 1999;195: 75-86.
27. Andrews KE, Pratten MK, Beck F. Epidermal growth factor: pinocytosis and effect on embryonic development. *Biochem. Soc. Trans.* 1987; 15: 920-1.
28. Cumberland PFT, Pratten MK. Differences in binding characteristics of rat and human transferrin by visceral yolk sac placenta. *Placenta* 1992; 14: 287-307.
29. Karabulut AK, Ülger H., Pratten MK. Visualisation of the uptake of prolactin (PRL) in rat embryonic tissues. *Marmara Medical Journal* 1999; 12: 11-9.
30. Kotch LE, Chen, SY, Sulik, K. Ethanol-induced teratogenesis: free radical damage as a possible mechanism. *Teratology* 1995; 52: 128-36.
31. Schmid BP, Cicurel L. Application of the post-implantation rat embryo culture system to in vitro teratogenicity testing. *Chem. Toxic.* 1986; 24 (6/7): 623-6.
32. Spezia F, Fournex R, Vannier B. Action of allopurinol and aspirin on rat whole-embryo cultures. *Toxicology* 1992; 72 (3): 239-50.
33. Karabulut AK, Ülger H, Pratten MK. Protection by free oxygen radical scavenging enzymes against salicylate-induced embryonic malformations in vitro. *Toxicol. In Vitro* 2000; 14: 297-307.
34. Joschko MA, Dreosti IE, Tulsi RS. The teratogenic effects of salicylic acid on developing nervous system in rats in vitro. *Teratology* 1993; 48: 105-14.
35. Anwar M, Macvicar J, Beck F. Teratogenicity of valproic acid in rats and humans. *Contemp. Rev. Obstet. Gynaecol.* 1990; 2: 5-10.
36. Klein NW. The use of whole rat embryo cultures to identify and characterize causes of reproductive failure. *Int. J. Dev. Biol.* 1997; 41 (2): 267-73.
37. Andrews JE, Rogers JM, Ebron-McCoy M, Logsdon TR, Monks TJ, Lau SS. Developmental toxicity of bromohydroquinone (BHQ) and BHQ-glutathione conjugates in vivo and in whole embryo culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1993; 120 (1): 1-7.
38. Piersma AH, Attenon P, Bechter R, Govers MJ, Krafft N, Schmid BP et al. Interlaboratory evaluation of embryotoxicity in the postimplantation rat embryo culture. *Reprod. Toxicol.* 1995; 9 (3): 275-80.
39. Fujinaga M, Baden J, Mazze R. Developmental toxicity of nondepolarising muscle relaxants in cultured rat embryos. *Anesthesiology* 1992; 76 (6): 999-1002.
40. Klug S, Thiel R, Schwabe R, Merker HJ, Neubert D. Toxicity of beta-blockers in a rat whole embryo culture: concentration-response relationships and tissue concentrations. *Arch. Toxicol.* 1994; 68 (6): 375-84.
41. Karabulut AK, Ülger H, Pratten MK. Teratogenicity of Edoferon Kappa A in cultured rat embryos, differences from the original molecule: salicylate, and interaction with the free oxygen radical scavenging enzymes. *Anat. Hist. Embriol.* 2000;29:363-70.
42. Mazze RI, Fujinaga M, Rice SA, Harris SB, Baden JM. Reproductive and teratogenic effects of nitrous oxide, halothane, isoflurane, and enflurane in Sprague-Dawley rats. *Anesthesiology* 1986; 64: 339-44.
43. Tabocova S, Hunter ES, Gladen BC. Developmental toxicity of inorganic arsenic in whole embryo culture: oxidation state, dose, time, and gestational age dependence. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996; 138 (2): 298-307.
44. Iwase T, Arishima K, Ohyama N, Inazawa K, Iwase Y, Ikeda Y et al. In vitro study of teratogenic effects of caffeine on cultured rat embryos and embryonic cells. *J. Vet. Med. Sci.* 1994; 56 (3): 619-21.
45. Saillenfait AM, Langonne I, Sabate JP. Developmental toxicity of trichloroethylene, tetrachloroethylene and four of their metabolites in rat whole embryo culture. *Arch. Toxicol.* 1995; 70 (2): 71-82.
46. Zhao SF, Zhang XC, Zhang LF, Zhou SS, Zhang F, Wang QF et al. The evaluation of developmental toxicity of chemicals exposed occupationally using whole embryo culture. *Int. J. Dev. Biol.* 1997; 41 (2): 275-82.
47. Tagoe CNB, Adjei DO. Effects of chloroquine and its enantiomers on the development of rat embryos in vitro. *Teratology* 1995; 52 (3): 137-42.
48. Andrews JE, Ebron-McCoy M, Logsdon TR, Mole LM, Kavlock RJ, Rogers JM. Developmental toxicity of methanol in whole embryo culture: a comparative study with mouse and rat embryos. *Toxicology* 1993; 81 (3): 205-15.
49. Brown-Woodman PD, Huq F, Hayes L, Herlihy C, Picker K, Webster WS. In vitro assessment of the effect of methanol and the metabolite, formic acid, on embryonic development of the rat. *Teratology* 1995; 52 (4): 233-43.



50. Andrews JE, Ebron-McCoy M, Kavlock RJ, Rogers JM. Developmental toxicity of formate and formic acid in whole embryo culture. *Teratology* 1995; 51 (4): 243-51.
51. Klein NW, Carey WS, Chatot CL. The use of cultured rat embryos to detect teratogens in serum from rats, humans and monkeys. In: *In vitro toxicity testing of environmental Agents. Current and future possibilities*, New York, Plenum Press 1983: 209-30.
52. Anwar M, Macvicar J, Beck F. Evaluation of the teratogenicity of serum from patients with histories of recurrent miscarriages using an in vitro whole embryo culture technique. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1987; 94: 918.
53. Anwar M, Macvicar J, Beck F. Serum from pregnant women carrying a fetus with neural tube defect is teratogenic for rat embryos. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 1989; 96: 33-7.
54. Dunton A, Al-Alousi LA, Pratten MK, Beck F. The giant yolk sac: a model for studying early placental transport. *J. Anat.* 1986; 145: 189-206.
55. Pratten MK, Dunton A, Beck F. The "giant" yolk sac: a model for studying transport across extra-embryonic membranes. *Arch Toxicol Suppl.* 1987;11:159-62.
56. Dunton A, Pratten MK, Beck F. Uptake and digestion of 125I-labelled bovine serum albumin by the rat visceral yolk sac cultured in vitro as a closed vesicle. *Placenta* 1988; 9 (3): 303-11.
57. Karabulut AK, Layfield R, Ülger H., Pratten MK. Analysis of the embryonic growth supporting fractions of extra embryonic coelomic fluid (EECF). *J. Anat.* 1997; 191 (1): 140-1.
58. Karabulut AK, Layfield R, Pratten MK. Growth promoting effects of different fractions of extra embryonic coelomic fluid (EECF) on embryonic development. *Anat. Hist. Embriol.* 2000; 29: 225-234.