

5

Dr. Yahya GÜVENÇ¹, Dr. Ali DALGIÇ²¹Ankara Sincan Devlet Hastanesi, Ankara; ²Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, AnkaraCİVCİV EMBRİYOLARINDA
OMURİLİK GELİŞİM MODELİ

Tavuk embriyosunun, erken dönemde gösterdiği gelişim, özellikle ilk 48 saatlik süreci, memeli omurgasının embriyonal gelişiminin ilk ayına benzer. Bunun için nörolasyon evresinin araştırılmasında civciv embriyoları uygun bir modeldir. Tavuk embriyosu, in vivo ortamda omuriliğin embriyolojik gelişim safhalarına müdahalenin kolay olmasından dolayı deneysel araştırmalar için önemli bir modelidir.

İnsan omuriliğinin gelişimini incelemek için, insan embriyolojisini bilmek kadar çalışılan deneklerin de embriyolojik gelişimi bilinmelidir. Ancak unutulmamalıdır ki, bu embriyolojik çalışma modeli, insan embriyolojisinde spinal kord gelişiminin erken evresine denk düşmektedir ve nörolasyon evresine ilişkin gelişim anomalilerini incelemek uygun olacaktır (Şekil 1).

CİVCİVDE EMBRİYOGENEZ

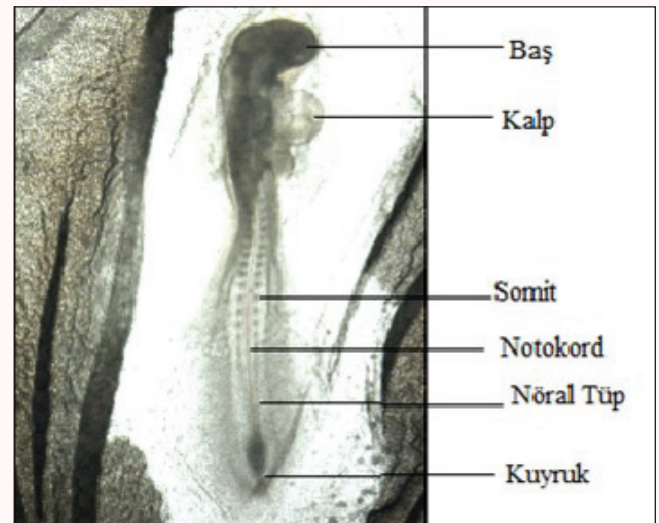
Tavuklarda ortalama olarak kuluçka süresi 22 gündür; bunun bir günü tavuk vücudunda, 21 günü kuluçkada geçmektedir. Yumurta kuluçka makinesine konuncaya kadar yumurtada bulunan embriyo uykudadır. Yumurtlama sonrasında embriyonik gelişmeyi tam olarak durdurmak için 15-18°C'ler arasında bir çevre sıcaklığı sağlanmalıdır. Embriyonik gelişmenin ihtiyaç duyduğu optimum sıcaklık 37.5°C'dir.

Gerek doğal ortamında, gerekse kuluçka makinesinde (Şekil 2) uygun ısı sağlandığı takdirde; birinci gün embriyonun uzun eksenini boyunca embriyoner

disk oluşur. Bu diskden endoderm, ektoderm ve mezoderm adı verilen hücre tabakaları farklılaşarak gelişmeye başlar. Vücudun bütün organ ve kısımlar bu üç hücre tabakasından meydana gelir. Hamburger ve Hamilton 1951 yılında civciv embriyosunun tüm gelişim safhalarını inceleyerek 46 evreye ayırmıştır (1). Buna göre; 8. evrede nöral plak gelişmiş ancak açıktır; 13. evreye gelindiğinde nörolasyona denk düşecek şekilde nöral tüp kapanmaktadır.

Evre 1 (Çizgi öncesi):

İlkel çizginin görünmeye başlaması. Hücrelerin blastodermin arka yarısına doğru toplanması sonucu oluşan embriyonik katlantı görülebilir.



Şekil 1: Civciv embriyosu.



Şekil 2: Kuluçka makinesi.

Evre 2 (İlk çizgi) (6-7 saat):

Geçici bir evre olup primitif çizginin kısa olarak, koni şeklinde kalınlaşmanın uzun olarak görüldüğü evredir. Genellikle inkübasyondan 6-7 saat sonra ortaya çıkar.

Evre 3 (Ara çizgi) (12-13 saat):

İlkel çizgi, posterior kenardan pellusid alanının merkezine doğru uzanmıştır. Çizgi boyuna göre rölâtif olarak daha geniştir ve etrafına göre parlak olarak görülür. İlkel oluk oluşmamıştır.

Evre 4 (Kesin Çizgi) (18–19 saat):

İlk çizgi oluşabileceği maksimum uzunluk olan 1.88 mm ulaşmıştır. İlkel oluk, ilkel çekirdek ve Hensen's nodu oluşmuştur. Pellusida alanı, uzunluğu daha da artmış olup armut şeklini almıştır.

Evre 5 (Baş oluşum başlangıcı) (19–22 saat):

Hensen's Nodu'nun ön köşesinden öne doğru uzanan, yoğunlaşan mezodermin bir çubuğu şeklinde notokord veya baş oluşumu görülmeye başlar. Başa ait katlantı henüz görünmemektedir.

Evre 6 (Baş kıvrımı) (23–25 saat):

Notokorda doğru olan blastodermin kesin katlantısı embriyonun ön ucunda belirginleşmiştir. Henüz somitler görülmeye başlamamıştır. Bu bir geçiş dönemi

midir, baş oluğu ve ilk somit çiftinin oluşumu yakın zaman aralığı içindedir. 7 ve 14. evreler primer olarak net görülebilen somit çiftine dayanır. Gelişimin bu döneminde evrelemede en basit kriter görünen somitlerin sayısıdır.

Evre 7 (Bir somit) (23–26 saat):

Bu dönemde gerçekte 2 somitlidir. Birinci somit henüz açık bir biçimde görülmez. Nöral katlantılar baş bölgesinde görülür hale gelmiştir.

Evre 8 (Dört somit) (26–29 saat):

Nöral katlantılar orta beyin seviyesinde birleşirler. Bu dönemde 4 somit vardır. Blastodermin posterior yarısında kan adacıkları görülmeye başlar.

Evre 9 (Yedi somit) (29–33 saat):

Primer optik kesecikler oluşmaya başlar. Kalbin odacıkları birleşmeye başlar. Somit sayısı ortalama 7'dir.

Evre 10 (On somit) (33–38 saat):

Somit sayısı 10'a ulaşmıştır. Birinci somit dağınık olarak yerleşim gösterir ve bundan sonraki evrelerde sayıya dahil edilmeyecektir. Kranial katlantının ilk işareti olan üç adet ilk beyin keseciği, açık şekilde görülür hale gelir. Optik kesecikler net değildir. Kalp hafif sağa doğru yerleşimlidir.

Evre 11 (Onüç somit) (40–45 saat):

Hafif bir kranial katlantı vardır. Arka beyin 5 nöromere ayrılmıştır. Ön nöropor kapanmaya başlamıştır. Optik kesecikler belirginleşir. Kalp sağa yerleşmiştir. Bu evrede somit sayısı 13 olmuştur.

Evre 12 (Onaltı somit) (45–49 saat):

Kafa sola doğru dönmüştür. Ön nöroporun kapanması ile nöral tüp kapanması tamamlanır. Telensefalon görülmeye başlamıştır. Primer optik kesecikler ve optik sak oldukça iyi şekilde görülür. Kulak çekirdeği derindedir ve geniş şekilde açıktadır. Kalp hafif bir S şekli alır. Amnionun baştaki katlantısı ön beyin bölgesinin girişini kaplar. Somit sayısı 16 olmuştur.

Evre 13 ve sonrasında Evre 46'ya kadar uzanan süreçte embriyo gelişimi tamamlanır.

KULUÇKA

Kuluçka makineleri, yumurtaların doğal ortamına benzer şekilde hava, ısı ve nem ortamı sağlamaya yarayan

araçlardır. Kuluçkalık yumurtalara ön ısıtma işlemi yapılmalıdır. Böylece makineye konulan yumurtalarda terlemeyi ve çıkışın uzamasını önlenmiş olur. Kuluçka sırasında ise hava sirkülasyonunu; taze havanın alınması ve kirli havanın verilmesi sağlar, sıcaklığı ve nemi doğal ortamına uygun aralıklarda tutarlar.

Sıcaklık: Sıcaklık kontrolü en kritik faktördür. Çünkü gelişen embriyo, çevre ısısına oldukça hassastır. Canlı embriyonun gelişmesini en iyi şekilde tamamlayabileceği optimum sıcaklık derecesi 37.5°C'dir.

Nem: Yumurtadaki suyun, fazla buharlaşması veya yeterli hızda buharlaşmaması sonucunda embriyo zarar görür. Kuluçka ortamında bağıl nem sınırları %50-65 arasındadır.

Havalandırma: Embriyonik gelişim ilerledikçe oksijen ihtiyacı artar. Böylece gelişen embriyoda metabolizma sonucu oluşan karbondioksitin atılması ve embriyoya oksijen temini için kuluçka makinesinde sürekli bir hava değişiminin sağlanması gerekir.

EMBRİYO ELDE EDİLME YÖNTEMİ

Inkübasyonun 28. saatinde (Hamburger-Hamilton'a göre 8. evre) yumurtalar kuluçka makinesinden alınır. Öncelikle, yumurta kabuğu üzerine "batikon" ve ardından %70 etanol dökülerek sterilizasyon sağlanır. Yumurtanın tam kutbunda olmayıp hafif yan yüzeyinde bir pencere açılır (Şekil 3). Bu teknik ile yumurta kabuğu kırılarak 3-5 mm yarıçaplı bir pencere açılır. Daha sonra kabuk membranı açılır. Halka şeklindeki embriyoner disk görülür. Çalışmaya başlamadan önce bu embriyolardan birkaçı çıkarılarak incelenmelidir. Burada amaç, yumurtaların kuluçka süreci ile embriyonik gelişim sürecinin paralellüğünün gösterilmesidir. Kuluçka süresi ile embriyonik gelişimin uyumu sağlandıktan sonra standardizasyon sağlanmış olur ve çalışma başlatılabilir.

Eğer herhangi bir etken maddenin nöral tüp gelişimine etkisi araştırılacak ise uygun zaman bu evredir. Ancak akılda bulundurulması gereken en önemli nokta embriyonun henüz karaciğer, böbrek vb. organlarının yokluğudur. Bu nedenle, embriyoya herhangi bir etken madde verilecek ise bu mutlaka bir aktif metabolit olmalıdır; ana etkeni aktif metabolite dönüştürecek organlar henüz gelişmemiştir.

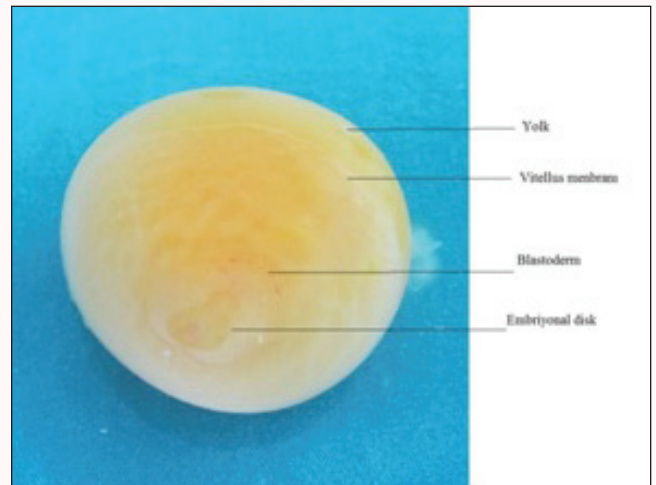
Araştırılacak maddeler, subblastodermik olarak embriyo diskine zarar vermeden yapılmalıdır. Bunun için Hamilton mikroşırıngalar kullanılır. Verilecek

hacim ise 10 mikrolitre üzerinde olmamalıdır, aksi takdirde embriyo diski ayrılır ve gelişimi durur. Enjeksiyon sonrası yumurta üzerindeki açık pencere hava almayacak şekilde, steril plastik "drape" ile kapatılır. Daha sonra yumurtalar 180 derece çevrilerek tekrar kuluçka makinesine konulur.

Hamburger-Hamilton'a göre 8. evre yani inkübasyonun yaklaşık 48. saatinde nöral tüpün kapanmış olması beklenir. Bunun için yumurtalar kuluçka makinesinden çıkartılır steril temizliği sağlanır. Yumurta kabuğu kırılarak yalnızca yumurta sarısı steril ringer laktat veya serum fizyolojik (%0.9 NaCl) bulunan cam bir kaba konulur (Şekil 4). Saat camı, blastodermi almak üzere hazır şekilde kaba yerleştirilir. Sonrasında ince forsepsler ve ince uçlu makaslar kullanılarak embriyonik zarlardan vitellin membran yolku üzerinden kesilir (Şekil 5, 6). Vitellin membran her iki uçtan dikkat-



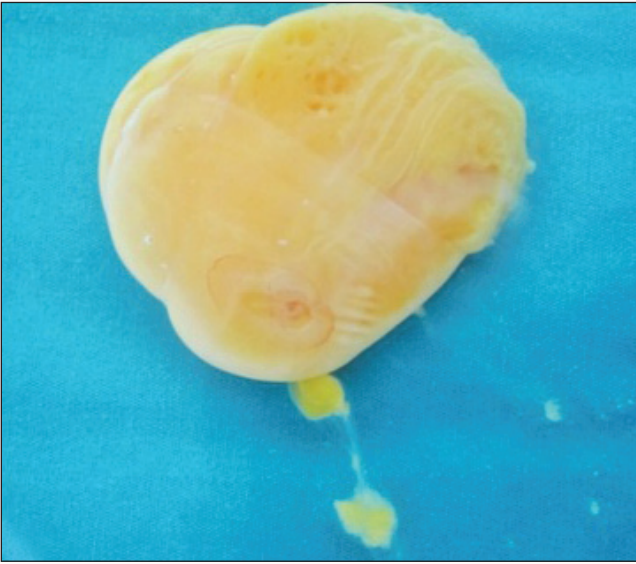
Şekil 3: Pencere açma tekniği ile açılmış yumurta.



Şekil 4: Cıvıv embriyosu ve embriyo diski.



Şekil 5: Yumurta sarısı %0.9 NaCl solüsyonu içinde.



Şekil 6: Cıvciv embriyosu ve embriyonik disklerin kesilip çıkartılması.



Şekil 7: Embriyodan parafin blok ile alınan bir kesitin hematoksil-eozin ile boyanmasından sonra ışık mikroskobu ile görünümü.

lice tutularak yolkta ayrılır ve membrana yapışık olan blastoderm, sıvı içinde ilerletilerek saat camı içerisine yerleştirilir. Sonrasında saat camı, üzerinde blastoderm olacak şekilde kaptan çıkartılır. Bu aşamadan sonra, embriyolar ışık mikroskobu altında incelenecek hale gelmiş olur.

Embriyoların Hamburger-Hamilton sınıflamasına göre kaçınıcı evrede olduğuna bakılır ve başlangıçta olduğu gibi kuluçka süresi ile embriyonik gelişim süreci doğrulanır.

Embriyolar elde edildikten sonra parafin doku takibine alınmak üzere %10'luk formol solüsyonu içerisinde 24-48 saat tespit edilir. Fiksatiflerin uzaklaştırılması amacı ile 5 dakika distile su ile yıkanır. Dehidratasyon amacı ile 3'er dakika %50'den %100'e kadar artan etil alkol serilerinden geçirilir. Embriyoların parafin bloklar içinde ve kesit aşamasında görünürlüğünü sağlamak için %90'luk alkol içeren kaplara bir damla eozin boyası ilave edilir. Takip işlemi sırasında embriyoların diseksiyon mikroskobunda makroskobik görüntüleri incelenir. Ardından 2'şer dakika şeffaflştırma amacı ile iki değişim ksilene tabi tutulur. Sonra 60°C'lik etüv içerisinde 10 dakika ksilen-parafin uygulandıktan sonra baş-kuyruk doğrultuları belirlenerek dokular parafin bloklar içerisine gömülür. Bloklardan mikrotom aracılığı ile 5µ luk seri kesitler alınır.

Kesitler, deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60 C°'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika 2 değişim ksilene tabi tutulur. Ardından rehidratasyon

işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilerek kesitler 5 dakika akan su altında yıkanır. Hematoksilen ile 2 dakika boyandıktan sonra boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akan suda yıkanır. Diferansiyasyon için 2-3 saniye asit alkol'de tutulup 30 saniye eozin boyası ile boyandı ve akan su altında 5 dakika yıkanır. Daha sonra %80 ve %95'lik alkol serilerinden geçirilip şeffaflaştırma amacı ile 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulur ve entellan

ile kapatılır. Böylece hematoksilen–eozin boyaması tamamlanmış olup embriyolar ışık mikroskobu altında ayrıntılı olarak incelenebilir (Şekil 7).

KAYNAKLAR

1. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph.; 88; 49–92, 1951