

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

**INTERLEUKİN-12'NİN EMBRİYONİK VİTELLUS  
KESESİ DAMARLANMASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Tezi Hazırlayan  
Mehtap HACIALİOĞULLARI**

**Tezi Yöneten  
Doç. Dr. Harun ÜLGER**

**Anatomi Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Ağustos 2005  
KAYSERİ**

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

**INTERLEUKİN-12’NİN EMBRİYONİK VİTELLUS  
KESESİ DAMARLANMASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Tezi Hazırlayan  
Mehtap HACIALİOĞULLARI**

**Tezi Yöneten  
Doç. Dr. Harun ÜLGER**

**Anatomi Anabilim Dalı  
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma fonu tarafından SBY-04-18 nolu proje  
ile desteklenmiştir.**

**Ağustos 2005  
KAYSER**

**TEZ ONAY FORMU**

**Doç.Dr.Harun ÜLGER**'in danışmanlığında **Mehtap HACIALİOĞULLARI** tarafından hazırlanan “**Interleukin-12'nin embriyonik vitellus kesesi damarlanması üzerine etkileri**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Anatomi** Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**03 /08/ 2005**

**JÜRİ**

**İmza**

**Üye : Prof. Dr. Kenan AYCAN**

**Üye : Doç. Dr. Harun ÜLGER (Danışman)**

**Üye : Yrd. Doç. Dr. Ayhan DÜZLER**

**ONAY**

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

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

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

## TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakóltesi Anatomi Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde yardım ve desteğini esirgemeyen, tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Harun ÜLGER'e, bilimsel destek sağlayan Anatomi Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Kenan AYCAN'a, çalışma süresince yardımlarını esirgemeyen Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof.Dr. Saim ÖZDAMAR'a, Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyelerimizden Sayın Doç.Dr. Nihat EKİNCİ'ye, Sayın Doç.Dr.Erdoğan UNUR'a, Veteriner Fakóltesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyelerine, katkılarından dolayı Anatomi Anabilim Dalı asistanlarına, personeline ve DEKAM çalışanlarına, her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen sevgili AİLEME çok teşekkür ederim.

## INTERLEUKİN-12’NİN EMBRİYONİK VİTELLUS KESESİ DAMARLANMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

### ÖZET

Günümüzde “anjiogenik hastalıklar” olarak isimlendirilen ve patolojik damarlanmayla karakterize edilen hastalıkların sayısı gittikçe artmaktadır. Memelilerde normal morfolojik gelişim için elzem olan damarlanma erken embriyogenez esnasında başlar. Sıçanlarda, embriyonik damar gelişimi gebeliğin 9,5. gününde gelişmeye başlar ve yaklaşık 11.-12. günlerde büyük ölçüde gelişimini tamamlar. 9,5 ve 11,5 günlük embriyonik periyodu kapsayan in vitro embriyo kültürü tekniği, vitellus kesesi damarlanması üzerinde anjiogenik ve antianjiogenik maddelerin etkilerinin çalışılabileceği uygun bir model olabilir. Sunulan çalışmada, embriyo kültür ortamına, bir antianjiogenik faktör olan Interleukin-12 (IL-12) ilave ederek embriyonik vitellus kesesi damarlanması üzerine olan etkisi araştırıldı. 48 saatlik kültür periyodu sonunda değişik dozlardaki (50 ng/ml, 100 ng/ml ve 200 ng/ml) IL-12’nin embriyolar üzerine etkisi morfolojik olarak değerlendirildi. Morfolojik skorlama sistemine göre toplam morfolojik skor, vitellus kesesi çapı, embriyo baş-kıç uzunluğu ve somit sayısı karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre deney gruplarında anlamlı bir gerilemenin olduğu tespit edildi. Vitellus kesesi damarlanmasında ve kalp gelişiminde de bir gerileme mevcuttu. Sonuçlar, IL-12’nin antianjiogenik etkisine bağlı olarak embriyonik gelişimde bir gerilemenin olabileceğini ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** 1. interleukin 12 2. damarlanma 3. vitellus kesesi 4. embriyo kültürü

## **EFFECT OF INTERLEUKIN 12 (IL-12) ON EMBRYONIC YOLK SAC VASCULARISATION**

### **ABSTRACT**

In the recent days diseases were increased known as“angiogenic disease” and characterized by patologic vascularisation. In the rat, development of embryonic vessel started to occur 9,5 day of gestation. The vascular system starts development in the very early stage of embryo in the mammals. The rat embryo circulation system completed to majority of development approximately day of 11.-12. Including at 9,5 ve 11,5 days embryonic period in vitro embryo culture could be suitable model to study effects of angiogenic and antiangiogenic substances on yolk sac vascularisation. In the present study, the effects of Interleukin-12 (IL-12), an antiangiogenic factor, investigated on the yolk sac vascularisation in addition to serum during the in vitro embryo culture. After 48 hours culture period, effects of the different doses of IL-12 (50 ng/ml, 100 ng/ml ve 200ng/ml) were estimated morphologically. According to morphologic scoring system, total morphologic score, yolk sac diameter, crown rump length and somite number were retarded in all experimental groups when compared to control. This developmental retardations were statically significant. There were also poor development in the yolk sac vascularisation and the heart. As a result, the IL-12 could cause developmental retardation of embryo because of its antiangiogenic effect.

**Key Words** :1. interleukin 12 2. vascularisation 3. yolk sac 4. embryo culture

## VI

### İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇ KAPAK .....	/
KABUL ONAY SAYFASI .....	II
TEŞEKKÜR .....	III
ÖZET .....	IV
ABSTRACT .....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
KISALTMALAR .....	VIII
RESİM VE TABLO LİSTESİ .....	IX
1.GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. IN VITRO SIÇAN EMBRİYO KÜLTÜRÜ .....	3
2.1.1. In Vitro Kültür Sistemlerinin Tarihçesi .....	3
2.1.2. In Vitro Kültür Sistemlerinin Önemi .....	4
2.1.3. In Vitro Olarak Büyütülen Embriyolarda Büyüme ve Gelişmenin Değerlendirilmesi .....	5
2.2. EMBRİYONİK GELİŞİM .....	7
2.2.1. Erken Dönem Embriyonik Sıçan Gelişimi .....	7
2.2.2. Sıçan Visseral Vitellus Kese'sinin Yapısı ve Görevi .....	8
2.2.3. Embriyoda Erken Dönem Damar Gelişimi .....	9
2.3. DAMARLANMAYI ETKİLEYEN FAKTÖRLER .....	11
2.3.1. Interleukin-12 (IL-12) .....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	15
3.1 DENEY HAYVANLARININ SEÇİMİ VE ÇİFTLEŞTİRİLMESİ.....	15
3.1.1. Sıçanlarda Estrus Döngüsü .....	17
3.2. EMBRİYO KÜLTÜRÜ .....	19

	<b><u>Sayfa no</u></b>
3.2.1. Kùltür Ortamının (Serum) Hazırlanması .....	19
3.2.2. Embriyoların Anne Karnından Çıkarılışı ve Kùltürü.....	19
3.2.3. IL-12'nin In Vitro Şartlarda Embriyonik Gelişim Üzerine Etkisi ....	24
4. BULGULAR .....	25
5.TARTIŞMA VE SONUÇ .....	30
6. KAYNAKLAR .....	34
ÖZGEÇMİŞ .....	41



**KISALTMALAR**

aFGF	: Asidik fibroblast büyüme faktörü
bFGF	: Bazik fibroblast büyüme faktörü
dk	: Dakika
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
IFN- gama	: Interferon gama
IL-12	: Interleukin-12
Kda	: Kilo Dalton
MAF	: Makrofaj aktive edici faktör
MS	: Morfolojik skor
NK	: Natural killer
TNF- $\alpha$	: Tümör nekrozis faktör- $\alpha$
TNF- $\beta$	: Tümör nekrozis faktör- $\beta$
VEGF	: Vasküler endotel hücre büyüme faktörü
LAK	: Lenfokin ile aktive edilmiş killer hücre

## TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 4.1.</b> Sıçan serumu ve IL-12'nin toplam embriyonik gelişim üzerine etkisi .....	<b>27</b>
<b>Tablo 4.2.</b> Kontrol grubu ile deney grubunun kalp gelişimi .....	<b>28</b>
<b>Tablo 4.3.</b> Kontrol grubu ile deney grubunun vitellus kesesi damarlanması .....	<b>29</b>

**RESİM LİSTESİ**

	<b>Sayfa No</b>
<b>Resim 3.1.</b> Dişi sıçanların kafesteki görünümü .....	<b>16</b>
<b>Resim 3.2.</b> Dişi sıçanların yakından görünümü .....	<b>16</b>
<b>Resim 3.3.</b> Dişi sıçanlardan elde edilen yayma preparatlarda estrus döngüsü: A-Diestrus evresi, B-Proestrus evresi.....	<b>18</b>
<b>Resim 3.4.</b> Dişi sıçanlardan elde edilen yayma preparatlarda estrus döngüsü: A-Estrus evresi, B-Metestrus evresi.....	<b>18</b>
<b>Resim 3.5.</b> Dişi ve erkek sıçanlardan serum için kan alımı .....	<b>20</b>
<b>Resim 3.6.</b> Gebe sıçanlardan embriyoların çıkarılışı .....	<b>21</b>
<b>Resim 3.7.</b> Embriyoların ekstraembriyonik dokudan çıkarılışı .....	<b>22</b>
<b>Resim 3.8.</b> Oksijen tüpleri ve lamin-air flow .....	<b>23</b>
<b>Resim 3.9.</b> Roller inkübatör .....	<b>23</b>
<b>Resim. 4.1.</b> Sıçan serumunda büyüyen 11,5 günlük sıçan embriyoları .....	<b>26</b>
<b>Resim 4.2.</b> Kültür ortamına 200 ng/ml IL-12 ilave edildikten sonraki 11,5 günlük sıçan embriyoları .....	<b>26</b>



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan vücudunun fonksiyonel parçaları olan organlar milyonlarca hücrenin bir araya gelmesi ile oluşur. Bir organın görev yapabilmesi için glikoz, mineral ve oksijen v.s. gibi materyallerin kan içerisinde damarlar aracılığı ile hücrelere ulaştırılması gerekir. Damar gelişimi embriyogenez esnasında, kadın üreme sisteminde ve yaraların iyileşmesinde ortaya çıkan normal bir durum iken solid tümör büyümesi, proliferatif retinopati ve rheumatoid arthritis ile ilgili olduğu zaman patolojik bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde “anjiogenik hastalıklar” olarak isimlendirilen ve patolojik damarlanmayla karakterize edilen hastalıkların sayısı gittikçe artmaktadır. Folkman tarafından solid tümör gelişiminin damar gelişimine bağlı olduğu rapor edildikten sonra fizyolojik ve patolojik damarlanmayı doğrudan ya da dolaylı olarak etkileyen faktörlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve saflaştırılması alanındaki çalışmalar oldukça artmıştır. Günümüzde yaygın olarak kullanılan kanser tedavi yöntemlerinin (kemoterapi ve radyoterapi gibi) birçok yan etkilerinin varlığı bilinmektedir. Son zamanlarda yapılan birçok deneysel çalışma antianjiogenik faktörlerin insan için zararlı olmadığını ve kanserle mücadelede halen kullanılan tedavi yöntemlerine göre daha az yan etkiye sahip bir tedavi yöntemi olabileceğine işaret etmektedir .

Sıçanlarda, embriyonik damar gelişimi gebeliğin 9,5. gününde gelişmeye başlar. Somitler gelişmeye başladığı sırada vitellus kesesinde de kan adacıkları oluşur ve bu kan adacıkları daha sonra birleşerek ilk damar ağını meydana getirir. Sıçan

embriyosunda dolaşım sistemi yaklaşık 11.-12. günlerde büyük ölçüde gelişimini tamamlar. 9,5 ve 11,5 günlük embriyonik periyodu kapsayan in vitro embriyo kültürü, vitellus kesesi damarlanması üzerinde anjiogenik ve antianjiogenik maddelerin etkilerinin çalışılabileceği uygun bir model olabilir.

Bir antianjiogenik faktör olan Interleukin-12 (IL-12), doğuştan gelen ve sonradan oluşan bağışıklığın Őekilleri arasında önemli rol oynayan bir sitokindir. Fagositik hücreler, B hücreleri, dentritik hücreler ve muhtemelen enfeksiyona neden olan ajanlarla karşılaştığında diğer hücreler tarafından da üretilen IL-12, özellikle interferon gama (IFN- gama) gibi sitokinlerin üretimi ve çoğalmasını indükleyerek ve lenfositlerin sitotoksik aktivitesini ve çoğalmasını arttırarak T lenfositleri ve natural killer (NK) hücreleri üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir. Bir heterodimerik molekül olan IL-12, biyolojik olarak aktif 74 kilo Dalton (kDa) molekül byklğine sahip bir disulfid bağ ile bağlanan bir  $\alpha$ -zincir ve bir  $\beta$ -zincir'den oluşmuştur. IL-12'nin T lenfositler ve NK hücreleri gibi efektör hücreleri aktive ederek ve IFN-gama gibi sitokinleri indükleyerek tümör gelişimini engelleyici etkisi birçok araştırıcı tarafından rapor edilmiştir.

Yapılan literatür taramasında bir antianjiogenik faktör olan IL-12'nin embriyonik damarlanmaya etkisi ile ilgili çok az çalışmaya rastlanmıştır. Bu alışmada, IL-12'nin embriyonik vitellus kesesi damarlanması üzerine olan etkisinin in vitro Şartlarda 9,5-11,5 günlük embriyonik gelişim sürecini içeren dönemde araştırılması amaçlanmıştır. Bir antitümöral ve antianjiogenik faktör olduğu daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilen IL-12'nin embriyonik vitellus kesesi damarlanması üzerindeki etkileri IL-12 antianjiogenik etkileri hakkında bilinenlere katkı sağlayacağı kanaatindeyiz

## **2. GENEL BİLGİLER**

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

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

Implantasyon sonrası embriyo kültürü denemeleri 1930'larda başlamasına rağmen 1960 yılındaki thalidomit faciasına kadar yaygın hale gelmemiştir. İlk denemelerde Waddington ve Waterman (1) tavşan embriyolarını plazma pıhtısı üzerinde 6-9 somit aşamasına kadar büyütmuşler, bunu Nicholas ve Rudnick'in heparinize edilmiş sıçan plazmasında sıçan embriyolarını kültür etmeleri izlemiştir (2). 1960'lara kadar kayda değer bir gelişme olmamış, 1964'te New ve Stein (3), 9-10 günlük sıçan embriyolarının sıçan serumunda plazma pıhtısında olduğu kadar iyi büyüebildiğini göstermiş ve bunu takiben New ve arkadaşları (4) Cambridge'de bu tekniği geliştirmişlerdir. Bu dönemden sonra, sıçan embriyosu kültürü tekniği bir çok araştırmacı tarafından benimsenmiş ve çalışmalarında kullanılmıştır.

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 (5).

In vitro sıçan embriyo kültürü; normal embriyonik büyüme ve gelişme için gerekli faktörlerin tanımlanmasında, toksik ve teratojen ajanlar ile ilaçların organogenez döneminde embriyonun büyüme ve gelişmesi üzerine etkilerinin incelenmesinde ve ayrıca visseral vitellus kesesi kültüründe kullanılmaktadır (5).

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

Gelişen teknoloji insanların hayatını kolaylaştırırken, teknolojinin üretilmesi sırasında 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 etmekte kalmayıp aynı zamanda anne karnında gelişmekte olan embriyo veya fetus üzerinde de istenmeyen etkiler yaparak hastalanmasına, sakat doğmasına hatta ölümüne sebep olmaktadır (5).

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 ve bunu takiben diğer çevresel etkenler ve farmakolojik ajanların (Thalidomit gibi) doğumsal defektlere yol açabileceğinin gösterilmesi (6) "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 (5).

Embriyonik gelişmenin en kritik dönemi, teratojenlerin büyük olasılıkla malformasyona yol açtıkları dönem olan ana organ taslaklarının geliştiği dönemdir (insanda 15-60., sıçanlarda 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 deneysel hayvan çalışmaları önem kazanmış ve bu amaçla



in vivo (canlıda) ve in vitro (organizma dışında) çalışmalar eş zamanlı olarak yürütülmüştür (5).

Memeli gelişimi sürecinde bütün ana organ sistemleri embriyonun uterus duvarına implantasyonundan 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 oldukça küçük boyuttadırlar. In vivo çalışmalarda karşılaşılan anne metabolizmasındaki fizyolojik farklılıklar hayvan deneylerinden elde edilen sonuçların insan için yorumlanabilmesini zorlaştırmaktadır. Çünkü teratojenler türe özgü değişiklik gösterebilir (5).

### **2.1.3. In Vitro Olarak Büyütülen Embriyolarda Büyüme ve Gelişimin Değerlendirilmesi**

Son yıllarda postimplante kemirgen embriyo kültür teknikleri, yaklaşık in vivo'daki gibi embriyoların büyümesini ve gelişmesini sağlamaktadır (4). Teratojenik aktivite hakkında maternal çevrenin karmaşık etkisini ortadan kaldırmak için in vitro ortamda büyüyen memeli embriyoların gelişmeye devam etme olasılığı özellikle teratolojistlerin dikkatini çekmiştir. Postimplante embriyo kültürü, ajanların toksitesinin doğrudan embriyo kültürü üzerinde araştırılmasını kolaylaştırmaktadır (4,7).

Embriyonun büyüme ve gelişmesini kantitatif olarak hesaplamada tanımlayıcı parametreler kullanılmalıdır. Objektif skorlama sistemi morfolojik gelişimi ölçmek üzere tasarlanmıştır. Skorlamada en geçerli ve sık kullanılan Van Maele-Fabry ve ark. (8) tarafından geliştirilen skorlamadır. 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. 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,

¼ oranında rotasyon varsa 1 puan, ½'lik bir rotasyon varsa 2 puan ¾'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 (8).

Her bir embriyo için skorların toplam sayısal değeri morfolojik skor (MS) olarak değerlendirilir. Ayrıca morfolojik skora embriyonik yaşı belli olan embriyolar için kullanılır. Embriyo kültür deneylerinde morfolojik skora sistemin kullanımı embriyonik gelişimin ayrıntılı indeksini verir. Spesifik primordia'nın yavaşlamasının ve dismorfogenezin bulunmasına yardımcı olur. Gelişim ve büyümenin kantitatif olarak karşılaştırılmasına olanak sağlar (8).

## 2.2. EMBRİYONİK GELİŞİM

### 2.2.1. Erken Dönem Embriyonik Sıçan Gelişimi

Sıçan ve insanın embriyonik gelişimi arasındaki en önemli fark gebelik süresidir. Bu süre sıçanlarda 21-22 gün, insanlarda ise yaklaşık 267 gündür (9). Cleavage ve blastula safhası benzerlik gösterir. Blastosist safhasından sonra, sıçan embriyo gelişimi bazı yerlerde farklıdır (10).

Sıçanlarda fertilizasyon ve hücre bölünmesi (cleavage ve morula safhası) tuba uterinayı geçerken meydana gelir ve dördüncü günde zona pellucida kaybolurken erken blastosist evresine geçer. 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 (10).

Reichert's membranı ilk olarak gebeliğin altıncı gününde trophoctoderm 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 kompartıman amniyotik boşluğun ya da eksosölomun genişlemesinden dolayı iki boşluğa dönüşür, ekto-plasental boşluk oblitere olmaya başlar. Zemini koriyon olan ekto-plasental boşluk ekto-plasental konun dokusuyla birleşir. Aynı zamanda primitif çizginin üst kısmındaki bir alandan eksosölomun içine doğru allantois gelişir (10).

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 karşında gelişir ve ekto-plasental kon ile birleşir. Bu zamanda, embriyo ventral olarak konveks olup hemen katlanmaya başlar ve kuyruğu kıvrılır. Katlanma olayı embriyo 11,5 günlükken tamamlanır ve 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 gelişir. Sıçan embriyosu 12,5 günlükken bütün organlar belirgindir ve bu durum insanlarla karşılaştırıldığı zaman 8. haftaya denk gelir (9). 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 (10).

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

Bütün kemirgenlerin ekstraembriyonik membran yapısı trofoblast, Reichert's membranı, parietal vitellus kesesi endodermi, vitellus kesesi boşluğu gibi yapılar visseral vitellus

kesesi endoderminden gelişir. Visseral vitellus kesesi, embriyo ve ektoplasental konu birleştirir. 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 (11). 10 günlük sıçan embriyolarının visseral vitellus kesesi yokluğunda kültürde büyümesi ve gelişmesinin mümkün olmadığı rapor edilmiştir (12). Erken organogenez sırasında vitellus kesesi embriyo ve anne arasındaki en büyük taşıyıcıdır (13,14). Embriyonun implantasyonundan koryoallantoik plasentanın fonksiyonel hale geçişinin başlangıcını kapsayan bu erken dönemde embriyonun besin ihtiyacı histiotrofik beslenme ile olur. Sıçanlarda bunu vitellus kesesi sağlar (15). Visseral vitellus kesesi, etrafında bulunan makromolekülleri pinosite etme kapasitesine sahiptir. Endodermal hücrelerle makromoleküller lizozoma taşınır, sindirilir ve ürün geliştirmekte olan embriyoya iletilir (16). 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 (17).

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

Dolaşım sistemi, embriyonun hızlı gelişmesine bağlı olarak metabolik ihtiyaçların karşılanabilmesi için ilk olarak gelişmeye başlar (18). 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. Bu olay gelişimi devam eden pek çok organ için önemlidir (19). Embriyoda dolaşım sisteminin gelişimi iki yolla olur. Birincisi vaskulogenez olup pluripotent mezodermal prekürsörlerin endotel hücrelerine farklılaşması şeklinde oluşur (20). 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 (21). Vaskulogenez erken embriyonik

periyotta meydana gelirken, angiogenez hem embriyoda hem de tüm yaşam boyunca devam eder (22-24).

Embriyoda, ekstraembriyonik damarlanma embriyodaki damarlanmadan önce ve her biri bağımsız olarak gelişir, sonra birleşir ve dolaşımın devamlılığını sağlar (25). Hem damar endoteli hem de kan hücreleri embriyoda farklı bölgelerde lokalize olan mezenşimal hücre gruplarından meydana gelir. Embriyoda somitlerin gelişmeye başladığı dönemde, vitellus kesesi üzerinde kan adacıkları oluşmaya başlar. Kan adacıklarının ortasında kalan hücreler kan hücrelerini oluştururken periferdeki hücreler endotele dönüşür. Kan adacıkları birleşerek ilk damar ağını oluşturur (26-28). Endotel hücrelerin farklılaşması ayrıca embriyo içinde de devam eder. Embriyo içindeki kan damarları vaskulogenez ve angiogenez ile şekillenir. Farklılaşan anjioblastlar mezoderm içinde ilk kılcal ağı oluşturur ve daha sonra büyük damarlar (dorsal aorta ve aortik arklar) kaynaşarak yeni büyük damarları oluştururlar. Endodermal organların damarlanması (örneğin akciğer, pankreas, mide ve bağırsak gibi) endotel hücrelerin farklılaşmasıyla oluşur (22). Bu durum hem organ damarlanmasının mekanizması hem de endotel hücre farklılaşması için çok önemli bir bulgudur. Diğer taraftan, bazı organların damarlanması açık bir şekilde angiogeneze bağlıdır. Beyin ve böbrek gibi organların damarlanması organogenezin erken döneminde buraya göç eden endotel hücreleri tarafından oluşturulur (28). İntra ve ekstra-embriyonik damarlanma bazı morfolojik farklar gösterir. Örneğin kan adacıkları embriyo içinde şekillenmez ve yalnız angioblastlar amniote embriyolardaki vitellus kesesiyle ilişkili olduğu nadir görülen bir olaydır (29). Bununla birlikte, endotelial veziküllerin kaynaşması, endotel kanallardan gelenlerle tomurcuklanması ve dallanması, bunların birbiriyle ve veziküllerle kaynaşması tümüyle her iki bölgede birbirine benzer.

Sıçanlarda, mezodermal germ tabakası şekillendiği zaman (yaklaşık olarak gebeliğin 9,5. gününde) kan damarların ilk gelişimi de başlar (28). Somitler şekillenmeye başladığı için kan adacıkları vitellus kesesinin duvarında gelişir ancak embriyonun gövdesinde gelişen damarlarla damar bağlantısı yoktur. Kan damarları şekillendikten sonra bu damarların birleşmesi sonucunda ilk damar ağı oluşur (23,27). Rudimenter halde olan kalp embriyo 6 somite ulaştığında hızlı bir şekilde gelişmeye başlar. İlk göze çarpan embriyonun ön kısmındaki mezoderm tabakasının kalınlaşmasıdır. Aynı zamanda sadece mezodermal hücreler birleşerek endotel tüpü oluşturur. Bu endotel tüp,

dorsal aortaları yapacak olan birinci aortik arkusla devam eder. 9. günde belli olan ön kardinal ven, nöral tüpün kapiller ağından gelen kanı alır. Dorsal aorta somit dizisinin ventralinde görülebilir. Kalp bundan sonra kan dolaşımını devam ettirebilme yeteneğindedir (30). Gebeliğin 11-12. gününde plasental dolaşımın oluşmasıyla besleyici molekülleri vitellus kesesinden embriyoya damarlar aracılığıyla taşınır (10).

### **2.3. DAMARLANMAYI ETKİLEYEN FAKTÖRLER**

Kan damarlarının gelişmesinin uyarılması çeşitli kimyasal, metabolik ve mekanik faktörler aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. Bu uyarma ayrıca kan akışı ve çevre dokunun büyümesindeki değişikliklerle de olabilir. Yeni damar şekillenmesi birçok anjiogenik faktöre bağlı olabilir. Bu anjiogenik faktörler, bağ dokusu içerisinde bulunan endotel hücrelerin hem çoğalmasını hem de göç etmesini başlatır ve yönetir (31). Anjiogenez fizyolojik şartlarda üst düzeyde denetim altına alınmış bir hadisedir. Embriyonik gelişim esnasında, yaraların iyileşmesinde ve menstrual siklusta görülen normal bir fizyolojik olay iken, tümör gelişiminde, diyabetik retinopati ve psoriasis'de kontrol edilemeyen ve patolojik şartlarda gelişen bir anjiogenez görülür (32,33). Anjiogenez oluşması bu olayın negatif ve pozitif düzenleyicileri arasındaki çok hassas bir denge aracılığıyla kontrol edilmektedir. Pek çok araştırmacı tümörlerin salgıladığı büyüme faktörleri aracılığıyla anjiogenezi harekete geçirdiğini rapor etmişlerdir. Bu büyüme faktörleri endotel hücre göçünü ve kılcalların çoğalmasını uyarır (34-36).

Son yıllarda çeşitli büyüme faktörlerinin anjiogenezi doğrudan ya da dolaylı olarak indüklediği belirtilmiştir. Düşük molekül ağırlığına sahip büyüme faktörlerinden bazıları şunlardır: epidermal büyüme faktörü (EGF), asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF), tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), tümör nekrozis faktör- $\beta$  (TNF- $\beta$ ), angiogenin, angiotropin, vasküler endotel hücre büyüme faktörü (VEGF) (37).

Hayvanlar üzerinde yapılan prelinik çalışmalarda anjiogenez inhibitörlerinin yeni kan damarı gelişimini bloke ederek tümör gelişimini engelleyebileceği ileri sürülmüştür (38). Birçok doğal ve sentetik anjiogenez inhibitörü günümüzde faz I ve faz II deneme aşamasından geçirilmektedir. Bu anjiogenez inhibitörlerinden bazıları metalloproteinase 1 ve 2, anti-VEGF, inhibitor of platelet-derived growth factor receptor, interferon, IL-1, IL-12, TNF- $\beta$ , retinoic acid, thalidomide, antibodies to integrin (vitaxin, V3), endostatin and angiostatin gibi doku inhibitörlerini kapsamaktadır (39,40).

### 2.3.1. Interleukin-12 (IL-12)

Bir heterodimerik molekül olan IL-12, biyolojik olarak aktif 74 kDa molekül büyüklüğüne sahip bir disulfid bağ ile bağlanan bir  $\alpha$ -zincir ve bir  $\beta$ -zincir'den oluşmuştur (41) ve antianjiogenik bir faktördür. IL-12, doğuştan gelen ve sonradan oluşan bağışıklığın tipleri arasındaki etkileşimde önemli rol oynayan bir sitokindir. Sitokinler; hormonlara benzeyen, nispeten düşük molekül ağırlıklı peptid veya glikopeptidlerdir. Hormonlardan farkları özel bir enzim tarafından değil de bir takım farklı doku ve hücrelerce yapılmasıdır. Sitokinleri hücreler arasında sinyal taşıyan çözülebilir arabulucular olarak tanımlayabiliriz. Gerek doğal gerek spesifik bağışıklığın etkin bir şekilde yapılabilmesi için sitokinlere gereksinim vardır. Bunlar vücut savunmasında rol alan immün ve inflamatuvar hücrelerin çok yönlü iletişim ve etkileşiminden sorumlu oldukları gibi, bağ dokusu, deri, sinir sistemi ve diğer organların somatik hücreleri arasında da iletişim sağlarlar. Hücre büyümesi, yara iyileşmesi, fibrozis, hematopoez ve diğer bir çok biyolojik olayda önemli rolleri vardır. Günümüzde 100'ün üzerinde sitokin bilinmektedir. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak pek çok sitokin üretilebilmektedir (42).

Fagositik hücreler, B hücreleri, dentritik hücreler ve muhtemelen enfeksiyona neden olan ajanlarla karşılaştığında diğer hücreler tarafından da üretilen IL-12, özellikle interferon-gama (IFN-gama) gibi sitokinlerin üretimi ve çoğalmasını indükleyerek ve lenfositlerin sitotoksik aktivitesini ve çoğalmasını artırarak T lenfositleri ve natural killer (NK) hücreleri üzerinde etkili olur (43). IFN-gama bilinen en güçlü makrofaj aktive edici faktör (MAF)'dür. IFN-gama makrofajların mikrobisit etkisini kuvvetlendirir. Muhtemelen TNF'nin de yardımıyla makrofajların tümör hücreleri üzerine sitotoksik etki göstermesine katkıda bulunur. Natural killer hücreler, IgG'nin Fc $\gamma$ RIII olarak bilinen düşük affiniteli reseptörünü ve IL-12'nin p70 ünitesini taşırlar (42). IL-12'nin T lenfositler ve NK hücreleri gibi efektör hücreleri aktive ederek ve IFN-gama gibi sitokinleri indükleyerek tümör gelişimini engelleyici etkisi birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (44-46).

Bir araştırmada in vitro olarak IL-12 aracılığıyla NK hücreleri aktive edilmiştir. Daha sonra aortadan alınan primer endotel hücrenin kültür ortamındaki kuvvetli sitotoksik etkisi gösterilmiş ve bu etkinin IFN-gama antibadisi kullanılarak nötralize edildiği görülmüştür (47). Ayrıca IL-12, damar endoteli büyüme faktörü ve bazik fibroblast



büyüme faktörü gibi endotel mitojenlerinin etkilerini azalttığı ve antitümör etkisinin yanında yüksek derecede keratinizasyon, apoptoz, insan tümörlerinin çoğalmasında azalma ve murin tümörlerinde yoğun nekroz gibi ilginç histolojik değişiklikler olduğu rapor edilmiştir (48).

İnsandaki IL-12'nin biyolojik özellikleri *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda IL-12'nin NK ve T hücre büyüme faktörü gibi davrandığı (49-51), NK/LAK hücre sitotoksik aktiviteyi artırdığı (51-54), sitolitik T hücre cevabını (54) artırdığı ve T ve NK hücreleri aracılığıyla IFN-gama salgılattığı ortaya çıkmıştır (52,55). Ayrıca IFN- $\chi$ , TNF ve diğer sitokinler tek başına ya da birlikte tümör hücreleri üzerinde sitotoksik veya sitostatik etkiye sahiptir. IL-12'nin aktive ettiği NK hücreler sitotoksik aktiviteyi artırarak tümör hücre ölümünü indükler ve tümör, damar endotelin bütünlüğünü bozabilir.

İnsanlardaki damarlaşmanın tam anlamıyla anlaşılması, gelecekte damar hastalıklarını tedavi etmek için yeni stratejilerin geliştirilmesine imkan sağlamaktadır. İnsan vitellus kesesi, damar ve hemopoetik dokular vitellus kesesinde kan adacıklarının büyümesine bağlı olarak gelişir (56,57). Sıçanlarda ise mezodermal germ tabakası şekillendiği zaman kan damarı primordiası gebeliğin 9,5. gününde ortaya çıkar (58). Kan adacıkları, somitler şekillenmeye başladığı zaman vitellus kesesi duvarında gelişir ancak embriyoda gelişen damarlarla bir damar bağlantısı yoktur. Kan adacıkları oluşuktan sonra bu kan adacıkları birleşerek ilk damar ağı meydana gelir (59,60). Besin molekülleri damarlar aracılığıyla vitellus kesesinden embriyoya transfer edildiği zaman dolaşım sistemi gebeliğin 11-12. gününde oluşur. Bu zamana kadar embriyonun 2 plasentası, bir korioallantoik plasentası ve bir damarlanmış vitellus kese plasentası vardır. Allantoik plasenta gebeliğin sonraki safhalarında önemli olmasına karşın embriyonik gelişim periyodu sırasında vitellus kesesi esas besleyici organdır.

Organogenez döneminde sıçan embriyolarını kültüre etmek mümkündür (4). Bu *in vitro* yöntem hem normal hem de anormal gelişimi ve teratojenik mekanizmaları araştırmada kullanılmaktadır. Organogenez dönemde kan dolaşımı ve kalp atımı başlamıştır. Özellikle visseral vitellus kesesi 48 saatlik *in vitro* periyodundan sonra damarsız bir dokudan vitellus damar ağına dönüşür. Embriyolu ve embriyosuz vitellus kesesi kültür teknikleri kullanılarak antianjiogenik faktörlerin anjiogenik etkileri embriyonik gelişim ve damarlanmada çalışılabilmektedir. Organogenez dönemde anjiogenik ve

antianjiogenik faktörlerin teşhisi patolojik damar gelişimi tümör şekillenmesini sınırlamada çok önemli bir ipucu olabilir.

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

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

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen Wistar türü dişi sıçanlar kullanıldı. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde 21°C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında su ve besin ihtiyaçları sağlandı (Resim 3.1 ve Resim 3.2).

Sıçanlar polyestrous'dur ve ovulasyon doğal bir şekilde oluşur. Sıçanların estrus siklusu 4 ya da 5 gün sürer. Hayvanlar karanlık periyodun ortasında çiftleşmeye meyillidirler (61). 150-250 gr ağırlığındaki 4-10 aylık dişiler döllenme yeteneği olan erkeklerle bir kafese konulmadan önce vajinal smear alınarak estrus siklusuna bakıldı ve estrus ve proestrus periyodundaki dişiler bir gece boyunca (saat 17.00 ile 9.00 arası) erkek sıçan ile aynı kafeste tutuldu. Sabah erkeklerden ayrılan dişilerden tekrar vajinal smear alınarak sperm olup olmadığına bakıldı. Vajinal smearde sperm görülen dişiler 0.5 günlük hamile olarak kabul edildi ve ayrı bir kafese alınıp normal diyet ile beslenerek 9 gün bekletildi.



**Resim 3.1.** Dişi sıçanların kafesteki görünümü



**Resim 3.2.** Dişi sıçanların yakından görünümü

### 3.1.1. Sıçanlarda Estrus Döngüsü

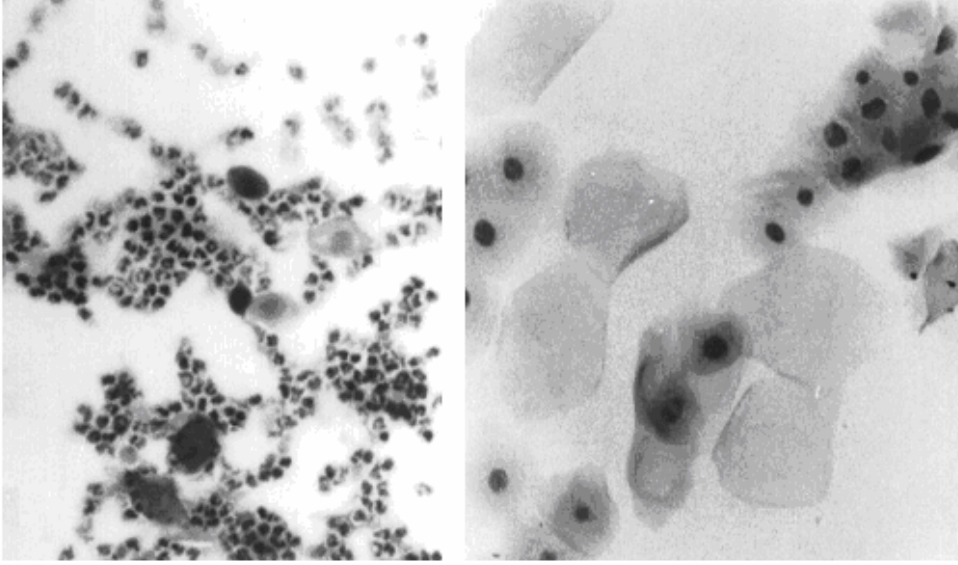
Sıçan estrus döngüsü 4 periyoda ayrılır. Bu periyotlar bir döngü içinde ve birbiri ardına oluşurlar. Ancak gebelik, çiftleşme sonrası dönem ve hemen doğum sonrası dönemde görülmez (anestrus). Sıçanın siklusunu tespit ederken vajinasındaki epitel döküntü şekline ve lökosit sayısına göre karar verilir.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

**Diestrus evresi;** ortalama 57 saat sürer. Yayma preparatlarda çok ince bir mukus içine karışmış çok sayıda lökosit ve bir kaç nukleuslu epitel hücresi görülmektedir (Resim 3.3A).

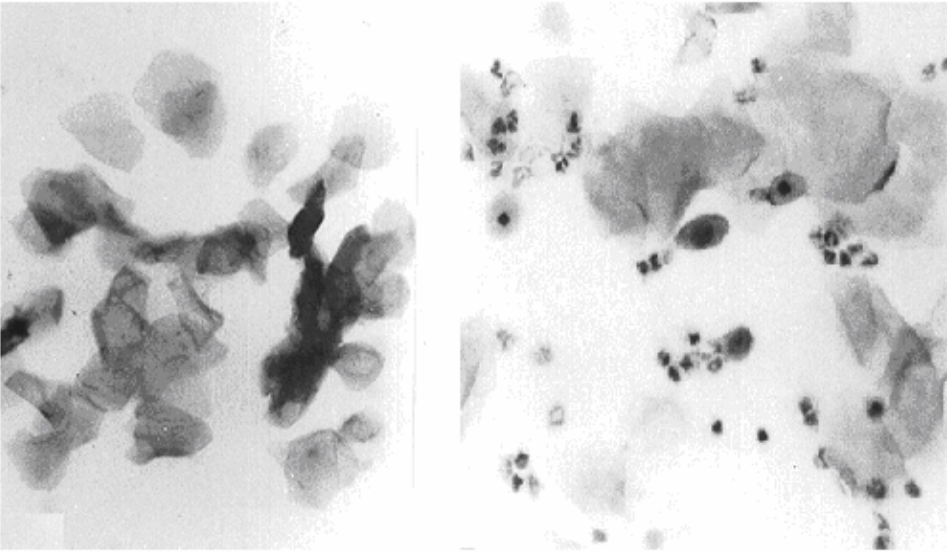
**Proestrus evresi;** ortalama 12 saat sürer. Yayma preparatlarda geniş, küçük, yuvarlak tek tek veya tabaka şeklinde nukleuslu epitel hücreler görülmektedir. Lökosit hiç yok veya çok az bulunabilir (Resim 3.3B).

**Estrus evresi;** döngünün 3. gününden sonraki gecede doğal olarak başlar ve 12-14 saat sürer. Ovulasyon estrusun 8-12. saatleri arasında gerçekleşir. Dişinin maksimal birleşme isteği siklus içinde yaklaşık 24 saatlik bir süreyi kapsar ve kuru vajina ve kabarık vulva ile belirlenebilen estrus safhasında oluşur. Yayma preparatlarda yüzlerce büyük dejenere nukleuslu kornifiye (yassılaştı) hücre içermektedir. Estrusun sonuna doğru yapışmış kornifiye hücrelerden dolayı smear peynirimsi bir görünüme dönüşmüştür (Resim 3.3C).

**Metestrus evresi;** ortalama 21 saat sürer. Yayma preparatlarda çok sayıda lökosit ve çok az kornifiye hücre görülmektedir (Resim 3.3D) (61).



**Resim 3.3.** Dişi sıçanlardan elde edilen yayma preparatlarda estrus döngüsü: A-Diestrus evresi, B-Proestrus evresi



**Resim 3.4.** Dişi sıçanlardan elde edilen yayma preparatlarda estrus döngüsü: A-Estrus evresi, B-Metestrus evresi

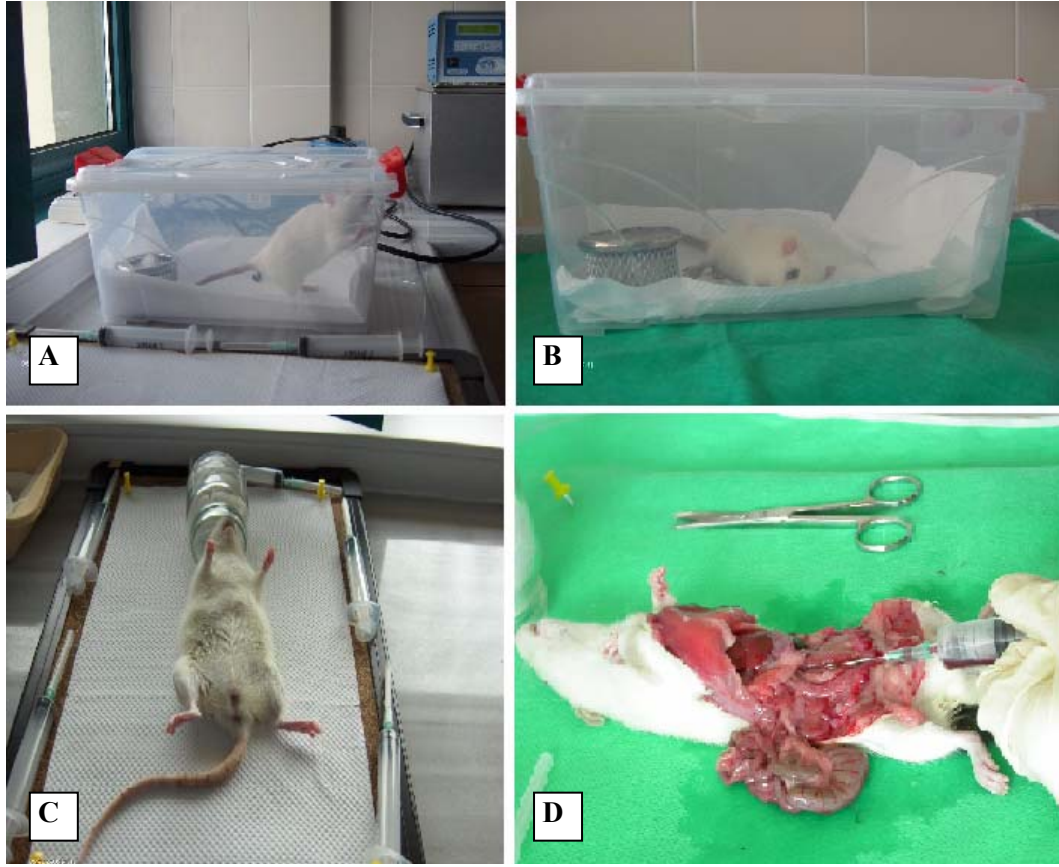
## **3.2. EMBRİYO KÜLTÜRÜ**

### **3.2.1. Kültür Ortamının (serum) Hazırlanması**

Dişi veya erkek sıçanlar eter ile anestezi kutusunda bayıltılır (Resim 3.5A-B). Anestezinin gerçekleştiği göz refleksi ile kontrol edildikten sonra hayvanlar anestezi kutusundan çıkarılarak düz bir satıh üzerine sırt üstü yatırılır (Resim 3.5C). Anestezinin devamı için içinde eter ile ıslatılmış pamuk ihtiva eden bir cam kavanoz hayvanın burun kısmı içinde olacak şekilde baş kısmına yerleştirilir ve karın duvarı %70'lik alkol ile temizlenir. Pens ve makas yardımıyla hayvanın karnında V şeklinde kesi yapılarak deri baş hizasına katlanır (Resim 3.5D). Karın içi organlar bir tarafa itilerek abdominal aorta görünür hale getirilir. Aortun çatallanma yerinden 10 cc'lik enjektör yardımıyla giriş yapılarak alınabildiği kadar kan alınır (yaklaşık 8-10 cc). Kan alınır alınmaz 3500 rpm'de 5 dk santrifüj edilir. Lamin-air flow altında steril pensle kan karıştırılarak tekrar santrifüj edilir. Santrifüj edildikten sonra steril Pasteur pipeti ile serum çekilir ve kültür şişesine konur. Sonra 56°C'ye ayarlanmış olan su banyosunda 30 dk bekletilir. Su banyosunda bekledikten sonra 0,22 µm'lik filtreden geçirilir. Serumun miktarına göre 100 IU/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin eklenir (1 cc'lik seruma 10µl streptomisin /penicilin). Serum hazırlandıktan sonra -20°C'ye kaldırılır. Serum kullanılacağı zaman su banyosunda 37° de bekletilerek kullanıma hazır hale getirilir.

### **3.2.2. Embrioların Anne Karnından Çıkarılışı ve Kültürü**

9.5 günlük gebe sıçanlar bölüm 3.2.1'de belirtildiği gibi, eter anestezisi altında bayıltılarak karınları açılır. Karın içi organları bir kenara itilerek abdominal aorta görünür hale getirilir ve 10 cc'lik enjektör yardımıyla aortun çatallanma yerinden girilerek alınabildiği kadar kan alınır. Alınan kan 3500 rpm'da 5 dk santrifüj edilir ve serum elde edilmek üzere saklanır. Daha sonra uterus boynuzunda dizili bir şekilde yer alan embriolar steril bir pens ve makas kullanılarak içinde Hanks solusyonu bulunan steril bir petri kabına transfer edilir (Resim 3.6).

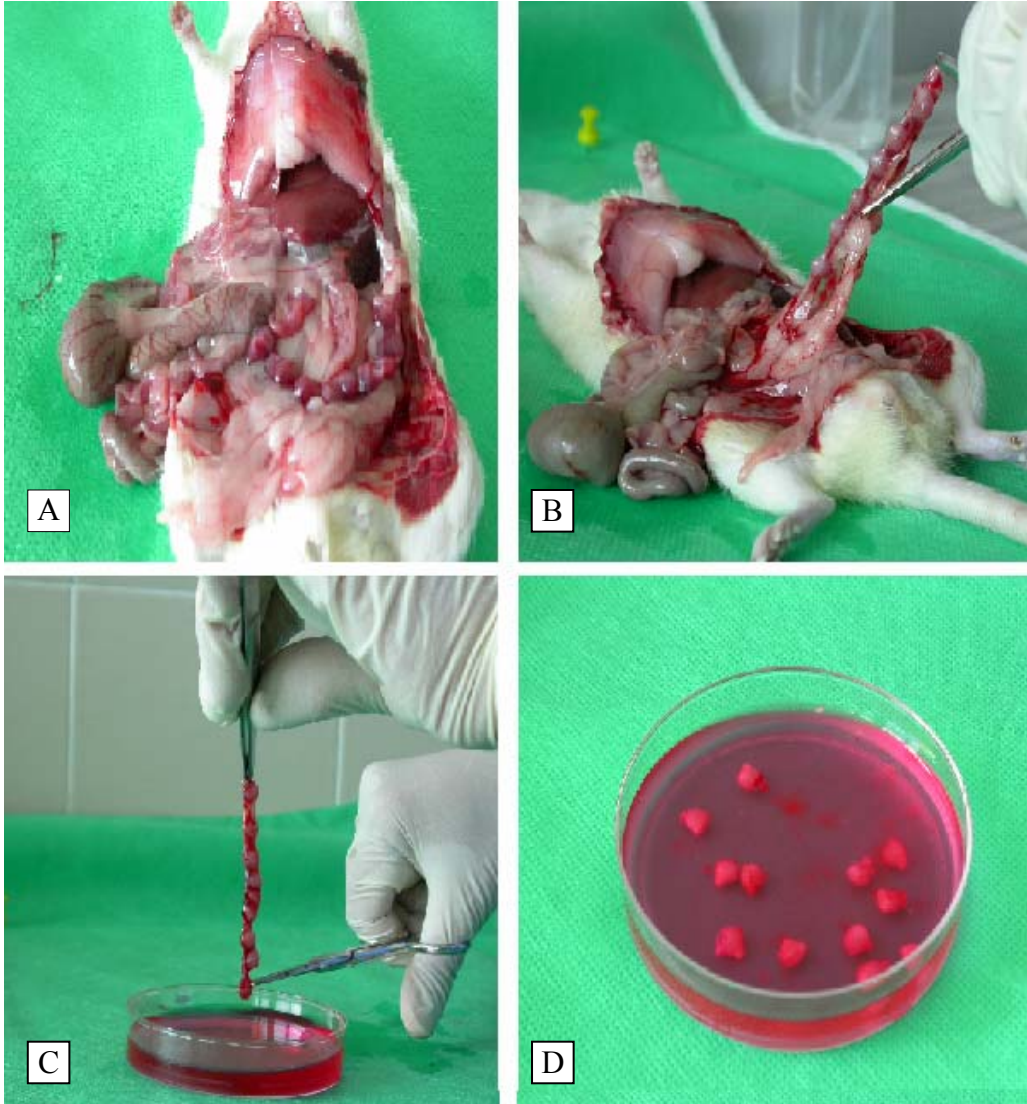


**Resim 3.5.** Dişi ve erkek sıçanlardan serum için kan alımı. A- anestezi altındaki dişi sıçanın görünümü, B- anestezi etkisini gösterdikten sonraki dişi sıçanın görünümü, C- Dişi sıçanın sırt üstü yatmış hali, D- Aort'un çatallanma yerinden alınan kanın görünümü

Bu aşamadan sonraki tüm işlemler Laminar kabinde, yarı steril şartlarda ve stero mikroskop altında gerçekleştirilir. Forceps yardımıyla uterus kası antimezometrial kenar boyunca dikkatlice kesilir. Desidual doku kitlesi ortadan ayrılarak içinde embriyo görünür hale getirilir. Embriyoya zarar vermeden disekte edilerek embriyo desidual dokudan ayrılır. Sonra kemirgenlerde bulunan embriyoyu çepeçevre kuşatan Reicherts membranı embriyonal kutupta pens yardımıyla parçalanarak çıkartılır. Embriyo medium içeren küçük steril petri kabına konur (Resim 3.7). Bu işlem bütün embriyolar için tekrarlanır. Zarar gören embriyolar kültür ortamına konulmaz. Sağlam embriyolar beşerli gruplara ayrılır ve içerisinde 5ml normal sıçan serumu bulunan 50 cc'lik steril cam kültür şişelerine (1 embriyo/1ml serum) steril bir cam Pasteur pipeti yardımıyla



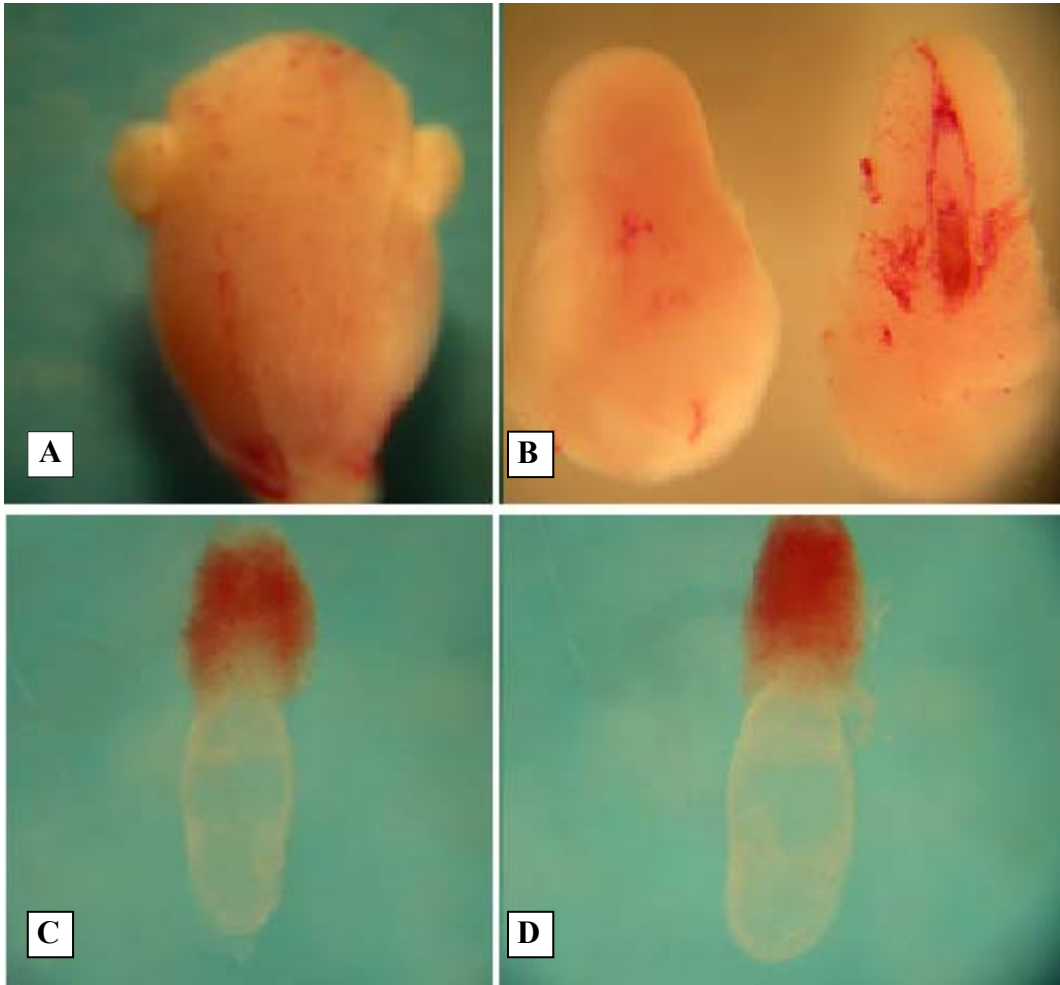
konur. Embriyo bulunan şişelere % 5'lik O<sub>2</sub>, % 5'lik CO<sub>2</sub>, % 90'lık N<sub>2</sub> (1. gaz karışımı) gaz karışımı 1dk süre ile verilir.



**Resim 3.6.** Gebe sıçanlardan embriyoların çıkarılışı. A-Karın içinde embriyoların görünümü, B- Uterus boynuzunda bulunan embriyoların görünümü, C- Embriyoların uterus boynuzundan çıkarıldıktan sonra Hanks solusyonuna transferi, D- Hanks solusyonu içindeki embriyoların görünümü

Şişenin ağzı plastik tıpa ile kapatılır. Kültür şişeleri 37°C' lik inkübatöre konur. Kültür şişeleri dakikada yaklaşık 30 devirle (30rpm/dk) dönen roller'a 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. Kültür şişeleri tekrar inkübatöre konur. Embriyoların morfolojik skorlamaları yapılmadan 4 saat önce % 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. 48 saatlik kültür ortamında büyütülen embriyolar içerisinde Hanks solusyonu bulunan petri kaplarına transfer edilir ve van Maele-Fabry ve ark. (1990) tarafından geliştirilen Morfolojik skorlama sistemine göre stereo mikroskop altında değerlendirilir (8).



**Resim 3.7.** Embriyoların ekstraembriyonik dokudan çıkarılışı. A- Uterus parçası, B- Decidua, C- Reicherts membranlı embriyo, D- Reicherts membranı çıkartılmış embriyo



**Resim 3.8.** Oksijen tüpleri ve lamin-air flow



**Resim 3.9.** Roller inkübatör

### **3.2.3. IL-12'nin In Vitro Şartlarda Embriyonik Gelişim Üzerine Etkisi**

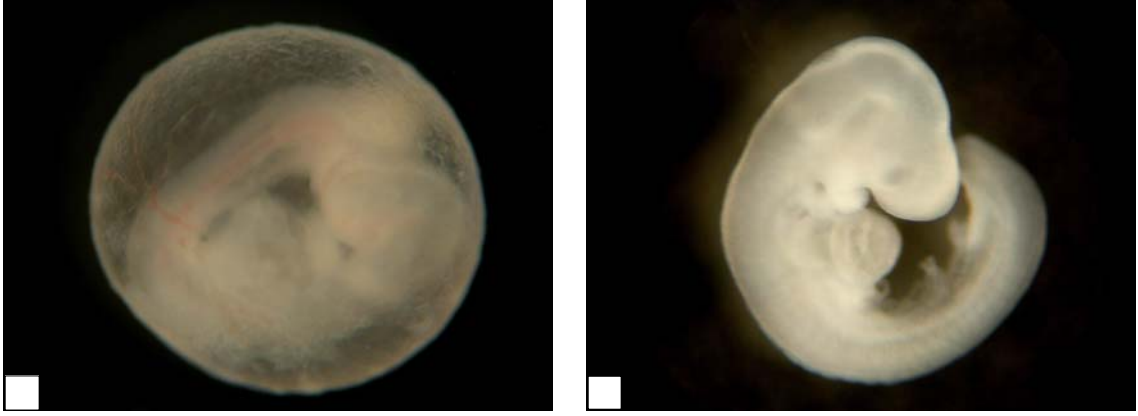
Bu çalışmada kullanılan deney hayvanları (20 dişi ve 20 erkek sıçan) Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezin'den sağlandı. Dişi sıçanlar çiftleştirilerek embriyoları kültür ortamında kullanılırken, hem dişi hem de erkek ratların kanları alınarak kültür ortamı için serum elde edildi. IL-12 ve Hanks (Hanks Balanced Salt Solution) Sigma'dan sağlandı.

Sunulan çalışmada, IL-12 değişik dozlarda kültür ortamına verilerek genel embriyonik gelişim ve vitellus kesesi üzerine etkileri araştırıldı. Gebe sıçanlardan elde edilen 9,5 günlük embriyolar, her grupta 10 embriyo olacak şekilde dört gruba ayrıldı. Birinci grup embriyolar (kontrol) normal sıçan serumunda büyütülürken ikinci, üçüncü ve dördüncü deney gruplarını oluşturan embriyoların kültür ortamına sırasıyla 50 ng/ml, 100 ng/ml ve 200 ng/ml IL-12 ilave edildi. Embriyolar bölüm 3.2.2'de belirtildiği gibi 48 saat kültür ortamında büyütüldü ve daha sonra stero mikroskop altında morfolojik olarak incelenip değerlendirilerek resimleri çekildi.

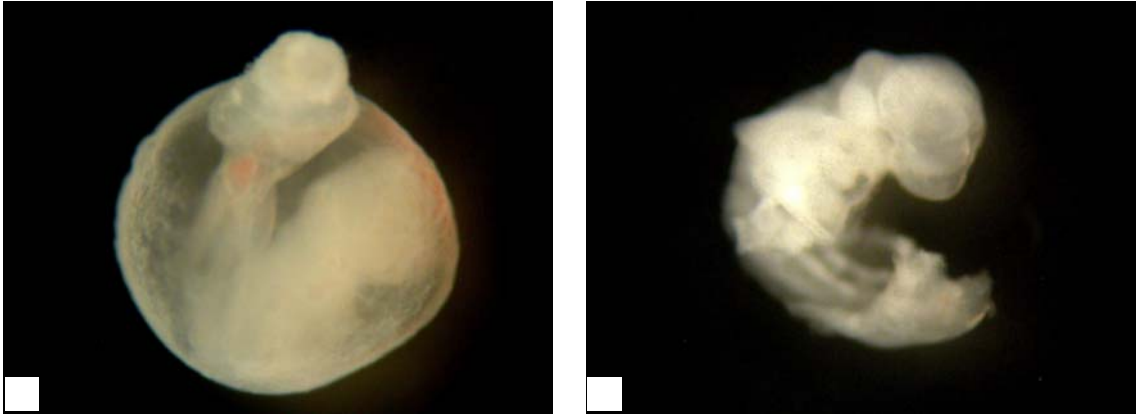
## 4. BULGULAR

48 saatlik kültür periyodu sonunda kontrol grubunu oluşturan embriyoların gelişiminin normal olduğu ve bölüm 2.1.3'de verilen morfolojik skorklama sistemine göre 11,5 günlük embriyonik gelişime yakın bir gelişme gösterdiği gözlendi (Resim 4.1). Deney gruplarında ise, verilen doza bağlı olarak embriyonik gelişimde bir gerilemenin varlığı gözlendi. Embriyonik gelişimdeki en belirgin gerileme en yüksek doz olan 200 ng/ml IL-12'de mevcuttu (Resim 4.2).

Morfolojik skorklama sistemine göre toplam morfolojik skor, vitellus kesesi çapı, embriyo baş-kıç uzunluğu ve somit sayısı karşılaştırıldığında kontrol grubu ile deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olduğu görüldü (Tablo 4.1). Bu fark IL-12'nin verilen yüksek dozlarında daha fazlaydı. Ayrıca vitellus kesesi damarlanması incelendiğinde IL-12 verilen grupta vitellus kesesi damarlanmasının gerilediği ve vitellus kesesinde kan adacıklarının varlığına karşılık damar ağının iyi gelişmediği görüldü (Tablo 4.2). Benzer bir gelişme geriliği kalp gelişiminde de mevcuttu. Normal sıçan serumunda büyüyen embriyolarda kalp  odacıklı iken (2 atrium, 1 ventrikül), kültür ortamına IL-12 verilen embriyolarda kalp gelişimi bu düzeye ulaşamamıştı (Tablo 4.3).



**Resim 4.1.** Sıçan serumunda büyüyen 11,5 günlük sıçan embriyoları A-Vitellus kesesi çıkartılmamış embriyo B- Embriyonun yandan görünüşü



**Resim 4.2.** Kültür ortamına 200 ng/ml IL-12 ilave edildikten sonraki 11,5 günlük sıçan embriyoları A- Vitellus kesesi çıkartılmamış embriyo B- Embriyonun yandan görünüşü

**Tablo 4.1.** Sıçan serumu ve IL-12'nin toplam embriyonik gelişim üzerine etkisi

Kültür Ortamı	Embriyo sayısı (N)	Toplam morfolojik skor	Vitellus kesesi çapı	Baş-kıç uzunluğu	Somit sayısı
Sıçan Serumu	10	58,45±0,47	3,17±0,14	2,80±0,11	24,20±0,68
50 ng/ml IL-12	10	53,20±1,23	2,86±0,14	2,46±0,17	23,00±1,45
100 ng/ml IL-12	10	50,90±1,53*	2,60±0,12*	2,12±0,13*	21,80±1,21
200 ng/ml IL-12	10	41,30±2,93***	2,31±0,13***	1,99±0,14**	17,80±1,06**

Sonuçlar ortalama değer olarak ifade edildi.

\* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$ , \*\*\* $p<0,001$

\* $p<0,05$  sıçan serumu ile 100 ng/ml IL-12, \*\* $p<0,01$  sıçan serumu ile 200 ng/ml IL-12, \*\*\* $p<0,001$  sıçan serumu ile 200 ng/ml IL-12 karşılaştırıldı.

Normal sıçan serumu ile 50 ng/ml, 100 ng/ml ve 200 ng/ml IL-12 kültür ortamına ilave edildikten sonra büyüyen embriyolar karşılaştırıldığı zaman 100 ng/ml IL-12 varlığında toplam morfolojik skor, vitellus kesesi çapı ile baş-kıç uzunluğunun 0,05'den ( $p<0,05$ ), 200 ng/ml IL-12 varlığında ise toplam morfolojik skor ile vitellus kesesi çapının 0,001'den ( $p<0,001$ ) ve baş-kıç uzunluğu ile somit sayısının ise 0,01'den ( $p<0,01$ ) küçük olduğu görüldü (Tablo 4.1).

**Tablo 4.2.** Kontrol grubu ile deney grubunun vitellus kesesi damarlanması

Kültür Ortamı	Embriyo sayısı (N)	Morfolojik skor				
		0	1	2	3	4
		<i>Vitellus kesesi damarları veya kan adacıkları belirgin</i>	<i>Ektoplasental kon etrafında kan adacıkları belirgin</i>	<i>Birkaç ince damar vitellus kesesi üzerinde</i>	<i>Damar ağı vitellus kesesinde belirgin</i>	<i>Çok sayıda ince dallar ana damar üzerinde</i>
<b>Sıçan Serum (Kontrol grubu)</b>	<b>10</b>	-	-	-	-	<b>10</b>
<b>50 ng/ml IL-12 (Deney grubu)</b>	<b>10</b>	-	-	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>6</b>
<b>100 ng/ml IL-12 (Deney grubu)</b>	<b>10</b>	-	-	<b>4</b>	-	<b>6</b>
<b>200 ng/ml IL-12 (Deney grubu)</b>	<b>10</b>	-	<b>6</b>	-	<b>2</b>	<b>2</b>

Tablo 4.2, kontrol grubunda büyüyen embriyoların vitellus kesesi üzerinde çok sayıda damarların geliştiğini, 50 ng/ml IL-12 varlığında 6 embriyoda çok sayıda damar, 1 tanesinde damar ağı, 3 tanesinde ise birkaç ince damarın meydana geldiği, 100 ng/ml IL-12 varlığında 6 embriyonun vitellus kesesi üzerinde çok sayıda damarların oluştuğu, 4 tanesinde ise birkaç ince damarın geliştiği, 200 ng/ml IL-12 varlığında ise 6 embriyonun vitellus kesesi üzerinde kan damarı oluşmadığı 2 tanesinde birkaç ince damar oluştuğu ve 2 tanesinde ise çok sayıda damar geliştiği gözlenmiştir.

Tablo 4.3, sıçan serumu, 50 ng/ml IL-12 ve 100 ng/ml IL-12 ve 200 ng/ml IL-12 konulan kültür ortamındaki embriyoların kalp gelişiminin morfolojik yapısını göstermektedir. Buna göre, sadece sıçan serumu bulunan kültür ortamında büyüyen embriyoların tamamının kalplerinin üç odacıklı olduğu görülmektedir. Ortama 50 ng/ml IL-12 ilave edilen embriyolardan 2'sinin kalbindeki atrium ile ventrikül birbirinden



ayrılmış, bulbus kordisin olduğu ve 8'inin kalbinin üç odacıklı olduğu saptanmıştır. Ortama 100 ng/ml IL-12 ilave edilmesi sonucunda, 8'inin kalbindeki atrium ile ventrikül birbirinden ayrılmış ve 2'sinin ise kalbinin üç odacıklı olduğu gözlenmiştir. Ortama 200 ng/ml IL-12 konulması neticesinde 2 embriyonun kalbi S harfine benzer bir tüp şeklinde, 7'sinin kalbindeki atrium ile ventrikül birbirinden ayrılmış ve 1'inin ise kalbinin üç odacıklı olduğu gözlenmiştir.

**Tablo 4.3.** Kontrol grubu ile deney grubunun kalp gelişimi

Kültür Ortamı	Embriyo sayısı (N)	Morfolojik skor			
		2	3	4	5
		<i>S şeklinde kalp tüpü</i>	<i>Bulbus cordis, atrium ve ventrikül ayrı ve belirgin</i>	<i>Kalp üç odacıklı</i>	<i>Kalp dört odacıklı</i>
<b>Sıçan Serumu (Kontrol grubu)</b>	<b>10</b>	-	-	<b>10</b>	-
<b>50 ng/ml IL-12 (Deney grubu)</b>	<b>10</b>	-	<b>2</b>	<b>8</b>	-
<b>100 ng/ml IL-12 (Deney grubu)</b>	<b>10</b>	-	<b>8</b>	<b>2</b>	-
<b>200 ng/ml IL-12 (Deney grubu)</b>	<b>10</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	-

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Pek çok araştırmacı vaskulogenez ve anjiogenezi, damar gelişiminde farklı iki yol olarak tanımlamışlardır. Bu olaylar erken embriyogenez ve postnatal yaşam sırasında meydana gelmektedir (62-63). Anjiogenez daha önceden var olan kan damarlarından yeni kapillerlerin meydana gelmesi anlamına gelir. Hem gelişen embriyo hem de postnatal hayatta bu olay gerçekleşir (64,65). Vaskulogenez de ise mezenşimal hücreler angioblastlara, angioblastlar endotel hücrelerine, endotel hücreleri ise primer kan damarına dönüşür (66). Dolayısıyla vaskulogenez erken embriyogenez sırasında oluşur ve erişkinlerde meydana gelmez (66-68). Bununla birlikte Shi ve ark. (1998) vaskulogenezin sadece erken embriyonik dönemde meydana gelmediğini ve bu olayın erişkinlerde sağlıklı durumda veya hastalıkta fizyolojik ve patolojik rollere sahip olduğunu ileri sürmüştür (69). Gelecekte insanlardaki vaskulogenez ve anjiogenez tamamıyla anlaşıldığı zaman damar hastalıklarını tedavi etmede yeni metotların gelişmesine katkı sağlayacaktır.

Günümüzde kanserli insanların daha uzun süre yaşayabilmesi ve yaşam kalitesini artırabilmesi için pek çok çalışma yapılmaktadır. Kanserlin erken teşhis edilmesi için daha iyi metotların bulunması sonucunda ilerleme kaydedilmiştir. Diğer taraftan kanser tedavisinde uygulanan yöntemlerin (radioterapi, kemoterapi gibi) birçok yan etkilerinin olduğu bilinmekte ve bu yan etkileri azaltmak için pek çok çalışma yapılmaktadır. Bilim

adamları, kanser hücrelerini diğer hücrelerden ayırmak için ne yapılması gerektiğini öğrenmeye çalışmakta ve bu bilgi doğrultusunda çeşitli ilaçlar geliştirilmektedir. Bu çalışmaların amacı normal hücrelere zarar vermeden sadece kanser hücreleri yok etmektir. Son yıllarda buna benzer çalışmalar yaygınlaşmıştır. Judah Folkman 1971’de yayınladığı ve bir dokunun damarlanmadan ancak 2mm<sup>2</sup> kadar büyüebildiğini rapor ettiği çalışmadan sonra kanser tedavisinde antianjiogenik faktörlerle ilgili çalışmalar hız kazanmış birçok antianjiogenik faktör izole edilmiştir (22). Son çalışmalar bazı deneysel antianjiogenik ilaçların güvenilir olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmalar kullanılan ilaçların damarlanmayı engelleyerek kanser hücrelerinin metastazını ortadan kaldırdığını göstermektedir. Bunun yanı sıra günümüzde yaygın olarak kullanılan tedavilerden daha az yan etkiye sahiptir.

Pek çok antianjiogenik ilaçlar ilk olarak yeni kan damarı yapımını engellemektedir. Endotel hücreleri büyüyerek kan damarların iç yüzünü kaplar. Bu endotel hücreleri olmadan yeni kan damarları oluşamaz. Bazı antianjiogenik ilaçlar protein yapısındadır; laboratuarda yapılmaktadır, bunlar organizmada yapılan proteinlerle aynıdır. Bu proteinler endotel hücrelerin büyümesini yavaşlatır. Organizmaya verildiği zaman bu insan yapımı proteinler doğal olarak organizmada yapılanlarla aynı etkiye sahip olabilir. Son zamanlarda araştırmacılar endotel hücrelerinin büyümesini engelleyerek çalışmayı düşünmektedirler.

Hızlı bir şekilde büyüyen embriyonun metabolik ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için ilk olarak dolaşım sistemi gelişmeye başlar. Ekstraembriyonik dokuda ve gelişen embriyoda damarlanma birbirinden bağımsız olarak gelişir ve daha sonra gelişen bu damarlar birleşerek dolaşımın devamlılığı sağlanır (70). Damarlanma, embriyonik gelişim esnasında, yaraların iyileşmesinde ve menstrual döngüde normal fizyolojik bir durumdur. Tümörlerin gelişmesi ve ilerlemesi ise büyük ölçüde damarlaşmasına bağlıdır. Yetişkinde yeni damar oluşumu anjiogenik ve antianjiogenik faktörler arasında meydana gelen bir denge ile sağlanır. Spesifik genlerin ekspresyonunu sonucunda antianjiogenik değişim meydana gelir. Bu değişim tümör hücreleri ve konakçı mikro çevrenin hücreleri tarafından yapılan anjiogenik ve antianjiogenik moleküller arasındaki dengeyi değiştirir. Bu olay önemlidir ve primer tümörün damarlaşması tümörün gelişmesine ve metastatik olarak yayılmasına yol açar (71). Son zamanlarda yapılan birçok çalışma IL-12’nin IFN-gama’yı indükleyerek antianjiogenik etki gösterdiğini

ortaya koymuştur (48,59). Voest ve ark. (1995), IL-12 uyguladıkları farelerde anjiogenik faktörlerle indüklenmiş korneal neovaskularizasyonun inhibe edildiğini ve bu etkinin IFN-gama nötralize antibadi kullanılarak engellendiği rapor ettikleri çalışmalarında, bu antianjiogenik etkiye bağışıklık sistemin spesifik tipinin aracılık etmediğini ve bunun yerine IL-12'nin IFN-gamayı uyararak antianjiogenik etki gösterdiğini belirtmişlerdir (72). Majewski ve ark. (1996) yaptıkları benzer bir çalışmada, IL-12'nin sistemik uygulanmasının zamana ve doza bağlı olarak damarlanmayı engellediğini, in vitro hücre kültürü üzerinde ise bir etkiye sahip olmadığını rapor ettiler (73). Bu durum IL-12'nin etkisini in vivo şartlarda gösterdiğini ortaya koymaktadır. Aynı çalışmada insan IFN-gama'nın insan tümör hücre kültüründe anjiogenik aktiviteyi inhibe ettiği gösterilmiştir. In vitro olarak IL-12 ile aktive edilen NK hücrelerinin aortadan elde edilen primer endotel hücre kültüründe kuvvetli sitotoksik etki gösterdiği ve bu etkinin IFN-gama antibadi kullanıldığında nötralize edildiği gösterildi (59). Ayrıca IL-12, vasküler endotel büyüme faktörü ve bazik fibroblast büyüme faktörü gibi endotel mitojenlerinin etkilerini azalttığı ve antitümör etkisinin yanında yüksek derecede keratinizasyon, apoptoz, insan tümörlerinin proliferasyon oranında düşme ve murin tümörlerinde yoğun nekroz gibi ilginç histolojik değişikliklere neden olduğu rapor edilmiştir (48). IL-12 bağışıklık sistemin anahtar düzenleyicisidir. Yapılan son çalışmalarda IL-12'nin antianjiogenezdeki önemi gösterilmiş, tümör gelişimi ve metastaz neovaskularizasyonundaki gelişmeye bağlı olarak kanser tedavisinde IL-12'nin antianjiogenik etkisine dikkat çekilmiştir (48).

IL-12 anjiogenezi inhibe ederek anti-tümör etki gösterir. IL-12 NK hücrelerini uyararak IFN- $\gamma$  'nın serbest kalmasını sağlar ve sitolitik yolu aktive eder (74). IL-12'nin anti-tümör ve anti-anjiogenik özelliği konakçıdaki immunitiyi artırabilme, özellikle sitotoksik T ve NK hücreleri aktive etme yeteneğine bağlanmaktadır (44) T ve NK hücreler merkezi bir role sahiptir ve IL-12'nin biyolojik aktivitesinin mediyatörü olarak rol oynar (59). IL-12'nin embriyonik vitellus kesesi damarlanması üzerine in vitro etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, doza bağlı olarak vitellus kesesi damarlanmasını ve kalp gelişimini engellediği tespit edildi. Ayrıca kültür ortamına IL-12 verilen embriyolarda total gelişimde de büyük ölçüde gerileme mevcuttu. Embriyoların morfolojik skorlarının ortalama değerleri, somit sayısı, baş-kıç uzunluğu, vitellus kesesi çapı, vitellus kesesi damarlaşması ve kalp gelişimindeki gerileme istatistiksel olarak da anlamlıydı.

Bir antianjiogenik faktör olan IL-12 ile ilgili daha önce yapılan çalışmalar ile bizim yapmış olduğumuz çalışmada elde edilen sonuçlar bu faktörün embriyonik damarlanmayı engellediğini ve toplam embriyonik gelişmede görülen gerileme ise IL-12'nin antianjiogenik etkisine bağlı olabileceğini göstermektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Waddington C. H. and Waterman A. J. The development in vitro of young rabbit embryos. *J Anat* 1933; 7:355-370.
2. Nicholas J.S, Rudnick D. Development of rat embryos of egg-cylinder to head-fold stages in plasma cultures. *J Exp Zool* 1938; 78(2):205-232.
3. 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.
4. New D .A. T. Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol Rev* 1978; 53 (1):81-125.
5. Karabulut, A. K., “In vitro rat embriyo kültürü ve ugulama 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
6. Mcbride WG. Thalidomide and congenital abnormalities. *Lancet* 1961; 16:1358.
7. Kohhar D.M. In vitro testing of teratogenic agents using mammalian embryos. *Teratog Carcinog Mutagen* 1980; 1:63-74.
8. Van Maele-Fabry, G, Delhaise F. and Picard J.J. Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos in vitro. *Toxicol* 1990; 4:149-156.

9. Moore K. L. The developing human. (4th Edition). W.B. Saunders Co, Harcourt Brace Jovanovich Inc. 1988.
10. 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
11. Padykula H. A, Deren J. J. and Wilson T. H. Development of structure and function in the mammalian yolk sac. I. Developmental morphology and vitamin B<sub>12</sub> uptake of the rat yolk sac. *Dev Biol* 1966; 13:311-348.
12. Payne G. S. and Deuchar E. M. An in vitro study of functions of embryonic membranes in the rat. *J Exp Morphol* 1972; 27 (3):533-542.
13. Steven D. H. The foetal membranes of the laboratory rat. Comparative placentation- essay in structure and function. Academic Press, London, 1975; ss:75-81.
14. Beaudoin A. R. Embryology and teratology. In: The laboratory rat. Baker H. J, Lindsey J. R. and Weisbroth S. H. (Eds.), Vol. II. Academic Press, New York, 1980; ss: 75-101
15. Dunton A, Al-Alousi L. A, Pratten M. K. and Beck F. The giant yolk sac: a model for studying early placental transport. *J Anat* 1986; 145:189-206.
16. Freeman S. J, Back F. and Lloyd J. B. The role of visceral yolk sac in mediating protein utilization by rat embryos cultured in vitro. *J Embryol Exp Morphol* 1981; 66:223-234.
17. Jollie W. P. Development, morphology and function of the yolk sac placenta of laboratory rodents. *Teratol* 1990; 41:361-381.
18. Sabin F. R. Origin and development of the primitive vessels of the chick and of the pig. *Carnegie Contrib. Embryol* 1917; 6:61-124.
19. 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; 1;79(2):315-328.
20. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88(2):277-285.

21. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992 ; 3(2):65-71.
22. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285(21):1182-1186.
23. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst* 1990; 82(1):4-6.
24. D'Amore PA. Capillary growth: a two-cell system. *Semin Cancer Biol* 1992; 3(2):49-56.
25. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86(3):353-364.
26. Gasparini G. Clinical significance of determination of surrogate markers of angiogenesis in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001; 37(2):97-114.
27. D'Amore P.A, Smith S.R. Growth factor effects on cells of the vascular wall: a survey. 1993; 8(1):61-75.
28. Harris A.L. Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet*. 1997; 349.
29. Brooks PC, Stromblad S, Klemke R, Visscher D, Sarkar FH, Cheresh DA. Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin. *J Clin Invest* 1995; 96(4):1815-1822.
30. Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer* 1996; 32A(14):2474-2484.
31. Gasparini G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs* 1999; 58(1):17-38.
32. Uhr JW, Scheuermann RH, Street NE, Vitetta ES. Cancer dormancy: opportunities for new therapeutic approaches. *Nat Med* 1997; 3(5):505-509.
33. Gastl G, Hermann T, Steurer M, Zmija J, Gunsilius E, Unger C, Kraft A. Angiogenesis as a target for tumor treatment. *Oncol* 1997; 54(3):177-184.
34. Folkman J. Clinical application of research on angiogenesis. *The New England J Med* 1995; 333 (26):1757-1763.



35. Mantovani A, Bussolino F, Introna M. Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to bedside. *Immunol Today* 1997; 18:231-240.
36. Nicosia R.F. What is the role of vascular endothelial growth factor-related molecules in tumor angiogenesis *Am J Pathol* 1998; 153:11-16.
37. Diaz-Flores L, Gitoerrez R. R. and Varela H. Angiogenesis: An update. *Histol Histopathol* 1994; 9(4):807-843.
38. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'reilly M.S. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997; 390:404-407.
39. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88(2):277-285.
40. Koch A.E. Angiogenesis implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998; 41:951-962.
41. D'Andrea A, Rengaraju M, Valiante NM, Chehimi J, Kubin M, Aste M. Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin-12) by peripheral blood mononuclear cells. *J Exp Med* 1992; 176:1387-1398.
42. Tokgöz G. *Klinik İmmünoloji*. Ankara Üniversitesi ANTIP A.Ş. Yayınları Ankara. 1997; 85-86.
43. Colombo M. P, Trinchieri G. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine and Growth Factor Rev* 2002; 13:155-168.
44. Brunda MJ, Luistro L, Warriar RR, Wright RB, Hubbard BR, Murphy M, Wolf SF, Gately MK. Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors. *J Exp Med*. 1993; 178(4):1223-1230.
45. Fujiwara H, Hamaoka T. Antitumor and antimetastatic effects of interleukin 12. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 38 Suppl:S22-6.
46. Wigginton JM, Gruys E, Geiselhart L, Subleski J, Komschlies KL, Park JW, Wiltrout TA, Nagashima K, Back TC, Wiltrout RH. IFN-gamma and Fas/FasL are required for the antitumor and antiangiogenic effects of IL-12/pulse IL-2 therapy. *J Clin Invest* 2001; 108(1):51-62.

47. Yao L, Sgadari C, Furuke K, Bloom ET, Teruya-Feldstein J, Tosato G. Contribution of natural killer cells to inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Blood* 1999; 93(5):1612-1621.
48. Duda DG, Sunamura M, Lozonchi L, Kodama T, Egawa S, Matsumoto G, Shimamura H, Shibuya K, Takeda K, Matsuno S. Direct in vitro evidence and in vivo analysis of the antiangiogenesis effects of interleukin 12. *Cancer Res* 2000; 60(4):1111-1116.
49. Cerami A, Y. Ikeda Trang N. Le, Hotez P.J, and . Beutler B. Weight loss associated with an endotoxin-induced mediator from peritoneal macrophages: the role of cachectin (tumor necrosis factor). *Immunol Lett* 1985; 11:173-177.
50. Cherwinski H. M., Schmachter J. H., Brown K. D, Mosmann T. R. Two types of Mouse hepler T cell clone. 3. Further differences in lymphokine synthesis between TH1 and TH2 clones revealed by RNA hybridisation, functionally nonspecific bioassays and monoclonal antibodies. *J Exp Med* 1987; 166:1229-1244.
51. Doherty G. M, Lange J. R, Langstein H. N, Alexander H. R, Buresh C. M, Norton J. A. Evidence for IFN-gamma as a mediator of the lethality of endotoxin and tumor necrosis alpha. *J Immunol* 1992; 149:1666-1670.
52. Alexander H. R, Doherty G. M, Buresh C. M, Venzon D. J, Norton J. A.. A recombinant human receptor antagonist to interleukin-1 improves survival after lethal endotoxemia in mice. *J Exp Med* 1991; 173:1029-1032.
53. Galanos C, Freudenberg M. A, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:5939-5943.
54. Gately M. K, Carvajal D. M, Connaughton S. E, Gillessen S, Warriar R. R, Kolinsky K. D, Wilkinson V. L, Dwyer C. M, Higgins, G. F, Podlaski F. J, Faherty D. A, Familletti P. C, Stern A. S, Presky D. H.. Interleukin-12 antagonist activity of Mouse interleukin-12 p40 homodimer in vitro and in vivo. *Ann N. Y. Acad Sci* 1996; 795:1-12.
55. Gately M. K, Wolitzky A. G, Quinn P. M, Chizzonite R. Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol* 1992; 143:127-142.
56. Mangi M.H. and Layton, D.M. The cells of human yolk sac blood island express CD34 and produce GM-CSF (Abstract). *Blood* 1994; 84:268a.

- 57.** Palis J, McGrath K.E, Kinsley P.D. Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac. *Blood* 1995; 86:156-163.
- 58.** Puchkov V. F. and Popov V.B. An experimental analysis of the development of the yolk sac blood circulation in rat embryos in normality. *Arkh Anat Histol Embriol* 1976; 70:78-84.
- 59.** Risau W. Embryonic angiogenesis factors. *Pharmacol Ther* 1991; 51:371-376.
- 60.** Wagner R. C. Endothelial cell embryology and growth. *Advances in Microcirculation* 1980; 9:45-75.
- 61.** Hebel R, Stromberg M.W. *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat*. Federal Republic of Germany, 1986; 231-232
- 62.** Folkman J. and D'amore P.A. Blood vessel formation. What is the molecular basis. *Cell* 1996; 87:1153-1155.
- 63.** Darland D.C. and D'amore P.A. Blood vessel maturation: vascular development comes of age. *J Clin Invest* 1999; 103:157-158.
- 64.** Asahara T, Murohara T, Sullivan A., Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatterman G, Isner J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275:964-967.
- 65.** Risau W. Mechanism of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-674.
- 66.** Risau W. and Flamme, I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995;11:73-91.
- 67.** Cine D.B, Pollak, E.S, Buck C.A, Loscalzo J, Zimmerman G.A, McEver R.P, Pober J.S, Wick T.M, Konkle B.A, Schwatz B.S, Barnathan E.S, McCrae K.R, Hug B.A, Schmidt A.M, Stern D.A. Endothelial cells in physiology and pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91:3527-3561.
- 68.** Yancopoulos G.D, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell* 1998; 93:661-664.
- 69.** Shi et al. Chemical constituents of the root of *Pimpinella thellungiana* Wolff. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 1998; 23(7):421-2, 448.

70. Reagan F.R.: Vascularization phenomena on fragments of embryonic bodies completely isolated from yolk sac entoderm. *Anat Rec* 1915; 9:329-341.
71. Strasly M, Cavallo F, Geuna M, Mitola S, Colombo MP, Forni G, Bussolino F. IL-12 inhibition of endothelial cell functions and angiogenesis depends on lymphocyte-endothelial cell cross-talk. *J Immunol* 2001; 166(6):3890-3899.
72. Voest EE, Kenyon BM, O'Reilly MS, Truitt G, D'Amato RJ, Folkman J. Inhibition of angiogenesis in vivo by interleukin 12. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87(8):581-586.
73. Majewski S, Marczak M, Szmurlo A, Jablonska S, Bollag W. Interleukin-12 inhibits angiogenesis induced by human tumor cell lines in vivo. *J Invest. Dermatol* 1996; 106:1114-1118.
74. Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept of therapy of solid tumors. *Ann Surg* 1972; 175:409-416.

## ÖZGEÇMİŞ

01.01.1979 yılında Kayseri’de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimimi TED Kayseri Koleji’de tamamladı. Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’’den 2002 eğitim-öğretim yılının bahar döneminde mezun oldu. Mezun olduktan sonra Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim’da Yüksek Lisans programına başladı. 31.12.2004 tarihinde Anatomi A.B.D’ında Arş. Gör. olarak göreve başladı. Halen Anatomi A.B.D.’ında görevini devam ettirmektedir.