

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

NORMAL VE METABOLİK OLARAK ZORLANAN
PREİMLANTİF EMBRİYOLARIN
METABOLİZMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Nilay KUŞCU

DOKTORA TEZİ

2020-ANTALYA

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

NORMAL VE METABOLİK OLARAK ZORLANAN
PREİMLANTİF EMBRİYOLARIN
METABOLİZMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Nilay KUŞCU

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2016-1795 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2020-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 15/01/2020

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCI
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Necdet DEMİR
Akdeniz Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Alp CAN
Ankara Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKCU
Ankara Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Enver Kerem DİRİCAN
Akdeniz Üniversitesi



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

Prof. Dr. Narin DERİN
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.



Nilay KUŞCU



Tez Danışmanı

Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ

TEŐEKKÜR

Teőekkürün en büyüğünü lisansüstü eğitimim ve akademik hayatım boyunca her zaman yanımda olarak en büyük destekçim olan, motivasyonunu, bilimsel, manevi ve maddi katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Çiler ÇELİK ÖZENCİ'ye etmek isterim.

Doktora tez projem süresi içerisinde beni laboratuvarlarına kabul edip çalışma imkanı sunan Prof. Dr. Daniel J. Needleman ve Harvard Üniversitesi Needleman Laboratuvarının tüm çalışanlarına,

Akademik hayatıma doktora tez sürecimde dahil olmak üzere tüm katkıları ve benden eksik etmedikleri destekleri, ilgileri ve sevgileri için Prof. Dr. Alp CAN'a, Doç. Dr. İ. Sinan ÖZKAVUKCU'ya ve Prof. Dr. Özgür ÇINAR'a ve bana laboratuvarlarında çalışma imkanı veren Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli çalışanlarına,

2214-A burs programı kapsamında Harvard Üniversitesi'ne gitmeme ve akademik kariyerime bu katkıyı yapmama olanak sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)'na,

Dokuz yıldır aile gibi görerek parçası olduğum Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli çalışanlarına,

Lisansüstü eğitim sürecimde yardımları ve destekleri için Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tüm değerli çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her zaman yanımda olarak istediğim hedeflere yürüdüğüm bu yolda manevi ve maddi katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen canım annem, canım babam ve canım ablama teşekkürlerin en büyüğünü sunmak isterim.

ÖZET

Amaç: Kliniklerde morfolojik parametrelere dayalı embriyo değerlendirmeleri yapılmaktadır. Ancak morfolojik kriterlere ek olarak kullanılacak ve embriyonun metabolik durumu hakkında bilgi verebilen yeni fakat invaziv girişimlerin bilinen olumsuz etkileri nedeniyle invaziv olmayan biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda normal ve metabolik olarak zorlanan preimplantif dönem fare embriyo metabolizmalarının, NADH ve FAD moleküllerinin otofloresan sinyallerinin invaziv olmayan FLIM ve konfokal mikroskobu ile ölçülmesi ve belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: FLIM ile NADH ve FAD ve konfokal mikroskobu ile FAD ölçümleriyle özellikle farklı besin, oksijen konsantrasyonu ve mitokondriyon bozucuları varlığında embriyo metabolizma yanıtları belirlenmiştir. Ayrıca anoksik embriyoların hangi metabolik yolağı enerji kaynağı olarak kullandığını belirlemek amacı ile Glut1 lokalizasyonu immünfloresan yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Bulgular: FLIM ile embriyo metabolizmasının farklı besin düzeyi ve oksijen koşullarına verdiği yanıtlar NADH ve FAD aracılığıyla belirlenerek embriyo metabolizma profilleri ortaya çıkarılmıştır. Konfokal mikroskobunun daha kolay uygulanabilir bir teknik olmasının avantajını kullanarak mitokondriyal belirteçlere benzeyen hatta daha seçici olan FAD ölçümü ile embriyo metabolizmasının belirlenebileceği gösterilmiştir. Ayrıca, anoksik koşullarda bölünen ve enerji kaynağı olarak oksijen bağımlı prekompaksiyon embriyoların bunu nasıl gerçekleştirdiği sorusundan doğan Glut1 sonuçlarına göre, anoksik koşullardaki erken evre embriyolarda Glut1'in ekspresyonunu artırarak membrana yerleştiği gösterilmiştir.

Sonuç: Çalışmamız sonucunda normal ve metabolik olarak zorlanan preimplantif dönem fare embriyo metabolizmalarının değerlendirilmesiyle elde edilen veriler, özellikle prekompaksiyon dönem embriyo metabolizması hakkında ilk kez detaylı bilgi sağlamıştır. Bu metabolik verilerin kullanımıyla ileriye yönelik "kaliteli embriyo seçimi" için kullanılacak yeni bir biyobelirteçin (örn; otofloresan FAD) oluşturulmasına ve ileri çalışmaların planlanmasına biyolojik ve teknolojik temel katkı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Embriyo metabolizması, mitokondriya, NADH, FAD, mikroskopi

ABSTRACT

Objective: Morphological assessment remains the primary method of embryo evaluation in ART. However, as a biomarker, noninvasive methods because of the well-known adverse effect of the invasive methods for assessing embryo metabolism has been needed besides morphological assessment. In our study, we aimed to determine and to measure of normal and metabolically challenged mouse embryo metabolism using FLIM and confocal microscopy via autofluorescence NADH and FAD.

Method: Under different nutrient, different oxygen and mitochondrial uncoupler conditions, the response of the embryo metabolism has been determined using NADH and FAD via FLIM and using FAD via confocal microscopy. On the other hand, the expression patterns of Glut1 has been determined by immunofluorescence to reveal which metabolic pathway has been used to produce energy by anoxic embryos.

Results: Embryo metabolism profiles have been revealed from the response of embryo metabolism under different nutrient and oxygen conditions using NADH and FAD via FLIM. Also, it has been showed that embryo metabolism can be measured using FAD not only other mitochondrial markers but also more selectively via confocal microscopy. Moreover, cell division of the anoxic embryos suggest a question: how these oxygen addicted precompaction embryos to produce energy could make it happen? Based on that question, we investigated the expression pattern of Glut1 and it is showed that expression of the Glut1 is increased and it is localized in the cell membrane under anoxia.

Conclusion: In our study, for the first time, the detail information has been revealed about precompaction mouse embryos via evaluation of the metabolism of the normal and metabolically challenged embryos. The data from our study may contribute to create a new biomarker to select the best embryo and also contribute biological and technical information for the future studies.

Key words: Embryo metabolism, mitochondria, NADH, FAD, microscopy.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	
2.1. Preimplantif Embriyo Gelişim Süreci	3
2.2. Mitokondriyanın Yapısı	4
2.3. Hücrede Enerji Üretimi	5
2.4. Mitokondri ve Preimplantif Dönem	12
2.4.1. Mitokondriyal DNA ve Preimplantif Dönem Embriyo İlişkisi	12
2.4.2. Preimplantif dönemde “Sessiz Embriyo” Hipotezi ve Mitokondri İlişkisi	13
2.4.3. Preimplantif Dönem Embriyo Metabolizması ve Enerji Üretimi.	14
2.5. Embriyo Canlılığının Belirlenmesi ve Mitokondrinin Önemi.	16
2.5.1. Metabolizma Çalışmalarında Biyo-belirteç Olarak Kullanılan NADH ve FAD Moleküllerinin Özellikleri ve Önemi	17
2.6. Çalışmanın Çıkış Noktası, Hipotezi ve Amacı	20
3. GEREÇ ve YÖNTEM	
3.1. Metabolizma ölçümünde invaziv olmayan FLIM tekniğinin kullanılması	22
3.1.1. Embriyo Eldesi ve Kullanıma Hazırlanması	22
3.1.2. FILM Tekniğinde Kullanılan Kültür Koşulları ve Oluşturulan Gruplar	22
3.1.3. Floresan Yarı Ömrü Görüntüleme Mikroskobu (FLIM) tekniğinin kullanımı ve yapılan ölçümler	27
3.2. Metabolizma ölçümünde invaziv olmayan Konfokal mikroskopi tekniğinin kullanılması	31
3.2.1. Embriyoların süperovulasyon ile eldesi ve kullanıma hazırlanması	31

3.2.2. Grupların oluşturulması ve embriyo kültür koşulları	32
3.2.3. Konfokal Mikroskopi Tekniğinin Kullanımı ve Yapılan Ölçümler	35
3.2.4. Konfokal mikroskopi tekniği kullanılarak canlı mitokondri değerlendirilmesi	35
3.2.5. İmmünofloresans Yöntemi	35
3.2.6. Floresan Sinyallerin Kantifikasyonu ve Analizi	37
3.2.7. İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR	
4.1. FLIM tekniği kullanılarak elde edilen metabolizma verileri	38
4.1.1. Farklı besin içeriklerindeki medyumlar kullanılarak metabolik olarak zorlanan embriyoların kültürü ve embriyo metabolizma yanıtlarının ölçümü	38
4.1.2. Farklı besin içeriklerindeki medyumlarda metabolik olarak zorlanan embriyo kültürünün oksijen düzeyinin kısa süreliğine değiştirilmesi ile kombinasyonu ve embriyo metabolizma yanıtlarının ölçümü	42
4.1.3. Medyum değişim sistemi ile metabolik olarak zorlanan embriyolara siyanid uygulaması ve metabolizma yanıtlarının ölçümü	45
4.1.4. Embriyonun anoksik ortamda kültüre edilmesi ve elde edilen sonuçlar	47
4.2. Konfokal mikroskopi tekniği kullanılarak elde edilen metabolizma verileri	51
5. TARTIŞMA	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Fare (A) ve insanda (B) gerçekleşen preimplantasyon gelişim sürecinin evreleri ve zamansal sürecin gösterimi	4
Şekil 2.2.	İnsan mitokondri genom düzenlenmesini gösteren şekil	6
Şekil 2.3.	Hücre içi enerji üretim mekanizmaları	7
Şekil 2.4.	Fare (A) ve insanda (B) gerçekleşen preimplantasyon gelişim sürecinin evreleri ve zamansal sürecin gösterimi	12
Şekil 2.5.	Preimplantif dönem embriyoların gelişim basamakları	16
Şekil 2.6.	Yarıklanma dönemindeki preimplantif embriyo metabolizması	17
Şekil 2.7.	Bir fare oositindeki sitozolik ve mitokondriyal kompartmanlardan üretilen NADH ve FAD otofloresanları	21
Şekil 3.1.	Kültür medyumu değişim sistemi için yapılması tasarlanan sistemin şematik çizimi	27
Şekil 3.2.	Kültür medyumu değişim sistemi için yapılması tasarlanan sistemin FLIM donanımına yerleştirilmiş görüntüsü	28
Şekil 3.3.	Tekli foton mikroskopisi kullanılarak görüntülenebilen, NADH/FAD spekturumu	30
Şekil 3.4.	FLIM ile yapılan bir metabolik görüntülemenin şematik çizimi	32
Şekil 3.5.	GEOTECH, G100 ile oksijen seviyesinin %0 olarak belirlendiğini gösteren fotoğraf	35
Şekil 4.1.	Zigotların blastosist aşamasına kadar kültüre edilmesi sonucunda elde edilen sonuçlar	40

Şekil 4.2	Farklı besin kompozisyonlarında kültüre edilen embriyolardan FLIM aracılığıyla elde edilen NADH ve FAD ölçümleri	43
Şekil 4.3.	Yalnızca pürivat içeren KSOM içerisinde kültüre edilen embriyolardan gelen ve oksijen düzeylerinin değiştirilmesiyle kombine gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen NADH and FAD ölçümleri	44
Şekil 4.4.	Pürivat ve laktat içeren KSOM içerisinde kültüre edilen embriyolardan gelen ve oksijen düzeylerinin değiştirilmesiyle kombine gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen NADH and FAD ölçümleri. NADH ve FAD floresan yoğunlukları ve birbirilerine oranları	46
Şekil 4.5.	Embriyolara medyum değişim sistemi ile verilen siyanid deneyleri sonucunda elde edilen NADH and FAD ölçülmesi. NADH ve FAD floresan yoğunlukları ve birbirilerine oranları (ilk satır), NADH ve FAD bağlı fraksiyon seviyeleri	47
Şekil 4.6.	Oksijen deneyleri için oluşturulan sistemin kendisinin kontrol edildiği deney sonucunda iki gruptan embriyoların 90. saatte morfolojik görüntüleri	48
Şekil 4.7.	Preimplantif dönemdeki her bir farklı aşamasında olan zigot, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli morula, blastosist ve hatch olan blastosistler	50
Şekil 4.8.	Anoksi Deney Sonuçları	51
Şekil 4.9.	İçerisinde deney grubuna ait embriyoların bulunduğu kutunun deney başlangıcı ve deney sonunda ölçülen oksijen yüzdesi	51

- Şekil 4.10.** 2 hücreli embriyoların kültürün 6. saatinde kontrol, kimyasal anoksi (FCCP) ve fiziksel anoksi (%0 O₂) grubuna ait embriyoların DIC, FAD, Mitotracker, Rhodamine ve Glut1 sonuçları 53
- Şekil 4.11.** 4 hücreli embriyoların kültürün 12. saatinde kontrol, kimyasal anoksi (FCCP) ve fiziksel anoksi (%0 O₂) grubuna ait embriyoların DIC, FAD, Mitotracker, Rhodamine ve Glut1 sonuçları 55
- Şekil 4.12.** 8 hücreli embriyoların kültürün 24. saatinde kontrol, kimyasal anoksi (FCCP) ve fiziksel anoksi (%0 O₂) grubuna ait embriyoların DIC, FAD, Mitotracker, Rhodamine ve Glut1 sonuçları 57
- Şekil 4.13.** Morula aşamasındaki embriyoların kültürün 36. saatinde kontrol, kimyasal anoksi (FCCP) ve fiziksel anoksi (%0 O₂) grubuna ait embriyoların DIC, FAD, Mitotracker, Rhodamine ve Glut1 sonuçları 59
- Şekil 4.14.** Blastosit aşamadaki embriyoların kültürün 60. saatinde kontrol, kimyasal anoksi (FCCP) ve fiziksel anoksi (%0 O₂) grubuna ait embriyoların DIC, FAD, Mitotracker, Rhodamine ve Glut1 sonuçları 61
- Şekil 5.1.** Normoksi (%5 O₂) ve anoksik koşullarda (%0 O₂) prekompaksiyon aşamada bir embriyodaki Glut1 ekspresyonunu ve enerji üretime ve canlılık için gerekli var olan ve olası sinyal yollarını gösteren şekil 67

SİMGELER ve KISALTMALAR

EGA	: Embriyonik Genom Aktivasyonu
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
ATP	: Adenozin trifosfat
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
mtDNA	: Mitokondriyal DNA
tRNA	: transfer RNA
rRNA	: ribozomal RNA
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
NAD	: Nikotinamid Adenin Nükleotit
NADH	: İndirgenmiş NAD ⁺
FAD	: Flavin adenin dinükleotid
FADH	: İndirgenmiş FAD ⁺
O₂	: Oksijen
ADP	: Adenozin difosfat
CO₂	: Karbondioksit
CoA	: Koenzim A
SGLT	: Sodyum glukoz bağlantılı taşıyıcılar
GLUT	: Glukoz taşıyıcılar
FLIM	: Floresan yarı ömrü görüntüleme mikroskobu (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy)
LDH	: Laktat dehidrogenaz
TCSPC	: Zamana korele tek foton sayma modülü (Time-correlated single photon counting)

PMSG : Gebe kısrak serum gonadotropini (Pregnant Mare Serum Gonadotropin)

hCG : İnsan koryonik gonadotropin (Human Chorionic Gonadotropin)



1. GİRİŞ

Embriyoların morfolojik özelliklerinin ve bölünme hızlarının implantasyon potansiyelleriyle ilişkisi ortaya konulmuş (Edwards ve ark., 1984) ve sonrasında kliniklerde “en iyi embriyo”yu seçmek amacıyla embriyo kalitesinin belirlenmesinde temel morfolojik kriterler kullanılmaya başlanmıştır. Ancak morfolojik olarak normal kabul edilen embriyoların implantasyon başarısızlığı gösterebildiği ve her zaman bu embriyoların “en iyi embriyo” olmadığı da bilinmektedir. Bu nedenle günümüzde embriyo değerlendirme ve seçim kriterlerinde morfolojik kriterlere ek kullanılabilecek ve özellikle embriyonun metabolik durumu hakkında güvenli bilgi verebilecek yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Son yıllarda zaman aralıklı (time lapse) görüntüleme sistemlerinin, invaziv olmayan ve embriyo gelişiminde detaylı bilgiyi sağlamasından dolayı kliniklerde kullanılmasına rağmen, elde edilen veriler hala morfolojik ve morfokinetik parametrelere dayanmaktadır. Özellikle 2002 yılında Henry Leese tarafından ortaya konulan “sessiz embriyo hipotezi”ne göre, embriyo canlılığının metabolizmasının aktifliği ile ters orantılı olmasının ortaya konulmasının ardından embriyo metabolizmasına ilişkin yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda kullanılan tekniklerin olumsuz yanı, mtDNA içeriklerinin belirlenmesi gibi yöntemlerde embriyo biyopsisi gibi invaziv uygulamaların gerekliliğidir. İnvaziv uygulamaların, özellikle oositlerde ve embriyolarda stres yaratarak pek çok olumsuz sonuca neden olduğu da yapılan çalışmalarca ortaya konulmuştur (Leese ve ark., 1998; Thompson ve ark., 2002; Lane ve Gardner, 2005; Leese, 2012). Ayrıca bu embriyolar daha sonra ileri değerlendirmelerde kullanılamayacağından, kaliteli embriyo seçiminde klinikte invaziv olmayan, zaman almayan, kolay uygulanabilir ve erişilebilir ve seçilen embriyonun daha sonra kullanılabileceği tekniklere ve kriterlere gerek duyulmaktadır.

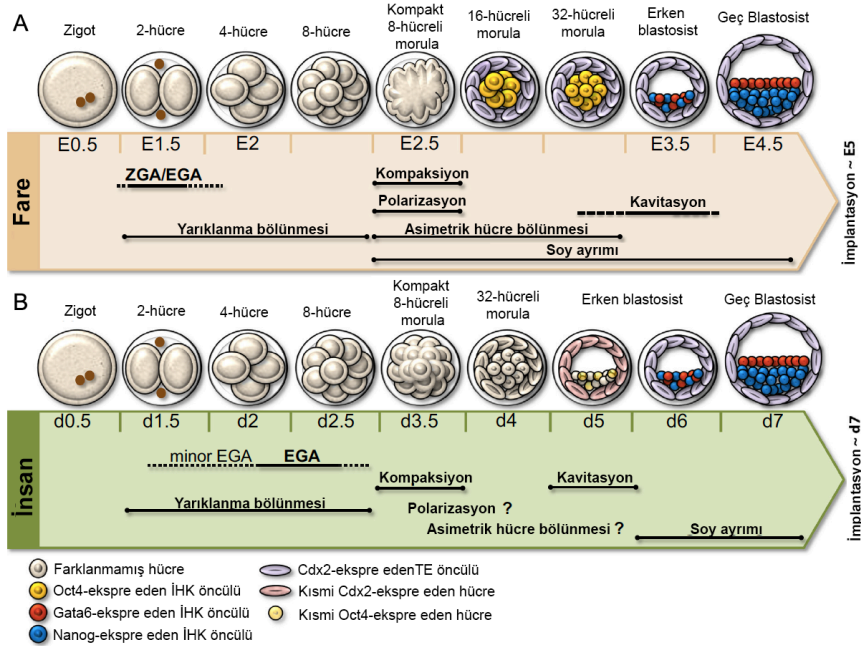
Hücre içinde enerji üretiminde önemli görevleri olan ve otofloresan olduklarından invaziv girişim gerektirmeden görüntülenebilen NADH ve FAD moleküllerinin görüntülenmesi ve ölçülmesi metabolik aktivite ve mitokondriyal anomali çalışmalarında oldukça yaygın bir şekilde kullanılmakta ve hücrelerin metabolik durumu hakkında bilgi sağlamaktadır (Chance ve Williams, 1955b, 1955c, 1955a, 1955d; Chance ve ark., 1955; Chance, Cohen, ve ark., 1962; Chance, Legallais, ve ark., 1962; Chance ve ark., 1965; Chance, 1976; Heikal, 2010b; Bartolome ve Abramov, 2015;

Stringari ve ark., 2017). Hücre metabolizmalarının farklı koşullara verdiği metabolik yanıt, NADH ve FAD'nin otofloresan özelliklerinden yararlanılarak floresan yarı ömrü görüntüleme mikroskobu (FLIM) ya da ileri konfokal mikroskobu gibi teknolojilerle ölçülebilmekte, hücre metabolizması ve koşullar arasında ilişki kurulabilmektedir. Bu durumun embriyo metabolizması için kullanması, ortam koşulları ve embriyo metabolizması arasındaki ilişkinin kurulabilmesi de mümkündür. Tüm bu literatür bilgisi ışığında bu çalışmanın hipotezi şöyledir: normal ve metabolik olarak zorlanan preimplantif dönem fare embriyo metabolizmaları, embriyoların ortam koşullarına bağlı olarak verdiği metabolik yanıtlara dayanarak, invaziv olmayan yöntemler ile otofloresan NADH ve FAD floresan sinyallerinin ölçümüyle belirlenebilir. Bu hipotez doğrultusunda planlanan çalışmamızda; invaziv olmayan iki farklı teknik olan FLIM (NADH ve FAD) ve konfokal mikroskobu (FAD) kullanılarak, NADH ve FAD otofloresan ölçümleriyle özellikle farklı besin içerikleri, farklı oksijen konsantrasyonu ve mitokondriyon bozucuları varlığında embriyo metabolizma yanıtının belirlenmesi amaçlanmıştır. Normal ve metabolik olarak zorlanan preimplantif dönem fare embriyo metabolizmalarının değerlendirilmesi sonucunda elde edilen verilerimiz, preimplantif dönem ve özellikle prekompaksiyon dönem embriyo metabolizması hakkında ilk kez detaylı bilgi sağlamıştır ve bu metabolizma verilerinin kullanımıyla ileriye yönelik kaliteli embriyo seçiminde kullanılacak yeni bir biyobelirteçin oluşturulmasına ve ileri çalışmaların yapılmasına katkı sağlamıştır. Sonuçlarımız; embriyo metabolizmasının invaziv olmayan yöntemlerle görüntülenebileceği ve özellikle kolay uygulanabilen, kolay erişilebilen ve FLIM gibi pahalı cihazlara göre kısmen pratik bir yöntem olan konfokal mikroskobu ile FAD görüntülemesinin embriyo metabolizmasındaki farkları ayırt edebildiği gösterilmiştir ve özellikle tekniksel olarak yapılabilirlik anlamında ileri çalışmalar için alt yapı sağladığını düşünmekteyiz. Çalışmamızın ve yapılacak ileri çalışmalarla birlikte elde edilecek verilerin kliniklerde morfolojik parametrelere ek olarak konfokal mikroskobu gibi tekniklerle metabolizma görüntülenme parametresinin de biyobelirteç olarak kullanılmasına katkı sağladığını düşünmekteyiz. Ayrıca erken evredeki prekompaksiyon embriyoların anoksik koşullar altında metabolik plastisite gösterebileceği ve bu embriyoların metabolizmalarını OXPHOS'tan glikoliz kullanma yönünde geçirmek için ilgili mekanizmaları upregüle edebileceği de önemli bir bilgi olarak literatüre sunulmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Preimplantif Embriyo Gelişim Süreci

Embriyolar için preimplantif dönem, fertilizasyon ile başlar ve embriyonun endometriyuma implantasyonuna kadar olan süreci kapsar. Bu süreçte; bir seri mitoz bölünme geçirmeye başlayan embriyo, gelişim süresince sırasıyla 2 hücre, 4 hücre, 8 hücre, morula ve blastosist aşamalarına ulaşır (Riley ve Moley, 2006). Preimplantif dönem embriyolar başarılı bir gelişim için; pronükleus oluşumu, embriyonik genom aktivasyonu (EGA), hücre bölünmeleri, kompaksiyon, farklılaşma ve blastosöl oluşumu (kavitasyon) aşamalarını organize bir şekilde gerçekleştirmelidir (Chason ve ark., 2011). Preimplantif embriyo gelişim süreci tüm memelilerde özdeş olmakla birlikte insan ve farede gelişim aşamalarında zamana bağlı farklılıklar bulunmaktadır (Şekil 2.1). Embriyo, zigot aşamasından 8 hücreli embriyo aşamasında gerçekleşen kompaksiyon olayına kadar “prekompaksiyon embriyo” olarak adlandırılmakta ve kompaksiyon ile birlikte embriyoda pek çok farklı morfolojik, fizyolojik ve metabolik değişiklikler meydana gelmektedir.

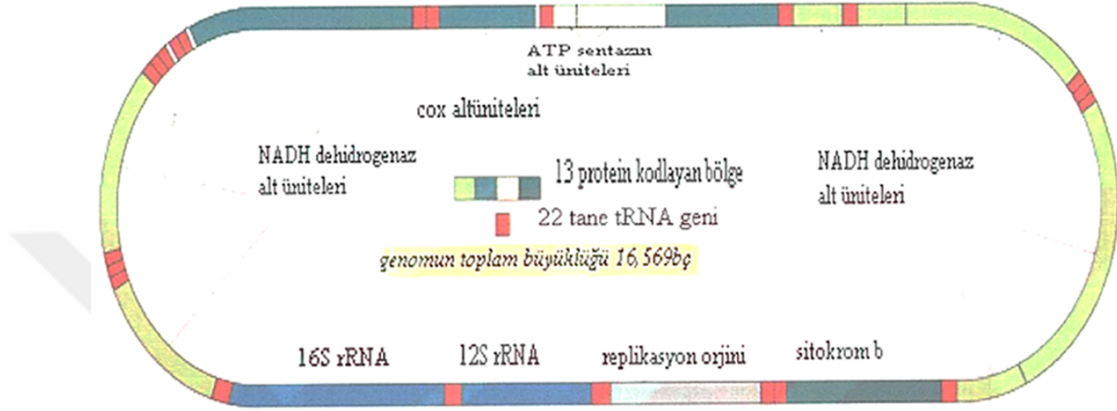


Şekil 2.1. Fare (A) ve insanda (B) gerçekleştirilen preimplantasyon gelişim sürecinin evreleri ve zamansal sürecin gösterimi (Sozen ve ark., 2014).

2.2. Mitokondriyanın Yapısı

Mitokondriyon, enerji üretimi, apoptoz, amino asit sentezi ve kalsiyum homeostazi gibi hücre için oldukça önemli olan hayati süreçlerin düzenlenmesinde görev olan bir organeldir (May-Panloup ve ark., 2005; Dumollard ve ark., 2009; St John ve ark., 2010; Bentov ve Casper, 2013; Tilly ve Sinclair, 2013). Bu nedenle mitokondri hücrenin güç merkezi olarak kabul edilmektedir. Yapısal olarak mitokondri; dış zar, iç zar, zarlar arası (periferal) bölge ve matriks olmak üzere dört bölgeden oluşmaktadır. Dış zar, iç zara göre daha kalındır ve porin denilen taşıyıcı proteinler bulundurur ve mitokondri içerisine girecek olan maddeler porinler aracılığı ile alınırlar. İç zar, dış zara göre daha seçici geçirgen yapıdadır. Dış ve iç zar arasındaki bölge periferal bölge olarak adlandırılmaktadır. İç zar, mitokondri matriksine doğru girintiler yaparak krista denilen yapıları oluşturur. Kristaların mitokondri eksenine uzanma biçimleri genellikle enine olmakla birlikte, boyuna ve çapraz olarak da olabilmektedir. İç zar üzerinde solunumda görev alan elektron taşıma sistemi (ETS) proteinleri bulunur. Bu nedenle enerji ihtiyacı fazla olan hücrelerin mitokondrielerindeki krista sayısı daha fazladır. İç zar üzerinde, elementer partikül (Racker partikülü) olarak adlandırılan yapılar vardır. Bu yapıların iç zarla bağlantılı olan bir sap bölgesi ve buna bağlı baş bölgesi vardır. Baş bölgesinde kimyasal enerjiden adenosin trifosfat (ATP) sentezi gerçekleştiğinden bu bölgeye ATPozom ismi verilmektedir. Matrikste, organel proteinlerinin 2/3'ü bulunmaktadır (Alberts, 2002; Campbell, 2006). Mitokondri diğer organeler ile kıyaslandığında, kendi ribozomlarını, deoksiribo nükleik asit (DNA)'larını ve ribo nükleik asit (RNA)'lerini içermeleri nedeniyle özgün bir organel olarak kabul edilmektedir. Mitokondriyal DNA (mtDNA); dairesel, çift zincirli ve 16.6 kb'dan oluşmaktadır (Şekil 2.2) ve mtDNA yapısı ve gen organizasyonu memeliler arasında oldukça korunmuştur. Memelilerde mtDNA molekülleri; biri guanin nükleotitinden zengin olan ağır zincir ve diğeri sitozin nükleotitinden zengin olan hafif zincir olmak üzere çift zincirden oluşmaktadır. Mitokondriyal DNA tarafından kodlanan toplam 37 genden 28'i ağır zincir tarafından kodlanırken, kalan 9 gen hafif zincir tarafından kodlanmaktadır. Ayrıca bu 37 genden 13 tanesi proteinlerin, 22 tanesi transfer RNA (tRNA)'ların ve 2 tanesi ribozomal RNA (rRNA)'ların küçük ve büyük alt ünitelerinin kodlanması içindir (Ward ve ark., 1981; Taanman, 1999). mtDNA molekülünden kodlanan bu genler, ETS'de önemli rolleri olan çeşitli komplekslerin alt ünitelerinin üretimini yaparak doğrudan hücre

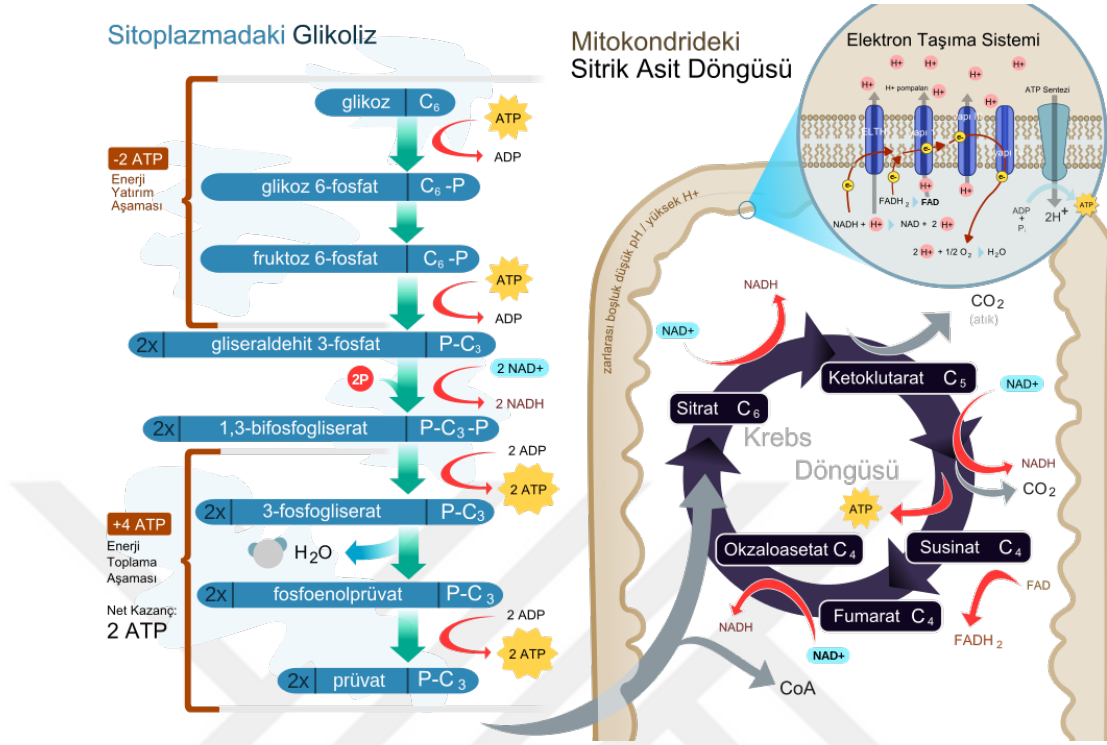
metabolizmasında rol oynamaktadır. Mitokondriyal genom tarafından kodlanan kompleksler, diğer ETS bileşenleri ile birlikte iç mitokondriyon membranında yerleşmişlerdir ve hücrede enerji yani ATP üretimi için hayati önem taşımaktadırlar (Anderson ve ark., 1981).



Şekil 2.2. İnsan mitokondri genom düzenlenmesini gösteren şekil. Mitokondriyal genom; 2 tane rRNA geni, 22 tane tRNA geni ve 13 tane protein kodlayan sekans bölgeleri içermektedir. Diğer memelilerin mitokondriyal genomları da bu yapıyla benzer şekilde düzenlenmektedir ((Alberts, 2002)'dan modifiye edilmiştir.)

2.3. Hücrede Enerji üretimi

Hücre içerisinde meydana gelen enerji üretimi; i) sitoplazmada gerçekleşen glikoliz ve mitokondride gerçekleşen ii) pürivat dekarboksilasyonu, iii) Krebs döngüsü (sitrik asit döngüsü) ve iv) oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) basamaklarını içermektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Hücre içi enerji üretim mekanizmaları (Scott ve ark., 2018). Sitoplazmada gerçekleşen ve glikozun pirüvata yıkımını içeren glikoliz ve mitokondride gerçekleşen Krebs döngüsü ve ETS'yi içeren OXPPOS basamaklarını gösteren şekil. ((Stryer, 1995)' dan modifiye edilmiştir.)

- i) **Glikoliz** tüm canlılarda benzer şekilde sitoplazmada gerçekleşen ve glukoz molekülünün pirüvata kadar yıkımını ve net 2 ATP üretimini içeren süreçtir. Bu süreçte oksijen (O₂) gereksinimi olmadığından anaerobik solunum için yeterli metabolik enerji ihtiyacını karşılayan mekanizmadır. Glikoliz süreci; glukoz molekülünün hücreler içerisine alınması ile başlamaktadır. Glukoz hücreler içerisine ya aktif olarak sodyum glukoz bağlantılı taşıyıcılar (SGLT) aracılığı ile ya da kolaylaştırıcı glukoz taşıyıcılar (GLUT) aracılığı ile taşınmaktadır (Purcell ve Moley, 2009). SGLT'lerin oosit ve embriyoda buldukları ancak bu hücrelerdeki rollerinin çok az olduğu bilinmektedir (Gardner ve Leese, 1988; Wiley ve ark., 1991). GLUT ailesinin; GLUT1-12, H⁺ bağlı miyoinositol taşıyıcı (HMIT) ve GLUT14 olmak üzere 14 adet üyesi bulunmaktadır (Joost ve ark., 2002; Wu ve Freeze, 2002). GLUT ailesinin üyeleri yüksek derecede sekans homolojisi gösterirler ancak substrat spesifliklerinde, kinetik karakteristiklerinde ve doku ve hücre dağılımlarında farklılıklar göstermektedirler (Joost ve ark., 2002). Embriyolardaki GLUT çeşitliliğinin ise, gelişim sürecinde

meydana gelen metabolik ve çevresel değişiklere karşı adaptasyonu kolaylaştıran bir faktör olduğu bilinmektedir (Purcell ve Moley, 2009). Preimplantif dönem embriyolar farklı GLUT'ları ekspre etmektedir ve preimplantif dönem embriyolarda karakterize edilen ilk GLUT'lardan biri GLUT1'dir. GLUT1, bütün gelişim süresindeki embriyolarda bulunmasına rağmen kompaksiyon aşamasından sonra hücre apikalinde lokalize olmaktadır (Aghayan ve ark., 1992; Pantaleon ve ark., 2001). Bu lokalizasyon değişikliği, glukozun hücreler içersine alınmasıyla ilişkili olan fonksiyonel durumun ifadesidir. GLUT2, 8 hücre aşamasına kadar bulunmazken, GLUT3 ekspresyonu kompaksiyon ile birlikte başlamaktadır (Aghayan ve ark., 1992; Pantaleon ve ark., 1997). GLUT4'ün embriyodaki ekspresyonu tartışmalı olduğu (Riley ve Moley, 2006), GLUT5'in de diğer türlerde bulunmakla birlikte fare ve insan embriyolarında bulunmadığı (Navarrete Santos ve ark., 2004), GLUT8'in (Carayannopoulos ve ark., 2000) ve GLUT9a'nın (Carayannopoulos ve ark., 2004) blastosist aşamasında bulunduğu bilinmektedir. Glikoliz sürecinde; glukozun hücre içine alınmasının ardından ilk reaksiyonlar olan glukozun heksokinaz enzimi aracılığı ile glukoz-6 fosfata (1 ATP tüketimi) ve daha sonra glukoz-6 fosfattan oluşan fruktoz-6-fosfatın fosfofruktokinaz enzimi aracılığı ile fruktoz-1, 6 bifosfata fosforillenmesi (1 ATP tüketimi) basamaklarında ATP kullanılır (Şekil 2.3). Glikoliz sürecinde, fosfofruktokinaz enzimi glikolitik yolaklar için anahtar kontrol elemanı olarak görev yapmakta ve yüksek ATP düzeyi ile inhibe olmaktadır. İnhibe olan fosfofruktokinaz enzimi sonucunda biriken glukoz-6-fosfat da heksokinaz enzimini inhibe ederek hücrede yeterli enerji kaynağı olması durumunda glukozun yıkımını durdurmaktadır. Glikolitik yolakta, fruktoz-1, 6 bifosfatın parçalanması sonucunda oluşan 2 adet gliseraldehit-3-fosfat yükseltgenerek 1,3-bisfosfogliseratı oluşturmakta (2 NADH üretimi) ve bu molekülün fosfat gruplarının hidroliziyle elde edilen yüksek enerji bir sonraki basamakta Adenozin difosfat (ADP)'dan ATP sentezi için kullanılmaktadır (Şekil 2.3). 1,3-bisfosfogliserat molekülünden 3-fosfogliserat (2 ATP üretimi), 3-fosfogliserattan 2-fosfogliserat ve bu molekülden de glikolizde ikinci yüksek enerjili ara bileşik olan fosfoenolpürivat oluşmaktadır (Şekil 2.3). Fosfoenolpürivatın pürivatı oluşturduğu basamakta

gerçekleşen ADP'den ATP üretiminde (2 ATP üretimi), fosfoenolpürivatın fosfat gruplarının hidroliziyle oluşan yüksek enerji kullanılmaktadır. Glikoliz sonucunda üretilen 2 ATP molekülüne ek olarak 2 NAD⁺ koenziminden elde edilen 2 NADH molekülü, anaerobik koşullarda pürivatın laktata ya da etanole dönüşümü sırasında NAD⁺'ye tekrar yükseltgenirken, aerobik canlılarda elektronlarını ETS'ye ileterek enerji kaynağı sağlamak ve sonucunda O₂'nin H₂O'ya indirgenmesi ile ek ATP oluşturmaktadır (Cooper G. M., 2016).

ii) Daha sonra gerçekleşen basamak **oksidatif dekarboksilasyondur** ve bu reaksiyon pürivatın karbonlarından bir tanesinin karbondioksit (CO₂) olarak serbest kalırken diğer ikisinin de koenzim A (CoA)'ya eklenmesi sonucunda asetil CoA oluşumunu içermektedir ve oluşan asetil CoA aktif açıl gruplarını genel taşıyıcısı olarak pek çok farklı metabolik reaksiyonda görev yapmaktadır. Ayrıca oksidatif dekarboksilasyon sürecinde bir NAD⁺ molekülünün indirgenmesi sonucunda bir adet NADH molekülü oluşmaktadır (Cooper G. M., 2016).

iii) **Krebs döngüsü**, asetil CoA'dan iki karbonlu asetil grubunun dört karbonlu oksaloasetata taşınması sonucunda sitrat molekülünün oluşumuyla birlikte başlamaktadır (Şekil 2.3). Sonraki iki reaksiyonda enzim aracılığıyla sitrattan hidroksil grubu ve hidrojen atomu çıkarılır ve sonucunda H₂O ve cis-akonitat oluşur. Aynı enzimin cis-akonitat molekülüne H₂O'yu tekrar eklemesi sonucunda ise izositrat molekülü oluşur. İzositratın birkaç elektronu ve bir hidrojen atomu bir enzim aracılığıyla NAD⁺ molekülünden NADH oluşumu için kullanılmak üzere verilir ve bu aşamada CO₂ oluşumu ile birlikte molekül α-ketoglutarat adını alır. Sonraki reaksiyonda, CoA'nın eklenmesiyle süksinil-CoA molekülü oluşurken bir NADH molekülü ve bir CO₂ molekülü de meydana gelmektedir. Süksinil-CoA'dan CoA molekülünün ayrılmasıyla ortaya çıkan yüksek enerji, GDP molekülüne fosfat grubu (Pi) eklemek ve GTP molekülünü oluşturmak için yeterlidir ve sonucunda oluşan molekül süksinattır. GTP, ATP gibi enerji depolayan bir moleküldür. Oluşan süksinat, elektronlarını FAD molekülüne vermekte ve FAD indirgenerek FADH₂ ve sonucunda fumarat molekülü oluşmaktadır (Şekil 2.3). Fumarata bir H₂O eklenmesiyle oluşan malat

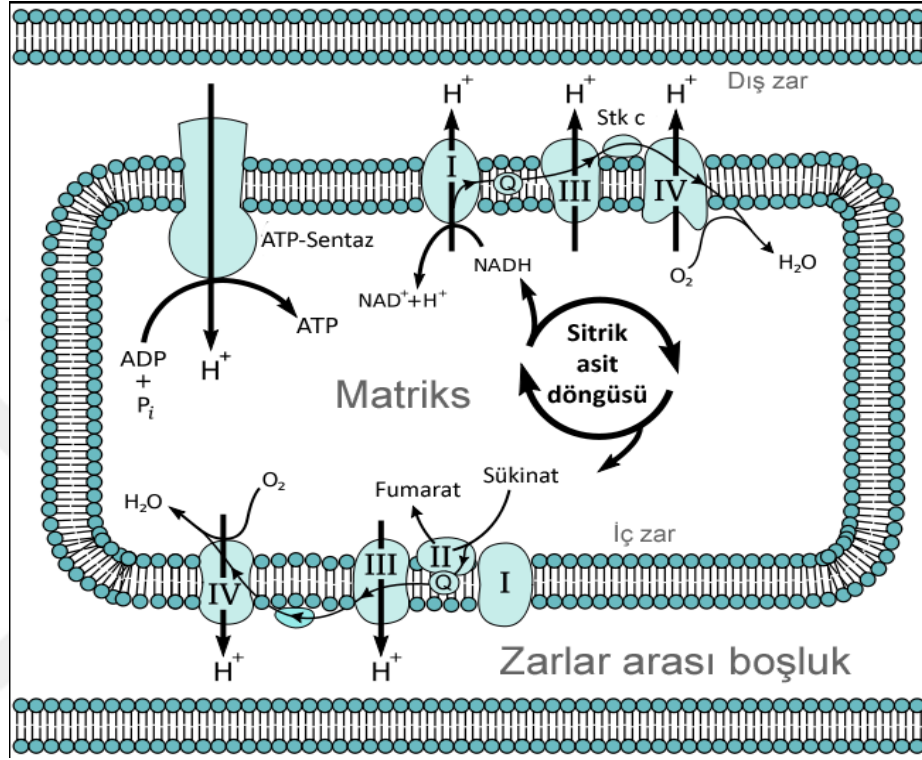
NAD⁺ molekülünü indirgeyerek NADH oluşumunu sağlar ve bu sırada oluşan molekül ise oksaloasetattır ve sonraki döngüde asetil CoA ile birleşip Krebs siklusunun tekrar başlaması için için hazır beklemektedir. Sonuç olarak, glikolize giren her bir glukoz molekülünden 2 pürivat ve 2 pürivattan da 2 asetil CoA üretilmektedir ve bu nedenle her bir krebs döngüsü; 1 adet GTP, 3 adet NADH ve 1 adet FADH₂ üretimi ile sonuçlanırken 2 asetil CoA molekülü üretildiğinden toplam kazanç 2 GTP, 6 NADH ve 2 FADH₂ şeklindedir (Cooper G. M., 2016).

iv) Oksidatif fosforilasyon; glikoliz ve Krebs döngüsü sırasında oluşan bileşiklerdeki NADH ve FADH₂ moleküllerindeki hidrojen atomlarının, mitokondrinin üzerinde bulunan ETS'den geçirilmesi sırasında oksijenle birleşerek su oluşturması ve kalan bileşiklerin ATP yapımında kullanılması olayıdır (Şekil 2.4). Hidrojen atomu, elektron ve protondan oluşmaktadır. Elektron, ETS sürecinde protondan ayrılır ve oksijen molekülüne taşınır. Fazladan bir elektron almış olan oksijenin, elektronsuz kalmış hidrojen protonuyla kenetlenmesiyle de su oluşur. Elektron transport sistemi, aerobik organizmaların enerji üretiminde kullanılan sistemdir. Glikoliz aşamasından sonra gerçekleşen krebs döngüsü sırasında üretilen NADH ve FADH₂'den gelen elektronlar elektron transport sistemine girmektedir. Elektron transferi sonucunda büyük bir enerji açığa çıkar ($\Delta G^{\circ} = -52.5$ kcal/mol bir elektron için) ancak bu enerjinin kullanılabilir formda olması için elektronların aşamalı olarak ETS'yi oluşturan bir dizi taşıyıcıdan geçmesi gerekmektedir. Mitokondri iç membranında lokalize olan ETS; NADH dehidrogenaz (Kompleks -I), süksinat dehidrogenaz (Kompleks -II), sitokrom c redüktaz (Kompleks -III), sitokrom c oksidaz (Kompleks -IV) ve ATP sentaz (Kompleks -V) olmak üzere beş kompleks içermektedir. NADH'dan köken alan elektronlar kompleks I'e iletilir (Şekil 2.4). Kompleks I, elektronların NADH'dan ubikinona (UQ, koenzim Q) transferini katalize ederken, Kompleks II, Krebs döngüsünde membrana bağlı enzimdir; elektronlarını Krebs döngüsü ara ürünü olan süksinattan alır ve übikinona (koenzim Q) transferini kataliz etmektedir. Koenzim Q elektronları önce kompleks III'e sonra sitokrom c ve kompleks IV'e iletmektedir. Kompleks III, elektronları ubikinondan sitokrom c'ye transfer eder ki kompleks III içinden

geçen elektronların yolu, “Q siklüsü” denilen bir döngü oluşturur. Sitokrom c, elektronları kompleks IV ‘ün yapısına taşır. Kompleks IV, elektronların sitokrom c’den O₂’e transferini ve böylece O₂’nin suya indirgenmesini katalize eder. Kompleks I, III ve IV’deki elektron aktarımı sırasında meydana gelen serbest enerji düşüşü, protonların matrikste zarlar arası boşluğa pompalanmasına ve sonucunda iç zarın iki tarafında proton gradiyenti oluşumuna neden olur. Proton gradiyentinde saklanan bu enerji, protonların matrikse kompleks V içerisinde geri dönüşü sırasında gerçekleşen ATP sentezinde kullanılmaktadır.

Bu süreçte NADH VE FADH₂ moleküllerinin rolleri şöyledir: Bir NADH molekülü 3 ATP oluşumunu sağlar. Kompleks II’nin süksinattan aldığı elektronlar NADH’a değil FADH₂’ye ve sonrasında koenzim Q’ya transfer edilir. NADH mekanizmasına benzer şekilde elektronlar önce kompleks III’e ve sonra kompleks IV’e aktarılır. Ancak burada kompleks I’de elektronların NADH’dan koenzim Q’ya aktarımı sonucunda meydana gelen serbest enerjideki önemli düşüş, elektronların FADH₂’ye aktarılması sırasında meydana gelmez ve bu nedenle FADH₂ kaynaklı elektronların ETS’den geçişinde sadece kompleks III ve IV’de serbest enerji açığa çıkar. Bir FADH₂ molekülü 2 ATP oluşumunu sağlar. Oksidatif fosforilasyon mekanizması ile elektronların kompleks I, III ve IV’den geçirilmesi sonucu açığa çıkan serbest enerjiden ATP üretilir. Elektron taşınımı sırasında açığa çıkan enerji, glikoliz ya da Krebs döngüsünde gerçekleşen yüksek enerjili fosfatın ADP’ye eklenerek elde edilen ATP mekanizmasından farklı olarak mitokondri iç zarının iki tarafında proton gradiyenti oluşmasına neden olur ve bu gradiyente saklanan enerji protonların kompleks V (ATP sentaz) içerisinde matrikse geri dönüşümü sırasında ATP üretimi için kullanılır. Metabolik olarak aktif hücrelerdeki mitokondri içerisindeki protonlar, zarın iki tarafındakinden 10 kat daha düşük konsantrasyondaysa matriksten dışarıya pompalanır. ATP sentaz, iç mitokondriyal membranın ATP sentezleyen enzim kompleksidir; elektron transportu ile ATP oluşumunu eşleyen kompleks V olarak da bilinir. ATP sentaz, F₀ (integral protein) ve F₁ (periferal protein) olmak üzere başlıca iki komponent veya faktöre sahiptir (Mandavilli ve ark., 2002). F₀ bölümü,

protonların zarlar arası boşluktan mitokondriye geri dönmesini sağlayan kanal oluştururken, F₁ bölümü ADP'den ATP oluşumunu sağlar (Cooper G. M., 2016).



Şekil 2.4. Hücre içinde gerçekleşen ve ETS'yi içeren oksidatif fosforilasyon ile enerji üretimini ve bu süreçteki molekülleri gösteren şekil. (https://en.wikipedia.org/wiki/Electron_transport_chain'den modifiye edilmiştir.)

Enerji Üretimi ve Kazançları Özetle Şu Şekildedir:

- i. Sitrik asit döngüsü glukozun 6 adet CO₂ molekülüne oksitlenmesi ile tamamlanır. Her bir glukoz molekülünden sitoplazmadaki glikolizden 2 ATP ve mitokondrideki Krebs döngüsünden 2 ATP olmak üzere toplam **4 ATP** üretilir.
- ii. İki adet glikolizden, 2 adet pürivat dekarboksilasyonundan ve 6 adet Krebs döngüsünden olmak üzere toplam 10 adet NADH üretilir. Her bir NADH molekülünün ETS'de elektronlarını transfer ederek yükseltgenmesi sonucunda 3ATP oluştuğundan toplam **30ATP** kazancı mevcuttur.
- iii. İki adet Krebs döngüsünden üretilen FADH₂ molekülünün ETS'de elektronlarını transfer ederek yükseltgenmesi sonucunda 2ATP oluştuğundan toplam **4 ATP** kazancı mevcuttur.
- iv. Sonucunda üretilen toplam enerji **38 ATP** şeklindedir. Ancak bazı hücrelerde glikolizden üretilen 2 NADH mitokondriye doğrudan girmemekte ve

elektronların mitokondriye mekik sistemi ile transfer edilmesi gerekmektedir. Aktarım sırasında, kullanılan sisteme bağlı olarak elektronların ETS'ye FADH₂ düzeyinde girmesi sonucunda elde edilen 2 NADH molekülünden 3 yerine 2 ATP üretimi olması durumunda enerji üretimi toplam 36 ATP ile sonuçlanabilmektedir.

2.4. Mitokondri ve Preimplantif Dönem Embriyo İlişkisi

2.4.1. Mitokondriyal DNA ve Preimplantif Dönem Embriyo İlişkisi

Hücrelerin içerdiği mitokondri sayısı, hücrenin hacmi ve enerji ihtiyacına göre birkaç yüzden birkaç bine değişiklik gösterebilmektedir. Olgun insan oositinin, diğer hücreler arasında en fazla mitokondri ve mtDNA içeren hücre olduğu bilinmektedir (May-Panloup ve ark., 2005). Oosit mitokondriyal replikasyonu, fetal gelişim süresince yaklaşık 200 mitokondri içeren oogonya içerisinde başlar (Eichenlaub-Ritter ve ark., 2011). Replikasyon, matürasyon ile senkronize bir şekilde devam eder ve metafaz II aşamasında olan bir oosit yaklaşık 100,000 mitokondri ve mtDNA'nın 50,000 ile 550,000 arasında kopyasını içermektedir (Chen ve ark., 1995; Cummins, 2000; Motta ve ark., 2000; Steuerwald ve ark., 2000; Reynier ve ark., 2001; May-Panloup ve ark., 2005). Memeli embriyolarında bulunan mitokondrilerin ve dolayısıyla mtDNA'ların, fertilize olan oositten kalıtıldığı bilinmektedir. Yarıklanma dönem insan embriyolarında mtDNA kantifikasyonu verilerine göre, preimplantif embriyo gelişim döneminin ilk 3 günü mtDNA miktarı stabildir (Steuerwald ve ark., 2000; Reynier ve ark., 2001; Barritt ve ark., 2002; Lin ve ark., 2004; Chan ve ark., 2005; May-Panloup ve ark., 2005). Fare preimplantif dönem embriyolarında, mtDNA miktarının zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar sabit olduğu ve embriyo başına düşen mtDNA miktarının 2.13 pg ya da 119,000 mtDNA molekü olduğu bildirilmiştir ve bu sonuçlar doğrultusunda mtDNA replikasyonun preimplantif dönem fare embriyolarında olmadığı sonucuna varılmıştır. Ancak mitokondriyal rRNA ve mRNA miktarlarına bakıldığında; oosit matürasyon sürecinden 2 hücreli embriyo aşamasına kadar sabit kalırlarken, 2 hücre embriyo aşamasından blastosist aşamasına kadar 20 ile 50 kat arasında bir artış olduğu gösterilmiştir (Piko ve Taylor, 1987). Bu sonuçlar, mitokondriyal genomun oosit aşamasından 2 hücreli embriyo aşamasına kadar büyük ölçüde inaktif olduğunu ve mitokondriyal transkripsiyonun büyük oranda yarıklanma döneminde başladığını göstermektedir (Piko ve Taylor, 1987). mtDNA'nın önemli derecedeki replikasyonunun

ilk hücrel farklanma olan trofektoderm ve iç hücre kitlesi oluşumu ve neticesinde oluşan blastosist aşamasında olduğu düşünülmektedir (St John ve ark., 2010; Eichenlaub-Ritter ve ark., 2011). Tüm bu bilgiler doğrultusunda, mtDNA'nın büyük bir kısmının oositte depolandığı ve implantasyona kadar replike olmadığı sonucuna varılmıştır.

Preimplantif embriyo gelişimi dinamik ve oldukça enerji gerektiren bir süreçtir. Erken dönem embriyolar, hücre bölünmeleri ve gelişimin başarılı bir şekilde ilerleyebilmesi için yeterli seviyede enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Literatür bilgileri doğrultusunda, doğru oosit mitokondriyal fonksiyonu ve mtDNA gen ekspresyonunun erken dönem embriyo gelişimi için gerekli olduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışma sonucunda, insan oositlerinin ATP içeriği ile embriyo gelişim potansiyeli ve *in vitro* fertilizasyon (IVF) siklusları sonuçları ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Van Blerkom ve ark., 1995). 2001 yılında yapılan bir çalışmada, düşük mt DNA içeriğinin, oositin fertilizasyon yeteneğini olumsuz etkilediği ortaya konmuş ve 2004 yılında yapılan bir çalışmada, azalmış mt RNA'nın oosit fertilizasyonunu ve embriyo gelişimini olumsuz etkilediği ilk kez gösterilmiştir (Hsieh ve ark., 2004). Disfonksiyonel mitokondrinin, embriyoda birinci ve ikinci mayoz bölünmeler sırasında kromozomal ayrılmama ve mitoz bölünmelerde hata yatkınlıklarında ve böylece yaşlı oosit ve embriyolarda kalitenin ve gelişim potansiyelinin azalmasında temel bir faktör olduğu düşünülmektedir (Eichenlaub-Ritter ve ark., 2011). Literatür verileri değerlendirildiğinde, oositin içerdiği mtDNA'nın embriyo canlılığı ve fertilizasyon başarısı ile ilişkili olduğu ve biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır (Reynier ve ark., 2001; Santos ve ark., 2006; Chappel, 2013).

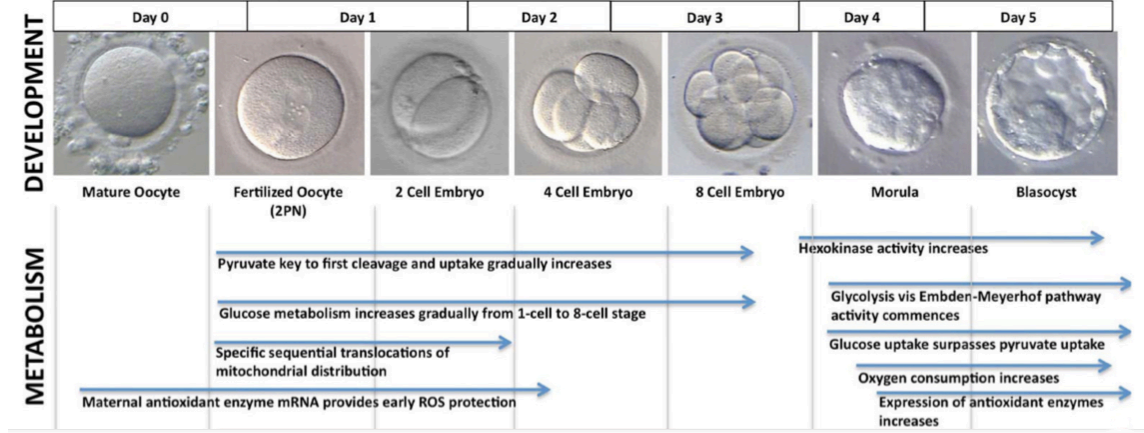
2.4.2. Preimplantif dönemde “Sessiz Embriyo” Hipotezi ve Mitokondri İlişkisi

Mitokondrinin hücrel süreçte bilinen önemine rağmen, memelilerdeki her bir embriyonun implantasyon öncesi aşamalarındaki mtDNA'larındaki varyasyon boyutu tam olarak bilinmemektedir. 2015 yılında yapılan çalışmada, ilk kez mtDNA kantifikasyonu ile insan embriyolarının implantasyon yeteneği arasındaki ilişki net bir şekilde tanımlanmıştır (Fragouli ve ark., 2015). Çalışmada belirlenen mtDNA eşiğinin üzerinde olan embriyoların tamamında implantasyonun hatalı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada mtDNA içeriği ile yaş ve embriyo kromozomal durumu da

değerlendirilmiş ve sonucunda özellikle anöploidi görülen embriyoların daha fazla mtDNA içerdiği gösterilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada, öplöid embriyoların içerdiği yüksek mtDNA'nın, düşük embriyo canlılığı ve implantasyonunun belirteci olduğu gösterilmiştir (Diez-Juan ve ark., 2015). Bu çalışmada mtDNA içeriği skorlanmış ve Mitoskor olarak adlandırılarak 60'dan büyük değere sahip olan embriyoların implante olmadığı belirtilmiştir. Araştırmacılar bu bulguları, embriyolarda artan mtDNA içeriğinin metabolik stresin göstergesi olduğu ve embriyoların mtDNA içeriklerini arttırarak bu stresi kompanse etmeye çalıştıkları şeklinde yorumlamışlardır. Bu bulgular, insanlarda artmış mtDNA'nın, embriyo metabolizmasını yansıtabileceği ve mtDNA miktarındaki artışın embriyo canlılığının azalması ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Bu sonuçlar, Henry Leese'in 2002 yılında ortaya attığı "**sessiz embriyo hipotezi**" (Leese, 2002) ile tutarlı olduğunu göstermektedir (Fragouli ve ark., 2015) ve mitokondri, kadınlarda üremenin yaşlanması ve anöploidi oluşumu arasında potansiyel bir ilişki olduğunu düşündürmektedir. Sessiz embriyo hipotezinde yaşayabilme olasılığı en yüksek olan hücrelerin daha pasif bir metabolizmaya sahip olduğu ve daha aktif metabolizmanın bir tür stres göstergesi olduğu desteklenmektedir (Leese ve ark., 2007). Tüm bu bilgiler değerlendirildiğinde son yıllarda; mtDNA içeriğinin IVF tedavilerinin geliştirilerek "eve götürülen bebek" oranlarının artırılması için potansiyel bir değer olarak kullanılabilir yeni bir biyobelirteç olabileceği kabul edilmektedir ve embriyo metabolizması hakkında bilgi veren mtDNA miktarı gibi parametrelerin değerlendirilmesinin kliniklerde kullanılabilir bir yöntem olması amaçlanmaktadır.

2.4.3.Preimplantif Dönem Embriyo Metabolizması ve Enerji Üretimi

Preimplantif dönem embriyo, hücrel fonksiyonlarını yerine getirmek üzere ihtiyaç duyduğu enerjiyi üretmek için farklı kaynaklar kullanmakta ve dönemsel olarak farklı enerji üretim yollarını tercihen kullanabilmektedir. Prekompaksiyon dönem embriyolar, gelişim sürecinde gereksinim duyduğu enerjinin üretimi için temel olarak pirüvat ve laktat kullanarak mitokondride gerçekleşen **aerobik solunumu kullanırken**, kompaksiyon ile birlikte embriyonun **glukoz kullanımının arttırması sonucu glikoliz**, enerji üretimi için baskın hale gelmektedir (Riley ve Moley, 2006; Gardner ve Harvey, 2015; Kaneko, 2016) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Preimplantif dönem embriyoların gelişim basamaklarını ve 8 hücreli aşamada gerçekleşen kompaksiyon öncesi ve sonrası embriyo metabolizmasında meydana gelen farkları gösteren şekil (Chason ve ark., 2011).

Prekompaksiyon embriyoların, fizyolojik koşullarda glikoz kullanamaması, günümüz bilgisi doğrultusunda temel olarak iki neden ile açıklanmaktadır: 1) Yüksek ATP:ADP oranının glikoliz yolağında temel enzimlerden biri olan fosfofruktokinaz (PFK) enzimini inhibe etmesi 2) Glikoz taşıyıcılarının (GLUT) yokluğundan ve/veya hücre membranında yerleşik olmamasından dolayı glikozun enerji kaynağı olarak kullanılamaması (Pantaleon ve ark., 1997; Pantaleon ve Kaye, 1998; Gardner ve Harvey, 2015). Prekompaksiyon dönem embriyolarda daha az enerji gereksinimlerinden (Leese ve ark., 1984) dolayı oluşan yüksek ATP:ADP oranının allosterik olarak PFK'yı inhibe etmesi sonucu (Barbehenn ve ark., 1974) glikoliz yolağında glikozun pirüvata dönüşümü bloke olmaktadır (Şekil 2.6). Glikozun hücre içine alınımında temel olarak görev yapan GLUT moleküllerinden GLUT1'in, tüm fare preimplantasyon döneminde ekspre olduğu, ancak kompaksiyona kadar plazma membranında lokalize olmadığı (Aghayan ve ark., 1992; Pantaleon ve ark., 2001) ve diğer GLUT2, GLUT3, GLUT4 ve GLUT8 moleküllerinin baskın olarak kompaksiyon aşamasından itibaren ekspre olduğu ve yine bu nedenle glikozun hücre içine alınmadığı bilinmektedir (Aghayan ve ark., 1992; Pantaleon ve ark., 1997; Purcell ve Moley, 2009). İnsan ve fare embriyolarının benzer koşullar altında benzer besin (glikoz, pürivat, laktat gibi) tüketim paternine sahip olduğu da bilinmektedir (Gardner ve ark., 2000).

detaylı bilgi sağlamasından dolayı oldukça yaygın bir şekilde kliniklerde kullanılmasına rağmen, bu yöntemden elde edilen veriler yine morfolojik ve morfokinetik parametrelere dayanmaktadır. Özellikle 2002 yılında Henry Leese tarafından ortaya konulan sessiz embriyo hipotezine göre, embriyo canlılığının metabolizmasının aktifliği ile ters orantılı olduğu bilgisinin ortaya konulmasının ardından embriyo ve metabolizması ile ilgili yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Ancak metabolik durum değerlendirmelerinde **literatürde yapılan çalışmalarda kullanılan tekniklerin olumsuz yanı, mtDNA içeriklerinin belirlenmesi gibi yöntemlerde embriyo biyopsisi gibi invaziv uygulamaların gerekliliğidir.** İnvaziv olarak yapılan uygulamaların, özellikle oositlerde ve embriyolarda stres yaratarak pek çok olumsuz sonuca neden olduğu da yapılan çalışmalarca ortaya konulmuştur (Leese ve ark., 1998; Thompson ve ark., 2002; Lane ve Gardner, 2005; Leese, 2012). **Ayrıca bu embriyolar daha sonra embriyo transferi gibi ileri değerlendirmelerde kullanılmayacağından,** kaliteli embriyo seçimi için klinikte özellikle **invaziv olmayan, zaman almayan, kolay uygulanabilir ve erişilebilir olan ve seçilen embriyonun daha sonra kullanılabileceği tekniklere ve objektif kriterlere gerek duyulmaktadır.**

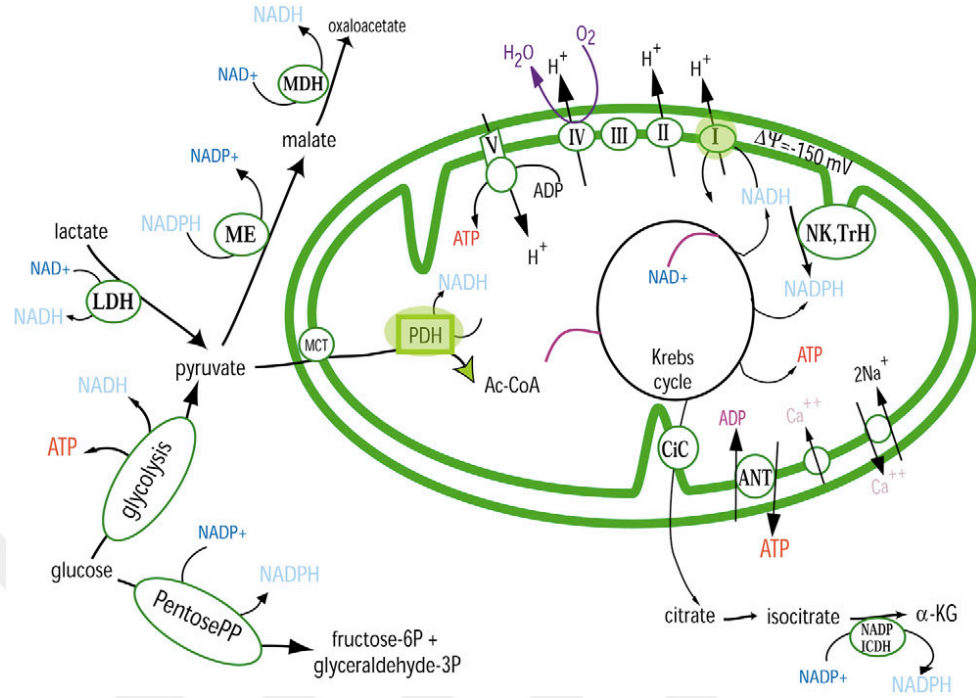
2.5.1. Metabolizma Çalışmalarında Biyobelirteç Olarak Kullanılan NADH ve FAD Moleküllerinin Özellikleri ve Önemi

Hücre içinde enerji üretim basamaklarında önemli görevleri olan ve otofloresan olmaları nedeniyle invaziv bir girişim gerektirmeden görüntülenebilen NADH ve FAD moleküllerinin görüntülenmesi ve ölçülmesi Chance ve arkadaşlarının yaptığı öncü çalışmaların ardından (Chance ve Williams, 1955d, 1955c, 1955b, 1955a; Chance ve ark., 1955; Chance, Cohen, ve ark., 1962; Chance, Legallais, ve ark., 1962; Chance ve ark., 1965; Chance, 1976) son yıllarda metabolik aktivite ve mitokondriyal anomalilerin değerlendirildiği çalışmalarda oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar (Heikal, 2010b; Bartolome ve Abramov, 2015; Stringari ve ark., 2017). NADH'ın ve FAD'nin yoğunlukları hücre içerisindeki metabolik yollar ile ilişkili olarak değişiklik gösterir, yani oksidasyon-redüksiyon oranındaki değişiklikler, NADH ve FAD yoğunluklarında değişikliklere neden olur. Farklı ortam koşulları, hücrede metabolizmayı etkileyerek beraberinde metabolik parametrelerin de değişimine neden olmaktadır. NADH ve FAD moleküllerinin otofloresan olmaları, görüntüleme için dışarıdan kullanılacak ekzojen boya gereksinimini ortadan kaldırarak toksik etkiyi ve non-spesifik bağlanma riskini de

elimine etmeleri önemli bir avantaj sağlar (Heikal, 2010b). NADH ve FAD'nin, özgün görüntüleme dalga boyları kullanılarak uyarılması sonucunda floresan özelliği olan mikroskoplar tarafından görüntülenmesi mümkündür. Örneğin glikoliz sonucu NADH üretildiğinden, sitoplazmik NADH konsantrasyon artışının glikoliz oranındaki artışla ilişkilendirilmesi mümkündür (Heikal, 2010b). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda, hipoksi gibi solunum zincirini bozan durumlarda, hücre sitoplazmasında NADH otofloresanının yani konsantrasyon artışının olduğu görülmüştür (Vishwasrao ve ark., 2005; Q. Yu ve Heikal, 2009a). Benzer şekilde mitokondriyal bir inhibitör olan siyanürün, sıçan kardiyak miyositlerinde (Huang ve ark., 2002; Chorvat ve ark., 2005) ve Gine domuzu ventriküler miyositlerinde (Romashko ve ark., 1998) FAD otofloresan konsantrasyonunu azalttığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Sonuç olarak; NADH ve FAD moleküllerinin gerçek zamanlı olarak görüntülenmesi ve ölçülmesi; bir yandan hücrenin redoks durumunu ortaya koyarken diğer yandan da metabolizmanın rasyometrik bir ölçümünü de sunmakta (Huang ve ark., 2002) ve kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve diyabet gibi mitokondriyal anomalilerle ilişkilendirilmiş hastalıkların araştırılması ve tedavisinde kullanılmaları ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir (Kirkpatrick ve ark., 2005; Mayevsky ve Rogatsky, 2007; Skala ve ark., 2007; Mayevsky ve Barbiro-Michaely, 2009; Q. R. Yu ve Heikal, 2009b).

Bu ölçümleri yapabilmek için yoğun bir şekilde mitokondri içerisinde lokalize olan FAD molekülünün aksine, özellikle sitoplazmik ve mitokondriyal NADH ayrımının yapılması oldukça önemlidir ve bunun için uzamsal çözünürlüğe sahip invaziv olmayan teknikler gerekir (Heikal, 2010b). NADH ve FAD kompartmanizasyonunun yapılması, bu biyobelirteçleri ölçüm için daha güçlü hale getirmektedir (Heikal, 2010b). Bu moleküllerin ölçümlerinin konvansiyonel biyokimyasal yöntemlerle yapılması mümkünse de bu yöntemlerin hücreyi/dokuyu parçalama gerektirmesi ve hücrenin metabolik durumu hakkında anlık ve morfoloji olmadan bilgi vermesi önemli dezavantajlar olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla hücre metabolizmalarının farklı koşullara verdiği metabolik yanıt, NADH ve FAD moleküllerinin otofloresan özelliklerinden yararlanılarak Floresan Yarı ömrü Görüntüleme Mikroskobu (FLIM) gibi teknolojilerle ölçülebilmekte ve hücre metabolizması ve koşullar arasında ilişki kurulabilmektedir (Heikal, 2010a). Benzer şekilde bu durumun embriyo metabolizmasının değerlendirilmesi için kullanması ve böylece ortam koşulları ve

embriyo metabolizması arasındaki ilişkinin kurulabilmesi de mümkündür. Bu alanda yapılan çalışmalardan biri 2007 yılında gerçekleştirilmiş ve pürivat, glikoz ve laktat gibi besin içeriklerinin değiştirildiği, FCCP gibi çeşitli mitokondriyal enerji üretimini bozan kimyasallar ya da oksamat gibi LDH inhibitörleri kullanılarak oluşturulan farklı koşullarda oosit metabolik yanıtı incelenmiş ve bu koşullara oosit metabolizmasının yanıtı hakkında literatüre önemli bilgiler sunulmuştur (Dumollard ve ark., 2007). Bu çalışmada, ilk kez fare oositindeki sitozolik ve mitokondriyal kompartmanlardan üretilen NADH ve FAD otofloresanları (Şekil 2.7) konfokal ve geniş alan veya konvensiyonel floresan yöntemi ile belirlenerek intraselüler redoks potansiyelinin ekzojen substratlar tarafından nasıl düzenlendiği ortaya konulmuştur (Dumollard ve ark., 2007). 2010 yılında yapılan bir diğer çalışmada maternal obezitenin fare oosit ve zigotlarının mitokondriyal metabolizmalarını değiştirdiği ve mtDNA kopya sayısı, Mitotracker gibi mitokondriyal metabolizma belirteçlerinin değerlendirildiği yöntemlerin yanı sıra otofloresan NADH ve FAD ölçümü kullanarak da ortaya konmuştur (Igosheva ve ark., 2010). Kriyoprezervasyon yöntemleri olan yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemlerinin fare ve insan oosit ve embriyolarının, hücrel redoks durumunu değiştirerek metabolizma üzerine etkileri 2015 yılında ve özellikle otofloresan NADH ve FAD ölçümleri yapılarak 2016 yılında yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Somoskoi ve ark., 2015; Nohales-Corcoles ve ark., 2016). Bu bilgiler doğrultusunda; özellikle preimplantif gelişim süresince fare embriyo metabolizmasının ve farklı çevresel koşullara (örneğin; besin kaynağı eksikliği ya da hipoksik koşullar) embriyoların verdiği yanıtın özellikle invaziv olmayan yöntemler kullanılarak belirlenmesi ve literatüre sunulması oldukça önem kazanmaktadır.



Şekil 2.7. Bir fare oositindeki sitozolik ve mitokondriyal kompartmanlardan üretilen NADH ve FAD otofloresanları. FAD kaynakları yeşil ile boyalı alanlar olarak gösterilmekte olan pürivat dehidrogenaz (PDH) ve ETS'de bulunan kompleks I'dir (Dumollard ve ark., 2007).

2.6. Çalışmanın Çıkış Noktası, Hipotezi ve Amacı

Günümüzde kliniklerde rutin olarak yapılmakta olan embriyo değerlendirmeleri temel olarak morfolojik ve morfokinetik parametrelere dayanmakla birlikte, morfolojik ve kromozomal olarak normal kabul edilen embriyoların implantasyon başarısızlığı gösterebildiği ve bu embriyoların mutlaka “en iyi kalitedeki embriyo” olmadığı da bilinmektedir. Bu nedenle günümüzde embriyo değerlendirme kriterlerinde morfolojik kriterlere ek olarak kullanılabilir ve özellikle embriyonun metabolik durumu hakkında bilgi verebilecek yeni biyobelirteçlere ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak metabolik durum değerlendirmelerinde **literatürde yapılan çalışmalarda kullanılan tekniklerin olumsuz yanı, mtDNA içeriklerinin belirlenmesi gibi yöntemlerde embriyo biyopsisi gibi invaziv uygulamaların gerekliliğidir.** İnvaziv olarak yapılan girişimlerin, özellikle oositlerde ve embriyolarda stres yaratarak pek çok olumsuz sonuca neden olduğu da bilinmektedir (Leese, 2012). Ayrıca bu embriyolar daha sonra embriyo transferi gibi ileri aşamalarda kullanılamayacağından, invaziv olmayan bir yöntem ihtiyacı duyulmaktadır. Tüm bu literatür bilgisi ışığında bu çalışmanın hipotezi şöyledir: **normal ve metabolik olarak zorlanan preimplantif dönem fare embriyo**

metabolizmaları, embriyoların bulunduğu ortam koşullarına bağlı olarak verdiği metabolik yanıtlara dayanarak, invaziv olmayan yöntemler olan otofloresan NADH ve FAD moleküllerinin floresan sinyallerinin ölçümüne dayanarak belirlenebilir.

Bu hipotez doğrultusunda planlanan çalışmamızda; invaziv olmayan iki farklı teknik olan FLIM ve yeni nesil konfokal mikroskopları kullanılarak, NADH ve FAD otofloresan ölçümleriyle özellikle farklı besin içerikleri, farklı oksijen konsantrasyonu ve mitokondriyon bozucuları varlığında embriyo metabolizma yanıtının belirlenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızdan elde edilecek sonuçların; fare embriyo metabolizmasıyla ilgili literatüre oldukça detaylı bilgiler sağlayacağını, özellikle tekniksel olarak ileri çalışmalar için alt yapı sağlayacağını ve çalışmamızla birlikte yapılacak ileri çalışmalardan elde edilecek verilerin kliniklerde morfolojik parametrelere ek olarak konfokal mikroskobu gibi teknikler aracılığıyla metabolizma görüntülenme parametresinin de biyobelirteç olarak kullanılmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Metabolizma Ölçümünde İnvaziv Olmayan FLIM Tekniğinin Kullanılması

3.1.1 Embriyo Eldesi ve Kullanıma Hazırlanması

FLIM tekniği kullanılarak yapılan tüm çalışmalarda Embryotech (Embryotech™ Laboratories, Inc, USA) firmasından temin edilen, dişi B6C3F1 ve erkek B6D2F1 melez soyundan elde edilmiş ve her bir pipet içerisinde 10 adet olacak şekilde dondurulmuş olan zigotlar (B1-10) kullanıldı. Embriyolar teminlerinden kullanılacakları süreye kadar nitrojen tankı içerisinde saklanmış ve deney öncesinde kullanılmak üzere firmanın önerdiği çözme protokolü uygulandı. Çözme protokolü; nitrojen tankından çıkartılan pipetin 2-3 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra iki ucunun makasla kesilmesinin ardından içerisindeki sıvının, firma tarafından temin edilen ince bir piston yardımıyla pamuk kısımdan itilerek M2 medyumu (MR-015-D, Merck) kullanılarak oluşturulmuş damlacıklardan ilkinde aktarılması şeklinde uygulandı. Elde edilen embriyolar stereomikroskop (Olympos) altında yaklaşık 10 dakika içerisinde oluşturulan diğer M2 damlacıklarından geçirilerek yıkama yapıldı ve böylece embriyolar için sitotoksik olan dondurma solüsyonunun uzaklaştırılması sağlandı. M2 medyumu içerisindeki embriyolar önceden CO₂ ile dengelenen KSOM medyumu (MR-121-D, Merck) içerisine transfer edildi. FLIM kullanılarak kültüre edilen embriyolar, özel olarak kullanılan “Well of well” (WOW, Primovision embriyo culture dish, Vitrolife) kaplarına yerleştirildi ve üzeri mineral yağ (Ovoil, Vitrolife) ile kaplandı.

3.1.2. FLIM Tekniğinde Kullanılan Kültür Koşulları ve Oluşturulan Gruplar

FLIM kullanılarak farklı koşullara embriyo metabolizmasının verdiği yanıtı belirlemek amacıyla farklı kültür ve ortam koşulları kullanıldı. Bu koşullar aşağıda maddeler halinde sıralanmıştır:

- **Farklı Besin İçeriklerindeki Medyumlar Kullanılarak Metabolik Olarak Zorlanan Embriyoların Kültürü ve Embriyo Metabolizma Yanıtlarının Ölçümü:** Bilindiği üzere, preimplantif embriyo gelişim sürecinde enerji üretiminde temel olan ve bu nedenle de medyum içeriklerinin temelini oluşturan besin maddeleri; pürivat, glikoz ve laktattır. Özellikle gelişimin erken evrelerinde glikoz kullanılmamasından dolayı enerji üretiminde temel olan besin pürivattır ve

kompaksiyon aşamasından itibaren glikoz kullanımını da enerji üretimi için bir besin maddesi olmakta hatta enerji üretiminde baskın hale geçmektedir. Çalışmamızda; farklı besin maddelerinin kombine edilmesiyle oluşturulan koşullara embriyo metabolizmasının verdiği yanıtın ortaya konulması ve bu amaçla embriyoların; pürivat, laktat ve glikozun farklı kompozisyonları ile oluşturulan medyumlarda kültüre edilmesi amaçlandı. Yapılan deneyler süresince, embriyoların morfolojileri, gelişimsel potansiyelleri ve metabolik yanıtları incelendi. Fare preimplantif dönem embriyo kültürü için temel olarak kullanılan medyum oldukça optimize edilmiş ve yaygın bir şekilde laboratuvarlarda kullanılan tek basamaklı KSOM medyumudur. Bu medyum; temel olarak pürivat, glikoz, laktat, proteinler ve tuzlar gibi preimplantif dönem embriyo gelişim süresince embriyonun ihtiyaç duyduğu maddeleri içeren bir medyumdur. Deneylerimizde farklı besin içerikleri oluşturmak üzere yapmak istediğimiz farklı kombinasyonlarda (örneğin; glikoz içermeyen KSOM medyumunu) kullanmak üzere istenilen içeriklerde KSOM'un ticari olarak bulunmamasından dolayı, farklı kombinasyonlardaki medyumların laboratuvarımızda hazırlayarak elde edilmesi gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu nedenle aşağıda içeriği belirtilen KSOM medyumunu hazırlama tarifi esas alınarak önce KSOM medyumunu ve daha sonra diğer tüm tuzlar ve protein miktarları sabit kalacak şekilde besin maddeleri olan pürivat, laktat ve glikoz içeriklerinin belirtildiği şekilde değiştirilmesiyle istenilen şekilde farklı kombinasyonlardaki medyumlar hazırlandı. Ayrıca deneyler sırasında elde edilen sonuçlar doğrultusunda pürivatın laktata karşılıklı dönüşümünü katalizleyen laktat dehidrogenaz (LDH) enziminin kompetitif inhibitörü olan oksamat (Merck, O751) kullanıldı (Wilkinson ve Walter, 1972). Oksamatın kullanım dozu benzer bir fare oositi çalışması referans alınarak 10mmol/l olarak belirlendi (Dumollard ve ark., 2007).

KSOM İçeriği: pH = 7.3 ± 0.1

- ❖ **Tuzlar:** NaCl: 5.55 g/L, KCl: 0.19 g/L, KH₂PO₄: 0.05 g/L, MgSO₄•7H₂O: 0.05 g/L, CaCl₂•2H₂O: 0.25 g/L, EDTA: 0.004 g/L, NaHCO₃: 2.1 g/L
- ❖ **Protein/aminoasitler:** L-glutamin: 0.146 g/L ve sığır serum albümini: 1g/L
- ❖ **Besinler:** Sodyum pürivat: 0.02 g/L, Sodyum laktat: 1.12 g/L ve Glikoz: 0.04 g/L

KSOM medyumunun literatürde belirtilen içeriğe göre hazırlanmasının ardından öncelikle yapılan KSOM medyumunun embriyo gelişimine olan etkisi pozitif kontrol olarak test edildi. Bu amaçla, pürivat (P), laktat (L) ve glikoz (G) içeren KSOM içerisinde (pozitif kontrol) ve farklı besinleri içeren medyumlarda embriyolar zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar FLIM donanımı kullanılarak embriyo gelişimi için optimum koşullar olan 37°C sıcaklık ve %5 O₂ ve %5 CO₂ gaz koşullarını sağlayan ibidi™ hücre kültür sistemi (Ibidi™, GmbH, Almanya) üzerinde kültüre edilerek, bir yandan morfolojileri ve gelişimsel potansiyelleri takip edilirken bir yandan da metabolik verileri olan NADH ve FAD canlı görüntülemesi yapıldı. Tüm deneyler sırasında kontrol grubu olarak bir grup embriyo inkübatör içerisinde 37°C, %5 O₂ ve %5 CO₂ koşullarda inkübatör içerisinde (Panasonic, MCO-5MUUV) kültüre edildi. Deney grubu olarak oluşturduğumuz farklı kültür medyumunu kompozisyonları şu şekildedir.

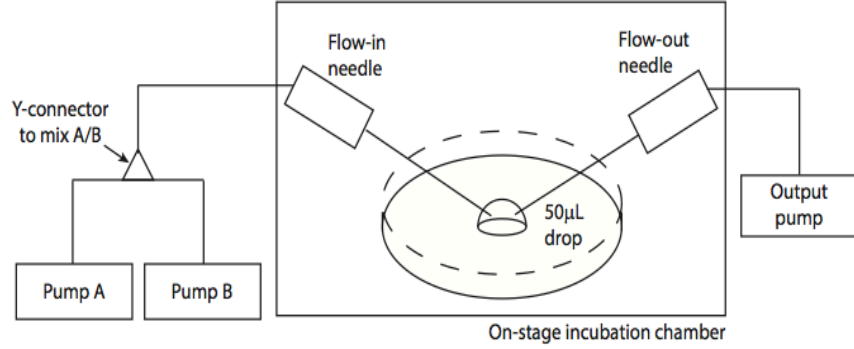
- **PLG:** Pürivat, Laktat ve Glikoz içeren kontrol grubu
 - **Besinsiz:** Pürivat, Laktat ve Glikoz içermeyen grup
 - **PL:** Pürivat ve Laktat içeren grup
 - **PG:** Pürivat ve Glikoz içeren grup
 - **P:** Sadece Pürivat içeren grup
 - **L:** Sadece Laktat içeren grup
 - **G:** Sadece Glikoz içeren grup
 - **LO:** Sadece laktat içeren medyuma oksamat eklenen grup
 - **PLGO:** Pürivat, Laktat ve Glikoz içeren medyuma oksamat eklenen grup
- **Farklı Besin İçeriklerindeki Medyumlarda Metabolik Olarak Zorlanan Embriyoların Kültürünün Oksijen Düzeyinin Değiştirilmesi ile Kombinasyonu ve Embriyo Metabolizma Yanıtlarının Ölçümü:** P ve PL grubundaki embriyolar için ek olarak O₂ seviyelerinin deney sürecinde 1 saat süre ile %0'a düşürüldüğü deneyler gerçekleştirildi. Bu deneyin amacı; erken evrede sadece pürivatın oksidatif fosforilasyonla enerji üretimi için yeterli olması beklenirken bu süreçte temel olan O₂'nin düşürülmesi ve bir süre sonra tekrar geri verilmesine embriyonun metabolik yanıtını ve bu yanıtın geri dönüşümlü olup olmadığının belirlenmesidir. Bu deney için FLIM donanımına yerleştirilmiş ibidi sistemindeki WOW kabında sadece pürivat içeren ya da sadece pürivat ve laktat içeren medyumda %5 O₂'de kültüre

başlanan embriyolardan 10 dakika boyunca görüntüleme yapılırken aynı anda metabolik NADH ve FAD ölçümleri yapıldı. 10 dakika sonunda oksijen düzeyi %0'a indirildi ve 1 saat boyunca %0 O₂ ile kültür yapıldıktan sonra tekrar %5 O₂'e yükseltildiği süre boyunca embriyolar aynı anda morfolojik olarak görüntülenirken bir yandan metabolik NADH ve FAD ölçümleri gerçekleştirilmeye devam edildi. Kültür sistemi içerisindeki oksijen düzeyi Gaslab (GasLab® Configuration & Data Logging Software, Florida, ABD) programı aracılığıyla ölçüldü ve kaydedildi.

- **Medyum Değişim Sistemi ile Metabolik Olarak Zorlanan Embriyolara Siyanid Uygulaması ve Metabolizma Yanıtlarının Ölçümü:**

Metabolizma çalışmalarında enerji üretiminin engellenmesi ve/veya bozulması metabolik yanıtın belirlenmesi açısından oldukça yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Bunun için genel olarak; ETS inhibitörleri (siyanid, rotenon, antimisin), oksidatif fosforilasyon inhibitörleri (oligomisin) ve ETS-OXPHOS arasındaki eşleşme bozucular (uncoupler, FCCP) kullanılmaktadır. ETS inhibitörleri genel olarak sistemdeki spesifik lokasyonlarına bağlanarak elektron transferini engelleyen moleküllerdir. ETS inhibitörlerinden biri olan siyanid, sitokrom oksidazın demir bölgesine ferrik iyon (Fe⁺³) şeklinde bağlanarak Kompleks IV'ü inhibe eden bir moleküldür. Dolayısıyla siyanid uygulaması sonucunda ETS inhibe olduğundan ve enerji üretilemediğinden, siyanid toksik bir moleküldür. Çalışmamızda; medyum değişim sistemi kullanılarak embriyolar KSOM içerisinde kültüre edilip, FLIM üzerinde ölçümleri yapılırken siyanid (Merck, kat. No.151-50-8) uygulaması yapıldı ve embriyoların metabolik yanıtları ölçüldü. Siyanid 50mM olacak şekilde KSOM içerisinde çözülerek stok solüsyon halinde -20°C'de saklandı. Kullanmadan önce KSOM içerisinde 1:10 dilue edilerek çalışma konsantrasyonu olarak 5mM siyanid kullanıldı. Siyanidin kültür sistemine verilmesi tarafımızdan özel olarak hazırlanan Şekil 3.1'de gösterilen çizimimiz esas alınarak uygulamaya geçirildi ve Şekil 3.2'de gösterilen sistem kurulduktan sonra pompa sistemi aracılığıyla verildi. Kullandığımız pompa sistemi ile pek çok farklı kültür medyumunu değişim modeli uygulanabilir, ancak siyanid kullanarak yaptığımız deneylerde "Basit Sürekli İnfüzyon" modeli kullanıldı. Bu model temel olarak iki pompadan birinin sıvıyı iterken ve diğerinin eşzamanlı olarak sıvıyı çekişi prensibine dayanmaktadır. Medyum değişimi sırasında pompa hızlarının belirlenmesi, embriyo stabilitesinin

sağlanarak FLIM ölçümlerinin sürekli bir şekilde alınabilmesi açısından oldukça önemliydi. Bu amaçla yapılan denemeler sonucunda 50 μ L/dk hızla yapılan medya değişiminin embriyo stabilitesini etkilemediği görüldü ve kültür medyumunu değişim sisteminde bu hız ile pompalama kullanıldı.



Şekil 3.1. Kültür medyumunu değişimi için yapılması tasarlanan sistemin şematik çizimi. Kültür medyumunu değişim sisteminde kültür medyumunun değişimini sağlamak üzere A ve B olmak üzere iki adet giriş pompası ve bir adet çıkış pompası bulunmaktadır. Sistemin çalışma prensibi; petri kabına sabitlenmiş olan giriş ve çıkış pompalarının bağlantısını sağlayan iğneler aracılığıyla, embriyoların içerisinde bulunduğu 50 μ L'lik damlacık içindeki medyumun istenilen içerikle değişiminin gerçekleşmesine dayanmaktadır.



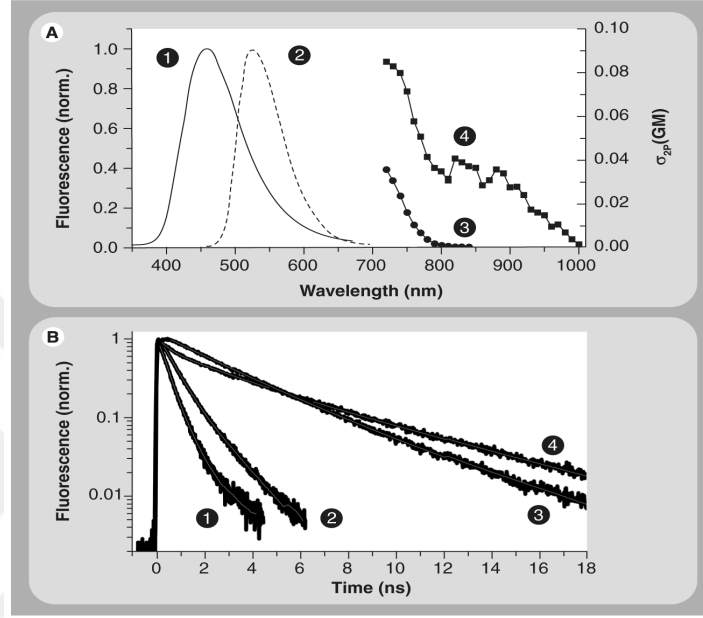
Şekil.3.2. Kültür medyumunu değişim sistemi için yapılması tasarlanan sistemin FLIM donanımına yerleştirilmiş görüntüsü. Kültür medyumunu değişim sisteminde medyum değişimini sağlayacak pompalar (kırmızı) ve FLIM sistemi görülmektedir.

Deney şu şekilde gerçekleştirilmiştir: FLIM üzerinde İbidi sisteminin içerisindeki WOW kabının içerisindeki KSOM ile kültüre başlanan embriyolardan 10 dakika boyunca görüntüleme yapılırken aynı anda metabolik NADH ve FAD ölçümleri gerçekleştirilmeye başlandı. 10 dakika sonunda sonra pompa sistemi çalıştırılarak içerisinde 5mM siyanid içeren KSOM medyumunu embriyonun içerisinde bulunduğu medyuma 5 dakika boyunca verildi ve süre sonunda 30 dakika daha embriyolar aynı anda görüntülenirken bir yandan metabolik NADH ve FAD ölçümleri gerçekleştirilmeye devam edildi.

3.1.3. Floresan Yarı Ömrü Görüntüleme Mikroskobu (FLIM) Tekniğinin Kullanımı ve Yapılan Ölçümler

Chance ve arkadaşlarının yaklaşık 60 yıl önce yaptıkları öncü çalışmalarından beri hücrelerde ve dokularda mitokondrinin metabolik durumunu belirlemek amacıyla, ATP üretiminin anahtar koenzim molekülleri olan NADH ve FAD otofloresanlarının kullanımından yukarıda detaylı bir şekilde bahsedilmiştir (Chance ve Williams, 1955d, 1955c, 1955b, 1955a; Chance ve ark., 1955; Chance, Cohen, ve ark., 1962; Chance, Legallais, ve ark., 1962; Chance ve ark., 1965; Chance, 1976). İki foton mikroskobisi; moleküllerin kızıl ötesi ışık ile yüksek sayısal açıklıklı objektif kullanılarak doğrusal olmayan (non-linear) eksitasyonu prensibine dayanmaktadır. Odak noktasında femto filtre hacminde bir bölgenin düşük enerjili iki fotonla uyarımına dayanır ve uyarım kaynağı olarak kırmızı ötesi lazer kullanılıp morötesi lazer kullanılmadığından hücrelere verilen zarar da çok aza indirgenmektedir (Denk ve ark., 1990; Xu ve Webb, 1996; Centonze ve White, 1998; Zipfel ve ark., 2003; Masters ve So, 2004; CAN, 2018). İki foton mikroskobu çizgisel olmayan uyarım sebebiyle yüksek uzaysal çözünürlük sağladığından konfokaldeki “pinhole”e gerek duymaz ve böylece floresan foton kaybı en aza indirgenmiş olur. Ayrıca bu çözünürlükte kullanım fototoksisiteyi de azaltır (Heikal, 2010b). Diğer mikroskoplardan farkı, uyarım yapan lazerlerin dalga boyunun yayılım ışınlarının dalga boyundan uzun olmasıdır ve her bir uyarım için bir değil, iki lazerden çıkan fotonlar kullanılır (CAN, 2018). Tekli foton mikroskobisi kullanılarak, NADH spektrumunun 458nm’de (Şekil 3.3A.1) ve FAD spektrumunun ise 528 nm emisyonunda (Şekil 3.3A.2) pik yaptığı (maksimum) noktalarda görüntülenebilir. İki foton mikroskobu kullanıldığında ise, NADH ve FAD’nin çizgisel olmayan olarak 730 nm’de uyarılabileceği ancak 850-950 nm dalga boyunda sadece FAD’nin eksite olarak

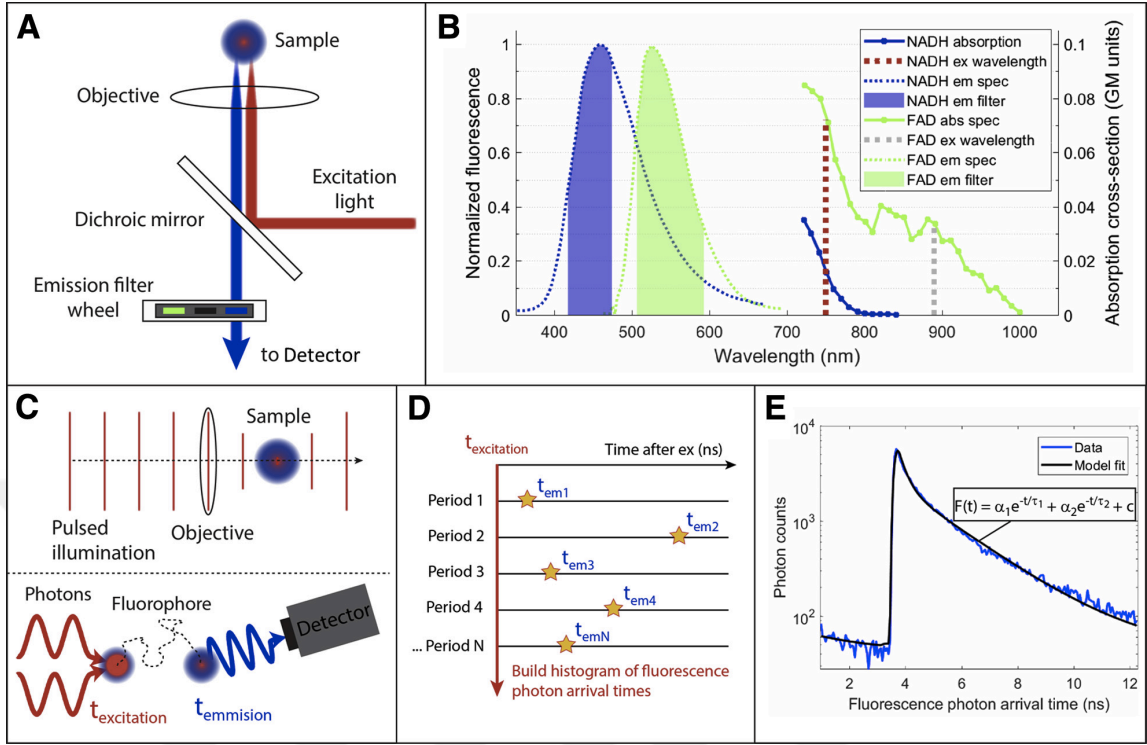
görüntülenebildiği (Şekil 3.3A.3-4) ve böylece uygun iki foton eksitasyon dalga boyu ve uygun belirleme filtreleri kullanılması sonucunda NADH ve FAD otofloresanlarını birbirinden ayırarak görüntülemek mümkündür (Huang ve ark., 2002; Heikal, 2010b) .



Şekil.3.3. A) Konfokal veya geniş alan floresan mikroskobu kullanılarak görüntülenebilen, NADH spektrumu (1) ve FAD spektrumu (2) ve iki foton mikroskobisi kullanılarak görüntülenebilen, NADH spektrumu (3) ve FAD spektrumu (4) görülmektedir. B) NADH (1) floresan yarı ömrü ve FAD (3) floresan yarı ömrü ve NADH'nin bir enzime bağlandığında (malat dehidrogenaz) (2) ve FAD'ın bir enzime bağlandığında (lipoamid dehidrogenaz) (4) değişen floresan yarı ömrü gösterilmektedir (Huang ve ark., 2002).

Yoğunluğa dayalı mikroskopların aksine, uyarılmış floresan yarı ömrünü ölçmek floroforun hem moleküler konformasyonuna hem de çevresel koşullarına oldukça duyarlı olmasından dolayı oldukça avantajlıdır. Floroforların floresan ömrü, zamana bağlı tekli foton sayma ile FLIM tarafından ölçülebilmektedir (Becker, 2005). FLIM, zaman ilişkili tekli foton sayma yolu ile görüntüdeki her fotonun saniyenin milyarda birinin altındaki varış zamanını kaydeder. Ayrıca bir floresanın yarı ömrü, floroforun benzer fizyolojik koşullardaki konsantrasyonundan bağımsızdır (Heikal, 2010b). NADH ve FAD floresanlarının ömrü proteinlere bağlandıklarında değişir (Lakowicz, 2006). Örneğin, enzime bağlı halde bulunan NADH yarı ömrü serbest halde bulunan NADH yarı ömrüne göre daha fazladır ve aksine enzime bağlı halde bulunan FAD yarı ömrü serbest halde bulunan FAD yarı ömrüne göre daha azdır (Vishwasrao ve ark., 2005; Q.

Yu ve Heikal, 2009a) (Şekil 3.3B). FLIM, iki foton görüntüleme ile birlikte kullanıldığında, NADH ve FAD fraksiyonlarını ve bu endojen floroforların diğer özelliklerini hücre içi çözünürlükleriyle birlikte kantitatif olarak ölçebilmektedir ve böylece, mitokondri ve hücrenin metabolik durumu kantifiye edilerek belirlenebilmektedir (Becker, 2005). Böyle yaklaşımlar ve yöntemler, kanser hücrelerinin (Q. Yu ve Heikal, 2009a), çeşitli hücre hatlarının (Niesner ve ark., 2004), kök hücrelerin (Stringari ve ark., 2011), memeli dokularının (Skala ve ark., 2007) ve *C. elegans*'da germ hücre farklılaşma sürecinin (Stringari ve ark., 2011) metabolik durumunu karakterize etmek için oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Çalışmamızda embriyoların metabolizma ölçümleri FLIM ile iki fotonlu Nikon mikroskop üzerinde Ti:Sapphire lazer (M-Squared lazer), bir galvanometrik tarayıcı, zaman ilişkili foton sayma modülü (Time-correlated single photon counting, TCSPC) (SPC-150; Becker and Hickl) ve bir foton sayma detektörü (HPM-100-40; Becker and Hickl) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4). NADH için eksitasyon dalga boyu 750 nm ve lazer gücü 45 mW ve FAD için eksitasyon dalga boyu 845 nm ve lazer gücü 75 mW olarak ayarlanmıştır. Dedektör önündeki filtreler NADH için 460/50 nm ve FAD için 550/88 nm (Chroma Technology) olarak kullanılmıştır. Görüntüleme 20X Nikon objektif (0.75 sayısal açıklık) kullanılarak yapılmıştır. NADH/FAD ölçümleri ve verilerin eldesi, Labview ile özel kodlanmış bir yazılım ve Becker Hickl (Becker-Hickl GmbH, Almanya) veri elde etme yazılımının kombinasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen görüntülerin tüm bilgilerini kaydetmek, görünebilir formata dönüştürmek ve tüm analizleri yapmak için özel olarak kodlanmış Matlab yazılımı kullanılmıştır. Embriyoların segmentasyonu Image J programı kullanılarak gerçekleştirilirken, aydınlık alan görüntüleri ise okülere bağlı bir Amscope kamera ile alınmıştır. Sonuç olarak embriyolardan NADH ve FAD'nin her biri için parlaklık (konsantrasyon), bağlı ve serbest halde bulunana fraksiyonlar ve bağlı ve serbest haldeki floresan ölçümleri gerçekleştirildi.



Şekil.3.4. FLIM ile yapılan bir metabolik görüntülemenin şematik çizimi. A) Floresan mikroskopunun temel kısımları. Florofor bir dalga boyundaki eksitasyon ışığı ile görüntülenir ve farklı bir dalga boyundaki floresan dikroik ayna ve emisyon filtresi kullanılarak izole edilir. B) İki foton mikroskopunda NADH ve FAD için eksitasyon ve emisyon spektrumlarını gösteren şekil. C) TCSPC FLIM, atımlı görüntüleme gerektirir ve her bir atım tek bir floroforu eksite edebilir ve kısa süre sonra molekülün yaydığı floresan floroforu SPC detektör ile belirlenir ve varış zamanları kaydedilir. D) FLIM 80MHz hızındaki vuruşları hızı bir şekilde ileterek kısa bir süre içerisinde pek çok floroforu uyarır ve varış zamanlarını kaydeder. Bu varış zamanları, varış zamanı histogramında toplanır. E) Histogram, floroforların mikroçevresi hakkında bilgi sağlar ve bilginin modelleme kullanılarak floresan azalmanın model ile olan uyumu sayesinde ekstraksiyonu yapılabilir (Sanchez ve ark., 2019).

3.2. Metabolizma Ölçümünde İnvaziv Olmayan Konfokal Mikroskopi Tekniğinin Kullanılması

3.2.1. Embriyoların Süperovulasyon ve Eldesi ve Kullanıma Hazırlanması

Embriyoların eldesi için kullanılan Balb/C türü 6-8 haftalık erişkin dişi ve erkek fareler Ankara Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Laboratuvarından temin edildi (Etik kurul protokol numarası: 2016.03.15), su ve besin kısıtlaması olmaksızın 12 saatlik periyodlarla aydınlık/karanlık sikluslarında muhafaza edildi. Folikülogenezi stimüle etmek için dişi farelere intraperitonel olarak 5 IU/hayvan PMSG (pregnant mare serum gonadotropin) enjeksiyonu ve PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra, ovulasyonu indüklemek için intraperitonel 5 IU/hayvan hCG (human chorionic gonadotropin) enjeksiyonu yapıldı. hCG enjeksiyonu yapıldığı günün akşamında dişi fareler erişkin

erkek fareler ile aynı kafeste bırakılarak çiftleşmeleri sağlandı ve ertesi sabah vajinal plak kontrolü yapılan ve plak belirlenen fareler fertilizasyonun 0,5. gününde kabul edildi. Vajinal plak kontrolü yapılarak gebeliğin pozitif olduğu varsayılan dişi fareler hCG enjeksiyonundan 42 saat sonra sakrifiye edildi ve Fallop tüpleri çıkartılarak G-3-N-morfolino propanesülfonik asit (GMOPS) medyumuna içerisine alındı. Stereomikroskop altında fallop tüpünün ampulla bölgesi patlatıldı ve 2 hücreli embriyolar toplanarak medyum içerisine aktarıldı. Elde edilen tüm embriyolar bölüm 3.2.2'de açıklanacak olan her bir gruba ait kültür medyumuna içerisine alındı.

3.2.2. Grupların Oluşturulması ve Embriyo Kültür Koşulları

- **Kontrol Grubu:** Deneye başlamadan bir gün önce gece boyu medyum gazlanması sağlanması ve dengelenmesi için 50µL'lik damlacıklar halinde medyumlar hazırlanarak ve mineral yağı (Ovoil, Vitrolife) ile kaplanarak 35mm Petri kaplarının (LP İtaliana SP L123518) içerisinde inkübatöre koyuldu. Elde edilen 2 hücreli embriyolar GTL (G-Time Lapse, Vitrolife) medyumuna içerisine alınarak blastosist aşamasına kadar %5 O₂, %5 CO₂ ve 37°C koşullarındaki inkübatörde (Panasonic, MCO 5M) kültüre edildi. Kültüre başlandığı an kültürün 0. saati olarak kabul edildi. Kültürün 6. saatinde 2 hücreli embriyolar alınarak canlı olarak konfokal mikroskopta DIC ve FAD görüntülerinin alınmasının ardından yine canlı mitokondri boyamaları olan Mitotracker® ve rhodamine boyamaları yapıldı. Daha sonra embriyolar paraformaldehit (PFA) ile fikse edilerek immunofloresan boyaması yapılmak üzere deneye alındı. Aynı deneysel süreç kültürün 12. saatinde 4 hücreli embriyo grubu için, kültürün 24. saatinde 8 hücreli embriyo grubu için, kültürün 36. saatinde morula grubu için ve kültürün 60. saatinde blastosist grubu için yapıldı.
- **Kimyasal Anoksi (FCCP) Grubu:** Farklı *in vitro* koşullarda metabolik olarak zorlanan preimplantif dönem embriyoların metabolizmalarının değerlendirilmesi amacıyla; mitokondriyel eşleşmeyi bozucu/engelleyciler (uncoupler) kullanılarak **kimyasal anoksi** grubu oluşturuldu. Mitokondride oksidatif fosforilasyon “uncoupler”ları; elektron transportu ve fosforilasyon reaksiyonları arasında eşleşmeyi ve böylece ATP sentezini, solunum zincirini ve ATP sentezi etkilemeden, inhibe eden moleküllerdir (Terada, 1990). Bu grupta, erken evre

prekompaksiyon embriyolarda enerjinin tek kaynağı olarak mitokondride gerçekleşen oksidatif fosforilasyonu (OXPHOS) inhibe eden ve bir protonofor olan Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) kullanıldı. FCCP (C2920, Sigma-Aldrich) kullanım dozu belirlemede literatür referans alınarak (Liu ve ark., 2001; Ge ve ark., 2012; Zander-Fox ve ark., 2015) 1µM ve 1mM olarak embriyolarda doz denemesi yapıldı. Deneye başlamadan bir gün önce gece boyu medyum gazlanması sağlanması ve dengelenmesi için 50µL'lik damlacıklar halinde medyumlar hazırlanarak ve mineral yağ (Ovoil, Vitrolife) ile kaplanarak 35mm Petri kaplarının (LP İtaliana SP L123518) içerisinde inkübatöre koyuldu. İki hücreli embriyo aşamasından blastosist aşamasına kadar 1µM ve 1mM FCCP içeren GTL içinde kültüre edilen embriyolara deney sonunda mitokondri boyamaları yapıldı ve sonuçlara göre embriyo gelişiminin durmadığı ve mitokondri membran potansiyelinin azaldığı görüldüğünden dolayı düşük doz 1µM FCCP uygulama dozu olarak belirlendi. Elde edilen 2 hücreli embriyolar 1µM FCCP içeren GTL medyumuna içerisine alınarak blastosist aşamasına kadar %5 O₂ ve %5 CO₂ ve 37°C koşullarındaki inkübatörde kültüre edildi. Kültüre başlandığı an kültürün 0. saati olarak kabul edildi. Kültürün 6. saatinde 2 hücreli embriyolar alınarak canlı olarak konfokal mikroskopta DIC ve FAD görüntüleri alınmasının ardından yine canlı mitokondri boyamaları olan Mitotracker ve rhodamine boyamaları yapıldı. Daha sonra embriyolar PFA ile fikse edilerek immünofloresan boyaması yapılmak üzere deneye alındı. Aynı deneysel süreç kültürün 12. saatinde 4 hücreli embriyo grubu için, kültürün 24. saatinde 8 hücreli embriyo grubu için, kültürün 36. saatinde morula grubu için ve kültürün 60. saatinde blastosist grubu için yapıldı.

- **Fiziksel Anoksi (%0 O₂) Grubu:** Farklı *in vitro* koşullarda metabolik olarak zorlanan preimplantif dönem embriyoların metabolizmalarının değerlendirilmesi amacıyla; **anoksi** (%0 O₂) ortamında kültüre edilen embriyolardan oluşan anoksi grubu oluşturuldu. Deneyde kullanılan inkübatörün oksijen ayarı 0.5'e ayarlandığında inkübatör içi oksijen seviyesinin ölçümü gaz analizörü kullanılarak (GEOTECH, G100) %0 olarak belirlendi (Şekil 3.5).



Şekil.3.5. Deneyde kullanılan inkübatörün oksijen ayarı 0.5'e ayarlandığında inkübatör içi oksijen seviyesinin ölçümü gaz analizörü kullanılarak (GEOTECH, G100) %0 olarak belirlendiğini gösteren fotoğraf.

Deneye başlamadan bir gün önce gece boyu medyum gazlanması sağlanması ve dengelenmesi için 50µl'lik damlacıklar halinde medyumlar hazırlanarak ve mineral yağ (Ovoil, Vitrolife) ile kaplanarak 35mm Petri kaplarının (LP İtaliana SP L123518) içerisinde inkübatöre koyuldu. Elde edilen 2 hücreli embriyolar GTL medyumuna içerisinde alınarak blastosist aşamasına kadar %0 O₂ ve %5 CO₂ ve 37°C koşullarındaki inkübatörde kültüre edildi. Kültüre başlandığı an kültürün 0. saati olarak kabul edildi. Kültürün 6. saatinde 2 hücreli embriyolar alınarak canlı olarak konfokal mikroskopta DIC ve FAD görüntüleri alınmasının ardından yine canlı mitokondri boyamaları olan Mitotracker ve rhodamine boyamaları yapıldı. Daha sonra embriyolar PFA ile fikse edilerek immunfloresan boyaması yapılmak üzere deneye alındı. Aynı deneysel süreç kültürün 12. saatinde 4 hücreli embriyo grubu için, kültürün 24. saatinde 8 hücreli embriyo grubu için, kültürün 36. saatinde morula grubu için ve kültürün 60. saatinde blastosist grubu için yapıldı.

3.2.3. Konfokal Mikroskopi Tekniğinin Kullanımı ve Yapılan Ölçümler

Her aşamada görüntülenecek olan embriyolar yüksek kalitede optik görüntüleme için cam tabanlı Petri (World Precision Instruments, FD35-100) kaplarına aktarılıp mineral yağ ile kaplandıktan sonra Zeiss Axio Observer invert mikroskop donanımlı Zeiss LSM-880 konfokal mikroskop (Zeiss, Germany) ile görüntülendi. Embriyolardan konfokal mikroskop üzerinde sırasıyla DIC görüntü, otofloresan FAD (488 nm), Mitotracker (543 nm) ve Rhodamine (514 nm) görüntüleri alındı. Embriyolar daha sonra PFA ile fikse edilip immünfloresan deneyleri gerçekleştirildikten sonra GLUT1 (488 nm) ve çekirdek için Hoechst (405 nm) görüntülemesi yapıldı.

3.2.4. Konfokal Mikroskopi Tekniği Kullanılarak Canlı Mitokondri Değerlendirilmesi

Deney sonunda FAD görüntülemesi yapılan her gruba (kontrol, kimyasal anoksi, fiziksel anoksi) ait embriyodan toplam mitokondrileri belirlemek amacıyla MitoTracker ve aktif mitokondrileri belirlemek amacıyla rhodamine (Johnson ve ark., 1980) boyaması gerçekleştirildi (Cottet-Rousselle ve ark., 2011; Volejnikova ve ark., 2013; Zorova ve ark., 2018; Al-Zubaidi ve ark., 2019). Elde edilen sinyallerden rhodamine/mitotracker oranı belirlenerek gruplar arasındaki mitokondri membran potansiyeli değerlendirildi. Embriyolar 0,5M MitoTracker™ Red CMRX (Molecular Probes, M7512) ve 1mg/mL Rhodamine123 (Molecular Probes™ R302) ile birlikte oluşturulan damlacık içerisinde 30 dakika 37°C karanlıkta inkübe edildi. Daha sonra embriyolar fazla solüsyondan kurtulmak için GMOPS ile yapılan yıkama işleminin ardından mineral yağ ile kaplı cam tabanlı petriye aktarılıp embriyolardan alınan canlı floresan sinyaller konfokal mikroskopta fotoğraflandı.

3.2.5. İmmünofloresan Yöntemi

Mitokondri değerlendirmeleri yapılan embriyolar PBS ile yıkanmalarının ardından PFA ile 20 dakika oda ısısında fikse edildi. Fiksasyon işleminin ardından embriyolar, 3 kez 10' ar dakika PBS'den geçirilerek yıkandı ve ardından embriyolar, % 0,25'lik Triton X 100 solüsyonunun içerisinde 15 dk boyunca oda ısısında bekletilerek permeabilize edildi. Permeabilizasyon işleminin ardından embriyoların, 3 kez 10' ar dakika PBS' den geçirilerek yıkamaları yapıldı. Yıkama işleminin ardından embriyolar, antikor dilüe edici solüsyon içerisinde hazırlanmış olan primer antikor olan rabbit GLUT1 (1:100, Abcam,

ab652) içerisine aktarıldı ve gece boyu +4°C' de inkübe edildi. Primer antikor ile inkübe edilme işleminin ardından ertesi gün embriyoların, 3 kez 10'ar dakika PBS'den geçirilerek yıkamaları yapıldı. Yıkama işleminin ardından embriyolar, antikor dilüe edici solüsyon içerisinde hazırlanmış olan floresan işaretli sekonder antikor olan 1:300 oranında hazırlanan Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen A11008) içerisine aktarılarak 1 saat oda ısısında ve karanlık ortamda inkübe edildi ve ardından embriyoların, 3 kez 10'ar dakika PBS'den geçirilerek yıkamaları yapıldı. Son olarak embriyolar üzeri yağ ile kaplı Hoechst içeren kapatma solüsyonunu içeren damlacıklara aktarıldıktan sonra floresan görüntülemeleri yapıldı.

Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışları:

• %3 Paraformaldehit Solüsyonu

Altı gram paraformaldehit 200 mL bidistile su içerisine eklenerek ve içerisine NaOH eklenip manyetik karıştırıcıda (Velp Scientifica F20520162) tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Berrak çözelti oluşmasının ardından bir tablet PBS karışıma eklendi (1X PBS, Sigma P4417). Solüsyonun pH=6.4 olacak şekilde pH metre ile ölçülerek ayarlandı ve daha sonra solüsyon eşit hacimlere bölünerek -20°C'de kullanıma kadar saklandı.

• PBS (Phosphate Buffered Saline-Fosfat tamponlu tuz)

Bir tablet PBS (Sigma P4417) 200 ml bidistile su içerisinde çözünmesiyle 1X PBS hazırlandı.

• Permeabilizasyon Solüsyonu

İki buçuk mikrolitre Triton X 100 (Sigma T8787) 1 mL PBS içerisinde % 0,25 oranında olacak şekilde çözülmesiyle hazırlandı.

• Antikor Diluent Solüsyonu

%0,1'lik Tween-20 (Sigma P1379) içeren PBS solüsyonu, antikor dilüe edici solüsyonu olarak kullanıldı.

• Hoechst İçeren Kapatma Solüsyonu

Bir mikrolitre Hoechst (Sigma H6024) 1 ml PBS içerisinde eklenmesiyle çözüldü. 0,005 ml 1mg/ml stok Hoechst solüsyonu, 2,5 ml gliserol, 2,5 ml PBS ve 125 mg sodyum azid eklenmesiyle kapatma solüsyonu hazırlandı.

3.2.6. Floresan Sinyallerin Kantifikasyonu ve Analizi

Her grup (kontrol, kimyasal anoksi, fiziksel anoksi) için elde edilen FAD, Mitotracker ve Rhodamine floresan sinyallerinin ölçümü Zen Blue v2.3 histogram aracı kullanılarak ölçüldü ve hesaplandı. Elde edilen verilerden sinyal hesaplaması şu şekilde formülize edildi: Düzeltilmiş toplam hücre floresanı (corrected total cell fluorescence (CTCF)) = Tümüleşik yeğlilik (Integrated density) – Seçilmiş hücre alanı (area of selected cell) × Arka plan okumalarının ortalama floresanı (mean fluorescence of background readings)] (Coskun ve Can, 2015). Daha sonra elde edilen veriler sonucunda gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar yapıldı.

3.2.7. İstatistiksel Analizler

Deneylerden elde edilen verilerde normal dağılımın varlığı test edildikten sonra sonuçlar parametrik testler kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizi Sigma Stat 3.5 programı kullanılarak yapıldı. Kimyasal ve fiziksel anoksi grubuna ait embriyoların ölçülen Rhodamine/mitotracker oranı ve FAD ölçümleri t testi kullanılarak kontrol grubuna ait ölçümlere göre test edildi. Analiz sonuçlarına göre $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

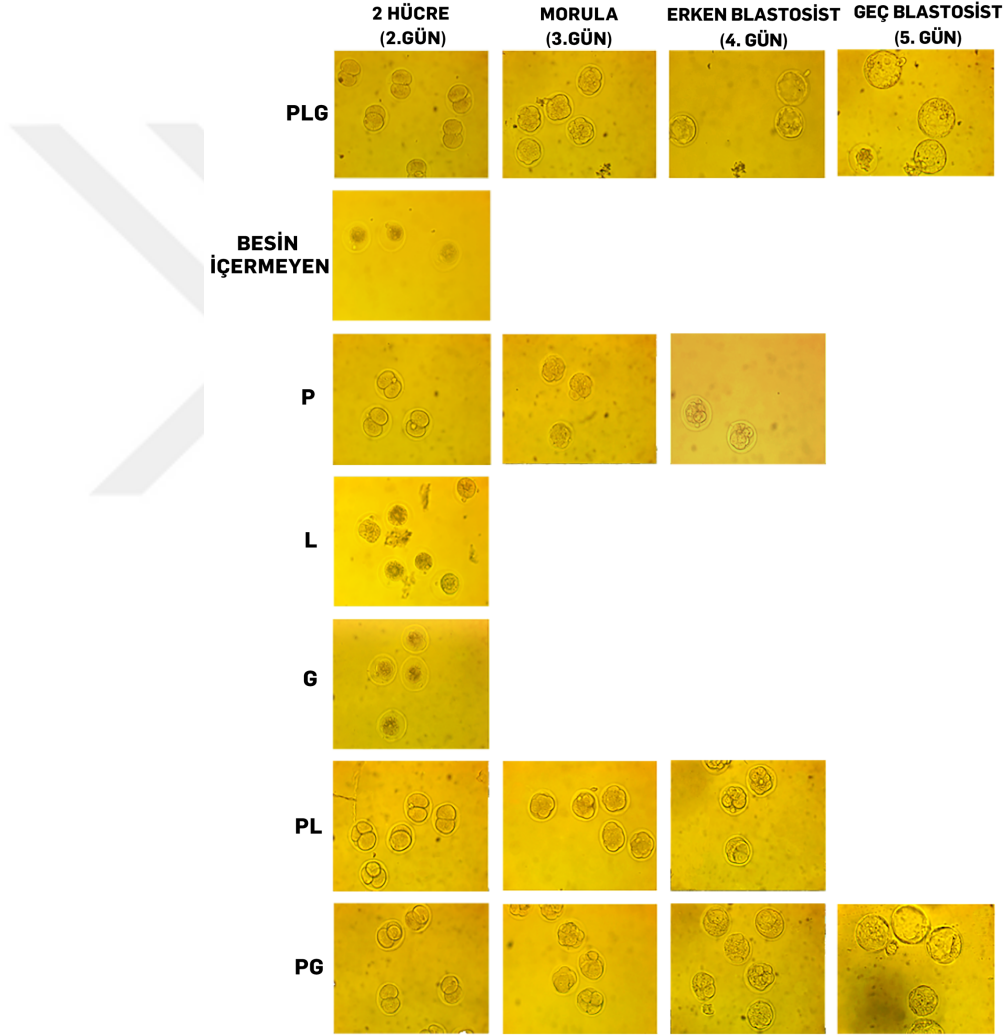
4. BULGULAR

4.1 FLIM Tekniği Kullanılarak Elde Edilen Metabolizma Verileri

4.1.1. Farklı Besin İçeriklerindeki Medyumlar Kullanılarak Metabolik Olarak Zorlanan Embriyoların Kültürü ve Embriyo Metabolizma Yanıtlarının Ölçümü

Bu grupta pürivat, laktat ve glikoz içeren kontrol grubunda (PLG), besin içermeyen grubunda, pürivat ve laktat içeren grupta (PL), pürivat ve glikoz içeren grupta (PG), sadece pürivat içeren grupta (P), sadece laktat içeren grupta (L), sadece glikoz içeren grupta (G), sadece laktat içeren medyuma oksamat eklenen grupta (LO) ve pürivat, laktat ve glikoz içeren medyuma oksamat eklenen grupta (PLGO) kültüre edilen embriyolardan metabolik ölçümler gerçekleştirildi. Metabolik verilere geçilmeden önce kendimiz tarafından yapılan medyumların doğruluğunu test etmek amacıyla PLG, besin içermeyen, PL, PG, P, L ve G gruplarında kültüre edilen embriyoların morfolojileri ve gelişim potansiyelleri değerlendirildi (Şekil 4.1). Gelişim sonuçları değerlendirildiğinde; yaptığımız KSOM medyumunun ticari olan KSOM ile benzer sonuçlar elde edecek şekilde olduğu ve embriyoların başarılı bir şekilde gelişerek blastosist aşamasına geldikleri görülmüştür ve böylece hazırladığımız medyum test edilmiştir ve medyum içeriği hazırlığımızın başarılı olduğu görülmüştür. Besin içermeyen grupta herhangi bir enerji üretim kaynağı olarak besin bulunmamasından dolayı beklenildiği gibi embriyolar zigot aşamasında duraklamışlardır ve gelişimlerini ilerletememişlerdir. Pürivat grubundaki embriyoların, morula aşamasına kadar gelişebildikleri ancak bu aşamada durakladıkları görülmektedir. Özellikle kompaksiyondan sonra embriyoların glikoza ihtiyaç duyduğu göz ününe alındığında bu sonuç literatür ile uyumlu olarak karşımıza çıkmıştır. Laktat ve glikoz grubundaki embriyoların da ilk bölünmeyi dahi gerçekleştiremeyerek zigot aşamasında durakladıkları görülmüştür. Kompaksiyon aşamasına kadar gerekli olan temel enerji kaynağı pürivat olmasından dolayı ve glikozun ve laktatın zigot tarafından metabolize edilememesinden dolayı bulgularımız literatür bilgisiyle uyumludur. Pürivat ve laktat grubundaki embriyoların morula aşamasında kadar geliştikleri ve hatta morulaya ulaşma oranının P grubundan daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durumun 2 hücreli embriyolar tarafından kullanılmaya başlanan laktatın, enerji üretimine olan ek katkısından dolayı olduğunu söylemek mümkündür.

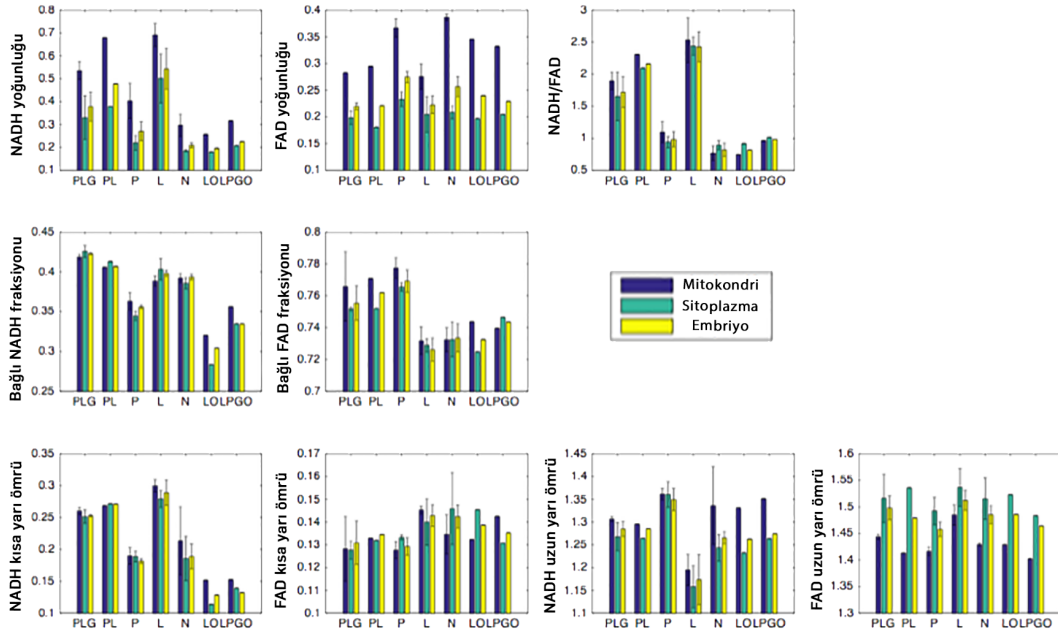
Pürivat ve glikoz grubundaki embriyoların çoğunun blastosist aşamasına ulaşabildikleri görülmüştür. Bu sonuç, glikozun varlığının kompaksiyon aşamasından sonraki enerji üretimine katkısı ve blastosist oluşumunu destekleyici etki ile uyumludur. Sonuç olarak; kendi hazırladığımız KSOM medyumunu ve bu KSOM ile yapılan farklı kombine medyumların literatür bilgisi ile uyumlu sonuçlar verdiği ve embriyo metabolizma ölçümlerinde kullanılabileceği bu sonuçlar ile gösterilmiştir.



Şekil.4.1. Metabolik değerlendirilmelere geçilmeden önce kendimiz tarafından hazırlanan medyumların doğruluğunu test etmek amacıyla pürivat, laktat ve glikoz içeren kontrol grubunda (PLG), besin içermeyen grubunda, sadece pürivat içeren grupta (P), sadece laktat içeren grupta (L), sadece glikoz içeren grupta (G), pürivat ve laktat içeren grupta (PL) ve pürivat ve glikoz içeren grupta (PG) zigotların blastosist aşamasına kadar kültüre edilmesi sonucunda elde edilen sonuçlar. Büyütme 20X. (n=6)

Elde edilen bu verilerin ardından zigotlar PLG, besin içermeyen, PL, PG, P, L, G, LO ve PLGO gruplarında farklı besin içeren ortamlarda kültüre edilirken, FLIM ile canlı NADH ve FAD ölçümleri yapıldı. Ölçümler şöyleydi; i) NADH ve FAD yoğunlukları ve ii) NADH yoğunluğunu FAD yoğunluğuna olan oranı (NADH/FAD), iii) NADH ve FAD bağlı fraksiyonlarını ve iv) NADH ve FAD uzun ve kısa yarı ömür ölçümleri yapıldı. Daha önce elde ettiğimiz veriler doğrultusunda embriyo metabolik yanıtını toplam olarak değerlendirmek yerine, embriyo sitoplazmasının, mitokondrisinin ve embriyonun toplamının farklı koşullarda verdiği metabolik yanıtların ayrı ayrı incelenmesinin farkları daha net bir şekilde ortaya koyduğu görülmüştür. Bu nedenle deneylerde embriyonun metabolik yanıtı her bir parametre için sitoplazma, mitokondri ve toplam olarak ayrı ayrı değerlendirildi. Sonuçları değerlendirmeden önce dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta şudur ki; farklı gruplardan elde edilen NADH ve FAD verilerinin artması ya da azalmasından doğrudan bir sonuç çıkarmak bu moleküllerin hücresel süreçteki karmaşık görevlerinden dolayı oldukça zordur. Buradaki temel amaç; farklı besin ortamlarında kültüre edilen bir embriyonun NADH ve FAD parametrelerindeki artış ve azalışlardan yola çıkılarak bir metabolik profilinin ortaya çıkartılmasıdır. Sonuçlarımıza göre; NADH yoğunluğu incelendiğinde pürivatın; NADH'ı sitoplazmada oksitlediği yani başka bir deyişle pürivatın NADH'ı mitokondride azalttığı görülmektedir (Şekil 4.2A). Bu sonuç, esasen pürivatın olmadığı L grubuna bakılarak çıkarılmıştır. Laktatın; NADH'ı sitoplazmada indirgediği görülmektedir. FAD yoğunluğu incelendiğinde laktatın; FAD seviyesini mitokondride azalttığı görülmektedir (Şekil 4.2B). NADH/FAD oranı incelendiğinde; laktatın ve pürivatın, laktat dehidrogenaz (LDH) aracılığıyla embriyonun redoks durumunu düzenlediği görülmektedir (Şekil 4.2C). NADH bağlı fraksiyon sonuçlarına göre; laktat NADH'ı LDH'ı bağlayarak arttırmakta ve pürivat NADH'ı mitokondride bağlayarak arttırmaktadır (Şekil 4.2D). FAD bağlı fraksiyon sonuçlarına göre; pürivat FAD bağlanmasını arttırırken, laktatın FAD bağlanmasını etkilemediği görülmüştür (Şekil 4.2E). En önemli sonuçlardan biri NADH'ın uzun yaşam süresi sonuçlarına bakıldığında; mitokondriyel enzimlere bağlı NADH'ın, LDH'a bağlı NADH'a göre daha uzun yaşam süresi olduğu görülmektedir (Şekil 4.2H). Sonuçlarda genel olarak, mitokondrinin besin yokluğunda ve farklı kombinasyonlardaki besin koşullarına verdiği metabolik yanıtın, sitoplazmaya göre daha şiddetli olduğu görülmüştür.

Bu deney sonuçları doğrultusunda, ek olarak iki farklı kombinasyonda besin ortamının yapılmasına karar verilmiştir. Bunlardan ilki LO grubu yani laktat ve oksamat içeren grup ve ikincisi LPGO yani pürivat, laktat, glikoz ve oksamat içeren gruptur. LDH'ın, glikolizin temel düzenleyicisi olduğu ve geri dönüşümlü olarak pürivatın laktata dönüşümünü katalizlediği bilinmektedir. Oksamat, bir LDH inhibitörüdür ve çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda yalnızca laktat içeren grupta NADH yoğunluk seviyesinin gruplar arasında en yüksek olmasından dolayı oksamat kullanılarak LDH inhibisyonu yapılmasına karar verilmiştir. Laktat, ortamda yalnızca laktat bulunduğu durumda enerji üretimi için pürivata dönüştürülebilir ancak embriyonun laktat kökenli pürivatı mitokondriyal ATP üretimi için kullanmadığı literatür bilgisi olarak yer almaktadır (Dumollard ve ark., 2008) ve bu da bizim deney düzeneğimizde embriyoların ölmesinin nedeni olarak açıklanabilmektedir. Bu bilgiden yola çıkarak; NADH birikiminin, laktatın enerji üretimi amacıyla pürivata dönüşümünden kaynaklı olabileceği düşünülmüştür ve bu nedenden dolayı oksamatın, fazla NADH varlığından emin olmak amacıyla kullanılmasına karar verilmiştir. LO grup sonuçlarına göre, oksamat uygulamasının NADH yoğunluk seviyesini L grubuna kıyasla azalttığı görülmüştür (Şekil 4.2A). Bu sonuç doğrultusunda, artmış NAD seviyesinin, laktatın pürivata dönüşüm basamağında üretilen NADH'den dolayı olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca, oksamatın PLG grubuna etkisini test etmek amacıyla oluşturulan LPGO grubunda oksamatın, NADH yoğunluğunu PLG grubuna kıyasla beklenildiği gibi yine azalttığı görülmüştür (Şekil 4.2A). Sonuç olarak; embriyonun mitokondri ve sitoplazmasının farklı besin kombinasyonlarının oluşturulduğu kültür koşullarındaki metabolik yanıtlarının ayrı ayrı değerlendirilmesi gerçekleştirilmiş ve mitokondrinin sitoplazmaya kıyasla metabolik yanıtının daha şiddetli olduğu ortaya koyulmuştur. Ayrıca çalışmamızda, önemli bir veri olarak gruplar arasında özellikle yalnızca laktat içeren grupta artmış ve en yüksek olan NADH'ın kaynağı ve altında yatan mekanizması oksamat kullanarak açığa çıkarılmıştır.

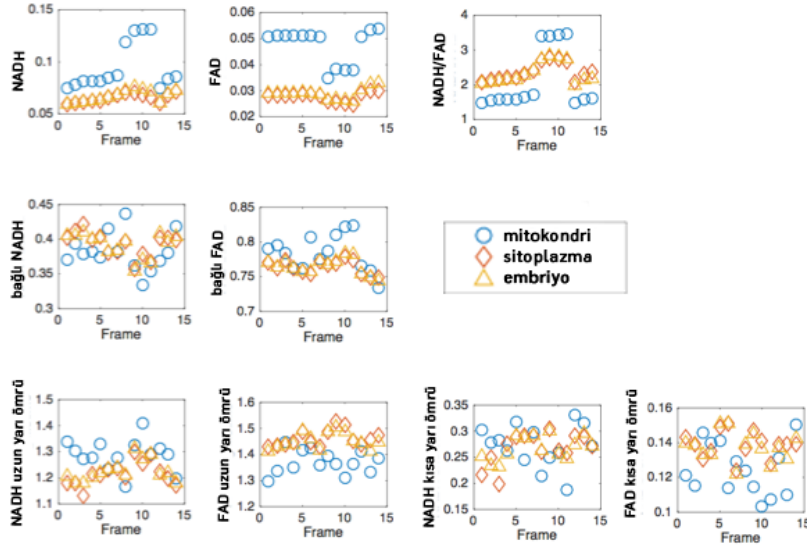


Şekil.4.2. Farklı besin kompozisyonlarında kültüre edilen embriyolardan FLIM aracılığıyla elde edilen NADH ve FAD ölçümler. NADH (A) ve FAD (B) floresan yoğunlukları ve oranları (C), NADH (D) ve FAD (E) bağlı fraksiyon seviyeleri ve NADH (F) ve FAD (G) kısa ve NADH (H) ve FAD (I) uzun yarı ömürleri grafik halinde sunulmaktadır. Mitokondrinin verdiği metabolik yanıt (mor), sitoplazmanın verdiği metabolik yanıt (yeşil) ve mitokondri ve sitoplazmanın tümünün değerlendirilerek embriyonun verdiği metabolik yanıt (sarı) barlar olarak sunulmuştur. (n=10)

4.1.2. Farklı Besin İçeriklerindeki Medyumlarda Metabolik Olarak Zorlanan Embriyo Kültürünün Oksijen Düzeyinin Kısa Süreliğine Değiştirilmesi ile Kombinasyonu ve Embriyo Metabolizma Yanıtlarının Ölçümü

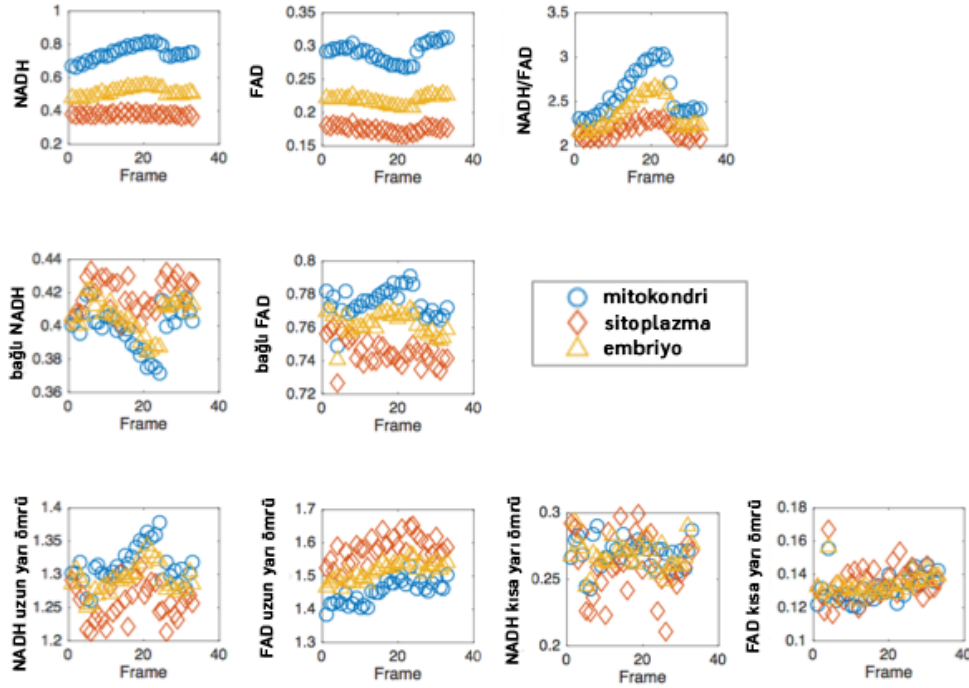
Farklı medyum kompozisyonlarında gerçekleştirilen ve ortaya konulan embriyo metabolizma ölçümlerinin ardından, besin deneyleri ile oksijen deneylerinin kombine uygulanmasına karar verildi. Bu deneylerin yapılmasının amacı; pürivat ya da laktat gibi enerji üretiminde kullanılacak besin kaynağı ve oksijen yokluğunda embriyo metabolizmasının vereceği yanıtı ve enerji üretimi için alternatif bir yolak kullanıp kullanamayacağını araştırmaktır. Bu amaçla embriyolar, P medyumunda içerisinde FLIM üzerine görüntü elde etmek ve metabolizma ölçümlerini almak amacıyla yerleştirildi ve eş zamanlı olarak bir saat boyunca oksijen düzeyi %5'den %0'a indirildi ve 1 saatin sonunda 20 dakika içerisinde oksijen düzeyinin %0'dan %5'e tekrar yükselmesi sağlandı. Bu deneyin ardından, yalnızca pürivat içeren (P) medyum içerisine konulan ve eş zamanlı olarak bir saat boyunca kalmak üzere oksijen düzeyi %5'den %0'a indirilen ve 1 saatin sonunda 20 dakika içerisinde oksijen düzeyinin %0'dan %5'e tekrar yükseltelen ortamdaki embriyolardan, FLIM ile metabolik ölçümler ve görüntülemeler

gerçekleştirildi. Bu embriyolardan gelen NADH ve FAD sinyalleri deney sürecinde izlendi ve elde edilen veriler kaydedildi. Bu deneyler sonucunda FLIM'den elde edilen veriler, Matlab ile analiz edilerek grafiğe dönüştürüldü (Şekil 4.3). Sonuçlara göre; oksijen seviyesinin %5'den %0'a düştüğü süre içerisinde; zıt bir şekilde NADH sinyalleri artarken FAD sinyallerinin azaldığı, ayrıca NADH bağlı fraksiyonlarının azaldığı ve FAD bağlı fraksiyonlarının arttığı görülmüştür. Deneylerin ileri aşamasında özellikle NADH/FAD oranının, oksijen seviyesinin %0'dan %5'e tekrar yükselmesi sonucunda başlangıçtaki %5 oksijen seviyesindeki değerlere geri döndüğü görülmüştür. Bu durum sonucunda oksijenin metabolizma üzerine olan etkilerinin geri dönüşümlü olduğu görülmektedir. Ayrıca grafikte gösterildiği üzere tüm embriyodan gelen sinyaller sitoplazma ve mitokondri düzeyinde ayrı olarak incelendiğinde, oksijen düzeyi değişikliklerine mitokondrinin sitoplazmaya kıyasla daha güçlü yanıt verdiği de önemli bir veri olarak karşımıza çıkmıştır. Sonuç olarak; embriyonun besin kaynağı olarak sadece pürivat içeren ortamdaki kültürü süresince enerji üretimi için oksijene ihtiyaç duyduğu, kombine etkinin metabolizmayı olumsuz etkilediği ve enerji üretimi için mitokondriden başka alternatif bir yolak kullanamadığı görülmüştür.



Şekil 4.3. Yalnızca pürivat içeren KSOM içerisinde kültüre edilen embriyolardan gelen ve oksijen düzeylerinin değiştirilmesiyle kombine gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen NADH and FAD ölçümleri. NADH ve FAD floresan yoğunlukları ve birbirilerine oranları (ilk satır), NADH ve FAD bağlı fraksiyon seviyeleri (ikinci satır), NADH ve FAD kısa/uzun yarı ömür (üçüncü satır) verilerinden oluşturulan grafikler görülmektedir. Embriyolardan gelen metabolik veriler; mitokondriden gelenler (mavi yuvarlak), sitoplazmadan gelenler (kırmızı kare) ve tüm embriyo (sarı üçgen) olarak ayrı ayrı değerlendirilmiş ve sunulmuştur. (n=12)

Bir sonraki aşamada, yapılan deneyler PL medyumunu kullanılarak benzer şekilde gerçekleştirildi. Bu amaçla embriyolar, PL içerisinde FLIM üzerine görüntü elde etmek ve metabolizma ölçümlerini almak amacıyla yerleştirildi ve eş zamanlı olarak bir saat boyunca oksijen düzeyi %5'den %0'a indirildi ve 1 saatin sonunda 20 dakika içerisinde oksijen düzeyinin %0'dan %5'e tekrar yükselmesi sağlandı ve ortamdaki embriyolardan FLIM ile ölçümler ve görüntülemeler gerçekleştirildi. Bu embriyolardan gelen NADH ve FAD sinyalleri deney sürecinde izlendi ve FLIM'den elde edilen veriler Matlab ile analiz edilerek grafiğe dönüştürüldü (Şekil 4.4). Sonuçlara göre; oksijen seviyesinin %5'den %0'a düştüğü süre içerisinde; zıt bir şekilde NADH sinyalleri artarken FAD sinyallerinin azaldığı, ayrıca NADH bağlı fraksiyonlarının azaldığı ve FAD bağlı fraksiyonlarının arttığı görülmüştür. Yalnızca pürivat içeren ve oksijen değişiklikleriyle kombine olarak gerçekleştirilen deneylerle benzer şekilde; PL grubunda da özellikle NADH/FAD oranının, oksijen seviyesinin %0'dan %5'e tekrar yükselmesi sonucunda başlangıçtaki %5 oksijen seviyesindeki değerlere geri döndüğü görülmüştür. Bu durum sonucunda oksijenin metabolizma üzerine olan olumsuz etkilerinin geri dönüşümlü olduğu görülmekte ve yine benzer şekilde grafikte gösterildiği üzere embriyodan gelen sinyaller sitoplazma ve mitokondri düzeyinde ayrı olarak incelendiğinde, oksijen düzeyi değişikliklerine mitokondrinin sitoplazmaya kıyasla daha güçlü yanıt verdiği de önemli bir veri olarak karşımıza çıkmıştır. Sonuç olarak; embriyonun besin kaynağı olarak pürivat ve laktat içeren ortamdaki kültürü süresince enerji üretimi için oksijene ihtiyaç duyduğu, kombine etkinin metabolizmayı olumsuz etkilediği ve enerji üretimi için mitokondriden başka alternatif bir yolak kullanmadığı görülmüştür.

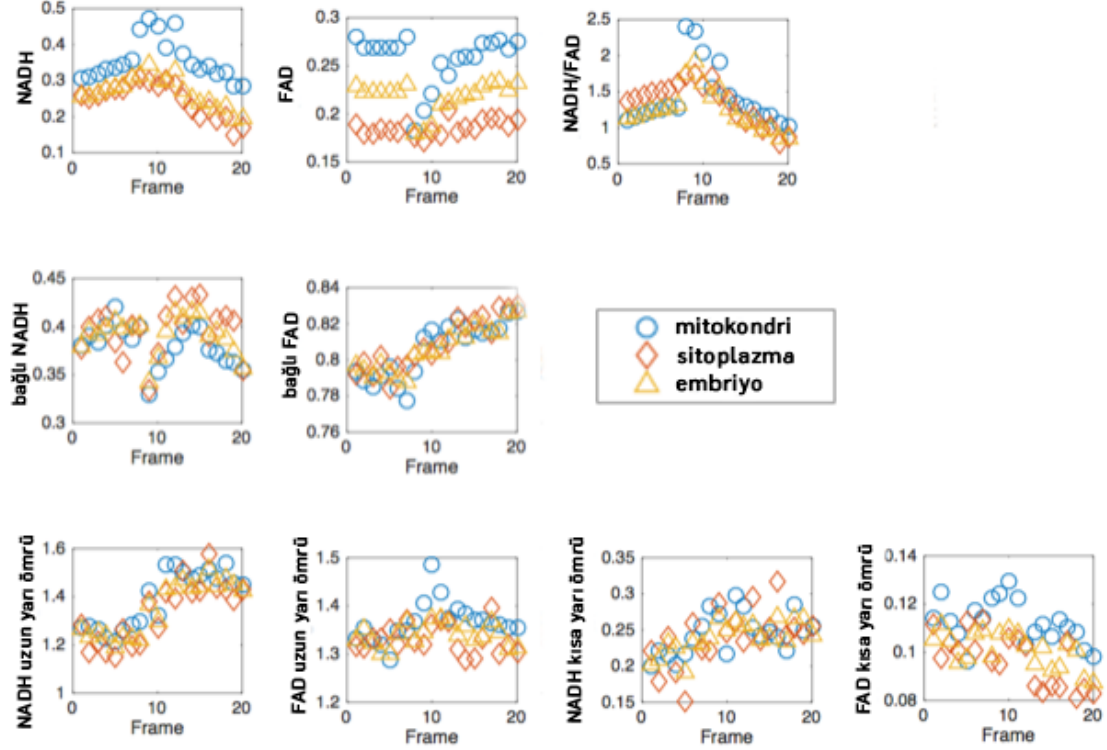


Şekil 4.4. Pürivat ve laktat içeren KSOM içerisinde kültüre edilen embriyolardan gelen ve oksijen düzeylerinin değiştirilmesiyle kombine gerçekleştirilen deneyler sonucunda elde edilen NADH and FAD ölçümleri. NADH ve FAD floresan yoğunlukları ve birbirilerine oranları (ilk satır), NADH ve FAD bağı fraksiyon seviyeleri (ikinci satır), NADH ve FAD kısa/uzun yarı ömür (üçüncü satır) verilerinden oluşturulan grafikler görülmektedir. Embriyolardan gelen metabolik veriler; mitokondriden gelenler (mavi yuvarlak), sitoplazmadan gelenler (kırmızı karo) ve tüm embriyo (sarı üçgen) olarak ayrı ayrı değerlendirilmiş ve sunulmuştur. (n=10)

4.1.3. Medyum Değişim Sistemi ile Metabolik Olarak Zorlanan Embriyolara Siyanid Uygulaması ve Metabolizma Yanıtlarının Ölçümü

Farklı besin içeriklerinin embriyo metabolizmasına olan etkilerinin değerlendirildiği deneylerin ardından, metabolik bozucu ajanlarla embriyo metabolizmasının zorlanması ve metabolizma ölçümleri gerçekleştirildi. Bu deneyin amacı, metabolik bozucular kullanılarak metabolik olarak zorlanan embriyoların metabolik profillerinin ortaya çıkarılmasıdır. Bu amaçla Kompleks IV'ü inhibe eden 5mM siyanidin medyum değişim sistemiyle FLIM üzerinde kültüre edilen zigotlara verilmesi sonucu ETS'nin inhibe olmasından dolayı enerji üretemeyen embriyoların metabolik yanıtı ölçülmüştür. Medyum değişim süresince FLIM ile veriler 30 dakika boyunca her 10 sn'de bir alınarak kaydedilmiştir. Medyum değişim sistemi kullanılarak embriyonun siyanide verdiği metabolik yanıtın her an kaydedilmesi sağlanmıştır. FLIM ile elde edilen tüm veriler Matlab aracılığıyla analiz edilerek grafik şeklinde sunulmuştur (Şekil 4.5). Sonuçlara göre, siyanid uygulaması sonucunda; NADH seviyesinin arttığı ve FAD seviyesinin

azaldığı görülmektedir. Bağlı NADH fraksiyonlarının azalırken, FAD bağlı fraksiyonlarının arttığı görülmektedir. Süre sonunda bütün değerlerin azalması enerji üretimini bloklayan ve toksik bir madde olan siyanidin embriyoların hızlı bir şekilde ölümüne yol açması nedeniyledir. Besin ve oksijenin kombine gerçekleştirildiği deneylere benzer şekilde siyanid uygulaması sonucunda da elde edilen mitokondri yanıtlarının sitoplazmaya kıyasla daha güçlü olduğu görülmektedir.

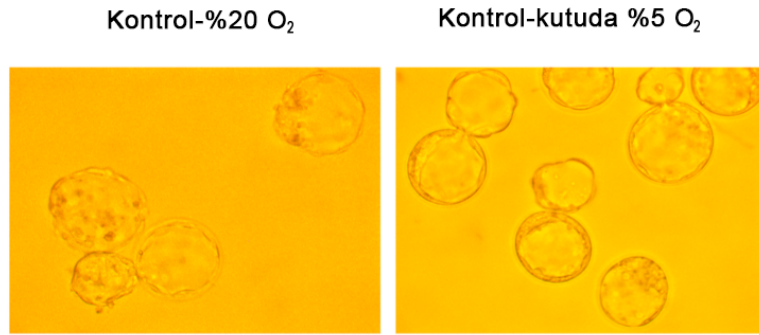


Şekil 4.5. Embriyolara medyum değişim sistemi ile verilen siyanid deneyleri sonucunda elde edilen NADH and FAD ölçülmesi. NADH ve FAD floresan yoğunlukları ve birbirilerine oranları (ilk satır), NADH ve FAD bağlı fraksiyon seviyeleri (ikinci satır), NADH ve FAD kısa/uzun yarı ömrü (üçüncü satır) verilerinden oluşturulan grafikler görülmektedir. Embriyolardan gelen metabolik veriler; mitokondriden gelenler (mavi yuvarlak), sitoplazmadan gelenler (kırmızı karo) ve tüm embriyo (sarı üçgen) olarak ayrı ayrı değerlendirilmiş ve sunulmuştur. (n=10)

Tüm bu FLIM analizleriyle farklı şekillerde metabolik olarak zorlanan embriyoların verdiği metabolik yanıt profilleri ortaya çıkarılmıştır ve ileride matematik modellemeler yapılarak elde edilen bir embriyo profilinin metabolik verilerinin hangi profile uyduğunun ortaya çıkarılması amaçlanmaktadır.

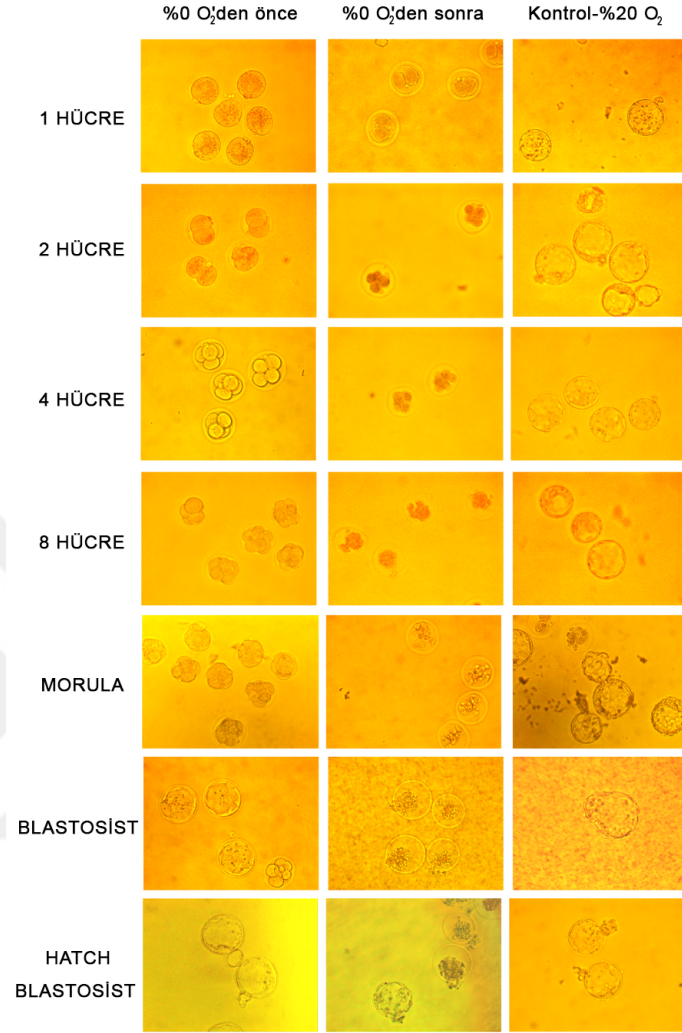
4.1.4. Embriyonun Anoksik Ortamda Kültüre Edilmesi ve Elde Edilen Sonuçlar

Oksijenin embriyo metabolizmasına etkisinin FLIM ile araştırıldığı çalışmalara ek deneyler gerçekleştirilmiştir. Bu deney planında; 0% oksijen (fiziksel anoksi) koşulunun preimplantif embriyo gelişiminin farklı aşamalarındaki embriyoların morfolojik gelişimlerine olan etkisini görmek amaçlanmıştır. Bu amaçla kendimizin dizayn ettiği bir sistem kuruldu ve bu sistem taşınabilir bir inkübatör, ağzı kapalı olarak içerisinde gazı muhafaza eden bir kutu ve %0 oksijen içeren gaz tankından oluşmaktadır. Deneylere başlamadan önce %0 oksijen içeren tank doğrudan oksijen sensörüne bağlandı ve içerdiği oksijen yüzdesi Gaslab ile ölçülerek içeriği belirlendi ve %0 oksijen içeren tankın içerdiği oksijen %0,58 olarak belirlendi. Bu deney için öncelikle kurulan sistemin kendisinin embriyo gelişimine olumsuz bir etkisinin olup olmadığını test etmek amacıyla sistemde %0 oksijen yerine normal koşullar olan %20 oksijen içeren tank kullanılarak embriyo gelişimi incelendi (Şekil 4.6). Bu amaçla deney grubundan birincisinde zigot aşamasında olan embriyolar %20 oksijen içeren normal inkübatör sisteminin içerisine konulurken (n=15), ikinci gruptaki zigotlar sistemde %5 oksijen içeriği olan kutunun içerisine konularak (n=15) gelişimlerinin 90. saatinde kontrol edilerek fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.6). Her iki gruptaki embriyolarda 90. saatte değerlendirildiğinde gelişimlerini başarılı bir şekilde tamamlayarak blastosist aşamasına geldikleri görülmüştür. Bu nedenle sistemin kendisinin embriyo gelişimine herhangi bir etkisi olmadığı görüldüğünden planlanan deneylere geçilmiştir.

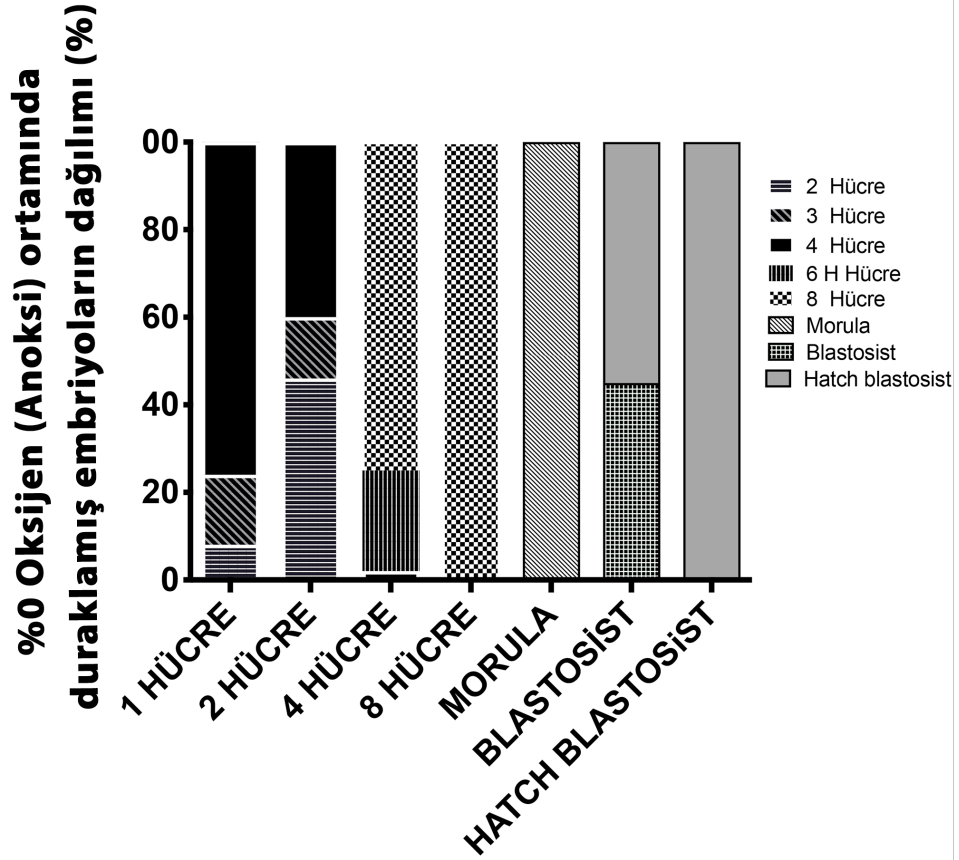


Şekil 4.6. Oksijen deneyleri için oluşturulan sistemin kendisinin kontrol edildiği deney sonucunda iki gruptan embriyoların 90. saatte morfolojik görüntüleri. İlk grupta zigot aşamasında %20 oksijen içeren normal inkübatör sisteminin içerisine konulan embriyoların, ikinci grupta ise oksijen deneyi için oluşturulan sistemde %5 oksijen içeriği olan kutunun içerisine konulan embriyoların 90. saatte gelişimleri görülmektedir. (n=6)

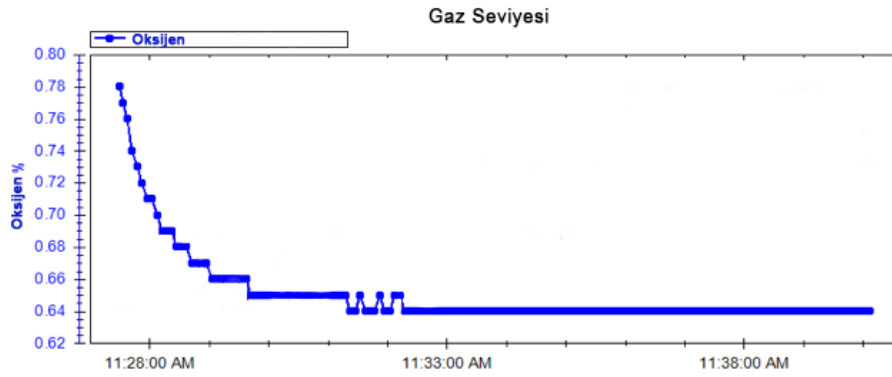
Deney planı Şu Şekilde yapılmıştır; preimplantif dđnemdeki her bir farklı aşamadaki embriyolar (zigot, 2 hđcreli, 4 hđcreli, 8 hđcreli, morula, blastosist ve hatch olan blastosist) %0 oksijen sistemini sağlayan kutunun iÇerisinde 48 saat bekletildi ve sđre sonunda gelişiminin hangi aşamasında olduğu belirlendi. Aynı anda kendisinin kontrol grubu olan embriyolar ise, %20 oksijen iÇeren inkubatörde gelişiminin son aşaması olan blastosist aşamasına geldiğinde kontrol edilerek sayısal olarak gelişimsel veriler kaydedildi. Bu deney planı doğrultusunda; deney sonunda embriyoların fotoğrafları çekilmiştir (Şekil 4.7). Her bir grup iÇin deneyler 3 kez tekrar edilmiş ve bu gelişimsel yđzdeler çıkartılarak elde edilen verilerden grafik oluŐturulmuŐtur (Şekil 4.8). Bu verilere gđre zigot aşamasında anoksik koşullar altında kđltre edilen embriyoların; %8,09'u 2 hđcre aşamasında, %15,88'i 3 hđcre aşamasında ve %76,03'ü 4 hđcreli aşamaya ulaŐmıŐtır. İki hđcre aşamasında anoksik koşullar altında kđltre edilen embriyoların; %46,2'si 2 hđcre aşamasında kalmış, %13,8'i 3 hđcre aşamasında ve %40'ı 4 hđcreli aşamaya ulaŐmıŐtır. Dđrt hđcre aşamasında anoksik koşullar altında kđltre edilen embriyoların; %2,22'si 4 hđcre aşamasında kalmış, %23,05'i 6 hđcre aşamasına ve %74,73'ü 8 hđcre aşamasına ulaŐmıŐtır. Sekiz hđcre aşamasında anoksik koşullar altında kđltre edilen embriyoların; %100'ü 8 hđcre aşamasında kalmıŐtır. Morula aşamasında anoksik koşullar altında kđltre edilen embriyoların; %100'ü morula aşamasında kalmıŐtır. Blastosist aşamasında anoksik koşullar altında kđltre edilen embriyoların; %43,3'ü blastosist aşamasında kalmış ve %56,7'si hatch olmaya baŐlamıŐ blastosist aşamasına ulaŐmıŐtır. Hatch aşamasında anoksik koşullar altında kđltre edilen blastosistlerin; %100'ü hatch aşamasındaki blastosist olarak kalmıŐtır. Ayrıca her deney iÇin embriyolar kutunun iÇerisine konulduğunda ve 48. saatin sonunda kutu açılmadan iŐerdiđi oksijen miktarı oksijen sensđrđyle ol đlmüŐtur. Bu değerin genel olarak %0,60-%0,67 arasında olduğu gđrđlmüŐtur (Şekil 4.9). Bu veri sayesinde deneydeki embriyoların anoksik ortamda kđltre edildiği dođrulanmıŐtır.



Şekil 4.7. Preimplantif dönemdeki her bir farklı aşamasında olan zigot, 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli morula, blastosist ve hatch olan blastosistler %0 oksijen sistemini sağlayan kutunun içerisine konulmadan ve 48 saat kültüre edildikten sonra fotoğraflanmıştır. Aynı anda kendisinin kontrol grubu olan embriyolarda %20 oksijen içeren inkübatörde gelişiminin son aşaması olan blastosist aşamasına geldiğinde kontrol edilmiş ve fotoğraflanmıştır. Büyütme 20X. (n=8)



Şekil 4.8. Anoksi deneyleri sonucunda elde edilen verilerden oluşturulan grafikte embriyoların 48 saat sonra gelişimlerinin hangi aşamasında olduğunun dağılımları gösterilmektedir.



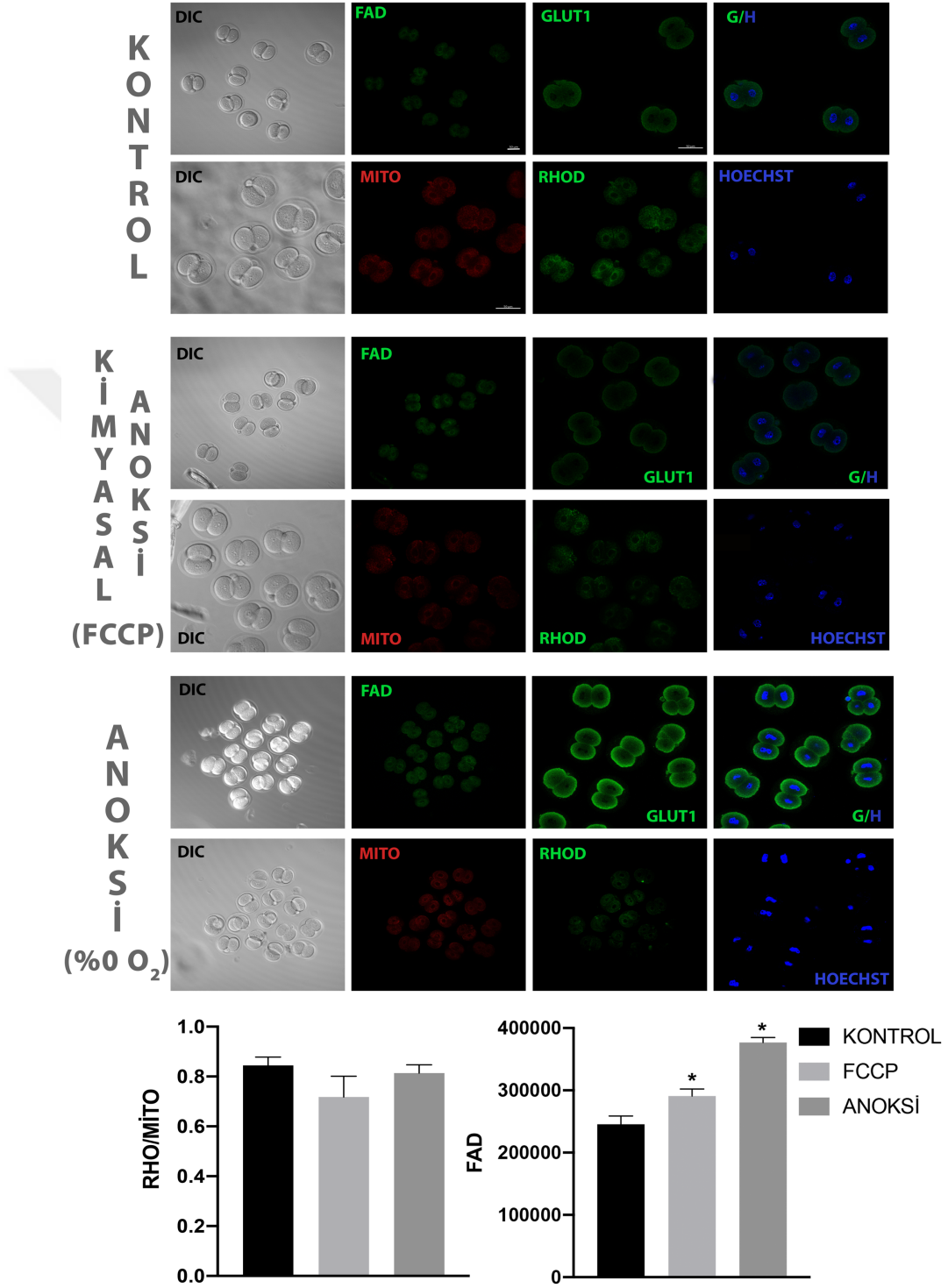
Şekil 4.9. İçerisinde deney grubuna ait embriyoların bulunduğu kutunun deney başlangıcı ve deney sonunda ölçülen oksijen yüzdesi. Burada örnek olarak bir grafik sunulmuştur ve görüldüğü gibi içerisinde embriyoların kültüre edildiği %0 oksijen içeren kutunun oksijen yüzdesi %0,64'dür (mavi).

Anoksi koşullarında yapılan deney sonuçları değerlendirildiğinde görülmektedir ki; embriyonik gelişimin erken aşamasındaki embriyolar anoksik koşullar altında 2-3 mitotik bölünme geçirebilmekte ve gelişiminin bir sonraki aşamasına geçebilmektedir. Ancak 8 hücre embriyo aşamasından itibaren embriyoların oksijen yokluğundan daha fazla etkilendiği ve gelişimlerine devam edemeyerek oldukları aşamada durakladıkları görülmektedir. Bu bulgular literatür bilgisi ile karşılaştırıldığında oldukça çarpıcıdır. Çünkü erken evre prekompaksiyon embriyoların enerji kaynağının sadece oksidatif fosforilasyon yani oksijen olduğu düşünülduğünde enerji kaynağı olmadan bir süre canlı kalan ve bölünme gerçekleştiren embriyoların altında yatan mekanizmayı araştırma gerekliliğini doğurmuştur. İlk akla gelen bu embriyoların anoksi nedeniyle Glut1 ekspresyonuna erken başladıkları fikri olmuştur. Bu mekanizmanın araştırıldığı ileri deneyler konfokal mikroskop ile gerçekleştirilmiştir.

4.2. Konfokal Mikroskopi Tekniği Kullanılarak Elde Edilen Metabolizma Verileri

Konfokal mikroskopi yöntemi ile kontrol, kimyasal anoksi (FCCP) ve fiziksel anoksi (%0 O₂) koşullarda kültüre edilmiş 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist aşamasındaki embriyolardan önce otofloresan FAD görüntülenmesi ve ardından mitokondri membran potansiyelini belirlemek amacıyla aktif mitokondri belirteci olan Rhodamine ve total mitokondri belirteci olan Mitotracker boyaması yapılarak görüntülenmesi gerçekleştirildi. FAD sinyali şiddetlerinin ölçümü ve aktif mitokondrilerin toplam mitokondrilere ölçümlerinden elde edilen Rho/Mito oranı kontrol grubuna göre kıyaslandı. Ardından her gruba ait embriyolara Glut1 immünofloresan boyama ve görüntülenmesi yapılarak özellikle glikoz taşıma görevini gerçekleştirdiği hücre membranındaki dağılım biçimi ve yerleşimi değerlendirildi. Kültürün 6. saatindeki 2 hücreli embriyo grubu değerlendirildiğinde (Şekil 4.10), Rho/Mito oranında anlamlı bir fark görülmezken, FAD sinyalinin FCCP ve %0 O₂ grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir (p=0,020). Glut1 ekspresyonu değerlendirildiğinde; kontrol grubundaki 2 hücreli embriyolarda Glut1 ekspresyonu membran ve sitoplazmaya yaygın bir patern gösterirken, FCCP grubunda sitoplazmadaki ekspresyonunun azalarak yoğun olarak membranda ekspresyon olduğu görülmektedir. %0 O₂ grubunda ise, Glut1 ekspresyonunun genel olarak kontrol grubuna kıyasla artmasıyla birlikte belirgin bir şekilde membranda lokalize olması yine dikkat çekmektedir.

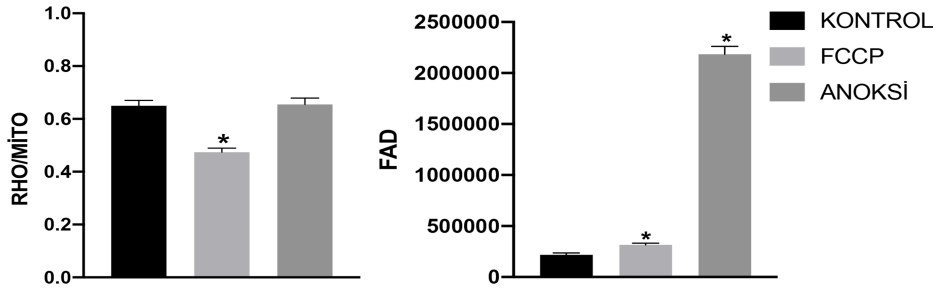
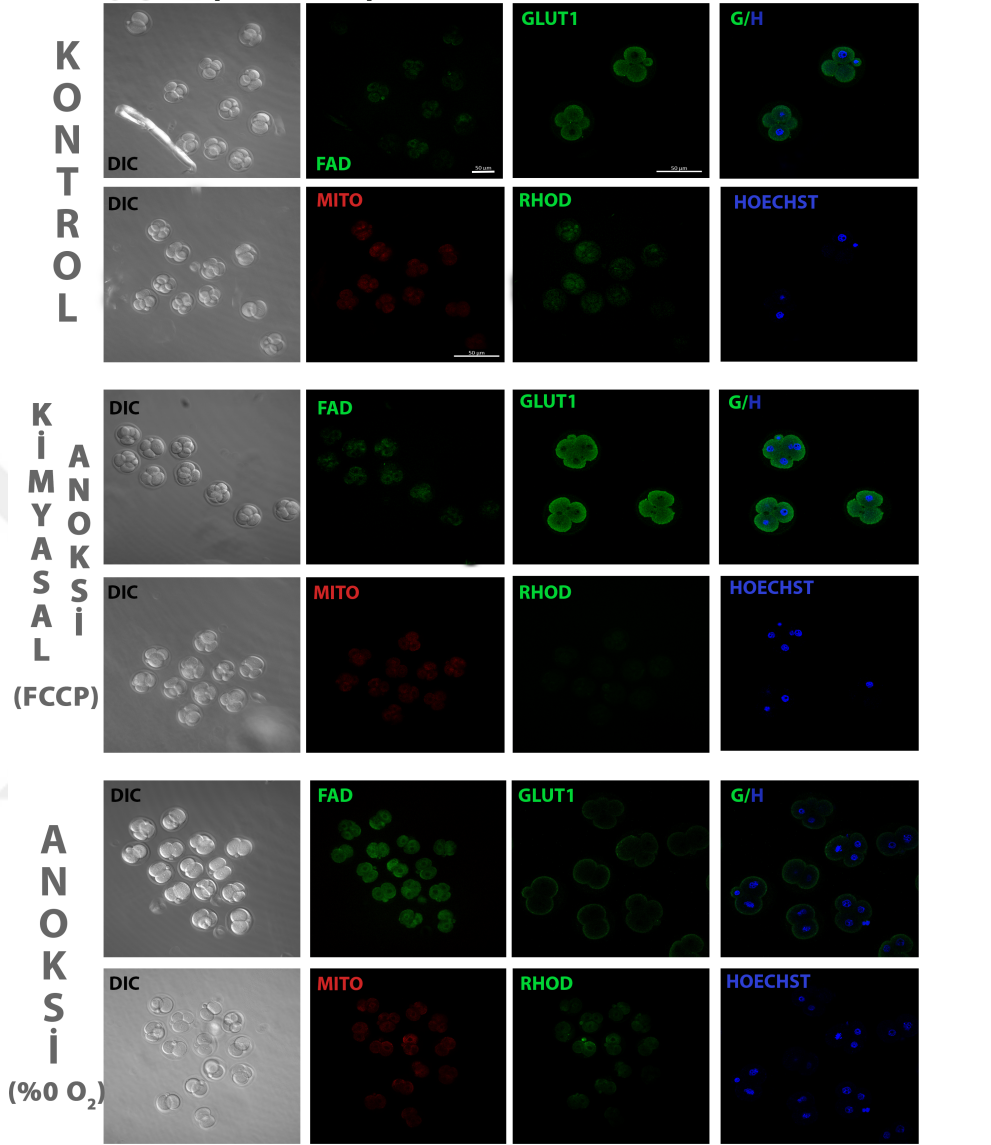
2 HÜCRE (6. saat)



Şekil 4.10. 2 hücreli embriyoların kültürün 6. saatinde kontrol, kimyasal anoksi (FCCP) ve fiziksel anoksi (%0 O₂) grubuna ait embriyoların DIC, FAD, Mitotracker, Rhodamine ve Glut1 sonuçları. Skala bar: 50µm. *: p<0,05, (n=15).

Kültürün 12. saatinde 4 hücreli embriyo grubu değerlendirildiğinde (Şekil 4.11), fiziksel anoksi (%0 O₂) grubundaki embriyoların 2 ya da 3 hücreli embriyo aşmasında durakladıkları görülmektedir. Rho/Mito oranının kimyasal anoksi (FCCP) grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığı ancak fiziksel anoksi (%0 O₂) grubunda anlamlı bir fark olmadığı görülmektedir. FAD sinyaline bakıldığında; FCCP (p=0,002) ve özellikle fiziksel anoksi grubunda (p=<0,001) kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttığı görülmektedir. Glut1 ekspresyonu kontrol grubundaki 4 hücreli embriyoların membran ve sitoplazmasına yaygın bir patern gösterirken, FCCP grubunda sitoplazmadaki ve membrandaki ekspresyonun paternin benzer ancak ekspresyon şiddetinin arttığı görülmektedir. Fiziksel anoksi grubundaki duraklayan embriyolarda ise, sitoplazmik Glut1 ekspresyonun genel olarak kontrol grubuna kıyasla azalıp ekspresyonun neredeyse hücre membranı ile sınırlı kalması dikkat çekmektedir.

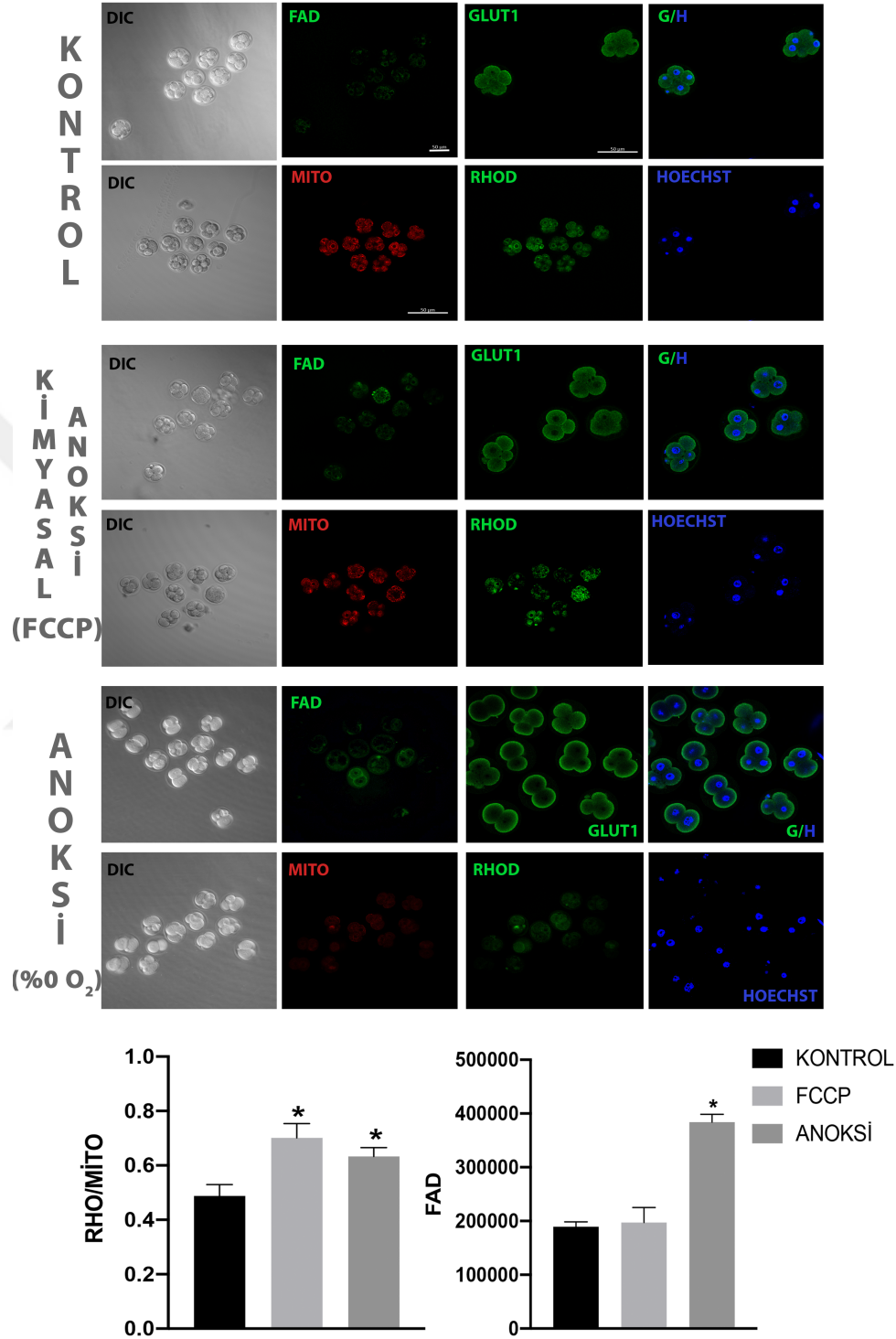
4 HÜCRE (12. saat)



Şekil 4.11. 4 hücreli embriyoların kültürün 12. saatinde kontrol, kimyasal anoksi (FCCP) ve fiziksel anoksi (%0 O₂) grubuna ait embriyoların DIC, FAD, Mitotracker, Rhodamine ve Glut1 sonuçları. Skala bar: 50μm. *: p<0,05, (n=15).

Kültürün 24. saatinde 8 hücreli embriyo grubu değerlendirildiğinde (Şekil 4.12), FCCP grubunda gelişimsel olarak bazı embriyoların geri kaldığı ve özellikle fiziksel anoksi grubunda 2, 3 ya da 4 hücreli aşamada durakladıkları görülmektedir. Rho/Mito oranının kontrol grubuna göre, FCCP ($p=0,006$) ve fiziksel anoksi ($p=0,012$) grubunda anlamlı bir şekilde arttığı görülmektedir. FAD sinyaline bakıldığında; kontrol grubuna göre sadece fiziksel anoksi grubunda anlamlı bir artış olduğu görülmektedir ($p=<0,001$). Glut1 ekspresyon paterninin, 8 hücreli embriyolarda önceki aşamalardaki 2 ve 4 hücreli kontrol grubunda görülen yaygın hücre ekspresyon paterninden membran lokalizasyonuna geçtiği görülmektedir. FCCP grubunda dikkat çekici bir şekilde gelişiminin erken evrelerinde kalmış olan prekompaksiyon embriyolarda Glut1'in membranda ekspre edildiği görülmektedir. Fiziksel anoksi grubunda ise, erken evrede duraklayan prekompaksiyon embriyolardaki belirgin ve artmış membranöz Glut1 ekspresyonu dikkat çekmektedir.

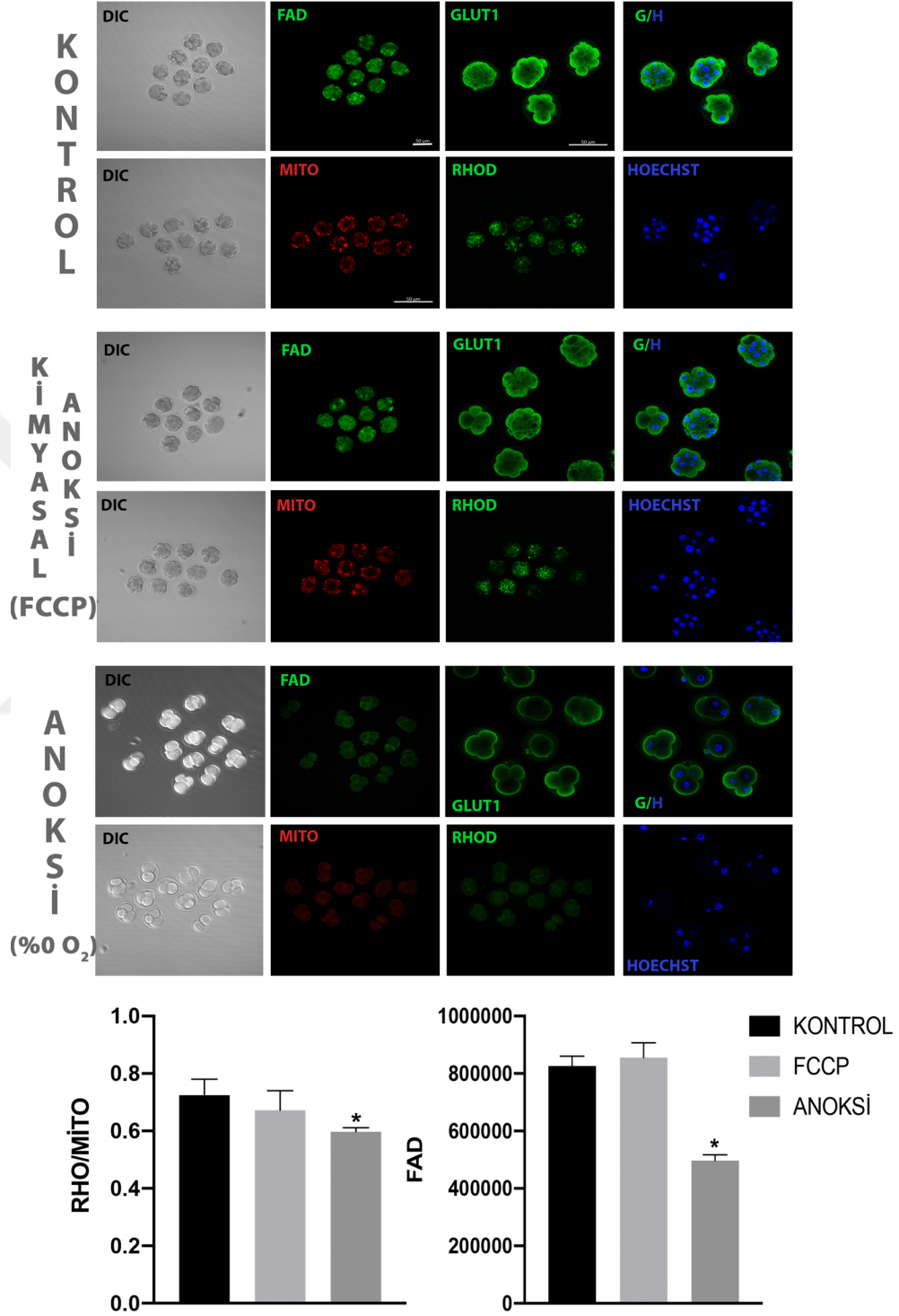
8 HÜCRE (24. saat)



Şekil 4.12. 8 hücreli embriyoların kültürün 24. saatinde kontrol, kimyasal anoksi (FCCP) ve fiziksel anoksi (%0 O₂) grubuna ait embriyoların DIC, FAD, Mitotracker, Rhodamine ve Glut1 sonuçları. Skala bar: 50µm. *: p<0,05, (n=15).

Kültürün 36. saatinde morula grubu değerlendirildiğinde (Şekil 4.13), FCCP grubunda geri kalan ve 4 hücre gibi aşamalarda duraklayan embriyolar olduğu ve özellikle fiziksel anoksi grubunda 2, 3 ya da 4 hücreli aşamada durakladıkları görülmektedir. Rho/Mito oranının kontrol grubuna göre, sadece fiziksel anoksi grubunda anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir ($p=0,032$). Benzer şekilde FAD sinyalinin de; kontrol grubuna göre sadece fiziksel anoksi grubunda anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir ($p<0,001$). Glut1 ekspresyonunun, kontrol grubu morulalarında literatür ile uyumlu olarak kompaksiyon ile birlikte membranda lokalize olduğu görülmektedir. FCCP grubundaki morulalarda kontrol grubu morulalara benzer bir ekspresyon gözlenirken, gelişim geriliği olan erken evre embriyolardaki membrana lokalize Glut 1 ekspresyonu ve benzer şekilde fiziksel anoksi grubunda da, erken evrede duraklayan prekompaksiyon embriyolardaki belirgin ve artmış membranöz Glut1 ekspresyonu dikkat çekmektedir.

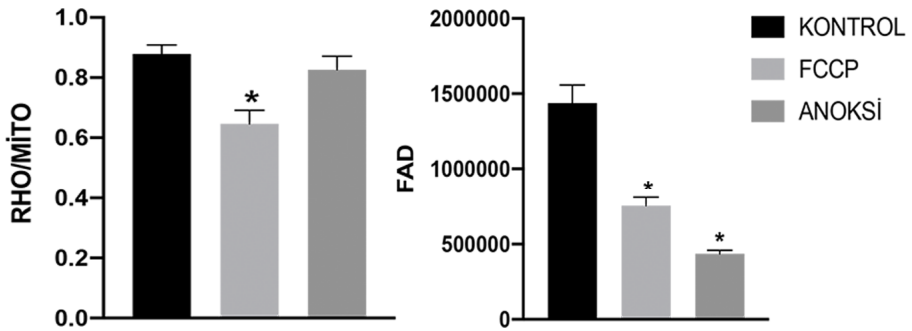
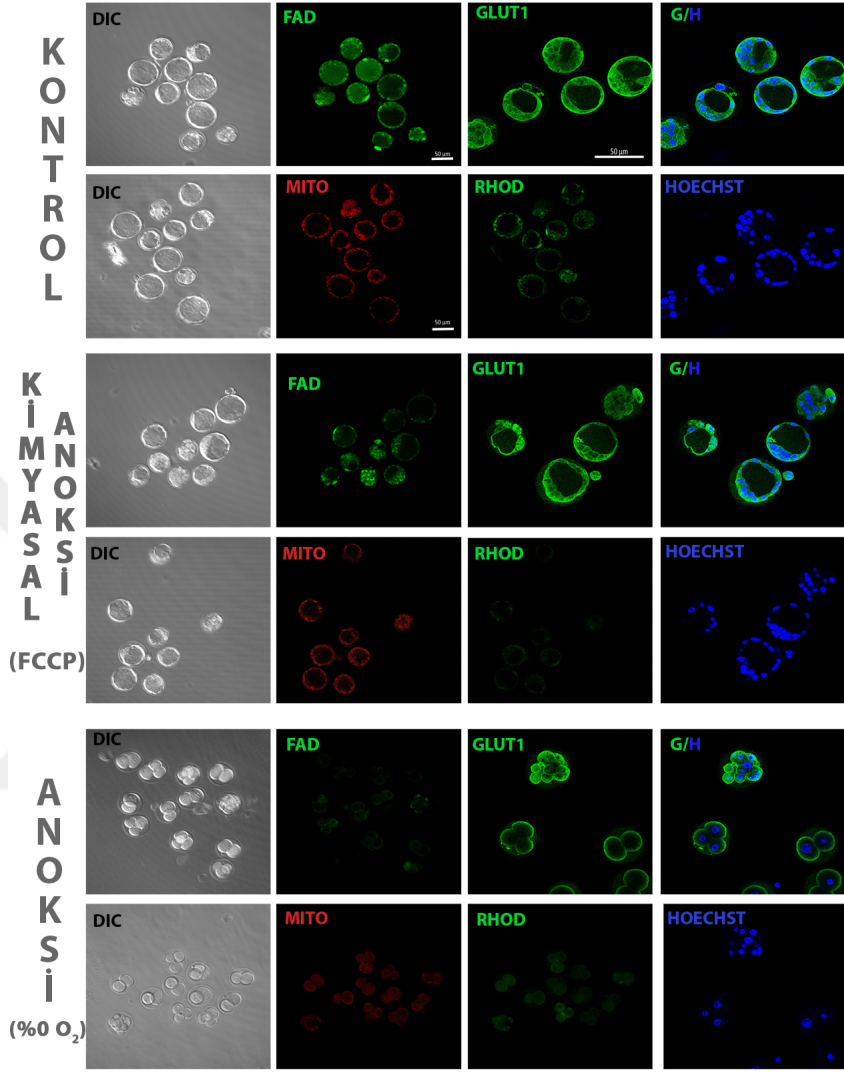
MORULA (36. saat)



Şekil 4.13. Morula aşamasındaki embriyoların kültürün 36. saatinde kontrol, kimyasal anoksi (FCCP) ve fiziksel anoksi (%0 O₂) grubuna ait embriyoların DIC, FAD, Mitotracker, Rhodamine ve Glut1 sonuçları. Skala bar: 50µm. *: p<0,05, (n=15).

Kültürün 60. saatinde blastosist grubu değerlendirildiğinde (Şekil 4.14), FCCP grubunda geri kalan embriyolar olduğu ve özellikle fiziksel anoksi grubunda 2, 3 ya da 4 hücreli aşamada durakladıkları görülmektedir. Ancak şaşırtıcı bir şekilde fiziksel anoksi grubunda bir embriyonun, morfolojik olarak çok sağlıklı görünmemekle birlikte morula aşamasına kadar gelebilmesi oldukça şaşırtıcı bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. Rho/Mito oranının kontrol grubuna göre, sadece FCCP grubunda anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir ($p < 0,001$). FAD sinyaline bakıldığında ise; kontrol grubuna FCCP ($p < 0,001$) ve fiziksel anoksi ($p < 0,001$) gruplarının her ikisinde de anlamlı bir şekilde azaldığı görülmektedir. Glut1 ekspresyonu değerlendirildiğinde, kontrol grubu blastosistlerinde literatür ile uyumlu olarak membrana lokalize olduğu görülmektedir. FCCP grubundaki blastosistlerdeki Glut1 ekspresyonunu kontrol blastosistlerine oldukça benzer olduğu görülmektedir. Ancak fiziksel anoksi grubunda, erken evrede duraklayan prekompaksiyon embriyolardaki ve morula aşamasına gelebilmiş olan embriyodaki belirgin ve artmış membranöz Glut1 ekspresyonu dikkat çekmektedir.

BLASTOSİST (60. saat)



Şekil 4.14. Blatosisit aşamadaki embriyoların kültürün 60. saatinde kontrol, kimyasal anoksi (FCCP) ve fiziksel anoksi (%0 O₂) grubuna ait embriyoların DIC, FAD, Mitotracker, Rhodamine ve Glut1 sonuçları. Skala bar: 50µm. *: p<0,05, (n=15).

5. TARTIŞMA

Preimplantif embriyo gelişimi dinamik ve oldukça enerji gerektiren bir süreçtir. Erken dönem embriyolar, hücre bölünmeleri ve gelişimin başarılı bir şekilde ilerleyebilmesi için yeterli seviyede enerjiye ihtiyaç duymaktadır. Preimplantif dönem embriyo, hücresel fonksiyonlarını yerine getirmek üzere ihtiyaç duyduğu enerjiyi üretmek için farklı kaynaklar kullanmakta ve dönemselsel olarak farklı enerji üretim yollarını tercihen kullanabilmektedir. Prekompaksiyon dönem embriyolar (zigot aşamasından kompakt morulaya kadar), gelişim sürecinde gereksinim duyduğu enerjinin üretimi için temel olarak pirüvat ve laktat kullanarak mitokondride gerçekleşen aerobik solunumu kullanırken, kompaksiyon ile birlikte embriyonun glikoz kullanımının arttırılması sonucu glikoliz, enerji üretimi için baskın hale gelmektedir. Bu bilgilere dayanarak, üremeye yardımcı tedavi kliniklerinde kullanılan morfolojiye dayalı embriyo seçim kriterlerine ek olarak embriyo metabolizmasının göstergesi olan mitokondri fonksiyonunun bir biyobelirteç olarak kullanılması hedeflenmiştir. Bu konuda pek çok çalışma yapılmıştır. Özellikle 2002 yılında, Henry Leese tarafından ortaya konulan sessiz embriyo hipotezine göre, embriyo canlılığının metabolizmasının aktifliği ile ters orantılı olduğu bilgisinin ortaya konulmasının ardından embriyo metabolizması ile ilgili yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Ancak metabolik durum değerlendirmelerinde literatürde yapılan çalışmalarda kullanılan tekniklerin olumsuz yanı, mtDNA içeriklerinin belirlenmesi gibi yöntemlerde embriyo biyopsisi gibi invaziv uygulamaların gerekliliğidir. İnvaziv olarak yapılan uygulamaların, özellikle oositlerde ve embriyolarda stres yaratarak pek çok olumsuz sonuca neden olduğu da yapılan çalışmalarca ortaya konulmuştur (Leese ve ark., 1998; Thompson ve ark., 2002; Lane ve Gardner, 2005; Leese, 2012). Ayrıca bu embriyolar daha sonra embriyo transferi gibi ileri değerlendirmelerde kullanılamayacağından, kaliteli embriyo seçimi için klinikte özellikle invaziv olmayan, zaman almayan, kolay uygulanabilir ve erişilebilir olan ve seçilen embriyonun daha sonra kullanılabileceği tekniklere ve objektif kriterlere gerek duyulduğu bilinmektedir.

Yaptığımız tez çalışması ile invaziv olmayan iki farklı teknik olan FLIM (NADH ve FAD) ve konfokal (FAD) mikroskopları kullanılarak, NADH ve FAD otofloresan parametrelerinin özellikle farklı oksijen konsantrasyonu ve mitokondriyon bozucuları varlığında embriyonun metabolizma yanıtı belirlenmiştir. Öncelikle FLIM ile elde edilen

verilerden farklı koşullarda embriyo metabolizmasının yanıtının belirlenmesi ve bu sonuçların bir algoritma ile modellenmesinin sonucunda NADH ve FAD ölçümü yapılan herhangi bir canlı embriyonunun hangi metabolik profile daha uygun olduğunun (hangi metabolizma yolağını kullandığının) belirlenmesine olanak sağlayan temel bir çalışma olmuştur. Bu tez çalışmasını Harvard Üniversitesi ile yürüttüğümüz sırada konu ile benzer bir çalışma yapılmış ve 2019 yılı Eylül ayında literatüre sunulmuştur (Ma ve ark., 2019). Çalışma temel olarak bizim de hedeflediğimiz gibi embriyolardan FLIM ile NADH ve FAD ölçümleri gerçekleştirilip elde ettikleri veriler doğrultusunda oluşturdukları skorlama ile metabolik ölçümü yapılan herhangi bir embriyonun sağlıklı ya da sağlıklı olmadığını %86 başarı oranı ile tespit edilebildiğini “embriyo canlılık indeksi” verisi ile literatüre sunulmuştur (Ma ve ark., 2019). Bu çalışmada; FLIM’in ve oluşturulan algoritma sayesinde üretilen indeksin, üremeye yardımcı tedavi merkezlerinde kaliteli embriyo seçiminde morfolojiye ek olarak kullanılacak kantitatif, güvenli ve hızlı bir teknik olarak kullanılabilmesi vurgulanmıştır. Dolayısıyla bu çalışma bizim verilerimizi desteklemekle birlikte literatür zamanlaması açısından orijinallik üstünlüğünden dolayı çalışmamızın ilerleyen kısmında konfokal mikroskopu ile yapılan deneylerimiz orijinallik açısından daha da önem kazanmıştır ve ilgili metabolik yollar açısından ek deneyler yapılmıştır. 2019 yılında ilk kez Raman spektroskopisi yöntemi ile fare embriyolarının gelişmelerini etkilemeden güvenli lazer dozları ve uygulama süresi kullanılarak ölçümler yapılabileceği literatüre sunulmuştur (Perevedentseva ve ark., 2019). Ancak çalışmada Raman sinyalleri ile embriyonun metabolik ilişkisi arasındaki bağlantıyı kurmanın güçlükleri ve embriyo canlılığı ve gelişimsel potansiyelinin belirlenmesi için ileri çalışma gerekliliği vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda; konfokal mikroskop ile elde ettiğimiz temel sonuçlardan biri embriyo metabolizmasının ucuz, kolay uygulanabilir ve pratik olan ve üremeye yardımcı tedavi merkezlerinde de kolayca kullanılacak olan bir teknik ile değerlendirilebilir olmasıdır. Sonuçlarımızda embriyo metabolizmasındaki farkların belirteç olarak bilinen Rhodamine ve Mitotracker belirteçlerine benzer bir şekilde otofloresan FAD değerlendirilmesi ile de belirlenebildiği üstelik Rho/Mito oranı tarafından belirlenemeyen farkların FAD ile daha belirgin biçimde ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu bilginin önemi FAD gibi bir metabolik belirtecin hiçbir invaziv girişim

gerçekleştirmeden görüntülenerek hızlı, kolay ve ucuz bir şekilde embriyo metabolizması hakkında bilgi sahibi olunmasına olanak vermesidir.

Çevresel faktörlerin ve buna karşılık gelişen metabolik yanıtın moleküler seviyede gen ekspresyonlarındaki değişiklikleri nasıl indüklediği, Louis Pasteur yıllarından itibaren devam eden bir araştırma konusudur. Anaerobik koşullarda glikozu metabolize etmek için kullanılan baskın olan yolağın glikoliz olduğu gözlenmiştir ve bu Pasteur etkisi olarak adlandırılmıştır (Engelhardt, 1974). Yaklaşık 60 yıl önce 1956 yılında, Otto Warburg bu konuyu memelilerde araştırmıştır (Burk ve Schade, 1956) ve aynı yıl Wesley Whitten ve arkadaşları, 8 hücreli fare embriyolarını blastosist aşmasına kadar geliştirdiği kültür medyumu içeriği çalışmasını yayınlamıştır (Whitten, 1956) ve ardından embriyo kültür sistemlerinin de gelişmeye başlamasıyla metabolizma araştırmaları da yapılmaya başlanmıştır.

İnsan hücrelerinde aerobik metabolik yollar kullanılarak enerji üretiminin sürdürülebilmesi için oksijene ihtiyaç duyulmaktadır, ancak kanser, kronik obstrüktif pulmoner hastalıklar, iskemi ve kalp hastalıkları gibi durumlarda oksijen seviyesi düşmekte ve hipoksik durumlar oluşmaktadır (Semenza, 2000b). Hipoksi özellikle solid tümörlerde görülmektedir ve bu sorunu kompanse etmek için hücrelerde temel olarak hipoksi indüklenebilir faktör (HIF) molekülünün ekspresyonu artmakta ve metabolik yollar, pH, anjiyogenez gibi hücresel olaylar düzenlenerek hücrede homeostaz sağlanmaktadır (Singh ve ark., 2017). Kanser hücreleri gibi yüksek proliferatif özelliğe sahip hücreler, oksijen yokluğunda ATP üretimini sürdürebilmek için metabolik yollarını daha üretken olan oksidatif fosforilasyondan daha az verimli olan anaerobik metabolizmaya kaydırmaktadır. Normal hücreler sadece oksijen yokluğunda anaerobik glikolizi kullanırken, kanser hücreleri normoksik koşullarda dahi glikolizi tercih etmektedir ve gerçekleşen bu uzun süreli aerobik glikoliz Warburg etkisi olarak adlandırılmaktadır (Burk ve Schade, 1956; Warburg, 1956; DeBerardinis ve ark., 2008; Yeung ve ark., 2008; Vander Heiden ve ark., 2009). Bu metabolik tercihinin nedenini araştıran çalışmalar; eğer glikoz akışı yeterince yüksek ise glikolizden üretilen ATP yüzdesinin oksidatif fosforilasyonun üzerinde ve daha hızlı olduğunu göstermiştir (Guppy ve ark., 1993; Kaneko, 2016). Oksidatif fosforilasyondan anaerobik glikolize doğru olan metabolik geçişin moleküler mekanizması temel olarak heksokinaz (HK) ve

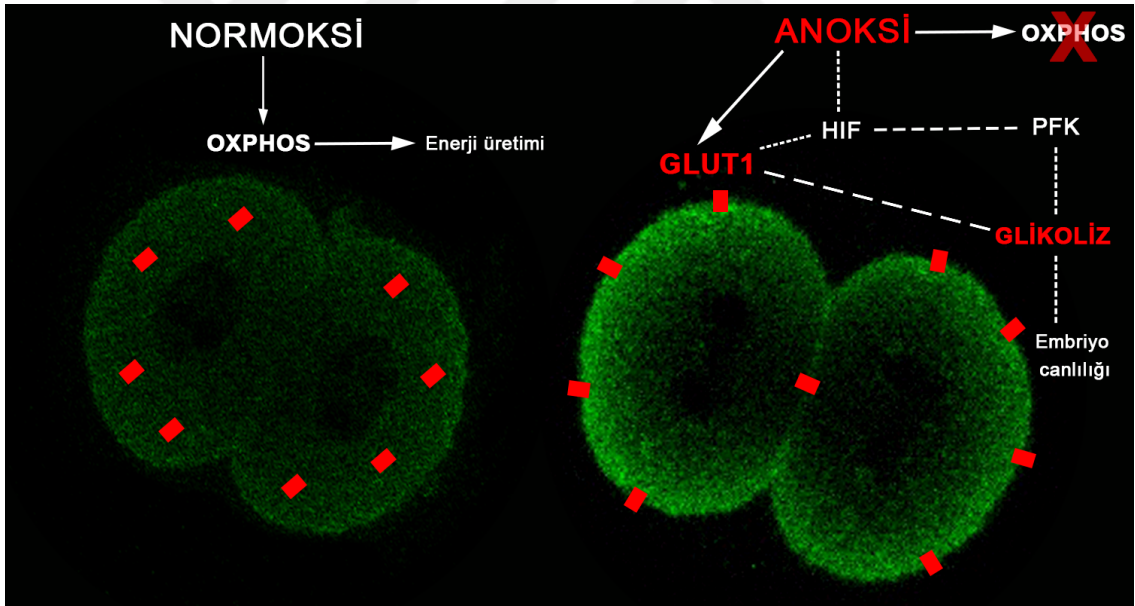
pirüvat kinaz (PK) upregülasyonu ile glikolizin arttırılması ve pirüvatın asetil CoA'ya dönüşerek TCA'ya girişini sağlayan pirüvat dehidrogenazın (PDH), pirüvat dehidrogenaz kinaz 1 (PDK-1) tarafından baskılanması ile gerçekleşmektedir (Semenza ve ark., 1994). Kanser hücrelerinde HIF-1 hedefinde olan ve metabolizmayı glikolize yönlendirmek ve TCA'ya girişi engellemek amacıyla hedef ekspresyonu artan protein ve enzimler; GLUT, heksokinaz, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD), fosfofruktokinaz (PFK), trifosfat izomeraz 1 (TPI1), pirüvat kinaz (PK), laktat dehidrogenaz (LDHA), pirüvat dehidrogenaz kinaz 1 (PDK1), monokarboksilat transporter (MCT)'dir (Singh ve ark., 2017). Ayrıca Warburg etkisinin embriyonik kök hücreler gibi yüksek proliferatif olan normal hücrelerde de görüldüğünü ve metabolizmalarının büyüme faktörleri (Feng ve Levine, 2010) ve HIF-1 aracılığıyla glikoliz yönüne değiştiği gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2012).

Preimplantif dönem boyunca embriyonun fizyolojik olarak maruz kaldığı oksijen konsantrasyonlarının önemi ve gelişimsel sonuçları açıkça gösterilmiştir ve özellikle implantasyona doğru ilerleyen blastosistin uterusu doğru azalan oksijen konsantrasyonlarına fizyolojik olarak maruz kaldığı bilinmektedir (Kind ve ark., 2005). İmplantasyona doğru ilerleyen blastosistin, gradiyent şeklinde azalan oksijene maruz kalmasının metabolik homeostazı sürdürmek için blastosist üzerinde çeşitli alternatif metabolik yolları aktive ettiği ve moleküler değişikliklere neden olduğu bilinmektedir (Gardner ve Harvey, 2015). Hücre içinde oksijen konsantrasyonundaki değişikliklere cevap verme yeteneği, DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktör HIF'e bağlıdır (Semenza, 2000a; Harvey, 2007). Normoksik koşullarda, HIF α proteinleri proteozomal degradasyona uğramaktadır. Oksijen konsantrasyonu %7'nin altında olduğunda hipoksik koşullarda ise, HIF α protein stabilitesi ve akümüasyonu artarak nükleusa lokalize olmaktadır (Jiang ve ark., 1996). Transkripsiyon faktörü olarak görev alan HIF α proteini metabolik değişimi aerobik glikolize kaydırmak amacıyla; GLUT'lar, bir önceki paragrafta adı geçen glikolitik enzimlerin transkripsiyonlarını aktive eder ve pirüvatı laktata dönüştüren LDH ve pirüvatın TCA'ya girişini sağlayan PDH'ı inhibe eden PDK1 ekspresyonunu düzenler (Semenza, 2000a; Luo ve Semenza, 2011). Ayrıca hücrenin redoks durumu, büyüme faktörleri ve sitokinler ve fosfatidilinositol 3 kinaz (PI3K)/Akt yoluyla aracılığıyla rapamisinin memeli hedefi (mTOR); HIF α molekülünü düzenleyen

diğer faktörlerdir (Dery ve ark., 2005; Sengupta ve ark., 2010). Preimplantif embriyonun gelişim sürecinde **post kompaksiyon** oksijen konsantrasyonunun, blastosistlerde çeşitli gen ekspresyonlarını HIF aracılığıyla düzenlediği gösterilmiştir (Gardner ve Harvey, 2015). Örneğin yapılan bir çalışmada; %2 O₂ konsantrasyonunda kültüre edilen blastosistlerde, temel glikolitik enzimlerden olan GLUT1 ve LDHA ekspresyonlarının, %7 ve %20 O₂'de kültüre edilen blastosistlere göre arttığı gösterilmiştir (Harvey ve ark., 2004; Harvey ve ark., 2007). Yapılan pek çok çalışma sonucunda diğer hücrelerde hipoksik koşullarda görülen HIF aracılı metabolik değişim, blastosistlerde de benzer moleküler yollar ile düzenlenmektedir ve anaerobik glikolize doğru olan metabolik geçiş temel olarak; glikozun hücre içine alınımını sağlamak amacıyla GLUT'ların ve glikolizin artırılması amacıyla HK ve PK upregülasyonu ve OXPHOS baskılanması amacıyla pirüvatın asetil CoA'ya dönüşerek TCA'ya girişini sağlayan PDH'ın, PDK1 tarafından baskılanması ile gerçekleşmektedir.

Konfokal mikroskopu kullanarak gerçekleştirdiğimiz anoksi koşullarındaki deneylerde özellikle **prekompaksiyon dönem embriyoların** bölünerek bir sonraki aşamaya belli bir oranda geçebilmesi, bu evrede oksijen bağımlı ve sadece OXPHOS ile enerji üretebilen bir hücre için oldukça şaşırtıcı bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. Özellikle kanser hücrelerinde görülen ve Warburg etkisi olarak adlandırılan aerobik glikoliz yönündeki moleküler seviyedeki HIF aracılı metabolik değişimin daha öncede bahsedildiği üzere blastosistlerde benzer mekanizmalarla düzenlendiği bilinmekte (Gardner ve Harvey, 2015) ve bu nedenle literatürde kanser hücrelerinin ve embriyo metabolizmasının paralel yönlerini belirten yayınlar bulunmaktadır (Krisher ve Prather, 2012; Redel ve ark., 2012; Smith ve Sturmey, 2013). Embriyoların *in vivo* fizyolojik olmayan koşullara ya da *in vitro* suboptimal kültür koşullarına adaptasyon yeteneği vardır ve bu **metabolik plastisite** olarak adlandırılmaktadır. Biz de yukarıdaki bilgiler doğrultusunda implantasyona hazırlanan blastosistte olduğu gibi prekompaksiyon dönem embriyoların hipoksik koşullar altında farklı metabolik yollarını aktive olabileceği ihtimali üzerine (Pasteur etkisi) Glut1 değerlendirmesi gerçekleştirdik. Bilindiği gibi erken evre embriyolarda hücre içine glikoz alımı ve sitoplazmada glikoliz gerçekleşmediğinden hücre membranında Glut1 ekspresyonu görülmemektedir. Sonuçlarımızda görüldüğü gibi özellikle 2 hücre, 4 hücre ve 8 hücreli embriyolardaki (prekompaksiyon dönem) anoksik koşullarda membrana lokalize belirgin Glut1

ekspresyonu, bu embriyolarda anoksiye bağılı metabolik plastisite yani OXPHOS'dan glikolize doğru metabolik geçişin olabileceği göstermektedir. Bu embriyolar 2-3 hücre bölünmesi geçirebilmekte ve hatta çok düşük oranda morulaya kadar ilerleyebilmektedir. Hücre bölünmesi için enerji gerekmektedir. Bu enerjinin alternatif bir yolla embriyoda ortaya konmasını işaret eden bulgular bu bağlamda oldukça önemlidir. Oksijen yokluğunda olası HIF aracılı, GLUT1'in büyük oranla membrana lokalize olması ve olası PFK inhibisyonunun ortadan kalkması ile glikolizin enerji kaynağı olarak alternatif bir yol olarak aktive edilebileceğini önermektedir ve sonuçlarımız Şekil 5.1'de özetlenmiştir. Konu ile ilgili anoksik koşullarda embriyo metabolizmasının OXPHOS'dan glikolize doğru metabolik geçişin olabileceği ihtimaini GLUT1'e ek olarak HIF ve PFK gibi hedef molekküllerin detaylı bir şekilde araştırıldığı çalışmalarımız devam etmektedir.



Şekil 5.1. Normoksi (%5 O₂) ve anoksik koşullarda (%0 O₂) prekompaksiyon aşamada bir embriyodaki Glut1 ekspresyonunu ve enerji üretime ve canlılık için gerekli var olan ve olası sinyal yollarını gösteren şekil. Şekilde örnek olarak sunulan bir normoksik 2 hücreli embriyoda genel olarak az şiddette ve yaygın sitoplazmik ekspresyon paterni gösteren Glut1 (kırmızı kare) ve bu evredeki bilinen enerji üretimi için kullanılan OXPHOS yolağı gösterilmektedir. Anoksik koşulda kültüre edilmiş ve 2 hücreli embriyo aşamasında kalan bu embriyoda ise, kontrol grubunda hücreye dağımik lokalizasyonu gösteren Glut1'in hücre membranına lokalizasyonu (kırmızı kare) görülmektedir. Hücrelerde meydana gelen metabolik geçişin anoksik koşullarda membrana lokalize Glut1'e ek olarak olası HIF ve PFK aracılı glikoliz aktivasyonu ile enerji üreterek embriyo canlılığı ihtimalleri (kesikli çizgi ile) ve oksijen yokluğu nedeniyle kullanılmayan OXPHOS yolağı (kırmızı çarpı ile) gösterilmektedir.

Çalışmamızın sonuçları; embriyo gelişim süresince embriyo metabolizmasının invaziv olmayan yöntemlerle görüntülenebileceği ve özellikle kolay uygulanabilen, kolay erişilebilen ve FLIM gibi pahalı cihazlara göre pratik bir yöntem olan konfokal mikroskobu ile FAD görüntülemesinin embriyo metabolizmasındaki farkları ayırt edebildiği gösterilmiştir. Çalışmamızın özellikle tekniksel olarak yapılabilirlik anlamında ileri çalışmalar için alt yapı sağladığını düşünmekteyiz. Bu anlamda çalışmamızın ve yapılacak ileri çalışmalarla birlikte elde edilecek verilerin kliniklerde morfolojik parametrelere ek olarak konfokal mikroskobu gibi teknikler aracılığıyla metabolizma görüntülenme parametresinin de biyobelirteç olarak kullanılmasına katkı sağladığını düşünmekteyiz. Ayrıca önemli bir bulgu olarak erken evre prekompaksiyon embriyoların anoksik koşullar altında metabolik plastisite gösterebileceği ve metabolizmasının OXPHOS'tan glikoliz kullanma yönünde geçirmek için ilgili mekanizmaları upregüle edebileceğini de önemli bir bilgi olarak literatüre sunulmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez projesi kapsamında, invaziv olmamaları nedeniyle oldukça avantajlı 2 farklı mikroskopi tekniği kullanılarak embriyo metabolizması hakkında detaylı bilgi sağlayabilecek ve morfolojik embriyo değerlendirme kriterlerine ek olarak kullanılacak veriler sunulmuştur. Öncelikle FLIM tekniği ile embriyo metabolizma profilleri ortaya çıkartılarak embriyo metabolizmasının farklı koşullara verdiği yanıtlar NADH ve FAD aracılığıyla güvenli biçimde belirlenmiştir. Bu bağlamda ayrıca konfokal mikroskopi tekniğinin ise daha kolay uygulanabilir, daha az maaliyeti olan ve kliniklerde de rahatlıkla kullanılarak farklı koşullara embriyo metabolizmasının verdiği yanıtı belirleyebilecek invaziv olmayan bir teknik olduğu gösterilmiştir. Bu teknik ile literatürde bilinen mitokondriyal belirteçlere benzer şekilde hatta daha ayırt edici olarak FAD ölçümü ile embriyo metabolizmasının belirlenebileceği gösterilmiştir. Ayrıca konfokal mikroskobu deneylerinde yapılan anoksik koşullarda gerçekleşen embriyo bölünmeleri, enerji kaynağı olarak oksijen bağımlı olan prekompaksiyon embriyoların bunu nasıl gerçekleştirebildiği sorusunu akla getirmiştir. Buradan yola çıkılarak yapılan Glut1 ekspresyon sonuçlarına göre, anoksik koşullardaki erken evre embriyolarda artarak membrana lokalize olan Glut1 ekspresyonu oldukça şaşırtıcı bir sonuç olarak karşımıza çıkmıştır. Normal şartlarda embriyo gelişiminin erken döneminde Glut1 hücre membranında değil sitoplazmada az ve dağınıktır. Embriyonun farklı koşullarda plastisite gösterdiği bilindiği üzere, anoksik koşullarda embriyo metabolizmasının Glut1 membran lokalizasyonuna ek olarak olası HIF1 ve PFK aracılığı ile oksidatif fosforilasyondan glikoliz yönüne geçebileceği sorusunu akla getirmiştir. Bu konu ile ilgili ileri çalışmalar planlanmakta ve yapılan tez çalışma sonuçları ve planlanan gelecek çalışma sonuçlarından elde edilecek metabolik verilerin embriyo metabolizma çalışmalarına ve kliniklerde morfolojik kriterlere ek olarak kullanılacak biyobelirteçlere hem biyolojik hem de tekniksel önemli katkılar sağlayacağını düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aghayan, M., Rao, L. V., Smith, R. M., Jarett, L., Charron, M. J., Thorens, B., & Heyner, S. Developmental expression and cellular localization of glucose transporter molecules during mouse preimplantation development. *Development*. 1992; 115 (1): 305-312.

Al-Zubaidi, U., Liu, J., Cinar, O., Robker, R. L., Adhikari, D., & Carroll, J. The spatio-temporal dynamics of mitochondrial membrane potential during oocyte maturation. *Mol Hum Reprod*. 2019.

Alberts, B. A. J. J. L. M. R. K. R. P. W. (2002). *Molecular biology of the cell*. .

Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., . . . Young, I. G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290 (5806): 457-465.

Barbehenn, E. K., Wales, R. G., & Lowry, O. H. The explanation for the blockade of glycolysis in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1974; 71 (4): 1056-1060.

Barritt, J. A., Kokot, M., Cohen, J., Steuerwald, N., & Brenner, C. A. Quantification of human ooplasmic mitochondria. *Reproductive biomedicine online*. 2002; 4 (3): 243-247.

Bartolome, F., & Abramov, A. Y. Measurement of mitochondrial nadh and fad autofluorescence in live cells. *Methods Mol Biol*. 2015; 1264: 263-270.

Becker, W. (2005). *Advanced time-correlated single photon counting techniques*. In. Berlin ; New York: Springer.

Bentov, Y., & Casper, R. F. The aging oocyte-can mitochondrial function be improved? *Fertil Steril*. 2013; 99 (1): 18-22.

Burk, D., & Schade, A. L. On respiratory impairment in cancer cells. *Science*. 1956; 124 (3215): 270-272.

Campbell, N. A. B. W. R. J. H. *Biology: Exploring life*. . Boston, Massachusetts: Pearson Prentice Hall.; 2006, p:

CAN, A. Yaşam bilimlerinde a'dan z'ye mikroskopi. 2018; 1.

Carayannopoulos, M. O., Chi, M. M. Y., Cui, Y., Pingsterhaus, J. M., McKnight, R. A., Mueckler, M., . . . Moley, K. H. Glut8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *P Natl Acad Sci USA*. 2000; 97 (13): 7313-7318.

Carayannopoulos, M. O., Schlein, A., Wyman, A., Chi, M., Keembiyehetty, C., & Moley, K. H. Glut9 is differentially expressed and targeted in the preimplantation embryo. *Endocrinology*. 2004; 145 (3): 1435-1443.

Centonze, V. E., & White, J. G. Multiphoton excitation provides optical sections from deeper within scattering specimens than confocal imaging. *Biophys J.* 1998; 75 (4): 2015-2024.

Chan, C. C., Liu, V. W., Lau, E. Y., Yeung, W. S., Ng, E. H., & Ho, P. C. Mitochondrial DNA content and 4977 bp deletion in unfertilized oocytes. *Molecular human reproduction.* 2005; 11 (12): 843-846.

Chance, B. Pyridine nucleotide as an indicator of the oxygen requirements for energy-linked functions of mitochondria. *Circ Res.* 1976; 38 (5 Suppl 1): I31-38.

Chance, B., Cohen, P., Jobsis, F., & Schoener, B. Intracellular oxidation-reduction states in vivo. *Science.* 1962; 137 (3529): 499-508.

Chance, B., Jamieson, D., & Coles, H. Energy-linked pyridine nucleotide reduction: Inhibitory effects of hyperbaric oxygen in vitro and in vivo. *Nature.* 1965; 206 (981): 257-263.

Chance, B., Legallais, V., & Schoener, B. Metabolically linked changes in fluorescence emission spectra of cortex of rat brain, kidney and adrenal gland. *Nature.* 1962; 195: 1073-1075.

Chance, B., & Williams, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem.* 1955a; 217 (1): 383-393.

Chance, B., & Williams, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. II. Difference spectra. *J Biol Chem.* 1955b; 217 (1): 395-407.

Chance, B., & Williams, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem.* 1955c; 217 (1): 409-427.

Chance, B., & Williams, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. IV. The respiratory chain. *J Biol Chem.* 1955d; 217 (1): 429-438.

Chance, B., Williams, G. R., Holmes, W. F., & Higgins, J. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. V. A mechanism for oxidative phosphorylation. *J Biol Chem.* 1955; 217 (1): 439-451.

Chappel, S. The role of mitochondria from mature oocyte to viable blastocyst. *Obstetrics and gynecology international.* 2013; 2013: 183024.

Chason, R. J., Csokmay, J., Segars, J. H., DeCherney, A. H., & Armant, D. R. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation embryo metabolism and development. *Trends Endocrin Met.* 2011; 22 (10): 412-420.

Chen, X., Prosser, R., Simonetti, S., Sadlock, J., Jagiello, G., & Schon, E. A. Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *American journal of human genetics.* 1995; 57 (2): 239-247.

Chorvat, D., Jr., Kirchnerova, J., Cagalinec, M., Smolka, J., Mateasik, A., & Chorvatova, A. Spectral unmixing of flavin autofluorescence components in cardiac myocytes. *Biophys J.* 2005; 89 (6): L55-57.

Cooper G. M., H. R. E. (2016). Biyoenerjetik ve metabolizma. In *Hücre moleküler yaklaşım*. İzmir: İzmir Tıp Kitabevi.

Coskun, H., & Can, A. The assessment of the in vivo to in vitro cellular transition of human umbilical cord multipotent stromal cells. *Placenta.* 2015; 36 (2): 232-239.

Cottet-Rousselle, C., Ronot, X., Leverve, X., & Mayol, J. F. Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes. *Cytometry A.* 2011; 79 (6): 405-425.

Cummins, J. M. Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. *Hum Reprod.* 2000; 15 Suppl 2: 92-101.

DeBerardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., & Thompson, C. B. The biology of cancer: Metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab.* 2008; 7 (1): 11-20.

Denk, W., Strickler, J. H., & Webb, W. W. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science.* 1990; 248 (4951): 73-76.

Dery, M. A. C., Michaud, M. D., & Richard, D. E. Hypoxia-inducible factor 1: Regulation by hypoxic and non-hypoxic activators. *Int J Biochem Cell B.* 2005; 37 (3): 535-540.

Diez-Juan, A., Rubio, C., Marin, C., Martinez, S., Al-Asmar, N., Riboldi, M., . . . Simon, C. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: Less is better. *Fertil Steril.* 2015; 104 (3): 534-541 e531.

Dumollard, R., Campbell, K., Halet, G., Carroll, J., & Swann, K. Regulation of cytosolic and mitochondrial atp levels in mouse eggs and zygotes. *Dev Biol.* 2008; 316 (2): 431-440.

Dumollard, R., Carroll, J., Duchen, M. R., Campbell, K., & Swann, K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. *Seminars in cell & developmental biology.* 2009; 20 (3): 346-353.

Dumollard, R., Ward, Z., Carroll, J., & Duchen, M. R. Regulation of redox metabolism in the mouse oocyte and embryo. *Development.* 2007; 134 (3): 455-465.

Edwards, R. G., Fishel, S. B., Cohen, J., Fehilly, C. B., Purdy, J. M., Slater, J. M., . . . Webster, J. M. Factors influencing the success of in vitro fertilization for alleviating human infertility. *J In Vitro Fert Embryo Transf.* 1984; 1 (1): 3-23.

Eichenlaub-Ritter, U., Wieczorek, M., Luke, S., & Seidel, T. Age related changes in mitochondrial function and new approaches to study redox regulation in mammalian oocytes in response to age or maturation conditions. *Mitochondrion.* 2011; 11 (5): 783-796.

Engelhardt, W. A. On the dual role of respiration. *Mol Cell Biochem.* 1974; 5 (1-2): 25-33.

Feng, Z. H., & Levine, A. J. The regulation of energy metabolism and the igf-1/mtor pathways by the p53 protein. *Trends in Cell Biology.* 2010; 20 (7): 427-434.

Fragouli, E., Spath, K., Alfarawati, S., Kaper, F., Craig, A., Michel, C. E., . . . Wells, D. Altered levels of mitochondrial DNA are associated with female age, aneuploidy, and provide an independent measure of embryonic implantation potential. *PLoS genetics.* 2015; 11 (6): e1005241.

Gardner, D. K., & Harvey, A. J. Blastocyst metabolism. *Reprod Fertil Dev.* 2015; 27 (4): 638-654.

Gardner, D. K., & Leese, H. J. The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development.* 1988; 104 (3): 423-429.

Gardner, D. K., Pool, T. B., & Lane, M. Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Seminars in Reproductive Medicine.* 2000; 18 (2): 205-218.

Ge, H., Tollner, T. L., Hu, Z., Dai, M., Li, X., Guan, H., . . . Dong, Q. The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation in vitro on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence. *Mol Reprod Dev.* 2012; 79 (6): 392-401.

Guppy, M., Greiner, E., & Brand, K. The role of the crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *Eur J Biochem.* 1993; 212 (1): 95-99.

Harvey, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci.* 2007; 98 (1-2): 113-128.

Harvey, A. J., Kind, K. L., Pantaleon, M., Armstrong, D. T., & Thompson, J. G. Oxygen-regulated gene expression in bovine blastocysts. *Biol Reprod.* 2004; 71 (4): 1108-1119.

Harvey, A. J., Kind, K. L., & Thompson, J. G. Regulation of gene expression in bovine blastocysts in response to oxygen and the iron chelator desferrioxamine. *Biol Reprod.* 2007; 77 (1): 93-101.

Heikal, A. A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark Med.* 2010a; 4 (2): 241-263.

Heikal, A. A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies. *Biomark Med.* 2010b; 4 (2): 241-263.

Hsieh, R. H., Au, H. K., Yeh, T. S., Chang, S. J., Cheng, Y. F., & Tzeng, C. R. Decreased expression of mitochondrial genes in human unfertilized oocytes and arrested embryos. *Fertil Steril*. 2004; 81 Suppl 1: 912-918.

Huang, S., Heikal, A. A., & Webb, W. W. Two-photon fluorescence spectroscopy and microscopy of nad(p)h and flavoprotein. *Biophys J*. 2002; 82 (5): 2811-2825.

Igosheva, N., Abramov, A. Y., Poston, L., Eckert, J. J., Fleming, T. P., Duchen, M. R., & McConnell, J. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. *Plos One*. 2010; 5 (4): e10074.

Jiang, B. H., Semenza, G. L., Bauer, C., & Marti, H. H. Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of o₂ tension. *Am J Physiol*. 1996; 271 (4 Pt 1): C1172-1180.

Johnson, L. V., Walsh, M. L., & Chen, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; 77 (2): 990-994.

Joost, H. G., Bell, G. I., Best, J. D., Birnbaum, M. J., Charron, M. J., Chen, Y. T., . . . Thorens, B. Nomenclature of the glut/slc2a family of sugar/polyol transport facilitators. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002; 282 (4): E974-976.

Kaneko, K. J. Metabolism of preimplantation embryo development: A bystander or an active participant? *Curr Top Dev Biol*. 2016; 120: 259-310.

Kind, K. L., Collett, R. A., Harvey, A. J., & Thompson, J. G. Oxygen-regulated expression of glut-1, glut-3, and vegf in the mouse blastocyst. *Mol Reprod Dev*. 2005; 70 (1): 37-44.

Kirkpatrick, N. D., Zou, C. P., Brewer, M. A., Brands, W. R., Drezek, R. A., & Utzinger, U. Endogenous fluorescence spectroscopy of cell suspensions for chemopreventive drug monitoring. *Photochem Photobiol*. 2005; 81 (1): 125-134.

Krisher, R. L., & Prather, R. S. A role for the warburg effect in preimplantation embryo development: Metabolic modification to support rapid cell proliferation. *Mol Reprod Dev*. 2012; 79 (5): 311-320.

Lakowicz, J. Principles of fluorescence spectroscopy (Vol. 3rd edition). New York: Springer; 2006, p:

Lane, M., & Gardner, D. K. Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. *Reprod Fert Develop*. 2005; 17 (3): 371-378.

Leese, H. J. Quiet please, do not disturb: A hypothesis of embryo metabolism and viability. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2002; 24 (9): 845-849.

Leese, H. J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*. 2012; 143 (4): 417-427.

- Leese, H. J., Biggers, J. D., Mroz, E. A., & Lechene, C. Nucleotides in a single mammalian ovum or preimplantation embryo. *Anal Biochem.* 1984; 140 (2): 443-448.
- Leese, H. J., Donnay, I., & Thompson, J. G. Human assisted conception: A cautionary tale. Lessons from domestic animals. *Human Reproduction.* 1998; 13: 184-202.
- Leese, H. J., Sturmey, R. G., Baumann, C. G., & McEvoy, T. G. Embryo viability and metabolism: Obeying the quiet rules. *Hum Reprod.* 2007; 22 (12): 3047-3050.
- Lin, D. P., Huang, C. C., Wu, H. M., Cheng, T. C., Chen, C. I., & Lee, M. S. Comparison of mitochondrial DNA contents in human embryos with good or poor morphology at the 8-cell stage. *Fertil Steril.* 2004; 81 (1): 73-79.
- Liu, L., Hammar, K., Smith, P. J. S., Inoue, S., & Keefe, D. L. Mitochondrial modulation of calcium signaling at the initiation of development. *Cell Calcium.* 2001; 30 (6): 423-433.
- Luo, W., & Semenza, G. L. Pyruvate kinase m2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget.* 2011; 2 (7): 551-556.
- Ma, N., Mochel, N. R., Pham, P. D., Yoo, T. Y., Cho, K. W. Y., & Digman, M. A. Label-free assessment of pre-implantation embryo quality by the fluorescence lifetime imaging microscopy (flim)-phasor approach. *Sci Rep.* 2019; 9 (1): 13206.
- Mandavilli, B. S., Santos, J. H., & Van Houten, B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation research.* 2002; 509 (1-2): 127-151.
- Masters, B. R., & So, P. T. Antecedents of two-photon excitation laser scanning microscopy. *Microsc Res Tech.* 2004; 63 (1): 3-11.
- May-Panloup, P., Chretien, M. F., Jacques, C., Vasseur, C., Malthiery, Y., & Reynier, P. Low oocyte mitochondrial DNA content in ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2005; 20 (3): 593-597.
- Mayevsky, A., & Barbiro-Michaely, E. Use of nadh fluorescence to determine mitochondrial function in vivo. *Int J Biochem Cell B.* 2009; 41 (10): 1977-1988.
- Mayevsky, A., & Rogatsky, G. G. Mitochondrial function in vivo evaluated by nadh fluorescence: From animal models to human studies. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292 (2): C615-640.
- Motta, P. M., Nottola, S. A., Makabe, S., & Heyn, R. Mitochondrial morphology in human fetal and adult female germ cells. *Hum Reprod.* 2000; 15 Suppl 2: 129-147.
- Navarrete Santos, A., Tonack, S., Kirstein, M., Kietz, S., & Fischer, B. Two insulin-responsive glucose transporter isoforms and the insulin receptor are developmentally expressed in rabbit preimplantation embryos. *Reproduction.* 2004; 128 (5): 503-516.

Niesner, R., Peker, B., Schlusche, P., & Gericke, K. H. Noniterative biexponential fluorescence lifetime imaging in the investigation of cellular metabolism by means of nad(p)h autofluorescence. *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*. 2004; 5 (8): 1141-1149.

Nohales-Corcoles, M., Sevillano-Almerich, G., Di Emidio, G., Tatone, C., Cobo, A. C., Dumollard, R., & De Los Santos Molina, M. J. Impact of vitrification on the mitochondrial activity and redox homeostasis of human oocyte. *Hum Reprod*. 2016; 31 (8): 1850-1858.

Pantaleon, M., Harvey, M. B., Pascoe, W. S., James, D. E., & Kaye, P. L. Glucose transporter glut3: Ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94 (8): 3795-3800.

Pantaleon, M., & Kaye, P. L. Glucose transporters in preimplantation development. *Rev Reprod*. 1998; 3 (2): 77-81.

Pantaleon, M., Ryan, J. P., Gil, M., & Kaye, P. L. An unusual subcellular localization of glut1 and link with metabolism in oocytes and preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod*. 2001; 64 (4): 1247-1254.

Perevedentseva, E., Krivokharchenko, A., Karmenyan, A. V., Chang, H. H., & Cheng, C. L. Raman spectroscopy on live mouse early embryo while it continues to develop into blastocyst in vitro. *Sci Rep-Uk*. 2019; 9.

Piko, L., & Taylor, K. D. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. *Developmental biology*. 1987; 123 (2): 364-374.

Purcell, S. H., & Moley, K. H. Glucose transporters in gametes and preimplantation embryos. *Trends Endocrinol Metab*. 2009; 20 (10): 483-489.

Redel, B. K., Brown, A. N., Spate, L. D., Whitworth, K. M., Green, J. A., & Prather, R. S. Glycolysis in preimplantation development is partially controlled by the warburg effect. *Molecular Reproduction and Development*. 2012; 79 (4): 262-271.

Reynier, P., May-Panloup, P., Chretien, M. F., Morgan, C. J., Jean, M., Savagner, F., . . . Malthiery, Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Molecular human reproduction*. 2001; 7 (5): 425-429.

Riley, J. K., & Moley, K. H. Glucose utilization and the pi3-k pathway: Mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. *Reproduction*. 2006; 131 (5): 823-835.

Romashko, D. N., Marban, E., & O'Rourke, B. Subcellular metabolic transients and mitochondrial redox waves in heart cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95 (4): 1618-1623.

Sanchez, T., Zhang, M., Needleman, D., & Seli, E. Metabolic imaging via fluorescence lifetime imaging microscopy for egg and embryo assessment. *Fertil Steril*. 2019; 111 (2): 212-218.

Santos, T. A., El Shourbagy, S., & St John, J. C. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril.* 2006; 85 (3): 584-591.

Scott, R., Zhang, M., & Seli, E. Metabolism of the oocyte and the preimplantation embryo: Implications for assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gyn.* 2018; 30 (3): 163-170.

Semenza, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1: Mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol.* 2000a; 59 (1): 47-53.

Semenza, G. L. Hif-1 and human disease: One highly involved factor. *Genes Dev.* 2000b; 14 (16): 1983-1991.

Semenza, G. L., Roth, P. H., Fang, H. M., & Wang, G. L. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 1994; 269 (38): 23757-23763.

Sengupta, S., Peterson, T. R., & Sabatini, D. M. Regulation of the mtor complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. *Mol Cell.* 2010; 40 (2): 310-322.

Singh, D., Arora, R., Kaur, P., Singh, B., Mannan, R., & Arora, S. Overexpression of hypoxia-inducible factor and metabolic pathways: Possible targets of cancer. *Cell Biosci.* 2017; 7.

Skala, M. C., Riching, K. M., Bird, D. K., Gendron-Fitzpatrick, A., Eickhoff, J., Eliceiri, K. W., . . . Ramanujam, N. In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia. *J Biomed Opt.* 2007; 12 (2): 024014.

Smith, D. G., & Sturme, R. G. Parallels between embryo and cancer cell metabolism. *Biochem Soc T.* 2013; 41: 664-669.

Somoskoi, B., Martino, N. A., Cardone, R. A., Lacalandra, G. M., Dell'Aquila, M. E., & Cseh, S. Different chromatin and energy/redox responses of mouse morulae and blastocysts to slow freezing and vitrification. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015; 13: 22.

Sozen, B., Can, A., & Demir, N. Cell fate regulation during preimplantation development: A view of adhesion-linked molecular interactions. *Dev Biol.* 2014; 395 (1): 73-83.

St John, J. C., Facucho-Oliveira, J., Jiang, Y., Kelly, R., & Salah, R. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: A journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Human reproduction update.* 2010; 16 (5): 488-509.

Steuerwald, N., Barritt, J. A., Adler, R., Malter, H., Schimmel, T., Cohen, J., & Brenner, C. A. Quantification of mtDNA in single oocytes, polar bodies and subcellular components by real-time rapid cycle fluorescence monitored PCR. *Zygote.* 2000; 8 (3): 209-215.

Stringari, C., Abdeladim, L., Malkinson, G., Mahou, P., Solinas, X., Lamarre, I., . . . Beaufrepaire, E. Multicolor two-photon imaging of endogenous fluorophores in living tissues by wavelength mixing. *Sci Rep.* 2017; 7 (1): 3792.

Stringari, C., Cinquin, A., Cinquin, O., Digman, M. A., Donovan, P. J., & Gratton, E. Phasor approach to fluorescence lifetime microscopy distinguishes different metabolic states of germ cells in a live tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011; 108 (33): 13582-13587.

Stryer, L. *Biochemistry* (Vol. 4th edition). New York: W.H. Freeman; 1995, p:

Taanman, J. W. The mitochondrial genome: Structure, transcription, translation and replication. *Biochimica et biophysica acta.* 1999; 1410 (2): 103-123.

Terada, H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environmental health perspectives.* 1990; 87: 213-218.

Thompson, J. G., Kind, K. L., Roberts, C. T., Robertson, S. A., & Robinson, J. S. Epigenetic risks related to assisted reproductive technologies: Short- and long-term consequences for the health of children conceived through assisted reproduction technology: More reason for caution? *Hum Reprod.* 2002; 17 (11): 2783-2786.

Tilly, J. L., & Sinclair, D. A. Germline energetics, aging, and female infertility. *Cell metabolism.* 2013; 17 (6): 838-850.

Van Blerkom, J., Davis, P. W., & Lee, J. Atp content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod.* 1995; 10 (2): 415-424.

Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 2009; 324 (5930): 1029-1033.

Vishwasrao, H. D., Heikal, A. A., Kasischke, K. A., & Webb, W. W. Conformational dependence of intracellular nadh on metabolic state revealed by associated fluorescence anisotropy. *J Biol Chem.* 2005; 280 (26): 25119-25126.

Volejnikova, A., Hlouskova, J., Sigler, K., & Pichova, A. Vital mitochondrial functions show profound changes during yeast culture ageing. *Fems Yeast Res.* 2013; 13 (1): 7-15.

Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956; 123 (3191): 309-314.

Ward, B. L., Anderson, R. S., & Bendich, A. J. The mitochondrial genome is large and variable in a family of plants (cucurbitaceae). *Cell.* 1981; 25 (3): 793-803.

Whitten, W. K. Culture of tubal mouse ova. *Nature.* 1956; 177 (4498): 96.

Wiley, L. M., Lever, J. E., Pape, C., & Kidder, G. M. Antibodies to a renal na⁺/glucose cotransport system localize to the apical plasma membrane domain of polar mouse embryo blastomeres. *Dev Biol.* 1991; 143 (1): 149-161.

- Wilkinson, J. H., & Walter, S. J. Oxamate as a differential inhibitor of lactate-dehydrogenase isoenzymes. *Enzyme*. 1972; 13 (4): 170-176.
- Wu, X. H., & Freeze, H. H. Glut14, a duplicon of glut3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics*. 2002; 80 (6): 553-557.
- Xu, C., & Webb, W. W. Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J Opt Soc Am B*. 1996; 13 (3): 481-491.
- Yeung, S. J., Pan, J., & Lee, M. H. Roles of p53, myc and hif-1 in regulating glycolysis - the seventh hallmark of cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65 (24): 3981-3999.
- Yu, Q., & Heikal, A. A. Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular nadh concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level. *J Photochem Photobiol B*. 2009a; 95 (1): 46-57.
- Yu, Q. R., & Heikal, A. A. Two-photon autofluorescence dynamics imaging reveals sensitivity of intracellular nadh concentration and conformation to cell physiology at the single-cell level. *J Photoch Photobio B*. 2009b; 95 (1): 46-57.
- Zander-Fox, D. L., Fullston, T., McPherson, N. O., Sandeman, L., Kang, W. X., Good, S. B., . . . Lane, M. Reduction of mitochondrial function by fccp during mouse cleavage stage embryo culture reduces birth weight and impairs the metabolic health of offspring. *Biol Reprod*. 2015; 92 (5): 124.
- Zhou, W., Choi, M., Margineantu, D., Margaretha, L., Hesson, J., Cavanaugh, C., . . . Ruohola-Baker, H. Hif1alpha induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during esc-to-episc/hesc transition. *EMBO J*. 2012; 31 (9): 2103-2116.
- Zipfel, W. R., Williams, R. M., & Webb, W. W. Nonlinear magic: Multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat Biotechnol*. 2003; 21 (11): 1369-1377.
- Zorova, L. D., Popkov, V. A., Plotnikov, E. Y., Silachev, D. N., Pevzner, I. B., Jankauskas, S. S., . . . Zorov, D. B. Mitochondrial membrane potential. *Anal Biochem*. 2018; 552: 50-59.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Nilay	Uyruğu	TC
Soyadı	KUŞCU	Tel no	05334842864
Doğum tarihi	07.07.1988	e-posta	nilaykuscu@akdeniz.edu.tr

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Kurtuluş Lisesi	2005
Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2010
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2014
Doktora	Akdeniz Üniversitesi	2020

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Araştırma Görevlisi	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2014-2020

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	ÜDS	86.25
İngilizce	KPDS	71

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Poli ADP-riboz polimeraz (PARP) inhibisyonunun varikosel ile indüklenen testiküler hasar ve infertiliteye etkisi.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2009
Doksorubisin kemoterapisinin neden olduğu testiküler germ hücre apoptozu ve infertilitede Poli (ADP-riboz) Polimeraz yolağının rolünün değerlendirilmesi.	TÜBİTAK Proje No: 110S377	2011
Sıçan torasik aortunda endotoksemiye bağlı gelişen endotel disfonksiyonuna resveratrol'ün etkilerinin değerlendirilmesi: SIRT1 ve eNOS'un rolü.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2012
Fare preimplantif embriyo gelişim sürecinde FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 ekspresyonlarının değerlendirilmesi.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2012-2014

Supraspinatus onarımı sırasındaki gerilimin ve kronisitenin Akt/mTOR yolağı üzerine etkisi.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2013
Fare preimplantif embriyo gelişim sürecinde FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 transkripsiyon faktörlerinin rollerinin araştırılması.	TÜBİTAK Proje No: 114S384	2014-2016
Sıçanlarda kronik metilglioksal (MGO) uygulamasıyla indüklenen erektil disfonksiyona glukagon-benzeri peptid-1 (GLP-1) agonisti exendin-4'ün etkisi: NADPH oksidaz/Rho kinaz yolağının rolü.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2015
Sıçanlarda nesfatin-1 tedavisinin isoproterenol ile indüklenen myokard infarktüsüne karşı koruyucu etkisinin değerlendirilmesi: PI3K/Akt/GSK-3β yolağının rolü.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2015
Sıçan ovaryum dokusu kriyoprezervasyonunun ve ototransplantasyonun ovaryum dokusu histolojisine ve mast hücresi ile anjiyogenik faktörlerin ekspresyonu üzerine etkisinin araştırılması ve catestatinin bu değerler üzerine etkisinin incelenmesi.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2015
Normal ve Metabolik Olarak Zorlanan Preimplantif Embriyoların Mitokondriyal Metabolizmalarının İnvaziv Olmayan Floresan Ömrü Görüntüleme Mikroskop Teknolojisi FLIM ile Tanımlanması ve Ölçülmesi	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2016
Fare Meme Kanseri Modeli Metastatik ve Non Metastatik Tümörlerde ve Hücre Hatlarında SIRT1 ile FoxO Proteinlerinin Ekspresyonlarının in vivo ve in vitro Değerlendirilmesi.	Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri	2017
Bir tirozin kinaz inhibitörü olan Nilotinibin üreme fonksiyonları üzerindeki etkisinin hayvan modeli kullanılarak araştırılması.	TÜBİTAK Proje No:118S068	2018

Burslar-Ödüller:

Bilimsel Yayın dalında Birincilik Ödülü, Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Derneği, 2012.

Seçilmiş Sözel Bildiri 3.lük Ödülü, Üreme tıbbı Derneği 2013.

TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu- Harvard Üniversitesi 2018.

Yayınlar ve Bildiriler:

Uluslararası Yayınlar

1. Dalaklioglu S, Kuscun N, Celik-Ozenci C, Sahin Z, Nacitarhan C, Ozdem SS. Chronic treatment with taurine ameliorates diabetes-induced dysfunction of nitric oxide-mediated neurogenic and endothelium-dependent corpus cavernosum relaxation in rats. *Fundam Clin Pharmacol.*, Ağustos, 2014. DOI: 10.1111/fcp.12041.
2. Kuscun N, Celik-Ozenci C. FOXO1, FOXO3, and FOXO4 are differently expressed during mouse oocyte maturation and preimplantation embryo development. *Gene Expr Patterns*, Nisan, 2015. DOI: 10.1111/fcp.12041.
3. Ugurel SS, Kuscun N, Celik-Ozenci C, Dalaklioglu S, Tasatargil A. Resveratrol Prevented Lipopolysaccharide-induced Endothelial Dysfunction in Rat Thoracic Aorta Through Increased eNOS Expression. *Balkan medical journal*, 2016 Mar;33(2):138-43. DOI: 10.1111/fcp.12041.
4. Kuscun N., Bizzarri M., and Bevilacqua A. Myo-Inositol Safety in Pregnancy: From Preimplantation Development to Newborn Animals. *Int J Endocrinol.* 2016; 2016:2413857. DOI: 10.1111/fcp.12041.
5. C. Celik-Ozenci, N. Kuscun, N. E. Gungor-Ordueri, A. Tasatargil, P. Sahin and H. Durmus. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase may have preventive potential for varicocoele-associated testicular damage in rats. *Andrology.* 2017 Mar;5(2):362-369. DOI: 10.1111/andr.12305.
6. Tasatargil A, Kuscun N, Dalaklioglu S, Adiguzel D, Celik-Ozenci C, Ozdem S, Barutcigil A, Ozdem S. Cardioprotective effect of nesfatin-1 against isoproterenol-induced myocardial infarction in rats: Role of the Akt/GSK-3 β pathway. *Peptides.* 2017 Sep; 95:1-9. DOI: 10.1016/j.peptides.2017.07.003.
7. Dalaklioglu S, Tasatargil A, Kuscun N, Celik S, Celik-Ozenci C, Ozdem S, Barutcigil A, Kucukcetin I. Protective effect of exendin-4 treatment on erectile dysfunction induced by chronic methylglyoxal administration in rats. *Peptides.* 2018 May 21; 106:1-8. DOI: 10.1016/j.peptides.2018.05.005.
8. Gungor-Ordueri NE, Kuscun N, Tasatargil A, Burgucu D, Karacan M, Celik-Ozenci C. Doxorubicin-induced testicular damage is related to PARP-1 signaling

molecules in mice. *Pharmacol Rep.* 2019 Feb 27;71(4):591-602. DOI: 10.1016/j.pharep.2019.02.018.

9. Adiguzel D, Sahin P, Kuscu N, Ozkavukcu S, Bektas NI, Celik-Ozenci C. Spatiotemporal expression and regulation of FoxO1 in mouse uterus during peri-implantation period. *PLoS ONE*, 2019, 14(5): e0216814. DOI: 10.1111/fcp.12041
10. Kuscu N, Gungor-Ordueri NE, Sozen B, Adiguzel D, Celik-Ozenci C. FoxO transcription factors 1 regulate mouse preimplantation embryo development. *J Assist Reprod Genet.* 2019 Oct;36(10):2121-2133. DOI: 10.1007/s10815-019-01555-1.
11. Topal Celikkan F, Mungan C, Sucu M, Uysal F, Kahveci S, Hayme S, Kuscu N, Ozkavukcu S, Celik-Ozenci C, Can A. PFA is Superior to Glyoxal in Preserving Oocyte, Embryo and Stem Cell Proteins evidenced by Super-Resolution Microscopical Surveys of Epitopes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics.* 2020 Jan. DOI: 10.1007/s10815-019-01666-9.

Ulusal Yayınlar

1. Kuşcu N, Çelik-Özenci Ç. Spermatogonyal Kök Hücreler. *Androloji Bülteni*, 52: 33-37, Mart 2013.
2. N. E. Gungor-Ordueri, Sahin P, Kuscu N, Celik-Ozenci C. Assessment of Caspase-Dependent and Caspase-Independent Apoptosis in the Development of Postnatal Mouse Testis. *Uludag University Medical Faculty Journal*, 44 (2) 103-109, 2018.

Ulusal Bildiriler:

1. Ordueri E, Şahin P, Kuşcu N, Taşatargil A, Durmuş H, Çelik-Özenci Ç. The expression patterns of poly (ADP-ribose) polymerization in time dependent doxorubicin treated mice. 2. Klinik Embriyoloji Derneği Kongresi, 23-25 Eylül, 2011, Muğla.
2. Şahin P, Şahin Z, Ordueri E, Kuşcu N, Çelik-Özenci Ç. The effect of rapamisin in germ cell proliferation in vitro culture of seminiferous tubul. 2. Klinik Embriyoloji Derneği Kongresi, 23-25 Eylül, 2011, Muğla.

3. Kuşcu N, Şahin P, Ordueri E, Taşatargil A, Durmuş H, Çelik-Özenci Ç. The effect of poly (ADP-ribose) polymerization inhibition to the germ cell apoptosis induced with varicocele. 2. Klinik Embriyoloji Derneği Kongresi, 23-25 Eylül, 2011, Muğla.
4. Şahin P, Ordueri E, Kuşcu N, Çelik-Özenci Ç. Ultrastructural analysis of seminiferous tubule and germ cell proliferation on testicular damage induced with doxorubicin. 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 25-28 Ekim 2011, Antalya.
5. Kuşcu N, Şahin P, Ordueri E, Çelik-Özenci Ç. The expression patterns of mTOR signal pathways in the testicular development (Sözlü sunum). 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 25-28 Ekim 2011, Antalya.
6. Ordueri E, Şahin P, Kuşcu N, Çelik-Özenci Ç. Ultrastructural analysis of testicular cord formation in fetal and postnatal mouse testis. 20. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 25-28 Ekim 2011, Antalya.
7. Şahin P, Ordueri E, Güngör E, Kuşcu N, Çelik-Özenci Ç. Rapamisin uygulamasının fare spermatogenik hücrelere etkisinin seminifer tübül kültüründe gösterilmesi. 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 16-19 Mayıs 2012, Denizli.
8. Kuşcu N, Şahin P., Ordueri E, Güngör E, Çelik-Özenci Ç, Taşatargil A. Doksorubisin ile indüklenen testiküler hasarda SIRT1, p53 ve p21 ekspresyonlarının değerlendirilmesi. 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 16-19 Mayıs 2012, Denizli.
9. Ordueri E, Şahin P., Kuşcu N, Çelik-Özenci Ç. Postnatal fare testis gelişiminde caspase-bağımlı ve caspase-bağımsız apoptozun değerlendirilmesi. 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 16-19 Mayıs 2012, Denizli.
10. Çelik-Özenci Ç, Ordueri E., Şahin P., Kuşcu N. Erişkin fare testisinde CD200 ve CD200R ekspresyonlarının değerlendirilmesi. 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 16-19 Mayıs 2012, Denizli.
11. Kuşcu N, Dilmaç S, Tanrıover G, Erin N, Çelik-Özenci Ç. Meme kanserinden elde edilen metastatik hücreler ile non-metastatik hücrelerin SIRT, p53 ve p21 ekspresyonları açısından in vivo ve in vitro

- değerlendirilmesi. 21. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi, 28-31 Mayıs 2013, Mersin.
12. Kuşcu N, Dönmez B, Çelik-Özenci Ç. Diyabetik ratlarda tungstat tedavisinin parp aktivitesi ve testiküler hasara olan etkisinin değerlendirilmesi. IV. Üreme Tıbbi Derneği Kongresi, 26-29 Eylül 2013, Antalya.
13. Çelik-Özenci Ç, Kuşcu N, Bektaş N, Ordueri E, Şahin P, Taşatargil A, Doksorubisin uygulanan PARP-1 geni silinmiş farelerde FOXO transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonları spermatogenez sürecinde değişiklik gösterir. IV. Üreme tıbbi Derneği Kongresi, 26-29 Eylül 2013, Antalya.
14. Kuşcu N, Çelik-Özenci Ç. FoxO1, FoxO3 Ve FoxO4 Transkripsiyon Faktörleri Fare Preimplantif Embriyo Gelişim Sürecinde Ekspre Olurlar. XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 27-30 Mayıs 2014, Ankara.
15. Kuşcu N, Çelik-Özenci Ç, Bevilacqua A. Fare Embriyo Kültür Ortamına Eklenen Myoinositol Akt Yolağı Üzerinden Embryo Gelişimine Etki Yapar. 6. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi, 06-09 Kasım 2014, Antalya.
16. Kuşcu N, Çelik-Özenci Ç. Yüksek pH Koşullarında In Vitro Kültüre Edilen Fare Embriyolarında FoxO Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonlarının Değerlendirilmesi: In vitro stres ve FoxO ilişkisi. V. Üreme Tıbbi ve Cerrahisi Derneği Kongresi, 28-31 Ekim 2015, Antalya.
17. Kuşcu N, Dilmaç S, Tanrıover G, Erin N, Çelik-Özenci Ç. Fare meme kanseri modeli metastatik ve non-metastatik tümörlerde ve hücre hatlarında FoxO1, FoxO3 ve FoxO4 ekspresyonlarının in vivo ve in vitro değerlendirilmesi. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan-03 Mayıs 2016, İzmir.
18. Adıgüzel D, Acar N, Kuşcu N, Çelik-Özenci Ç. FoxO transkripsiyon faktörlerinin peri-implantasyon sürecindeki rolleri: Endometriyal reseptivitenin olası yeni belirteci. XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30 Nisan-03 Mayıs 2016, İzmir.
19. Kuşcu N, Güngör-Ordueri N. E., Sözen B., Demir N., Çelik-Özenci Ç. FoxO transkripsiyon faktörleri, fare preimplantasyon embriyo gelişiminde temel

- düzenleyicilerdendir. 7. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi. 17-20 Kasım, Antalya, 2016 (Sözlü sunum).
20. Kuşcu N, Adıgüzel D., Özkavukcu S., Cengiz-Seval G., Çelik-Özenci Ç. Kronik myeloid lösemi tedavisinde kullanılan bir tirozin kinaz inhibitörü olan nilotinib hücre proliferasyonunu azaltarak ve apoptozu artırarak gonadotoksik etki gösterir. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Ankara.
21. Bektaş N. İ., Adıgüzel D, Akçay G, Derin N, Kuşcu N, Çelik-Özenci Ç. Farelerde sirkadiyen ritim bozukluğunda görülen intrauterin büyüme geriliği, sirkadiyen saat proteinlerinin azalmış ekspresyonu ve endotel disfonksiyonu ile ilişkili olabilir. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Ankara (Sözlü sunum).
22. Yıldırım S., Dilmaç S, Kuşcu N, Adıgüzel D, Yoldaş S. B., Erin N., Tanrıöver G. Sirt1 spesifik yolaklar ile metastazı tetikleyen FoxO proteinlerinin hedefini etkileyebilir mi? 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Ankara (Sözlü sunum).
23. Adıgüzel D, Şahin P., Bektaş N. İ., Tosun G, Kuscun N, Çelik-Özenci Ç. FoxO3 transkripsiyon faktörü fare implantasyonu ve desidualizasyonunda rol oynuyor olabilir. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 10-13 Mayıs 2018, Ankara.

Uluslararası Bildiriler:

1. Celik-Ozenci C., Tasatargil A., Gungor Ordueri E., Kuscun N., Sahin P. Role of the poly (ADP-ribose) polymerase activity in doxorubicin-induced testicular damage. 28th Annual Meeting of European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), 01-04 2012, Istanbul, Turkey.
2. Kaya H., Oktay C., Celik-Ozenci C. Gungor NE., Kuscun N, Ozkan O. Comparison of n-butyl 2-cyanoacrylate and super glue for the closure of incisional wounds. International Conference of Emergency Medicine, ICEM, 27-30 June 2012, Dublin, Ireland.
3. S. Dalaklioglu, N. Kuscun, C. Celik-Ozenci, Z. Bayram, C. Nacitarhan and S.S. Ozdem. Chronic Treatment with Taurine Ameliorates Diabetes-Induced

Dysfunction Of Nitric Oxide-Mediated Neurogenic And Endothelium-Dependent Corpus Cavernosum Relaxation In Rats. 11th EACPT Congress, 28-31 August 2013, Geneva, Switzerland.

4. Celik-Ozenci C., Kuscu N., Ozkavukcu S. Expressions of follicular activation inhibitory molecules; Foxo3a, p27, and Foxl2 in mouse ovulation induction model. ALPHA 2014, 10th Biennial Conference, 9-11 Mayıs 2014, Antalya.
5. Kuscu N., Celik-Ozenci C. Evaluation Of The Foxo4 Expressions in Mouse Preimplantation Embryo Development. ALPHA 2014, 10th Biennial Conference, 9-11 Mayıs 2014, Antalya.
6. Guldane Cengiz Seval, Sinan Ozkavukcu, Murat Seval, Ciler Celik Ozenci, Nilay Kuscu, Meltem Ayli. The Effect Of Nilotinib In Chronic Myeloid Leukemia Treatment Dose On Fertility And Teratogenicity In A Healthy Mouse Model. EHA 2015, 20th Congress of European Hematology Association (EHA), 11-14 June, 2015, Vienna, Austria.
7. Kuscu N, Okan A, Demir N, Celik-Ozenci C. Evaluation of FoxO1, FoxO3, and FoxO4 expressions in in vivo and in vitro developed mouse blastocysts under hyperglycemic conditions. The 3rd biomarker Meeting in Personalized Reproductive Medicine, 7-9 April, 2016, Valencia, Spain.
8. Sati G.L., Kuscu N., Tas G. G. Soygur B., Celik-Ozenci C. Comparison of the expression and localization of FoxO3 in normal term and gestational diabetic placentas. 13th Multinational Congress on Microscopy, Rovinj, CROATIA, 24-29 September 2017, pp.1-1.
9. Donmez B.O, Kuscu N., Ozturk N., Ozdemir S., Oguz N., Sari R., Celik-Ozenci C. The Effect of Tungstate Treatment on Poly Polymerase Activity in Diabetic Rat Testis. 3rd Annual International Conference on Public Health 19-22 June 2017, Athens, GREECE.