T.C.

Maltepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

FARKLI EMBRİYO DONDURMA YÖNTEMLERİNİN, EMBRİYONİK KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİNDEN NANOG, OCT4, SOX2 VE SSEA4 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

KLİNİK EMBRİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice İSAN

141503103

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Ranan Gülhan AKTAŞ

İSTANBUL

2016

T.C. Maltepe Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

21.07.2016 tarihinde tezinin savunmasını yapan Hatice İSAN'a ait "Farklı Embriyo Dondurma Tekniklerinin Embriyonik Kök Hücre Belirteçlerinin Nanog, Oct4, Sox2 ve SSEA4 Ekspresyonu Üzerine Etkiler" başlıklı çalışma, Jürimiz tarafından Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı, Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programında Yüksek Lisans Tezi Olarak **Oy Birliği/Oy Çokluğuyla** Kabul Edilmiştir.

.....

Prof. Dr. Ranan Gülhan AKTAŞ
(Üye)

.....

Prof. Dr. Mehmet CINCIK
(Üye)

.....

Prof. Dr. Feriha ERCAN
(Üye)

T.C.

Maltepe Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

FARKLI EMBRİYO DONDURMA YÖNTEMLERİNİN, EMBRİYONİK KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİNDEN NANOG, OCT4, SOX2 VE SSEA4 EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİLERİ

KLİNİK EMBRİYOLOJİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hatice İSAN

141503103

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Ranan Gülhan AKTAŞ

İSTANBUL

2016

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, sağladığı mükemmel çalışma ortamıyla, her zaman desteğini yanımda hissettiğim, kişiliğini ve vizyonunu örnek aldığım, değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ranan Gülhan Aktaş'a; sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel yaklaşımları ve destekleri için hocalarım Sayın Prof. Dr. Mehmet Cıncık, Sayın Yrd. Doç. Dr. Pınar Buket Atalay'a,

Deneylerimin yürütülmesi esnasında, laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan ve laboratuvar çalışmalarımda önerileri ile bana yol gösterici olan Koç Üniversitesi, KUARF laboratuvar sorumlusu saygıdeğer hocam, Dr. Ali Cihan Taşkın ve ekibine,

Deneysel çalışmalarım sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım saygıdeğer hocam Olgu Enis Tok'a, sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen öğrenci arkadaşlarımdan başta Ayşe Uyanık olmak üzere; Rümeysa Doğan, Melis Gökçe Çil, Begüm Ceviz, Kübra Tüfekçi'ye, manevi destekleri için MÜKKAM ve İÜKÖK grubu öğrenci arkadaşlarıma, üniversitemizin pataloji ekibinden Derya Baran, Şule Kavaklı'ya, muhteşem arkadaşlığı ve manevi desteği için Yunus Emre Atlı'ya, tezimin düzenlenmesindeki yardımları için Fatma Çolak'a, koşulsuz sevgileri ve iyilikleriyle kendimi emin ellerde hissettiğim Nadime-Selim Türk ve Hülya-Celal Mengüç'e, çalışmam sırasında küçük veya büyük yardımını esirgemeyen herkese sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştirip bugünlere gelmemi sağlayan kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım, her zaman kalbimde yaşattığım anneme; sevgilerini ve desteklerini hep hissettiğim, en zor anlarımda hep yanımda olan babama ve kardeşlerime, çalışmam süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatıma girdiği andan itibaren bana sonsuz sevgisiyle destek olan değerlim Ferit Türk'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Hatice İsan, Farklı Embriyo Dondurma Yöntemlerinin, Embriyonik Kök Hücre Belirteçlerinden Nanog, Oct4, Sox2 Ve Ssea4 Ekspresyonu Üzerine Etkileri, Klinik Embriyoloji, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2016 Çalışmamızda; blastosist safhasındaki embriyoların klasik vitrifikasyon ve katı yüzey dondurma tekniği (SSV)yöntemleri ile dondurularak çözülmesinin ardından canlılık oranları ile embriyonik kök hücre belirteçlerinden Nanog, Oct4, Sox2 ve SSEA4 ekspresyonları açısından karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. B6C3F1 (C57BL/6J X C3H/HeN) dişi farelerden elde edilen pronükleer safhada (PN) embriyolar blastosist safhasına kadar kültüre edilmiştir. Bu embriyolardan 3 deney grubu (kontrol- SSV-vitrifikasyon) oluşturulmuştur. Dondurup çözme işleminin ardından 3 deney grubundaki blastosistler; morfolojik özellikleri ve embriyonik kök hücre belirteçlerinden Nanog, Oct4, Sox2, SSEA-4 ekspresyonları açısından değerlendirilmiştir. Embriyoların morfolojileri; faz kontrast mikroskopta incelenmiştir. Embriyonik kök hücre belirteçlerinin lokalizasyonu konfokal mikroskoplar kullanılarak araştırılmıştır. Zenn görüntü analiz programı ile belirteçlerdeki değişim sayısal olarak analiz edilmiştir. Tüm sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 20.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. SSV dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülen 68 adet blastosistin 49 adedi (%72), klasik vitrifikasyon dondurma yöntemi kullanılarak dondurulup çözündürülen 71 adet blastosistten 48 adedi (%68) canlılığını sürdürmüştür. Blastosistlerin dondurulmasında uygulanan SSV yönteminin, klasik vitrifikasyon yöntemine göre, çözündürme sonrası canlılık açısından daha avantajlı bir yöntem olduğu gözlemlenmiştir. Embriyonik kök hücre belirteçlerinden olan; Nanog, Oct4, Sox2 ve SSEA4 ekspresyon düzeyleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; SSV ve klasik vitrifikasyon gruplarında azalma olduğu görülmüştür. Ekspresyondaki azalma her dört kök hücre belirteci için ayrı ayrı incelendiğinde; klasik vitrifikasyon grubunda azalmanın daha belirgin olduğu dikkati çekmiştir. Nanog ve Sox2 ekspresyonu değerlendirildiğinde kontrol grubundan, klasik vitrifikasyon grubuna doğru ortalamalarda azalış gözlenmiştir;ancak kontrol ve SSV grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Tüm kök hücre belirteçleri içerisinde; dondurup çözme işleminin ardından her iki grupta da en fazla etkilenen belirtecin SSEA-4 olduğu görülmüştür.

Tüm bu sonuçlar; SSV tekniğinin de klasik vitrifikasyon yöntemine alternatif bir metod olarak düşünülmesi gerektiğini göstermektedir. Bu yöntemin klinikte hastalarda kullanımının tartışılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Kriyoprezervasyon, vitrifikasyon, katı yüzey dondurma tekniği (SSV), Nanog, Oct4, Sox2, SSEA-4.

ABSTRACT

Hatice İsan, The Effects Of Different Cryopreservation Techniques on the Expression of Nanog, Oct4, Sox2 and SSEA-4 , Clinical Embryology, Graduate Student, Istanbul, 2016

The current study aims comparative examination of the effects of classical vitrification and SSV techniques on the expression of main stem cell markers, Nanog, Oct4, Sox2 and SSEA4, on blastocysts.

Embryos at pronuclear (PN) stage were extracted from female B6C3F1 (C57BL/6J X C3H/HeN) mice. Those embryos were cultured until blastocyst stage. Healthy blastocysts were divided into three experimental groups : Control, SSV and classical vitrification groups.

After freeze and thaw process; all embryos were examined under phase contrast microscope.

Then, they were labeled with the antibodies specific for Nanog, Oct4, Sox2 or SSEA-4. Zenn image analysis ssytem was used for examination of the results. Statistical analysis was done by using SPSS 20.0.

49 out of 68 embryos (%72) were survived in SSV groups after thawing; while 48 out of 71 embryos (%68) exsisted after classical vitrification. Survival of the embryos after SSV group was higher than the classical vitrifiaction group. Nanog, Oct4, Sox2 ve SSEA4 expression were lowered when compared with the control. Only change at Nanog and Sox2 levels were not statistical meaningful. The most change was seen in the embryos labeled with SSEA4. Those results show that SSV method should also be considered as an alternative technique to the classical vitrification method. Further studies are needed to analyse if this method can also be used in clinics for therapy.

Keywords: Cryopreservation, vitrification, slow surface vitrification, Nanog, Oct4, Sox2, SSEA-4

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR i
ÖZET ii
ABSTRACT iii
İÇİNDEKİLER iv
ŞEKİLLER DİZİNİ viii
TABLOLAR DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Kriyoprezervasyon 3
2.1.1. Embriyo Kriyoperzervasyonu ve Avantajları 4
2.1.2. Kriyoprotektanlar 6
2.1.3. Kriyoprezervasyon Yöntemleri 8
2.1.3.1. Geleneksel Yavaş Dondurma (Slow Freezing) Yöntemi 9
2.1.3.2. Hızlı Dondurma (Rapid Freezing) Yöntemi 9
2.1.3.3. Vitrifikasyon Yöntemi 10
2.1.4. Embriyoların Çözündürme İşlemi 12
2.2. Farelerde Reprodüksiyon 13
2.2.1. Farelerde Süperovulasyon, PN Embriyo Eldesi ve Blastosist Safhasına Geliştirilmesi 14
2.2.2. In Vitro Ortamın Yardımcı Üreme Teknikleri Uygulamalarındaki Etkileri 14
2.2.3. İn Vitro Embriyo Kültürü 15
2.2.4. Embriyo Gelişim Aşamaları 15
2.3. Embriyonik Kök Hücreler 16
2.3.1. Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri 17
2.3.1.1. Nanog: 17
2.3.1.2. Oct4 18
2.3.1.3. Sox2: 19
2.3.1.4. SSEA4 19
2.3.1.5. Transkripsiyon Faktörlerinin Birbirleriyle İlişkisi: 20
3. GEREÇ VE YÖNTEM 24

3.1. Deneysel Yöntem 24
3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler 25
3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar 27
3.4. Süperovulasyon Amacıyla Gonodotropinlerin Hazırlanması 29
3.4.1. PMSG (Pregnant Mare Serum Gonodotropin) 29
3.4.2. hCG (Human Chorionic Gonodotropin) 29
3.5. Yıkama Medyumunun Hazırlanması 29
3.6. Kültür Medyumunun Hazırlanması 30
3.7. Süperovulasyon 30
3.8. Embriyoların Elde Edilmesi 30
3.9. Embriyoların Kriyoprezervasyonu 31
3.9.1. Klasik Vitrifikasyon Yöntemi ile Dondurma ve Çözme 31
3.9.2. SSV (Solid Surface Vitrification) Yöntemi İle Dondurma ve Çözme 33
3.10. İmmunohistokimyasal Boyama İşlemleri 35
3.11. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi 37
4. BULGULAR 37
4.1. Süperovulasyon ve PN Embriyo Eldesi Sonuçları 37
4.2. Dondurma-Çözme Deneyleri 38
4.3. İmmünohistokimyasal Boyama 42
4.4. İstatistiksel Analiz Değerlendirmesi 46
5. TARTIŞMA 51
6.SONUÇ VE ÖNERİLER 56
KAYNAKLAR 58
ÖZGEÇMİŞ 67

SİMGELER VE KISALTMALAR

BSA: Sığır Serum Albümin

CO_2: Karbondioksit

DAPI: 4′,6- diamidin-2- fenilidin

DMA: Dimetil Asetamid

DMSO: Dimetilsülfoksit

EG: Etilen Glikol

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon

hCG: İnsan Koryonik Gonadotropin

HTF: Human Tubal Fluid (İnsan Tüp Sıvısı)

İ.P: İntraperitoneal

ICM: Inner Cell Mass (iç hücre kitlesi)

IU: İnternational Unit (Uluslararası Ünite)

IVF: *In vıtro* fertilizasyon (yapay döllenme)

LIF: Lösemi İnhibitör Faktör

KPA: Kriyoprotektan Ajan

LH: Lüteinleştirici hormon

OHSS: Overyan Hiperstimülasyon Sendromu

PBS: Tuzlu Fosfat Tamponu

PMSG: Gebe Kısrak Serum Gonadotropini

PN: Pronükleer Safha

PROH: Propilen Glikol

PVP: Polivinil Pirrolidon

SAGE-1: SAGE Yarıklanma Medyumu

SAGE-2: SAGE Blastosist Medyumu

SSA: Seviye Spesifik Antijen

SSV: Solid Surface Vitrification (Katı Yüzey Camsı Dondurma)

YÜT: Yardımla Üreme Teknikleri

ZP: Zona Pellusida

° C: Santigrad Derece

μl : Mikrolitre

gr: Gram

M: Molarite

mg: Miligram

ml: Mililitre

sn: Saniye

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.2.4.1. Fare embriyosunun in vitro gelişimi. 16

Şekil: 2.3.1.5.1. Oct3/4 ve Sox faktörlerinin transkripsiyonel bağlantıları 21

Şekil: 2.3.1.5.2. Nanog, Oct3/4 ve STAT3' ün preimplantasyon evresindeki embriyolarda (üstteki) ve embriyonik kök hücrelerdeki (alttaki) fonksiyonları 22

Şekil: 3.9.1.1 Klasik vitrifikasyon yönteminin uygulanması 33

Şekil: 3.9.2.1 SSV yöntemi ile embriyo dondurma ve çözme işlemlerinin farklı aşamaları. 35

Şekil: 3.10.1.1. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemlerinin Farklı Aşamaları….36

Şekil: 4.2.1. Kontrol grubu fare embriyo blastosistleri, X40 39

Şekil: 4.2.2. Kontrol grubu fare embriyo blastosistleri-5 saat sonra, X40 39

Şekil: 4.2.3. SSV grubu embriyo blastosistleri, X100 40

Şekil: 4.2.4. SSV grubu embriyo blastosistleri (dondurulup çözündürülme işleminden 5 saat sonra, X100) 40

Şekil: 4.2.5. Klasik vitrifikasyon grubu embriyo blastosistleri (dondurulup çözündürülme işleminden hemen sonra, X100). 41

Şekil: 4. 2. 6. Klasik vitrifikasyon grubu embriyo blastosistleri (dondurulup çözündürülme işleminden 5 saat sonra, X100) 41

Şekil: 4.3.1. Kontrol grubu embriyo blastosistlerinde embriyonik kök hücre belirteçleri ifadeleri. 43

Şekil: 4.3.2. SSV grubu embriyo blastosistlerinde embriyonik kök hücre belirteçleri ifadeleri 44

Şekil: 4.3.3. Klasik vitrifikasyon grubu embriyo blastosistlerinde embriyonik kök hücre belirteçleri ifadeleri 45

Şekil: 4.4.1. SPSS Histogram Grafiği 48

Şekil 4.4.2. Oct4 Ekspresyonundaki Standart Sapma ve Ortalamaların Deney Gruplarına Göre Dağılımı 49

Şekil 4.4.3. Nanog Ekspresyonundaki Standart Sapma ve Ortalamaların Deney Gruplarına Göre Dağlımı 49
Şekil 4.4.4. SOX2 Ekspresyonundaki Standart Sapma ve Ortalamaların Deney Gruplarına Göre Dağlımı 50
Şekil 4.4.4. SOX2 Ekspresyonundaki Standart Sapma ve Ortalamaların Deney Gruplarına Göre Dağılımı 50

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo: 2.1.2.1. Kriyoprotektan Ajanların Sınıflandırılması..... 8

Tablo: 2.3.1.4.1. İnsan Ve Fare Embriyolarında Preimplantasyon Safhalarındaki Hücre Yüzey Antijen Ekspresyonları 20

Tablo: 2.3.1.5.1. SSEA-4, Oct-4, Nanog ve Sox-2 nin Karşılaştırmalı Özellikleri... 23

Tablo: 3. 1. Çalışmada Kullanılan Blastosist Sayıları Ve Deney Grupları..... 24

Tablo: 4.1- Hormon Uygulamasında Elde Edilen Pronükleer Safhadaki Embriyo Sonuçları (7,5IU PMSG, 7,5 IU hCG)..... 37

Tablo: 4.2.1. Dondurulup Çözündürülme Sonrası Blastosist Canlılık Oranları 42

Tablo: 4.3.1. Çalışmada Kullanılan Deney Grupları Ve Antikorlar. 42

Tablo 4.4.1. Varyansların Homojenite Değerleri..... 46

Tablo 4.4.2. Tek Yönlü Varyans Analizi Sonuçları..... 47

1. GİRİŞ

Yardımla Üreme Teknikleri (YÜT) ile ilgili uygulamalarda son yıllarda büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Bunlar arasında; embriyo, oosit, sperm ve doku örneklerinin dondurularak gerek duyulduğunda kullanılmak üzere saklanması yöntemleri, kısa adıyla "kriyoprezervasyon", çok önemli bir yer tutmaktadır. Kriyoprezervasyon konusundaki gelişmeler, yardımcı üreme tedavileri merkezlerine başvuran hastalarda başarının artmasını sağlamıştır. Bunun yanısıra, çok farklı alanlardaki deneysel çalışmalarda bu gelişen dondurma teknolojileri kullanılmaya başlanmıştır. Yine bu araştırmaların sonuçları, sanayide kullanılmaya başlanmış, hayvanlar ile ilgili teknolojilerin geliştirilmesinde son derece önemli katkılar sağlamıştır.

Kök hücre teknolojilerinin de giderek geliştiği ve umut vaat ettiği günümüzde, embriyoların ve embriyonal kök hücrelerinin en uygun şekilde dondurulması büyük önem taşımaktadır. Embriyo dondurma teknolojilerindeki gelişmeler başta yardımcı üreme merkezleri olmak üzere; biyomühendislik, transgenik teknolojiler, in vitro embriyo üretimi ve hayvancılık alanındaki çalışmalara inanılmaz katkılarda bulunmaktadır.

Embriyo dondurmak için farklı teknikler geliştirilmiştir. Bunlar arasında; klasik vitrifikasyon tekniği embriyoların uzun süreli saklanmasında dünya çapında sıklıkla kullanılan bir teknik haline gelmiştir. Katı yüzey camsı dondurma tekniği (SSV =solid surface vitrification) ise; 2000'li yıllardan sonra hayvan embriyolarında uygulanmaya başlanmış bir tekniktir. Soğutulmuş yüzey üzerinde hızlı dondurma tekniğinin embriyo üzerinde daha az hasara yol açabileceği düşüncesiyle geliştirilmiştir. Hayvan embriyoları üzerinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. İnsan embriyoları üzerinde henüz denenmemiştir. Bu tekniğin başarısının çok yönlü incelenmesi ve tekrarlayan deneylerle farklı parametreler açısından klasik vitrifikasyon yöntemine göre avantajlarının ve dezavantajlarının gösterilmesi gerekmektedir. Klasik vitrifikasyon yöntemi ile karşılaştırıldığında farklı açılardan üstünlüğü gösterilebilirse; insan embriyolarında da uygulamaya geçilebilir.

Gerek klasik vitrifikasyon yönteminin, gerekse SSV'nin embriyonik kök hücre belirteçleri ekspresyonu üzerine etkileri konusunda yeterince veri yoktur. Oysa, bir embriyonun normal gelişim sürecini tamamlayabilmesi için bu kök hücre belirteçlerinin embriyo gelişim zamanına uygun şekilde dağılımını ve değişimini tamamlaması gerekir. Çok farklı fonksiyonlara sahip bu kök hücre belirteçlerinin artması ya da azalması; embriyonik kök hücrelerde morfolojik ve fonksiyonel değişikliklere, dolayısıyla da embriyo anomalilerine sebep olabilir.

Bu çalışmada; klasik vitrifikasyon ve SSV yöntemlerinin gerek blastosist aşamasındaki embriyo yaşamda kalım oranlarını, gerekse embriyonik kök hücre belirteçleri ekspresyonlarını nasıl etkilediğinin karşılıklı olarak araştırılması hedeflenmiştir. Deneysel çalışmaların temelini oluşturduğu, genetik olarak kolay manipüle edilebildiği ve insan embriyosuna yüksek benzerlik gösterdiği için fare embriyosu model olarak tercih edilmiştir.

B6C3F1 (C57BL/6J X C3H/HeN) dişi farelerden süperovulasyon tekniği kullanılarak pronükleer safhada (PN) embriyolar elde edilmiştir. Elde edilen PN embriyolar in vitro hücre kültüründe blastosist aşamasına kadar geliştirilmiş; bu aşamadaki embriyolardan bir kısmı SSV yöntemi ile; bir kısmı ise klasik vitrifikasyon ile dondurulup çözündürülmüştür. Bu iki farklı vitrifikasyon tekniği uygulamasının ardından embriyonik kök hücrelerinde, en önemli embriyonik kök hücre belirteçlerinden olan Nanog, Oct4, Sox2, SSEA-4 ekspresyonundaki değişiklikler immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Ardından; embriyoların morfolojileri; faz kontrast, floresan ve konfokal mikroskoplar kullanılarak karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Embriyoların kök hücre belirteçleri ile işaretlenme oranları Zen görüntü analiz sistemi ile karşılaştırılmış, sonuçlar istatistiksel olarak da değerlendirilmiştir.

Elde edilen bulgular: embriyolar için en iyi dondurma çözme yönteminin belirlenmesi ve EKH belirteçleri ekspresyonu ile ilişkilendirilmesi açısından önem taşımaktadır. Embriyolarda kök hücre potansiyelindeki hücrelerin varlığının ve farklı kök hücre belirteçlerinin ifade düzeylerinin araştırılması; dondurma tekniği ile ilişkili olarak gerek embriyolar gerekse embriyonik kök hücreler ile ilgili araştırmalarda ve tedavilerde yol gösterici sonuçlar ortaya çıkarabilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kriyoprezervasyon

Yardımla Üreme Teknikleri (YÜT) giderek daha da yaygınlaşmış; yeni tekniklerin geliştirilmesine bağlı olarak da ilk uygulandıkları tarihten günümüze kadar büyük aşamalar ve ilerlemeler kaydedilen bir bilim alanı haline gelmiştir. Bunlar arasında; kriyoprezervasyon ile ilgili gelişmeler çok önemli bir yer tutmaktadır. Bu gelişmeler sayesinde; embriyolar uzun yıllar başarılı şekilde dondurularak saklanabilmekte, yardımcı üreme tekniklerinin uygulanacağı hastalarda ihtiyaç duyulduğunda çözülerek hastaya transfer edilmekte, daha başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir (1). Ancak bu başarının daha da arttırılabilmesi için çok yönlü çalışmalar hızla devam etmektedir.

1949 yılında spermlerin gliserol kullanılarak başarıyla dondurulması (2), bilimsel anlamda embriyo kriyoprezervasyonu araştırmalarının yapılması için bir başlangıç oluşturmuştur. Polge ve arkadaşlarının ilk başarılı spermatozoa dondurmasından yaklaşık 20 yıl sonra, ilk başarılı embriyo kriyoprezervasyonu yavaş dondurma yöntemi kullanılarak, Whittingham ve arkadaşları tarafından fare embriyolarında gerçekleştirilmiştir (6). Daha sonra bu çalışmayı sığır embriyolarının dondurulup çözündürülme işlemleri takip etmiş ve bunun sonucunda gebelik elde edilmiştir (7). Yapılan bu ilk çalışmalarda kriyoprotektan olarak DMSO (dimetilsülfoksit) kullanılmıştır. Bu süreç sonrasında birçok araştırma yapılmış ve bu araştırmalar neticesinde günümüzde birçok insan ve farklı hayvan embriyoları başarılı bir şekilde dondurulmuştur (8, 9, 10,11). Tüm bu gelişmelerin ardından embriyo kriyoprezervasyonu sonucu ilk başarılı doğum 1984'te gerçekleşmiştir (12).

Kriyobiyoloji; hücre, doku, organ ve organizmaların dondurulmasını inceleyen bilim dalı olarak günümüzde önemini daha da artırmıştır. Farklı teknolojilerle dondurularak çozülen hücrelerin fizyolojik ve fonksiyonel özelliklerinin daha iyi anlaşılması, kriyobiyolojiye çok önemli yönlendirici bilgiler sunmaktadır (3). YÜT'de gözlemlenen çoklu gebelikler; kriyoprezervasyonun önemini daha da arttıran bir diğer sorundur (4). İmplantasyon öncesi embriyoların dondurulması, embriyo dondurma teknolojilerinin ileriki gelişimleri açısından oldukça büyük önem taşımaktadır (5).

Kriyoprezervasyon ve YÜT sayesinde erkek ve dişi üreme hücrelerinde gözlemlenen yaşlanma, non-senkronize olgunlaşma ve bu nedenlerden kaynaklanan verimli olmayan hücrelerin üremede engel oluşturması sorunu neredeyse ortadan kalkmıştır. Embriyo kriyoprezervasyonu uygulamalarının başarı şansının arttırılabilmesi için günümüzde kullanılan tıbbi teknik ve uygulamaların (kültür ortamları, embriyo manipülasyonu, embriyo kültür teknikleri uygulamaları vs.) geliştirilmesi gereken yönleri bulunmaktadır.

Hücrelerin dondurulup çözündürme sonrası canlılık oranlarını doğrudan etkileyen faktörler bulunmaktadır. Türler arasındaki farklılık, dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında uygulanan donma-çözme hızları, hücrelerin geçirgenlik özellikleri, embriyoların gelişim dönemleri ve büyüklükleri, kriyoprotektanların toksisiteleri ve osmotik özellikleri bu faktörlerin en önemlileri arasındadır (13, 14, 15, 16).

Dondurulan farklı aşamadaki embriyoların soğutulması sırasında dengeye ulaşma biçimlerinden kaynaklanan farklılıklar ve dondurma sırasındaki işleminin hızı hücreler / embriyolar üzerinde son derece önemli etkiler yaratmaktadır. Uygulanmakta olan dondurma yöntemlerinin tümünde temel amaç, dondurma ve çözündürme işlemleri sırasında hücrelerde meydana gelebilecek hücre içi ve hücre dışı buz kristallerinin oluşumunun engellenmesidir. Bunu sağlamak amacıyla hücre içindeki sıvının kriyoprotektan maddeler ile yer değiştirmesi gereklidir.

2.1.1. Embriyo Kriyoperzervasyonu ve Avantajları

Embriyo kriyoprezervasyonunun, gametlerin dondurulmasına göre bazı avantajları bulunmaktadır. Hem anneden hem de babadan gelen genomik materyali içeren gamet ve embriyoların ayrı ayrı dondurularak saklanabilmesi, embriyo kriyoprezervasyonunu diğer biyolojik materyallere göre daha üstün avantajlı kılmaktadır. Gametlere kıyasla embriyolar diploid yapıda olup daha stabildirler ve bu stabillikten kaynaklanan mutajenik ve stress faktörlerine daha dirençlidirler. Bu bağlamda embriyo kriyoprezervasyonunun daha avantajlı olduğu düşünülmektedir (17).

Embriyo kriyoprezervasyonu insanlarda üremeye yardımcı yöntemlerin başarı şansını artıran, çiftlik ve laboratuvar hayvanlarında deneysel amaçlı çalışmaların yapılabilmesine, üstün genetik niteliklerin gelecek kuşaklara aktarılarak hayvan

ıslahının sağlanmasına ve soyu tükenmekte olan türlerin korunmasına olanak sağlayan YÜT'dir (18).

Günümüzde kriyoprezervasyon yöntemleri yardımla üreme merkezlerinde in vitro şartlarda elde edilen transfer fazlası embriyoların en uygun koşullarda saklanabilmesi amacıyla oldukça sık kullanılan bir yöntemdir (19). Bu transfer fazlası embriyolar dondurularak saklanmakta, transfer sonrası gebelik elde edilmediği durumlarda bu dondurularak saklanmakta olan embriyolar çözündürülerek sonraki embriyo transferlerinde kullanılabilmektedir. Özellikle son yıllarda klinik uygulamalarda çoğul gebeliklerin önlenebilmesi için, transferi yapılacak embriyo sayısına getirilen kısıtlamalar kriyoprezervasyon yöntemlerinin geliştirilmesi yönünde yapılan araştırmaların artmasına neden olmuştur. YÜT'lerinde dondurulmuş embriyoların kullanımının en büyük avantajı uterin polip varlığı, endometrial kavite içinde sıvı birikimi, kötü kalitede endometriyum, transfer öncesinde oluşan vajinal kanamalar, over hiperstimülasyon sendromu (OHSS) gibi taze embriyo transferinin kontrendike olduğu vakalarda uygulanabilmesi ve kadına kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) uygulamasına gerek kalmadan bir kez daha embriyo transfer şansı vermesidir (20). Aynı zamanda maddi yönden ve zaman açısından büyük avantajlar sağlamaktadır.

Genetik çeşitliliğin ve gen kaynaklarının etkin bir şekilde saklanması, biyoçeşitliliğin korunması dondurma teknolojilerinin uygulanmasını gerektiren diğer önemli bir alandır. Mevcut bölgelerden başka bölgelere canlının transfer edilmesi yerine elde edilecek embriyoların dondurularak saklanması, olası doğal afetlerden dolayı deney hayvanı vb. canlı hatlarının bu risklere maruz kalmalarını önlemek amacıyla da avantajlı olmaktadır (21).

Kriyoprezervasyon teknolojilerinin biyoteknoloji alanında getirdiği bu avantajlar, yeni teknolojilerin üretilmesi amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Canlı hücrelerin dondurularak uzun yıllar güvenli bir şekilde saklanabilmesi ve gerekli durumlarda çözündürülerek kullanılabilmesi bilim dünyasını ilgilendiren en önemli konulardan biri olmaya devam etmektedir.

2.1.2. Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektan ajanlar (KPA) ; embriyo, doku, gamet ve hücre gibi biyolojik materyallerin dondurma- çözündürme uygulamaları sırasında soğuk şoku ile oluşabilecek hasarları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddelerdir. Düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerini sadece belirli oranlarda katıldıklarında oluşturmaları KPA'ların en önemli özellikleridir (13,2). Hücre, dondurulmadan önce kriyoprotektanlarla muameleye tabi tutularak, hücre içi bakımından dengeye gelmesi sağlanır (22,13).

Hücreler soğuk şokuna maruz kaldıklarında membranlarında ve ozmotik basınçlarında değişiklikler meydana gelir. Bu değisiklikler hücrelerin çözülmesi sonrası yasamsal faaliyetlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda soğuk şokunun ve ozmotik zararın engellenmesinde gamet ve embriyoların bulunduğu ortamlara kriyoprotektif ajanlar katılmaktadır. Bu ajanlar çözum sonrası canlılığı ve fertilizasyonu optimize etmektedir. Son yıllarda geliştirilen bazı membransal parametreler, kriyoprotektif ajanların ortama hangi oranlarda ekleneceğinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Kriyobiyolojik mekanizmaların iyi anlaşılması, eşey hücrelerinin dondurulmasındaki başarıyı arttıracak ve fertiliteyi olumlu yönde etkileyecektir.

Dondurma- çözündürme işlemleri sırasında hücrelerde meydana gelebilecek hücre içi ve hücre dışı buz kristallerinin oluşumunun ve şok etkinin engellenmesi uygulanan tüm dondurma yöntemlerindeki temel amaçtır. Hücre dondurma medyumundaki KPA'ların toksisitesini azaltmak için, hücrelerin KPA'lara maruz kalma süresi kısaltılmakta, ya da geçirgen özelliği olmayan KPA'lar ek olarak kullanılmaktadır (23).

Hücreye penetrasyon kapasitelerine göre hücre membranından geçebilen (Permeabl) KPA'lar ve hücre membranından geçemeyen (Non-Permeabl) KPA'lar olmak üzere ikiye ayrılırlar. "Tablo: 2.1.2.1." de k KPA'ların sınıflandırılması ve bu gruplara giren kimyasal ajanlar özetlenmiştir.

Dimetilsülfoksit (DMSO), gliserol, etilen glikol, propilen glikol (PROH), 2,3 Bütanediol, dimetilasetamid (DMA) permeabl (intrasellüler) özelliğe sahip KPA'lardır. Bu tür KPA'lar, hücre içi sıvısı ile yer değiştirerek dehidrasyonu sağlayıp, hücre protein yapılarının korunmasını sağlarlar. Donma ve çözünme sırasında hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek hücre yapısının korunmasını sağlarlar. Dondurma solüsyonlarının içerisinde intrasellüler KPA' lardan en az bir tane bulunmalıdır (24).

Ekstrasellüler KPA'lar, hücre membranındaki fosfolipitlerin stabilitesini ve dehidrasyon oluşumunu kontrol ederler (25). Tek başlarına kullanılmazlar. Farklı KPA'lar ile birlikte kullanılarak çözme sırasında gerçekleşebilecek hücresel şişmeye engel olarak hücredeki hasarı en aza indirmeye çalışırlar (24).

Ekstrasellüler KPA'lar, makromoleküller ve sakkaritler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır:

i. Makromoleküller: Polietilen glikol, dekstran, bovine serum albumin (BSA), ficoll 70, mannitol ve polivilinilprolidon makromoleküllerinden en cok kullanılanlarıdır (26, 27, 28).

ii. Sakkaritler: Glukoz, galaktoz, sukroz, trehaloz ve raffinoz sakkaritlere örnek verilebilir. İntrasellüler bölgede oluşacak letal kristallenmeyi önlemek icin hücrede dehidrasyon oluşmasını sağlarlar (29,30). Dondurma ve çözme esnasında oluşan membran hasarlarına karşı, hücre membranındaki mevcut fosfolipid molekülleriyle etkileşime girerler. Bu sayede yüzeyde artış meydana getirerek hücreleri korurlar ve çözme işlemi süresince hücrelerin ozmotik şoka girmesini engellerler (28,29). Memeli embriyolarının dondurulmasında kullanılan sükroz oranı 0.25- 0,5 M'dır (31).

KPA'ların kullanılma oranları ; uygulanacak dondurma tekniğine göre değişkenlik göstermektedir. Yavaş dondurma metodu ile embriyoların dondurulmasında KPA'lar düşük oranlarda katılmaktadır (32,33). Vitrifikasyon metodunda ise, embriyoların dondurulmasında KPA'ların yüksek yoğunlukta kullanılması gerekmektedir.

Yine; farklı hücre soylarının ve farklı tür canlılara ait embriyoların KPA'lara yanıtı da farklılık göstermektedir. Kriyoprezervasyonda kullanılan solüsyonların içerikleri, dengelenme süreleri ve dengedeki sıcaklık değerleri oldukça önemlidir ve her hücre tipi için farklılık göstermektedir (34). Donma hasarı, osmotik stres, buz kristallerinin letal etkileri ve kriyoprotektif ajanların toksisitesi, kriyoprezervasyona bağlı ortaya çıkan komplikasyonlarda başlıca nedenlerdir (35).

Tablo: 2.1.2.1. Kriyoprotektan Ajanların Sınıflandırılması.

Hücre Membranından Geçebilen (İntrasellüler) Kriyoprotektanlar	Etilen Glikol (EG), Gliserol, Propilen Glikol (PROH), Dimetilsülfoksit (DMSO), 2,3 Bütanediol, Dimetilasetamid (DMA)	
Hücre Membranından Geçemeyen (Ekstrasellüler) Kriyoprotektanlar	**Makromoleküller**	Bovine Serum Albümin (BSA), Polivinilprolidon, Dekstran, Ficoll 70, Mannitol
	Sakkaritler	Glukoz, Galaktoz, Sukroz, Raffinoz, Trehaloz

2.1.3. Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Uygun bir dondurma protokolünü oluştururken başlıca amaç, embriyoyu fizyolojik olmayan çok düşük ısılara maruz bırakırken olabildiğince az hasar görmesini sağlamaktır. Yardımla üreme merkezlerinde ve deneysel çalışmalarda embriyo kriyoprezervasyonu için kullanılan yöntemler üç gruba ayrılmaktadır. Bunlar; Geleneksel Yavaş Dondurma (Slow Freezing), Hızlı Dondurma (Rapid Freezing) ve Vitrifikasyon yöntemleri'dir (27,36).

Bu teknikler ilk kez deney ve çiftlik hayvanları modellerinde geliştirilmiş, daha sonrasında bazı iyileştirmeler ve geliştirmeler yapılarak insan embriyolarında da uygulanmışlardır.

2.1.3.1. Geleneksel Yavaş Dondurma (Slow Freezing) Yöntemi

Başlangıçta embriyoların dondurulmasında yavaş ya da kademeli soğutmayı gerektiren programlı yavaş dondurma yöntemi (slow freezing) kullanılmıştır (37, 38).

Dünyada ilk kez yavaş dondurma tekniği kullanımı ile blastosist aşamasındaki embriyo dondurulup çözülmesi sonrasında gebelik elde edilmiştir (39). Bu sistemde embriyonun dengelenmesi orantılı olarak düşük kriyoprotektan konsantrasyonlarında (1.0- 1.5 mol/l) gerçekleşmektedir. Daha sonraki aşamada ekstrasellüler osmolarite arttıkça intrasellüler çözünen kriyoprotektif ajan konsantrasyonu da artar, embriyoda dehidrasyon ve büzülme olayları gözlenir. Yavaş dondurma koşullarında işlem sırasında oluşan küçük buz kristalleri daha büyük buz kristallerine dönüşüm eğilimindedir. Bunun önlenmesi amacıyla yavaş soğutma oranları uygulanarak büyük buz kristallerine dönüşüm engellenmeye çalışılmaktadır. Slow freezing yönteminde uygulanan "seeding" işlemi buz kristallerinin kontrolsüz bir şekilde oluşumunu engelleyerek ekstrasellüler ortama sıvı geçişi için yeterli süreyi sağlamaktadır. Bu amaçla insanlarda ilk uygulanan ve her evredeki embriyolarda kullanılabilen kriyoprotektan DMSO'dur (40,41). Blastosist aşamasındaki embriyoların dondurulmasında ise; gliserol'ün kullanımının tercih edildiği görülmektedir (42). Tüm bu aşamaların dengeli ve optimal şekilde uygulandığı başarılı bir yavaş dondurma işlemi; ortalama 90-120 dakika sürmektedir.

Yavaş dondurma sisteminde, diğer dondurma sistemlerine göre daha pahalı ve komplike cihazlar kullanılmaktadır. Bu durum olumsuz olarak algılansa bile daha sistematik, yanılma payı daha düşük olması nedeniyle ayrı bir avantaj olarak nitelendirilmektedir. Ticari embriyo transferi amaçlı kriyoprezervasyon uygulamalarında geleneksel yavaş dondurma yöntemi hala yaygın şekilde kullanılmaktadır (43).

2.1.3.2. Hızlı Dondurma (Rapid Freezing) Yöntemi

Hızlı dondurma yönteminde hücrelerin dondurma hızı oldukça yüksektir (dakikada yaklaşık 1200-1250 °C). Hızlı dondurma tekniği, yavaş dondurma ve vitrifikasyon metodu arasında bir yöntem olarak tanımlanır. Yavaş dondurma

yönteminden daha hızlıdır ayrıca pahalı ekipmanlara ihtiyaç duyulmaz. Bu yöntem vitrifikasyonla kıyaslığında; hızlı dondurma yönteminde kullanılan kriyoprotektan konsantrasyonunun daha düşük olduğu görülür(44).

Bu yöntemde kullanılan kriyoprotektan maddelerin oranı ise, yaklaşık 2- 4,5 molar civarındadır. Hücre membranından geçebilen kriyoprotektan maddelerden (gliserol, etilen glikol, propanodiol, DMSO) en az birinin 2- 4.5 M kadar, hücre membranından geçemeyen kriyoprotektanlardan (sükroz, galaktoz, laktoz, trehaloz) birinin 0.25-0.5 M kadar karışım oluşturularak kullanılması hızlı dondurma uygulamalarında başarılı sonuçlar vermektedir.

Hızlı dondurma yönteminde, hücrelerin dondurma solüsyonuna transferinden önce, dondurma solüsyonuna göre daha az oranda kriyoprotektan madde içeren, osmotik dengeleme solüsyonlarına kısa süreliğine tabii tutulması gerekmektedir. Böylece kriyoprotektan maddelerin toksik etkisini ve osmotik farklılığın getirdiği şok etkinin en aza indirgenmesi sağlanır. Dengeleme solüsyonuna tabii tutulan hücreler kısmen dehidrasyona uğrarlar ve sonrasında hücreler sıvı azot buharında çok kısa bir süre tutulup direkt olarak sıvı azota daldırılarak dondurulurlar.

Hızlı dondurma yöntemi kullanılan embriyoların çözme sırasında uygun molariteye sahip çözündürme solüsyonları kullanılmadığı taktirde; hücrelerde ani ölüm ve parçalanma durumu meydana gelebilmektedir (13).

2.1.3.3. Vitrifikasyon Yöntemi

Vitrifikasyon; yüksek konsantrasyonda kriyoprotektanlarla hazırlanan, vizkozitesi artırılmış vitrifikasyon solüsyonları kullanılarak hızlı soğutma oranları ile buz kristalizasyonu oluşmadan gerçekleştirilen dondurma işlemidir. Hücre içerisindeki buz kristalleri şekillenmeyeceği için, viskozitenin yoğun olması yöntemin başarısını doğrudan etkilemektedir. Vitrifikasyon solüsyonlarından geçirilen hücre ve dokular sıvı azot içerisine alınır ve hızlı soğutma ile dondurularak çözündürüleceği zamana kadar saklanır (45).

Vitrifikasyonda kullanılan soğutma hızı kriyoprotektan solüsyonunun miktarıyla ters orantılıdır. Yani, solüsyonunun miktarı ne kadar az ise sıvı azot içerisindeki soğutma oranı da o kadar hızlı olur. Dolayısıyla embriyoda oluşabilecek toksik ve osmotik hasarın önlenebilmesi için vitrifikasyon işleminde çok hızlı davranılmalı, kriyoprotektanların yüksek konsantrasyonda düşük hacimde

kullanılmasına dikkat edilmelidir (46).

Vitrifikasyon solüsyonlarında kriyoprotektan olarak ilk yıllarda DMSO ve gliserol kullanılmıştır. İlerleyen yıllarda düşük toksisiteleri nedeniyle propilen glikol ve etilen glikol gibi kriyoprotektanlar tercih edilmeye başlanmıştır (47).

Vitrifikasyon uygulamalarında yavaş dondurma uygulamalarına benzeyen bir süreç işlemekte olup ilk aşama embriyonun kriyoprotektif ajan ile dengelenmesidir. Fakat ilk metodun aksine bu kademede vitrifikasyonda kullanılan kriyoprotektif ajan konsantrasyonu oldukça yüksektir. İntrasellüler osmotik denge dakikalar içerisinde değişir; ilk önce hücrede büzülme ardından ise hücre sitoplazmasında yeniden şişme gözlemlenir. Daha sonra kriyoprotektif ajan miktarı daha da artar. Embriyo fazla miktarda intrasellüler su kaybederken direk nitrojen teması sağlanır ve hücre vitrifiye edilir. İntrasellüler ve ekstrasellüler su molekülleri uygulanan yüksek soğutma hızları sonucunda sıvı fazdan camsı faza geçmekte ve bu sayede buz kristali oluşumu engellenmektedir.

Diğer bir vitrifikasyon metodu olan SSV (Solid Surface Vitrification) tekniği; ilk olarak olgunlaşmış sığır oositlerini vitrifiye etmek amacıyla kullanılmış yeni bir vitrifikasyon metodudur (48). SSV yöntemi uygulanması oldukça kolay ve ucuz bir yöntemdir. Bu yöntemin avantajları; sıvı nitrojen içeren soğuk metal yüzeyin kapağa ihtiyaç duymaması ve kullanılan solüsyonların az miktarda olmasıdır. Bu özellikler sayesinde ısıyı iletmede ve sonrasında soğutma hızını arttırmada oldukça etkilidir. Bu vitrifikasyon tekniğinde kullanılan solüsyonları; donma süresince hücrelerin buz formasyonunu azaltır, dehidrasyonunu sağlar ve hücre membranını korur (48, 49, 50).

Klasik vitrifikasyon yöntemine kıyasla SSV, çok yüksek seviyede soğutma hızı sağlamaktadır. SSV metodu ile; 2-3 µl'yi aşmayacak vitrifikasyon solüsyonu damla şeklinde soğuk yüzeyin üzerine dikkatlice yerleştirilir. Az miktarda ve daha düşük konsantrasyonda kullanılan solüsyon miktarı ve embriyolara yapılan işlem sırasındaki hasar riskinin azalması SSV yöntemini ilgi çekici hale getirmektedir. Hücrelerin KPA'lara maruz bırakılma süresi de daha kısadır.

SSV metodunda çok az miktarlarda kullanılan solüsyon miktarı; soğutma ve çözündürme işlemleri sırasında embriyoların çatlama riskini azaltmakla beraber hızlı soğutma sağlamaktadır. Vitrifiye edilen hücrelerin çekirdekleri ile plazma

membranları arasındaki yüksek sıcaklık farkından kaynaklanan "çatlama" şeklinde hasar görülebilir (48,49). Embriyolardaki bu çatlama zona pellusidanın hasar görmesine veya plazma membranının lizise uğramasına neden olmaktadır. SSV metodu ile bu risk azalmaktadır.

Hem SSV dondurma hem de klasik vitrifikasyon dondurma teknikleri, hızlı ve yavaş dondurma tekniklerine göre daha ucuzdur. Uygulaması kolay ve pratik tekniklerdir. Komplike cihazlara gereksinim duyulmamaktadır.

Başarılı bir vitrifikasyon islemi, iyi permeabilite özelliklerine sahip düşük toksisiteli KPA'ların kullanımını, KPA'ların ortama çoklu adımlar halinde ilavesini, dondurma işleminin düşük sıcaklıklarda yapılmasını ve hücrede oluşacak yıkımları önlemek için relaksanların kullanılmasını gerektirir (27).

Geleneksel yavaş dondurma protokolleri günümüze kadar farklı gelişim evrelerindeki embriyolarda uygulanmıştır. Bir çok uygulamada klinik açıdan beklenen başarının elde edilemediği, sonuçlar arasında tutarsızlıklar gözlemlendiği dikkati çekmiştir. Bu gözlemler ve son yıllarda geliştirilip piyasaya sürülen çeşitli kitler sayesinde, vitrifikasyonun klinik uygulamaları artmıştır.

Vitrifikasyon tekniği, diğer dondurma tekniklerine oranla maliyet açısından daha uygun olması, oldukça kısa sürede ve cihaz kullanımına gerek kalmadan yapılabilir olması nedeniyle daha avantajlıdır. Ancak manipülasyonu daha güçtür. Hücre / embriyo kaybetme riski daha yüksektir (51).

2.1.4. Embriyoların Çözündürme İşlemi

KPA'ların embriyodan uzaklaştırma işlemi ya tek aşamada ya da üç aşamada yapılır. Tek aşamada yapılan KPA uzaklaştırmasında genellikle çözündürme işleminden hemen sonra dondurma tüpleri elle sallanarak içindeki solüsyonların karışması sağlanır ve embriyoların direkt transferi gerçekleştirilir. Eğer bu yöntem uygulanmayacaksa embriyolar dondurma tüplerinden alınarak KPA'ların zararlı etkilerini önlemek amacıyla farklı konsantrasyonlardaki sakkaritlerden (sukroz, trehaloz veya galaktoz) geçirilerek kriyoprotektif maddelerin hücre dışına çıkması sağlanır. Çözündürme işlemi de dondurma işlemi gibi çok hızlı yapılmalıdır.

Çözdürülen embriyolar transfer zamanına kadar kültür medyumunda bekletilebilir.

Blastosistler çok sayıda hücreden oluşma avantajına sahiptirler. Dondurma çözme sırasında birkaç hücre kaybı embriyo bütünlüğüne zarar vermez. Bu durum yıllardır evcil hayvan embriyolarının araştırma veya ticari amaçlı olarak başarılı bir şekilde dondurulup çözülmesini sağlamaktadır. Yavaş dondurma yönteminde dünya genelinde elde edilen sonuçlardaki farklılıklar ve özellikle bazı embriyo gelişim dönemlerinde elde edilen düşük canlılık oranları, beraberinde alternatif olarak vitrifikasyon yönteminin klinik pratiğe girmesini hızlandırmıştır.

Vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan embriyolarda çözdürülme sonrası canlılık oranları karşılaştırıldığında; insanda, blastosist aşamasında dondurulan embriyoların, bölünme döneminde dondurulup çözdürülen embriyolara göre canlılık oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (52,53).

Embriyo dondurma yöntemleri uzun zamandır klinikte kullanılsa da hem klinik uygulama metodlarındaki optimizasyonlar hem de ileri embriyo manipülasyonu gerektiren çalışmalar için sınırlı sayıda embriyonun etkili bir biçimde dondurulup çözünmesi ihtiyacını ortaya koymaktadır.

2.2. Farelerde Reprodüksiyon

Dişi fare üreme organı; bir çift ovaryum ve ovidukt, bir uterus, kısa bir serviks ve vajinadan oluşmaktadır. Puberteye ulaşma süreleri ırktan ırka değişmektedir. Ortalama 28. ile 49. günler arasında tamamlanmaktadır. Tüm yıl üreyebilme özelliğine sahiptirler. Vajinanın açılması ve kornifiye epitel hücrelerinin vajinal mikroskobide gözlenmesi puberteye ulaşma belirtileridir. Farelerde ovulasyon 4-5 günde bir oluşmaktadır. Fertilizasyon, çiftleşmenin ardından karanlık periyodun başlamasından 4-5 saat içerisinde gerçekleşmektedir (54). Çiftleşme sonrası erkeklerin seminal plazmadan salınan sekresyonları koagüle olur, daha sonra vajinal plaklar oluşur ve bu plaklar 16-24 saat içerisinde gözlenir. Gebelik süresi 19-21 gün sürmektedir (55).

2.2.1. Farelerde Süperovulasyon, PN Embriyo Eldesi ve Blastosist Safhasına Geliştirilmesi

Süperovulasyon uygulaması infertilite nedeniyle tedavi gören çiftlerden kadınlara uygulanmaktadır. Bu uygulamanın amacı IVF uygulamasında döllenme ihtimalini artırmak için çok sayıda, iyi kalitede, olgun oositler elde edebilmektir. Elde edilen oosit sayısı, oositlerin olgunluğu ve kaliteleri ne kadar iyiyse embriyo kültürü ve implantasyon başarı ihtimali de o kadar artacaktır.

"Süperovulasyon"; 6-8 haftalık dişi farelerin çiftleşmeden önce, ovulasyonlarının indüklenmesi aracılığıyla oosit sayılarını artırmak için dişi farelere gonodotropin hormonlarının uygulanması işlemidir. Bu amaçla; folikül uyarıcı hormon (FSH) etkisine sahip olan ve folikülleri uyaran gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG) ile çok sayıda folikülün gelişimi uyarılır. Gelişen foliküllerin ovulasyonunu sağlamak için lüteinleştirici hormon (LH) benzeri etkiye sahip ikinci gonodotropin olan insan korionik gonodotropin (hCG) hormonu uygulanır (54,56,57). Ardından dişiler erkek fareler ile çifleştirilir. Süperovule dişilerin vajinal plak göstermesini takiben, 0-12 saatlik zaman dilimi içerisinde, servikal dislokasyon ile sakrifiye edilir. Sakrifiye edilen farelerin oviduktları HEPES tamponlu M2 manipülasyon medyumu kullanılarak stereo mikroskop altında oviduktların ampulla bölgesi yırtılarak kumulus hücreler ile çevrili zigotlar elde edilir. Ağız toplama pipeti yardımıyla zigotlar enzimsiz M2 medyumunda yıkanır. Sonrasında Quinn's blastosist medyumunda %5 CO_2, 37° C inkübatör içerisinde blastosist aşamasına kadar kültüre edilir. Stereo mikroskop altında in vitro gelişim oranları günlük olarak değerlendirilir. Kullanılan dişlerin ırkı, yaşı, ağırlığı, uygulanan gonadotropinlerin dozu ve uygulama zamanı; süperovulasyon işleminin başlıca parametrelerdir.

2.2.2. In Vitro Ortamın Yardımcı Üreme Teknikleri Uygulamalarındaki Etkileri

Oosit ve embriyolar başta olmak üzere hücrelerin, pH ve sıcaklık degişikliklerine karşı toleransları oldukça düşüktür. Fare zigotlarını oda sıcaklığında çok kısa bir süre tutmak dahi yarıklanma bölünmelerinin oranlarını azaltmakta; daha fazla (10-15 dk) tutmak ise, blastosiste dönüşüm sürecini yarı yarıya düşürmektedir.

In vitro manipülasyonlar esnasında gerçekleşen sıcaklık değişiklikleri, oositlerde iğ yapılarının bozulmasına ve bunun sonucunda anormal ya da hiç gerçekleşmeyen fertilizasyona neden olabilmektedir. Bu nedenle, çalışma esnasında ortam sıcaklığının etkisini en aza indirmek için çalışma kısa sürede gerçekleştirilmeli ve kullanılan ısı tablasının sıcaklığını 37°C'de sabitlenmelidir.

Kullanılan kültür medyumlarında oluşacak herhangi bir kontaminasyonun önüne geçmek için medyum ortamına antibiyotik eklenmeli, tek seferlik kullanılıp atılan, petri kapları, pipet gibi malzemeler kullanılmalı ve laminar kabin içerisinde çalışılmalıdır.

2.2.3. İn Vitro Embriyo Kültürü

Preimplantasyon aşamasındaki fare embriyoları, laboratuvarda sağlanan yaşamları için elverişli kültür ortamlarında gelişimlerine devam edebilmektedirler. Embriyoların kültür ortamlarındaki değişimlere diğer doku ve hücrelerden daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (58). Sağlıklı ve normal gelişimlerini sürdürebilen embriyolar için; *in vitro* steril koşullar sağlanmalıdır. Besi yerleri, diğer adıyla medyumlar; fertilizasyon, erken embriyonel gelişim ve implantasyon üzerine oldukça etkilidir. Embriyo gelişiminde her döneme özel bileşenler içeren ticari medyumlar üretilmiştir. Bu medyumlar kullanılarak memeli embriyosunun laboratuvar ortamında gelişimi gerçekleştirilir (59).

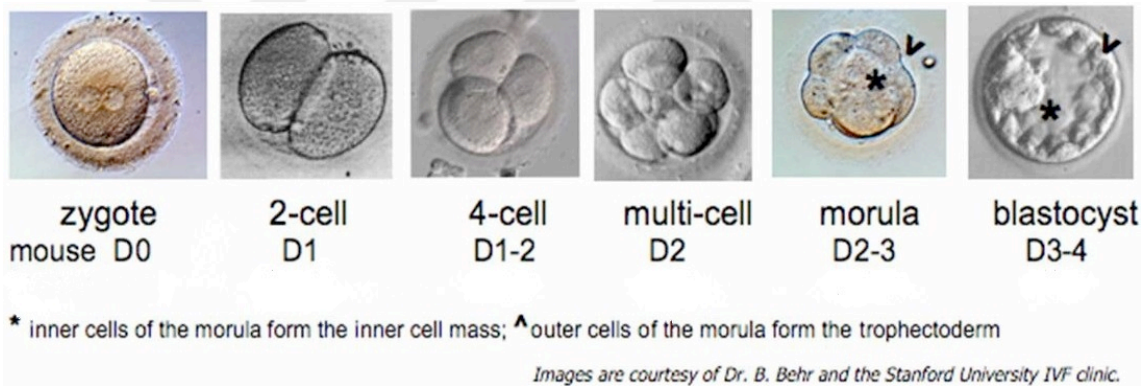
Medyum içeriğinde yer alan maddeler (besleyici mineraller, protein kaynakları, serbest radikaller vb.), atmosfer koşulları (CO_2 ve O_2 oranları), ortam ısısı, medyumun osmotik basıncı, kültür damlalarının hacmi, embriyo manipülasyon işlemleri; in vitro embriyo kültürünü etkileyen başlıca faktörlerdir (60,61).

2.2.4. Embriyo Gelişim Aşamaları

Fertilizasyon sonrası zigot oluşumundan, uterustaki blastosistin implantasyonuna kadar geçen süreçte, embriyo gelişimi sürecinin ve değişimlerin anlaşılması, yapılacak çalışmaların tasarlanmasında oldukça önem arz eder. Bu gelişimsel dönem; dört farklı aşama olan zigot, bölünme, kompaktlaşma ve blastosist aşamalarını içermektedir (62). Erken gelişim dönemi olan fertilize yumurtadan iki

hücreli aşamaya kadar geçen süreç; maternal genomun kontrolü altındadır. Kompaktlaşma öncesi ve blastosist dönemleri ise embriyonik genom kontrolünde gerçekleşen gelişim süreçleridir.

Fare embriyosunun normal gelişim sürecinde, üçüncü günde sekiz hücreli evrede kompaktlaşma gözlenmektedir. Kompaktlaşma; hücreler arası bağların birbirine yakınlaşması ile bir hücrenin diğerine yapışmasını sağlamaktadır. Blastosist; trofektoderm ve iç hücre kitlesi olmak üzere iki farklı hücre grubundan oluşmaktadır. Dış hücrelerden trofoektoderm, daha sonra plasenta ve diğer destek dokuları meydana gelmektedir. Blastosistin içinde bulunan mevcut hücreler ise vücuttaki tüm dokuları oluşturmaktadır. Bu nedenle içte bulunan bu hücreler pluripotent özelliktedir ve embriyonik kök hücreler olarak adlandırılırlar. Fare embriyosunun *in vitro* gelişimi aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.



Sekil 2.2.4.1. Fare embriyosunun *in vitro* gelişimi.

2.3. Embriyonik Kök Hücreler (EKH)

EKH' ler preimplantasyon blastosist dönemindeki İHK' den köken alan hücrelerdir. Bu hücreler kendi kendilerini yenileyebilirler. Ayrıca; endoderm, mezoderm ve ektoderm olmak üzere üç hücre tabakasına da farklılaşabilen pluripotent özellikte hücrelerdir (63,64). Bu yüzden EKH' ler erken embriyonik gelişimin ve hücrelerin gelişimlerinin anlaşılmasında, dejeneratif hastalıklara ve yaralanmalara karşı hücre temelli tedavi metodlarının geliştirilmesinde eşsiz bir role sahiptir.

İlk olarak fare İHK' sinden 1981 yılında, daha sonra insan blastosistlerinden 1998 yılında elde edilmiştir (64,65). EKH' ler hakkında çalışmalar başlandığından beri EKH' lerin kendi kendini yenileme ve farklılaşma mekanizmaları üzerinde etkili olan sitokinler, transkripsiyon faktörleri ve yüzey belirteçleri gibi genetik ve epigenetik pek çok etken araştırılmıştır.

2.3.1. Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri

Memeli blastosistlerinin iç hücre kitlelerinden kaynaklanan EKH' ler başka hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptir. İHK' de gözlemlenen EKH' lerin bu pluripotentlik özelliği pek çok transkripsiyon faktörü tarafından sağlanmaktadır. Transkripsiyon faktörleri genlerin düzenlenmesinde aktivatör ya da inhibitor olarak rol oynar. Pluripotensiden sorumlu transkripsiyon faktörler olan Nanog, Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc ve Lin 28 proteinleri yeniden programlama etkenleri olarak tanımlanmaktadır. Fare EKH'lerinin pluripotentliğinin sağlanmasında özelikle Oct3/4, Nanog ve Sox2 rol oynar. Bu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu İHK, epiblast ve farklılaşmamış EKH' lerde oldukça fazladır (66). Bu genlerin her birinin transkripsiyonunun eksikliğinde pluripotentliğin sağlanamamasından dolayı erken safhada embriyonik ölüm gerçekleşmektedir (67, 68, 69).

Farklılaşmamış EKH' ler; memeli pluripotent hücrelerine spesifik moleküler belirteçleri eksprese etme özelliğine sahiptirler. İnsan EKH'lerinde sıkça eksprese edilen yüzey belirteçleri glikolipid yapıdaki antijenler olan SSEA-3 ve SSEA-4 ile proteoglikan yapıdaki Tra 1-60 ve Tra 1-81'dir. Hücre yüzey antijenleri hücrelerin tanımlanmasında ve hücrelerin farklılaşmasının analiz edilmesinde oldukça önemlidir. Özellikle seviye spesifik antijenler (SSA) gelişime bağlı olarak erken embriyonik safha boyunca düzenlenirler. Bu yüzden yüzey belirteçleri, hem fare hem de insan EKH'lerin farklılaşmasının gösterilmesinde sıklıkla kullanılan önemli belirteçlerdir.

Çalışmamızda aşağıda belirtilen transkripsiyon faktörleri ve yüzey belirteçlerinin embriyo üzerindeki ekspresyonları incelenmiştir.

2.3.1.1. Nanog

Nanog proteini, hücrenin nükleer bileşenine lokalize olmuş, 305 aminoasit

içeren DNA materyalinin bağlanmasını kolaylaştıran bir proteindir. Nanog proteini EKH'lerin, pluripotent özelliğini etkileyen bir faktördür. Bu gen insan ile farenin embriyonik kök hücreleri ve embriyonik germ hücreleri gibi farklılaşmamış hücrelerinde eksprese olurken testis, over gibi farklılaşmış hücrelerde de mevcuttur (68).

Nanog geninin mRNA'sı insan ve farenin pluripotent hücrelerinde bulunurken, olgunlaşmış hücrelerde bulunmamaktadır. Nanog geninin eksprese olmaması, hem EKH'lerin hem de iç hücre kitlesinin kendi kendini yenileme özelliklerinin kaybına yol açar. Bu durum EKH'lerin ekstraembriyonik doku hücrelerine dönüşmelerini indükler (68,70).

2.3.1.2. Oct4

Oct-4, EKH'lerin pluripotansi özelliğinin korunmasında ana rol oynayan bir proteindir. Bu nedenle bu hücrelerin teşhisinde en iyi bilinen ve en çok kullanılanıdır. Oct4 transkripsiyon faktörü, POU5f1 geni tarafından kodlanır. Blastosist evresindeki embriyonun iç hücre kitlesinde eksprese olur ve farklılaşma süresi boyunca ekspresyonu azalır. Bu faktörün ifade seviyesi değişkenlik göstermekle beraber oldukça önemlidir, eksik veya fazla eksprese olması EKH'lerin farklılaşmasına yol açar.

Embriyonik kök hücrelerin gelişiminde bu transkripsiyon faktörününün ifade seviyesinin 3 önemli etkisi gözlemlenmektedir: Oct-4 ifadesindeki artış, hücrelerin primitif endoderm ve mezoderm yönünde farklılaşmasına neden olmaktadır. Düşük seviyede ifade edildiğinde ise; hücreler pluripotent özellikte kalmakta ve farklılaşma olmamaktadır. İfadesinin baskılanması ve eksik ifadelenmesi durumunda hücrelerin pluripotentlik kapasiteleri kaybolmakta ve sonucunda bu hücreler trofektoderm yönünde farklılaşmaktadır (71).

Oct4 protein seviyesi gastrulasyon aşamasında belirli seviyelerde seyreder. Primitif endoderm hücreleri farklılaşmaya ve ektoderme göç etmeye başladıklarında, bu hücrelerin Oct4 protein seviyeleri geçici olarak artar. Daha sonra Oct4 gen ekspresyonu primitif endoderm ve epiblast hücrelerinde baskılanır. Gastrulasyon aşamasında seyreden bu durum embriyo implantasyon aşamasında da aynıdır. Son olarak Oct4 gen ekspresyonu primordiyal germ hücrelerini baskılar; bu hücreler ekstraembriyonik mezodermin ilk özelleşen hücreleridir.

Oct4 geni fare oositlerinde ana transkripsiyon faktörü olarak eksprese edilir. Zigotun ilk yarıklanmasında kaybolur, embriyo dört hücreli aşamaya geldiğinde tekrar görülür. Bu gen gastrulasyon sonrası farklılaşmış hücrelerde bulunmaz (72).

2.3.1.3. Sox2

Sox2 geni EKH'lerin pluripotansi özelliğinin korunması için vazgeçilmez bir gendir (73). Morula ve blastosist gibi erken embriyonik safhalarında, germ hücrelerinde ve epiblastta ifade edilir. Embriyo gelişiminde Sox2 geninin ifadesinin baskılanması durumunda epiblast oluşumunda bazı sorunların gelişmesinden dolayı embriyolar yok olur.

Trofektodermal ve kısmen endodermal farklılaşmayı engelleyerek EKH' lerin pluripotansiyel özelliğinin sürdürülmesinde gereklidir (74). Sox2'nin en önemli görevlerinden birisi de Oct4 ekspresyonunu regüle etmesidir. Yapılan çalışmalarda Sox2 ve Oct4'ün birbirinin ifadesini etkileyerek kök hücrelerin pluripotent karakterinin oluşturulmasında görev aldıkları ve birbirlerini etkiledikleri gösterilmiştir (73).

Sox2'nin insan ve fare EKH'leri üzerindeki etkisini kıyaslamak gerekirse; farelerde eksikliği hücrelerin %95'inin (73), insanda hücrelerin %98.5'inin (74) trofektoderm belirteçlerince pozitif hücrelere dönüşümüne yol açar. Sox2'nin farelerde artışı EKH' lerin çeşitli hücre tiplerine dönüşümüne, nöronal farklılaşmaya ya da kitlesel hücre ölümlerine yol açarken (75, 76), insanda artışı (74) trofektoderm soyuna ait hücrelere dönüşümünü sağlar.

2.3.1.4. SSEA-4

Seviye spesifik embriyonik antijen (SSEA-4), seramid bağlı glikosfingolipid yapı ile ilişkili bir yüzey antijenidir. SSEA-4 ekspresyonu insanda döllenmemiş yumurtada, primitif endodermde, preimplantasyon döneminde erken safhada bulunan embriyodaki İHK hücrelerinde ve embriyonal karsinoma hücrelerinde gözlenir; fakat blastosist aşamasında ve İHK hücrelerinde eksprese edilmezler (77,78). Farklılaşmamış fare EKH' leri SSEA-4'ü eksprese etmezler. Farklılaşmış fare embriyonal karsinoma hücreleri ve EKH'lerinde SSEA4'ün varlığı gözlenirken, insan embriyonik karsinoma hücrelerinde SSEA-4' ün baskılandığı gözlemlenmiştir (79,80).

İnsan ve fare embriyolarındaki yüzey belirteçlerinin ekspresyon zamanlarını kıyaslamak için yapılan çalışmada SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 ve TRA-1-81 indirekt immünfloresan boyama yöntemiyle incelenmiştir. TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA3 ve SSEA4 insanda zona pellusidasından ayrılan (hatch olan) blastosistlerde temel olarak İHK'de yer almaktadır. Aynı safhadaki fare embriyolarında aynı belirteçler bulunmaz; fakat daha erken safhadaki bölünme döneminde varlıkları gözlemlenmiştir. Buna karşın SSEA1'in ekspresyonu insan blastosistlerinde trofektodermden sağlanırken, farelerde özellikle İHK olmak üzere trofektodermden de sağlanmaktadır (81).

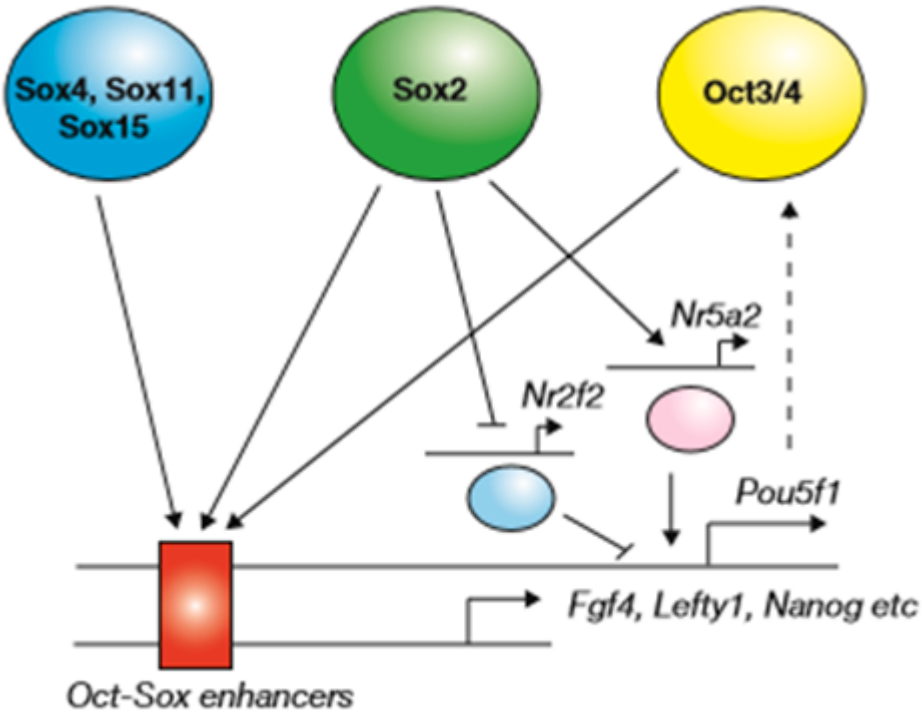
Tablo: 2.3.1.4.1. İnsan ve fare embriyolarında preimplantasyon safhalarındaki hücre yüzey antijen ekspresyonları (81).

Cells of preimplantation embryos				
	Human			
	2-8 cell	Morula	ICM	Trophoblast
Antigens				
SSEA1	–	+	–	+
SSEA3	–	–	++	–
SSEA4	–	–	++	–
TRA-1-60	–	–	+++	–
TRA-1-81	–	–	++	–
	Mouse			
SSEA1	+	+	++	+
SSEA3	+	+	–	–
SSEA4	+	++	–	–
TRA-1-60	*	–	–	–
TRA-1-81	–	–	–	–

2.3.1.5. Transkripsiyon Faktörlerinin Birbirleriyle İlişkisi:

Oct-4, Nanog ve Sox2 genleri insan ve fare embriyonik kök hücrelerinde

hücrelerin farklılaşmasında veya farklılaşmayıp pluripotentliğinin korunmasında rol oynayan önemli transkripsiyon faktörleridir. Ayrıca bu genlerin ekspresyonu hücrelere kendini yenileme özelliği sağlamaktadır. EKH' lerin pluripotentliğinin oluşmasını sağlayan Fgf4, Utf1, Nanog ve Sox2 gibi pek çok transkripsiyon faktörünün fonksiyonunu, Oct-Sox aktivatörü gerçekleştirmektedir (82). Sox2 ve diğer Sox faktörleri (Sox4, Sox11, Sox15) Oct-Sox aktivatörüne bağlı genlerin ekspresyonunu önemli derecede etkilemektedir. Oct3/4 ekspresyonunu pozitif veya negatif yönden etkileyen çoklu genleri ise sadece Sox2 düzenlemektedir (73)



Şekil: 2.3.1.5.1. Oct3/4 ve Sox faktörlerinin transkripsiyonel bağlantıları (73).

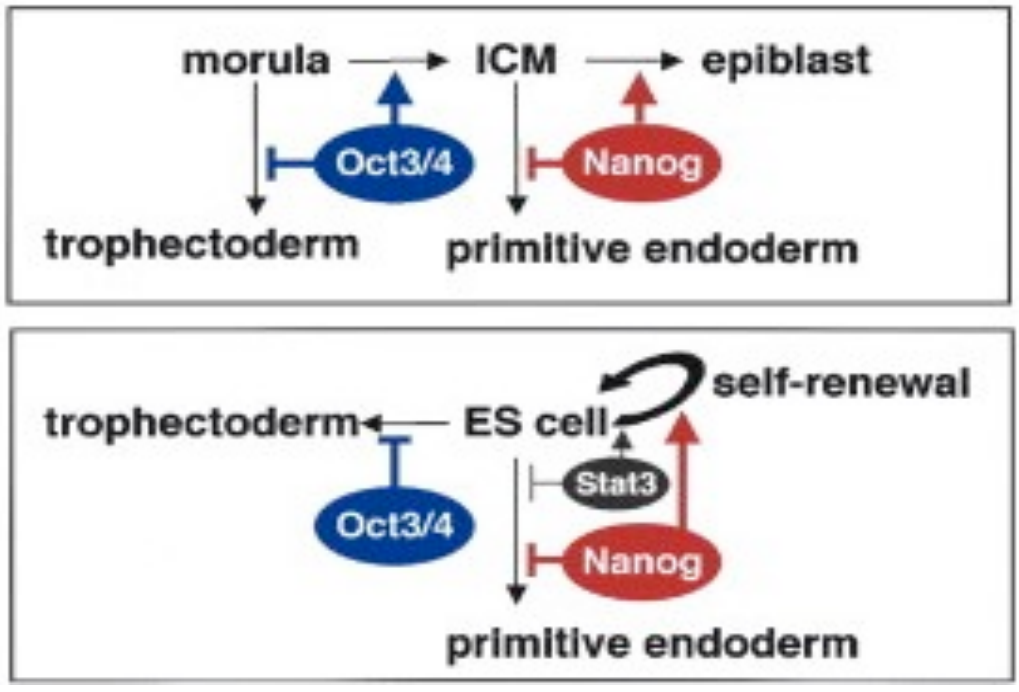
Sox2 EKH' lerin kendi kendini yenileme fonksiyonlarında, mutlak olarak gereklidir. Oct3/4 trankripsiyonel aktivasyonuyla oldukça ilişkili Sox2; EKH'lerin pluripotentliğinin sağlanmasında eşsiz bir role sahiptir.

Masui ve ark.'larının yaptığı çalışmalarda ise Sox2 seviyelerindeki azalma sonucu qPCR analiziyle 623 genin aktivasyona, 648 genin inaktivasyona uğradığı gösterilmiştir. Oct3/4 ve Nanog ekspresyonunda artış, Sox ailesinden Sox4, Sox11, Sox15' in ekspresyonundaysa azalış gözlemlenmiştir (73).

Nanog, Oct3/4 ve Stat3'ün pluripotentliğin sağlanmasında ve kendi kendini

yenilemede rolleri kanıtlanmıştır. Preimplantasyon döneminde hücrelerin trofektoderme farklılaşacağına veya pluripotent bir şekilde kalacağına ilk olarak morula safhasında karar verilir. Bu aşamada Nanog ekspresyonu düşük olduğu için anahtar yapı Oct3/4'tür.

İkinci olarak hücrelerin primitif endoderme farklılaşacağına veya İHK hücrelerinin epiblast gibi pluripotent bir şekilde kalacağına blastosist aşamasında karar verilir. Nanog bu aşamada eksprese edilmeye başlanır ve fonksiyonu hücrelerin geleceğinin belirlenmesinde çok kritiktir. Sonuç olarak EKH'lerin trofektoderme veya primitif endoderme farklılaşmasının önlenmesinde sırasıyla Oct3/4 ve Nanog temel yapı taşlarıdır. Ancak hücrelerin kendi kendini yenilemesinde bu faktörler yeterli değildir. Stat3 tarafından aktive edilmiş LIF (lösemi inhibitor faktör)'e ihtiyaç duyulmaktadır. Nanog'un etkisi Stat3'ten bağımsız olmakla birlikte Oct3/4 ile çok yakın ilişkilidir (68).



Şekil: 2.3.1.5.2. Nanog, Oct3/4 ve STAT3' ün preimplantasyon evresindeki embriyolarda (üstteki) ve embriyonik kök hücrelerdeki (alttaki) fonksiyonları (68).

Sonuç olarak preimplantasyon morula döneminde Oct4 ve Sox2'nin, blastosist dönemindeyse Oct4 ve Sox2'ye ilaveten Nanog'un da EKH'lerin farklılaşmasında önemli rolü olduğu gösterilmiştir. EKH'lerde Sox2 gen

ekspresyonu kendisi ve Oct-4 geni tarafından, Oct-4 gen ekspresyonu ise kendisi ve Sox2 geni tarafından düzenlenmektedir (83).

Tablo: 2.3.1.5.1. SSEA-4, Oct-4, Nanog ve Sox2' nin Karşılaştırmalı Özellikleri.

	Fare	**İnsan**	**Özelliği**	**Fonksiyonu**
SSEA-4	+	+	Yüzey belirteci	Farklılaşmış EKH'lerin yüzey belirtecidir.
Oct-4	+	+	Transkripsiyon faktörü	Embriyonik hücrelerin farklılaşmasını inhibe eder.
Nanog	+	+	Transkripsiyon faktörü	Oct-4 le birlikte hücrelerin farklılaşmış düzeyde kalmalarını sağlar.
Sox2	+	+	Transkripsiyon faktörü	Oct-4 ile beraber EKH'lerin pluripotansiyel özelliklerinin korunmasını sağlar.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneysel Yöntem

Koç Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan Yüksek Lisans Tez Araştırma projesinde planlanan deneysel çalışmada kullanılacak hayvanlar için, deneylerin etik olarak uygun olduğunu belirten bir etik kurul kararı alındı. Deneysel çalışmalar (hayvanların hazırlanması, blastosist eldesi aşamaları, kriyoprezervasyon aşamaları, in vitro hücre kültür çalışmaları, immünohistokimyasal boyamalar ve analizler); Koç Üniversitesi Hayvan Araştırma Laboratuvarı (KUARF) ve Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştırma Merkezi (MÜKKAM) laboratuvarlarında, çalışma izni dahilinde gerçekleştirildi.

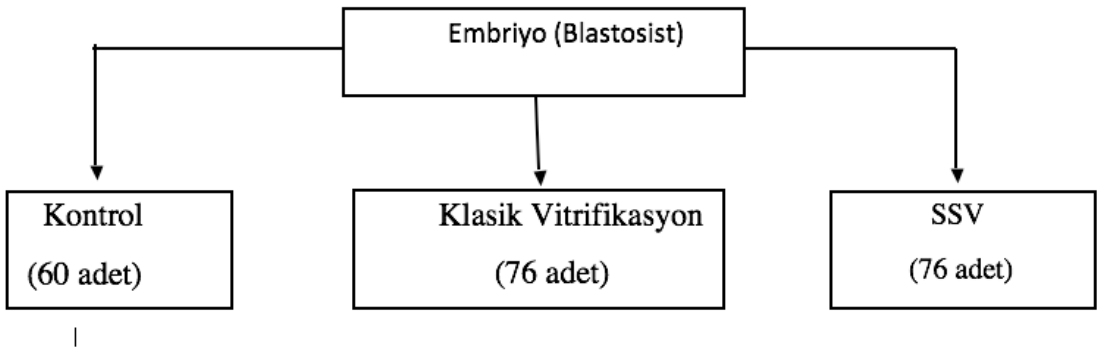
Çalışma, birbirini izleyen 3 farklı basamaktan oluşturuldu:

I- Süperovulasyon, in vitro kültür, blastosist aşamasında embriyo eldesi.

II- Blastosistlerin iki farklı vitrifikasyon yöntemi ile dondurulması, çözündürülmesi ve bu işlemler sonrasında embriyoların immünohistokimyasal boyalarla boyanarak morfolojik analizlerinin yapılması.

III- Karşılaştırılmalı istatistiksel değerlendirerek deneysel sonuçların karşılaştırmalı yorumlanması.

Tablo: 3. 1. Çalışmada kullanılan blastosist sayıları ve deney grupları.



3.2. Çalışmada Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler :

Cihaz	Kullanım Amacı	Marka/Modeli
Konfokal Mikroskop	Mikroskobik Değerlendirmelerde/Hücre boyamalarının incelenmesinde	LSM 70
İnverted Mikroskop	Mikroskobik İncelemelerde	Zeiss Primo Vert
-80 Derin Dondurucu	Medyumların, Bazı Maddelerin Uzun Süre Saklanması	Panasonic-Sanyo
Binoküler Mikroskop	Embriyo Manipülasyon Amaçlı	Nikon Cds
-20 Buzdolabı	Kimyasalların saklanması	Siemens(6s 29 vvw30n)
Soğuk Oda	Kimyasalların Stoklanmasında	
Stereo Mikroskop	Mikroskobik Değerlendirmelerde	Zeiss/Stemi Sv8
Ultra Saf Su Sistemi	Kimyasalların, Sulandırıcıların Hazırlanmasında	Elga Flex 3
Hassas Terazi	Kimyasal Maddelerin Tartımında	Shimadzu ATX-224
Otoklav	Kullanılacak Alet ve Ekipmanın Sterilizasyonunda	Hirayama
Kuru Sterilizatör	Kullanılacak Alet ve Ekipmanın Sterilizasyonunda	Nüve/Fn 120
İnkübatör	Embriyo Kültür	Thermo/3141

	Çalışmalarında	
Cerrahi Set	Fare Embriyo Eldesinde	Photonic PI 2000 Ve Nikon Lf10
Steril Kabin	Medyum Hazırlanmasında	Cleannair
Ağız Pipeti	Embriyo Manipülasyonlarında	Sigma
Isıtıcı Tabla	Dış ortamda embriyo kültür petrileri için	Minitube Ht 400
Aydınlatıcı	Ters Mikroskop Aparatı	Nikon Lhm 100 C-1
Otomatik Pipet	Embriyo Kültürlerinin Hazırlanmasında	Pipettus/ Hırschmann
Pipet Seti	Embriyo Kültür Hazırlanmasında	0.1-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl, Nichiryo
Vortex	Hazırlanan Karışımların Homojen Bir Şekilde Karıştırılmasında	Fine
Sıvı Azot Depolama Tankı	Örnek Saklama Tanklarına Azot Takviyesinde Ve Depolama Amaçlı.	Taylor Wharton
Sıvı Azot Örnek Saklama Tankı	Örneklerin Saklanmasında	Taylor Wharton

Malzemeler	**Katalog No**	**Firma**
B6C3F1 (Erkek fare)	__	Kuarf
B6C3F1 (Dişi Fare)	__	Kuarf
4 Well Plate	Ref:144444 Lot:145303	Nunc

Lam	__	Lamtek
Yuvarlak Lamel	__	Marienfeld Gmbh
Eppendorf Tüpler	__	Capp
Santrifüj Tüp (15 ml-50 ml)	__	Capp
Cyrovial Tüpleri (Dondurma Tüpleri)	Lot:12P1073500	TPP
Transfer Pipeti	2-000-050	Broomall, Pa
Mikropipet Uçları	__	Capp
Serolojik Pipet	__	Capp
Filtreler(22 µm çaplı)	__	Millipore
Enjektör (1 ml- 10 ml)	__	
15X60 Petri Kabı		TPP
15X35 Petri Kabı	08440129	Granier
Payet (0.25 ml)	Lot:BO10282 Ref: 019179	İmv
Aliminyum Folyo	__	__
Soğutucu Blok	__	__
Köpük kutu	__	__

3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar:

Kimyasal Maddeler	**Katalog No**	**Firma Adı**
Hepes Quinn's Advantage Medyumu	Cat-1223 Lot-7193A	SAGE
Quinns' Blastosist Medyumu	B213-C	SAGE
Sığır Serum Albümin(BSA)	A-3311	SIGMA

hCG (İnsan Koriyonik Ganodotropini)	__	Pregnyl; Organon
PMSG(Kısrak Serum Ganodotropini)	G-4877	SIGMA
Mineral Yağ	A-155A	SAGE
HTF(Human Tubal Fluid)		
HEPES		SIGMA
PBS(Tuzlu Fosfat Tamponu)	BE17-512F	LONZA
Vitrifikasyon Kiti(0.25 M Sukroz- DAP213- 1 M DMSO)	(R- Y077, R- T073, R- T072)	Cosmo Bio
Sıvı Nitrojen		
NaCl		
PVP (Polivinilpirrolidon)	P-0930	SIGMA
EG(Etilen Glikol)	E-9129	SIGMA
Trehaloz	T-0167	SIGMA
Triton X-100	T-8787	SIGMA
Tween-20	170-6531	BIORAD
Sodium azide	S2002-25G	SIGMA
Gliserol		SIGMA
% 4 Paraformaldehit		
Hoechst 33258		SIGMA
Nanog (primer antikor)	ab21624	ABCAM
Oct4 (primer antikor)	ab19857	ABCAM
Sox2 (primer antikor)	ab97959	ABCAM
SSEA-4 (primer antikor)	ab16287	ABCAM
Goat Anti-Rabbit Dylight	35552	Thermo

488 (sekonder antikor)		
Goat Anti-Mouse Dylight 405 (sekonder antikor)	35501BID	Thermo

3.4. Süperovulasyon Amacıyla Gonodotropinlerin Hazırlanması

Dişi farelerin süperovulasyonu amacıyla aşağıda belirtilen şekillerde Pregnant Mare Serum Gonodotropin (PMSG) ve Human Chorionic Gonodotropin (hCG) hazırlandı:

3.4.1. PMSG (Pregnant Mare Serum Gonodotropin):

- Gebe kısrak serum gonadotropini, PMSG, 1000 IU' lik liyofilize formun tümü 20 ml' lik %0,9 NaCl ile eritildi.
- 1 ml' lik solüsyonlar halinde eppendorf tüplerde alliquatlandı.
- 3 ay süre ile kullanım amacıyla -20 ºC' lik derin dondurucuda saklandı.

3.4.2. hCG (Human Chorionic Gonodotropin):

- İnsan koriyonik gonadotropin (hCG) liyofilize formda bulunmaktadır.
- Liyofilize formdaki 5000 IU' lik hCG, 9 ml %0,9 NaCl ile sulandırılarak ana stok olusturuldu.
- Ana stoklardan 100 µl alınarak 900 µl %0,9 NaCl ile 1 ml uygulama solüsyonları hazırlandı ve eppendorf tüplerde alliquatlandı.
- 3 ay süre ile kullanım amacıyla -20 ºC' lik derin dondurucuda saklandı.

3.5. Yıkama Medyumunun Hazırlanması

- Bu çalısmada, yıkama medyumu olarak HEPES' li Quinn's Advantage® Medyumu (QAM) kullanıldı.
- Embriyo elde etme işlemleri sırasında ve inkübatör dışında yapılan manipülasyonların sırasında kullanma amacı ile steril kabin içerisinde günlük olarak yıkama medyumu, hazırlandı.
- Protein kaynağı olarak medyum içerisine 3 mg/ml BSA eklendi.
- BSA' nın çözünmesinden sonra medyum, 10 ml enjektör yardımı ile 22 µm' lik millipore filtreden geçirildi.
- Daha sonra15 ml' lik falkon tüp içerisinde kullanılmak üzere 37 ºC'lik etüve kaldırıldı.

3.6. Kültür Medyumunun Hazırlanması

- Embriyoların kültürü, 4 mg/ml BSA eklenen SAGE Quinn's Blastosist Medyumunda(QBM) gerçekleştirildi.
- BSA eklendikten sonra, medyum 22 μm'lik millipore filtreyle 5 ml'lik steril tüpe aktarıldı.
- Petri kabı içerisinde 10 μl' lik embriyo kültür damlaları oluşturuldu.
- Damlaların üstü embriyoların dış ortamla ilişkisini minimale indirebilmek amcı ile tümüyle mineral yağı ile kaplandı.
- Hazırlanan petri kapları embriyoların aktarılmasından en az 2 saat önce inkübatöre (%5 CO_2 , 37° C) kaldırılarak ısı ve pH düzenlemeleri yapıldı.

3.7. Süperovulasyon

- Çalışmada B6C3F1 dişi fareler embriyo eldesi amacıyla kullanıldı.
- Uygulama için hazırlanan PMSG hormonu -20°C'den çıkarılarak oda ısısında eritildi.
- Eritilen PMSG hormonu, 1 ml'lik insülin enjektörü kullanılarak hayvan başına 7,5 IU dozda i.p. uygulandı.
- PMSG uygulamasından 48 saat sonra, uygulama için hazırlanan hCG hormonu -20°C'den alınarak oda ısısında eritildi.
- Eritilen hCG hormonu, 1 ml' lik insülin enjektörü kullanılarak hayvan başına 7.5 IU dozda i.p. uygulandı.
- Enjeksiyon sonrası dişi fareler çiftlesmeleri için erkek farelerle aynı kafeslere konularak çiftleştirildi.
- Çiftlesmenin saptanması için vajinal plak kontrolleri yapıldı.
- Vajinal plak gösteren fareler ayrı bir kafese konuldu.

3.8. Embriyoların Elde Edilmesi

- Süperovule dişilerin vajinal plak göstermesini takiben, servikal dislokasyon ile ötenazileri yapıldı.
- Stereo mikroskop altında sakrifiye edilen farelerin yumurta kanalları (ovidukt

= tuba uterine) HEPES tamponlu M2 manipülasyon medyumu kullanılarak ampulla bölgesinden yırtıldı ve kumulus hücreler ile çevrili zigotlar elde edildi.

- Ağız toplama pipeti yardımıyla zigotlar enzimsiz M2 medyumunda yıkandı.
- Sonrasında zigotlar Hepes Quinn's Advantage Medyumu %5 CO_2, 37 °C inkübatör içerisinde kültüre edildi. Ertesi gün Quinns' Blastosist Medyumu' na transfer edilerek blastosist aşamasına kadar orada kültüre edildi.
- Stereo mikroskop altında in vitro gelişim oranları günlük olarak değerlendirildi.

3.9. Embriyoların Kriyoprezervasyonu

3.9.1. Klasik Vitrifikasyon Yöntemi ile Dondurma ve Çözme:

Embriyoların, vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmasında Cosmo Bio vitrifikasyon kiti kullanıldı. Vitrifikasyon kiti içerisindeki solüsyonlar (1M DMSO, DAP213 ve 0.25 M SUKROZ) oda ısısına getirildi. Bu yöntemde blastosistler kit içerisinde yer alan ozmotik dengeleme solüsyonu ve dondurma solüsyonu olmak üzere iki farklı kriyoprotektan içeren solüsyonlara maruz bırakılarak donduruldu. Ardından, önerilen çözündürme solüsyonu ile çözündürüldü.

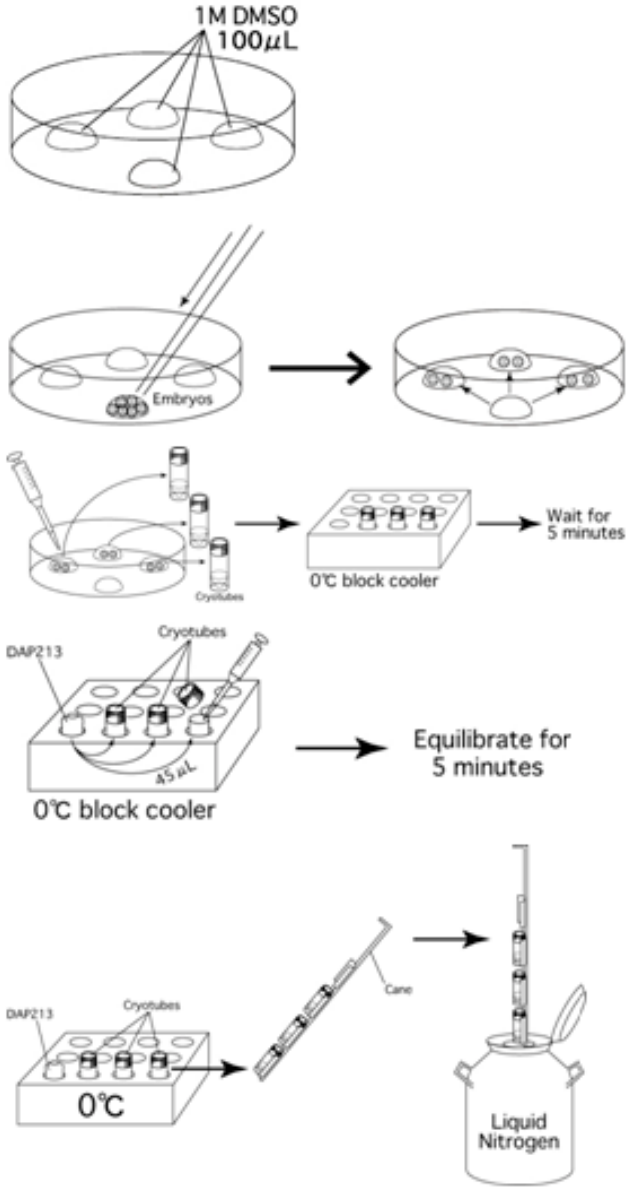
Dondurma:

- Vitrifikasyon prosedürüne başlamadan bir gün önce, soğutucu blok -20 °C de bekletildi.
- Dondurma işlemine başlamadan 10 dakika önce soğutucu blok -20°C buzdolabından çıkarıldı ve içerisine dondurma tüpleri yerleştirildi.
- Dondurma tüplerinin 0°C' ye geldiği kontrol edildi.
- Bir petri kabının içerisine 2 adet, 100'er µl lik 1 M DMSO içeren damlacıklar hazırlandı. Düzgün zona pellisudaya, belirgin iç hücre kitlesine sahip blastosist safhasındaki embriyolar, *in vitro* kültürün sonunda SAGE blastosist medyumundan alınarak bu damlacıklara transfer edildi ve yıkama aşamalarından geçirildi.
- 1 M DMSO içeren damlacıklardaki embriyolar pipetle 5µl çekilerek soğutucu blok üzerindeki dondurma tüplerine transfer edildi. Embriyolar burada 0°C de 5 dakika bekletildi.

- Dondurma tüplerinin üzerine 45µl DAP213 eklendi ve tekrar 0°C 5 dakika daha bekletildi.
- Sonrasında dondurma tüpleri hızlıca azot tankına bırakıldı ve donduruldu.

Çözündürme:

- Çözündürme işlemine başlamadan 30 dakika önce taze olarak hazırlanan SAGE blastosist medyumu petri kabı içerisine 10 µl'lik damlacıklar yapılarak inkübatöre (37 °C, %5 CO_2) kaldırıldı.
- Çözündürme işlemine başlamadan önce kullanılacak olan 0.25 M Sukroz inkübatöre (37 °C, %5 CO_2) kaldırıldı.
- Azot tankından çıkarılan dondurma tüpü kapağı açılıp 30 saniye bekletildikten sonra üzerine 0.9 ml 0.25 M sukroz eklendi. Ardından 30 kez çok yavaş bir şekilde pipetaj yapıldı.
- Petri kabı içerisine, dondurma tüpü içerisindeki pipetaj yapılan medyum 0.4-0.5 ml olacak şekilde aktarıldı ve hızlıca ağız pipetiyle embriyolar toplanarak SAGE blastosist medyumunun içerisine transfer edildi. 10 dakika bekletildikten sonra embriyolar diğer damlacıklarda yıkandı ve tekrar inkübatöre kaldırıldı.



Şekil: 3.9.1.1 Klasik vitrifikasyon yönteminin uygulanması (84).

3.9.2. SSV (Solid Surface Vitrification) Yöntemi İle Dondurma ve Çözme

SSV metodu olarak, Bağış ve arkadaşlarının 2002 yılında yayınlamış oldukları protokol uygulandı. Kullanılacak olan solüsyonlar deney günü aşağıdaki şekilde taze olarak ve steril kabin içerisinde hazırlandı:

Kullanılan Solüsyonlar:

- Ekilibrasyon Solüsyonu: 0.2 ml EG + 4.8 ml M2 + 20 mg BSA+ filtre edildi.

- Dondurma Solüsyonu: 0.875 ml EG + 1.625 ml M2 + 0.3785 gr Trehalose + 125 mg PVP + 10 mg BSA + Filtre edildi.
- Çözündürme Solüsyonu: 0.5675 gr Trehalose + 5 ml M2 + 20 mg BSA + Filtre edildi.

Deneyin Yapılışı:

- Dengeleme (Ekilibrasyon) solüsyonundan, petri kabına 50 µl'lik 2 adet damlacık yapıldı.
- Düzgün zona pellisudaya, belirgin iç hücre kitlesine sahip blastosist safhasındaki embriyolar, *in vitro* kültürün sonunda SAGE blastosist medyumundan alınarak, bu ekilibrasyon damlasında ısıtıcı tabla üzerinde (37 ºC de) 12-14 dakika bekletildi.
- Sonrasında vitrifikasyon solüsyonundan petri kabının içerisine 3 damlacık yapıldı, 3 kez yıkanarak 20- 25 saniye içerisinde – 150 °C deki aliminyum yüzeye damla halinde bırakıldı.
- Sıvı azotun buharı ile embriyolar çok kısa sürede dondu. (Aliminyum yüzey üzerinde damlaların şeffaf gözükmesi; dondurma işleminin başarı ile yapıldığının göstergesidir. Mat renkte görülen damlalarda ise buz kristalleri oluşmuştur.)
- Dondurulan ve buz kristali oluşmamış olan embriyolar daha önce sıvı azotta soğutulan dondurma tüplerine konuldu. Dondurma tüpleri azot tankı içerisine konuldu.
- Çözündürme işlemi için 4 kuyulu petrinin 1. Kuyusuna çözündürme solüsyonu, diğer 3 kuyuya taze olarak hazırlanan 500 er µl'lik M2 medyumu konuldu.
- Aliminyum yüzeydeki donmuş damlalar soğutulmuş pens yardımıyla aliminyum yüzeyden alınarak direkt olarak çözündürme solüsyonu içerisine bırakıldı.
- Embriyolar çözündürme solüsyonu içerisinde 3 dakika kadar bekletildi.
- Sonrasında embriyolar 3 adet M2 kuyusunda toplam 8 dakika boyunca yıkandı.
- Deney başlamadan önce taze olarak hazırlanıp inkübatörde bekletilen SAGE 2 medyumuna en az 3 kez yıkanarak transfer edildi.



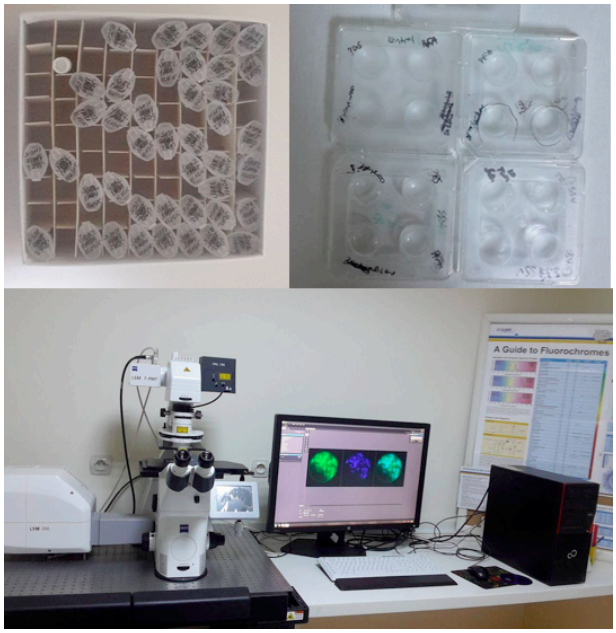
Şekil: 3.9.2.1 SSV yöntemi ile embriyo dondurma ve çözme işlemlerinin farklı aşamaları.

3.10. İmmunohistokimyasal Boyama İşlemleri

Her üç deney grubundan blastosist aşamasındaki embriyolar fikse edildi. Anna Mallol, Josep Santalo ve Elena Ibanez'in 2014 yılında yayınladıkları protokol modifiye edilerek aşağıdaki işlemler uygulanarak indirekt immunohistokimyasal boyama yöntemi ile işaretlendi:

- SAGE Quinn's Blastosist Medyumundan (QBM) alınan embriyolar, PBS tampon solüsyonu ile yıkandı.

- %4'lük paraformaldehit içerisinde 15 dakika fikse edildi.
- %0,1'lik Triton X-100 içerisinde 30 dakika oda ısısında bekletildi.
- %0,01 Tween 20 ve %2'lik sodyum azid içerisinde 15-25 embriyo olacak şekilde saklandı.
- %1 BSA ve %0,05'lik Tween 20 içerisinde, +4 ° C de bir gece boyunca bloklama işlemi uygulandı.
- Embriyo blastosistleri, Rabbit Polyclonal (Nanog (1:200), Oct4 (1:100), Sox2 (1:500)) ve Mouse Monoclonal (SSEA4 (1:100)) primer antikorlarında +4 ° C de bir gece boyunca bekletildi.
- PBS solüsyonu ile yıkandı.
- Floresan işaretli, sekonder antikorlarında Goat Anti-Rabbit Dylight 488(1:400) ve Goat Anti-Mouse Dylight 405(1:400) 2- 2,5 saat, karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildi.
- PBS solüsyonu ile yıkandı.
- Hoechst 33258, çekirdek boyası ile embriyolar 10 dakika karanlıkta, oda ısısında bekletildi.
- Kapama medyumu (Hoechst + gliserol) kullanılarak kapatıldı.
- Zeiss LSM 70 konfokal mikroskopta incelendi.



Şekil: 3.10.1.1. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemlerinin Farklı Aşamaları

3.11. Sonuçların İstatistiksel Değerlendirilmesi

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesi için SPSS 20.0 yazılımı kullanıldı. Sonuçlar İki Yönlü Varyans Analiz (*Ünivariate Anova*) yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

Çalışma gruplarını oluşturacak embriyoların eldesi için KUARF laboratuvarlarında B6C3F1 (C57BL/6J X C3H/HeN) erkek ve dişi fareler kullanıldı. Elde edilen blastosist safhasındaki embriyolar iki farklı vitrifikasyon metodu (klasik vitrifikasyon ve SSV yöntemi) ile dondurulup çözündürüldü. Çözme işleminin ardından 5 saat kültür ortamında dinlendirilen blastosistlerin canlılıklarını sürdürme oranları incelendi. Embriyonik kök hücre belirteçleri olan Nanog, Oct-4 Sox2 ve SSEA-4 ile işaretlenmiş embriyolar üzerinde bu kök hücre belirteçlerinin ifade düzeyleri araştırıldı.

4.1. Süperovulasyon ve PN Embriyo Eldesi Sonuçları

Foliküler gelişimin uyarılarak daha fazla sayıda oosit elde edilebilmesi amacıyla uygulanan süperovulasyon işlemi sırasında farelere; 7,5 IU PMSG- 7,5 IU hCG olmak üzere hormon kompozisyonu uygulandı. 9 fareden 276 adet PN embriyo elde edildi. Yapılan deneyler ve elde edilen embriyo sayıları Tablo 4.1 de özetlenmiştir.

Tablo: 4.1- Hormon Uygulamasında Elde Edilen Pronükleer Safhadaki Embriyo Sonuçları (7,5IU PMSG, 7,5 IU hCG).

Deney Tarihi	**Süperovule Edilen Dişi Sayısı**	**Plak Gösteren Dişi Sayısı**	**Elde Edilen Zigot Sayısı**
09.05.2016	4	2	52
27.05.2016	10	6	182
07.06.16	5	1	42
TOPLAM	**19**	**9**	**276**

4.2. Dondurma-Çözme Deneyleri

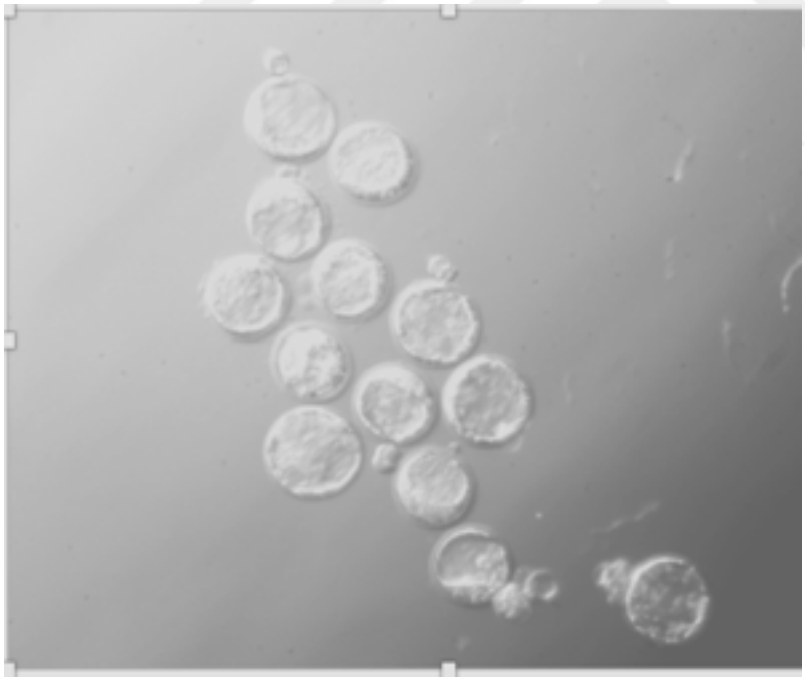
Bu çalışmada, in vitro embriyo kültürü sonucunda blastosist safhasına ulaşan embriyolar klasik vitrifikasyon ve SSV yöntemleri ile dondurulup çözündürüldü. Çözme sonrası devam eden in vitro kültürde canlılıklarının devamı incelendi.

Elde edilen toplam 276 adet embriyodan 64 adedi ya in vitro kültürler sırasında dejenere oldu; ya da blastosist aşamasına gelemedi. Geri kalan 212 adet embriyodan; klasik vitrifikasyon, SSV yöntemi ve kontrol grubu olmak üzere 3 faklı grup oluşturuldu. Kontrol grubu için 60 blastosist, SSV ve klasik vitrifikasyon grupları için ise 76'şar blastosist kullanıldı. Kriyoprezervasyon işlemleri sırasında SSV grubundan 8 blastosist, klasik vitrifikasyon grubundan 5 blastosist kaybedildi. Çalışmanın sonucunda, klasik vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözündürülen 71 adet blastosistten 48 adedi (% 68) canlılığını sürdürdü. SSV yöntemiyle dondurulup çözündürülen 68 adet blastosistten ise, 49 adedi (%72) çözündürme sonrası canlılığını sürdürmüştür. Kontrol grubu blastosistlere herhangi bir dondurma işlemi uygulanmayarak kültürlerine devam edildi.

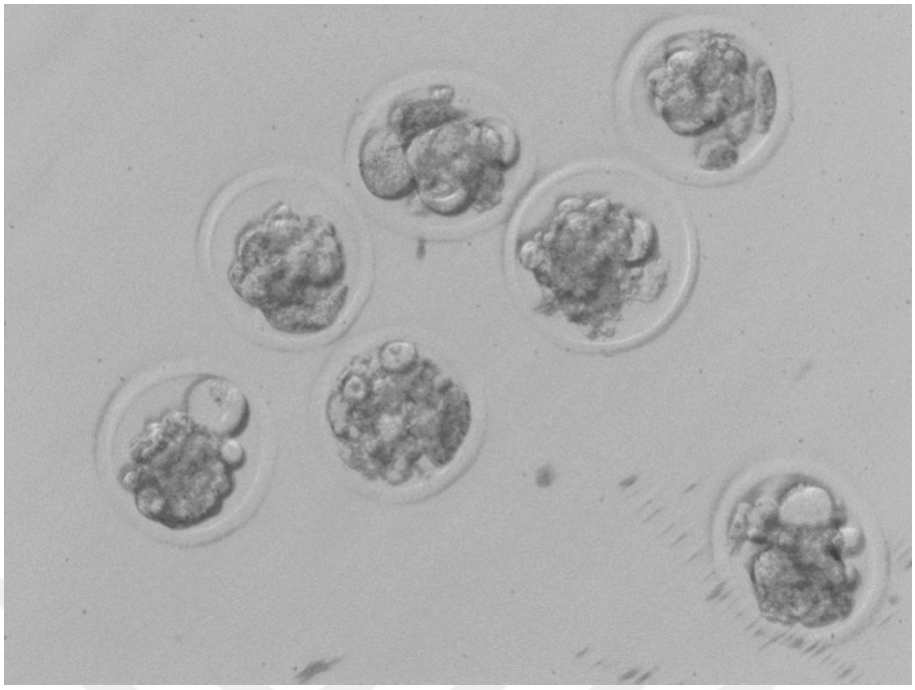
Dondurulan blastosistler 1 saat içerisinde çözündürülerek en az 5-6 saat in vitro embriyo kültürlerine devam edildi. Ardından Zeiss Primovert İnvert Faz Kontrast mikroskobunda, X4 / X10 / X20 / X40 büyütmelerde embriyoların canlı görüntüleri incelendi ve fotoğrafları çekildi (Şekil: 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3.). Bu embriyolarda 3 deney grubu arasında morfolojik açıdan belirgin bir farklılık gözlenmedi.



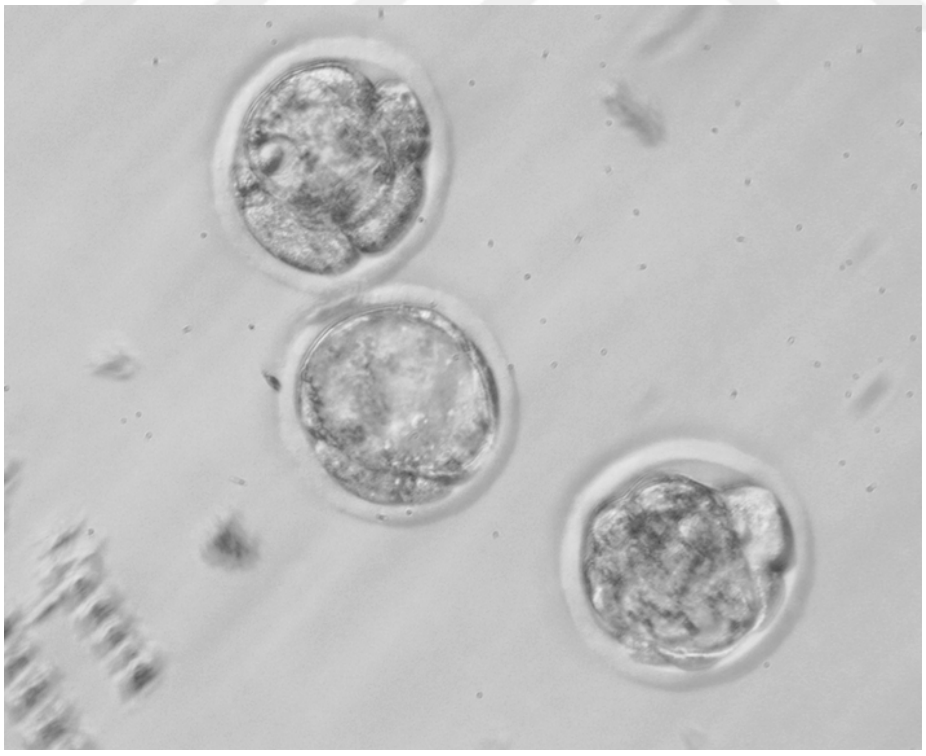
Şekil: 4.2.1. Kontrol grubu fare embriyo blastosistleri, X40



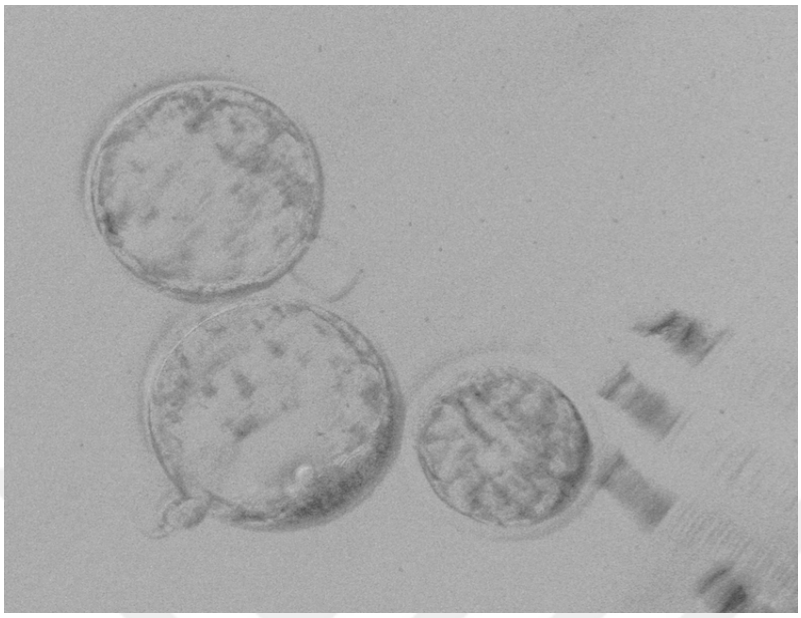
Şekil: 4.2.2. Kontrol grubu fare embriyo blastosistleri-5 saat sonra, X40



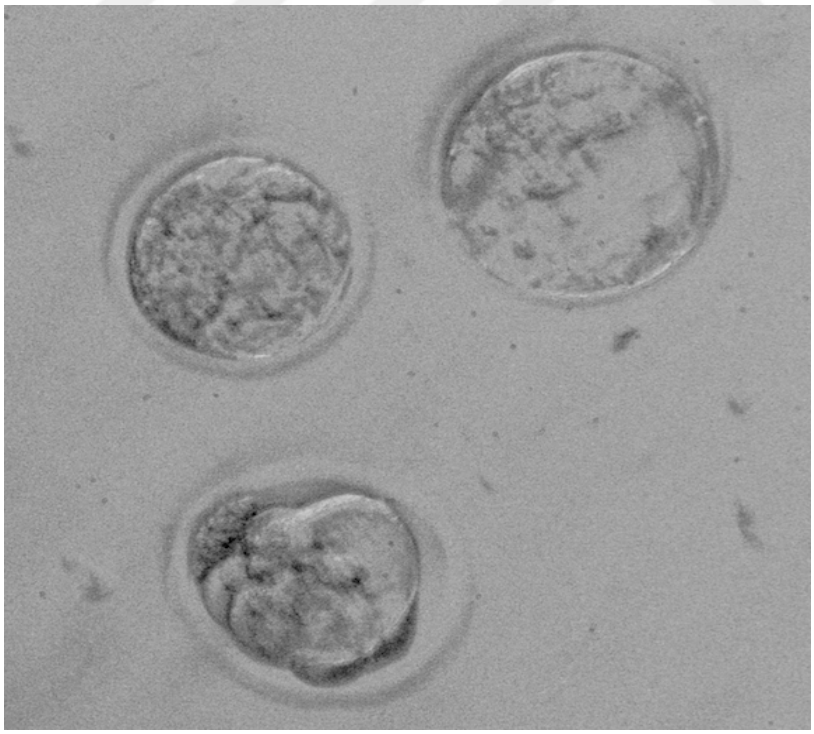
Şekil: 4.2.3. SSV grubu embriyo blastosistleri, X100(dondurulup çözündürülme işleminden hemen sonra, X100)



Şekil: 4.2.4. SSV grubu embriyo blastosistleri (dondurulup çözündürülme işleminden 5 saat sonra, X100)



Şekil: 4.2.5. Klasik vitrifikasyon grubu embriyo blastosistleri (dondurulup çözündürülme işleminden hemen sonra, X100)



Şekil: 4. 2. 6. Klasik vitrifikasyon grubu embriyo blastosistleri (dondurulup çözündürülme işleminden 5 saat sonra, X100)

Tablo: 4.2.1. Dondurulup Çözündürülme Sonrası Blastosist Canlılık Oranları

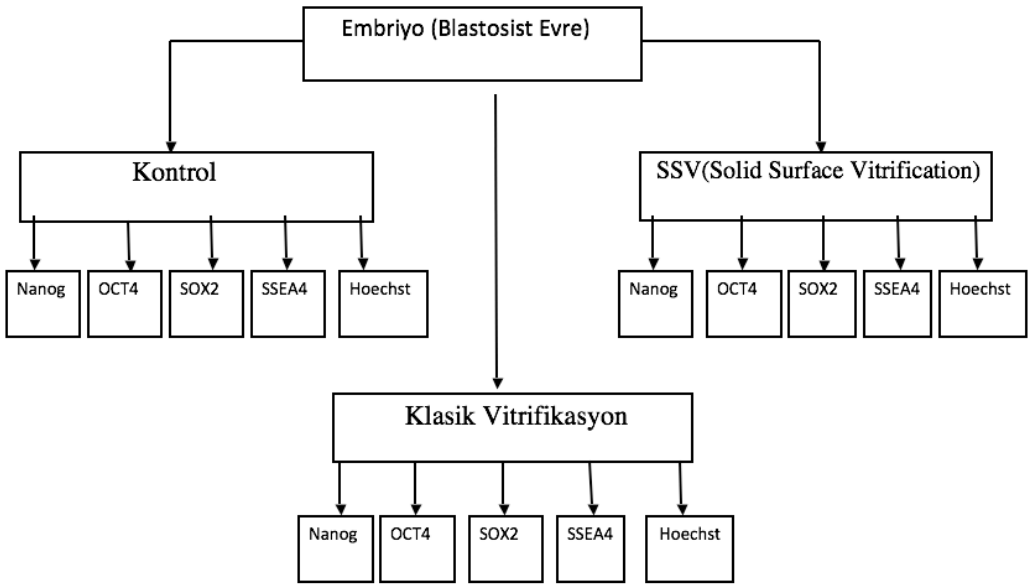
Deney Grupları	**Dondurulup Çözündürülen Blastosist Sayısı**	**Çözündürülen Blastosistlerin Canlılık Sayıları ve Oranları(%)**
SSV Grubu	68	49 (%72)
Klasik Vitrifikasyon Grubu	71	48 (%68)

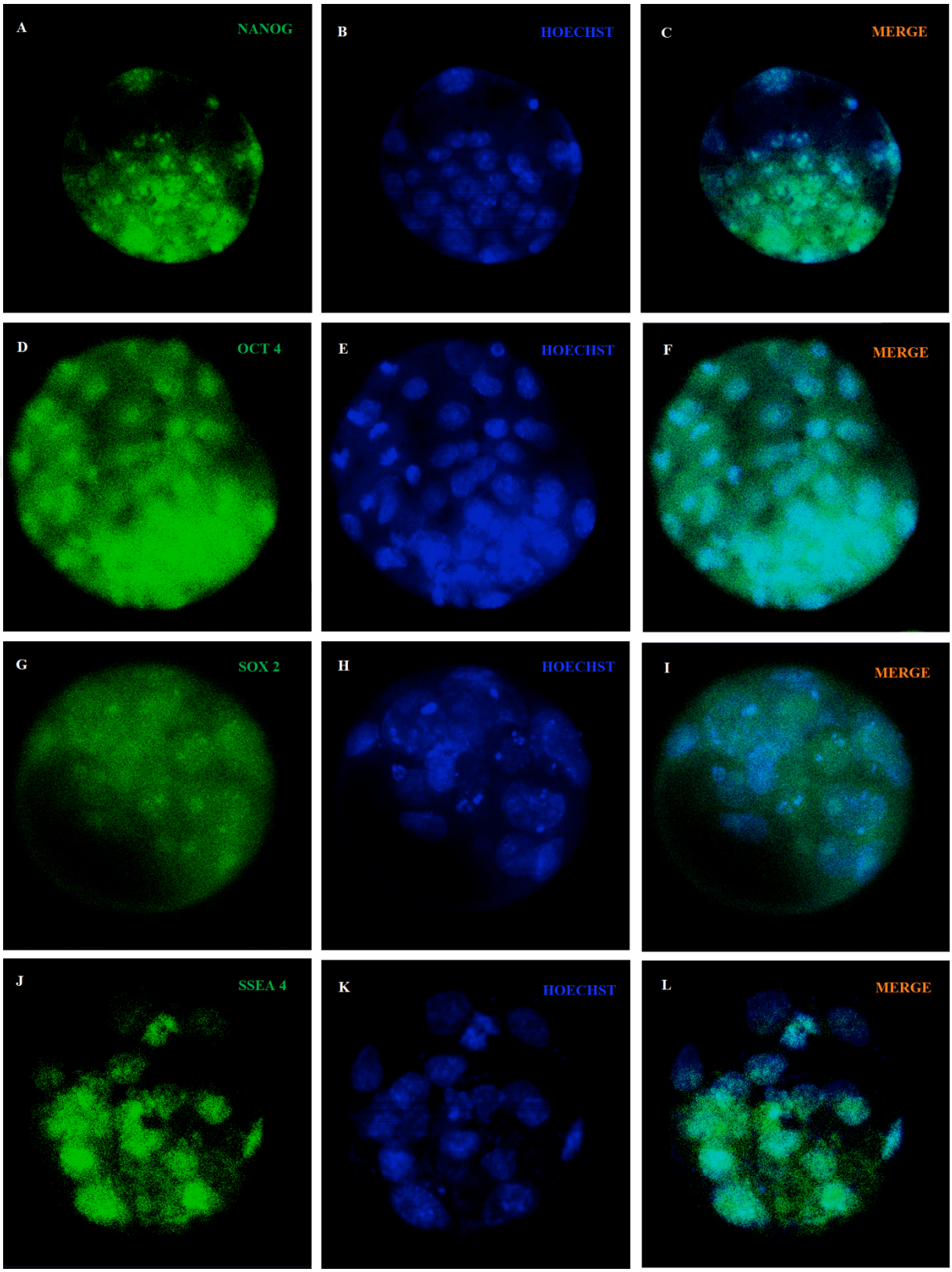
4.3. İmmünohistokimyasal Boyama

Kontrol amaçlı kültürlerine devam edilen embriyolar ve dondurulup çözündürülen tüm blastosistler incelenerek immünofloresan boyamaları yapıldı. İşaretlenmiş embriyoların Zeiss LSM 70 konfokal mikroskobu altında incelenerek fotoğrafları çekildi.

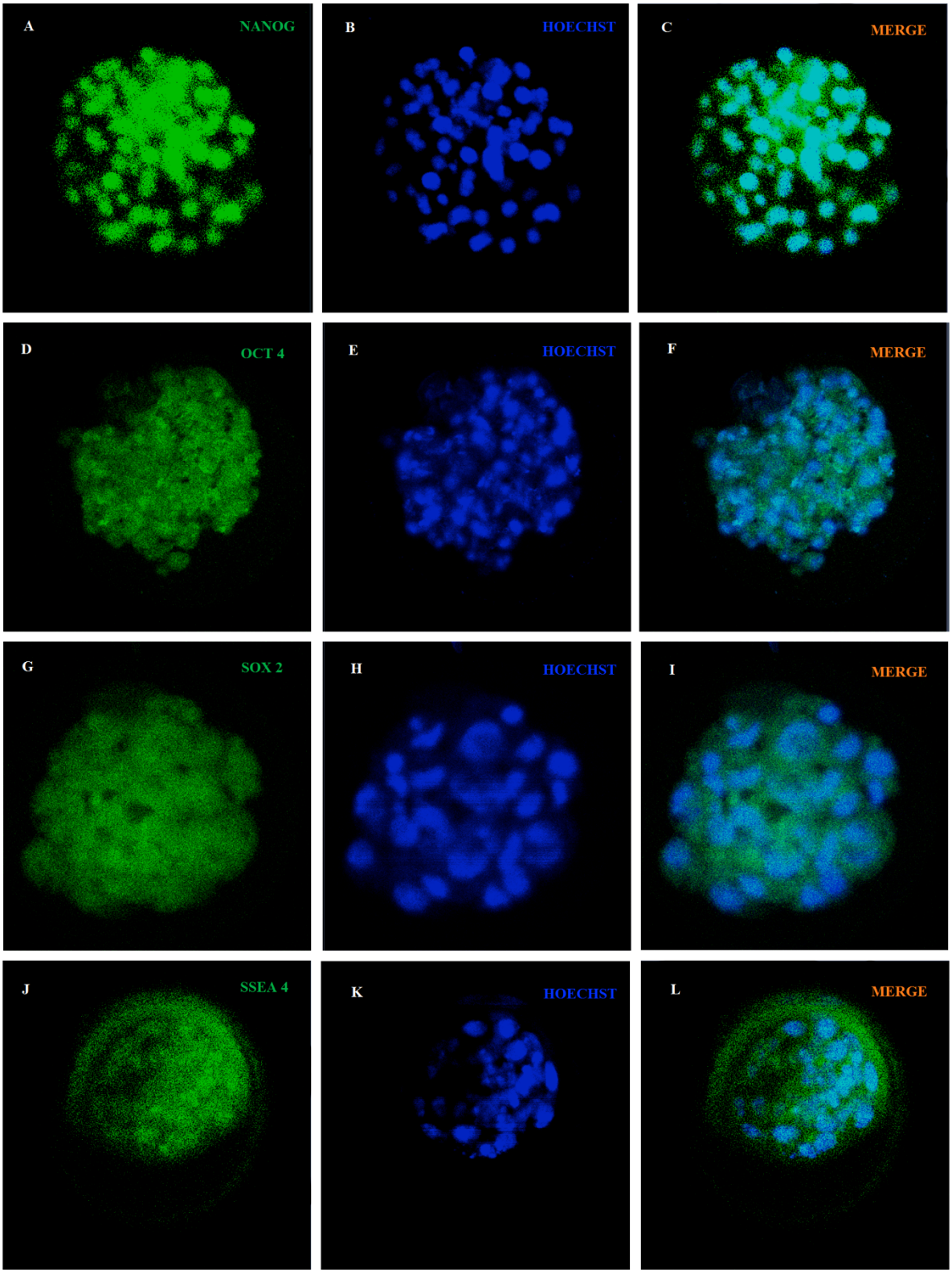
Her üç çalışma grubundaki blastosistler Nanog, Oct4, Sox2, SSEA-4 antikorları ve Hoechst 33258 çekirdek boyası ile boyandıktan sonra konfokal mikroskop altında incelenmiştir.

Tablo: 4.3.1. Çalışmada kullanılan deney grupları ve antikorlar.

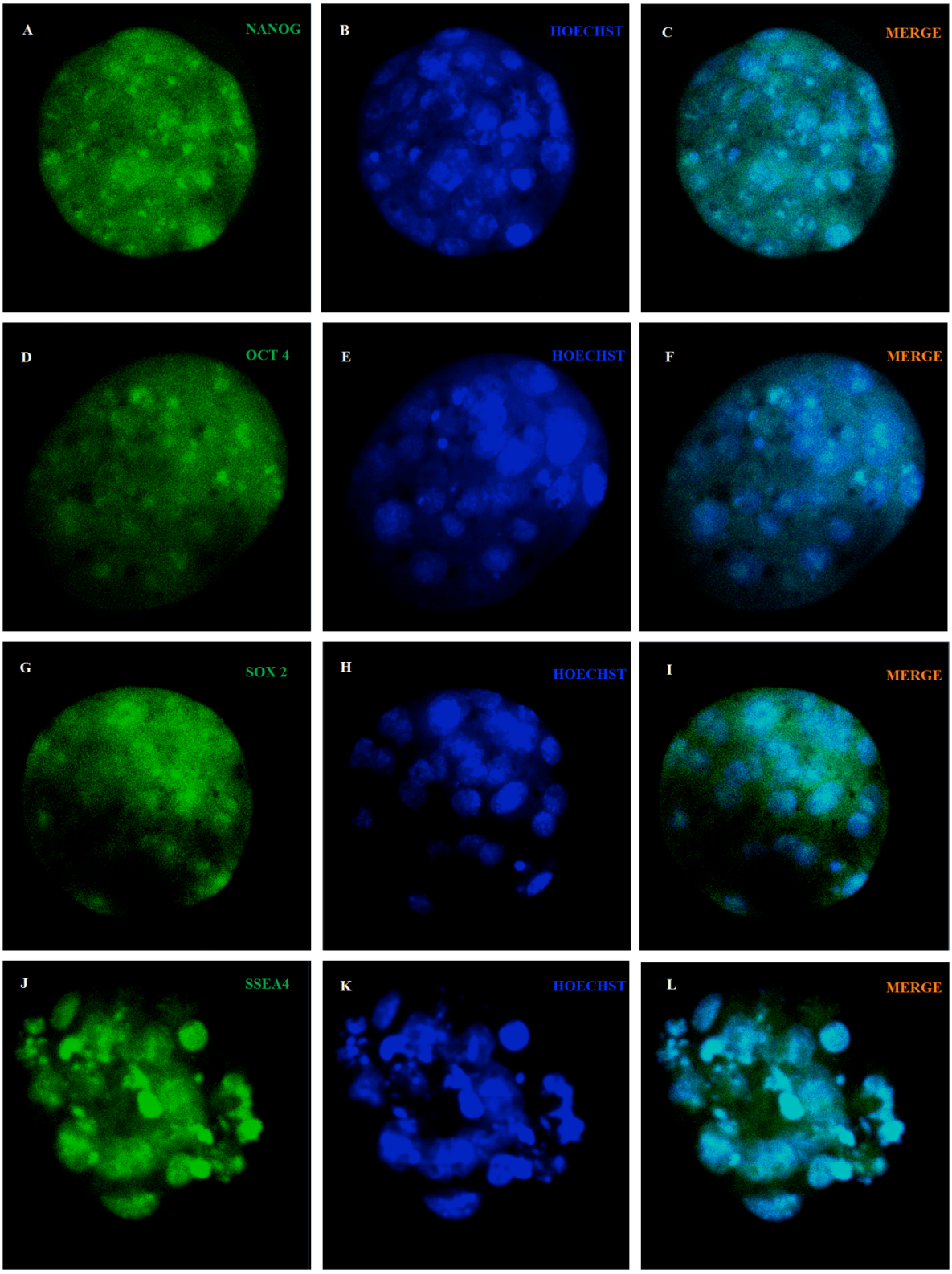




Şekil: 4.3.1. Kontrol grubu embriyo blastosistlerinde embriyonik kök hücre belirteçleri ifadeleri. A. Nanog, B. Hoechst, C. Birleşik, D. Oct4, E. Hoechst, F. Birleşik, G. Sox2, H. Hoechst, I. Birleşik, J. SSEA-4, K. Hoechst, L. Birleşik.



Şekil: 4.3.2. SSV grubu embriyo blastosistlerinde embriyonik kök hücre belirteçleri ifadeleri. A. Nanog, B. Hoechst, C. Birleşik, D. Oct4, E. Hoechst, F. Birleşik, G. Sox2, H. Hoechst, I. Birleşik, J. SSEA-4, K. Hoechst, L. Birleşik.



Şekil: 4.3.3. Klasik vitrifikasyon grubu embriyo blastosistlerinde embriyonik kök hücre belirteçleri ifadeleri. A. Nanog, B. Hoechst, C. Birleşik, D. Oct4, E. Hoechst, F. Birleşik, G. Sox2, H. Hoechst, I. Birleşik, J. SSEA-4, K. Hoechst, L. Birleşik.

4.4. İstatistiksel Analiz Değerlendirmesi

Zeiss LSM 70 mikroskobunda her deney grubundan blastosist aşamasındaki embriyonik kök hücre belirteçleri ile işaretlenmiş embriyoların fotoğrafları çekildi. Fotoğrafların üzerinde Zenn görüntü analiz programı kullanılarak her bir deney grubundan 34 farklı görüntü değeri elde edildi. Kontrol grubundaki embriyoların ve klasik vitrifikasyon ile SSV metodu uygulanan embriyoların Oct4, Sox2, Nanog ve SSEA4 ekspresyonlarının istatistiksel değerlendirmesi SPSS 20.0 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar İki Yönlü Varyans Analiz (*Univariate Anova*) yöntemi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Değişken (Oct4, Sox2, Nanog, SSEA4) değerlerinin varyans homojeniteleri her bir deney grubunda (kontrol, klasik vitrifikasyon, ssv) ayrıca kıyaslanmıştır. Sonuçlar homojen bulunmuştur ($p>0,05$).

Tablo 4.4.1. Varyansların homojenite değerleri

Tukey HSD	**Kontrol**	**Klasik Vitrifikasyon**	**SSV**
OCT4	1,000	1,000	1,000
SOX2	1,000	,996	,996
NANOG	,076	,076	1,000
SSEA4	1,000	1,000	1,000

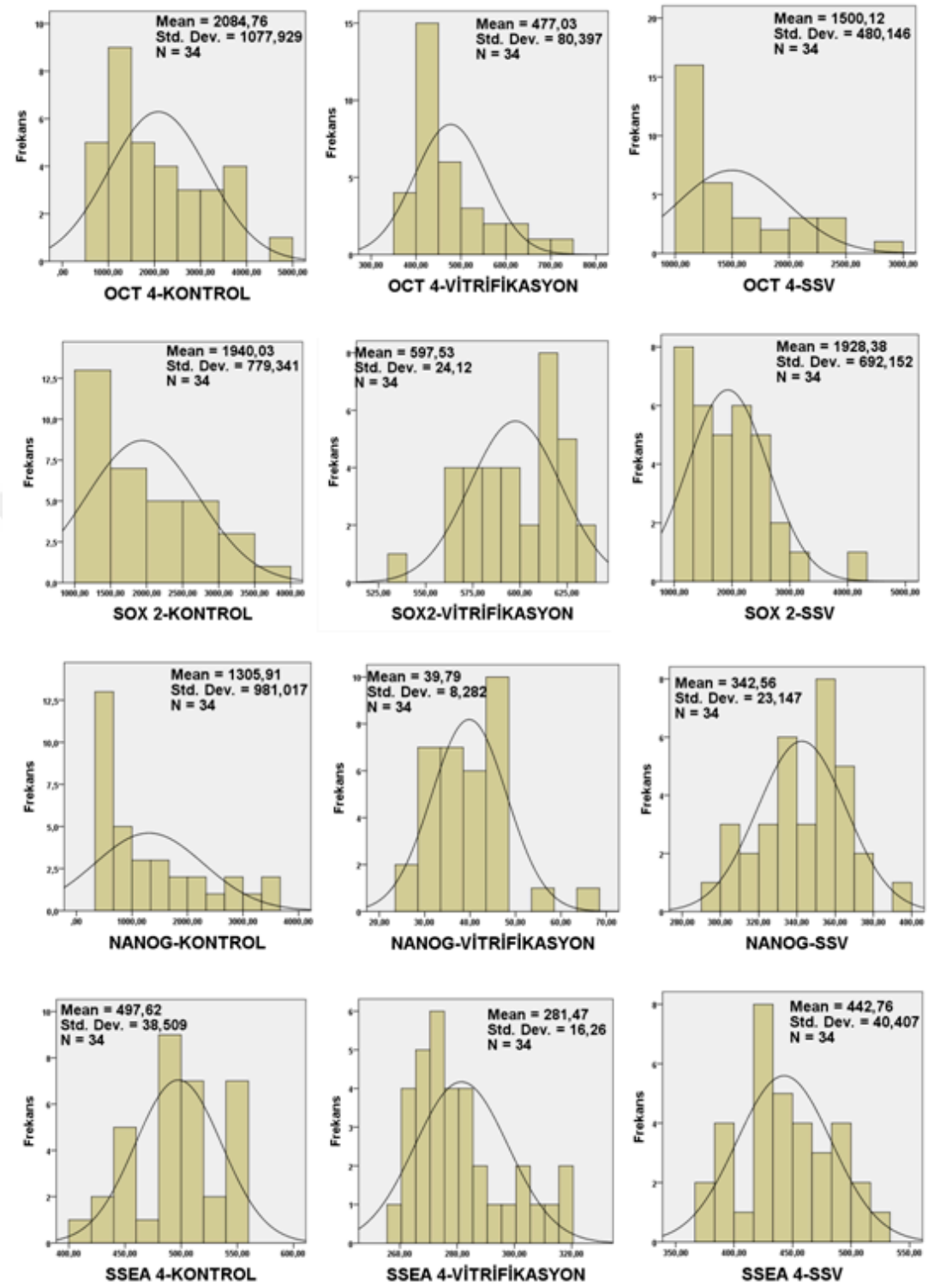
İki Yönlü Varyans Analizi sonucu elde edilen değişken değerler aynı şekilde her bir deney grubunda birbirleriyle kıyaslanmıştır. Oct4 ve SSEA4 ekspresyon düzeyleri incelendiğinde, kontrol, SSV ve klasik vitrifikasyon gruplarında giderek azaldığı saptanmıştır. Bu sonuçlar anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Sox2 ekspresyon düzeyi ise, kontrol gruplarından SSV ve klasik vitrifikasyon gruplarına doğru giderek azalmış, ancak kontrol ve SSV grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Nanog ekspresyonu değerlendirildiğinde; yine aynı şekilde kontrol grubundan, klasik vitrifikasyon grubuna doğru ortalamalarda azalış gözlenmiştir; ancak vitrifikasyon ve SSV grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Tablo 4.4.2. İki Yönlü Varyans Analizi Sonuçları

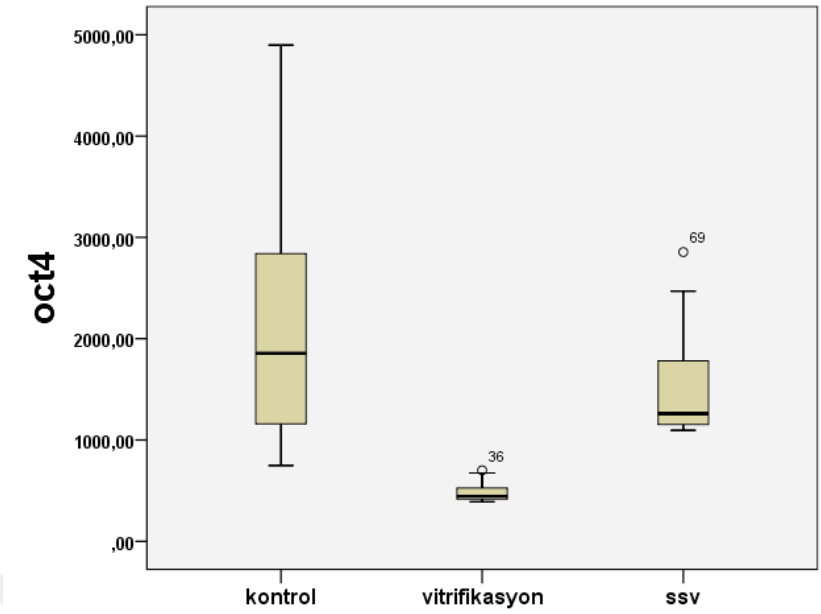
ANOVA

Tukey HSD

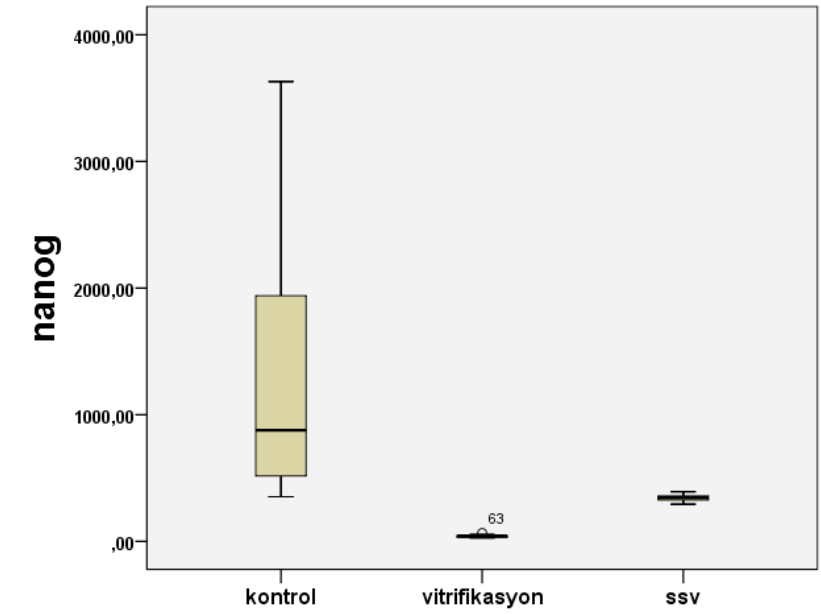
Dependent Variable			Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
oct4	kontrol	ssv	584,64706*	165,62027	,002	190,5579	978,7362
		vitrifikasyon	1607,73529*	165,62027	,000	1213,6462	2001,8244
	vitrifikasyon	kontrol	-1607,73529*	165,62027	,000	-2001,8244	-1213,6462
		ssv	-1023,08824*	165,62027	,000	-1417,1774	-628,9991
	ssv	kontrol	-584,64706*	165,62027	,002	-978,7362	-190,5579
		vitrifikasyon	1023,08824*	165,62027	,000	628,9991	1417,1774
sox2	kontrol	ssv	11,64706	145,99409	,996	-335,7421	359,0362
		vitrifikasyon	1342,50000*	145,99409	,000	995,1109	1689,8891
	vitrifikasyon	kontrol	-1342,50000*	145,99409	,000	-1689,8891	-995,1109
		ssv	-1330,85294*	145,99409	,000	-1678,2421	-983,4638
	ssv	kontrol	-11,64706	145,99409	,996	-359,0362	335,7421
		vitrifikasyon	1330,85294*	145,99409	,000	983,4638	1678,2421
nanog	kontrol	ssv	963,35294*	137,41297	,000	636,3823	1290,3235
		vitrifikasyon	1266,11765*	137,41297	,000	939,1471	1593,0882
	vitrifikasyon	kontrol	-1266,11765*	137,41297	,000	-1593,0882	-939,1471
		ssv	-302,76471	137,41297	,076	-629,7353	24,2059
	ssv	kontrol	-963,35294*	137,41297	,000	-1290,3235	-636,3823
		vitrifikasyon	302,76471	137,41297	,076	-24,2059	629,7353
ssea4	kontrol	ssv	54,85294*	8,14101	,000	35,4816	74,2243
		vitrifikasyon	216,14706*	8,14101	,000	196,7757	235,5184
	vitrifikasyon	kontrol	-216,14706*	8,14101	,000	-235,5184	-196,7757
		ssv	-161,29412*	8,14101	,000	-180,6654	-141,9228
	ssv	kontrol	-54,85294*	8,14101	,000	-74,2243	-35,4816
		vitrifikasyon	161,29412*	8,14101	,000	141,9228	180,6654



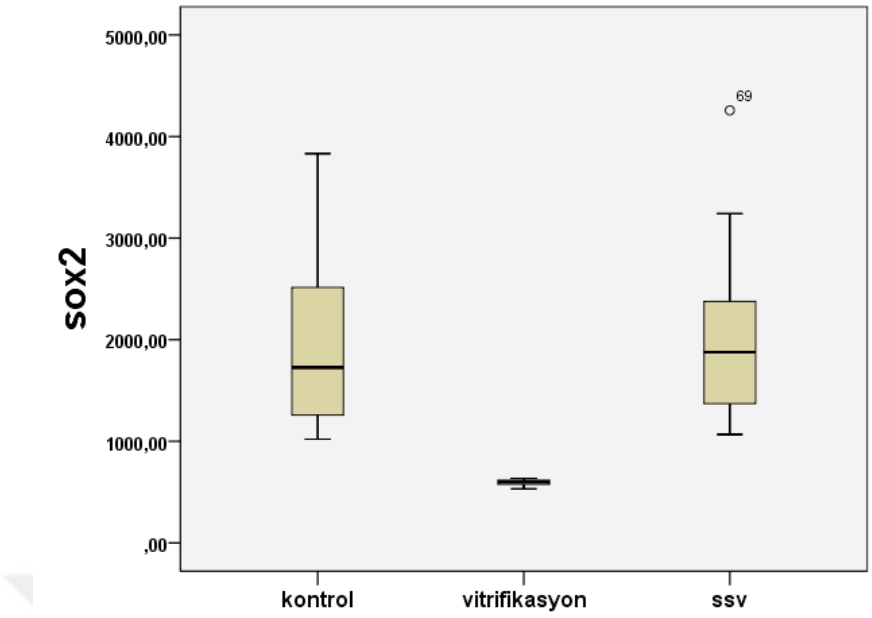
Şekil: 4.4.1. SPSS Histogram Grafiği. SPSS histogramı kullanılarak hazırlanan yukarıdaki grafiklerde, deney gruplarından elde edilen verilerin frekansı, dağılım eğrisi, ortalamaları, standart sapmaları ve değer sayıları görülmektedir.



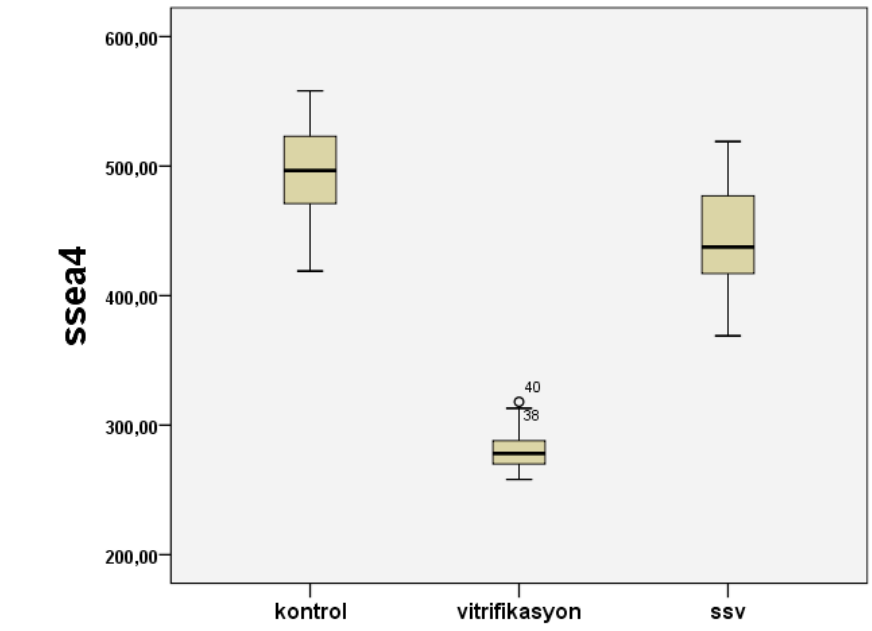
Şekil 4.4.2. Oct4 Ekspresyonundaki Standart Sapma ve Ortalamaların Deney Gruplarına Göre Dağlımı



Şekil 4.4.3. Nanog Ekspresyonundaki Standart Sapma ve Ortalamaların Deney Gruplarına Göre Dağlımı



Şekil 4.4.4. SOX2 Ekspresyonundaki Standart Sapma ve Ortalamaların Deney Gruplarına Göre Dağlımı



Şekil 4.4.4. SSEA4 Ekspresyonundaki Standart Sapma ve Ortalamaların Deney Gruplarına Göre Dağılımı

5. TARTIŞMA

Reprodüktif biyoteknoloji uygulamaları içerisinde; embriyo kriyoprezervasyonunun ayrı bir yeri vardır. Günümüzde kriyoprezervasyon uygulamaları hem yardımla üreme merkezlerinde, hem de endüstriyel hayvancılıkta sıkça uygulanmaktadır. Whittingham ve arkadaşları tarafından fare embriyolarında gerçekleştirilen ilk araştırmaların ardından; embriyo gelişimini minimum düzeyde etkileyecek en uygun dondurma ve çözme yönteminin geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir. Araştırmacılar tarafından, farklı kriyoprezervasyon metodlarının geliştirilmesi ve bu metodların iyileştirilmesi, kriyoprezervasyonun etkilerinin araştırılması, dondurma çözme sonrası embriyolardaki gelişim süreçlerinin izlenmesi, kriyoprezervasyon başarısını etkileyecek faktörlerin belirlenmesi için öncelikle çiftlik ve laboratuvar hayvanları üzerinde deneyler yapılmakta; ardından klinikte uygulanabilirlikleri sorgulanmaktadır. Kriyoprezervasyonun etkilerinin, türlere, embriyoların kalitesine, tercih edilen yönteme, embriyoların bulundukları evreye, dondurma çözme işlemleri sırasında maruz bırakılan kriyoprotektanlara ve kriyoprotektan konsantrasyonuna bağlı olarak farklılıklar gösterdiği ortaya konulmuştur (13,85). Klasik vitrifikasyon; günümüzde embriyo kriyoprezervasyonunda en sık kullanılan yöntem olmuştur.

Sunulan tez çalışmasında;

1)Süperovulasyon yöntemiyle PN aşamasında embriyolar elde edilip, blastosist aşamasına kadar in vitro kültürleri yapılmıştır.

2) Embriyo blastosistleri SSV yöntemi ve klasik vitrifikasyon yöntemleri kullanılarak dondurulup çözündürülmüş ve çözme sonrası blastosistlerin canlılık oranları araştırılmıştır.

3) İki farklı vitrifikasyon yöntemi uygulanan blastosist grupları ve hiçbir işleme tabi tutulmayan kontrol grubu blastosistleri embriyonik kök hücre belirteçlerinden Oct-4, Sox 2, Nanog ve SSEA-4 ile işaretlenmiş; blastosistler üzerinde bu belirteçlerin ekspresyonlarındaki değişim incelenmiştir.

Kriyoprezervasyon işlemleri, sonuçların etkilenmemesi ve bireysel etkilerin önlemesi amacıyla aynı araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiştir. Yine her uygulama sırasında aynı teknikler kullanılmıştır.

Hormon kompozisyonları, süperovulasyon yönteminde oosit eldesini etkileyen faktörlerin başında gelir. Son yıllarda iyileştirilen protokoller ve tekniklerle farelerden daha kaliteli ve fazla sayıda oosit elde edildiği gözlemlenmiştir. Bu tez çalışmasında, Bağış ve ark.nın, 2004 yılında yaptıkları çalışmada belirttikleri şekilde foliküler gelişim uyarılarak daha fazla sayıda oosit elde edilebilmesi amacıyla süperovulasyon işlemi uygulanmıştır (50). Farelere; 7,5 IU PMSG- 7,5 IU hCG verilmiştir. 9 fareden 276 adet PN embriyo elde edilmiştir. PN safhasındaki embriyolar kültür ortamında blastosist aşamasına getirilerek dondurulmuştur. Yardımcı üreme tekniklerinin uygulandığı merkezlerde blastosist aşamasındaki embriyoların dondurulup çözündürülmesinin ardından yapılan transferler daha başarılı sonuçlar vermektedir. Bu nedenle çalışmamızda blastosist safhasındaki embriyolar kullanılmıştır.

Araştırmada, klasik vitrifikasyon ve SSV yöntemlerinin fare blastosistlerinde sağ kalım oranları üzerine etkileri ile kök hücre belirteçlerinin en önemlilerinden sayılan Nanog, Oct4, Sox2, SSEA4 ekspresyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Literatürde bu iki yöntemin karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Klasik vitrifkasyon yönteminin bazı kök hücre belirteçleri üzerine etkilerini inceleyen kısıtlı sayıda araştırma mevcuttur. Aşağıda, bu araştırmalarda elde edilen sonuçlarla çalışmamızın bulguları karşılaştırılmıştır.

Baranyai ve ark.nın 2005 yılında fare embriyoları üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada in vitro fertilizasyon sonucu elde edilen 8 hücreli aşamadaki embriyolar morula veya blastosist aşamasına kadar kültüre edilmiştir (86). Ardından bu kültüre edilen embriyoların bir kısmına SSV veya klasik vitrifikasyon metodları uygulanmış; bir kısmına da biyopsi işlemi yapılmıştır. SSV metodunda, morula aşamasında biyopsi yapılmış embriyolarda sağ kalım oranı %86 (30/35), biyopsi yapılmamışlarda %97(35/36); blastosist aşamasında biyopsi yapılmış embriyolarda sağ kalım oranı %97(28/29), biyopsi yapılmamışlarda ise %94 (63/67) bulunmuştur. Klasik vitrifikasyon metodunda morula aşamasında biyopsi yapılmış embriyolarda sağ kalım oranı %75(24/32), biyopsi yapılmamışlarda %95 (38/40); blastosist aşamasında biyopsi yapılmış embriyolarda sağ kalım oranı %100 (24/24), biyopsi yapılmamışlarda %91(52/57) bulunmuştur. Araştırmamıza benzer şekilde; SSV metodu ile daha iyi canlılık oranları elde edilebildiği görülmektedir. Baranyai ve ark.

nın çalışmasındaki canlılık oranları gerek SSV gerekse klasik vitrifikasyon uygulanmış gruplarda bizim çalışmamıza oranla daha yüksektir.

Zhao ve arkadaşları ise, fare blastosistleri üzerinde yaptıkları vitrifikasyon çalışmalarında çözme işlemi sonrasında %92 (1670/1815) sağ kalım elde etmişlerdir (87). Kamath ve arkadaşları ise, insan blastosistlerini SSV yöntemi ile dondurmuşlar ve ardından sağkalım oranının ve %85 (204/240) olduğunu saptamışlardır (88). Her iki çalışmada da; gerek SSV gerekse klasik vitrifikasyon yöntemlerinin uygulandığı blastosistlerde sağ kalım oranları çalışmamıza oranla daha yüksek bulunmuştur. Bu tez çalışmasında, çözündürülen blastosistlerin canlılıklarını sürdürme özelliklerinin daha objektif değerlendirilebilmesi için 5-6 saatlik kültür sürecinin ardından değerlendirilmeleri tercih edilmiştir. Yukarıdaki araştırmalarla karşılaştırıldığında açığa çıkan farklılığın bir sebebi; çözme işlemi ardından yapılan kültür sürelerindeki farklılık olabilir. Yine taşıyıcı sistemlerindeki farklılık; sağkalım oranlarını etkileyebilir. Bartolac ve ark.nın çalışmalarında; blastosistler vitrifikasyon yöntemi ile dondurularak farklı taşıma sistemlerinde (açık ve kapalı sistemler) saklanmıştır. Embriyoların çözülmelerinin ardından canlılık oranları % 37 ila %79,6 arasında değişmiştir (89). Çalışmamızda ise dondurma tüpleri (cryo-vial) kullanılmıştır. SSV dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülen 68 adet blastosistin 49 adedi (%72) canlılığını sürdürmüştür. Klasik vitrifikasyon dondurma yöntemi kullanılarak dondurulup çözündürülen 71 adet blastosistten 48 adedi (%68) canlılığını sürdürmüştür.

Araştırmamızda, farklı büyütmelerde her üç deney grubundaki embriyoların canlı görüntüleri incelendiğinde, morfolojik açıdan belirgin bir farklılık gözlenmediği dikkati çekmiştir. Bağış ve ark. nın çalışmasında da; benzer şekilde SSV yönteminin ardından belirgin bir morfolojik değişikliğe rastlanmadığı görülmektedir (50).

Çalışmanın devamında blastosistler, immünfloresan boyama tekniği kullanılarak farklı antikorlarla boyanmış, embriyonik kök hücre belirteçlerinin ekspresyonları bakımından veriler birbirleri arasında ve kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır.

Kök hücre belirteçleri ile işaretlenmiş embriyolar değerlendirildiğinde; tüm bu belirteçlerin özellikle İCM hücreleri üzerinde lokalize olduğu görülmüştür. Sadece Oct-4 ile işaretli hücrelere trofoblastlar arasında da rastlanmaktadır Literatürde; incelenen kök hücre belirteçlerinin lokalizasyonları ile ilgili benzer ifadelere rastlanmaktadır (90).

Szczepańska ve arkadaşlarının (2011) farelerde yaptıkları çalışmada blastosist gelişimi sırasında, trofektodermde Oct4 gen ekspresyonunun kademeli olarak azaldığı, iç hücre kitlesinde ise ekspresyonunun kısıtlandığı gözlemlenmiştir (90). Blastosistin geç dönemlerine kadar Oct-4'ün trofoektodermde kaldığını göstermişlerdir. Oct-4'ün implantasyon sırasında ise tamamen yok olduğunu belirtmişlerdir. Yine Rajabpour-Niknam ve arkadaşlarının geç dönem fare blastositlerinde yaptıkları çalışmada ise; Oct-4 gen ekspresyonu seviyesinde azalma gözlemlenmiştir (91).

Çalışmamızda azalan Oct-4 düzeyinin bir nedeni de; normal embriyo gelişim süreci içerisinde ekspresyonda beklenen azalma olabilir. Ancak üç deney grubu karşılaştırıldığında; dondurma-çözme işlemlerinin bu faktör ekspresyonunu etkileyerek belirgin şekilde azalmaya sebep olduğu gözlenmektedir.

Zhao ve arkadaşlarının 2012 yılında fare blastositlerinde yaptıkları çalışmada vitrifikasyon sonucunda Oct-4 ve Nanog gen ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir (92). Rajabpour-Niknam ve ark, (2013) nın çalışmasında da, fare embriyolarında vitrifikasyon ardından Oct4 seviyesinde azalma saptanmıştır (91). Bizim çalışmamızda gerek Nanog, gerekse Oct-4; klasik vitrifikasyon işlemi sonrasında azalmıştır.

Avilion ve ark, 2003 yılında erken fare gelişimi üzerine yaptıkları çalışmalarda Sox2 ekspresyonunun erken embriyo dönemine ait bir işaret olduğunu bulmuşlardır (93). Sox2 aktivasyonu embriyoların farklılaşmasıyla negatif bir korelasyon gösterir. Ayrıca Sox2 erken embriyogenezisde sitoplazma ve çekirdek arasında mekik görevi görür. Bu protein büyüyen oositlerin sitoplazmasında yer alır. Maternal Sox2 iki hücreli evrede etkin haldedir. Bu aktivasyon geç morula döneminde gerçekleşen yeni Sox2 transkripsiyonundan bağımsızdır (93). Çalışmamızda; Sox2 ekspresyon düzeyinde; kontrol gruplarından SSV ve klasik

vitrifikasyon gruplarına doğru giderek azalma görülmüştür. Ancak kontrol ve SSV grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Yukarıdaki araştırmalarda ortaya çıkarılan Sox-2'nin fonksiyonları ile ilgili bilgiler dikkate alındığında; Sox-2 deki düşüşün embriyo gelişimi açısından belirgin bir defekte yol açmayacağı düşünülmektedir.

Suemori ve ark, 2006 yılında insan blastosistlerinden izole ettikleri embriyonik kök hücrelerde Oct4, Nanog, Sox2, SSEA1 ve SSEA4 ekspresyonunu göstermişler, vitrifikasyon metodunun yavaş dondurma metoduna göre daha başarılı bir dondurma tekniği olduğu sonucuna varmışlardır (94).

Araştırmamızda; Nanog ekspresyonu, vitrifikasyon ve SSV metodunda kontrol grubuna göre daha az olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak vitrifikasyon ve SSV grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Nanog; hücrelerin kendilerini yenilemelerinde esastır (95). Oct-4 ve Sox-2 ile birlikte çalışarak; EKH' lerinin pluripotent özelliklerini düzenler (95). Bu nedenlerle, bu kök hücre belirteçlerindeki değişiklikler hücrelerin kendilerini yenileme ve pluripotent özelliklerini etkileyecektir.

Çalışmanın bir diğer ilginç sonucu, SSEA4 ekspresyonunun SSV metodunda ve klasik vitrifikasyonda diğer belirteçlere oranla çok daha fazla azalmasıdır ($p<0,05$).

Özet olarak, sunulan çalışmada ilk kez SSV tekniği ile klasik vitrifikasyon yöntemleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar; SSV yönteminin de klasik vitrifikasyon yöntemine alternatif bir teknik olabileceğini düşündürmektedir. Hayvanlarda sıkça kullanılan bu tekniğin, yardımcı üreme teknikleri içerisinde kullanılabilirliği konusunda ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

Çalışma; gerek SSV gerekse klasik vitrifikasyon tekniklerinin uygulanması sonrası kök hücre ekspresyonlarında değişikler ortaya çıktığını göstermektedir. Bu değişikliklerin gelişen embriyoyu nasıl etkileyeceği; belirteçteki değişim oranı ve bu belirtecin fonksiyonu ve diğer belirteçlerle ilişkisi ile bağlantılı olacaktır.

Klasik vitrifikasyon ile SSV yöntemlerinin karşılaştırıldığı bu çalışmada elde edilen veriler, en iyi kriyoprezervasyon yöntemin geliştirilebilmesi alanındaki araştırmalara ışık tutacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Süperovulasyon yönteminde oosit eldesini etkileyen faktörlerin başında hormon kompozisyonlarının geldiği ve çalışmada uygulanan hormon dozlarının uygun ve yeterli olduğu anlaşıldı.
- Blastosist gelişim oranları açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SSV ve klasik vitrifikasyon grubu embriyolarda çözündürme sonrası blastosist gelişim oranları daha düşük bulundu.
- SSV ve klasik vitrifikasyon tekniklerinin uygulanması sonrası blastosist safhasındaki fare embriyoları morfolojik açıdan karşılaştırıldığında, kontrol grubuna benzer özellikler gözlendi.
- Farelerde, SSV ve klasik vitrifikasyon uygulamaları sonrası blastosist sağkalım oranları karşılaştırıldığında SSV yönteminin daha başarılı olduğu görüldü.
- Her üç deney grubunda da; Nanog, Oct-4, SSEA-4 ve Sox-2 pozitif hücrelerin özellikle İCM içerisinde lokalize olduğu görüldü. Oct-4 trofoektoderm hücrelerinde de gözlendi.
- Oct4 ekspresyonunda; SSV metodu ya da klasik vitrifikasyon yöntemi ile dondurma ve çözme işlemlerinin ardından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p<0,05$). SSV metodu ile dondurulup çözündürülen embriyolarda görülen ekspresyon düzeyi, vitrifikasyon grubuna göre daha yüksek düzeyde idi.
- Sox2 ekspresyon düzeyinde, sırası ile, kontrol, SSV ve klasik vitrifikasyon gruplarında azalma mevcuttu. Kontrol ve klasik vitrifikasyon grupları karşılaştırıldığında, anlamlı bir farklılık vardı ($p<0,05$). Ancak; kontrol ve SSV grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0,05$).
- Nanog proteini, vitrifikasyon ve SSV metodlarının ardından kontrol grubuna göre daha az ekspresse ediliyordu ($p<0,05$). Kontrol ve SSV uygulamalarının ardından, blastosistlerde vitrifikasyon grubuna göre daha fazla miktarda Nanog gözleniyordu ($p<0,05$).
- Gerek Oct4, gerekse SSEA4 ekspresyon düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; SSV ve klasik vitrifikasyon deney gruplarında giderek

azaldığı saptandı. İncelenen dört embriyonik kök hücre belirteci içerisinde; gerek SSV gerekse klasik vitrifikasyon yöntemlerinin ardından ekspresyonu en fazla değişen belirtecin SSEA-4 olduğu dikkati çekti ($p<0,05$).

Bu sonuçlar; gerek klasik vitrifikasyon gerekse SSV yöntemlerinin kök hücre belirteçlerinin ekspresyonlarında azalmaya yol açtığını göstermektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; SSV metodunun ardından çözülen embriyolarda canlılık oranları ve kök hücre belirteçleri ekspresyonları açısından daha iyi sonuçlar gözlenmiştir. SSV tekniğinin; klasik vitrifikasyon yöntemine alternatif bir metod olarak avantajlarının ve dezavantajlarının farklı yönleriyle ortaya konulması gerekmektedir. Bu çalışmada ortaya konulan veriler ışığında; SSV metodunun embriyolar üzerine etkilerinin ayrıntılı şekilde tanımlanmasını sağlayacak ileri çalışmalar klinikte hastalar üzerinde uygulanabilirliği konusunda da önemli adımlar atılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Mahmoudi R, Ragardi KI, Abbasi M, Amidi F, Sobhani A, Abolhasani F, Saadipour KH, Amiri I. (2008). In vitro maturation and fertilization capacity of Mouse GV stage oocyte following stepwise vitrification. Journal of Clinical and Diagnostic Research. 259:230-345.

2. Polge C, Smith AU, Parkes AS. (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666-667.
3. Bucak MN, Tekin N. (2007) Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 54, 67-72.
4. Tiitinen A. (2012) Prevention of multiple pregnancies in infertility treatment. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 26, 829-840.
5. Akkoc T, Taskin AC, Caputcu TA, Arat S, Bagis H. (2011) The effect of solid surface vitrification (SSV) versus classic vitrification technique on survive rate of *in vitro* produced bovine blastocysts. *Journal of Animal and Veterinary Advances*,10(22): 2885-2891.
6. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. (1972) Survival of Mouse embryos frozen to −196°C and −269°C. *Science* 178 411–414doi:10.1126/science.178.4059.411.
7. Wilmut I, Rowson Lea. (1973) The successfull ow temperature preservation of Mouse and cow embryos. *J. Reprod. Fertil.* 33, 352-353.

8. Dattena M, Ptak G, Loi P. ve diğerleri. (2000) Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. *Theriogenology.* 53, 1511-1519.

9. Elgayar M, Holtz W. (2001) Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled- straw method. *J. Anim. Sci*, 79: 2436-2438.

10. Misumi K, Suzuki M, Sato S, ve diğerleri. (2003) Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocyst susing a micro

droplet method. *Theriogenology*; in press

11. Otoi T, Koyama N, Yamamoto K. ve diğerleri. (2000) Developmental competence of frozen-thawed blastocysts from fair quality bovine embryos cultured with β-mercaptoethanol. *Vet. J,* 159: 282- 286.

12. Zeilmaker GH, Alberda AT, VanGent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC. (1984) Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril*, 42:293-296.
13. Palasz At, Mapletoft Rj. (1996) Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: *Recent advances. Biotechnol. Adv*, 14: 127-149.
14. Ludwig M, Muschalla H, Al-Hasani S, Diedrich K. (1998)The effect of multiple cryopreservation procedures and blastomere biopsy on the in vitro development of Mouse embryos. *Hum Reprod,* 13: 3165-3168.
15. Edashige K, Asano A, An Tz, Kasai M. (1999) Restoration of resistancetoosmoticswelling of vitrifiedmouseembryosbyshort-termculture. *Cryobiology,* 38: 273-280.
16. Aksoy M, Takahashi Y, Hishinuma M, Elsbeikh As, Tanaka A, Kanagawa H. (1999) Influences of retrieval stages and glutathione addition on post-thaw viability of quick frozen mouse morula during in vitroculture. *Theriogenology,* 51: 681-687.
17. Cherfas NV, Zoy RM. (1984) New Genetic Methods of Fish Selection. Moscow, Legkaya i pishevayapromishlennost;
18. Nilsson EE, Skinner MK. (2003) Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordiyal follicle development. *Biol Reprod*, 69: 1265- 72.

19. Campbell BK, Pıcton HM. Oocyte storage. (1999) *Curr. Obstet. Gyn*. 9: 203-209
20. Brian Dale and Kay Elder. (1997) Invitrofertilization, Cryopreservation; Embryo freezing and thawing.

21. Dinnyes A, Bagis H, Ji W. ve diğerleri (2003). Gene banking in rare breeds and species whose gametes are difficult to cryopreserve. *Animal Husbandry and Nutrition,* 52: 82-90.

22. Leibo SP, Brandley L. (1999) Comparative cryobiology of mammalian spermatozoa. 502-515.
23. Massip A. (2001)Cryopreservation of embryos of farm animal. *Reprod Dom Anim,* 36: 49-55.
24. Sağırkaya H, Bağış H. (2003) Memeli Embriyolarının Kriyoprezervasyonu, *Uludağ Univ.J. Fac. Vet. Med,* 22:121-129
25. Delilbaşı L. (2008). İn vitro fertilizasyon (IVF)laboratuvar yöntemleri. Güneş Tıp Kitabevleri.
26. Cabria E, Anel L, Herraez MP (2001)cEffect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved raınbow trout sperm. *Theriogenology,* 52, 623-635.
27. Kasai M (1996): Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci*, 42, 67-75.
28. Mcgann LE (1978) Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. *Cryobiology*, 15, 382-390.
29. Mcwilliams RB, Gibbons WE, Leibo SP (1995) Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono-and disaccharides. *Hum Reprod,* 10, 1163-1171.
30. 37-Rudolph AS, Crowe HJ (1985) Membrane stabilization during: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. *Cryobiology,* 53,59-72.
31. Mazur P (1990) Equilibrium, quasi- equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. *Cell Biophysics,* 14, 53-92.
32. Kasai M (2002) Advaces in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reprod Med Biol,* 1, 1-9.
33. Leeuw FED, Leeuw AMD, Daas JHG, Colenbrander BV, Erkleij AJ (1993) Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds on bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology,* 30, 32-44.
34. Shaw JM, Jones GM (2003) Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*, 9(6):583-605.
35. Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A (2009) Do physical forces

contribute to cryodamage? *Biotechnology and Bioengineering,* 104(4):719–728.

36. Uechi H, Tsutsumi O, Morita Y, Takai, Taketani Y (1999) Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell Mouse embryos and their subsequent development. *Human Reproduction* 14(11): 2827-2832.
37. Campana A, Sakkas D, Stalberg A ve diğerleri. (1996) Intrauterine insemination: evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. *Hum Reprod,* 11(4): 732-6
38. Fahy UM, Cahill DJ, Wardle PG, Hull MG. (1995) In vitro fertilization in completely natural cycles. *Hum Reprod,* 10:572-575.
39. Menezo Y ve diğerleri. (1992) *Freezing cocultured human blastocysts. Fertil Steril*, 58(5): p. 977-80.
40. Trounson A, Mohr L. (1983)Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo. *Nature*, 305:707-9.
41. Van der Elst J, Camus, M. Van den Abbeel E., Maes, R., Devroey, P., Van Steirteghem AC. (1995) Prospective randomized study on the cryopreservation of human embryos with dimethylsulfoxide or 1,2-propanediol protocols. *Fertil Steril*, 63:92-100.
42. Camus M, Van den Abbeel E, Waesberghe LV, Wisanto A, Devroey P,Van Steirteghem AC. (1989) Human embryo viability after freezing with dimethylsulfoxide as acryoprorectant. *Fertil Steril,* 51:460-465.
43. Vajta G. (2000) Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci,* 60-61: 357-364
44. AbdelHafez FF, Desai N , Abou-Setta AM, Falcone T, Goldfarb J. (2010) Slow freezing, vitrification and ultra-rapid freezing of human embryos: a systematic review and meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 20(2): 209–222.
45. Zheu SE, Zeng SM, Yu W, ve diğerleri. (2001) Vitrification of in vivo and in vitro produced ovine blastocysts. *Animal Biotechnology*, 12: 193-203.

46. Yavin S, Aroyo A, Roth Z, et al. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. Human Reproduction 2009; 24: 797– 804.
47. Shaw JM, Kola I, MacFarlane DR, ve diğerleri. (1991) An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-orming properties of the cryoprotective solution. *J Reprod Fertil;* 91: 9–18.
48. Dinnyes A, Dai YP, Jiang S, Yang XZ. (2000) High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 63:513–518.
49. Bagis H, Keskintepe L, Odaman Mercan H, Sagirkaya H. (2002) Comparing the birth rates of microinjected hybrid mouse zygotes transferred into outbred and foster mothers. *Turk J Vet Anim Sci* 26:329–333.
50. Bagis H, Sagirkaya H, Mercan HO, Dinnyès A. (2004) Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos on solid surface (SSV) versus in cryotube: comparison of the effect of equilibration time and different sugars in the vitrification solution. *Mol Reprod Dev.,* 67(2).
51. Akkoç T. (2006) Albino Irkı Sıçanlardan Süperovulasyon ile Pronükleer Aşamadaki Embriyoların Eldesi, vitrifikasyonu ve Vitrifikasyon Sonrası Embriyo Kültür Koşullarının Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı
52. Mukaida T, Wada S, Takahashi K. (1998) Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8 cell mouse embryos. *Human Reproduction*,13: 2874-5.
53. Yokota Y, Sato S, Yokota M. (2000) Successfull pregnancy following blastocyst vitrification. *Human Reproduction,* 15:1802-3.
54. Hogan B, Beddıngton R, Costantını F, And Lacy E. (1994)Manipulating the Mouse Embryo (2nd) Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Cold Spring Harbor*, Tennessee, page 217-252,
55. Schwıebert R. (2007) The Laboratory Mouse. Laboratory Animals Centre National University of Singapore, page 10-11,.
56. Bagıs H, Akkoc T, Taskın C, Arat S. (2010) Comparison of different cryopreservation techniques: higher survival and implantation rate of frozen-

thawed mouse pronuclear embryos in the presence of beta-mercaptoethanol in post-thaw culture. *Reproduction in Domestic Animals,* 45(6): 332-337,

57. Bagıs H, Arat S, Tas Ac, Akkoc T, Cetınkaya G, Taskın Ac, Turgut G, Sekmen S. (2009) ‘’Yardımcı üreme teknikleri ve transgenik hayvan üretiminde kullanılan yöntemler ‘’uygulamalı eğitim kursu. TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Gebze, sayfa 1-50
58. KılıçoğLu C. (1995) The in vitro cultivation of mouse ova from one cell to blastocyst. *Ankara Üniversitesi Veteteriner Fakültesi Dergisi*, 32: 301-310.
59. Gardner Dk, Lane M, Watson Aj. (2004) A Laboratary Guide to The Mammalian Embryo, Oxford, Oxford University Press, page 24-125.
60. Quınn P, Harlow Gm. (1978) The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. Journal Experimental Zoology, 206: 73-80.
61. Umaoka Y, Noda Y, Narımoto K, Morı T. (1992) Effects of oxygen toxicity on early development of mouse embryos. Molecular Reproduction and Development, 31: 28-33.
62. Agostonı E. (1993) Preimplantation development of the mammalian embryo. Ann. 1.st. Super Sanita, 15-25.
63. Evans MJ, Kaufman MH. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature,* 292:154–156.
64. Martin GR. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA.; 78:7634–7638.
65. Thomson Ja, Itskovitz-Eldor J, Shapiro Ss, Waknitz Ma, Swiergiel Jj, Marshall Vs, Jones Jm. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 282:1145–1147.
66. Niwa, H. (2007)How is pluripotency determined and maintained? Development 134, 635–646
67. Nichols, J. ve diğerleri. (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379–391.

68. Mitsui, K. ve diğerleri. (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell,* 113, 631–642
69. Avilion, A. ve diğerleri. (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes Dev. 17, 126–140
70. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S ve Smith, A. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell,* 113(13); 643–655.
71. Guangming Wu ve Hans R Schöler. (2014) Role of Oct4 in the early embryo development. Cell Regen (Lond). 3(1): 7.
72. Niwa H, Miyazaki J, Smith A. G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cell. Nat Genet, 24; 372–6.
73. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov, Niwa H. (2007) Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3 / 4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol*, 9; 625–635.
74. Adachi K, Suemori H, Yasuda Sh, Nakatsuji N, Kawase E. (2010) Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells*, 15; 455–469.
75. Kopp J.L, Ormsbee B.D, Desler, M. & Rizzino, A. (2008) Small increases in the level of sox2 trigger the differentiation of mouse embryonic stem cells. *Stem Cells* 26, 903– 911.
76. Zhao S, Nichols J, Smith A.G. & Li M. (2004) SoxB transcription factors specify neuroectodermal lineage choice in ES cells. *Mol. Cell. Neurosci*. 27, 332–342.
77. Shevinsky LH, Knowles BB, Damjanov I ve diğerleri. (1982)Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells. *Cell*,30:697-705.
78. Kannagi R, Cochran NA, Ishigami F ve diğerleri. (1983) Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. Embo J, 2:2355-2361.

79. Solter D, Shevinsky LH, Knowles BB ve diğerleri. (1979) The induction of antigenic changes in a teratocarcinoma stem cell line (F9) by retinoic acid. Dev Biol. 70:515-521.
80. Martin GR, Lock LF. (1983) Pluripotent cell lines derived from mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, section 9. In: Silver LM, Martin GR, Strickland S, eds. Teratocarcinoma Stem Cells. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Press,:635-646.
81. Henderson, J.K., et al. (2002) Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. Stem Cells 20: 329-337. PMID: 12110702
82. Maruyama M, Ichisaka T, Nakagawa M. & Yamanaka S. (2005) Differential roles for Sox15 and Sox2 in transcriptional control in mouse embryonic stem cells. J. Biol. Chem. 280, 24371–24379 .
83. Okumura-Nakanishi, N., Saito, M., Niwa, H., Ishikawa, F. Oct-3/4 and Sox2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 280; 5307–5317.
84. http://card.medic.kumamoto-u.ac.jp/card/english/sigen/manual/ebvitri.html
85. Desai N, Blackmon H, Szeptycki J, Goldfarb J. Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: post-vitrification development, pregnancy outcomes and live births. Reproductive BioMedicine Online.2007;14(2):208-13.
86. Baranyai B, Bodo S, Dinnyes A, Gocza E. (2005) Vitrification of biopsied mouse embryos. *Acta Vet Hung*, 53: 103-12.
87. Zhao XH, Yue TF, Sui XL. (2004). Cryopreservation of mouse morula and blastocysts by vitrification]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 39: 526-8.
88. Kamath S M, Mangal,araj A M, Cullinan R. (2011) Blastocyst cryopreservation using solid surface vitrification: A preliminary study.
89. Bartolac Lk, Lowe Jl, Koustas G, Sjöblom C, Grupen Cg. (2015) A comparison of different vitrification devices and the effect of blastocoele collapse on the cryosurvival of *in vitro* produced porcine embryos. *J Reprod Dev.,* 61(6): 525–531.
90. Szczepańska K, Stańczuk L, Maleszewski M. (2011) Oct4 protein remains in

trophectoderm until late stages of mouse blastocyst development. *Reprod Biol.* 11(2):145-56.

91. Rajabpour-Niknam M, Totonchi M, Shahhosseini M, Farrokhi A, Alipour H, ve Eftekhari-Yazdi P.(2013) Quantitative expression of developmental genes, Pou5f1 (Oct4) and Mest (Peg1), in vitrified mouse embryos, *Iran J Reprod Med.*11(9): 733–740.
92. Zhao XM1, Du WH, Hao HS, Wang D, Qin T, Liu Y, Zhu HB. (2012)Effect of vitrification on promoter methylation and the expression of pluripotency and differentiation genes in mouse blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 79(7):445-50.
93. Avilion AA1, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. (2003)
Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.*17(1):126-40.
94. Suemori H1, Yasuchika K, Hasegawa K, Fujioka T, Tsuneyoshi N, Nakatsuji N.. (2006) Efficient establishment of human embryonic stem cell lines and long-term maintenance with stable karyotype by enzymatic bulk passage. *Biochem Biophys Res Commun.* 345(3):926-32.
95. Pan G1, Thomson JA. (2007) Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Res.* 17(1): 42-9.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hatice İSAN

Doğum Yeri- Yılı: Gaziantep- 15.06.1988

Eğitim Durumu:

2010-2014 :Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü- Antalya. Lisans

2014-2016: Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi- Klinik Embriyoloji- İstanbul-Yüksek Lisans

Çalıştığı Kurum ve Kuruluşlar:

2013 Haziran-Eylül: Lisans Stajı, Gayrettepe Florance Nightingale Hastanesi

2015 : Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştıma Merkezi (MÜKKAM)gönüllü araştırmacı, Tubitak Bursiyer.

2015 Ağustos - : Maltepe Üniversitesi Kanser ve Kök Hücre Araştıma Merkezi (MÜKKAM)gönüllü araştırmacı.

Bilimsel Yayınlar:

- İsan H, Göklü ME, Tüfekçi K, Misyağcı NM, Aktaş RG. Karaciğer Hepatosellüler Kanser Hücrelerinin Büyüme, Çoğalma Ve Morfolojileri Üzerine Farklı Kültür Yüzeylerinin Etkisi , Çanakkale, 08- kasım 2015, (poster).
- Guner DC, Sirolu C, Yildiz A, Gul CC, Isan H, Aktas RG. Evaluation of cytotoxic effects of dimethylsulfoxide (DMSO) on Hepg2 cells during thawing period. The Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Meeting Abstracts, Mol Biol Cell, 2015.
- Tüfekçi K, Göklü ME, Qipa E, İsan H, Aktaş RG. Dondurma-Çözme İşleminin Ardından Uygulanan Santrifüje Bağlı Ortaya Çıkan Mekanik Stresin Karaciğer Hepatosellüler Kanser Hücreleri Üzerine Morfolojik Ve Fonksiyonel Düzeydeki Etkileri, Çanakkale, 6-8 Kasım 2015, (poster).
- Güner DC, İsan H, Şirolu C, Aktaş RG. Karaciğer Kanser Hücreleri Ve Apopitoz. Çanakkale, 6-8 Kasım 2015, (sözlü sunu).

- Demirel PB, İsan H. İğ İpliği Kontrol Noktasının Regülasyonu. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Ölüdeniz- Fethiye 27-30 Ekim 2015, (Sözlü Sunu).
- Tatar G, Şengül E, İsan H, Aktaş RG. Kanser Kök Hücreleri ve Kanserli Hücre Pasaj Sayısı İlişkisi, Masco, İstanbul, 28-30 Mayıs 2015.
- Doğan R, Uzun S, İsan H, Aktaş RG. Dimetil Sülfoksitin Karaciğer Kanser Hücrelerinde Beta-Galaktosidaz Enzimi Üzerine Etkileri. Masco, İstanbul, 28-30 Mayıs 2015.
- Aktas RG, Erdin S, Apa DD, Isan H. Effects of confluency on morphological and functional properties of HepG2 cells, a hepatocellular carcinoma cell line. EACR Sponsored 3rd Anticancer Agent Development Congress, İzmir, Turkey 2015.EndFragment
- Şengül E, Uzun S, İsan H, Aktaş RG. Kültür Sürecine Bağlı Olarak Hepatosellüler Karsinoma Hücrelerinde Glikojen Depolanmasında Ortaya Çıkan Değişimin Morfolojik Düzeyde Değerlendirilmesi, Cerrahpaşa 4. Bilim Günleri, İstanbul 19-20 Mart 2016. (poster)
- Uyanık A, Şengül E, Ceviz B, Doğan R, İsan H, Aktaş RG. Düşük doz dimetilsülfoksitin hepatosellüler karsinoma hücrelerinin proliferasyonu, morfolojik özellikleri ve lipid içeriği üzerine etkileri. Cerrahpaşa 4. Bilim Günleri, İstanbul 19-20 Mart 2016. (sözlü sunu)

Ödüller:

- Pratet 1.Ulusal Tıp Öğrenci Kongresi, En iyi Birinci Poster Ödülü, Çanakkale, Kasım 6-8, 2015.
- İğ İpliği Kontrol Noktasının Regülasyonu. XIV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi. Ölüdeniz- Fethiye (Sözlü Sunu1. liği) 27-30 Ekim 2015.