

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DONDURMA ÖNCESİ VE SONRASI OOSİT VE
EMBRİYOLARDA UPR (UNFOLDING PROTEIN
RESPONSE) SİNYAL YOLUNUN ARAŞTIRILMASI VE
PREİMLANTASYON EMBRİYO GELİŞİMİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

İDİL BOZKURT

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2011

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-2008970020

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DONDURMA ÖNCESİ VE SONRASI OOSİT VE
EMBRİYOLARDA UPR (UNFOLDING PROTEIN
RESPONSE) SİNYAL YOLUNUN ARAŞTIRILMASI VE
PREİMLANTASYON EMBRİYO GELİŞİMİNE
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İDİL BOZKURT

Danışman Öğretim Üyeleri:

1-Doç. Dr. Işıl TEKMEN

2- Doç. Dr. Ümit A. Kayışlı

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-2008970020

Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Yüksek lisans programı öğrencisi İdil Bozkurt'un DONDURMA ÖNCESİ VE SONRASI
OOSİT VE EMBRİYOLARDA UPR (UNFOLDING PROTEIN RESPONSE) SİNYAL YOLUNUN
ARAŞTIRILMASI VE PREİMLANTASYON EMBRİYO GELİŞİMİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI Konulu yüksek lisans tezi tarihinde tarafımızdan
değerlendirilerek başarılı/başarısız bulunmuştur.

Doç. Dr. Işıl Tekmen

BAŞKAN

Doç.Dr. Ülker SÖNMEZ

ÜYE

Yrd.Doç.Dr.Nilgün YENER

ÜYE

Prof.Dr. Gülgün OKTAY

YEDEK ÜYE

Doç.Dr. Güven ERBİL

YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR:.....	vi
ÖZET.....	1
SUMMARY.....	4
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	7
2.GENEL BİLGİLER.....	10
2.1. Ovaryum.....	10
2.1.1. Oogenez.....	11
2.1.2. Folikülogenez.....	12
2.1.3. Oosit Maturasyonu.....	14
2.2. Fertilizasyon.....	16
2.3. Erken Embriyo Gelişimi.....	18
2.3.1 Zigotun Yarıklanması.....	18
2.3.2. Blastosist Oluşumu.....	20
2.4. Gamet Kriyoprezervasyonu.....	20
2.4.1. Oositlerin Yavaş Dondurulması ve Vitrifikasyonu.....	23
2.4.2. Embriyoların Yavaş Dondurulması ve Vitrifikasyonu.....	24
2.4.3. Kriyoprezervasyon için Optimum Embriyonik Evre.....	24

2.5. Endoplazmik Retikulum.....	25
2.5.1. Endoplazmik Retikulum Stresi.....	25
2.5.2. UPR (Unfolding Protein Response).....	27
2.5.3. Katlanamamış Proteinlerin Tanınması ve ER Bağımlı Şaperonlar	30
2.5.4. Tunikamisin.....	32
2.5.5. Tunikamisinin Apoptotik Etkisi.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Araştırmanın Tipi.....	34
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	35
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma grupları.....	36
3.4. Çalışma Materyali.....	38
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	39
3.6. Veri Toplama Araçları.....	40
3.6.1. Araştırmada kullanılan Demirbaş Malzemeler.....	40
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler.....	40
3.6.2.1. C57BL/6 farelerden in vivo 2- hücreli embriyoların elde edilmesi ve Blastosist Kültürü.....	40
3.6.2.2. C57BL/6 farelerden oositlerin elde edilmesi.....	41
3.6.2.3. Oositlerin ve Blastosistlerin Dondurulması ve Çözülmesi.....	42
3.6.2.4. İmmünofloresan Tekniği.....	42

3.6.2.5. Western Blot Tekniği.....	43
3.6.2.6. Reverse transkripsiyon PCR Tekniği.....	44
3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi.....	46
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	47
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	48
3.10. Etik Kurul Onayı.....	49
4- BULGULAR.....	50
4.1. UPR sinyal yolağının in vitro preimplantasyon embriyo gelişimi üzerine etkisi.....	50
4.2. UPR sinyal yolağının kısa ve uzun dönem aktivasyonunun preimplantasyon embriyo gelişimine etkisi.....	52
4.3.Preimplantasyon öncesi blastosistlerde dondurma (kriyoprezervasyon) ve çözme işleminin UPR sinyal yolağının aktivasyonuna etkisi.....	54
4.4. Olgun oositlerde dondurma (kriyoprezervasyon) ve çözme işleminin UPR sinyal yolağının aktivasyonuna etkisi.....	58
5. TARTIşMA.....	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
7. KAYNAKLAR.....	70
8. EKLER.....	82

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Yıkama solusyonunun içeriği ve miktarları.....	43
---	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Metafaz II (Olgun oosit)	16
Şekil 2: Fertilizasyon (45).....	18
Şekil 3: Zigotun yarıklanması.....	19
Şekil 4: XBP-1'in aktivasyonu.....	28
Şekil 5: UPR'in sinyal mekanizması.....	32
Şekil 6: Preimplantasyon embriyo gelişimine tunikamisinin ve sikloheksimidin etkisi.....	51
Şekil 7: Kısa ve uzun dönem tunikamisin preimplantasyon embriyo gelişimine etkisi.....	53
Şekil 8: Kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma teknikleri ile dondurulup çözülen blastosistlerde BiP immüno reaktivitesi.....	55
Şekil 9: Kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma teknikleri ile dondurulup çözülen blastosistlerde BiP protein seviyesinin Western blot ile gösterilmesi.....	56
Şekil 10: Vitrifikasyon ve yavaş dondurma tekniği ile dondurulup çözülen blastosistlerde BiP, XBP-1 ve sXBP-1 mRNA seviyesinin RT-PCR tekniği ile gösterilmesi.....	57
Şekil 11: Kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma teknikleri ile dondurulup çözülen oositlerde BiP immüno reaktivitesi.....	59
Şekil 12: Kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma teknikleri ile dondurulup çözülen oositlerde BiP protein seviyesinin Western blot tekniği ile gösterilmesi.....	60
Şekil 13: Vitrifikasyon ve yavaş dondurma tekniği ile dondurulup çözülen oositlerde BiP, XBP-1 ve sXBP-1 mRNA seviyesinin RT-PCR tekniği ile gösterilmesi	62

KISALTMALAR

ATF-6: Activating transcription factor 6

BiP: Binding immunoglobulin protein

BZIP: Basic leucine zipper

CPs: Kriyoprotektan konsantrasyonu

ER: Endoplazmik Retikulum

ERAD: ER associated degradation

FSH: Follicle Stimulating hormone

GnRH: Gonadotropin salgılayıcı faktör

GRP78: Glucose-regulated protein

GV: Germinal Vezikül

ICM: Inner cell mass

ICSI: Intrastoplazmik sperm enjeksiyonu

IRE-1: Inositol-requiring 1 α

IVF: In Vitro Fertilizasyon

KL: Korpus luteum

LH: Luteinizan Hormon

OMI: Oosit maturasyon inhibitörü

PERK: Double stranded RNA dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase

SUZI: Subzonal sperm enjeksiyonu

TE: Trofoektoderm

Tg: Transisyon sıcaklığı

UPR: Unfolded protein Response

XBP-1: X-box binding protein

YÜT: Yardımcı Üreme Teknikleri

ZP: Zona Pellusida

ÖZET

DONDURMA ÖNCESİ VE SONRASI OOSİT VE EMBRİYOLARDA UPR (UNFOLDING PROTEIN RESPONSE) SİNYAL YOLUNUN ARAŞTIRILMASI VE PREİMLANTASYON EMBRİYO GELİŞİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Idil Bozkurt

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı.

AMAÇ

Bu çalışmamızda, ER stresinin preimplantasyon embriyo gelişimine olan etkisini ve dondurma (kriyoprezervasyon) çözme tekniğinin oosit ve embriyolarda yaratabileceği olası ER stresine bağlı olumsuz etkiyi Immünofloresan, Western Blot ve RT-PCR yöntemleri ile incelemeyi amaçladık.

YÖNTEM

Deneyisel modelimiz C57BL/6 dişi farelerden superovulasyonu ve in vivo fertilizasyonu takiben iki hücreli embriyolar toplandı .Embriyolar üç gruba ayrıldı: I. Kontrol n=6, II. Tunikamisin (0.5 µg/ml; n=6), III. Sikloheximid (10 µg/ml; n=6), bu gruplar preimplantasyon süreci boyunca inkübe edildiler (2.günden 4. güne kadar) ve gün gün gruplar arasında karşılaştırmalı gelişim analizi yapıldı. İkinci set deneyimiz, kontrol (n=12), kısa dönem tunikamisin (n=12) ve uzun dönem tunikamisin (n=12) ile inkübe edilen deney gruplarından oluşturularak, kısa süreli yada uzun süreli UPR aktivasyonunun etkisi preimplantasyon embriyo gelişiminde araştırıldı. Benzeri olarak üçüncü set deney gruplarımızda elde edilen iki hücreli embriyolar ve olgun oositler 3 gruba ayrıldı; I. grup kontrol, II. grup vitrifikasyon grubu, III. grup yavaş dondurma grubu. Oosit ve embriyolar morfolojik değerlendirmeyi takiben ER stress molekülleri olan BiP ile protein düzeyinde ve BiP, XBP-1 ve sXBP-1 ile de mRNA seviyesinde analiz edildi.

BULGULAR

Sikloheksimid grubundaki embriyoların preimplantasyon embriyo gelişim süreci boyunca iki hücreli aşamada kaldıkları gözlenirken, kontrol ve tunikamisin gruplarındaki embriyoların preimplantasyon üçüncü günde 8 hücreli aşamayı takiben morfolojik bir fark olmaksızın kompaksiyon düzeyine geldikleri gözlemlendi. Dördüncü günde ise kontrol grup embriyoların hepsi blastosist aşamasında iken tunikamisinli medyum ile inkübe edilen embriyoların hiçbirinin blastosist aşamasına gelemediğini gözlemledik. Dahası kontrol, kısa dönem ve uzun dönem tunikamisinle inkübe edilen embriyolarda blastosist formasyon oranı sırasıyla; %100, %33, ve %0 idi. Vitrifikasyon ve yavaş dondurma ile dondurulup çözölen oosit/embriyolarda kontrol gruplarına oranla daha yüksek BiP immüno reaktivitesi saptandı. Western blot analizi sonucunda dondurulup çözölen oosit/embriyolar da dondurulmamış gruplardaki oosit/embriyolara oranla daha yüksek BiP protein seviyesi gözlemlendi ve buna ek olarak RT-PCR analizlerinde dondurulup çözölen oositler/embriyolarda daha yüksek BiP ve sXBP-1 seviyesi saptandı. Ayrıca, yavaş dondurulup çözölen embriyolarda Immünofloresan, Western blot ve RT-PCR analizlerinde vitrikasyon ile dondurulup çözölen embriyolara oranla daha yüksek BiP seviyesi saptandı.

SONUÇ

Sonuçta bulgularımız, gelişim sürecindeki embriyoların UPR sinyal yolağını aktive edebilen ER stresinin, preimplantasyon embriyo gelişim sürecine olan etkisinin çok büyük olduğunu göstermiştir. Kısa veya uzun dönem UPR sinyal moleküllerinin aktivasyonu embriyoların kompaksiyon aşamasından sonra gelişimlerini duraklatmaktadır. Dondurma çözme deneylerimiz sonrasında oosit ve blastosistlerin ER stresi aracılı UPR sinyal yollarının aktive olmasının preimplantasyon gelişimide etkisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: UPR, ER stresi, BiP, sXBP-1, preimplantasyon embriyo, oosit, vitrifikasyon, yavaş dondurma

SUMMARY

The Investigation of UPR (UNFOLDING PROTEIN RESPONSE) Signaling Cascade in Oocyte and Embryos Before and After Cryopreservation and Its Impact on Preimplantation Embryo Development.

Idil Bozkurt

Department of Histology & Embryology, Institute of Health Sciences, Dokuz Eylül University.

PURPOSE

In this thesis, we aimed to investigate the comparative impact of endoplasmic reticulum (ER) stress in normal mature oocyte and preimplantation embryo development and in differently cryopreserved oocytes and preimplantation embryos using Immunofluorescence staining and Western blot techniques at the protein level and RT-PCR technique at the RNA level.

MATERIAL-METHOD

We used C57BL/6 female mice for our experimental animal model. Following standard superovulation protocol and in vivo fertilization in C57BL/6 mice embryos at two cell stage were collected. Embryos were then divided into 3 groups; I. Control (n=6), II. Tunicamycin (0.5 µg/ml; n=6) and III. Cycloheximide (10 µg/ml; n=6) and incubated in vitro conditions during the preimplantation period (from day 2 to day 4) to achieve the comparative development analysis among the groups in a day to day basis. In the second set of the experiments embryos in two cell stage were divided into three groups; I. control (n=12), II. short time exposure (4 h) of tunicamycin and III. long time exposure (72 h) of tunicamycin to investigate the role of short- and long-term effects of UPR stressors on preimplantation embryo development. Similarly, in the third set of our experiments embryos and mature oocytes (MII) from obtained in vivo conditions as described above

were analyzed in three groups as I. Control (no freezing-thawing procedure), II. Vitrification and III. Slow freezing-thawing groups. Following morphological evaluation embryos and oocytes in all groups were analyzed for ER stress molecules BiP at the protein and mRNA level and XBP-1 and sXBP-1 at the mRNA level.

RESULTS

Embryos treated with cycloheximide were arrested at two cells stage during the preimplantation development while control and tunicamycin groups were first divided to 8-cell stage and then followed with compaction stage without significant morphological differences between these two groups. However, there was a significant difference in the number of blastocyst formed between two groups on the day of blastocyst formation (on day 4). None of tunicamycin-treated embryos could achieve blastocyst formation with a clear inner cell mass and outer cell mass while almost all embryos in the control group could reach to the blastocyst stage. Moreover, blastocyst formation rate in control, short-term and long-term tunicamycin treated groups was 100%, 33% and 0%, respectively. In RT-PCR analysis, sXBP-1 mRNA level was significantly increased with long-term tunicamycin treatment compared to short-term and control groups. Embryos and oocytes cryopreserved with both slow freezing and vitrification techniques showed higher BiP immunofluorescence staining compared to that of control embryos and oocytes. Moreover, BiP expression was increased in both protein and RNA level in slow frozen and vitrified oocytes and embryos compared to that in control oocytes and embryos as determined by Western blot and RT-PCR. Compared to XBP-1 form, sXBP1 was predominant with significantly higher level in frozen-thawed oocytes and embryos compared to that in control oocytes and embryos. Moreover, embryos from slow freezing group showed higher BiP expression compared to embryos from vitrification group.

CONCLUSION

In conclusion, these results suggest that activation of ER mediated UPR signaling in developing preimplantation embryos is extremely important to complete preimplantation development. Either long-term or short-term activation of UPR mediated signaling molecules prevents the embryos to progress from compacting stage to blastocyst stages suggesting that even a short time activation of ER stress molecules could inhibit embryonic cell differentiations. Our freeze-thaw experiments also suggest that these processes could activate ER-mediated UPR signaling and in turn could have a negative impact on later stage of preimplantation embryo development.

Keywords: UPR, ER stress, BiP, sXBP-1, preimplantation embryo, oocyte, vitrification, slow freezing

1. GİRİŞ VE AMAC

İnsanda ilk in vitro fertilizasyon uygulamasından itibaren, yardımcı üreme tekniklerini (YÜT) kullanan hasta sayısı hızla artış göstermiştir. 30 yılı aşkın süredir, infertilite tedavisi, değişikliğe uğramış yeni yardımcı üreme tekniklerinin gelişimi ile sağlanmaktadır. 1978’de ilk in vitro fertilizasyon (IVF) bebeği olan Louise Brown doğmuştur (1), daha sonra intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu (2) (ICSI) yöntemi ve son dönemlerde ‘preimplantasyon genetik tanı’ bir teknik (3-5) olarak gelişmiştir. Bu kompleks teknolojiler bütün dünyada artış göstermekte olan infertilite tedavisi gören hastalarda uygulanmaktadır. Dünya çapında 1 milyondan fazla bebeğe YÜT teknikleri kullanılarak gebe kalınmıştır. (6)

İnsan oositlerinin ve embriyolarının kriyoprezervasyonu YÜT’ de uzun zamandan beri kullanılmakta olan bir yöntemdir. Kriyoprezervasyon sonucu ilk gebelik 25 sene önce elde edilmiştir(11). IVF siklusu sonrasında arta kalan fazla oosit yada embriyoların dondurulup saklanması hormon verilmeden ve oositlerin toplanması gibi invazif bir işleme gerek duyulmadan tekrar transfere olanak sağlamaktadır. Ayrıca erken menopoza, cerrahi girişimler yada kemoterapi/radyoterapi gibi ovaryum işlevinin kaybolmasına yol açabilecek işlemler uygulanmadan önce oosit yada embriyoların dondurulup saklanması hem hastaya hem de klinisyene avantaj sağlamaktadır.(12)

Endoplazmik Retikulum(ER) dallı tübüllerden ve yassılaştırmış keselerden oluşan, bütün ökaryotik hücrelerde bulunan bir hücre organelidir. Hücrenin sitoplazması boyunca uzanır ve sınırını çekirdek kılıfı belirler. ER, proteinlerin biyosentezinden, katlanmasından, paketlenmesinden ve çözünebilir hücre membran proteinlerinin modifikasyonundan sorumludur.(13). Yaklaşık %33 oranında yeni sentez edilmiş proteinler ER lümenine taşınırlar. ER lümenindeki bu yeni proteinler hedeflenen farklı organellerin yapısına katılmadan yada hücre yüzeyine taşınmadan önce 3 boyutlu hale getirilerek katlanırlar.

Proteinlerin katlanma gereksinimleri fizyolojik durumlara bağılı olarak artar yada azalır ve bu gereksinim ER'un proteinleri katlama kapasitesi ile sıkı sıkıya bağılantılıdır. Ancak bir stres uyarını katlanan proteinlerin arasındaki reaksiyonu bozabilir ve bu da ER'un protein katlama yükü ve kapasitesi arasında uyumsuzluk yaratabilir. Bunun sonucunda ER lümeninde katlanmamış proteinler birikir. Bu durum 'ER stresi' olarak adlandırılır. Proteinlerin katlanmasının devamlılığı ve katlanmamış proteinlerin birikiminin önlemesi için hücreler; UPR (Unfolded Protein Response) olarak adlandırılan, ER bağımlı hücresel bir cevabı tetikler. UPR, ER'un stres durumlarıyla başa çıkabilmesi ve bu durumlarda meydana gelen protein katlanma hatalarının çözömlenmesi için hücrenin transkripsiyonel ve translasyonel programlarını düzenlenmesi için aktive olan hücresel bir süreçtir (14,15).

Memeli hücreleri UPR efektörü olarak fonksiyon gösteren 3 tane ER transmembran protein kinazı içerirler. Bunlar: IRE1- α (inositol-requiring 1 α), PERK (double-stranded RNA dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase) ve ATF6 (activating transkription factor 6) (14,15). PERK'in aktivasyonu ökaryotik translasyon başlatma faktörü 2 α (eIF2 α) ve translasyon inhibitörünün fosforilasyonuna öncülük eder (16,17). Buna ek olarak PERK'in otofosforilasyona öncülük eden kinaz aktivitesi, IRE1 aynı zamanda X-box bağılayıcı protein (XBP1) 1 mRNA'yı uçuca bağılayan endoribonukleaz aktivitesini gösterir. Bu da aktif transkripsiyon faktörü XBP1'in üretimine yol açar (18,19). UPR'in ATF-6 aracılı kısmı, XBP1 mRNA'sının salınımının çok yüksek artması sonucunda ortaya çıkan IRE1 ile düzenlenir.

UPR aktivasyonundan sonra hücre döngüsü öncelikle G1 fazında duraklamaktadır (20). G1 fazının ilerlemesi için, bir yada birden fazla D tipi siklinlerin (D1,D2,D3) CDK4 veya CDK6 ile etkileşime girerek aktive olması gerekmektedir, bunu siklin E ve A'nın bağımsız kinaz CDK2 aktivasyonu takip eder. Bu sırada hücreler G1/S geçişindedir (21). G1 fazında duraklama ile indüklenen ER stresinin, D1 siklin spesifik proteinin eksikliğinin D1 siklin translasyonunu inhibe etmesi ile ortaya çıktığına işaret etmektedir (20). Son

günlerde bildirilen başka bir gelişme de UPR aktivasyonunun siklin D1 in oluşumuna aracılık etmek ve hücre döngüsündeki duraklamayı ilerletmek için yeterli olduğu yönündedir (22).

Yapılan çalışmalarla dondurulup saklandıktan sonra çözülen oositlerin ve embriyoların sağ kalımlarının, döllenme oranlarının, erken bölünme oranlarının ve blastosist oluşturma oranlarının dondurulma işlemine tabi tutulmadan kültürü yapılan aynı aşamadaki oositler ve embriyolara göre anlamlı şekilde düşük olduğu gösterilmiştir (25). Bizim hipotezimiz dondurulup çözülen oosit ve embriyolarda UPR sinyal yolunun aktive olduğu ve bu nedenle oosit ve embriyo gelişiminden sonraki evreleri negatif etkilediğidir.

Bu projede preimplantasyon embriyonal gelişiminde ve dondurma işleminde meydana gelebilecek olası UPR'ın etkisi araştırılacaktır. Böylece bu projenin sonunda dondurulmuş embriyolarda bu yolağın aktive olduğunun ispatlaması, daha sonra yapılacak araştırmalarda bu sinyal yolunu inhibe eden faktörler ile dondurulup çözülen embryo/oositlerin gelişim kalitelerinin artırılması ve tüp bebek merkezlerindeki bu konudaki temel problemin çözümüne alternatif yaklaşımlar getirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

Doğum yapmamış kadınlarda ovaryum çift, badem şeklinde, pembe-beyaz bir yapıdadır. Uzunluğu 3 cm, genişliği 1,5 cm ve kalınlığı da yaklaşık 1 cm'dir. Menopoz sonrası kadınlarda ovaryum üreme yaşamındaki boyutunun ¼ boyutuna geriler. Puberteden önce ovaryum yüzeyi düzgün iken üreme yaşamı boyunca tekrarlayan ovulasyonlar nedeniyle düzensiz bir hal alır.

Organı en dıştan tek katlı yassı ya da kübik hücrelerden oluşmuş germinatif epitel çevreler. Ovaryumun yüzeyini örten germinatif epitel gençlerde tek katlı kübik, ileri yaşlarda ise tek katlı yassıdır. Epitelin altında sıkı bir bağ dokunun oluşturduğu tunika albuginea bulunur (27, 38).

Ovaryum morfolojik olarak iki farklı bölümden oluşur. Bunlar, dışta medulla ve içte korteks bölgesidir (26). Ovaryumun merkezi bölümünü oluşturan medulla, gevşek bağ dokusu içinde damardan zengin bir yapı gösterir (26, 27). Medulla bölgesinde çok sayıda bulunan damarlardan baska hilus hücreleri, düz kas hücreleri ve sinir teli demetleri bulunur. Organın periferik bölümünü korteks oluşturur. Ergin dişilerde kortekste, hücreden zengin bağ doku içine gömülü farklı gelişme dönemlerine ait çok sayıda follikül bulunmaktadır. Ayrıca, rüptüre olmuş atretik folliküller, korpus luteum, korpus albicans, intersitisyel hücreler ve bağ doku hücreleri bulunur. (27) Çocukluk çağındaki ovaryum korteksinde primordial foliküller çok sayıda iken; seksüel olgunluğa erişmiş kadınlardaki ovaryum korteksinde ise rüptüre foliküllerin yerini alan korpus luteum' lar çoktur.

Ovaryumlar, dışıde gametlerin üretilmesi (gametogenesis) ve steroid yapıdaki hormonların sentezlenip salgılanmasıyla yükümlüdür.

Östrojen, iç ve dış genital organların gelişmesi büyümesi ve olgunlaşması için gereklidir. Ayrıca dışı seks karakterlerinin özelliklerinin

belirlenmesinde, meme bezlerinin gelişmesinde ve yağ dokusunun birikiminin yönlendirilmesinde rol oynar (29).

Progesteron hormonu, fertilizasyondan sonra uterus endometriyumunu implantasyona ve gebeliğe hazır duruma getirir. Gebeliğin daha ileri dönemlerinde de, meme bezlerini lobüler proliferasyon ile laktasyon dönemi için hazırlar. Fertilizasyon ve implantasyon olmaması halinde progesteron hormonunun eksikliği; uterus endometriyumunun stratum fonksiyonalis kısmının dejenere olarak menstruasyon ile atılmasına neden olur. Her iki hormon da uterusu implantasyona hazırlayarak menstrual siklusta önemli rol oynar . Etkileri, döngüsel değişikliklerin düzensizleşip, zaman içinde tamamen kaybolduğu süreye (menapoz) kadar azalarak devam eder (29).

2.1.1. Oogenez

İlkel dişi üreme hücrelerinin gelişip olgunlaşmasına oogenez denir. Oogenezin erken basamakları mitotik aktivite ile oogonia sayısının arttığı fetal yaşamda gerçekleşir. Doğumda kortekste bulunan oositler gelişimin birinci mayoz bölünmesindedirler. Ovaryumlardan olgun bir oositin oluşturularak atılması (ovulasyon) pubertede başlar ve menapoza kadar devam eder. Puberte boyunca küçük folikül grupları siklik olarak büyüme ve gelişim gösterirler. İnsanda ovulasyon menstrüasyonun başlangıcından itibaren 13-14. günlerde gerçekleşir ve her 28 günde bir oositin atılmasıyla tekrarlanan bu olaylar ovarian siklus olarak bilinir.

,Ovarian siklus 3 fazdan oluşur;

1- Folikül büyüme ve gelişiminin görüldüğü foliküler faz,

2- Ovulasyon,

3- Korpus luteum (KL) oluşumuyla birlikte durağan bir sürecin gözlemlendiği luteal faz (31).

2.1.2. Folikülogenez

Folikülogenezin en önemli amacı ovulasyon ve fertilizasyon için olgun yumurta hücresi üretmektir (30). Folikülogenezin sürekliliğini sağlayan üç mekanizma vardır; oosit büyümesi, granüloza hücre bölünmesi, tekanın gelişmesi. Folikülogenez; oositlerin, çevresini saran somatik hücre tabakası granüloza hücreleriyle birlikte gelişip büyüdüğü sürekli bir gelişim işlemidir (30-32). İnsanda folikülogenez fetal hayatta başlar. Yirminci hafta civarlarında gelişmekte olan ovaryumlar içerisinde primordiyal germ hücreleri (oogonia) popülasyonu artmaya başlar. Bunlar, doğumdan birkaç hafta öncesine kadar mitoz ile sürekli olarak bölünürler. Bu süreden sonra, yeni oositler üretilmez. Gestasyonun ortalarında yaklaşık yedi milyon germ hücresi vardır, ancak ileri gestasyona kadar programlı hücre ölümü nedeniyle sayıları dramatik olarak azalır. Bu durumda, insan dişi yenilenemeyen yaklaşık bir-iki milyon oosit ile doğar. Puberteye kadar ovaryumda 400.000 oosit kalır (33).

Erken gestasyon döneminde, pek çok fetal oogonia mayoza girerek birinci profaza kadar ilerler ve bloke olur. Bu hücreler, oosit olarak ifade edilirler ve büyüme aşamasına başlayana kadar 50 yıla yakın süre profaz aşamasında kalabilirler. Küçük çaplı bir oosit ve pregranüloza adı verilen bazal membran üzerinde yerleşmiş tek tabaka yassı epitel hücrelerinden oluşan bu yapı primordiyal folikül olarak tanımlanır. Toplam sayı yaşla birlikte azalsa da dişi ovaryumundaki en fazla folikül her zaman, primordial aşamaya aittir.

Büyümenin erken aşamasında primer folikül oluşumu gözlenir. Granüloza hücreleri kübik şekil alır ve hücre bölünmesi gözlenir. Bunun ardından, oositi çevreleyen granüloza hücre tabakası sayısı artar ve folikül preantral aşamaya ulaşır. Granüloza hücreleri oosit maturasyonu için gerekli çeşitli büyüme faktörlerini salgılamaya başlarlar. Aynı zamanda folikül çevresindeki bağ dokusu da farklılaşarak teka folikülü adını alır (35). Granüloza hücrelerine yakın olan hücresel tabaka teka interna, stroma ile kaynaşan dış tabaka ise teka eksterna olarak adlandırılır. Çapı artmakta olan oosit,

granüloza hücreleri ile birlikte nonsellüler bir matriks sentezler. Zona pellusida (ZP) denilen bu yapı homojen ve mukopolisakkaritlerden zengin bir madde içerisinde, oositin ve granüloza hücrelerinin yüzeyinden çıkarak birbirine doğru uzanan mikrovillusları bulundurur. Folikül çapı arttıkça ZP kalınlaşır (36).

Folikül antral seviyeye ulaştığında, oositin olgun hacmi yaklaşık 120 µm çapa kadar ulaşır. Granüloza hücre sayılarının oldukça arttığı ve oositin tam olarak geliştiği durumda, sıvı dolu boşluk (antrum) gözlenir ve genişlemeye başlar. Erken antral aşamada gözlenen küçük boşluklar, folikül preovulatuvar aşamaya ulaştığında birleşir ve tek, büyük bir boşluk halini alır. Bu aşamadaki folikül Graaf folikülü olarak isimlendirilmektedir. Granüloza hücreleri folikülün periferinde birkaç tabaka şeklinde yerleşir ve membrana granüloza tabakası olarak adlandırılırlar. Bir kısım granüloza hücreleri ise oositin etrafını sararlar ve oosite yakın olanlar korona radiata, geri kalanlar ise kümülüs hücreleri şeklinde tanımlanırlar. Folikül rüptüre olup ovulasyon gerçekleşeceği anda olgun oosit, korona ve kümülüs hücreleriyle birlikte atılır (36).

Pubertenin başlamasıyla hipotalamustan salgılanan gonadotropin salgılayıcı faktör (GnRH), hipofizer portal sistem yolu ile hipofiz bezinin ön lobuna taşınarak, folikül stimule edici hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) gibi gonadotropik hormonların ön lop hücrelerinden salgılanmasını stimule eder. Her bir siklusun başlangıcında yükselen FSH etkisiyle bir grup antral folikül uyarılmakta ve Graaf folikül aşamasına doğru ilerlemesi gerçekleşmektedir. Foliküllerin gelişimi endokrin ve parakrin faktörlerin kontrolündedir. Foliküller primordial, primer ve antral aşamalara kadar gelişir. Antral aşamada çoğu folikül atreziye uğrar, çok azı ise siklik gonadotropinlerin uyarımı ile preovulatuvar aşamaya ulaşır. Bu Graaf foliküller reproduktif dönemdeki kadında ovaryan östrojenlerin ana kaynağıdır. Preovulatuvar gonadotropin salınımına cevap olarak her siklusta dominant Graaf folikül, fertilize olabilecek matur oositi LH'nin etkisi ile dışarı atar. Kalan teka ve granüloza hücreleri, korpus luteum oluşturmak üzere değişikliğe uğrar (35).

2.1.3. Oosit Maturasyonu

Oosit maturasyonu; doğum öncesi olgunlaşma (prenatal maturasyon) evresi ve doğum sonrası olgunlaşma (postnatal maturasyon) evresi olarak ikiye ayrılabilir.

Oosit maturasyonu hem mayotik siklus ilerlemesini hem de sitoplazmik olayların yeniden düzenlenmesini içeren kompleks bir süreçtir. İn vivo'da maturasyonun son noktası matur (MII) oositin folikülden salınmasıdır (37). İlk dişi üreme hücresi olan oogonia yumurtalıklarda tekrarlayan mitozlarla çoğalıp primer oosite dönüşür. Primordiyal üreme hücrelerinin dişi gonada ulaşp, oogonyumlara farkanması ve primer oositi içeren primordiyal folliküllerin oluşması süreci prenatal maturasyon evresi olarak adlandırılır. Primer oosit, etrafı folikül hücreleri ile çevrili olarak primordiyal folikül içinde gelişir (37). Oositin içinde bulunduğu bu ortam oositin büyüme ve gelişimi için gereken faktörleri içerir ve aynı zamanda çevresinde bulunan bağ dokusuyla olan bağlantısını da gerçekleştirir. Oositler büyüme ve gelişimlerini ovaryumlardaki bu foliküler ortamlarda tamamlayarak olgunlaşır. Olgunlaşan oositler döllenebilme ve embriyonik gelişime devam edebilme yeteneği kazanır (33).

Doğum sonrası olgunlaşma süreci ise postnatal maturasyon olarak adlandırılır. Doğumda, tüm primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz safhasındadır. Ancak, bölünmenin metafaz ile devam etmesi gerekirken, primer oositler çekirdek kromatinin seyrek ve düzensiz bir yapılaşma gösterdiği birinci mayoz bölünmenin profaz safhasının diploten evresine girerler ve puberteye kadar dinlenme halinde kalırlar. Bu süre boyunca, oositin olgunlaşması, follikül hücreleri tarafından salgılanan oosit olgunlaşmasını inhibe eden bir madde olan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) tarafından baskılanır. Maturasyonun germinal vezikül (GV) aşamasında kabul edilen oositler ovulasyona kadar hücre siklusunun G0 olarak adlandırılan dinlenme aşamasında bekler. Bu sürede büyüme ve gelişimleri sırasında mayozun yeniden tamamlanması için nükleer lokalizasyon ve hücre siklus regülatör

proteinlerinde belirgin artışlara ve bunu izleyen translasyonel ve post-translasyonel modifikasyonlara gereksinim vardır (38,39). Bu aşamada, hücre bir takım nükleer ve sitoplazmik değişiklikler geçirir. Oosit ancak bu aşamaları geçtikten sonra fertilizasyona hazır hale gelebilmektedir.

Oositin nükleer matürasyonu esnasında mayoz yeniden başlar ve Metafaz II'ye geçiş olur. Bu sırada uzun süre folikül içerisinde bekleyen oositler hem mayozu yeniden başlatabilme yeteneği, hem de mayotik matürasyonu tamamlamayı sağlayacak protein ve RNA yükünü kazanırlar (40). Preantral foliküllerde bekleyen oositler, mayozu yeniden başlatabilme yeteneğine sahip değildir. Ovulasyonun hemen öncesinde, henüz olgunlaşmamış oosit nükleusunun bozulması (germinal vezikülün dağılması) ile Metafaz I'i tamamlayarak Anafaza giriş yapar ve Metafaz II'ye (MII) ulaşarak, fertilizasyona kadar bu aşamada dururlar (41).

Sitoplazmik matürasyonda ise, oositin fertilizasyon ve erken embriyo gelişimi (preimplantasyon) için hazırlandığı ve mayotik ilerleme ile doğrudan ilgisi olmayan diğer matürasyon olayları gerçekleşir (42,43). Bu aşamada oositin sitoplazması ve organellerinin iç yapısında değişiklikler gerçekleşir (41). Bu şekilde inhibitör bir foliküler ortamda bekleyen oositlerde, foliküllerdeki in vivo luteinizan hormon (LH) artışına bağlı olarak bir 'pozitif sinyal' gelişir. Bu sinyal foliküler inhibisyonu ortadan kaldırarak, primer oositin sitoplazmasının asimetrik olarak bölünüp, farklı büyüklükte iki hücre oluşturmaya yol açar (44,45). Büyük olan sekonder oosit (Metafaz II), küçük olan ise kutup cisimciği (polar cisimcik) olarak adlandırılır. Bu haliyle oosit artık tam olarak fertilizasyon için hazır durumdadır (Şekil1). Fertilizasyonla birlikte ikinci kutup cisimciği de oluşur ve oluşa zigot mitoz bölünmeler geçirerek hücre sayısını artırmaya devam eder (45).



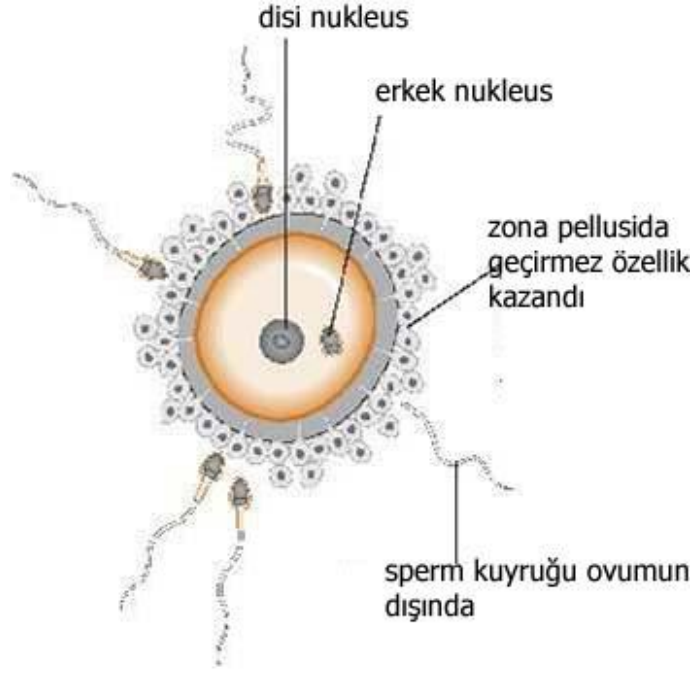
Şekil 1. Metafaz II (olgun oosit) (116)

2.2. Fertilizasyon

Fertilizasyon; ovaryumdan ovulasyonla atılan oositin normalde tuba uterinanın 1/3 lük üst ampullar bölgesinde spermatozoonla karşılaşması ve onunla birleşmesine denir. Ovulasyon esnasında, tuba uterinanın açık olan infundibulum bölgesinde fimbrialar ovulasyon yapılacak bölgeye kayarlar. Sertleşen fimbrialar geniş bir alanda oositi yakalayarak tuba uterinanın içine çekerler. (29).

Ejakulat içinde bulunan 350-400 milyon kadar spermatozoon fertilizasyon yönüne doğru (vajina , serviks uteri, uterus ve tuba uterina) harekete geçerler. Vajinanın asidik ortamından kısa zamanda kurtulan spermatozoonlar uterusun bazik ortamına geçerler. Spermin oositi fertilize edebilme potansiyeli kazanması için, kadın genital sistemi içerisine girdikten sonra kapasitasyon denilen bir süreç geçirmesi gereklidir. Kapasitasyon neticesinde spermdede, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu gelişir. Akrozom reaksiyonu; spermin zona pellusidaya bağlanmasının ardından zona proteinleri tarafından başlatılır. Bu reaksiyon, zona pellusidanın penetrasyonu için gerekli olup, aralarında tripsin-benzeri maddelerin ve akrozinin de bulunduğu bazı enzimlerin salgılanmasıyla gerçekleşir. Akrozomal reaksiyon spermlerin oositle karşılaştıkları dönemde geçirdikleri bir süreçtir.

Spermatazoonlar, korona radiata ile sarılı sekonder oosit ile karşılaştığında korona radiata hücrelerini geçmek için, akrozomundan salgılanan hiyaluronidaz enzimi ile bu hücrelerin bağlayıcı biyokimyasal yapısını bozarlar ve sonrasında, zona pellusidayı da geçerek sekonder oosite ulaşırlar. Spermatazoonlar zona pellusida reseptörlerine bağlanabilir, böylece akrozom membranı füzyonu ile akrozomal enzimler (hiyaluronidaz, nörominidaz, aril sülfataz, akrozin, asit fosfotaz, fibrolizin, fibrojenaz, fruktoz, proteaz) zona pellusidaya nüfuz eder (28). Zona pellusidanın geçirgenliği, sperm başının oositin yüzeyine temas etmesiyle değişikliğe uğrar. Buradaki ekstrasellüler glikoprotein örtünün içeriği fertilizasyondan sonra değişir. Bu temas ile, oositin plazma membranının altındaki kortikal granüllerden lizozomal enzimler salgılanır. Bu enzimler de, sperm penetrasyonunu engellemek ve zona yüzeyinde sperm için türe özgü reseptör bölgelerinin inaktivasyonunu sağlamak için, zona pellusidanın özelliklerinde bazı değişiklikler yaratırlar (zona reaksiyonu) (Sekil 2). Zona pellusida içinde gömülü baska spermlere de rastlanmasına rağmen, bunlardan ancak bir tanesi oositin içine girebilir (47).



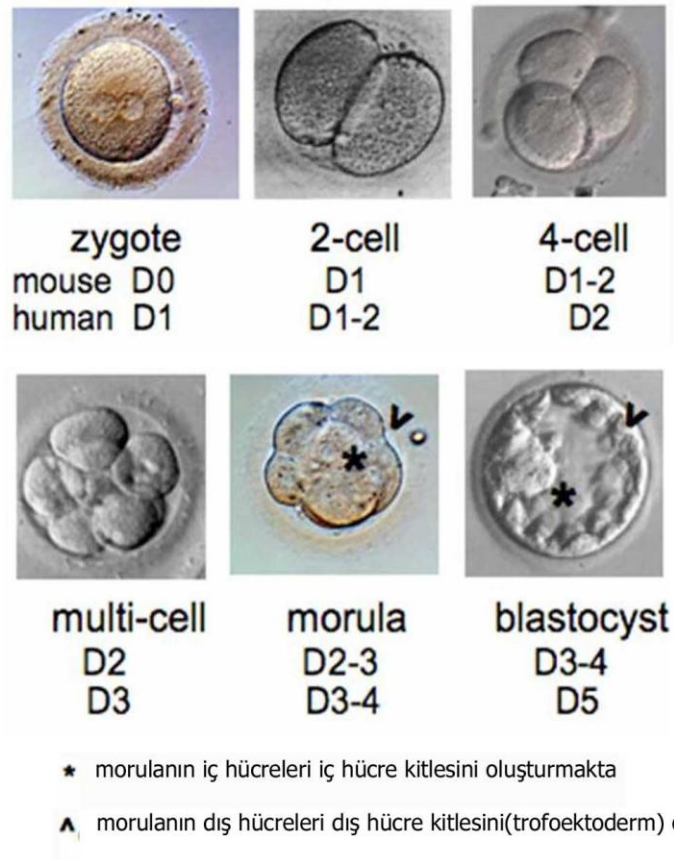
Şekil 2. Fertilizasyon (50)

2.3. Erken embriyo gelişimi (preimplantasyon)

2.3.1. Zigotun yarıklanması

Zigot; iki hücreli evreye ulaştıktan sonra, bir seri mitotik bölünmeye girerek hücre sayısını hızla arttırmaktadır. Klivaj adı verilen bu dönemde, her yarıklanma sonrasında, hacmi giderek küçülen bu hücrelere blastomer denir. (sırasıyla iki, dört, sekiz, blastomer şeklinde devam eder). Bu dönem, pronükleusların birleşmesi sonrası oluşan embriyoya ait genomun da devreye girdiği dönemdir. Normal olarak yapılanmamış bir genoma sahip embriyoların çoğu bu dönem sonrası ileri gelişim göstermezler (46). Hücreler arası bağların (sıkı bağlantılar, tutucu bağlantılar ve oluklu bağlantılar) kuvvetlenerek arttığı bir dönemdir. Bu bağların bir kısmı hücreleri birbirine sıkıca bağlayarak geçirgen olmayan bir tabaka oluştururken diğer bir kısmı seçici olarak bazı moleküllerin taşınmasını ve böylece ileri embriyo gelişim döneminde hücreler arası sinyal mekanizmalarının oluşumu sonucu gerçekleşen başkalaşimleri sağlarlar. Morula (kompaksiyon) olarak da adlandırılan bu dönemde artık

hücrelerin sınırlarını belirlemek zordur (Şekil 3) (48). Blastomerler şekil değiştirir ve embriyo 16-32 hücreli sıkı bir kitle haline gelir. Bu aşamadaki bir embriyo morula adını alır. İmplantasyon öncesi embriyo (preimplantif embriyo); morula evresi; fertilizasyondan 3 gün sonra oluşur ve uterusu gelir (47).



Şekil 3. Zigotun yarıklanması (48)

2.3.2 Blastosist oluşumu

Morula tuba uterina'dan uterusu ulaştığında preimplantif embriyoda oluşan sıvı dolu blastoselin genişlemesi ile bir kese-blastosist kesesi oluşur. Bu değişim morulayı blastosiste dönüştürür. Blastosist, uterus boşluğunda bir veya iki gün kalırken daha ileri değişimlerin hazırlığını yapar ve bu esnada zona pellusida'yı kaybeder. Merkezde bulunan ve embriyoblastlardan oluşan hücreler-iç hücre kitlesi (inner cell mass-ICM), embriyonun başlangıcı veya taslağıdır. Birde bu hücre grubunu çevreleyen trofoblastlardan oluşan bir dış hücre kitlesi trofoektoderm (TE)'den meydana gelmiştir. İç hücre kitlesinden embriyonun dokuları, dış hücre kitlesinden de daha sonra plasentayı oluşturacak olan trofoblastlardan farklılaşan embriyo dışı yapılar gelişir (49).

2.4. Gametlerin dondurulması(kriyoprezervasyonu)

İnsan oositlerini ve embriyolarının kriyoprezervasyonu YÜT' te uzun zamandan beri kullanılmakta olan bir yöntemdir. IVF siklusu sonrasında arta kalan ekstra oosit yada embriyoların daha sonra tekrar transfer edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Taze oosit ve embriyolar ile karşılaştırıldığında düşük gebelik ve canlı doğum oranı eldirmesine rağmen kriyoprezervasyon YÜT ile bütünleşen bir teknik olarak sayılmaktadır.

Oosit ve embriyo kriyoprezervasyonu şu anda iki temel teknik ile hüküm sürmektedir. İlk gelişen teknik yavaş dondurmadır (50,51,52,53). Bu tekniği takiben, embriyolar derceli olarak nispeten düşük konsantrasyonlarda kryoprotektanların nüfuzuna maruz bırakılmıştır. Bu kryoprotektanlar sıklıkla hücre kültür medyalarına eklenen oositler için 1.0- 1.5M, embriyolar için ise 1.35- 1.5M aralığında kullanılan gliserol ve dimetil sülfoksit (DMSO) dur. Diğer kriyoprotektanlarda tek başlarına veya farklı kombinasyonlarda yaygın bir kullanıma sahiptir. Bunlar permabil olarak etilen glikol ve propilen alkol gibi (54,55), non-permabil olarakta sükroz,glukoz ve fruktoz gibi kryoprotektanlardır (56,57). Gametler düşük volümde dondurma pipetlerine yüklenir ve ekilibrasyon için birkaç dakika tutulacağı -5,-7 dereceye soğutulur.

Ekilibrasyon sonrası, solusyona ekstraselüler soğutma için seeding denilen bir yöntem uygulanır ve dakikada 0.3, 0.5 °C olmak üzere -30 ile -65 arasında bir dereceye kadar soğutulur. İstenilen sıcaklığa gelindiği zaman dondurma pipetleri depolanmak üzere sıvı nitrojene kaldırılır. Ekstraselüler solusyona seeding işlemi ve yavaş soğutma oranı dondurma işleminin sadece gametlerin dışında olmasını sağlar. Bu işlem, gametlerin intraselüler matriksinin vitrifiye olacağı sıcaklığa ulaşınca kadar ,osmatik olarak aktif suyun ve dereceli dehidrasyonlarının gametlerden dışarı doğru hareketi ile sonuçlanır (58).

İkinci bir teknik olan vitrifikasyon için üç önemli faktör vardır.

1- Soğutma oranı: bu teknik sıvı nitrojen ile gerçekleştirilir. Sıvı nitrojen kullanılırken, örnek sıvı nitrojene daldırıldığında konteynere, miktara, termal iletkenliğe ve solusyonun kompozisyonuna bağlı olarak değişebilen dakikada 10000 ile 100000 °C arasında soğutma oranı meydana gelir (59). Sıvı nitrojen slush yapılması için donma noktasına (-210) yakın bir dereceye kadar soğutulması gerekir. Slush VitMaster (IMT Ltd., Ness Ziona, Israel) tarafından üretilen bir cihazdır, bu cihaz negatif basınç uygulayarak sıvı nitrojenin sıcaklığını -205 ve -210 °C arasında tutar. Sıvı nitrojen soğukluğu oluşturulur ve soğutma oranı ciddi derecede artar. Soğutma oranı bu şekilde ilk aşamada (-20,-10) sıvı nitrojenli dondurma pipetlerine-OPS yada EM gridlerine oranla 2-6 kere daha hızlı gerçekleşir (60). Oosit ve embriyolar için dondurma oranının arttırılması yaşam oranını %37'e kadar iyileştirdiğini göstermiştir.

2- Kullanılan medyumların vizkozitesi: Bu durum vitrifikasyon sırasında farklı kriyoprotektanların ve diğer eklenen maddelerin davranışları ve konsantrasyonları olarak tanımlanmaktadır. Daha yüksek kriyoprotektan konsantrasyonu (CPs) ve daha yüksek cam transisyon sıcaklığı (Tg) ile buz nukleasyonu ve kristalizasyonu düşürülebilir. Çeşitli kriyoprotektanlar ve eklenen maddeler farklı toksisite, penetrasyon, penetrasyon oranı ve Tg'ye sahiptir. Çoğu zaman vizkoziteyi arttırmak, Tg'yi düşürmek ve toksisite

düzeyini azaltmak için kriyoprotektanların farklı kombinasyonları uygulanır (61).

3- Volüm (Miktar-Hacim): Daha düşük volüm, daha yüksek vitrifikasyon olasılığıdır (62,59). Daha düşük volümler; daha iyi ısı transferine bu yol ile de yüksek soğutma oranına yardımcı olur. Son 10 yılda örneklerin saklanma volümünün azaltılmasına yönelik metodlar literatürde yer almıştır. Dondurma medyumunun volümünü düşürmek ve soğutma oranını arttırmak, kriyoprotektan konsantrasyonunu makul bir şekilde düşürmeye olanak sağlar ve böylece toksik ve osmatik zararların etkileri minimum indirilir (63).

Yavaş dondurma ve vitrifikasyonu karşılaştırmak aslında, temel bir method ile fiziksel bir işlem arasındaki karşılaştırmaya dayanır. Bu iki dondurma yöntemi arasındaki farkı; vitrifikasyonda, yüksek dondurma oranı ve yüksek kriyoprotektan konsantrasyonu kullanılırken; yavaş dondurmada, yavaş dondurma oranı ve düşük kriyoprotektan kullanılır; şeklinde tanımlamak yanlış ve yüzeysel olur. Başarılı bir vitrifikasyon; çok düşük soğutma oranı (64) ve düşük kriyoprotektan konsantrasyonu (62) ile de gerçekleştirilebilir. Yavaş dondurma ile kriyoprezervasyon ekstraselüler suyun kristalize oluşu ile intraselüler vitrifikasyonunun oluşumuna kadar, osmatik gradient ile suyun intraselüler kompartmandan sürüklenişi ile sonuçlanan bir yöntemdir. Vitrifikasyon ile kriyoprezervasyonda ise selüler dehidrasyonun gerçekleşmesinden sonra hem intraselüler hemde ekstraselüler kompartmanlar vitrifiye olur.

Dondurulduğunda ve vitrifiye edildiğinde, gametler net bir bozulma olmadan çok uzun süre depolanabilir. Dondurulmuş insan embriyolarının; 20 yıla kadar depolanmasında, çözme sonrası canlılıkta, implantasyon oranlarında, klinik gebelik, düşük ve canlı doğum oranlarında karşılaştırılan parametrelerde bir etki göstermediği anlaşılmıştır (65).

2.4.1. Oositlerin Yavaş Dondurulması ve vitrifikasyonu

Kriyoprezerve oositten ilk insan gebeliği (yavaş dondurma ile) 1986'da bildirilmiştir. Bu başarı diğer başka laboratuvarlarda farede (66) ve ratta (67) elde edilen başarıları takiben gelmiştir. Bu ilk raporların üstünden uzun süre geçmesine rağmen başarı hala çok sınırlıdır. Kriyoprezervasyon alanında bir çok ilerlemeye karşın özellikle oositlerin (ovule, matür, immatür) kriyoprezervasyonu hala yerleşik bir prosedür olarak değerlendirilmemektedir ve bugün deneysel bir teknik olarak sınıflandırılmaktadır (68). İnsan oositlerinde yapılan yavaş dondurma metaanalizlerinin çözülmüş oosit başına göstermiş olduğu oranlar; %2.4 (95/4000) ve canlı doğum oranı ise %1.9 (4000/76) şeklindedir (69). Vitrifikasyon, 2005'ten sonra hız kazanmıştır. Bundan önce sadece 10 insan gebeliği vitrifiye oositlerden elde edilmiştir (69). Her iki method ile de canlı kalım oranı yüksek olsa da, embriyo transfer oranı taze oosit kullanılanlara oranla oldukça düşüktür (70). Yavaş dondurma ile vitrifikasyon karşılaştırıldığında daha yüksek canlı kalım oranı vitrifikasyon ile gerçekleştirilmiştir (%95,899/948 vs %75,1275/1683) ama oosit başına gelişen gebelik oranları hem yavaş dondurma (%1.9-8.6) hemde vitrifikasyon (%3.9-18.8) için düşüktür (71).

Kriyoprezervasyonda oositler sperm ve embriyodan oldukça farklıdır. Memeli oositi spermatozoadan 1000-10000 kat daha büyüktür. Bu yüzden oositlerin yüzey hacim oranları düşük olduğu için dondurmaya karşı ve intraselüler buz kristalleri oluşumuna karşı fazlaca hassastırlar (72,73). MII oositlerin plazma membranı düşük permeabilite katsayısına sahiptir, dolayısıyla kriyoprotektanların ve suyun hareketi yavaştır (73). Oositler zona pellusida ile çevrilidir, zona pellusida suyun ve kriyoprotektanların oositin içine ve dışına doğru hareketine karşı ek bir bariyer olarak davranır. Dondurma çözme işleminin sonucunda, zona pellusida'nın sertleşmesine ve sperm penetrasyonunu ve fertilizasyonu olanaksız kılan prematüre kortikal granül ekzositozu oluşabilir (74). Bu durum anca ICSI (intracytoplasmic sperm

injection) yada SUZI (subzonal sperm insertion) teknikleri ile giderilebilir. Oositler ayrıca dondurma hassasiyetini arttıran yüksek lipid içeriğine sahiptirler (73). Submembranöz aktin mikofilamentlerine sahip olduklarından dolayı daha az sağlamdırlar (75). Kriyoprezervasyon hücre iskeletinde düzensizliğe, kromozom ve DNA anamolilerine sebep olabilir (76). MII safhası ile oluşan mayotik iğ iplikçikleri dondurmaya ve tekrar uyum sağlamaya karşı hassastır (77). İn vitro kültürde çözme(thaw) veya ısıtma(warm) sonrası oositlerin yenilenmesi yavaş dondurmaya oranla vitrifikasyonda daha hızlı olmaktadır (77). Oositler ayrıca reaktif oksijen türlerinin hasarına karşı da daha hassastırlar (78). Bu parametrelerin bir çoğu fertilizasyondan sonra değişir ve embriyoyu dondurmaya karşı daha hassas ve kolay dondurulabilir yapar (75).

2.4.2. Embriyoların Yavaş Dondurulması ve Vitrifikasyonu

Yeryüzündeki bir çok tür için, kriyoprezervasyondaki geçerli bilgi birikimi, sadece erkek gametlerin dondurma yöntemi ile korunabildiği, oositlerin veya herhangi bir gelişim aşamasında olan embriyoların korunamadığı yönünde olabilir. Oositler ve embriyolar boyut, kompozisyon ve yapı açısından büyük farklılıklar göstermektedir. Özellikle başlıca endişe, intraselüler buz formasyonu konusudur. Bu formasyondan kaçınmak için; düşük volüm, yüksek kriyoprotektan konsantrasyonu ve çok hızlı dondurma ile vitrifikasyon hali oluşturulmuş yada düşük kriyoprotektan konsantrasyonu ve yavaş dondurma ile sadece ekstraselüler haznede buz formasyonu sağlanmıştır. İlk başarılı embriyo kriyoprezervasyonuna ait raporlar 1971-2'de yayınlanmıştır (50,53). Bir kaç yıl sonra soğutma oranlarında yapılan modifikasyonlar ile oluşan temel protokol bugün hala yaygın olarak kullanılmaktadır. (79,80). Embriyo kriyoprezervasyonunun en önemli avantajı ise her iki aile fertinde genetik komplemanlarının korunmasıdır.

2.4.3. Kriyoprezervasyon için optimum embriyonik evre

Embriyo kriyoprezervasyon alanındaki bir çok gelişmeye rağmen embriyo kriyoprezervasyonunda optimal gelişim evresine dair henüz bir görüş

birliği bulunmamaktadır. İnsan embriyolarında IVF-ET sonuçlarını karşılaştırılarak yapılan bir çalışmada, pronuklear evrede (birinci gün), klivaj (üçüncü gün) ve blastosist aşamasında dondurulmuş gruplar arasında implantasyon, klinik gebelik, çoklu gebelik ve erkek/kadın oranları arasında bir fark bulunmamıştır (81). Tek fark, dondurma-çözme sonrası, üçüncü gün embriyoların canlı kalım oranı, 1.gün ve blastosist aşamalarında dondurulan gruplara göre daha düşük bulunmuştur. Bir başka çalışmada embriyolar; zigot, ikinci gün ve üçüncü gün evrelerinde dondurulmuş, çözme sonrası transfer edilmişlerdir (82). Yine bu çalışmada da klinik gebelik, implantasyon, canlı doğum oranı açısından gruplar arasında bir farklılık gözlenmezken, düşük oranı ise zigot grup (%21.3) ve ikinci gün (%18.3) gruplarına göre üçüncü gün grubun (%45) daha yüksek bulunmuştur. Efisiyan (çözölmüş embriyo başına canlı doğum) düşük bulunmuştur. (hepsi %7.3, zigot %7.1, ikinci gün %7.6 ve üçüncü gün %4.2). Diğer bir yandan ise beşinci gün ve altıncı gün blastosistlerin vitrifikasyonunu takiben canlı kalım oranı, %96.3 ve implantasyon oranı %29.3 açısından üstünlük göstermektedir (83).

2.5. Endoplazmik Retikulum

Endoplazmik Retikulum (ER) dallı tübüllerden ve yassılaşımış keselerden oluşan, bütün ökaryatik hücrelerde bulunan membranöz ağdan oluşan bir hücre organelidir. Hücrenin sitoplazması boyunca uzanır. ER; sekretuvar ve membran proteinlerinin, lipidlerin sentez yeri ayrıca major intraselöler kalsiyum depolama kompartmanıdır. ER, proteinlerin sadece sentez edildiği değil aynı zamanda proteinlerin doğru biçimlendirilmesinide sağlayan bir organeldir (84). Sentezlenmiş proteinler, ER'da katlanır ve olgunlaşır. Proteinler ER'a katlanmamış polipeptid zincirler şeklinde giriş yapar. ER, sitosole nazaran olgunlaşan proteinlerin disulfid bağlarının oluşumlarına olanak sağlayan devamında da protein yapısını stabilize eden oksidize bir ortamdır (85). Bu dinamik durumu idare edebilmek için hücreler kendilerini ER'da protein katlanma kapasitesi gerekliliklerine uygun olarak ayarlar. Böyle bir homeostatik kontrol ER lümenine bakan sensörleri olan, hücrenin diğer

kompartmanlarına mesaj iletebilen ve efektörleri olan sinyal aktarım yolları ile gerçekleştirilmektedir. Böyle bir intraselüler olaylar dizisinin varlığına dair ilk ipucu, seçici ER yerleşimli şaperonları aktive eden katlanmamış ER protein birikimini arttıran farmakolojik ve genetik manipulasyonların araştırılması ile sağlanmıştır (86).

Bütün organizmalarda, proteinlerin görevlerini yerine getirebilmeleri için protein katlanması gerekli bir süreçtir. Ökaryotik hücrelerde salgı yollarına gidecek olan proteinler, Golgiye geçmeden önce katlanmak üzere ER’da toplanırlar. Proteinlerin kalite kontrolü olarak adlandırılan bu mekanizmanın amacı, sadece düzgün katlanan proteinlerin ER’den çıkmasına izin vererek diğer hücre içi organellere gitmesini sağlamaktır.

ER lümenine giren, yeni sentezlenmiş polipeptid zincirleri amino uçlarından karbonhidrat yan zincirleri (3glikoz-2Mannoz-2N Asetilglikozamin) eklenerek translasyon sonrası değişikliğe uğrarlar. Bu reaksiyon OST(oligosakkarittransferaz enzimi) tarafından katalizlenir. Daha sonra devreye Glikozidaz I ve II enzimleri girerek en uçtaki 2 glikoz molekülünü uzaklaştırarak tek bir glikoz molekülü içeren katlanmamış protein halini almasını sağlar. ER şaperon proteinlerinden Kalneksin ve Kalretikulin, Erp57 ile birlikte protein katlanmasını gerçekleştirir. Düzgün katlanmış proteinler kalneksin/ kalretikulin döngüsünden çıkarak Golgiye geçerler (87).

2.5.1. Endoplazmik Retikulum Stresi

ER’da depolanan proteinler hücre türleri arasında ve hücrenin yaşamı boyunca farklılık gösterir. Gelişim süreci, hücre siklus döngüsü ve çevresel ortam ER’da depolanması gereken proteinlerin çeşidini ve miktarını etkileyebilir (88). Ancak bir stres uyarısı katlanan proteinlerin arasındaki reaksiyonu bozabilir ve bu da ER’un protein katlama yükü ve kapasitesi arasında uyumsuzluk yaratabilir. Bunun sonucunda ER lümeninde katlanmamış yada yanlış katlanmış proteinler birikir. Bu durum Endoplazmik Retikulum stresi olarak adlandırılır (88).

Hücreler yaşamları boyunca proteinlerin katlanma gereksiniminin ER'un katlama kapasitesini aşan ve ER stresi ile sonuçlanan durumlar ile karşı karşıya kalırlar. ER stresi, ekstraselüler sinyallerdeki değişimlere cevap olarak, hücrede geçici gen ekspresyon programında gelişebilecek bir değişiklik nedeniyle yada daha kalıcı olarak sekretuar yada membran proteinlerinin tam olgunlaşmasına engel olan mutasyonlar ile karşılaşmasından dolayı ortaya çıkabilir. ER stresine aynı zamanda besin eksikliği, anoxia, iskemi, viral enfeksiyon ve proteinleri degrade edebilen ısı gibi çevresel düzensizliklerde neden olabilir (88).

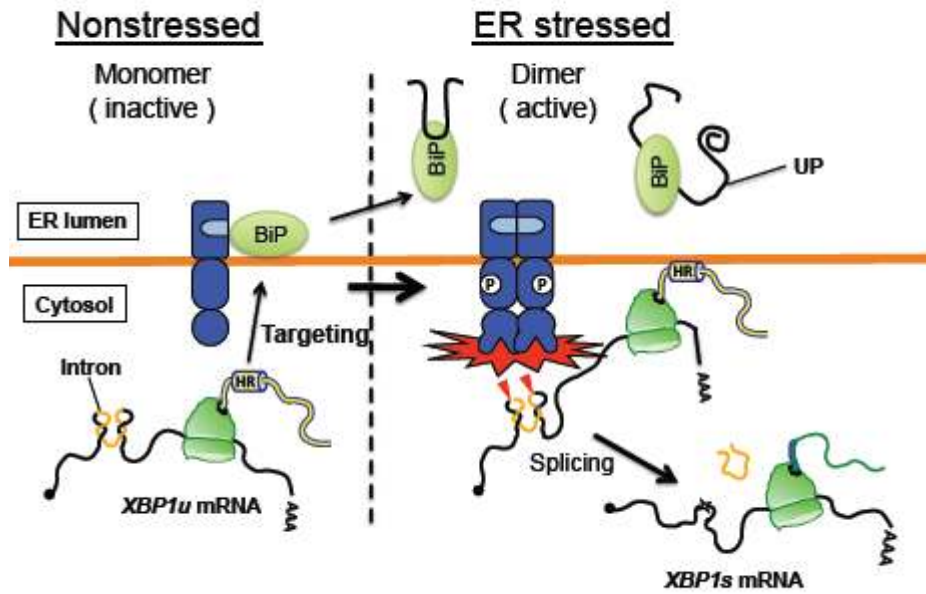
2.5.2. UPR (*unfolded protein response*)

Proteinlerin katlanmasının devamlılığı ve katlanmamış yada yanlış katlanan proteinlerin birikiminin önlemesi için hücreler UPR olarak adlandırılan, ER bağımlı hücresel bir cevabı tetikler (89,90). Bu hücresel cevap transkripsiyonel ve translasyonel düzeyde gerçekleşir.

Son zamanlarda temeli daha iyi tanımlanmış UPR yolağında, ER'a giren katlanmamış proteinlerin birikimi ile bu birikimi idare edebilecek hücresel mekanizma arasındaki dengesizlik 3 ana cevabı harekete geçirmektedir. İlki protein sentezini ve ER'a translokasyonunu azaltarak ER'a giren protein yüklenmesini azaltmak; ikincisi, ER'da katlanmayan proteinler ile başa çıkabilmesi için uzun dönem adaptasyon olan, ER protein katlanma mekanizmasını fonksiyone eden genler dahil UPR hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonuna yol açarak ER kapasitesini azaltmaktır. ER başarılı olamadığı takdirde proteinler ubiquitinleneceği ve 26S proteozomları tarafından degradasyonu hedeflendiği ERAD (ER associated degradation) adı verilen süreç boyunca sitosole aktarılır (91). Eğer homeostaz tekrar kurulamaz ise üçüncü mekanizma hücre ölümünün tetiklenmesidir (92).

Memeli hücreleri UPR efektörü olarak fonksiyon gösteren üç tane ER transmembran protein kinazı içerirler. Bunlar IRE1- α (inositol-requiring 1 α), PERK (double stranded RNA dependent protein kinase (PKR)-like ER kinase) ve ATF6 (activating transcription factor 6) dır.

IRE1, yarı N terminal kısmı ER lümeninde yarı C terminal kısmı sitosolde konumlanmış tip 1 transmembran proteindir. Sitosolik bölgesi bir protein kinaz ve Rnase dual enzimlerinden oluşan efektör bölgesidir. Luminal bölgesi, ER lümeninde katlanmamış proteinlerin birikimini algıladığı zaman IRE1, bir stres reseptörü gibi davranır (89,90). Bu da, XBP-1 (x-box binding protein) mRNA 'sından bir parça sekansın kesilmesini tetikler (93,94) ve aktif transkripsiyon faktörünün sXBP-1 oluşumunu başlatır (Şekil 4). Aktive olmuş sXBP-1 UPR'da görev alan ER şaperonların seviyelerini düzenler. Buna ek olarak, ERAD mekanizmasının komponentlerini kodlayan genlerin transkripsiyonlarını aktifleştirerek ER'da protein katlanma kapasitesini artırır (95,96).



Şekil 4. XBP-1'in aktivasyonu

Diğer sensör protein PERK, IRE1'e karşılık gelen zayıf bir homoloji gösteren luminal bir bölge içerir. Sitosolik bölgesi kinaz aktivitesi göstererek eIf2'nin (α -subunit of eukaryotic translation initiation factor 2) fosforilasyonunu ve inaktive edilmesini sağlar bu da protein sentez etkinliğinin azalması ile sonuçlanır (97,98). Bu şekilde ER lümenine protein birikimi engellenmiş olur.

PERK'in protein sentezini azaltma görevine ek olarak, UPR yolağında görev alan genlerin yaklaşık üçte birinin transkripsiyonunu indükler. PERK'in eIF2'i fosforile etmesiyle, transkripsiyon faktör 4 seçici translasyon ile aktifleşir. ATF 4'de UPR yolağında görev alan hedef genlerin transkripsiyonlarını aktifleştirir (98,99,100).

3. sensor protein ATF 6 BZip (basic leucine zipper) transkripsiyon faktör bölgesinden oluşmuş, sitosolik yüzeye doğru çıkıntı yapmış N terminal bölgesi içeren tip II transmembran proteininden oluşur. ER stresine bağlı olarak ATF6, ER'dan Golgi'ye COPII vezikülleri aracılığı ile taşınır ve Golgi'de yerleşik S1P (the serin protease site 1) ve S2P (metalloprotease site 2) proteazları ile taşınan ATF6'dan parçalar kesilip ayrılır (101). Kesilmiş sitosolik bölgeler membrandan salınır ve ER şaperon ve ERAD bağımlı genleri transkripsiyonel olarak indüklemek için nukleusa taşınır (102,103).

UPR aktivasyonundan sonra hücre döngüsü öncelikle G1 fazında duraklamaktadır (20). G1 fazının ilerlemesi için, bir yada birden fazla D tipi siklinlerin (D1,D2,D3) CDK4 veya CDK6 ile etkileşime girerek aktive olması gerekmektedir, bunu siklin E ve A'nın bağımsız kinaz CDK2 aktivasyonu takip eder. Bu sırada hücreler G1/S geçişindedir (21). G1 fazında duraklama ile indüklenen ER stresinin, D1 siklin spesifik proteinin eksikliğinin D1 siklin translasyonunu inhibe etmesi ile ortaya çıktığına işaret etmektedir (20). Son günlerde bildirilen başka bir gelişme de UPR aktivasyonunun siklin D1'in oluşumuna aracılık etmek ve hücre döngüsündeki duraklamayı ilerletmek için yeterli olduğu yönündedir (22).

Stressiz koşullarda IRE1, PERK ve ATF6 şaperon protein GRP78 (Glucose-regulated protein)/BiP (Binding immunoglobulin protein)'e bağlıdır.

2.5.3. Katlanamamış proteinlerin tanınması ve ER bağımlı şaperonlar

ER hücredeki protein sentezi ve transport rolünden dolayı GRP78, GRP94 ve Calricutinin gibi kalsiyum bağımlı moleküler şaperonlardan zengindir.

Bu şaperonlar protein katlanmasını sağlayan aracı molekülleri stabilize eder. Hatalı protein katlanmasına engel olmak için protein taşınımı boyunca yeniden sentezlenen 2 yada daha fazla aminoasit içeren bileşik madde zincirlerini tutarlar.

BiP ER lümeninde en çok bulunan şaperondur ve ER'da protein kalite kontrolünün sürdürülmesinde merkezi bir rol oynamaktadır (104). BiP, HSP70 (heat shock 70 protein) ailesinin üyesi bir ATPaz'dır ve diğer HSP70 şaperon ailesinin üyeleri gibi doğal polipeptidler ile etkileşime girmez. ER'a transfer edilecek yeni sentezlenen proteine geçici olarak, glukozillenme sürecinde olan ve hatalı katlanmış ya da katlanmamış proteinlere ise kalıcı olarak bağlanmaktadır (105).

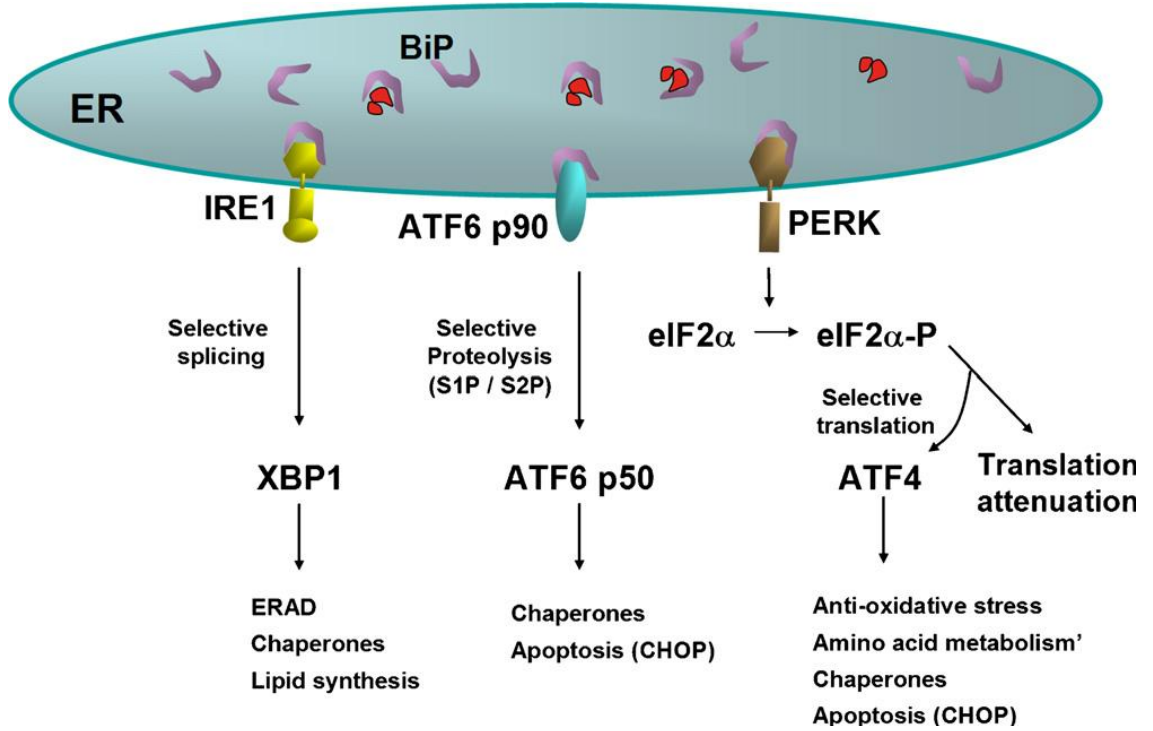
Stres olmayan koşullarda BiP üç stres sensörü ile etkileşimde bulunmaktadır, fakat ER stresine cevaben hızlıca salınır (106,107). Stres olmadığı koşullarda BiP; IRE1, PERK ve ATF6'nın luminal domainlerine bağlanarak ER'da muhafaza edilmelerini sağlamaktadır. Ancak katlanmamış veya hatalı katlanmış proteinlerin birikimi durumunda BiP, IRE1, PERK ve ATF6'dan ayrılarak bu proteinlerin spontan olarak oligomerize/ dimerize olmasına ve kendi kendilerini fosforlayarak sonrasında da aktivasyonlarına yol açmaktadır (106,108) (Şekil 5). Bu yolla serbest kalan BiP ise katlanmamış proteinler tarafından tutulur. BiP'in katlanmamış bir proteine bağlanması o proteinin katlanmasına yardımcı olmaz ama proteini katlanmaya elverişli bir biçimde tutar (104).

Memeli hücrelerinde ve mayalarda yapılan çalışmalar, UPR indüksiyonu için gereken sinyalin, direk olarak katlanmamış polipeptidlerin birikiminden değil de, katlanmamış proteinler ile oluşturdukları kompleks tarafından alıkonulması sonucunda ER'da serbest BiP konsantrasyonunun azalmasına bağlı olduğunu önerir (109).

BiP'in IRE1 yada PERK ile birlikteliği ya da ayrılma durumu hücredeki aktivasyon ve baskılanma durumu ile bir hayli korelasyon gösterir (106,108).

Biyokimyasal kanıtlar inaktif durumda IRE1 ve PERK'in luminal bölgelerinin BiP ile bağlantıda olduğunu destekler (106,107). ER'da katlanmamış proteinlerin birikimi üzerine BiP kompetitif olarak katlanmamış proteinlerin ER'da yüksek titrasyonuna bağlı olarak IRE1 ve PERK'in luminal bölgelerinden ayrılır (106). BiP'in ATF6'ya bağlanması ise IRE1'de gözlendiği gibi ATF6 dimer/oligodimerlerinin oluşumunu baskılamaktan ziyade ER'den golgiye taşınmasını engeller. BiP'in ATF6'nın luminal bölgesine bağlanması Golgi içinde yerleşimli Golgi transport sinyalinin moleküler olarak engeller bu yolla Golgi'ye transportu bloke eder (107). Bu sonuçlar BiP'in ER stres sensörlerinin luminal bölgesine bağlanarak stres ile karşılaşınca kadar inaktif durumda kalmalarını sağladığı ileri sürülmektedir (106,108).

ER'de hatalı katlanmış veya katlanmamış protein birikimine ERAD ve UPR yolları ile yanıt verilmeye çalışılsa da hatalı katlanmış protein miktarının çok fazla olması strese karşı verilen yanıtları yetersiz kılabilir. Böyle bir durumda ER stresi apoptozu (programlı hücre ölümünü) tetiklemektedir. ER stresi sonunda oluşan apoptoz hem mitokondri-bağımlı hem de bağımsız yollardan uyarılabilir (87).



Şekil 5. UPR'ın sinyal mekanizması

2.5.4. Tunikamisin

Çeşitli aktinomiset türlerinden izole edilen bir antibiyotik olan tunikamisin, diğer antibiyotiklerden farklı olarak memeliler için yüksek derecede toksiktir, bu yüzden antibakteriyal ajan olarak kullanılmaz (110). UDP-Nasetilglukozamin'den dolikol monofosfata N asetilglukozamin-1-fosfatın transferini inhibe ederek karbohidrat ve protein arasındaki N-glikozidik tip bağlanmayı bloke eder (111). Tunikamisin Post translasyonel glikozilasyonu inhibe etme kapasitesinden dolayı normal hücre yüzey morfolojisi ve normal hücre adezyonunun korunması, sürdürülmesi, hücre yüzeyi ile ilişkili proteinlerin salgılanması ve hücre içi transportu, virüslerin enfeksiyonu ve yayılması gibi çeşitli olaylardaki proteinlerin N-glikozidik bağlı oligosakkarit kısımlarının fonksiyonlarını araştırmada kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra, gelişen fare embriyolarında insan, fare ve sıçan myeloid lösemi hücrelerinin farklılaşmasında memeli hücrelerinde mutasyona uğramış olan hücrelerin seleksiyonunda spesifik olarak da tunikamisin kullanılmaktadır (111). Tunikamisin; urasil, N-asetilglukozamin (GlcNAc), eşsiz 11-karbon 2-

aminodiadoz şeker (tunicamin), ve değişken uzunlukda N-asil zincirinden oluşmaktadır. Tunikamisinin birçok homologu vardır. Tunikamisin homologları, N-asil zincirinin değişik uzunlukta olmasından dolayı farklılık göstermektedir. Tunikamisinin bileşenleri birçok aktiviteyi paylaşıırken bu aktivitelerde gerekli olan antibiyotik miktarında da farklılık göstermektedir. Homologlarından bir kısmı lipidlerin N-bağlı glikozilasyonunu inhibe etmek için 5 µg/ml' ye gerek duyarken diğer homologları için 1-2 µg/ml bu inhibisyon için yeterli olmaktadır (112). Protein sentezi üzerine genel bir etkisi olmaksızın protein glikozilasyonunu tamamen inhibe etme yeteneğine sahip olması nedeniyle tunikamisin in vivo da ve biyolojik deneylerde yoğun olarak kullanılmaktadır (113).

2.5.5. Tunikamisinin Apoptotik Etkisi

Tunikamisin; bitki ve memeli hücrelerinde endoplazmik retikulum stresini uyarak programlanmış hücre ölümüne yol açar. Tunikamisin N- bağlı glikozilasyonu inhibe eder ve bu inhibisyon apoptozisi indükler (114).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın tipi:

Araştırma deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştımının yeri ve zamanı:

Çalışmamız Yale Üniversitesi Kadın Doğum ve Üreme Bilimi Anabilim Dalı laboratuvarlarında geçekleştirilmiştir. Çalışma Nisan 2010 tarihinde başlamış 10 Mart 2011 tarihinde sonlanmıştır.

3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme/çalışma grupları:

UPR sinyal yolağının in vitro preimplantasyon embriyo gelişimi üzerine etkisine görmeyi hedeflediğimiz çalışmada oluşturulan gruplar:

I. grup Kontrol grubu: Hiç bir uygulamaya maruz kalmayan deney grubu. (n=6)

II. grup Tunikamisin grubu: 0.5 µg/ml tunikamisinli medyumda inkübe edilen embriyo grubu. (n=6)

III. grup Sikloheksimid grubu: 10 µg/ml sikloheksimidli medyumda inkübe edilen embriyo grubu. (n=6)

UPR sinyal yolağının kısa ve uzun dönem aktivasyonunun preimplantasyon embriyo gelişimine etkisini görmeyi hedeflediğimiz çalışmada oluşturulan gruplar:

I. grup Kontrol grubu: Hiçbir uygulamaya maruz kalmayan embriyo grubu. (n=12)

II. grup kısa dönem tunikamisin grubu: 0.5 µg/ml tunikamisinli medyumda 4 saat inkübe edilerek kontrol medyuma aktarılan embriyo grubu. (n=12)

III. grup Uzun dönem tunikamisin grubu: 0.5 µg/ml tunikamisinli medyum deney sonlanıncaya kadar inkübe edilen embriyo grubu. (n=12)

Preimplantasyon öncesi blastosistlerde dondurma (kriyoprezervasyon) ve çözme işleminin UPR sinyal yolağının aktivasyonuna etkisini gözlemek istediğimiz çalışmada oluşturulan gruplar:

I. grup Kontrol grubu: Hiçbir uygulamaya maruz kalmayan blastosist grubu. (n=35)

II. grup Vitrifikasyon grubu: Vitrifikasyon tekniği ile dondurulup çözülen blastosist grubu. (n=40)

III. grup Yavaş dondurma grubu: Yavaş dondurma çözme tekniği ile dondurulup çözölen blastosist grubu. (n=40)

Oositlerde dondurma (kriyoprezervasyon) ve çözme işleminin UPR sinyal yolağının aktivasyonuna etkisini gözlemlmek istediğimize çalışmada oluşturulan gruplar:

I. grup Kontrol grubu: Hiçbir uygulamaya maruz kalmayan oosit grubu. (n=70)

II. grup Vitrifikasyon grubu: Vitrifikasyon tekniği ile dondurulup çözölen oosit grubu. (n=60)

III. grup Yavaş dondurma grubu: Yavaş dondurma çözme tekniği ile dondurulup çözölen oosit grubu. (n=60)

3.4. Çalışma Materyali:

Çalışma materyali, Yale Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuvarlarından temin edilen C57BL/6 suşuna ait farelerden elde edilen oosit ve embriyolardır. Çalışmamız süresince Yale Üniversitesi Etik Kurul kararlarına uyuldu. Çalışmada kullanılan 6 haftalık C57BL/6 dişi ve 10 haftalık C57BL/6 erkek fareler Yale Üniversitesi Deney Hayvanları Bölümü'nden sağlandı. Bu suş çalışmamızla ilgili literatür ile uyumlu olmasından dolayı seçilmiştir. Tüm hayvanlar deneyler sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Labartuvarlarında 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık 20-22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Bu çalışmada kullanılan fareler eter anestezisi uygulamasını takiben servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi.

3.5. Araştırmanın değişkenleri

Araştırmada kontrol gruplarına herhangi bir işlem uygulanmamıştır. İlk deneyimizde, grup 2 deki embriyolar tunikamisinli, grup 3'teki embriyolar sikloheksimidli medyumda inkübe edilmişlerdir. İkinci deneyimizde grup 2'deki embriyolar 4 saat grup 3'teki embriyolar 72 saat boyunca tunikamisinli medyumda tutulmuşlardır. Üçüncü deneyimizde grup 2 ve grup 3 embriyoları blastosist aşamasına kadar getirilerek grup 2 vitrifikasyon, grup 3 ise yavaş dondurma tekniği ile dondurulup çözülmüştür. Dördüncü deneyimizde de grup 2 oositler vitrifikasyon grup 3 oositler yavaş dondurma tekniği ile dondurulup çözülmüşlerdir.

3.6. Veri toplama araçları

3.6.1. Araştırmada kullanılan demirbaş malzemeler

Araştırmada toplanan oositlerin ve iki hücreli embriyoların inkübasyonu için inkübatör, gametlerin manipülasyonu esnasında gerekli olan sıcak tablalı stereomikroskop, immünofloresan, western blot ve RT-PCR deneyleri için otomatik mikropipetler kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada kullanılan yöntemler

3.6.2.1 C57BL/6 farelerden in vivo 2- hücreli embriyoların elde edilmesi ve Blastosist Kültürü

6 haftalık C57BL/6 farelere 7.5 IU PMSG (Folligon, Sigma–Aldrich) ve 46-48 saat sonra da farelerin kendi fizyolojik LH pikleri oluşmadan hCG (Chorulon, Sigma–Aldrich) enjeksiyonu intrapertoneal olarak yapılarak superovule edildi. hCG enjeksiyonunu takiben çiftleşmenin sağlanması için 6 haftalık dişiler 10 haftalık erkekler ile aynı kafese konuldu. Ertesi sabah çiftleşmenin etkinliğini gözlemlemek için vaginal plak kontrolü yapıldı. hCG enjeksiyonundan 36 saat sonra dişi fareler eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile kurban edildi. Oviduktlar disseke edildikten sonra 1.0mg/mL bovine serum albumin(BSA) eklenmiş HEPES’li Quinn’s® Advantage Medyuma aktarıldı. Stereomikroskop altında ovidukt enjektör yardımı ile parçalanarak 2-hücreli embriyoların serbest kalması sağlandı. UPR sinyal yolağının in vitro preimplantasyon embriyo gelişimi üzerine etkisi gözlemek istediğimiz çalışmada hCG enjeksiyonundan 46 saat sonra toplanan 2-hücreli embriyolar Quinn’s® Advantage Cleaveage medyuma alınarak gruplara ayrıldı ve tedaviye başlandı. i) kontrol n=6, ii) UPR tetikleyicisi tunikamisin (0.5 µg/ml) (Sigma-Aldrich St. Louis MO, USA) n=6, iii) genel protein sentezi inhibitörü sikloheximid (10 µg/ml)) (Sigma- Aldrich St. Louis MO, USA) n=6, hCG enjeksiyonundan 68 saat sonra kültür ortamındaki embriyolar gruplara göre hazırlanan i) kontrol n=6, ii) tunikamisin (0.5 µg/ml) n=6, iii) sikloheximid (10

µg/ml) n=6 HEPES'li Quinn's® Advantage Blastosist medyuma aktarılarak tekrar inkübatöre kaldırıldı gün gün ayrı gruplardaki embriyolar Grillo ve ark.'nın derecelendirme sistemi kullanılarak karşılaştırıldı. UPR sinyal yolağının kısa ve uzun dönem aktivasyonunun preimplantasyon embriyo gelişimine etkisini araştırmak istediğimiz çalışmada ise, i) kontrol n=12, ii) kısa dönem tunikamisin n=12, iii) uzun dönem tunikamisin n=12 olmak üzere üç farklı grup oluşturuldu. Yetmiş iki saatlik deney sonunda blastosist aşamasına gelen embriyolar Grillo ve ark.'nın derecelendirme sistemi kullanılarak karşılaştırıldı (115). XBP1 ve sXBP-1 ve β-aktin mRNA düzeyleri RT-PCR tekniği ile incelenmek üzere blastositler gruplarına göre ayrı ayrı RNAqueous Microkit (Ambion, Austin, TX)'ine ait 100 µl lizis buffer içine konuldu. Preimplantasyon öncesi blastositlerde dondurma (kriyoprezervasyon) ve çözme işleminin UPR sinyal yolağının aktivasyonuna etkisini araştırmak için yapılan deneylerde yukarıda anlatıldığı gibi toplanan 2 hücreli embriyolar mineral yağ ile kaplanmış HEPES'li medium ile yıkandıktan sonra cleavage medyuma aktarılarak inkubatöre (6% CO₂:5% O₂:89% N₂) kaldırıldı. hCG enjeksiyonundan 68 saat sonra kültür ortamında 8 hücreli yada morula safhasına ulaşan embriyolar blastosist medyuma aktarılarak tekrar inkubatöre kaldırıldı. hCG enjeksiyonundan 96 saat sonra blastosist aşamasına gelen embriyoların bir kısmı deney gruplarına göre üç gruba ayrıldı. i) Kontrol (Dondurulmamış) (n=25), ii) Yavaş Dondurma (n=35), iii) Vitrifikasyon (n=35).

3.6.2.2. C57BL/6 farelerden oositlerin elde edilmesi:

6 haftalık C57BL/6 fareler 7.5 IU PMSG (Folligon, Sigma–Aldrich) ve 46-48 saat sonra da farelerin kendi fizyolojik LH pikleri oluşmadan hCG (Chorulon, Sigma–Aldrich) enjeksiyonu intraperitoneal olarak yapılarak superovule edildi. hCG enjeksiyonundan 13 saat sonra fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi . Oviduktların ampullar bölgesi disseke edildikten sonra 1.0mg/mL bovine serum albumin(BSA) eklenmiş HEPES'li Quinn's® Advantage Medyuma aktarıldı. Kumulus-oosit kompleksi stereomikroskop altında oviduktın ampulla bölgesi yırtılarak elde edildi. Oositler

hyaluronidaz (SAGE, In Vitro Fertilization Inc. Trumbull, CT, USA) ve cam pipet yardımıyla mekanik ayırma ile kumulus hücrelerinden temizlendi. Çıplak oositler 37 dereceye ayarlanmış stereomikroskop tablasında mineral yağ ile kaplanmış HEPES'li medium ile yıkandı ve deneyleri beklemek üzere inkübatöre (6% CO₂:5% O₂:89% N₂) yerleştirildi.

3.6.2.3. Oositlerin ve Blastosistlerin Dondurulması ve Çözülmesi

60 adet oosit, embriyo dondurma medyum kiti (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) ile kitin yavaş dondurma protokolü uygulanarak donduruldu. Diğer 60 oosit ise Vitrifikasyon kiti (SAGE Media, Trumbull, CT, USA) ile kitin protokolü doğrultusunda vitrifiye edildi ve direk olarak sıvı nitrojene konuldu. Yavaş dondurma tekniği uygulanan oositler programlı dondurucuya analog olarak soğutulurak sıvı nitrojene aktarıldı. İki ayrı grupta bulunan oositler de 1 hafta süreyle sıvı nitrojen tankında saklandı. 1 haftanın sonunda yavaş dondurulan oositler embriyo warming kit (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) ile, vitrifiye edilen oositler de vitrifikasyon çözme kiti (SAGE Media, Trumbull, CT, USA) ile çözüldü. Her iki gruba ait çözülen oositler uygulanacak prosedürlerin uygunluğuna göre gerekli solüsyonlara alındı. Yavaş dondurma ve vitrifikasyon için elde edilen 25'er blastosist ise oositler ile aynı teknikler kullanılarak fakat blastosistler için özel üretilen dondurma medyumları (yavaş dondurma çözme; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA, vitrifikasyon ve çözme için ise Vitrolife, Göteborg, Sweden) ile dondurma ve çözme işlemi uygulandı.

3.6.2.4. İmmünofloresan Tekniği

Dondurulup çözülen oosit/embriyolar öncelikle %4'lük paraformaldehid ile oda sıcaklığında 10 dakika fikse edildikten sonra PBS içinde %2'lik normal keçi-at serumunda (Vector Labs, Burlingame, CA) hazırlanmış yıkama solusyonunda (Tablo 1) 3 defa 5'er dakikalık yıkama aşamalarından geçirildi ve arkasından bloklama için aynı solusyon içinde 37°C'de inkübe edildi. Oosit ve embriyolar 1/100 dilüsyonda hazırlanmış anti-PERK ve GRP78 (Cell Signaling

Technology, Beverly, MA, USA) antikorları ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra tekrar 3 defa 5'er dakikalık yıkama aşamalarından geçirildi. Yıkamanın ardından, 1/1000 dilusyonda flouresan işaretli anti-tavşan sekonder antikor (Vector Labs, Burlingame, CA) ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilen oosit ve embriyolar 3 defa 5'er dakikalık yıkama aşamalarından geçirildikten sonra Poly-L-lysinli lam üstünde DAPI'li kapatma solusyonu kullanılarak mikroskop altında incelendi.

Tablo 2. Yıkama solusyon içeriği ve miktarları

Sodyum asitli PBS	500ml
Yağsız kuru süt	1 g
Normal Goat Serum (Vector s-1000)	10ml
Bovine Serum albumin (BSA) (Sigma-A9647-100G)	5g
Glisin (Merk 118478)	3.75g
Triton (Sigma T-8787) (%10 stok)	0.5ml

3.6.2.5. Western Blot Tekniği

Kontrol, yavaş dondurma ve vitrifikasyon gruplarına ait oosit ve embriyolar Western Blot analizleri ile değerlendirildi. Oosit ve embriyolar çözme sonrası 5 µl PBS ve 5 µl liziz buffer karışımına konularak -80'e kaldırıldı. Deney günü buzun içinde çözdürülen oosit/embriyolar 100°C'de kaynatıldı ve 5 dakika buzun üzerinde soğumaları beklendi. Örnekler; +4'te, 12000 rpm'de, 5 dakika santrifüj işleminden geçirildikten sonra, %7'5 luk SDS jeline yüklenerek 55 volt'da 15 dakika, 179 volt'ta 60 dakika olmak üzere

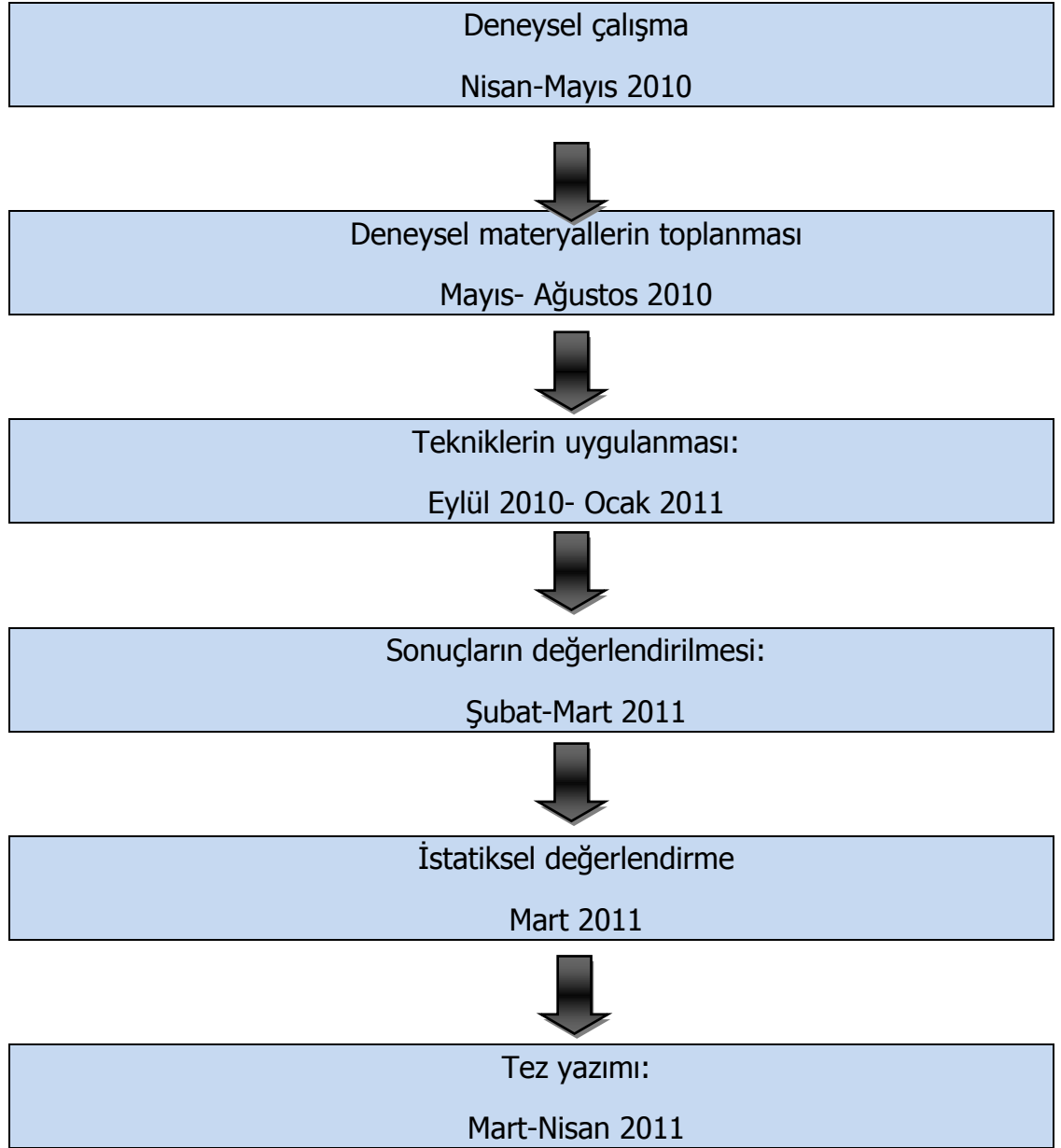
elektroforez edildi. Jele yüklenen proteinler, 32V'DA gece boyu +4'de Nitrocelüloz membrana elektroforetik cihazla transfer edildiler. Protein yüklü membranlar %0.1'lik Tween-TBS(T-TBS) te yağsız kuru süt kullanılarak hazırlanan solusyonda bloklama işleminden geçirildikten sonra, T-TBS solusyonunda hazırlanmış 1/1000 dilusyonda GRP78 (78 kDa) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA) antikoru ile +4'te gece boyu inkübe edildiler. 6 kere 5 dakikalık T-TBS solusyonunda yıkandıktan sonra 1/5000 dilüsyon kullanılarak HRP-konjuge goat anti-rabbit sekonder antikorunda 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldılar. Tekrar 6 kere 5 dakikalık yıkamadan sonra kemiluminesans deteksiyon solusyonunda 1 dakikalık inkübasyonun ardından kasete yerleştirilerek örneklerin sinyalleri 15 dakika sonunda film üzerinde değerlendirildi. Aynı membran strip edilmeden 1 saat oda sıcaklığında β -actin antikoru ile inkübe edilip yıkama aşamasından geçirildikten sonra aynı şekilde film üzerinde görüntüsü alındı. Görüntülenen GRP78/BiP bantları her grubun kendine ait β -actin bandı ile normalize edilerek karşılaştırıldı.

3.6.2.6. Reverse transkripsiyon PCR Tekniği

Deney sonrası her gruptaki oosit/embriyolar RNAqueous Microkit (Ambion, Austin, TX)'ine ait 100 μ l lizis buffer içine kondu. RNAqueous Microkit (Ambion, Austin, TX) 'deki talimatlara uyularak total RNA oosit ve embriyolardan elde edildi. Elde edilen RNA, genomik DNA kontaminasyonu DNase1(Ambion) kullanılarak uzaklaştırıldı. Elde edilen RNA'nın kalitesi ve konsantrasyonu 260 ve 280 nm'de absorbans ölçülerek saptandı. Amplifikasyonlar, ilk olarak uygulanan 94 °C'de denaturasyon sonrasında, 20 μ l'lik 1X PCR buffer(Roche) her biri için 0.125 mM dNTP, her primer için 0.5 μ M , ve 2 birim SuperTaq polimeraz hacminde, 10 siklus 92°C/30 s, 65°C/20 s (-1°C siklus başına), ve 72°C/1 dakika kilobaz başına ve sonra 25 siklus 92°C/30 s, 55°C/20 s, ve en son 72°C/1 dakika olmak üzere 35 siklusa gerçekleştirildi. Semi-quantatif RT-PCR GRP78/BiP'in spesifik formu, XBP1'in spliced ve unspliced spesifik formu ve internal kontrol olarak β -actin primerleri kullanılarak gerçekleştirildi. Amplifikasyonda kullanılan primerler: fare

GRP78/BiP, 5'-AGTGGTGGCCACTAATGGAG-'3, ve 5'-CAATCCTTGCTTGATGCTGA-'3 fare XBP1, 5'-ACACGCTTGGGAATGGACAC-'3, ve, 5' CCATGGGAAGATGTTCTGGG'3; ve fare β -aktin 5'-CGGATGTCAACGTCACACTT-'3, ve 5'- TCGGTGACATCAAAGAGAAG-'3. PCR ürünleri ve moleküler ağırlık belirteci 10 mg/ml ethidium bromid içeren BiP ve β -aktin için %1.5 luk ve XBP-1 için %3.5'luk agaroz jelde yürütüldü ve ultraviolet ışık altında görüntülendi. Her bandın intansitesi her örneğin β -aktin bandı ile normalize edildi ve değerler örnekler arasında semi-quantatif şekilde karşılaştırıldı.

3.7. Araştırma planı ve takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Deneylerimizde preimplantasyon embriyoların gelişimi Grillo ve ark.'nın skorlama sistemi ile skorlanmış ve değerlendirilmiştir. İmmünofloresan deneyimiz sonunda preparatlar immünofloresan mikroskop altında değerlendirilmiştir. Western blot sonuçları Komogorov-Smirnov testine göre oluşturulmuştur. Deney grupları arasındaki istatistiksel hesaplamalar SigmaPlot ile gerçekleştirilmiştir (version 11.0).

3.9. Araştırmanın sınırlılıkları

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş, herhangi bir sınırlılık durumu ortaya çıkmamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Yale University

Institutional Animal Care and Use
Committee (IACUC)
300 George St., 6th Floor
New Haven, Connecticut 06511
Telephone: 203 785 5992
Fax: 203-785 5033

June 6, 2009

IACUC #: 2009-11300
(Please refer to this number when
inquiring about this project)

PRINCIPAL INVESTIGATOR: Umit Kayisli

DEPARTMENT: Ob/Gyn

TITLE OF PROTOCOL: *"The Role of Unfolded Protein Response During Oocyte Maturation & Preimplantation Embryo Development"*

APPROVAL PERIOD: 06/04/09 TO 06/30/10

Yale's Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) granted approval for the use of animals in the project referenced above on June 4, 2009. A copy of your approved protocol will be sent via campus mail.

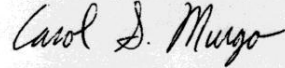
According to Federal Regulations, approval of this protocol is effective for one year and approval may be renewed twice. If the project will extend past three years another new protocol application will be required for IACUC review. Prior to the expiration of initial approval and each of the two renewal periods, you will be asked to submit a short progress report if you wish approval extended for an additional year. If you do not renew approval, you will be unable to use or order any animals under this project.

You should retain a copy of both your approved protocol and this letter of approval in your files. In accordance with Federal regulations, *a copy of the approved protocol is also to be filed in all locations where the project is being conducted.*

Approval of the IACUC does not, in and of itself, constitute approval for implementation of this project. Other levels of review and approval may be required (e.g. Environmental Health and Safety, Radiation Safety), and the project should not begin until all required approvals have been obtained.

The Yale University has an approved Animal Welfare Assurance (#A3230-01) on file with the NIH Office for Protection from Research Risks. The Assurance was approved May 16, 2007.

If you have any questions, or require any additional assistance, please do not hesitate to phone the IACUC Office at 785-5992.



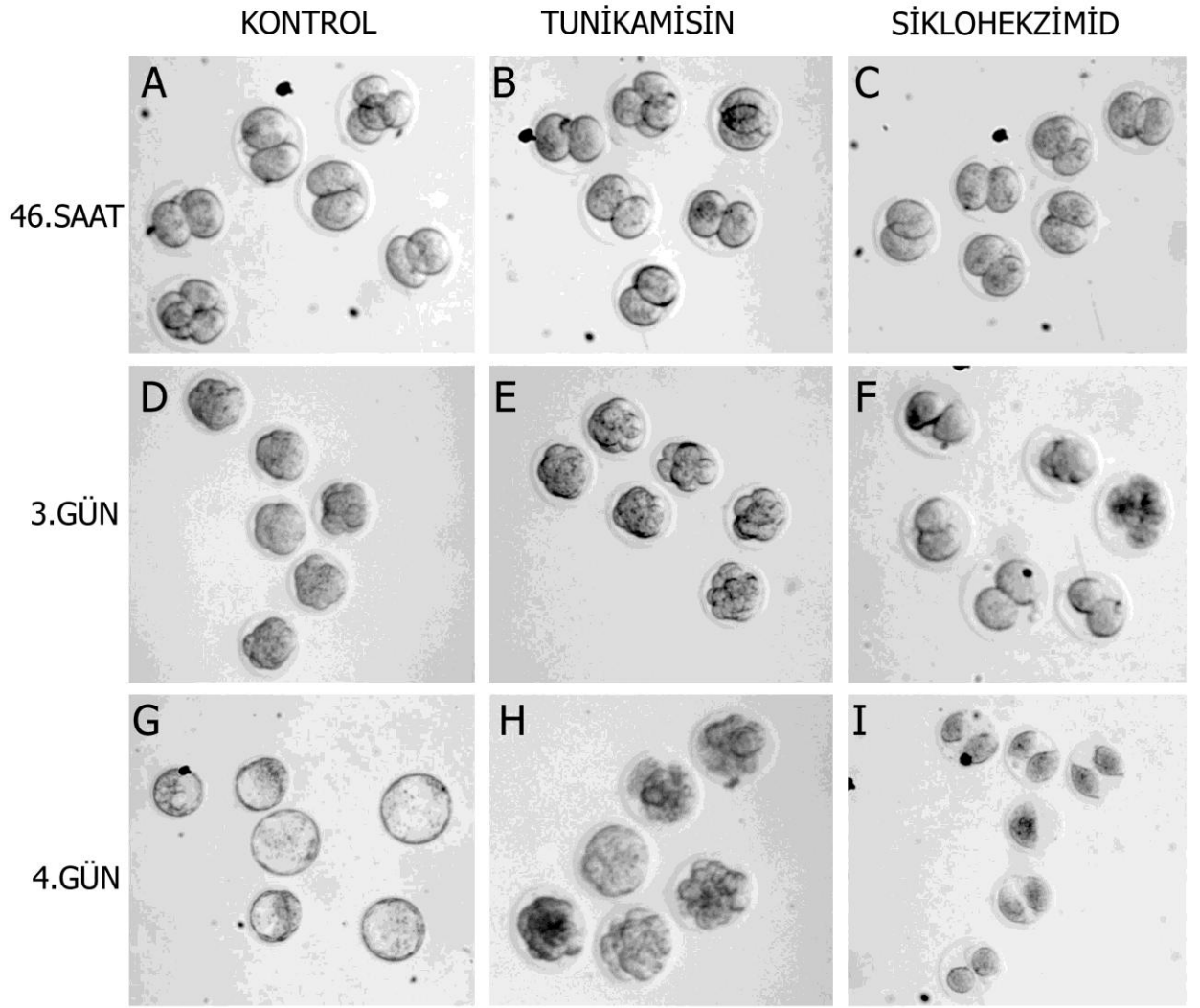
Carol Murgio
IACUC Coordinator
On behalf of the IACUC

4. BULGULAR

4.1. UPR sinyal yolağının in vitro preimplantasyon embriyo gelişimi üzerine etkisi

UPR sinyal yolağının preimplantasyon embriyo gelişimi üzerindeki rolünü araştırmak amacıyla ER stres molekülleri in vitro ortamda uyarıldı. Bu amaçla hCG enjeksiyonunu takip eden 46. saatte C57BL/6 dişi farelerin tuba uterina bölgesinden toplanan iki hücreli embriyolar kontrol, tunikamisin ve sikloheksimid gruplarına rastgele ayrıldı. Her gruba ait embriyolar iki hücreli aşamada toplanıp 24 saat aralıklarla Grillo ve ark.nın kriterlerine göre skorlanarak değerlendirildi. Deney gruplarındaki embriyolar eşit sayıda (altı embriyo) ve aynı kalitede idi (Şekil 6A-C). Preimplantasyon üçüncü gün kontrol grubu embriyoları embriyonik gelişim sürecine uygun olarak kompaksiyon evresinde gözlemlendi (Şekil 6D). Tunikamisin grubu embriyolarıda kompaksiyon evresinde olup kontrol embriyolarıyla benzer morfolojik kalitede gözlemlendi (Şekil 6E). Sikloheksimid grubu embriyolarının ise üçüncü günde hücre bölünmesine gitmediği ve hala iki hücreli aşamada oldukları gözlemlendi (Şekil 6F).

Preimplantasyon dördüncü gün kontrol grubu embriyoları iç hücre kitlesi ve dış hücre kitlesi (trofoektoderm) belirgin olarak ayırt edilebilecek düzeye ulaşmış blastosistlerden oluşmaktaydı (Şekil 6G). Buna karşın, tunikamisin grubu embriyolarının bir kısmı hala kompaksiyon aşamasında nisbeten daha koyu sitoplazmalı görünüme sahip blastomerlerden oluşmaktaydı. Geriye kalan tunikamisin grubu embriyoları ise blastosist aşamasına geçmeden dejenere oldukları gözlemlendi (Şekil 6H). Dördüncü gün sikloheximid grubu embriyolarının ise halen iki hücreli blastomer aşamasında olduğu ve yoğun bir hücresel dejenerasyon sürecinde oldukları gözlemlendi (Şekil 6İ).



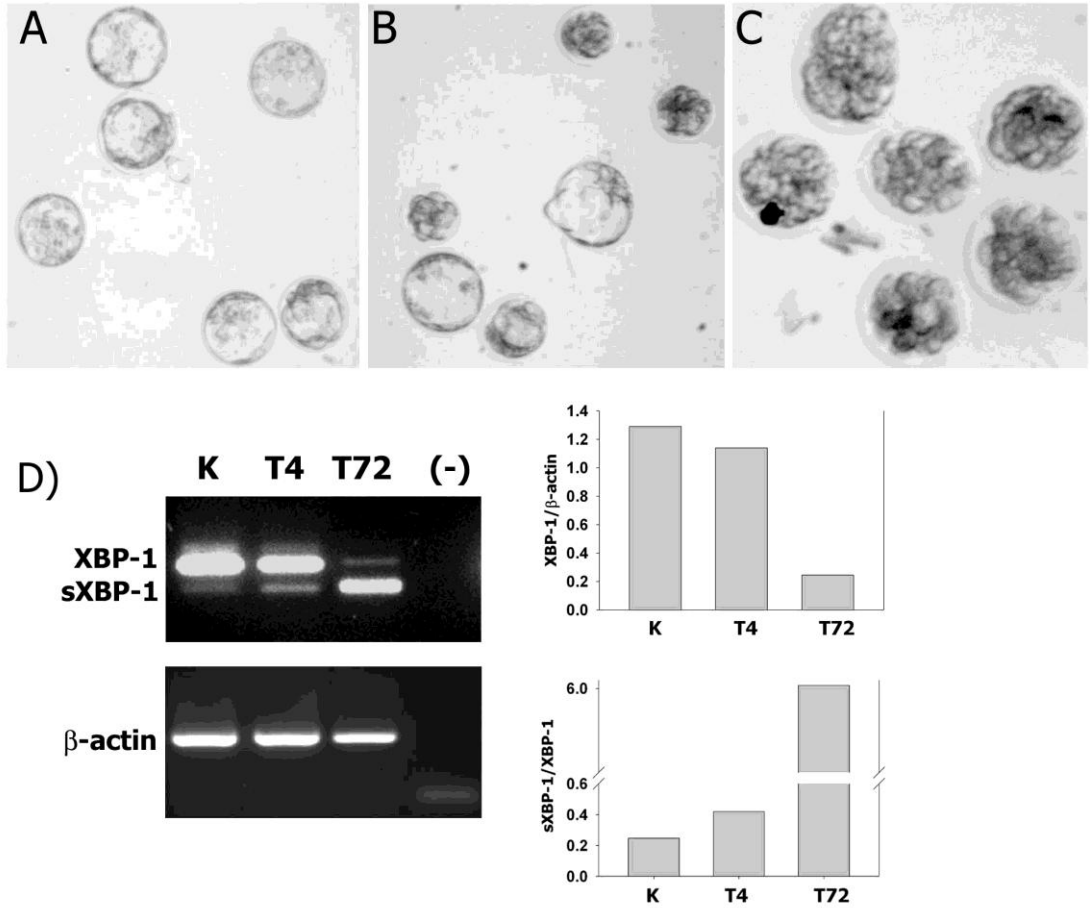
Şekil 6. Preimplantasyon embriyo gelişimine tunikamisinin ve sikloheksimidin etkisi. hCG enjeksiyonunu takip eden 46. saatte deneye başlanan 2-4 hücreli kontrol (A), tunikamisin (B) ve sikloheksimidle (C) uyarılan embriyolar görülmekte. 3 gün kontrol (D), tunikamisin (E), sikloheksimid (F) gruplarına ait embriyoların preimplantasyon aşamaları gölülmekte. 4.günde blastosist aşamasına gelen kontrol embriyolar (G) tunikamisin grubunda dejenere embriyolar (H) ve Sikloheksimid grubundaki 2 hücreli aşamadaki dejenere olan embriyolar izlenmekte (İ).

4.2. UPR sinyal yolağının kısa ve uzun dönem aktivasyonunun preimplantasyon embriyo gelişimine etkisi

Kısa ve uzun dönem ER stresinin preimplantasyon embriyolar tarafından gelişim sürecinde tolere edilemeyeceğini araştırmak için iki hücreli embriyolar kontrol, kısa dönem ve uzun dönem tunikamisin ile uyarılarak üç grupta incelendiler. Kısa dönem tunikamisin grubu embriyoları 4 saat tunikamisinli medyada kalıp akabinde kontrol medyumuna aktarıldı. Uzun dönem tunikamisin grubu embriyoları ise deney boyunca sürekli tunikamisinli medyuma inkübe edildi. Kontrol grubundaki embriyoların blastosist oluşma yüzdesi %100 olarak gerçekleşti (Şekil 7A). Diğer taraftan, tunikamisinli medyuma 4 saat tutulan embriyoların kontrol grubu embriyolarıyla kıyaslandığında blastosist gelişme yüzdesinin sadece %33, geriye kalan embriyoların ise dejenerasyon sürecinde olduğu saptandı (Şekil 7B). Uzun dönem tunikamisine maruz bırakılan embriyoların hepsi blastosist aşamasına ulaşmadan ilk deneyimiz ile uyumlu olarak dejenere oldukları gözlemlendi (Şekil 7C).

Tunikamisinin kısa dönem ve uzun dönem uyarılması sonucu preimplantasyon embriyolarında ortaya çıkan etkinin ER stres molekülleri aracılığıyla gerçekleşip gerçekleşmediğini araştırmak amacıyla 72 saatlik inkübasyonun sonunda toplanan embriyolarda XBP-1 ve sXBP-1'nin mRNA seviyeleri RT-PCR tekniği ile tespit edildi (Şekil 7D). RT-PCR sonuçlarına göre, uzun dönem tunikamisin uygulaması sonucunda embriyolarda sXBP-1 mRNA düzeyinin kontrol ve kısa dönem tunikamisin uygulamasına maruz kalmış embriyolara göre anlamlı düzeyde yüksek olduğu gözlemlendi (Şekil 7D). Uzun dönem tunikamisinin etkisi ile artan sXBP-1 mRNA seviyesi β -aktine normalize edildikten sonra kontrol grubuna göre 30 kat ve kısa dönem tunikamisin uyarısı alan embriyo grubuna göre 15 kat olduğu saptandı (Şekil 7D). Buna ilaveten, kısa dönem tunikamisin ile inkübe edilip akabinde kontrol medyumuna aktarılan embriyolarda ise β -aktinle normalize edilen sXBP-1 seviyesi kontrolle kıyaslandığında 2 kat daha yüksek oranda saptandı (Şekil 7D). XBP-1 mRNA seviyesinin ise uzun dönem tunikamisin ile inkübe edilen embriyolarda, kontrol ve kısa dönem tunikamisin ile uyarılmış embriyolara

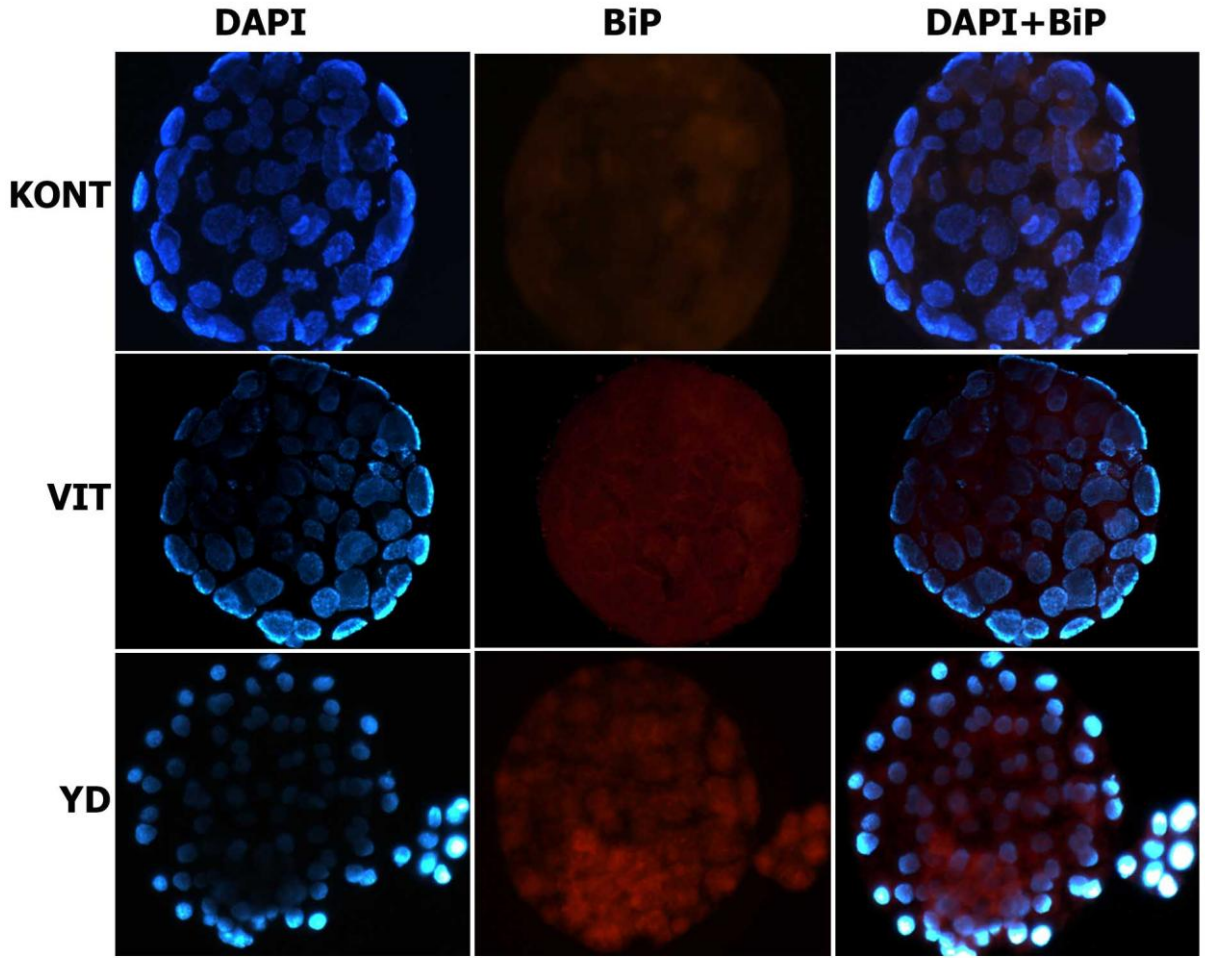
kiyasla anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlendi. Bununla birlikte kısa dönem tunikamisin grubu embriyolarında XBP-1 mRNA seviyesinin kontrole göre azaldığı saptandı (Şekil 7D).



Şekil 7 Kısa ve uzun dönem tunikamisin preimplantasyon embriyo gelişimine etkisi. 72 saat sonunda Kontrol grubuna ait blastosistler (A) Kısa dönem tunikamisin (4 saat) grubuna ait blastosistler ve dejenere embriyolar (B). Uzun dönem tunikamisin (72 saat) grubuna ait dejenere embriyolar (C) izlenmekte. 72 saatlik deney sonunda gruplar arasında XBP-1, s-XBP-1 ve β -actin mRNA seviyelerinin RT-PCR ile incelenmesi (D). Kontrol, kısa ve uzun dönem tunikamisin grubu embriyolarındaki XBP-1 ve sXBP-1 mRNA seviyeleri gözlenmekte (D). K, kontrol; T4, kısa dönem tunikamisin; T72, uzun dönem tunikamisin.

4.3. Preimplantasyon öncesi blastosistlerde dondurma (kriyoprezervasyon) ve çözme işleminin UPR sinyal yolağının aktivasyonuna etkisi

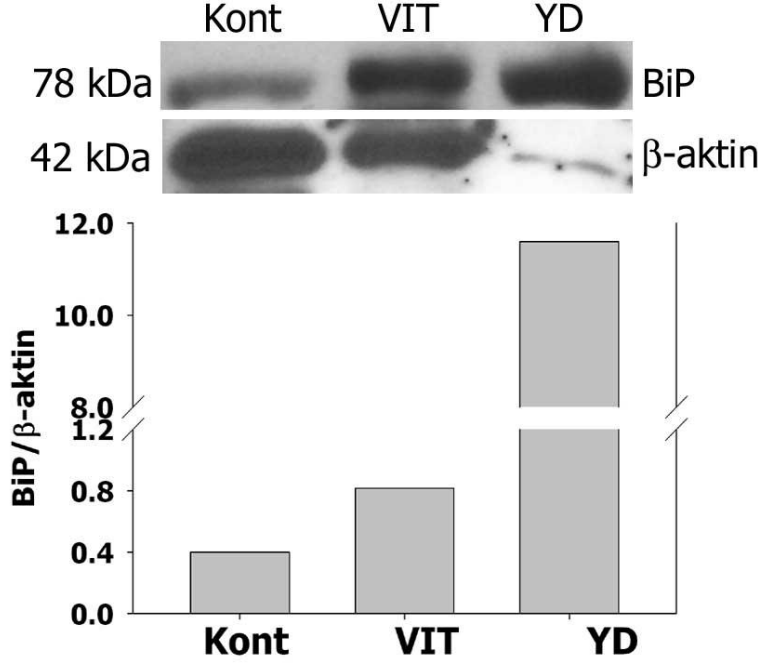
Günümüzde çok yaygın olarak YÜT'te kullanılan dondurma çözme tekniği ile elde edilen blastosistlerde implantasyon ve canlı doğum parametreleri çok düşük oranlardadır. Vitrifikasyonla bu oranın arttırabilir olduğuna dair bir çok data ve çalışma bulunsa da, bu oran hala önemli derecede düşüktür. Bu nedenle blastosist aşamasına kadar in vitro ortamda kültüre edilen fare embriyoları dondurulup çözüldükten sonra kontrol, vitrifikasyon ve yavaş dondurma olmak üzere üç grupta ER stres belirteci BiP'in seviyesi immünofloresan boyama ile kıyaslandı. Yavaş dondurma tekniği ile dondurulup çözülen blastosistlerde BiP immunoreaktivitesinin kontrol ve vitrifikasyon gruplarındaki blastosistlerle kıyaslandığında en yüksek seviyede olduğu gözlemlendi (Şekil 8). Vitrifikasyon ile dondurulup çözülen blastosistlerde ise BiP ekspresyonu kontrole göre daha yüksek yavaş dondurma grubuna göre düşük olarak saptandı (Şekil 8).



Şekil 8. Kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma teknikleri ile dondurulup çözülen blastosistlerde BiP immünoreaktivitesi. I. Kolon resimler DAPI nuklear boyaması; II. Kolon resimler BiP immunoreaktivitesi; III. Kolon resimler DAPI ve BİP'i birlikte göstermektedir. KONT: Kontrol; VIT: Vitrifikasyon; YD;Yavaş dondurma

İmmüno Floresan işaretlememize ilaveten kontrol, vitrifikasyon ve yavaş dondurma gruplarındaki blastosistlerde, Western blot tekniği ile de BiP'in hücrelerdeki seviyesine bakıldı. Bip seviyesi, immüno Floresan tekniği ile uyumlu olarak en yüksek yavaş dondurma grubunda saptandı (Şekil 9). Vitrifikasyon grubundaki blastosistlerde ise BiP ekspresyonu kontrole göre

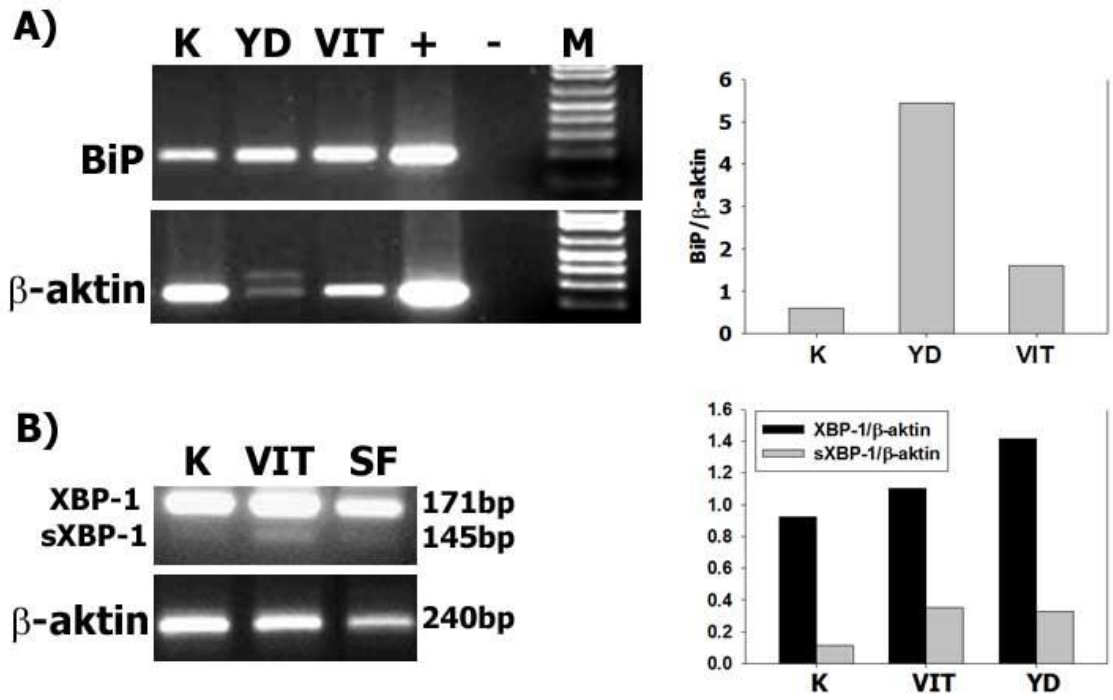
anlamalı düzeyde artış gösterirken, yavaş dondurma grubuna kıyasla daha düşük düzeydedi (Şekil 9).



Şekil 9. Kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma teknikleri ile dondurulup çözülen blastosistlerde BiP protein seviyesinin Western blot ile gösterilmesi. Grafik Vitrifikasyon ve yavaş dondurma gruplarındaki blastosistlerde BiP protein seviyesinin kontrole göre sırasıyla 2 kat ve 15 kat arttığı göstermektedir. K, kontrol; VIT, vitrifikasyon; YD,yavaşıdondurma-çözme.

Bu deneylere ilaveten dondurulup çözülen blastosistlerde, ER stresin etkisinin mRNA düzeyine yansıyıp yansımadığını araştırmak için, BiP, sXBP-1 ve XBP-1'in mRNA düzeyleri RT-PCR tekniği ile analiz edildi. Kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma grupları BiP mRNA seviyesi açısından kıyaslandığında, yavaş dondurma-çözme işlemine maruz kalan blastosistler en yüksek BiP mRNA seviyesine sahipti (Şekil 10A). Ayrıca, Western blot sonuçlarına paralel olarak vitrifikasyon tekniği ile dondurulup çözülen blastosistlerde ise, BiP mRNA düzeyinin kontrole göre daha yüksek,

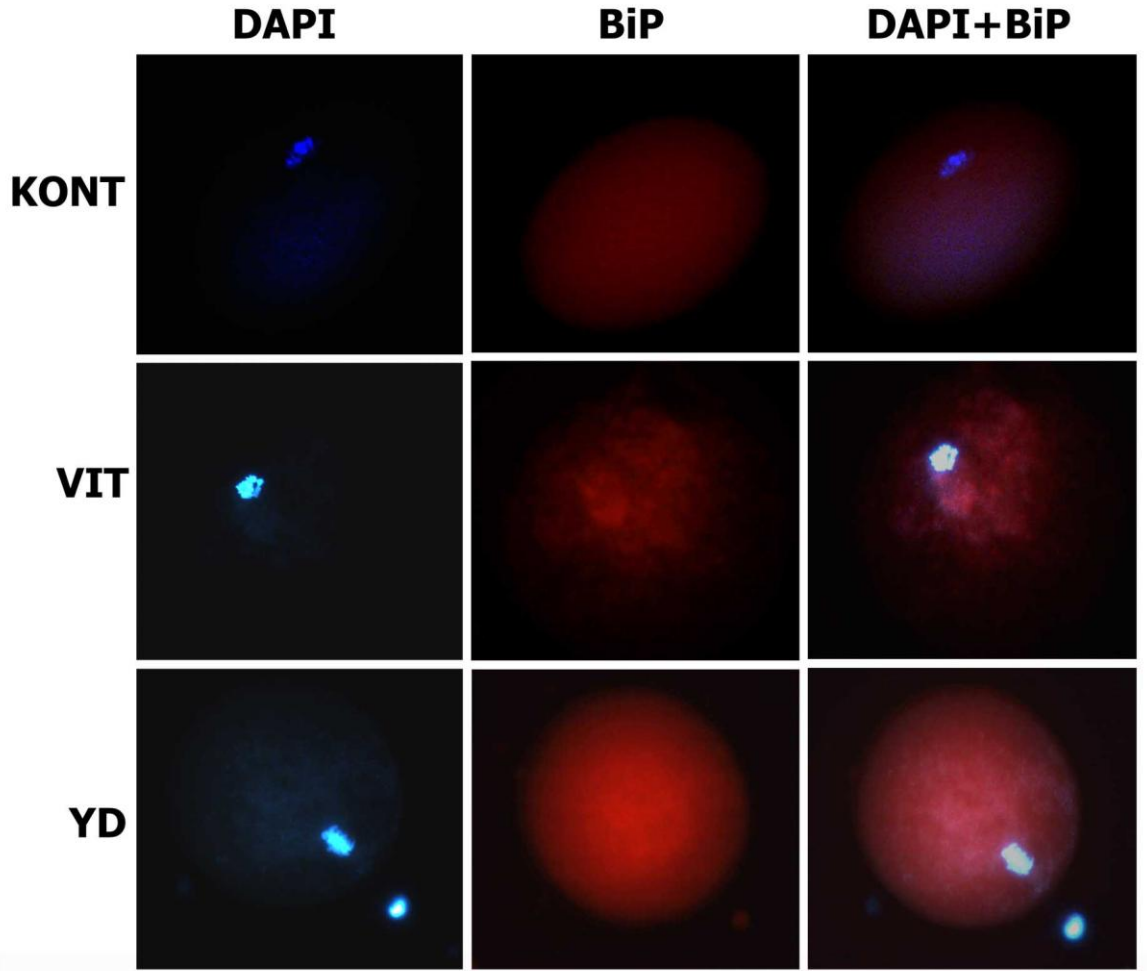
yavaş dondurma-çözme grubundaki blastosistlere göre daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 10A). Kontrol, vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme işlemine maruz kalan embriyolar XBP-1'in aktif formu olan sXBP-1 mRNA seviyesi açısından kıyaslandığında, vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme gruplarındaki blastosistlerde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artan sXBP-1 mRNA seviyesi saptandı (Şekil 10B).



Şekil 10. Vitrifikasyon ve yavaş dondurma tekniği ile dondurulup çözülen blastosistlerde BiP, XBP-1 ve sXBP-1 mRNA seviyesinin RT-PCR tekniği ile gösterilmesi. Grafikler kontrol, vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme gruplarındaki blastotistlerin BiP mRNA (A), XBP-1 mRNA ve sXBP-1 mRNA seviyesinin β-aktin mRNA'sına normalize edilmiş seviyelerini göstermektedir (B). K, kontrol; VIT, vitrifikasyon; YD, yavaş dondurma-çözme.

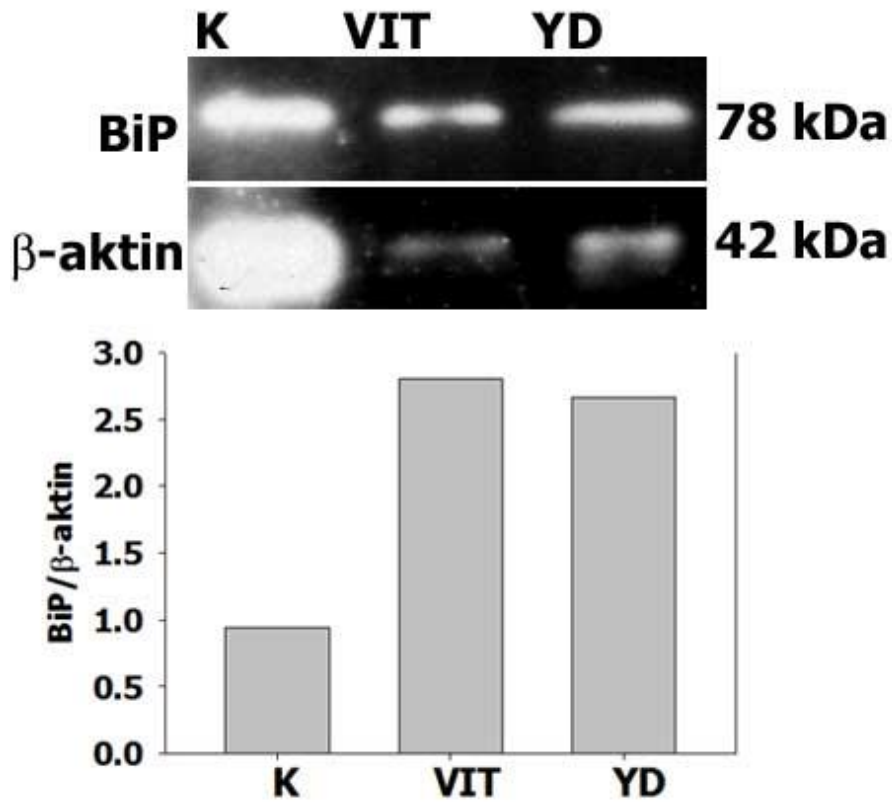
4.4. Olgun oositlerde dondurma (kriyoprezervasyon) ve çözme işleminin UPR sinyal yolağının aktivasyonuna etkisi

Dondurulup çözülen oositlerin fertilizasyon kapasitesi ve daha sonraki aşamalarda sağlıklı blastosist oluşturma ve implante olma oranları çok düşüktür. Oositlerde dondurup çözme tekniğinin başarısını sınırlandıran nedenlerden bir tanesi, bu süreç boyunca oosit endoplazmik retikulumunda oluşturabileceği stres moleküllerinin aktivasyonu olabilir. Stres moleküllerinin aktivasyonunu araştırmak için farelerin tuba uterinasının ampullar bölgesinden toplanan oositler kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma dondurup-çözme işlemini takiben ER stresi üzerine etkilerini belirlemek amacıyla BiP antikoru ile immünofloresan boyama tekniği ile işaretlendi. Yavaş dondurma ve vitrifikasyon tekniği ile dondurulup çözülen oositlerde BiP immunoreaktivitesinin kontrol grubundaki oositlerle kıyaslandığında daha yüksek bir immünofloresan sinyali verdikleri gözlemlendi (Şekil 11). Vitrifikasyon ile dondurulup çözülen oositler ise yavaş dondurma grubu ile kıyaslandığında benzer bir BiP immünofloresan şiddetine sahipti (Şekil 11).



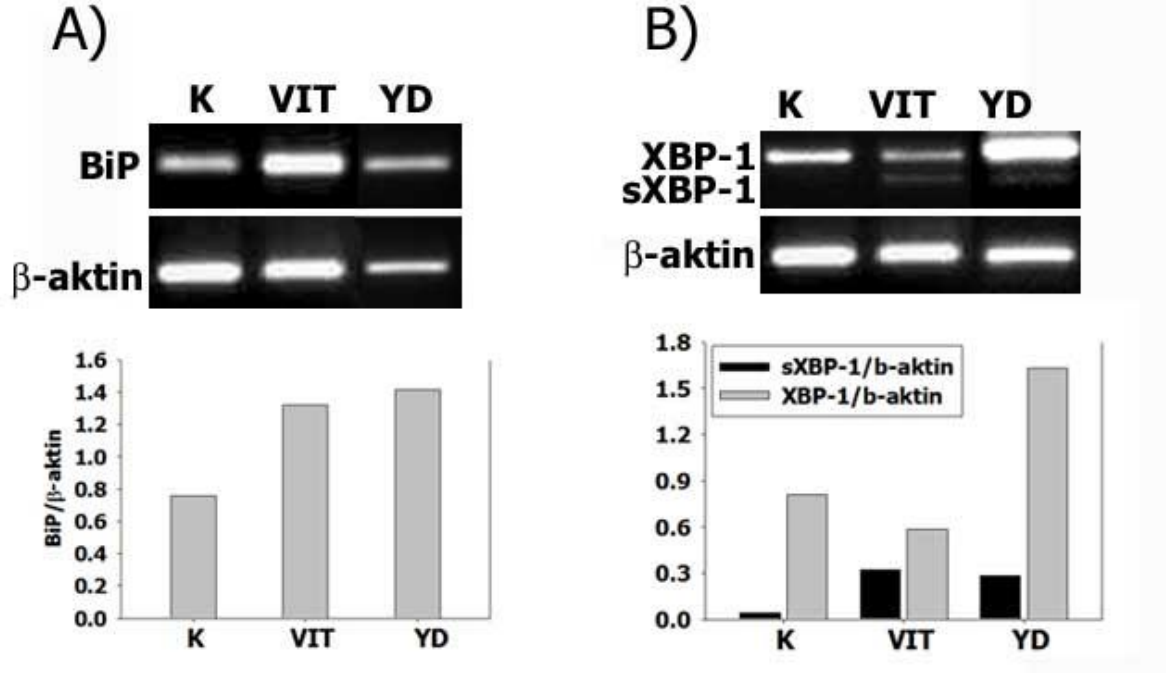
Şekil 11. Kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma teknikleri ile dondurulup çözülen oositlerde BiP immüno reaktivitesi. I. Kolon resimler DAPI nuklear boyaması; II. Kolon resimler BiP immunoreaktivitesi; III. Kolon resimler DAPI ve BiP'i birlikte göstermektedir. KONT: Kontrol; VIT: Vitrifikasyon; YD;Yavaş dondurma

Immüno Floresan tekniğine ek olarak kontrol, vitrifikasyon ve yavaş dondurma gruplarındaki oositlerde, Western blot tekniği ile de BiP protein düzeyine bakıldı. BiP seviyesi en yüksek vitrifikasyon tekniği ile dondurulup çözölen oositlerde saptandı (Şekil 12). Yavaş dondurma grubundaki oositlerde de BiP ekspresyonu kontrole göre anlamlı düzeyde artış gösterirken, vitrifikasyon grubundaki oositler ile kıyaslandığında bir fark gözlenmedi (Şekil 12).



Şekil 12. Kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma teknikleri ile dondurulup çözölen oositlerde BiP protein seviyesinin Western blot tekniği ile gösterilmesi. Vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme gruplarındaki oositlerde kontrol grubundaki oositlere oranla daha fazla BiP seviyesi gözlemlendi. Grafik, vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme gruplarının kontrole göre anlamlı artışı göstermektedir. K, kontrol; VIT, vitrifikasyon; YD, yavaş dondurma-çözme.

Dondurma-çözme işlemi sonrası protein düzeyinde ortaya çıkan ER stresin etkisinin oositlerin mRNA düzeylerine de yansıyıp yansımadığını araştırmak için, BiP, XBP-1 ve sXBP-1'in mRNA düzeyleri RT-PCR tekniği ile analiz edildi. Kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma gruplarındaki oositler, BiP mRNA seviyesi açısından kıyaslandığında, yavaş dondurma-çözme ve vitrifikasyon işlemlerine maruz kalan oositler arasında BiP mRNA seviyesi açısından anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 13A). Diğer taraftan, her iki dondurma grubuna ait oositlerin kontrol grubu oositlerine oranla daha yüksek bir BiP mRNA seviyesine sahip oldukları gözlemlendi (Şekil 13A). Kontrol, vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme işlemine maruz kalan oositler, XBP-1'in aktif formu olan sXBP-1 mRNA seviyesi açısından kıyaslandığında ise, vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme gruplarındaki oositler birbirleri ile kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmezken, kontrol grubu ile kıyaslandığında ise sXBP-1 mRNA seviyesinde artış saptandı (Şekil 13B).



Şekil 13. Vitrifikasyon ve yavaş dondurma tekniği ile dondurulup çözölen oositlerde BiP (A), XBP-1 ve sXBP-1 mRNA seviyesinin RT-PCR tekniği ile gösterilmesi (B). Grafikler kontrol, vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme gruplarındaki oositlerin BiP (A), XBP-1 ve sXBP-1 mRNA seviyesinin β -aktin mRNA'sına normalize edilmiş seviyelerini göstermektedir (B). K, kontrol; VIT, vitrifikasyon; YD, yavaş, dondurma-çözme.

5. TARTIŞMA

UPR, ER’da yeni sentezlenmiş katlanmamış proteinlerin ve katlama kapasitesindeki dengesizliğe cevap olarak gelişen adaptif bir mekanizmadır. Strese neden olan bir çok farklı faktör ve fizyolojik şartlar ER’da katlanmamış protein birikimine neden olabilir ve UPR yolağındaki ER yerleşimli transmembran proteinleri indükleyebilir (117,118). Bugünlerde ER stresinin nörodejenaratif hastalıklar (119, 120), bipolar bozukluk (121,122), diabetes mellitus (123, 124), inflamasyon (125, 126) ve iskemi (127, 128) gibi bir çok hastalıkta rol aldığı iyi bilinmektedir. Bu gelişmelere rağmen ER stresinin gametler ve embriyo gelişimi üzerindeki biyolojik rolü hakkında fazla kaynak bulunmamaktadır.

Bizim çalışmamızda, ilk basamak olarak ER stresinin preimplantasyon embriyo gelişimine etkisinin değerlendirilmesi için vivo kaynaklı iki hücreli embriyoların in vitro kültürleri yapılmıştır. Bizim çalışmamız ER stresinin, BiP-IRE1-XBP1 yolağının aktivasyonu ile preimplantasyon embriyo gelişimi üzerinde negative etkisinin olduğuna dair ilk kanıtı sağlamıştır.

Çalışmamızda in vivo kaynaklı iki hücreli embriyolar pre-implantasyon embriyo gelişimi sırasındaki BiP-IRE1-XBP-1 kaskadını açığa çıkarmak için ER stress başlatıcısı olan tunikamisin ile inkübe edilmiştir. Her 24 saatte bir embriyolar yukarıda belirtilen Grillo ve ark.’ın (115) skarlama sistemine göre skorlanarak değerlendirilmiştir. İlginç olarak üçüncü günde tunikamisin ve kontrol grupları arasında kompaksiyon evresi skorlandığında fark gözlenmemiştir (şekil 6, A,B). Beşinci gün ise embriyo kalitesi tunikamisin ile indüklenmiş grupta kontrole oranla önemli ölçüde azalmıştır (şekil 6, D,E). Sikloheximid inkübasyonuna maruz bırakılan iki hücreli embriyoların total protein sentezi inhibisyonuna bağlı olarak 3.günde hala iki hücreli aşamada kalması (şekil 6, C,F) ve beşinci günde ise tamamen dejenere olması (şekil 6, İ) tunikamisinin etkisinin total protein sentezinin inhibisyonuna bağlı olarak değilde UPR yolağına spesifik olarak geliştiğini ortaya koymaktadır.

Kısa dönem tunikamisin ile inkübe edilen embriyolarda ise kontrole göre az (%33), fakat uzun dönem inkübe edilen embriyolara oranla daha fazla blastosist oluşumu gözlenmiştir (%67) (Şekil 7). Tunikamisinli medyumda 4 saat inkübasyondan sonra kontrol medyuma aktarılmaları sonucunda embriyoların blastosist aşamasına kadar gelebilmeleri ve UPR yolağındaki sXBP-1 mRNA düzeyinin kontrol grubuna göre fazla ama 72 saat tunikamisin grubuna göre azalmış olması bu stresin geri dönüştürülebildiğini destekler nitelikteydi.

BiP(GRP78) ER stresi için en iyi bilinen belirteç şaperondur. Fizyolojik koşullar altında BiP IRE1'in luminal domenine bağlanır ve IRE1'i inaktif durumda kalmasını sağlar. ER stresi sürecinde ise, protein katlanmasına destek olmak için IRE1'den ayrılır ve IRE1 in aktivasyonuna sebep olur (109,129). Çalışmamızda immunofloresan analizi ile Tunikamisin ile indüklenmiş embriyolar daha yüksek nuklear fragmentasyon ve apoptozis indikatörü göstermiştir. (Şekil 7)

Dahası apoptoz bağlantılı BAX ve BAK proteinleri IRE1 in sitosolik domeni ile direk olarak etkileşimde olduğu bulunmuş ve bu etkileşimin ER stress cevabını arttırdığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada, Tunikamisinle indüklenmiş embriyolarda apoptoz indikatörü olan nuklear fragmentasyon daha fazla gözlemlendi. Tunikamisin indüksiyonunun apoptozla sonuçlandığını açığa çıkarmak amacıyla XBP1/sXBP1 ve RT-PCR analizleri yapılmıştır. BiP-IRE1-XBP-1 yolağı üzerinden ise sXBP-1(aktive) mRNA düzeyi en yüksek uzun dönem tunikamisinde gözlenirken, kısa dönem tunikamisin grubunda kontrole göre fazla, fakat uzun dönem tunikamisine oranla daha az sXBP-1 düzeyi saptanmıştır (Şekil 7).

BiP ekspresyonunda artış, s-XBP1 formunun düzeyinin artması pre-implantasyon embriyo gelişiminde nuklear fragmentasyon artışı indüklenerek hücrel stresin UPR bağlantılı aktivasyonu blastosist formasyonunu engellemekte olduğunu göstermektedir. Bu belkide YÜT laboratuvarlarında düşük blastosist oluşumunun nedenlerinden birtanesi olabilir.

Bugün oosit ve embriyo kriyoprezervasyonu, infertilite tedavisinin başarı oranını arttırmada önemli bir role sahiptir. Oosit ve embriyo kriyoprezervasyonu ovaryumlara tekrarlı farmakolojik hiperstimulasyona ve fazla zaman alan, stresli ve hasta için riskler barındıran oosit elde etme prosedürüne ihtiyaç olmaksızın gebelik sağlayabilmektedir (130). Embriyo kriyoprezervasyonunun her iki aile ferдинde genetik komplemanlarının saklanması açısından sağladığı yararın yanı sıra oosit kriyoprezervasyonu kemoterapi yada radyoterapi tedavisi gören kanser hastalarının üreme yetisini kaybetme ihtimaline karşı veya gebeliği üreme yaşının ileri safhalarına ertelemiş yada ertelemek zorunda kalmış hastalar için klinik ve pratik bir avantaj sağlamaktadır (131).

Oosit ve kriyoprezervasyonu sonucu ilk gebelik raporlarının üstünden uzun yıllar geçmiştir (131). Yeni olarak, kriyoprotektanlar ile ilişkili buz kristal oluşumunun hücre sel biyolojisi ve biyofiziksel niteliklerine yönelik gelişen bilgi birikimi, artan ilgi ve çalışmalar ile oosit kriyoprezervasyonunda hem yavaş dondurma hemde vitrifikasyon tekniklerine odaklanılmıştır (132,133). Embriyo kriyoprezervasyonunda geleneksel olan yöntem pahalı bir ekipman gerektiren yavaş-dondurma kriyoprezervasyonudur. Vitrifikasyon prosedürü IVF laboratuvarlarında test edilmiş olsada (134,135) önceleri kriyoprotektanların yüksek toksik düzeylerine ve hücrelerde oluşan osmatik şokun sonucu olarak hızlı dehidrasyonuna bağlı olarak düşük başarı oranları elde edilmiştir (136,137). Ancak daha az toksik kriyoprotektan içeriği ve vitrifiye edilen materyalin depolanmasını kolaylaştıran cihazın gelişimi ile yeni vitrifikasyon protokolleri başarı şansını yüksek oranda arttırmıştır (138). Vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme tekniklerindeki son gelişmelere rağmen hala gebelik ve canlı doğum oranları önemli derecede düşüktür. Günümüzde yavaş dondurma ve vitrifikasyon prosedürlerinin karşılaştırmalı literatür tarama (139) ve retrospektif çalışmaları yapılırken bir yandan da hayvan modelleri arasında deneysel çalışmalar yapılmaktadır (139).

Bu alışmalar kriyoprezervasyon için in vitro şartların hala yetersiz olduğu ve bir problemin kriyoprezervasyon prosedürünü sınırladığı göstermektedir. Her iki prosedürde de oosit ve embriyolar sitoplazmik yapı, organel fizyolojisi bozukluklarına ve hatta hücre ölümüne neden olabilecek mekanik, kimyasal ve termal streslere maruz kalmaktadır (140,141). Oositler açısından değerlendirildiğinde ise , düşük blastosist oluşum oranları, geniş sitoplazmik hacime bağlı olarak bütün iyileşmeyi etkileyebilecek hassasiyete sahip olmalarına bağlanabilir. Deneylerimizde ER stresi yaratılan pre-implantasyon embriyoların gelişimlerini tamamlayamaması ve UPR sinyal yolağındaki XBP-1 mRNA seviyelerinin kontrol gruplarına oranla daha yüksek bulunması, dondurulup çözölen oosit ve embriyolarda ER stresinin taze oositlere ve embriyolara oranla daha aktif olabileceğini düşündürmüştür.

Bu bağlamda ilk başta in vitro ortamda költüre edilerek blastosist aşamasına getirilen embriyolar hem vitrifikasyon hemde yavaş dondurma teknikleri ile dondurulup özölerek ER stress belirteci olan BiP immünoreaktivitesi açısından değerlendirilmiştir. Yavaş dondurma tekniği ile dondurulup çözölen blastosistlerde BiP immünoreaktivitesinin kontrol ve vitrifikasyon gruplarındaki blastosistlerle kıyaslandığında en yüksek seviyede olduğu gözlendi (şekil 8). Vitrifikasyon ile dondurulup çözölen blastosistlerde ise BiP ekspresyonu kontrole göre daha yüksek yavaş dondurma grubuna göre düşük olarak saptandı (şekil 8). Kontrol(dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme gruplarındaki blastosistlerde Western blot analizi ile tespit edilen BiP seviyeleri immünofloresan deneyimizin sonuçları ile uyumluluk göstermektedir (şekil 9). Bu deneylere ek olarak yapılan RT-PCR tekniği ile bakılan XBP-1, sXBP-1 ve ̢-aktin mRNA düzeyleri karşılaştırıldığında yavaş dondurma-çözme işlemine maruz kalan blastosistler en yüksek BiP mRNA seviyesine sahipti (şekil 10A). Vitrifikasyon ile çözölen blastosistlerde ise, BiP mRNA düzeyinin kontrole göre daha yüksek, yavaş dondurma-çözme grubundaki blastosistlere göre daha düşük olduğu gözlendi (şekil 10A). Kontrol, vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme işlemine maruz kalan

embriyolar XBP-1'in aktif formu olan sXBP-1 mRNA seviyesi açısından kıyaslandığında, vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme gruplarındaki blastosistlerde kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde artan sXBP-1 mRNA seviyesi saptandı (Şekil 10B).

Oositlerin kriyoprezervasyon yöntemi ile dondurulması maternal yaşa bağımlı oosit rezervinin azalması, oosit kaynaklı kromozom anomali riskinin artması (40 yaş ve sonrası), oosit fertilize olabilmek kapasitesinin azalması ve kanser hastalarında tedavi sonrası ovaryumda oosit üretme yeteneğinin ortadan kalkması temel nedenler olarak sayılabilir. Gelişmiş ülkelerde kadınlarda kansere bağlı olarak kemoterapi ve radyoterapi gerekliliği, veya kariyer ve ileri yaşta çocuk sahibi olma tercihi oosit kriyoprezervasyon tekniğini günümüzde yaygın olarak tercih edilen bir yöntem haline getirmiştir. Dondurulup çözülen oositlerin fertilizasyon kapasitesi ve daha sonraki aşamalarda sağlıklı blastosist oluşturma ve implante olma oranları çok düşüktür. Oositlerde dondurma tekniklerini sınırlandıran nedenlerden birisinin de, işlem sırasında bir çok strese maruz kalan oositlerde oluşan ER stresinin olabileceğini düşündüğümüz bu çalışmada immünofloresan sonuçlarına baktığımızda, Yavaş dondurma ve vitrifikasyon tekniği ile dondurulup çözülen oositlerde BiP immunoreaktivitesinin kontrol grubundaki oositlerle kıyaslandığında daha yüksek seviyede olduğu gözlemlendi (Şekil 11). Vitrifikasyon ile dondurulup çözülen oositler ise yavaş dondurma grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 11). Immünofloresan tekniğinin yanısıra Western blot analizi ile değerlendirdiğimizde, BiP seviyesi, en yüksek vitrifikasyon grubundaki oositlerde saptandı (Şekil 12). Yavaş dondurma grubundaki oositlerde ise BiP ekspresyonu kontrole göre anlamlı düzeyde artış gösterirken, vitrifikasyon grubu arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi (Şekil 12). RT-PCR sonuçlarında önceki deneyleri destekler şekildeydi. Kontrol (dondurulmamış), vitrifikasyon ve yavaş dondurma gruplarındaki oositler, BiP mRNA seviyesi açısından kıyaslandığında, yavaş dondurma-çözme ve vitrifikasyon işlemlerine maruz kalan oositler arasında BiP mRNA seviyesi açısından anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 13A). Fakat her iki dondurma grubundaki

oositlerin de kontrol oositlere oranla daha yüksek BiP mRNA seviyesine sahip oldukları gözlemlendi. (Şekil 13A). Kontrol, vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme işlemine maruz kalan oositler, XBP-1'in aktif formu olan sXBP-1 mRNA seviyesi açısından kıyaslandığında ise, vitrifikasyon ve yavaş dondurma-çözme gruplarındaki oositler birbirleri ile kıyaslandığında anlamlı bir fark gözlenmezken yine aynı şekilde kontrol grubuna kıyaslandığında sXBP-1 mRNA seviyesinde artış saptandı (Şekil 13B).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu projede ER stres moleküllerinin aktive olmasının preimplantasyon embriyo gelişimine etkisinin olduğu ve buna ek olarak YÜT' te yaygın olarak kullanılan kriyoprezervasyon tekniğinin oosit ve embriyolarda ER stresine bağlı UPR sinyal yolağını aktive ettiği gösterilmiştir. Daha sonra yapılacak araştırmalar bu sinyal yolunu inhibe eden faktörler ile dondurulup çözölen embriyo ve oositlerin gelişim kalitelerinin artırılması yönünde olmalıdır. Ayrıca tüp bebek merkezlerindeki bu konudaki temel problemin çözümüne alternatif yaklaşımlar getirilmesi amaçlanmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. Steptoe, P.C. and R.G. Edwards, Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 1978. 2(8085): p. 366.
2. Palermo, G., et al., Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992. 340(8810): p. 17-8.
3. Munne, S., et al., Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*, 1993. 8(12): p. 2185-91.
4. Pellestor, F., et al., [Cytogenetic study of fragmented embryos not transferred in in vitro fertilization]. *Ann Genet*, 1993. 36(2): p. 94-9.
5. Pellestor, F., et al., Direct assessment of the rate of chromosomal abnormalities in grade IV human embryos produced by in-vitro fertilization procedure. *Hum Reprod*, 1994. 9(2): p. 293-302.
6. Bonduelle, M., et al., A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception. *Hum Reprod*, 2005. 20(2): p. 413-9.
7. Andersen, A.N., et al., Assisted reproductive technology in Europe, 2003. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*, 2007. 22(6): p. 1513-25.
8. Wright, V.C., et al., Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2003. *MMWR Surveill Summ*, 2006. 55(4): p. 1-22.
9. Edwards, R.G. and H.K. Beard, Is the success of human IVF more a matter of genetics and evolution than growing blastocysts? *Hum Reprod*, 1999. 14(1): p. 1-4.
10. Wright, V.C., et al., Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2002. *MMWR Surveill Summ*, 2005. 54(2): p. 1-24.
11. Trounson, A. and L. Mohr, Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 1983. 305(5936): p. 707-9.
12. Falcone, T., et al., Ovarian function preservation in the cancer patient. *Fertil Steril*, 2004. 81(2): p. 243-57.
13. Kaufman, R.J., Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*, 1999. 13(10): p. 1211-33.
14. Ron, D. and P. Walter, Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. 8(7): p. 519-29.

15. Schroder, M. and R.J. Kaufman, The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, 2005. 74: p. 739-89.
16. Deng, J. and C.H. Rodeck, New fetal cardiac imaging techniques. *Prenat Diagn*, 2004. 24(13): p. 1092-103.
17. Gregor, M.F. and G.S. Hotamisligil, Thematic review series: Adipocyte Biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res*, 2007. 48(9): p. 1905-14.
18. Cox, J.S., C.E. Shamu, and P. Walter, Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell*, 1993. 73(6): p. 1197-206.
19. Urano, F., et al., Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 2000. 287(5453): p. 664-6.
20. Brewer, J.W., et al., Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(15): p. 8505-10.
21. Sherr, C.J., G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*, 1994. 79(4): p. 551-5.
22. Brewer, J.W. and J.A. Diehl, PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(23): p. 12625-30.
23. Liu, W.X., et al., Comparative study between slow freezing and vitrification of mouse embryos using different cryoprotectants. *Reprod Domest Anim*, 2009. 44(5): p. 788-91.
24. Son, W.Y. and S.L. Tan, Comparison between slow freezing and vitrification for human embryos. *Expert Rev Med Devices*, 2009. 6(1): p. 1-7.
25. Vutyavanich, T., et al., Closed-system solid surface vitrification versus slow programmable freezing of mouse 2-cell embryos. *J Assist Reprod Genet*, 2009. 26(5): p. 285-90.
26. Young b, heath jw. *Wheater's Functional Histology a Text and Colour Atlas*. Copyright Licensing Agency Ltd., London, page 341-348, 2000.
27. Junqueira lc, carneiro j, kelley ro. *Basic Histology (Temel Histoloji)*. Çeviren: aytekin y. Baris Kitabevi, _stanbul, sayfalar 423-431, 1998.
28. Dellmann dh, evrell ja. *Textbook of Veterinary Histology*, Lippincott Williams&Wilkins, page 247- 255, 1998.

29. Gürsoy E, Koptagel E, Ergin K. Hücre dokuları, genel embriyoloji, disi üreme sistemi, Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları, Aydın, 2009; 196-201
30. Pritchett KR, Taft RA. Reproductive biology of the laboratory Mouse. In: The Mouse in Biomedical Research. Fox JG, Davission MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcamer CE, Smith AL (Eds). Vol III. Chapter 3. 2. edition. USA: Elsevier; 2007: 97-101.
31. Kierszenbaum AL. Follicle development and menstrual cycle. In: Histology and Cell Biology. USA. Mosby Inc.; 2002: 564-75.
32. McGee E.A. , Hsueh A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev 2000; 21(2): 200-14.
33. Balla A. , Danilovich N. , Yang Y. , Sairam M.R. Dynamics of Ovarian development in the FORKO immature Mouse: Structural and functional implications for ovarian reserve. Biol Reprod 2003; 69:1281-93.
34. Macklon NS, Fauser BC. Aspects of ovarian follicle development throughout life. Horm Res 1999; 52(4): 161-70.
- 35.30- Speroff L, Glars RH, Kase NG. Ortaç F, Aytaç R. Menstruel Siklusun Regülasyonu. Erk A. (Çev.Ed.). Klinik Jinekolojik Endokrinoloji ve İnfertilite. 5. baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitapevi; 1996: 183-230.
36. Michael H Ross, Edward J Reith, Lynn J Romrell. Female Reproductive System. Histology: A text and Atlas. 2. edition. USA. Williams&Wilkins; 1989: 649-62.
37. Fulka Jr J, First NL, Moor RM. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. Mol. Hum. Reprod 1998; 4(1): 41-49.
38. Mitra J, Schultz R.M. Regulation of the acquisition of meiotic competence in the mouse: changes in the subcellular localization of cdc2, cyclin b1, cdc25c, and wee1, and in the concentration of these proteins and their transcripts. J. Cell. Sci 1996; 109: 2407-15.
39. De Vanterly C, Stutz A, Vasalli J.D, and Schorderct-Slatkine S. Acquisition of meiotic competence in growing mouse oocytes in controlled at both translational and post translational levels. Dev. Biol 1997; 187: 43-54.
40. De La Fuente R, J.O'Brien M, Eppig J.J. Epidermal growth factor enhances

preimplantation developmental competence of maturing Mouse oocytes. Hum. Reprod 1999; 14: 3060-8.

41. Rutherford A.J. The practical aspects of in vitro maturation of human oocytes. Fertility and Reproductive Medicine 1998: 577-87.

42. Eppig J.J, Schultz R.M, OBrien M, and Chesnel F. Relationship between the developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. Dev. Biol 1994; 164:1-9.

43. Eppig J.J.: Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. Reprod Fert Dev 1996; 8:485-6.

44. Eppig J.J, Downs S.M. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. Biol. Reprod. 1984; 30:1.

45. Downs S.M, Daniel S.A.J, Eppig J.J. Induction of maturation in cumulus cell-enclosed mouse oocyte by follicle-stimulating hormone and epidermal growth factor: evidence for a positive stimulus of somatic cell origin. J Exp Zool 1988; 245-86.

46. Delilbası L. invitro Fertilizasyon Laboratuvar Yöntemleri. Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2008

47. Moore LK. Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.

48. Şekil 3 Dr. B. Behr ve Stamford üniversitesinin IVF kliniğinden izinlidir.

49. Klun V, Tomazevic T, Zorn B, L. Bacer-Kermavner, J. Mivsek, and H. Meden-Vrtovec. Blastocyst formation- Good indicator of clinical tests after ICSI with testicular spermatozoa. Hum Reprod. 2003, 18: 1070-1076.

50. Wilmut, I. (1972). "The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during freezing and thawing." Life sciences. Pt. 2: Biochemistry, general and molecular biology 11(22): 1071-1079.

51. Willadsen, S., C. Polge, et al. (1978). "The viability of deep-frozen cow embryos." Journal of reproduction and fertility 52(2): 391-393.

52. Whittingham, D. G., S. P. Leibo, et al. (1972). "Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C." Science 178(59): 411-414.

53. Whittingham, D. G. (1971). "Survival of mouse embryos after freezing and thawing." Nature 233(5315): 125-126.

54. Chen, S. U., Y. R. Lien, et al. (2005). "Observational clinical follow-up of oocyte cryopreservation using a slow-freezing method with 1,2-propanediol plus sucrose followed by ICSI." *Human reproduction* 20(7): 1975-1980.
55. Luz MR, Holanda CC, Pereira JJ, Teixeira NS, Vantini R, Freitas PMC, Salgado AEP, Oliveira SB, Guaitolini CRF & Santos MC 2009 Survival rate and in vitro development of in vivo-produced and cryopreserved dog embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 22 208-209 (abstract).
56. Diez, C., Y. Heyman, et al. (2001). "Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability." *Theriogenology* 55(4): 923-936.
57. Barcelo-Fimbres & Seidel 2007b Barcelo-Fimbres, M. and G. E. Seidel, Jr. (2007). "Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation." *Molecular reproduction and development* 74(11): 1395-1405.
58. Mazur, P. (1963). "Kinetics of Water Loss from Cells at Subzero Temperatures and the Likelihood of Intracellular Freezing." *The Journal of general physiology* 47: 347-369.
59. Yavin, S. and A. Arav (2007). "Measurement of essential physical properties of vitrification solutions." *Theriogenology* 67(1): 81-89.
60. Arav A & Zeron Y 1997 Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is effected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology* 47 341 (abstract)
61. Saha, S., T. Otoi, et al. (1996). "Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone." *Cryobiology* 33(3): 291-299.
62. A, A. (1992). "Yeast genome project:300,000 and counting." *Science* 256(5056): 462.
63. Yavin, S., A. Aroyo, et al. (2009). "Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush." *Human reproduction* 24(4): 797-804.
64. Seki S & Mazur P 2009 The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology* 59 75-82.

65. Riggs R, Mayer J, Dowling-Lacey D, Chi T-F, Jones E & Oehninger S 2010 Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos. *Fertility and Sterility* 93 109-115.
66. Whittingham, D. G. (1977). "Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at --196 degrees C." *Journal of reproduction and fertility* 49(1): 89-94.
67. Kasai, M., A. Iritani, et al. (1979). "Fertilization in vitro of rat ovarian oocytes after freezing and thawing." *Biology of reproduction* 21(4): 839-844.
68. Noyes N, Boldt J & Nagy ZP 2010 Oocyte cryopreservation: is it time to remove its experimental label? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 27 69-74.
69. Oktay K, Cil AP & Bang H 2006 Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertility and Sterility* 86 70-80.
70. Magli MC, Lappi M, Ferraretti AP, Capoti A, Ruberti A & Gianaroli L 2010 Impact of oocyte cryopreservation on embryo development. *Fertility and Sterility* 93 510-516.
71. Chen S-U & Yang Y-S 2009 Slow freezing or vitrification of oocytes: Their effects on survival and meiotic spindles, and the time schedule for clinical practice. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* 48 15-22.
72. Toner M, Cravalho EG & Karel M 1990 Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells. *Journal of Applied Physics* 67 1582- 1593.
73. Ruffing NA, Steponkus PL, Pitt RE & Parks JE 1993 Osmometric behavior, hydraulic conductivity, and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. *Cryobiology* 30 562-580.
74. Mavrides A & Morroll D 2005 Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of bovine oocytes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 118 66-70.
75. Gook DA, Osborn SM & Johnston WIH 1993 Cryopreservation of mouse and human oocytes using 1, 2-propanediol and the configuration of the meiotic spindle. *Human Reproduction* 8 1101-1109.

76. Luvoni GC & Pellizzari P 2000 Embryo development in vitro of cat oocytes cryopreserved at different maturation stages. *Theriogenology* 53 1529-1540
77. Ciotti PM, Porcu E, Notarangelo L, Magrini O, Bazzocchi A & Venturoli S 2009 Meiotic spindle recovery is faster in vitrification of human oocytes compared to slow freezing. *Fertility and Sterility* 91 2399-2407.
78. 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 2602-2607.
79. Willadsen S, Polge C & Rowson LEA 1978 The viability of deep-frozen cow embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 52 391-393.
80. Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA & Moor RM 1976 Deep freezing of sheep embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 46 151-154.
81. Moragianni VA, Cohen JD, Smith SE, Schinfeld JS, Somkuti SG, Lee A & Barmat LI 2010 Outcomes of day-1, day-3, and blastocyst cryopreserved embryo transfers. *Fertility and Sterility* 93 1353-1355.
82. Salumets A, Tuuri T, Makinen S, Vilska S, Husu L, Tainio R & Suikkari A-M 2003 Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozenthawed embryo transfer. *Human Reproduction* 18 1890-1895.
83. Liebermann J 2009 Vitrification of human blastocysts: an update. *Reproductive Biomedicine Online* 19 105-114.
84. Inokuchi, Y., Y. Nakajima, et al. (2009). "Effect of an inducer of BiP, a molecular chaperone, on endoplasmic reticulum (ER) stress-induced retinal cell death." *Investigative ophthalmology & visual science* 50(1): 334-344.
85. Bernales, S., F. R. Papa, et al. (2006). "Intracellular signaling by the unfolded protein response." *Annual review of cell and developmental biology* 22: 487-508.
86. Kozutsumi, Y., M. Segal, et al. (1988). "The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins." *Nature* 332(6163): 462-464.
87. Malhotra, J. D. and R. J. Kaufman (2007). "The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response." *Seminars in cell & developmental biology* 18(6): 716-731.

88. Kohno, K. (2010). "Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals." *Journal of biochemistry* 147(1): 27-33.
89. Shamu, C. E. and P. Walter (1996). "Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus." *The EMBO journal* 15(12): 3028-3039.
90. Welihinda, A. A. and R. J. Kaufman (1996). "The unfolded protein response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomerization and trans-phosphorylation of Ire1p (Ern1p) are required for kinase activation." *The Journal of biological chemistry* 271(30): 18181-18187.
91. Cox, D. J., N. Strudwick, et al. (2011). "Measuring signaling by the unfolded protein response." *Methods in enzymology* 491: 261-292.
92. Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." *Nature reviews. Molecular cell biology* 8(7): 519-529.
93. Cox, J. S. and P. Walter (1996). "A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response." *Cell* 87(3): 391-404.
94. Calton, M., H. Zeng, et al. (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." *Nature* 415(6867): 92-96.
95. Travers, K. J., C. K. Patil, et al. (2000). "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation." *Cell* 101(3): 249-258.
96. Lee, A. H., N. N. Iwakoshi, et al. (2003). "XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response." *Molecular and cellular biology* 23(21): 7448-7459.
97. Harding, H. P., Y. Zhang, et al. (1999). "Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase." *Nature* 397(6716): 271-274.
98. Shi, Y., K. M. Vattam, et al. (1998). "Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control." *Molecular and cellular biology* 18(12): 7499-7509.

99. Scheuner, D., B. Song, et al. (2001). "Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis." *Molecular cell* 7(6): 1165-1176.
100. Ron, D. (2002). "Translational control in the endoplasmic reticulum stress response." *The Journal of clinical investigation* 110(10): 1383-1388.
101. Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Dave, U. P., Prywes, R., Brown, M. S., and Goldstein, J. L. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs (2000) *Mol. Cell* 6, 1355-1364
102. Okada, T., H. Yoshida, et al. (2002). "Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response." *The Biochemical journal* 366(Pt 2): 585-594.
103. Adachi, Y., K. Yamamoto, et al. (2008). "ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum." *Cell structure and function* 33(1): 75-89.
104. Schroder, M. and R. J. Kaufman (2005). "The mammalian unfolded protein response." *Annual review of biochemistry* 74: 739-789.
105. Gündeşli H, Dincer P, (2008). Endoplazmik retikulum stresinin moleküler mekanizması ve kas patolojisi arasındaki ilişki *Hacettepe Tıp Dergisi*; 39:109-114
106. Bertolotti, A., Y. Zhang, et al. (2000). "Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response." *Nature cell biology* 2(6): 326-332.
107. Shen, J., X. Chen, et al. (2002). "ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals." *Developmental cell* 3(1): 99-111.
108. Liu, C. Y., Z. Xu, et al. (2003). "Structure and intermolecular interactions of the luminal dimerization domain of human IRE1alpha." *The Journal of biological chemistry* 278(20): 17680-17687.
109. Kohno, K., K. Normington, et al. (1993). "The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum." *Molecular and cellular biology* 13(2): 877-890.

110. Kimura, K. and T. D. Bugg (2003). "Recent advances in antimicrobial nucleoside antibiotics targeting cell wall biosynthesis." *Natural product reports* 20(2): 252-273.
111. Duksin D, Seiberg M, Mahoney WC. Inhibition of protein glycosylation and selective cytotoxicity toward virally transformed fibroblasts caused by B3-tunicamycin. *European journal of biochemistry / FEBS* 1982;129:77-80.
- 112-Duksin D, Mahoney WC. Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of tunicamycin. *The Journal of biological chemistry*
113. Mahoney WC, Duksin D. Separation of tunicamycin homologues by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography* 1980;198:506-10.
- 114.Yoshimi M, Sekiguchi T, Hara N, Nishimoto T. Inhibition of N-linked glycosylation causes apoptosis in hamster BHK21 cells. *Biochemical and biophysical research communications*
115. Grillo, J. M., M. Gamberre, et al. (1991). "Influence of the morphological aspect of embryos obtained by in vitro fertilization on their implantation rate." *Journal of in vitro fertilization and embryo transfer : IVF* 8(6): 317-321.
116. Şekil 1. (http://www.drimalpani.com/In_Vitro_Maturation.htm)
117. Ellgaard, L. and A. Helenius (2003). "Quality control in the endoplasmic reticulum." *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(3): 181-191.
118. Gething, M. J. and J. Sambrook (1992). "Protein folding in the cell." *Nature* 355(6355): 33-45.
119. Lindholm, D., H. Wootz, et al. (2006). "ER stress and neurodegenerative diseases." *Cell death and differentiation* 13(3): 385-392.
120. Zhao, L., C. Longo-Guess, et al. (2005). "Protein accumulation and neurodegeneration in the woozy mutant mouse is caused by disruption of SIL1, a cochaperone of BiP." *Nature genetics* 37(9): 974-979.
121. Kakiuchi, C., M. Ishiwata, et al. (2005). "Functional polymorphisms of HSPA5: possible association with bipolar disorder." *Biochemical and biophysical research communications* 336(4): 1136-1143.
122. Kusumi I, Masui T, Kakiuchi C, Suzuki K, Akimoto T, Hashimoto R et al. Relationship between XBP1 genotype and personality traits assessed by TCI and NEO-FFI. *Neurosci Lett* 2005;391:7-10.

123. Araki E, Oyadomari S, Mori M. Endoplasmic reticulum stress and diabetes mellitus. *Intern Med* 2003;42:7-14.
124. Harding HP, Ron D. Endoplasmic reticulum stress and the development of diabetes: a review. *Diabetes* 2002;51 Suppl 3:S455-61.
125. Gotoh T, Mori M. Arginase II downregulates nitric oxide (NO) production and prevents NO-mediated apoptosis in murine macrophage-derived RAW 264.7 cells. *J Cell Biol* 1999;144:427-34.
126. Yamazaki T, Muramoto M, Oe T, Morikawa N, Okitsu O, Nagashima T et al. Diclofenac, a non-steroidal anti-inflammatory drug, suppresses apoptosis induced by endoplasmic reticulum stresses by inhibiting caspase signaling. *Neuropharmacology* 2006;50:558-67.
127. Martindale JJ, Fernandez R, Thuermer D, Whittaker R, Gude N, Sussman MA et al. Endoplasmic reticulum stress gene induction and protection from ischemia/reperfusion injury in the hearts of transgenic mice with a tamoxifen-regulated form of ATF6. *Circ Res* 2006;98:1186-93.
128. Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada JI et al. Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ* 2004;11:403-15.
129. Liu CY, Kaufman RJ. The unfolded protein response. *J Cell Sci* 2003;116:1861-2.
130. Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J. & Sambrook, J. The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 1988 332, 462–464
131. Zenzes, M. T., R. Bielecki, et al. (2001). "Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes." *Fertility and sterility* 75(4): 769-777.
132. Lane, M. and D. K. Gardner (2001). "Vitrification of mouse oocytes using a nylon loop." *Molecular reproduction and development* 58(3): 342-347.
133. Coticchio, G., M. A. Bonu, et al. (2007). "Truths and myths of oocyte sensitivity to controlled rate freezing." *Reproductive biomedicine online* 15(1): 24-30.
134. 12. Kasai M, Mukaida T. Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2004;9:164–70.
135. Zhang X, Trokoudes KM, Pavlides C. Vitrification of biopsied embryos at cleavage, morula and blastocyst stage. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:526–31.

136. Saito H, Ishida GM, Kaneko T, Kawachiya S, Ohta N, Takahashi T, et al. Application of vitrification to human embryo freezing. *Gynecol Obstet Investig*. 2000;49:145–9.
137. Michelmann HW, Nayudu P. Cryopreservation of human embryos. *Cell Tissue Bank*. 2006;7:135–41
138. Sugiyama R, Nakagawa K, Shirai A, Sugiyama R, Nishi Y, Kuribayashi Y, et al. Clinical outcomes resulting from the transfer of vitrified human embryos using a new device for cryopreservation (plastic blade). *J Assist Reprod Genet*. 2010;27:161–7.
139. Wilding, M. G., C. Capobianco, et al. (2010). "Human cleavage-stage embryo vitrification is comparable to slow-rate cryopreservation in cycles of assisted reproduction." *Journal of assisted reproduction and genetics* 27(9-10): 549-554.
140. Huang, J. Y., H. Y. Chen, et al. (2008). "Comparison of spindle and chromosome configuration in in vitro- and in vivo-matured mouse oocytes after vitrification." *Fertility and sterility* 90(4 Suppl): 1424-1432.
141. Huang, J. Y., H. Y. Chen, et al. (2007). "Effect of choline-supplemented sodium-depleted slow freezing versus vitrification on mouse oocyte meiotic spindles and chromosome abnormalities." *Fertility and sterility* 88(4 Suppl): 1093-1100.

8. EKLER

Ek-1, Etik kurul onayı

Ek-2, Özgeçmiş

Yale University

Institutional Animal Care and Use
Committee (IACUC)
300 George St., 6th Floor
New Haven, Connecticut 06511
Telephone: 203 785 5992
Fax: 203-785 5033

June 6, 2009

IACUC #: 2009-11300

(Please refer to this number when
inquiring about this project)

PRINCIPAL INVESTIGATOR: Umit Kayisli

DEPARTMENT: Ob/Gyn

TITLE OF PROTOCOL: *"The Role of Unfolded Protein Response During Oocyte Maturation & Preimplantation Embryo Development"*

APPROVAL PERIOD: 06/04/09 TO 06/30/10

Yale's Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) granted approval for the use of animals in the project referenced above on June 4, 2009. A copy of your approved protocol will be sent via campus mail.

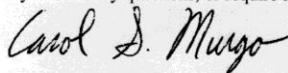
According to Federal Regulations, approval of this protocol is effective for one year and approval may be renewed twice. If the project will extend past three years another new protocol application will be required for IACUC review. Prior to the expiration of initial approval and each of the two renewal periods, you will be asked to submit a short progress report if you wish approval extended for an additional year. If you do not renew approval, you will be unable to use or order any animals under this project.

You should retain a copy of both your approved protocol and this letter of approval in your files. In accordance with Federal regulations, *a copy of the approved protocol is also to be filed in all locations where the project is being conducted.*

Approval of the IACUC does not, in and of itself, constitute approval for implementation of this project. Other levels of review and approval may be required (e.g. Environmental Health and Safety, Radiation Safety), and the project should not begin until all required approvals have been obtained.

The Yale University has an approved Animal Welfare Assurance (#A3230-01) on file with the NIH Office for Protection from Research Risks. The Assurance was approved May 16, 2007.

If you have any questions, or require any additional assistance, please do not hesitate to phone the IACUC Office at 785-5992.



Carol Murgo
IACUC Coordinator
On behalf of the IACUC



ÖZGEÇMİŞ
Araştırma
Görevlisi İDİL BOZKURT

TC Kimlik No / Pasaport No:	21629163808
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi :	1396 sok no:16/14 kahramanlar/izmir İzmir/Türkiye
Telefon :	232-4221091
e-posta :	idilbozkurt@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	Biyoloji	Lisans	2008

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TEMEL TIP BİLİMLERİ	Araştırma Görevlisi	2009-

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
--	--

Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Diğer yayınlar

--

Düzenleme Tarihi :19/04/2011