

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTI FGF-9'UN IN VITRO EMBRİYONİK GELİŞİM  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Tezi Hazırlayan  
İlkinur İLKNUR TEKİNARSLAN**

**Tezi Yöneten  
Doç. Dr. Erdoğan UNUR**

**Anatomi Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Eylül 2007  
KAYSERİ**

**T.C  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANTI FGF-9'UN IN VITRO EMBRİYONİK GELİŞİM  
ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Tezi Hazırlayan  
İlkinur İLKNUR TEKİNARSLAN**

**Tezi Yöneten  
Doç. Dr. Erdoğan UNUR**

**Anatomi Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından SBT- 07-06 nolu  
proje ile desteklenmiştir**

**Eylül 2007  
KAYSERİ**

**Doç. Dr. Erdoğan UNUR** danışmanlığında **İlkin İlkur TEKİNARSLAN** tarafından hazırlanan “**Anti FGF-9’un In Vitro Embriyonik Gelişim Üzerine Etkileri**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Anatomi Anabilim Dalında Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

20/09/2007

**JÜRİ**

**İmza**

Başkan : Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Üye : Doç. Dr. Erdoğan UNUR (Danışman)

Üye : Doç. Dr. Harun ÜLGER

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun .....tarih ve ..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

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

**Enstitü Müdürü**  
**Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU**

**TEŞEKKÜR**

Çalışmamda bana göstermiş olduğu her türlü sabır, destek ve emekten dolayı, tez danışmanım ve Erciyes Üniversitesi Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Erdoğan UNUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Kenan AYCAN'a, Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nihat EKİNCİ'ye, bilgilerinden yararlandığım ve çalışmamda gerekli olan her türlü yardım ve olanağı sağlayan Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi Müdürü ve Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Harun ÜLGER'e, Araş. Gör. Tolga ERTEKİN'e, Araş. Gör. Mehtap HACIALİOĞULLARI'na, Yüksek Lisans Öğrencisi Seda ARSLAN'a, Yüksek Lisans Öğrencisi Serbülent KAYA'ya, Anatomi Anabilim Dalı personeline, DEKAM çalışanlarına ve her zaman yanımda olan, desteğini esirgemeyen sevgili AİLEME teşekkürlerimi sunarım.

## ANTI FGF-9'UN IN VITRO EMBRİYONİK GELİŞİM ÜZERİNE ETKİLERİ ÖZET

Gelişen teknoloji insan hayatını kolaylaştırırken ortaya çıkan yan ürünler ise insan sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Bu zararlı ürünler anne karnındaki embriyoyu etkileyerek ölü doğumlara ya da sakat doğmasına neden olmaktadır. Sıçanlarda embriyonik gelişimin 9,5.-11,5. günler arası organ taslaklarının geliştiği dönemi kapsamaktadır. Bu dönemlerde teratojenlere maruz kalmak gebeliğin sonlanmasına ya da malformasyonlara neden olmaktadır. Teratojenlerin ve ilaçların etkilerinin önceden belirlenebilmesi ve doğumsal malformasyonların etkilerinin erken saptanabilmesi için *in vivo* (canlıda) ve *in vitro* (organizma dışında) çalışmalar başlamıştır. 9,5 ve 11,5 günlük embriyonik periyodu kapsayan *in vitro* embriyo kültürü tekniği anti fibroblast büyüme faktörlerin embriyo üzerindeki etkilerinin çalışılabilmesi için uygun bir dönemdir. Sunulan çalışmada, embriyo kültür ortamına monoclonal fibroblast growth factor-9 (anti FGF-9) ilave ederek embriyo kültürü üzerine olan etkisi araştırıldı. 48 saatlik kültür periyodu sonunda değişik dozlardaki (1 mikrogram, 2 mikrogram ve 4 mikrogram) anti FGF-9'un embriyolar üzerine etkisi morfolojik olarak değerlendirildi. Toplam morfolojik skor kontrol grubunda  $59.6 \pm 0.51$  iken deney gruplarında (1, 2 ve 4 mikrogram) sırasıyla  $43.7 \pm 4.94$ ;  $42.4 \pm 13.52$  ve  $29.2 \pm 10.97$ 'dir. Morfolojik skorlama sistemine göre toplam morfolojik skor, vitellus kesesi çapı, embriyo baş-kıç uzunluğu ve somit sayısı karşılaştırıldığında deney gruplarında anlamlı bir gerilemenin olduğu tespit edildi. Sonuçlar, anti FGF-9'un embriyonik gelişimde gerilemeye neden olabileceğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar kelimeler:** Rat, *In vitro*, Embriyo Kültürü, FGF-9, Anti FGF-9

**THE EFFECTS OF ANTI FGF-9 ON EMBRYONIC DEVELOPMENT IN VITRO**  
**ABSTRACT**

Tecnological impruments make human life easier but its products culd be harmful for life and development. These harmful products cause abortions and malformed babies. Primordias of embryonic organs develop during 9,5-11,5<sup>th</sup> days of embryonic development in rats. Exposure of teratogens during this period results with abortion or embryonic malformations. *In vivo* (in living organisms) and *in vitro* (out of living organisms) studies are being made to understand the effects of drugs and teratogens. These studies help us to detect the malformations at an early stage. *In vitro* embryo culture technique that include between the 9,5 and 11,5<sup>th</sup> days of the embryonic period culd be suitable for studying the effects of anti fibroblast growth factors on the embryo. In this study, monoclonal fibroblast growth factor-9 (anti FGF-9) is applied to the embryonic culture and its effects were observed. After the 48 hours of culture period, effects of different doses of anti FGF-9 (1 microgram, 2 microgram, 4 microgram) on the embryos were evaluated morphologically. Total morphologic score in the control and research group (1, 2 and 4 microgram) were  $59.6 \pm 0.51$ ,  $43.7 \pm 4.94$ ;  $42.4 \pm 13.52$  and  $29.2 \pm 10.97$  respectively. According to Morphologic Scoring Systems, there were a significant regression in the research group in the total morphologic score, yolk sac diameter, crown-rump lengths and somite number when compared to the control group. As a result it was clear that. The results suggest that anti FGF-9 may cause a regression in the embryonic development period.

**Key words:** Rat, *In vitro*, Embryonic Culture, FGF-9, Anti FGF-9

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK .....	I
KABUL VE ONAY SAYFASI .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
ÖZET .....	IV
ABSTRACT .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLO VE RESİM LİSTESİ .....	VIII
KISALTMALAR .....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. BÜYÜME FAKTÖRLERİ.....	3
2.2. FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRLERİ.....	5
2.3.FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖR RESEPTÖRLERİ (FGFR).....	6
2.4. FGF AİLESİ.....	6
2.5. FGF'LERİN BİYOLOJİK FONKSİYONLARI .....	13
2.5.1 Angiogenezinin Biyolojik İşlevi ve Yara İyileşmesi.....	13
2.5.2 Enflamasyonda FGFs.....	13
2.5.3 Onarım safhasında FGFs .....	14
2.5.4 FGF'lerin Regenerasyondaki Rolü .....	14
2.5.5 Gelişim Sürecinde FGF'lerin rolü.....	14
2.5.6 FGF'lerin ekstremitte gelişimindeki rolü .....	15
2.6. EMBRİYONİK GELİŞİM.....	15
2.6.1 Sığan Embriyosunun Gelişimi.....	16
2.6.2 Sığan Visseral Vitellus Kese'sinin Yapısı ve Görevi .....	17
2.6.3 Embriyoda Erken Dönem Damar Gelişimi .....	18
2.7. IN VITRO SIĞAN EMBRİYO KÜLTÜRÜ.. .....	18
2.7.1 In Vitro Kültür Sistemlerinin Tarihçesi .....	18
2.7.2 In Vitro Kültür Sistemlerinin Önemi .....	19
2.7.3 In Vitro Olarak Büyütülen Embriyolarda Büyüme ve Gelişimin Değerlendirilmesi.....	20

	<u>Sayfa No</u>
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ .....	23
3.1.1 Sıçanlarda Estrus Döngüsü .....	25
3.2. EMBRİYO KÜLTÜRÜ .....	26
3.2.1 Kültür Ortamının (serum) Hazırlanması.....	26
3.2.2 Anti FGF-9 .....	29
3.2.3 Hank's Balanced Salts Solution (HBSS) Hazırlanışı.....	29
3.2.4 Embriyoların anne karnından çıkarılışı ve kültürü .....	30
3.2.5 Çalışma Gruplarının Oluşturulması .....	31
4. BULGULAR.....	36
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	43
6. KAYNAKLAR .....	46
ÖZGEÇMİŞ	



## TABLO VE RESİM LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
<b>Tablo 4.1.</b> Sıçan serumu ve anti FGF-9'un toplam embriyonik gelişim üzerine etkisi .....	39
<b>Tablo 4.2.</b> Toplam Morfolojik Skor .....	39
<b>Tablo 4.3.</b> Yolc sac Çapı .....	40
<b>Tablo 4.4.</b> Somite Sayısı .....	40
<b>Tablo 4.5.</b> Baş-kıç uzunluğu.....	41
<b>Tablo 4.6.</b> Kontrol grubu ile deney grubunun vitellus kesesi damarlanması .....	41
<b>Resim 3.1.</b> Dişi sıçanların kafesteki görünümü.....	24
<b>Resim 3.2.</b> Dişi sıçanların yakından görünümü .....	24
<b>Resim 3.3.</b> Hemotoksilen+Eosin ile boyanmış estrus evresindeki vaginal smearda görülen spermeler.....	25
<b>Resim 3.4.</b> Anestezi kutusundaki dişi sıçanın görünümü .....	27
<b>Resim 3.5.</b> Dişi sıçanın sırt üstü yatmış hali.....	28
<b>Resim 3.6.</b> Karın ön duvarının %70'lik etanol ile temizlenmesi .....	28
<b>Resim 3.7.</b> Aort'un çatallanma yerinden alınan kanın görünümü.....	29
<b>Resim 3.8.</b> Karın içinde embriyoların görünümü.....	31
<b>Resim 3.9.</b> Uterus boynuzunda bulunan embriyoların görünümü .....	32
<b>Resim 3.10.</b> Embriyoların uterus boynuzundan çıkarıldıktan görünümü .....	32
<b>Resim 3.11.</b> Hanks solüsyonu içindeki embriyoların görünümü .....	33
<b>Resim 3.12.</b> İçerisinde embriyo bulunan uterus.....	33
<b>Resim 3.13.</b> Decidua .....	34
<b>Resim 3.14.</b> Reicherts membranlı embriyo .....	34
<b>Resim 3.15.</b> Reicherts membranı çıkartılmış embriyo.....	35
<b>Resim 4.1.</b> Sıçan serumunda büyüyen 11,5 günlük vitellus kesesi çıkartılmamış sıçan embriyosu.....	37
<b>Resim 4.2.</b> Sıçan serumunda büyüyen 11,5 vitellus kesesi çıkartılmış embriyonun yandan görünüşü.....	37
<b>Resim 4.3.</b> Kültür ortamına 4 mikrogram anti FGF-9 ilave edildikten sonraki 11,5 günlük vitellus kesesi çıkartılmamış sıçan embriyosu .....	38
<b>Resim 4.4.</b> Kültür ortamına 4 mikrogram anti FGF-9 ilave edildikten sonraki 11,5 günlük vitellus kesesi çıkarılmış embriyonun yandan görünüşü .....	38

**KISALTMALAR**

<b>FGF</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)
<b>aFGF</b>	: Asidik Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>bFGF</b>	: Bazik Fibroblast Büyüme Faktörü
<b>IL-6</b>	: Interleukin-6
<b>VEGF</b>	: Vasküler Endotel Hücre Büyüme Faktörü
<b>kDa</b>	: Kilo Dalton
<b>FGFs</b>	: Fibroblast Büyüme Faktörleri
<b>FGFR</b>	: Fibroblast Büyüme Faktör Reseptör

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fibroblast büyüme faktörleri (Fibroblast Growth Factorler: FGFs) ilk kez 1975 yılında tanımlanmış olup inek beyninden ve hipofizinden ekstrakte edilmiştir. 23 üyeye sahip olan FGFs nematodlardan (yuvarlak solucan) insanlara kadar hem omurgasızlarda hem de omurgalılarda bulunmaktadır. Fibroblast büyüme faktörleri heparin ve diğer anyonik moleküllere sıkıca bağlanan polipeptit ailesidir. FGFs embriyonik ve fetal gelişimde, damarlanmada, yara iyileşmesinde ve kanser oluşumu için ilk adımda, yeni doku oluşumunda ve şekillenmesinde, yangıda, sinirsel korumada, hücre çoğalmasında, göçünde, yuvalanmada ve tümör gelişimi gibi birçok önemli biyolojik sürecin düzenlenmesinde etkilidir.

FGF-9 heparin bağlayan bir moleküldür ve glikozlanmış tek bir zincirden ibarettir. FGF ailesinin diğer üyeleriyle %30 benzerlik gösteren 208 aminoasitten oluşur. Ağırlığı glikozlanma derecesine bağlı olarak 20-30 kilo Dalton (kDa) arasında değişir. Sıçan FGF-9'u ile insan FGF-9 molekülleri arasında %94 oranında benzerlik vardır. İnsan, fare ve sıçanlara ait FGF-9'lar yapısal olarak %93 oranında birbirine benzerler. FGF-9'un beyin ve böbrek üzerine etkisi vardır. FGF-9 insan glioma hücrelerinden ve sıçan merkezi sinir sisteminden bol olarak üretilir.

*In vitro* embriyo kültürü tekniği New ve Stein tarafından 1964 yılında ortaya konmuştur. *In vitro* embriyo kültür tekniği günümüzde, tıpta kullanılan ilaçların embriyo gelişimi üzerindeki etkilerinin incelenmesinde, embriyonik gelişim sürecinde etkili olan faktörlerin ve mekanizmaların araştırılmasında ve gelişim sürecinde değişen fiziksel ve kimyasal çevrenin embriyo üzerindeki rollerini ortaya koymak için kullanılmaktadır.

Bizim bu çalışmadaki amacımız anti FGF'in kültür ortamına ilave edilmesi ile FGF-9'un bloke edilmesinin sonucunun *in vitro* şartlarda 9,5-11,5 günlük embriyolar üzerindeki etkisinin ne olduğuna bakıldı.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. BÜYÜME FAKTÖRLERİ**

Polipeptit büyüme faktörleri çeşitli hücre tiplerine veya nispeten sınırlı hedef gruba etki edebilirler. Bu mediatörler; büyümeyi uyarmalarının ötesinde onarım ve yara iyileşmesinde önemli olan hücre hareketi, kasılması ve farklılaşmasını etkilerler. Yara iyileşmesi ve bağ dokusu ile onarımda, en sık dokudaki bir hücre tarafından salgılanan ve komşu hücrelerin aktivasyonunu düzenleyen bir faktör (parakrin stimülasyon) olarak rol alsa da; endokrin, parakrin veya otokrin yollarla etkili olan çeşitli büyüme faktörleri vardır. Kompensatuar epitelial hiperplazinin önemli olduğu hasarlı bölgelerde kendi üretimi faktörlere karşı reseptör taşıyan hücreler de otokrin stimülasyon gösterebilir (örneğin; karaciğer yenilenmesi). Farklı ve geniş etkilere (angiogenezis, kemotaksis, hücre çoğalması, fibroblast göçü, yara iyileşmesi, kollagen yapımı ve kollagen salınımı) sahip çok sayıda büyüme faktörü bulunmaktadır (1).

FGFs heparin ve diğer anyonik moleküllere sıkıca bağlanan polipeptit ailesidir. Bu yüzden bazal membrana karşı yoğun bir affinite gösterirler. Özellikle bFGF angiogenezisteki tüm basamaklarda uyarıcı etkiye sahiptir. Aktif makrofaj ve diğer hücrelerce serbestleştirilir (1).

FGFs çok hücreli canlılarda, omurgalı ve omurgasızlarda, hücre farklılaşmasında, göçünde, yaşamın devamında ve apoptosiste önemli rol oynamaktadır (2- 4).

FGFs embriyonik ve fetal gelişimde, damarlanmada, yara iyileşmesinde ve kanser oluşumu için ilk adımda, yeni doku oluşumunda ve şekillenmesinde, yangıda (5, 6) sinirsel koruma, hücre çoğalmasında, göçünde, yuvalanmasında ve tümör gelişimi gibi birçok önemli biyolojik sürecin düzenlenmesinde işe karışır (7, 8).

FGFs omurgalılarda birçok embriyonik organın gelişmesini sağlamak için indüklenmesinden, daha sonraki gelişiminden ve düzenlenmesinden sorumludur (9). FGFs aktif makrofajlarda sentezlenir. Yeni kan damarı sentezinin (angiogenezis) tüm basamaklarında etkilidirler. Yara iyileşmesi alanına endotel, makrofaj ve fibroblast gelmesini kolaylaştırırlar. Epidermis çoğalmasını hızlandırır. Fetüste iskelet kası ve akciğer matürasyonunda rolleri vardır. Mezenkimal hücrelerin angioblasta dönüşmesini sağlarlar. Kan hücrelerinin ve kemik iliği stromasının gelişimini arttırırlar (10).

FGF ailesine mensup üyeler embriyonik dönemde, fetal periyotta ve çocukluk çağında, özellikle sinir sistemi gelişiminde çok önemli rollere sahiptirler. FGF ailesine mensup 23 üyenin en az 10 adedi merkezi sinir sistemi gelişimi esnasında görev üstlendiği gösterilmiştir. FGF-1 ve FGF-2 merkezi sinir sisteminin farklı kısımlarından embriyonik 9. günden itibaren görülmektedir ve FGF-1 yetişkinlerde de varlığını devam ettirmektedir (2).

FGF'lerin fonksiyonu hücre büyümesiyle sınırlı değildir. Gerçekten, FGF'lerin bazı üyeleri fibroblast çoğalmasını oluşturmasına rağmen, orijinal FGF molekülü (FGF-2 veya bFGF)'de diğer hücreler ile birlikte endotelial hücrelerin, kondrositlerin, düz kas hücrelerinin ve melanositlerin çoğalmasını indüklediği bilinmektedir. Aynı zamanda adiposit farklılaşmasını teşvik edebilir, makrofaj ve fibroblastların Interleukin-6 (IL-6) üretimini teşvik eder. Astrosit göçünü uyarır. Nöronların yaşamını uzatır. FGFs genel olarak bilinen proliferatif aktivitelerinin yanı sıra onların kısmen de olsa gelişimde, angiogeneziste, hematopoesiste ve tümör gelişiminde hayati rolleri olduğu bilinmektedir (3).

## 2.2. FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRLERİ

Fibroblast Büyüme Faktörleri (Fibroblast Growth Factors: FGFs) 1970'li yıllarda sığırlarda hipofiz bezinin bir ürünü olarak ortaya çıkarılmış olup 1980'li yıllarda fonksiyonları daha iyi anlaşılmıştır (1, 2, 11, 12). Günümüze kadar 23 üyesi belirlenen FGFs, nematodlardan (yuvarlak solucan) insanlara kadar, hem omurgasızlarda hem de omurgalılarda yaygın olarak bulunmaktadır (3).

İnsanda *FGF* genleri genom (genetik materyal) içerisinde dağılık olarak bulunurlar. İnsanda 22 adet *FGF* geni tanımlanmış ve *FGF-16* hariç tümünün kromozom yerleşimleri bilinmektedir. Bu genlerin yerleşimleri göstermektedir ki *FGF* gen familyası; hem gen hem de kromozomal kopyalama ve de bunların gelişim esnasındaki yer değiştirmeleri tarafından oluşturulur (3).

*Fgf* genleri hem omurgasız hem de omurgalılarda tespit edilmiştir. İlginç bir durum *Fgf* benzeri bir genin nükleer polyhedrosis virüs genomunda kodlandığının gösterilmesidir. Ancak benzer durum (*Fgf* benzer sekanslar) bakteri (*Escherichia coli*) ve maya (*Saccharomyces cerevisiae*) gibi tek hücreli organizmalarda bulunmamıştır (3).

Sineklerde (*Drosophila*) ve İplik kurdunda (*Caenorhabditis elegans*) genomlar ortaya konmasına rağmen *Drosophila*'da sadece bir *Fgf* geni (dalsız), *C. elegans*'da iki adet *Fgf* geni belirlenmiştir. Bu durumun aksine omurgalılarda çok sayıda *Fgf* geni tespit edilmiştir (3).

FGF ailesine ait bireyler büyüme faktörleri içerisinde üzerinde en çok çalışma yapılan grubu oluşturmaktadır (1). FGF ailesine mensup üyelerden ilk keşfedilenlere Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF) (FGF-2) ve Asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF) (FGF-1) gibi isimler verilmişse de daha sonra aile üyelerinin sayısı arttıkça isimlendirmede 1'den 23'e kadar sayıların verilmesi genel kabul görmüştür (13).

FGFs omurgalılarda 17-34 Kilo dalton (kDa) arasında değişen bir büyüklüğe sahip iken, *Drosophila*'da 84 kDa büyüklüğe sahiptir (3). FGFs ana yapılarında (korunmuş bölgelerinde) 120 aminoasit bulundurulur. Bu aminoasitlerin %30-60'ını paylaşanlar FGF ailesinin bir üyesi olarak kabul edilirler (2). FGF'lerin çoğu merkezi bölgelerinde sağlam ve iyi korunmuş 28 aminoasit ve 6 benzer aminoasit artığı ihtiva etmektedir. İyi korunan aminoasitlerin 10'u FGF reseptörüyle (FGFR) reaksiyona girer (3).

### 2.3. FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖR RESEPTÖRLERİ (FGFR)

FGFs biyolojik aktivitelerini yapısal olarak tyrosine kinase ile ilişkili Fibroblast büyüme faktör reseptörü (FGFR) ile gerçekleştirirler. FGFR'ler membrana bağlanan tyrosine kinase IV'ün alt grubuna aittirler. Şimdiye kadar 4 adet FGFR (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 ve FGFR-4) tespit edilmiştir (2, 14). FGFR1-4, FGF ailesinin 23 üyesine ait polipeptidler ile bağlanabilen yapısal özelliklere sahip proteinlerden meydana gelmiştir (5).

FGFs heparin bağlayan büyüme faktörleri ailesinden olup, kendi pro-angiogenik etkilerini değişik endotel hücrelerinin yüzey reseptörleriyle (tyrosine kinase reseptörleri, heparan sülfat proteoglycanları ve integrinler) etkileşerek ortaya koyarlar (6).

FGFs 4 tane birbirleriyle ilişkili transmembran reseptörüne bağlanır ve onları aktive eder. Bu reseptörler tyrosine kinase reseptör familyasının bir alt grubunu oluştururlar. FGFR'lerinin ekstrasellüler bölgeleri iki ya da üç adet immunoglobulin benzeri (Ig-like) alan ihtiva eder. Bu alanlar farklı uçlarla değişik şekillerde bağlanırlar (15).

### 2.4. FGF AİLESİ

**Fibroblast Growth Factor-1 (FGF-1):** FGF-1 aynı zamanda asidik growth factor (aFGF, FGFa) olarak da bilinir. 17-18 kDa ağırlığında glikozlanmamış polipeptid olup her üç germ tabakasının bazı hücrelerinden üretilir (13). Hem FGF-1 ve hem de FGF-2 ilk önce sıgırların hipofiz bezinden izole edildi (11).

İnsanlarda 155 aminoasitten sentezlenmiş bir protein olan FGF-1 hücre sitoplazmasındaki bilinen kanallardan üretilen bir peptid değildir. Onun üretim süreci hücre çekirdeği ile ilişkilidir (11). Ancak FGF-1'in çekirdek içerisindeki izlediği üretim rotası açık değildir (13). FGF-1'in mitogenezisi indükleyebilmesi için onun çekirdek içerisinde yerleşim göstermesinin önemli olduğu, uzaklaştırıldığında mitojenik etkisinin ortadan kalkmasıyla anlaşılmıştır (11). İnsan ve farelere ait FGF-1'lerin aminoasit benzerliği %96 iken insan ve sıçanlara ait FGF-1'lerin aminoasit içeriği %95 benzerdir (13).

Yapılan çalışmalar FGF ailesine ait üyelerin merkezi sinir sistemi gelişiminde erken dönemde salındığını göstermiştir. Bunlardan FGF-1, FGF-2 ve FGF-15 gelişen neural tüp boyunca salgılanır ve hem embriyonik hem de yetişkin merkezi sinir sisteminde



bulunurken FGF-8 ve FGF-17 embriyonik gelişimin neurogenesis ve üreme fazında gelişmekte olan beynin belirli bölgelerinde lokalize olarak bulunur (2).

**Fibroblast Growth Factor-2 (basic FGF: bFGF):** FGF-2 18 kDa ağırlığında 155 aminoasit uzunluğunda, hem hücre içinde hem de hücre dışında aktiviteye sahip glikozlanmamış polipeptid olup % 55 oranında FGF-1 ile benzerlik gösterir. Bir *fgf-2* geninden şekillenen FGF-2 polipeptitlerinin 4 ayrı tipi vardır. Bunların ağırlıkları 18 kDa, 22.5 kDa, 23.1 kDa ve 24.2 kDa'dur (11, 13).

FGF-2 angiogenesis için gereklidir ve aynı zamanda tümör dokusundan da bol olarak üretilir. Tümör dokusunda parakrin ve otokrin tarzda ya tümör hücrelerinden ya da makrofajlar tarafından üretilebilir. Bu Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gibi diğer önemli angiogenik faktörleri ya da plasminogen aktivatörlerin düzenlemesini etkileyerek endotelial hücrelerin apoptosisini engeller ve damarlanmanın artmasına yol açar. FGF-2'nin blokajı *in vitro* ve *in vivo* ortamda angiogenesisin inhibasyonuna yol açar. FGF-2 geni olmayan transgenik farelerde embriyonik büyümenin damar gelişiminin bozulduğu gösterilmiştir (12).

FGF-2 üretimi yaptığı bilinen hücreler; embriyonik ve neuroektodermal dokulardaki çok sayıda bulunan, visseral ve vaskular düz kas hücreleri, kalp kası hücreleri, kolon ve bronşları döşeyen epitel hücreleri, nöronlar, beyincikteki Purkinje hücreleri, megakaryositler ve plateletler, endotel hücreler, mast hücreleri, glomerullardaki paryetal epitelial hücreler ve podositler, astrositler, değişik T hücreleri ve fibroblastlardır (13).

**Fibroblast Growth Factor-3 (FGF-3):** İlk defa farelerdeki meme karsinogenезisi sırasında tanımlandı. FGF-3 molekülü 28-32 kDa ağırlığında 222 aminoasit dizisinden oluşan bir yapıya sahiptir. İnsan ve farelerde bulunan FGF-3 %81 oranında birbirine benzer. FGF-3 üretimi DNA sentezini indüklerken hücre çoğalması üzerine inhibitör etki gösterir. FGF-3 genellikle gelişmekte olan hücrelerde ve kanserlerde ortaya çıkar, normal insan hücrelerinde görülmez. Embriyonik gelişim sırasında primitif çizgi mezoderm hücrelerinde, yutak ceplerine ait endoderm ve yutak kavislerine ait ektoderm hücrelerinde, arka beyin neuroepitelyumunda, iç kulağın duyu hücrelerinde görülür. Göğüs kanserinde ve kolon kanseri hücre kültürlerinde görülür (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-4 (FGF-4):** FGF-4 ilk defa mide kanserli insanlarda Kaposi sarkom örneklerinde ortaya kondu. FGF-4, 22 kDa ağırlığında 176 aminoasitten meydana gelen bir glikoproteindir. İnsan ve farelere ait FGF-4 %87 oranında birbirine

benzerdir. FGF-4 hem fibroblastlar hem de endotel hücreleri üzerinde mitojenik etkiye sahiptir. FGF-4 üretimi yapan hücreler hem kanserli dokularda hem de embriyonik dokularda bulunur.

FGF-4 üretimi yapan embriyonik hücreler, primitif çizgi mezoderminde, molar dişlere ait mine taslağının epitelyumunda, dişlerin keskin kenar ektoderminde, olgun somit myotomlarında ve Hensen düğümünde bulunur (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-5 (FGF-5):** İlk kez insan tümör hücre kültürlerinde tespit edilmiştir. 32-38 kDa ağırlığındadır. Öncü FGF-5, 268 aminoasit uzunluğunda iken olgun FGF-5, 251 aminoasit uzunluğunda bir polipeptiddir. FGF-5'in temel bölgesi %40 olarak FGF-1 ile %50 olarak FGF-2 ile benzerlik gösterir. FGF-5 yoğun olarak glikoz içeren karbonhidrat moleküllerinin reseptör aktivasyonu için gereklidir. İnsan ve farelerin öncü FGF-5'leri % 85 oranında benzerlik gösterirken olgun FGF-5'leri % 88 oranında benzerlik gösterir.

Hem embriyonik hem de olgun hücreler FGF-5 üretimi yapar. Embriyodaki FGF-5 üretimi yapan hücreler myotomlarda, lateral splanchnic mesoderimde ve ganglion spiralede bulunur. Erişkinlerde, hippocampus, thalamus, iskelet kasları, pankreasın Langerhans adacığındaki bazı hücrelerden ve ductus hücrelerinden, fibroblastlardan ve asiner hücrelerden FGF-5 üretimi yapılır (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-6 (FGF-6):** Hst-2 olarak da bilinen FGF-6, bir FGF-4/*hst* homolog genin ürünü olarak tespit edilmiştir. İnsanda olgun FGF-6 25 kDa glikozlu polipeptid olarak üretilir. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar öncü FGF-6'nın standart yapısının 198 aminoasit uzunluğunda olduğunu ortaya koymuştur. İnsan ve farelere ait FGF-6'lar %93 oranında birbirine benzer. Fibroblastlar için mitojenik ve endotel hücreleri üzerinde marjinal aktivite rolü oynayan FGF-6 tam olarak glikozlandığında endotel hücreleri üzerine de mitojenik aktivite gösterir. FGF-6'nın iskelet kasları üzerindeki etkisi iyi bilinmektedir. FGF-6 sadece myotomlarda ve kaslarda üretilmektedir (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-7 (FGF-7):** FGF-7 başlangıçta keratinocyte growth factor (KGF) olarak isimlendirilmiş olup 28 kDa ağırlığında tek zincirli bir glikoproteindir. Öncü molekül 194 aminoasit içerir, olgun molekül ise 163 aminoasit içerir. İnsan ve farelerin olgun FGF-7'leri %96 oranında birbirine benzer. Erişkinlerde FGF-7

fibroblastlardan, düz kas hücrelerinden ve ovaryumdaki theca hücreleri tarafından üretilir. Embriyoda ise gelişim evreleri sürecinde oluşan mezenşimde bulunur (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-8 (FGF-8):** Başlangıçta testesteronla stimüle edilmiş fare Shionogi kanser hücrelerinden üretilen androjen indükleyici growth faktör (AIGF) olarak izole edilmiştir. Başlangıçta 28-32 kDa ağırlığında birbirine eklenmiş iki alternatif şekilli bir glikoproteindir. Çok eklentili formlar insan ve fare FGF-8'lerinde vardır. Farelerde 8 izoform var iken insanda 4 adet izoform vardır. Fare ve insana ait bazı formlar % 100 birbirine benzer iken bazıları %98 birbirine benzerdir. Fetusta FGF-8 üretimi yaptığı bilinen bölgeler; embriyonik infundibulum, ekstremitte tomurcuklarının uç kısımlarındaki ektoderm, birinci yutak cebinden gelişen ağız epiteli, embriyonik ektodermden gelişen primitif çizgi, nefrojenik uzantılar, Bowman kapsülü, iç kulak labirenti, ovaryum follikülleri ve spermatogoniumlardır (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-9 (FGF-9):** FGF-9 aynı zamanda glia aktivatör faktör (GAF) olarak da bilinir. İlk kez insan glioma hücre kültürlerinde tanımlanmıştır. FGF-9 heparin bağlayan bir molekül olup, glikozlanmış tek bir zincirden ibarettir. Ağırlığı glikozlanma derecesine bağlı olarak 23-30 kDa ağırlığındadır. FGF ailesinin diğer üyeleriyle %30 benzerlik gösteren 208 aminoasit ihtiva eder. Molekül türlere göre fazla farklılık göstermez. Sıçan FGF-9'u ile insan FGF-9 molekülleri arasında %94 oranında benzerlik vardır. FGF-9'un merkezi sinir sistemi ve hücre aktivasyonu üzerinde eşsiz bir spektrumu vardır. FGFs gibi fibroblastlar üzerinde mitojenik etkiye sahip olmasına karşın insan umbilikal ven endothelial hücreler üzerine FGF-9'un etkisi yoktur.

FGF-9 oligodentrositlerin, astrositlerin, fibroblastların ve pheochromacytoma hücrelerinin proliferasyonunu stimüle eder. İnsan FGF-9 murine fibroblastlarına transfer edildiği zaman kanserojen etki gösterir. FGF-9'un beyin ve böbrek üzerine etkisini gösteren çalışmalar vardır. FGF-9 özellikle FGFR-2 ve FGFR-3 ile bağlantı kurarken FGFR-1 ve FGFR-4 ile ilişkisi yoktur. FGF-9'un biyolojik gereksinimlerde ve patolojik durumlarda oynadığı rol ortaya konmasından bu yana, çalışmalarda FGF-9'un tayin edilmesi arzu edilmektedir. Diğer FGF bağları gibi, FGF-9'un biyolojik aktivite göstermesi ve reseptöre bağlanabilmesi için heparin sülfata ihtiyaç vardır (16).

FGF-9 insan glioma hücrelerinde ve sıçan merkezi sinir sisteminde bol olarak üretilir. İnsan FGF-9'u için kodlanan gen, 11q11-13 kromozomunda bulunur. İnsan, fare ve sıçanlara ait FGF-9'lar yapısal olarak %93 oranında birbirine benzerler. FGF-9'un

yetişkin dokuda potansiyel bir mitojen olduğu ve sinir hücrelerinin varlığının devamı için önemli bir faktör olduğu bulunmuştur (7).

FGF-9 eksikliği olan yavru farelerin, mezenşim miktarının azalmasıyla birlikte akciğer hipoplazisi gösterdiği ve doğumdan kısa bir süre sonra öldükleri gösterilmiştir. Buna ek olarak FGF-9 yokluğunda farelerin embriyogenez sırasında erkekten dişiye cinsiyet dönüşümüne yol açtığı görülmüştür. Bu durum FGF-9'un testis gelişimdeki kritik rolünü gösterir. FGF-9'un prostat stroma hücrelerinde eksprese edildiği tespit edilmiştir. Prostatik hücre çoğalmasında FGF-9'un otokrin ve parakrin bir faktör olarak rol aldığı gösterilmiştir. FGF-9 uterusu da üretilir ve uterus endometriyum hücreleri için mitojenik bir aktiviteye sahiptir. FGF-9'un ekspresyonu ovaryum steroid hormonlarıyla düzenlenir (7).

FGF-9, beyinde yüksek miktarda eksprese edilen glikozlanmış ve nörotropik bir polipeptidtir (17).

FGF-9'un kemik gelişimi sırasında, yassı kemiklerde sutural mezenşimde üretilir ve endochondral kemikleşmenin düzenlenmesinde aktif rol oynar. Doğumdan sonra bu rol azalarak devam eder. Uzun kemiklerin gelişiminde, endochondral gelişimin başlangıcında FGF-9 yoğunlaşan mezenşimden üretilir (18).

FGF-9 calvarium'u oluşturan kemiklerden üretilir ve olgun osteoblastlardan meydana gelen hücre çoğalmasını stimüle eder (19).

İnsan ve sıçan dokuları üzerinde yapılan çalışmalar FGF-9'un merkezi sinir sisteminin çeşitli kısımlarından (medulla spinalis motor nöronlarından, ganglion spinaleden, astrositlerden, beyin sapından, beyincikten, korpus kallosumdan) üretildiğini göstermektedir. Merkezi sinir sistemi gelişimi esnasında E10.5-E14 günler arasında üretiminin aşırı derecede azalması, bulbus olfactorius'un ve medulla spinalis motor nöronların gelişimini sınırlandırdığı ifade edilmektedir (2).

**Fibroblast Growth Factor-10 (FGF-10):** FGF-10 ilk defa sıçan embriyolarında tanımlandı. 30 kDa ağırlığında, 209 aminoasit uzunluğunda bir glikoproteindir. İnsan ve fare FGF-10'ları % 94 oranında benzerken, insan ve sıçan FGF-10'ları %100 birbirine benzerlik gösterir.

FGF-10 üretimi yapan hücreler yetişkinlerdeki fibroblastlar ve öncü adipositler ile fetustaki akciğer mezenkimi, arka ekstremitte tomurcuğuna ait mesoderm, prostat ve seminal vezikül hücreleridir (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-11, -12, -13, -14 (FGF homolog faktörleri: FHF's):** Fibroblast homolog faktörleri insana ait retina dokusunda yapılan araştırmalarda birlikte ortaya konmuştur. Bu FHF's kendi aralarında %58- %71 aminoasit benzerliğine sahiptir. Diğer FGF'lerle ise %30 benzerliğe sahiptirler. FHF's çekirdek yerleşimli sinyaller üretirler, bunların hiçbirisinin üretim yolu ortaya konmamıştır. FGF-11 embriyonik gelişimin değişik safhalarında görülür.

FGF-12, embriyoda iskeleti oluşturan mezenkim çevresinde, glomerüllerde, atrium kasında görülürken, yetişkinlerde FGF-12 mesajları çeşitli bölgelerde bulunur.

FGF-13, fetal endimide, ganglion spinalde ve kranial sinirlere ait ganglionlarda, kalp kasında ve böbrek toplayıcı kanalları ile ilgili mezenşimde bulunmuştur.

FGF-14 embriyonik dönemde, merkezi sinir sistemi içerisinde göç eden nöron ve glia hücrelerinde, arkus aortada ve onun dallarında, beyinciğin granüler hücrelerinde ve korpus mamillarede bulunurken erişkinlerde sadece spermatoisitlerde bulunur (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-15 (FGF-15):** Bu molekölün sadece farede mevcut olduğu bilinir. 218 aminoasit uzunluğunda bir moleköl olup embriyonik gelişimde rol aldığı düşünölmektedir (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-16 (FGF-16):** İnsan FGF-16'sı 16 kDa ağırlığında 207 aminoasit uzunluğunda bir polipeptittir. İnsan ve sıçanlara ait FGF-16'lar %98 oranında birbirine benzer. FGF-16 kahverengi yağ hücrelerinden salınır (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-17 (FGF-17):** FGF-17, FGF-8 molekölünün bir benzeridir. İnsanda standart yapı 216 aminoasit uzunluğundadır. Üç alt tipinin (A,B ve C) varlığı rapor edilmiştir. İnsan FGF-17B'si fare ve sıçan FGF 17B ile %93 oranında benzerlik gösterir. FGF-17 embriyoda rhombencephalon ve mesencephalon birleşim yerinde, telencephalon ve diencephalon geçiş kısmında, büyük arterlerin duvarlarında bulunan düz kaslarda, kondrositlerde, primer osteoblastlarda ve mezenkimal hücrelerinde bulunmuştur (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-18 (FGF-18):** İnsan FGF-18'i 31kDa ağırlığında heparin bağlayan glikoprotein olup fetal ve yetişkin dokularında bulunur. Öncü molekülü 207 aminoasit uzunluğunda olup olgun segmenti ise 181 aminoasit uzunluğundadır. İnsan FGF-18 hem fare hem de sıçan FGF-18 ile % 99 oranında benzerdir. FGF-18, hem erişkin hem de fetal akciğer solunum respiratör sisteminde bulunduğu için akciğer fizyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (11, 13).

**Fibroblast Growth Factor-19 (FGF-19):** FGF-19 sadece insanda bilinir ve 216 aminoasit uzunluğunda bir moleküldür. FGF-19 üretimi yapan embriyonik dokular, deri, kıkırdak, retina, safra kesesi ve ince bağırsaktır (13).

**Fibroblast Growth Factor-20 (FGF-20):** İnsanda FGF-20, 23kDa ağırlığında, 211 aminoasit uzunluğunda bir moleküldür. FGF-20, FGF-9 ile %72 oranında benzerlik gösterir. Üretim tarzı da FGF-9'a benzemektedir (13).

**Fibroblast Growth Factor-21 (FGF-21):** FGF-21, 209 aminoasit uzunluğunda bir polipeptittir. İnsan FGF-21'i, fare FGF-21'i ile sadece %75 oranında benzerlik gösterir. Ayrıcalıklı olarak karaciğerde salınır (13).

**Fibroblast Growth Factor-22 (FGF-22):** FGF familyasının son keşfedilen üyelerinden birisi olup, FGF-7 ve 10 ile benzerlik göstermektedir. FGF-22, 170 aminoasit uzunluğunda bir molekül yapısına sahiptir. FGF-7, FGF-10 ve FGF-22'nin nötralizasyonu, in vivo şartlarda granüler hücreler ile yosun fibrillerin temas ettiği noktalarda presinaptik farklılaşmayı inhibe eder. Gelişmekte olan fare embriyolarında 16.5 güne kadar beyin, dil ve deride bol olarak bulunurken diğer dokularda tespit edilememiştir. Deri yaralanmalarında, yaralanmayı takip eden 5. günden itibaren FGF-22 mRNA seviyeleri aşağı doğru düşerken iyileşmenin ileriki süreçlerinde üretimi oldukça artmaktadır. Deri gelişiminde ve tamirinde, beyindeki presinaptik organizasyonun gelişiminde etkili olduğu ileri sürülmektedir (20, 21, 22).

**Fibroblast Growth Factor-23 (FGF-23):** FGF-23 diğer aile üyelerinden daha büyük molekül yapısına sahip olup öncü molekülü 251 aminoasit uzunluğuna sahiptir ancak bu moleküllerin ilk 24'ü azaltılarak üretilir ve molekül uzunluğu 227'ye düşer. FGF üyelerinden farklı olarak fosfat ve D vitamini metabolizmasında etkilidir (23, 24).

## **2.5. FGF'LERİN BİYOLOJİK FONKSİYONLARI**

### **2.5.1. Angiogenезisin Biyolojik İşlevi ve Yara İyileşmesi**

FGF'lerin angiogenезisin düzenlenmesinde önemli bir biyolojik faktör olduğu bilinmektedir. Angiogenезis; yara iyileşmesinde önemli bir rol oynar. FGF-2'nin hem yara iyileşmesini kolaylaştırdığı ve hem de sıçan, köpek ve domuz gibi hayvanlarda miyokard enfarktüsünün iyileşmesini hızlandırdığı tespit edilmiştir (11, 25).

Yara iyileşmesi 4 aşamalı bir süreçte gerçekleşir. Bu safhalar; enflamasyon, kontraksiyon, onarım ve yenilenme süreçlerinden ibarettir. Başlangıç safhası olan enflamasyon safhasında, çok sayıdaki enflamasyon hücreleri ve plateletler yara bölgesine akın ederek fibrin ve fibrinojenden zengin bir sıvı çıkarırlar. Daha sonra perisit ya da mezenkimal stroma hücrelerinden farklılaşan miyofibroblastlar hasarlı kısmı düzeltmek için harekete geçerler. Onarım safhasının en önemli aşaması zengin bir damar dokusunun oluşumunu sağlayan granülasyon fazıdır. Granülasyon fazında endotel hücrelerinin ve fibroblastların kollogen ihtiva etmeyen ekstrasellüler matriks içerisine doğru göçüyle yeni kılcal damarların oluşumu başlar. Onarım safhasının sonunda ise kollagen doku birikimi ve yeni kan damarlarının oluşumu ile gerçekleşir. Son yenilenme safhasında ise kaybolan epitel hücreler yerini yeni hücrelere bırakır. Bu demektir ki FGFs yara iyileşmesinin en az 3 veya 4 safhasında önemli roller üstlenmektedir. Bunlar, enflamasyon, onarım ve yenilenme safhalarıdır. FGFs sadece hücre dışı sıvıda değil aynı zamanda endotel hücreleri ve fibroblastlar içinde de bulunurlar (11).

Yukarıda bahsedildiği üzere, yara onarımı esnasında bu hücrelerden FGF'lerin üretimi yaranın oluşumu ile başlamaktadır. Yapılan araştırmalar, çeşitli büyüme faktörlerinin mekanik olarak hasarlanmış yaralı endotel hücreleri tarafından üretildiğini ortaya koymuştur. Mekanik etkinin hücre içinden FGF-2'nin üretimini tetiklediği ileri sürülmüştür. Tabi ki hücre içinden ve dokudan FGF'in üretiminin mekanik bir etki sonucunun dışındaki başka faktörlerle de olabileceğine dair işaretler mevcuttur (11).

### **2.5.2. Enflamasyonda FGFs**

Enflamasyonda FGF'lerin rolü, enflamasyonlu eklem sıvısında FGF-1'in varlığıyla belirlenmektedir. Eklem iltihabı ve doku reddi, lenfositlerin çoğalmasıyla karakterizedir. Güçlü bir lenfosit büyüme faktörü olan interleukin-2'nin oluşumunu

FGF-1'in stimüle ettiği gösterilmiştir. Diğer faktörlerle birlikte FGFs, enflamasyon hücrelerinin enflamasyon sahasına transferini teşvik etmektedir. FGFs, enflamasyona karşı oluşturulan cevabın önemli yapıtaşlarından olan platelet üretimini düzenleyerek yara iyileşmesinin başlangıç safhasında önemli bir rol oynar. FGF-4'ün öncü megakaryosit hücrelerin oluşumunu stimüle ettiği gösterilmiştir. FGF-2'siz farelerin serumlarında platelet seviyeleri anormal düzeydedir (11).

### **2.5.3. Onarım Safhasında FGFs**

Onarım safhasında FGF'lerin potansiyel rolü, endotel hücrelerinin ve fibroblastların çoğalmasını indükleyici etkisinden dolayıdır. FGF'lerin diğer önemli bir rolü adhesyon (yapışma) molekülleri ve proteolizin düzenlenmesi ile endotel hücrelerin göçünü kolaylaştırmasından ileri gelmektedir. FGF-2 fibroblastlar ve endotel hücrelerinde bulunan urokinase-type plasminogen active edici (uPA) geni indükler. uPA zymogen plasminogenleri plasmine çeviren bir serin proteazdır. Bu madde pıhtılaşmanın başlangıç aşamasında diğer maddeler arasında fibrin birikimini sağlar. uPA, uPA reseptörü aracılığı ile hücre yüzeyine yerleşir ve endotel hücrelerinin fibrin pıhtısının içerisine doğru göçünü kolaylaştırmak suretiyle hücre çevresinde fibrinolizisi başlatır. FGF-2 aynı zamanda yara iyileşmesi sürecinde, hücre yüzeyini birleştirici molekülleri düzenleyerek endotel hücrelerin hareketini kolaylaştırır. FGF-2 uygulanan insan kılcal damarlarında endotel hücrelerinin yüzeyinde hücre yüzeyi birleştirici moleküllerin artış gösterdiği tespit edilmiştir (11).

### **2.5.4. FGF'lerin Regenerasyondaki Rolü**

FGF'lerin yara iyileşmesinin final fazı olan rejenerasyondaki rolü, kimyasal olarak zarar verilen böbrek proksimal tübülünün iyileşmesi sırasında ortaya kondu. FGFs özellikle de FGF-7 epitel rejenerasyonunu kolaylaştırdığı, böbrek gelişiminin ileriki safhalarında olduğu gibi epitel farklılaşmasını sağladığı ileri sürülmektedir (11).

### **2.5.5. Gelişim Sürecinde FGF'lerin rolü**

FGF'lerin implantasyondan önceki gelişim sürecinde bile rol oynadığı bilinmektedir. FGF sinyalleri farelerde 5. hücre bölünmesi safhasında embriyonik ve ekstraembriyonik hücrelerin bölünmesini indükler. FGF'lerin üç germ tabakasının oluşumunda (gastrulasyonda) önemli rolü vardır. FGF'lerin kurbağalarda mesodermi indükleyen faktör olduğu ortaya kondu. FGF-3 ve FGF-4'ün mesodermi indüklenme kapasitesinde



oldukları, FGF-5'in gastrulasyonu düzenleyici faktör olduğu tespit edilmiştir. Fare embriyolarında ise FGF-8'in primitif çizgi boyunca epitel-mezenşim değişimi için gerekli olduğu ortaya konmuştur. FGF-8 yoksunu farelerde yapılan deneylerde migrasyondaki başarısızlık sonucu mesodermden, endodermden ve neuroektodermden türetilen dokuların oluşmadığı tespit edilmiştir.

FGF'lerin organogenezis ile özellikle sinir sistemi, akciğer ve ekstremit gelişimleriyle yakından ilgili olduğu gösterilmiştir. FGF-8 özellikle mesencephalon gelişimi ve neural plağa ait hücrelerin şekillenmesiyle ilgilidir. FGF-3 ise iç kulağın indüklenmesinde önemli rol oynar. FGF-10 ise akciğer gelişiminde özellikle akciğer epitelinin oluşumunda, farklılaşmasında ve bronşial ağacın dallara ayrılmasında tetikleyici bir güçtür. Sonuç olarak FGFs ekstremitelerin ve organların gelişiminde oldukça önemli rollere sahiptir (11).

### **2.5.6. FGF'lerin Ekstremit Gelişimindeki Rolü**

FGF'lerin ekstremiteler üzerindeki etkileri civcivler ve fareler üzerinde yapılan model çalışmalarda ortaya konmuştur. Normal ekstremit gelişimi, lateral mesodermin ektoderm ile kaplanmasıyla oluşan ekstremit tomurcuğunun çıkıntı şeklinde belirmesiyle başlar. Ekstremit tomurcuğundaki mezenkimal hücreler, ekstremitenin iskelet elemanlarına ve bağ dokusuna farklılaşırken, kas hücreleri; somitlerden ekstremit tomurcuğuna göç eden hücreler tarafından meydana getirilir. Ekstremit uzadıkça proksimalden distale doğru ekstremit elemanları belirmeye başlar. FGFs ekstremit tomurcuğunun indüklenmesinden sorumludurlar (11).

## **2.6. EMBRİYONİK GELİŞİM**

### **2.6.1. Sıçan Embriyosunun Gelişimi**

Sıçanlardaki gebelik süresi 21-22 gün sürerken insanlarda bu süre 267 gündür. Cleavage (yarıklanma) ve blastula safhaları benzerlik gösterirken blastosist safhasından sonra sıçan embriyo gelişimi bazı yerlerde farklılık gösterir (26).

Sıçanlarda cinsel birleşmeden 10 dakika sonra uterus duvarında kasılmalar ortaya çıkar. Bu dalgalar birkaç saniye içerisinde semeni uterus ile tuba uterinanın birleşim yerine ulaştırır. Utero-tubal bileşke sadece olgun ve hareketli spermilerin geçmesine müsaade eder. Ejakulasyondan 1saat sonra (genelde bu süre 4 saate kadar çıkar) ovumun etrafı spermilerle kuşatılır ve penetrasyon gerçekleşir (27).

Sıçanlarda ilk yarıklanma spermin ovum içerisine penetrasyonunu takiben 21.-25. saatler arasında görülürken ikinci yarıklanma 40.-70. saatler arasında görülür. Takip eden bölünme ise 65.-90. saatleri arasında ortaya çıkar. Fertilizasyonu takip eden 80.-110. saatlerde ise blastosist dönemine girilir. Bu sürecin tamamı tuba uterina içerisinde gerçekleşir. Bu aşamada blastula 60-85 mikron uzunluğundadır ve 4. günde zona pellucida kaybolmaya başlar. Bu aşamada uterus lümenine ulaşır. 5. günün sonunda blastosist zona pellucidasını kaybeder ve uterus yüzeyine iyice yaklaşır. İmplantasyonun başlamasından önce blastosist uterus boynuzunun antimezometrial kenarındaki epitel çöküntüsü içerisinde yuvalanmaya başlar (27).

Blastosist iki grup hücreden oluşur: iç hücre kütlesi (embriyoblast) ve blastosölün sınırını oluşturan trofoblast hücreler. Mural trofoblast, trofoblastik büyük hücrelerden oluşur ve maternal doku ile bağlantıyı sağlar. Polar trofoblastlar çoğalarak ekto plasental konu oluşturur. İç hücre kütlelerinin farklılaşmasıyla gelişen endodermal hücrelerin bir bölümü embriyonel diskin alt bölümünü oluştururken bir bölümü visseral endodermi şekillendirir. Bir kısım endoderm hücresi ise mural trofoblastın iç yüzünü kaplar ve parietal endodermi oluşturur. Bu olay gerçekleştiği zaman visseral endoderm olarak bilinen iç hücre kütlesi embriyonel endodermi oluşturur. Bu zamanda embriyo 6-7 günlük, embriyonik ektodermin merkezinde, proamniotik boşlukta ve ekstraembriyonik ektoderimde boşluklar görülür. Bu boşluklar birleşerek embriyonik silindirin (egg cylinder) içinde dar bir lümen oluşturur (26).

Reichert's membranı ilk olarak gebeliğin altıncı gününde trophectoderm ve parietal endoderm arasında amorf salgı olarak görünür ve 8. günde kalın hyalin membran haline döner. Aynı zamanda primitif çizgi oluşur ve buradan göç eden hücreler ektoderm ve endoderm arasına girerek mezodermi oluşturur. Mezodermal doku çoğalırken iç kısımda bir aralık görülür. Sonunda çoğalan bu hücre kitlesi embriyonik silindirin lümenini tamamiyle bloke eder ve 8,5 günlük embriyoda aralığın birleşmesiyle bu silindir üç çembere ayrılır: Bunlar; ekto plasental boşluk, eksosölom ve amniyotik boşluk olup bunların etrafında vitellus boşluğu bulunur. Bu üç kompartman amniyotik boşluğun ya da eksosölomun genişlemesinden dolayı iki boşluğa dönüşür, ekto plasental boşluk oblitere olmaya başlar. Zemini koryon olan ekto plasental boşluk ekto plasental konun dokusuyla birleşir. Aynı zamanda primitif çizginin üst kısmındaki bir alandan eksosölomun içine doğru allantois gelişir (26).

10,5 günlükken embriyo fark edilebilir yapıdadır. Nöral crest, kas-iskelet sistemi, kalp, ön barsak ve karaciğer tomurcukları ile somitler (7-9 arasında) belirginleşmiştir. Buna ek olarak allantois eksosölom karşısında gelişir ve ektoplasental kon ile birleşir. Bu zamanda, embriyo ventral olarak konveks olup hemen katlanmaya başlar ve kuyruğu kıvrılır. Bükülme 10. günde embriyonun amniyotik kavite tarafından çevrelenmesiyle başlar ve embriyo 11,5 günlükken tamamlanır. Bundan sonra embriyo dorsal olarak konveks hale gelir. Embriyo amniyon kesesi içinde katlandığı için amniyon embriyonun etrafını çevreler ve aynı zamanda etrafında vitellus kesesi gelişir böylece hem amniyon hem de embriyo tamamen vitellus kesesi içinde yer alır. Sıçan embriyosu 12,5 günlükken bütün organlar belirgindir ve bu durum insanlarla karşılaştırıldığı zaman 8. haftaya denk gelir. Aynı zamanda embriyo, korio-allantoik plasenta ve damarlanmış vitellus kesesi plasenta olmak üzere iki plasentaya sahiptir. Allantoik plasenta gebeliğin son safhasında önemli olmasına rağmen, vitellus kesesi embriyonik gelişim periyodu sırasında esas besleyici organdır (26-28).

### **2.6.2. Sıçan Visseral Vitellus Kese'sinin Yapısı ve Görevi**

Bütün kemirgenlerin ekstraembriyonik membran yapısı trofoblast, Reicherts membranı, parietal vitellus kesesi endodermi, vitellus kesesi boşluğu gibi yapılar visseral vitellus kesesi endoderminden gelişir. Visseral vitellus kesesi, embriyo ve ektoplasental konu arasında bağlantıyı sağlar. Visseral vitellus kesesinde endodermal hücreleri tek tabaka halinde bulunur. Burası vasküler membrandır ve absortif ve mezotelyal olmak üzere iki epitel yüzeyden oluşur. Absortif yüzey mezenşimden oluşan basit bir kolumnar epitelium (visseral endoderm)'dur. Vitellus kesesi damarlarının yönü mezenşime doğrudur. Ayrıca emilen maddeler vitellus damarları ile mezenşimal tabaka içinde visseral endoderme iletilmek zorundadır. Serosal membran eksosölomda bulunan yassılaştırmış mezotelyumdan mezenşimi ayırır. 15. günde vitellus kesesinin parietal duvarı dejenere olur ve daha sonra visseral endoderm uterinal boşluğun içeriği ile karışır. 10 günlük sıçan embriyolarının visseral vitellus kesesi yokluğunda kültürde büyümesi ve gelişmesinin mümkün olmadığı rapor edilmiştir. Erken organogenez sırasında vitellus kesesi embriyo ve anne arasındaki en büyük taşıyıcıdır. Embriyonun implantasyonundan koryoallantoik plasentanın fonksiyonel hale geçişinin başlangıcını kapsayan bu erken dönemde embriyonun besin ihtiyacı histiotrofik beslenme ile olur. Sıçanlarda bunu vitellus kesesi sağlar. Visseral vitellus kesesi, etrafında bulunan

makromolekülleri pinosite etme kapasitesine sahiptir. Endodermal hücrelerle makromoleküller lizozoma taşınır, sindirilir ve ürün gelişmekte olan embriyoya iletilir (26, 28). Bazı proteinler visseral vitellus kesesinin endodermal hücreleri aracılığı ile alınır ve vitellus kesesi damarlarından geçerek embriyoya ulaşır. Ayrıca visseral vitellus kesesi taşıma fonksiyonunun yanı sıra, hematopoetik, immunolojik ve metabolik fonksiyonları da yerine getirmektedir (29).

### **2.6.3. Embriyoda Erken Dönem Damar Gelişimi**

Metabolik ihtiyaçların karşılanabilmesi için ilk olarak dolaşım sistemi gelişmeye başlar (26, 28). Embriyonik gelişimin erken safhası sırasında, pek çok organ damarsız olarak gelişmeye başlar. Bu organların damar kanallarının ve kılcak damar ağının şekillenmesiyle aynı zamanda olduğu belirlenmiştir (30). Embriyoda dolaşım sisteminin gelişimi iki yolla olur. Birincisi vaskulogenez olup birçok yönde farklılaşma kabiliyeti olan öncü mezodermal hücrelerin endotel hücrelerine farklılaşmasıyla ortaya çıkar. Bu tip damarlanma hem kanatlı hem de memeli embriyolarında vitellus kesesi ve embriyonik organlarda meydana gelir. İkinci tip damarlanma ise anjiogenez olup daha önce var olan damarlardan tomurcuklanma yolu ile gelişir. Vaskulogenez erken embriyonik evrede meydana gelirken, anjiogenez hem embriyoda hem de tüm yaşam boyunca devam eder (26, 28).

## **2.7. IN VITRO SIÇAN EMBRİYO KÜLTÜRÜ**

### **2.7.1. In Vitro Kültür Sistemlerinin Tarihçesi**

Günümüzde yaygın olarak kullanılan *in vitro* embriyo kültür tekniği, New ve Stein'in (31) 1964 yılında ortaya koydukları ve daha sonra New ve arkadaşları tarafından modifiye edilen tekniğe dayanmaktadır. Ancak konu ile ilgili çalışmaların temeli 1930'lu yıllara kadar dayanmaktadır. Waddington ve Waterman (32) o yıllarda yaptıkları çalışmada tavşan embriyolarını plazma pıhtısında 6-9 somit aşamasına kadar büyütebilmişlerdir. Nicholas ve Rudnick heparinize edilmiş sıçan plazmasında sıçan embriyolarını kültüre etmişlerdir (28).

*In vitro* embriyo kültür tekniği günümüzde, embriyonik gelişim sürecinde etkili olan faktörlerin ve mekanizmaların araştırmalarda, tıpta kullanılan ilaçların embriyo gelişimi üzerine etkisinin tespitinde ve gelişim sürecinde değişen fiziksel ve kimyasal çevrenin embriyo üzerindeki rollerini ortaya koymak için kullanılmaktadır (33).

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 (33).

### **2.7.2. *In Vitro* Kültür Sistemlerinin Önemi**

Teknolojinin gelişmesi insan hayatını kolaylaştırırken ortaya çıkan zararlı ürünler insan sağlığını olumsuz yönde etkiler. Bu zararlı ürünler sadece o ortamdaki kişiyi etkilemekle kalmayıp anne karnındaki embriyoyu da etkileyerek sakat ya da ölü doğmasına neden olabilmektedir (33).

Doğum öncesi gelişmeye etki eden konjenital malformasyonların sebeplerinin ortaya çıkarılması teratolojinin çalışma sahasını oluşturmaktadır. 1941 yılında kızamıkçık virüsünün embriyonik gelişim sürecinde çeşitli doğumsal patolojilere yol açtığının ortaya konmasıyla birlikte teratolojinin temelleri atılmıştır. Bu tarihten itibaren çeşitli kimyasal ve farmakolojik ajanların gelişim sürecindeki etkilerinin incelenmesi süreci başlamıştır. Gelişim sürecinde olumsuz etkilere yol açan ajanlar da Teratojenler olarak isimlendirilmektedir. Teratolojik çalışmaların başlamasından önceki dönemde, uterus dokusu ve embriyonik zarların gelişen embriyoyu dış etkenlerden korumak için yeterli olduğu ve konjenital malformasyonların sadece genetik kökenli olduğu fikri hakimdi. Oysa günümüzde bu fikir tamamen yıkılmıştır. Gelişim sürecinde embriyonun veya annenin maruz kaldığı her türlü çevresel, fiziksel ve kimyasal faktör embriyonik gelişime etki edebilmektedir (33).

Sıçanlarda embriyonik gelişimin 9,5.-11,5. günler arası organ taslaklarının geliştiği dönemi (organogenezis dönemi) kapsamaktadır. Bu dönem insanlar için gelişimin 15.-60. günleri arasına denk gelmektedir. Bu dönemde teratojenlere maruz kalmak malformasyonlara sebep olabilirken daha erken dönemlerde maruz kalmak ise gebeliğin sonlanmasına neden olur. Daha geç dönemlerde ise fizyolojik anomalilere ve organlarda fonksiyon bozukluğuna neden olmaktadır. Teratojenlerin ve ilaçların etkilerinin önceden belirlenebilmesi ve doğumsal malformasyonların etkilerinin daha erken saptanabilmesi için hayvan deneyleri önem kazanmıştır. Bu amaçla da *in vivo* (canlıda) ve *in vitro* (organizma dışında) çalışmalar başlatılmıştır (28).

Embriyonun uterusu implantasyonundan sonra organlar gelişmeye başladığı için bu aşamada yapılabilecek *in vivo* çalışmaların başarı şansı sınırlı olmaktadır. Çünkü embriyo endometriyum içine yerleştiği için net olarak izlenememektedir. Ayrıca bugün bilinen çeşitli metotlarla (ultrasonografi radyolojik metodlar ve amnioskopi) incelemek için de oldukça küçük boyuttadırlar. Bu olumsuzluklara ilaveten *in vivo* çalışmalarda karşılaşılan olumsuz faktörlerden birisi de anne metabolizmasındaki fizyolojik farklılıklar hayvan deneylerinden elde edilen sonuçların insan için yorumlanabilmesini zorlaştırmaktadır. Çünkü teratojenler türe özgü değişiklik gösterebilir (28).

### **2.7.3. *In Vitro* Olarak Büyütülen Embriyolarda Büyüme ve Gelişmenin Değerlendirilmesi**

Embriyoların *in vivo* şartlarda olduğu kadar *in vitro* şartlarda da geliştirilebilmesi teratolojik çalışmaların yapılmasında büyük avantajlar ortaya koymuştur. Embriyoların *in vitro* ortamda büyümesi ve gelişimini devam ettirmesi teratolojistlerin dikkatini çekmiştir (28).

Embriyonun büyüme ve gelişmesini kantitatif olarak hesaplamada tanımlayıcı parametreler kullanılmalıdır. Van Maele-Fabry ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve sık kullanılan skorlama sistemi morfolojik gelişimi ölçmek için tasarlanmıştır. Bu sistem kullanılarak sıçan gebeliğinin 10, 11, 12 ve 13. günlerinde çıkartılan embriyolarda 17 morfolojik özelliğe bakılmaktadır. Her bir parametre 6 safhaya ayrılmıştır ve bu safhalara 0 ile 5 arasında değişen puanlar verilmiştir (28).

Bu parametreler şunlardır:

Vitellus kesesi damarlanması: damar oluşmaz veya kan adacıkları oluşursa 0 puan, ektoplasental kon etrafında kan adacıkları oluşursa 1 puan, vitellus kesesi üzerinde birkaç ince damar oluşursa 2 puan, vitellus kesesinde damar ağı oluşursa 3 puan, ana damardan çok sayıda ince dallar çıkıyorsa 4 puan, vitellus 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 damarlar aorttan ayrıldığı görülürse 3 puan verilir.

Fleksiyon; ventral olarak konveks ise 0 puan,  $\frac{1}{4}$  oranında rotasyon varsa 1 puan,  $\frac{1}{2}$ 'lik bir rotasyon varsa 2 puan  $\frac{3}{4}$ 'lük rotasyon varsa 3 puan, dorsal olarak konveks ise 4 puan, tamamen katlanırsa 5 puan verilir.

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

Arka beyin; nöral tabaka oluşmuş ise 0 puan, V-şeklinde nöral katlantı varsa 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 birleşmiş ise 5 puan verilir.

Orta beyin; nöral tabaka veya mesensefalik beyin katlantısı varsa 0 puan, V-şeklinde nöral katlantı varsa 1 puan, U-şeklinde nöral katlantı varsa 2 puan, kısmen mesensefalik katlantı birleşmiş ise 3 puan, tamamiyle mesensefalon birleşmiş ise 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 birleşmiş ise 4 puan, telensefalik evaginasyon görünürse 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 varsa 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 oluşursa 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 şey oluşmamış ise 0 puan, 9 ila 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 şey oluşmamış ise 0 puan, 26 ila 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 ila 5 arasında ise 0 puan, 6 ila 10 arasında ise 1 puan, 11 ila 15 arasında ise 2 puan, 16 ila 20 arasında ise 3 puan, 21 ila 25 arasında ise 4 puan, 26 ila 30 arasında ise 5 puan verilir (28).

Her bir embriyo için skorların toplam sayısal değeri morfolojik skor (MS) olarak değerlendirilir. Ayrıca morfolojik skorlama embriyonik yaşı belli olan embriyolar için kullanılır. Embriyo kültür deneylerinde morfolojik skorlama sistemin kullanımı embriyonik gelişimin ayrıntılı indeksini verir. Spesifik primordia'nın yavaşlamasının ve dismorfogenezin bulunmasına yardımcı olur. Gelişim ve büyümenin kantitatif olarak karşılaştırılmasına olanak sağlar (28).



### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1. DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ**

Çalışmamız Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi'nde (DEKAM) bulunan embriyo kültür laboratuvarında gerçekleştirildi. Bu çalışma Erciyes Üniversitesi etik kurallarına uygun olarak yapılmıştır. DEKAM'da özel olarak yetiştirilen Wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Erkek ve dişi sıçanlar ayrı ayrı özel kafesler içinde dörderli gruplara ayrılarak 21 derece sıcaklıkta ve 12 saatlik aydınlık karanlık ortamında tutuldu. Su ve besin ihtiyaçları, kafes içi temizlikleri sağlandı (Resim 3.1 ve 3.2).

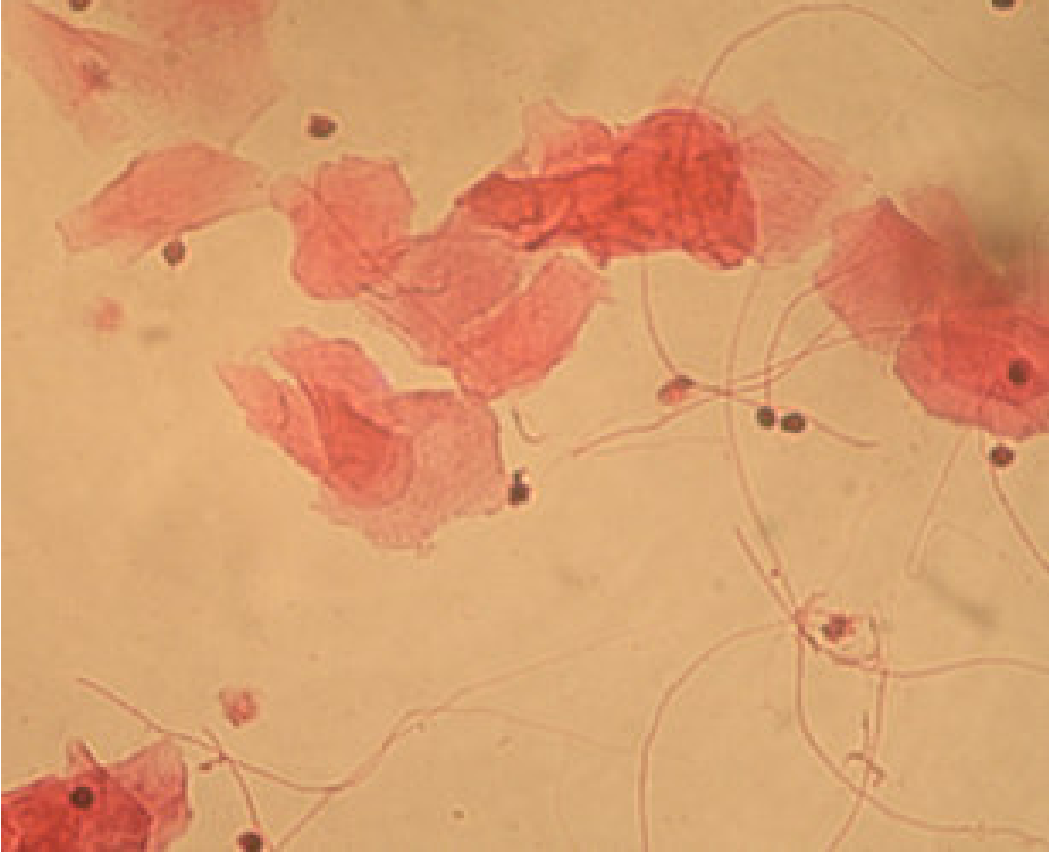
Çalışmada kullanılacak embriyoları elde etmek için ortalama 200gr. ağırlığında olan 5-6 aylık dişi sıçanlar ile ortalama 250-300gr ağırlığında olan 6 aylık erkek sıçanlar kullanıldı. Döllenmeyi gerçekleştirmek için 3 adet dişi sıçan ile 1 adet erkek sıçan birlikte saat 17.00 de aynı kafese konuldu. Sabah saat 8.30 da dişi sıçanlar erkek sıçanlardan ayrıldı. Dişi sıçanların hamile kalıp kalmadıklarını tespit etmek için vaginal smear bakıldı. Pasteur pipeti ile vaginaya 1cc kadar distile su verildi ve tekrar çekildi. Alınan sıvı lam üzerine yayılarak mikroskop altında incelendi. Vaginal smearde sperm görülen dişiler 0.5 günlük hamile olarak kabul edildi (Resim 3.3). Hamile olarak kabul edilen dişi sıçanlar ayrı bir kafese alınıp normal bir diyetle beslenerek 9 gün bekletildi.



**Resim 3.1.** Dişi sıçanların kafesteki görünümü



**Resim 3.2.** Dişi sıçanların yakından görünümü



**Resim 3.3.** Hematoksilen+Eosin ile boyanmış estrus evresindeki vaginal smearda görülen spermler

### 3.1.1. Sıçanlarda Estrus Döngüsü

Sıçanlarda estrus 4 ya da 5 gün sürer. Siklusun herhangi bir fazında orta boydaki bir follikül 300-500 mikron boyutundadır. Follikülün bir parçası ovulasyonla atılırken kalan kısmı korpus luteuma dönüşür. Ovaryumdaki değişikliklere vagina ve uterustaki değişiklikler eşlik eder.

Sıçan estrus döngüsü 4 evreye ayrılır. Bu evreler bir döngü içinde ve birbiri ardına oluşurlar. Ancak gebelik, çiftleşme sonrası dönem ve hemen doğum sonrası dönemde görülmez (anestrus). Sıçanın siklusunu tespit ederken vaginasındaki epitel döküntü şekline ve lökosit sayısına göre karar verilir. Sıçanın siklusunu belirlemek için vaginal smear yapıldı ve alınan örnekler incelendi.

**Proestrus evresi;** bu evrede önceki siklustan kalan corpus luteum dejenerasyona uğrarken follikül hızla büyür. Uterus lümenini döşeyen epitel hücreleri kolumnardan kuboidale değişir. Uterus lümeninde sıvı birikir. Vaginal epitelyum kalındır ve yüzeyel hücrelerin altında kornifiye tabaka gelişir. Bu süre ortalama 12 saat sürer. Yayma

preparatlarda geniş, küçük, yuvarlak tek tek veya tabaka şeklinde çekirdekli epitel hücreler görülmektedir. Lökosit hiç yok veya çok az bulunabilir.

**Estrus evresi;** bu evrede follikül büyüklüğü maksimuma çıkar. Endometrium hiperemik olup lümen iyice şişkindir. Vaginal epitelyum kornifiye hücrelerle kaplanmıştır. 12-14 saat sürer. Ovulasyon estrusun 8.-12. saatleri arasında gerçekleşir. Dişi proestrusun sonunda ve estrus safhasında çiftleşmeyi kabul eder. Yayma preparatlarda yüzlerce büyük dejenere çekirdekli kornifiye (yassılaştı) hücre içermektedir. Estrusun sonuna doğru yapıştı kornifiye hücrelerden dolayı smear peynirimsi bir görünüme dönüşmüştür.

**Metestrus evresi;** ortalama 21 saat sürer. Erken metestrus 15 saat kadar sürer ve ovulasyonun gerçekleştiği safhadır. Uterus içerisindeki sıvı azalmıştır. Lökosit infiltrasyonu artmıştır. Alçak kuboidal epitelyum vakuolar dejenerasyon gösterir. Vaginanın kornifiye epitelyumu ayrılır. Bu yüzden yayma preparatlarda çok sayıda lökosit ve çok az kornifiye hücre görülmektedir.

**Diestrus evresi;** ortalama 57 saat sürer. Bu safhada korpus luteum ve folliküller sürekli büyür. Uterusun regenerasyonu tamamlanır. Lökosit infiltrasyonu azalır. Vaginal epitelyum düşüktür. Yayma preparatlarda çok ince bir mukus içine karıştı çok sayıda lökosit ve birkaç çekirdekli epitel hücresi görülmektedir (27, 28).

## 3.2. EMBRİYO KÜLTÜRÜ

### 3.2.1. Kültür Ortamının (serum) Hazırlanması

Embriyoların büyümesi için kültür ortamı olarak kullanılan serumu elde etmede hem erkek ve hem de dişi sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar özel olarak hazırlanan anestezi kabini içerisinde eter ile anestezi edildikten sonra, göz kapağı refleksinin kaybolmasına bakılarak anestezinin tamamlandığına karar verilir (Resim 3.4). Daha sonra sıçanlar anestezi kabininden alınarak düz bir zemin üzerine yatırılır (Resim 3.5). Anestezinin etkisinin devam etmesi için eter ile ıslatılmış olan pamuk cam kavanoza konularak hayvanın solumasını sağlayacak şekilde burnuna yerleştirilir. Sıçanın karın ön duvarı %70'lik etanol ile temizlenerek tüylerin kontaminasyonu önlenir (Resim 3.6). 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 sağa doğru yatırılarak pars abdominalis aortae ortaya çıkarılır. Pars abdominalis aortae'nın bifurkasyon

noktasından steril bir enjektör ile kan alınır (Resim 3.7). Alınan kan miktarı sıçanların büyüklüğüne bağlı olarak sıçan başına 5-10 cc arasında değişmektedir. Alınan kan vakit geçirmeden 3500 devirde 5 dakika süreyle santrifüj edilir. Lamin-air flow altında kanın serumu ayrı bir tüp içerisine alınır. Eğer serum katı kıvamda ise steril pensle karıştırılarak tekrar santrifüj edilir. Santrifüj edildikten sonra steril Pasteur pipeti ile serum alınarak ayrı bir tüp içerisine transfer edilir. Elde edilen serum, protein inaktivasyonu için (antijenik özelliklerini kaybettirmek amacıyla) 56°C'lik su banyosunda 30 dakika süreyle bekletilir. Su banyosunda bekledikten sonra 0,22µm'lik filtreden geçirilir. Elde edilen serum içerisine 10. 000 IU/ml penisilin ve 10 mg/ml streptomisin karışımından her ml serum için 10µl ilave edilir. Hazırlanan serum -20 derecede dondurulup bekletilir ve kullanılacağı zaman çıkarılıp su banyosunda 37°C'de bir süre bekletilerek kullanıma hazır hale getirilir (28).



**Resim 3.4.** Anestezi kutusundaki dişi sıçanın görünümü



**Resim 3.5.** Dişi siçanın sırt üstü yatmış hali



**Resim 3.6.** Karın ön duvarının %70'lik etanol ile temizlenmesi





**Resim 3.7.** Aort'un çatallanma yerinden alınan kanın görünümü

### 3.2.2. Anti FGF-9

Araştırmada kullandığımız Monoclonal Anti-Fibroblast Growth Factor-9 (anti FGF-9) (Mouse IgG1 isotype) (SIGMA Ürün kodu: F1672) immünize farelerden alınan splenocytlerin ve myeloma hücrelerinin birleşiminden elde edilen FGF-9-77 hibridoma'dan elde edilmiştir. İmmunogen olarak murineden elde edilen recombinant FGF-9 kullanılmıştır.

Monoclonal antifibroblast growth factor-9 (anti FGF-9) spesifik olarak FGF-9 ile reaksiyona girer. Bu yüzden FGF'lerin özelliklerini anlamaya yönelik yapılan değişik çalışmalarda rahatlıkla kullanılabilir (16).

### 3.2.3. Hank's Balanced Salts Solution (HBSS) Hazırlanışı

Embriyolar, eter anestezisi altında anne karnından alındıktan sonra kültür şişesine transfer edilinceye kadar geçen yaklaşık 1 saatlik süre içerisinde pH'sı 7-7.4 arasında olan Hanks Balanced Salts Solusyonu (HBSS) içerisinde tutulur. Çalışmamızda kullandığımız HBSS (SIGMA Ürün Kodu: H 6136) toz halinde bulunmaktadır. Toz halinde bulunduğu için distile su ile solüsyon haline getirilir. 900cc'lik distile su geniş bir behere konur ve içine stiker (balık) konur. Toz halindeki Hanks Balanced Salts

içerisi distile su dolu behere dökülür ve beher magnetik karıştırıcı üzerine konur. Madde tamamen eriyene kadar karıştırılır. Karışımın içerisine 0,35gr sodyum bikarbonat ilave edilir ve karıştırmaya devam edilir. Hanks Balanced Salts ve Sodyum Bikarbonat tamamen eridiği zaman magnetik karıştırıcı durdurulur ve PH metre ile PH'ı ölçülür. Solüsyonumuzun PH'ı 7 ile 7,4 arasında olmalıdır. PH ölçüldükten sonra distile su ile karışım 1 litreye tamamlanır ve 0,22 µm'lik filtrelerden süzülür. Hazırlanan karışım steril şişelere konur ve +4°C'de saklanır. Çalışmalar yapılırken ortamın steril olmasına dikkat edilmelidir.

### **3.2.4. Embriyoların Anne Karnından Çıkarılışı ve Kültürü**

Gebeliklerinin 9.5'uncu gününde dişi sıçanların karın ön duvarı anestezi altında açılıp daha önce tarif edildiği şekilde kanları alınarak serum hazırlanmasında kullanılır. Daha sonra içerisinde embriyo içeren sayıları 8-15 arasında değişen keselerin oluşturduğu uterus disseke edilerek bu keseler tek tek kesilip içerisinde Hanks solüsyonunun bulunduğu steril petri kabına konur (Resim 3.8-3.11). Bu aşamadan sonraki tüm işlemler 'lamin-air flow' kabin içerisinde yarı steril şartlarda ve stero mikroskop altında gerçekleştirilir. Steril forceps yardımıyla uterus kas tabakası (Resim 3.12) ve decidua çıkartılıp (Resim 3.13), decidua ikiye ayrılarak bir yüzünde yerleşmiş olan embriyoya zarar vermeden özen gösterilerek embriyo deciduadan ayrılır (Resim 3.14). Kemirgenlerde bulunan ve embriyoyu çepeçevre kuşatan Reicherts membranı embriyonal kutupta pens yardımıyla parçalanarak çıkartılır (Resim 3.15). Embriyo Hanks solüsyonu içeren küçük steril petri kabına konur ve bu işlem bütün embriyolar için tekrarlanır. Bu aşamada zarar gören, gelişimi geri ya da anormal görünümlü olduğu saptanan embriyolar kültür ortamına konulmaz. Sağlam embriyolar beşerli gruplara ayrılır ve içerisinde 5ml normal sıçan serumu bulunan 50cc'lik steril cam kültür şişelerine (1 embriyo/1 ml serum) steril bir cam Pasteur pipeti yardımıyla konur. Embriyo bulunan şişelere % 5'lik O<sub>2</sub>, % 5'lik CO<sub>2</sub>, % 90'lık N<sub>2</sub> (1. gaz karışımı) gaz karışımı 1dk süre ile verilir ve böylece embriyoların oksijen gereksinimleri karşılanmış olur. Şişenin ağzı mantar tıpa ile kapatılır. Kültür şişeleri 37°C'lik inkübatöre konur. Kültür şişeleri dakikada yaklaşık 30 devirle (30 rpm/dk) dönen rollera yerleştirilir. Eksplantasyondan 24 saat sonra kültür şişeleri inkübatörden alınarak plastik tıparları açılır ve % 20 O<sub>2</sub>, % 5 CO<sub>2</sub>, % 75 N<sub>2</sub> ihtiva eden (2. gaz karışımı) gaz karışımı ile 1 dk süre ile gazlanır ve kültür şişeleri tekrar inkübatöre konur. Embriyoların morfolojik



değerlendirmelerinin yapılacağı son gün ise 44. saatte (skorlamadan 4 saat önce) embriyolara % 40 O<sub>2</sub>, % 5 CO<sub>2</sub>, % 55 N<sub>2</sub> (3. gaz karışımı) gaz karışımı ile şişelere 1 dk süre ile tekrar gaz verilir ve kültür süresi 48 saat olunca embriyolar içerisinde Hanks solüsyonu bulunan petri kaplarına transfer edilir. Van Meale- Fabry ve arkadaşları (28) tarafından geliştirilen Morfolojik skorlama sistemine göre mikroskop altında değerlendirilir.

### 3.2.5. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamız biri kontrol üçü deney grubu olmak üzere toplam 4 grup üzerinde gerçekleştirildi. Kontrol grubunda sadece WRS (Whole rat serum: total rat serumu) kullanıldı. Deney gruplarında ise embriyo başına 1, 2 ve 4 mikrogram anti-FGF-9 ilaveli WRS kullanıldı. Tüm çalışmada toplam 40 embriyo kullanıldı. Çalışmamız iki ayrı aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada her bir grupta 5'er embriyo olmak üzere toplam 20 embriyo kullanıldı. İkinci aşama 15 gün sonra aynı işlemin tekrarlanmasıyla gerçekleştirildi. Böylelikle kontrol ve deney gruplarında kullanılan embriyolar 10'a tamamlandı. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçları değerlendirmek için nonparametrik bir test olan Spearman korelasyon testi ve Kruskal-Wallis One Way Analysis testi uygulandı.



**Resim 3.8.** Karın içinde embriyoların görünümü



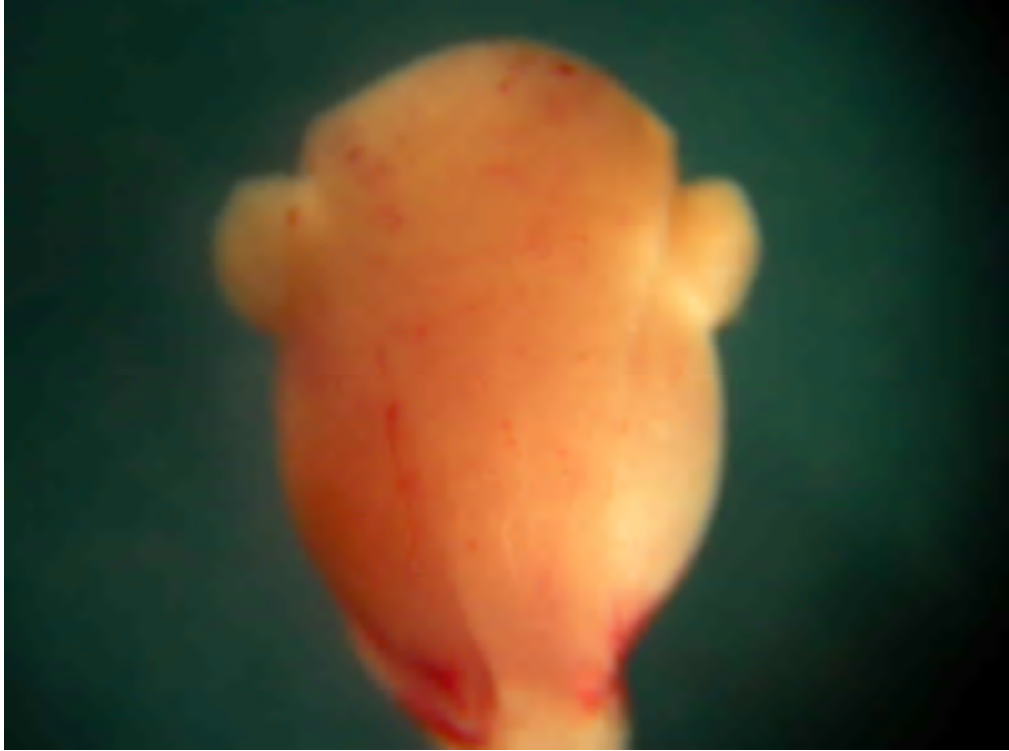
**Resim 3.9.** Uterus boynuzunda bulunan embriyoların görünümü



**Resim 3.10.** Embriyoların uterus boynuzundan çıkarılırken görünümü



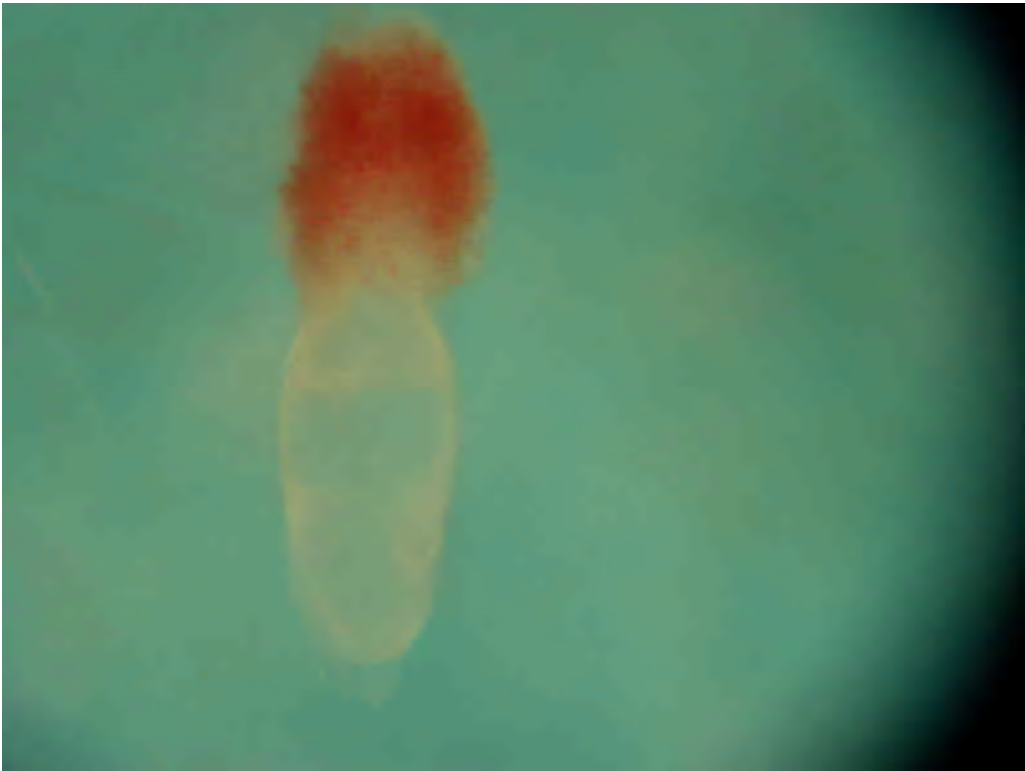
**Resim 3.11.** Hanks solüsyonu içindeki embriyoların görünümü



**Resim 3.12.** İçerisinde embriyo bulunan uterus



**Resim 3.13.** Decidua



**Resim 3.14.** Reicherts membranlı embriyo



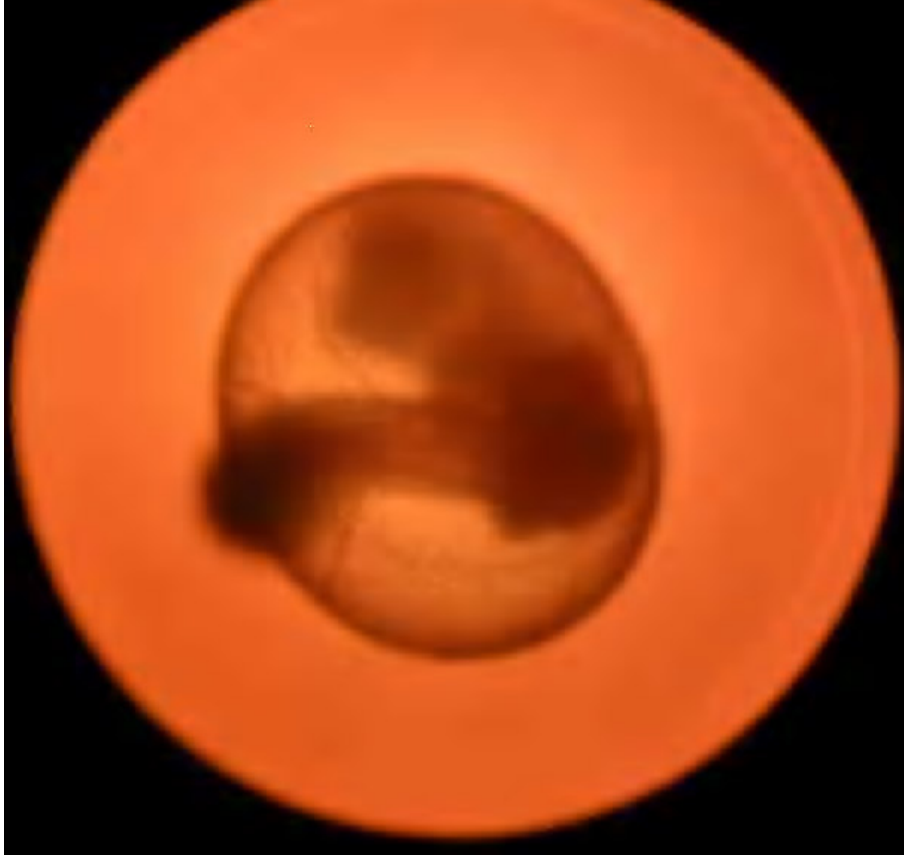
**Resim 3.15.** Reicherts membranı çıkartılmış embriyo

## 4. BULGULAR

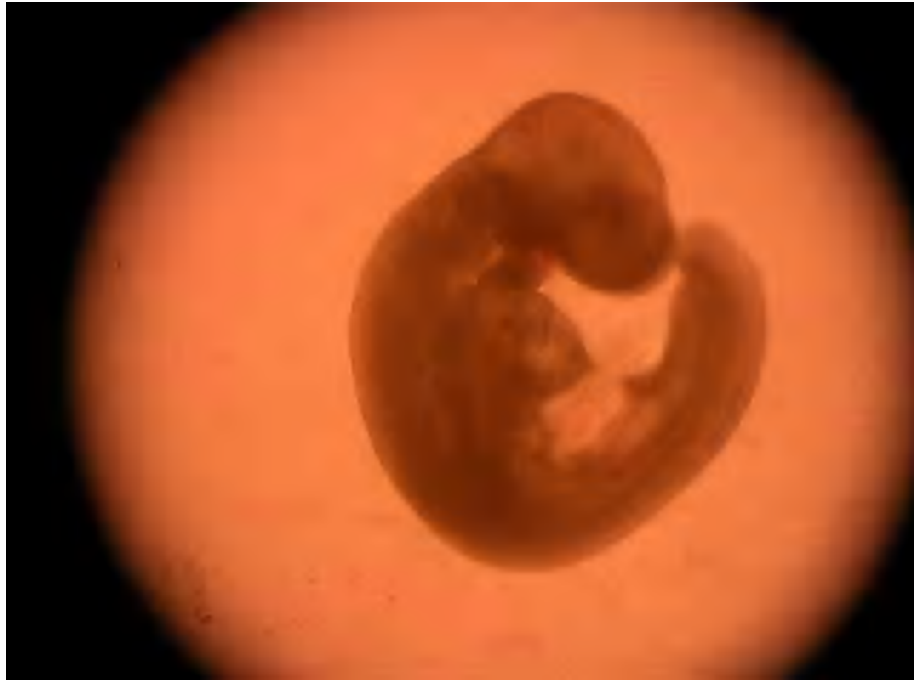
Çalışmamızda oluşturduğumuz toplam 4 grubun (kontrol ve 3 deney grubu) 48 saatlik kültür periyodundan sonraki morfolojik skorlama sonuçlarına baktığımızda; kontrol grubuna ait embriyoların 11,5 günlük embriyonik gelişime yakın bir gelişme gösterdiği gözlemlendi (Resim 4.1, 4.2). Farklı dozlar verilerek oluşturulan deney gruplarında ise embriyonik gelişimde gerileme olduğu gözlemlendi. Sonuçları istatistiksel olarak değerlendirmek için parametrik olmayan bir test olan Spearman korelasyon testi uygulandı. Test sonuçlarına göre doz arttıkça embriyonik gelişim gerilemektedir. Ancak embriyonik gelişimdeki en belirgin gerileme en yüksek doz olan 4 mikrogram anti FGF-9'da mevcuttu (Resim 4.3, 4.4).

Toplam morfolojik skor, embriyo baş-kıç uzunluğu, somit sayısı ve vitellus kesesi çapına ait morfolojik skorlama değerlerine ait ortalama veriler tablo 1'de toplu olarak sunulmuştur. Tabloda da görüldüğü üzere incelenen tüm değişkenlere ait ortalama değerler doz artışına bağlı olarak azalmaktadır (Toplam morfolojik skor ve somit sayısı  $p<0,001$ ; vitellus kesesi çapı ve baş-kıç uzunluğu  $p<0,05$ ).

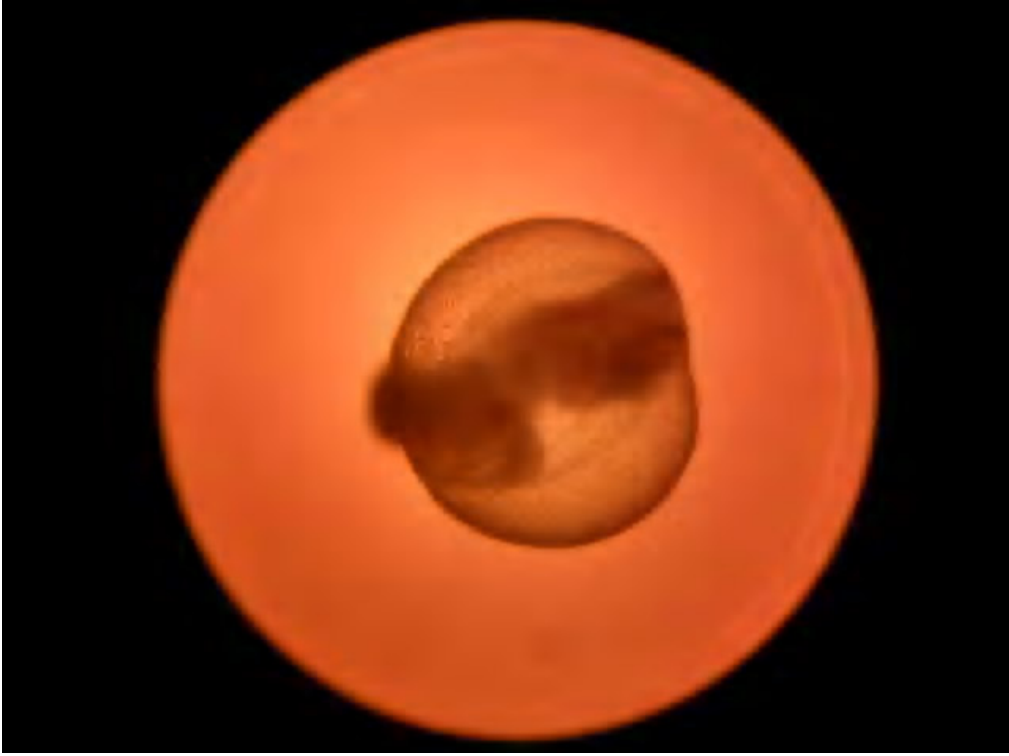




**Resim 4.1.** Sıçan serumunda büyüyen 11,5 günlük vitellus kesesi çıkartılmamış sıçan embriyosu



**Resim 4.2.** Sıçan serumunda büyüyen 11,5 günlük vitellus kesesi çıkartılmış embriyonun yandan görünüşü



**Resim 4.3.** Kültür ortamına 4 mikrogram anti FGF-9 ilave edildikten sonraki 11,5 günlük vitellus kesesi çıkartılmamış sıçan embriyosu



**Resim 4.4.** Kültür ortamına 4 mikrogram anti FGF-9 ilave edildikten sonraki 11,5 günlük vitellus kesesi çıkarılmış embriyonun yandan görünüşü



**Tablo 4.1.** Sıçan serumu ve anti FGF-9'un toplam embriyonik gelişim üzerine etkisi

Kültür ortamı	Embriyo sayısı	Toplam morfolojik skor	Vitellus kesesi çapı	Baş-kıç uzunluğu	Somit sayısı
<b>Kontrol grubu</b>	10	59,6±0,51	5±0	5,48±0,18	21,2±2,04
<b>1mikrogram Anti FGF-9</b>	10	43,7±4,94	3±0	4,34±0,29	19,9±1,52
<b>2mikrogram Anti FGF-9</b>	10	42,4±13,52	2,8±1,31	5±0,69	18±4,16
<b>4mikrogram Anti FGF-9</b>	10	29,2±10,97	1,6±1,07	4,6±0,46	15,4±1,89
		p<0.001	p<0.05	p<0.05	p<0.001

**Tablo 4.2.** Toplam Morfolojik Skor

Grup	En küçük değer	En büyük değer	Ortanca	Aritmetik ortalama	Standart sapma
<b>Kontrol</b>	59,00	60,00	60,0000 <sup>a</sup>	59,6000	,51640
<b>1 Mikrogram Anti FGF-9</b>	41,00	47,00	43,5000 <sup>b</sup>	43,7000	1,94651
<b>2 Mikrogram Anti FGF-9</b>	23,00	57,00	48,5000 <sup>b</sup>	42,4000	13,52528
<b>4 Mikrogram Anti FGF-9</b>	19,00	50,00	25,5000 <sup>b</sup>	29,2000	10,97269

Toplam morfolojik skor yönünden deney grupları ile kontrol grubunu incelediğimizde kontrol grubu ile deney grupları arasında anlamlı farkın olduğu görüldü. Toplam morfolojik skora ait değerlerin ortancaları arasındaki farklılık üst simge olarak belirtildi. Benzer harfler grupların benzer olduğunu göstermektedir (Tablo 4.2).

**Tablo 4.3.** Yolc sac apı

Grup	En küçük değer	En byk değer	Ortanca	Aritmetik ortalama	Standart sapma
<b>Kontrol</b>	5,25	6,25	5,5000 <sup>a</sup>	5,6000	,35746
<b>1 Mikrogram Anti FGF-9</b>	4,50	5,20	4,7750 <sup>b</sup>	4,7990	,17584
<b>2 Mikrogram Anti FGF-9</b>	4,78	6,17	5,6250 <sup>a</sup>	5,4710	,53722
<b>4 Mikrogram Anti FGF-9</b>	4,60	5,50	4,7500 <sup>b</sup>	4,8820	,32967

Deney ve kontrol gruplarına ait Yolc sac çapına ait veriler tablo 4.3.'de görülmektedir. Tabloda da görüldüğü üzere kontrol grubu ile deney gruplarından 1 mikrogramlık ve 4 mikrogramlık gruba ait değerler arasında fark görülmektedir. Yolc sac çapına ait değerlerin ortancaları arasındaki farklılık st simge olarak belirtildi. Benzer harfler grupların benzer olduğunu göstermektedir (Tablo 4.3).

**Tablo 4.4.** Somite Sayısı

Grup	En küçük değer	En byk değer	Ortanca	Aritmetik ortalama	Standart sapma
<b>Kontrol</b>	18,00	23,00	22,0000 <sup>a</sup>	21,2000	2,04396
<b>1 Mikrogram Anti FGF-9</b>	18,00	22,00	19,0000 <sup>a</sup>	19,9000	1,52388
<b>2 Mikrogram Anti FGF-9</b>	13,00	24,00	18,5000 <sup>ab</sup>	18,0000	4,16333
<b>4 Mikrogram Anti FGF-9</b>	13,00	18,00	15,5000 <sup>b</sup>	15,4000	1,89737

Çalışmada oluşturduğumuz grupları somit sayıları bakımından incelediğimizde kontrol grubu ile 1 mikrogramlık ve 2 mikrogramlık gruplar arasında fark görülmemesine rağmen kontrol grubu ile 4 mikrogramlık gruplar arasında anlamlı farkın olduğu görülmüştür. Somite sayısına ait değerlerin ortancaları arasındaki farklılık st simge olarak belirtildi. Benzer harfler grupların benzer olduğunu göstermektedir (Tablo 4.4).

**Tablo 4.5.** Baş-Kıç Uzunluğu

Grup	En küçük değer	En büyük değer	Ortanca	Aritmetik ortalama	Standart sapma
<b>Kontrol</b>	5,20	5,70	5,5000 <sup>a</sup>	5,4800	,18135
<b>1 Mikrogram Anti FGF-9</b>	4,00	4,70	4,5000 <sup>b</sup>	4,3400	,29889
<b>2 Mikrogram Anti FGF-9</b>	4,20	6,00	5,0500 <sup>ba</sup>	5,0000	,69602
<b>4 Mikrogram Anti FGF-9</b>	4,20	5,40	4,4500 <sup>b</sup>	4,6000	,46188

Gruplar arasındaki baş-kıç uzunluğuna ait değerler Tablo 4.5’de görülmektedir. Kontrol grubu ile 1 mikrogramlık ve 4 mikrogramlık gruplar arasında anlamlı fark var iken kontrol grubu ile 2 mikrogramlık gruplar arasında fark yoktur. Baş-kıç uzunluğuna ait değerlerin ortancaları arasındaki farklılık üst simge olarak belirtildi. Benzer harfler grupların benzer olduğunu göstermektedir (Tablo 4.5).

Vitellus kesesine ait damarlanma özellikleri toplu halde Tablo 4.6’da görülmektedir.

**Tablo 4.6.** Kontrol grubu ile deney grubunun vitellus kesesi damarlanması

Kültür ortamı	Embriyo sayısı	Vitellus kesesi damarları veya kan adacıkları belirgin	Ektoplasental kon etrafında kan adacıkları belirgin	Birkaç ince damar vitellus kesesi üzerinde	Damar ağı vitellus kesesinde belirgin	Çok sayıda ince dallar ana damar üzerinde
<b>Kontrol grubu</b>	10	–	–	–	–	10
<b>1 Mikrogram Anti FGF-9</b>	10	–	–	–	10	–
<b>2 Mikrogram Anti FGF-9</b>	10	–	2	2	3	3
<b>4 Mikrogram Anti FGF-9</b>	10	–	7	1	1	1

Tablo 4.6’da, kontrol grubunda büyüyen embriyoların vitellus kesesi üzerinde çok sayıda damarların geliştiği gözlenmiştir.

1 mikrogram anti FGF-9 ilave edilen grupta ise vitellus kesesinde damar ağının belirgin olduğu görülmüştür.

2 mikrogram anti FGF-9 varlığında 3 embriyonun vitellus kesesi üzerinde çok sayıda damarların geliştiği, 3 tanesinde damar ağının vitellus kesesi üzerinde belirgileştiği, 2 tanesinde birkaç ince damarın oluştuğu ve 2 tanesinde ise ektoplasental kon etrafında kan adacıklarının oluştuğu gözlenmiştir.

4 mikrogram anti FGF-9 varlığında ise 1 embriyoda vitellus kesesi üzerinde çok sayıda damarların geliştiği, 1 embriyoda damar ağının oluştuğu ve yine 1 embriyoda birkaç ince damarın oluştuğu, 7 embriyoda ise ektoplasental kon etrafında kan adacıklarının oluştuğu gözlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hem omurgasızlarda hem de omurgalılarda mevcut olan Fibroblast büyüme faktörleri (FGFs) üzerinde yaklaşık 30 yıldır yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Çalışmaların büyük çoğunluğu FGF'lerin moleküler yapısını ve biyolojik özelliklerini anlamaya yönelik olarak yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda FGF'lerin embriyonik ve fetal gelişimde, damarlanmada, yara iyileşmesinde ve kanser oluşumu için ilk adımda, yeni doku oluşumunda ve şekillenmesinde, yangıda, sinirsel korumada, hücre çoğalmasında, göçünde, yuvalanmasında ve tümör gelişimi gibi birçok önemli biyolojik sürecin düzenlenmesinde etkili olduğu ortaya konmuştur. (3, 5-8). FGFs omurgalılarda birçok organın indüklenmesinden, daha sonraki gelişiminden ve düzenlenmesinden sorumludur (9).

Günümüze kadar FGF ailesine mensup toplam 23 üye keşfedilmiştir. Bu üyelerden birisi de FGF-9'dur. FGF-9 da FGF ailesine mensup diğer üyeler gibi biyolojik süreçlerde oldukça etkilidir. Yetişkin dokularda potansiyel bir mitojen olarak görev yapar. Özellikle sinir hücrelerinin varlığının devamında önemli bir rol oynar (7). FGF-9'un kemik gelişiminde, merkezi sinir sisteminin aktivasyonunda, akciğer gelişiminde, testis gelişiminde, prostat gelişiminde, uterus ve ovaryum gelişiminde etkili olduğu bildirilmektedir (2, 17-19).

Çalışmada kullandığımız anti FGF-9 monoklonal özellikte olup sadece FGF-9 ile reaksiyona girer ve FGF-9'un biyolojik aktivitesini nötralize eder. FGF-9'un özelliklerini ve etkilerini anlamaya yönelik yapılan değişik çalışmalarda rahatlıkla kullanılabilir (16).

Embriyo kültürü tekniği günümüzde teratojenik ve toksikolojik araştırmalarda, klinik araştırmalarda, embriyonun gelişimi üzerinde etkili olan hormonlar ve büyüme faktörlerinin etkilerinin incelenmesinde ve embriyo metabolizması ile ilgili araştırmalarda kullanılmaktadır. *In vitro* embriyo kültürü; embriyonik büyüme için gerekli olan etkenlerin tanımlanmasında, teratojenlerin ve toksik ajanların embriyonik gelişim üzerine etkilerinin incelenmesinde ve visseral vitellus kesesi kültüründe kullanılmaktadır (28, 33).

Yaptığımız çalışmada, embriyoların gelişim düzeylerini değerlendirebilmek için Van Meale-Fabry ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve 17 parametre ihtiva eden toplam morfolojik skora yöntemi kullandık. Elde ettiğimiz veriler göstermektedir ki; normal sıçan serumunda kültüre edilen embriyoların gelişim düzeyleri *in vivo* şartlarda yetişen embriyolar ile büyük benzerlik göstermektedir. Farklı dozlarda anti FGF-9 ilave ettiğimiz kültür ortamında yetişen embriyolarda ise belirgin bir gelişim geriliği gözlemlendi. Bu gelişim düzeyindeki gerileme kültür ortamına ilave edilen anti FGF-9 miktarına bağlı olarak değişmektedir. İlave edilen doz arttıkça gelişim gerilemektedir. En az gelişim gösteren grup embriyo başına 4 mikrogram anti FGF-9 ilave ettiğimiz grupta görüldü. Kontrol grubuna ait morfolojik skor  $59.6 \pm 0.51$  iken deney gruplarına (1,2 ve 4 mikrogram anti FGF-9/ embriyo) ait değerler sırasıyla  $43.7 \pm 4.94$ ;  $42.4 \pm 13.52$ ;  $29.2 \pm 10.97$ 'dir.

Brown ve Fabro (34) yaptıkları çalışmada Yolk sac çapının 11,5 günlük embriyolarda  $4.6 \pm 0.1$ mm olarak bildirilmektedir. Çalışmamızda kontrol grubunda  $5.6 \pm 0.3$ mm iken 4 mikrogramlık grupta  $4.8 \pm 0.3$ mm tespit edildi.

Embriyo kültürü ile ilgili yapılan çalışmalarda 11.5 günlük sıçan embriyolarında kontrol gruplarına ait somit sayıları  $27.7 \pm 0.3$  (34),  $24.2 \pm 0.7$  (28),  $26.5 \pm 0.5$  (35) olarak bildirilmektedir. Çalışmamızda ise kontrol grubuna  $21.2 \pm 2$  iken, 1,2 ve 4 mikrogramlık deney gruplarında sırasıyla  $19.9 \pm 1.5$ ,  $18 \pm 4$  ve  $15.4 \pm 1.8$  olarak tespit edildi.

Kültüre edilen 11.5 günlük sıçan embriyolarının baş-kıç uzunluğu hakkında kaynaklarda  $2.8\pm 0.11$  (28) ile  $3.6\pm 0.06$  (34) arasında değişen rakamlar verilmektedir. Çalışmamızda ise kontrol grubu  $5.4\pm 0.18$  iken 4 mikrogramlık deney grubunda  $4.6\pm 0.4$  olarak tespit edildi. Çalışmalar arasında görülen farklılıklar çalışmalarda kullanılan sıçan türlerinin farklılığından, çalışma ortamının farklılığından ve çalışmayı ve skorlamayı yapan kişilerin farklılığından olabilir.

Sonuç olarak şunu diyebiliriz ki, anti FGF-9 ilave edilen sıçan serumunda kültüre edilen embriyoların gelişim düzeyleri normal sıçan serumunda kültüre edilen embriyolara göre gerilemektedir. Bu gerileme toplam morfolojik skorda çok bariz olarak görülürken, morfolojik skorlama yönteminde kullanılan parametreler tek tek ele alındığında bazı parametrelerde daha az gerileme görülürken bazı parametrelerde daha belirgin gerilemeler görülmektedir. Kültür ortamına ilave edilen anti FGF-9 miktarı arttıkça gerileme çok daha bariz olarak görülmektedir.

Anti FGF-9'u kültür ortamına ilave ederek FGF-9'un nötralizasyonu gerçekleştirmek suretiyle yaptığımız bu çalışmada, anti FGF-9'un *in vitro* embriyo kültürü üzerindeki etkisini direkt olarak gözlerken aynı zamanda FGF-9'un embriyo gelişimi üzerindeki etkisini de dolaylı olarak inceleme imkanı bulduk.

## 6. KAYNAKLAR

1. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Çeviri Editörü: Çevikbaş U. Basic Pathology (Temel Patoloji). İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti. 2000; 51.
2. Ford-Perriss M, Abud H. and Murphy M. Fibroblast growth factors in developing central nervous system. *Clinical and Experimental Pharmacology* 2001; 28: 493-503.
3. Ortíz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2001; 2: 1-12.
4. Böttcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine Reviews* 2005; 26: 63-77.
5. Hossain WA, Morest DK. Fibroblast Growth Factors (FGF-1, FGF-2) Promote Migration and Neurite Growth of Mouse Cochlear Ganglion Cells In Vitro: Immunohistochemistry and Antibody Perturbation. *Journal of Neuroscience Research* 2000; 62: 40-55.
6. Presta M, Dell'Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Reviews* 2005; 16: 159-178.
7. Tsai SJ, Wu MH, Chen HM, Chuang PC, Wing LYC. Fibroblast Growth Factor-9 Is an Endometrial Stromal Growth Factor. *Endocrinology* 2002; 143: 2715-2721.



8. Wing LYC, Chuang PC, Wu MH, Chen HM, Tsai SJ. Expression and Mitogenic Effect of Fibroblast Growth Factor-9 in Human Endometriotic Implant Is Regulated by Aberrant Production of Estrogen. *The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism* 2003; 88: 5547-5554.
9. Martin GR. The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs. *Genes&Development* 1998; 12: 1571-1586.
10. Şahin D, Özbay NÖ. *Patoloji&Histoloji*. Tusem Tıbbi Yayıncılık 2006; 51.
11. Powers C.J, McLeskey S.W, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer* 2000; 7: 165-197.
12. Hagedorn M, Bikfalvi A. Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 2000; 34: 89-110.
13. R&D Systems, Inc 614 Mckinley Place NE Minneapolis, MN 55413  
<[http://www.rndsystems.com/mini\\_review\\_detail\\_objectname\\_MR01\\_FGFs.aspx](http://www.rndsystems.com/mini_review_detail_objectname_MR01_FGFs.aspx)>  
(10.07.2007).
14. Goldfarb M. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Reviews*. 1996; 7: 311-325.
15. Santos-Ocampo S, Colvin J.S, Chellaiah A, Ornitz D.M. Expression and Biological Activity of Mouse Fibroblast Growth Factor-9. *The Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 1726-1731.
16. <http://www.sigma.sial.com>. 17.07.2007.
17. Miyakava K, Hatsuzawa K, Kurokawa T, Asada M, Kuroiwa T, Imamura T. A Hydrophobic Region Locating at the Center of Fibroblast Growth Factor-9 Is Crucial for Its Secretion. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 29352-29357.
18. Govindarajan V, Overbeek PA. FGF9 can induce endochondral ossification in cranial mesenchyme. *BMC Developmental Biology* 2006; 6: 1-14.
19. Fakhry A, Ratisoontorn C, Vedhachalam C, Salhab I, Koyama E, Leboy P, Pacifici M, Kirschner RE, Nah HD. Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: Differentiation stage- dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. *Bone* 2005; 36: 254-266.
20. Beyer TA, Werner S, Dickson C, Grose R. Fibroblast growth factor 22 and its potential role during skin development and repair. *Experimental Cell Research* 2003; 287: 228-236.

21. Nakatake Y, Hoshikawa M, Asaki T, Kassai Y, Itoh N. Identification of a novel fibroblast growth factor, FGF-22, preferentially expressed in the inner root sheath of the hair follicle. *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1517: 460-463.
22. Umemori H, Linhoff MW, Ornitz DM, Sanes JR. FGF22 and its close relatives are presynaptic organizing molecules in the mammalian brain. *Cell* 2004; 118: 257-270.
23. Yamashita T. Structural and biochemical properties of fibroblast growth factor-23. *Therapeutic Apheresis and Dialysis* 2005; 9: 313-318.
24. Erik A. Imel, Munro Peacock, Pisit Pitukcheewanont, Howard J. Heller, Leanne M. Ward, Dorothy Shulman, Moustapha Kassem, Paula Rackoff, Mark Zimering, Alan Dalkin, Elaine Drobny, Giacomo Colussi, Joseph L. Shaker, Elizabeth H. Hoogendoorn, Siu L. Hui and Michael J. Econs. Sensitivity of Fibroblast Growth Factor 23 Measurements in Tumor-Induced Osteomalacia. *The Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism* 2006; 91: 2055-2061.
25. Nishida S, Nagamine H, Tanaka Y, Watanabe G. Protective Effect of Basic Fibroblast Growth Factor Against Myocyte Death and Arrhythmias in Acute Myocardial Infarction in Rats. *Circulation Journal* 2003; 67: 334-339.
26. Ülger H, The Growth Promoting Effects Of bFGF, VEGF and PD-ECGF On Embryonic Development and Yolk Sac Vascularisation, PhD Thesis, Department of Human Anatomy and Cell Biology University of Nottingham, England 1997.
27. Hebel R, Stromberg MW. Anatomy and embryology of the laboratory rat. *BioMed Verlag* 1986; 231-251.
28. Hacıoğlu M. Interleukin-12'nin Embriyonik Vitellus Kesesi Damarlanması Üzerine Etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri. Ağustos 2005.
29. Jollie WP. Development, morphology and function of the yolk sac placenta of laboratory rodents. *Teratology* 1990; 41: 361-381.
30. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: A Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma. *Cell* 1994; 79: 315-328.
31. New D. A. T. and Stein K. F. Cultivation of post-implantation mouse and rat embryos on plasma clots. *J Embryol Exp Morphol* 1964; 12: 101-111.
32. Waddington CH. and Waterman AJ. The development in vitro of young rabbit embryos. *Journal of Anatomy* 1933; 7: 355-370.

33. Karabulut, A. K. "In vitro rat embriyo kültürü ve uygulama alanları", XVIII. Gevher Nesibe Tıp Gnleri III. Deneysel ve Klinik Araştırma Kongresi ve "Workshop"u, Kongre Kitabı, ss:16-24, 18-20 Mayıs 2000, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.
34. Brown N.A, Fabro S. Quantitation of rat embryonic development in vitro: A morphological scoring system. *Teratology* 1981; 24: 65-78.
35. lger H, zdamar S, Unur E, Pratten M.K. The effect of vascular endothelial growth factor on in vitro embryonic heart development in rats. *Anatomy Histology Embryology* 2004; 33: 334-338.

## ÖZGEÇMİŞ

09.09.1981 yılında KIRŞEHİR/Kaman'da doğdu. İlköğrenimini İskenderun Demirçelik İlkokulunda, orta öğrenimini ve lise öğrenimini İskenderun Demirçelik Lisesi'nde tamamladı. Gazi Üniversitesi Kırşehir Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik bölümünden 2004 eğitim-öğretim yılının bahar döneminde mezun oldu. Mezun olduktan sonra 1,5 yıl Ankara'da Başkent Üniversitesi Hastanesi'nin Pediatri Yoğun Bakım ünitesinde hemşirelik yaptı. Daha sonra 2005 yılı Eylül ayı içerisinde Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalında Yüksek Lisans programına başladı.