

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI
ANTİ FGF-2 NİN EMBRİYO KÜLTÜRÜ ÜZERİNE ETKİLERİ

Proje No: TA-06-14

Proje Türü
NAP

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Erdoğan UNUR
Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı

Araştırmacının Adı Soyadı
Harun ÜLGER
Tıp Fakültesi
Anatomi Anabilim Dalı

EYLÜL 2011

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	5
GİRİŞ	6
MATERYAL VE METOT:	7-8
BULGULAR	9-14
TARTIŞMA ve SONUÇ	15
KAYNAKLAR	16-17

ÖZET:

Bu çalışmada anti-fibroblast growth factor-2 (anti-FGF-2 or anti-bFGF)'nin kültüre edilen rat embriyoları üzerinde etkilerini incelemeyi amaçlandı. Total embriyonik gelişim üzerine anti-bFGF-2'nin in vitro etkilerini toplam 40 rat embriyosu üzerinde incelendi. Embriyolar 9.5 günlük hamile ratlardan elde edildi. Beş hamile rattan elde edilen toplam 40 embriyo toplam 4 gruba bölündü. Embriyolar total rat serumu (WRS) içerisinde ve WRS +2.5, 5 ve 10 mikrogram /ml anti-bFGF ilave edilen kültür ortamında tutuldu. 48 saat kültür ortamında büyütülen her gruba embriyolar kültür ortamından alınarak morfolojik skorlama sistemiyle ve daha sonra protein içeriğini tespit etmek için biyokimyasal olarak incelendi. Embriyoların morfolojik skoru, embriyo protein içeriği, somit sayısı ve baş-kıç uzunluğu, total rat serumuna anti-bFGF ilave edildiğinde anlamlı olarak embriyo gelişiminin gerilediğini ortaya koydu. Ortalama morfolojik skorlar total rat serumunda (WRS) ve 2.5, 5 ve 10 mikrogram anti-FGF-2 ilave edilen kültür ortamında büyütülen her bir embriyo için sırasıyla 61.4 ± 1.64 , 46.3 ± 8.42 , 27 ± 2.58 ve 13.6 ± 0.96 olarak tespit edildi.

ABSTRACT: In this study, we aimed at the in vitro effects of anti-fibroblast growth factor-2 (anti-FGF-2 or anti-bFGF) on embryo culture in rats. In vitro effects of anti-bFGF on total embryonic development were investigated in 40 rat embryos (which were divided into four groups) (obtained from five pregnant females) at 9.5 days of gestation that were cultured in whole rat serum (WRS), and in WRS+ 2.5, 5, and 10 lg/ml anti-bFGF. After 48 h of culturing, the embryos from each group were harvested to be analysed morphologically according to a morphological scoring system and biochemically to obtain the embryo protein content. The morphological score, embryo protein content, somite number and crown-rump length of embryos indicated that embryos cultured in WRS+ anti-bFGF had significant embryonic retardation. Mean morphological scores for the embryos grown in WRS, in the presence of 2.5, 5 and 10 lg anti-FGF-2 were 61.4 ± 1.64 , 46.3 ± 8.42 , 27 ± 2.58 and 13.6 ± 0.96 respectively. These results suggest that bFGF is very important for normal embryonic development and rat anti-bFGF neutralizes bFGF effect.

GİRİŞ: Çok az miktarları bile hem *in vivo* ve hem de *in vitro* olarak hücre aktivitesini etkileyen protein karakterindeki maddelere büyüme faktörleri denir. Büyüme faktörleri fonksiyonlarını endokrin, otokrin veya parakrin mekanizmalarla sağlamaktadır. Farklı etkilere (angiogenezis, kemotaksis, hücre çoğalması, fibroblast göçü, yara iyileşmesi ve kollagen yapımı) sahip çok sayıda büyüme faktörü bulunmaktadır (1). Büyüme faktörleri içerisinde üzerinde en çok çalışma yapılan grup Fibroblast Growth Factor (FGF) ailesidir. FGF ailesine ait ilk üye 1974 yılında izole edilmiştir (2). Günümüze kadar FGF ailesine mensup 23 üye tespit edilmiş olup bunların varlığı omurgalı ve omurgasız birçok canlıda gösterilmiştir (3). FGF'ler embriyonik ve fetal gelişimde, damarlanma, yara iyileşmesi, doku oluşumu, yangı, sinirsel koruma, hücre çoğalması, hücre farklılaşması, hücre göçü, tümör gelişimi ve apoptosis gibi birçok önemli biyolojik sürecin düzenlenmesinde rol almaktadır (4-6). FGF'ler heparin ve diğer anyonik moleküllere sıkıca bağlanan polipeptit ailesidir. Bu yüzden bazal membrana karşı yoğun bir affinite gösterir. FGF'ler biyolojik aktivitelerini Fibroblast Growth Factor Receptor (FGFR) ile gerçekleştirir. Şimdiye kadar 4 adet FGFR (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 ve FGFR-4) tespit edilmiştir (5).

FGF-2 (basic-FGF: bFGF yada FGF-2) en çok bilinen FGF olup üzerinde yoğun olarak çalışılmıştır(3). FGF-2 moleküler ağırlığı 17 kDa olan tek zincirli bir polipeptit olup heparine olan yoğun affinitesinden dolayı heparin bağlayan polipeptit 2 olarak ta bilinir. FGF-2 *in vivo* angiogenesiste ve *in vitro* hücre proliferasyonunda endotel hücrelerinin ve düz kas hücrelerinin göçünü ve çoğalmasını tetikleyerek damar oluşumunu ve onların ağ yapısı kazanmasını indükler (7). FGF-2 endotel hücrelerinin büyümesini ve hayatiyetini devam ettirebilmesi için önemli bir rol oynayarak endotel hücre apoptosisini engeller. *In vivo* olarak ve deneysel olarak yapılan çalışmalar FGF-2'nin bloke edilmesi angiogenesinin inhibisyonu ile engellenir. FGF-2 geni olmayan farelerde yapılan çalışmalarda damar gelişimi ve embriyonik büyümenin olmadığı gösterilmiştir. Bu yüzden FGF-2 geni olmayan farelerde deride oluşturulan yaralarda iyileşme sürecinin ertelendiği ve bununda angiogenesis ile ilgili olduğu bilinmektedir (8).

FGF-2'nin etkisini nötralize eden antibody'nin kültür ortamına ilave edilmesi FGF-2'nin endogenez etkisini ortadan kaldıracak ve nöron büyümesini ve göçünü engelleyecektir (5). FGF-2'nin hücre kültürü üzerine etkilerini ortaya koyan sayısız çalışmalar mevcut olmasına rağmen *in vitro* kültürler üzerinde yapılan çok az çalışma vardır. Bu çalışmada biz total rat serumu içerisine anti-basic FGF ekleyerek, anti-basic FGF'in *in vitro* embriyo kültür ortamındaki doğrudan olan etkisini ve indirek olarak ta FGF-2'nin yokluğunda rat embriyolarında ortaya çıkan tabloyu ortaya koymayı amaçladık.

MATERYAL VE METOT: Çalışmamız Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır. Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinden temin edilen yaklaşık 8 haftalık 175-200gr ağırlığındaki Wistar albino turu ratlardan 3 dişi ve 1 erkek rat saat 17.00'de aynı kafese kondu.

Ertesi sabah Saat 08.00'de erkek ratlar kafeslerden ayrıldı ve dişi ratlardan vaginal smear alınarak ışık mikroskopunda incelendi. Vaginal smear'da sperm görülen raylar hamile olarak kabul edildi. Bu ratların iki ya da üç tanesi ayrı bir kafese alınarak etiketlendi ve 0.5 günlük gebe kabul edildi (9-12).

Gebeliklerinin 9.5'inci gününde dişi ratların karın ön duvarı eter anestezisi altında açılarak içerisinde embriyo bulunan uterus keseleri Hanks dengeli tuz solüsyonu bulunan petri kabına konuldu. Her bir gebe rattan yaklaşık 5-12 adet içerisinde embriyo bulunan uterus kesesi alındı. Bundan sonraki aşamalar lamin-air flow kabin içerisinde, stero mikroskop altında ve forceps kullanılarak gerçekleştirildi.

Uterus keseleri içerisinde bulunan embriyolara ulaşabilmek için uterus kas tabakası uzaklaştırılarak decidua'ya ulaşıldı. Embriyoya ulaşabilmek için decidua ikiye ayrıldı. Embriyo bulunduğu decidua yarımından embriyoya zarar vermeden nazikce çıkarıldı. Embriyo etrafında bulunan ve kemirgenlere özgü bir yapı olan Reicherts membranı embriyonal kutuptan yırtılarak embriyo etrafından alınarak embriyo izolasyonu tamamlandı. Böylece kültür ortamına konacak embriyolar elde edildi.

Çalışmamızda toplam 6 adet dişi rattan elde edilen 60 embriyo eksplantasyon prosedurune tabi tutularak izole edildi. Bu embriyolardan 10 tanesi iyi gelişmediği için, 10 tanesi ise izolasyon işlemi sırasında hasar gördüğü için kültür ortamına konulmadı. Kalan 40 embriyo deneysel çalışmamızda kullanıldı.

Eter anestezisi altında karın ön duvarı açılan hamile ratların bağırsakları sağ tarafa yatırılarak pars abdominalis aortae'nın bifurkasyonundan steril bir enjektör yardımıyla kan alındı. Alınan kan 3500 devirde 5 dakika süreyle santrifüj edildi. Elde edilen serum, içerisinde bulunan proteinlerin inaktivasyonu için 56°C'lik su banyosunda 30 dakika süreyle tutuldu. Bu serumlar daha sonra 0.22 µm'lik filtrelerden geçirilerek süzüldü. Serum içerisine kontaminasyonu engellemek için antibiyotik ilave edildi.

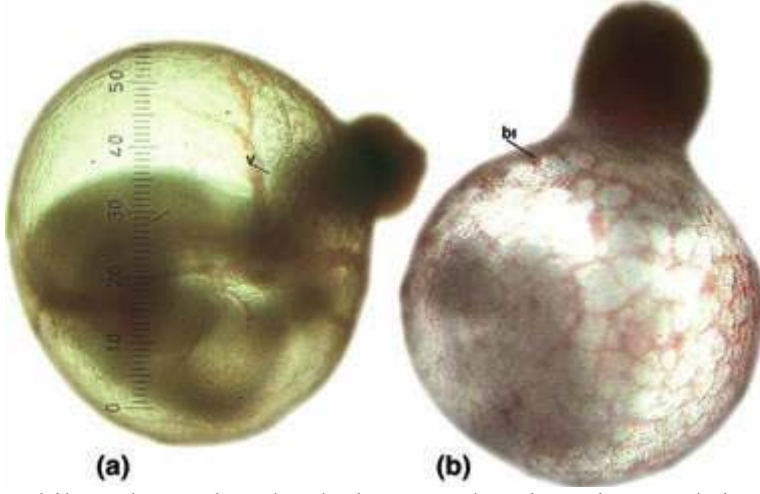
Çalışmamızın deneysel kısmını yapabilmemiz için 1 kontrol ve 3 deney grubu olmak üzere toplam 4 grup oluşturuldu. Kontrol grubuna ait embriyolar, embriyo başına 1ml total rat serumu (WRS) içerisinde kültüre edilirken (Her bir kültür şişesinde toplam 5 ml serum ve 5 embriyo), deney gruplarında embriyo başına 1ml normal rat 2.5, 5 ve 10 mikrogram anti-FGF-2 ilave edildi. Bu işlem 2 kez tekrarlanarak kontrol ve deney gruplarında embriyo sayısı 10'a tamamlandı.

Kültür şişesine aktarılan embriyolar içerisinde %5 O₂, %5 CO₂ ve %90 N₂ bulunan gaz karışımı ile 1 dakika gazlandı. Ağzı kapatılan kültür şişeleri 37°C'lik inkübatöre içerisinde dakikada yaklaşık 30 devirle dönen tüpler üzerine yerleştirildi. Eksplantasyondan 24 saat sonra kültür şişeleri inkübatörden alınarak içerisinde %20 O₂, %5 CO₂ ve %75 N₂ bulunan gaz karışımı ile 1 dakika gazlandı. Embriyolar morfolojik skorlamanın yapılacağı son gün ise 44. saatte (skorlamadan 4 saat önce)

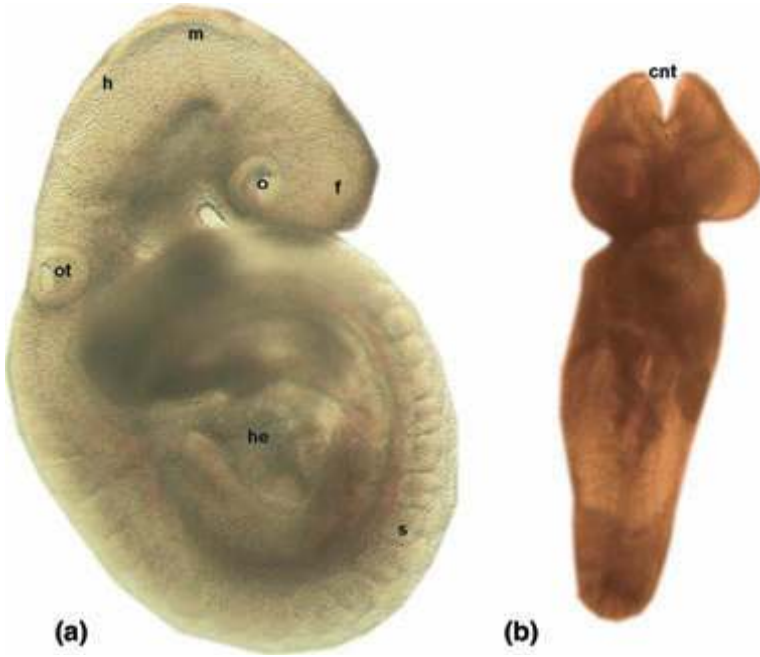
içerisinde %40 O₂, %5 CO₂ ve %55 N₂ bulunan gaz karışımı ile 1 dakika gazlandı. Üçüncü gazlamadan 4 saat sonra saat 13.00'de embriyolar kültür ortamından alınarak Van Maele-Fabry (18) ve ark. tarafından tanımlanan yönteme uygun olarak incelendi ve skorlamaları yapıldı. İstatistiksel olarak; 17 parametrenin toplanması ile elde edilen ve embriyo gelişimini içeren toplam morfolojik skor ile birlikte vitellus kesesi çapı, embriyonun tepe-kıç uzunluğu ve somit sayısı değerlendirildi. Toplam morfolojik skor içerisinde vitellus kesesi, allantois, vucut fleksiyonu, kalp gelişimi, nöral tüp, ön beyin, orta beyin, arka beyin, göz, kulak, burun, yutak kavisleri, maksillar çıkıntı, mandibular çıkıntı, ön ayak tomurcuğu, arka ayak tomurcuğu ve somit sayısı bulunmaktadır.

Elde edilen veriler (Toplam morfolojik skor ve somit sayısı, yolk kesesi çapı, baş-kıç uzunluğu ve protein içeriği istatistiksel olarak değerlendirildi. İstatistiksel analizde one-way anova ve non-parametrik bir test olan Kruskal–Wallis testi kullanıldı. İstatistiksel inceleme sonucunda P değeri < 0.05 olanlar anlamlı kabul edildi. Grupların karşılaştırılmasında Tukey ve Tamhane testleri kullanıldı.

BULGULAR: Kontrol grubuyla (total rat serumunda kültüre edilen) embriyolar ile deney gruplarında (anti-FGF-2 ilave edilen) yetişen embriyolar karşılaştırıldığında, deney gruplarındaki embriyolarda gelişim geriliği açıkça görülmektedir (Şekil 1 ve 2)



Şekil: 1-a kontrol grubu, b-deney grubunda yetişen embriyolar.



Şekil: 2-a kontrol grubu, b-deney grubunda yetişen embriyolar.

Morfolojik skorlama ve embriyo protein içeriğine baktığımızda deney gruplarındaki gerileme kültür ortamına ilave edilen ilave sistemin elde anti-FGF-2 miktarıyla doğru orantılı olarak artmaktadır (Tablo 1).

Table 1. Total rat serumu ve anti-FGF-2 ilave edilmiş kültür ortamında büyüyen embriyolara ait verilerin istatistiksel analizi

	Kontrol	2.5µg/emb.	5µg/emb.	10µg /emb.	P-value
Total morphological score					
SD	61.4 ± 1.64	46.3 ± 8.42	27 ± 2.58	13.6 ± 0.96	<0.001*
Median	62a	45ab	27bc	13.50c	
Min-max	59-64	35-57	21-31	12-15	
Yolk sac diameter					
SD	6.01 ± 0.19a	5.12 ± 0.29b	3.97 ± 0.52c	4.13 ± 0.34c	<0.001_
Median	5.95	5.15	3.85	4.00	
Min-max	5.75-6.25	4.60-5.50	3.40-5.30	3.70-4.60	
Crown-rump length					
SD	5.43 ± 0.22a	4.95 ± 0.21b	4.37 ± 0.42c	3.27 ± 0.40d	<0.001_
Median	5.40	4.95	4.25	3.25	
Min-max	5.10-5.80	4.70-5.40	4.00-5.50	2.80-3.70	
Somite number					
SD	24.30 ± 1.33	19.50 ± 2.17	14.80 ± 3.25	10.70 ± 2.21	<0.001*
Median	24a	19ab	15.50bc	11.50c	
Min-max	22-27	17-23	6-17	7-13	
Protein content					
SD	193.13 ± 30.9	149.41 ± 8.7	114.06 ± 10.0	78.60 ± 13.95	<0.005*
Median	196.4a	148.6b	114.25c	76.55d	
Min-max	149.4-235.6	137.9-162.8	99.6-130.4	55.3-97.7	

*Parametric test; one-way anova

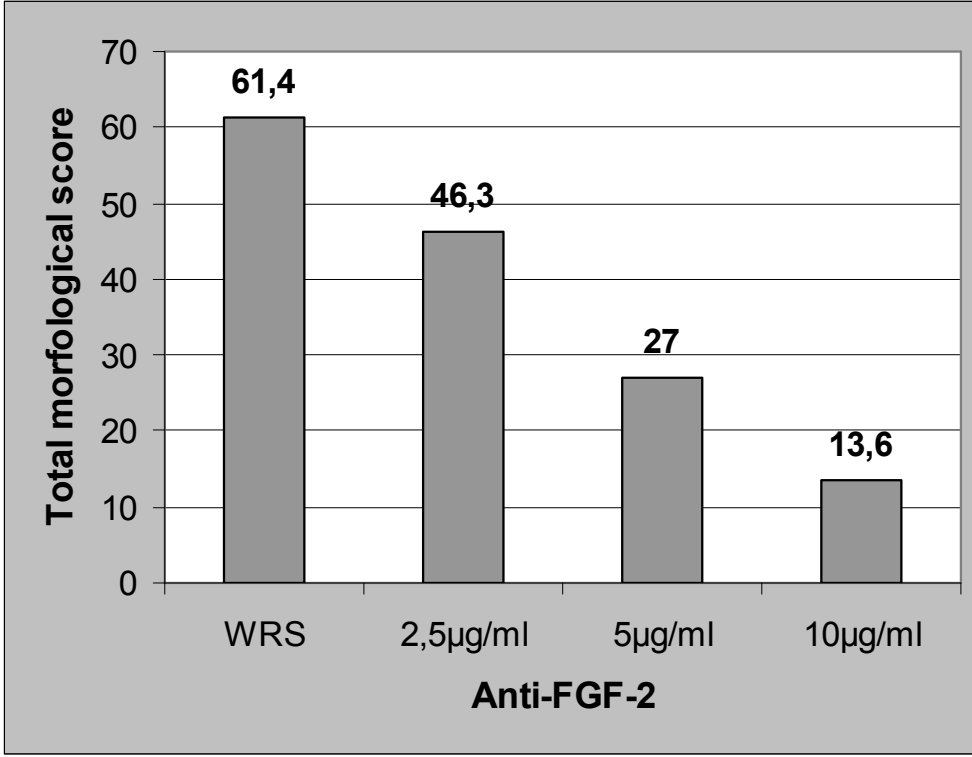
_ Non-parametric test; Kruskal-Wallis.

Deney gruplarında morfoljik skorun düşük olması yanında, yolk kesesinin az geliştiği, nöral tüpün kapanmadığı, embriyonik fleksiyonun tamamlanmadığı, göz, kulak ve koku taslaklarının az geliştiği, alt ve üst çene çıkıntılarının tam gelişmediği, ön ve arka ekstremite tomurcuklarının az geliştiği görüldü. Deney gruplarında total morfoljik skora ilave olarak yolk kesesi çapının düşük olduğu, baş-kıç uzunluğunun az olduğu somit sayısında ve embriyo protein, içeriğinde azalma olduğu görüldü.

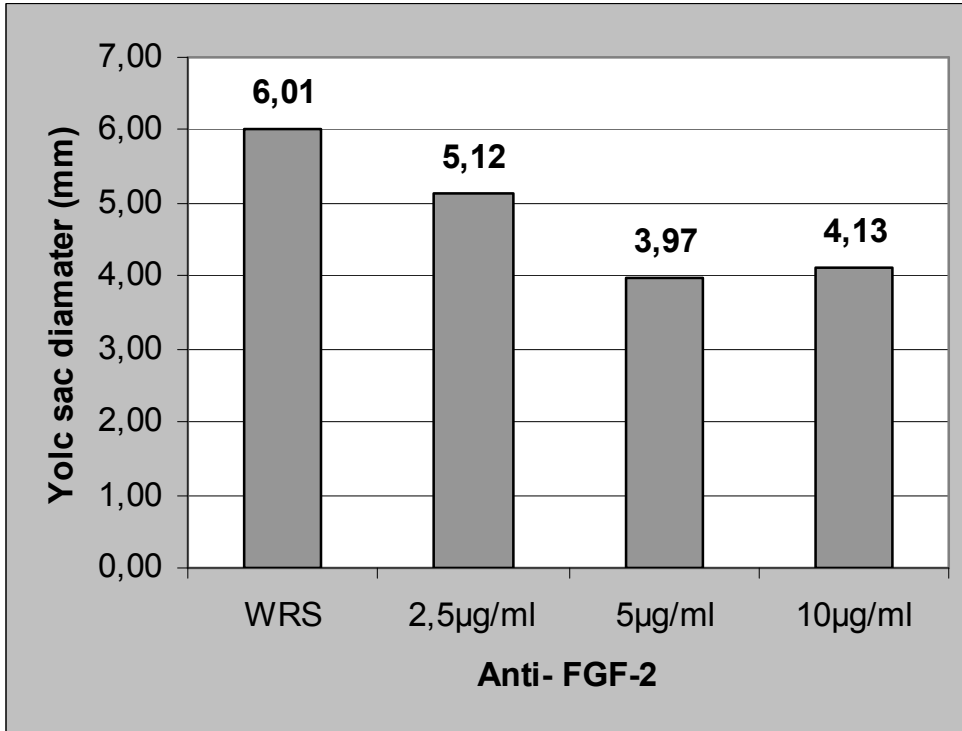
Kontrol grubu ile deney gruplarındaki toplam morfoljik skor kıyaslandığında kültür ortamına ilave edilen anti-basic FGF miktarı arttıkça toplam morfoljik skorun düştüğü görüldü (Şekil 3).

İstatistiksel analiz yolk kesesi çapında anlamlı bir gerileme olduğunu ($P < 0.01$), baş-kıç uzunluğunda ve somit sayısında ve embriyo protein içeriğinde ($P < 0.05$) değerinde anlamlı bir gerileme olduğunu ortaya koydu (tablo 1). Yolk kesesi çapı kontrol grubunda 6.01 ± 0.19 mm iken deney gruplarında sırasıyla 5.12 ± 0.29 , 3.97 ± 0.52 and 4.13 ± 0.34 mm idi (Şekil: 4).

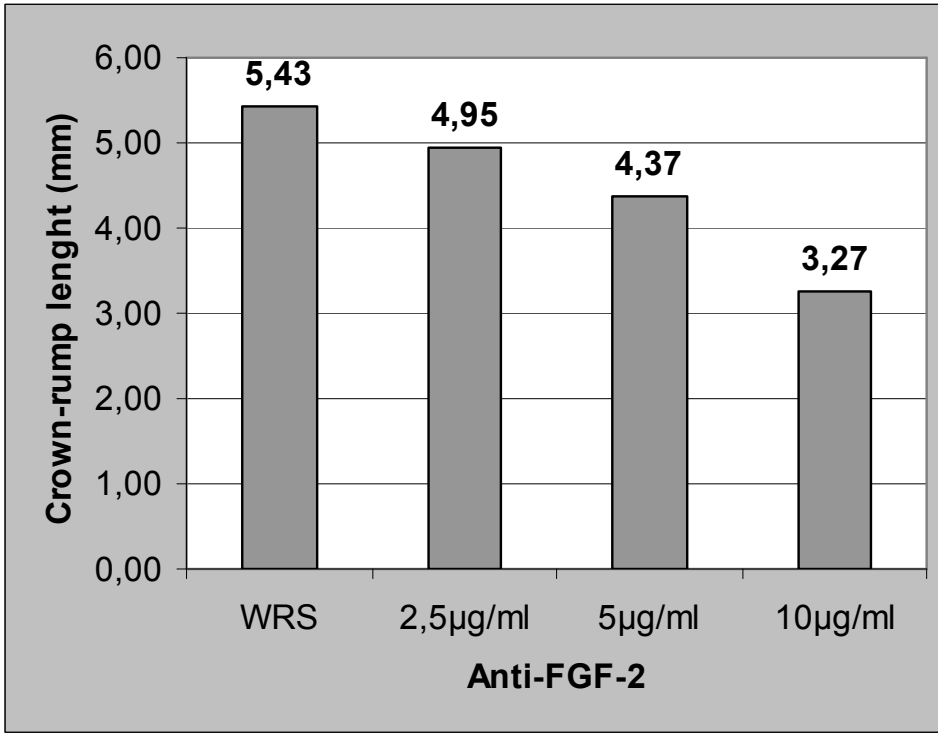
Baş-kıç uzunluğu kontrol grubunda 5.43 ± 0.22 mm iken deney gruplarında anti-FGF-2 dozuna bağlı olarak sırasıyla 4.95 ± 0.21 , 4.37 ± 0.42 and 3.27 ± 0.40 mm.'ye geriledi. (Şekil: 5).



Şekil -3: Kontrol ve deney gruplarındaki toplam morfolojik skor.

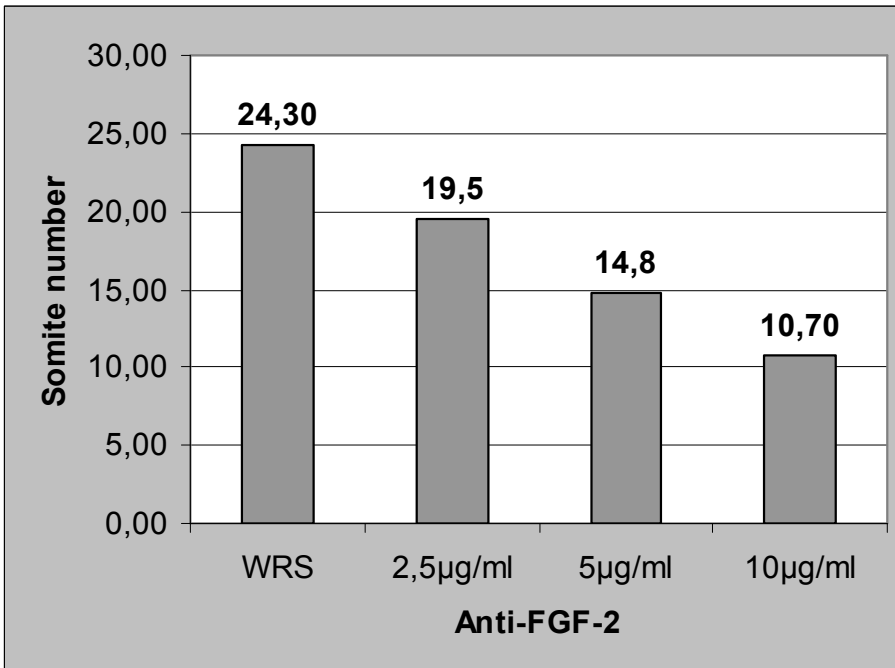


Şekil -4: Kontrol ve deney gruplarındaki yolc kesesi çapı.



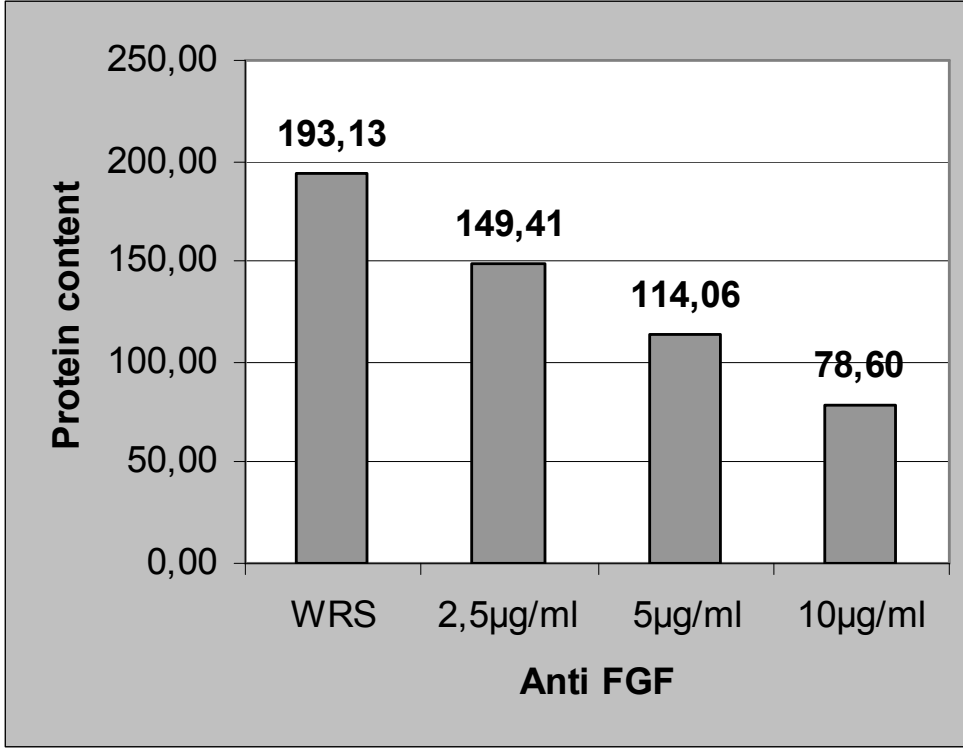
Şekil-5: Kontrol ve deney gruplarındaki baş-kıç uzunluğu.

Ortalama somit sayısı kontrol grubunda 24.3 ± 1.33 iken deney gruplarında sırasıyla 19.50 ± 2.17 , 14.80 ± 3.25 ve 10.70 ± 2.21 'e geriledi (Şekil: 6).



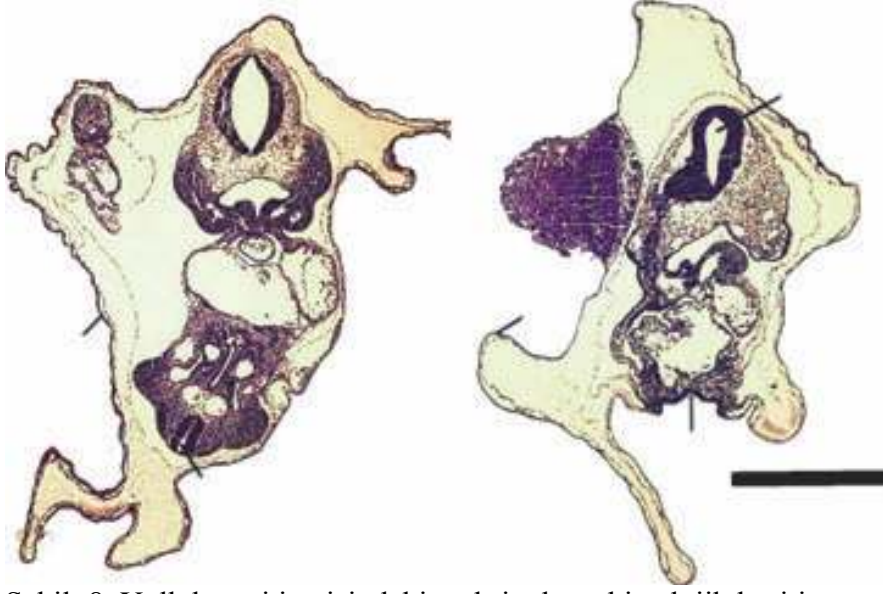
Şekil-5: Kontrol ve deney gruplarındaki somit sayısı.

Ortalama embriyo protein içeriği kontrol grubunda 193.13 ± 30.9 lg/ml iken, deney gruplarında sırasıyla 149.41 ± 8.7 , 114.06 ± 10.0 , 78.60 ± 13.95 lg/ml'ye geriledi (Şekil: 7)



Toplam rat serumunda büyüyen kontrol grubuna ait embriyolarda yolk kesesi damarlanması tam şekillendiği halde WRS+ 2.5 lg anti-FGF-2 ilave edilen grupta vitellus dolaşımı oluşmuş ancak yolk kesesi damarlanması çok azdı. WRS+ 5 lg anti-FGF-2 ilave edilen grupta ise hiç damar gelişimi görülmedi sadece kan adacıkları mevcuttu (Şekil: 1a,b).

Şekil 4 yolk kesesi çapının kontrol ve deney grupları arasındaki karşılaştırmayı göstermektedir. Tüm deney gruplarında nöral tüp oluşumunda gelişme geriliği görüldü. Anti-FGF-2 ilave edilen kültür ortamında büyütülen embriyoların nöral tüplerinin kranial ve kaudal bölgelerinde açıklıklar mevcuttu (Şekil: 2b). Histolojik kesitler deney gruplarındaki benzer durumu açık olarak ortaya koydu (Şekil: 8a,b).



Şekil: 8. Yolk kesesi içerisindeki embriyoların histolojik kesiti.
Boya: hemetoxilen eosin. Çubuk: 200 μm

TARTIŞMA VE SONUÇ:

Fibroblast büyüme faktörleri, nematodlardan insanlara kadar değişik organizmalarda bulunan bir polipeptid ailesi olup vertebralılarda şimdiye kadar 23 üyesi tespit edilmiştir (4, 14). FGF'ler omurgalıların yaşam süreçlerinin farklı evrelerinde değişik roller üstlenmektedir (20-22). Yaptığımız çalışmada, embriyoların gelişim düzeylerini değerlendirebilmek için Van Meale-Fabry ve arkadaşları (18) tarafından geliştirilen ve 17 ayrı parametre ihtiva eden toplam morfolojik skorlama yöntemini kullandık.

Elde ettiğimiz veriler şunu açıkça göstermektedir ki; normal sıcan serumunda kültüre edilen embriyoların gelişim düzeyleri **in vivo** şartlarda yetişen embriyolar ile büyük benzerlik göstermektedir.

Farklı dozlarda anti anti-FGF-2 ilave ettiğimiz kültür ortamında yetişen embriyolarda ise belirgin bir gelişim geriliği gözlemlendi. Bu gelişim düzeyindeki gerilemenin kültür ortamına ilave edilen anti FGF-2 miktarına bağlı olarak değiştiği ve en fazla gelişim gerilemesinin embriyo başına 10 µgr anti FGF-2 ilave ettiğimiz grupta olduğu tespit edildi.

Anti FGF-2 ilave edilen rat serumunda kültüre edilen embriyoların gelişim düzeyleri normal rat serumunda kültüre edilen embriyolara göre gerilemektedir. Anti FGF-2'nin kültür ortamına ilave edilmesi ve FGF-2'nin nötralizasyonunun sağlanmasıyla yaptığımız bu çalışmada, anti FGF-2'nin in vitro embriyo kültür ortamındaki etkisini direkt olarak, FGF-2'nin etkisini ise indirekt olarak inceleme imkânı bulduk.

KAYNAKLAR:

- 1-Heath JK. Growth factors. Oxford: Oxford University Pres; 1993.
- 2-McGee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, et al. Recombinant basic fibroblast growth factor accelerates wound healing. *J Surg Res* 1988;45:145-53.
- 3-Ford-Perriss M, Abud H, Murphy M. Fibroblast growth factors in developing central nervous system. *Clinical and Experimental Pharmacology* 2001;28:493-503.
- 4-Ortniz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biology* 2001;2:1-12.
- 5- Hossain WA, Morest DK. Fibroblast growth factors (FGF-1, FGF-2) promote migration and neurite growth of mouse cochlear ganglion cells in vitro: Immunohistochemistry and antibody perturbation. *Journal of Neuroscience Research* 2000;62:40-55.
- 6- Powers C J, McLeskey SW, Wellstein A. Fibroblast growth factors, their receptors and signaling. *Endocrine-Related Cancer* 2000;7:165-97.
- 7-Nishida, S., H. Nagamine, Y. Tanaka, and G. Watanabe, 2003: Protective effects of basic fibroblast growth factor against myocyte death and arrhythmias in acute myocardial infarction in rats. *Circ. J.* 67, 334–339.
- 8-Hagedorn, M., and A. Bikfalvi, 2000: Target molecules for antiangiogenic therapy: from basic research to clinical trials. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 34, 89–110.
- 9-New, D. A. T., 1978: Whole embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 53, 81–125.
- 10-Ulger H, Pratten MK. The in vitro effects of low molecular weight serum fractions on embryonic wistar rat (*Rattus norvegicus*) development. *Anat. Histol. Embryol* 1999;28:265-9.
- 11- Ulger H, Karabulut AK, Pratten MK. The growth promoting effects of bFGF, PD-ECGF and VEGF on cultured postimplantation rat embryos deprived of serum fractions. *J. Anat.* 2000;197:207-21.
- 12- Ulger H, Ozdamar S, Unur E, Pratten MK. The effect of vascular endothelial growth factor on in vitro embryonic heart development in rats. *Anat. Histol. Embryol.* 2004;33:334-8.
- 13-Van Maele-Fabry G, Delhaise F, Picard JJ. Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryo. *Toxicol. In Vitro* 1990;4:149-56.
- 14-Bottcher RT, Niehrs C. Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine Reviews* 2005;26:63-77.
- 15-Presta M, Dell’Era P, Mitola S, Moroni E, Ronca R, Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Reviews* 2005;16:159-78.

16- Goldfarb M. Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996;7:311-25.

17- Dell'Era P, Ronca R, Coco L, Nicoli S, Metra M, Presta M. Fibroblast growth receptor-1 is essential for in vitro cardiomyocyte Development. *Circulation Research* 2003;5:414-20.