T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARE EMBRİYOLARININ TİPIII ANTIFREEZE PROTEİN VE HUMAN HEAT SHOCK PROTEİN 70 İLE VİTRİFİKASYONU VE ÇÖZDÜRÜLMESİ SONRASI İN VİTRO GELİŞİM ORANLARINA ETKİSİ

Arş. Gör. Mustafa BODU

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

I. Danışman

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN

II. Danışman

Dr. Ali Cihan TAŞKIN

KONYA-2021

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARE EMBRİYOLARININ TİPIII ANTIFREEZE PROTEİN VE HUMAN HEAT SHOCK PROTEİN 70 İLE VİTRİFİKASYONU VE ÇÖZDÜRÜLMESİ SONRASI İN VİTRO GELİŞİM ORANLARINA ETKİSİ

Arş. Gör. Mustafa BODU

DOKTORA TEZİ

DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

I. Danışman

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN

II. Danışman

Dr. Ali Cihan TAŞKIN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 18102031 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2021

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Arş. Gör. Mustafa BODU tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	Unvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Danışman:	Unvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Üye:	Unvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Üye:	Unvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza
Üye:	Unvanı Adı SOYADI Üniversitesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu ……. tarih ve ……. Sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Unvanı Adı SOYADI
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Kriyoprezervasyon tekniği, biyolojik hücrelerin veya dokuların sıfırın altındaki sıcaklıklarda muhafaza edildiği bir süreçtir. Kriyoprezervasyon ile hücrelerin metabolik aktiviteleri en aşağı düşürülerek uzun süreli olarak saklanmaları sağlanmaktadır. Ayrıca donmanın hücrelerde yarattığı hasarın da en aşağı seviyelerde olması gerekmektedir. Hücresel hasarın iki ana sebebi bulunmaktadır. Bunlardan ilki buz kristallerinin oluşması ile oluşan fiziksel hasar; ikincisi ise hücre içi çözünen maddelerin konsantrasyonlarından kaynaklanan kimyasal hasardır. Bu hasarlar, ya sıcaklık, kontrollü bir şekilde azaltılarak ya da hücresel koşullar değiştirilerek önlenebilmekte ya da en aza indirilebilmektedir. Kryoprotektanlar kullanılarak hücrenin hızlı bir şekilde soğutulması ile ortaya çıkabilecek fiziksel hasarların oranı düşürülebilmektedir. Bu nedenle kullanılacak kriyoprotektanın en az toksisiteye sahip olması, hücre içine nüfuz edebilmesi ve çok düşük sıcaklıklara dayanabilmesi gerekmektedir. Kriyoprotektan benzeri ajanların kullanımı da hücreleri dondurma çözdürme sonrası oluşabilecek hasarlardan koruyabilmektedir. Bu nedenle sunulan tez projesinde kriyoprotektif etkili ajanların kullanılması ile üstün nitelikli hayvanların embriyoları hasar oluşmadan dondurulması ve çözdürülmesi sonrası uygun bir zamanda nakledilebilmesi ve böylece yararlı genlerin aktarımının da süreklilik kazanması umulmaktadır.

Ülkemizde in vitro fertilizasyon sonrası embriyoların vitrifikasyonu ile yapılan çalışmalar oldukça azdır. İn vitro fertilizasyon sonrası eğer dondurma işlemi yapılmayacaksa bu embriyoların nakledilmesi gerekmektedir. Fakat dondurma işlemi yapılacaksa, oluşturulan embriyolar alıcı hayvanlara istenilen zaman dilimi içerisinde senkronizasyon işlemi uygulanarak nakledilebilmektedir. Vitrifikasyon sonrası oluşan kriyojenik hasarın blastosist oranlarını etkilediğini birçok araştırmacı belirtmektedir. Sunulan tez çalışmasında Antifreeze Protein tip III ve Heat Shock Protein 70 kullanımıyla embriyonun in vitro gelişim oranlarını artırmak ve kullanılan proteinlerin etkilerini değerlendirmek hedeflenmiştir.

Tez çalışmam ve doktora eğitimimin her aşamasında hiçbir yardımını ve tecrübesini esirgemeyen başta danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN'a teşekkürü bir borç bilirim. Ayrıca 2. tez danışmanım Sayın Dr. Ali Cihan TAŞKIN'a yaptığı katkılardan dolayı teşekkür ederim. Yine tez çalışmam süresince tecrübelerini ve bilgilerini esirgemeyen Prof. Dr. Abdullah KAYA'ya ve Prof. Dr. Mustafa Numan BUCAK'a, Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nuri

BAŞPINAR'a, Koç Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Serçin KARAHÜSEYİNOĞLU'na, Zootekni Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mustafa GARİP'e, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ'e ve Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden Vet. Hek. Salih Metin GÖKYAPRAK'a teşekkür ederim. Sunulan tez çalışmasının uygulamalarında bana yardımlarını esirgemeyen Ahmet KOCABAY'a, Vet. Hek. Vahit AĞIR'a ve Vet. Hek. Ayşe ÖZCAN'a sonsuz teşekkür ederim. Tez çalışmamda beni hep motive eden ve Anabilim Dalımıza geldiği günden beri yardımını ve desteğini hep yanımda hissettiğim, hem özel hem de akademik hayatımda son derece önemli bir yeri bulunan Arş. Gör. Ali Erdem ÖZTÜRK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her aşamasında bana inancı tam olan ve beni bu günlere getiren kıymetli aileme ve tüm zor zamanlarımda yanımda olan, benim adeta psikolojik danışmanım olan, duasını hiç esirgemeyen, tüm hayatım boyunca da yanımda olacağını bildiğim eşim Şefika BODU'ya sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

Sunulan tez çalışması 18102031 proje numarası ile desteklenmiştir. Tez projemi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne teşekkür ederim.

Bu çalışma, T.C. Kalkınma Bakanlığı tarafından desteklenen, Koç Üniversitesi Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi (KUTTAM)'nin hizmet ve altyapısı kullanılarak yürütülmüştür. Yazının içeriğinden tümüyle yazarlar sorumludur ve Kalkınma Bakanlığı'nın resmi görüşünü yansıtmamaktadır.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **iv**
1. GİRİŞ **1**
1.1. Dişi Farelerde Seksüel Olgunluk 1
1.2. Dişi Farelerde Östrüs Siklusu 2
1.2.1. Proöstrüs 2
1.2.2. Östrüs 3
1.2.3. Ovulasyon 3
1.2.4. Metöstrüs 4
1.2.5. Diöstrüs 4
1.3. Farelerde Embriyonik Gelişim 5
1.3.1. Embriyonik Gelişim Aşamaları 5
1.4. Farelerde Süperovulasyon 8
1.5. Embriyoların Kriyoprezervasyonu 8
1.5.2. Embriyo Kriyoprezervasyon Yöntemleri 9
1.7. Antifreeze Protein Tip III 15
1.8. Human Heat Shock Protein 70 17
2. GEREÇ VE YÖNTEM **20**
2.1. GEREÇ 20
2.2. YÖNTEM 20
2.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar 20
2.2.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzeme ve Cihazlar 21
2.2.3. Çalışmada Kullanılan Medyumların Hazırlanması 22
2.2.4. Dişi Farelerin Süperovulasyonu 24
2.2.5. Dişi Farelerden Embriyo Eldesi 26
2.2.6. Embriyoların SSV Yöntemi ile Dondurulması 29
2.2.7. Embriyoların Çözdürülmesi ve Kültüre Edilmesi 30
2.2.8. İn Vitro Kültür Oranlarının Değerlendirilmesi 31
2.2.9. Diferansiyel Boyama ile Hücre Sayılarının Belirlenmesi 31
2.2.10. İstatistiksel Analizler 33
3. BULGULAR **33**
4. TARTIŞMA **39**
5. SONUÇ **50**
6. KAYNAKLAR **51**
7. EKLER **56**
7.1. Ek A: Etik Kurul 56
8. TURNİTİN RAPORU **58**
9. ÖZGEÇMİŞ **60**

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Blastosist Aşamasındaki Embriyonun Görünümü 5
Şekil 1.2. Embriyonik Gelişim Aşamaları 7
Şekil 1.3. Konvansiyonel (Yavaş) Dondurma (SlowFreezing) Yöntemine Uygun Payet Şeklinin Gösterilmesi 10
Şekil 1.4. One-Step (Tek Adım) Yöntemine Uygun Payet Şeklinin Gösterilmesi 11
Şekil 1.5. Stepwise Dondurma Yöntemine Uygun Payet Şeklinin Gösterilmesi 12
Şekil 2. 1. Dişi Farelerin Süperovulasyonu Amacıyla İntraperitoneal Uygulama..... 25
Şekil 2. 2. Dişi Farede Vaginal Plug Görünümü 25
Şekil 2. 3. Operasyon Masasının Hazırlanması 27
Şekil 2. 4. Ovaryum'lardan Ovidukt'ların Ayrılması İşlemi 27
Şekil 2. 5. Dört Kuyucuklu Petrinin Kümülüs Hücrelerinin Temizlenmesi Amacıyla Hazırlanması 28
Şekil 2. 6. Ovidukt'ta Ampullanın Görünümü..... 28
Şekil 2. 7. Ampullalardan elde edilen pronüklear embriyolar. 29
Şekil 2. 8. Embriyoların Katı Yüzey Vitrifikasyon Yöntemi ile Dondurulması 30
Şekil 2. 9. Hücre Sayılarının Belirlenmesi Amacıyla Preparatların Hazırlanması 32
Şekil 2. 10. Boyanan Embriyoların 4-Well Petrilerinden Alınması. 33
Şekil 3. 1. 72 – 96. Saatlerde Embriyolarda İn Vitro Gelişim 35
Şekil 3. 2. Hoeschst 33285 ve Propidyum iyot (PI) ile TE ve ICM Hücrelerinin Gösterilmesi 37

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 3. 1. Dondurma Çözdürme Sonrası Elde Edilen İn Vitro Gelişim Oranları . 33
Çizelge 3. 2. Diferansiyel Boyama İle Blastosistlerde ICM, TE ve Toplam Hücre Sayılarının Belirlenmesi 36

SİMGELER VE KISALTMALAR

-	Eksi
+	Artı
±	Artı-Eksi
%	Yüzde
º	Derece
<	Küçüktür
=	Eşittir
>	Büyüktür
/	Bölme
≤	Küçük Eşittir
≥	Büyük Eşittir
ºC	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
kDa	Kilodalton
AFP	Antifriz Protein
AFPIII	Antifriz Protein Tip 3
AFPIII200	Antifriz Protein Tip 3 200 ng/ml
AFPIII400	Antifriz Protein Tip 3 400 ng/ml
AFPIII800	Antifriz Protein Tip 3 800 ng/ml
AFGP	Antifriz Glikoprotein
Apaf – 1	Apoptotik Proteaz Aktive Edici Faktör – 1 (Apoptotic Protease Activating Factor-1)
C	Kontrol
Ca^{+2}	Kalsiyum İyonu
DMSO	Dimetilsülfoksit

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EG	Etilen Glikol
ENU	Etil Nitroso Üre
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
G	Gliserol
H_3^+O	Hidronyum İyonu
HSP	Heat Shock Protein
HHSP70	Human Heat Shock Protein 70 kDa
HHSP70 – 1	Human Heat Shock Protein 70 kDa 1µg/ml
HHSP70 – 2	Human Heat Shock Protein 70 kDa 2µg/ml
HHSP70 - 4	Human Heat Shock Protein 70 kDa 4µg/ml
ICM	İç Hücre Kitlesi (Inner Cell Mass)
İVM	İn Vitro Maturasyon
İVF	İn Vitro Fertilizasyon
K^+	Pozitif Kontrol
K^-	Negatif Kontrol
K^{+1}	Potasyum İyonu
KPA	Kriyoprotektan Ajan
LH	Lüteinleştirici Hormon
MPa	Megapaskal
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
PG	Propilen Gliol
PEG	Polietilen Glikol
PVP	Polivinil pirrolidon
QAE	Kuaterner aminoetil
ROS	Reaktif Oksijen Türleri (Reactive Oxygen Species)
SSV	Katı Yüzey Vitrifikasyon (Solid Surface Vitrification)

SP	Sülfopropil
TE	Trofektoderm
ZP	Zona Pelusida

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fare Embriyolarının TipIII Antifreeze Protein ve Human Heat Shock Protein 70 ile Vitrifikasyonu ve Çözdürülmesi Sonrası İn Vitro Gelişim Oranlarına Etkisi

Mustafa BODU

Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA 2020

Sunulan tez çalışmasında fare embriyolarının vitrifikasyon medyumlarına eklenen Antifreeze Protein tip III (AFPIII) ve Human Heat Shock Protein 70'in dondurma çözdürme sonrası in vitro gelişim ve hücre sayıları üzerine etkisi incelendi.

Toplamda 10 adet dişi fareye senkronizayon amaçlı 10 IU PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra 10 IU hCG intraperitoneal olarak enjekte edildi. Fareler hCG enjeksiyonundan hemen sonra aynı kafeste 2 dişi 1 erkek olacak şekilde çiftleştirildi. Çiftleştirmeden 24 saat sonra farelerde vaginal plug oluşumu kontrol edildi ve vaginal plug bulunan fareler operasyon masasına alındı. Farelerin ötenazileri yapıldıktan sonra pronüklear aşamadaki embriyolar CO_2 gerektirmeyen 150 IU hyaluronidaz içeren Human Tubal Fluid - 4-(2-hidroksietil)-1-piperazine etansulfonik asit (HTF-HEPES) medyumu içerisine aktarılarak kümülüsleri uzaklaştırıldı. Embriyolar dondurulunca kadar ekilibrasyon medyumu içerisinde 37^{o}C'de inkübatörde bekletildi. Pozitif control (K^+), negatif control (K^-), Antifreeze Protein tip III (AFPIII)'ün 200, 400 ve 800 ng/ml (AFPIII200, AFPIII400, AFPIII800) ve Human Heat Shock Protein 70 (HHSP70)'in 1, 2 ve 4µg/ml (HHSP70-1, HHSP70-2, HHSP70-4) dozları kullanılarak toplamda 8 grup oluşturuldu ve katı yüzey vitrifikasyon (solid surface vitrification, SSV) solüsyonu hazırlandı. Embriyolar bu medyumlarda vitrifikasyon yöntemi ile dondurulduktan sonra, gelişim oranlarının belirlenmesi amacıyla çözdürülerek kültür medyumuna aktarıldı ve in vitro gelişim oranları 24, 48, 72 ve 96. saatlerde izlendi. Tam blastosist aşamasına gelen embriyolardan her gruptan 4'er tane alınarak iç hücre kitlesi (ICM), trofektoderm (TE) ve toplam hücre sayılarının belirlenmesi amacı ile Hoeschst 33258 ve propidium iyot (PI) boyaları ile boyandı. Elde edilen in vitro gelişim oranları, ICM, TE ve toplam hücre sayılarının istatistiksel analizleri SPSS 25.0 programı One – Way ANOVA ile yapıldı.

Embriyoların in vitro gelişimleri açısından 0 ve 24. saatlerde elde edilen oranlar açısından gruplar arasında istatistiksel bir farklılık tespit edilemezken ($p>0,05$); 48, 72 ve 96. saatlerde elde edilen oranlar açısından gruplar arasında istaistiksel farklılıkların olduğu belirlendi ($p<0,05$). İn vitro gelişim açısından 48. saatte K^+ ve AFPIII400 grupları ile AFPIII200 ve HHSP70-4 grupları; 72. saatte K^+ grubu ile K^-, AFPIII200, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 grupları, AFPIII400 grubu ile HHSP70-4 grubu; 96. saatte K^+ grubu ile K^-, AFPIII200, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 grupları, AFPIII400 grubu ile HHSP70-1 ve HHSP70-4 grupları arasında elde edilen oranlar arasındaki farklılıklar önemli ($p<0,05$) bulundu. ICM sayıları açısından K^+ grubu ve AFPIII400 grupları ile K-, AFPIII200, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 grupları, TE açısından K^+ ve AFPIII400 grubu ile K^-, AFPIII200, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 grupları, AFPIII200 grubu ile K^-, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 grupları, Toplam hücre sayıları açısından K^+ ve AFPIII400 grubu ile K^-, AFPIII200, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 grupları, AFPIII200 grubu ile K, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 grupları arasında elde edilen oranlar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulundu.

Sonuç olarak pronüklear embriyoların dondurulmasında Antifreeze protein tip III'ün 400 ng/ml kullanımının oldukça etkili olduğu tespit edildi.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

The Effect of TypeIII Antifreeze Protein and Human Heat Shock Protein 70 Added to Freezing Vitrification Mediums of Mouse Embryos on In Vitro Development Rates

Mustafa BODU

Department of Reproduction and Artificial Insemination

PhD THESIS / KONYA 2020

In the thesis study presented, the effects of Antifreeze Protein type III (AFPIII) and Human Heat Shock Protein 70 added to vitrification medium of mouse embryos on in vitro growth and cell numbers after freezing and thawing were investigated.

A total of 10 female mice were injected intraperitoneally with 10 IU hCG 48 hours after 10 IU PMSG injection for synchronization. Mice, after hCG injection, 2 females and 1 male were mated in same cage. 24 hours after mating, the condition of the vaginal plug in mice was checked and the mice with vaginal plugs were taken to the operating table. After the mice were euthanized, their cumulus was removed by transferring the embryos at the pronuclear stage into Human Tubal Fluid - 4-(2-hidroxyethyl)-1- piperazine ethanesulfonic acid (HTF-HEPES) not requiring CO_2 and containing 150 IU hyaluronidase. The embryos were kept in equilibration medium at 37ºC until they were frozen. Positive control (K^+), negative control (K^-), containing doses of Antifreeze protein type III (AFPIII) 200, 400 and 800 ng/ml (AFPIII200, AFPIII400, AFPIII800) and Human Heat Shock Protein 70 (HHSP70) 1, 2 and 4 µg/ml (HHSP70-1, HHSP70-2, HHSP70-4) a total of 8 groups was formed and solid surface vitrification (SSV) medium was prepared. Following the embryos were vitrified in these medium, they were thawed and transferred to the culture medium and in vitro development rates were followed at 24, 48, 72 and 96 hours. Four embryos at the full blastocyst stage were taken from each group and stained with Hoeschst 33258 and propidium iodine (PI) dyes in order to determine the inner cell mass (ICM), trophectoderm (TE) and total cell numbers. Statistical analyzes of obtained in vitro growth rates, ICM, TE and total cell numbers were performed with SPSS 25.0 program One-Way ANOVA.

While there was no statistical difference among the groups in terms of in vitro development of embryos at the 0 and 24th hours ($p > 0,05$), It was determined that there were significiant statistical differences between the groups in the rates obtained at 48, 72 and 96 hours ($p<0,05$). For in vitro fertilization, at the 48th hours between K^+ and AFPIII400 groups and AFPIII200 and HHSP70-4 groups; At the 72nd hours between K^+ group and K-, AFPIII200, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 and HHSP70-4 groups, between AFPIII400 group and HHSP70-4 group; at the 96th hours between K^+ group and K^-, AFPIII200, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 and HHSP70-4 groups, between AFPIII400 group and HHSP70-1 and HHSP70-4 groups ($p <0,05$). In terms of ICM numbers between K^+ and AFPIII400 groups and K^-, AFPIII200, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 and HHSP70-4 groups; in terms of TE numbers between K^+ and AFPIII400 and K^-, AFPIII200, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 and HHSP70-4 groups, between AFPIII200 group and K^-, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 and HHSP70-4 groups; in terms of total cell number between K^+ and AFPIII400 and K^-, AFPIII200, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 and HHSP70-4 groups, between AFPIII200 group and K, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 and HHSP70-4 groups were found to be statistically significant ($p <0.05$).

As a result, it was determined that the use of 400 ng / ml of Antifreeze protein type III in freezing pronuclear embryos was quite effective.

1. GİRİŞ

Zooarkeolojik verilere dayanarak, insanlar ve farelerin son buzul dönemi sonundan neolitik devrim zamanına, yine neolitik devrim zamanından bugüne kadar yani yaklaşık 12000 yıl önceden beri yakın temasta oldukları bildirilmektedir (Gabriel ve ark 2010). Kimi araştırmalar (Gabriel ve ark 2010, Guénet ve ark 2012), farelerin dünyanın birçok yerinde, özellikle Japonya ve Çin'de olmak üzere üç bin yıl öncesine kadar evcil hayvan olarak beslendiklerini göstermektedir.

En iyi bilinen fare türü ev faresidir ve Mus musculus olarak adlandırılmaktadır. Fare türleri Rodentia sınıfında yer almaktadırlar. Fareler, insanlarla yüksek derecede homoloji (homoloji: yüksek seviyede protein ve DNA dizilim benzerliğine ve özdeşliğine sahip olması) paylaştıkları için çoğunlukla deney hayvanları olarak kullanılmaktadır. En yaygın kullanılan memeli model organizmalarıdır. Fareler 2,7 milyar baz çifti ve 20 çift kromozom bulundurmaktadırlar (Spencer 2002). Farelerin bilimsel çalışmalarda kullanılmalarının en önemli nedenleri; küçük ve ucuz olmaları, hızlı bir şekilde üremeleri ve kısa sürede yeni generasyon oluşturabilmelerinden kaynaklanmaktadır.

Fareler şartlar uygun olduğu taktirde tüm yıl boyunca üreyebilmektedirler. Yani fareler poliöstrik hayvanlardır, spontan ovulasyon gösterirler ve ovulasyon östrüsün herhangi bir zamanında oluşabilmektedir. Diğer hayvan türlerine kıyasla aynı soydan gelen farelerle çiftleştiklerinde doğmasal anomalileri daha kolay tolere edebilmektedirler. Yıllar boyunca, fareler oluşan bazı mutasyonların anlaşılmasına oldukça büyük katkı sağlamışlardır. Bu mutant fareler çoğu zaman insan genetik hastalıklarının hayvan modellerini temsil ettiğinden, dünya çapında güçlü mutajen olan etil nitroso üre (ENU) adı verilen mutajenez programları geliştirilmiş ve bu konuda birçok çalışma yapılmıştır (de Angelis ve ark 2000, Nolan ve ark 2000).

Farelerde üreme olayı, bir dizi ilişkili ve bağımlı hormonal ve nöyral olaylardan oluşmaktadır. Temel olarak ön hipofiz, plasental ve gonadal hormonların etkileri ile oluşmaktadır. Folikül uyarıcı hormon (FSH), hipofiz ön lobunun gonadotrop hücreleri içinde üretilir. FSH her iki cinsiyette de gametogenezi uyarmak için gerekli bir hormondur (Snell 1941).

1.1. Dişi Farelerde Seksüel Olgunluk

Dişi farede üreme, türün yeni üyelerinin başarılı bir şekilde sayılarının çoğaltılmasını sağlamaktır. Üreme işlemi temel olarak ön hipofiz, plasental ve gonadal

hormonların etkileri ile gerçekleşmektedir. Folikül uyarıcı hormonun (FSH), hipofiz ön lobunun gonadotrop hücreleri içinde üretilmektetir. FSH, her iki cinsiyette de gametogenezi uyarmak için gerekli bir hormondur. Başka bir gonadotropin olan lüteinleştirici hormon (LH) ise gonadal hormonların salgılanmasını stimüle etme, yani dişilerde östrojen ve progesteron ve erkeklerde androjenlerin salınmasında rol almaktadır. Üçüncü bir ön hipofiz hormonu olan prolaktin, laktasyonda ve gebelik sırasında ovaryumların gelişiminde rol almaktadır. Gonadal hormonlar, sekonder cinsiyet karakterlerinin oluşması, çiftleşme davranışlarının oluşması ve yine gametogenezisin başlaması için merkezi sinir sistemine etki etmektedir. Eğer yavru erkek ise gebeliğin 6. gününden, eğer yavru dişi ise gebeliğin 12. gününden itibaren cinsiyet farklılığı anlaşılabilmektedir (Snell 1941).

Dişi fareler seksüel olgunluğa 6. haftadan itibaren uluşmakta, erkek farelerde ise bu durum dişi farelerden 1 ya da 2 hafta daha geç şekillenmekte ve dişi fareler ise 5. haftadan itibaren östrüs göstermeye başlamaktadırlar (Flurkey ve Currer 2009).

1.2. Dişi Farelerde Östrüs Siklusu

Östrüs siklusu temelde üç hücre (nötrofiller, çekirdeksiz keratinize hücreler ve çekirdekli epitelyal hücreler) tipinin hangi dönemlerde hangi oranda var olduğu ile anlaşılabilmektedir. Östrüs siklusu proöstrüs, östrüs, metöstrüs ve diöstrüs olmak üzere dört döneme ayrılmakta ve ortalama 5-6 gün sürmektedir (Goldman ve ark 2007).

Vaginal sitoloji örneklerinin değerlendirilmesinde, öncelikle nötrofillerin varlığı değerlendirilmeketedir. Farelerden elde edilen vaginal smear örneğinde nötrofiller baskın bir şekilde gözlemleniyorsa, dişi fare metöstrüs ya da diöstrüstedir. Nötrofiller nadir olarak gözlemleniyorsa, dişi fare ya proöstrüs ya da östrüstedir (Byers ve ark 2012, Cora ve ark 2015).

1.2.1. Proöstrüs

Proöstrüs, farelerde 24 saatten daha az sürmektedir (Allen 1922). Proöstrüste çoğunluk olarak düzgün görünüm ve büyüklükte küçük, yuvarlak, çekirdekli epitel hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler koyu bazofilik olarak boyanmaktadır. Çoğunlukla küme şeklinde (üzüm kümeleri), tabakalar ya da iplik şeklinde görülmektedirler. Ancak, bu kümeler, tabakalar veya iplikçikler her zaman gözlenmeyebilir. Özellikle az hücre yoğunluğuna sahip örneklerde hayvanın hangi

siklusta olduğunu öğrenmek için bu kümeler bir ön koşul olarak düşünülmemektedir. Hücreler smear boyunca tek tek olarak da görülebilmektedir. Tipik olarak, hiçbir nötrofil hücresi görülmemektedir. Diöstrüsten proöstrüse geçerken yani erken proöstrüste nadir olarak bulunabilmektedir. Nispeten az sayıda büyük epitel hücreler ve keratinize çekirdeksiz hücreler gözlemlenebilmektedir. Östrüs yaklaştıkça, keratinize çekirdeksiz hücreler daha yoğunlukta olmaktadır (Byers ve ark 2012, Cora ve ark 2015).

1.2.2. Östrüs

Östrüs süresi farelerde 12 ile 48 saat arasında değişmektedir (Allen 1922). Çoğunlukla çekirdeksiz keratinize epitel hücreleri bulunmaktadır. Hücrelere yapışmış veya arka planda serbest olarak çok sayıda bakteri görülebilmektedir. Östrüs aşaması boyunca ara sıra çekirdekli epitel hücreleri görülebilmektedir. Nötrofil bulunmamakla birlikte bazen geç östrüste görülebilir. Araştırmacılar östrüsü, birinci ve ikinci aşama ya da erken ve geç östrüs olarak ikiye ayırmaktadır. Erken östrüste proöstrüsü anımsatan kümeler halinde düzenlenmiş daha küçük çekirdekli epitel hücreleri görülebilmektedir. Geç östrüste ise çekirdeksiz epitel hücreleri genellikle daha büyük, daha eşit dağılmış ve sayıca daha yüksektir (Byers ve ark 2012).

1.2.3. Ovulasyon

Farelerde ovulasyon, çiftleşme gerçekleşsin ya da gerçekleşmesin östrüs sırasında spontan olarak gerçekleşebilmektedir. Bununla birlikte, her östrüste, özellikle henüz hiç çiftleşmemiş farelerde ovulasyon gerçekleşmeyebilir. FSH'nın artması sonucu foliküler gelişim başlamakta, daha sonra folikülerdeki granuloza hücrelerinden östrojen salınmakta, östrojenin pik yapması ile FSH-inhibin salgılanmakta ve LH seviyeleri yükselmeye başlamaktadır. Bunun sonucu olarak da ovulasyon şekillenmektedir (Snell 1941).

Folikülün epitel hücreleri oosit genişlemeye başladığında bölünmekte, öncelikle küboidal sonra sütun şeklini almaktadır. Oosit maksimum büyüklüğe ulaştığında ise antrum gelişmektedir. Farede, folikül ile oositin büyüme oranı başlarda aynı olurken, oositin 70 μm çapına gelmesi ile birlikte oosit boyutunda önemli bir artış olmamakta; folikül çapı ise hızla artarak 125 μm'den ovulasyondan hemen önce yaklaşık 550 μm'ye (LH'nin etkisi altında) kadar yükselmektedir (Snell 1941).

Ovulasyondan hemen önce oositte sentrozomlar iki sentriyole bölünmekte, asterler şekillenmekte (Aster: Hücre bölünmesi sırasında görülen ve sentriyolden dışa uzanan yıldız şeklindeki mikrotüpçük sistemi) ve iğ iplikçikleri görünmektedir (Snell 1941). Metafaz plağı şekillendikten sonra (Metafazda, sentriyollerden çıkan lifler kromozomları hücre çekirdeğinin ortasına hizalı bir şekilde sıraya sokmaktadır. Bu kromozom sırasına, "metafaz plağı" denilmektedir), anafaz I ve telofaz I'i geçiren oositte ilk mayotik bölünme tamamlanmakta ve ilk polar cisimcik zona pelusidanın altında uzanmaktadır. İkinci mayotik bölünme oosit çekirdeğinde başlamakta, ancak metafaz II evresinde kalmaktadır. Çekirdek normal olarak spermatozoon ovum sitoplazmasına girene kadar bu durumda kalmaktadır (Snell 1941).

1.2.4. Metöstrüs

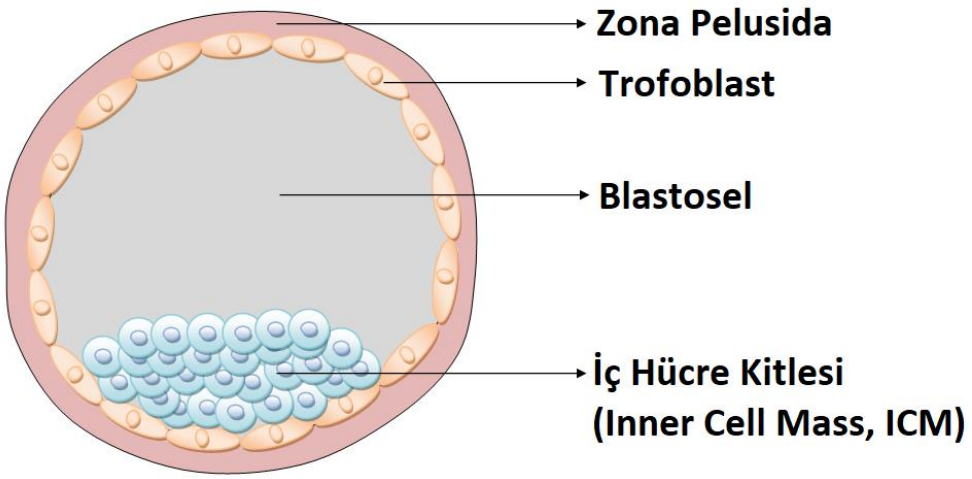
Farelerde metöstrüs 24 saate kadar sürebilmektedir. Metöstrüste, çekirdeksiz keratinize epitel hücreleri ve nötrofil infiltrasyonu ile karakterizedir. Çekirdekli epitel hücreleri metöstrüs boyunca bazen ortaya çıkabilmektedir. Erken metöstrüste, nötrofiller epitelyal hücreler arasında veya hücrelerin etrafında toplanmaktadır. Bu evrede çoğunlukla epitel hücreleri baskındır, ancak nötrofillerle eşit oranda gözlemlenebilmektedir. Metöstrüs devam ederken nötrofillerin sayısı oldukça artmaktadır. Geç metöstrüste ise nötrofil ve epitel hücre sayıları azalmaktadır. Metöstrüsün bittiği ve diöstrüsün başladığı zamanda yapılan smear örneklerinde aynı hücre tipleri bulunduğu için metöstrüs sonunu ve diöstrüs başlangıcını ayırt etmek zordur. (Goldman ve ark 2007).

1.2.5. Diöstrüs

Diöstrüs, hem farelerde hem de ratlarda ortalama 48-72 saat süren östrüs siklusunun en uzun aşamasıdır (Grasso ve ark 1998). Bu dönemde metöstrüsten diöstrüse geçerken, çekirdeksiz keratinize epitel hücrelerinin sayısında önemli bir azalma meydana gelmektedir. Az sayıda nötrofil, küçük ve büyük çekirdekli epitel hücreleri ve yine az sayıda çekirdeksiz keratinize epitel hücreleri bulunmaktadır. Nötrofil sayıları değişebilir, ancak epitelyal hücrelere göre genellikle sayıca daha fazladırlar. Erken diöstrüste bazen nötrofiller kümeler halinde görülebilmektedirler. Diöstrüste yapılan smear örneklerinde özellikle diöstrüsün 2. veya 3. gününde hücre sayısı oldukça azalmaktadır. Geç diöstrüste hücreler daha yuvarlak hale gelmekte ve kümelenebilmektedirler. Ayrıca nötrofiller halen gözlemlenebilmektedir.

1.3. Farelerde Embriyonik Gelişim

Farelerde embriyonik gelişim üzerinde uzun yıllardır araştırma yapılmaktadır. Farelerde embriyonik gelişim yaklaşık olarak 18-20 gün sürmektedir. Fertilizasyondan 3,5 gün sonra blastosist oluşmakta, implantasyon ise blastosist oluşumundan bir gün sonra meydana gelmektedir. Embriyo silindirinin (egg cylinder) oluşumu ile implantasyondan sonra gelişim hızla devam etmektedir. Yani ektoplasental koni belirmektedir. Embriyo içindeki hücrelerinin sayısında hızlı bir artış ile embriyo kütlesi artmakta ve epiblast oluşumu meydana gelmektedir. Embriyonik gelişimin 6,5'inci gününde gastrülasyonun başlaması ile morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Blastosist oluşumundan sonra embriyonun alt bölümündeki hücreler blastosele doğru bir girinti oluşturmakta ve endoderm ve ektoderm tabakası oluşturmaktadır. Dışta ektoderm ve içte endoderm tabakasından ayrılan hücreler farklılaşarak bu iki tabaka arasında mezoderm tabakasını oluşturmaktadır. Bu üçlü embriyonik germ katmanı oluşumuna gastrulasyon adı verilmekte ve bu katmanlar ile temel vücut planı oluşmaya başlamaktadır (Tam ve Behringer 1997). Kardiyovasküler sistem oluşumu ile organogenez embriyonik gelişimin 8,5'inci gününde başlamaktadır. Embriyonik gelişimin 11,5'inci gününe kadar ise birçok organın oluşumu başlamaktadır.



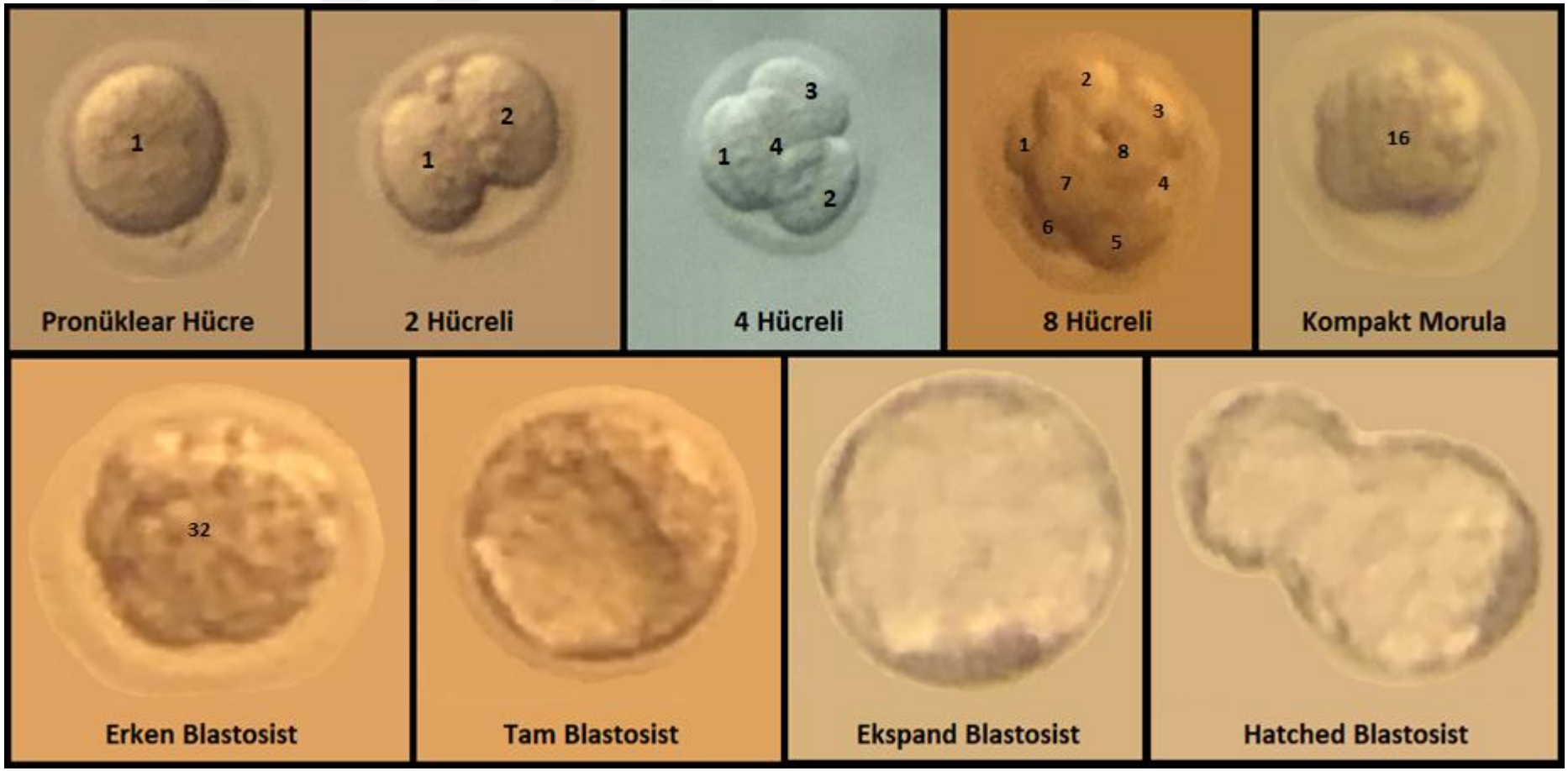
Şekil 1.1. Blastosist Aşamasındaki Embriyonun Görünümü

1.3.1. Embriyonik Gelişim Aşamaları

Farede embriyonik gelişim, fertilizasyon ile başlamaktadır. Ancak, fertilizasyon dişi farenin ovidukt kanalı içinde gerçekleştiği için, bu olayın kesin olarak zamanı tespit edilememektedir. Embriyonik yaş genellikle çiftleşmeden sonraki günler

(koitus sonrası yaş) veya embriyonik günler (E) (embriyonik yaş) olarak adlandırılmaktadır. Fertilizasyonu takiben, tek hücreli fare embriyosu, üç hücre tipi olan tetrofektoderm (TE), epiblast (EPI) ve ilkel (primitif) endoderm (PrE)'den oluşan bir blastosist oluşturmak için art arda bölünmeler gerçekleştirir. Her bölünmeden sonra embriyodaki toplam hücre sayısının iki katına çıkmaktadır. Embriyonun yaşı hem hücre sayısı hem de bölünme döngüsü ile belirlenebilmektedir (Snell 1941).

Fare embriyolarındaki ilk bölünme oviduktta meydana gelmektedir. İlk bölünme, çiftleşmeden yaklaşık 24 saat sonra meydana gelmekte ve tek hücreli bir embriyo ile aynı büyüklükte iki blastomerli bir hücre oluşmaktadır. Bölünmeler daha hızlı gerçekleşmekte ve genellikle senkronize bir şekilde ilerlemektedir. Bir embriyo bölünmeyi, başladıktan 5 dakika sonra tamamlamaktadır. İki bölünme arası süre ise yaklaşık 12 saat sürmektedir. Onaltı hücre sayısına sahip ya da hiçbir kavite göstermeyen daha fazla hücre sayısına sahip embriyo morula olarak adlandırılmaktadır. Embriyolar genellikle 16 ya da daha fazla hücreli sayıya yaklaşık 60 saat sonra ulaşmakta ve 6 ile 12 saat sonra yavaş yavaş hareket ederek oviduktan uterusa geçmektedirler (Snell 1941).



Şekil 1.2. Embriyonik Gelişim Aşamaları

1.4. Farelerde Süperovulasyon

Sınırlı sayıda dişi fareden çok sayıda follikülün ovulasyonunu eksojen olarak uyarmak için superovulasyon kullanılmaktadır. Superovulasyon, farelerin üretilmesini kolaylaştırmakta ve kullanılan hayvan sayısını da azaltmaktadır (Luo ve ark 2011).

Süperovulasyon işlemi 6 – 8 haftalık dişi farelere uygulanmaktadır. Folikül gelişimini uyarmak amacı ile FSH ya da PMSG hormonları kullanılmaktadır. Ovulasyonun sağlanması için ise lüteinleştirici hormon etkisine sahip hCG hormonu kullanılmaktadır (Hogan ve ark 1995). Uygulama sırasında ilk olarak dişi farelere bireysel olarak 10 IU PMSG hormonu intraperitoneal (IP) olarak enjekte edilmektedir. PMSG enjeksiyonunu takiben 48 saat sonra, 7,5 IU hCG yine intraperitoneal (IP) olarak uygulanmaktadır. hCG enjeksiyonunun hemen ardından çiftleşmeleri için 2 dişi 1 erkek aynı kafes içine bırakılmaktadır (Bagis ve Odaman Mercan 2004).

Wang ve ark (2018); yaptıkları araştırmada 7 - 8 haftalık Kunming ırkı dişi farelere 10 IU PMSG ve takibinde 48 saat sonra ise 10 IU hCG enjekte etmişlerdir. Araştırmacılar enjeksiyondan 24 saat sonra dişi farelerden toplamda 725 adet kaliteli ovum elde etmişlerdir.

Azizi ve ark (2020); yaptıkları araştırmada 6 haftalık NMRI outbred (Naval Medical Research Institute) ırkı dişi fareleri 10 IU PMSG ve 48 saat sonra ise 10 IU hCG enjeksiyonun ardından erkek farelerle çiftleştirmişlerdir. Vaginal plug kontrolü yapılan dişi farelerden 65 – 66. saatlerde 30 adet 8 hücreli ve 92 – 94. saatlerde 50 adet blastosist aşamasında olan toplamda 80 adet kaliteli embriyo elde edildiği araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir.

Caglar ve ark (2020); 6 haftalık B6CBAF1/J ırkı dişi farelere 10 IU PMSG ve 48 saat sonra ise 10 IU hCG enjekte etmişlerdir. Enjeksiyondan hemen sonra fareler çiftleşmeleri için 2 dişi 1 erkek olacak şekilde aynı kafese bırakmışlardır. Araştırmacılar dişi farelerden 205 adet pronüklear aşamada kaliteli embriyo elde ettiklerini ifade etmişlerdir.

1.5. Embriyoların Kriyoprezervasyonu

Embriyoların dondurularak saklanması oldukça hassas bir işlemdir ve dondurma sonrası bazı riskleri de beraberinde getirmektedir. Dondurma işlemi sırasında, embriyolar düşük sıcaklığın doğrudan etkilerinden veya buz oluşumunun neden olduğu fiziksel değişikliklerden kaynaklanan bazı hasarlara maruz kalmaktadır.

Kriyoprezervasyon işlemi, hücre yapısına ve fonksiyonuna zarar verebilmektedir. Özellikle mitoz bölünmenin metafaz aşamasında oluşan iğ iplikçikleri yani mitotik iğcik soğuk şokuna karşı oldukça duyarlıdır. Kriyoprezervasyon işleminin neden olduğu hasarın boyutu, hücrelerin şekli ve boyutu, membran yapısı ve geçirgenliği gibi çeşitli faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Tüm bu faktörler türe bağlı olarak farklılık arz etmektedir (Vladimirov ve ark 2018).

Buz kristali oluşumu hücreler için oldukça zararlıdır. Meydana gelen bu hasar, sadece kristal şeklinde buz oluşumundan değil, aynı zamanda hücre içinden hücre dışına suyun çıkışı esnasında ortaya çıkan yüksek çözünen madde konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır (Mazur 1996). Kriyoprotektanlar (KPA) ise, hücrenin dondurulması sırasında meydana gelen soğuk şokuna, intraselüler olarak oluşabilecek buz kristali oluşumuna ve membranda gelişebilecek destabilizasyona karşı koruyucu amaçla kullanılmaktadırlar.

1.5.2. Embriyo Kriyoprezervasyon Yöntemleri

Konvansiyonel (yavaş) (slow freezing), one-step, stepwise ve ultra hızlı (ultrarapid) olmak üzere temelde 5 adet dondurma yöntemi bulunmaktadır.

Konvansiyonel (Yavaş) Dondurma (Slow Freezing) Yöntemi

Konvansiyonel yavaş dondurma (slow freezing), yavaş soğutma hızı ve düşük konsantrasyonda KPA kullanımına dayanan bir kriyoprezervasyon yöntemidir. Bu yöntemde hücreler veya dokular daha az toksisiteye maruz kalmakta ancak buz oluşumunun önüne geçilememektedir. Konvansiyonel yavaş dondurma yöntemi, hücre ya da dokuların hücre membranından geçebilen (permeabl) düşük konsantrasyonda (1 – 1,5 M) bir kriyoprotektan ve sükroz (0,1 M) içeren bir sulandırıcı içerisinde ekilibre edilmesinden oluşan bir yöntemdir. Hücre ya da dokunun bulunduğu ortama kriyoprotektan ajanların eklenmesi sonrası, ilk olarak hücrede dehidrasyon meydana gelmektedir. Ortama kriyoprotektanların eklenmesi ile birlikte ekstraselüler ortamdaki su kriyoprotektanlar ile bağ kurmaktadır. Bu açıdan hücre dışı ortamda bulunan serbest su miktarı hücre içi ortamdaki serbest su miktarına oranla daha düşük ozmotik basınca sahiptir. Bu nedenle önce ozmotik dengenin sağlanması için intraselüler ortamdan ekstraselüler ortama su çıkışı olmaktadır. Ekstraselüler ortama çıkan su ortamdaki kriyoprotektanlara bağlanarak kriyoprotektan-su komplekslerini oluştururmaktadırlar. İntraselüler ortamda oluşan dehidrasyon sonrası serbest su kalmadığı için extraselüler

ortamdaki kriyoprotektan-su kompleksleri ozmotik dengenin sağlanması bakımından tekrardan hücre içerisine girmektedir. Bu sayede son durumda intraselüler ve ekstraselüler ortamdaki ozmotik denge sağlanmış olmaktadır (Öztürk ve ark 2019). Hücre ya da dokular payet ya da kriyotüplere alındıktan sonra bunların kademeli olarak soğutulmasına izin veren kontrollü hızlı dondurma makinesi yardımıyla sıcaklık yavaşça düşürülmekte ve son olarak dondurulmuş hücre ya da dokuların uzun süre saklanması için sıvı azot içine atılmakta ve bu hücreler kullanılıncaya kadar sıvı azot içerisinde saklanmaktadır. Yavaş soğutmadaki amaç hücre içi buz oluşumu meydana gelmeden önce hücrelerin ya da dokuların su kaybetmesini sağlamaktır. Bununla birlikte, optimum soğutma hızı, hücreler ve doku tipleri arasında değişkenlik gösterebilmektedir (Fuller ve Paynter 2007).



Şekil 1.3. Konvansiyonel (Yavaş) Dondurma (SlowFreezing) Yöntemine Uygun Payet Şeklinin Gösterilmesi

Yavaş dondurmadaki önemli noktalardan biri de buz kristali oluşumunun kontrolünü sağlamaktır. Embriyolar payet ya da kriyotüplere alındıktan sonra erime noktasından daha düşük bir dereceye kadar (-5^{o}C ile -7^{o}C arasına) soğutulmaktadır. Bu sıcaklıklarda, aşırı soğutma nedeniyle solüsyonlar donmadan kalmaktadır. Bu olaya supercooling adı verilmektedir. Supercooling, bir çözeltinin sıcaklığının ekstraselüler buz oluşumu olmadan donma noktasının altına düşürülmesidir. Buz kristalinin kontrollü bir şekilde oluşturulmasıyla dondurma işlemi çeşitli soğutma hızlarında devam etmektedir. Payet ya da kriyotüplerin sıcaklıklarının -30^{o}C ile -80^{o}C arasına ulaşmasının ardından sıvı azot içerisine alınmaktadır (Vladimirov ve ark 2018).

Khunmanee ve ark (2020); vitrifikasyon ve slow freezing yöntemlerinin embriyo dondurma başarısı üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında, Dorper melezi koyunların (n=44) senkronizasyonu ve laparoskopik olarak tohumlanması sonrası 2. gününde 8 -16 hücreli embriyoları, 5,5 – 6. günlerinde morula ya da blastosist aşamasındaki embriyoları toplamış ve her grupta 36 adet 8 – 16 hücreli ve morula/blastosist olacak şekilde 4'e bölmüştür. Slow freezing ve vitrifikasyon yöntemleri ile bu hücreleri dondurmuştur. Çözdürme sonrası slow freezing gruplarında

%91,67 oranında canlı 2 – 8 hücreli, %97,22 oranında canlı morula/blastosist; vitrifikasyon gruplarında ise %94,44 oranında canlı 2 – 8 hücreli, %100 oranında canlı morula/blastosist elde etmişlerdir.

Meikle ve ark (2018); 8 – 12 haftalık yaşta B6D2 ırkı farelere süperovulasyon sonrası çiftleştirmişlerdir. Çiftleşmeden 2,5 gün sonra 8 – 16 hücreli embriyoları elde etmişlerdir. Bu hücrelerin slow freezing ve vitrifikasyon yöntemi ile dondurulması sonrası in vitro gelişim oranlarını izlemişlerdir. Çözdürme sonrası slow freezing grubunda %89,3 canlılık oranı, canlı embriyolardan %87,3 blastosist oranı elde ederlerken; vitrifikasyon grubunda %92,7 canlılık oranı ve canlı embriyolardan %91,6 blastosist oranı elde etmişlerdir.

One-Step Dondurma Yöntemi

Konvansiyonel (yavaş) dondurma yönteminden farklı olarak bu yöntemde embriyolar tek tek ve az miktarda kriyoprotektan ile payetlere çekilmektedir. Payet içerisinde ayrıca hava kabarcıkları ile ayrılmış sükroz çözeltisi bulunmaktadır. Embriyoların çözdürülmesi sonrası payet sallanarak sükroz çözeltisi ile karışması ve bu şekilde kriyoprotektanın seyreltilmesi sağlanmaktadır. Embriyolar çözdürüldükten sonra mikroskop altında değerlendirilme yapılmadan direkt olarak nakledilmektedir (Leibo 1984).



Şekil 1.4. One-Step (Tek Adım) Yöntemine Uygun Payet Şeklinin Gösterilmesi

Ware ve Boland (1987); one-step yöntemi ile koyun embriyolarının dondurulmasında kullanılması gereken optimal sükroz (0; 0,25; 1,0 ve 1,25M) ve gliserol (1; 1,4; 2,0 ve 2,8M) oranlarını araştırdıkları çalışmalarında en uygun gliserol oranını 1,4 ve 2,0M; en uygun sükroz oranını ise 1,0M olarak belirlemişlerdir.

Stepwise Dondurma Yöntemi

Stepwise Dondurma Yönteminde soğutma iki aşamada gerçekleştirilmektedir. Embriyolar 70x8 mm tüp ya da payetlere çekildikten sonra derin dondurucuda 8 dakika bekletilerek -7^{o}C'ye soğutulmakta, daha sonra dondurma cihazına alınmakta ve burada

30 dakika bekletilerek -30°C'ye kadar soğutulmakta ve sonrasında direkt olarak azot sıvısına (-196°C) atılmaktadır (Wood ve Farrant 1980).



Şekil 1.5. Stepwise Dondurma Yöntemine Uygun Payet Şeklinin Gösterilmesi

Cocero ve ark (1988), stepwise yöntemi ile koyun embriyolarını etilen glikol ve gliserol kullanarak dondurdukları araştırmalarında dondurma çözdürme sonrası (çözdürdükten 24 saat sonra) gliserol grubunda %23,63; etilen glikol grubunda %62,5 oranında canlılık oranı tespit ettiklerini ifade etmişlerdir.

Vitrifikasyon Yöntemi

Vitrifikasyon yöntemi, embriyoların dondurulması için yavaş dondurma yöntemine alternatif bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Vitrifikasyon, hem intraselüler hem de ekstraselüler buz kristallerinin oluşumunu önlediği için yavaş donmadan daha farklıdır (Rall ve Fahy 1985). Vitrifikasyon yöntemi, programlanabilir dondurma cihazları gibi pahalı ekipman gerektirmediği ve konvansiyonel yöntem ile karşılaştırıldığında zaman kaybı olmadığı için uygulanabilirliği daha kolaydır. Araştırmacılar vitrifikasyonu, bir çözeltinin düşük sıcaklıklarda buz kristali oluşumu ile değil, soğutma sırasında viskozitede artış ile katılaştırılması olarak tanımlamaktadırlar (Fahy ve ark 1984, Fahy 1986).

Embriyoların ilk başarılı vitrifikasyonu, 1985 yılında Rall ve Fahy (1985) tarafından gerçekleştirilmiştir. Araştırmacılar DMSO, PEG ve asetamid kullanılarak fare embriyolarının başarılı bir şekilde vitrifikasyonunu sağlamışlardır. Embriyoların vitrifikasyonu amacıyla internal kriyoprotektanlar (EG, PG, G, DMSO, asetamid) ve eksternal kriyoprotektanlar (sükroz, trehaloz) kullanılmaktadır. Yapılan birçok araştırmayla, farklı internal kriyoprotektanların kullanılması ve kullanılan kriyoprotektanların kombine etkisi ile (Ali ve Shelton 1993) vitrifikasyon işlemi başarılı bir şekilde uygulanmakta, dondurulan embriyoların çözdürülmesi sonrası blastosist aşamasına kadar embriyo gelişebilmekte ve embriyoların transferi sonrası canlı bireyler elde edilebilmektedir (Hsieh ve ark 1999, Yokota ve ark 2000).

Embriyonun dondurulması amacıyla kullanılan vitrifikasyon yöntemi birkaç adımdan oluşmaktadır. İlk olarak, embriyolar yüksek konsantrasyonlarda KPA'lara

maruz bırakılmakta, daha sonra payetlere ya da kriyotüplere transfer edilmekte ve son olarak hızla dondurularak saklanmaktadır. Embriyo dondurmada kullanılan solüsyonun vitrifikasyonunu sağlamak için hem soğutma oranı artırılmalı hem de kullanılan kriyoprotektan konsantrasyonlarında bir artış şekillenmelidir. Gerçekte bu iki faktör ters orantılıdır. Çünkü soğutma oranı ne kadar yüksek olursa, gerekli kriyoprotektan konsantrasyonu da o kadar düşük olmaktadır. Vitrifikasyon sırasında yüksek konsantrasyonda KPA kullanılmakta ve bu durum hücrelere zarar verebilmektedir. Bu sebeple çeşitli kriyoprotektanların kombinasyonu yapılarak toksisiteyi azaltmak amaçlanmaktadır (Vladimirov ve ark 2018).

Vitrifikasyon teknikleri "açık" ve "kapalı" yöntemler olarak ikiye ayrılmaktadır. Açık yöntemlerde embriyolar doğrudan azot sıvısına maruz kalmaktadır ve bu durumda soğutma hızı artmaktadır. Ancak açık yöntemlerde sıvı azotta depolama sırasında embriyoların kontaminasyon riski fazladır. Kapalı yöntemler ise embriyoları tüm kontaminasyonlardan korumaktadır. Öte yandan, soğutma oranı açık yöntemlere göre daha düşüktür. Vitrifikasyonda açık ve kapalı yöntem kullanımının çözdürme sonrası hangi yöntemin blastosist oranını daha çok artırdığına yönelik çok az çalışma mevcuttur. Bu sistemlerle alakalı karşılaştırma Kuwayama ve ark (2005) ve Panagiotidis ve ark (2013) tarafından yapılmış ve iki yöntem arasında istatistiksel bir fark tespit edilmemiştir.

Vitrifikasyon yönteminde bulunan Open Pulled Straw (OPS) tekniği, ultra hızlı dondurma yöntemine benzer olarak yüksek oranda kriyoprotektan kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Ultra hızlı dondurma yönteminden farklı olarak payetler ısıtılıp çekilerek daha küçük çapta olması sağlanmaktadır. 1 – 2 µl'lik vitrifikasyon damlası içinde bulunan oosit ya da embriyolar payet içine çekilerek payetin ağzı kapatılmadan direkt olarak sıvı nitrojen içine atılmaktadır (Vajta ve ark 1998).

Cryotop tekniğinde ise özel payetler kullanılmaktadır. Bu teknikte bir payet ve bir de payet kapağı bulunmaktadır. Payetin ucunda çok ince ve 3 cm uzunluğunda laminant film bulunmaktadır. Vitrifikasyon medyumundan alınan oosit ya da embriyolar laminant filmin ucuna konulmakta ve payetin bu kısmı direkt olarak sıvı nitrojen içerisine daldırılmaktadır. Sıvı nitojen içerisinde payet kapağı kapatılarak uzun süre saklanabilmektedir (Kuwayama 2007).

Katı yüzey vitrifikasyon (Solid Surface Vitrification, SSV), önceden soğutulmuş metal blok üzerine embriyo, oosit ya da ovumları içeren dondurma solüsyonunun bilek hareketi ile küçük bir damlacık şeklinde doğrudan temas etmesi

ile gerçekleştirilen bir tekniktir. Donmuş damlacıklar daha sonra kriyotüplere aktarılarak azot sıvısında (-196) saklanabilmektedir (Dinnyés ve ark 2000).

Azizi ve ark (2020); yaptıkları araştırmada 6 haftalık NMRI ırkı dişi farelerin süperovulasyonu ve erkek farelerle çiftleştirilmesi sonrası 65 – 66. saatlerde 30 adet 8 hücreli ve 92 – 94. saatlerde 50 adet blastosist aşamasında olmak üzere toplamda 80 adet kaliteli embriyo elde etmişler ve embriyoları vitrifikasyon yöntemi ile dodnurmuşlardır. Vitrifikasyon sonrası çözdürülen 8 hücreli embriyolardan %93, blastosistlerden ise %89 oranında canlı emriyo elde etmişlerdir.

Movahed ve ark (2019); yaptıkları araştırmada bir grup 6 – 8 haftalık NMRI ırkı dişi farelerin süperovulasyonu ve erkek farelerle çiftleştirilmesinden 24 saat sonra iki hücreli embriyoları elde etmişler ve vitrifikasyön yöntemi ile dondurmuşlardır. Diğer bir grubun süperovulasyonunu sağladıktan sonra sekonder oositleri toplamışlar ve in vitro fertilizasyon (IVF) yapıp dondurmadan gelişim durumlarını gözlemlemişlerdir. Çözdürme sonrası vitrifikasyon grubunda %96,23; IVF grubunda ise %100 oranında canlılık tespit etmişlerdir. İki grubun da 120 saat kültüre edilmesinden sonra vitrifikasyon grubunda %39,48; IVF grubunda ise %65,98 oranında hatched blastosist elde etmişlerdir.

Amidi ve ark (2018); yaptıkları araştırmada 8 – 10 haftalık NMRI ırkı farelerin süperovulasyonu sonrası elde ettikleri ovumları %10 DMSO + %10 EG (VS1) ve %14,5 DMSO + %14,5 PROH (VS2) içeren vitrifikasyon solüsyonlarında hem Open Pulled Straw (OPS) hem de Cryotop yöntemi ile dondurmuşlar ve çözdürme sonrası in vitro fertilizasyon oranlarını karşılaştırmışlardır. OPS tekniği ile dondurulması sonrası VS1 grubunda %85,5, VS2 grubunda %83,6 canlılık oranı; VS1 grubunda %29,2, VS2 grubunda ise %19,7 fertilizasyon oranı belirlemişlerdir. Cryotop tekniği ile dondurulması sonrası VS1 grubunda %91,2, VS2 grubunda %89,2 canlılık oranı; VS1 grubunda %39, VS2 grubunda ise %34 fertilizasyon oranı belirlemişlerdir.

Ultrarapid (Ultra hızlı) Dondurma Yöntemi

Ultrarapid (Ultrahızlı) dondurma yöntemi, yüksek konsantrasyonda kriyoprotektan kullanımı ve bu kriyoprotektanların 0,25 M sükroz ile kombinasyonu sonrasında oosit ya da erken dönemdeki embriyoların (pronüklear ya da 2 hücreli) dondurulması esasına dayanmaktadır. Bu amaçla kriyoprotektan olarak dimetilsülfoksit (DMSO) ya da propanediol (PROH) kullanılmaktadır. Oosit ya da erken dönemdeki embriyoların toplanması ve dondurma medyumunda 2 ya da 3

dakika bekletilmesi sonrasında 0,25'lik payetlere çekilmekte ve payetlerin, polivinil alkol tozu veya hemotokrit kriyozal kullanılarak kapatılmasıyla direkt olarak azot sıvısı (-196) içerisine atılmaktadır (Wilson ve Quinn 1989).

Trounson ve ark (1987); ultra hızlı dondurma yöntemi ile iki hücreli fare embriyolarını 2>; 2 - 2,5; 3 - 3,5; 4 - 4,5 ve 6 dakika DMSO (2M) ile ekilibrasyona tabii tuttukları ve dondurdukları çalışmalarında, çözdürme sonrası sırasıyla %48, %81, %50,%48 ve %48 canlılık oranı; %46, %30, %23, %5 ve %0 in vitro gelişim oranı elde ettiklerini belirtmişlerdir.

1.7. Antifreeze Protein Tip III

Antifreeze proteinler (AFP'ler), sıfırın altındaki ortamlarda hayatta kalmayı sağlayan balık, bitki veya böcek gibi çeşitli organizmalar tarafından sentezlenen polipeptit bileşiklerdir (Jinyao ve ark 2005). İlk olarak DeVries ve Wohlschlag (1969) tarafından denizin donmuş yerlerinde yaşayan balıkların kan plazmasında ortaya konmuştur. Plazmanın ozmotik basıncını değiştirmeden kanın donma noktasını denizin donma noktasından daha aşağıya çeken bu polipeptit bileşik, antifreeze protein olarak adlandırılmıştır (Crevel ve ark 2002). AFP'ler sadece balıklardan değil, aynı zamanda bitki ve böceklerden de identifiye edilmiştir (Crevel ve ark 2002, Jinyao ve ark 2005, Hassas-Roudsari ve Goff 2012). AFP'ler Termal Histerezis (TH) özelliğine sahiptirler. Bu özellik, balıkların sıfırın altındaki sularda, kanlarının donma noktasını aşağıya çekerek düşük sıcaklıklarda hayatta kalmasına izin vermektedir. Ayrıca intraselüler sıvılarda buz kristali oluşmasını engelleyerek ve hücre membranını soğuk şoku hasarından koruyarak etki göstermektedirler (Harding ve ark 2003). AFP'ler sadece donma sıcaklığını düşürmekle kalmazlar. Aynı zamanda rekristalizasyonu önler ve dondurma-çözülme sırasında rekristalizayon ile ilişkili büyük buz kristali oluşumunu da önleme yeteneğine sahiptirler (Üstün ve Turhan 2015).

Kristalizasyon iki ana adımdan oluşmaktadır. Bunlardan birincisi, kararlı bir kristal çekirdeğin oluşumu olan nükleasyon; ikincisi ise çekirdeğin büyümesiyle buz kristallerinin yayılmasıdır. Nükleasyon genellikle yabancı bir molekülün etrafında meydana gelmektedir (heterojen nükleasyon). Ya da mutlak su varlığında moleküllerin kendiliğinden nükleasyon oluşturduğu (homojen nükleasyon) bir işlemle meydana gelmektedir. Rekristalizasyon, sıcaklığın sıfırın altındaki bir aralıkta dalgalanmasıyla daha küçük buz kristallerinin daha büyük buz kristallerine dönüşmesiyle meydana

gelmektedir. Bu durum ise hücre ve dokulara küçük buz kristallerinden daha fazla zarar vermektedir (Hassas-Roudsari ve Goff 2012).

AFP'lerin özellikleri arasında, erime sıcaklığını değiştirmeden donma sıcaklığınının düşürülmesi (termal histerezis), buz kristali büyümesinin engellenmesi (rekristalizasyon) ve hücresel bütünlüğün arttırılması gibi özellikler bulunmaktadır (Kontogiorgos ve ark 2007). İlk iki özellik AFP'nin su ve buz arasındaki etkileşimleri ile ilişkili olsa da, diğer özellikler donma noktasının biraz üzerindeki sıcaklıklarda (soğutma işleminde) meydana gelmektedir (Boonsupthip ve Lee 2003). Böceklerde termal histerezis aktivitesi oranları (2 - 5^{o}C, bazı türlerlerde 8 - 9^{o}C) bitkilerden (0,2 – 0,5^{o}C) ve balıklardan (0,7 – 1,5^{o}C) daha yüksek olarak belirlenmiştir (Jinyao ve ark 2005).

Tip III AFP, hem Kuzey yılan balığı hem de Antartik yılan balığı ve kurt balıklarından identifiye edilmiştir (Davies ve Hew 1990). Moleküler ağırlığı 6.5 ile 14 kDa arasında değişen globüler yapıda bir polipeptittir (Yeh ve Feeney 1996, Crevel ve ark 2002). Tip III AFP'ler, esas olarak büyük loplarla birbirine bağlanan β2 sarmallarından oluşmaktadır. Tip III AFP'ler, sekans benzerliklerine ve affinitelerine göre sülfopropil (SP) ve kuaterner aminoetil (QAE) olmak üzere göre iki gruba ayrılmaktadır. QAE'ler ayrıca QAE1 ve QAE2 alt gruplarına ayrılmaktadırlar. Bazı çalışmalara göre, QAE1 izoformlarının QAE2 ve SP izoformlarına göre daha yüksek TH aktiviteleri bulunmaktadır. SP ve QAE2 izoformlarının buz oluşumunu durduramadığı bildirilmektedir (DeLuca ve ark 1996, Baardsnes ve Davies 2002). Tip III AFP HPLC12, QAE1 alt grubuna aittir ve globüler β sandviç yapısı göstermekte olup, bu yapı iki adet antiparalel üç sarmallı β tabakası içermektedir. Tip III AFP'ler esas olarak birkaç loptan oluşmasına rağmen, hidrofobik etkileşimler ve yapının merkezindeki bir dizi hidrojen bağı yoluyla kararlı yapılar oluşturmaktadırlar (Chao ve ark 1994, Jia ve ark 1996, Sönnichsen ve ark 1996). Tip III AFP'lerin geniş pH aralığında (2-11) bile aktif olduğu bildirilmekte ve normalde protein denatürasyonuna neden olacak yüksek pH'da bile stabil olduğunu göstermektedir (Chao ve ark 1994). Tip III Antifreeze protein'in yapısında bulunan Treonin18 (Thr18) ile buz kristali etkileşimi meydana gelmektedir. Thr18'in, buzun birincil prizma düzlemlerinin tanınması ve etkileşiminden sorumlu olduğu düşünülmektedir. AFP'ler suya erişilebilen buz yüzeylerini kaplamakta ve böylelikle buz oluşumunu engellemektedir. Tip III Antifreeze protein'in yapısında bulunan Glutamin9 (Gln9), Asparajin14 (Asn14), Treonin15 (Thr15), Alanin16 (Ala16), Treonin18 (Thr18) ve Glutamin44

(Gln44) buz bağlanma bölgeleri olup TH aktivitesini ve buz kristali morfolojisini önemli ölçüde değiştirebilmektedir (Chao ve ark 1994, Jia ve ark 1996, DeLuca ve ark 1998). Buz bağlama bölgelerindeki hidrofobik etkileşimler de proteinin antifriz aktivitesi için önemli olduğu bildirilmektedir (Chen ve Jia 1999, Graether ve ark 1999).

Nishijima ve ark (2014); yaptıkları araştırmada 6 – 26 ay arası yaşta Japon Beyazı ırkı tavşanlara 150 IU gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG) ve 72 saat sonra suni tohumlamayı takiben ovulasyonu uyarmak amacıyla 5 IU insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulamışlardır. Uygulamadan 68 saat sonra morula aşamasındaki embriyoları elde etmişlerdir. Elde ettikleri embriyoları, kontrol grubu (K) dahil olmak üzere AFPIII'ün 100 (AFPIII100), 500 (AFPIII500) ve 1000 (AFPIII1000) ng/ml dozları ile Open Pulled Straw (OPS) tekniği ile dondurmuşlardır. Araştırmacılar çözdürme sonrası K, AFPIII100, AFPIII500 ve AFPIII1000 gruplarında sırasıyla %68,2; %60,7; %80,7 ve %42,4 in vitro gelişim oranları elde etmişlerdir.

Jo ve ark (2011); 6 haftalık BDF-1 farelere 5 IU PMSG enjeksiyonunun ardından 48 saat sonra 5 IU hCG enjeksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra oviduktlardan metafaz II aşamasındaki ovumları elde etmişlerdir. Daha sonra bu ovumları ikiye bölerek AFPIII (500 ng/ml) ihtiva eden ve etmeyen vitrifikasyon medyumlarında dondurmuşlardır. Çözdürme sonrası kontrol grubunda %84,5; AFPIII grubunda ise %94,6 oranında canlı ovum elde etmişlerdir. Canlı ovumların in vitro fertilizasyonu sonrasında kontrol grubunda %68,9; AFPIII grubunda ise %89,1 blastosist oranı elde etmişlerdir.

1.8. Human Heat Shock Protein 70

Isı şoku proteinleri (Heat Shock Protein'ler, HSP'ler) hem prokaryotik hem de ökaryotik hücrelerde bulunmaktadır. Yapıları yüksek oranda korunmaktadır. Bu da temel hücresel süreçlerde rol oynadıklarını göstermektedir. HSP'ler, ısı şokuna maruz kalan hücrelerde indüklenmektedir. HSP sentezini sadece ısı şoku indüklememektedir (Kiang ve Tsokos 1998). Hücrelerin amino asit analoglarına (Kelley ve Schlesinger 1978, Li ve Laszlo 1985), glikoz analoglarına (Pouysségur ve ark 1977), ağır metallere (Levinson ve ark 1980), protein kinaz C (PKC) uyarıcılarına ve Ca^{+2} arttırıcı maddelere (Ding ve ark 1996), iskemi, sodyum arsenit (Johnston ve ark 1980),

mikrobiyal enfeksiyonlar, nitrik oksit, hormonlar ve antibiyotiklere maruz bırakılması da HSP'lerin ekspresyonunu indükleyebilmektedir.

HSP'ler sitosol, mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdekte bulunmaktadır. Uzun bir yarılanma ömrüne sahiptirler (insan epidermoid hücrelerinde 48 saat). HSP'lerin koruma aktivitesi onların moleküler şaperonlar olarak fonksiyon görmesinden kaynaklanmaktadır. Bu şaperonların uygun olmayan protein birikmesini önlemek, olgunlaşmamış proteinlerin paketleme işlemi için hedef organellere taşınmasına aracılık etmek, degradasyon (bir bileşiğin kendisini oluşturan daha basit parçalara ayrılması) veya onarım gibi görevleri bulunmaktadır (Kiang ve Tsokos 1998).

Isı Şoku Proteini 70 kDa (Heat Shock Protein 70, HSP70), ökaryotik hücreler arasında %60-70; ökaryotik HSP70 ve Escherichia coli DnaK (bakteriyel HSP70) arasında ise %40-60 baz benzerliği bulunmaktadır (Bardwell ve Craig 1984, Craig ve Schlesinger 1985, Lindquist 1986). Hsp70 proteinlerinin üç ana fonksiyonel alanı bulunmaktadır. N – terminal ATPaz bölgesi 44 kDa ağırlığında (aminoasit sırası 1 – 386 arası) olup Adenozin trifosfoat (ATP)'ye bağlanmakta ve ATP'yi Adenozin difosfata (ADP) hidrolize etmektedir. N – Terminal bölgesi, aralarında derin bir yarık bulunan 2 lobdan oluşmaktadır (Mayer 2010). Substrat bağlanma bölgesi (aminoasit sırası 384-543 arası) ise 25 kDa'lık β-tabakası ve 10 kDa'lık α-heliks alt alanlarından oluşmaktadır (Zhu ve ark 1996). C – terminal bölgesi ise (aminoasit sırası 542–646 arası) 10 kDa ağırlığında ve alfa helix yapı bakımından zengin olup substrat bağlanma alanı bakımından bir kapak görevi görmektedir. C – terminal bölgesinde beş adet heliks yani sarmal yapı bulunmakta olup bu yapılardan bir tanesi dış taraftaki loplardan birine tuz köprüleri ve hidrojen bağları kurarak bir kapak oluşturmaktadır. Diğer üç sarmal yapının ise bu kapağın stabilizasyonunu sağlamak adına hidrofobik bir çekirdek oluşturduğu bildirilmektedir (Mayer 2010, Arakawa ve ark 2011).

Hsp70 proteinleri, hücreleri termal veya oksidatif stresten koruyabildiği bildirilmektedir (Ikwegbue ve ark 2018). Stres faktörleri normal olarak proteinlere zarar vererek protein birikimine sebep olabilmektedir. Hsp70, strese maruz kalan hidrofobik aminoasit sıralarına geçici olarak bağlanarak, kısmen denatüre olan bu proteinlerin birikmesini önlemektedir. Fare embriyolarında HSP70 ve HSP60 antikorlarının kullanıldığı bir araştırmada apoptotik trofektoderm ve apoptotik iç hücre kitlesinin arttığı ve bu sebeple bu proteinlerin apoptozisin modülasyonunda rol aldıkları bildirilmiştir (Esfandiari ve ark 2007). Apoptozis sırasında, sitokrom – C,

apoptotik proteaz aktive edici faktör – 1 (Apaf – 1) ve dATP/ATP (Deoksiadenozintrifosfat/Adenozintrifosfat) ile bağlanarak apoptozom kompleksini oluşturmaktadır. Daha sonra bu kompleks prokaspaz – 9'u kaspaz – 9'a dönüştürerek aktive etmekte ve kaspaz – 9 ise kaspaz – 3'ün aktivasyonunu sağlayarak apoptozise sebep olmaktadır. HSP70'in ise bu kompleksin prokaspaz – 9'u kaspaz – 9'a dönüşümünü engelleyerek bu süreci inhibe ettiği bildirilmektedir (Beere ve ark 2000) Ayrıca, HSP'lerin, ROS'un hücresel etkilerini inhibe etmek veya nötralize etmek için antioksidan sistemle birlikte rol oynadığı araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Trott ve ark 2008, Ikwegbue ve ark 2018).

Alvarez-Rodríguez ve ark (2013); Cantabria ırkı boz ayılarından elektroejekülatör ile elde ettikleri spermayı 4'e bölerek HSPA8'in 0; 0,5; 1 ve 5 µg/ml dozlarını kullanarak dondurmuşlardır. Dondurma çözdürme sonrası motilite oranlarını kontrol grubunda %55, 0,5 µg/ml HSPA8 kullandıkları grupta %53, 1 µg/ml HSPA8 kullandıkları grupta %50 ve 5 µg/ml HSPA8 kullandıkları grupta %52 olarak elde etmişlerdir.

Holt ve ark (2015); boğa spermalarında HSPA8'in 0; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 ve 12,8 µg/ml dozlarını kullanarak dondurmuşlar ve tüm gruplarda plazma membran bütünlüğünü araştırmışlardır. Dondurma çözdürme sonrası kontrol; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 ve 12,8 µg/ml HSPA8 kullandıkları gruplarda sırasıyla %45,5; %44,5; %45,5; %43,5; %43; %45; %46 ve %45,5 plazma membran bütünlüğü elde etmişlerdir.

Sunulan tez çalışmasındaki amaç, sperma çalışmalarındaki amaca benzer olarak embriyoların dondurma solüsyonuna HHSP70 eklenmesi ile antiapoptotik özelliğinden faydalanarak çözdürme sonrası in vitro gelişim oranını artırmak olmuştur.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. GEREÇ

Sunulan tez çalışmasında, fertiliteleri ispatlanmış 6-8 haftalık CB6 ırkı 20 adet dişi ve 16 haftalık CB6 ırkı 10 adet erkek fare kullanıldı. Tüm hayvanların günlük bakımları bireysel havalandırmalı hepafiltreli kafeslerde (IVC) yapıldı ve sağlık kontrolleri veteriner hekim tarafından gerçekleştirildi. Kafes sistemlerinin bulunduğu odalarda, ışıklandırma 330 lüks ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık döngüsü olacak şeklinde ayarlandı. Oda içi iklimlendirme koşulları, sıcaklık 20-24ºC ve nisbi nem %45-65 olacak şekilde düzenlendi.

Sunulan tez çalışması için ayrıca, Koç Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KU-HADYEK)'ndan, 2020.HADYEK.015 numaralı etik kurul onayı alındı. Bu tez araştırmasında kullanılan deney hayvanları, Koç Üniversitesi, Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi (KUTTAM), Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edildi ve embriyo deneyleri Embriyo Manipulasyon Laboratuvarında gerçekleştirildi.

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar

No	Kimyasal/Solüsyon İsmi	Ürün Kodu	Firma İsmi
1	Antifreeze Protein III		A/F Protein Inc. 935 Main Street, Waltham, MA 02451, USA
2	Bovine Serum Albumine	A4378	Sigma Aldrich
3	Chorulon		MSD
4	Etilen Glikol (EG)	E9129	Sigma Aldrich
5	Folligon	Item No: 85155	MSD
6	GLOBAL HEPES	HGTH-050	Life Global Group
7	Hoechst	H3570	Thermofisher
8	HTF Medium	MR-70-D	Merck Millipore
9	Human Heat Shock Protein 70	H7283	Sigma Aldrich
10	Mineral Yağ	M8410	Sigma Aldrich
11	Penisilin-Streptomisin	P4333	Sigma Aldrich

12	Propilen Glikol (PG)	P1009	Sigma Aldrich
13	Polivinilpirrolidon (PVP)	P0930	Sigma Aldrich
14	Trehalose	T0167	Sigma Aldrich

2.2.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzeme ve Cihazlar

No	Kimyasal/Solüsyon İsmi	Ürün Kodu	Firma İsmi
1	Ağız Pipeti	P1049-1PAK	Sigma Aldrich
2	Buzdolabı	Derin Dondurucu	Arçelik
3	Cam Serolojik Pipet Uçları	Stripette Pipets	Corning
4	Cerrahi Set	Mouse Surgical Kit	Kent Scientific
5	Dikey Akışlı Güvenlik Kabini	0000045372	Alpina
6	Distile Su Cihazı	Milli Q İntegral 5	Millipor
7	Dondurucu (-80)	Ultra TempetureFreezer Premium U570	New Brunscwich Scientific
8	Filtre Steril (0,22 µm)	27415069	Corning
9	Floresan Ataçmanlı İnverted Mikroskop		Carl Zeiss
10	Güç Kaynağı		Nikon
11	Hassas Terazi	M-power	Sartorius
12	Hayvan Kafes Sistemi	Ecoflow	IVC
13	Invert Mikroskop	SZM 745	Nikon
14	Isıtıcı Tabla		Linkam
15	İnkübatör	Galaxy 14S	New Brunswick Scientific
16	Laboratuvar tipi kar buz makinası	AF80	Scotsman
17	Manyetik Karıştırıcı	BPX000613180	Benchmark
18	Otomatik Pipetler	10µl – 20 µl – 200 µl - 1000 µl	Axygen
19	Motopet	12627305	Axygen
20	Lam, Lamel	5501083	Thermo

21	Otoklav	OT-100V	Nüve
22	Payet		IMV
23	Payet Kapağı		IMV
24	Petri (35 mm, 60mm)	353001-4	Falcon
25	Petri (merkez petri, 4 kuyulu petri)	30004	Oosafe
26	pH Metre	Starter 3000	Ohaus
27	Santrifüj tüpü (2ml, 15ml, 50ml)	SCT-ml-25S	Axygen
28	Santrifüj tüpü (2ml, 15ml, 50ml)	SCT-ml-25S	Axygen
29	Sıvı azot tankı ve ikmal tankı	M4493	MV
30	Vorteks	BW100	Benchmark

2.2.3. Çalışmada Kullanılan Medyumların Hazırlanması

Yıkama Medyumlarının Hazırlanması

Tüm medyumların hazırlanmasında Hepafiltreli çalışma kabini kullanıldı. Çalışma kabini kullanımdan hemen önce sterilize edildi. Embriyoların in vitro manipülasyonları için GLOBAL W/HEPES ticari medyum kullanıldı. Bu medyumun özelliği manipülasyonlarda CO_2'ye gereksinim duyulmamasıdır. GLOBAL W/HEPES'e ilave olarak 3 mg/ml BSA (A4378) eklendi. BSA'nın çözünmesinden sonra, 0,22 µm'lik filtreden geçirildi. Medyum, 37 ºC ısıtma tablasında 10 dk bekletilerek hazırlandı.

Kültür Medyumlarının Hazırlanması

Kültür medyumu olarak Global® Total® LP kullanıldı. Kültür medyumunun kullanıma hazır hale gelmesi için hazırlıklara embriyo elde edilmesinden 12-16 saat öncesi başlandı. Buzdolabında bulunan embriyo kültür medyumuna protein desteği olarak 4 mg/ml BSA (SIGMA A4378) eklendikten sonra 0,22 µm'lik filtreden geçirildi. Filtreden geçirildikten sonra embriyo kültür medyumundan otomatik pipet yardımı ile 35 mm'lik embriyo kültür petrisi yüzeyine 10 µl'lik damlalar halinde dağıtıldı.

Ekilibrasyon Medyumunun Hazırlanması

Ekilibrasyon medyumunun hazırlanması amacı ile 0,2 ml EG (Sigma EG E-9129) + 4,8 ml HTF-HEPES + 20 mg BSA karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan solüsyon filtreden geçirildikten sonra 200 µl'lik otomatik pipet yardımı ile 100µl'lik damlalar halinde 60 mm'lik petri (Falcon 353004) içine aktarıldı ve dondurma işlemine kadar 37 ºC'lik ısıtıcı tablada bekletildi

Deney Gruplarının Oluşturulması

1. Pozitif Kontrol Grubu: Pronüklear aşamadaki embriyolar hiç dondurulmadan sadece kültür medyumunda hatched blastosist aşamasına kadar bekletildi.
2. Negatif Kontrol Grubu: Pronüklear aşamadaki embriyolar, SSV medyumuna hiçbir protein katılmadan dondurulup çözdürüldükten sonra kültür medyumunda hatched blastosist aşamasına kadar kültüre edildi.

- SSV medyumunun hazırlanması amacıyla 0,875 ml EG + 0,3785 gr Trehalose (Sigma-T0167) + 125 mg PVP (Sigma P0930) + 10 mg BSA, 1,625 ml HTF-HEPES içerisine eklenerek hazırlandı, filtrelendi ve kullanıma hazır hale getirildi.

3. Antifreeze Protein III – 200 Grubu: Pronüklear aşamadaki embriyolar, SSV medyumuna 15µl Antifreeze Protein III (200 ng/ml) eklenerek dondurulduu ve çözdürme sonrası hatched blastosist aşamasına kadar kültüre edildi.
4. Antifreeze Protein III – 400 Grubu: Pronüklear embriyolar SSV medyumuna 30µl Antifreeze Protein III (400 ng/ml) eklenerek dondurulduu ve çözdürme sonrası hatched blastosist aşamasına kadar kültüre edildi.
5. Antifreeze Protein III – 800 Grubu: Pronüklear aşamadaki embriyolar, SSV medyumuna 60 µl Antifreeze Protein III (800 ng/ml) eklenerek dondurulduu ve çözdürme sonrası hatched blastosist aşamasına kadar kültüre edildi.
6. Human Heat Shock Protein 70 – 1 Grubu: Pronüklear aşamadaki embriyolar, SSV medyumuna 25 µl Human Heat Shock Protein 70 (1 µg/ml) eklenerek dondurulduu ve çözdürme sonrası hatched blastosist aşamasına kadar kültüre edildi.
7. Human Heat Shock Protein 70 – 2 Grubu: Pronüklear aşamadaki embriyolar, SSV medyumuna 50 µl Human Heat Shock Protein 70 (2 µg/ml) eklenerek dondurulduu ve çözdürme sonrası hatched blastosist aşamasına kadar kültüre edildi.

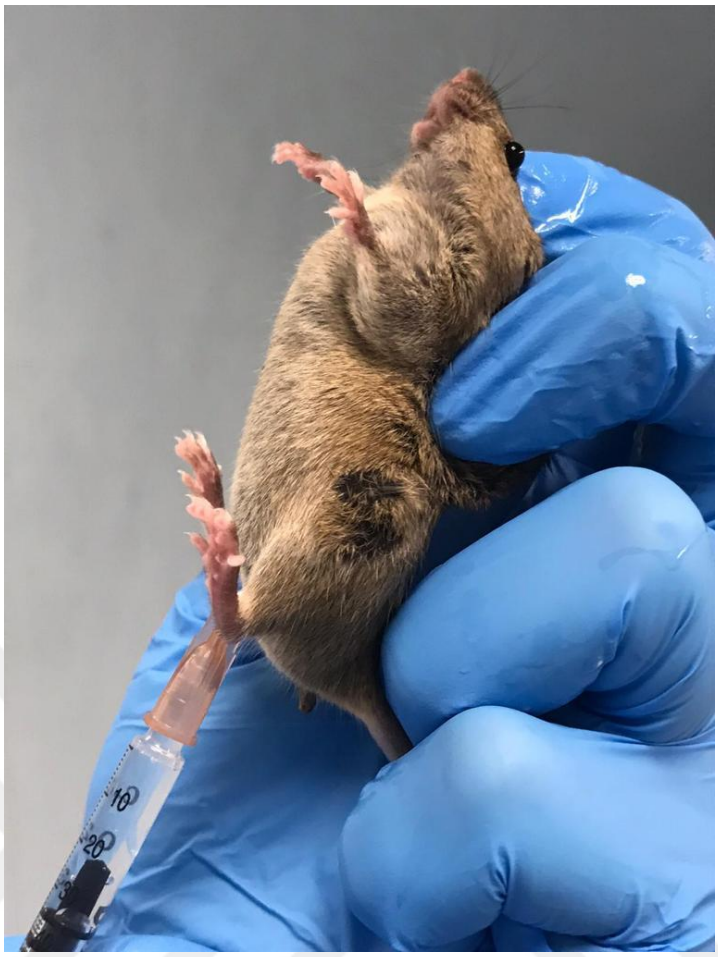
8. Human Heat Shock Protein 70 – 4 Grubu: Pronüklear aşamadaki embriyolar, SSV medyumuna 100 µl Human Heat Shock Protein 70 (4 µg/ml) eklenerek donduruldu ve çözdürme sonrası hatched blastosist aşamasına kadar kültüre edildi.

Çözdürme Solüsyonunun Hazırlanması

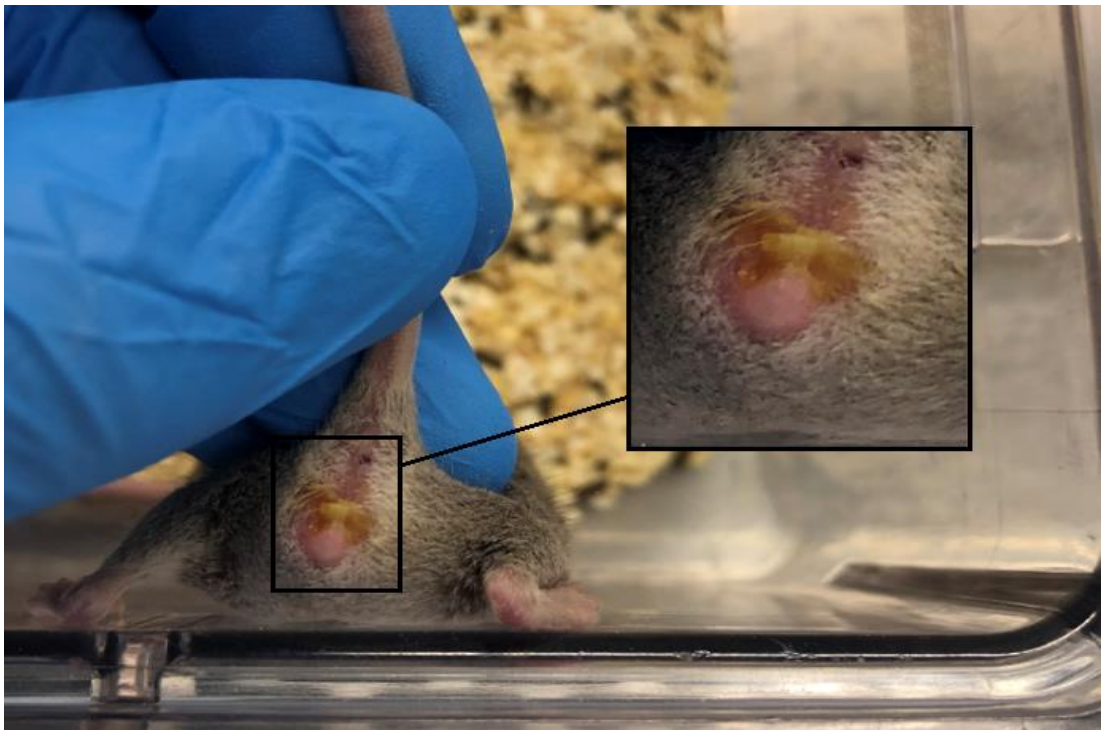
Çözdürme solüsyonunun hazırlanması amacıyla 5 ml HTF-HEPES içerisine 0,5675 gr Trehalose ve 20 mg BSA eklendi ve filtrelendi.

2.2.4. Dişi Farelerin Süperovulasyonu

Dişi farelere senkronizasyon amacıyla uygulama günü saat 13.00'da PMSG (Folligon) 10 IU intraperitoneal olarak uygulandı (Şekil 2.1). Uygulamadan 48 saat sonra yine saat 13.00'da ovulasyonu sağlamak amacı ile10 IU hCG (chorulon) intraperitoneal olarak uygulandı. Çiftleştirme amacı ile 16 haftalık erkek fareler kullanıldı ve 2 dişi 1 erkek aynı kafese bırakıldı. Çiftleştirme başlangıcından 22-24 saat sonra vaginal plug kontrolleri yapıldı (Şekil 2.2). Vaginal plug gözlemlenen dişi fareler operasyon salonuna alındı.



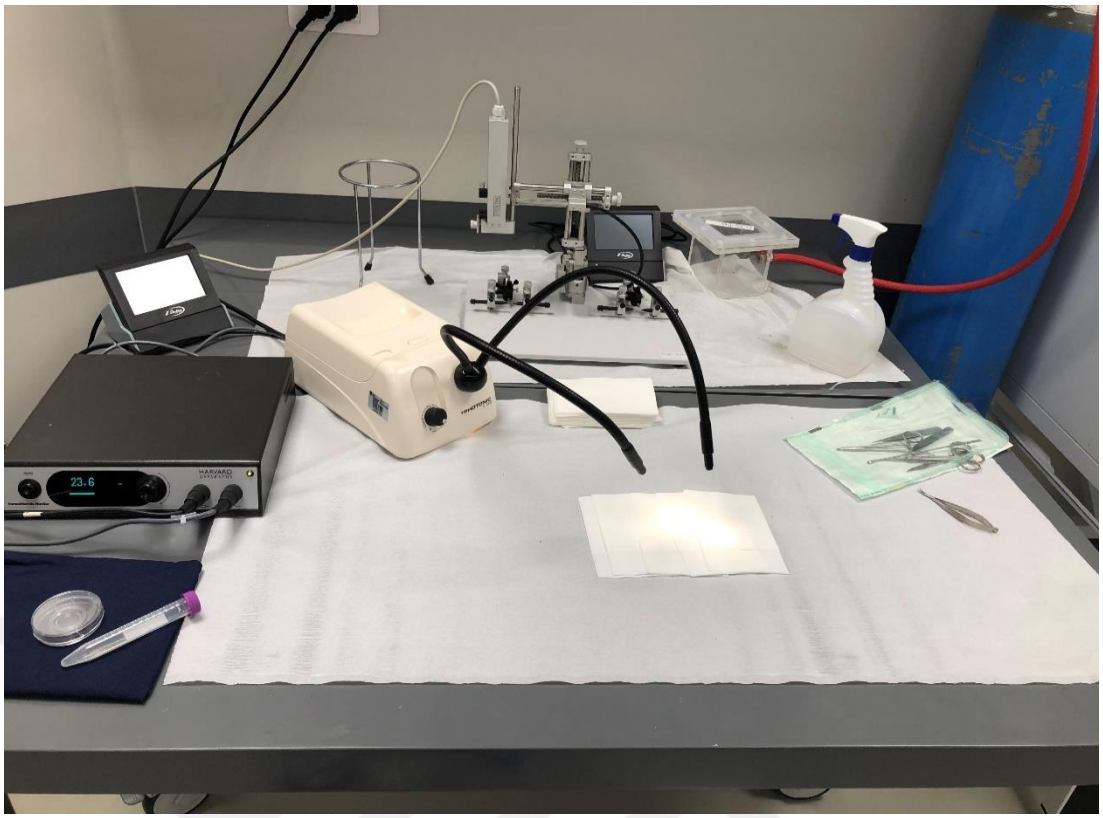
Şekil 2. 1. Dişi Farelerin Süperovulasyonu Amacıyla İntraperitoneal Uygulama



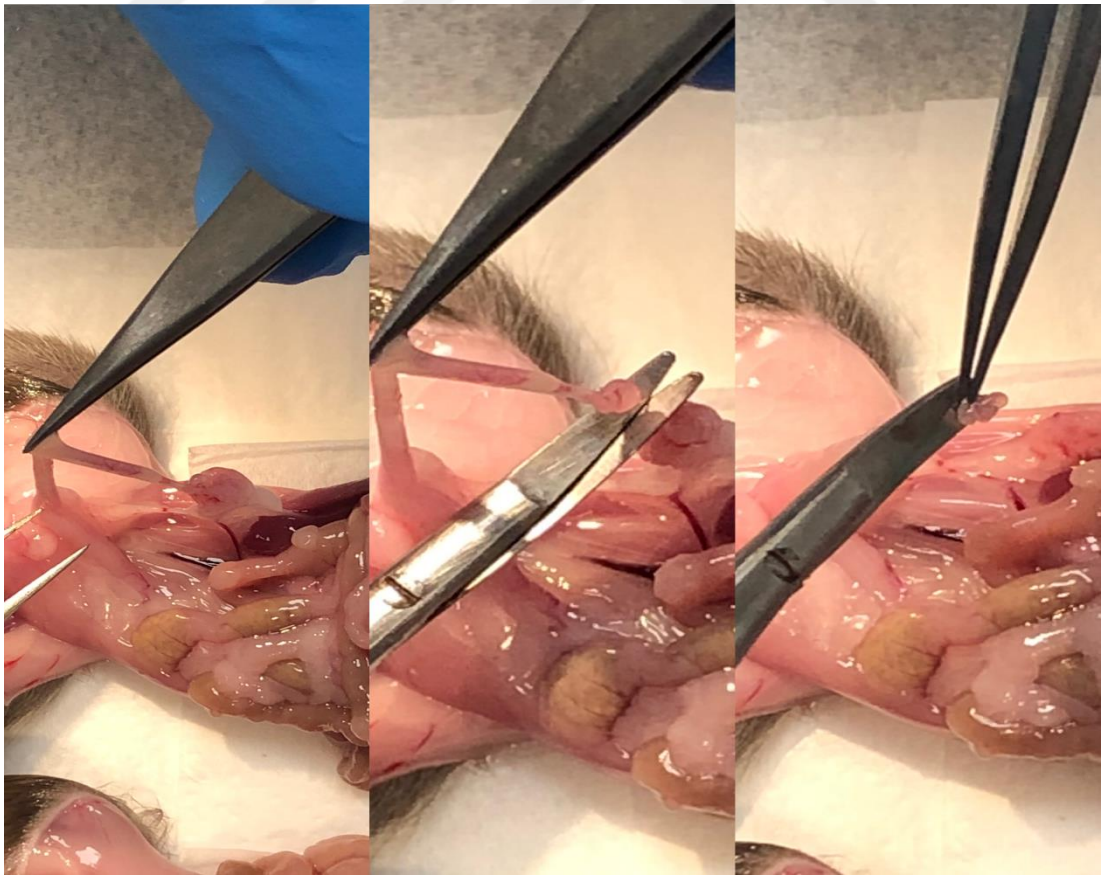
Şekil 2. 2. Dişi Farede Vaginal Plug Görünümü

2.2.5. Dişi Farelerden Embriyo Eldesi

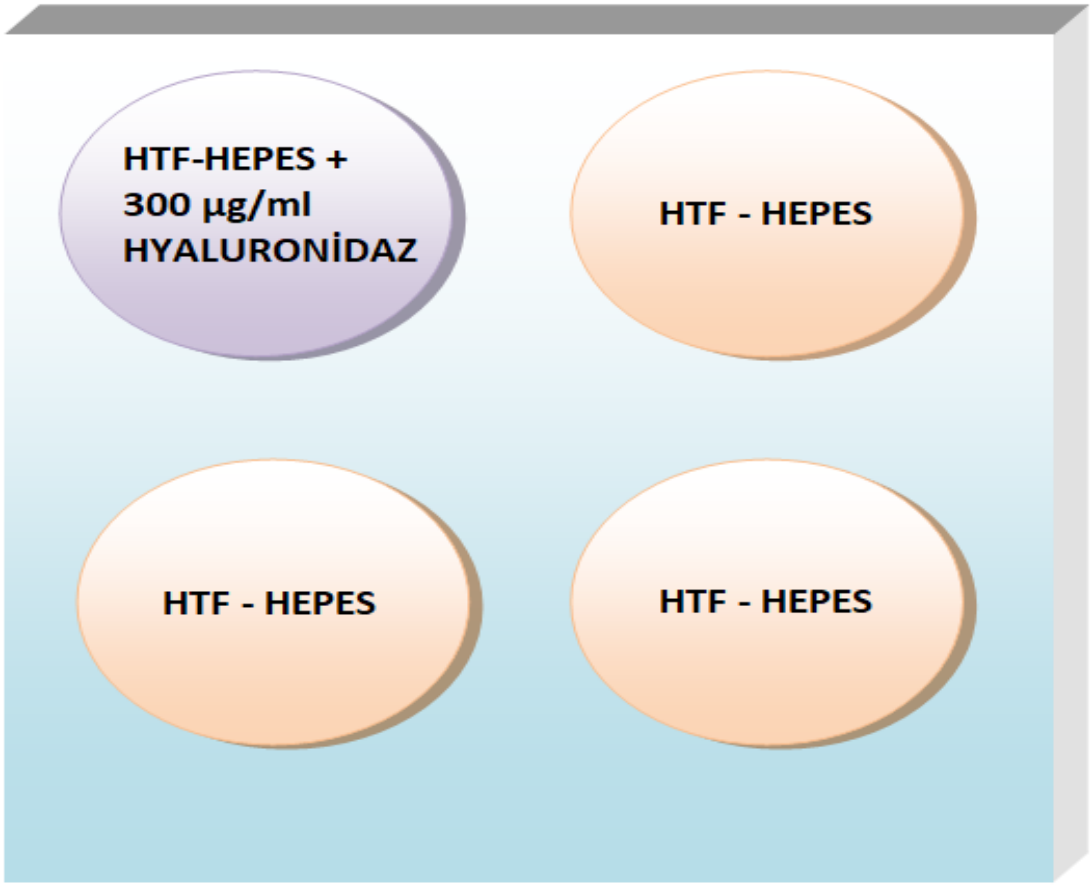
Dişi fareler operasyon masasına alınarak (Şekil 2.3) servikal dislokasyon ile ötenazileri sağlandı. Ötenazi edilen farelerin abdomenleri alkol ile steril edilerek orta hat boyunca sivri uçlu makas ile ensize edildi. Ensizyondan sonra organ ve dokular uzaklaştırıldı ve ovaryuma ulaşıldı. Ovaryum üzerinde yağ dokular uzaklaştırılarak oviduklar dikkatlice toplandı (Şekil 2.4). HTF-HEPES içine 4 mg/ml BSA takviye edilerek oviduktlar bu solüsyon içinde yıkandı. Dört (4) kuyucuklu petrinin bir kuyusu içine HTF-HEPES'ten koyuldu ve içerisine 300 µg/ml hyalüronidaz ilave edildi. Diğer 3 kuyusuna pronüklear embriyoların yıkanması amacıyla sadece HTF-HEPES'ten koyuldu (Şekil 2.5). HTF-HEPES-hyaluronidaz solüsyonu içine alınan oviduktların ampulla bölgesine (Şekil 2.6) streril dişli pens yardımı ile bir kesik atıldı. Ampullaya atılan kesikten dışarı çıkan pronuklear aşamadaki kümülüslü embriyolar bu solüsyon içinde 3 dakika bekletildi. Hemen ardından 3 farklı kuyuda yıkandı. Son kuyuda embriyoların en iyi kalitede olanları seçildi. Başka bir 4 kuyucuklu petriye kültür medyumu eklendi. HTF-HEPES medyumu içerisinde elde edilen embriyolar, kültür medyumuna transfer edildi ve pipetler her defasında değiştirildi. Daha sonra embriyolar 3 farklı kuyucuk içerisinde yıkandı ve yine cam pipet her defasında değiştirildi. Toplamda 308 adet kaliteli pronüklear embriyo elde edildi. Tek hücreli embriyolar kültür medyumu (Global® Total® LP) içerisinde %95 nem ve 37 ºC ve % 5 CO_2'li inkübatörde vitrifikasyon aşamasına kadar kültüre edildi.



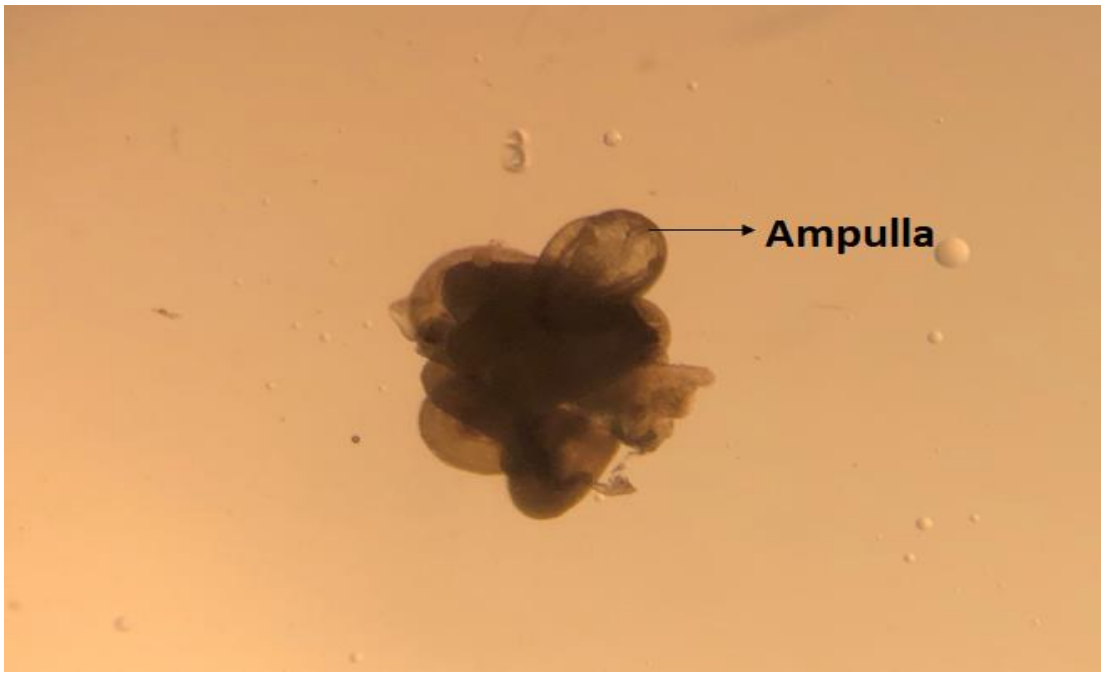
Şekil 2. 3. Operasyon Masasının Hazırlanması



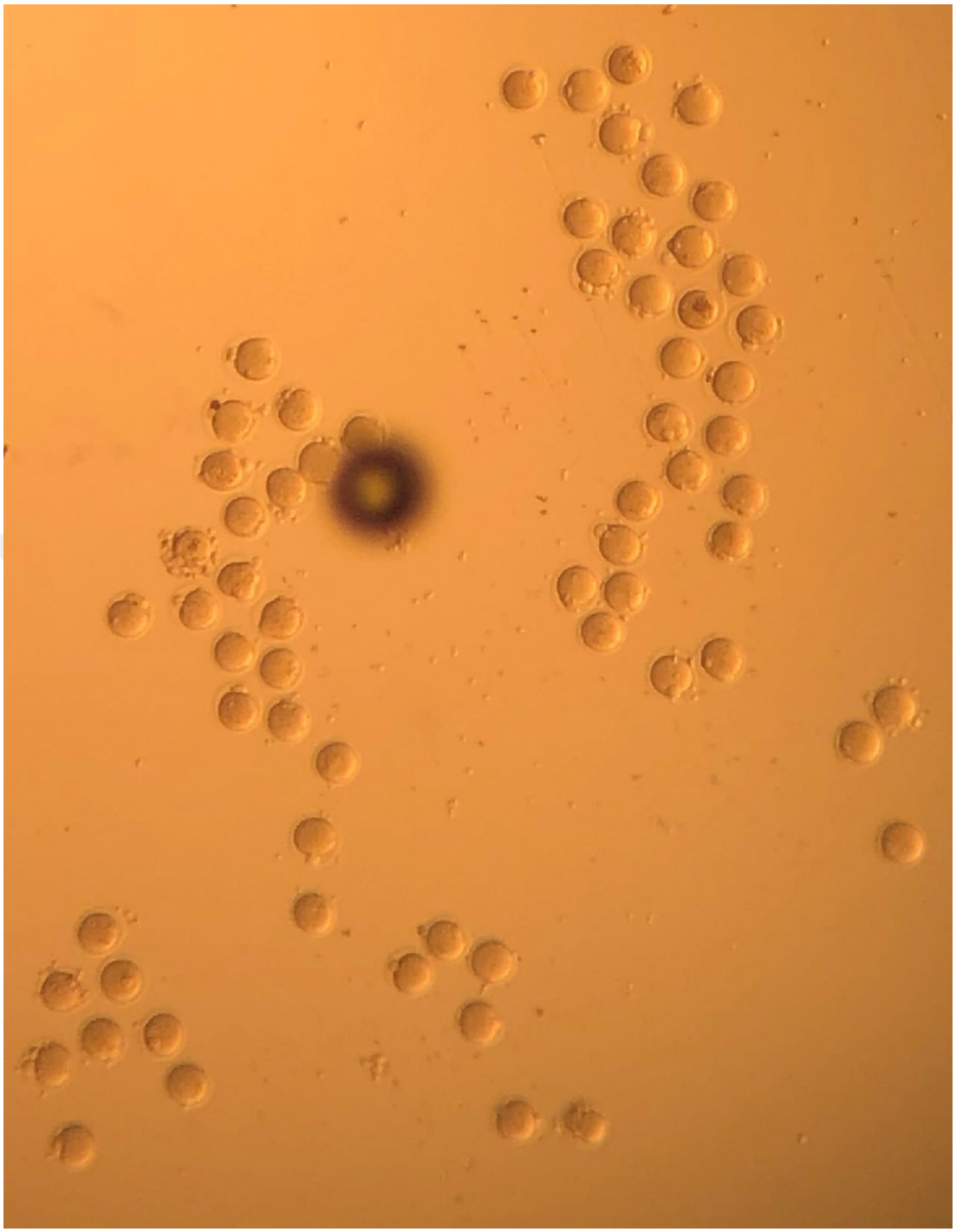
Şekil 2. 4. Ovaryum'lardan Ovidukt'ların Ayrılması İşlemi



Şekil 2. 5. Dört Kuyucuklu Petrinin Kümülüs Hücrelerinin Temizlenmesi Amacıyla Hazırlanması



Şekil 2. 6. Ovidukt'ta Ampullanın Görünümü



Şekil 2. 7. Ampullalardan elde edilen pronüklear embriyolar.

2.2.6. Embriyoların SSV Yöntemi ile Dondurulması

Embriyolar 100 µl'lik ekilibrasyon damlasına transfer edilerek burada 12-14 dk kadar bekletildi. Daha sonra dondurma damlalarına alınarak 3 kez yıkandı ve deneme gruplarının bulunduğu son dondurma damlası cam pipet ile çekildi. Daha sonra yukarıdan bir damla şekilde sıvı azot içerisindeki yüzeyi düz bir şekilde alüminyum folyo ile kaplanmış tepsiye damla halinde bırakıldı. Donmuş damlalar pens

yardımıyla alınarak kriyotüp içerisine bırakıldı ve kriyotüp hemen sıvı azot içerisine daldırıldı. Deney 4 kez tekrar edildi.



Şekil 2. 8. Embriyoların Katı Yüzey Vitrifikasyon Yöntemi ile Dondurulması

2.2.7. Embriyoların Çözdürülmesi ve Kültüre Edilmesi

Embriyoların dondurulması sonrası aynı gün çözdürme solüsyonu içinde çözdürüldü. Bunun için kriyotüp içinden alınan embriyolar çözdürme solüsyonu içerisine alınarak burada 3 dakika kadar bekletildi ve sonrasında 3 adet HTF kuyusunda yıkandı. Daha sonra embriyo kültür medyumunda en az 3 kez yıkanarak kültüre edildi.

2.2.8. İn Vitro Kültür Oranlarının Değerlendirilmesi

Çözdürme sonrası kültür medyumlarına transfer edilen pronüklear aşamadaki tüm embriyolar 96 saat kültüre edildi ve in vitro gelişim oranları her grupta 24, 48, 72 ve 96. saatlerde değerlendirildi.

2.2.9. Diferansiyel Boyama ile Hücre Sayılarının Belirlenmesi

Tam blastosit aşamasındaki embriyoların kalite değerlendirmesi maksadıyla diferansiyel boyama yapılarak trofektoderm ve iç hücre kitlesi hücre sayıları hesaplandı.

Embriyoların Propidyum İyot (PI) Boyası ile Boyanması

PI boyasından 25 mg tartıldı ve 10 mL'ye PBS/PVP ile tamamlandı. Sonuçta 2,5 mg/ml stok elde edildi. Ticari olarak satın alınan Triton-100x'ten 10 µL alındı ve 10 ml PBS/PVP ile karıştırıldı. Yani %0,1'lik TritonX hazırlandı (Triton X çok yapışkan olduğu için 37^{o}C'de bu işlemler yapılmalı, aksi taktirde Triton X otomatik pipet ucunu tıkar). Daha sonra son konsantrasyon 100 µg/ml olacak şekilde PBS/PVP-TritonX ile dilüe edildi. Bu boyadan 2 µl alınarak 998 µl HTF medyumunun içine aktarıldı. 4-well plate içerisine 500 µl'lik hazırlanan PI boyasından aktarıldı. Embriyolar PI drobu içine aktarıldı ve 10 – 15 sn burada bekletilerek boyandı.

Embriyoların Hoeschst 33258 Boyası ile Boyanması

Hoeschst 33258 boyasından 40 µL alındı ve 780 µL %100'lük etanol içine aktarılarak Hoeschst 33258 boyası oluşturuldu ve 500 µL bu boyadan 4 – well petrisinin bir kuyucuğu içerisine konuldu. Bu petrinin diğer kalan 3 kuyucuğuna 1 ml % 100'lük etanolden konuldu ve içlerine peçete konuldu. Buradaki amaç hoeschst boyasında bulunan alkolün uçmasını engellemektir. Embriyoların boyanması için PI boyaması sonrası Hoeschst 33258 drobu içine aktarıldı, petrinin tamamı streç film ve alüminyum folyo ile kaplanarak 24 saat +4^{o}C'de bekletildi. Daha sonra bu boyadan alınan embriyolar hazırlanan preparatlara aktarıldı. Bu işlemlerin hepsi karanlık ortamda yapıldı.

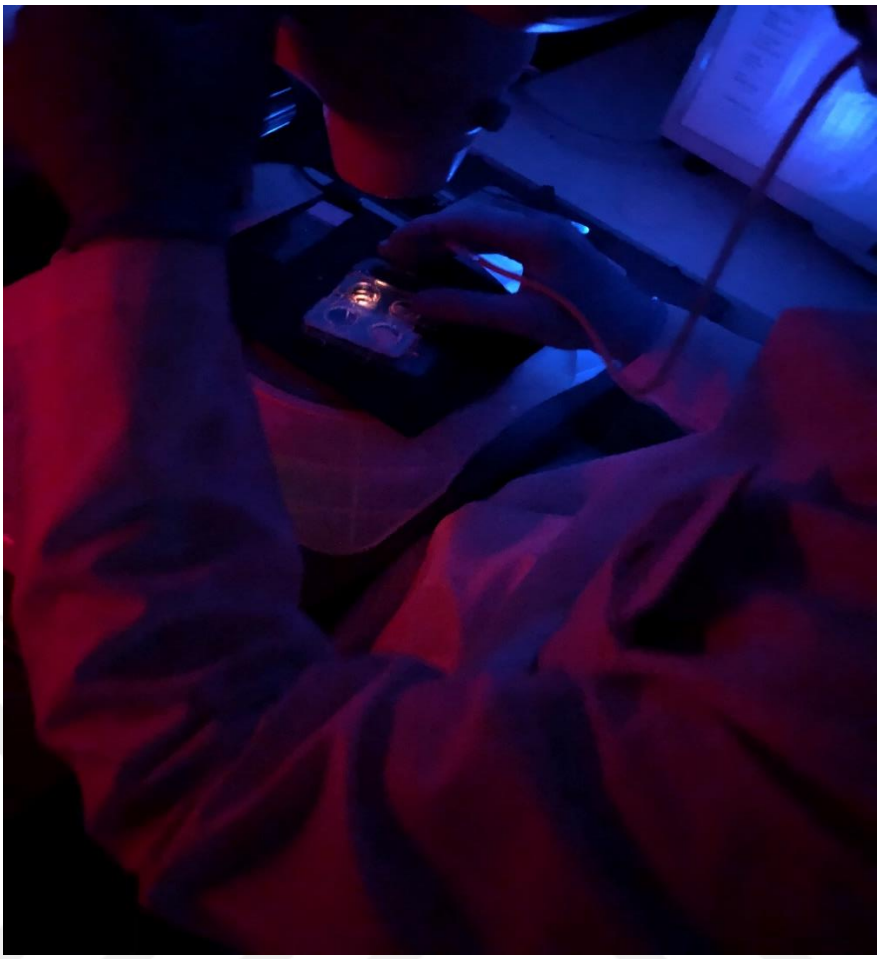
Embriyo Boyamalarının Görüntülenmesi

Embriyo boyamalarının görüntülenmesi amacı ile ilk olarak daire şekilli lameller parçalanarak küçük parçalar haline getirildi. Küçük lamel parçaları ortasında bir boşluk oluşturacak şekilde yerleştirildi ve şeffaf oje ile lam üzerine sabitlendi. Bu

şekilde yükseltilmiş preparatlar hazırlandı (Şekil 2.7). Daha sonra 20 µL gliserol bu lam üzerine damlatıldıktan sonra çok az miktar sıvı ile droplardan alınan embriyolar gliserolün üzerine aktarıldı (Şekil 2.8). Üzerine lamel kapatıldı, etrafı oje ile kapatıldı ve kalan boşluklar gliserol ile tamamlandı. Tüm işlemler karanlık ortamda yapıldı. Hazırlanan preparatlar kırmızı ve mavi floresan ataçmanlı konfokal mikroskobunda görüntelenerek, trofektoderm (TE) ve iç hücre sayıları (ICM) hesaplandı. Boyanan blastosistlerin iç hücre kitle hücreleri kırmızı renk, trofektoderm hücreleri mavi renk olarak gözlendi.



Şekil 2. 9. Hücre Sayılarının Belirlenmesi Amacıyla Preparatların Hazırlanması



Şekil 2. 10. Boyanan Embriyoların 4-Well Petrilerinden Alınması.

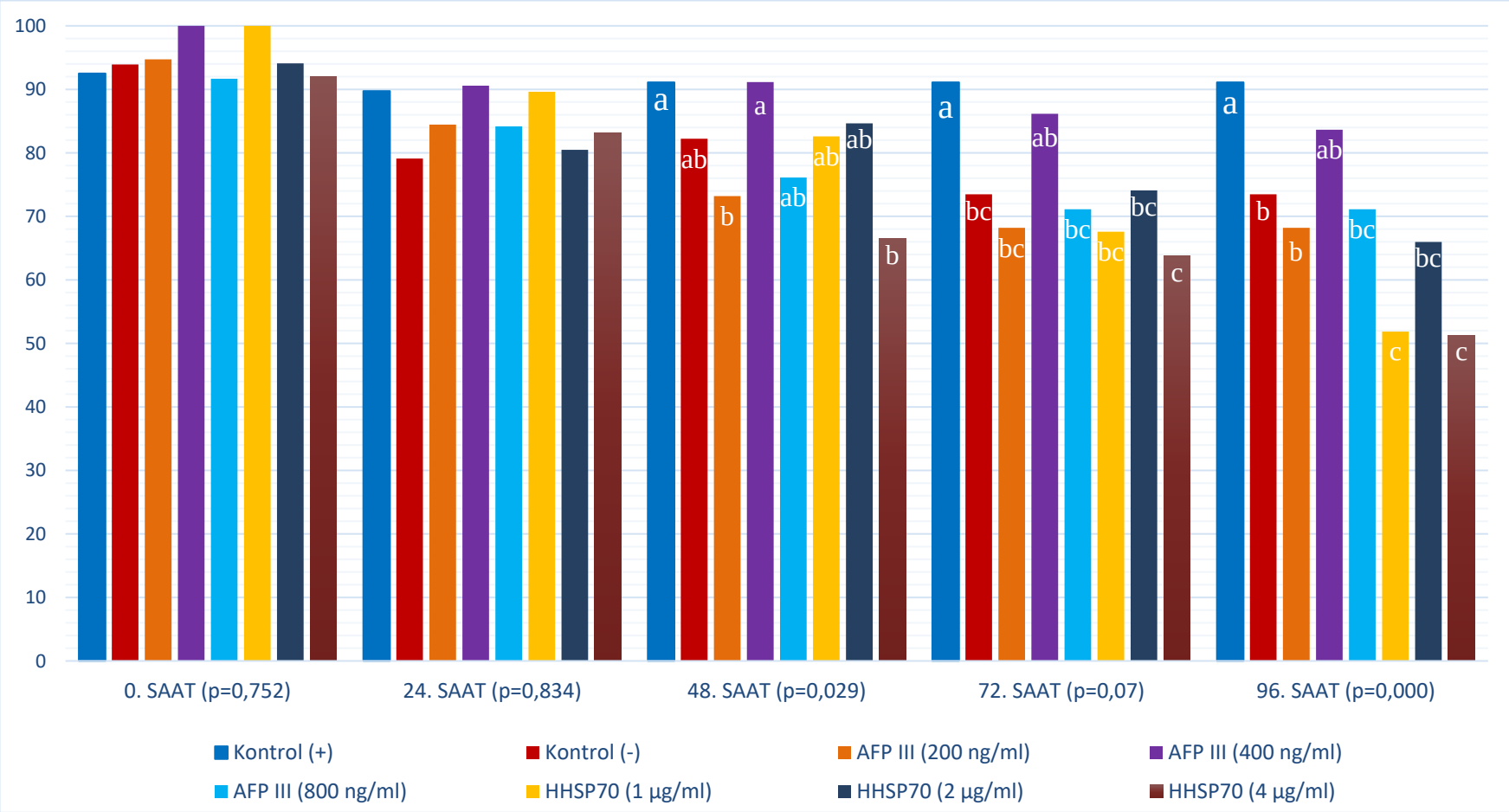
2.2.10. İstatistiksel Analizler

Pozitif kontrol (K^+), negatif kontrol (K^-), Antifreeze Protein III 200 ng/ml (AFPIII200), Antifreeze Protein III 400 ng/ml (AFPIII400), Antifreeze Protein III 800 ng/ml (AFPIII800), Human Heat Shock Protein 70 1µg/ml (HHSP70-1), Human Heat Shock Protein 70 2µg/ml (HHSP70-2) ve Human Heat Shock Protein 70 4µg/ml (HHSP70-4) grupları arasındaki farklılıklar IBM SPSS Statistics 25.0 programı One-Way ANOVA yardımı ile belirlendi. Bir grupta elde edilen oran (%), o grupta in vitro gelişebilen embriyo sayısının yine aynı gruptaki toplam embriyo sayısına bölünmesi ile elde edildi ve aynı işlem tüm gruplarda ve saatlerde uygulandı. Hesaplama sonucu oran olarak elde edilen tüm verilerin standardizasyonunun sağlanması amacı ile arcsin transformation metodu kullanıldı ve daha sonra istatistiki analizi IBM SPSS Statistics 25.0 programı One-Way ANOVA ile yapıldı

3. BULGULAR

Sunulan tez çalışmasında K^+, K^- AFP200, AFP400, AFP800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-3 gruplarında 0, 24, 48, 72 ve 96. saatlerde elde edilen in vitro gelişim oranları Çizelge 3.1'de sunulmuştur.

Çizelge 3. 1. Dondurma Çözdürme Sonrası Elde Edilen İn Vitro Gelişim Oranları



Çizelge 3.1.'den izleneceği üzere pozitif kontrol (K^+), negatif kontrol (K^-), Antifreeze Protein III 200 (AFPIII200), Antifreeze Protein III 400 (AFPIII400), Antifreeze Protein III 800 (AFPIII800), Human Heat Shock Protein 70 – 1 (HHSP70-1), Human Heat Shock Protein 70 – 2 (HHSP70-2) ve Human Heat Shock Protein 70 – 4 (HHSP70-4) gruplarında arcsin transformation metodu ile verilerin standardizasyonu sonrası istatistiksel olarak elde edilen canlı embriyo oranları (%) sırasıyla 92,50 (59/61); 93,93 (32/35); 94,72 (31/33); 100 (43/43); 91,67 (31/32); 100 (27/27); 94,10 (31/33) ve 91,94 (41/44) olarak elde edilmiştir. İn vitro gelişim oranları (%) ise 24. saatte sırasıyla 89,72 (55/61); 79,11 (28/35) 84,45 (27/33); 90,58 (39/43); 84,17 (28/32); 89,63 (24/27); 80,48 (27/33) ve 83,09 (38/44); 48. Saatte 91,11 (57/61); 82,23 (29/35); 73,20 (24/33); 94,16 (39/43); 76,11 (25/32); 82,59 (22/27); 84,65 (28/33) ve 66,50 (31/44); 72. Saatte 91,11 (57/61); 73,48 (26/35); 68,19 (22/33); 86,15 (37/43); 71,11 (23/32); 67,59 (18/27); 74,10 (24/33) ve 63,73 (28/44); 96. Saatte 91,11 (57/61); 73,48 (26/35); 68,20 (22/33); 83,65 (36/43); 71,11 (23/32); 51,85 (14/27); 65,97 (21/33) ve 51,31 (24/44) olarak elde edilmiştir.

İn vitro gelişim oranları açısından gruplar arasında 0. ve 24. saatlerde istatistiki olarak herhangi bir farklılık gözlenmez iken ($p>0,05$),

<u>48. saatte;</u>

K^+ ile AFPIII200,

K^+ ile HHSP70-4,

AFPIII400 ile AFPIII200,

AFPIII400 ile HHSP70-4 grupları arasında,

<u>72. saatte;</u>

K^+ ile K^-,

K^+ ile AFPIII200,

K^+ ile AFPIII800,

K^+ ile HHSP70-1,

K^+ ile HHSP70-2,

K^+ ile HHSP70-4,

AFPIII400 ile HHSP70-4 grupları arasında;

<u>96. saatte;</u>

K^+ ile K^-,

K^+ ile AFPIII200,

K^+ ile AFPIII800,

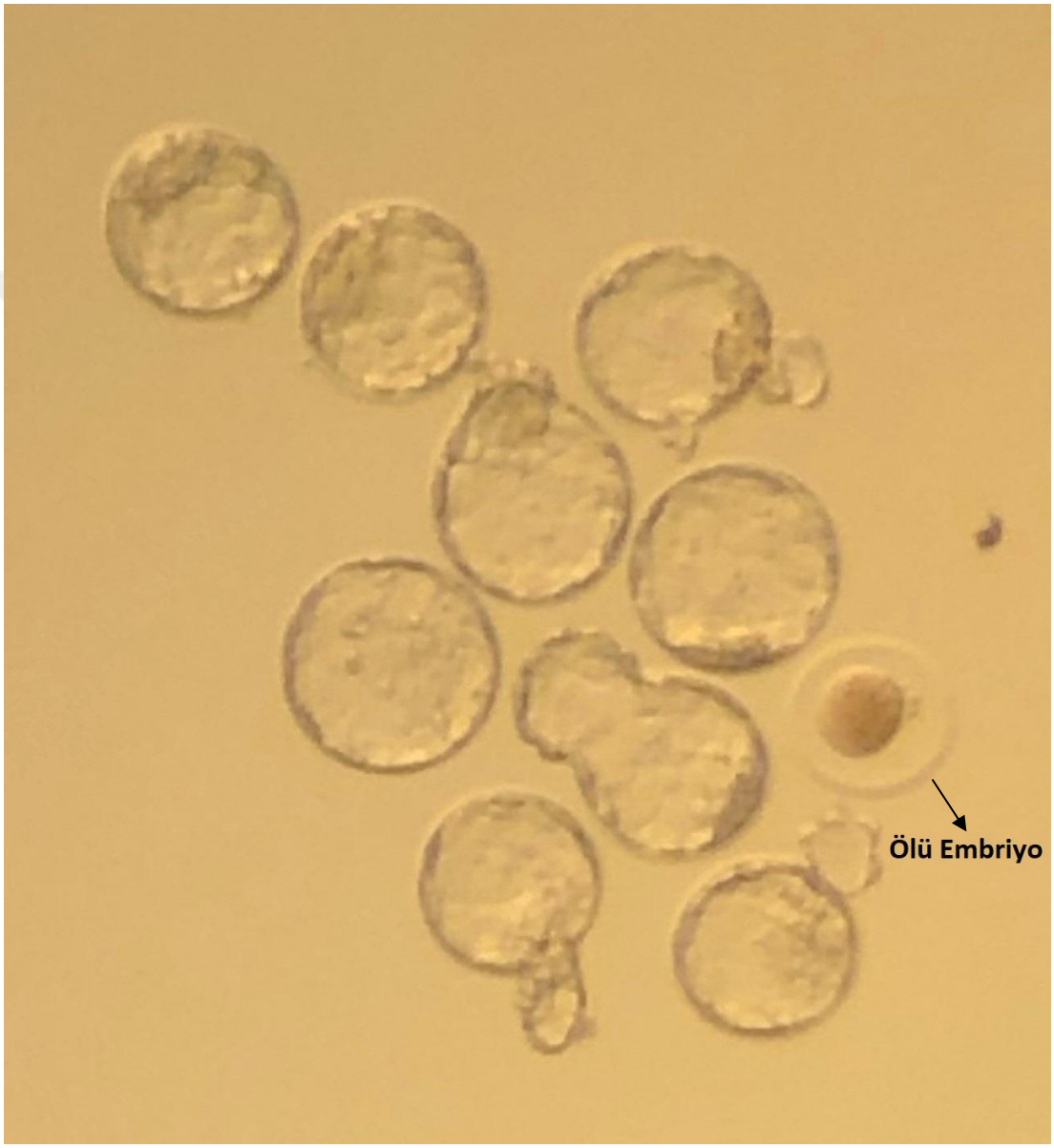
K^+ ile HHSP70-1,

K^+ ile HHSP70-2,

K^+ ile HHSP70-4,

AFPIII400 ile HHSP70-1,

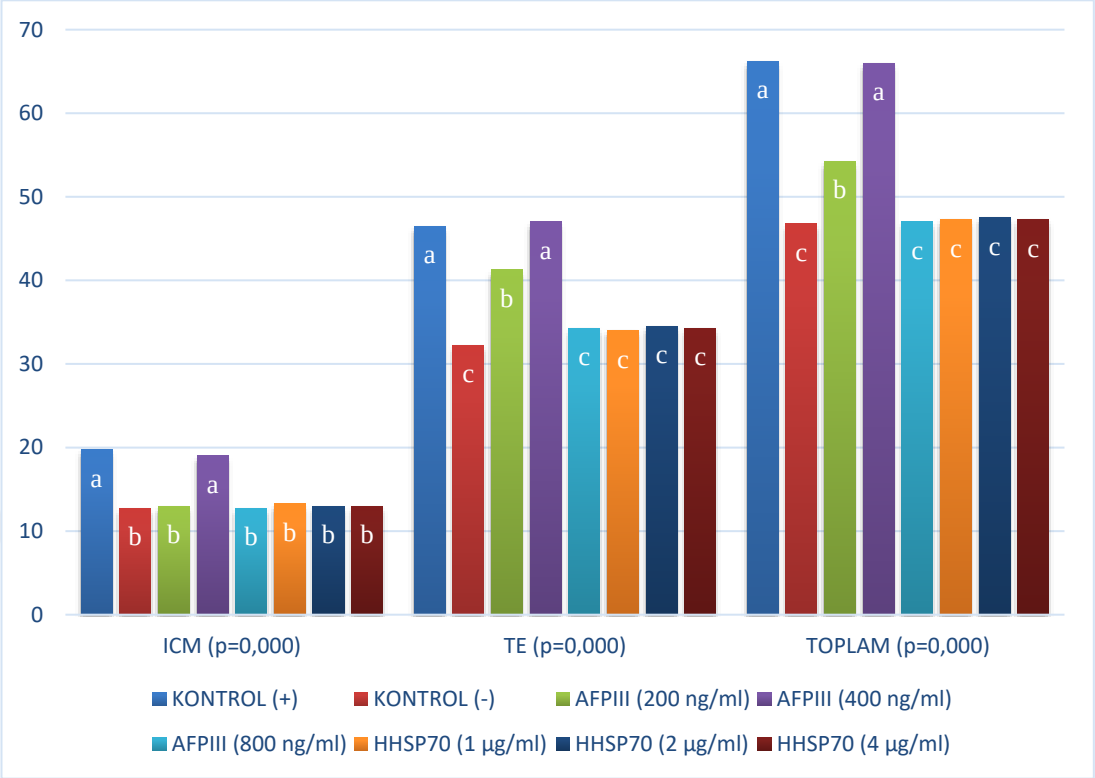
AFPIII400 ile HHSP70-4 grupları arasında elde edilen oranlar arasındaki farklılıklar önemli ($p<0,05$) bulunmuştur.



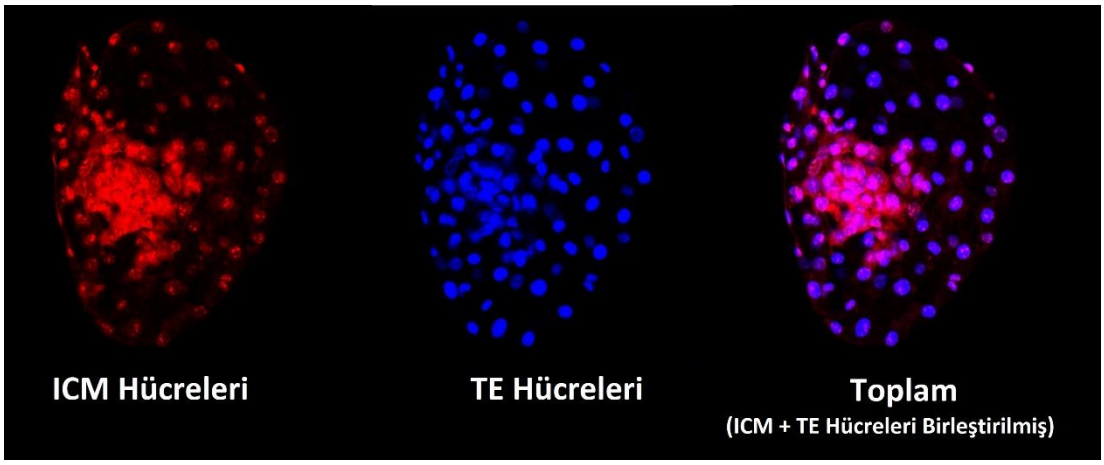
Şekil 3. 1. 72 – 96. Saatlerde Embriyolarda İn Vitro Gelişim

Sunulan tez çalışmasında K^+, K^- AFP200, AFP400, AFP800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-3 gruplarında diferansiyel boyama ile elde edilen ICM, TE ve Toplam hücre sayıları Çizelge 3.2'de sunulmuştur.

Çizelge 3. 2. Diferansiyel Boyama İle Blastosistlerde ICM, TE ve Toplam Hücre Sayılarının Belirlenmesi



Çizelge 3.2'den de izleneceği üzere iç hücre kitlesi (ICM)'nde elde edilen hücre sayıları pozitif kontrol (K^+), negatif kontrol (K^-), Antifreeze Protein III 200 ng/ml (AFPIII200), Antifreeze Protein III 400 ng/ml (AFPIII400), Antifreeze Protein III 800 ng/ml (AFPIII800), Human Heat Shock Protein 70 1µg/ml (HHSP70-1), Human Heat Shock Protein 70 2µg/ml (HHSP70-2) ve Human Heat Shock Protein 70 4µg/ml (HHSP70-4) gruplarında ICM sayıları sırasıyla 19,75; 12,75; 13,00; 19,00; 12,75; 13,25; 13,00 ve 13,00; trofektoderm (TE) sayıları sırasıyla 46,5; 32,25; 41,25; 47,00; 34,25; 34,00; 34,50 ve 34,25; toplam hücre sayıları ise sırasıyla 66,25; 46,75; 54,25; 66,00; 47,00; 47,25; 47,50 ve 47,25 olarak elde edilmiştir. Gruplar arasında elde edilen ICM, TE ve total hücre sayıları arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli bulunmuştur ($p<0,05$);



Şekil 3. 2. Hoeschst 33285 ve Propidyum iyot (PI) ile TE ve ICM Hücrelerinin Gösterilmesi

ICM hücre sayıları açısından;

K^+ ile K^-,

K^+ ile AFPIII200,

K^+ ile AFPIII800,

K^+ ile HHSP70-1,

K^+ ile HHSP70-2,

K^+ ile HHSP70-4

AFPIII400 ile K^-,

AFPIII400 ile AFPIII200,

AFPIII400 ile AFPIII800,

AFPIII400 ile HHSP70-1,

AFPIII400 ile HHSP70-2 ve

AFPIII400 ile HHSP70-4 grupları arasında,

TE hücre sayıları açısından;

K^+ ile K-,

K^+ ile AFPIII200

K^+ ile AFPIII800

K^+ ile HHSP70-1

K^+ ile HHSP70-2

K^+ ile HHSP70-4

AFPIII400 ile K^-,

AFPIII400 ile AFPIII200,

AFPIII400 ile AFPIII800,

AFPIII400 ile HHSP70-1,

AFPIII400 ile HHSP70-2,

AFPIII400 ile HHSP70-4,

AFPIII200 ile K^-,

AFPIII200 ile AFPIII800,

AFPIII200 ile HHSP70-1,

AFPIII200 ile HHSP70-2 ve

AFPIII200 ile HHSP70-4 grupları arasında,

Toplam hücre sayıları açısından;

K^+ ile K-,

K^+ ile AFPIII200,

K^+ ile AFPIII800,

K^+ ile HHSP70-1,

K^+ ile HHSP70-2,

K^+ ile HHSP70-4,

AFPIII400 ile K^-,

AFPIII400 ile AFPIII200,

AFPIII400 grubu ile AFPIII800,

AFPIII400 grubu ile HHSP70-1,

AFPIII400 grubu ile HHSP70-2,

AFPIII400 grubu ile HHSP70-4,

AFPIII200 grubu ile K^-,

AFPIII200 grubu ile AFPIII800,

AFPIII200 grubu ile HHSP70-1,

AFPIII200 grubu ile HHSP70-2 ve

AFPIII200 grubu ile HHSP70-4 grupları arasında elde edilen oranlar arasındaki farklılıklar istatistiksel açıdan önemli ($p<0,05$) bulunmuştur.

4. TARTIŞMA

Oosit ve embriyoların kriyoprezervasyonu, üstün genetik özelliğe sahip ya da soyu tükenmekte olan hayvan kaynaklarının yaygınlaştırılması ve korunması için çok önemli bir uygulamadır. Son yıllarda embriyo dondurma ile ilgili birçok araştırma yapılmış ve ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen etkin bir protokol henüz oluşturulamamıştır. Embriyolar soğutma ve dondurmaya karşı oldukça duyarlıdırlar. Tüm embriyolar, dondurma sırasında önemli morfolojik ve fonksiyonel hasara uğramaktadırlar. Ancak bu hasarların büyüklüğü, embriyoların bu hasarlara karşı canlılığını sürdürebilmesi ve gelişim oranlarındaki farklılıklar türlere, hasarın şekline ve kökenine bağlı olarak değişebilmektedir. Damızlık olarak kullanılan genetik olarak üstün nitelikli, soyu tükenmekte olan ve herhangi bir nedenden ötürü zorunlu olarak yetiştirme programından çıkarılan hayvanların in vitro kültür ortamında üretilen embriyoları sayesinde yavru alınabilme olanağı artmaktadır. Yine bu tür hayvanların embriyolarının uzun süreli saklanması da dondurmanın en önemli nedenlerinden biridir. Bu embriyoların başarılı bir şekilde dondurularak saklanması ile her an istenilen vakitte embriyo transferi gerçekleştirilebilmektedir.

Kromozomlarda ya da mikrotübüllerde (iğ iplikçiklerini oluşturmada görevli yapılar) meydana gelen zararların birçoğu embriyoların soğutulması ya da dondurulması sırasında meydana gelmektedir (Succu ve ark 2007). Ayrıca polisperminin artması, kortikal granüllerin yer değiştirmesi ya da zona pelusidanın sertleşmesi de şekillenebilmektedir (Morató ve ark 2008). Bazı çalışmalarda, embriyoların dondurulması – çözdürülmesi sonrası zona pelusida veya sitoplazmik membranda kırıklara ve embriyonik hücre ölümlerine rastlanmıştır (Lim ve ark 1992, Cuello ve ark 2007). Bu kapsamda sunulan tez çalışması, bahsedilen hasarları elimine etmek adına embriyoya zarar vermeyen bazı ajanlar eklenerek korunması gerektiği ve ayrıca embriyoların dondurulması ve çözdürülmesi sonrası oluşabilecek hasarların ancak bu şekilde önlenebileceği düşüncesinden yola çıkılarak oluşturulmuştur.

Nishijima ve ark (2014), yaptıkları araştırmada 6 – 26 ay arası yaşta Japon Beyazı ırkı tavşanlara 150 IU gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG) uygulamışlar ve 72 saat sonra suni tohumlamayı takiben ovulasyonu uyarmak amacıyla 5 IU insan koryonik gonadotropin (hCG) enjekte etmişlerdir. Uygulamadan 68 saat sonra morula aşamasındaki embriyoları toplamışlardır. Elde ettikleri embriyoları, kontrol grubu (K) dahil olmak üzere AFPIII'ün 100 (AFPIII100), 500 (AFPIII500) ve 1000

(AFPIII1000) ng/ml dozları ile Open Pulled Straw (OPS) tekniği ile dondurmuşlardır. Araştırmacılar çözdürme sonrası K, AFPIII100, AFPIII500 ve AFPIII1000 gruplarında sırasıyla %68,2; %60,7; %80,7; %42,4 in vitro gelişim oranları elde etmişlerdir. Nishijima ve ark (2014)'nın AFPIII1000 (%42,4) grubunda elde ettiği değer, sunulan tez çalışmasında elde edilen tüm değerlerden (K^+ - %90; K^- - %73,48; AFPIII200 - %68,20; AFPIII400 - %83,65; AFPIII800 - %71,11; HHSP70-1 - %51,85; HHSP70-2 - %65,97 ve HHSP70-4 - %51,31) düşük; araştırmacıların K (%68,2) ve AFPIII100 (%60,7) gruplarında elde ettiği değerler, sunulan tez çalışmasındaki AFPIII200 (%68,2) ve HHSP70-2 (%65,97) ile benzer, araştırmacıların AFPIII500 (%80,7) grubunda elde ettiği değer sunulan tez çalışmasındaki K^- (%73,48), AFPIII200 (%68,20), AFPIII800 (%71,11), HHSP70-1 (%51,85), HHSP70-2 (%65,97) ve HHSP70-4 (%51,31) gruplarında elde edilen değerlerden yüksektir. Çalışmada elde edilen veriler arasındaki farklılıklara AFPIII ve HSP70'de kullanılan doz farklılıkları, fare yerine tavşan embriyosu dondurulması ve dondurma yönteminin farklı olmasının sebep olabileceği düşünülmektedir. Nitekim SSV yönteminin OPS yöntemine göre daha yüksek oranda blastosist oranı sağladığı bildirilmektedir (Bagis ve ark 2010).

Rubinsky ve ark (1992), 4 haftalık C57B/6J ırkı farelere süperovulasyon amacı ile 5 – 7,5 IU arası PMSG uygulamışlar ve 48 saat sonra 5 – 7,5 IU arası hCG enjekte etmişlerdir. hCG uygulamasından hemen sonra CBA/CaJ ırkı erkek farelerle çiftleştirilmiş ve 40 saat sonra oviduktlardan iki hücreli embriyoları toplamışlardır. Daha sonra "Apparent Vitrification Solution" (AVS) adını verdikleri (AVS = %17,5 propilen glikol + %2,5 gliserol + %20 FCS + 0,05M sükroz PBS içinde + 0,34 mM pirüvat + %4 BSA + 5,5 mM glikoz + 70µg/ml kanamisin) dondurma solüsyonuna pozitif (K+) ve negatif kontrol (K-) dahil AFGP'nin 1 (AFGP1), 10 (AFGP10), 20 (AFGP20), 40 (AFGP40) mg/ml ve AFP'nin (antarctic nototheniid balıklarından elde edilen) 50 mg/ml (AFP50) dozları ile toplam 7 grup oluşturarak vitrifikasyon yöntemi ile dondurmuşlardır. Çözdürme sonrası K^+ grubunda %95, K^- grubunda %0, AFGP1 grubunda %0, AFGP10 grubunda %10, AFGP20 grubunda %80, AFGP40 grubunda %82,5 ve AFP50 grubunda %0 blastosist oranları elde etmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında K^+ grubunda (%90) elde edilen oran Rubinsky ve ark (1992)'nın K- (%0), AFGP1 (%0), AFGP10 (%10), AFGP20 (%80), AFGP40 (%82,5) ve AFP50 (%0) gruplarında elde ettikleri orandan yüksek; tez çalışmasında AFPIII400 grubunda elde edilen oran (%83,65) araştırmacıların AFGP20 (%80) ve AFGP40 (%82,5)

grupları ile benzerlik göstermekte; araştırmacıların K- (%0), AFGP1 (%0), AFGP10 (%10) ve AFP50 (%0) gruplarında elde ettikleri oranlar sunulan tez çalışmasında elde edilen tüm oranlardan (K^+ - %90; K^- - %73,48; AFPIII200 - %68,20; AFPIII400 - %83,65, AFPIII800 - %71,11; HHSP70-1 - %51,85; HHSP70-2 - %65,97 ve HHSP70-4 - %51,31) düşüktür. Oranlar arası farklılıklara AFPIII protein yerine AFGP kullanılmasından ve araştırmacıların AFPIII uyguladıkları grupta kullanılan dozun sunulan tez çalışmasında kullanılan dozdan yüksek olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Ayrıca yüksek dozda AFPIII kullanımının sodyum potasyum (Na-K) pompasını bozarak aktif transport ile hücre içine glikoz alımını engelleyebileceği düşünülmektedir. AFPIII kullanımının 0,5 mg/ml'den daha yüksek kullanılması sonrası potasyum (K^{+1}) ve kalsiyum (Ca^{+2}) kanallarını bloke ederek bu minerallerin geçişlerini bozduğu araştırmacılar tarafından önemle vurgulanmaktadır (Negulescu ve ark 1992, Rubinsky ve ark 1992).

Jo ve ark (2011), 6 haftalık BDF-1 farelere 5 IU PMSG enjeksiyonu takiben 48 saat sonra 5 IU hCG enjekte etmişlerdir. Oviduktlardan metafaz II aşamasındaki ovumları elde etmişler ve kümülüsleri 85 IU/ml hyaluronidaz enzimi ihtiva eden solüsyon içerisinde uzaklaştırmışlardır. Daha sonra ovumları ikiye bölerek AFPIII (500 ng/ml) ihtiva eden ve etmeyen vitrifikasyon medyumlarında dondurmuşlardır. Ayrıca blastosist aşamasındaki embriyoları boyayarak total hücre sayılarını belirlemişlerdir. Çözdürme sonrası kontrol grubunda %84,5, AFPIII grubunda ise %94,6 oranında canlı ovum elde etmişlerdir. Canlı ovumların in vitro fertilizasyonu sonrasında kontrol grubunda %68,9, AFPIII grubunda ise %89,1 blastosist oranı elde etmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında K^- (%73,48), AFPIII200 (%68,20), AFPIII400 (%83,65), AFPIII800 (%71,11), HHSP70-1 (%51,85), HHSP70-2 (%65,97) ve HHSP70-4 (%51,31) gruplarında elde edilen oranlar Jo ve ark (2011)'nın AFPIII500 grubunda elde etttiği orandan düşüktür. Araştırmacılar boyama sonrası kontrol grubunda 57,2, AFPIII (500 ng/ml) grubunda ise 66,2 oranında total hücre sayıları elde etmişlerdir. Araştırmacıların AFPIII grubunda elde ettiği total hücre sayıları (66,2) sunulan tez çalışmasında K^+ (66,25) ve AFPIII400 (66) grupları ile benzer, araştırmacıların kontrol grubunda elde ettiği oran (57,2) sunulan tez çalışmasında K^- (46,75), AFPIII200 (54,25), AFPIII800 (47), HHSP70-1 (47,25), HHSP70-2 (47,5) ve HHSP70-4 (47,25) gruplarında elde edilen oranlardan yüksektir. İn vitro gelişim açısından oranlar arası farklılıklara kullanılan AFPIII dozunun farklı olması ve araştırmacıların embriyo yerine oosit dondurarak in vitro fertilizasyon ile embriyo elde

etmeleri olarak düşünülmektedir. Dondurma çözdürme sonrası pronüklear embriyolarda mitokondriyal membran potansiyelinin (ΔΨm) daha düşük olduğu ve bu embriyoların dondurma çözdürmeye karşı daha hassas oldukları kimi araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Leibo ve ark 1996, Zhao ve ark 2009). Total hücre sayıları açısından ise yapılan araştırmalardan (Jo ve ark 2012, Nishijima ve ark 2014) ve sunulan tez çalışmasında elde edilen sonuçlardan elde edilen bulgulara dayanılarak AFPIII'ün kim dozlarının donma noktasını düşürerek oosit ve embriyo membran bütünlüğünü koruduğu söylenebilir.

Jo ve ark (2012), BDF-1 ırkı farelerden germinal vezikül (GV) aşamasındaki (profaz I'in diploten aşamasındaki) oositleri elde etmişler ve oositleri ikiye bölerek AFPIII (500 ng/ml) ihtiva eden ve etmeyen vitrifikasyon medyumlarında dondurmuşlardır. Çözdürme sonrası kontrol grubunda %91, AFPIII grubunda ise %97,1 oranında canlı oosit, yine kontrol grubunda %77,8, AFPIII grubunda ise %77,7 oranında maturasyon oranı elde etmişlerdir. Dondurma-çözdürme öncesi GV aşamasındaki oositlerden, dondurma-çözdürme, in vitro maturasyon, in vitro fertilizasyon ve in vitro kültürü sonrasında kontrol grubunda %33,2, AFPIII grubunda ise %56,1 canlı blastosist oranı elde etmişlerdir. Ayrıca blastosistleri boyayarak total hücre sayılarını belirlemişlerdir. Sunulan tez çalışmasında yapılan araştırmadan farklı olarak pronüklear aşamadaki embriyolar dondurularak in vitro gelişim oranları belirlenmiştir. Sadece HHSP70-1 ve HHSP70-4 grupları Jo ve ark (2012)'nın AFPIII grubunda elde ettikleri orandan düşüktür. Tez çalışmasında HHSP70-1 (%51,85) ve HHSP70-4 (%51,31) grupları hariç elde edilen tüm değerler (K^+ - %90; K^- - %73,48; AFPIII200 - %68,20; AFPIII400 - %83,65; AFPIII800 - %71,11 ve HHSP70-2 - %65,97) araştırmacıların elde ettiği oranlardan yüksektir. Jo ve ark (2012), boyama sonrası total hücre sayılarını kontrol grubunda 67,8; AFPIII500 grubunda ise 78,2 olarak elde etmişlerdir. İn vitro gelişim oranları arasındaki farklılıkların profaz I'in diploten aşamasındaki primer oositlerin vitrifiye edilmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim bazı araştırmacılar primer oositlerin dondurma-çözdürme ve maturasyonu sonrası fertilizasyonunun düşük olduğunu ve iğ iplikçikleri ve kromozomlarda abnormalitelerin meydana gelebileceğini belirtmişlerdir (Toth ve ark 1994, Boiso ve ark 2002). Total hücre sayıları açısından, sunulan tez çalışmasında tüm gruplarda (K^+ - 66,25; K^- - 46,75, AFPIII200 - 54,25; AFPIII400 – 66,00; AFPIII800 – 47,00; HHSP70-1 - 47,25; HHSP70-2 - 47,5; HHSP70-4 - 47,25) elde edilen hücre sayıları Jo ve ark (2012)'nın elde ettiği total hücre sayılarından düşüktür. Oranlar arası

farklılıkların AFPIII dozunun sunulan tez çalışmasında (400 ng/ml), Jo ve ark (2012)'nın çalışmalarından (500 ng/ml) daha düşük kullanması ve in vitro kültür süresinin tez çalışmasında 96 saat olmasına karşılık Jo ve ark (2012)'nın 120 saat süre ile tutmaları olarak düşünülmektedir. Nitekim kültür aşamasının 96 saat yerine 120 saat olarak tutulmasının blastomer sayılarını artırması aşikardır.

Lee ve ark (2015), 4 – 6 haftalık BDF-1 ırkı dişi farelere süperovulasyon amacı ile 5 IU PMSG ve 48 saat sonra ovulasyonu uyarmak amacıyla 5 IU hCG enjekte etmişlerdir. hCG enjeksiyonundan 24 saat sonra oviduktlardan metafaz II aşamasındaki ovumları toplamışlardır. Daha sonra bu ovumları dondurma medyumuna bakterilerden (0,05 mg/ml) "flavobacterium frigoris ice-binding protein" (FfIBP), mayalardan (0,1 mg/ml) "Glaciozyma türü ice-binding protein" (LeIBP) (en çok bilineni Leucosporidium) elde edilen AFP'ler ve AFPIII (0,1 mg/ml) ilave ederek kontrol grubu ile birlikte 4 grup oluşturarak dondurmuşlardır. Çözdürme sonrası canlı ovum oranlarını kontrol grubunda %75, FfIBP grubunda %89, LeIBP grubunda %90 ve AFPIII grubunda %85 olarak tespit etmişlerdir. Bölünme oranlarını, in vitro fertilizayon sonrası kontrol grubunda %58,7, FfIBP grubunda %81, LeIBP grubunda %87,8 ve AFPIII grubunda %81,2 olarak belirlemişlerdir. Embriyoların 120 saat kültüre edilmesinden sonra kontrol grubunda %30,7, FfIBP grubunda %78, LeIBP grubunda %68,9 ve AFPIII grubunda %62,4 blastosist oranı elde etmişlerdir. Araştırmacılar blastosistleri DAPI boyası ile boyayarak total hücre sayılarını belirlemişlerdir. Lee ve ark (2015), total hücre sayılarını kontrol grubunda 53,7; FfIBP grubunda 69,8; LeIBP grubunda 73,9 ve AFPIII grubunda 63,5 olarak elde etmişlerdir.

Sunulan tez çalışmasında in vitro gelişim oranları K^+, K^-, AFPIII200, AFPIII400, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 gruplarında 24. saatte sırasıyla %90; %79,11; %84,45; %90,58; %84,17; %89,63; %80,48 ve %83,09; 48. saatte %90; %82,23; %73,20; %94,16; %76,11; %82,59; %84,65 ve %66,50; 72. saatte %90; %73,48; %68,19; %86,15; %71,11; %67,59; %74,10 ve %63,73; 96. saatte %90; %73,48; %68,20; %83,65; %71,11; %51,85; %65,97 ve %51,31 olarak elde edilmiştir. Lee ve ark (2015)'nın kontrol grubunda elde ettiği blastosist oranı (%30,7), sunulan tez çalışmasında elde edilen oranların tamamından düşük; FfIBP grubunda elde ettiği oran (%78), sunulan tez çalışmasında K^+ (%90) ve AFPIII400 (%83,65) gruplarında elde edilen oranlardan düşük, K^-(%73,48), AFPIII200 (%68,20), AFPIII800 (%71,11), HHSP70-1 (%51,85), HHSP70-2 (%65,97), HHSP70-4 (%51,31) gruplarında elde edilen oranlardan yüksek; LeIBP grubunda elde ettiği oran (%68,9) sunulan tez

çalışmasında K+ (90), K- (%73,48), AFPIII400 (%83,65), AFPIII800 (%71,11) gruplarında elde edilen oranlardan düşük, AFPIII200 (%68,20) grubu ile benzer, HHSP70-1 (%51,85), HHSP70-2 (%65,97), HHSP70-4 (%51,31) gruplarında elde edilen oranlardan yüksek; AFPIII grubunda elde ettiği oran (%62,4), sunulan tez çalışmasında K^+ (%90), K^-(%73,48), AFPIII200 (%68,20), AFPIII400 (%83,65) ve AFPIII800 (%71,11) gruplarında elde edilen oranlardan düşük, HHSP70-1 (%51,85), HHSP70-2 (%65,97), HHSP70-4 (%51,31) gruplarında elde edilen oranlardan yüksektir. Sunulan tez çalışmasında K^+ (66,25), K^- (46,75), AFPIII200 (54,25), AFPIII400 (66), AFPIII800 (47), HHSP70-1 (47,25), HHSP70-2 (47,5), HHSP70-4 (47,25) gruplarında elde edilen tüm hücre sayıları, Lee ve ark (2015)'nın FfIBP (69,8) ve LeIBP (73,9) gruplarından elde ettiği sayılardan düşük; sunulan tez çalışmasında K^+ (66,25) ve AFPIII400 (66) gruplarında elde edilen total hücre sayıları, araştırmacınların kontrol (53,7) ve AFPIII (63,5) gruplarında elde ettiği sayılardan yüksek; sunulan tez çalışmasında AFPIII200 (54,25) ile araştırmacıların kontrol grubunda elde ettiği hücre sayıları birbiri ile benzerdir. İn vitro gelişim açısından oranlar arası farklılıkların kullanılan proteinlerin ve dozlarının farklı olması, embriyo yerine metafaz II aşamasındaki sekonder oositlerin dondurulması ve termal histerezis aktivitesi farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim flavobacterium frigoris ice-binding proteinin, glaciozyma türü ice-binding proteinden 10 kat daha fazla (Do ve ark 2012), hatta böceklerden elde edilen antifriz proteinin diğer tüm balıklardan elde edilen antifriz proteinlerinden (AFP tip I, II ve III) 10 -30 kat daha fazla termal histerezis aktivitesi olduğu belirtilmektedir (Tyshenko ve ark 1997). Total hücre sayıları açısından ise farklılıkların boyama için alınan embriyoların in vitro kültür sürelerinin (sunulan tez çalışmasında 96 saat, yapılan araştırmada 120 saat) farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Wen ve ark (2014), dişi farelere 10 IU PMSG ve 48 saat sonra 10 IU hCG enjekte etmişlerdir. Uygulamadan 18 – 20 saat sonra dişi farelerin oviduktlarını toplayarak metafaz II aşamasındaki ovumları elde etmişlerdir. Ovumları 4 gruba ayırarak ilk iki grubu dondurmamışlardır. Üçüncü grup kontrol grubu olarak vitrifiye edilmiş ve 4. gruba ise AFPIII'ün 2,5 mg/ml dozu eklenerek vitrifiye edilmiştir. Çözdürme sonrası kontrol ve AFPIII gruplarında sırasıyla %82 ve %92 canlı ovum oranları elde etmişlerdir. Bu ovumların in vitro fertilizasyonu sonrası kontrol ve AFPIII gruplarında sırasıyla %31,7 ve %46,73 fertilizasyon oranı; %53,85 ve %55,81 blastosist oranı tespit etmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında K^+ (%90), K^-(%73,48),

AFPIII200 (%68,20), AFPIII400 (%83,65), AFPIII800 (%71,11) ve HHSP70-2 (%65,97) gruplarında elde edilen blastosist oranları Wen ve ark (2014)'nın kontrol (%53,85) ve AFPIII (%55,81) gruplarında elde ettiği oranlardan yüksek, tez çalışmasında HHSP70-1 (%51,85) ve HHSP70-4 (%51,31) grupları ile benzer olarak elde edilmiştir. Oranlar arası farklılıkların Wen ve ark (2014)'nın çalışmalarında embriyo yerine ovum kullanmaları, kullanılan AFPIII dozlarının farklı olması ve AFPIII'ün ortam pH'sını düşürmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim AFPIII'ün bazik aminoasitlerden daha çok asidik aminoasit ihtiva ettiği ifade edilmektedir (Graether ve ark 1999).

Sun ve ark (2020), sığırlarda mezbaha materyallerinden elde ettikleri primer oositlerin in vitro maturasyonunu sağlayarak metafaz II aşamasına gelmelerini sağlamışlardır. Daha sonra bu ovumları kontrol grupları dahil AFPIII'ün 0,1 (AFPIII-0,1); 1 (AFPIII-1) ve 10 (AFPIII-10) mg/ml ve LeIBP 0,1 (L-0,1); 1 (L-1) ve 10 (L-10) mg/ml dozları ile vitrifiye etmişlerdir. Vitrifikasyon sonrası çözdürülen ovumların in vitro ferilizasyonunu gerçekleştirerek blastosist gelişimlerini gözlemlemişlerdir. İn vitro kültür sonrası blastosist oranlarını kontrol, AFPIII-0,1; AFPIII-1, AFPIII-10, L-0,1; L-1 ve L-10 gruplarında sırasıyla %58,13; %54,55; %56,07; %58,34; %74,09; %63,69; %55,95 olarak elde etmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında blastosist oranları K^+ , K^- , AFPIII200, AFPIII400, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 gruplarında sırasıyla %90; %73,48; %68,20; %83,65; %71,11; %51,85; %65,97 ve %51,31 olarak elde edilmiştir. Sun ve ark (2020) ve Do ve ark (2012) benzer olarak LeIBP türü proteinlerin termal histerezis aktivitelerinin yüksek olmasına bağlı olarak embriyoları dondurma çözdürme sonrası soğuk şokuna karşı koruduğunu, buz kristali oluşumunu önlediğini ve ROS üretimini azalttığını vurgulamaktadırlar. Sunulan tez çalışmasında ise AFPIII proteinlerinin LeIBP proteinleri ile benzer aktivite göstererek in vitro gelişim oranlarını indirekt olarak desteklediği, AFPIII dozlarının yüksek oranda kullanımının ise toksik etki göstererek embriyo gelişimini engelleyebileceği ifade edilebilir.

Chaves ve ark (2016), sığırlarda mezbaha materyallerinden elde ettikleri primer oositleri 22 saat 38,5^{o}C'de %5 CO_2 ihtiva eden inkübatör içerisinde in vitro maturasyonunu sağlamışlardır. Maturasyon sonrası kontrol grubu dahil olmak üzere AFPIII'ün 500 ng/ml (AFPIII500) ve 1000 ng/ml (AFPIII1000) dozları ile OPS tekniği kullanarak vitrifiye etmişlerdir. Çözdürme sonrası in vitro fertilizasyonu gerçekleştirilen canlı ve hasarsız ovumlardan blastosist aşamasına kadar bölünmeleri

takip edilmiş ve 8. günde kontrol, AFPIII500 ve AFPIII1000 gruplarında sırasıyla %10; %3,8 ve %9,4 blastosist oranları elde etmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında blastosist oranları K^+ , K^- , AFPIII200, AFPIII400, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 gruplarında sırasıyla %90; %73,48; %68,20; %83,65; %71,11; %51,85; %65,97 ve %51,31 olarak elde edilmiştir. Chaves ve ark (2016), sığır oositlerini vitrifikasyon yöntemi ile AFPIII proteinin 500 ve 1000 ng/ml oranlarını ekleyerek dondurmuşlar ve AFPIII'ün tüm dozlarının kontrol grubuna göre daha az blastosist oranı sağladığını ifade etmişlerdir. Buna karşılık sunulan tez çalışmasında AFPIII'ün daha fazla sayıda farklı dozları kullanılmış ve embriyo gelişim oranları üzerine AFPIII'ün 400 ng/ml oranında kullanımının daha fazla koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir. Her iki araştırma için de yüksek dozlarda AFPIII kullanımının toksik etki gösterebileceği düşünülebilir. Gerek sunulan tez çalışmasında 800 ng/ml oranında ilave edilen AFPIII'ün embriyo gelişim üzerine olumsuz etki gösterdiği gerekse Sun ve ark (2020)'nın da çalışmalarında önemle ifade ettikleri üzere AFPIII'ün yüksek dozlarının embriyo gelişim üzerine olumsuz etkilere sahip olduğu vurgulanmaktadır. Dolayısıyla AFPIII proteinin yüksek dozlarının kullanılmasının embriyo gelişim ve total hücre sayıları üzerine olumsuz etki gösterebileceği elde edilen sonuçlara bakılarak söylenebilir.

Li ve ark (2020), koyunlarda elde ettikleri primer oositleri 24 saat boyunca %5 CO_2 ve 38,58^oC ısı içeren inkübatörde in vitro maturasyonunu sağlamışlardır. Mature olan ovumların, 21 saat süre ile fertilizasyonunu sağlamışlardır. İn vitro fertilizasyon sonrası fertilize olan embriyoları kültür medyumlarına aktararak 6 – 8 gün kadar blastosist aşamasına kadar kültüre etmişlerdir. Blastosist aşamasına gelen embriyoları konvansiyonel ve vitrifikasyon yöntemi kullanarak dondurmuşlardır. Her iki dondurma yönteminde de *Anatolica polita* türü böceklerden elde ettikleri ApAFP914 antifriz proteinini kullanmışlar, kontrol dahil bu proteinin 5 (ApAFP914/5), 10 (ApAFP914/10), 15 (ApAFP914/15) ve 30 (ApAFP914/30) µg/ml dozlarını kullanarak toplamda 10 grup oluşturmuşlar ve dondurmuşlardır. Çözdürme sonrası slow freezing yöntemi kullandıkları kontrol, ApAFP914/5, ApAFP914/10, ApAFP914/15 ve ApAFP914/30 gruplarında blastosist oranlarını sırasıyla %77,37; %78,66; %84,95; %82,43 ve %85,62; vitrifikasyon yöntemi kullandıkları kontrol, ApAFP914/5, ApAFP914/10, ApAFP914/15 ve ApAFP914/30 gruplarında blastosist oranlarını sırasıyla %95,14; %96,23; %95,09; %94,12 ve %93,50 olarak elde etmişlerdir. Yine slow freezing yöntemi kullandıkları kontrol, ApAFP914/5,

ApAFP914/10, ApAFP914/15 ve ApAFP914/30 gruplarında hatched blastosist oranlarını sırasıyla %22,95; %23,22; %35,63; %9,11 ve %7,95; vitrifikasyon yöntemi kullandıkları kontrol, ApAFP914/5, ApAFP914/10, ApAFP914/15 ve ApAFP914/30 gruplarında hatched blastosist oranlarını sırasıyla %56,74, %66,16, %62,92, %55,56 %51,86 olarak elde etmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında katı yüzey vitrifikasyon metodu kullanılarak fare pronüklear aşamadaki embriyolar dondurulmuş ve çözdürülmüştür. Çözdürme sonrası elde edilen canlı embriyo oranları K^+, K^-, AFPIII200, AFPIII400, AFPIII800, HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 gruplarında sırasıyla 90; 93,93; 94,72; 100; 91,67; 100; 94,10 ve 91,94; kültüre edilen embriyolardan elde edilen hatched blastosist oranları ise %90, %73,48, %68,20; %83,65; %71,11; %51,85; %65,97 ve %51,31 olarak belirlenmiştir. Li ve ark (2020), yaptıkları çalışmalarında kullandıkları ApAFP14 tipi proteinin kontrol gruplarına göre koruma sağladığını belirtmektedirler. Vitrifikasyon yöntemine göre slow freezing yönteminde daha az miktarda kriyoprotektan kullanılmasından dolayı büyük buz kristallerinin önüne geçilememesi kimi araştırmacılar tarafından önemle belirtilmektedir (Gibbons ve ark 2011, Vladimirov ve ark 2018). Li ve ark (2020), yaptıkları çalışmada konvansiyonel (yavaş) dondurma yönteminin daha etkisiz; ancak vitrifikasyon yönteminin daha etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Sunulan tez çalışmasında ise vitrifikasyon yöntemi kullanılmış olup Li ve ark (2020)'ın sonuçlarına benzer sonuçlar elde edildiği, bunlara ilaveten tez çalışmasında kullanılan AFPIII'ün 400 ng/ml kullanımının koruyucu etki gösterdiği belirlenmiştir. Aksine AFPIII'ün 800 ng/ml kullanımının hiç farklılık göstermemesi, AFPIII'ün yüksek dozlarının zararlı olabileceği ifade edilebilir. Li ve ark (2020) da AFP'nin yüksek dozlarının olumsuz etki gösterdiğini vurgulamakta ve bu bulgular çalışmamızdan elde edilen bulgular ile paralellik göstermektedir.

Liang ve ark (2016), sığır primer oositlerini in vitro maturasyon medyumuna alarak metafaz II aşamasına (sekonder oosit) gelmelerini sağlamışlardır. Daha sonra sekonder oositleri pozitif (dondurulmamıştır) kontrol, negatif kontrol ve antifreeze glikoprotein 8 (AFGP8)'in 1 mM dozu (27 mg/ml) dahil olmak üzere 3 gruba ayırarak vitrifiye etmişlerdir. Çözdürme sonrası in vitro fertilizasyonunu sağlayarak ve kültüre ederek in vitro gelişimlerini incelemişlerdir. Ayrıca blastosist aşamasına gelen (fertilizasyondan 7 gün sonra) embriyoları boyayarak total hücre sayılarını belirlemişlerdir. İn vitro kültür sonrası blastosist oranlarını pozitif kontrol grubunda %25,7, negatif kontrol grubunda %8,9 ve AFGP8 grubunda %12,9 olarak elde

etmişlerdir. Boyama sonrası ise pozitif kontrol grubunda 132,6; negatif kontrol grubunda 112,5 ve AFGP8 grubunda 127,2 toplam hücre sayısı tespit etmişlerdir. Liang ve ark (2016)'nın sığır oositlerinin vitrifikasyon solüsyonuna AFGP8 proteinin eklenmesi, dondurma-çözdürme ve in vitro fertilizasyonu sonrası in vitro gelişim oranlarını araştırdıkları bu çalışmalarında ilave edilen AFGP8'in dondurmanın meydana getirdiği zararlara karşı koruyucu etki gösterdiği, ROS seviyelerini düşürdüğünü ve bu sayede embriyonik gelişim üzerine olumlu etki gösterdiğini ifade etmektedirler. Sunulan tez çalışmasında da katı üzey vitrifikasyon tekniği kullanılmış, AFPIII'ün farklı dozları eklenmiş ve 400 ng/ml kadar ilave edilen oranın embriyo gelişimi üzerine olumlu etkisinin olduğu ve hücre sayılarını artırdığı belirlenmiştir. Dolayısıyla vitrifikasyon soüsyonuna farklı dozlarda ve farklı yapıdaki proteinlerin katılmasının benzer mekanizmalar göstererek (ROS seviyesini düşürdüğü, soğuk şokunu engellediği, buz kristali oluşumunu engellediği, indirekt olarak embriyo gelişimini desteklediği) embriyolarda in vitro gelişim oranlarını artırması Liang ve ark (2016)'nın yaptıkları araştırma ile benzerlik arz etmektedir.

Tez çalışmamızda kullanılan Human Heat Shock Protein 70 (HHSP70) proteini daha önce embriyo ya da oosit vitrifikasyon çalışmalarında kullanılmamış olup, tez çalışmasında kullanılan dozlar yapılan sperma çalışmalarından dikkate alınarak (Alvarez-Rodríguez ve ark 2013, Holt ve ark 2015) oluşturulmuştur. HHSP70-1, HHSP70-2 ve HHSP70-4 gruplarında 0. saatte çözdürme sonrası canlı embriyo oranları sırasıyla %100, %94,10 ve %91,94; bölünme oranları 24. saatte sırasıyla %89,63, %80,48 ve %83,09; 48. saatte %82,59, %84,65 ve %66,50; 72. saatte %67,59, %74,10 ve %63,73 ve 96. saatte %51,85, %65,97 ve %51,31 olarak elde edilmiştir. Sıfırıncı saatten 96. saate kadar bölünme oranlarında azalış ve dejenerasyon oranlarında artış meydana gelmiştir. Her ne kadar Heat Shock Protein 70 sitosol, mitokondri, endoplazmik retikulum ve çekirdekte üretilip, şaperon olarak görev yapıp (Kiang ve Tsokos 1998) anti-apoptotik faktör olarak belirtilse de (Esfandiari ve ark 2007), bu proteinin hücre dışındaki rollerinin farklı olabileceğinden dejenerasyonların gerçekleşebileceği düşünülmektedir. HHSP70 kendi bünyesinde kükürtlü aminoasitler (sistein ve metiyonin) ihtiva etmektedir (Arakawa ve ark 2011, Yang ve ark 2020). Sisteinler aynı protein üzerinde birbirleri arasındaki tiyol grupları ya da diğer proteinin sistein amino asitinin tiyol grubu ile disülfit bağları kurmaktadırlar (RSH + RSH = RS-RS + $2H^+$ + $2e^-$). Disülfit bağları kurarken ortama hidrojen iyonu (H^+) vermektedirler (Witt 2008). H^+ sulu ortamda su molekülüne (H_2O) bağlanarak hidronyum iyonu

(H_3^+O) oluşturmaktadır. Hidronyum iyonu asidiktir ve ortam pH'sını düşürmektedirler (Başpınar 2010). Gitgide azalan bölünme oranlarının ortam pH'sının düşmesinden dolayı meydana geldiği söylenebilir.

Vitrifikasyon yöntemi ile dondurmanın mitokondriyal hasarı, apoptozu, ROS miktarını ve bloklanmayı artırdığı kimi araştırmacılar tarafından belirtilmektedir (Somfai ve ark 2007, Gupta ve ark 2010). Bununla birlikte, ROS'un embriyonik gelişimi azalttığı ve erken embriyonik dönemde apoptozu uyardığı önemle vurgulanmaktadır (Evans ve ark 2004). Yapılan tüm araştırmalardan anlaşılacağı üzere AFPIII'ün kullanılması ile oosit ve embriyo membranı korunmakta, kromozom ve miyotik iğ iplikçiklerinin zarar görmesi engellenmekte, apoptotik hücrelerin oluşması azalmakta ve kaliteli bir şekilde embriyolar dondurulabilmektedir. Fakat araştırmalardan ve sunulan tez çalışmasından AFPIII'ün doz bağımlı olduğu düşünülmektedir. Farelerde 400 – 500 ng/ml kullanılması ile daha yüksek in vitro gelişim oranı ve total hücre sayıları elde edilebilmektedir. Fakat sığır ve koyun gibi diğer hayvanlarda doz çalışmalarının yapılması gerekmektedir. Sunulan tez çalışmasında kullanılan HHSP70 proteini ise ilk defa denenmiş olup bu protein ile ilgili daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

5. SONUÇ

Sunulan tez çalışmasında vitrifikasyon medyumlarına eklenen AFPIII ve HHSP70 proteinlerinin in vitro gelişim, iç hücre kitlesi, trofektoderm ve total hücre sayıları açısından gruplar arasında istatistiksel bir fark belirlenmiştir.

Sonuç olarak;

Antifreeze protein tip III'ün 400 ng/ml dozunun farelerde pronüklear embriyoların dondurulmasında daha etkin rol aldığı ve embriyo membran bütünlüğünü koruduğu,

Antifreeze protein tip III'ün doz bağımlı olduğu, yüksek dozlarının embriyo gelişimini azaltabileceği,

Sığır ve koyunlarda doz çalışmalarının yapılarak kullanılabileceği,

Human Heat Shock Protein 70 ile ilgili embriyo çalışmasının ilk defa sunulan tez çalışmasında yapıldığı ve daha fazla çalışmaların yapılması gerektiği,

Ayrıca bu proteinlerin kullanılmasından sonra embriyoların enerji metabolizmalarının da belirlenmesi gerektiği,

Doz çalışmalarının yapılmasından sonra üstün nitelikli hayvanların embriyolarının zarar görmeden bu proteinler ile vitrifiye edilebileceği kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

Ali J, Shelton J, 1993. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. Reproduction, 99, 2, 471-7.

Allen E, 1922. The oestrous cycle in the mouse. American journal of anatomy, 30, 3, 297-371.

Alvarez-Rodríguez M, Alvarez M, Borragan S, Martinez-Pastor F, Holt WV, Fazeli A, de Paz P, Anel L, 2013. The addition of heat shock protein HSPA8 to cryoprotective media improves the survival of brown bear (Ursus arctos) spermatozoa during chilling and after cryopreservation. Theriogenology, 79, 3, 541-50.

Amidi F, Khodabandeh Z, Mogahi MHN, 2018. Comparison of the effects of vitrification on gene expression of mature mouse oocytes using cryotop and open pulled straw. International journal of fertility & sterility, 12, 1, 61.

Arakawa A, Handa N, Shirouzu M, Yokoyama S, 2011. Biochemical and structural studies on the high affinity of Hsp70 for ADP. Protein Science, 20, 8, 1367-79.

Azizi E, Novin MG, Naji M, Amidi F, Hosseinirad H, Mofarahe ZS, 2020. Effect of vitrification on biogenesis pathway and expression of development-related microRNAs in preimplantation mouse embryos. Cell and Tissue Banking, 1-12.

Baardsnes J, Davies PL, 2002. Contribution of hydrophobic residues to ice binding by fish type III antifreeze protein. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics, 1601, 1, 49-54.

Bagis H, Akkoc T, Taskin 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, e332-e7.

Bagis H, Odaman Mercan H, 2004. Effect of chemically defined culture medium supplemented with β-mercaptoethanol and amino acids on implantation and development of different stage in vivo- or in vitro-derived mouse embryos. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 69, 1, 52-9.

Bardwell J, Craig EA, 1984. Major heat shock gene of Drosophila and the Escherichia coli heat-inducible dnaK gene are homologous. Proceedings of the National Academy of Sciences, 81, 3, 848-52.

Başpınar N, 2010. Biyofiziksel Kimya, In: Biyokimya, Eds: Kalaycıoğlı L, Serpek B, Nizamlıoğlu M, Başpınar N, Tiftik AM, 4. Baskı, Ankara, p. 1-29.

Beere HM, Wolf BB, Cain K, Mosser DD, Mahboubi A, Kuwana T, Tailor P, Morimoto RI, Cohen GM, Green DR, 2000. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. Nature cell biology, 2, 8, 469-75.

Boiso I, Veiga A, Edwards RG, 2002. Fundamentals of human embryonic growth in vitro and the selection of high-quality embryos for transfer. Reproductive BioMedicine Online, 5, 3, 328-50.

Boonsupthip W, Lee TC, 2003. Application of antifreeze protein for food preservation: Effect of type III antifreeze protein for preservation of gel-forming of frozen and chilled actomyosin. Journal of food science, 68, 5, 1804-9.

Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA, 2012. Mouse estrous cycle identification tool and images. PLoS One, 7, 4, e35538.

Caglar K, Kocabay A, Taskin AC, Arat S, 2020. Treatment with Melatonin Enhances the Embryo Quality and the Development of Vitrified/Warmed Eight Cell Mouse Embryos by Solid Surface Vitrification (SSV). Cryoletters, 41, 2, 62-7.

Chao H, DeLuca CI, Davies PL, Sykes BD, Sönnichsen FD, 1994. Structure-function relationship in the globular type III antifreeze protein: identification of a cluster of surface residues required for binding to ice. Protein Science, 3, 10, 1760-9.

Chaves DF, Campelo IS, Silva MM, Bhat MH, Teixeira DI, Melo LM, Souza-Fabjan JM, Mermillod P, Freitas VJ, 2016. The use of antifreeze protein type III for vitrification of in vitro matured bovine oocytes. Cryobiology, 73, 3, 324-8.

Chen G, Jia Z, 1999. Ice-binding surface of fish type III antifreeze. Biophysical journal, 77, 3, 1602-8.

Cocero M, Procureur R, De la Fuente J, Chupin D, 1988. Glycerol or ethylene glycol for cryoprotection of deep frozen ewe embryos. Theriogenology, 29, 1, 238.

Cora MC, Kooistra L, Travlos G, 2015. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. Toxicologic pathology, 43, 6, 776-93.

Craig EA, Schlesinger MJ, 1985. The heat shock respons. Critical Reviews in Biochemistry, 18, 3, 239-80.
Crevel R, Fedyk J, Spurgeon M, 2002. Antifreeze proteins: characteristics, occurrence and human exposure. Food and Chemical Toxicology, 40, 7, 899-903.
Cuello C, Berthelot F, Delaleu B, Venturi E, Pastor LM, Vazquez J, Roca J, Martinat-Botte F, Martinez E, 2007. The effectiveness of the stereomicroscopic evaluation of embryo quality in vitrified–warmed porcine blastocysts: An ultrastructural and cell death study. Theriogenology, 67, 5, 970-82.
Davies PL, Hew CL, 1990. Biochemistry of fish antifreeze proteins. The FASEB Journal, 4, 8, 2460-8.
de Angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, Heffner S, Pargent W, Wuensch K, Jung M, 2000. Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. Nature genetics, 25, 4, 444.
DeLuca CI, Chao H, Sönnichsen F, Sykes BD, Davies PL, 1996. Effect of type III antifreeze protein dilution and mutation on the growth inhibition of ice. Biophysical journal, 71, 5, 2346-55.
DeLuca CI, Davies PL, Ye Q, Jia Z, 1998. The effects of steric mutations on the structure of type III antifreeze protein and its interaction with ice. Journal of molecular biology, 275, 3, 515-25.
DeVries AL, Wohlschlag DE, 1969. Freezing resistance in some Antarctic fishes. Science, 163, 3871, 1073-5.
Ding XZ, Smallridge RC, Galloway RJ, Juliann G, 1996. Increases in HSF1 translocation and synthesis in human epidermoid A-431 cells: role of protein kinase C and [Ca2+] i. Journal of investigative medicine, 44, 4, 144-53.
Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X, 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. Biology of reproduction, 63, 2, 513-8.
Do H, Lee JH, Lee SG, Kim HJ, 2012. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of an ice-binding protein (FfIBP) from Flavobacterium frigoris PS1. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 68, 7, 806-9.
Esfandiari N, Falcone T, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK, 2007. Heat-shock proteins modulate the incidence of apoptosis and oxidative stress in preimplantation mouse embryos. Fertility and sterility, 87, 5, 1214-7.
Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS, 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 567, 1, 1-61.
Fahy G, 1986. Vitrification: a new approach to organ cryopreservation. Progress in clinical and biological research, 224, 305.
Fahy GM, MacFarlane D, Angell CA, Meryman H, 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. Cryobiology, 21, 4, 407-26.
Flurkey K, Currer JM, 2009. The Jackson Laboratory handbook on genetically standardized mice, Jackson Laboratory, p.
Fuller BJ, Paynter SJ, 2007. Cryopreservation of mammalian embryos. In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Eds: Springer, p. 325-39.
Gabriel SI, Jóhannesdóttir F, Jones EP, Searle JB, 2010. Colonization, mouse-style. BMC biology, 8, 1, 131.
Gibbons A, Cueto M, Bonnet FP, 2011. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. Small Ruminant Research, 95, 1, 61-4.
Goldman JM, Murr AS, Cooper RL, 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology, 80, 2, 84-97.
Graether SP, DeLuca CI, Baardsnes J, Hill GA, Davies PL, Jia Z, 1999. Quantitative and qualitative analysis of type III antifreeze protein structure and function. Journal of Biological Chemistry, 274, 17, 11842-7.
Grasso P, Rozhavskaya M, Reichert Jr LE, 1998. In Vivo Effects of Human Follicle-Stimulating Hormone-Related Synthetic Peptide hFSH-, β-(81–95) and Its Subdomain hFSH-β-(90–95) on the Mouse Estrous Cycle. Biology of reproduction, 58, 3, 821-5.
Guénet J-L, Orth A, Bonhomme F, 2012. Origins and Phylogenetic Relationships of the Laboratory Mouse. In. Eds, p. 3-20.
Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT, 2010. Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. Fertility and sterility, 93, 8, 2602-7.
Harding MM, Anderberg PI, Haymet A, 2003. 'Antifreeze'glycoproteins from polar fish. European journal of biochemistry, 270, 7, 1381-92.

Hassas-Roudsari M, Goff HD, 2012. Ice structuring proteins from plants: Mechanism of action and food application. Food Research International, 46, 1, 425-36.
Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E, (1995). Manipulating the Mouse Embryo, Plainsville, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
Holt W, Del Valle I, Fazeli A, 2015. Heat shock protein A8 stabilizes the bull sperm plasma membrane during cryopreservation: effects of breed, protein concentration, and mode of use. Theriogenology, 84, 5, 693-701.
Hsieh Y-Y, Tsai H-D, Chang C-C, Chang C-C, Lo H-Y, Lai AC, 1999. Ultrarapid cryopreservation of human embryos: experience with 1,582 embryos. Fertility and sterility, 72, 2, 253-6.
Ikwegbue PC, Masamba P, Oyinloye BE, Kappo AP, 2018. Roles of heat shock proteins in apoptosis, oxidative stress, human inflammatory diseases, and cancer. Pharmaceuticals, 11, 1, 2.
Jia Z, DeLuca CI, Chao H, Davies PL, 1996. Structural basis for the binding of a globular antifreeze protein to ice. Nature, 384, 6606, 285-8.
Jinyao L, Ji M, Zhang F, 2005. Recent advances in research of antifreeze proteins. Chinese Journal of biochemistry and molecular biology, 21, 6, 717-22.
Jo JW, Jee BC, Lee JR, Suh CS, 2011. Effect of antifreeze protein supplementation in vitrification medium on mouse oocyte developmental competence. Fertility and sterility, 96, 5, 1239-45.
Jo JW, Jee BC, Suh CS, Kim SH, 2012. The beneficial effects of antifreeze proteins in the vitrification of immature mouse oocytes. PLoS One, 7, 5, e37043.
Johnston D, Oppermann H, Jackson J, Levinson Wt, 1980. Induction of four proteins in chick embryo cells by sodium arsenite. Journal of Biological Chemistry, 255, 14, 6975-80.
Kelley PM, Schlesinger MJ, 1978. The effect of amino acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. Cell, 15, 4, 1277-86.
Khunmanee S, Tharasanit T, Suwimonteerabutr J, Panyaboriban S, Techakumphu M, Swangchan-Uthai T, 2020. On-farm lambing outcomes after transfer of vitrified and slow frozen embryos. Animal Reproduction Science, 106467.
Kiang JG, Tsokos GC, 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. Pharmacology & therapeutics, 80, 2, 183-201.
Kontogiorgos V, Regand A, Yada R, Goff HD, 2007. Isolation and characterization of ice structuring proteins from cold-acclimated winter wheat grass extract for recrystallization inhibition in frozen foods. Journal of Food Biochemistry, 31, 2, 139-60.
Kuwayama M, 2007. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. Theriogenology, 67, 1, 73-80.
Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, Kato O, 2005. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. Reproductive biomedicine online, 11, 5, 608-14.
Lee HH, Lee HJ, Kim HJ, Lee JH, Ko Y, Kim SM, Lee JR, Suh CS, Kim SH, 2015. Effects of antifreeze proteins on the vitrification of mouse oocytes: comparison of three different antifreeze proteins. Human Reproduction, 30, 9, 2110-9.
Leibo S, Martino A, Kobayashi S, Pollard J, 1996. Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. Animal Reproduction Science, 42, 1-4, 45-53.
Leibo SP, 1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. Theriogenology, 21, 5, 767-90.
Levinson W, Oppermann H, Jackson J, 1980. Transition series metals and sulfhydryl reagents induce the synthesis of four proteins in eukaryotic cells. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis, 606, 1, 170-80.
Li GC, Laszlo A, 1985. Amino acid analogs while inducing heat shock proteins sensitize CHO cells to thermal damage. Journal of cellular physiology, 122, 1, 91-7.
Li X, Wang L, Yin C, Lin J, Wu Y, Chen D, Qiu C, Jia B, Huang J, Jiang X, 2020. Antifreeze protein from Anatolia polita (ApAFP914) improved outcome of vitrified in vitro sheep embryos. Cryobiology.
Liang S, Yuan B, Kwon J-W, Ahn M, Cui X-S, Bang JK, Kim N-H, 2016. Effect of antifreeze glycoprotein 8 supplementation during vitrification on the developmental competence of bovine oocytes. Theriogenology, 86, 2, 485-94. e1.
Lim J, Fukui Y, Ono H, 1992. Developmental competence of bovine oocytes frozen at various maturation stages followed by in vitro maturation and fertilization. Theriogenology, 37, 2, 351-61.
Lindquist S, 1986. The heat-shock response. Annual review of biochemistry, 55, 1, 1151-91.

Luo C, Zuñiga J, Edison E, Palla S, Dong W, Parker-Thornburg J, 2011. Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 50, 4, 471-8.

Mayer MP, 2010. Gymnastics of molecular chaperones. Molecular cell, 39, 3, 321-31.

Mazur P, 1996. Principles of medical cryobiology: The freezing of living cells, tissues, and organs. In: Principles of Medical Biology. Eds: Elsevier, p. 355-84.

Meikle MN, Schlapp G, Menchaca A, Crispo M, 2018. Minimum volume Spatula MVD vitrification method improves embryo survival compared to traditional slow freezing, both for in vivo and in vitro produced mice embryos. Cryobiology, 84, 77-81.

Morató R, Izquierdo D, Albarracín JL, Anguita B, Palomo MJ, Jiménez-Macedo AR, Paramio MT, Mogas T, 2008. Effects of pre-treating in vitro-matured bovine oocytes with the cytoskeleton stabilizing agent taxol prior to vitrification. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 75, 1, 191-201.

Movahed E, Soleimani M, Hosseini S, Akbari Sene A, Salehi M, 2019. Aberrant expression of miR-29a/29b and methylation level of mouse embryos after in vitro fertilization and vitrification at two-cell stage. Journal of cellular physiology, 234, 10, 18942-50.

Negulescu PA, Rubinsky B, Fletcher GL, Machen TE, 1992. Fish antifreeze proteins block Ca entry into rabbit parietal cells. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 263, 6, C1310-C3.

Nishijima K, Tanaka M, Sakai Y, Koshimoto C, Morimoto M, Watanabe T, Fan J, Kitajima S, 2014. Effects of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit. Cryobiology, 69, 1, 22-5.

Nolan PM, Peters J, Strivens M, Rogers D, Hagan J, Spurr N, Gray IC, Vizor L, Brooker D, Whitehill E, 2000. A systematic, genome-wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. Nature genetics, 25, 4, 440.

Öztürk AE, Bucak MN, Bodu M, Başpınar N, Çelik İ, Shu Z, Keskin N, Gao D, 2019. Cryobiology and Cryopreservation of Sperm. In: Cryopreservation. Eds: IntechOpen, p.

Panagiotidis Y, Vanderzwalmen P, Prapas Y, Kasapi E, Goudakou M, Papatheodorou A, Passadaki T, Petousis S, Nikolettos N, Veletza S, 2013. Open versus closed vitrification of blastocysts from an oocyte-donation programme: a prospective randomized study. Reproductive BioMedicine Online, 26, 5, 470-6.

Pouysségur J, Shiu RP, Pastan I, 1977. Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation. Cell, 11, 4, 941-7.

Rall WF, Fahy GM, 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at− 196 C by vitrification. Nature, 313, 6003, 573-5.

Rubinsky B, Arav A, Devries A, 1992. The cryoprotective effect of antifreeze glycopeptides from antarctic fishes. Cryobiology, 29, 1, 69-79.

Rubinsky B, Mattioli M, Arav A, Barboni B, Fletcher G, 1992. Inhibition of Ca2+ and K+ currents by" antifreeze" proteins. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 262, 3, R542-R5.

Snell GD, 1941. Biology of the laboratory mouse.

Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Karja NWK, Farhudin M, Dinnyés A, Nagai T, Kikuchi K, 2007. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. Cryobiology, 55, 2, 115-26.

Sönnichsen FD, DeLuca CI, Davies PL, Sykes BD, 1996. Refined solution structure of type III antifreeze protein: hydrophobic groups may be involved in the energetics of the protein–ice interaction. Structure, 4, 11, 1325-37.

Spencer G, 2002. International Team of Researchers Assembles Draft Sequence of Mouse Genome. https://www.genome.gov/10002983/2002-release-draft-sequence-of-mouse-genome, Erişim Tarihi: 03.01.2020.

Succu S, Leoni GG, Berlinguer F, Madeddu M, Bebbere D, Mossa F, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S, 2007. Effect of vitrification solutions and cooling upon in vitro matured prepubertal ovine oocytes. Theriogenology, 68, 1, 107-14.

Sun W-S, Jang H, Kwon HJ, Kim KY, Ahn S, Hwang S, Hwang IS, Lee SG, Lee JH, Lee J-W, 2020. The protective effect of Leucosporidium-derived ice-binding protein (LeIBP) on bovine oocytes and embryos during vitrification. Theriogenology.

Tam PP, Behringer RR, 1997. Mouse gastrulation: the formation of a mammalian body plan. Mechanisms of development, 68, 1-2, 3-25.

Toth TL, Baka SG, Veeck LL, Jones Jr HW, Muasher S, Lanzendorf SE, 1994. Fertilization and in vitro development of cryopreserved human prophase I oocytes. Fertility and sterility, 61, 5, 891-4.
Trott A, West JD, Klaić L, Westerheide SD, Silverman RB, Morimoto RI, Morano KA, 2008. Activation of heat shock and antioxidant responses by the natural product celastrol: transcriptional signatures of a thiol-targeted molecule. Molecular biology of the cell, 19, 3, 1104-12.
Trounson A, Peura A, Kirby C, 1987. Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. Fertility and sterility, 48, 5, 843-50.
Tyshenko MG, Doucet D, Davies PL, Walker VK, 1997. The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein. Nature biotechnology, 15, 9, 887-90.
Üstün NS, Turhan S, 2015. Antifreeze proteins: Characteristics, function, mechanism of action, sources and application to foods. Journal of food processing and preservation, 39, 6, 3189-97.
Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H, 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 51, 1, 53-8.
Vladimirov IK, Tacheva D, Dobrinov V, 2018. The Present and Future of Embryo Cryopreservation. In: Embryology-Theory and Practice. Eds: IntechOpen, p.
Wang Y, Zhang M, Chen Z-J, Du Y, 2018. Resveratrol promotes the embryonic development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal, 54, 6, 430-8.
Ware C, Boland M, 1987. Effect of varying glycerol and sucrose concentration combinations on embryo survival rate in a one-step cryoprotectant removal from frozen-thawed ovine embryos. Theriogenology, 27, 5, 721-8.
Wen Y, Zhao S, Chao L, Yu H, Song C, Shen Y, Chen H, Deng X, 2014. The protective role of antifreeze protein 3 on the structure and function of mature mouse oocytes in vitrification. Cryobiology, 69, 3, 394-401.
Wilson L, Quinn P, 1989. Development of mouse embryos cryopreserved by an ultra-rapid method of freezing. Human Reproduction, 4, 1, 86-90.
Witt D, 2008. Recent developments in disulfide bond formation. Synthesis, 2008, 16, 2491-509.
Wood MJ, Farrant J, 1980. Preservation of mouse embryos by two-step freezing. Cryobiology, 17, 2, 178-80.
Yang J, Zhang H, Gong W, Liu Z, Wu H, Hu W, Chen X, Wang L, Wu S, Chen C, 2020. S-Glutathionylation of human inducible Hsp70 reveals a regulatory mechanism involving the C-terminal α-helical lid. Journal of Biological Chemistry, 295, 24, 8302-24.
Yeh Y, Feeney RE, 1996. Antifreeze proteins: structures and mechanisms of function. Chemical reviews, 96, 2, 601-18.
Yokota Y, Sato S, Yokota M, Ishikawa Y, Makita M, Asada T, Araki Y, 2000. Successful pregnancy following blastocyst vitrification: case report. Human Reproduction, 15, 8, 1802-3.
Zhao XM, Fu XW, Hou YP, Yan CL, Suo L, Wang YP, Zhu HB, Dinnyés A, Zhu SE, 2009. Effect of vitrification on mitochondrial distribution and membrane potential in mouse two pronuclear (2-PN) embryos. Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research, 76, 11, 1056-63.
Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA, 1996. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. Science, 272, 5268, 1606-14.

8. TURNİTİN RAPORU

FARE EMBRİYOLARININ TİPIII ANTIFREEZE PROTEİN VE HUMAN HEAT SHOCK PROTEİN 70 İLE VİTRİFİKASYONU VE ÇÖZDÜRÜLMESİ SONRASI İN VİTRO GELİŞİM ORANLARINA ETKİSİ

Yazar Mustafa Bodu

Gönderim Tarihi: 26-Oca-2021 01:37PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1494628073
Dosya adı: MUSTAFA_BODU_TEZ_SON_HAL.docx (5.69M)
Kelime sayısı: 16965
Karakter sayısı: 110123

FARE EMBRİYOLARININ TİPIII ANTIFREEZE PROTEİN VE HUMAN HEAT SHOCK PROTEİN 70 İLE VİTRİFİKASYONU VE ÇÖZDÜRÜLMESİ SONRASI İN VİTRO GELİŞİM ORANLARINA ETKİSİ

ORIJINALLIK RAPORU

%5	%4	%2	%1
BENZERLIK ENDEKSI	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCI ÖDEVLERI

BIRINCIL KAYNAKLAR

1	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	%1
2	acikerisim.selcuk.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	%1
3	burkonturizm.com İnternet Kaynağı	<%1
4	hdl.handle.net İnternet Kaynağı	<%1
5	Marcion, Guillaume, Renaud Seigneuric, Evelyne Chavanne, Yves Artur, Loïc Briand, Tarik Hadi, Jessica Gobbo, Carmen Garrido, and Fabrice Neiers. "C-terminal amino acids are essential for human heat shock protein 70 dimerization", Cell Stress and Chaperones, 2014. Yayın	<%1

9. ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Karaman'ın Ermenek ilçesinde doğmuştur. İlk öğrenimini Konya Zeliha ve Lütfi Kulluk İlkokulu, Ermenek Şehit Daniş Tunaligil İlkokulu ve Ermenek Zehra Galip Sumra Atatürk İlkokulu'nda; liseyi Ermenek Lisesi'nde okumuştur.

2008 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazanmıştır. 2008 – 2009 Eğitim Öğretim yılında S.Ü. Yabancı Diller Yüksekokulunda 1 yıl ingilizce eğitimi almıştır. Veteriner Fakültesi'nde 5 yıllık eğitimini tamamlayarak 2014 yılında bu fakülteden mezun olmuştur.

2014 yılında S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başlamıştır. 2014 yılının Kasım ayında S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsüne Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır. 2018 yılının Ocak ayında ise S.Ü. Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atanmıştır. Halen Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.