

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

**NORMAL VE *IN VİTRO* FERTİLİZASYON SONUCU
GERÇEKLEŞEN GEBELİKLERİN
PLASENTALARINDA VASKÜLOGENEZ VE
ANJİYOGENEZ MEKANİZMALARININ
İNCELENMESİ**

Emre ÇETİNDAG

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

Emre ÇETİNDAG

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

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

NORMAL VE *IN VITRO* FERTİLİZASYON SONUCU
GERÇEKLEŞEN GEBELİKLERİN
PLASENTALARINDA VASKÜLOGENEZ VE
ANJİYOGENEZ MEKANİZMALARININ
İNCELENMESİ

Emre ÇETİNDAG

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. Gökhan AKKOYUNLU
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Filiz TEPEKÖY
Altınbaş 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.

Emre ÇETİNDAG

İmza

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,

Eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen çok kıymetli anneme, babama, kardeşlerime, Mehmet & Emine BOZOĞLU'na, Seyfettin & Gülşen ÇETİNDAG'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 (Türkan YANIK, Erhan CEBECİ, Gizem KORKMAZ, Kerem YANAR, Selin KISAR, Rıza Can ÇAKMAKÇI, Ezgi AKAN ve Mehmet DOĞAN),

Yardımlarından dolayı Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm değerli çalışanlarına, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Bu projede taze embriyo transferi ve dondurulmuş embriyo transferi sonucu oluşan gebeliklerden elde edilen term plasentalarda, anjiyogenez faktörlerinden VEGF, VEGFR-2, CD34 proteinlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Normal gebelik, *in vitro* fertilizasyon sonucu gerçekleşen gebeliklerde doğum sonrası elde edilen plasentalar toplanıp gruplandırıldı. Plasentaların bir kısmı rutin ışık mikroskopi takibi yapılarak histolojik kesitler alındı. Bu kesitlere immünohistokimyasal boyama uygulandı ve araştırılan proteinlerin lokalizasyonu belirlendi. Dokuların diğer kısmıyla Western Blot deneyleri için gerekli protokoller gerçekleştirildi. İstatistiksel analizler yapıldı.

Bulgular: VEGF protein miktarı için kontrol gurubu, DETP gurubu ve TETP grupları arasında istatistiksel olarak bir fark yoktu. VEGFR2 protein miktarının DETP grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu tespit edildi. CD34 protein miktarı ise Kontrol gurubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu belirlendi. Yapılan immünohistokimyasal deneyler sonucunda VEGF, VEGFR2 ve CD 34 proteinlerin immuno lokalizasyonları, tüm gruplarda fakat farklı yoğunluklarda sitotrofoblast hücrelerinde, sinsisyotrofoblast hücrelerinde, villus stromal hücrelerde, villüs endotel hücrelerinde immuno pozitif reaksiyon gösterdiği tespit edildi.

Sonuç: Bulgularımız sonucunda araştırmış olduğumuz VEGF, VEGFR2, CD34 proteinlerinin tümünde DETP grubu ekspresyon miktarları TETP grubuna kıyasla daha yüksektir.

Anahtar Kelimeler: yardımcı üreme teknikleri, *in vitro* fertilizasyon, plasenta, dondurulmuş embriyo transferi, taze embriyo transferi.

ABSTRACT

Objective: In this project, it was aimed to investigate the angiogenesis factors VEGF, VEGFR-2, CD34 proteins in term placentas obtained from pregnancies resulting from fresh embryo transfer and frozen embryo transfer.

Method: The placentas obtained after delivery in pregnancies resulting from normal pregnancy and *in vitro* fertilization were collected and grouped. Some of the placentas were followed by routine light microscopy and histological sections were taken. Immunohistochemical staining was applied to these sections and the localization of the investigated proteins was determined. Necessary protocols for Western Blot experiments were performed with the other part of the tissues. Statistical analyzes were performed.

Results: There was no statistical difference between the control group, DETP group and TETP group for VEGF protein amount. It was determined that the amount of VEGFR2 protein was statistically higher in the DETP group than the other groups. The amount of CD34 protein was found to be statistically higher in the control group than the other groups. As a result of immunohistochemical experiments, expression for VEGF protein was observed in syncytiotrophoblast, cytotrophoblast, villus vascular endothelial cells and stromal cells in all groups except villus stromal cells of TETP group. Expression of VEGFR2 protein was observed in syncytiotrophoblast, cytotrophoblast, villus vascular endothelial cells and stromal cells in all groups except cytotrophoblast cells of control group and syncytiotrophoblast of DETP group. For CD34 protein, expression was observed in syncytiotrophoblast, cytotrophoblast, villus vascular endothelial cells and stromal cells in all groups except the villus stromal cells and syncytiotrophoblast of control group.

Conclusion: As a result of our findings, the expression amounts of the DETP group are higher in all of the VEGF, VEGFR2, CD34 proteins that we have investigated compared to the TETP group.

Key words: assisted reproduction techniques, *in vitro* fertilization, placenta, frozen embryo transfer, fresh embryo transfer.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Yardımcı Üreme Teknikleri ve <i>In Vitro</i> Fertilizasyon	4
2.2. Süperovulasyonun Embriyonal ve Plasental Gelişime Etkisi	8
2.3. Plasental Vaskülogenez ve Anjiyogenez	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Denekler	16
3.2. Deney Grupları	16
3.3. Yardımcı Üreme Teknikleri	16
3.4. Plasentaların Toplanması	19
3.5. Doku Takibi	19
3.5.1. Protokol	19
3.6. İmmünohistokimya	19
3.6.1. Kullanılan Solüsyonlar	19
3.6.2. Protokol	20
3.7. Western Blot	21
3.7.1. Numunelerin Hazırlanması ve Lowry Deneyi	21
Kullanılan Solüsyonlar	21
Protokol	22
	iii

3.7.2 Western Blot Deneyi	23
Kullanılan Solüsyonlar	23
Protokol	24
3.8 İstatistiksel Analizler	25
4. BULGULAR	27
4.1 İmmünohistokimyasal Deney Sonuçları	27
4.1.1 VEGF İmmünohistokimya Boyanmaları	27
4.1.2 VEGFR2 İmmünohistokimya Boyanmaları	29
4.1.3 CD34 İmmünohistokimya Boyanmaları	30
4.2 Western Blot	33
4.2.1 VEGF	33
4.2.2 VEGFR2	35
4.2.3 CD34	37
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	57

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1 Imudia ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada elde edilen bulgular	7
Tablo 3.1 Deney grupları tablosu	16
Tablo 3.2 Toplanan plasentalar ile ilgili bilgiler	18
Tablo 4.1 İmmünohistokimyasal boyanma sonuçları	32



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. VEGF reseptörleri	12
Şekil 2.2 VEGF ve VEGF reseptör sistemi.	13
Şekil 2.3. Vaskülogenez ve anjiyogenez.	14
Şekil 4.1 Deney ve kontrol gruplarında VEGF immünohistokimyasal boyanmaları	28
Şekil 4.2 Deney ve kontrol gruplarında VEGFR2 immünohistokimyasal boyanmaları	30
Şekil 4.3 Deney ve kontrol gruplarında CD34 immünohistokimyasal boyanmaları	32
Şekil 4.4 Western blot VEGF sonuçları	35
Şekil 4.5 Western blot VEGFR2 sonuçları	37
Şekil 4.6 Western blot CD34 sonuçları	39

SİMGELER ve KISALTMALAR

AEC	: Amino-Etil Karbazol
CO²	: Karbondioksit
DET	: Dondurulmuş Embriyo Transferi
E2	: Östrojen
FGF2	: Fibroblastik Büyüme Faktörü 2
GnRH	: Gonodotropin Salgılatıcı Hormon
HMG	: İnsan Menapozal Hormon
HRP	: Yabanturpu peroksidaz
HRT	: Hormon Replasman Tedavisi
ICM	: İç Hücre Kitlesi
ICSI	: İntra-stoplazmik Sperm Enjeksiyonu
Ig-G	: İmmünoglobulin-G
IUGR	: İntrauterin Büyüme Geriliği
İVF	: <i>İn Vitro</i> Fertilizasyon
KOS	: Kontrollü Ovaryan Stimülatör
O²	: Oksijen
OCP	: Oral Kontraseptif Hap
OPU	: Oosit Toplama
P	: Progesteron
PBS	: Fosfat-Salin Tamponu
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDGF	: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
PE	: Preeklampsi
PIGF	: Plasental Büyüme Faktörü
PIGF2	: Plasental Büyüme Faktörü 2
rFSH	: Rekombine Folikül Stimüle Edici Hormon
srVEGF	: Suda Çözünmüş Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü
sVEGFR1	: Suda Çözünmüş Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü1
sVEGFR2	: Suda Çözünmüş Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü2
sVEGFR3	: Suda Çözünmüş Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü3
TBS-T	: Tween-20 ilaveli Tris-salin Tamponu

TE	: Trofoektoderm
TET	: Taze Embriyo Transferi
TGF-β	: Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
Tie2	: Anjiyopeitin Reseptör 2
TVUS	: Transvajinal Ultrason Taraması
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VEGF-A	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü A
VEGF-B	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü B
VEGF-C	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü C
VEGF-D	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü D
VEGF-E	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü E
VEGFR1	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü 1
VEGFR2	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü 2
VEGFR3	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü 3
vWF	: vonWillebrand Faktör
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri
βhCG	: Beta-İnsan Koryonik Gonodotropin Hormonu

1. GİRİŞ

In vitro fertilizasyon (İVF) ile oluşan ilk çocuğun doğumundan geçen 40 yıldan bu yana, yardımcı üreme teknikleri ile infertilite sorununa çözüm getirilmeye çalışılmıştır. Günümüzde tüm Kuzey Amerika ve Avrupa'daki canlı doğumların %1 ila %3'ü İVF ile gerçekleşmektedir. Yardımcı üreme teknikleri (YÜT) yoluyla gerçekleşen gebeliklerde plasentaların fonksiyonlarını normal şekilde gerçekleştirebilmesi için vaskülogenez ve anjiyogenez mekanizmasının bilinmesi yararlı olacaktır.

İVF için gerekli çok sayıda oosit elde edilmesini maternal süperovulasyon işlemi sağlar. İVF işlemleri ile elde edilen oositlerin spermiler aracılığıyla fertilizasyonu sonucunda embriyolar elde edilir. Elde edilen embriyoların hemen transferi (taze embriyo transferi) annede süperovulasyona bağlı olarak oluşan maternal hormonal dengenin bozulmuş olmasının etkisi altında kalarak endometriyuma implantasyonunda başarısızlıklara neden olabilir. Süperovulasyondan kaynaklanan maternal hormonal etkiyi azaltmak amacıyla son dönemde taze embriyo transferi yerine embriyolar dondurularak transfer edilir (dondurulmuş embriyo transferi). Dondurulmuş embriyoların, maternal hormonal dengeye ulaşıncaya kadar bekletilip daha sonra çözülerek transferinin gerçekleştirilmesi annenin süperovulasyon kaynaklı hormonal etkiye maruz kalma olasılığını yok eder.

Plasenta fetüsün büyümesi için gerekli olan tüm besinlerin tedariğini sağlayan maternofetal bir dokudur. Plasentanın maternofetal dolaşımı sağlayabilmesi için plasentada vaskülogenez / anjiyogenez olaylarının normal olarak gerçekleşmesi gerekir. Vaskülogenez, öncü anjiyoblast hücrelerinden, birincil vasküler ağın formasyonu ile yeni kan damarlarının oluşturulmasıdır. Anjiyogenez ise, yeni vasküler ağdan dallanmaların sağlanması ile vasküler ağın tekrar modellenmesidir. Vaskülogenez ve anjiyogenez bu özellikleri sayesinde embriyonik gelişimde ve post-natal büyümede önemli rol oynarlar. Vaskülogenez ve anjiyogenezdeki problemler düşük riski, preeklampsi ve intrauterin büyüme geriliği gibi plasental patolojilere neden olur. Normal gebelikteki plasentalarda vaskülogenez ve anjiyogenez

mekanizmaları literatürde sıkça araştırılmasına karşın, İVF 'de bu mekanizmaların regülasyonu hakkında sınırlı sayıda çalışma yapılmıştır.

Bu tezin hipotezi; Yardımcı üreme teknikleri aracılığıyla gerçekleşen gebeliklerin plasentaları ile normal gebelik plasentalarındaki anjiyogenez mekanizmaları farklılık gösterebilir.

Araştırma sorusu: YÜT sonucu gerçekleşen gebelikler ve normal gebelik sonucunda gelişen plasentalarda anjiyogenezle ilişkili proteinlerin rollerinde bir farklılık mevcut mudur? Süperovulasyon sonucu olarak maternal hormonal dengenin bozulması ve daha sonra tekrardan maternal hormonal dengenin sağlanmasıyla plasentalarda gerçekleşen anjiyogenez olayında anjiyogenez ile ilişkili proteinlerin rollerinde bir değişim mevcut mudur? YÜT ile gerçekleşen gebeliklerde plasental anjiyogenez mekanizması ile ilişkili olarak plasental gelişim nasıl etkilenir?

İVF işleminde çok sayıda oosit elde etmek için yapılan süperovulasyon işlemi sonucunda maternal hormonal denge bozulur. Elde edilen oosit ve sperm fertilizasyonu sonucu elde edilen embriyonun maternal hormonal dengenin normale dönmeden, yani taze embriyo transferi sonucu oluşan gebeliklerdeki plasentalarda anjiyogenez mekanizması embriyo gelişimini belirler. Bu nedenle embriyo gelişimi için maternal denge düzelmeden (TET) ya da düzeldiğinde gerçekleşen embriyo transferleri (DETP) sonucu oluşan plasentalardaki anjiyogenez mekanizmasının karşılaştırılması önemlidir.

Tezin amaçları:

Normal, plasental anjiyogenez mekanizmasında VEGF, VEGFR2 ve CD34 proteinlerinin rollerinin araştırılması.

Süperovulasyonun TETP grubunda gerçekleşen anjiyogenez mekanizması üzerindeki etkisinin VEGF, VEGFR2 ve CD34 proteinleri üzerinden araştırılması.

DETP, grubu plasentalarının anjiyogenez mekanizmalarında VEGF, VEGFR2 ve CD34 proteinlerinin rollerinin araştırılması.

2. GENEL BİLGİLER

İnfertilite, toplumumuzun önemli problemlerinden biridir. Bu problem yardımcı üreme teknikleri (YÜT) aracılığıyla çözülmeye çalışılmaktadır. YÜT başarı oranı hiç de küçümsenecek bir düzeyde değildir. Bu nedenle ülkemizde çok sayıda YÜT merkezi bulunmakta ve yılda binlerce hasta başvuru yapmaktadır. *In Vitro* Fertilizasyonda gerçekleşen süperovulasyon işlemi annede hormonal dengeyi bozmaktadır. İVF’de gerçekleşen; süperovülasyonun, embriyo kültürünün; fetal ve plasental gelişimde değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (Weinerman ve Mainigi, 2014). Süperovulasyonun anne üzerindeki hormonal etkisini azaltmak amacıyla son yıllarda taze embriyo transferi yerine dondurulmuş embriyo transferi gerçekleştirilmektedir (Velea ve ark., 2013; Maheshwari ve ark., 2018). 2004 yılında, YÜT sonrası doğan çocukların %30’u kriyoprezerve (dondurulmuş) embriyolardan meydana gelmiş olması bu durumu kanıtlar niteliktedir (Spijkers ve ark., 2017). Son veriler; dondurulmuş embriyo transferlerinde canlı doğum oranının, taze embriyo transferi ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğunu göstermektedir (Stanhiser ve ark., 2017; J. Zhang ve ark., 2018). YÜT ile gerçekleşen gebeliklerde plasentadaki vaskülogenez ve anjiyogenez çalışmaları yapılmıştır. Genel olarak bu çalışmalar sonucunda anjiyogenik faktörlerden VEGFR3, bFGF, IFN- γ ve MMP1’in kontrol plasentalara kıyasla İVF grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığına dair bulgular elde edilmiştir (Li ve ark., 2016). Bunun yanı sıra yapılan bir diğer çalışmada İVF gruplarında anti-anjiyogenik faktörlerden sFLT-1’in kontrol grubuna kıyasla arttığı, İVF gruplarında anjiyogenik faktörlerden PlGF’nin ise kontrol grubuna kıyasla azaldığı bulunmuştur (M. S. Lee ve ark., 2015b). YÜT ile gerçekleşen gebeliklerdeki plasenta ve embriyo gelişiminde etkili olan mekanizmaların araştırılmasına rağmen taze ve dondurulmuş embriyo transferi sonucunda gerçekleşen gebeliklerde plasentada gerçekleşen vaskülogenez ve anjiyogenez mekanizması hakkında bilinenler sınırlıdır. Bu nedenle çalışmamızın önemini oluşturan unsurları şu şekilde sıralayabiliriz.

Konunun önemi:

1- İnfertilite tedavisi için günümüzde her iki tekniğin (TET ve DET) yaygın olarak kullanılması.

2- Bu iki teknikte (TET ve DET) anjiyogeneze bağlı olarak plasental gelişim ve dolayısıyla fetüs gelişimi için hangi tekniğin ideal olduğunun bilinmemesi.

3- YÜT kullanılan bu iki yöntemle gerçekleşen gebeliklerdeki plasentalarda anjiyogeneze mekanizmasının bilinmemesi

4- Günümüzde DET’de canlı doğum ve gebelik başarı oranı daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Stanhiser ve ark., 2017; J. Zhang ve ark., 2018). DET ile gerçekleşen bu başarıda plasentadaki anjiyogeneze mekanizmasının olası rolünün açıklanması

2.1. Yardımcı Üreme Teknikleri ve *In Vitro* Fertilizasyon

In vitro fertilizasyon ile oluşan ilk çocuğun doğumundan geçen 40 yıldan bu yana, yardımcı üreme teknolojilerine olan güven oldukça artmış ve artık tüm Kuzey Amerika ve Avrupa’daki canlı doğumların %1 ila %3’ü YÜT aracılığıyla gerçekleşmektedir (Nyboe Andersen ve ark., 2008; Sunderam ve ark., 2015). Bu istatistik bize YÜT tekniklerine ne kadar sıkça başvurulduğunu göstermektedir. IVF; oositlerin toplanıp, spermiler ile laboratuvar ortamında birleştirilerek fertilizasyonun sağlanması işlemlerini içerir. Devamında fertilizasyon sonucu gelişen embriyolar uterusu transfer edilir. Ayrıca intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu ve embriyo kriyoprezervasyonu gibi yöntemler yardımcı üreme teknolojisinde son yıllarda infertilite tedavisinde daha yoğun olarak kullanılmaktadır. Yardımcı üreme teknikleri gerek klinikteki rutin işleyişi gerekse tarihsel gelişimi sayesinde ön plana çıkan teknikler arasındadır. Dünya çapında 4,5 milyon bebek bu teknik sayesinde dünyaya gelmiştir (O. Ishihara ve ark., 2015).

İnfertilite, fertil dönemdeki toplumun %10-15’ini ilgilendiren bir sorundur. Günümüzde infertil hastaların tedavisinde önemli gelişmeler elde edilmiştir. Özellikle yardımcı üreme tekniklerinin gelişmesiyle infertilite tedavisindeki başarı oranları artmış ve daha çok infertil çiftin sağlıklı bir bebeğe sahip olabilmesi sağlanmıştır. 1970’lerin sonunda ilk başarılı *in vitro* fertilizasyon gerçekleştirildiğinden beri, 2 milyondan fazla çocuk İVF ile dünyaya geldi. Çocukların büyük çoğunluğu için bu tekniğin başarılı ve güvenli olduğu kanıtlanmıştır (Wang ve Sauer, 2006). YÜT ile başarı oranları arttıkça, dikkatler doğum sonuçlarına ve YÜT ile doğan çocukların uzun vadeli sağlık durumlarının takibine yönelmiştir (Hart ve Norman, 2013b, 2013a). YÜT ile doğan çocukların büyük çoğunluğu sağlıklı olmasına rağmen, epidemiyolojik çalışmalar, YÜT’ün fetal büyüme geriliği, düşük doğum ağırlığı, anormal plasenta,

erken doğum ve preeklampsi gibi olumsuz perinatal sonuçlarda artışla ilişkili olduğunu göstermektedir (Schieve ve ark., 2002; Jackson ve ark., 2004). YÜT'ün birçok yönden embriyo gelişimini ve büyümesini etkilediği gösterilmiştir (Grafodatskaya ve ark., 2013; Bloise ve ark., 2014; Duranthon ve Chavatte-Palmer, 2018). İVF, implantasyon ve gelişim potansiyeline sahip embriyonun oluşturulması için klinik ve laboratuvar girişimlerinden yararlanır. Her basamağı her aşamayı tek tek incelemek, bu basamakların embriyo gelişimine katkısını ya da varsa olumsuz perinatal sonuçları değerlendirmek için önemlidir. YÜT de kullanılan girişimlerden / basamaklardan biri gonadotropinler ile süperovülasyondur. Süperovülasyon, *in vitro* fertilizasyonun ayrılmaz bir parçasıdır. Çünkü kontrollü ovaryan hiperstimülasyon, fertilizasyon ve embriyo gelişimi için birden fazla oositin elde edilmesini sağlar. Fare çalışmalarında; süperovülasyonun, İVF'nin 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 (Irrázaval ve ark., 2015; Jiang ve ark., 2017). Gonadotropin uygulaması ile gelişmekte olan folikül sayısında ve serum östradiol oranında artış (normal siklusun 10 katı kadar) meydana gelir. Süperovülasyon; oosit gelişimi sırasında ve embriyo transferinden sonra Östrojen (E2), Progesteron (P) ve vasküler endotelial büyüme faktörlerinin seviyesini arttırmaktadır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada serum östradiol seviyelerinin optimal düzeyde olması ile İVF başarısı arasında korelasyon olduğu bulunmuştur ve yüksek östradiol seviyelerinin gebelik ve doğum oranlarını düşürdüğü gözlenmiştir (Bu ve ark., 2015). İVF esnasında, süperovülasyon ve hCG uygulamasının olduğu günde yüksek östradiol seviyelerinin görülmesi IUGR ve gebeliğin hipertansif aksaklıkları gibi plasantasyon bozuklukları ile ilişkilidir (Farhi ve ark., 2010; Imudia ve ark., 2012). Süperovülasyon; oosit, endometriyum ve implante olan embriyoda ayrıca plasentada birçok değişiklik oluşturma potansiyeline sahip olabilir. Bu etkilerin olumsuz sonuçları tam olarak bilinmemektedir. YÜT'ün hangi yönlerinin bu olumsuz sonuçlara neden olduğuna dair tartışmalar vardır (Ertzeid ve Storeng, 2001). Süperovülasyonun olumsuz etkilerinden biri implantasyon başarı oranında azalma olduğu kabul edilebilir. Son veriler; taze embriyo transferlerinde implantasyon başarı oranının, dondurulmuş embriyo transferi ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğunu göstermektedir (Shapiro ve ark., 2011;

Roque ve ark., 2013; Weinerman ve Mainigi, 2014). Böyle olmasına rağmen taze embriyo transferinden sonra da embriyoların belirli bir yüzdesi implante olmaktadır. Süperovülasyon sonrasında normal olmayan hormonal çevrenin, endometriyuma implante olmuş olan embriyoya etkisi ne olur? İmplantasyondan sonra oluşan plasentasyonda süperovülasyonun etkisi nedir? Bu sorular tam anlamıyla cevap bulmuş değildir. Son epidemiyolojik kanıtlar, süperovülasyon tarafından oluşturulan peri-implantasyon ortamının, YÜT ‘ün yan etkilerini arttırabileceğini ve bu etkilerin dondurulmuş embriyo transferi ile azaltılabileceğini göstermiştir (Henningsen ve ark., 2011; Kalra, Ratcliffe, Coutifaris, ve ark., 2011; Kalra, Ratcliffe, Milman, ve ark., 2011; Kato ve ark., 2012; Osamu Ishihara ve ark., 2014; Weinerman ve Mainigi, 2014). Bu değişikliklerin arkasındaki mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Süperovülasyonun, fetal ve plasental büyümeye etkisini daha iyi açıklamak için peri-implantasyon ortamını izole eden bir fare deneyi gerçekleştirilmiştir. Sıçan ya da Fare plasentası esas olarak dört kısımdan oluşur. 1- Labirent bölge 2-Bağlantı bölgesi 3-Trofoblast dev hücreleri 4- Desidua. Labirent bölge; plasental transport işleminin gerçekleştiği, maternal ve fetal kan damarlarını içeren materno/fetal dolaşımın gerçekleştiği alandır. Bağlantı bölgesi; sıçan plasentasının maternal kısmını içerir. Bu bölge fetal damar içermez, sadece maternal damarlar bulunur. Erkek ve dişi fareler çiftleştirilmiş ve 3,5. günde blastosistler toplanmıştır. Doğal gebelerden alınan blastosistler; vazoktemize erkeklerle çiftleştirilen yalancı gebelerle (kontrol grubu) ve gonadotropin uygulaması (süperovülasyon grubu) sonrası vazoktemize erkeklerle çiftleştirilerek oluşturulan yalancı gebelere transfer edilmiştir. Gebe fareler embriyonik 19.günde eks edilip plasenta ve fetüsleri toplanmıştır. Süperovüle farelerden elde edilen yavrular, kontrollere göre %25 daha düşük ağırlıkta bulunmuştur. Plasentalar da süperovüle gruplarda kontrollere göre daha küçüktür (Ertzeid ve Storeng, 2001). Aynı çalışmada histolojik olarak, besin aktarımını sağlayan labirent bölgesinde farklılıklar görülmüştür. Histolojik olarak Labirent bölgenin, kontrol grubuna göre daha çok gelişirken bağlantı bölgesinin daha az geliştiği tespit edilmiştir. Dev hücre belirteci olan *Hand1* ve bağlantı bölgesi belirteci olan *Tpbpa* genlerinde bir değişiklik gözlenmezken Labirent bölge belirteci olan *Tec* ve endotel belirteci olan *Tek* genlerinde kontrole göre süperovüle gruplarda artış tespit edilmiştir. Sonuç olarak; taze embriyo transferinin gerçekleştiği İVF sikluslarındaki süperovülasyonla oluşturulan hormonal ortamın, plasental ve fetal büyümeyi negatif

olarak etkileyebileceği düşünülmektedir (Shapiro ve ark., 2011; Roque ve ark., 2013; Weinerman ve Mainigi, 2014).

YÜT'ün birçok yönden embriyo ve plasenta gelişimini etkilediği gösterilmiştir. Rinaudo P. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmaya göre İVF sonucunda elde edilen fetüs ağırlıkları normale göre daha küçük, plasenta ağırlıkları ise daha büyüktür (Delle Piane ve ark., 2010). Kontrol gruplarına göre İVF gruplardaki fare plasentalarında apoptoz miktarında önemli bir değişiklik görülmezken proliferasyon miktarı artmıştır. Apoptoz ve proliferasyon analiziyle plasentadaki büyümenin apoptozdaki azalma ile değil de proliferasyondaki artış ile gerçekleştiği ileri sürülmektedir (Rudge ve ark., 2012). Bu çalışmaya göre İVF ve kontrol plasentalarında morfolojik olarak labirent bölge ile bağlantı bölgelerinde büyüklük açısından bir fark tespit edilememiştir. YÜT'ün; plasentada, plasenta previa artışına neden olduğu ve preeklampsi, IUGR gibi plasental bozuklukları arttırdığı belirlenmiştir. Ovaryan hiperstimülasyon sırasında; hCG verilmesiyle, artmış serum E2 seviyelerinin düşük olanlara göre tekli doğumlarda, IUGR ve Preeklampsi ile ilişkisinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada şu sonuçlar tespit edilmiştir. Yüksek serum E2 düzeylerine sahip olan gebelerin %26,9'da IUGR gözlenirken bu oran düşük serum E2 düzeylerine sahip olanlarda %3,8 tir. Yüksek serum E2 düzeylerine sahip olan gebelerin %18,5 preeklampsi gözlenirken bu oran düşük serum E2 düzeylerine sahip olanlarda %4,5'tur. Bu sonuçlara göre IUGR ve PE istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek serum E2 düzeylerine sahip olan gebelerde artmıştır (Tablo 2.1) (Imudia ve ark., 2012).

Tablo 2.1 Imudia ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada elde edilen bulgular (Imudia ve ark., 2012).

	Preeklamptik gebelikler (%)	İntrauterin büyüme geriliği görülen gebelikler (%)
Serumda E2 seviyesi kontrol grubuna göre artan gebeler	%18,5	%26,9
Serumda E2 seviyesi kontrol grubuna göre azalan gebeler	%4,5	%3,8

Diğer taraftan hayvan modellerindeki çalışmalar göstermiştir ki *in vitro* kültür, gametler ve embriyo için stresli bir ortamdır. Örneğin; farklı medyumlar ve oksijen oranlarında kültür edilen blastosistlerde, kontrol grubuna göre 981 adet genin farklı eksprese edildiği görülmüştür. Bu 981 adet genden 177 tanesindeki değişiklik miktarı ise 5 kat ve üzeri olarak bulunmuş, bunun sonucunda uzun dönemde sağlık problemleri olabileceği ileri sürülmektedir. (Giritharan ve ark., 2010; Cagnone ve Sirard, 2016). Günümüze kadar, dondurup çözme işlemi nedeniyle embriyo kayıpları olabileceği korkusu ile dondurulmuş embriyolara nazaran taze embriyo transfer için tercih ediliyordu. Ancak, vitrifikasyonun keşfi ile birlikte dondurulmuş embriyo transferlerindeki başarı oranının taze embriyo transferindeki başarı oranından daha yüksek düzeye çıktığı ortaya konmuştur (Weinerman ve Mainigi, 2014; Bradley ve ark., 2017; Wei ve ark., 2017). Vitrifikasyon, iyi klinik sonuçlar vermesine rağmen etkileri henüz tam olarak anlaşılamamış yeni bir teknolojidir. Farelerde vitrifikasyonun erken embriyo metilasyonunu etkileyebildiği gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2014; Saenz-de-Juano ve ark., 2016).

2.2 Süperovulasyonun Embriyonal ve Plasental Gelişime Etkisi

YÜT ile gerçekleşen gebeliklerde doğum oranının yüksek olmasına rağmen epidemiyolojik çalışmalar YÜT'ün fetal büyüme geriliği, düşük doğum ağırlığı, anormal plasenta gelişimi (Reynolds ve Schieve, 2006), erken doğum ve preeklampsi gibi olumsuz gebelik süreçlerinde artışa neden olabileceğini göstermektedir (Kalra, Ratcliffe, Coutifaris, ve ark., 2011; Honorato ve ark., 2017). YÜT'ün ayrılmaz bir parçası olan süperovulasyonun, İVF'nin ve embriyo kültürünün, fetal ve plasental büyümeyi etkilediği (Delle Piane ve ark., 2010; Bloise ve ark., 2012; Feuer ve ark., 2013) ve sadece neonatal morbiditeyi etkilemekle kalmayıp metabolik, genetik ve epigenetik hastalıklarla da ilişkilendirildiği gösterilmiştir (Denomme ve Mann, 2012; Eroglu ve Layman, 2012). Süperovulasyonun gerçekleşmesi için kullanılan gonadotropin, serum östradiol miktarını artırır. Süperovulasyon ayrıca progesteron ve vasküler endotelial büyüme faktörünün seviyesini de arttırmaktadır (Joo ve ark., 2010). Süperovulasyonun anne vücudunda oluşturduğu hormonal etkinin yanı sıra VEGF gibi oosit ve plasentasyonda görev alan bir faktörü de etkilemesiyle dolaylı olarak plasentasyon mekanizması etkilenir (Farhi ve ark., 2010; Imudia ve ark., 2013). Özellikle östradiyol seviyesindeki artışın gebelik ve doğum oranlarını düşürdüğü gösterilmiştir (Joo ve ark., 2010). Son epidemiyolojik kanıtlar, süperovulasyon

tarafından oluşturulan implantasyon ortamının, YÜT'ün yan etkilerini arttırabileceğini ve bu etkilerin taze embriyo transferi yerine dondurulmuş embriyo transfer ederek azaltılabileceğini göstermiştir (Henningsen ve ark., 2011; Kalra, Ratcliffe, Coutifaris, ve ark., 2011; Iwasaki ve ark., 2012; Maheshwari ve ark., 2012; Sazonova ve ark., 2013; Mansour ve ark., 2014; Cai ve ark., 2017). Bu değişikliklerin arkasındaki mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır.

2.3 Plasental Vaskülogenez ve Anjiyogenez

Plasenta, fetüsün gelişimi için gerekli olan tüm besinlerin tedarikini sağlayan maternal-fetal bir dokudur. Plasentanın materno fetal dolaşımı sağlayabilmesi için plasentada vaskülogenez ve anjiyogenez olayları eksiksiz olarak gerçekleşmelidir (Miles ve ark., 2005; Bertolini ve ark., 2006). Dolayısıyla vaskülogenez ve anjiyogenez olayları doğacak olan fetüsün sağlığıyla direkt olarak ilişkilidir. Gebelikte, plasental kan akımı önemli bir ölçüde, fetal gelişimi, fetal ağırlığı ve sağ kalımı doğrudan etkiler (Y.-M. Zheng ve ark., 2013). Plasentanın normal gelişimi de novo kan damarı sentezine işaret eden vaskülogenez ve daha önceden var olan kan damarlarının tekrar modellenmesi anlamına gelen anjiyogenez süreçlerine sıkı sıkıya bağlıdır. Plasentada zayıf vaskülarizasyon, fetal büyüme geriliğine, preeklampsi ve fetal ölümlere neden olabilmektedir (Pereira ve ark., 2015).

Vaskülogenez farklılaşmamış prekürsör angioblast–hemangioblastların, primitif endotel hücrelerine farklanıp damarları oluşturmasıdır (Werner Risau, 1997). Anjiyogenez ise önceden var olan kan damarlarından yeni kapillerlerin oluşması olarak tanımlanabilir. Vaskülogenez ve anjiyogenez bu özellikleri sayesinde embriyonik gelişimde ve postnatal büyümede önemli rol oynarlar. Vaskülogenez ve anjiyogenez mekanizmasındaki problemler preeklampsi, düşük riski ve intrauterin büyüme geriliği gibi plasental patolojilere neden olur (Li ve ark., 2016).

Plasental vasküler formasyon, hematopoeitik kök hücreleri ve vasküler öncülleri de içeren kök ve öncül hücreler sayesinde gerçekleşir (Herr ve ark., 2010). Vaskülogenez sırasında birincil kapillerler, pluripotent mezenkimal hücrelerden türeyen hemanjiyogenik kök hücrelerin in situ farklanması ile açığa çıkar. Hemanjiyogenik kök hücreler daha da farklanarak endotelial hücrelerin öncülleri olan anjiyoblastik hücreleri oluştururlar. Ayrıca bu süreçlerde insan koryonik gonadotropinin, insülin-

benzeri büyüme hormonu-II'nin ve alfa-fetoprotein'in de rol oynayabileceği belirtilmektedir (Herr ve ark., 2009).

Anjiyogenez olayı ise kapiller bölünme ve anjiyogenik tomurcuklanma olmak üzere iki yolla meydana gelmektedir (Güzel, 2015). Vaskülatür gelişimde VEGF ailesine mensup proteinlerin en önemli proteinler olduğu bilinmektedir (Ferrara, 2002). Vasküler Endotel Büyüme Faktörü, endotel hücreleri için multifonksiyonel bir büyüme faktörü ailesidir (Rosenstein ve Krum, 2004). Endotel hücresinin proliferasyonuna, migrasyonuna ve diferensiyasyonuna sebep olur (Ferrara ve Davis-Smyth, 1997). Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörleri süper ailesinin önemli bir üyesi olan VEGF ailesi VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve PlGF adı verilen altı üyeden meydana gelmektedir (Monacci ve ark., 1993; Millauer ve ark., 1994; Tamanini ve De Ambrogi, 2004). VEGF ailesine ait 6 adet reseptör mevcuttur. Bunlar; VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, sVEGFR-1, sVEGFR-2 ve sVEGFR3 olarak isimlendirilmiştir (Şekil.1) VEGF bu reseptörlere bağlanarak transfosforilasyonu başlatır ve anjiyogenez aktivasyonunu indükler. VEGFR1'in VEGF'e karşı affinitesi VEGFR2'den daha fazladır. Her ne kadar VEGFR1'in affinitesi daha fazla da olsa VEGFR2, VEGF ile bağlandıktan sonra VEGFR1'e göre tirozinle daha etkin şekilde fosforile edilir ve intraselüler sinyalizasyonu başlatır (Hiratsuka ve ark., 1998). Yapılan çalışmalar VEGFR-1 ve VEGFR-2'nin farklı sinyal özellikleri olduğunu göstermiştir. VEGFR-1 hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimlerinin kontrolü ile doku mimarisinin belirlenmesinde ve vaskülogenezde rolü olduğunu göstermiştir (Albuquerque ve ark., 2009). Bu reseptör VEGF-A, VEGF-B, srVEGF, PlGF2'nin etkilerine aracılık etmektedir. VEGFR-2 VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve srVEGF'in etkilerine aracılık ederken, VEGFR-1 ise ya yanıltıcı (decoy) olarak görev yapmakta ya da sinyalizasyonu baskılayarak negatif bir etki göstermektedir (Rosenstein ve Krum, 2004) (Şekil2).

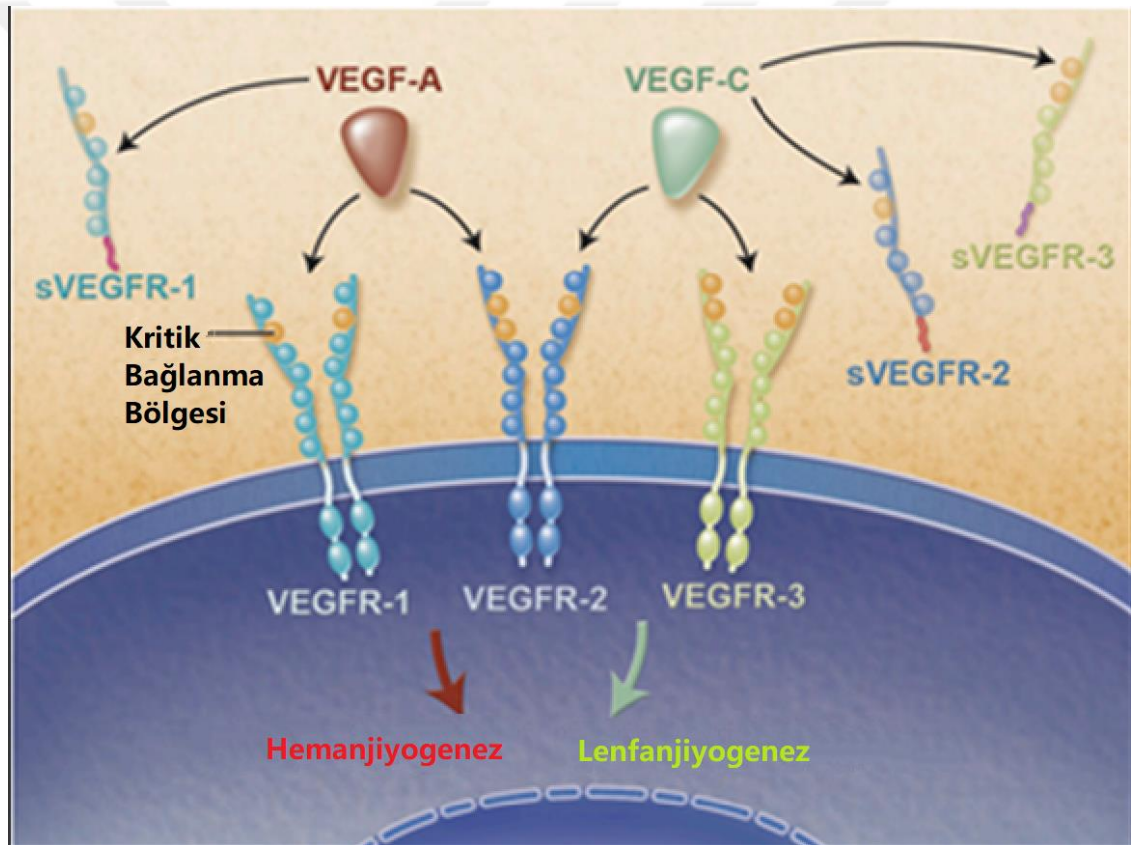
VEGF, vasküler geçirgenliği sağlamasının yanında endotel hücreleriyle ilgili olarak proliferasyon, hayatta kalma ve farklılaşma gibi süreçlerin yönetilmesi ve düzenlenmesinde de rol alan çok fonksiyonlu bir anjiyogenik faktördür (Apte ve ark., 2019). VEGF İlk olarak Senger ve arkadaşları tarafından 1983'te keşfedilmiştir ve anjiyogenezde en önemli ve en güçlü faktör olduğu kanıtlanmıştır (Senger ve ark., 1983; Melincovici ve ark., 2018). Kinaz aktivitesi en yüksek olan reseptör VEGFR1

olmasına rağmen VEGFR2'nin VEGF'e daha yüksek affinite göstermesinden dolayı VEGF en çok bu reseptöre bağlanır (Guo ve ark., 2021). VEGF'in rol oynadığı düşünülen çok çeşitli fizyolojik ve patolojik koşullar mevcuttur. Embriyo gelişimi sürecinde VEGF, embriyonik vaskülogenez ve anjiyogeneze katılır (Carmeliet ve ark., 1996; Ferrara ve ark., 1996). Ayrıca, doğum sonrası birey gelişiminde de VEGF'in vücut büyümesi ve organ gelişimindeki önemli rolünü gösteren çalışmalar vardır. VEGF endometriyum reseptivitesinde, endometriyal anjiyogenezi ve vasküler geçirgenliği destekler, (Rockwell ve ark., 2002; Fan ve ark., 2008) monosit aktivasyonunu sağlar (Barleon ve ark., 1996). Makrofajların bölgeye kemotaksisini sağlar ve aktivasyonunda görev alır (Kim ve ark., 2017; Wheeler ve ark., 2018) Yine VEGF embriyo gelişimi ile ilgili olarak perifoliküler kapiller ağ gelişimi (Pauli ve ark., 2005; Monteleone ve ark., 2008; Nishimura ve Okuda, 2020) ovaryum kanalı hareketliliğinin düzenlenmesi (Wijayagunawardane ve ark., 2005) korpus luteum tarafından hormon üretimi, ovaryum kanalı salgılarının düzenlenmesinde görev alır (Lam ve ark., 2003). VEGF, blastosist hücre sayılarını artırır (Binder ve ark., 2014; Anchordoquy ve ark., 2015). Embriyo implantasyonunda da VEGF endometriyal epitel hücrelerinin adhezyon yeteneğini geliştirir ve implantasyon oranlarını artırır (Hannan ve ark., 2011; Binder ve ark., 2014). Embriyo kaynaklı VEGF ise, implantasyon bölgesinde anjiyogenezi uyarır (Kapiteijn ve ark., 2006).

Vasküler endotel büyüme faktörü reseptörü 2, esas olarak vasküler endotelial hücrelerde eksprese edilir. Ayrıca KDR geni tarafından kodlandığı bilinen bir tip V reseptör tirozinkinazdır. Bu reseptör vasküler endotelial büyüme faktörü bağlanma sinyaline yanıt verir, bu da nükleer düzenleyici hedefleri içeren ve endotelial proliferasyon ve göçün artmasıyla sonuçlanan bir fosforilasyon başlatır (Masabumi Shibuya, 2006a). VEGFR2 proteini ayrıca KDR, Flk-1 ve CD309 olarak da isimlendirilmiştir. VEGFR-2, VEGF reseptörleri içinde en güçlü proanjiyogenik aktiviteye sahip olan reseptördür. VEGF'e bağlanma affinitesi çok yüksektir. Vasküler endotel hücrelerinde yüksek miktarda eksprese edilmektedir (Melincovici ve ark., 2018).

Farelerde yapılan çalışmalarda, VEGFR-2'nin eksik veya bozuk ekspresyonunda bu hayvanların hematopoietik prekürsörlere, farklılaşmış endotel hücrelerine ve organize kan damarlarına sahip olmadıkları görülmüştür. Bu da VEGFR-2'nin hem endotel hem

de hematopoietik öncül hücrelerin gelişimi için zorunlu olduğunu göstermiştir. Bunun aksine; VEGFR-1'in ekspresyonundaki eksikliklerde, olgun endotel hücreleri oluşabilmesine rağmen, bu damarların aşırı genişlediği ve yapısal bozukluklara sahip olduğu görülür. Böylece VEGFR-1'in hücre-hücre veya hücre-matriks etkileşimlerinin kontrolü ile doku mimarisinin belirlenmesinde rolü olduğunu gösterilmiştir (Albuquerque ve ark., 2009). VEGFR-1; VEGF-A ve PlGF'e yüksek affinite ile bağlanır ama bu aktivite sonucu iyi bir proliferasyon ve kemotaktik cevap elde edilemez. Ancak, PlGF'e bağlanmayan ama VEGF'e sıkıca bağlanan VEGFR-2 ile etkileşim sonucunda etkili bir cevap alınır (Achen ve Stacker, 1998).

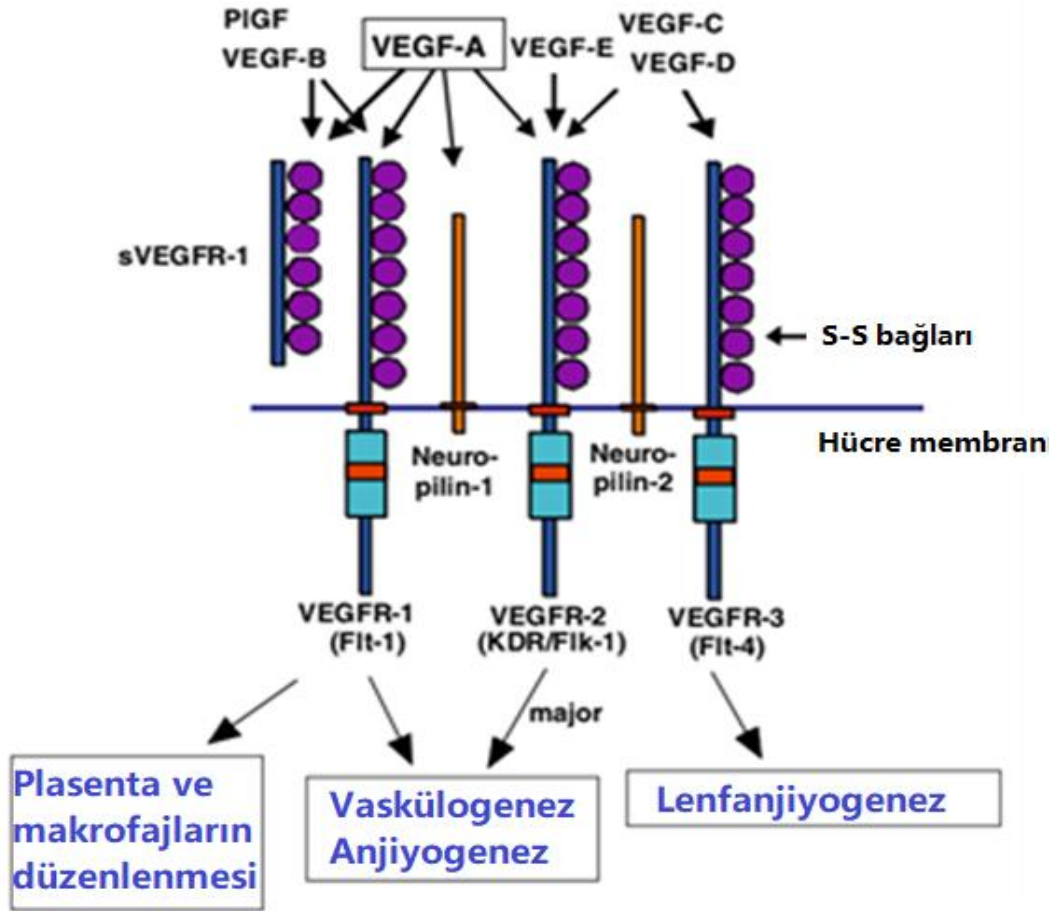


Şekil 2.1. VEGF Reseptörleri

Anjiyogenez, yeniden yapılanma ve eskilere göre yeni kan damarlarının oluşumunu içerir. Anjiyogenez, vaskülogenez tarafından başlatılan damar oluşumunu tamamlar. Her adımda yer alan başlıca parakrin faktörler diyagramda gösterilmiş ve reseptörleri (damar oluşturan hücreler üzerinde) altlarında gösterilmiştir. Vasküler endotel büyüme

faktörleri vaskülojenenez ve anjiyogenezde rol oynayan ana büyüme faktörleridir (W Risau ve ark., 1998; Ribatti, 2005) (Şekil 3.).

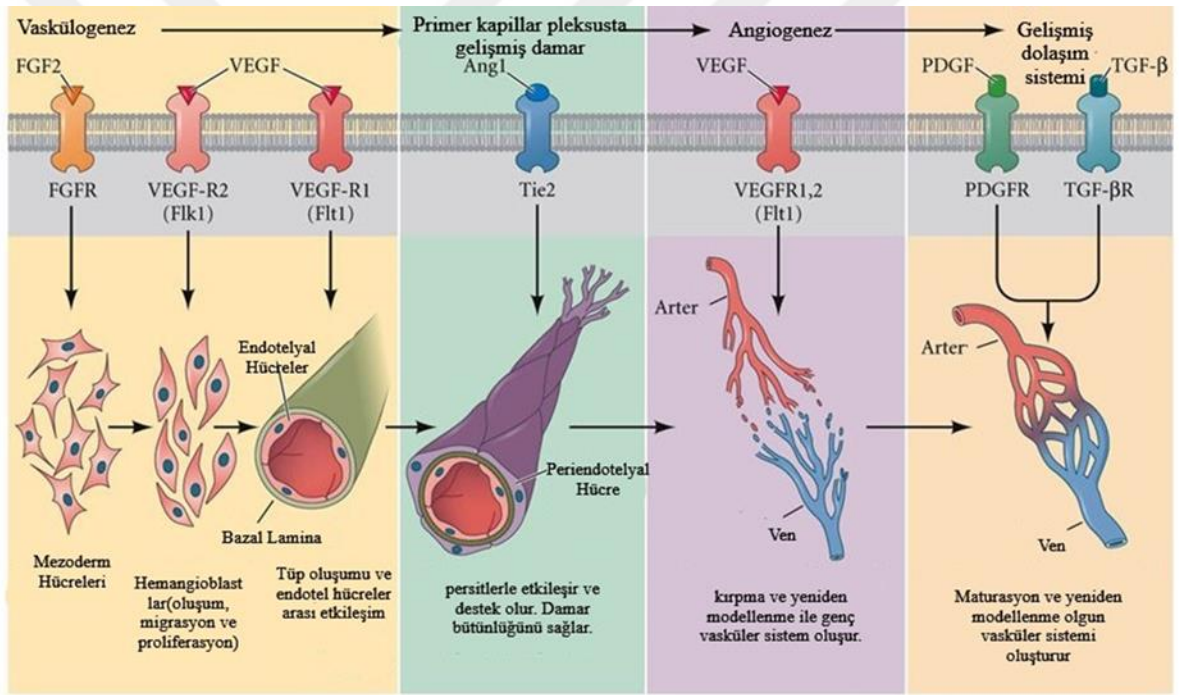
Endotel hücre mitojenleri olarak önemli rolleri vardır (Dvorak ve ark., 1995; Ferrara ve ark., 1996). İlâveten plasenta dâhil farklı dokularda eksprese edildiği gösterilmiştir (Vuorela ve ark., 1997; Celik-Ozenci ve ark., 2003; Celik-Ozenci ve ark., 2004). Bu süreçlerde yer alan diğer iyi çalışılmış faktörler; asidik ve bazik fibroblast büyüme faktörü, epidermal büyüme faktörü (Ferriani ve ark., 1994; Cooper ve ark., 1995; Kingdom ve ark., 2000) ve PlGF'dir (Maglione ve ark., 1991).



Şekil 2.2 VEGF ve VEGF-reseptör sistemi.

Anjiyogeneze önemli bir katkıda bulunan VEGF-A, VEGFR-1'in yanı sıra VEGFR-2'yi bağlar ve aktive eder ve vaskülojenenez, anjiyogenez düzenler. Çözünür VEGFR-1 formunun plasental vaskülatür için önemli bir modülatör olduğu düşünülmektedir. VEGF-C ve D esas olarak VEGFR-3'ü aktive eder ve lenfanjiyogenezi düzenler (Shibuya, 2006).

Gelişmiş bir damar ağının oluşması sırasında, vaskülogenez, primer kapiller pleksusta gelişmiş damar oluşumu ve anjiyogenez olaylarıyla gerçekleşir. Vaskülogenezin ilk aşamasında, embriyodaki primitif çizgiyi terk eden hücreler hem kan hücrelerinin hem de kan damarlarının yapılarının öncülleri olan hemanjiyoblastları oluştururlar. Bu yapıların oluşması FGF2 sinyali ile gerçekleşir (Flamme ve Risau, 1992). Splanknik mezodermdaki hemanjiyoblastlar, genellikle kan adaları olarak adlandırılan kümelenmelerde yoğunlaşırlar (Shalaby ve ark., 1997; Huber ve ark., 2004). Kan adacıklarının yakınlarındaki mezenşim hücrelerinden salgılanan VEGF'in VEGFR2'ye bağlanmasıyla hemanjiyoblastlar, kan progenitör hücreleri, anjiyoblastları oluşturur (Millauer ve ark., 1993).



Şekil 2.3. Vaskülogenez ve anjiyogenez.

Vaskülogenez, kısaca kan damarlarının oluşumunu ve bunlardan kılcal damarların gelişimini içerir (Hanahan, 1997).

VEGF'in VEGFR2 ile bağlanması sonucu anjiyoblastlar çoğalır ve kan damarlarının temelini oluşturan endotel hücrelerine ayrılır. Endotel hücrelerinde VEGF'in VEGFR1 reseptörüne bağlanması ile de tüpler oluşturulur. Bu mekanizma damar ağının oluşumu için yine de yeterli değildir. Oluşmuş olan bu damar yapısının tamamlanması için peri-endotelyal hücreler ve perisitler gibi destek hücrelere ihtiyacı vardır. Bu endotel yapısındaki hücrelerde Angiopoeitin reseptörü Tie-2'ye bağlanmasıyla ihtiyacı olan

destek hücreleri bölgeye çağırılır. Tüpler primer kılcal pleksusu oluşturmak için birbirine bağlanır (Davis ve ark., 1996; Suri ve ark., 1996; Vikkula ve ark., 1996; Moyon ve ark., 2001). Anjiyogenez sırasında, mevcut kan damarındaki bazı endotel hücreleri VEGF sinyaline yanıt verebilir ve yeni bir damar oluşturmak için "filizlenmeye" başlayabilir. Bu hücreler uç hücreler olarak isimlendirilir ve diğer damar hücrelerinden farklıdırlar. VEGF sinyallerine karşı diğer endotel hücrelerinden daha hassastırlar. Uç hücreler, hücre yüzeylerinde VEGFR-2 ile yoğun bir şekilde paketlenmiş filopodia üretir (Tammela ve ark., 2008). Bu reseptörler, uç hücrenin VEGF kaynağına doğru uzanmasını sağlar ve hücre bölündüğünde, bölünme VEGF'lerin oluşturduğu gradyana doğrudur. Bunun sonucunda juvenil damar ağı oluşur. PDGF ve TGF- β 'bin reseptörlerine bağlanması sonucu maturasyon ve remodellenme ile olgun vasküler sistem oluşur.

Anjiyogenez ile ilgili olarak CD34 de önemli bir anjiyogenik faktördür. CD34, insanlarda, farelerde, sıçanlarda ve diğer türlerde CD34 geni tarafından kodlanan bir transmembran fosfolipoprotein proteinidir (Satterthwaite ve ark., 1992; Simmons ve ark., 1992). CD34 ilk olarak hematopoietik kök hücreler üzerinde bağımsız bir hücre yüzeyi glikoproteini olarak Civin ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Civin ve ark., 1984). CD34 hücre-hücre adhezyon faktörü olarak işlev görür (R. W. Tindle ve ark., 1985; Loken ve ark., 1987; R. Tindle ve ark., 1987). Ayrıca hematopoietik kök hücrelerin kemik iliği hücre dışı matriksine veya doğrudan stromal hücrelere bağlanmasına aracılık edebilir. Klinik olarak, kemik iliği nakli için hematopoietik kök hücrelerin seçimi ve zenginleştirilmesi ile ilişkilidir. Bu tarihsel ve klinik ilişkiler nedeniyle, CD34 ekspresyonu hemen hemen her yerde hematopoietik hücrelerle ilişkilidir; ancak aslında diğer birçok hücre tipinde de bulunur (Sidney ve ark., 2014). Ayrıca CD34 anjiyogenez olayında da önemli görev almaktadır. Endotel hücrelerinin, göç eden ve çoğalan hücreleri takip eden uç hücrelere fonksiyonel farklanması, anjiyogenezde yeni damarların filizlenmesi sırasında önemli rolleri vardır. Yapılan bir çalışmada CD34'ün kültürlenmiş endotel hücrelerinin küçük bir alt kümesinde eksprese edildiğini ve bu hücrelerin filopodları genişlettiği gösterilmiştir (Martin J Siemerink ve ark., 2012a).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Denekler

Toplam 18 adet term plasentada çalışılmıştır. 6 adet normal, 6 adet taze embriyo transferiyle oluşmuş ve 6 adet dondurulmuş embriyo transferiyle oluşmuş gebelik sonucunda elde edilen plasentalarla belirlenen metotlar için gerekli rutin işlemler yapılmıştır.

3.2 Deney Grupları

Tüm deney grupları Tablo 3.1’de açıklanmıştır.

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 stimülatör olan GnRH 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 İVF (COOK Medical, Sidney İVF, ABD) medyumunu kullanılarak yapılmıştır. İnkübasyon koşulları %6 CO₂, %5 O₂ ve 37°C'ye ayarlanmıştır. (K-Sistemler, Kivex Biotech Ltd, Danimarka). Tüm oosit aşılımaları, 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 tarafından önerilen 3 kademeli derecelendirme sistemine göre değerlendirilmiştir (Gardner, Lane, & Schoolcraft, 2000; Gardner, Lane, Stevens, ve ark., 2000). 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 Kriyotop 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, çözdürme, seyreltme ve yıkama solüsyonları, piyasadaki Kriyotop kitlerinde bulunmaktadır. Kısaca, blastosistler oda sıcaklığında dengeleme ve vitrifikasyon aşamalarına alınmış, sonrasında Kriyotop strip üzerine yerleştirilip sıvı nitrojene daldırılmıştır. Strip üzerine ikiden fazla blastosist yerleştirilmemiştir. Kriyotop stripi, sıvı nitrojende kriyotank içinde saklanmıştır. Isınması için, başlıklı bir Kriyotop 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 Kriyotop 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 ölçülmüş ve progesteron konsantrasyonunu kontrol etmek için kan örneği alınmıştır (Abdalla ve ark., 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 oluşacak ve gebeliğin en az 9 haftası devam edecektir (Vaisbuch ve ark., 2014).

Bu işlemler Antalya Tüp bebek merkezinde çalışan Doç. Dr. Kemal Özgür ve Dr. Murat Berkkanoglu tarafından yapılmıştır.

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

3.4 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.

3.5 Doku Takibi

3.5.1 Protokol

- Plasentalar elde edildikten sonra dokular %4 Formalin ile gece boyu muamele edilmiştir.
- Dokular Akan su altında 4 saat yıkanmıştır.
- Dokular, dehidrasyon işlemi için sırasıyla %70, %80 ve %90’lık artan alkol serilerinde 1’er gün bekletildikten sonra %100’lük alkolde 3 saat bekletilmiştir.
- Dokular şeffaflaştırma için ksilole alınarak, ksilolde 5 dakika bekletilir.
- Sertleştirme işlemi içinse dokular 3x1 saat parafin içerisinde bekletilmiştir.
- 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.

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 800mL 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

- Mikrotomla 5µm'lik kesitler alındıktan sonra 37°C su banyosunda superfrost lamlara alındı
- Superfrost lamlara alınmış olan kesitler 2 saat ısı tablasında maksimum 40°C sıcaklıkta beklenir.
- Isı tablasından alınan lamalar gece boyunca 60°C etüvde bekletildi.
- Deparafinizasyon işlemi için Ksilol II ve Ksilol I de 10ar dakika kesitler bekletildi.
- Kesitler sırasıyla %100-%90-%80-%70 alkol serilerinde 5er dakika bekletildi.
- Kesitler distile suda 5 dakika bekletildi.
- Epitoplara açılması için 3x7 dakika mikrodalga fırında 750 watt'da sitrat tampon ile kaynatıldı.
- Kaynatılan kesitler 20 dakika oda sıcaklığında soğutmaya alındı
- Örneklerin etrafı pappen ile çizilerek 3x5 dakika PBS yıkaması yapıldı.
- 30 dakika boyunca %5 Hidrojen peroksit ile muamele edildi.
- 3x5 dakika PBS yıkaması yapıldı.
- 5 dakika Uv bloklama yapıldı.
- Kesitlere ilgili primer antikörler (VEGF 5µg/ml dilüsyon – *Abcam ab1316*, VEGFR2 1/600 dilüsyon – *Cell Signalling #2479*, CD34 1/500 dilüsyon - *Abcam ab54208*) eklendi ve +4°C'de gece boyu inkübasyona bırakıldı.

2. GÜN

- Örnekler 3x5 dk PBS ile yıkandı.
- Primer antikoru fare kaynaklı antikör kullanılan örnekler Primer Antibody enhancer eklendi. 30 dakika bekletildi. (Primer antikör kaynağı fare dışında bir hayvan ise kesitler üzerine kurumaması için PBS eklendi eşit süre bekletildi)

- HRP polimer (thermo) ile 30 dakika inkübasyon yapıldı. (Üzeri siyah renkli bir materyal ile kapatıldı.)
- 3x5 dk PBS ile yıkandı.
- Substrat olan AEC kromojeni ile dokularda reaksiyon gözlemleninceye kadar muamele edildi.
- Distile su ile reaksiyon durduruldu.
- Mayer hematoksilen ile 10 saniye zıt boyama yapıldı.
- Akan suda yıkama yapıldı.
- Kapatma solüsyonu ile kesitler kapatıldı ve mikroskopta fotoğraflandı.

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 Ortohoivanadate

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 Sodyum orthovanadate
- 1 gr Sodyum dodesil sülfat
- 1 tablet proteaz inhibitör kokteyl

Yukarıdaki maddeler 90ml 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 $\text{CuSO}^4_5(\text{H}^2\text{O})$

Protokol

Sıvı nitrojen tankında bekletilmiş olan dokular

- Mekanik olarak bisturi aracılığıyla parçalanmıştır. Bu parçalama işlemi buz üzerinde gerçekleştirilmiştir.
- Parçalanmış dokular lizis solüsyonu ile (0,2 gram doku başına 600 mikrolitre lizis solüsyonu olacak şekilde) muamele edildi.
- Dokular lizis solüsyonu ile birlikte eppendorf tüplere alındı ve vortekslendi.
- Vortekslenen tüpler $+4^\circ\text{C}$ 'de 15000 g' de 10-15 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrasında süpernatantlar alındı.
- Protein miktarlarının belirlenmesi için lowry deneyine başlandı.
- 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

- Numuneler genellikle 1:40 dilüe edilerek çalışıldı.
- Lowry ölçümü için numuneler çift tekrarlı çalışıldı.
- Her bir numune PBS ile 1:40 dilüe edilip eppendorf tüpe alındı
- Tüm standart, kör ve numunelere daha önce lowry A, B ve C solüsyonu karışımı ile elde edilen lowry solüsyonundan 600 μl ilave edildi ve vortekslendi.
- 10 dakika buz üzerinde inkübasyon yapıldı.
- Daha sonra da tüm, standartlara, numunelere ve blank'a 60 μl folin (1:1 oranında distile su ile dilüe edilmiş) eklendi.
- Folin ile karanlık ortamda 30 dakika inkübasyon işlemi gerçekleştirildi.

- 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 1000ml'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 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

- %10 luk jel döküldü.
- 10'luk tarak kullanıldı.
- IVF ve kontrol plasentalardan hazırlanmış 33µg'lık numunelerden kullanıldı. Ve kuyulara 15µl yüklendi.
- Aşağıda belirtilen sıra ile yükleme yapıldı.

YÜRÜTME

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

BLOTLAMA

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

2.Gün

- Kaset soğuk odadan alındı ve membranlar ayrı kaplara ayrıldı.
- Membran TBS-T ile 3x5 dakika yıkandı.
- Poncaeu-S boyası ile bantlar gözlemlendi.
- Bantlar gözlemlendikten sonra boya toplandı ve membran temizlenene kadar TBS-T ile yıkandı. (3x5 dakika)

BLOKLAMA

- %5'lik süt tozu hazırlandı.
- Membran hazırlanan süt tozu ile 1 saat mekanik çalkalayıcı üzerinde muamele edildi.
- Yıkama yapmadan membrana hazırlanmış ilgili primer antikorlar (β -Aktin 1/2000 dilüsyon – *Cell Signalling* #4970, VEGF 1/1000 dilüsyon – *Abcam* ab1316, VEGFR2 1/1000 dilüsyon – *Cell Signalling* #2479, CD34 1/1000 dilüsyon - *Abcam* ab54208) eklendi.
- Membran soğuk odada gece boyu shaker üzerinde antikorla muamele edildi.

3. Gün.

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

3.8 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. 0.05 anlamlılık düzeyi ve %95 Güven aralığı belirlenerek *Tukey* post testi kullanılmıştır.

“ **0,1 < p < 0,05 aralığında** ; *Sınırdan anlamlılık*
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 simgelenmiştir. (Kul, 2014)



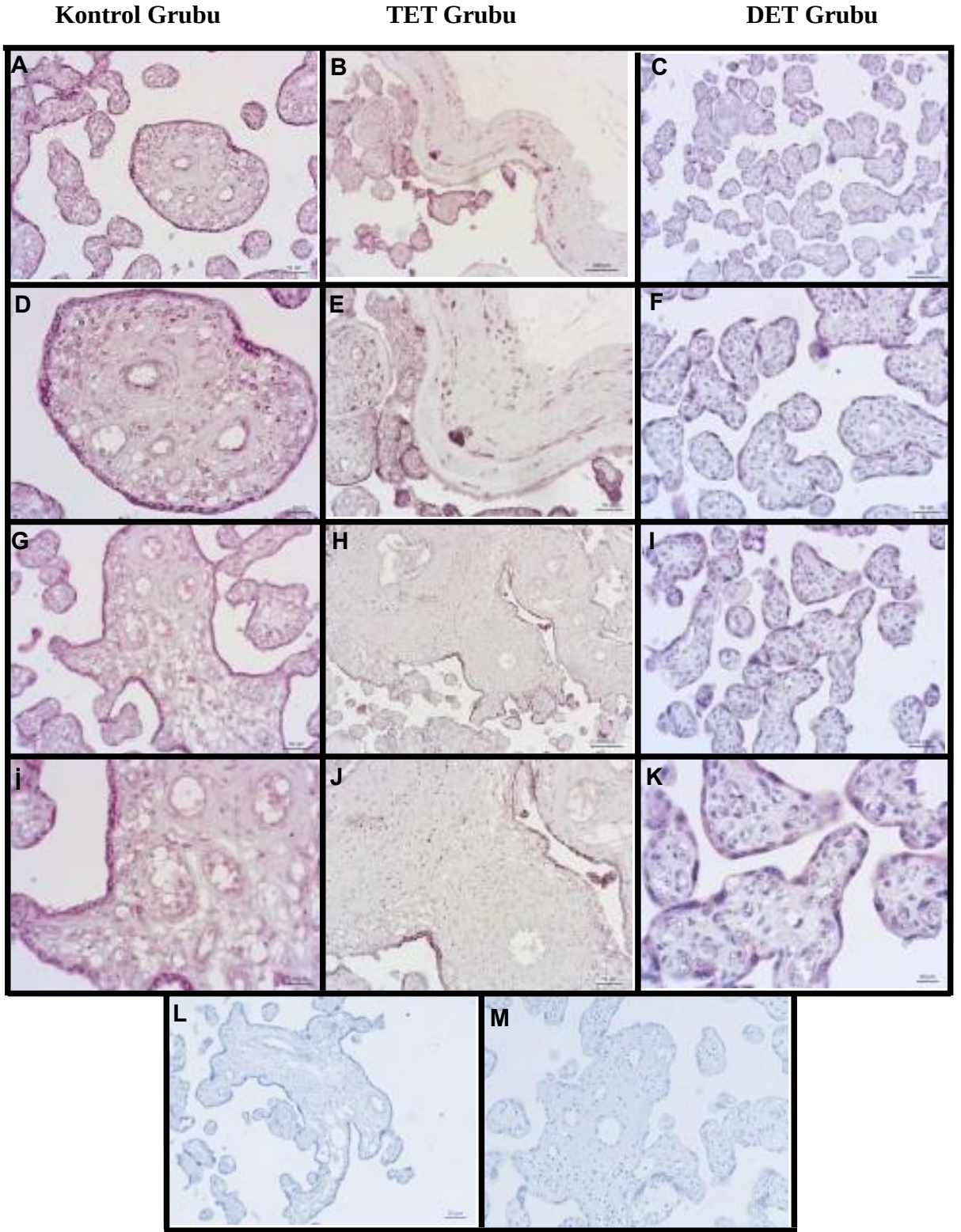
4. BULGULAR

Bu çalışmada *in vitro* fertilizasyon sonucu gerçekleşmiş gebeliklerin plasenta örnekleri ve normal gebelik sonucu oluşmuş olan plasenta örneklerinde VEGF, VEGFR2 ve CD34 proteinlerinin miktarı, Western Blot deneyleri ile incelenmiştir. Bu proteinlerin ekspresyon şiddeti ve lokalizasyonları ise immünohistokimyasal deneyler ile incelenmiştir.

4.1 İmmünohistokimyasal Deney Sonuçları

4.1.1 VEGF İmmünohistokimya Boyanmaları

Yapmış olduğumuz immünohistokimyasal boyanmalara göre VEGF için tüm gruplarımızda pozitif reaksiyonlar gözlemlenmiştir. Bu boyanmalar yoğunluklu olarak villüs endotel hücrelerinde ve villüs stromal hücrelerdedir. İVF ve kontrol gruplarının tamamında endotel hücrelerinde VEGF pozitif immün reaksiyonlar gösterilmiştir (Şekil 4.1). Ayrıca Kontrol, TETP ve DETP grubunda villüslerdeki stromal hücrelerde immün pozitif reaktivite tespit edildi.



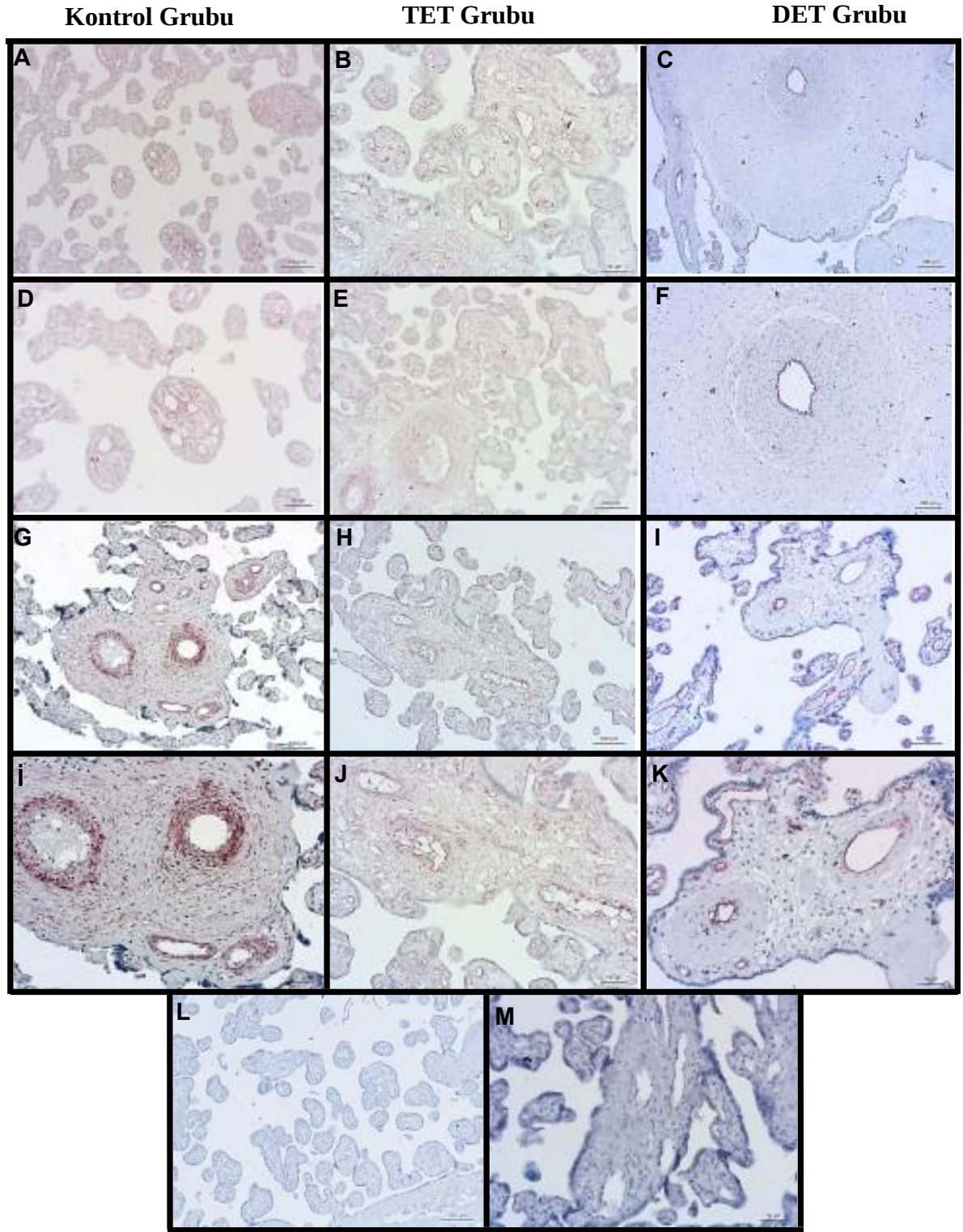
Şekil 4.1 Deney ve kontrol gruplarında VEGF immünohistokimyasal boyanmaları

A, D, G, İ: Kontrol Plasenta B, E, H, J: TET sonucu oluşmuş plasenta C, F, I, K: DET sonucu oluşmuş plasenta. L: İzotip kontrol M: Negatif kontrol. C ve H 10x büyütme ile A, B, F, G, I, J, L, M 20x büyütme ile D, E, İ, K, 40x büyütme ile fotoğraflanmıştır. Tüm fotoğraflar ZEISS Axiolab ışık mikroskobu altında ZEN Blue Edition programı kullanılarak çekilmiştir.

4.1.2 VEGFR2 İmmünohistokimya Boyanmaları

VEGFR2, immünohistokimyasal olarak tüm gruplarda esas olarak endotel hücrelerinde ve stromal hücrelerde pozitif reaksiyon göstermiştir. Kontrol grubu stromal hücrelerindeki boyanma şiddeti İVF gruplarına göre daha yoğundur (Şekil 4.2).





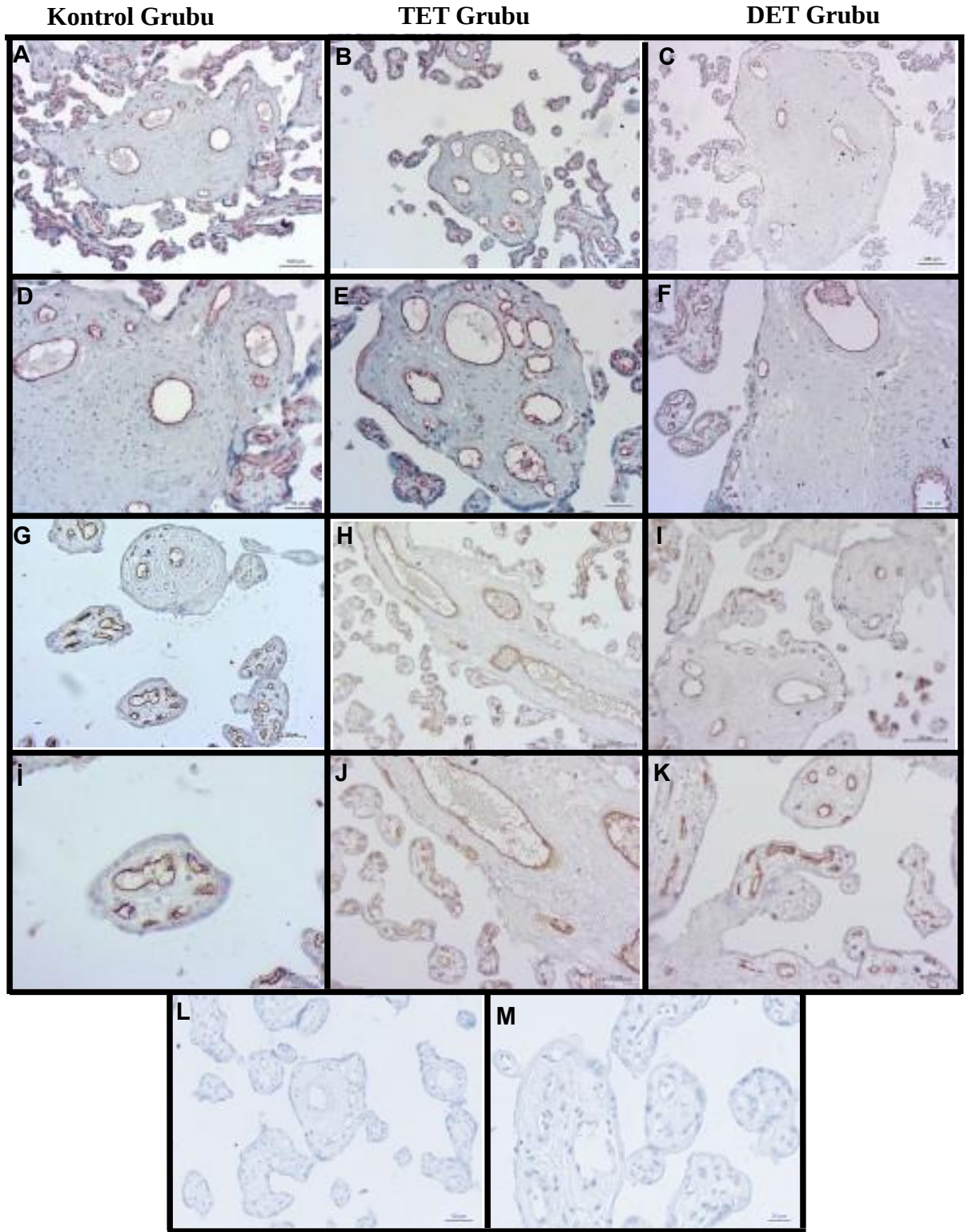
Şekil 4.2 Deney ve kontrol gruplarında VEGFR2 immünohistokimyasal boyanmaları

A, D, G, İ: Kontrol Plasenta B, E, H, J: TET sonucu oluşmuş plasenta C, F, I, K: DET sonucu oluşmuş plasenta, L: İzotip kontrol M: Negatif kontrol. C, 5x büyütme ile, A, B, F, G, I, L 10x büyütme ile, D, E, İ, J, K, M 20x büyütme ile fotoğraflanmıştır. Tüm fotoğraflar ZEISS Axiolab ışık mikroskobu altında ZEN Blue Edition programı kullanılarak çekilmiştir.

4.1.3 CD34 İmmünohistokimya Boyanmaları

Yapmış olduğumuz immünohistokimyasal boyanmalara göre CD34 için tüm gruplarımızda pozitif reaksiyonlar gözlemlenmiştir. İmmünohistokimyasal boyanmalar endotel hücrelerinde ve stromal hücrelere pozitifdir (Şekil 4.3).





Şekil 4.3 Deney ve kontrol gruplarında CD34 immünohistokimyasal boyanmaları

A, D, G, İ: Kontrol Plasenta B, E, H, J: TET sonucu oluşmuş plasenta C, F, I, K: DET sonucu oluşmuş plasenta, L: İzotip kontrol M: Negatif kontrol. C, 5x büyütme ile, A, B, H, I, L 10x büyütme altında, D, E, F, G, J, K, M 20x büyütme ile İ 40x büyütme ile fotoğraflanmıştır. Tüm fotoğraflar ZEISS Axiolab ışık mikroskobu altında ZEN Blue Edition programı kullanılarak çekilmiştir.

Tablo 4.1 İmmünohistokimyasal boyanma sonuçları

<i>Gruplar</i>	<i>VEGF</i>			<i>VEGFR2</i>			<i>CD34</i>		
	<i>KP</i>	<i>TETP</i>	<i>DETP</i>	<i>KP</i>	<i>TETP</i>	<i>DETP</i>	<i>KP</i>	<i>TETP</i>	<i>DETP</i>
<i>Sitotrofoblast Hücreleri</i>	+	+	++	+	+	+	+	+	+
<i>Sinsisyotrofoblast Hücreleri</i>	+	++	+/-	+/-	+	+/-	-	++	+/-
<i>Endotel Hücreleri</i>	++	++	+++	+++	+	++	++	+++	++
<i>Stromal Hücreler</i>	+	+	++	+++	+	++	+/-	+	+

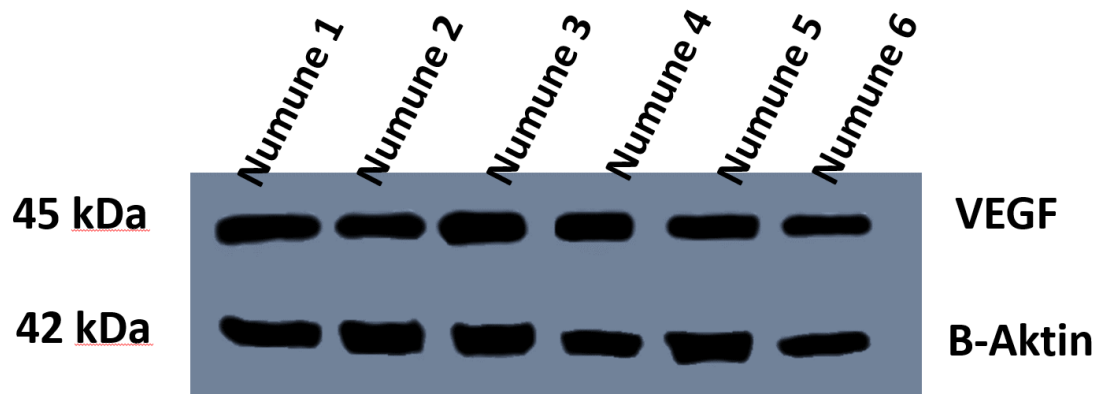
4.2 Western Blot

4.2.1 VEGF

Tüm grupların protein miktarlarını belirlemek için yapmış olduğumuz Western Blot deney sonuçlarımıza göre VEGF proteini için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir fark tespit edilememiştir ($p>0,1$) (Şekil 4.4).

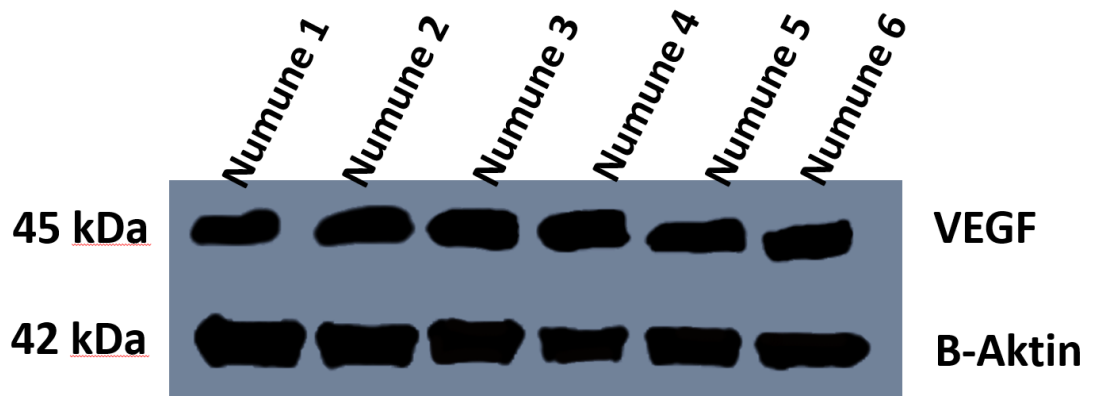
A

Kontrol Plasenta



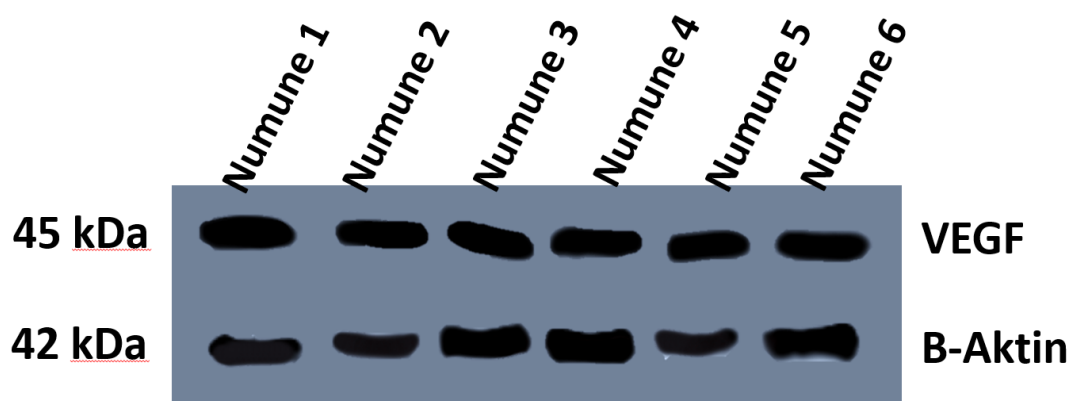
B

TET Plasenta

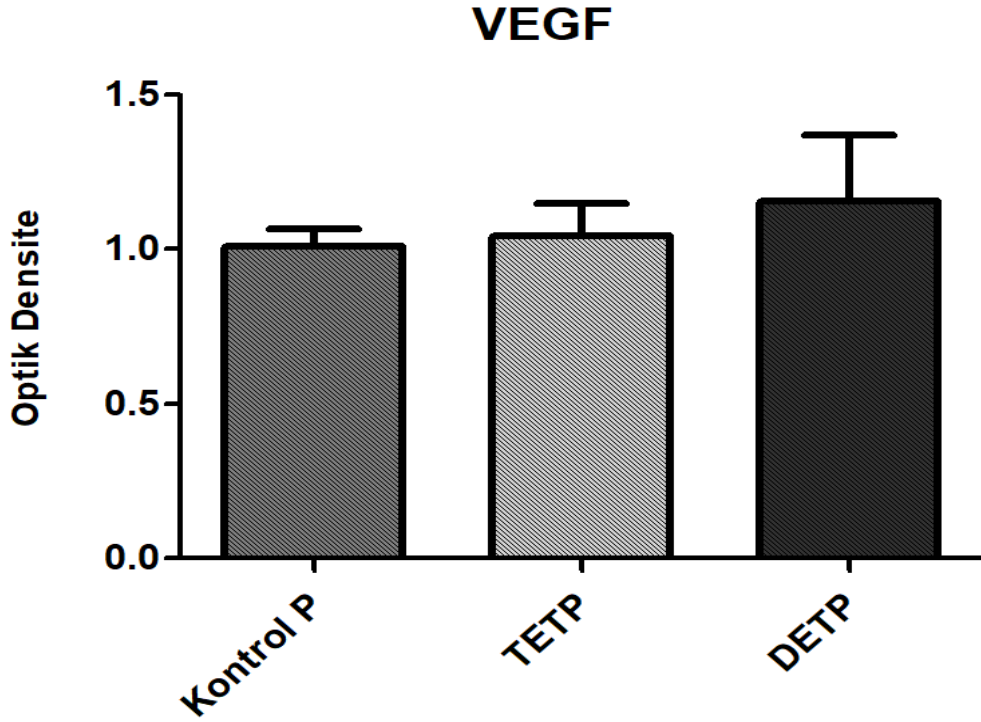


C

DET Plasenta



D



Şekil 4.4 Western Blot VEGF sonuçları

A: Kontrol grubu numunelerinin VEGF ve β -Aktin proteinlerinin bantları

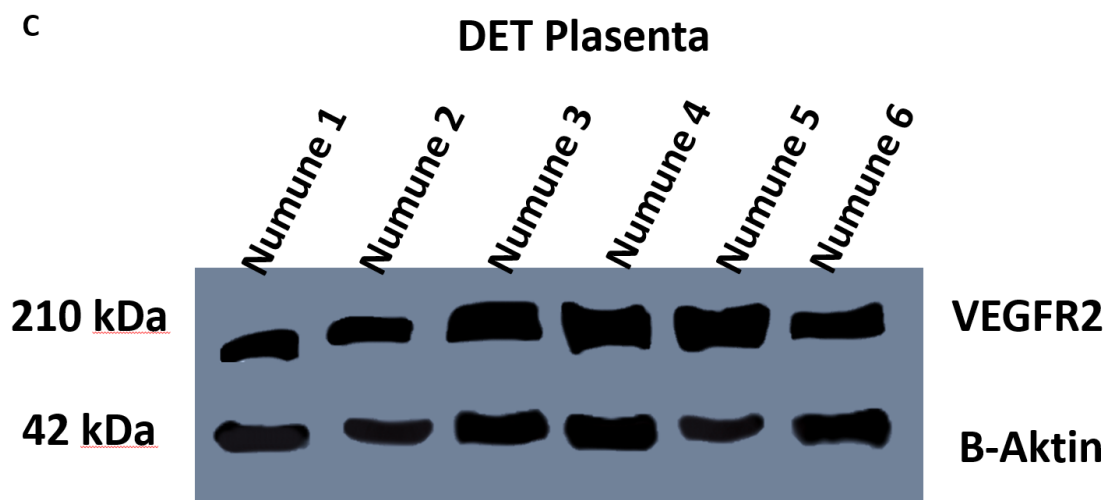
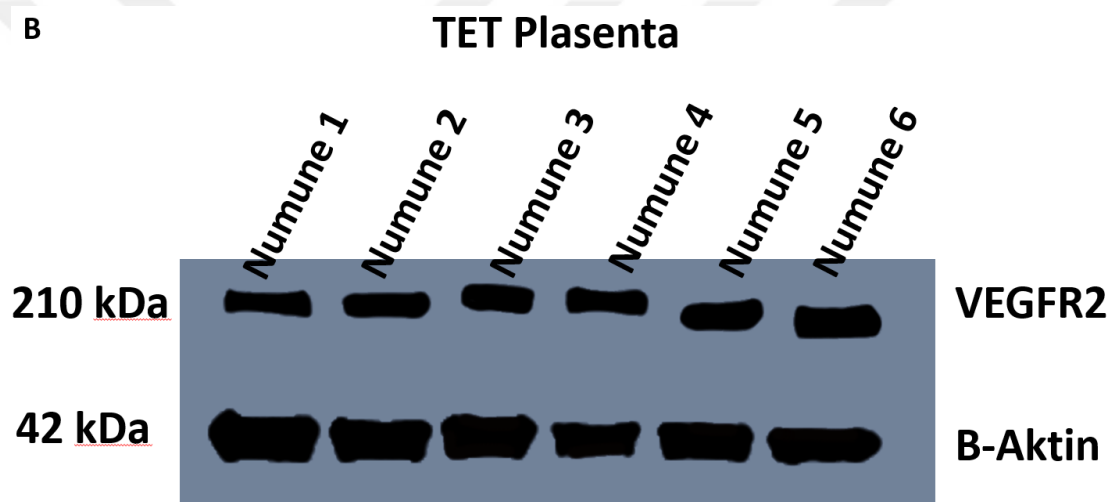
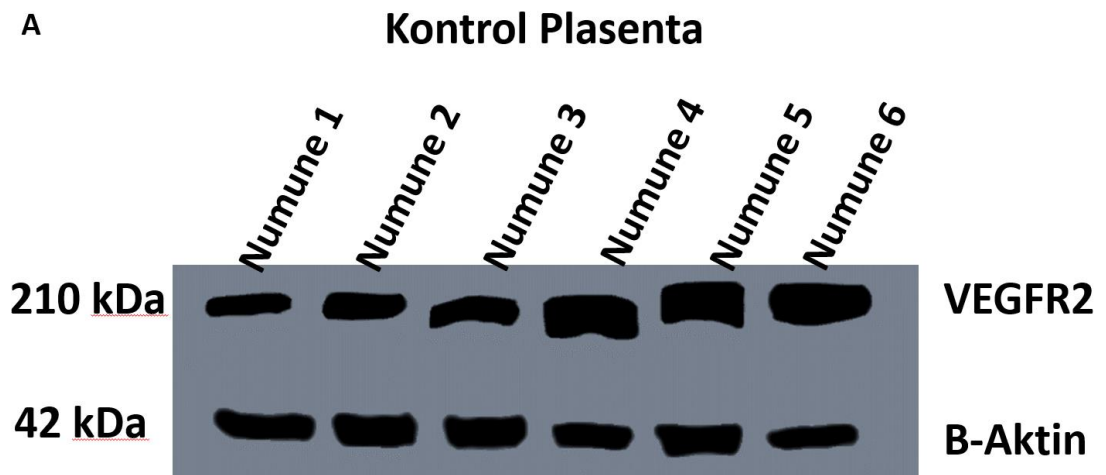
B: Taze embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta grubu numunelerinin VEGF ve β -Aktin proteinlerinin bantları

C: Dondurulmuş embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta grubu numunelerinin VEGF ve β -Aktin proteinlerinin bantları

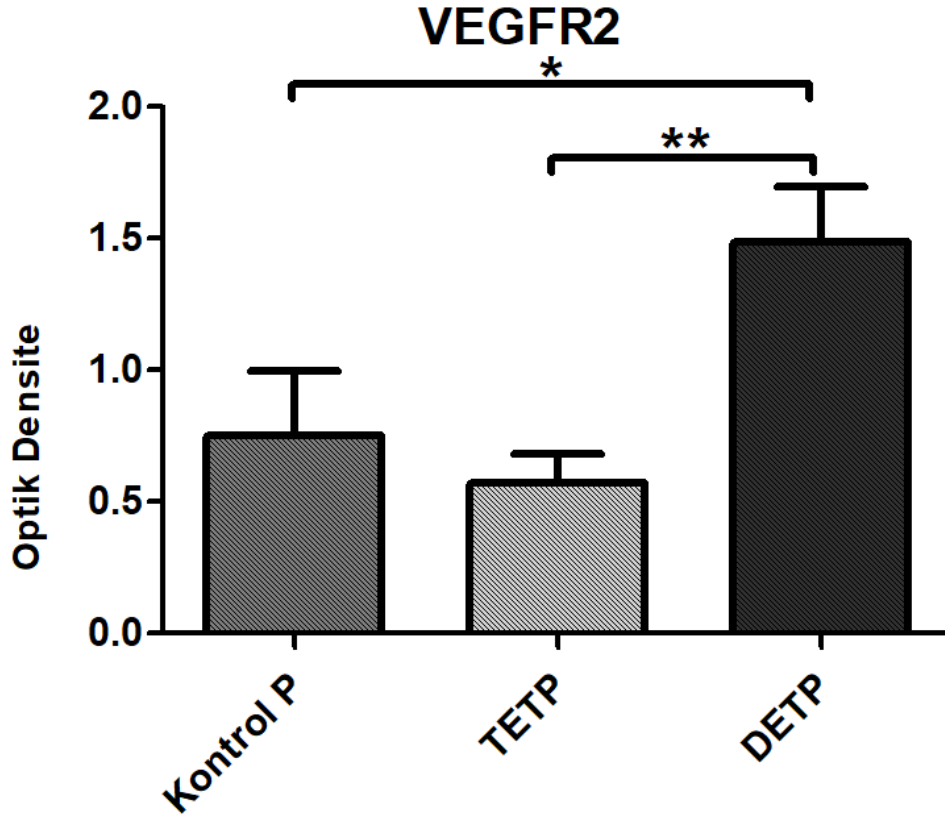
D VEGF proteininin Western Blot deneyi sonucu analizleri.

4.2.2 VEGFR2

Western Blot analizlerine göre Kontrol grubu VEGFR2 protein miktarı TETP grubuna göre daha fazlayken DETP grubuna göre daha düşük miktardadır. TETP grubu protein miktarı kontrol grubuyla kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı miktarda fark bulunmamıştır ($p>0,1$). TETP grubu protein miktarı, DETP grubuyla kıyaslandığında ise istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı olacak şekilde daha az miktarda olduğu belirlenmiştir $0,001<p<0,01$. DETP grubu protein miktarı ise hem kontrol grubuna hem de TETP grubuna kıyasla daha çok miktardadır. DETP grubu ekspresyon miktarının her iki grup arasındaki ekspresyon miktarı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (KP-DETP: $0,01<p<0,05$, TETP-DETP: $0,001<p<0,01$) (Şekil 4.5).



D



Şekil 4.5 Western Blot VEGFR2 sonuçları

A: Kontrol grubu numunelerinin VEGFR2 ve β -Aktin proteinlerinin bantları

B: Taze embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta grubu numunelerinin VEGFR2 ve β -Aktin proteinlerinin bantları

C: Dondurulmuş embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta grubu numunelerinin VEGFR2 ve β -Aktin proteinlerinin bantları

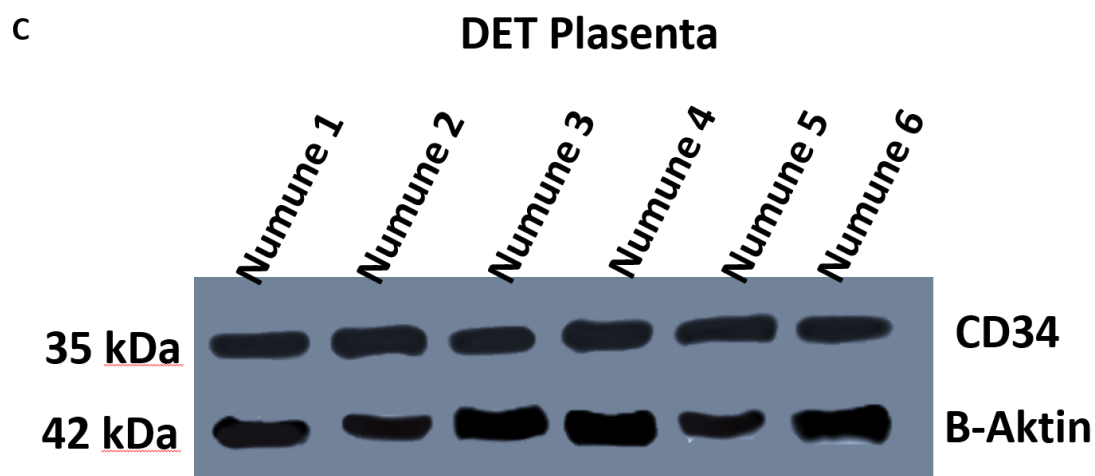
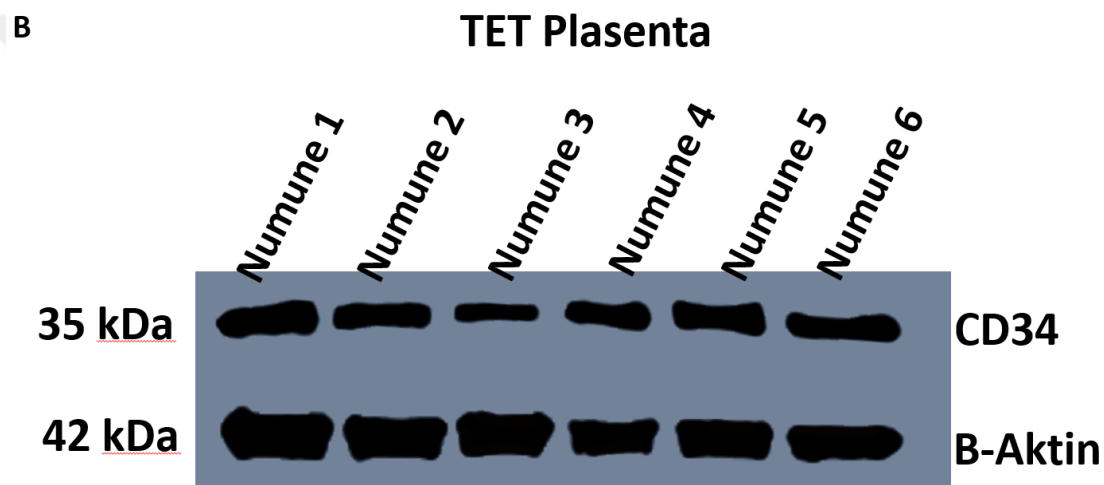
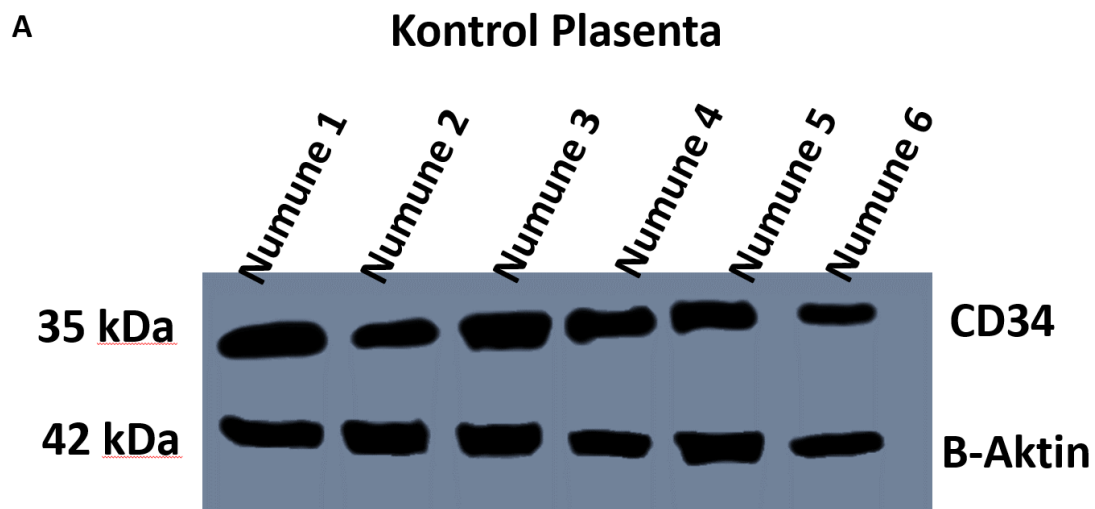
D VEGFR2 proteininin Western Blot deneyi sonucu analizleri.

* : $0,01 < p < 0,05$

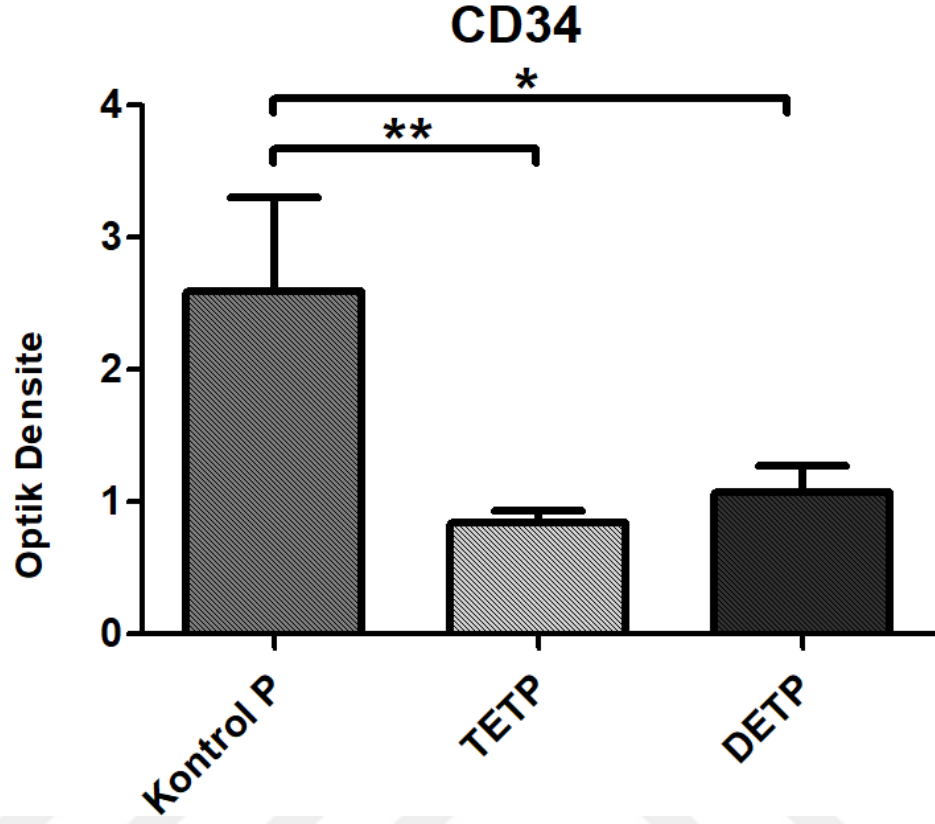
** : $0,001 < p < 0,01$

4.2.3 CD34

Western Blot deneyi sonucu analizlerine göre Kontrol grubu CD34 protein miktarı hem TETP grubuna göre ($p < 0.01$) hem de DETP grubuna göre ($p < 0.05$) daha fazla miktardadır. DETP ve TETP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,1$) (Şekil4.6)



D



Şekil 4.6 Western Blot CD34 sonuçları

A: Kontrol grubu numunelerinin CD34 ve β -Aktin proteinlerinin bantları

B: Taze embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta grubu numunelerinin CD34 ve β -Aktin proteinlerinin bantları

C: Dondurulmuş embriyo transferi sonucu oluşmuş gebeliklerden alınmış plasenta grubu numunelerinin CD34 ve β -Aktin proteinlerinin bantları

D CD34 proteininin Western Blot deneyi sonucu analizleri

* : $0,01 < p < 0,05$

** : $0,001 < p < 0,01$

5. TARTIŞMA

Yapılan birçok çalışma, İVF sonucu gerçekleşmiş gebeliklerin, doğal yollardan gelişen gebeliklere kıyasla fetüs ve anne sağlığı açısından içerdiği risk miktarının daha yüksek oranda olduğunu ileri sürmektedir (Ceelen ve ark., 2008; Wilkins-Haug, 2008; Steel ve Sutcliffe, 2009; Fujimoto ve ark., 2010; Thoma ve ark., 2014; Scherrer ve ark., 2015; Qin ve ark., 2016). *In vitro* fertilizasyonda embriyogenez, anjiyogenez ve plasenta oluşumu gibi süreçlerde kullanılan yolaklar ve bu yolaklarda görev alan faktörler normal yoldan gerçekleşen gebeliklere göre benzerlik ve farklılık gösterirler. Bu benzerlik ve farklılıkları, bu süreçteki mekanizmaları belirlemek kolay değildir (Sutcliffe ve Ludwig, 2007). YÜT sonucu gerçekleşen gebeliklerde gebeliğin sağlıklı olarak sonlanması zorlaştıracak ek patolojiler de olabilir.

Çok önemli bir endokrin organ olan plasenta birçok önemli sinyal üretir. Bu sinyallerden kaynaklanan herhangi bir bozukluk, fetal gelişimi ciddi anlamda etkileyebilecek önemli patofizyolojik süreçlere neden olabilir (Jauniaux ve ark., 1990; J. Zheng ve ark., 1996; Y. Zhang ve ark., 2010). Bu nedenle, plasantanın başta endokrin özellikleri olmak üzere işlevleri ile ilgili çalışmalar YÜT'ün güvenliği açısından kullanışlı bilgiler sağlayabilir.

Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgulara göre araştırmakta olduğumuz anjiyogenik faktörlerden VEGFR2 için DETP grubu TETP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde arttığı, CD34 ve VEGF proteinleri için ise DETP ve TETP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın bulunmadığı Western Blot deneyleriyle tespit edilmiştir. İmmünohistokimyasal deneylerde belirlenen pozitif reaksiyonlarda da bu proteinlerin ekspresyon şiddetleri ve lokalizasyonları belirlenmiştir.

Yapılan diğer çalışmalarda YÜT sonucu gerçekleşmiş gebeliklerde anjiyogenez ile ilgili olarak VEGF, VEGFR2, VEGFR3, Tie-2, PlGF, bFGF, FGF-2, Angiopoeitin-1, Angiopoeitin-2 gibi önemli anjiyogenik faktörlerin İVF sonucu oluşmuş plasentalarda kontrol grubu plasentalara göre ekspresyon sonuçlarının yüksek olduğu MikroArray,

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), Western Blot ve İmmünohistokimyasal deneyler ile gösterilmiştir (Malinda S Lee ve ark., 2015a; Li ve ark., 2016; Zhao ve ark., 2020). Ancak bu çalışmalarda deney grupları oluşturulurken İVF grupları için taze ve dondurulmuş embriyo transferleri ayrı ayrı gruplandırılmamıştır. Taze ve dondurulmuş embriyo transferleri sonucu gelişen gebeliklerden alınan plasentalar İVF grubu olarak bir bütün şeklinde değerlendirilmiştir. Bizim yaptığımız bu çalışmada kontrol gruplarımızın yanı sıra İVF gruplarımızda kendi içerisinde taze embriyo transferi sonrası oluşmuş gebeliklerden elde edilen plasentalar ve dondurulmuş embriyo transferi sonrası oluşmuş gebeliklerden elde edilen plasentalar olmak üzere iki ayrı grupta ele alınmış ve sonuçlar birbiri ile kıyaslanmıştır.

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

VEGF ve reseptörleri, tek bir VEGF alelinin kaybı bile embriyonik ölümle sonuçlanabildiğinden dolayı, embriyonun sağlıklı gelişimi ve embriyonik vasküler gelişim için gereklidir (Azliana ve ark., 2017). VEGF ve reseptörlerinin invazyondan anjiyogeneze kadar birçok süreçte görev aldığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Rockwell ve ark., 2002; Fan ve ark., 2008; Carmeliet ve ark., 1996; Ferrara ve ark., 1996). Yine yapılan çalışmalarda VEGF ve reseptörlerinin kontrol plasentalarda maternal ve fetal kaynaklı hücrelerde eksprese edildiği hem hücre hatları hem plasental eksplantlar kullanılarak gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2002; Azliana ve ark., 2017). Yapılan çalışmalarda maternal kanda artan sFLT-1 seviyeleri ve azalan PlGF ve VEGF seviyeleri sonucunda anti-anjiyogenik ortamın oluştuğu bildirilmiştir (Maynard ve Karumanchi, 2011; Woo ve ark., 2017). Bu çalışmalarda maternal kandan yapılan ölçümler sonucunda sFLT-1:PlGF ve sFLT-1:VEGF oranlarının yükselmesi sonucunda preeklampsi, plasental abrupsiyon, plasenta previa, hamilelik sırasında anormal kanama gibi istenmeyen durumlar ve patolojiler meydana gelebildiği gösterilmiştir (Maynard ve Karumanchi, 2011; Woo ve ark., 2017). Bahsi geçen çalışmalardan Maynard ve Karumanchinin 50 adet TET grubu ve 24 adet DET grubu maternal kan örnekleri ile yaptığı çalışmada preeklampsi, plasental abrupsiyon, plasenta previa, ilk trimester kanaması, hamilelik sırasında anormal kanama gibi patolojiler incelenmiş ve gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Barut ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise 110 adet IUGR plasenta ile çalışılmış ve IUGR plasenta örneklerinde kontrole kıyasla sitotrofoblast, sinsistyotrofoblast, ekstrasvillöz

trofoblast, vasküler düz kas, villus stromal ve endotelyal hücrelerde VEGF-A ve b-FGF ekspresyonlarının istatistiksel olarak arttığı bulgusu yer almaktadır (Barut ve ark., 2010). Dolayısı ile VEGF ekspresyonunun kontrol plasentalara göre artması ve azalması anjiyogenik ortamı etkileyeceğinden ekspresyon seviyesinde hem artma hem de azalma çeşitli patolojilere sebep olabilmektedir.

Bu çalışmada Yapılan Western Blot analizlerine göre VEGF protein miktarı hiçbir grupta istatistikler olarak anlamlı bir artış ya da azalış göstermemiştir. Tüm gruplardaki protein miktarları birbirine yakındır. VEGF ile ilgili bulgularımız literatürde daha önce Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadaki Western blot analizleri ile uyumluluk göstermektedir (Li ve ark., 2016). Zhao ve arkadaşlarının 2020 yılında yapmış olduğu çalışma sonuçlarına göre ise VEGF ile ilgili İVF ve kontrol grupları plasentalarında yapılan PCR ve immünohistokimyasal deneyler sonucunda İVF gruplarında kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek düzeyde olacak şekilde anlamlı artış gösterilmiştir. Yapmış olduğumuz immünohistokimyasal deneylerle de VEGF, Kontrol grubu DETP ve TETP gruplarında pozitif reaksiyon göstermiştir. En şiddetli reaksiyonlar sırasıyla DETP grubunda gözlemlenirken TETP ve kontrol gruplarında birbirine yakın seviyede pozitif reaksiyon görülmüştür. Tüm gruplarda boyanmalar endotel ve stromal hücrelerde görülmüştür (Tablo 4.1).

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktör Reseptörü-2

VEGFR-2, VEGF reseptörleri arasından en güçlü proanjiyogenik aktiviteye sahip olan VEGF reseptörüdür (Melincovici ve ark., 2018). VEGFR2 kontrol grubu plasentalarda esas olarak plasental villus vasküler yapılarına lokalize olmaktadır. Bu yapılar ise anjiyogenik hücreler ve Hofbauer hücreleridir (Ramazan Demir, 2009). Vasküler olmayan kısımlarda ise VEGFR2 proteini plasental villüslerde sitotrofoblastik tabaka ve temel stromal hücrelerde lokalizedir (Ramazan Demir, 2009).

Yapılan çalışmalarda VEGFR2 ekspresyonunun azalması GDM, IUGR ve preeklampsi gibi patolojiler ile ilişkilendirilmiştir. Meng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, GDM'li kadınlardan elde edilen plasental dokularda VEGF-A ve VEGFR2 ekspresyonlarının azaldığını ortaya koymuştur. Azalmış VEGF/VEGFR2'nin GDM'li gebelikte plasental kan bariyerini ve anjiyogenezi ve bunun sonucunda plasental

fonksiyonu etkileyebileceği bildirilmiştir (Meng ve ark., 2016). Yapılan diğer bir çalışmada ise yine kontrol grubu plasentalar GDM patolojisine sahip plasentalar ve gebelik öncesi klinik diyabet tanısı konmuş kadınların gebeliği sonucu elde edilen plasentalar üzerinde çalışılmış ve GDM'li ve gebelik öncesi diyabet tanısı konmuş kadınların plasentalarında VEGF, VEGFR-1 ve VEGFR2 protein miktarlarında kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu bulgusuna yer verilmiştir (Pietro ve ark., 2010).

Munaut ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise ELISA analizi sonuçları ile çözünür VEGFR-2 izoformunun, preeklampitik kadınların dolaşımında kontrol grubu kadınlara göre düşük seviyelerde mevcut olduğunu göstermiştir (Munaut ve ark., 2012). Bu konu ile ilişkili yapılan diğer araştırmalar ise, VEGFR-2 plazma düzeylerinin erken preeklampsi sırasında veya intrauterin büyüme geriliği olan gebeliklerde düştüğünü belgelemiştir (Wallner ve ark., 2007; Chaiworapongsa ve ark., 2008; Tripathi ve ark., 2009).

Yapılan Western Blot analizlerine göre VEGFR-2 protein miktarı DETP grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı seviyede arttığı görülmüştür. DETP grubu VEGFR2 protein miktarı TETP grubuyla karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı şekilde artmıştır. TETP ve kontrol grubu arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Western Blot sonucu VEGFR2 proteini ile ilgili elde etmiş olduğumuz bulgular literatürde bir çalışma ile uyumluluk göstermektedir (Li ve ark., 2016).

Yapmış olduğumuz immünohistokimyasal deneyler sonucunda tüm gruplarda villüs vasküler endotel hücrelerinde ve stromal hücrelerde pozitif reaksiyonlar gözlemlenmiştir. En yoğun ve en şiddetli reaksiyon kontrol grubunda gözlemlenmiştir. Vasküler endotel hücrelerinde diğer gruplara göre özellikle vasküler endotel hücrelerinde şiddetli pozitif reaksiyon görülürken, bazı villüs stromal hücrelerde pozitif reaksiyon görülmüştür. Reaksiyon şiddetine göre gruplarımız kontrol grubu, DETP grubu ve TETP grubu olarak sıralanabilir (Tablo 4.1). DETP ve TETP gruplarında da VEGFR-2 proteini için vasküler endotel hücrelerde pozitif reaksiyon görülmüştür.

Hematopoeitik Kökenli Progenitör ve Endotel Hücre Belirteci (CD34)

İnsan plasenta gelişimi sırasında damar oluşumu, hem vaskülogenez hem de anjiyogenez (mevcut damarlardan kılcal damarların filizlenmesi) yoluyla gerçekleşir (R Demir ve ark., 1989; Burton ve ark., 2009). Fetoplasental vaskülogenez, 22. günden 26. haftaya kadar kademeli olarak bağlanan hemanjiyoplastik kordların oluşumu ile ilerler (R Demir ve ark., 1989; Challier ve ark., 2001; Kaufmann ve ark., 2004). Anjiyogenez olayında ise belirteç olarak kabul edilen önemli belirteçlerinden birisi de CD34'dür (Siemerink ve ark., 2012). Yapılan bir çalışmada insan plasentasında CD34 ile beraber, CD31, VEGFR-2, Tie2, vonWillebrand Faktör (vWF) endotelyuma özgü belirteçlerin ifade edildiği gösterilmiştir (Pavlov ve ark., 2014).

CD34 ile ilgili olarak yapılan çalışmalarda CD34 ekspresyon miktarının azalması preeklampsi ile ilişkilendirilmiştir (Surbek ve ark., 2001; Sahin ve ark., 2015). Surbek ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptığı çalışmada doğum sırasında umbilikal venden alınan kordon kanı analiz edilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre CD34 eksprese eden hücrelerin sayısı preeklampsi grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azalma göstermiştir. Sahin ve arkadaşları ise 57 adet plasenta üzerinde çalışmışlar ve Submerk ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzer sonuçları elde etmişlerdir. Ayrıca CD34'ün CD131 ile birlikte preeklampsi için potansiyel bir belirteç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yapılan başka bir çalışmada CD34 immünoaktivitesinin kontrol grubu plasental kök villus ve olgun ara villüslerde yoğun boyanma gösterirken, villöz kapillerlerin endotel hücrelerinde CD34 immünoaktivitesinin IUGR plasentalarında daha az olduğu belirlenmiştir (Novac ve ark., 2018). Bu çalışmaya zıt olarak Mackiewicz ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmalarda hem kontrol plasentalarda hem IUGR plasentalarında CD34 pozitif hücre sayısı miktarının oldukça yüksek olduğu, gruplar arasında anlamlı fark olmadığı raporlanmıştır (Mackiewicz ve ark., 2021).

CD34 ile ilgili olarak yapılan diğer bir çalışmada fareler üzerinde YÜT kullanılarak elde edilen plasentalarda labirent kısımları immünohistokimyasal olarak boyanmış ve bunun sonucunda E12,5. günde YÜT plasentalarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bildirilmiştir. Aynı çalışmada E18,5. gün YÜT plasentaları ve kontrol grubu plasentaları da immünohistokimyasal olarak boyanmış ve bunun

sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır (Vrooman ve ark., 2020).

Bu çalışmada yapmış olduğumuz Western Blot analizlerine göre CD34 protein miktarı kontrol grubunda hem TETP grubuna göre hem de DETP grubuna göre daha yüksek seviyededir. Kontrol ve TETP grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı iken DETP grubu ile istatistiksel olarak anlamlı olarak bulunmuştur. DETP ve TETP grubu protein miktarı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

İmmünohistokimyasal deneyler sonucunda ise tüm gruplarda villüslerin endotel hücrelerinde ve stromal hücrelerinde pozitif reaksiyon tespit edilmiştir. Boyanmalar yoğunluklu olarak endotel hücrelerinde gözlemlenmiştir (Tablo 4.1). CD34'ün primer görevi ve anjiyogenezele ilişkisi göz önüne alındığında bu hücrelerin hematopoietik kökenli hücreler olduğu düşünülmektedir. Literatürde CD34 proteini YÜT sonucu oluşmuş plasenta örneklerinde deney hayvanlarında incelenmiş olsa da daha önce insan plasentalarında incelenmemiştir. Bu çalışmada CD34 proteini ile ilgili elde edilen veriler bu alanda bir ilk olarak kabul edilebilir.

Bu çalışmada birçok anjiyogenik faktör arasından VEGF, VEGFR-2 ve CD34 proteinleri araştırılmıştır. Araştırılan bu proteinlerden VEGF görevleri ve bilinen özellikleri sebebiyle anjiyogenik faktörler arasında anjiyogenezi en belirleyici olanıdır (Melincovici ve ark., 2018). VEGFR-2 proteini ise aktivitesi VEGFR-1'den daha düşük olmasına rağmen VEGF'e bağlanma affinitesi en yüksek reseptör olması sebebiyle anjiyogenezele en çok araştırılan proteindir. CD34 ise anjiyogenezele ilişkilendirilmiş olmasına rağmen YÜT sonucu gelişmiş gebeliklerin plasentalarında daha önce hiç araştırılmamıştır. Yine de genel olarak anjiyogeneze hakkında sağlıklı yorum yapabilmek için daha fazla metotla birlikte daha fazla sayıda pro-anjiyogenik ve anti-anjiyogenik faktörler birlikte incelenmelidir.

Bu çalışmada bulgularımız sonucunda araştırılan proteinlerden VEGFR2 proteini için DETP ve TETP grubu arasında istatistiksel olarak yüksek düzeyde anlamlı farklılıklar bulunmuştur. VEGF ve CD34 proteinleri içinse DETP ve TETP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Yapmış olduğumuz çalışmada YÜT plasentalarında anjiyogeneiz mekanizması açısından DET ve TET grubu plasentalarının birbirlerine olan avantaj ve dezavantajları ortaya konulmaya çalışılmıştır. Literatürde genel olarak İVF plasentalarında anjiyogenik faktörlerin kontrol plasentalara göre arttığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2016; Zhao ve ark., 2020). Çalışmamız sonucunda VEGF ve VEGFR-2 ile ilgili bulgularımız literatürdeki çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (Li ve ark., 2016; Zhao ve ark., 2020). CD34 ile ilgili bulgularımızın sonuçları ise farelerde YÜT teknikleri kullanılarak yapılan bir çalışmayla uyum gösterse de (Vrooman ve ark., 2020) fare ve insan bulgularını kıyaslamak sağlıklı olmayacaktır. Buna rağmen bu çalışma gelecek çalışmalara fikir sağlaması açısından öncülük edecektir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada sağlıklı kadınlardan normal doğum sonucu elde edilmiş kontrol plasentaları İVF tekniği ile elde edilmiş taze embriyo transferi sonrası gelişmiş gebeliklerden elde edilen plasentalar ve dondurulmuş embriyo transferi sonrası gelişmiş gebeliklerden elde edilen plasentalar ile çalışılmıştır. DETP grubu ve TETP grubu arasında belirlenen bazı anjiyogenik faktörler kıyaslanmıştır.

Elde edilen sonuçlar maddeler halinde aşağıda belirtilmiştir.

1. VEGF protein miktarı gruplar arasında istatistiksel olarak farklı değildir.
2. VEGFR2 protein miktarı DETP grubunda TETP ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazladır. Kontrol grubu ile TETP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark mevcut değildir.
3. CD34 protein miktarı kontrol grubunda, DETP grubu ve TETP grubuna göre istatistiksel olarak daha fazla miktarda olduğu belirlenmiştir. TETP ve DETP grubu mukayese edildiğinde ise CD34 protein miktarı için istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenememiştir.

Öneriler: İVF yöntemindeki iki farklı yaklaşımın (DET ve TET) plasental anjiyogenez mekanizması ile ilgili olarak birbirine olan avantaj ve dezavantajlarının daha net bir şekilde ortaya konulması için daha çok sayıda anjiyogenik faktör ile çalışılması, gebe sayısına bağlı olarak plasenta sayısının artırılması bu mekanizmanın anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abdalla, H., Brooks, A., Johnson, M., Kirkland, A., Thomas, A., & Studd, J. Endometrial thickness: A predictor of implantation in ovum recipients? *Human Reproduction*. 1994; 9 (2): 363-365.
- Achen, M. G., & Stacker, S. A. The vascular endothelial growth factor family; proteins which guide the development of the vasculature. *International journal of experimental pathology*. 1998; 79 (5): 255-265.
- Albuquerque, R. J. C., Hayashi, T., Cho, W. G., Kleinman, M. E., Dridi, S., Takeda, A., Ambati, J. Alternatively spliced vascular endothelial growth factor receptor-2 is an essential endogenous inhibitor of lymphatic vessel growth. *Nat Med*. 2009; 15 (9): 1023-1030.
- Azliana, A., Zainul-Rashid, M., Chandramaya, S., Farouk, W., Nurwardah, A., Wong, Y., & Tan, G. Vascular endothelial growth factor expression in placenta of hypertensive disorder in pregnancy. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 2017; 60 (4): 515-520.
- Barut, F., Barut, A., Gun, B. D., Kandemir, N. O., Harma, M. I., Harma, M., Ozdamar, S. O. Intrauterine growth restriction and placental angiogenesis. *Diagn Pathol*. 2010; 5: 24-24.
- Bertolini, M., Wallace, C. R., & Anderson, G. B. Expression profile and protein levels of placental products as indirect measures of placental function in in vitro-derived bovine pregnancies. *Reproduction*. 2006; 131 (1): 163-173.
- 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. *Human reproduction 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.
- Bradley, C. K., Livingstone, M., Traversa, M. V., & McArthur, S. J. Impact of multiple blastocyst biopsy and vitrification-warming procedures on pregnancy outcomes. *Fertility and sterility*. 2017; 108 (6): 999-1006.
- Bu, Z., Wang, K., Guo, Y., Su, Y., Zhai, J., & Sun, Y. Impact of estrogen-to-oocyte ratio on live birth rate in women undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015; 8 (7): 11327.
- Burton, G., Charnock-Jones, D., & Jauniaux, E. Regulation of vascular growth and function in the human placenta. *Reproduction*. 2009; 138 (6): 895-902.
- Cagnone, G., & Sirard, M.-A. The embryonic stress response to in vitro culture: Insight from genomic analysis. *Reproduction*. 2016; 152 (6): R247-R261.
- Cai, J., Liu, L., Zhang, J., Qiu, H., Jiang, X., Li, P., Ren, J. Low body mass index compromises live birth rate in fresh transfer in vitro fertilization cycles: A retrospective study in a chinese population. *Fertility and sterility*. 2017; 107 (2): 422-429. e422.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Eberhardt, C. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single vegf allele. *Nature*. 1996; 380 (6573): 435-439.
- Ceelen, M., van Weissenbruch, M. M., Vermeiden, J. P., van Leeuwen, F. E., & Delemarre-van de Waal, H. A. Cardiometabolic differences in children born after in vitro fertilization: Follow-up study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008; 93 (5): 1682-1688.

Celik-Ozenci, C., Akkoyunlu, G., Kayisli, U. A., Arici, A., & Demir, R. Localization of vascular endothelial growth factor in the zona pellucida of developing ovarian follicles in the rat: A possible role in destiny of follicles. *Histochemistry and cell biology*. 2003; 120 (5): 383-390.

Celik-Ozenci, C., Akkoyunlu, G., Korgun, E. T., Savas, B., & Demir, R. Expressions of vegf and its receptors in rat corpus luteum during interferon alpha administration in early and pseudopregnancy. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 2004; 67 (4): 414-423.

Chaiworapongsa, T., Romero, R., Gotsch, F., Espinoza, J., Nien, J. K., Goncalves, L., Kusanovic, J. P. Low maternal concentrations of soluble vascular endothelial growth factor receptor-2 in preeclampsia and small for gestational age. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 2008; 21 (1): 41-52.

Challier, J.-C., Vervelle, C., & Uzan, S. Ontogenesis of villi and fetal vessels in the human placenta. *Fetal diagnosis and therapy*. 2001; 16 (4): 218-226.

Cheng, K.-R., Fu, X.-W., Zhang, R.-N., Jia, G.-X., Hou, Y.-P., & Zhu, S.-E. Effect of oocyte vitrification on deoxyribonucleic acid methylation of h19, peg3, and snrpn differentially methylated regions in mouse blastocysts. *Fertility and sterility*. 2014; 102 (4): 1183-1190. e1183.

Cooper, J., Sharkey, A., McLaren, J., Charnock-Jones, D., & Smith, S. Localization of vascular endothelial growth factor and its receptor, flt, in human placenta and decidua by immunohistochemistry. *Reproduction*. 1995; 105 (2): 205-213.

Davis, S., Aldrich, T. H., Jones, P. F., Acheson, A., Compton, D. L., Jain, V., Maisonpierre, P. C. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996; 87 (7): 1161-1169.

Delle Piane, L., Lin, W., Liu, X., Donjacour, A., Minasi, P., Revelli, A., Rinaudo, P. Effect of the method of conception and embryo transfer procedure on mid-gestation placenta and fetal development in an ivf mouse model. *Human reproduction*. 2010; 25 (8): 2039-2046.

Demir, R. Expression of vegf receptors vegfr-1 and vegfr-2, angiopoietin receptors tie-1 and tie-2 in chorionic villi tree during early pregnancy. *Folia Histochemica et Cytobiologica*. 2009; 47 (3): 435-445.

Demir, R., Kaufmann, P., Castellucci, M., Erben, T., & Kotowski, A. Fetal vasculogenesis and angiogenesis in human placental villi. *Cells Tissues Organs*. 1989; 136 (3): 190-203.

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.

Duranthon, V., & Chavatte-Palmer, P. Long term effects of art: What do animals tell us? *Molecular Reproduction and Development*. 2018; 85 (4): 348-368.

Dvorak, H. F., Brown, L. F., Detmar, M., & Dvorak, A. M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *The American journal of pathology*. 1995; 146 (5): 1029.

Eroglu, A., & Layman, L. C. (2012). *Role of art in imprinting disorders*. Paper presented at the Seminars in reproductive medicine.

Ertzeid, G., & Storeng, R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Human Reproduction*. 2001; 16 (2): 221-225.

Farhi, J., Haroush, A. B., 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. *Reproductive biomedicine online*. 2010; 21 (3): 331-337.

Fauque, P., Mondon, F., Letourneur, F., Ripoché, M.-A., Journot, L., Barbaux, S., Jouannet, P. In vitro fertilization and embryo culture strongly impact the placental transcriptome in the mouse model. *PloS one*. 2010; 5 (2): e9218.

Ferrara, N. (2002). *Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: Therapeutic implications*. Paper presented at the Seminars in oncology.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Moore, M. W. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the vegf gene. *Nature*. 1996; 380 (6573): 439-442.

Ferrara, N., & Davis-Smyth, T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews*. 1997; 18 (1): 4-25.

Ferriani, R. A., Ahmed, A., Sharkey, A., & Smith, S. K. Colocalization of acidic and basic fibroblast growth factor (fgf) in human placenta and the cellular effects of bfgf in trophoblast cell line jeg-3. *Growth factors*. 1994; 10 (4): 259-268.

Feuer, S., Camarano, L., & Rinaudo, P. Art and health: Clinical outcomes and insights on molecular mechanisms from rodent studies. *Molecular human reproduction*. 2013; 19 (4): 189-204.

Flamme, I., & Risau, W. Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*. 1992; 116 (2): 435-439.

Fujimoto, V. Y., Luke, B., Brown, M. B., Jain, T., Armstrong, A., Grainger, D. A., Group, S. f. A. R. T. W. Racial and ethnic disparities in assisted reproductive technology outcomes in the united states. *Fertility and sterility*. 2010; 93 (2): 382-390.

Gardner, D. K., Lane, M., & Schoolcraft, W. B. Culture and transfer of viable blastocysts: A feasible proposition for human ivf. *Human Reproduction (Oxford, England)*. 2000; 15: 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. *Fertility and sterility*. 2000; 73 (6): 1155-1158.

Giritharan, G., Li, M., De Sebastiano, F., Esteban, F., Horcajadas, J., Lloyd, K. C., . . . Rinaudo, P. Effect of icsi on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. *Human reproduction*. 2010; 25 (12): 3012-3024.

Grafodatskaya, D., Cytrynbaum, C., & Weksberg, R. The health risks of art. *EMBO Rep*. 2013; 14 (2): 129-135.

Güzel, D. Damar oluşum fizyolojisi ve vasküler endotelial büyüme faktörü. *Journal of Human Rhythm*. 2015; 1 (2): 42-45.

Hanahan, D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science*. 1997; 277 (5322): 48-50.

Hart, R., & Norman, R. J. The longer-term health outcomes for children born as a result of ivf treatment. Part ii—mental health and development outcomes. *Human Reproduction Update*. 2013a; 19 (3): 244-250.

Hart, R., & Norman, R. J. The longer-term health outcomes for children born as a result of ivf treatment: Part i—general health outcomes. *Human Reproduction Update*. 2013b; 19 (3): 232-243.

Henningsen, A.-K. A., Pinborg, A., Lidegaard, Ø., 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. *Fertility and sterility*. 2011; 95 (3): 959-963.

Herr, F., Baal, N., Widmer-Teske, R., McKinnon, T., & Zygmont, M. How to study placental vascular development? *Theriogenology*. 2010; 73 (6): 817-827.

Herr, F., Baal, N., & Zygmunt, M. Studies of placental vasculogenesis: A way to understand pregnancy pathology? *Zeitschrift für Geburtshilfe und Neonatologie*. 2009; 213 (03): 96-100.

Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., & Shibuya, M. Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95 (16): 9349-9354.

Honorato, T., Hoek, A., Henningsen, A.-K., Pinborg, A., Lidegaard, O., Mooij, T., Haadsma, M. Low oocyte yield during ivf treatment and the risk of a trisomic pregnancy. *Reproductive biomedicine online*. 2017; 35 (6): 685-692.

Huber, T. L., Kouskoff, V., Fehling, H. J., Palis, J., & Keller, G. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*. 2004; 432 (7017): 625-630.

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. *Fertility and sterility*. 2012; 97 (6): 1374-1379.

Imudia, A. N., Awonuga, A. O., Kaimal, A. J., Wright, D. L., Styer, A. K., & Toth, T. L. Elective cryopreservation of all embryos with subsequent cryothaw embryo transfer in patients at risk for ovarian hyperstimulation syndrome reduces the risk of adverse obstetric outcomes: A preliminary study. *Fertility and sterility*. 2013; 99 (1): 168-173.

Irrázaval, I., Rolle, A. J., Gutiérrez, J. I., Moreno Mauro, R. D., & Santos Alcántara, M. In vitro fertilization (ivf) in mammals: Epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for ivf in humans. 2015.

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.

Ishihara, O., Araki, R., Kuwahara, A., Itakura, A., Saito, H., & Adamson, G. D. Impact of frozen-thawed single-blastocyst transfer on maternal and neonatal outcome: An analysis of 277,042 single-embryo transfer cycles from 2008 to 2010 in japan. *Fertility and sterility*. 2014; 101 (1): 128-133.

Iwasaki, Y., Terayama, E., Kato, A., Ito, R., Saito, K., Makino, T., & Nakazawa, H. Quantitative analysis of perfluorinated chemicals in media for in vitro fertilization and related samples. *Chemosphere*. 2012; 88 (4): 445-449.

Jackson, R. A., Gibson, K. A., Wu, Y. W., & Croughan, M. S. Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: A meta-analysis. *Obstetrics and gynecology*. 2004; 103 (3): 551-563.

Jauniaux, E., Englert, Y., Vanesse, M., Hiden, M., & Wilkin, P. Pathologic features of placentas from singleton pregnancies obtained by in vitro fertilization and embryo transfer. *Obstetrics and gynecology*. 1990; 76 (1): 61-64.

Jiang, Z., Wang, Y., Lin, J., Xu, J., Ding, G., & Huang, H. Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2017; 44: 90-104.

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. *Fertility and sterility*. 2010; 93 (2): 442-446.

Kalra, S. K., Ratcliffe, S. J., Coutifaris, C., Molinaro, T., & Barnhart, K. T. Ovarian stimulation and low birth weight in infants conceived through in vitro fertilization. *Obstetrics and gynecology*. 2011; 118 (4): 863.

Kalra, S. K., 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. *Fertility and sterility*. 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. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2012; 161 (1): 46-50.

Kaufmann, P., Mayhew, T., & Charnock-Jones, D. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta*. 2004; 25 (2-3): 114-126.

Kingdom, J., Huppertz, B., Seaward, G., & Kaufmann, P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2000; 92 (1): 35-43.

Kul, S. İstatistik sonuçlarının yorumu: P değeri ve güven aralığı nedir?/interpretation of statistical results: What is p value and confidence interval? *Plevra Bülteni*. 2014; 8 (1): 11.

Lee, M. S., Cantonwine, D., Little, S. E., McElrath, T. F., Parry, S. I., Lim, K.-H., & Wilkins-Haug, L. E. Angiogenic markers in pregnancies conceived through in vitro fertilization. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2015a; 213 (2): 212.e211-212. e218.

Lee, M. S., Cantonwine, D., Little, S. E., McElrath, T. F., Parry, S. I., Lim, K. H., & Wilkins-Haug, L. E. Angiogenic markers in pregnancies conceived through in vitro fertilization. *Am J Obstet Gynecol*. 2015b; 213 (2): 212.e211-218.

Li, C., Zhang, Y., Tang, L., Zhao, H., Gao, C., Gao, L., Liu, J. Expression of factors involved in the regulation of angiogenesis in the full-term human placenta: Effects of in vitro fertilization. *Reprod Biol*. 2016; 16 (2): 104-112.

Mackiewicz, E., Dudek, G., Gùàb, J., Kubicki, Y., Kontinen, Mackiewicz, Z., Kontinen, Y. Zygumnt cd34 + stem cells in normal placenta tissues and in placenta with intrauterine growth retardation. 2021.

Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., & Persico, M. G. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991; 88 (20): 9267-9271.

Maheshwari, A., Pandey, S., Amalraj Raja, E., Shetty, A., Hamilton, M., & Bhattacharya, S. Is frozen embryo transfer better for mothers and babies? Can cumulative meta-analysis provide a definitive answer? *Hum Reprod Update*. 2018; 24 (1): 35-58.

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.

Mansour, R., Ishihara, O., Adamson, G. D., Dyer, S., de Mouzon, J., Nygren, K. G., Zegers-Hochschild, F. International committee for monitoring assisted reproductive technologies world report: Assisted reproductive technology 2006. *Human Reproduction*. 2014; 29 (7): 1536-1551.

Maynard, S. E., & Karumanchi, S. A. Angiogenic factors and preeclampsia. *Semin Nephrol*. 2011; 31 (1): 33-46.

Melincovici, C. S., Bosca, A. B., Susman, S., Marginean, M., Mihiu, C., Istrate, M., Mihiu, C. M. Vascular endothelial growth factor (vegf)-key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018; 59 (2): 455-467.

Meng, Q., Shao, L., Luo, X., Mu, Y., Xu, W., Gao, L., Cui, Y. Expressions of vegf-a and vegfr-2 in placentae from gdm pregnancies. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2016; 14 (1): 1-9.

Miles, J. R., Farin, C. E., Rodriguez, K. F., Alexander, J. E., & Farin, P. W. Effects of embryo culture on angiogenesis and morphometry of bovine placentas during early gestation. *Biology of reproduction*. 2005; 73 (4): 663-671.

Millauer, B., Shawver, L. K., Plate, K. H., Risau, W., & Ullrich, A. Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative flk-1 mutant. *Nature*. 1994; 367 (6463): 576-579.

Millauer, B., Witzigmann-Voos, S., Schnürch, H., Martinez, R., Møller, N. P. H., Risau, W., & Ullrich, A. High affinity vegf binding and developmental expression suggest flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell*. 1993; 72 (6): 835-846.

Monacci, W. T., Merrill, M. J., & Oldfield, E. H. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in normal rat tissues. *The American journal of physiology*. 1993; 264 (4 Pt 1): C995-1002.

Moyon, D., Pardanaud, L., Yuan, L., Bréant, C., & Eichmann, A. Selective expression of angiopoietin 1 and 2 in mesenchymal cells surrounding veins and arteries of the avian embryo. *Mechanisms of development*. 2001; 106 (1-2): 133-136.

Munaut, C., Lorquet, S., Pequeux, C., Coulon, C., Le Goarant, J., Chantraine, F., Foidart, J. M. Differential expression of vegfr-2 and its soluble form in preeclampsia. *PLoS One*. 2012; 7 (3): e33475.

Novac, M. V., Niculescu, M., Manolea, M. M., Dijmărescu, A. L., Iliescu, D. G., Novac, M. B., Tudorache, Ș. Placental findings in pregnancies complicated with iugr-histopathological and immunohistochemical analysis. *Romanian journal of morphology and embryology= Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2018; 59 (3): 715-720.

Nyboe Andersen, A., Goossens, V., Ferraretti, A. P., Bhattacharya, S., Felberbaum, R., de Mouzon, J., Embryology. Assisted reproductive technology in europe, 2004: Results generated from european registers by eshre. *Human Reproduction*. 2008; 23 (4): 756-771.

Pavlov, N., Frendo, J.-L., Guibourdenche, J., Degrelle, S. A., Evain-Brion, D., & Badet, J. Angiogenin expression during early human placental development; association with blood vessel formation. *BioMed research international*. 2014; 2014.

Pereira, N., Reichman, D. E., Goldschlag, D. E., Lekovich, J. P., & Rosenwaks, Z. Impact of elevated peak serum estradiol levels during controlled ovarian hyperstimulation on the birth weight of term singletons from fresh ivf-et cycles. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2015; 32 (4): 527-532.

Pietro, L., Daher, S., Rudge, M. V., Calderon, I. M., Damasceno, D. C., Sinzato, Y. K., Bevilacqua, E. Vascular endothelial growth factor (vegf) and vegf-receptor expression in placenta of hyperglycemic pregnant women. *Placenta*. 2010; 31 (9): 770-780.

Qin, J., Liu, X., Sheng, X., Wang, H., & Gao, S. Assisted reproductive technology and the risk of pregnancy-related complications and adverse pregnancy outcomes in singleton pregnancies: A meta-analysis of cohort studies. *Fertility and sterility*. 2016; 105 (1): 73-85. e76.

Reynolds, M., & Schieve, L. Trends in embryo transfer practices and multiple gestation for ivf procedures in the USA, 1996–2002. *Human Reproduction*. 2006; 21 (3): 694-700.

Ribatti, D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: A historical review. *British journal of haematology*. 2005; 128 (3): 303-309.

Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386 (6626): 671-674.

Risau, W., Esser, S., & Engelhardt, B. Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. *Pathologie-biologie*. 1998; 46 (3): 171-175.

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. *Fertility and sterility*. 2013; 99 (1): 156-162.

Rosenstein, J. M., & Krum, J. M. New roles for vegf in nervous tissue—beyond blood vessels. *Experimental neurology*. 2004; 187 (2): 246-253.

Rudge, M. V. C., Costa, E., Barbisan, L. F., Damasceno, D. C., Bueno, A., Saito, F. H., Rodrigues, M. M. P. Evaluation of cell proliferation and apoptosis in placentas of rats with severe diabetes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2012; 55 (2): 243-250.

Saenz-de-Juano, M., Billooye, K., Smits, J., & Anckaert, E. The loss of imprinted DNA methylation in mouse blastocysts is inflicted to a similar extent by in vitro follicle culture and ovulation induction. *Molecular human reproduction*. 2016; 22 (6): 427-441.

Sahin, H., Gunel, T., Benian, A., Onay Ucar, E., Guralp, O., & Kilic, A. Genomic and proteomic investigation of preeclampsia. *Experimental and therapeutic medicine*. 2015; 10 (2): 711-716.

Sazonova, A., Källen, K., Thurin-Kjellberg, A., Wennerholm, U.-B., & Bergh, C. Neonatal and maternal outcomes comparing women undergoing two in vitro fertilization (ivf) singleton pregnancies and women undergoing one ivf twin pregnancy. *Fertility and sterility*. 2013; 99 (3): 731-737.

Scherrer, U., Rexhaj, E., Allemann, Y., Sartori, C., & Rimoldi, S. F. Cardiovascular dysfunction in children conceived by assisted reproductive technologies. *European heart journal*. 2015; 36 (25): 1583-1589.

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. *New England Journal of Medicine*. 2002; 346 (10): 731-737.

Shalaby, F., Ho, J., Stanford, W. L., Fischer, K.-D., Schuh, A. C., Schwartz, L., Rossant, J. A requirement for flk1 in primitive and definitive hematopoiesis and vasculogenesis. *Cell*. 1997; 89 (6): 981-990.

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. *Fertility and sterility*. 2011; 96 (2): 344-348.

Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor receptor-1 (vegfr-1/flt-1): A dual regulator for angiogenesis. *Angiogenesis*. 2006; 9 (4): 225-230.

Siemerink, M. J., Klaassen, I., Vogels, I. M. C., Griffioen, A. W., Van Noorden, C. J. F., & Schlingemann, R. O. Cd34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*. 2012; 15 (1): 151-163.

Spijkers, S., Lens, J. W., Schats, R., & Lambalk, C. B. Fresh and frozen-thawed embryo transfer compared to natural conception: Differences in perinatal outcome. *Gynecol Obstet Invest*. 2017; 82 (6): 538-546.

Stanhiser, J., Hayward, B., Ansari, S., Mahony, M. C., Fritz, M. A., & Mersereau, J. E. Fresh transfer compared to primary frozen embryo transfer (fet): Retrospective analysis of demographics, cycle characteristics and implantation, pregnancy, and live birth rates. *Fertility and Sterility*. 2017; 108 (3): e330-e331.

Steel, A. J., & Sutcliffe, A. Long-term health implications for children conceived by ivf/icsi. *Human fertility*. 2009; 12 (1): 21-27.

Sunderam, S., Kissin, D. M., Crawford, S. B., Folger, S. G., Jamieson, D. J., Warner, L., Prevention. Assisted reproductive technology surveillance - united states, 2013. *MMWR Surveill Summ*. 2015; 64 (11): 1-25.

Surbek, D. V., Danzer, E., Steinmann, C., Tichelli, A., Wodnar-Filipowicz, A., Hahn, S., & Holzgreve, W. Effect of preeclampsia on umbilical cord blood hematopoietic progenitor-stem cells. *American journal of obstetrics and gynecology*. 2001; 185 (3): 725-729.

Suri, C., Jones, P. F., Patan, S., Bartunkova, S., Maisonpierre, P. C., Davis, S., Yancopoulos, G. D. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the tie2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996; 87 (7): 1171-1180.

Sutcliffe, A. G., & Ludwig, M. Outcome of assisted reproduction. *The Lancet*. 2007; 370 (9584): 351-359.

Tamanini, C., & De Ambrogi, M. Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reproduction in Domestic Animals*. 2004; 39 (4): 206-216.

Tammela, T., Zarkada, G., Wallgard, E., Murtomäki, A., Suchting, S., Wirzenius, M., Peltonen, R. Blocking vegfr-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature*. 2008; 454 (7204): 656-660.

Thoma, M. E., Boulet, S., Martin, J. A., & Kissin, D. Births resulting from assisted reproductive technology: Comparing birth certificate and national art surveillance system data, 2011. *National vital statistics reports: from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*. 2014; 63 (8): 1-11.

Tripathi, R., Rath, G., Ralhan, R., Saxena, S., & Salhan, S. Soluble and membranous vascular endothelial growth factor receptor-2 in pregnancies complicated by pre-eclampsia. *Yonsei medical journal*. 2009; 50 (5): 656.

Vaisbuch, E., de Ziegler, D., Leong, M., Weissman, A., & Shoham, Z. Luteal-phase support in assisted reproduction treatment: Real-life practices reported worldwide by an updated website-based survey. *Reproductive biomedicine online*. 2014; 28 (3): 330-335.

Veleva, Z., Orava, M., Nuojua-Huttunen, S., Tapanainen, J. S., & Martikainen, H. Factors affecting the outcome of frozen-thawed embryo transfer. *Hum Reprod*. 2013; 28 (9): 2425-2431.

Vikkula, M., Boon, L. M., Iii, K. L. C., Calvert, J. T., Diamonti, A. J., Goumnerov, B., Cantley, L. C. Vascular dysmorphogenesis caused by an activating mutation in the receptor tyrosine kinase tie2. *Cell*. 1996; 87 (7): 1181-1190.

Vrooman, L. A., Rhon-Calderon, E. A., Chao, O. Y., Nguyen, D. K., Narapareddy, L., Dahiya, A. K., Bartolomei, M. S. Assisted reproductive technologies induce temporally specific placental defects and the preeclampsia risk marker sflt1 in mouse. *Development*. 2020; 147 (11): dev186551.

Vuorela, P., Hatva, E., Lymboussaki, A., Kaipainen, A., Joukov, V., Persico, M. G., Halmesmäki, E. Expression of vascular endothelial growth factor and placenta growth factor in human placenta. *Biology of reproduction*. 1997; 56 (2): 489-494.

Wallner, W., Sengenberger, R., Strick, R., Strissel, P. L., Meurer, B., Beckmann, M. W., & Schlembach, D. Angiogenic growth factors in maternal and fetal serum in

pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Clinical science*. 2007; 112 (1): 51-57.

Wang, J., & Sauer, M. V. In vitro fertilization (ivf): A review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Therapeutics and clinical risk management*. 2006; 2 (4): 355.

Wei, D., Sun, Y., Liu, J., Liang, X., Zhu, Y., Shi, Y., & Chen, Z.-J. Live birth after fresh versus frozen single blastocyst transfer (frefro-blastocyst): Study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2017; 18 (1): 1-7.

Weinerman, R., & Mainigi, M. Why we should transfer frozen instead of fresh embryos: The translational rationale. *Fertility and sterility*. 2014; 102 (1): 10-18.

Wilkins-Haug, L. Assisted reproductive technology, congenital malformations, and epigenetic disease. *Clinical obstetrics and gynecology*. 2008; 51 (1): 96-105.

Woo, I., Chan, Y., Sriprasert, I., Louie, K., Ingles, S., Stanczyk, F., Chung, K. The role of angiogenic markers in adverse perinatal outcomes: Fresh versus frozen embryo transfers. *J Assist Reprod Genet*. 2017; 34 (12): 1639-1643.

Zhang, J., Du, M., Li, Z., Wang, L., Hu, J., Zhao, B., Sun, L. Fresh versus frozen embryo transfer for full-term singleton birth: A retrospective cohort study. *Journal of Ovarian Research*. 2018; 11 (1): 59.

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.

Zhao, L., Sun, L., Zheng, X., Liu, J., Zheng, R., Yang, R., & Wang, Y. In vitro fertilization and embryo transfer alter human placental function through trophoblasts in early pregnancy. *Molecular medicine reports*. 2020; 21 (4): 1897-1909.

Zheng, J., Johnson, M. L., Redmer, D. A., & Reynolds, L. P. Estrogen and progesterone receptors, cell proliferation, and c-fos expression in the ovine uterus during early pregnancy. *Endocrinology*. 1996; 137 (1): 340-348.

Zheng, Y.-M., Li, L., Zhou, L.-M., Le, F., Cai, L.-Y., Yu, P., Li, L.-J. Alterations in the frequency of trinucleotide repeat dynamic mutations in offspring conceived through assisted reproductive technology. *Human reproduction*. 2013; 28 (9): 2570-2580.

Zhou, Y., McMaster, M., Woo, K., Janatpour, M., Perry, J., Karpanen, T., Fisher, S. J. Vascular endothelial growth factor ligands and receptors that regulate human cytotrophoblast survival are dysregulated in severe preeclampsia and hemolysis, elevated liver enzymes, and low platelets syndrome. *The American journal of pathology*. 2002; 160 (4): 1405-1423.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Emre	Uyruğu	T.C.
Soyadı	ÇETİNDAG	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Kemalpaşa Beri Şaşal Anadolu Lisesi	2012
Lisans	Gebze Teknik Üniversitesi	2018
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	Yök-Dil	61,250

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler:

Poster sunumu, Elektron Mikroskopi Kongresi. 24-26 Nisan.

“YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ SONUCU GERÇEKLEŞEN GEBELİKLERİN PLASENTALARINDA ANJİYOGENEZ MEKANİZMASININ İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK İNCELENMESİ”

"Does fresh or frozen embryo transfer affect imprinted gene expressions in human term placenta?", Acta Histochem, 123 (3), 151694. Ozmen, A., Kipmen-Korgun, D., Isenlik, B. S., Erman, M., Sakinci, M., Berkkanoglu, M., Coetzee, K., Ozgur, K., Cetindag, E., Yanar, K., Korgun, E. T. 2021.

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

"Contribution of Human Trophoblast Progenitor Cells to Neurogenesis in Rat Focal Cerebral Ischemia Model", Brain Inj, 1-13. Yanar, K., Molbay, M., Özaydın-Goksu, E., Unek, G., Cetindağ, E., Unal, A., Korgun, E. T. 2021.