

## EMBRİYO KÜLTÜRÜ TEKNİĞİ The Embryo Culture Techniques

Mehtap NİSARİ<sup>1</sup>, Harun ÜLGER<sup>2</sup>

**Özet :** Akşam saat 5'de Wistar türü dişi ve erkek sıçanlar aynı kafeste tutulur. Ertesi gün dişi sıçanlardan vaginal smear alınarak sperm olup olmadığına bakılır. Vajinal smearde sperm görülen dişiler 0.5 günlük hamile olarak kabul edilir ve ayrı kafese alınarak 9 gün bekletilir. 9.5 günlük hamile dişi sıçanlara eter anestezisi uygulanarak düz bir sath üzerine sırt üstü yatırılır ve hayvanın karnında V şeklinde kesi yapılarak deri yukarı doğru katlanır. Aortun çatallanma yerinden bir enjektörle girilerek alınabildiği kadar kan alınır. Kan alınır alınmaz 3500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir ve serum elde edilmek üzere saklanır. Uterus boynuzunda bulunan embriyolar Hanks solusyonu içeren steril petri kabına konur. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler Laminar-air flow kabinde ve steromikroskop altında gerçekleştirilir. Uterus kası antimezometrial kenar boyunca kesilir. Desidual doku ve sonra da embriyonun Reicherts membranı çıkartılır Embriyo medium içeren petri kabına konur. Sağlam embriyolar beşerli gruplara ayrılır ve içerisinde 5ml sıçan serumu bulunan 50 ml'lik cam kültür şişelerine konur. Embriyo bulunan şişelere O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, ve N<sub>2</sub> gaz karışımı 1dk süreyle verilir. Kültür şişeleri dakikada yaklaşık 30 devirle (30rpm/dk) dönen 37°C' lik roller inkübatöre yerleştirilir. 48 saatlik kültür periyodundan sonra 11,5 günlük embriyoların gelişimi 17 embriyonik tomurcuğun gelişimini içeren Morfolojik Skorlama Sistemine göre morfolojik olarak değerlendirilir.

**Anahtar kelimeler:** Embriyo kültürü, morfolojik skorlama, sıçan

**Summary:** Female Wistar rats were paired with their male partners in cages. The females were checked for presence of vaginal plugs as an indication of mating and hence fertilisation. On the assumption that mating occurred around midnight, the female was considered to be 0.5-day pregnant at noon that day. The pregnant females were kept in larger cages in groups at the same stage of pregnancy until use. At 9.5 days of gestation, the embryos were removed from the mother. The pregnant rat was anaesthetised with diethyl ether. Then, the animals were placed in a supine position. The abdomen opened by midline incision in the anterior wall. The uterine horns containing the conceptuses were excised and placed in Hank's balanced salt solution. After this stage, the procedure was carried out in a laminar-air flow cabinet. Under a dissecting microscope, the decidual tissue around the conceptus was dissected and the parietal yolk sac and Reichert's membrane were removed. Embryos were transferred to 50 cc glass culture bottle that include heat-inactivated heterologous rat serum. They were gassed with a mixture of O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> for one minute. The bottle was sealed with a sterile silicon bung and placed in a roller incubator rotating at approximately 30 rpm at 37°C. After 48 hours culture period, which is equivalent of 11.5 days, the embryos were harvested and embryonic growth was estimated morphologically and biochemically.

**Keywords:** Embryo culture, morphologic scoring, rat

<sup>1</sup> Arş. Gör. Erciyes Ün, Sağlık Bil. Ens, Anatomi AD, Kayseri

<sup>2</sup> Prof. Dr. Erciyes Ün, Tıp Fak. Anatomi AD, Kayseri

Geliş Tarihi : 24.08.2006 Kabul Tarihi : 13.12.2010

### **In Vitro Embriyo 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 büyütmüşler, bunu Nicholas ve Rudnick'in (2) heparinize edilmiş sıçan plazmasında sıçan embriyolarını kültür etmeleri izlemiştir. Daha sonra 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 ark. (4), Cambridge'de bu tekniği geliştirmişlerdir. Bu dönemden sonra, sıçan embriyosu kültürü tekniği bir çok araştırmacı tarafından benimsenmiş ve çalışmalarında kullanılmıştır (5).

Günümüzde bu teknik klinik çalışmalarda, toksikolojik, teratojenik ve farmakolojik ajanların in vitro etkilerinin araştırılmasında, embriyo gelişimini etkileyen hormonlar ile büyüme faktörlerinin etkilerinin ve etki mekanizmalarının incelenmesinde ve embriyo metabolizması ile ilgili araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (5-11).

### **In Vitro Sıçan Embriyo Kültürü Tekniği**

150-250 gr ağırlığındaki 4-10 aylık dişiler döllenme yeteneği olan erkeklerle akşam saat 5'de bir kafese konulur. Sabah erkeklerden ayrılan dişilerden vajinal smear alınarak sperm olup olmadığına bakılır. Vajinal smearde sperm görülen dişiler 0.5 günlük hamile olarak kabul edilir ve ayrı bir kafese alınıp normal diyet ile beslenerek 9 gün bekletilir (12).

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

Dişi veya erkek sıçanlar eter ile anestezi kutusunda bayıltılır. Anestezinin gerçekleştiği göz refleksi ile kontrol edildikten sonra hayvanlar anestezi kutusundan çıkarılarak düz bir yüzey üzerine sırt üstü yatırılır. 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. Karın içi organlar bir tarafa itilerek aorta abdominalis görünür hale getirilir. Aorta abdominalis'in çatallanma yerinden 10 cc'lik enjektör yardımıyla giriş yapılarak alınabildiği kadar kan alınır (yaklaşık 8-10 cc). Kan alınır alınmaz 3500 rpm'de 5 dakika (dk) santrifüj edilir. Laminar-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 mm'lik filtreden geçirilir. Serumun miktarına göre 100 IU/ml penisilin ve 100 ug/ml streptomisin eklenir (1 cc'lik serum 10ml streptomisin / penisilin). Serum hazırlandıktan sonra -20°C'de saklanır. Serum kullanılacağı zaman su banyosunda 37°C'de bekletilerek kullanıma hazır hale getirilir (12).

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

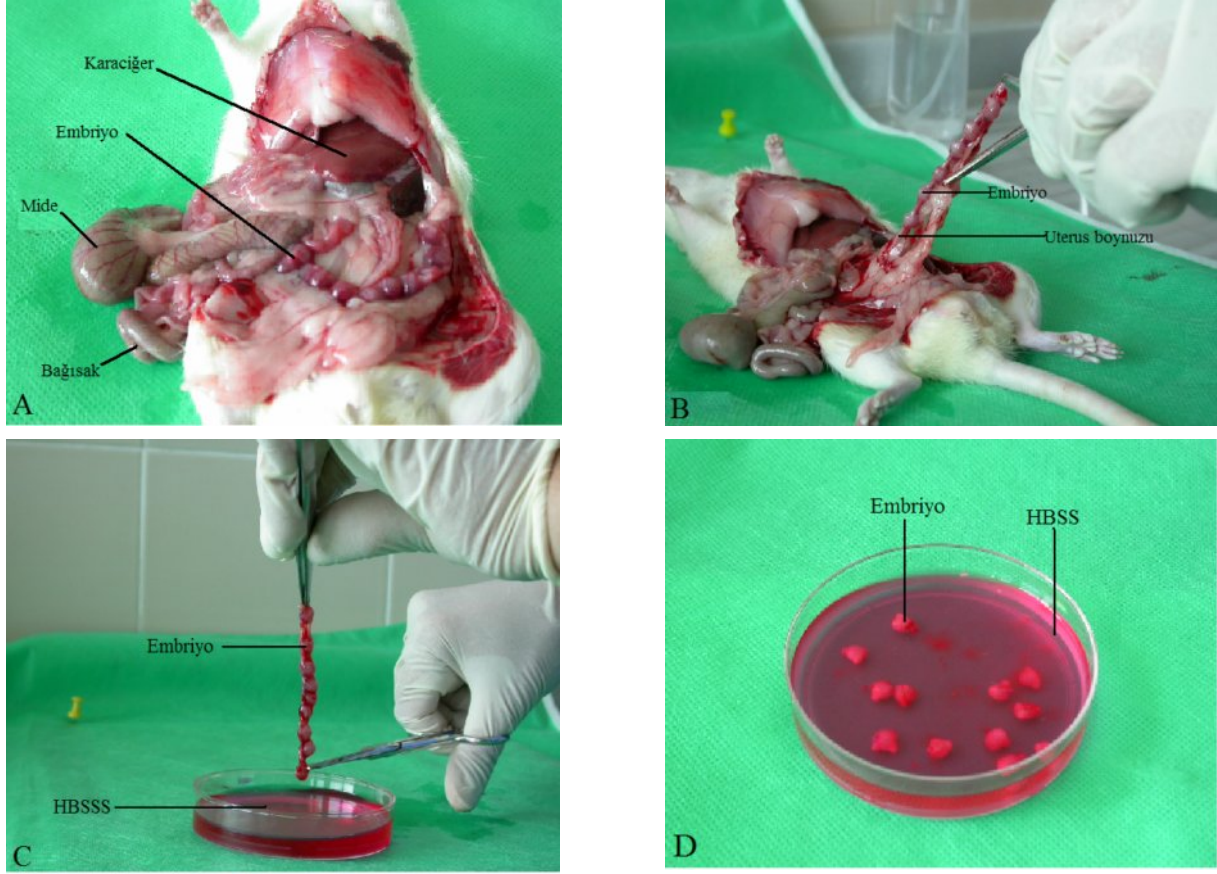
9.5 günlük gebe sıçanlar yukarıda belirtildiği gibi, eter anestezisi altında bayıltılarak karınları açılır. Karın içi organları hayvanın sağ tarafına itilerek abdominal aorta görünür hale getirilir ve 10 cc'lik enjektör yardımıyla aortun çatallanma yerinden girilerek alınabildiği kadar kan alınır. Alınan kan 3500 rpm'da 5 dk santrifüj edilir ve serum elde edilmek üzere saklanır. Daha sonra uterus boynuzunda dizili bir şekilde yer alan embriyolar steril bir pens ve makas kullanılarak içinde Hanks solusyonu bulunan steril bir petri kabına transfer edilir. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler Laminar-air kabinde, yarı steril şartlarda ve stero mikroskop altında gerçekleştirilir. Kuyumcu Forceps'i yardımıyla uterus kasi 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. Bu işlem bütün embriyolar için tekrarlanır. Zarar gören embriyolar



**Resim 1.** 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

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. Şişenin ağzı plastik tupa 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 in-

kübatörden alınarak plastik tıpaları 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. (13) tarafından geliştirilen Morfolojik skorlama sistemine göre stero mikroskop altında değerlendirilir.































**Resim 2.** 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




































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. (13) 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, allantois; fleksiyon, kalp, kaudal nöral tüp, arka beyin, orta beyin, ön

beyin, otik sistem, optik sistem, olfaktör sistem, branşiyal bar, maksiller çıkıntı; mandibular çıkıntı, ön ayak, arka ayak, somitler (13). 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 sisteminin kullanımı embriyonik gelişimin ayrıntılı indeksini verir. Spesifik primordia'nın yaşlaşmasının ve dismorfogenezin bulunmasına yardımcı olur. Gelişim ve büyümenin kantitatif olarak karşılaştırılmasına olanak sağlar (13).

**Tablo I.** Morfolojik skorlamada kullanılan parametreleri gösteren tablo



















Embriyonik tomurcuk	0	1	2	3	4	5	6	
<b>Vitellus kesesi damarlanması</b>								
<b>Allantois</b>								
<b>Fleksiyon</b>								
<b>Kalp</b>								
<b>Kaudal nöral tüp</b>								

**Tablo I.** Morfolojik skorlamada kullanılan parametreleri gösteren tablo (devamı)









Embriyonik tomurcuk	0	1	2	3	4	5	6
<b>Arka beyin</b>							
	nöral tabaka oluşmuş ise	V-şeklinde nöral katlantı varsa	nöral katlantı U-şeklinde ise	ön nöropor oluşmuş ancak açık ise	ön nöropor kapalı, rhombencephalon şekillenmiş ise	dördüncü ventrikülün açık üst kenarıyla pons birleşmiş ise	
<b>Orta beyin</b>							
	nöral tabaka veya mesensefalik beyin katlantısı varsa	V-şeklinde nöral katlantı varsa	U-şeklinde nöral katlantı varsa	kısmen mesensefalik katlantı birleşmiş ise	tamamiyle mesensefalon birleşmiş ise	mesensefalon ve rhinensefalon arasında bir bölme varsa	
<b>Ön beyin</b>							
	nöral tabaka oluşmuş ise	V-şeklinde nöral katlantı varsa	U-şeklinde nöral katlantı varsa	prosensefalik katlantı kısmen birleşmiş ise	prosensefalon tamamen birleşmiş ise	telensefalik evaginasyon görünürse	
<b>Otik sistem</b>							
	herhangi bir belirti yoksa	düz bir otik primordium varsa	otik çukur varsa	otik vezikül kapalı ancak epidermisten ayrılmamış ise	otik vezikül epidermisten ayrılmış ise	otosit dorsale yerleşmiş ise	
<b>Optik sistem</b>							
	herhangi bir belirti yoksa	sulcus opticus varsa	optik primordium uzamış ise	optik primordium oval şekilli ise	primer optik vezikül oluşmuş ve optik sap açık ise	lens tabakası oluşmaya başlamış ise	



**Tablo I.** Morfolojik skorlamada kullanılan parametreleri gösteren tablo (devamı)

Embriyonik tomurcuk	0	1	2	3	4	5	6
<b>Olfaktör sistem</b>	herhangi bir belirti yoksa						
<b>Branşiyal bar</b>	branşiyal bar görünmüyorsa						
<b>Maksiller çıkıntı</b>	rudimental bar kafanın ön kısmıyla birleşmiş olarak görünüyorsa						
<b>Mandibular çıkıntı</b>	herhangi bir şey görünmüyorsa						
<b>Ön ayak</b>	herhangi bir şey oluşmamış ise						

**Tablo I.** Morfolojik skorlamada kullanılan parametreleri gösteren tablo (devamı)

Embriyonik tomurcuk	0	1	2	3	4	5	6
<b>Arka ayak</b>	 herhangi bir şey oluşmamış ise	 26 ila 30 somit seviyesinde dışarıya doğru bombeleşme varsa	 arka ayak tomurcuklanmış ise	 arka ayak tomurcuğu kürek şeklinde ise			
<b>Somit sayısı</b>	somit sayısı 0 ila 5 arasında ise	6 ila 10 arasında ise	11 ila 15 arasında ise	16 ila 20 arasında	21 ila 25 arasında ise	26 ila 30 arasında ise	
<b>Vitellus kesesi çapı</b>							
		Somit sayısı	Baş-kıç uzunluğu	Baş uzunluğu			

### Embriyo Kültür Tekniklerinin Önemi ve Kullanım Alanları

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 etmekle 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 (14) "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 dö-



nemdir (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 yada 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 yürütülmektedir (5).

Son yıllarda postimplante kemirgen embriyo kültür teknikleri, 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 (4,15).

Ayrıca 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).

Embriyo kültürü tekniği kullanılarak pek çok farmakolojik, toksikolojik ve teratojenik ajanların embriyo gelişimi üzerine etkileri ve etki mekanizmalarını araştırmak mümkün olabilmektedir.

## 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 uygulama alanları", XVIII. Gevher Nesibe Tıp Günleri III. Deneysel ve Klinik Araştırma Kongresi ve "Workshop"u, Kongre Kitabı, ss:16-24, 18-20 Mayıs 2000, Erciyes Üniversitesi, Kayseri
6. Al-Alousi, L A. *The investigation of some nutritional requirements of rat embryos undergoing organogenesis in vitro. PhD thesis, University of Leicester* 1983.
7. Calvert, N I R. *Trophic factors in rat serum and their effects on embryonic development. B.Sc. thesis, University of Leicester* 1985.
8. Daston, G P & D'Amato, RA. *In vitro techniques in teratology. Toxicology and Industrial Health* 1989, 5 (3): 555-585.
9. Williams, C L, Priscott, P K, Oliver, I T & Yeoh, G C. *Albumin and transferrin synthesis in whole rat embryo cultures. Journal of Embryology and Experimental Morphology* 1986, 92: 33-41.

10. Ülger, H & Pratten, M K. *The effect of VEGF on embryonic development and yolk sac vascularisation. J. Anat.* 1996, 189 (1): 239.
11. Ülger, H, Karabulut, A K & Pratten, M K. *The effect of fibroblast growth factor on embryonic development and yolk sac vascularisation. Teratology* 1996, 53: 32A
12. 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.
13. 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.
14. Mcbride WG. *Thalidomide and congenital abnormalities. Lancet* 1961, 16:1358
15. Kohhar D M. *In vitro testing of teratogenic agents using mammalian embryos. Teratog Carcinog Mutagen* 1980, 1:63-74.