

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**NORMAL VE *İN VİTRO* FERTİLİZASYON SONUCU
GERÇEKLEŞEN GEBELİKLERİN PLASENTALARINDA
HÜCRE SİKLUS MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Gizem KORKMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

Gizem KORKMAZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**NORMAL VE *İN VİTRO* FERTİLİZASYON SONUCU
GERÇEKLEŞEN GEBELİKLERİN PLASENTALARINDA
HÜCRE SIKLUS MEKANİZMASININ İNCELENMESİ**

Gizem KORKMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Kök Hücre Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Serdar FİLİZ
Kocaeli Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Saffet Öztürk
Akdeniz Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Gizem KORKMAZ

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda destek olup yol göstericiliği ile yanımda olan ve tez projemin gerçekleştirilmesinde önemli katkıları olan danışman hocam Prof. Dr. Emin Türkay KORGUN'a,

En az danışman hocam kadar üzerimde emeği olan Prof. Dr. Dijle KİPMEN KORGUN'a,

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli öğretim üyelerine, araştırma görevlilerine ve çalışanlarına,

İhtiyaç duyduğum her an bana yardımcı olan çok sevgili çalışma arkadaşlarıma (Erhan CEBECİ, Türkan YANIK, Emre ÇETİNDAG, Kerem YANAR, Rıza Can ÇAKMAKCI, Selin KISAR, Ezgi AKAN ve Mehmet DOĞAN),

Yardımlarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm değerli çalışanlarına,

Beni her zaman destekleyen ve motivasyon kaynağım olan sevgili arkadaşlarıma (Buse TELAŞ, Ceren ÇAKIR, Merve EKİNCİ, Tuğberk YILMAZ ve Kerem KÖSE)

Son olarak eğitim hayatım boyunca benim yanımda olan, aldığım kararları her zaman destekleyen, sadece bu çalışma sürecinde değil tüm hayatım boyunca beni cesaretlendiren ve moral veren annem Zahide KORKMAZ'a, babam Hikmet KORKMAZ'a ve kardeşim Görkem KERİMOĞLU'na sonsuz şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı normal gebeliklerde, TET ve DET sonucu gerçekleşen gebeliklerde, gelişen plasental değişikliklerde, plasantasyonla ilişkili hücre siklus proteinlerinin araştırılmasıdır.

Yöntem: Normal gebelik, TET ve DET sonucu gerçekleştirilmiş gebeliklerden elde edilen plasenta dokuları üzerinde İHK ve WB deneyleri gerçekleştirilmiştir. Kontrol, TETP ve DETP gruplarında, PCNA, siklin D3 ve p57 proteinlerinin miktarları ve plasental hücrelerdeki immunolokalizasyonları tespit edilmiştir. İstatistiksel analizler yapılmıştır.

Bulgular: WB analizlerine göre PCNA protein miktarı TETP grubuna kıyasla DETP grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir. Siklin D3 protein miktarının, kontrol grubuna kıyasla DETP grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. p57 protein miktarı TETP grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. İHK deney sonuçlarına göre PCNA proteini boyanma sıklığı en yüksek DETP grubu sitotrofoblast hücrelerindedir. PCNA proteini üç grup için de sitotrofoblast ve stromal hücrelerde immünreaktivite göstermektedir. Endotel hücrelerinde ise PCNA boyanması mevcut değilken sinsisyotrofoblastlar için sadece TETP grubunda reaksiyon gözlenmektedir. Siklin D3 proteininin boyanma sıklığının, sitotrofoblast hücrelerinde kontrole kıyasla DETP ve TETP gruplarında arttığı tespit edilmiştir. Stromal hücrelerde, KP, TETP ve DETP gruplarında immünreaktivite gözlenirken, sinsisyotrofoblast ve endotel hücrelerinde siklin D3 boyanması mevcut değildir. p57 için ise sitotrofoblast ve stromal hücrelerde, en yüksek immünoreaktivite kontrol grubunda gözlenirken, sinsisyotrofoblast ve endotel hücrelerinde boyanma tespit edilmemiştir.

Sonuç: YÜT ile taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasentalarda hücre döngüsü mekanizması farklılık göstermektedir. Bu sonuçlar YÜT'ün sebep olduğu patolojik olgularla ve DET ile TET sonucu gerçekleşen gebeliklerin başarı oranları ile ilişkili olabilir.

Anahtar Kelimeler: Yardımcı üreme teknikleri, plasenta, dondurulmuş embriyo transferi, taze embriyo transferi, hücre siklus.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to investigate cell-cycle proteins associated with placentation in normal pregnancies, pregnancies as a result of TET and DET, developing placental changes.

Method: IHC and WB experiments were performed on placental tissues obtained from pregnancies with normal pregnancy, TET and DET. The amounts of PCNA, cyclin D3 and p57 proteins and their immunolocalization in placental cells were determined in the control, TETP and DETP groups. Statistical analyzes were performed.

Results: According to WB analysis, it was determined that the amount of PCNA protein increased statistically in DETP group compared to TETP group. It was determined that the amount of cyclin D3 protein was statistically significantly increased in DETP group compared to the control group. According to IHC test results, the highest frequency of PCNA protein staining was in the cytotrophoblast cells of DETP group. PCNA protein shows immunoreactivity in cytotrophoblast and stromal cells for all three groups. While PCNA staining was not present in endothelial cells, reaction was observed only in the TETP group for syncytiotrophoblasts. It was determined that the frequency of cyclin D3 protein staining of cytotrophoblast cells increased in the DETP and TETP groups compared to the control. While immunoreactivity was observed in the stromal cells for KP, TETP and DETP groups, cyclin D3 staining was not present in the syncytiotrophoblast and endothelial cells. For p57, while there was the highest immunoreactivity in cytotrophoblast and stromal cells of control group, no staining was detected in syncytiotrophoblast and endothelial cells.

Conclusion: Cell cycle mechanism differs in the placentas of pregnancies resulting from fresh and frozen embryo transfer with ART. These results may be related to the pathological cases caused by ART and the success rates of pregnancies as a result of DET and TET.

Key words: ART, placenta, DET, FET, cell cycle.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
İÇİNDEKİLER	III
SİMGELER VE KISALTMALAR	VII
1. GİRİŞ	1
1.1. Çalışmanın Hipotezi	2
1.2. Çalışmanın Amacı	2
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yardımcı Üreme Teknikleri	3
2.2. Süperovulasyonun Embriyonal ve Plasental Gelişime Etkisi	5
2.3. Taze ve Dondurulmuş Embriyo Transferi	9
2.4. Hücre Döngüsü Mekanizması ve Plasentasyon	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Denekler	19
3.2. Deney Grupları	19
3.3. Yardımcı Üreme Teknikleri	19
3.4. Plasentaların Toplanması	21
3.5. Doku Takibi	21
3.5.1 Protokol	21
3.6. İmmünohistokimya	22
3.6.1. Kullanılan Solüsyonlar	22
3.6.2. Protokol	22
3.7. Western Blot	23
3.7.1. Numunelerin Hazırlanması ve Lowry Deneyi	23
3.7.2. Western Blot Deneyi	25
4. BULGULAR	29
4.1. İmmünohistokimyasal Boyanmalar	29
4.1.1. PCNA İmmünohistokimyasal Boyanmaları	29
4.1.2. Siklin D3 İmmünohistokimyasal Boyanmaları	31
4.1.3. p57 İmmünohistokimyasal Boyanmaları	32

4.2. Western Blot Analizleri	33
4.2.1. PCNA	33
4.2.2. Siklin D3	34
4.2.3. p57	36
4.3. Plasenta Ağırlıkları	37
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	50

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. YÜT Kullanımında Plasental Ağırlık ve Transport Fonksiyonu ile İlişkili Gen Analizleri Özeti	15
Tablo 3.1. Deney Grupları Tablosu	19
Tablo 3.2. Toplanan Placentalar ile İlgili Bilgiler	21
Tablo 4.1. PCNA, Siklin D3 ve p57 İmmünohistokimyasal Boyanma Sonuçları	33



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>In Vitro</i> Fertilizasyonun Şematik Gösterimi	4
Şekil 2.2. Yardımcı Üreme Teknikleri	9
Şekil 2.3. 2005-2014 Yılları Arası Yardımcı Üreme Teknikleri Kullanım Oranları	10
Şekil 2.4. Villusların Gelişiminin Şematik Gösterimi	12
Şekil 2.5. Uterus ve Fetal Membranların Şematik Gösterimi	13
Şekil 2.6. Ökaryotik Hücre Siklusu Mekanizmasının Şematik Gösterimi ve Bir Hücre Döngüsü Fazından Diğetine Geçişini Sağlayan Anahtar Düzenleyici Proteinler	16
Şekil 4.1. PCNA İmmünohistokimyasal Boyanmaları	30
Şekil 4.2. Siklin D3 İmmünohistokimyasal Boyanmaları	31
Şekil 4.3. p57 İmmünohistokimyasal Boyanmaları	32
Şekil 4.4. Western Blot PCNA Sonuçları	33
Şekil 4.5. PCNA Proteininin Western Blot Deneyi Sonucu Analizleri	34
Şekil 4.6. Western Blot Siklin D3 Sonuçları	35
Şekil 4.7. Siklin D3 Proteininin Western Blot Deneyi Sonucu Analizleri	35
Şekil 4.8. Western Blot p57 Sonuçları	36
Şekil 4.9. p57 Proteininin Western Blot Deneyi Sonucu Analizleri	36
Şekil 4.10. Plasenta Ağırlıkları	37

SİMGELER ve KISALTMALAR

AEC	: Amino-Etil Karbazol
CDK	: Siklin Bağımlı Kinazlar
CO₂	: Karbondioksit
DET	: Dondurulmuş Embriyo Transferi
DETP	: Dondurulmuş Embriyo Transferi Plasentaları
E2	: Östrojen
ET	: Embriyo Transferi
GnRH	: Gonodotropin Salgılatıcı Hormon
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
HMG	: İnsan Menapozal Hormon
HRP	: Yaban Turpu Peroksidaz
ICM	: İç Hücre Kitlesi
ICSI	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
Ig-G	: İmmünoglobulin-G
IUGR	: İntrauterin Gelişme Geriliği
IVF	: <i>İn Vitro</i> Fertilizasyon
IVK	: <i>İn Vitro</i> Kültür
KOS	: Kontrollü Ovaryum Uyarımı
M	: Mitoz
O₂	: Oksijen Molekülü
OPU	: Oosit Toplama
P	: Progesteron
p21	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1
p57	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1C
PBS	: Fosfat-Salin Tamponu
PCNA	: Prolifere Olan Hücre Nükleer Antijeni
PE	: Preeklampsi
rFSH	: Rekombine Folikül Stimüle Edici Hormon
TBS-T	: Tween-20 İlaveli Tris-Salin Tamponu

TET	: Taze Embriyo Transferi
TETP	: Taze Embriyo Transferi Plasentaları
TVUS	: Transvajinal Ultrason Taraması
US	: Ultrason
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
WB	: Western Blot
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri



1. GİRİŞ

İnfertilite, toplumumuzun önemli sağlık problemlerinden biridir. Bu problem yardımcı üreme teknikleri (YÜT) aracılığıyla çözülmeye çalışılmaktadır. YÜT ile gerçekleşen sağlıklı gebeliklerin oranı gün geçtikçe artmaktadır. Bu nedenle ülkemizde çok sayıda YÜT merkezi bulunmakta ve yılda binlerce hasta infertilite sebebi ile başvuru yapmaktadır. *In Vitro* Fertilizasyonda (IVF) daha fazla sayıda oosit elde etmek için uygulanan süperovulasyon işlemi, anne adayında hormonal dengeyi bozmaktadır. Süperovulasyonun ve embriyo kültürünün; fetal ve plasental gelişimde değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (Choux ve ark., 2015). Süperovulasyon uygulamasının kadın üzerinde hormonal değişikliklere sebep olarak, gebelik ve fetüs gelişimindeki etkisini azaltmak amacıyla son dönemlerde taze embriyo transferi (TET) yerine, embriyolar dondurulmakta ve süperovulasyonun hormonal etkisi ortadan kalktıktan sonra, dondurulmuş embriyolar çözülerek kadına transfer (DET) edilmektedir. Taze embriyo transferinin gerçekleştiği IVF sikluslarındaki, süperovulasyonun neden olduğu hormonal ortamın, plasental ve fetal büyümeyi negatif olarak etkileyebileceği yönünde düşünceler bulunmaktadır. Bu düşünceleri destekleyen son veriler; dondurulmuş embriyo transferlerinde, implantasyon başarı oranının, taze embriyo transferi ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu göstermektedir (Bosch ve ark., 2020). Literatüre ve bu projede yer alan kadın doğum uzmanlarının klinik sonuçlarına göre başarılı doğum ve gebeliğin sağlıklı ilerleyişinde birçok parametrede dondurulmuş embriyo transferinin gebeliğe olumlu etkileri tespit edilmiştir. Her ne kadar YÜT ile ilgili gelişmeler sayesinde, başarılı gebelik gerçekleşme yüzdeleri artsa da, epidemiyolojik çalışmalar, YÜT'ün fetal büyüme geriliği (IUGR), düşük doğum ağırlığı, anormal plasenta gelişimi (Schieve ve ark., 2002; Jackson ve ark., 2004), erken doğum ve preeklampsi (PE) gibi olumsuz perinatal sonuçlarda artışla ilişkili olduğunu göstermektedir (Chung ve ark., 2006; Henningsen ve ark., 2011; Kalra ve ark., 2011). Ek olarak literatürdeki diğer çalışmalar, YÜT ile gerçekleşen gebeliklerde, sağlıklı gebeliğin temeli olan plasentasyonda, spontan gebeliklerden bazı farklılıklara dikkat çekmektedir. YÜT ile gerçekleşen gebeliklerdeki patolojik olgular ve plasenta anormallerinin altında yatan sebep, hücrelerin moleküler mekanizmasının temelini oluşturan, proliferasyon ve farklılaşmada rolü olan hücre siklusu mekanizması ile ilişkili olabilir. Bu sebeple plasental hücrelerin, hücre döngüsü mekanizması büyük önem taşımaktadır.

1.1. Çalışmanın hipotezi: Normal ve YÜT ile taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasentaları, hücre siklus mekanizmasında rol alan proteinlerin rollerine bağlı olarak farklı gelişim gösterebilirler.

1.2. Çalışmanın amacı: Normal ve YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasentalarında hücre siklusu mekanizmasının araştırılmasıdır. Ayrıca, taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonucu gerçekleşen gebeliklerde gerçekleşen plasental gelişimde hücre siklus proteinlerinin rollerinin araştırılması ve bu konuda literatüre katkı sağlamaktır.

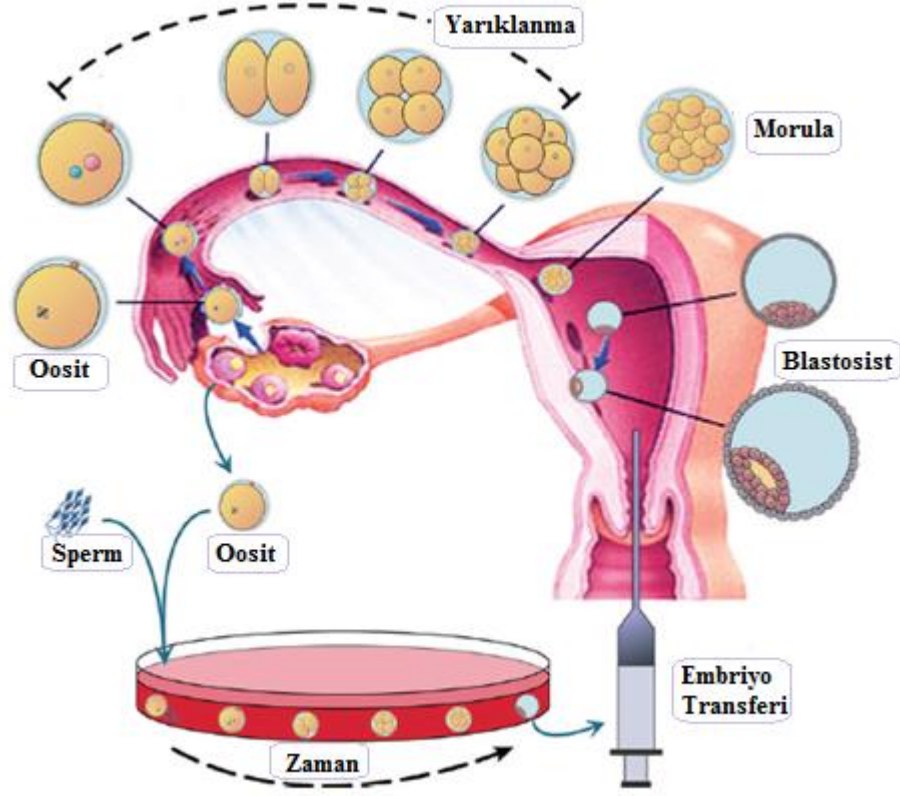
Bu amaç doğrultusunda; YÜT ile taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasenta dokularında, hücre döngüsü ile ilişkili PCNA, Siklin D3 ve p57 proteinlerinin miktarları western blot yöntemi ile belirlenmiştir ve bu proteinlerin plasentadaki yerleşimleri immünohistokimya yöntemi ile gösterilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Yardımcı Üreme Teknikleri

İnfertilite, çiftlerin %10-15'inin karşılaştığı bir sağlık problemidir. Günümüzde infertil hastaların tedavisinde önemli gelişmeler elde edilmiştir. Özellikle yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) gelişmesiyle infertilite tedavisindeki başarı oranları artmış ve daha çok infertil çiftin sağlıklı bir bebeğe sahip olabilmesi sağlanmıştır (Szamatowicz, 2016).

YÜT, uterus dışında *in vitro* bir ortamda fertilizasyonun sağlanması (IVF) ve oluşan embriyonun uterusu transfer edilmesi çerçevesinde gerçekleşir. IVF, ovaryan foliküllerinin gelişimini uyarmak için ekzojen gonadotropin uygulaması ile kontrollü ovaryum hiperstimülasyonu ile başlayan bir dizi olayı içerir. Bunu transvajinal ultrason (US) eşliğinde oositlerin alınması, oositlerin sperm ile *in vitro* fertilizasyonu, elde edilen embriyoların kültürü ve embriyoların alıcıya transferi takip eder (Şekil 2.1). YÜT'deki önemli bir yenilik, olgun bir oositin sitoplazmasına tek bir spermin enjeksiyonunu içeren intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yoluyla fertilizasyona yardımcı olmasıdır. YÜT'ün diğer modaliteleri arasında embriyo destekli kuluçka, otolog endometriyal kokültür, preimplantasyon genetik tanı veya tarama, gametlerin, embriyoların ve ovaryum dokusunun dondurularak saklanması, donmuş çözölmüş embriyo transferi (DET), verici gametlerin ve gebelik taşıyıcılarının kullanımı bulunmaktadır. YÜT'ün ortaya çıkmasından önce, daha az kullanılan diğer prosedürler arasında gametlerin (gamet intrafallop transferi), zigotlar (zigot intrafallop transferi) ve embriyoların laparoskopik tubal transferi (tubal embriyo transferi) bulunur. İnvaziv olmaları ve bu işlemler sırasında genel anestezi kullanma zorunluluğu nedeniyle bu yöntemlerin kullanımları oldukça azalmıştır. Sadece transservikal embriyo transferinin teknik olarak zor olduğu durumlarda kullanılmaktadırlar.



Şekil 2.1. *İn vitro* fertilizasyon şematik gösterimi (Bloise ve ark., 2014).

YÜT’de kullanılan işlem basamaklarından birisi gonadotropinler ile süperovülasyondur. Süperovülasyon, *in vitro* fertilizasyonun ayrılmaz bir parçasıdır, çünkü kontrollü ovaryal hiperstimülasyon, fertilizasyon ve embriyo gelişimi için birden fazla oositin elde edilmesini sağlar. Fare çalışmalarında; süperovülasyonun, IVF’in ve embriyo kültürünün; fetal ve plasental gelişimde değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (Delle Piane ve ark., 2010; Fauque ve ark., 2010). Bu sonuçlar, sadece neonatal morbidite ile değil ayrıca metabolik hastalıkların görülmesinde artış da dâhil olmak üzere uzun vadeli sağlık sorunları ile ilişkili olabilir. Buna ek olarak, bu teknolojiyle ilişkili birçok nadir genetik ve epigenetik hastalıklar görülmüştür (Ventura-Junca ve ark., 2015; Jiang ve ark., 2017).

Dünya çapında her yıl YÜT yöntemleri ile 200.000'den fazla bebek doğmaktadır ve bu sayı gün geçtikçe artmaktadır (Halliday ve ark., 2010; Bloise ve ark., 2014; Zhao ve ark., 2020). 1978'de ilk IVF bebeği Louise Brown doğmuştur. Canlı doğumlarla ilgili ilk raporlardan bu yana 5 milyondan fazla IVF sonucu bebeğin doğmuş olduğu bilinmektedir (Evans ve ark., 2014). YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerin büyük

çoğunluğu için bu tekniğin başarılı ve güvenli olduğu kanıtlanmıştır (Ishihara ve ark., 2015).

YÜT'ün birçok yönden embriyo gelişimini ve büyümesini etkilediği gösterilmiştir. IVF göz önüne alındığında implantasyon ve gelişim potansiyeline sahip embriyo kohortu oluşturmak için klinik ve laboratuvar girişimlerden yararlanır. Her basamağı tek tek incelemek, bu basamakların embriyo gelişimine katkısını ya da olası olumsuz perinatal sonuçlarını değerlendirmek için önemlidir.

YÜT ile başarı oranları arttıkça, dikkatler doğum sonuçlarına ve YÜT ile doğan çocukların uzun vadeli sağlık durumlarının takibine yönelmiştir (Kalra ve ark., 2011).

2.2 Süperovulasyonun Embriyonal ve Plasental Gelişime Etkisi

YÜT ile doğan bebeklerin büyük çoğunluğu sağlıklı olmasına rağmen; Gerçekleşen gebeliklerde, fetal ve plasenta büyüme eğrilerinde göze çarpan değişiklikler tespit edilmiştir. Epidemiyolojik çalışmalar, YÜT'in İntrauterin gelişme geriliği (IUGR), düşük doğum ağırlığı, anormal plasenta gelişimi (Schieve ve ark., 2002; Jackson ve ark., 2004), erken doğum ve preeklampsi (PE) gibi olumsuz perinatal sonuçlarda artışlar ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Chung ve ark., 2006; Henningsen ve ark., 2011; Kalra ve ark., 2011).

YÜT de kullanılan basamaklardan biri gonadotropinler ile süperovulasyon uygulamasının gerçekleştirilmesidir. Süperovulasyon, *in vitro* fertilizasyonun ayrılmaz bir parçasıdır. Çünkü kontrollü ovaryal hiperstimülasyon, döllenme ve embriyo gelişimi için birden fazla oositin elde edilmesini sağlar. Fare çalışmalarında; süperovulasyonun, IVF'in ve embriyo kültürünün; fetal ve plasental gelişimde değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (Delle Piane ve ark., 2010; Bloise ve ark., 2012; Feuer ve ark., 2013). Bu sonuçlar, sadece neonatal morbidite ile değil ayrıca metabolik hastalıkların görülmesinde artış da dâhil olmak üzere uzun vadeli sağlık sorunları ile ilişkili olabilir (Hovi ve ark., 2007; Kajantie ve Hovi, 2014). Buna ek olarak, bu teknolojiyle ilişkili birçok nadir genetik ve epigenetik hastalıklar görülmüştür (Denomme ve Mann, 2012; Eroglu ve Layman, 2012). Gonadotropin uygulaması ile, gelişmekte olan folikül sayısında ve serum östradiol seviyesinde artış (normal siklusun 10 katı kadar) meydana gelir. Süperovulasyon, oosit gelişimi sırasında ve embriyo transferinden sonra çok sayıda hormonun ve diğer faktörlerin; Estradiol (E2), progesteron (P) ve vasküler endotelial büyüme faktörlerin (VEGF) seviyesini

artırmaktadır (Lawrenz ve Fatemi, 2017; A. Wang, Santistevan, ve ark., 2017; Lawrenz ve ark., 2018). Son yıllarda yapılan bir çalışmada serum östradiol seviyelerinin optimal düzeyde olması ile IVF başarısı arasında korelasyon olduğu bulunmuştur. Yüksek östradiol seviyesi gebelik ve sağlıklı doğum oranlarını düşürdüğü gözlenmiştir (Joo ve ark., 2010). IVF esnasında, süperovulasyon ve insan koryonik gonadotropini (hCG) uygulamasının olduğu günde yüksek östrodiol seviyelerinin görülmesi, IUGR ve gebeliğin hipertansif aksaklıkları gibi plasentasyon bozuklukları ile ilişkilidir (Farhi ve ark., 2010; Imudia ve ark., 2012).

Süperovulasyon; oosit, endometriyum, implante olan embriyoda ve plasentada birçok değişiklik oluşturma potansiyeline sahip olabilir. Bu etkilerin, olumsuz etkileri tam olarak bilinmemektedir. YÜT'ün hangi yönlerinin bu olumsuz sonuçlara neden olduğuna dair tartışmalar vardır (Feuer ve ark., 2013). Süperovulasyonun olumsuz etkilerinden biri implantasyon oranında azalma olduğu kabul edilebilir (Şekil 2.2). Süperovulasyon sonucu anormal hormonal çevreye maruz kalan endometriyuma tutunmuş embriyoya ne olur? Süperovulasyonun, implantasyonun devamında gerçekleşen plasentasyon üzerindeki etkileri nelerdir? Bu soruların cevapları tam olarak bilinmemektedir. Süperovulasyonun fetal ve plasental büyümeye etkisini daha iyi açıklamak için peri-implantasyon ortamının izole edildiği, fareler üzerinde bir çalışma gerçekleştirilmiştir (Mainigi ve ark., 2014). Erkek ve dişi fareler çiftleştirilmiş ve 3.5. günde blastositler toplanmıştır. Spontan gebelerden alınan blastositler; vazoktemize erkeklerle çiftleştirilen, yalancı gebelerle (kontrol grubu) ve gonadotropin uygulaması (süperovulasyon grubu) sonrası vazoktemize erkeklerle çiftleştirilerek oluşturulan yalancı gebelere transfer edilmiştir. Gebeliğin 19. günü eks edilen gebe farelerin, plasenta ve fetüsleri toplanmıştır. Süperovüle farelerden elde edilen yavruların fetal ağırlıkları, kontrol grubunun fetal ağırlıklarına göre % 25 daha düşük ağırlıkta bulunmuştur. Benzer şekilde plasenta ağırlıkları da süperovüle gruplarda, kontrollere göre daha düşüktür (Mainigi ve ark., 2014).

YÜT'ün birçok yönden embriyo ve plasenta gelişimini etkilediği gösterilmiştir. Rinaudo ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış olduğu çalışmaya göre IVF sonucunda elde edilen fetüs ağırlıkları normale göre daha düşük, plasenta ağırlıkları ise daha büyüktür (Delle Piane ve ark., 2010; Bloise ve ark., 2012; Feuer ve ark., 2013). Bu bulgularla paralel olarak, Paolo ve arkadaşlarının, 2014 yılında yaptığı bir çalışmada, YÜT kullanılarak gerçekleşen gebeliklerin, normal gebeliklere göre birçok yönden

farklılık gösterdiği doğrulanmıştır. Çalışmada, spontan gebe kalan kadınların gerçekleştirdiği doğum sonrası fetüs ağırlıkları ile YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerin fetüs ağırlıkları karşılaştırılmış ve çalışmanın sonucunda, yardımcı üreme teknikleri ile gerçekleşen gebeliklerdeki doğum ağırlığının (3451.0 g) spontan gebeliklere (3560.6 g) göre daha düşük ortalamalarda seyrederken, plasenta ağırlıklarının (678.9 g / 673,0 g) ise daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Bloise ve ark., 2014).

Günümüze kadar yapılan çalışmalar göstermiştir ki düşük doğum ağırlığı, intrauterin stresin bir belirticidir, ayrıca koroner kalp hastalığı, hipertansiyon ve hiperlipidemi ile bağlantılıdır. Ayrıca, düşük doğum ağırlığı ile yetişkinlikte değişen glukoz ve insülin metabolizması arasında bir ilişki tanımlanmıştır (de Boo ve Harding, 2006; Meas, 2010; Marciniak ve ark., 2017). Jimenez ve arkadaşları da, 2006 yılında fareler üzerine yaptıkları araştırmalarda, YÜT ile elde edilen fetüslerden düşük doğum ağırlığına sahip olanların gelecekteki yaşamlarında glukoz intöleransı ve diyabet fenotipleri tespit etmişlerdir (Jimenez-Chillaron ve ark., 2006). Sonuç olarak YÜT ile gerçekleşen gebelikler sonucu düşük doğum ağırlığı, bir çok probleme neden olabilmektedir. Bu sonuçların doğmasının önüne geçilebilmesi için YÜT ile gerçekleşen gebeliklerdeki mekanizmaların iyi araştırılması, bu tekniklerin ise optimizasyonu önem arz etmektedir.

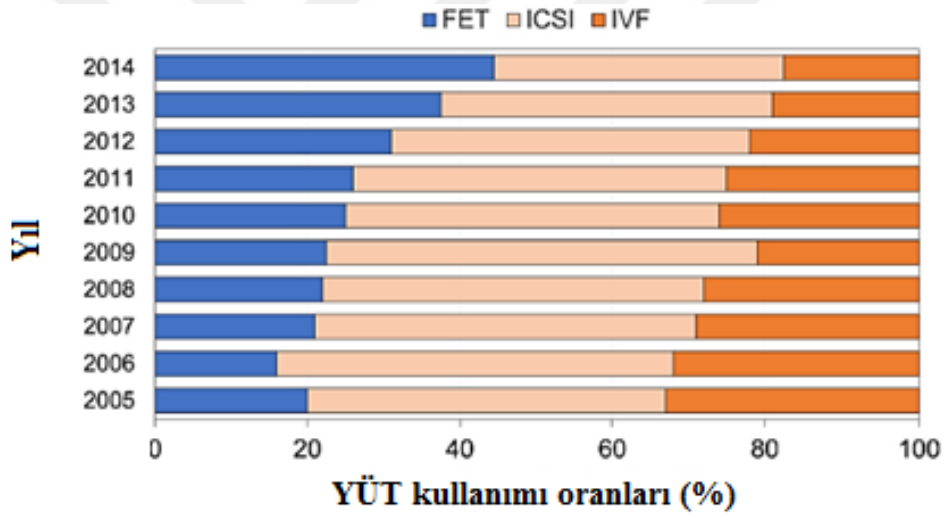
YÜT ile gerçekleşen gebeliklerde; plasenta previa spektrumu (Romundstad ve ark., 2006), PE, IUGR (Imudia ve ark., 2012) gibi olgularla ilişkili plasental bozuklukların arttığı belirlenmiştir (Z. J. Chen ve ark., 2016). Özellikle son yıllarda YÜT prosedürleri ile sağlanan gebelikler, gebeliğin erken ve orta döneminde IUGR ile ilişkilendirilerken, gebeliğin sonlarına doğru ise plasenta boyutunda ve fetüs gelişiminde anormal hızlı bir artış ile ilişkilendirilmektedir.

2007 yılında kemirgenler üzerinde yapılan bir çalışmada ise, YÜT kullanımının IUGR gelişimini indüklediği tespit edilmiştir. YÜT sonucu elde edilen fetüsler ve plasentalarda, *in vivo* gerçekleşen gebe plasentalarına kıyasla morfoloji ve gelişimsel yeterlilik açısından büyük ölçüde farklılık olduğu gösterilmiştir (Drost, 2007).

Ovaryum hiperstimulasyonu sırasında; hCG verilmesiyle, serum E2 seviyelerinde artış olan kadınlar ile düşük olan kadınların dahil edildiği bir çalışmada analizler yapılarak bazı parametreler değerlendirilmiştir. Çalışmada, süperovülasyonun etkilerinden

serum yüksek E2 seviyesi ile IUGR ve PE gelişme ilişkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada şu sonuçlar tespit edilmiştir. Yüksek serum E2 seviyesi olan gebelerin %26.9'unda IUGR gözlenirken bu oran düşük serum E2 seviyesine sahip olanlarda %3.8 dir. Serumlarında yüksek E2 seviyesi tespit edilen gebelerin %18.5'inde PE gözlenirken, bu oran düşük serum E2 seviyesine sahip olan kadınlarda %4.5 dir. Sonuçlara göre IUGR ve PE gelişme oranı, serumlarında E2 seviyesi yüksek olan gebelerde istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı belirlenmiştir (Imudia ve ark., 2012). Diğer taraftan gelişmekte olan embriyolardaki kromozomal anormallikler, gerçekleşen düşüklerin temel sebeplerinden biridir (Brown, 2008). Hayvan modellerindeki çalışmalar ise *in vitro* kültür (IVK), gametler ve embriyo için stresli bir ortam olduğunu göstermiştir. Örneğin; farklı medyumlar ve oksijen oranlarında kültüre edilen blastosistlerin, genel gen ekspresyonunda değişiklikler olduğu tespit edilmiş (Giritharan ve ark., 2007; Fernandez-Gonzalez ve ark., 2009) ve uzun dönemde sağlık problemleri belirlenmiştir (Ecker ve ark., 2004; Fernandez-Gonzalez ve ark., 2004).

literatürde ilk kez 20 yıl önce ortaya çıkmıştır ve süper ovülasyonun etkilerinden kaçınmak için yeni bir protokol olarak tanımlanmıştır (Devroey ve ark., 2011). Kriyoprezervasyon ve ertelenmiş embriyo transferinin öncüleri, bu işlemi IVF tedavilerinin “segmentasyonu” adı altında tanımlamışlardır. Sonrasında ise bu yöntem belki de tüm süreci daha iyi temsil eden ve daha yeni bir terim olan “dondurulmuş embriyo transferi” şeklinde tanımlanmıştır. (Roque ve ark., 2019). Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Derneği'nin (ESHRE) hazırladığı, Avrupa IVF İzleme (EIM) konsorsiyumu tarafından 2010 ve 2014 yılları arasında yürütülen bir ankette, 17 ülkede toplam 34.705 oosit kriyoprezervasyon uygulaması bildirmiştir. Genel olarak, bildirilen dondurulmuş embriyo transferinin kullanıldığı uygulama sayısı, 5 yıllık süre boyunca sürekli olarak artmıştır (Europe ve ark., 2017) (Şekil 2.3). Araştırmalara göre 2005-2014 yıllarını kapsayan veriler de dondurulmuş embriyo transferinin artışını vurgulamaktadır (Şekil 2.2).



Şekil 2.3. 2005-2014 yılları arası yardımcı üreme teknikleri kullanım oranları (Bosch ve ark., 2020).

Dondurulmuş embriyo transferi işlemindeki son teknik gelişmeler, çözüldükten sonra embriyonun hayatta kalma şansının artmasına ve ardından dondurulmuş-çözülmüş embriyo transferi başına gebelik oranlarının artmasına neden olmuştur (Bhattacharya, 2016; Santos-Ribeiro ve ark., 2016; Lattes ve ark., 2017; Ozgur ve ark., 2018). Yapılan çalışmalar: taze embriyo transferlerinde implantasyon başarı oranının, dondurulmuş embriyo transferi ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğunu göstermektedir (Shapiro ve ark., 2011; Roque ve ark., 2013; Shapiro ve ark., 2013). Epidemiyolojik kanıtlar, süperovülasyon tarafından oluşturulan peri-implantasyon ortamının, YÜT ‘ün yan etkilerine katkıda bulunabileceğini ve bu etkilerin dondurulmuş embriyo transfer

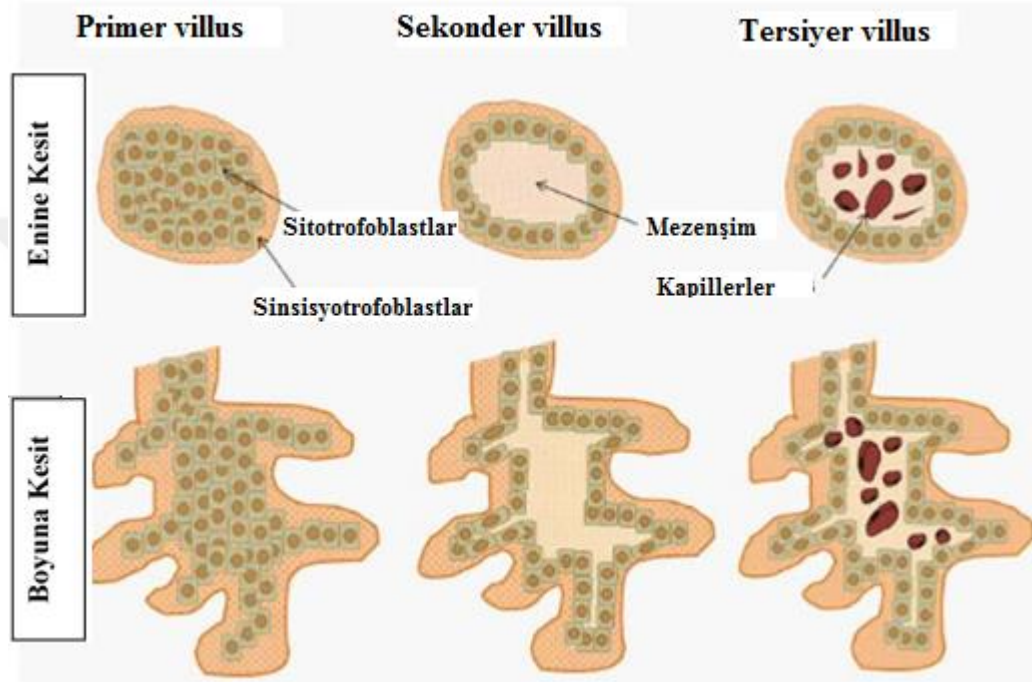
ederek azaltılabileceğini göstermiştir (Pelkonen ve ark., 2010; Pinborg ve ark., 2010; Henningsen ve ark., 2011; Kalra ve ark., 2011; Kansal Kalra ve ark., 2011; Kato ve ark., 2012; Maheshwari ve ark., 2012). Birçok çalışma; taze embriyo transferi ile gerçekleşen IVF sikluslarında doğan bebeklerin, dondurulmuş embriyo transferi ile gerçekleşen IVF sikluslarından sonra doğan bebeklere göre, düşük doğum ağırlığı ve / veya erken doğum riski taşıdıklarını bildirmiştir (Kalra ve Barnhart, 2011; Maheshwari ve ark., 2012; E. T. Wang, Kathiresan, ve ark., 2017). Taze ve dondurulmuş embriyo transferinin karşılaştırıldığı bir başka çalışmada ise, ICSI sonucu oluşturulmuş embriyoların taze transfer edilenlerde (%13.1), dondurulduktan sonra transfer edilen embriyolara (%18.6) göre daha fazla düşük gerçekleşme oranına sahip olduğu belirtilmiştir (Aytoz ve ark., 1999).

Yukarıda bahsedilen süperovülasyonun sebep olduğu olumsuzluklar, süperovülasyonun anne üzerindeki hormonal etkisi geçtikten sonra transfer edilen dondurulmuş embriyo transferi ile önlenebilmektedir (B. Zhang ve ark., 2018). Bunun altında yatan neden, süperovülasyonun implante olan embriyo için endometriyal invazyonu azalttığı iddiasıdır (Kolibianakis ve ark., 2002; Bourgain ve Devroey, 2003). Uyarılmamış endometriyum örnekleriyle, uyarılan endometriyumdaki moleküler seviyeyi karşılaştıran çalışmalar, iki koşul arasında farklı gen ekspresyon profilleri göstermiştir (Haouzi ve ark., 2009). İnfertil çiftlerin sağlıklı gebelikleri sağlamak ve canlı doğum oranlarını arttırmak için bu etkilerin moleküler mekanizmasının araştırılması gerekmektedir.

2.4 Hücre Döngüsü Mekanizması ve Plasentasyon

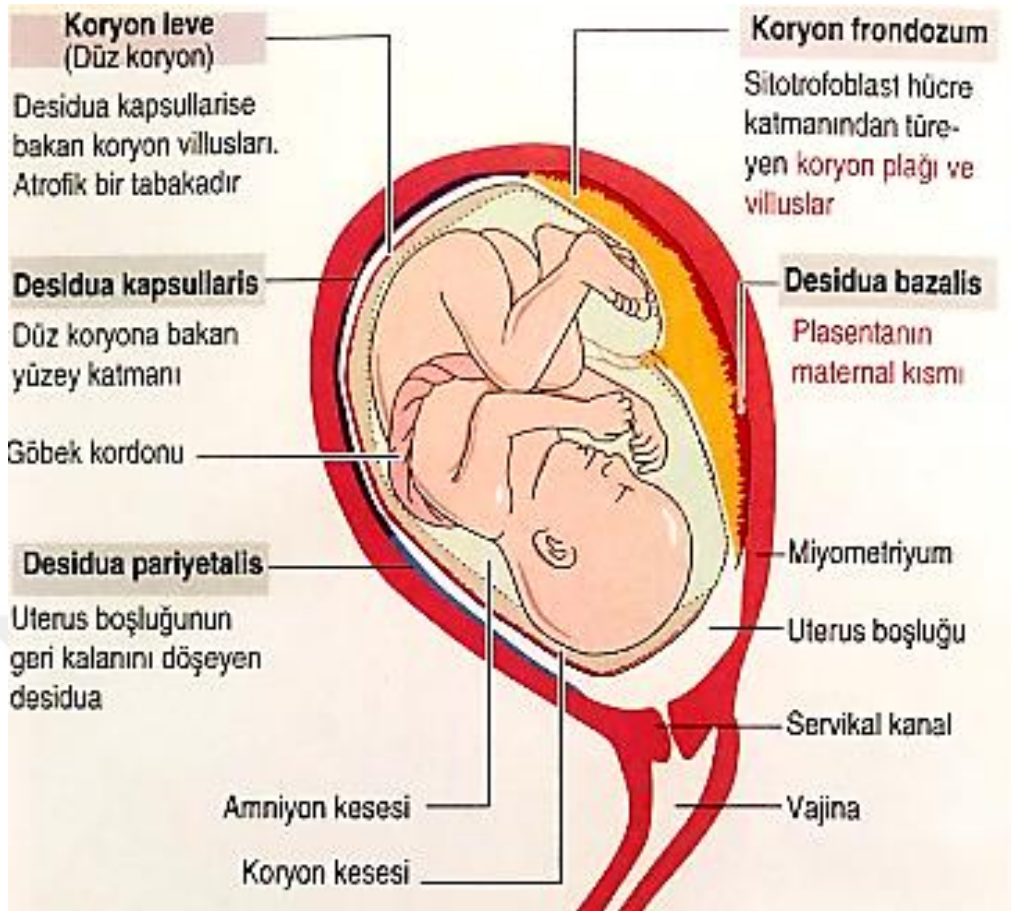
Plasenta, tartışmasız vücudun en önemli organlarından biridir. Geçici varlığı sırasında, akciğerler, karaciğer, bağırsaklar, böbrekler ve endokrin bezler dâhil olmak üzere çeşitli ayrı organlar tarafından üstlenilen eylemleri gerçekleştirir. Başlıca işlevi fetüsün gelişimi için gerekli olan tüm besinlerin ve oksijenin tedarikini sağlamak olan maternal-fetal bir dokudur. Gebelik boyunca plasenta, annenin fizyolojik adaptasyonundan immünolojik kabul, beslenme ve gelişen embriyonun desteklenmesine kadar çok sayıda görevi yerine getirir. Maternal kanla temas halinde olan plasental villuslar, gelişmekte olan fetüse besin ve oksijen sağlayan ve onun atık ürünlerini temizleyen organın taşıma birimlerini temsil ederler. Gebelik süresince bu villuslar dinamik morfolojik değişikliklere uğrarlar (Hamilton ve Boyd, 1960; Burton ve Fowden, 2015). Primer villüsler dışta sinsisyotrofoblast içte ise sitotrofoblast

hücrelerinden oluşur. Primer villusların, içlerine ekstra embriyonik mezoderm uzanması sonucu üçüncü haftanın başlarında sekonder villus yapısı oluşur. Sekonder villusların içerisinde ilk fetal kapillerlerin görülmesiyle birlikte tersiyer villus olarak adlandırılırlar (Burton ve ark., 2009) (Şekil 2.4.). Villusların geniş dallanma morfogenezi, fetüsün yüksek büyüme oranları gösterdiği bir zamanda, yeterli beslenmeyi sağlayan yaklaşık 12-14 m²'lik genel bir epitel yüzeyi oluşturur.



Şekil 2.4. Villusların gelişiminin şematik gösterimi ("Issue information," 2021).

Plasenta, maternal ve fetal kısım olmak üzere iki kısımdan oluşur. İki kısımdan biri olan plasantanın maternal kısmı, desidua bazalis olarak isimlendirilir. Tüm desidual bölge esas olarak 3 kısımdan oluşur; (1) Desidua bazalis, (2) Desidua kapsularis; bu bölge gelişen fetüs ve koryon kesesi ile ilişkilidir; (3) Desidua pariyetalis, embriyo ile direkt ilişkisi olmayan uterus boşluğunu kaplayan kısımdır. Koryon frondozum ise plasantanın fetal bölümünü oluşturur. Desidua kapsülarisin dış yüzeyindeki villusların dejenere olması sonucu oluşan düz kısım ise koryon leve olarak isimlendirilir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5 Uterus ve fetal membranların şematik gösterimi (Kierszenbaum ve Tres, 2012).

Plasenta gelişmekte olan fetüsün ihtiyaçlarını karşılamaya yanı sıra, annenin kan dolaşımına çok sayıda hormon salgılayarak annenin metabolizmasını da etkiler (Napso ve ark., 2018). Bu hormonlar çoğu maternal doku ve organı etkiler ve gebeliğin sürdürülmesini, besinlerin mobilizasyonunu, doğumu ve emzirmeyi desteklemek için annenin fizyolojisini etkili bir şekilde düzenler. Ayrıca, bazı plasental hormonlar da fetal dolaşıma salınır ve böylece fetal gelişim, büyüme ve doğum zamanlamasını düzenler (Mastorakos ve Ilias, 2003; Velegrakis ve ark., 2017). Dördüncü ayın sonlarında plasenta, gebeliğin devamını sağlayacak kadar progesteron salgılar. Plasentada hormonlar sinsisyotrofoblastlar tarafından üretilir. Anne ile fetüs arasındaki birçok metabolik aktiviteyi düzenleyen bir organ olan plasenta, gebeliğin sağlıklı devamı için kritik bir öneme sahiptir. Bu nedenle, fetal büyüme, doğrudan plasenta gelişimi ile ilgilidir. Plasental gelişim, trofoblast hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşmasına ve invazyonuna bağlıdır. Plasentadaki hücrelerin bu fonksiyonları gerçekleştirmesi için hücre döngüsü mekanizmasının ve farklılaşma sürecinin sağlıklı işlemesi gerekmektedir.

Bu noktada plasental hücrelerin, hücre döngüsü mekanizması büyük önem taşımaktadır. Ek olarak YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerde, patolojik sonuçların doğmasının altında yatan sebep plasenta gelişimi ile ilişkili olabilir. Yeterli vaskülarizasyon ve plasenta gelişimi sağlanmadığı takdirde, fetal ortam tehlikeye girebilir ve fetüs büyümesi için gerekli desteği alamayabilir.

Birçok çalışmada, YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerden elde edilen plasentaların ortalama ağırlıkları, sağlıklı gebeliklere göre farklılık göstermektedir. Yüt sonucu gerçekleşen gebelikler ile normal gebelikler sonucu elde edilen plasentalardaki farkın öneminin vurgulandığı bir çalışmada 8 YÜT sonucu gerçekleşen gebe kadın plasentalarından, 15 adet spontan gebelik gerçekleştiren kadınlardan elde edilen plasentalardan iki grup oluşturulmuştur. Çalışmada plasental bariyer, fetal kılcal damarlar, villöz stroma, sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast morfolojisi transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile incelenen gruplar karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, birçok değişiklik tanımlanmıştır (Y. Zhang ve ark., 2010). Bu sonuçları destekler şekilde YÜT plasentalarında, daha kalın plasenta bariyeri, daha az sayıda apikal mikrovillus ve çok sayıda vakuol dahil olmak üzere terminal villuslarda (ağırlıklı olarak sinsityotrofoblast hücrelerinde) dejeneratif değişiklikler tespit edilmiştir (Y. Zhang ve ark., 2008). YÜT sonucu elde edilen plasentaların maternal/fetal arayüzdeki bu anormallikler, proteomiks analizleriyle daha da desteklenen bir hipotez olan plasental bariyerin bozulmuş şeklini yansıtabilir. Maternal/fetal arayüzdeki bu anormallikler, IVF ve ICSI plasentalarında membran transportu, hücre iskeleti bütünlüğü, metabolizma, stres yanıtı ve nükleik asit işlemedeki değişiklikleri inceleyen proteomik analizlerle daha da desteklenen bir başka çalışmada, plasental kan bariyerinin bozulmuş olabileceği hipotezi doğrulamaktadır. Benzer şekilde bu çalışmayı takiben, anormal transmembran taşıma, metabolizma, oksidatif stres, immün yanıt ve hücre farklılaşması ile ilişkili mikrodizi analizi yapılmış, ilgili fonksiyonlarda rolü olan genlerin, gen ekspresyonu sonuçları YÜT ile gerçekleşen gebelikler ile normal gebeliklerdeki örneklerin farkını vurgulamıştır (Y. Zhang ve ark., 2010; Y. Zhang ve ark., 2011).

Bahsedilen çalışmalar plasentasyonun sağlıklı gebelik için önemini vurgulamaktadır. YÜT sonucu elde edilen ve sağlıklı gebelikler üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilen bulgulara göre, fetal-plasental ağırlık oranları, transport fonksiyonu ve ilişkili

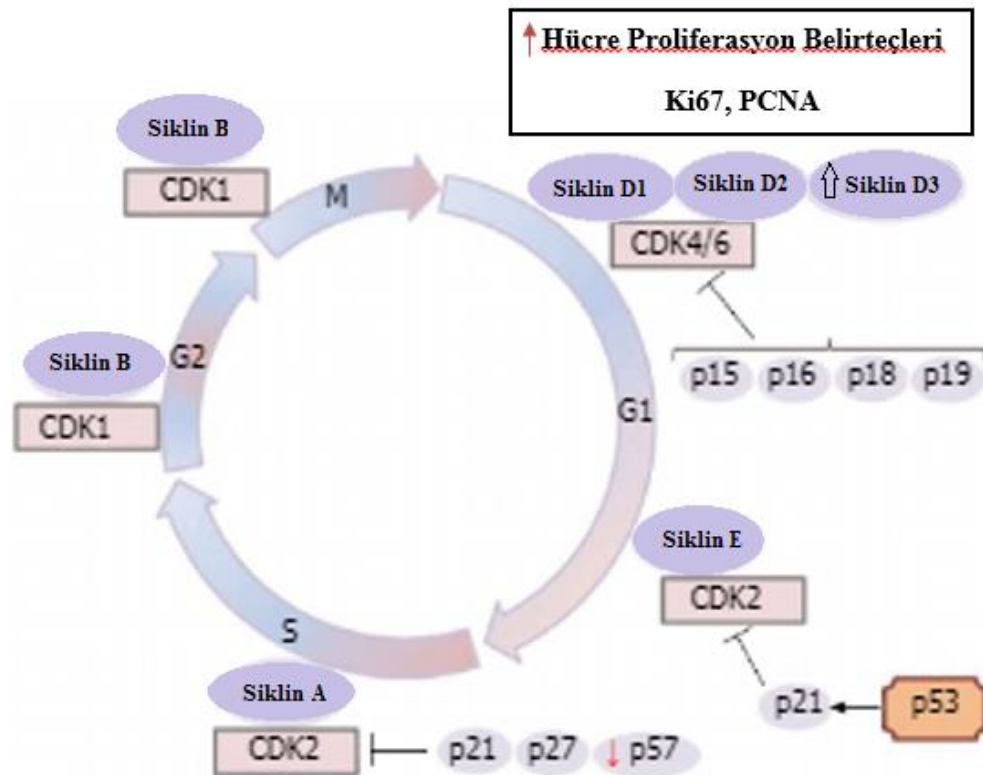
genlerin analizleri ile ilgili literatürde bulunan çalışmalar aşağıda tablo şeklinde verilmiştir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Yardımcı üreme teknikleri kullanımında plasental ağırlık ve transport fonksiyonu ile ilişkili gen analizleri özeti (Bloise ve ark., 2014).

TÜR	YÜT	Fetal:plasental ağırlık oranı	Plasental besin transportu	Transportörlerin ekspresyonu
Fare	IVF	↓ E12.5 günden sonra	↓ E18.5.gün Nötr amino asit; Glukoz taşınımında değişiklik yoktur	↓ Glut1, Glut3/GLUT3, Snat2 ve Snat3 mRNA
Sığır	IVF	↓ E70 ve E180. gün	↓ Fetal plazma glukoz konsantrasyonu (E90); ↑ Doğum sırası fetal plazma fruktoz konsantrasyonu	↔ Glut 1 ve Glut3 mRNA ekspresyonu
	SCNT	↓ E200. günden sonra	↔ Fetal glukoz konsantrasyonu; ↓ Allantois sıvısı glukoz ve fruktoz seviyesi	↑ Glut 1 ve Glut3 mRNA ekspresyonu
İnsan	IVF / ICSI	↓ Gebeliğin 34. haftası	-	↑ Snat 1 mRNA Ekspresyonu

2006 yılında yapılan bir çalışmada kontrol gruplarına göre IVF gruplarındaki fare plasentalarında apoptoz miktarında önemli bir değişiklik görülmezken proliferasyon miktarı artmıştır. Bunu destekleyen 2012 yılında yapılan ayrı bir çalışmada da IVF ve embriyo kültürünün ardından apoptoz seviyelerinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir (Nelissen ve ark., 2014). Apoptoz ve proliferasyon analiziyle plasentadaki büyümenin apoptozdaki azalma ile değil de proliferasyondaki artış ile gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Albrecht ve ark., 2006). Bu noktada plasental hücrelerin hücre döngüsü mekanizmasının sağlıklı işleyişi çok önemlidir.

Ökaryotik hücre siklusu 4 fazdan oluşur; G1, S, G2 ve M fazları. G1 ve G2 fazları ara fazlardır ve hücrenin büyümesi, protein ile organel miktarının iki katına çıkarılması ve bölünmeye hazırlanması için zaman aralığını oluştururlar. G1 fazı DNA sentezine (S fazı) ve G2 fazı da mitoz (M fazı) hazırlık fazlarıdır. Eğer şartlar uygun değilse, hücre G1’de ilerlemeyi erteleyebilir, durabilir hatta G0 diye bilinen dinlenme fazına geçebilir. Ortam şartları uygun olduğunda ve sinyaller büyüme ve bölünme için uygun olduğunda, G0’daki hücreler G1 fazına geçer. Hücre döngüsü boyunca ilerleme ve hücre proliferasyonu, bir dizi siklin ve siklin bağımsız kinaz (CDK) kompleksinin kontrolü altındadır (Sherr, 1993; Hunter ve Pines, 1994). CDK4 ve CDK6, siklin D ile, CDK2 siklin E veya siklin A ile ve CDK1 de siklin B ile kompleks oluşturur. Hücre siklusu inhibitör proteinleri (CKİ) de siklinlere, CDK’lara veya Siklin-CDK komplekslerine bağlanarak CDK’ların aktivitelerini inhibe ederler. CKİ’ler de yapısal ve fonksiyonel olarak, Ink4 ailesi ve Cip/Kip ailesi olmak üzere iki gruba ayrılırlar.



Şekil 2.6 ökaryotik hücre siklusu mekanizmasının şematik gösterimi ve bir hücre döngüsü fazından diğerine geçişi sağlayan anahtar düzenleyici proteinler. p15, p16, p18, p19 (INK4 grubu), p21, p27 ve p57 (CIP/KIP sınıfı) gibi siklin bağımlı kinaz inhibitörleri ve proliferatif belirteçler de gösterilmiştir. **G1**: G1 fazı; **S**: sentez aşaması; **G2**: G2 2 fazı; **M**: Mitoz; **CDK**: Siklin bağımlı kinazlar; **PCNA**: Proliferatif hücre nükleer antijeni; **p53**: Tümör proteini p53 (Aires ve Dos Santos, 2015).

Cip/Kip ailesinden olan p57 aynı zamanda CDKN1C olarak da isimlendirilir. p57'nin gelişim sırasında iskelet kası, beyin, kalp, akciğerler ve gözde yüksek düzeyde ekspresyon profili sergiler (Matsuoka ve ark., 1995). İnsan plasentaları üzerinde yapılan çalışmalarda p57 ekspresyonu villöz sitotrofoblastlarda, villöz stromal hücrelerde, amniyotik epitelde, ekstra villöz trofoblastlarda (EVT) ve desidual hücrelerde bulunmuştur (Allias ve ark., 2009). Ancak sinsisyotrofoblast ve endometriyal bez hücrelerinde p57 ekspresyonu saptanmamıştır (Genbacev ve ark., 2000; Fukunaga, 2002). p57 eksprese eden hücrelerin çoğu terminal olarak farklılaşır, bu da p57 'nin gelişme ve farklılaşma sırasında hücre döngüsünden çıkma kararlarında rol oynadığını gösterir. p57 proteini, siklin A, E ve D ile ilişkili siklin bağımlı kinazları inhibe ederek G1/S geçişini ve S-fazının tamamlanmasını düzenler (Xiu ve ark., 2003). Hücre proliferasyonunun negatif bir düzenleyicisidir. CDKN1C'nin mutasyonları sporadik kanserlerde ve Beckwith-Wiedemann sendromunda rol oynar ve bunun tümör baskılayıcı bir aday olduğu düşünülmektedir (Matsuoka ve ark., 1995). CDKN1C, kromozom 11 (11p15) üzerinde bulunur. Bu genin bir mutasyonu,

kontROLSÜZ hücre çoğalmasına yol açan hücre döngüsü üzerindeki kontrol kaybına yol açabilir.

G1 fazı hücre döngüsü düzenleyici protein olan siklin D3 ise hücre proliferasyonu ve desidualizasyonunda yer alır. Siklin D3 insanlarda *CCND3* geni tarafından kodlanan bir proteindir ve 6p21 bandında lokalize olur. Bu siklin, hücre döngüsü G1/S geçişi için gerekli olan CDK4 veya CDK6'nın düzenleyici bir alt birimi ile bir kompleks oluşturur ve bu şekilde işlev görür. Bu proteinin, tümör baskılayıcı protein Rb ile etkileşime girdiği ve fosforilasyonuna dahil olduğu gösterilmiştir. İnsan plasentalarında Siklin D3 villöz sitotrofoblast hücrelerinde eksprese edilir, fakat sinsisyotrofoblast ve ekstra villöz trofoblastlarda ekspresyonu gözlenmemektedir. Plasenta gelişimi sırasında, villöz sitotrofoblastlarda Siklin D3 protein ekspresyonu terne doğru azalma göstermektedir (Genbacev ve ark., 2000).

Hücre siklusunun geç G1 ve S fazlarında sentezlenen proteinlerden birisi ise Proliferatif hücre nükleer antijen (PCNA)'dır. PCNA, DNA sentezi, DNA tamiri ve hücre siklusu düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır ve hücre proliferasyonu saptamak için yaygın kullanılan belirteçlerden birisidir (Unek ve ark., 2014a). PCNA, replikasyon ve onarım mekanizmasının bir bileşeni olarak nükleik asit metabolizmasında önemli bir rol oynar. Bu toroidal şekilli protein, DNA'yı çevreler ve dubleks boyunca çift yönlü olarak kayabilir. PCNA, hızlı ve işlemsel DNA sentezi için polimeraz katalitik birimini DNA şablonuna bağlanır (Kelman, 1997).

Ek olarak, PCNA protein ekspresyonu gebeliğin erken döneminde artış göstermekle birlikte orta dönem ve term gebelikte de ekspresyonu devam etmektedir (Maruo ve ark., 2001). Yapılan bir çalışmada ise, gebeliğin 11. ve 13. günlerinde, plasentada PCNA ekspresyonu yoğunluk gösterirken, 17. ve 21. gebelik günlerinde azaldığı bildirildi (Acar ve ark., 2008). İnsan plasentasında, PCNA'nın en yoğun ekspresyonu villöz ve EVT hücrelerinde tanımlanmıştır. Ayrıca, PCNA ekspresyonu sinsisyotrofoblast, villöz stromal hücreler, desidual hücreler ve desidual bez hücrelerinde de tespit edilmiştir (Korgun ve ark., 2006).

Plasental gelişimi kontrol eden hücre döngüsü ile ilgili proteinlerin gebelik patolojilerine neden olabildiği bilinmektedir. Bu olayları kontrol eden hücre döngüsüyle ilgili proteinlere yönelik ilgili çalışmalar sınırlıdır. Anormal plasental

gelişim, PE, IUGR, diabetes mellitus ve gestasyonel trofoblastik hastalıklar gibi çeşitli gebelik patolojileriyle bağlantılıdır. Sağlıklı bir gebelik için insan plasentasının hücre döngüsü mekanizması iyi anlaşılmalıdır. Literatürdeki çalışmalarda YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasentalarında, hücresel proliferasyon belirteci olan Ki67 pozitif hücre sayısında aşırı artış mevcuttur ve araştırmacıları bu durumun plasentanın fazla gelişmesine sebep olabileceği şeklinde yorumlamıştır. Sonraki yıllarda benzer bir şekilde YÜT kullanılarak gebelik gerçekleştirilen sığırların plasentalarında aşırı büyüme tespit edilmiştir. *In vitro* çalışmalarda da bu sonuç, kontrol gruplarına kıyasla çapı artan ve kalınlığı azalan plasentalar ile desteklenmiştir (Aires ve Dos Santos, 2015). İnsan plasentalarının kullanıldığı bir araştırmada, plasenta boyutlarındaki ve kalınlıklarındaki farklılıklar doğrudan infertilite, gebelik komplikasyonları, perinatal sonuçlar ve doğum ağırlığı ile ilişkilendirilmiştir. Bu sonuç, YÜT sonucu plasentadaki değişikliklerin önemini vurgulamaktadır (Daniel ve ark., 1999).

Literatürde YÜT ile taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonrası gerçekleşen gebeliklerin plasentaların hücre siklus mekanizması ile ilgili çalışmalar ise sınırlı sayıdadır. YÜT'ün bazı durumlarda patolojik gebeliklere sebep olduğunun bilindiği bu noktada, bu tekniğin optimizasyonu önem arz etmekte bunun yapılabilmesi için de taze ile dondurulmuş embriyo transferi sonrası plasentaların hücre siklus mekanizmasındaki farkların aydınlatılması gerekmektedir. Süperovülasyonun, peri-implantasyon çevresini, implantasyonu, plasantasyon üzerindeki negatif etkilerinin bilinmesi sebebiyle, IVF sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasentalarında hücre siklus proteinlerinin araştırılması, bu olumsuz etkilerin mekanizmalarının aydınlatılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bu sebeple, bu projede, normal ve IVF ile taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonucu gerçekleşen gebeliklerde hücre siklus mekanizmasını aydınlatmak amacıyla, hücre döngüsü ile ilişkili p57, Siklin D3 ve PCNA proteinlerinin miktarlarının ve lokalizasyonlarının, plasental dokularda araştırılması ve gruplar arasında karşılaştırılması yapılmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Denekler

Toplam 18 adet term plasenta örneği ile çalışılmıştır. Altı adet normal, 6 adet taze embriyo transferiyle gerçekleştirilmiş ve 6 adet dondurulmuş embriyo transferiyle gerçekleştirilmiş gebelik sonucunda elde edilen plasentalarla belirlenen metodlar için gerekli rutin işlemler yapılmıştır.

3.2 Deney Grupları

Tablo 3.1 Deney grupları tablosu. **DETP:** Dondurulmuş embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden elde edilen plasenta. **TETP:** Taze embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden elde edilen plasenta

Kontrol Grubu	IVF Grubu	
	DETP Grubu	TETP Grubu
6 plasenta	6 plasenta	6 plasenta

3.3 Yardımcı Üreme Teknikleri

Foliküler stimülasyon için kontrollü ovaryan uyarıcı olan gonodotropin salgılatıcı hormon antagonisti (Cetrotide, 0,25 mg, Merck Serono, Türkiye) ve rFSH (Gonal-F, Merck Serono, Türkiye) ve HMG (Menopur, Ferring pharmaceuticals, Hindistan) ile birlikte tedavi protokolleri ve ovulasyon indüksiyonu için GnRH agonisti (Gonapeptyl, Ferring pharmaceuticals, Hindistan) kullanılmıştır. Transvajinal ultrason yardımıyla OPU işlemi, ovulasyon indüksiyonundan 36 saat sonra yapılmıştır. Tüm gamet manipülasyonları ve embriyo kültürleri, Sydney IVF (COOK Medical, Sidney IVF, ABD) medyumunu kullanılarak yapılmıştır. İnkübasyon koşulları %6 CO₂, %5 O₂ ve 37°C'ye ayarlanmıştır. (K-Sistemler, Kivex Biotec Ltd, Danimarka). Tüm oosit aşılama, ICSI kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Embriyolar mineral yağı bulunan ortamda, medyum mikro damlacıklarının içinde kültürlenmiştir. Tüm embriyolar OPU sonrası 5. güne kadar vitrifikasyon ya da transfer için kültürlenmiştir. Blastosistler,

Gardner ve Schoolcraft (Gardner, Lane, & Schoolcraft, 2000; Gardner, Lane, Stevens, ve ark., 2000) tarafından önerilen 3 kademeli derecelendirme sistemine göre değerlendirilmiştir. Blastosist ekspansiyonu 1-6 arasında bir ölçekte, ICM hücre sıkışma sayısı ve derecesine göre A ile C arası ölçekte ve TE'de trofoektoderm hücrelerinin sayısı, boyutu ve bitişik düzenlenmesine göre A ile C arası ölçekte sınıflandırılmıştır.

Blastosistlerin vitrifikasyon ve ısınması için modifiye edilmemiş bir Cryotop yöntemi (Kitazato, İlaç Ltd, Japonya) kullanılmıştır. Bu yöntemde ultra-hızlı vitrifikasyon ve ısınma oranları ile yüksek konsantrasyonda kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. İşlemler için gerekli olan dengeleme, vitrifikasyon, çözündürme, seyreltme ve yıkama solüsyonları, piyasadaki Cryotop kitlerinde bulunmaktadır. Kısaca, blastosistler oda sıcaklığında dengeleme ve vitrifikasyon aşamalarına alınmış, sonrasında Cryotop strip üzerine yerleştirilip sıvı nitrojene daldırılmıştır. Strip üzerine ikiden fazla blastosist yerleştirilmemiştir. Cryotop stripi, sıvı nitrojende kriyotank içinde saklanmıştır. Isınması için, başlıklı bir Cryotop kabı kriyotanktan çıkarılıp, sıvı nitrojen altında kapak kaldırılmış ve stripten uzaklaştırılmıştır. Strip, sıvı nitrojenden alınarak ısınma çözeltisi içine daldırılmıştır. Ardından blastosistler iki kez yıkanmıştır. Transfer gününde hasta başına çıkarılacak Cryotop kabı sayısı, transfer için 2 adet canlı blastosist elde edilecek şekilde belirlenmiştir.

Tüm DET döngüleri, östrojen (Estrofem, Novo Nordisk, Türkiye) ve progesteron (Crinone, Merck Serono, Türkiye) ilaveleri kullanılarak endometriyumun transfere hazırlandığı ve senkronize edildiği HRT döngüleri ile programlanmıştır. Siklusların başlangıcı, OCP ile programlanmıştır. Endometriyumun transfere hazırlanması için östrojen takviyesi (2 mg/gün ila 8 mg/gün) uygulanmıştır. TVUS ile endometriyum kalınlığı ölçülecek ve progesteron konsantrasyonunu kontrol etmek için kan örneği alınmıştır (Abdalla vd., 1994). Eğer endometriyum kalınlığı > 7mm ve luteinizasyon yoksa, östrojen takviyesine (6 mg/gün) devam edilmiş ve progesteron (% 8 günde iki kez) takviyesi uygulanmıştır. Blastosist ısınma ve transferi, progesteron verilmesinin 6. gününde gerçekleştirilmiştir.

Transfer için seçilen bütün blastosistler mineral yağ ile örtülmüş medyum damlacıkları içine yerleştirilmiştir. Isınmadan yaklaşık 2 saat sonra, blastosistlerin sağ kalım ve morfolojileri değerlendirilmiştir. Blastosist transfer prosedürleri, trans-abdominal

ultrason rehberliğinde ve embriyo kateterine (Wallace, Smiths Medical, İngiltere) bağlı olan Hamilton şırınga (50uL, Hamilton, ABD) kullanılarak yapılmıştır.. Eğer biyokimyasal gebelik (> 30 IU β hCG) progesteron verilmesinin 15. gününde doğrulanırsa, taze ve vitrifiye siklusların luteal faz desteği, östrojen ve progesteron takviyesi rejiminden oluşmuştur ve gebeliğin en az 9 haftası devam edilmiştir. (Vaisbuch vd., 2014).

3.4 Plasentaların Toplanması

Kontrol grubu ve YÜT grubu olarak toplanılan plasentaların tamamı sağlıklı doğumlardan elde edilen plasentalardır. Deneyde kullanılan plasentalar ile ilgili bilgiler ayrıntılı olarak Tablo 3.2’de belirtilmiştir.

Tablo 3.2 Toplanan plasentalar ile ilgili bilgiler. SS: Standard Sapma, VKİ: Vücut kitle indeksi

	Kontrol Grubu (Ortalama $\pm$ SS)	TETP Grubu (Ortalama $\pm$ SS)	DETP Grubu (Ortalama $\pm$ SS)
Gestasyonel Yaş	37.49 $\pm$ 1.15	38.12 $\pm$ 1.6	37.66 $\pm$ 0.94
Anne Yaşı	30.667 $\pm$ 4.96	35 $\pm$ 1.09	35.5 $\pm$ 2.43
Anne VKİ	26.58 $\pm$ 4.6	26.93 $\pm$ 1.4	24.8 $\pm$ 4.83
Fetal Ağırlık (g)	3456.66 $\pm$ 394.7	2940 $\pm$ 336.65	3030.83 $\pm$ 232.42
Plasental Ağırlık (g)	520.33 $\pm$ 71.55	567.5 $\pm$ 56.91	581.83 $\pm$ 60.34

3.5 Doku Takibi

3.5.1 Protokol

1. Plasentalar elde edildikten sonra dokulara %4 formalin ile gece boyu muamele edilmiştir.
2. Dokular akan suda altında 12 saat yıkanmıştır.
3. Dokular, dehidrasyon işlemi için sırasıyla %70, %80 ve %90’lık artan alkol serilerinde birer gün bekletildikten sonra %100’lük alkolde 3 saat bekletilmiştir.
4. Dokular şeffaflaştırma için ksilole alınarak, ksilolde 5 dakika bekletildi.
5. Sertleştirme işlemi içinse dokular 3x1 saat parafin içerisinde bekletilmiştir.
6. Son basamak olarak, dokular parafin içerisine gömülmüşlerdir.

3.6 İmmünohistokimya

3.6.1 Kullanılan Solüsyonlar

PBS

1 litre 1x PBS hazırlamak için;

- 0.137 M NaCl (MA: 58.4 g/mol); 8 g
- 0.0027 M KCl (MA: 74.551 g/mol); 200 mg
- 0.01 M Na₂HPO₄ (MA: 141.96 g/mol); 1.44 g
- 0.0018 M KH₂PO₄ (MA: 136.086 g/mol); 245 mg

Yukarıdaki kimyasallar belirtilen miktarlarda alınarak 1 litre distile suda çözündürülmüştür. pH 7.4'e ayarlanmıştır. MA:Moleküler ağırlık

Sitrat Tamponu

1 litre sitrat tamponu hazırlamak için;

- 0.0825M sodyum sitrat dehidrat (MA: 294.1 g/mol), 24.269 g
- 0.0175M sitrik asit (MA: 192.1 g/mol), 3.358 g

Yukarıdaki kimyasallar belirtilen miktarlarda alınarak 800 mL distile suda çözündürülmüştür. pH 6.0'a ayarlanmıştır. Distile su eklenerek son hacim 1 litreye tamamlanmıştır.

3.6.2 Protokol

Takibi yapılmış dokulardan alınmış kesitlere 2 günlük deney protokolü uygulandı.

1. gün

1. Dokulardan 5µ kalınlığında kesitler alındıktan sonra 37°C su banyosunda superfrost lamlara alındı.
2. Superfrost lamlara alınmış olan kesitler, 2 saat ısı tablasında maksimum 40°C sıcaklıkta bekletildi.
3. Isı tablasından alınan lamalar gece boyunca 60°C etüvde bekletildi.
4. Deparafinizasyon işlemi için kesitler ksilol II ve ksilol I de onar dakika kesitler bekletildi.
5. Kesitler sırasıyla %100, %90, %80, %70 alkol serilerinde beşer dakika bekletildi.
6. Daha sonar kesitler, distile suda 5 dakika bekletildi.
7. Epitopların açılması için 3x7 dakika mikrodalga fırında 750 watt'da sitrat tampon ile kaynatıldı.
8. Kaynatılan kesitler 20 dakika oda sıcaklığında soğutmaya alındı

9. Örneklerin etrafı pappen ile çizilerek 3x5 dakika PBS yıkaması yapıldı.
10. 30 dakika boyunca %5 hidrojen peroksit ile muamele edildi.
11. 3x5 dakika PBS yıkaması yapıldı.
12. 5 dakika UV bloklama yapıldı.
13. Kesitlere primer antikorlar eklendi ve +4 °C’de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

2. GÜN

14. Örnekler 3x5 dk PBS ile yıkandı.
15. Kesitler primer antikor fare kaynaklı antikor kullanılan örneklerle Primer Antikor enhancer eklendi. 30 dakika bekletildi. (Primer antikor kaynağı fare dışında bir hayvan ise kesitler üzerine kurumaması için PBS eklendi eşit süre bekletildi.)
16. HRP polimer (thermo) ile 30 dakika inkübasyon yapıldı. (Üzeri siyah renkli bir materyal ile kapatıldı.)
17. 3x5 dk PBS ile yıkandı.
18. Substrat olan AEC kromojeni ile dokularda reaksiyon gözlemleninceye kadar muamele edildi.
19. Distile su ile reaksiyon durduruldu.
20. Mayer hematoksilen ile 10 saniye zıt boyama yapıldı.
21. Akan suda yıkama yapıldı.
22. Kapatma solüsyonu ile kesitler lamel ile kapatıldı ve ışık mikroskopunda analiz edilip, bilgisayara bağlı kamera ile fotoğraflar çekildi.

3.7 Western Blot

3.7.1 Numunelerin Hazırlanması ve Lowry Deneyi Kullanılan Solüsyonlar

Tris Solüsyonu

0.1M Tris solüsyonu hazırlamak için;

0,6 gr Tris 40 ml distile suda çözüldü. Hidroklorik asit ile solüsyonun pH’ı 7.4’e ayarlandı. Son hacim distile su ilave edilerek 50 ml’ye tamamlandı.

Sodyum Ortoho vanadate

Bu solüsyon 100X olacak şekilde hazırlandı. 0.184 gr Na-orthovanadate önceden hazırlanmış 10ml Tris solüsyonu içinde çözüldü.

Lizis Solüsyonu

Lizis solüsyonu hazırlamak için;

- 10 ml 0.1 ml Tris (pH: 7.4)
- 1 ml Na- orthovanadate

- 1 gr Na dodesil sülfat
- 1 tablet proteaz inhibitör kokteyl

Yukarıdaki maddeler 90 ml Distile suda çözülerek solüsyon hazırlandı.

Lowry Solüsyonları

Lowry A solüsyonu:

- 0.2 M Na_2CO_3
- 0.1 M NaOH

Lowry B solüsyonu

- %1 $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$

Lowry C Solüsyonu

- %1 $\text{CuSO}_4 \cdot 5(\text{H}_2\text{O})$

Protokol

Sıvı nitrojen tankında bekletilmiş olan dokular

1. Mekanik olarak bisturi aracılığıyla parçalandı. Bu parçalama işlemi buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.

2. Parçalanmış dokular lizis solüsyonu ile (0,2 gram doku başına 600 µl lizis solüsyonu olacak şekilde) muamele edildi.

3. Dokular lizis solüsyonu ile birlikte 1,5 mL'lik tüplere alındı ve vortekslendi.

4. Vortekslenen tüpler +4 °C'de 15000 g' de 10-15 dakika santrifüj edildi.

5. Santrifüj sonrasında süpernatantlar alındı.

6. Protein miktarlarının belirlenmesi için Lowry deneyine başlandı.

7. 5 adet standart solüsyonlar aşağıda belirtildiği gibi BSA kullanılarak hazırlandı.

- 1 nolu standart 20 µl BSA stok solüsyonu
- 2 nolu standart 20 µl BSA stok solüsyonu + 20 µl PBS
- 3 nolu standart 20 µl BSA stok solüsyonu + 40 µl PBS
- 4 nolu standart 20 µl BSA stok solüsyonu + 60 µl PBS
- 5 nolu standart 20 µl BSA stok solüsyonu + 100 µl PBS

8. Numuneler genellikle 1:40 dilüye edilerek çalışıldı.

9. Lowry ölçümü için numuneler çift tekrarlı çalışıldı.

10. Her bir numune PBS ile 1:40 dilüe edilip 1,5 mL'lik tüpe alındı

11. Tüm standart, kör (blank) ve numunelere daha önce lowry A, B ve C solüsyonu karışımı ile elde edilen lowry solüsyonundan 600 µl ilave edildi ve vortekslendi.

12. 10 dakika buz üzerinde inkübasyon yapıldı.

13. Daha sonra da tüm, standartlara, numunelere ve kör'e 60 µl folin (1:1 oranında distile su ile dilüye edilmiş) eklendi.

14. Folin ile karanlık ortamda 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirildi.

15. Bu işlem sonrasında ise 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede ölçümler yapılarak hazırlanan numunelerdeki protein miktarları tespit edildi.

3.7.2 Western Blot Deneyi

Kullanılan Solüsyonlar

Yürütme Solüsyonu

- 9 g TRIS
- 43,2 g Glisin-
- 3 g SDS
- 600 ml dH₂O

Solüsyon 5x olarak hazırlandı. Kullanılacağı zaman 100ml 5x solüsyondan alındı ve 400ml distile su ile seyreltilerek kullanıma hazır hale getirildi. pH aralığı 8.3-8.6 arasında olmalıdır. Bu solüsyonun pH'ına müdahale edilmez.

Blotlama Solüsyonu

- 3 g TRIS
- 14.3 g Glisin
- 700 ml dH₂O
- 200 mL metanol

Solüsyon yukarıdaki maddeler kullanılarak hazırlandı. pH aralığı 8.3-8.6 arasında olmalıdır. Bu solüsyonun pH'ına müdahale edilmez. pH ölçümünden sonra distile su ile solüsyon 1000ml'ye tamamlandı.

TBS-T Solüsyonu

- 60.55 g TRIS
- 87.66 g NaCl
- 800 mL dH₂O

Bu solüsyon 10X olarak hazırlandı. pH 7.4'e ayarlandıktan sonra distile su ile son hacim 1000 ml'ye tamamlandı. Kullanılacağı zaman 100 mL 10X solüsyon alınıp 900 ml distile su ile 1X oranına seyreltildi. 1ml Tween-20 eklenerek solüsyon hazırlandı.

Süt Tozu

- 5 g Süt Tozu
- 100 mL TBS-T

5 gram süt tozu alınarak 100 mL TBS-T solüsyonu içinde manyetik çalkalayıcı üzerinde homojen olarak çözüldü. %5'lik olarak kullanıma hazırlandı.

Coomassie Blue Solüsyonu

- 0.5 g Coomasie Brilliant Blue
- 100 mL metanol
- 800 mL dH₂O
- 100 mL konsantre asetik asit

Yukarıdaki kimyasallar 15-20 dakika boyunca karıştırıldı. Filtreden geçirilerek süzüldü. Kullanıma hazır hale getirildi.

Coomassie Giderici

- 100 mL Asetik asit
- 100 mL Metanol
- 800 mL dH₂O

Protokol

1. Gün

1. %10luk jel döküldü.
2. 10luk tarak kullanıldı.
3. IVF ve kontrol plasentalardan hazırlanmış 33 µg'lık numunelerden kullanıldı. Ve kuyulara 15µl yüklendi.

Yürütme

5. Yürütme cihazı 140Volt 70 miliAmper 10Watt'a ayarlandı ve 15 dakika yürütme yapıldı.
6. Hemen ardından cihaz 160Volt 70 miliAmper 10Watt'a ayarlandı 45 dakika daha numuneler yürütüldü.

Blotlama

7. Kasetler hazırlandı. Cihaz 90 Volt 30 miliampere ayarlandı ve +4 °C derece soğuk odada gece boyu numuneler blotlandı.

2.Gün

- 1.Kaset soğuk odadan alındı ve membranlar ayrı kaplara ayrıldı.
- 2.Membran TBS-T ile 3x5 dakika yıkandı.
- 3.Poncaeu-S boyası ile bantlar gözlemlendi.

4. Bantlar gözlemlendikten sonra boya uzaklaştırıldı ve membran temizlenene kadar TBS-T ile 3x5 dakika yıkandı.

BLOKLAMA

5. %5lik süt tozu hazırlandı.

6. Membran hazırlanan süt tozu ile 1 saat mekanik çalkalayıcı üzerinde muamele edildi.

7. Yıkama yapmadan membrana hazırlanmış primer antikor eklendi.

8. Membran soğuk odada gece boyu shaker üzerinde antikorla muamele edildi.

3. Gün.

1. Membran soğuk odadan alındı.
2. Primer antior geri toplanadı.
3. Membran 3x5 dakika TBS-T ile yıkandı.
4. Sekonder antikor ile 2 saat muamele edildi.
5. Membran 3x5 dakika TBS-T ile yıkandı.
6. Advansta WesternBright ECL kit solüsyonları 1'er ml olacak şekilde karanlık ortamda 2ml hazırlandı.
7. Membran karanlıkta mekanik çalkalayıcı üzerinde ECL solüsyonları karışımı ile 5 dk muamele edildi.
8. Görüntüleme cihazı ile görüntüleme yapıp sonuçlar kaydedildi.

İstatistiksel Analizler

Yapılan Western blot deneylerinde her grup için 6 farklı numune kullanılmıştır (n=6). Deney sonuçlarına istatistiksel olarak One-Way-ANNOVA testi yapılarak tüm gruplar birbiri arasında incelenmiştir. $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi ve %95 güven aralığı belirlenerek Tukey post testi kullanılmıştır.

$0.01 < p < 0.05$ aralığında ; * istatistiksel olarak anlamlı fark vardır.

$0.001 < p < 0.01$ aralığında ; ** istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı fark vardır.

$p < 0.001$ ise ; *** istatistiksel olarak çok yüksek düzeyde anlamlı fark vardır.” Şeklinde değerlendirilip simgelendirilmiştir (Kittelsohn, 2011).



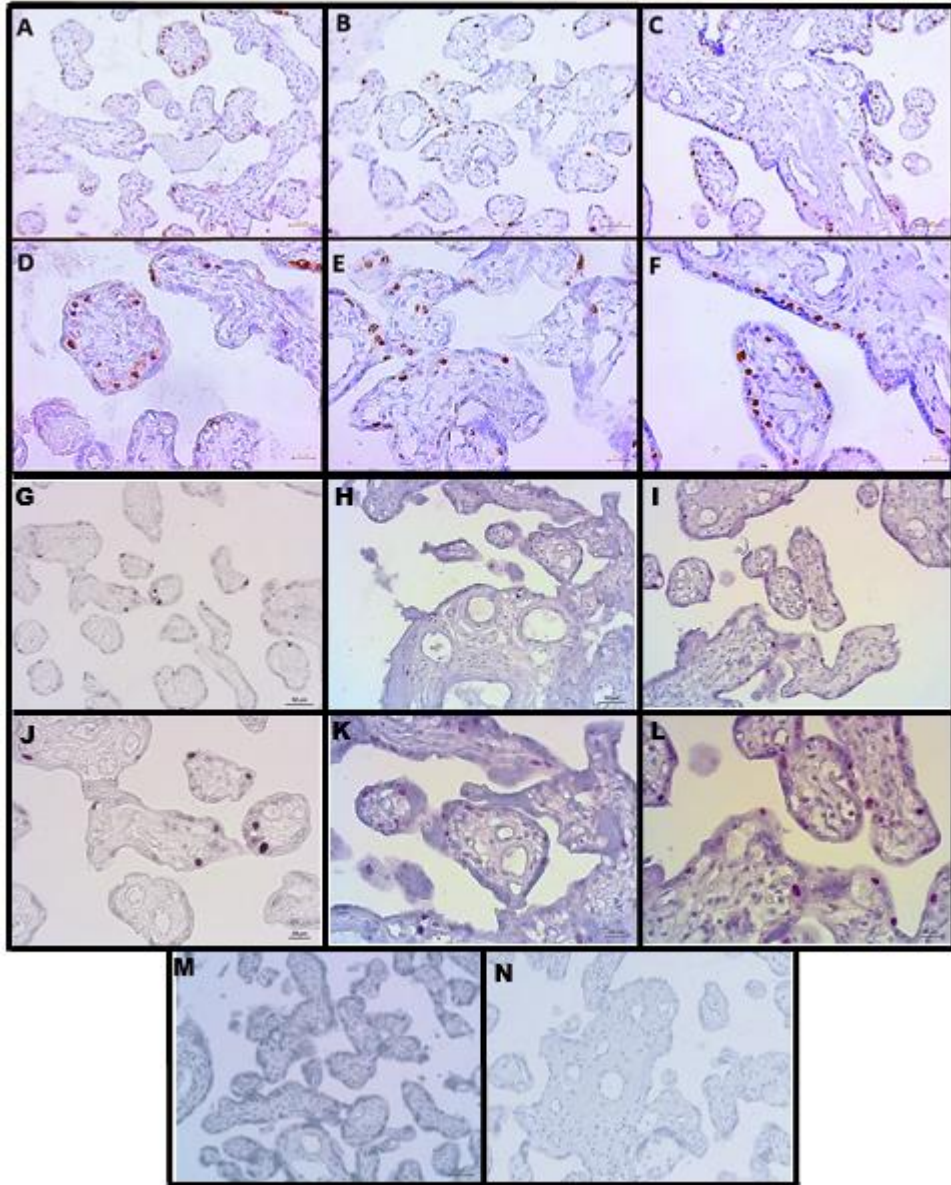
4. BULGULAR

Bu çalışmada, taze embriyo transferi ve dondurulmuş embriyo transferi sonucu gerçekleşen gebeliklerden elde edilen plasentalar ve sağlıklı gebeliklerden elde edilen kontrol plasentalarında, hücre siklusu ile ilişkili olan PCNA, siklin D3 ve p57 proteinleri araştırılmıştır. Plasental dokulardaki protein lokalizasyonlarını belirlemek için immünohistokimyasal boyanmalar yapılmıştır. İmmünohistokimyasal boyanma sonuçlarına göre PCNA, siklin D3 ve p57 proteinlerinin immünoreaktivitesi plasental hücre tiplerine göre incelenmiştir. Dokulardaki protein miktarları ise western blot analizleri ile tespit edilmiştir.

4.1 İmmünohistokimyasal Boyanmalar

4.1.1 PCNA İmmünohistokimyasal Boyanmaları

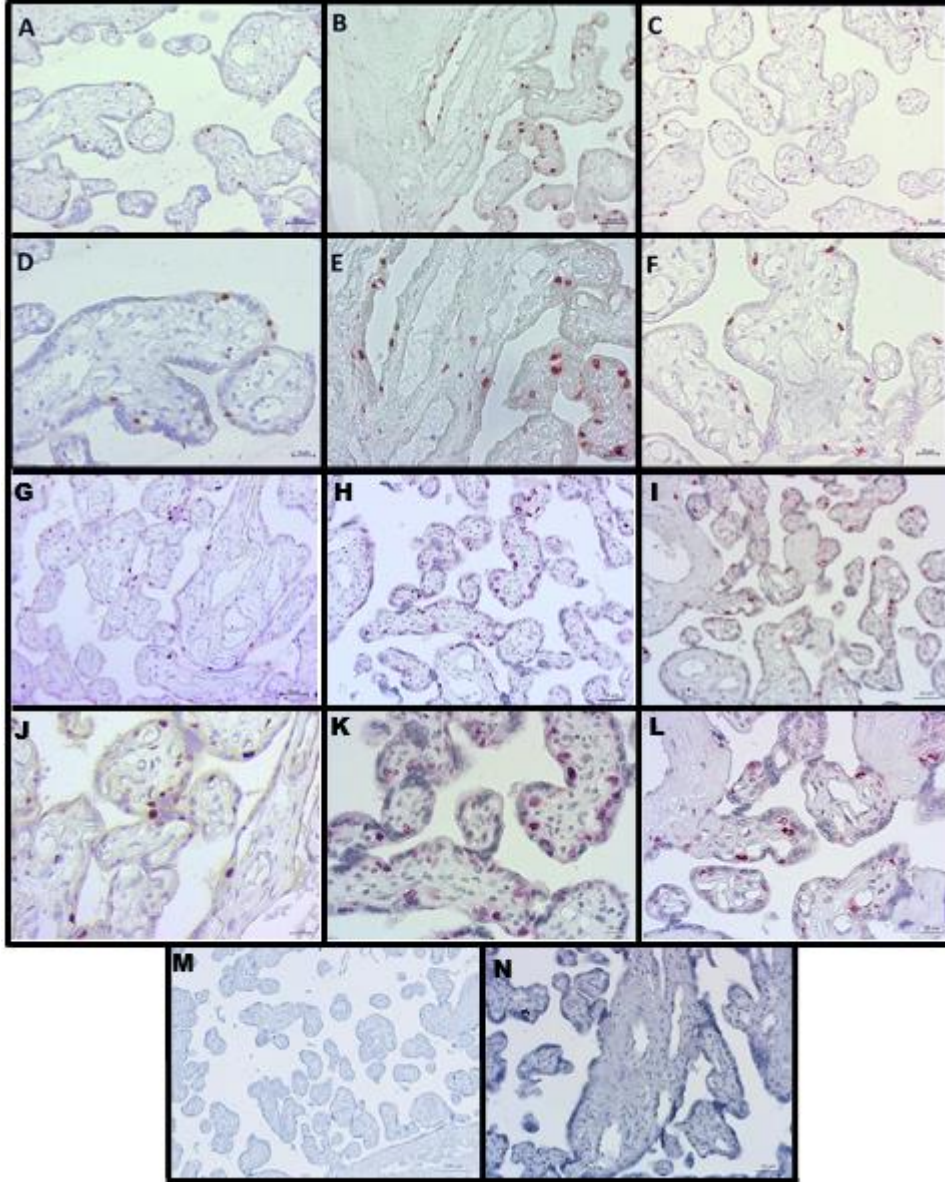
Hücrelerdeki PCNA immüno lokalizasyonu nükleerdir. İmmünohistokimya deney sonuçlarına göre sitotrofoblastlardaki PCNA immün reaktif pozitif hücre sayısı DETP grubunda kontrol ve TETP gruplarına göre belirgin şekilde daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Sinsisyotrofoblast tabakasındaki PCNA pozitif hücre düzeyi, her üç grup için de sitotrofoblast hücrelerine göre daha azdır. Normal koşullarda sinsisyotrofoblast hücreleri proliferasyon için PCNA proteini içermemeleri gerekir. Fakat PCNA proteinin yarılanma ömrü çok uzun olduğu için sitotrofoblastlarda mevcut olup sinsisyotrofoblasta dönüşen hücreler hala PCNA için immün reaktivite gösterir. Endotel hücrelerinde PCNA pozitif immünoreaktivitesi gözlenmemiştir. Stromal hücrelerdeki PCNA immün boyanması, sitotrofoblast hücreleri ile karşılaştırıldığında, daha düşük seviyede tespit edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1. PCNA immünohistokimyasal boyanmalar. Kontrol (A ve G), TETP (B ve H), ve DETP (C ve I) grupları 200X orjinal büyütmeye fotoğraflanmıştır Kontrol (D ve J), TETP (E ve K) , ve DETP (F ve L) grupları 400X orjinal büyütmeye fotoğraflanmıştır. (M) İzotip kontrol. (N) Negatif kontrol. Tüm görüntüler, Zeiss Axiolab ışık mikroskobu altında Zen Blue Edition programı kullanılarak çekilmiştir.

4.1.2 Siklin D3 İmmünohistokimyasal Boyanmaları

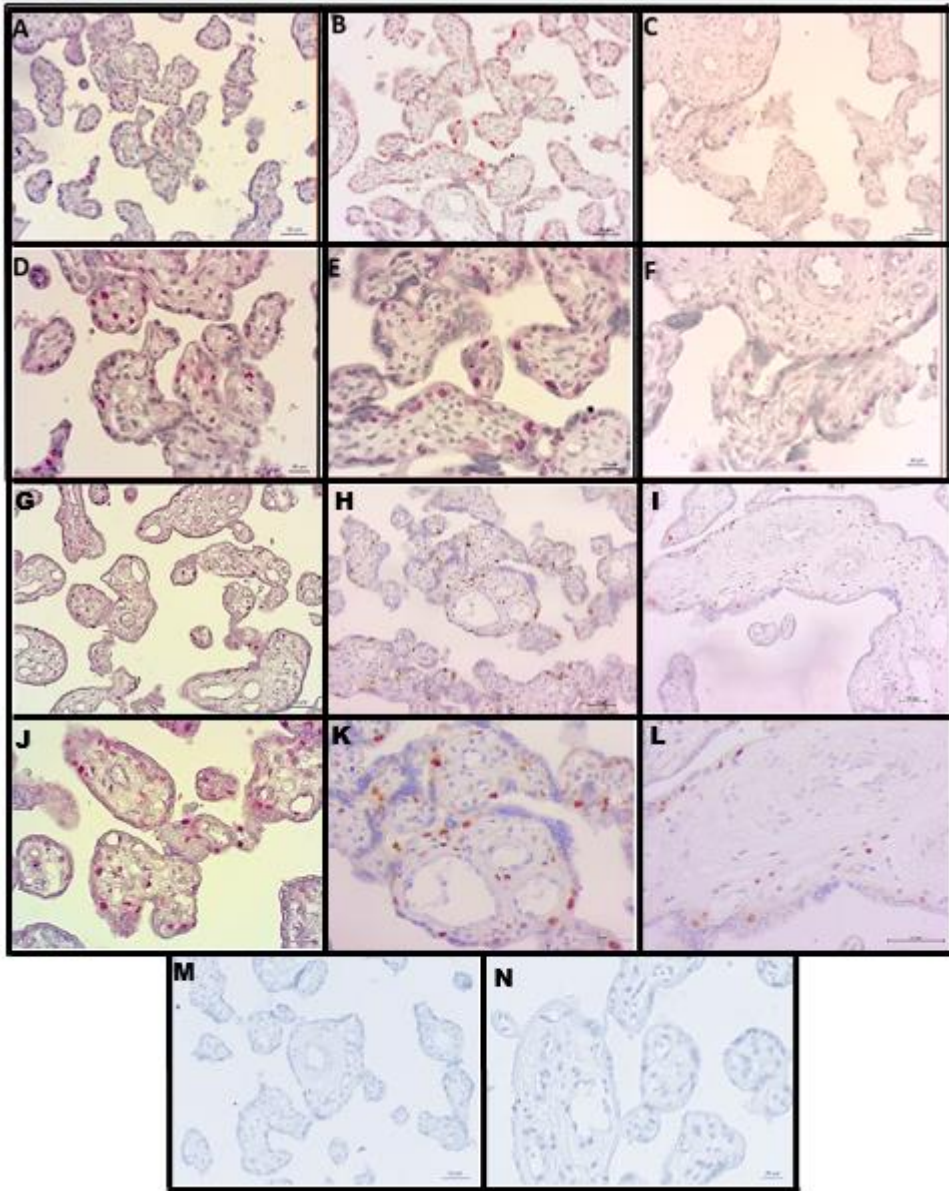
Siklin D3 immün reaktivitesi için TETP ve DETP gruplarındaki sitotrofoblast hücrelerinde, kontrol grubuna göre daha fazla sayıda mevcut olduğu tespit edilmiştir. Kontrol, TETP ve DETP gruplarında, sinsisyotrofoblastlarda ve endotel hücrelerinde siklin D3 immünoreaktivitesi görülmemektedir. Kontrol, TETP ve DETP grupları stromal hücrelerinde siklin D3 immünoreaktivitesi tespit edilmiştir fakat TETP ve DETP gruplarında boyanma yoğunluğu artmış ve benzer profil göstermektedir. Hücrelerde, siklin D3 çekirdekte immün pozitif reaksiyon göstermiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Siklin D3 immünohistokimyasal boyanmalar. Kontrol. (A ve G), TETP (B ve H) ve DETP (C ve I) grupları 200X orjinal büyütmede fotoğraflanmıştır. Kontrol (D ve J), TETP (E ve K), ve DETP (F ve L) grupları 400X orjinal büyütmede fotoğraflanmıştır. (M) İzotip kontrol. (N) Negatif kontrol. Tüm görüntüler Zeiss Axiolab ışık mikroskobu altında Zen Blue Edition programı kullanılarak çekilmiştir.

4.1.3 p57 İmmünohistokimyasal Boyanmaları

Kontrol grubu sitotrofoblast hücrelerindeki p57 boyanma yoğunluğu, DETP grubuna göre belirgin şekilde daha yüksek tespit edilmiştir. KP, TETP ve DETP grupları sinsisyotrofoblast ve endotel hücrelerinde p57 boyanması gözlenmemiştir. Stromal hücrelerde ise kontrol grubu p57 proteini boyanma yoğunluğu, TETP ve DETP grubuna kıyasla belirgin şekilde artış göstermektedir (Şekil 4.3).



Şekil 4. 3. p57 immünohistokimyasal boyanmalar. Kontrol (A ve G), TETP (B ve H) ve DETP (C ve I) grupları 200X orjinal büyütmede fotoğraflanmıştır. Kontrol (D ve J), TETP (E ve K), ve DETP (F ve L) grupları 400X orjinal büyütmede fotoğraflanmıştır. İzotip kontrol (M), Negatif kontrol (N). Tüm görüntüler Zeiss Axiolab ışık mikroskobu altında Zen Blue Edition programı kullanılarak çekilmiştir.

PCNA, Siklin D3 ve p57 immunohistokimyasal sonuçlar tablo şeklinde özetlenmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 PCNA, Siklin D3 ve p57 immuno histokimyasal boyanma sonuçları.

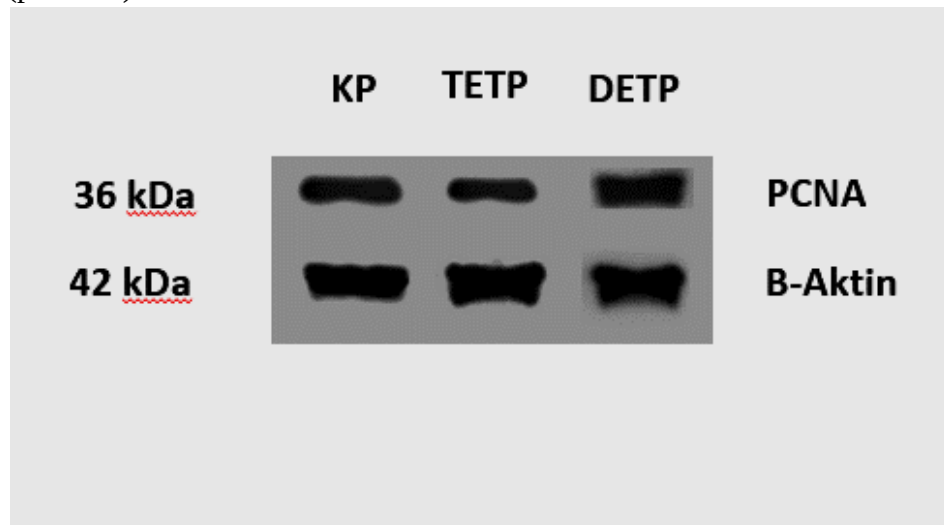
<i>Hücre Tipleri</i>	<i>Sitotrofoblast</i>			<i>Sinsisyotrofoblast</i>			<i>Endotel Hücreleri</i>			<i>Stromal Hücreler</i>		
<i>Gruplar</i>	KP	TETP	DETP	KP	TETP	DETP	KP	TETP	DETP	KP	TETP	DETP
<i>PCNA</i>	++	++	+++	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>Siklin D3</i>	+	+++	+++	-	-	-	-	-	-	+	++	++
<i>p57</i>	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	+++	+	+

+: Hafif seviyede ekspresyon mevcuttur.
 ++: Orta seviyede ekspresyon mevcuttur.
 +++: Yoğun seviyede ekspresyon mevcuttur.

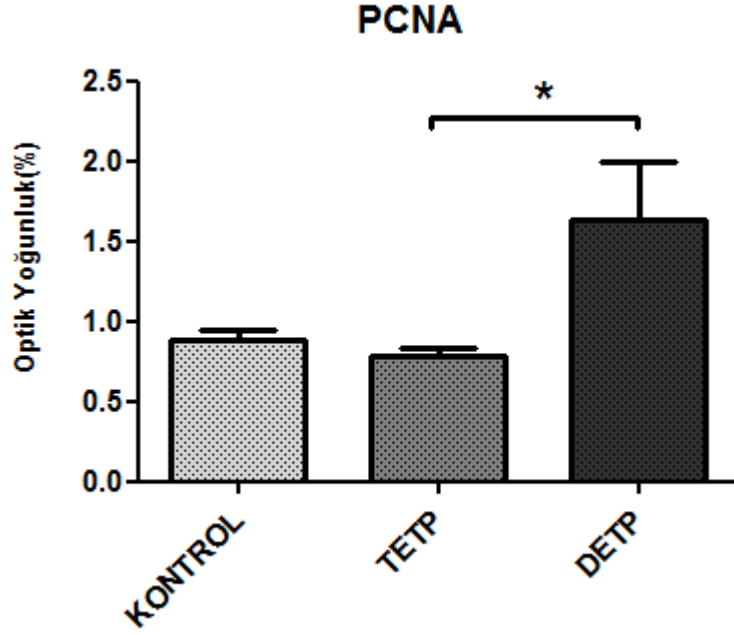
4.2 Western Blot Analizleri

4.2.1 PCNA protein düzeyi

Western blot analizlerine göre PCNA protein düzeyi DETP grubunda kontrol ve TETP gruplarına göre istatistiksek olarak anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. Kontrol ve TETP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur. DETP grubundaki PCNA proteini düzeyi, TETP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p \leq 0.05$).



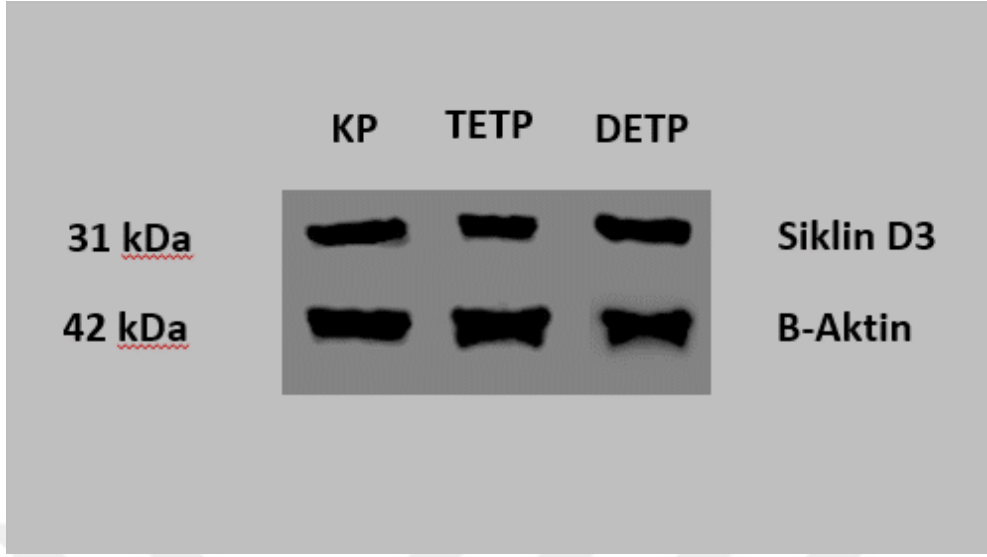
Şekil 4.4. Western Blot PCNA sonuçları. PCNA ve β -Aktin proteinlerinin bantları **KP:** Kontrol grubu plasenta dokularından alınmış plasenta örnekleri **TETP:**Taze embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri. **DETP:**Dondurulmuş embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri



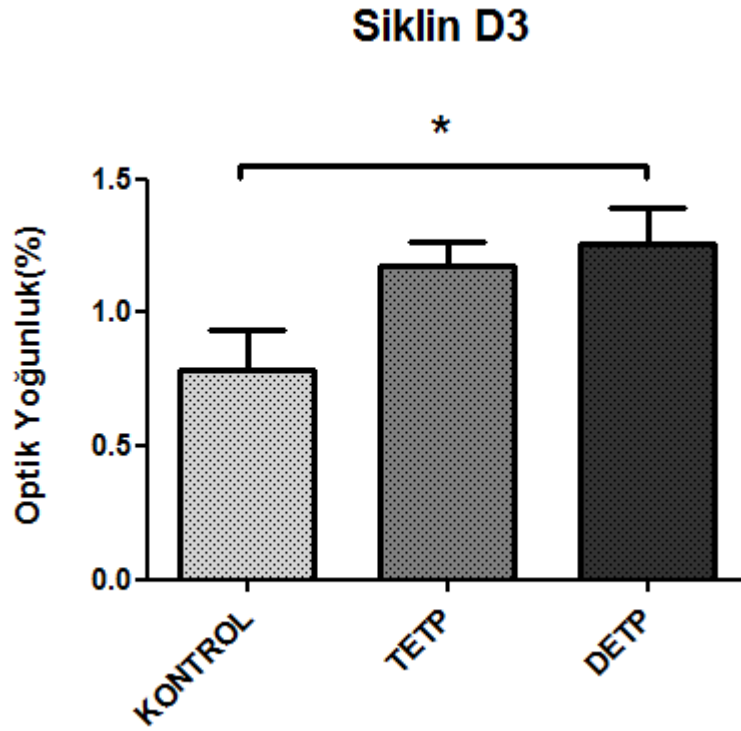
Şekil 4.5 PCNA proteininin Western blot deneyi sonucu analizleri. **KP:** Kontrol grubu plasenta dokularından alınmış plasenta örnekleri. **TETP:** Taze embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri. **DETP:** Dondurulmuş embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri. Veriler her grup için 3 tekrarın ortalaması alınarak elde edilmiştir. * $p \leq 0.05$.

4.2.2 Siklin D3

Western blot analizi sonuçlarına göre Siklin D3 protein ekspresyonu, TETP ve DETP gruplarında kontrol grubuna göre fazladır. Siklin D3 protein miktarında, kontrol ve TETP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur. DETP grubundaki Siklin D3 protein miktarı, TETP grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermektedir ($p \leq 0.05$).



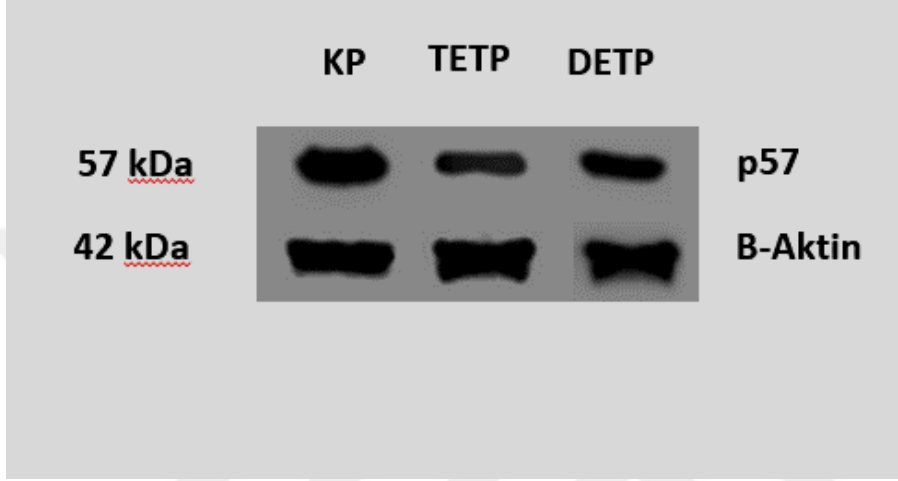
Şekil 4.6. Western blot siklin D3 sonuçları. Siklin D3 ve β -Aktin proteinlerinin bantları **KP:** Kontrol grubu plasenta dokularından alınmış plasenta örnekleri. **TETP:**Taze embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri. **DETP:**Dondurulmuş embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri



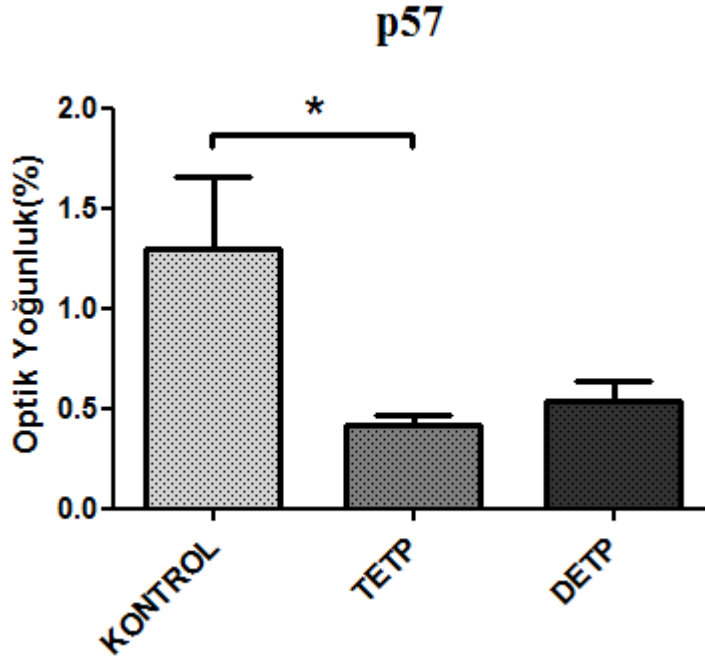
Şekil 4.7. Siklin D3 proteininin Western blot deneyi sonucu analizleri. **KP:** Kontrol grubu plasenta dokularından alınmış plasenta örnekleri. **TETP:**Taze embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri. **DETP:**Dondurulmuş embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri. Veriler her grup için 3 tekrarın ortalaması alınarak elde edilmiştir. * $p \leq 0.05$.

4.2.3 p57

Western blot analizine göre p57 protein miktarı, TETP ve DETP gruplarında kontrol grubuna göre azalmıştır. Kontrol grubu p57 protein ekspresyonu, TETP grubuna kıyasla istatistiksel olarak artış göstermektedir ($p \leq 0.05$). TETP ve DETP gruplarındaki protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.



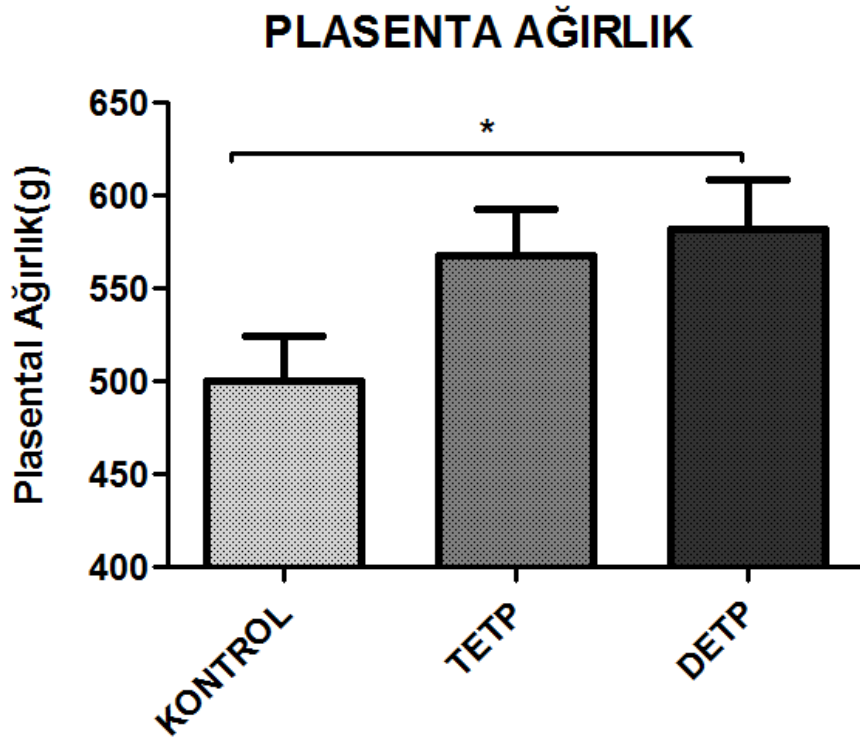
Şekil 4.8. Western blot p57 sonuçları. Siklin D3 ve β -Aktin proteinlerinin bantları. **KP:** Kontrol grubu plasenta dokularından alınmış plasenta örnekleri. **TETP:**Taze embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri. **DETP:**Dondurulmuş embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri



Şekil 4.9 p57 proteininin Western Blot deneyi sonucu analizleri. **KP:** Kontrol grubu plasenta dokularından alınmış plasenta örnekleri. **TETP:**Taze embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri. **DETP:**Dondurulmuş embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta örnekleri. Veriler, her grup için 3 tekrarın ortalaması alınarak elde edilmiştir.* $p \leq 0.05$.

4.3 Plasenta Ağırlıkları

Bu çalışmaya dahil edilen kontrol, TET ve DET ile gerçekleşen gebelikler sonucu doğumlardan elde edilen plasentaların ağırlıkları grafiğe dökülmüştür.



Şekil 4.10. Plasenta ağırlıkları.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında, DETP grubu plasenta ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksektir ($p \leq 0.05$), (Şekil 4.10).

5. TARTIŞMA

Küresel bir sorun olan infertilite, dünya nüfusunun ortalama %10'lu kısmını etkilemektedir. Yardımcı üreme teknolojisi gelişmesi, infertil çiftlere umut ışığı olmuştur. Özellikle son yıllarda YÜT ile ilgili gelişmeler hızla artmaktadır. Tüm Dünya'da çiftlerin 5'te 1'inde infertilite görüldüğü belirtilmektedir. Dünya çapında her yıl YÜT yöntemleri ile 200.000'den fazla bebek doğmaktadır ve bu sayı gün geçtikçe artmaktadır (Halliday ve ark., 2010; Bloise ve ark., 2014; Zhao ve ark., 2020). YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerin büyük çoğunluğu için bu tekniğin başarılı ve güvenli olduğu kanıtlanmıştır (Ishihara ve ark., 2015). Kliniğe, doktorlara ve hasta tercihine bağlı olarak çok çeşitli YÜT seçenekleri ve prosedürleri mevcuttur.

YÜT ile elde edilen yüksek başarı oranlarına rağmen, YÜT'ün hem güvenliği hem de anne ve bebek üzerindeki etkisi konusunda endişeler vardır. Yardımcı üreme tekniklerinin bir basamağı olan gonadotropinler ile birden fazla oositin elde edilmesini sağlayan süperovülasyonun YÜT gebeliklerinde olumsuz sonuçlara neden olabileceğine dair hipotezler yapılan çalışmalar ile doğrulanmıştır. Süperovülasyonun olası etkilerini incelemek adına fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasental gelişiminde farklılıklar göze çarpmıştır (Delle Piane ve ark., 2010; Bloise ve ark., 2012; Feuer ve ark., 2013). Buna ek olarak, bu teknolojiyle ilişkili birçok nadir genetik ve epigenetik hastalıklar görülmüştür (Denomme ve Mann, 2012; Eroglu ve Layman, 2012). Bu bulguları destekler şekilde diğer araştırmalar, süperovülasyonun bir sonucu olarak oosit ve gelişen embriyonun transkriptomundaki değişiklikleri ortaya çıkarmıştır (Steuerwald ve ark., 2007; Chu ve ark., 2012; Huffman ve ark., 2015). Daha sonra, süperovülasyonun neden olabileceği olumsuz sonuçlardan kaçınmak adına embriyoların dondurulup, fizyolojik olarak süperovülasyonun etkileri geçtikten sonra transfer edildiği dondurulmuş embriyo transferi yöntemi geliştirildi. Epidemiyolojik kanıtlar da, süperovülasyonun sebep olabileceği etkilerin dondurulmuş embriyo transfer ederek azaltılabileceğini göstermiştir (Henningsen ve ark., 2011; Wennerholm ve ark., 2013).

Yardımcı üreme tekniklerindeki gelişmelere rağmen, özellikle son yıllardaki çalışmalar, yardımcı üreme teknikleri sonucu doğabilecek potansiyel riskler üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bunun temel sebebi ise kohort çalışmalarında in vitro fertilizasyon ve embriyo transferi sonucu gerçekleşen gebeliklerde, spontan gebeliklere kıyasla,

düşük, erken doğum, düşük doğum ağırlığı, intrauterin büyüme geriliği ve gebelik hipertansiyonu dahil olmak üzere özellikle perinatal dönemde çok sayıda olumsuz sonuç ile karşılaşılmasıdır. Çok sayıda YÜT ile gerçekleşen gebelikleri dahil eden bir çalışmada yapılan meta-analiz sonuçları da benzer şekilde, bu tür gebeliklerin erken doğum, düşük doğum ağırlığı, plasenta previa, gestasyonel diyabet, preeklampsi ve yenidoğan yoğun bakıma yatış sayısında artış dahil olmak üzere olumsuz perinatal sonuçlar açısından artan risk altında olduğunu göstermiştir (Jackson ve ark., 2004).

Son birkaç yılda, memeli embriyonik gelişiminin erken evrelerinin mikro çevreye çok duyarlı olduğu ve fetüs, doğum sonrası ve yetişkin sağlığı üzerinde uzun vadeli etkileri olduğunu gösteren çalışmalar, YÜT yöntemlerini araştırmaların odağı haline getirmiştir (Padhee ve ark., 2015; Antonelli ve ark., 2017). YÜT sonucu gerçekleşen gebelikler ile spontan gebeliklerden elde edilen ilk trimester plasental dokuların karşılaştırıldığı bir çalışmada bazı gen ve protein ekspresyon profillerinde değişimlerin meydana geldiği tespit edilmiştir (Y. Zhang ve ark., 2010; Y. Zhang ve ark., 2011). Benzer şekilde, YÜT sonucu gerçekleşen gebelikleri dahil eden bir başka çalışmanın bulguları ise, YÜT sonrası hipertansif bozukluklarda, plasenta previa ve plasental ayrılma gibi plasental anormalliklerde ve sezaryen doğum insidansında önemli bir artış olduğunu gösteren metaanaliz sonuçlarını desteklemektedir (Shevell ve ark., 2005). Yine aynı çalışmada elde edilen bulgular, kontrollere kıyasla IVF gebeliklerinde preeklampsi riskinin 2,7 kat arttığı gösterilmiştir. YÜT ve preeklampsi arasındaki bu ilişki, 2004'te Jackson ve diğerleri, 2002'de Wang ve diğerleri, 1998'de Maman ve diğerleri ve 1992'de Tan ve diğerleri dahil olmak üzere diğer araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir (Tan ve ark., 1992; Verlaenen ve ark., 1995; Marcus ve ark., 1996; Jackson ve ark., 2004).

Patolojik gebelikler ile ilgili bulgulara ek olarak, literatürde, YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasenta ağırlık ve kalınlıklarının spontan gebelik plasentalarına göre farklılık gösterdiğini tespit eden çalışmalar da mevcuttur (Bloise ve ark., 2014). Preeklampsi, plasental abruption ve plasenta previa gibi gebelik patolojilerinin hepsinin, plasenta yerleşimi ve fonksiyonu ile ilişkili olması, oluşan problemlerin temelinde anormal plasantasyon yatabileceği hipotezini şiddetle desteklemektedir. Bu noktada, YÜT' ün doğurabileceği problemlerin altında yatan temeli anlamak ve çözmek için plasenta çalışmalarının artması gerekmektedir. Bu sebeple, bu projede

YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerden elde edilen plasentalar ve spontan gebeliklerden elde edilen plasentalar üzerinde araştırmalar yapılmıştır.

Maternal-fetal bir doku olan placent, fetüsün organları gelişirken fetal akciğerlerin (gaz değişimi), gastrointestinal sistemin (besin alımı) ve böbreklerin (sıvı hacminin düzenlenmesi ve atık metabolitlerin ortadan kaldırılması) işlevlerini aşamalı ve geçici olarak üstlenir. Fetüsün gelişebilmesi için moleküllerin, iyonların ve gazların anne ile fetus arasındaki değişimini düzenler. Aynı zamanda kendi başına bir endokrin organ olarak görev yapar ve her iki dolaşıma da steroid ve peptid hormonları salgılar (Donnelly ve Campling, 2014). Bu fonksiyonlarını yerine getirebilmesi için trofoblast hücrelerinin uterus dokusuna invaze olması ve uterus spiral arter duvarlarının yeniden şekillenmesi, gelişmekte olan fetoplacental ünitenin gerekli kan kaynağını almasını sağlaması gerekmektedir. Tüm bu görevleri nedeni ile normal placent gelişimi ve işlevi, sağlıklı gebeliğin sağlanması için esastır. Sağlıklı bir gebeliğin gerçekleşebilmesi için plasantasyonun düzgün gerçekleşmesi gerekmektedir.

Plasantasyon için ise placentadaki trofoblastların invazyonu ve farklılaşma mekanizmalarının sağlıklı ilerlemesi gerekmektedir. İnsan plasentasının koryonik villusları, Langhans hücreleri olarak adlandırılan dışta sinsityotrofoblast ve iç tarafta sitotrofoblast olmak üzere iki trofoblastik katmanla kaplıdır. Sitotrofoblast hücreleri proliferatif aktiviteleri yüksek olan hücrelerdir. Placentada bulunan sitotrofoblast hücrelerinin bir kısmı proliferatif olarak sitotrofoblastları oluşturmaya devam ederken, bir kısmı ise füzyon ile mitotik olarak aktif olmayan sinsisyotrofoblastları oluştururlar. Sinsisyotrofoblast hücreleri sitotrofoblastların füzyonu sonucu oluşan çok nükleuslu hücre kitlesidir. Bu süreç villöz ağacın büyümesinde ve patolojik koşullar altında trofoblastın yenilenme yeteneği açısından büyük önem taşımaktadır (Arnholdt ve ark., 1991). Normal gebeliklerde sitotrofoblast hücrelerinin proliferasyon mekanizmasına dayanan bu süreç sağlıklı ilerlemektedir. Placent gelişimi kontrol eden hücre döngüsü ile ilgili proteinlerin gebelik patolojilerine neden olabildiği bilinmektedir. Literatürde, preeklampsi ve diabetes mellitus gibi çeşitli patolojik durumlarda, trofoblastik katmandaki hücrelerin sayısında artış olduğu bildirilmiştir (Wigglesworth, 1962; Fox, 1964; Jones ve Fox, 1980; Teasdale, 1985). Ancak, literatürde trofoblast hücrelerinin proliferasyonunu araştıran çalışmaların sonuçları uyumsuzdur (Hustin ve ark., 1984; Arnholdt ve ark., 1991).

Anormal plasental gelişimi, PE, IUGR, diabetes mellitus ve gestasyonel trofoblastik hastalıklar gibi çeşitli gebelik patolojileriyle bağlantılıdır. Hücre döngüsü çıkışı, birçok hücre tipinin terminal farklılaşması için gereklidir ve hücre döngüsü ilerlemesi, katalitik alt birimlerden, belirlenmiş CDK'lerden ve siklinler olarak adlandırılan aktive edici alt birimlerden oluşan bir dizi sikline bağımlı kinaz (CDK'ler) tarafından düzenlenir (Lew ve ark., 1991; Sherr ve Roberts, 1995). Farklı siklin-CDK'lerin yeterli anlarda aktivasyonu ve inaktivasyonu, hücre döngüsüne doğru ilerleme için gereklidir (Zavitz ve Zipursky, 1997).

Hücre çekirdeğinde bulunan PCNA bir proliferasyon belirtecidir. Hücre siklusunun geç G1 ve S fazlarında sentezlenen proteinlerden birisi olan PCNA 36 kDa ağırlığındadır. PCNA, DNA sentezi, DNA tamiri ve hücre siklusu düzenlenmesinde önemli roller oynamaktadır. PCNA protein ekspresyonunun hücrede saptanması hücrelerde proliferasyon ya da DNA tamiri gerçekleştirmesine işaretir (Kelman, 1997; Unek ve ark., 2014a). Miktar olarak S fazında maksimum iken G2 ve M fazından azalmaktadır. Hücre siklusunda rol alan birçok protein, PCNA'ya bağlanarak görev alır. Bu noktada hücre siklusunda PCNA proteini önemli bir role sahiptir (Kelman, 1997). PCNA ekspresyonu en yoğun 1. trimesterde gözlenirken terme doğru azalmaktadır (Smith ve ark., 1998; Maruo ve ark., 2001).

D tipi siklinler büyüme faktörü sensörleri olarak hücre dışı sinyallerle birlikte rol alırlar ve başlama siklinleri şeklinde isimlendirilirler. Ortak kinazları CDK4 ve CDK6 ile birlikte, G1-S kontrol noktası boyunca ilerlemeyi düzenlemek için erken-orta G1'de çalışırlar (Sherr, 1994). Yaklaşık 30 dakika olmak üzere yarılanma ömürleri çok kısadır. Sentezleri ise büyüme faktörleri olmadığında durdurulur ve hücre G0 fazına girer. Siklinlerin içerisinde en yoğun ekspresyonu gözlenen tip siklin D3 proteindir. Literatüre göre normal gebeliklerin plasentalarında, siklin D3 ekspresyonu sitotrofoblast hücrelerinde yoğun olarak gözlenirken, sinsisyotrofoblastlarda ve EVT'lerde gözlenmedikleri bildirilmiştir. Ekspresyonu PCNA gibi 1. trimesterde en yoğun seviyede terme doğru azalmaktadır (Genbacev ve ark., 2000).

Cip/Kip ailesinden olan p57 G1 siklin/Cdk kompleksinin güçlü bir sıkı bağlanma inhibitörü ve hücre proliferasyonunun negatif düzenleyicisidir. p57, G1/S geçişinde ve

S fazının tamamlanmasını engelleme fonksiyonuna sahiptir. Siklin D/CDK4, siklin E/CDK2 ve ya Siklin A/CDK2 komplekslerine bağanarak siklinlerin inhibe olmalarını sağlar. Kontrol edilemeyen hücre proliferasyonunun engellenmesi için CDK inhibitörleri büyük önem taşımaktadır (Nakayama ve Nakayama, 1998; Sherr ve Roberts, 1999). Literatürde normal gebeliklerin plasentalarında, p57 ekspresyonu sitotrofoblastlarda, EVT'lerde tespit edilmiştir. İçlerinde en yoğun ekspersyon profilini gösteren hücreler sitotrofoblaslar olarak bildirilmiştir (Genbacev ve ark., 2000; Fukunaga, 2004).

Literatürde IVF ile gebelik gerçekleşen fareler üzerinde yapılan bir çalışmada, IVF sonucu gerçekleşen gebeliklerin düşük doğum ağırlığına sebep olmasının anormal plasantasyonla ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Çalışmada gebeliğin 12.5. gününde IVF grubunda kontrole kıyasla proliferasyonun bir belirteci olan Ki67 proteinin boyanmasının arttığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar gebeliğin başlangıcında IVF grubunda mitozdaki artışın, kısıtlanmış bir plasental doku kütleini kurtarmak için bir telafi edici mekanizmayı temsil etmesi ihtimali olabileceğini vurgulamışlardır (Delle Piane ve ark., 2010).

Sonrasında 2012 yılında Bloise ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada farelerin plasental dokularında immünohistokimyasal analizler yapmışlar ve benzer şekilde IVF sonucu gebelik gerçekleşen gebeliklerde kontrol grubuna kıyasla proliferasyonun arttığını bildirmişlerdir (Bloise ve ark., 2012). Bir diğer çalışmada, İnsan IVF ve normal gebelik grubu oluşturulmuş, gebelerin plasentalarından elde edilen dokularda PCNA protein ekspresyonu araştırılmıştır. IVF grubu dondurulmuş embriyo transferi sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasental dokularında, taze embriyo transferi sonucu gerçekleşen gebeliklerin dokularına göre PCNA ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Ozmen ve ark., 2021). Hücre proliferasyonu ve tamir mekanizmasında rol alan PCNA protein ekspresyonunun TETP ve DETP grubunda farklı profile sahip olması TET sonucu gerçekleşen gebeliklerde anormal plasantasyon gelişme riski ile alakalı olabilir. Sağlıklı bir gebelik için plasantasyonun kusursuz gerçekleşebilmesi ve plasentadaki hücrelerin hücre siklusu mekanizmasının problemsiz çalışmasının ne kadar önem arz ettiği bilinse de literatürde, YÜT ile gerçekleştirilen gebelikler ile spontan gebeliklerden elde edilen dokuların hücre siklus mekanizması konusunda limitli çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmada normal ve IVF yöntemi ile taze ve dondurulmuş embriyo transeri sonucu gerçekleşen gebelerin plasentalarında, hücre siklus mekanizmasının incelenmesi amacıyla dokular üzerinde hücre siklusu ile ilişkili, PCNA, siklin D3 ve p57 proteinlerinin Western Blot ve immünohistokimya deneyleri gerçekleştirilmiştir. PCNA, siklin D3 ve p57 protein miktarlarının değişimi Western Blot analizleri ile incelenmiştir ve immünohistokimya yöntemi ile plasentadaki hücre tiplerine göre boyanma yoğunlukları tespit edilmiştir.

İmmünohistokimya deney analizlerine göre sitotrofoblastlardaki PCNA protein miktarı DETP grubunda, kontrol ve TETP gruplarına göre belirgin şekilde daha yüksek tespit edilmiştir. Sinsisyotrofoblast tabakasındaki PCNA reaksiyonu TETP grubunda tespit edilmiş ve sitotrofoblast hücrelerine göre daha azdır. Stromal hücrelerdeki PCNA immün boyanması, sitotrofoblast hücreleri ile karşılaştırıldığında, daha düşük seviyede tespit edilmiştir ve üç grup için de benzer profil göstermektedir (Şekil 4.1). Bilindiği üzere sitotrofoblastlar yoğun proliferatif aktiviteye sahip hücrelerdir ve diğer trofoblast soylarını oluşturarak plasentanın gelişmesini sağlarlar (Arnholdt ve ark., 1991). Bu bağlamda PCNA protein boyanmasının sitotrofoblast hücrelerinde yoğun olması literatürle paralellik göstermektedir. Bulgularımızda ise sitotrofoblast hücrelerindeki en yoğun PCNA boyanması DETP grubunda tespit edilmiştir. Bu sonuç son yıllarda çıkan dondurulmuş embriyo transferinin, taze embriyo transferine kıyasla daha yüksek oranda başarılı doğum gerçekleşmesiyle ilişkili olabilir. TETP grubunda düşük seviyede PCNA boyanması, IVF sonucu, düşük plasenta ağırlığı ile ilgili patolojik olguların gelişmesiyle alakalı olabilir.

Western blot analizlerimize göre de immünohistokimyasal analizlere benzer şekilde en yoğun PCNA protein miktarı DETP grubunda tespit edilmiştir (Şekiller 4.4. ve 4.5). Elde edilen bulgulara göre DETP grubundaki PCNA protein miktarının fazla olması, PCNA proteinin hücre proliferasyonunda ve tamirinde rol alması sebebi ile hücre döngüsü mekanizmasının TETP grubundan farklı ilerlediğine bir işaret olabilir. 2019 yılında insan plasentaları üzerinde yapılan bir çalışmada, IUGR grubunda PCNA negatif hücre nükleus miktarının sağlıklı gebeliklik grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Barapatre ve ark., 2019). Bu çalışmada TETP grubundaki PCNA protein miktarının DETP grubuna kıyasla az olması, IUGR gibi patolojik gebeliklerde de PCNA protein miktarının spontan gebeliklere kıyasla düşük olması ile benzerlik

göstermektedir. G1 ve S fazlarında sentezlenen PCNA protein miktarının TETP grubunda düşük olması, hücre siklusunda daha az hücre olduğunun ve düşük proliferatif aktivitenin bir işareti olabilir. Literatürdeki çalışmalar da YÜT ile gerçekleşen gebeliklerde IUGR, preeklampsi, plasenta previa gibi patolojik gebelikler ile karşılaşma riskinin daha fazla olduğuna işaret etmektedir. Literatürde, preeklampsi ve IUGR plasentalar kontrol plasentalarına kıyasla daha düşük ağırlıktadır (Dypvik ve ark., 2017). Bulgularımızda TETP grubu PCNA ekspresyonunun DETP grubuna kıyasla daha düşük olması, TET sonucu gerçekleşen gebeliklerde azalmış proliferatif aktiviteye bağlı olarak küçük plasenta, IUGR ve preeklampsi olguları ile ilişkili olabilir. Bu noktada TETP ve DETP grubundaki PCNA protein ekspresyonundaki istatistiksel olarak anlamlı fark önem taşımakta ve daha detaylı araştırılmaya değer olması göz önünde bulundurulmalıdır. Ek olarak PCNA, PCNA'ya bağlı DNA replikasyonunun inhibisyonunu sağlayan siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1 (p21)'in karboksi terminaline bağlanarak p21 aktivitesinin önemli bir düzenleyicisidir (Goland ve ark., 1995). Sonuç olarak PCNA'nın hücre döngüsündeki önemli rolü sebebi ile bulgularımızdaki TETP ve DETP grupları arasındaki protein ekspresyon farkı, iki grup arasında hücre döngüsünde bazı farklılıklar olduğuna işaret etmektedir.

Siklin D3 proteininin immünohistokimyasal deneylerinin sonuçlarına göre, TETP ve DETP gruplarındaki sitotrofoblast hücrelerinde, kontrol grubuna göre daha yüksek boyanma yoğunluğu tespit edilmiştir. Kontrol, TETP ve DETP gruplarında, sinsisyotrofoblastlarda ve endotel hücrelerinde Siklin D3 immünoreaktivitesi, mevcut değildir. Kontrol, TETP ve DETP gruplarında stromal hücrelerinde Siklin D3 boyanması pozitif olup, TETP ve DETP gruplarında boyanma yoğunluğu artmış ve benzer profil göstermektedir (Şekil 4.2.). Sonuçlarımıza göre genel olarak TETP ve DETP gruplarında siklin D3 boyanması kontrol grubuna kıyasla fazladır ve hücre tiplerinde benzer profilde boyanma yoğunluğu göstermektedir. Bu sonuç YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasentalarındaki hücre siklus mekanizmasının normal gebeliklere göre farklı işlediğine işaret etmektedir. Bu çalışmada deney grupları oluşturulurken IVF grupları için taze ve dondurulmuş embriyo transferleri ayrı ayrı gruplandırılması, literatürde çalışma bulunmayan siklin D3 proteininin, taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonucu sağlanmış gebeliklerden elde edilen plasenta dokularındaki miktarını kıyaslama imkanı sunmuştur.

Western Blot analizleri sonuçlarına göre, siklin D3 protein miktarı kontrol grubu ile kıyaslandığında DETP grubunda daha yüksek seviyededir. DETP grubu siklin D3 protein ekspresyonundaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). TETP ile DETP grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır (Şekiller 4.6 ve 4.7). Sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, IUGR grubu oluşturulmuş ve IUGR grubu plasentalarında siklin D3 protein miktarı düşük seviyede tespit edilmiştir (Er ve ark., 2015). IUGR olgularında plasental yetmezlik söz konusu olduğu bilinmektedir ayrıca bu olgularda plasenta boyutları spontan gebeliklere kıyasla küçük olarak saptanır. Literatürde mevcut çalışmalara göre dondurulmuş embriyo transferi sonrası başarılı doğum oranları, taze embriyo transferine göre daha yüksektir (Roque ve ark., 2019). YÜT ile gerçekleştirilen gebeliklerin IUGR gibi patolojik gebeliklere sebep olduğu bilindiğinden (Hiendleder ve ark., 2004; Delle Piane ve ark., 2010; Bloise ve ark., 2012; Z. Chen ve ark., 2013; Grazul-Bilska ve ark., 2013). DETP grubundaki siklin D3 protein miktarındaki artış dondurulmuş embriyo transferinin başarı oranlarıyla ilişkilendirilebilir. Literatür çalışmalarında YÜT ve spontan gebelikler detaylı araştırılmış olmasına rağmen, taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonrası gerçekleşen gebeliklerin plasentalarında hücre döngüsü proteinleri karşılaştırılmamıştır. İki yöntem arasında başarılı doğum ve patolojik gebelik gelişme riski yüzdeleri arasındaki belirgin fark göz önüne alındığında, bu çalışmadaki bulgular bu konuda daha fazla araştırma yapılmasına gerek olduğunun altını çizmektedir. Bir başka çalışmada ise , diyabetik grup plasentaları incelenmiş, villöz kısımlarında, bazal plaklarda ve koryonik plakta, kontrol plasentalarına kıyasla önemli ölçüde artan siklin D3 boyama yoğunlukları tespit edilmiştir (Unek ve ark., 2014b). Çalışmanın sonucunda siklin D3 protein miktarındaki belirgin artış diyabetik plasentalarda gözlenen immatur villus sayısındaki artış ile ilişkilendirilerek hücre proliferasyonunun artması şeklinde yorumlanmıştır. Sonuç olarak siklin D3 protein miktarı, preeklampsi, IUGR, gestasyonel diyabet gibi patolojik gebeliklerde, sağlıklı gebeliklerden farklı profile sahip olup, TET ve DET sonucu gerçekleştirilen gebeliklerde gelişen anormal plasantasyonla ilişkili olabilir.

p57 proteini immünohistokimya deney sonuçlarına göre kontrol grubu sitotrofoblast hücrelerindeki p57 boyanma yoğunluğu, DETP grubuna göre belirgin şekilde daha yüksek tespit edilmiştir. KP, TETP ve DETP grupları sinsisyotrofoblast ve endotel hücrelerinde p57 boyanması gözlenmemiştir. Bulgularımızla paralel bir şekilde,

literatürde bulunan 2018 yılında yapılan bir çalışmada da, trofoblast hücrelerinin alt tiplerinde p57 gen ekspresyonu araştırılmış ve sinsisyotrofoblastlarda bu proteinin ekspresyonunun gözlenmediği bildirilmiştir (Liu ve ark., 2018). Stromal hücrelerde ise kontrol grubu p57 proteini boyanma yoğunluğu, TETP ve DETP grubuna kıyasla belirgin şekilde artış göstermektedir (Şekil 4.3). Analiz sonuçlarımıza göre genel olarak kontrol grubu p57 proteini boyanma yoğunluğu, TETP ve DETP gruplarına kıyasla yüksek çıkmıştır. p57 hücre döngüsünden çıkma kararlarında rol oynar. Kontrol grubunda p57 proteinin yüksek boyanma yoğunluğu, hücre döngüsünden çıkan hücrelerin farklılaşma yoluna girdiğinin belirteci olabilir. Plasentadaki proliferatif aktivitelerini kaybeden sitotrofoblast hücreleri, füzyon ile sinsiyotrofoblastlara farklılaşmaktadırlar. Kontrol grubunda bu farklılaşma ve sağlıklı plasentasyon sağlanabiliyorken, DETP ve TETP gruplarında p57 düşüklüğü hücrelerin farklılaşma yoluna gidemediğini ve bu sebeple YÜT'ün patolojik gebeliklere sebep olduğuna işaret ediyor olabilir. Literatüre göre diyabetik insan plasentalarında p57 protein ekspresyonunun, villus kısımlarında sağlıklı gebeliklere kıyasla düşük olduğu tespit edilmiştir (Aires ve Dos Santos, 2015).

p57 için Western Blot bulguları incelendiğinde, TETP grubu p57 protein ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük seviyede tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). Kontrol ve DETP gruplarındaki protein seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemektedir (Şekiller 4.8 ve 4.9). Western blot analiz sonuçları, immünohistokimya deney sonuçları ile paralellik göstermektedir. 2014 yılında yapılan bir çalışmada, p57 protein ekspresyonu, villus sitotrofoblastlarında, villöz stromal hücrelerde, amniyotik epitelde, invaziv sitotrofoblastlarda ve insan plasentalarının desidual hücrelerinde tanımlanmıştır (Unek ve ark., 2014a). Crocker ve ekibinin yaptığı bir diğer çalışmada ise, preeklampitik gebeliklerden elde edilen plasentalarda p57 protein ekspresyonunun arttığı tespit edilmiş, ve aşırı apoptoz ile ilişkilendirilmiştir (Crocker ve ark., 2004). P57 siklin/Cdk kompleksine bağlanan bir inhibitor proteindir ve hücre proliferasyonunun negatif düzenleyicisidir (Lees, 1995). Literatürde taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonrası gerçekleşen gebeliklerde p57 proteininin ekspresyon profilini kıyaslayan çalışmalar mevcut değildir. Bu sebeple, bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre TETP ve kontrol grupları arasında hücre döngüsünün önemli bir inhibitor protein olan p57 miktarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık çıkması, hücre döngüsü mekanizmasının TETP ve DETP gruplarında

farklı işlediğinin bir işareti olarak, YÜT ile gerçekleşen gebeliklerde patolojik olgu gelişme riskinin fazla olması ile ilişkili olabilir. Ayrıca TETP grubunda p57 protein miktarının az olması hücrelerin, siklustan çıkıp differansiye olamadığını ve böylece sonuç olarak plasentasyonun yetersiz kalmasına sebep olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda elde edilen bulgulara göre TETP ve DETP gruplarında hücre döngüsü ile ilişkili proteinler araştırılmış ve bazı farklılıklar tespit edilmiştir. Ek olarak, çalışmamıza dahil ettiğimiz TET ve DET ile gerçekleşen gebelikler sonucu doğumlardan elde edilen plasentaların ağırlıkları grafiğe dökülmüştür (Şekil 4.10). Kontrol grubu ile kıyaslandığında, DETP grubu plasenta ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksektir. Bu bulgular, DETP grubunda hücre proliferasyonu ile ilişkili olarak PCNA ve siklin D3 protein miktarlarının yüksek çıkması ile paralellik göstermektedir. Plasentadaki hücrelerin proliferasyon miktarının artması, plasenta boyutlarında artışa sebep olabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada spontan gebelikler ile taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonucu gerçekleşen gebeliklerden elde edilen plasentalardan doku örnekleri alınarak, hücre siklusu ile ilişkili PCNA, siklin D3 ve p57 proteinlerinin gruplar arası miktarlarını karşılaştırmak amacıyla western blot analizleri ve bu proteinlerin plasentadaki lokalizasyonlarını belirlemek için immünohistokimyasal analizler yapılmıştır. Bu çalışmada YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasentalarında hücre siklusu proteinleri incelenmiştir.

Elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda özetlenmiştir:

1. PCNA protein miktarı TETP grubu ile kıyaslandığında DETP grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede daha yüksek bulunurken diğer gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

2. Siklin D3 protein miktarı kontrol grubu ile kıyaslandığında DETP grubunda daha yüksek seviyededir

PCNA ve Siklin D3 proteinlerinin hücre döngüsünün ilerlemesinde ve proliferasyonda rolü olması sebebi ile miktarlarının birbiri ile paralellik göstermesi beklenmektedir. Bizim bulgularımızda da DETP grubunda her ikisinin de yüksek seviyede olması bu bilgi ile örtüşmektedir.

3. TETP grubu p57 protein ekspresyonu kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak düşük seviyede tespit edilmiştir.

Taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasentalarında hücre döngüsü mekanizması bu çalışmada ilk kez incelenmiştir. Hücre döngüsünde rol alan her üç protein miktarında da istatistiksel olarak anlamlı farklılık çıkması, hücre döngüsü mekanizmasının TETP ve DETP gruplarında farklı işlediğine işaret etmektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, hücre döngüsünün işleyişindeki farklar, YÜT'ün sebep olduğu patolojik olguların ve anormal plasantasyonun altında yatan nedenlerden biri olabilir. Bu noktada, TET ve DET ile gerçekleşen gebeliklerin plasentalarındaki hücre siklusu mekanizmalarının

aydınlatılması, sağlıklı gebelik gerekleşirme yüzdelerinin arttırılmasında etkili olabilir.

4. Bu çalışmada kullanılan normal ve YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerin plasental ağırlıkları, en yüksek DETP grubunda tespit edilmiştir.

Bu sonuç, DETP grubunda proliferasyon ile ilişkili PCNA ve siklin D3 proteinlerinin miktarlarının artması ile korelasyon göstermektedir.



KAYNAKLAR

- Acar, N., Korgun, E. T., Cayli, S., Sahin, Z., Demir, R., & Ustunel, I. Is there a relationship between pcna expression and diabetic placental development during pregnancy? *Acta Histochem.* 2008; 110 (5): 408-417.
- Aires, M. B., & Dos Santos, A. C. Effects of maternal diabetes on trophoblast cells. *World J Diabetes.* 2015; 6 (2): 338-344.
- Albrecht, E. D., Bonagura, T. W., Burleigh, D. W., Enders, A. C., Aberdeen, G. W., & Pepe, G. J. Suppression of extravillous trophoblast invasion of uterine spiral arteries by estrogen during early baboon pregnancy. *Placenta.* 2006; 27 (4-5): 483-490.
- Allias, F., Lebreton, F., Collardeau-Frachon, S., Azziza, J., Pasquier, C. J., Arcin-Thoury, F., . . . Devouassoux-Shisheboran, M. Immunohistochemical expression of p57 in placental vascular proliferative disorders of preterm and term placentas. *Fetal Pediatr Pathol.* 2009; 28 (1): 9-23.
- Antonelli, M. C., Pallares, M. E., Ceccatelli, S., & Spulber, S. Long-term consequences of prenatal stress and neurotoxicants exposure on neurodevelopment. *Prog Neurobiol.* 2017; 155: 21-35.
- Arnholdt, H., Meisel, F., Fandrey, K., & Lohrs, U. Proliferation of villous trophoblast of the human placenta in normal and abnormal pregnancies. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1991; 60 (6): 365-372.
- Aytoz, A., Van den Abbeel, E., Bonduelle, M., Camus, M., Joris, H., Van Steirteghem, A., & Devroey, P. Obstetric outcome of pregnancies after the transfer of cryopreserved and fresh embryos obtained by conventional in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1999; 14 (10): 2619-2624.
- Barapatre, N., Haeussner, E., Grynspan, D., Schmitz, C., Edler von Koch, F., & Frank, H. G. The density of cell nuclei at the materno-fetal exchange barrier is sexually dimorphic in normal placentas, but not in iugr. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 2359.
- Bhattacharya, S. Maternal and perinatal outcomes after fresh versus frozen embryo transfer-what is the risk-benefit ratio? *Fertil Steril.* 2016; 106 (2): 241-243.
- Bloise, E., Feuer, S. K., & Rinaudo, P. F. Comparative intrauterine development and placental function of art concepti: Implications for human reproductive medicine and animal breeding. *Hum Reprod Update.* 2014; 20 (6): 822-839.
- Bloise, E., Lin, W., Liu, X., Simbulan, R., Kolahi, K. S., Petraglia, F., . . . Rinaudo, P. Impaired placental nutrient transport in mice generated by in vitro fertilization. *Endocrinology.* 2012; 153 (7): 3457-3467.
- Bosch, E., De Vos, M., & Humaidan, P. The future of cryopreservation in assisted reproductive technologies. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020; 11: 67.
- Bourgain, C., & Devroey, P. The endometrium in stimulated cycles for ivf. *Hum Reprod Update.* 2003; 9 (6): 515-522.
- Brown, S. Miscarriage and its associations. *Semin Reprod Med.* 2008; 26 (5): 391-400.
- Burton, G. J., Charnock-Jones, D. S., & Jauniaux, E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction.* 2009; 138 (6): 895-902.
- Burton, G. J., & Fowden, A. L. The placenta: A multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2015; 370 (1663): 20140066.
- Chen, Z., Robbins, K. M., Wells, K. D., & Rivera, R. M. Large offspring syndrome: A bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome beckwith-wiedemann. *Epigenetics.* 2013; 8 (6): 591-601.
- Chen, Z. J., Shi, Y., Sun, Y., Zhang, B., Liang, X., Cao, Y., . . . Legro, R. S. Fresh versus frozen embryos for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med.* 2016; 375 (6): 523-533.

- Choux, C., Carmignac, V., Bruno, C., Sagot, P., Vaiman, D., & Fauque, P. The placenta: Phenotypic and epigenetic modifications induced by assisted reproductive technologies throughout pregnancy. *Clin Epigenetics*. 2015; 7: 87.
- Chu, T., Dufort, I., & Sirard, M. A. Effect of ovarian stimulation on oocyte gene expression in cattle. *Theriogenology*. 2012; 77 (9): 1928-1938.
- Chung, K., Coutifaris, C., Chalian, R., Lin, K., Ratcliffe, S. J., Castelbaum, A. J., . . . Barnhart, K. T. Factors influencing adverse perinatal outcomes in pregnancies achieved through use of in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2006; 86 (6): 1634-1641.
- Crocker, I. P., Tansinda, D. M., & Baker, P. N. Altered cell kinetics in cultured placental villous explants in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *J Pathol*. 2004; 204 (1): 11-18.
- Daniel, Y., Schreiber, L., Geva, E., Amit, A., Pausner, D., Kupferminc, M. J., & Lessing, J. B. Do placentae of term singleton pregnancies obtained by assisted reproductive technologies differ from those of spontaneously conceived pregnancies? *Hum Reprod*. 1999; 14 (4): 1107-1110.
- de Boo, H. A., & Harding, J. E. The developmental origins of adult disease (barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2006; 46 (1): 4-14.
- Delle Piane, L., Lin, W., Liu, X., Donjacour, A., Minasi, P., Revelli, A., . . . Rinaudo, P. F. Effect of the method of conception and embryo transfer procedure on mid-gestation placenta and fetal development in an ivf mouse model. *Hum Reprod*. 2010; 25 (8): 2039-2046.
- Denomme, M. M., & Mann, M. R. Genomic imprints as a model for the analysis of epigenetic stability during assisted reproductive technologies. *Reproduction*. 2012; 144 (4): 393-409.
- Devroey, P., Polyzos, N. P., & Blockeel, C. An ohss-free clinic by segmentation of ivf treatment. *Hum Reprod*. 2011; 26 (10): 2593-2597.
- Donnelly, L., & Campling, G. Functions of the placenta. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*. 2014; 15 (3): 136-139.
- Drost, M. Complications during gestation in the cow. *Theriogenology*. 2007; 68 (3): 487-491.
- Dypvik, J., Larsen, S., Haavaldsen, C., Jukic, A. M., Vatten, L. J., & Eskild, A. Placental weight in the first pregnancy and risk for preeclampsia in the second pregnancy: A population-based study of 186 859 women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017; 214: 184-189.
- Ecker, D. J., Stein, P., Xu, Z., Williams, C. J., Kopf, G. S., Bilker, W. B., . . . Schultz, R. M. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101 (6): 1595-1600.
- Er, H., Acar, N., Kipmen-Korgun, D., Celik-Ozenci, C., Ustunel, I., Asar, M., & Korgun, E. T. Determination of pcna, cyclin d3, p27, p57 and apoptosis rate in normal and dexamethasone-induced intrauterine growth restricted rat placentas. *Acta Histochem*. 2015; 117 (2): 137-147.
- Eroglu, A., & Layman, L. C. Role of art in imprinting disorders. *Semin Reprod Med*. 2012; 30 (2): 92-104.
- Europe, E. W. G. o. O. C. i., Shenfield, F., de Mouzon, J., Scaravelli, G., Kupka, M., Ferraretti, A. P., . . . Goossens, V. Oocyte and ovarian tissue cryopreservation in european countries: Statutory background, practice, storage and use. *Hum Reprod Open*. 2017; 2017 (1): hox003.
- Evans, J., Hannan, N. J., Edgell, T. A., Vollenhoven, B. J., Lutjen, P. J., Osianlis, T., . . . Rombauts, L. J. Fresh versus frozen embryo transfer: Backing clinical decisions with scientific and clinical evidence. *Hum Reprod Update*. 2014; 20 (6): 808-821.
- Farhi, J., Ben-Haroush, A., Andrawus, N., Pinkas, H., Sapir, O., Fisch, B., & Ashkenazi, J. High serum oestradiol concentrations in ivf cycles increase the risk of pregnancy

- complications related to abnormal placentation. *Reprod Biomed Online*. 2010; 21 (3): 331-337.
- Fauque, P., Mondon, F., Letourneur, F., Ripoche, M. A., Journot, L., Barbaux, S., . . . Vaiman, D. In vitro fertilization and embryo culture strongly impact the placental transcriptome in the mouse model. *PLoS One*. 2010; 5 (2): e9218.
- Fernandez-Gonzalez, R., de Dios Hourcade, J., Lopez-Vidriero, I., Benguria, A., De Fonseca, F. R., & Gutierrez-Adan, A. Analysis of gene transcription alterations at the blastocyst stage related to the long-term consequences of in vitro culture in mice. *Reproduction*. 2009; 137 (2): 271-283.
- Fernandez-Gonzalez, R., Moreira, P., Bilbao, A., Jimenez, A., Perez-Crespo, M., Ramirez, M. A., . . . Gutierrez-Adan, A. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mrna expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101 (16): 5880-5885.
- Feuer, S. K., Camarano, L., & Rinaudo, P. F. Art and health: Clinical outcomes and insights on molecular mechanisms from rodent studies. *Mol Hum Reprod*. 2013; 19 (4): 189-204.
- Fox, H. The villous cytotrophoblast as an index of placental ischaemia. *J Obstet Gynaecol Br Commonw*. 1964; 71: 885-893.
- Fukunaga, M. Immunohistochemical characterization of p57(kip2) expression in early hydatidiform moles. *Hum Pathol*. 2002; 33 (12): 1188-1192.
- Fukunaga, M. Immunohistochemical characterization of p57kip2 expression in tetraploid hydropic placentas. *Arch Pathol Lab Med*. 2004; 128 (8): 897-900.
- Gardner, D. K., Lane, M., & Schoolcraft, W. B. Culture and transfer of viable blastocysts: A feasible proposition for human ivf. *Hum Reprod*. 2000; 15 Suppl 6: 9-23.
- Gardner, D. K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T., & Schoolcraft, W. B. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2000; 73 (6): 1155-1158.
- Genbacev, O., McMaster, M. T., & Fisher, S. J. A repertoire of cell cycle regulators whose expression is coordinated with human cytotrophoblast differentiation. *Am J Pathol*. 2000; 157 (4): 1337-1351.
- Giritharan, G., Talbi, S., Donjacour, A., Di Sebastiano, F., Dobson, A. T., & Rinaudo, P. F. Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. *Reproduction*. 2007; 134 (1): 63-72.
- Goland, R. S., Tropper, P. J., Warren, W. B., Stark, R. I., Jozak, S. M., & Conwell, I. M. Concentrations of corticotrophin-releasing hormone in the umbilical-cord blood of pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Reprod Fertil Dev*. 1995; 7 (5): 1227-1230.
- Grazul-Bilska, A. T., Johnson, M. L., Borowicz, P. P., Baranko, L., Redmer, D. A., & Reynolds, L. P. Placental development during early pregnancy in sheep: Effects of embryo origin on fetal and placental growth and global methylation. *Theriogenology*. 2013; 79 (1): 94-102.
- Halliday, J. L., Ukoumunne, O. C., Baker, H. W., Breheny, S., Jaques, A. M., Garrett, C., . . . Amor, D. Increased risk of blastogenesis birth defects, arising in the first 4 weeks of pregnancy, after assisted reproductive technologies. *Hum Reprod*. 2010; 25 (1): 59-65.
- Hamilton, W. J., & Boyd, J. D. Development of the human placenta in the first three months of gestation. *J Anat*. 1960; 94: 297-328.
- Haouzi, D., Assou, S., Mahmoud, K., Tondeur, S., Reme, T., Hedon, B., . . . Hamamah, S. Gene expression profile of human endometrial receptivity: Comparison between natural and stimulated cycles for the same patients. *Hum Reprod*. 2009; 24 (6): 1436-1445.
- Henningsen, A. K., Pinborg, A., Lidegaard, O., Vestergaard, C., Forman, J. L., & Andersen, A. N. Perinatal outcome of singleton siblings born after assisted reproductive

- technology and spontaneous conception: Danish national sibling-cohort study. *Fertil Steril*. 2011; 95 (3): 959-963.
- Hiendleder, S., Mund, C., Reichenbach, H. D., Wenigerkind, H., Brem, G., Zakhartchenko, V., . . . Wolf, E. Tissue-specific elevated genomic cytosine methylation levels are associated with an overgrowth phenotype of bovine fetuses derived by in vitro techniques. *Biol Reprod*. 2004; 71 (1): 217-223.
- Hovi, P., Andersson, S., Eriksson, J. G., Jarvenpaa, A. L., Strang-Karlsson, S., Makitie, O., & Kajantie, E. Glucose regulation in young adults with very low birth weight. *N Engl J Med*. 2007; 356 (20): 2053-2063.
- Huffman, S. R., Pak, Y., & Rivera, R. M. Superovulation induces alterations in the epigenome of zygotes, and results in differences in gene expression at the blastocyst stage in mice. *Mol Reprod Dev*. 2015; 82 (3): 207-217.
- Hunter, T., & Pines, J. Cyclins and cancer. II: Cyclin d and cdk inhibitors come of age. *Cell*. 1994; 79 (4): 573-582.
- Hustin, J., Foidart, J. M., & Lambotte, R. Cellular proliferation in villi of normal and pathological pregnancies. *Gynecol Obstet Invest*. 1984; 17 (1): 1-9.
- Imudia, A. N., Awonuga, A. O., Doyle, J. O., Kaimal, A. J., Wright, D. L., Toth, T. L., & Styer, A. K. Peak serum estradiol level during controlled ovarian hyperstimulation is associated with increased risk of small for gestational age and preeclampsia in singleton pregnancies after in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2012; 97 (6): 1374-1379.
- Ishihara, O., Adamson, G. D., Dyer, S., de Mouzon, J., Nygren, K. G., Sullivan, E. A., . . . Mansour, R. International committee for monitoring assisted reproductive technologies: World report on assisted reproductive technologies, 2007. *Fertil Steril*. 2015; 103 (2): 402-413 e411.
- Issue information. *Histopathology*. 2021; 78 (7): 917-917.
- Jackson, R. A., Gibson, K. A., Wu, Y. W., & Croughan, M. S. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: A meta-analysis. *Obstet Gynecol*. 2004; 103 (3): 551-563.
- Jiang, Z., Wang, Y., Lin, J., Xu, J., Ding, G., & Huang, H. Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017; 44: 90-104.
- Jimenez-Chillaron, J. C., Hernandez-Valencia, M., Lightner, A., Faucette, R. R., Reamer, C., Przybyla, R., . . . Patti, M. E. Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. *Diabetologia*. 2006; 49 (8): 1974-1984.
- Jones, C. J., & Fox, H. An ultrastructural and ultrahistochemical study of the human placenta in maternal pre-eclampsia. *Placenta*. 1980; 1 (1): 61-76.
- Joo, B. S., Park, S. H., An, B. M., Kim, K. S., Moon, S. E., & Moon, H. S. Serum estradiol levels during controlled ovarian hyperstimulation influence the pregnancy outcome of in vitro fertilization in a concentration-dependent manner. *Fertil Steril*. 2010; 93 (2): 442-446.
- Kajantie, E., & Hovi, P. Is very preterm birth a risk factor for adult cardiometabolic disease? *Semin Fetal Neonatal Med*. 2014; 19 (2): 112-117.
- Kalra, S. K., & Barnhart, K. T. In vitro fertilization and adverse childhood outcomes: What we know, where we are going, and how we will get there. A glimpse into what lies behind and beckons ahead. *Fertil Steril*. 2011; 95 (6): 1887-1889.
- Kalra, S. K., Ratcliffe, S. J., Coutifaris, C., Molinaro, T., & Barnhart, K. T. Ovarian stimulation and low birth weight in newborns conceived through in vitro fertilization. *Obstet Gynecol*. 2011; 118 (4): 863-871.
- Kansal Kalra, S., Ratcliffe, S. J., Milman, L., Gracia, C. R., Coutifaris, C., & Barnhart, K. T. Perinatal morbidity after in vitro fertilization is lower with frozen embryo transfer. *Fertil Steril*. 2011; 95 (2): 548-553.

- Kato, O., Kawasaki, N., Bodri, D., Kuroda, T., Kawachiya, S., Kato, K., & Takehara, Y. Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012; 161 (1): 46-50.
- Kelman, Z. Pcn: Structure, functions and interactions. *Oncogene.* 1997; 14 (6): 629-640.
- Kierszenbaum, A. L., & Tres, L. L. *Histology and cell biology : An introduction to pathology.* 2012.
- Kittelson, J. M. A review of: "Fundamentals of biostatistics, 7th ed., by b. Rosner". *Journal of Biopharmaceutical Statistics.* 2011; 21 (5): 1046-1048.
- Kolibianakis, E., Bourgain, C., Albano, C., Osmanagaoglu, K., Smitz, J., Van Steirteghem, A., & Devroey, P. Effect of ovarian stimulation with recombinant follicle-stimulating hormone, gonadotropin releasing hormone antagonists, and human chorionic gonadotropin on endometrial maturation on the day of oocyte pick-up. *Fertil Steril.* 2002; 78 (5): 1025-1029.
- Korgun, E. T., Celik-Ozenci, C., Acar, N., Cayli, S., Desoye, G., & Demir, R. Location of cell cycle regulators cyclin b1, cyclin a, pcna, ki67 and cell cycle inhibitors p21, p27 and p57 in human first trimester placenta and deciduas. *Histochem Cell Biol.* 2006; 125 (6): 615-624.
- Lattes, K., Checa, M. A., Vassena, R., Brassesco, M., & Vernaev, V. There is no evidence that the time from egg retrieval to embryo transfer affects live birth rates in a freeze-all strategy. *Hum Reprod.* 2017; 32 (2): 368-374.
- Lawrenz, B., & Fatemi, H. M. Effect of progesterone elevation in follicular phase of ivf-cycles on the endometrial receptivity. *Reprod Biomed Online.* 2017; 34 (4): 422-428.
- Lawrenz, B., Labarta, E., Fatemi, H., & Bosch, E. Premature progesterone elevation: Targets and rescue strategies. *Fertil Steril.* 2018; 109 (4): 577-582.
- Lees, E. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 1995; 7 (6): 773-780.
- Lew, D. J., Dulic, V., & Reed, S. I. Isolation of three novel human cyclins by rescue of g1 cyclin (cln) function in yeast. *Cell.* 1991; 66 (6): 1197-1206.
- Liu, Y., Fan, X., Wang, R., Lu, X., Dang, Y. L., Wang, H., . . . Wang, H. Single-cell rna-seq reveals the diversity of trophoblast subtypes and patterns of differentiation in the human placenta. *Cell Res.* 2018; 28 (8): 819-832.
- Maheshwari, A., Pandey, S., Shetty, A., Hamilton, M., & Bhattacharya, S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2012; 98 (2): 368-377 e361-369.
- Mainigi, M. A., Olalere, D., Burd, I., Sapienza, C., Bartolomei, M., & Coutifaris, C. Peri-implantation hormonal milieu: Elucidating mechanisms of abnormal placentation and fetal growth. *Biol Reprod.* 2014; 90 (2): 26.
- Marciniak, A., Patro-Malysza, J., Kimber-Trojnar, Z., Marciniak, B., Oleszczuk, J., & Leszczynska-Gorzela, B. Fetal programming of the metabolic syndrome. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2017; 56 (2): 133-138.
- Marcus, S., al-Shawaf, T., & Brinsden, P. The obstetric outcome of in vitro fertilization and embryo transfer in women with congenital uterine malformation. *Am J Obstet Gynecol.* 1996; 175 (1): 85-89.
- Maruo, T., Ishihara, N., Samoto, T., Murakoshi, H., Laoag-Fernandez, J. B., & Matsuo, H. Regulation of human trophoblast proliferation and apoptosis during pregnancy. *Early Pregnancy.* 2001; 5 (1): 28-29.
- Mastorakos, G., & Ilias, I. Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci.* 2003; 997: 136-149.
- Matsuoka, S., Edwards, M. C., Bai, C., Parker, S., Zhang, P., Baldini, A., . . . Elledge, S. J. P57kip2, a structurally distinct member of the p21cip1 cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev.* 1995; 9 (6): 650-662.

- Meas, T. Fetal origins of insulin resistance and the metabolic syndrome: A key role for adipose tissue? *Diabetes Metab.* 2010; 36 (1): 11-20.
- Nakayama, K., & Nakayama, K. Cip/kip cyclin-dependent kinase inhibitors: Brakes of the cell cycle engine during development. *Bioessays.* 1998; 20 (12): 1020-1029.
- Napso, T., Yong, H. E. J., Lopez-Tello, J., & Sferruzzi-Perri, A. N. The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. *Front Physiol.* 2018; 9: 1091.
- Nelissen, E. C., Dumoulin, J. C., Busato, F., Ponger, L., Eijssen, L. M., Evers, J. L., . . . van Montfoort, A. P. Altered gene expression in human placentas after ivf/icsi. *Hum Reprod.* 2014; 29 (12): 2821-2831.
- Ozgur, K., Bulut, H., Berkkanoglu, M., Humaidan, P., & Coetzee, K. Frozen embryo transfer can be performed in the cycle immediately following the freeze-all cycle. *J Assist Reprod Genet.* 2018; 35 (1): 135-142.
- Ozmen, A., Kipmen-Korgun, D., Isenlik, B. S., Erman, M., Sakinci, M., Berkkanoglu, M., . . . Korgun, E. T. Does fresh or frozen embryo transfer affect imprinted gene expressions in human term placenta? *Acta Histochem.* 2021; 123 (3): 151694.
- Padhee, M., Zhang, S., Lie, S., Wang, K. C., Botting, K. J., McMillen, I. C., . . . Morrison, J. L. The periconceptional environment and cardiovascular disease: Does in vitro embryo culture and transfer influence cardiovascular development and health? *Nutrients.* 2015; 7 (3): 1378-1425.
- Pelkonen, S., Koivunen, R., Gissler, M., Nuojua-Huttunen, S., Suikkari, A. M., Hyden-Granskog, C., . . . Hartikainen, A. L. Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer: The finnish cohort study 1995-2006. *Hum Reprod.* 2010; 25 (4): 914-923.
- Pinborg, A., Loft, A., Aaris Henningsen, A. K., Rasmussen, S., & Andersen, A. N. Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement: The danish national cohort study 1995-2006. *Fertil Steril.* 2010; 94 (4): 1320-1327.
- Romundstad, L. B., Romundstad, P. R., Sunde, A., von Düring, V., Skjaerven, R., & Vatten, L. J. Increased risk of placenta previa in pregnancies following ivf/icsi; a comparison of art and non-art pregnancies in the same mother. *Hum Reprod.* 2006; 21 (9): 2353-2358.
- Roque, M., Haahr, T., Geber, S., Esteves, S. C., & Humaidan, P. Fresh versus elective frozen embryo transfer in ivf/icsi cycles: A systematic review and meta-analysis of reproductive outcomes. *Hum Reprod Update.* 2019; 25 (1): 2-14.
- Roque, M., Lattes, K., Serra, S., Sola, I., Geber, S., Carreras, R., & Checa, M. A. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2013; 99 (1): 156-162.
- Santos-Ribeiro, S., Polyzos, N. P., Lan, V. T., Siffain, J., Mackens, S., Van Landuyt, L., . . . Blockeel, C. The effect of an immediate frozen embryo transfer following a freeze-all protocol: A retrospective analysis from two centres. *Hum Reprod.* 2016; 31 (11): 2541-2548.
- Schieve, L. A., Meikle, S. F., Ferre, C., Peterson, H. B., Jeng, G., & Wilcox, L. S. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Med.* 2002; 346 (10): 731-737.
- Shapiro, B. S., Daneshmand, S. T., Garner, F. C., Aguirre, M., Hudson, C., & Thomas, S. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: A prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril.* 2011; 96 (2): 344-348.
- Shapiro, B. S., Daneshmand, S. T., Restrepo, H., Garner, F. C., Aguirre, M., & Hudson, C. Matched-cohort comparison of single-embryo transfers in fresh and frozen-thawed embryo transfer cycles. *Fertil Steril.* 2013; 99 (2): 389-392.
- Sherr, C. J. Mammalian g1 cyclins. *Cell.* 1993; 73 (6): 1059-1065.
- Sherr, C. J. G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell.* 1994; 79 (4): 551-555.

- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. Inhibitors of mammalian g1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev.* 1995; 9 (10): 1149-1163.
- Sherr, C. J., & Roberts, J. M. Cdk inhibitors: Positive and negative regulators of g1-phase progression. *Genes Dev.* 1999; 13 (12): 1501-1512.
- Shevell, T., Malone, F. D., Vidaver, J., Porter, T. F., Luthy, D. A., Comstock, C. H., . . . D'Alton, M. E. Assisted reproductive technology and pregnancy outcome. *Obstet Gynecol.* 2005; 106 (5 Pt 1): 1039-1045.
- Smith, S. C., Price, E., Hewitt, M. J., Symonds, E. M., & Baker, P. N. Cellular proliferation in the placenta in normal human pregnancy and pregnancy complicated by intrauterine growth restriction. *J Soc Gynecol Investig.* 1998; 5 (6): 317-323.
- Steuerwald, N. M., Bermudez, M. G., Wells, D., Munne, S., & Cohen, J. Maternal age-related differential global expression profiles observed in human oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14 (6): 700-708.
- Szamatowicz, M. Assisted reproductive technology in reproductive medicine - possibilities and limitations. *Ginekol Pol.* 2016; 87 (12): 820-823.
- Tan, S. L., Doyle, P., Campbell, S., Beral, V., Rizk, B., Brinsden, P., . . . Edwards, R. G. Obstetric outcome of in vitro fertilization pregnancies compared with normally conceived pregnancies. *Am J Obstet Gynecol.* 1992; 167 (3): 778-784.
- Teasdale, F. Histomorphometry of the human placenta in maternal preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol.* 1985; 152 (1): 25-31.
- Trounson, A., & Mohr, L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature.* 1983; 305 (5936): 707-709.
- Unek, G., Ozmen, A., Mendilcioglu, I., Simsek, M., & Korgun, E. T. The expression of cell cycle related proteins pcna, ki67, p27 and p57 in normal and preeclamptic human placentas. *Tissue Cell.* 2014a; 46 (3): 198-205.
- Unek, G., Ozmen, A., Mendilcioglu, I., Simsek, M., & Korgun, E. T. Immunohistochemical distribution of cell cycle proteins p27, p57, cyclin d3, pcna and ki67 in normal and diabetic human placentas. *J Mol Histol.* 2014b; 45 (1): 21-34.
- Velegrakis, A., Sfakiotaki, M., & Sifakis, S. Human placental growth hormone in normal and abnormal fetal growth. *Biomed Rep.* 2017; 7 (2): 115-122.
- Ventura-Junca, P., Irarrazaval, I., Rolle, A. J., Gutierrez, J. I., Moreno, R. D., & Santos, M. J. In vitro fertilization (ivf) in mammals: Epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for ivf in humans. *Biol Res.* 2015; 48: 68.
- Verlaenen, H., Cammu, H., Derde, M. P., & Amy, J. J. Singleton pregnancy after in vitro fertilization: Expectations and outcome. *Obstet Gynecol.* 1995; 86 (6): 906-910.
- Wang, A., Santistevan, A., Hunter Cohn, K., Copperman, A., Nulsen, J., Miller, B. T., . . . Yurttas Beim, P. Freeze-only versus fresh embryo transfer in a multicenter matched cohort study: Contribution of progesterone and maternal age to success rates. *Fertil Steril.* 2017; 108 (2): 254-261 e254.
- Wang, E. T., Kathiresan, A. S. Q., Bresee, C., Greene, N., Alexander, C., & Pisarska, M. D. Abnormal implantation after fresh and frozen in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2017; 107 (5): 1153-1158.
- Wennerholm, U. B., Henningsen, A. K., Romundstad, L. B., Bergh, C., Pinborg, A., Skjaerven, R., . . . Tiitinen, A. Perinatal outcomes of children born after frozen-thawed embryo transfer: A nordic cohort study from the conartas group. *Hum Reprod.* 2013; 28 (9): 2545-2553.
- Wigglesworth, J. S. The langhans layer in late pregnancy: A histological study of normal and abnormal cases. *J Obstet Gynaecol Br Emp.* 1962; 69: 355-365.
- Xiu, M., Kim, J., Sampson, E., Huang, C. Y., Davis, R. J., Paulson, K. E., & Yee, A. S. The transcriptional repressor hbp1 is a target of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cell cycle regulation. *Mol Cell Biol.* 2003; 23 (23): 8890-8901.

- Zavitz, K. H., & Zipursky, S. L. Controlling cell proliferation in differentiating tissues: Genetic analysis of negative regulators of $G_1 \rightarrow S$ -phase progression. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997; 9 (6): 773-781.
- Zeilmaker, G. H., Alberda, A. T., van Gent, I., Rijkmans, C. M., & Drogendijk, A. C. Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil Steril*. 1984; 42 (2): 293-296.
- Zhang, B., Wei, D., Legro, R. S., Shi, Y., Li, J., Zhang, L., . . . Chen, Z. J. Obstetric complications after frozen versus fresh embryo transfer in women with polycystic ovary syndrome: Results from a randomized trial. *Fertil Steril*. 2018; 109 (2): 324-329.
- Zhang, Y., Cui, Y., Zhou, Z., Sha, J., Li, Y., & Liu, J. Altered global gene expressions of human placentae subjected to assisted reproductive technology treatments. *Placenta*. 2010; 31 (4): 251-258.
- Zhang, Y., Zhang, Y. L., Feng, C., Wu, Y. T., Liu, A. X., Sheng, J. Z., . . . Huang, H. F. Comparative proteomic analysis of human placenta derived from assisted reproductive technology. *Proteomics*. 2008; 8 (20): 4344-4356.
- Zhang, Y., Zhao, W., Jiang, Y., Zhang, R., Wang, J., Li, C., . . . Wang, L. Ultrastructural study on human placentae from women subjected to assisted reproductive technology treatments. *Biol Reprod*. 2011; 85 (3): 635-642.
- Zhao, J., Yan, Y., Huang, X., & Li, Y. Do the children born after assisted reproductive technology have an increased risk of birth defects? A systematic review and meta-analysis. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2020; 33 (2): 322-333.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gizem	Uyruğu	T.C.
Soyadı	KORKMAZ	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Aldemir Atilla Konuk Anadolu Lisesi	2013
Lisans	Orta Doğu Teknik Üniversitesi	2018
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2021
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	82,5

Yayınlar ve Bildiriler:

Poster sunumu, Elektron Mikroskopi Kongresi. 24-26 Nisan. “YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ KULLANILARAK GERÇEKLEŞEN GEBELİKLERİN PLASENTALARINDA P57, SIKLIN D3 PROTEİNLERİNİN İMMUNOHISTOKİMYASAL DAĞILIMLARI”.

Molbay, M., et al., Human Trophoblast Progenitor Cells Express and Release Angiogenic Factors. Int J Mol Cell Med, 2018. 7(4): p. 203-211

“Mezenkimal Kök Hücreler ve İmmünomodülasyon Fonksiyonları”, Akdeniz Medical Journal. Cebeci, E., Yanik, T., Çetindağ, E., Yanar, K., Korkmaz, G., Korgun, E. 2020.