

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
VHE-YL-2014-0001

**FARELERDE *IN VITRO* EMBRİYO KÜLTÜRÜ VE EMBRİYO
TRANSFERİNİN FÖTAL TRAKEYA DOKUSUNDA BAZAL
HÜCRELERİN SAYISI ÜZERİNE ETKİSİ**

Uzman Biyolog Göksel DOĞAN

DANIŞMAN

Doç. Dr. Levent KARAGENÇ

AYDIN-2014

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı (Veteriner) Programı öğrencisi Göksel Doğan tarafından hazırlanan “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerine etkisi” başlıklı tez 18.07.2014 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Unvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

Doç. Dr. Levent Karagöç

Adnan Menderes Üniversitesi

Prof. Dr. Mustafa Sandıkçı

Adnan Menderes Üniversitesi

Doç. Dr. Hümeysra Ünsal

Adnan Menderes Üniversitesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu yüksek lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla (tarih) tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Güzel Dişçigil

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

2013-2014 bahar döneminde, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloj-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, Doç. Dr. Levent KARAGENÇ'in danışmanlığı altında yürütülen bu çalışma yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır.

Sunulan tez çalışması "Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerine etkisi" isimli ve VTF14028 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) komisyonu tarafından desteklenmiştir.

Sunulan tez çalışması aynı zamanda Doç. Dr. Levent Karageç'in yürüttüğü "Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda Toll-benzeri reseptörlerin (TLR) ekspresyonu üzerine etkisi" isimli 1120259 nolu Tübitak projesi ile bağlantılı ve eş zamanlı olarak yapılmıştır.

Literatür bilgileri ışığında, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin direkt olarak, fetal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığı konusunda bir bilgiye rastlanılmamıştır. Bu bakımdan, sunulan çalışma özgün bir çalışma niteliğinde olup, gelecekte yapılacak olan ya da yapılması planlanan birçok çalışma için rehber niteliğinde olacaktır.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
EKLER DİZİNİ.....	viii
GİRİŞ	1
1.1. İnfertilite ve Üremeye Yardımcı Tedavi Yöntemleri.....	2
1.2. ÜYTE Yöntemlerine Bağlı Olarak Gelişen Sağlık Problemleri	2
1.3. <i>In Vitro</i> Embriyo Kültürünün Embriyo Kalitesi ve Fötal Gelişim Üzerine Etkisi.....	4
1.4. ÜYTE Uygulamalarının İmmun Sistem Üzerine Etkileri.....	5
1.5. Farelerde Trakeya ve Akciğer Gelişimi.....	6
1.6. Farelerde Solunum Yolu Epitel Hücreleri ve İşlevleri.....	9
1.7. Trakeyada Hücre Farklılaşması ve Bazal Hücre Gelişimi.....	12
2. GEREÇ VE YÖNTEM	17
2.1. Hayvan materyali	17
2.2. Vazektomize erkeklerin hazırlanması	17
2.3. Yalancı Gebe Dişilerin Hazırlanması.....	18
2.4. Embriyoların Toplanması.....	18
2.5. <i>In Vitro</i> Embriyo Kültürü İçin Mikrodropların Hazırlanması	18
2.6. <i>In vitro</i> Emriyo Kültürü	19
2.7. Yalancı Gebe Dişilere Embriyo Transferi.....	19
2.8. Dokuların Alınması.....	21
2.9. Doku Takibi ve Dokuların Bloklanması	21

2.10. Üçlü, İmmnoflöresan ve İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemleri.....	21
2.11. İstatistiksel Analizler.....	23
3. BULGULAR	24
4. TARTIŞMA.....	33
5. SONUÇ	39
ÖZET	40
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	44
EKLER.....	51
ÖZGEÇMİŞ.....	56
TEŞEKKÜR.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

µg:	Mikro gram
µl:	Mikro litre
µm:	Mikro metre
µm ² :	Mikro metre kare
ART:	Assisted reproductive therapy (Üremeye yardımcı tedavi)
d.p.c:	Days post coitum
DAB :	3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride
H ₂ O ₂ :	Hidrojen peroksit
hCG:	İnsan koryonik gonodotropini
IVF:	<i>In vitro</i> fertilizasyon
İ.Ü:	İnternasyonal ünite
KRT:	Keratin
PBS:	Phosphate buffer saline
PBT:	Phosphate buffer saline- Tween
PMSG:	Gebe kısrak serum gonodotropini
pO ₂ :	Parsiyal oksijen basıncı
SD:	Standart sapma (Standard Deviation)
TBS:	Tris buffer saline
TLR:	Toll-like reseptör
TRP63:	Transformasyon ilişkili protein 63
ÜYTE:	Üremeye yardımcı tedavi yöntemleri
ve ark:	ve arkadaşları

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. İnsan ve fare bazal hücreleri için seçilmiş belirteçler	15
Çizelge 3.1. Quinn's Advantage vasat sistemleri kullanılarak elde edilen embriyo gelişim oranları.....	24
Çizelge 3.2. Kontrol ve Deney gruplarını oluşturmak üzere izole edilen fötüslerin canlı ağırlıkları	27
Çizelge 3.3. Kontrol ve Deney gruplarına ait trakeya dokularında bazal hücre sayıları, epitel kalınlıkları, lümen yüzey alanları ve vücut ağırlıkları	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Laringo-trakeyal ve trakeyo-özefageal olukların ön bağırsaktan şekillenmesi, trakeya, özefagus ve akciğer tomurcuklarının gelişim basamakları.....	7
Şekil 1.2. Trakeya, bronkus ve bronkiyolusların dallanma morfogenezinin şematik görünümü	9
Şekil 1.3. Fare solunum sisteminde hücre tipleri ve ilişkili yapılar	12
Şekil 1.4. Trakeyada hücre farklılaşması	13
Şekil 1.5. P63 ile ilişkili biyolojik fonksiyonların listesi	16
Şekil 2.1. Kontrol ve Deney gruplarını oluşturmak amacıyla gebeliğin 18. Gününde (18.5 d.p.c.) izole edilen fötusların elde edilişlerini özetleyen genel deney dizaynı.....	20
Şekil 3.1. Deney grubunu oluşturmak üzere zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar 95 saat süreyle gerçekleştirilen in vitro embriyo kültürü sonrasında embriyo gelişimi.....	25
Şekil 3.2. Gebeliğin 18. Gününde (18.5 d.p.c.) fötüs ve trakeya dokularının izolasyonu.....	26
Şekil 3.3. Gebeliğin 18. Gününde (18.5 d.p.c) izole edilen K9 fötüsünde trakeya ve akciğer loblarının genel görünümü (Orijinal).....	28
Şekil 3.4. Fötal (18.5 d.p.c.) trakeya dokusunun genel histolojik görünümü.....	28
Şekil 3.5. Fötal (18.5 d.p.c.) trakeya dokusunda imünofloresan boyama yöntemi ile bazal hücrelerin belirlenmesi.....	29
Şekil 3.6. Fötal (18.5 d.p.c.) trakeya dokusunda immuno-histokimya boyama yöntemi ile bazal hücrelerin belirlenmesi.....	30

EKLER DİZİNİ

Ek 1. Araştırmada kullanılan solüsyon ve kimyasallar.....	51
Ek 2. Araştırmada kullanılan diğer malzeme, araç ve gereçler.....	55

1. GİRİŞ

Cinsel olgunluğa erişmiş çiftlerin bir yıl boyunca düzenli olarak ve herhangi bir korunma yöntemi kullanmaksızın cinsel ilişkiye girmelerine karşın, çocuk sahibi olamamaları, infertilite olarak tanımlanmaktadır. Tüm dünya genelinde toplumun %7'sini etkileyen (Boivin ve ark 2007) önemli bir sağlık sorunudur. Son yıllarda, infertilite tedavisinde başta *in vitro* fertilizasyon (tüp bebek), *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi olmak üzere çeşitli üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) yöntemleri yaygın bir biçimde kullanılmaktadır. ÜYTE uygulanan çiftlerde birden fazla embriyo transferi yapılmasının bir sonucu olarak ortaya çıkan çoğul gebelik, prematür doğum (37.haftadan önce gerçekleşen doğumlar), rahim içi gelişme geriliği, rahim içinde ölüm ve kromozomal anomali oluşma risklerini artırması sebebiyle son derece önem taşımaktadır. ÜYTE yöntemlerinin uygulanması sonucu dünyaya gelen çocuklarda, infertil/subfertil olmayan çiftlerden doğan çocuklar ile kıyaslandığında, çeşitli sağlık sorunlarının görülme riskinin daha yüksek olduğu görülmektedir (Schieve ve ark 2004; Alukal ve Lipshultz, 2008). Ancak yapılan literatür araştırmalarına göre *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin direkt olarak fötal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığı konusunda bir bilgiye rastlanmamıştır.

Trakeya dokusundan başlayarak akciğerlere kadar uzanan solunum yollarının yüzeyini örten epitel dokusu sürekli olarak kendini yenilemektedir. Yenilenme süreci yavaş gerçekleşmesine rağmen doku dinamik bir yapıya sahiptir. Solunum epitelinde birbirinden farklı yapılara sahip ve farklı görevleri yerine getirmek üzere sekiz tip hücre yer almaktadır. Bu hücreler silli, sekretör ve bazal hücreler olarak üç grupta toplanmıştır (Knight ve Hogate 2003). Bazal hücreler, solunum yollarında trakeyadan başlayarak bronşiyollere kadar bulunmaktadır. Bazal membran ile sıkı bir bağ kuran bazal hücreler, yoğun oranda dezmozomal ve hemidezmozomal bağlar içermektedirler (Evans ve ark 2001). Bazal hücreler, bir hasar durumunda kendilerini yenileyerek (Rock ve ark, 2009), silli ve salgı hücrelerine farklılaşabilmelerinden dolayı multipotent kök hücreleri olarak değerlendirilmektedirler (Hong ve ark 2004b). Bazal hücreler, transkripsiyonfaktörü

transformasyon-ilişkili protein 63 (Trp 63)'ü, sitokeratin 5 ve 14 (Krt 5 ve Krt 14)'ü eksprese etmeleri ile karakterize edilmektedirler (Rock ve ark, 2009).

Sunulan çalışmada, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferine bağlı olarak, farelerde fetal trakeya dokusunda Trp63 eksprese eden bazal hücrelerin sayılarında herhangi bir artış ya da azalış olup olmadığı araştırılmıştır. Sunulan tez çalışması, Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde, Doç. Dr. Levent Karagenç tarafından yürütülmekte olan, "Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda Toll-benzeri reseptörlerin (TLR) ekspresyonu üzerine etkisi" isimli ve 1120259 nolu TÜBİTAK projesi ile bağlantılı ve eş zamanlı olarak gerçekleştirilmiştir.

1.1.İnfertilite ve Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYTE) Yöntemleri

Günümüzde, infertilite tedavisinde başta *in vitro* fertilizasyon (tüp bebek), *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi olmak üzere çeşitli üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. *In vitro* fertilizasyon ve embriyo transferi uygulanarak dünyaya gelen ve ilk tüp bebek olarak tarihe geçen Louis Brown'un doğumunu takiben (Steptoe ve Edwards 1978), bütün dünyada benzer yöntemler kullanılarak doğan bebek sayısının 1 milyonun üzerinde olduğu tahmin edilmektedir (de Mouzon ve ark 2009). Ülkemizde *in vitro* fertilizasyon ve embriyo transfer çalışmaları ilk olarak Prof. Dr. Refik Çapanoğlu başkanlığında Ege Üniversitesi Aile Planlaması ve Kısırlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmış olup, ilk tüp bebek (Ece) 16.04.1989 tarihinde dünyaya gelmiştir. Ocak 2010 itibarıyla ülkemizde T.C. Sağlık Bakanlığı'nca sertifikalandırılmış tüp bebek ünitelerinin sayısı 121'e ulaşmış bulunmaktadır (<http://www.saglik.gov.tr/THGM/belge/1-6484/saglik-bakanligi-ruhsatli-uremeye-yardimci-tedavitup-be-.html>). Bu rakamlar, sorunun yaygınlığını ve infertilite/subfertilite tedavisine duyulan ihtiyacı ortaya koyması açısından önem taşımaktadır.

1.2. ÜYTE Yöntemlerinin Uygulanmasına Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Sağlık Sorunları

İnfertilite tedavisinin gerektirdiği ovulasyon indüksiyonu, spermin, ovumun hazırlanması ve *in vitro* fertilizasyon/ mikroenjeksiyon yöntemleriyle elde edilen zigotun belirli bir süre laboratuvar ortamında kültürü, doğacak bebeğin sağlığı açısından herhangi

bir risk oluşturmakta mıdır? Bu soru, yöntemin insan infertilite tedavisinde kullanıldığı andan itibaren, konuyla ilgili tüm bilim insanlarını, infertil/subfertil anne/baba adaylarını ve toplumun genelini kaygılandırmaktadır. Elimizdeki veriler, bu kaygının yersiz olmadığını ve infertil/subfertil çiftlere ÜYTE yöntemlerinin uygulanması sonucu dünyaya gelen çocuklarda, infertil/subfertil olmayan çiftlerden doğan çocuklar ile kıyaslandığında, çeşitli sağlık sorunlarının görülme riskinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Schieve ve ark 2004, Alukal ve Lipshultz 2008).

İnfertil/subfertil çiftlere ÜYTE uygulamaları sonucu doğan çocuklarda Beckwith-Wiedemann Sendromu, Prader Sendromu ve Angelman Sendromu gibi ender rastlanan genetik anomalilerin oranlarında artış olduğu bildirilmektedir (Maher ve ark 2003, Ørstavik ve ark 2003). Yine, ÜYTE yöntemleriyle dünyaya gelen bebeklerde serebral palsi (Hvidtjørn ve ark 2006) ve epilepsi (Sun ve ark 2007) görülme riskinin normal doğumlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ancak, birden fazla embriyo transferi yapılmasının bir sonucu olarak ortaya çıkan çoğul gebelik ve bunu bağlı olarak gelişen çeşitli komplikasyonlar, tüm dünya genelinde infertilite tedavisinde karşılaşılan en yaygın sağlık riski olarak kabul edilmektedir. Normal popülasyonda %1-2 olan çoğul gebelik oranı, ÜYTE uygulanan çiftlerde Avrupa'da %22.7 (Andersen ve ark 2008), A.B.D.'de %31.7 (Wright ve ark 2008) olarak bildirilmektedir. Ülkemizde, Yayla ve Baytur (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, ÜYTE uygulamalarının çoğul gebeliklerin %75'inden sorumlu olabileceği belirtilmektedir. Çoğul gebelik riskini azaltmaya yönelik olarak tüm dünya genelinde siklus başına transfer edilen embriyo sayısı yasal olarak düzenlenmekte ve pek çok Avrupa ülkesinde birden fazla embriyo transferine izin verilmemektedir. Ülkemizde T.C. Sağlık Bakanlığı'nca düzenlenen ve denetlenen ÜYTE uygulamalarında da benzer bir yaklaşım sergilenmektedir. Yürürlükte olan ÜYTE yönetmeliğine göre (6.3.2010 tarih, 27513 sayılı Resmi Gazete) merkezlerde ÜYTE uygulamasında birden fazla embriyo transfer edilmemesi esastır. Ancak, 35 yaşa kadar birinci ve ikinci uygulamada tek embriyo, üçüncü ve sonraki uygulamalarda iki embriyo, 35 yaş ve üzerinde tüm uygulamalarda en fazla iki embriyo transfer edilebilmektedir.

ÜYTE uygulanan çiftlerde birden fazla embriyo transferi yapılmasının bir sonucu olarak ortaya çıkan çoğul gebelik, prematür doğum (37. haftadan önce gerçekleşen doğumlar), rahim içi gelişme geriliği, rahim içinde ölüm ve kromozomal anomali oluşma risklerini artırması sebebiyle son derece önem taşımaktadır. Ayrıca, insanlarda doğum ağırlığı düştükçe erişkin dönemde kalp krizi, Tip 2 diyabet ve dislipidemi (lipid

profilindeki bozukluklar) görülme riski artmaktadır (Calkins ve Devaskar 2011). İlk kez Barker (2007) tarafından ortaya atılan ve Barker hipotezi olarak bilinen bir hipoteze göre, erişkin dönemde görülen bazı hastalıklar, fetal gelişim sürecinde görülebilecek olan aksaklıkların bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu noktada, implantasyon öncesi embriyo gelişiminin, fetal gelişimi etkileyen en önemli faktörlerden birisi olduğu göz ardı edilmemelidir (Lane ve Gardner 2005). Dolayısıyla, çoğul gebelik olgusundan bağımsız olarak, subfertil/infertil çiftlere ait embriyoların optimum olmayan laboratuvar koşullarında büyütülmeleri (*in vitro* embriyo kültürü) ve anne adaylarına transferi sonucunda oluşan bazı tekil gebeliklerde de fötusun ve plasentanın gelişimi normal seyrini takip edememekte ve bu durum doğacak yavrunun erişkin dönemde yukarıda belirtilen hastalıklara yakalanma riskini artırabilmektedir (Fleming ve ark 2004).

1.3. *In Vitro* Embriyo Kültürünün Embriyo Kalitesi ve Föetal Gelişim Üzerine Etkisi

Yukarıda sözü edilen ve ÜYTE uygulamaları sonucu doğan bebeklerde görülen sağlık sorunlarının, ÜYTE uygulanan çiftlerin infertil/subferil olmalarının altında yatan ve çoğu zaman tam olarak tanımlanamayan genetik faktörlerden, fertilizasyonun değişik aşamalarındaki manipülasyonlardan, süperovulasyon ve ovulasyon indüksiyonunu oluşturmak amacıyla uygulanan gonadotropinlerin etkisiyle follikül ve oositin yapısında ortaya çıkabilecek değişikliklerden, oositlerin mekanik manipülasyonu ve subfertil erkek spermelerinin kullanılmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Basetemur ve Sutcliffe 2008). Ancak, çoğu zaman kontrol edilemeyen bütün bu faktörlerden bağımsız olarak, optimum olmayan koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültürünün, ortaya çıkan olumsuz tabloda son derece önemli bir rol oynadığı bilinmektedir.

Gerek insan infertilite tedavisinde, gerekse çeşitli hayvan türlerinde yapılan *in vitro* fertilizasyon ve *in vitro* embriyo kültür çalışmalarında embriyolar, özel olarak hazırlanmış olan vasatlar (medium) içerisinde büyütülmektedirler. Vasatların içeriği dışında, embriyo kültürü sırasında kullanılan sıcaklık, ışık, pH ve oksijen konsantrasyonu gibi fiziksel parametreler de embriyo gelişimi üzerine etki etmektedir. Kullanılan vasatlar da dahil olmak üzere *in vitro* embriyo kültürü sırasında embriyoların maruz kaldıkları mikro çevreyi oluşturan ve *in vitro* embriyo kültür sistemi olarak tanımlanan bütün bu unsurların optimizasyonuna yönelik çalışmalar devam etmektedir (Vajta ve ark 2010). Bununla birlikte, embriyoların *in vitro* koşullarda maruz kaldıkları mikro çevrenin, *in vivo* koşulları yansıtmaktan son derece uzak olduğu kabul edilmektedir (Pool, 2005).

Optimum olmayan koşullarda yapılan *in vitro* embriyo kültürü, implantasyon öncesi embriyo gelişimini geriletlediği gibi implantasyon sonrası fetal gelişim bozukluklarına da neden olabilmektedir. Örneğin, sığır ve koyunlarda yapılan *in vitro* fertilizasyon çalışmalarında karşılaşılan ve makrozomi, hipotiroidizm, hiperinsülinemi, hiperglisemi ile karakterize olan iri yavru sendromu (large offspring syndrome), embriyo kültür vasatı içerisinde serum katılmasıyla ortaya çıkmaktadır (Sinclair ve ark 2000). Yine, fare, koyun ve sığır embriyoları ile yapılan çalışmalarda embriyoların blastosist aşamasına kadar optimum olmayan kültür koşullarında büyütölmelerine bağılı olarak embriyolarda gelişim geriliğı, çeşitli genetik ve metabolik bozukluklar ortaya çıkabilmekte ve buna bağılı olarak fetal gelişim ve plasenta gelişimi de olumsuz yönde etkilenmektedir (Lane ve Gardner 2005). Daha da önemlisi, optimum olmayan koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültürüne bağılı olarak embriyonal ve fetal dönemde ortaya çıkan gelişim bozuklukları, doğacak yavruda kalıcı ve uzun vadeli sağılık sorunlarının ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Örneğin, farelerde yapılan bir çalışma *in vitro* embriyo kültürüne bağılı olarak, erişkin dönemde sistolik kan basıncı değerlerinin yükseldiğini göstermektedir (Watkins ve ark 2008). Yine farelerde, Ecker ve ark (2004) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar laboratuvar koşullarında büyütölen embriyoların, yalancı gebe dişilere transferinden elde edilen erişkin farelerde öğrenme güçlüğü ve hafıza kaybı gibi çeşitli davranış bozukluklarının ortaya çıktığı ve bu etkilerin kalıcı olduğu saptanmıştır.

1.4. ÜYTE Uygulamalarının İmmun Sistem Üzerine Etkileri

ÜYTE uygulamaları sonucu dünyaya gelen bebeklerde, immün sistemin doğrudan etkilendiğine dair hangi bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, yapılan çalışmalar infertilite tedavisi sonucunda dünyaya gelen bebeklerin, normal bebeklere oranla enfeksiyonlara (Bonduella ve ark 2005, Ludwig ve ark 2009) ve astım gibi alerjik solunum yolları hastalıklarına (Ericson ve ark 2002, Finnström ve ark 2011) daha duyarlı olduklarını göstermektedir. Konuyla ilgili olarak, ülkemizde Türk Neonatoloji Derneğı tarafından 18 tüp bebek merkezinin katılımıyla gerçekleştirilen bir çalışmada ise, neonatal sepsis ve mortalite oranlarının infertilite tedavisi sonucunda doğan bebeklerde daha yüksek oranda göröldüğü belirtilmektedir (Türk Neonatoloji Derneğı Yardımlı Üreme Teknikleri ve Çoğul Gebelikler Çalışma Grubu, 2010). Bütün bu veriler, infertilite tedavisi ile dünyaya gelen bebeklerde bağışıklık sisteminin gelişimini tam olarak tamamlamamış

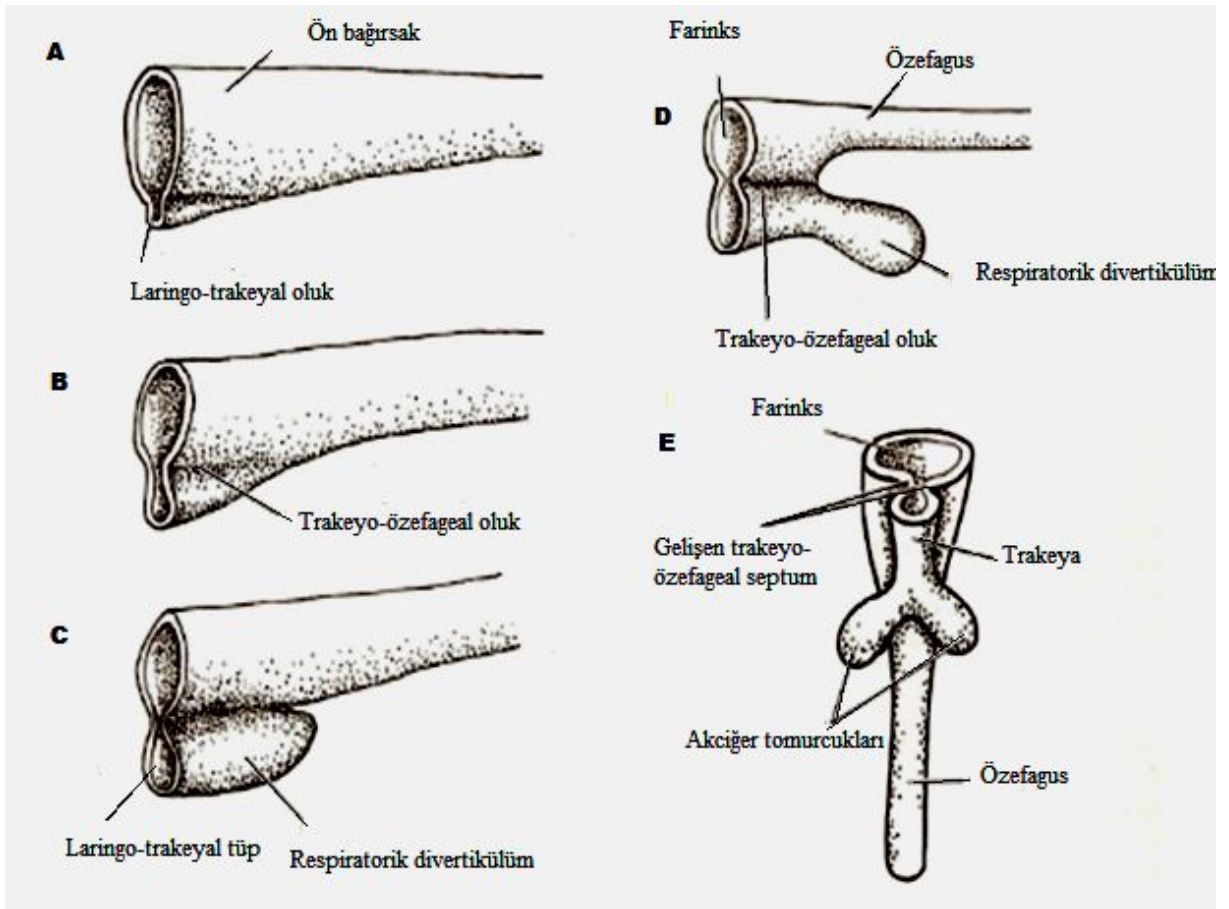
olabileceğini ve buna bağlı olarak neonatal dönemde çeşitli alerjik ve enfeksiyöz hastalıklara duyarlılığın artabileceğini düşündürmektedir.

Konuyla ilgili olarak Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesinde Doç Dr. Levent Karagenç tarafından yürütülmekte olan “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal akciğer dokusunda Toll-benzeri reseptörlerin (TLR) ekspresyonu üzerine etkisi” isimli ve 112O259 nolu TÜBİTAK projesinin amacı farelerde zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar atmosferik oksijen konsantrasyonunda gerçekleştirilecek olan *in vitro* embriyo kültürünün fetal akciğer dokusunda doğal bağışıklığın önemli düzenleyicilerinden olan toll-benzeri reseptörlerin (TLR 1-13) ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını test etmektir. Bu amaçla, blastosist aşamasında yalancı gebe dişilere embriyo transferi yapılacak ve her bir grup için gebeliğin 18. gününde (18 d.p.c.) elde edilecek olan fötlara ait akciğer doku örneklerinde, toll-benzeri reseptörlerin (TLR 1-13) ekspresyonu mRNA (transkripsiyonel) ve protein (translasyonel) düzeylerinde kantitatif ve semi-kantitatif olarak belirlenecektir. Ayrıca, *in vitro* embriyo kültürünün fetal akciğer dokusunda TLR sinyal yolları ve doğal bağışıklık sisteminde rol oynayan diğer tüm genler de dahil olmak üzere toplam 45 bin (45,000) adet genin transkripsiyonel düzeyde ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığı kantitatif olarak belirlenecektir. Elde edilen bulgular, her bir grup için fetal akciğer ve karaciğer dokularında malondialdehid (MDA), süperoksit dismutaz, katalaz aktiviteleri; total glutatyon, total antioksidan düzeyleri de dikkate alınarak değerlendirilecektir. Zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar atmosferik oksijen konsantrasyonunda gerçekleştirilecek olan *in vitro* embriyo kültürünün fetal trakeya dokusunda epitel hücre popülasyonu üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığına dair literatür bilgisi bulunmamaktadır. TÜBİTAK destekli olarak yürütülmekte olan proje (TÜBİTAK 112O259) ile bağlantılı ve eş zamanlı olarak yürütülmüş olan sunulan tez çalışmasının amacı, atmosferik oksijen konsantrasyonunda gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültürünün fetal trakeya dokusunun genel histolojik yapısı ve trakeya dokusunda kök hücre olarak görev yapan bazal hücrelerin sayısı üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını test edilmesidir.

1.5. Farelerde Trakeya ve Akciğer Gelişimi

Farelerde solunum sisteminin gelişimi, ön bağırsağın (foregut) anteriyör kısmından longitudinal olarak iki tüpe ayrılması ile başlar. Ön bağırsağın tüplere ayrılması, insanda

yaklaşık olarak gebeliğin 28. gününde görülürken, farelerde 9,5. embriyonik günde (- 22 somit evresi) görülmektedir (Morrisey ve Hogan 2010). Ön bağırsağın ventralinde, laringo-trakeyal oluk olarak isimlendirilen bir oluk şekillenmektedir (Şekil 1.1-A). Laringo-trakeyal oluk dışı doğru büyür ve ön bağırsaktan ayrılır. Böylece, trakeyo-özefageal oluklar şekillenir (Şekil 1.1-B). Bu oluklar birleşerek trakeyo-özefageal septumu oluştururlar (Şekil 1.1-E). İki septumun kaynaşması sonucu birbirinden ayrılan tüpler daha sonra özefagus ve trakeyayı oluşturacak şekilde gelişimlerine devam ederler. Oluşan tüplerden, dorsal tüp özefagusu meydana getirirken, ventral tüp trakeya ve akciğer tomurcuklarını şekillendirir (Şekil 1.1-D) (Que ve ark 2006, McGeady 2006, Evcil 2010).

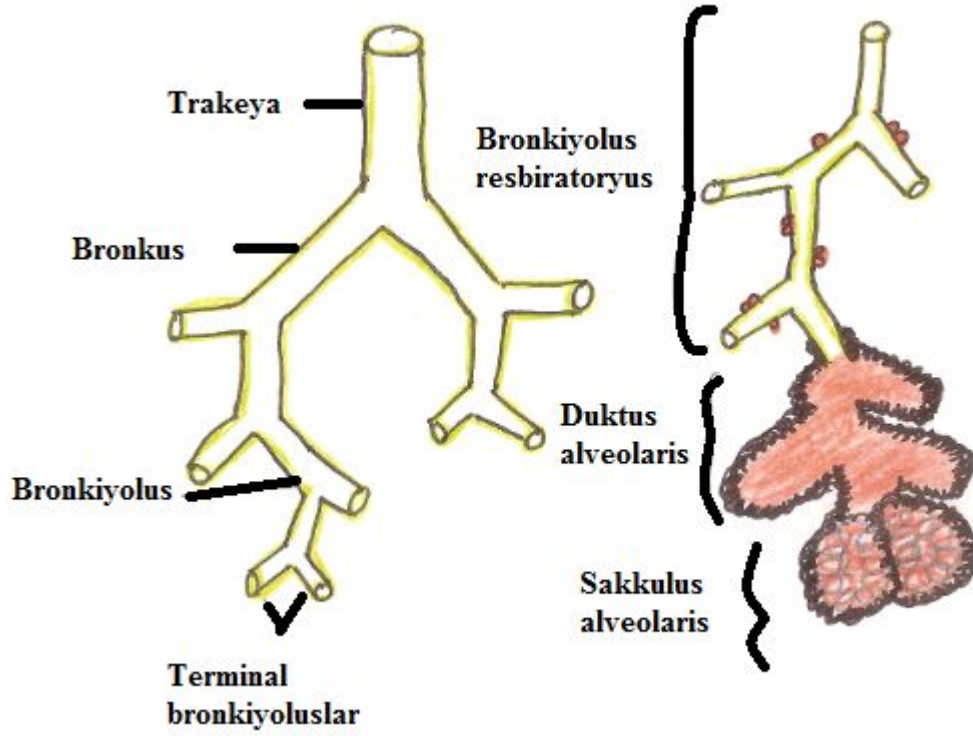


Şekil 1.1. Laringo-trakeyal ve trakeyo-özefageal olukların ön bağırsaktan şekillenmesi, trakeya, özefagus ve akciğer tomurcuklarının gelişim basamakları (McGeady 2006).

Trakeya ve akciğer tomurcuklarını oluşturacak olan laringo-trakeyal tüp, iç tarafta yerleşen endoderm tabakasından ve bu tabakayı dıştan saran splanchnik mezoderm katmanlarından oluşmaktadır. Larinks, trakeya ve bronşları döşeyen epitel, akciğerlerde olduğu gibi tümüyle endodermden köken alırken, trakeya ve akciğerlerin kıkırdak ve kas yapıları ön barsağı çevreleyen mezodermden oluşmaktadır (McGeady 2006). Laringo-

trakeyal t p, kese seklinde solunum divertik l m n  (respiratorik divertik l m) meydana getirecek biçimde bir kabartı oluşturmaktadır (Şekil 1.1-C,D; Laudy ve Wladimiroff 2000, Moore ve Persaud 2002). Splanchnik mezoderm ile kaplı respiratorik divertik l m büyüyerek uzamaya devam eder ve iki kola ayrılarak akciğer tomurcuklarını oluŐturur (Şekil 1.1-E). Her bir tomurcuk, iç tarafta endodermal bir epitel tabakası ve bu epiteli çevreleyen mezoderm katmanlarından oluşmaktadır. Laringo-trakeyal tüpün, akciğer tomurcuklarının dallanma (bifurkasyon) noktasına kadarki kısmı trakeyayı meydana getirmektedir (Şekil 1.1-E).

Her bir tomurcuk genişleyerek bronkus prensipalisleri (primer ve sekonder bronŐlar) oluŐturur. Bu bronŐlar dorsal ve ventral eksen hizasında kaudal olarak uzarlar. Daha sonra, hilusdan akciğer loblarına giren bu ilk bronŐlar sürekli dallanırlar. Bu dallanmalarla oluşan bronŐlar, bronkus lobaris ya da tersiyer bronŐlar olarak adlandırılır. Tersiyer bronŐlar ise akciğer dokusunun içerisinde bir dizi dallanma geçirerek bronŐcuk (bronŐiyol, bronkulus ya da bronkiyolus) adı verilen küçük tüpleri oluştururlar. BronŐcukların ilk bölümü bronkiyolus verus (terminal), son bölümü ise bronkiyolus respiratoryus (alveolaris) olarak ifade edilir. BronŐcukların son bölümünü oluşturan alveolarislerin u kısımları, birkaç kola ayrılarak duktus alveolarislere (alveol kanalları) açılırlar. Duktus alveolarisler de, alveollerin gruplar halinde bir araya gelerek oluŐturacaĐı sakkulus alveolarislere (alveol keseleri) bağlanırlar (Şekil 1.2, McGeady 2006).



Şekil 1.2. Trakeya, bronkus ve bronkiyolusların dallanma morfogenezinin şematik görünümü

1.6. Farelerde Solunum Yolu Epitel Hücreleri ve İşlevleri

Karmaşık bir üç boyutlu yapıya sahip olan fare akciğer dokusunun hücresel kompozisyonu proksimodistal eksen boyunca farklılık göstermektedir (Rawlins ve ark 2009). Erişkin solunum sistemi, proksimal ve distal solunum yolu boyunca çeşitli dağılımlarda bulunan ve farklı akciğer işlevlerini yerine getirmek için özelleşmiş epitel hücreleri ile sıralanmıştır (Warburton ve ark 2000). Postnatal büyümeyi takiben, epitelial dönüşüm hızı yavaşlayarak, akciğer kararlı durum (steady state) halini alır. Ancak, solunum yollarının bütün bölgeleri bir hasar söz konusu olduğunda, tamir edilebilmektedirler (Rawlins ve ark 2009).

Solunum epitelinde birbirinden farklı yapılara sahip ve farklı görevleri yerine getirmek üzere sekiz tip hücre yer almaktadır. Bu hücreler silli, sekretör ve bazal hücreler olarak üç grupta toplanmıştır (Knight ve Hogate 2003). Tüm hücre nüfusunun neredeyse %50'sinden fazlasını oluşturan prizmatik silli hücreler trakeyada yoğun olarak bulunmaktadır. Solunum yollarının maruz kaldığı kirleticilerden arındırılmasını, düzenli olarak yaptıkları mukosilyer hareketlerle sağlamaktadırlar. Bazal ya da sekretör

hücrelerden farklılaşarak meydana gelen silli hücreler en iyi biçimde farklılaşmış hücre grubu olarak nitelendirilmektedirler (Knight ve Hogate, 2003, Puchelle ve ark, 2006). Silli hücreler, Forkhead transkripsiyon faktörünü (FoxJ1) eksprese ederler ve FoxJ1'in silli hücrelerin farklılaşmasından sorumlu olduğu düşünülmektedir (Chen ve ark 1998, Brody ve ark 2000).

Farelerde patojen bir durum söz konusu olmadığı müddetçe, goblet hücreleri nadir olarak bulunmaktadır (Rock ve Hoogan 2011). Yapılan bir çalışmada, bir transkripsiyon faktörü olan *Spdef* (ETS domain transcription factor)'nin Clara hücrelerinde çok fazla eksprese edilmesi sonucunda, Clara hücrelerinin mukus salgılayan goblet hücrelerine dönüştükleri gösterilmiştir (Chen ve ark 2009). Çeşitli inflamatuvar hastalıklarda sayılarında bariz olarak gözlenen artışla mukus hücre hiperplazisi ve mukus metaplazisine sebep olmaktadır (Lumsden ve ark 1984).

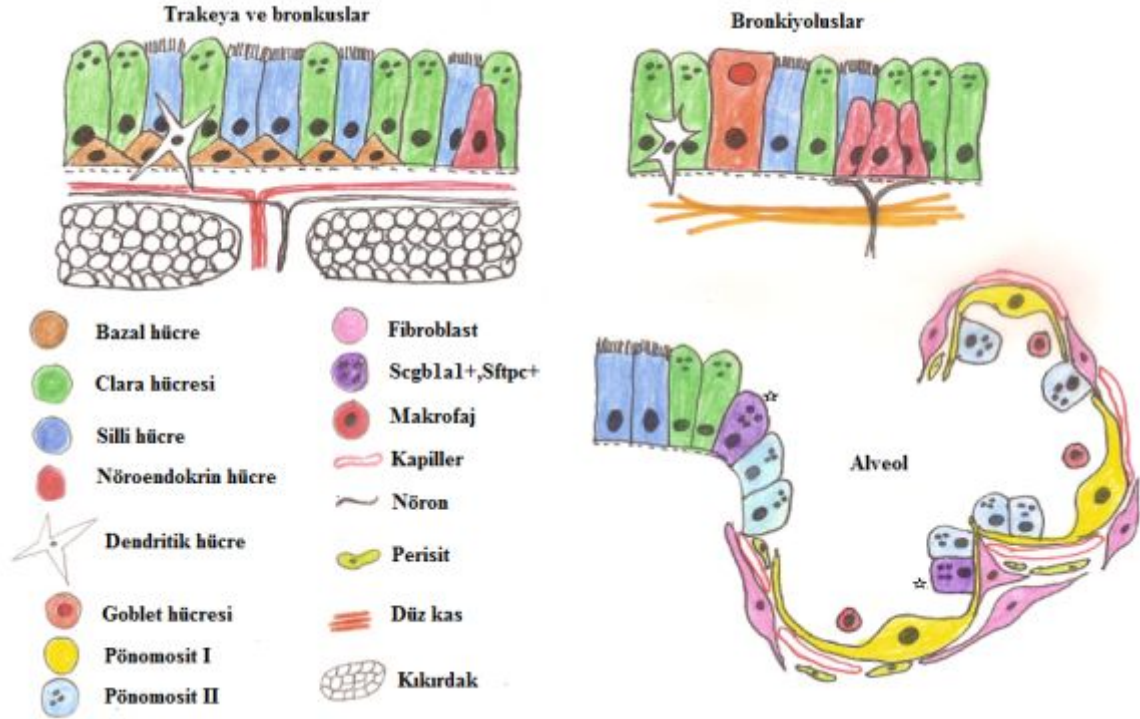
Sekretörük karaktere sahip Clara hücreleri ise, Scgb1a1 (secretoglobün 1a1) gibi sekretoglobünlerin başlıca kaynağı olmaktadır. Scgb1a1 ekspresyonu yapan hücreler kendilerini yenileme özellikleri nedeniyle ve silli hücreleri üretebilme yeteneklerinden dolayı kök hücresi olarak değerlendirilmektedirler (Rawlins ve ark 2009b). Gerektiğinde silli hücrelere ve mukus salgılayan hücrelere farklılaşabilmektedirler (Evans ve Plopper 1988; Hong ve ark 2004a; Rock ve ark 2009). Bronşiyollerde sürfaktan, lökosit proteaz inhibitör ve p450 monooksijenaz gibi maddeleri salgılayarak inflamasyonların azalmasına yardımcı olurlar (Hong ve ark 2004a).

Epitel ve bağ doku arasına yerleşerek, bazal membrana oturmuş olan bazal hücreler, solunum yollarında trakeyadan başlayarak bronşiyollere kadar bulunmaktadır. Bazal hücreler yoğun oranda dezmozomal ve hemidezmozomal bağlar içermektedirler (Evans ve ark 2001) ve bu sayede bazal membran ile sıkı bir bağ kurmaktadır. Bazal hücreler, bir hasar durumunda kendilerini yenileyebilmektedirler (Rock ve ark 2009). Bazal hücreler, kendilerini yenileme yeteneğine sahip oldukları gibi, silli ve salgı hücrelerine farklılaşabilmelerinden dolayı multipotent kök hücreleri olarak değerlendirilmektedirler (Hong ve ark 2004b).

Diğer bir hücre tipi de, pulmoner nöroendokrin hücrelerdir. Bu hücreler üst solunum yollarından başlayarak, bronkiyoalveolar bağlantılara kadar dağınık bir biçimde yerleşmektedirler (Van Lommel ve ark 2001). Akciğer ve trakeya gelişimi için fetal

dönemde önemli roller üstlenen nöroendokrin hücreler, herhangi bir hasardan dolayı bazal hücrelerin zarar görmesi durumunda, kök hücre görevi yapmaktadırlar (Knight ve Hogate, 2003).

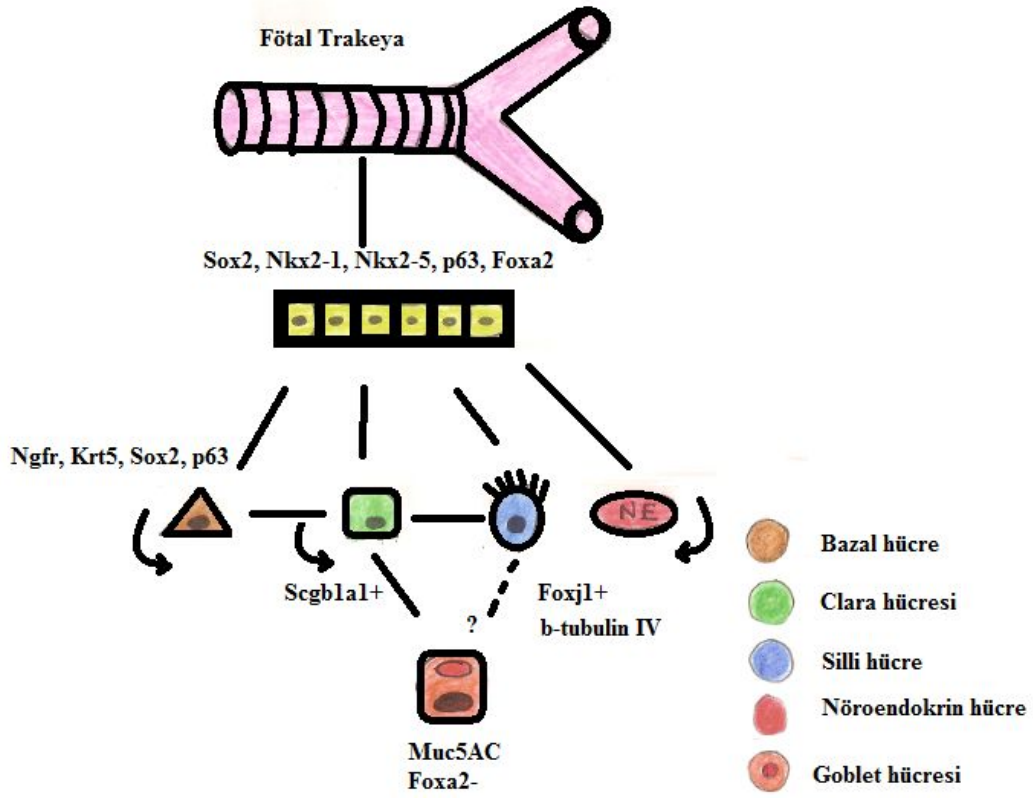
Fare solunum sisteminde trakeyadan alveollere kadar uzanan yalancı çok katlı epitel alveollerde yerini tek katlı kübik epitele bırakmaktadır (Boers ve ark1998, Knight ve Hogate 2003, Puchelle ve ark 2006, Rock ve ark 2010). Alveoller, iyice yassılaştırılmış yapıdaki Pönomosit I ve piramit ya da küre şekilli Pönomosit II hücrelerini barındırmaktadırlar. Pönomosit I hücreleri gaz değişimini kolaylaştıran pulmoner endotelial hücrelerle sıkı bir bağlantı oluştururken, Pönomosit II hücreleri Sftp (sümfaktant protein) A ve C'yi salgırlar (Costa ve ark 2001). Bronşioalveolar kanal bağlantılarında ve alveollerde birkaç hücre aynı anda hem Sftp C'yi hem de sekretoglobin1a1 (Scgb1a1)'i exprese etmektedirler (Şekil 1.3,*'lı hücreler). Ayrıca gerektiğinde kök hücre olarak görev yaparak Pönomosit I hücrelere farklılaşabilmektedirler (Berthiaume ve ark 2006). Alveol epitel hücreleri fibroblastlar, miyofibroblastlar, lipositler, mezotel, endotel hücreleri ve perisitler gibi mezenşimal hücrelerle yakından ilişkilidirler (Srianni ve ark 2003, Kapanci ve ark 1992, Burns ve ark 2003, Morimoto ve ark 2010, Morrisey ve Hogan 2010). Böylece epitelin altında yerleşen monosit ve dendritik hücre gibi inflamatuvar hücreler, doku makrofajları, polimorfonükleer lökositler, fibroblastlar ve düz kas hücreleri epitel mikroçevresinin oluşmasında katkıda bulunurlar (Knight ve Hogate 2003, Srianni ve ark 2003, Rock ve Hogan 2011).



Şekil 1.3. Fare solunum sisteminde hücre tipleri ve ilişkili yapılar (Rock ve Hogan 2011'den adapte edilmiştir)

1.7. Trakeya'da Hücre Farklılaşması ve Bazal Hücrelerin Gelişimi

Fötal traqueya dokusunda bütün projenitör hücreler Sox2, p63, Nkx2-1, Nkx2-5 ve Foxa2 transkripsiyon faktörlerini eksprese etmektedirler (Şekil 1.4). Bu projenitör hücreler bazal hücrelere, Scgb1a1+ (sekretoglobün1a1 pozitif) sekretör hücrelere, silli hücrelere ve nöroendokrin hücrelere dönüşebilmektedirler (Morrisey ve Hogan 2009). Bazal hücreler uzun vadede kendini yenileyebilen projenitör hücreler olarak fonksiyon görmektedirler (Hong ve ark 2004b). Scgb1a1+ hücreler de bölünebilmekte ve silli hücreleri oluşturabilmektedirler (Rawlins ve ark 2009b). Notch sinyal yolağı bu farklılaşmayı kontrol altında tutmaktadır (Tsao ve ark 2009). Bazal hücreler aynı zamanda, sekretör hücreleri ve silli hücreleri de oluşturabilme yeteneğine sahiptirler (Hong ve ark 2004b).



Şekil 1.4. Trakeyada hücre farklılaşması (Morrisey ve Hogan 2009'dan adapte edilmiştir)

Yetişkin bir farenin trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı diğer epitel hücrelerinin toplam sayısının yaklaşık % 30'u kadardır (Rock ve ark 2009). Yoğun bir biçimde dezmozomal ve hemidezmozomal bağlar içeren (Evans ve ark 2001) bazal hücreler, silli hücreler ve sekretör hücreler ile kıyaslandıklarında, daha az oranda farklılaşabilmektedirler. Bazal hücreler, karakteristik özellikleri olan transkripsiyon faktör transformasyon-ilişkili protein 63 (Trp63) ile sitokeratin 5 ve 14 (Krt5 ve Krt14)'ü eksprese etmektedirler (Rock ve ark 2009).

Trakeya dokusunda bir hasar meydana geldiğinde bazal hücreler öncelikli olarak kök hücre görevi alarak kendilerini yenilemektedirler (Hong ve ark 2004b). Daha sonra gerektiğinde goblet hücrelerine ve/veya silli epitel hücrelerine farklılaşabilmektedirler (Evans ve Plopper 1988, Knight ve Hogate 2003). Bir bazal hücrenin sekretör karaktere sahip bir hücreye dönüşebilmesi için çeşitli sinyaller gereklidir. Bu sinyaller komşu epitel hücrenden salınan Wnt, epitel growth factor (EGF), transforming growth factor- beta (TGF- β) ve SAM pointed domain ETS factor (SPDEF) gibi parakrin sinyallerdir (Evans ve Plopper 1988, Rock ve ark 2009).

Trp63 bazal hücre popülasyonlarında yüksek düzeylerde ifade edilmektedir (Rock ve ark 2009, Crum ve Mckeon 2010). Trp63+ hücreler en erken 10,5. embriyonik günde trakeyada gözlenmektedirler. Bu hücreler Trp63 varyantları ekprese etmektedirler (Que ve ark 2007). Yapılan bir çalışmada Trp63+ prizmatik epitel hücrelerinden bazal hücrelerin farklılaştığı gözlemlenmiştir (Rock ve Hogan 2011). Trp63 allelinden yoksun homozigot fareler bazal hücreleri postnatal olarak üretememektedirler. Ancak bazal hücre popülasyonunun farklılaşmasını ve olgunlaşmasını etkileyen diğer genler hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Daniely ve ark 2004).

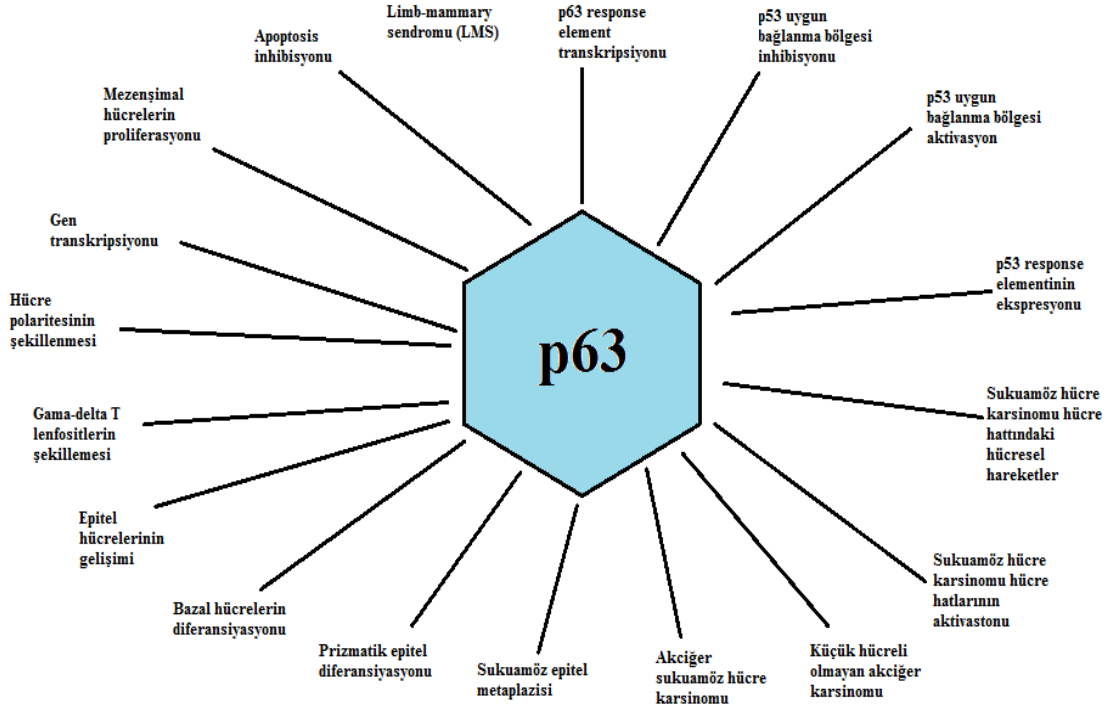
Bazal hücrelerin, yalancı çok katlı solunum yollarının uzun ömürlü kök hücreleri olarak işlev gösterdikleri düşünülmektedir (Randell 2006, Rawlins ve Hogan 2006, Rock ve ark 2010). Stabil koşullarda (steady state), işaretli DNA öncülleri ile yapılan deneylerde ve nitrojen dioksit (NO₂) solunumuna bağlı oluşan hasara cevapta bazal hücrelerin arttığı gösterilmiştir. Trakeyadan flow sitometri ile saflaştırılan bazal hücreler *in vitro* olarak bazal olmayan hücrelere göre daha yüksek oranda koloni şekillendirme potansiyeline sahiptirler (Schoch ve ark 2004). Ayrıca rodent ve insandan saflaştırılan bazal hücreler *in vitro* kültüre edildiklerinde kendilerini yenileyebilme yeteneğinde oldukları gibi, silli ve sekretör hücrelere dönüşerek farklılaşabildikleri gösterilmiştir (Hackett ve ark 2008, Rock ve ark 2009). Rock ve ark (2010)'nın bir çalışmasında insan ve fare bazal hücreleri için ortak olarak kullanılan belirteçler Çizelge1.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. İnsan ve fare bazal hücreleri için seçilmiş belirteçler (Rock ve ark 2010)

Gen Sembolü (Protein)	Farelerde ekspresyonu için referanslar	İnsanlarda ekspresyonu için referanslar
<i>Trp63</i>	Rock ve ark 2009	Araya ve ark 2007
<i>Snai2</i>	Parent ve ark 2004;Rock ve ark 2009	J.R.R. ve B.L.M.H., (yayınlanmamış veri)
<i>Ngfr</i>	Rock ve ark 2009	Rock ve ark 2009
<i>Egfr</i>	Rock ve ark 2009	Voynow ve ark 2005
<i>Pdpr</i>	Farr ve ark 1992;Rawlins ve ark 2009	Human Protein Atlas ^a
<i>Krt 5</i>	Schoch ve ark 2004;Rock ve ark 2009	Human Protein Atlas ^a
<i>Krt 14</i>	Hong ve ark 2004	Nakajima ve ark 1998
<i>Aqp</i>	Rock ve ark 2009	Avril-Delplanque ve ark 2005
<i>Cdh3</i> (P- cadherin)	Rock ve ark 2009	Human Protein Atlas ^a
<i>Itgb6</i> (integrin 6)	Rock ve ark 2009	Araya ve ark 2007

Bazal hücreler, trakeyanın farinkse daha yakın bölgelerinde genellikle tek sıra halinde bulunurlarken, distale doğru ya kümeler halinde ya da bireysel hücreler olarak yerleşmişlerdir. Komşu hücreler ile dezmozomlar aracılığı ile sıkı bir bağlantı kurarlar. Bazal laminaya ise hemidezmozomlar ve diğer adezyon molekülleri ile otururlar (Rock ve ark 2010). Çok yüksek düzeylerde ifade edilen ve bazal hücrelerin karakteristik özelliği

olan TRP63, doğumdan sonra bazal hücrelerin gelişimlerini tamamlamaları için şarttır. Daniely ve ark (2004) yaptıkları bir çalışmada *Trp63* geninden yoksun farelerin trakeya epitelinde bazal hücrelerin yer almadığını göstermişlerdir. p63'ün bazı biyolojik fonksiyonları Şekil 1.5'te özetlenmiştir.



Şekil 1.5. P63 ile ilişkili biyolojik fonksiyonların listesi (Li ve ark 2011)

Sunulan tez çalışmasının amacı, atmosferik oksijen konsantrasyonunda gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültürünün fötal trakeya dokusunun genel histolojik yapısı ve trakeya dokusunda kök hücre olarak görev yapan bazal hücrelerin sayısı üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını test edilmesidir. Sunulan çalışma “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fötal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerine etkisi” isimli ve VTF14028 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Rektörlüğü, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Komisyonu tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Bu çalışma, 2013-2014 bahar döneminde Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışma için gerekli olan F1 hibrid fareler (C57BL/6 X BALBc), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 23.07.2013 tarihinde alınan 64583101/2013/047 sayılı kararı ile Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden sağlanmıştır. Hayvanların bakımı ve beslenmesi aynı ünite de gerçekleştirilmiştir. Fareler tüm çalışma süresince, 14 saat aydınlık; 10 saat karanlık ışık siklusunda, 22 ±2 °C çevre sıcaklığı ve %50-70 oranında neme sahip odalarda barındırılmıştır. Yem ve su *ad libitum* olarak verilmiştir. Kontrol grubunu oluşturacak olan fütusları elde etmek amacıyla kullanılan 8-12 haftalık dişi farelere herhangi bir gonadotropin uygulaması yapılmamıştır. Her bir dişi fare, aynı yaştaki damızlık erkek bir fareyle bireysel kafeslere alınmıştır. Çiftleşmenin gerçekleşip gerçekleşmediği ertesi sabah dişi farelerin vajinalarında tıkaç (vajinal plug) olup olmadığına göre değerlendirilmiştir. Deney grubu örneklerini oluşturan fütusları elde etmek amacıyla 8-12 haftalık dişi farelere gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG) ve insan koryonik gonadotropini (hCG) uygulanmıştır. Süperovulasyon oluşturmak amacıyla dişi farelere 5 İ.Ü. gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG) *intra peritoneal* olarak uygulanmıştır. Ovulasyon indüksiyonu, PMSG uygulamasını takip eden 48. saatte *intra peritoneal* yolla 5 İ.Ü. insan koryonik gonadotropin (hCG) uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. hCG uygulanan her bir dişi fare, damızlık erkek bir fareyle bireysel kafeslere alınmıştır. Çiftleşmenin gerçekleşip gerçekleşmediği ertesi sabah dişi farelerin vajinalarında tıkaç (vajinal plug) olup olmadığına göre değerlendirilmiştir. Süperovulasyon uygulanan ve vajinal plug tespit edilen dişi fareler, embriyo izolasyonunda kullanılmıştır.

2.2. Vazektomize Erkeklerin Hazırlanması

Cinsel olgunluğa erişmiş olan erkek F1 fareler, genel anestezi (ketamin/xylazin) altına alınarak, vazektomi operasyonu standart yöntemlere göre (Nagy ve ark 2003)

gerçekleştirilmiştir. Operasyondan sonra, 2-3 haftalık bir iyileşme dönemini takiben bu erkek farelerin steril olup olmadıkları test edilmiştir. Bunun için, vazektomize erkekler tek bireyler halinde kafeslere alınarak süperovulasyon/ovulasyon indüksiyonu uygulanmış olan dişilerle çiftleştirilmişlerdir. Çiftleştirmeyi takip eden gün içerisinde vajinal plug oluşumunu kontrol edilmiştir. Vajinal plug görülen dişi fareler çiftleşmeyi takip eden ikinci günde, servikal dislokasyonla ötenazi edilerek dişilerin oviduktu yıkanmıştır. Yıkama sonrası, döllenmemiş oositler görülmüştür. Yalancı gebe dişilerin elde edilmesinde, sadece sterilitesi kanıtlanmış olan erkekler kullanılmıştır.

2.3. Yalancı Gebe Dişilerin Hazırlanması

Yalancı gebe dişileri elde etmek için, 8-12 haftalık F1 dişi fareler vazektomize erkeklerle çiftleştirilmiştir. Çiftleştirmeyi takiben vajinal tıkaç görüldüğü gün, gebeliğin 1. günü olarak kabul edilmiştir. Deney grubu örneklerini oluşturmak amacıyla, embriyolar uterusu çiftleşmeyi takip eden 4. günde (-1 asenkroni) transfer edilmiştir.

2.4. Embriyoların Toplanması

Deney grubu örneklerini oluşturmak için zigot aşamasına gelmiş embriyolar, oviduktun ampulla kısmından toplanmıştır. Bu amaçla çiftleştirmeyi takiben vajinal plug tespit edilen dişiler, hCG enjeksiyonundan 22 saat sonra servikal dislokasyonla ötanazi edilmişlerdir. Karın boşluğu açılmış ve oviduktun genişleyerek daha belirgin hale gelmiş olan ampulla kısmı ince bir makasla kesilmiştir. Kesilen ampullalar içerisinde %10LGPS-QA-Hepes oosit/embriyo toplama vasatı (QA-Hepes/LGPS) bulunan 35 mm çapında bir petri kabına (BD 353801) toplanmıştır. Hemen ardından yine içinde 0,5 ml QA-Hepes/LGPS bulunan tek gözlü başka bir petri kabına (BD 353653) alınan ampullalar steril pensetler yardımı ile patlatılmış ve kümülüs hücreleri ile sarılı embriyoların vasat içerisine geçmeleri sağlanmıştır. Embriyoları kümülüs hücrelerinden ayırmak amacıyla, oviduktun izolasyonundan embriyoların ayrılmasına kadar gerçekleşen tüm işlemler 37 °C'ye ayarlı bir ısıtma tablası ve yine 37 °C'ye ayarlı bir ısıtma tablası ile donatılmış bir steryomikroskop kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.5. *In Vitro* Embriyo Kültürü İçin Mikrodropların Hazırlanması

Embriyo kültürü, doku kültür uyumlu petri kaplarında (BD353801) hazırlanan 20 µl'lik mikrodroplarda (damlalar) karbondioksitli (%5 CO₂) bir etüvde gerçekleştirilmiştir.

Embriyo kültürü için QA vasatları (Cooper Surgical) hazırlanmıştır. Embriyolar ilk 46 saat QA-Cleavage vasatı içerisinde, sonraki 49 saatte ise blastosist gelişimi için optimize edilmiş olan QA-blastocyst vasatı kullanılarak büyütülmüşlerdir. Embriyoların protein ihtiyacını karşılamak amacıyla, kullanılan vasatlara %10 oranında LGPS (LifeGlobal® Protein Supplementi, LifeGlobal) eklenmiştir. Mikrodropların üzeri embriyolarda toksisitesi daha önceden test edilmiş olan parafin yağ (Quinn's advantage, QA, Cooper Surgical) kullanılarak kapatılmıştır. Tüm bu işlemler laminar kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan petri kapları, bir gece boyunca %5 CO₂'li etüvde tutulmuştur. Böylece vasatların uygun pH/sıcaklık değerlerine ulaşması sağlanmıştır.

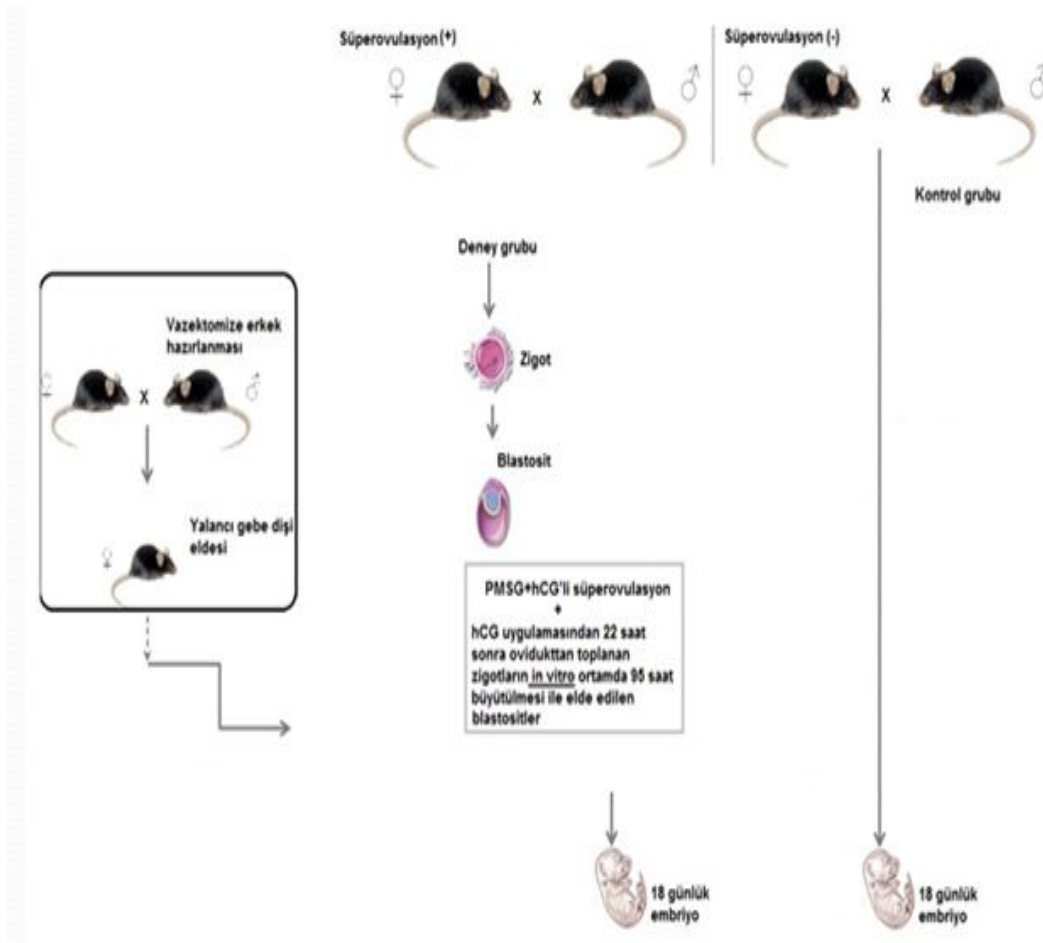
2.6. In Vitro Embriyo Kültürü

Yukarıda da bahsedildiği gibi, ampullalardan kümulus hücreleri ile sarılı zigotların QA-Hepes/LGPS vasatı içerisine toplanmasının ardından, kümülüs hücrelerini ve zigotu ayırmak için, zigotlar hyaluronidase (0,5 mg/ml, Sigma H4272) içeren vasat içerisinde yaklaşık olarak 1 dakika bekletilmişlerdir. Kümülüs hücrelerinden ayrılan zigotlar, bir ağız pipetine bağlanan ve dış çapı 80-100 µm olan pastör pipetler kullanılarak steryomikroskop altında toplanmıştır. Embriyo kültürü, literatürde bildirilen protokollere göre (Gardner ve Lane, 2004, Karagenç ve ark 2004a,b 2005) yapılmıştır. Bu şekilde kümulus hücrelerinden ayrılan ve toplanan zigotlar ilk olarak QA-Hepes/LGPS ile oluşturulan 50 µl'lik üç ayrı dropta, daha sonra ise QA-Cleavage/LGPS embriyo vasatı ile hazırlanmış 20 µl'lik mikrodoplar içerisinde yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından, embriyolar aynı vasat ile hazırlanan 20 µl'lik droplarda onarlı gruplar halinde (her bir dropta 10 embriyo olacak şekilde) %5 CO₂-%20 O₂'li etüvde 46 saat süreyle inkubasyona bırakılmışlardır. Embriyo kültürünün başlamasından 46 saat sonra (3. gün, saat 09:00), % 10 oranında LGPS içeren QA-Blastocyst vasatları ile hazırlanmış 20 µl'lik mikrodoplar içerisinde yıkanarak yine aynı vasatlar ile oluşturulan 20 µl'lik droplara onarlı gruplar halinde aktarılan embriyolar, %5 CO₂-%20 O₂'li etüvde 49 saat süreyle inkübe edilerek blastosist aşamasına kadar gelişmeleri sağlanmıştır.

2.7. Yalancı Gebe Dişilere Embriyo Transferi

Deney grubunda, embriyoların fütal gelişimlerini takip edebilmek amacıyla, elde edilen blastosistler gebeliğin dördüncü gününde (bir günlük asenkroni) yalancı gebe dişilere transfer edilmişlerdir. Bunun için öncelikle yalancı gebe dişiler bireysel olarak

tartılmış ve ketamin/xylazin kombinasyonu kullanılarak anestezide alınmışlardır. Ketamin, 100-200 mg/kg; xylazin ise 5-16 mg/kg dozunda uygulanmıştır. Transfer işlemi, Nagy ve ark (2003) ve Karagenç ve ark (2004a) tarafından belirtildiği şekilde steryomikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Transfer işleminin ardından, deri 1-2 dikişle kapatılarak fare yananana kadar ılık bir pad üzerinde tutulmuştur. İki *kornu uteri*'ye sahip olan farelerde, her bir *kornu uteri*'ye 5 adet blastosist transfer edilmiştir. Bu şekilde, her bir yalancı gebe fareye toplam 10 adet embriyo transfer edilmiştir. Tüm çalışma süresince, üç (3) adet yalancı gebe fareye toplam 30 adet blastosist transfer edilmiştir. Tüm deney düzeneği Şekil 2.1'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Kontrol ve Deney gruplarını oluşturmak amacıyla gebeliğin 18. Gününde (18.5 d.p.c.) izole edilen fötusların elde edilmişlerini özetleyen genel deney dizaynı. Kontrol grubunu oluşturan fötusların eldesinde kullanılan dişi farelere herhangi bir gonodotropin uygulaması yapılmamıştır. Deney grubu fötuslarını elde etmek amacıyla embriyo transfer işleminde kullanılan, vazektomize erkeklerle çiftleştirilmiş yalancı gebe dişiler önceden hazırlanmıştır. Deney grubunu oluşturan fötusların eldesinde kullanılan dişi farelere PMSG

ve hCG uygulaması yapılmıştır. Embriyo transferini takiben gebeliğin 18. gününde (18.5 d.p.c.) fötuslar izole edilmiştir.

2. 8. Dokuların Alınması

Gebeliğin 18. gününde (18.5 d.p.c.) elde edilen fötuslardan izole edilen trakeya doku örnekleri, soğuk ışık kaynağına sahip bir steryomikroskop altında, steril PBS (pH 7.4) içeren, steril petri kapları içerisinde alınmıştır (Şekil 2.1). Gebeliğin 18. gününde (18.5 d.p.c.) fötuslardan izole edilen trakeya dokuları, PBS içerisinde hazırlanan % 4'lük paraformaldehyde (pH 7.4) içerisinde +4 C°'de, 2 saat süreyle tespit edilmişlerdir.

2.9. Doku Takibi ve Dokuların Bloklanması

Doku takibi, Rawlins ve ark (2009a,b)'a göre gerçekleştirilmiş olup, dokular paraplast içerisinde bloklanmıştır. Paraplast içerisinde gerçekleştirilen bloklama işlemleri, standart doku takip prosedürlerine göre gerçekleştirilmiştir. Alınan doku örnekleri, PBS içerisinde iki üç kez çalkalanarak, 4 x 15 dakika süreyle PBS (Phosphate buffer saline) içerisinde ve +4 C°'de yıkama işlemine tabi tutulmuşlardır. Paraplast içerisinde bloklanan dokular metanol-PBT (phosphate buffer saline + tween 20) serilerinden geçirilmiştir. Metanol-PBT serileri ile (%25, %50 ve %75) 30'ar dakika süreyle inkübe edilen dokular, daha sonra % 100'lük metanol ile 3 x 45 dakika süreyle inkübe edilmiştir. Doku takibinden önce 65 C°'ye ayarlanan parafin etüvde, 1:1 oranında metanol:xilen karışımına 30 dakika süre ile maruz bırakıldılar. Hemen ardından 2 x 30 dakika süreyle xylenden geçirilen dokular, 1:1 oranında paraplast:xilen içerisinde 30 dakika süreyle inkübe edilmişlerdir. Paraplast/xilen inkübasyonundan sonra dokular 2 x 30 dakika süreyle paraplast içerisinde inkübe edilmişlerdir. Dokular daha sonra, bek alevinde plastik kasetlere, uygun pozisyonlarda bloklanmışlardır. Bloklanan dokular, donduktan sonra 4C°'de muhafaza edilmişlerdir.

2.10. Üçlü boyama, İmmünoflöresan ve İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemleri

Sunulan tez çalışmasında, üçlü boyama, immünoflöresan ve immünohistokimyasal boyama metotları, 100 µm aralıklarla alınan 5µm kalınlığında seri kesitler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde, her bir fötüs için toplam 12 adet kesit, bazal hücre sayıları, trakeya epitel kalınlıkları ve lümen yüzey alanlarını belirlemek amacıyla immünoflöresan ve immünohistokimyasal boyama yöntemleri ile boyanmıştır.

Sunulan çalışmada, paraplasta gömülü trakeya dokularının genel histolojik görünümünün incelenmesi amacıyla, Crossman'ın üçlü boyama metodu uygulanmıştır (Crossman 1937). Kesitler boyandıktan sonra entellan ile kapatılarak, histolojik incelemeler için muhafaza edilmişlerdir.

Sunulan tez çalışmasında, immünofloresan boyama tekniğini (Rawlins ve ark 2009a,b) uygulamak amacıyla, kesitler önce xylol ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edilmişlerdir. Yıkama işlemi 3 x 10 dakika süreyle TBS (Tris buffer saline) ile yapılmıştır. Spesifik olmayan bağlanmaları bloke etmek amacıyla (bloke etmeye yönelik olarak), dokulara 20 dakika süreyle, oda sıcaklığında keçi serumu uygulanmıştır. Bazal hücrelerin belirlenmesi amacıyla, primer antikor olarak anti-p63 (4A4, 1:100, mouse monoclonal, sc-25268) kullanılmıştır. Dokular +4 °C'de, bir gece primer antikor ile inkübe edilmişlerdir. Ertesi gün, primer antikor uzaklaştırılarak, dokular 3 x 10 dakika süreyle TBS ile yıkanmışlardır. Yıkamadan sonra, dokular Alexa-Fluor ile işaretli sekonder antikor (Alexa-Fluor -A21131- coupled secondary antibodies, İnvitrogen) ile 1 saat 37°C'de inkübe edilmişlerdir. Süre dolduğunda sekonder antikor uzaklaştırılarak, dokular yaklaşık 2 dakika süreyle, çekirdek boyası DAPI (Invitrogen) ile boyanmışlardır. TBS ile 3 x 10 dakika süreyle yıkama işlemini takiben, kesitler kaplama solüsyonu (İnvitrogen) ile kaplanmışlardır.

Sunulan çalışmada, immunofloresan boyama yöntemine alternatif olarak immünohistokimya yöntemi de uygulanmıştır. Kesitler önce xylol ve alkol serilerinden geçirilerek deparafinize edilmişlerdir. Distile suya alınan kesitler antijen *retrival* işlemi için SSB (Sodyum-sitrat buffer) ile 5 dakika süreyle kaynatılmışlardır. Kesitler 1 saat oda sıcaklığında soğutmaya bırakılmışlardır. Kesitler soğuyunca, 3 x 10 dakika süreyle TBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek amacıyla, kesitler yıkamadan sonra 5 dakika süreyle %3'lük H₂O₂ ile inkübe edilmişlerdir. Tekrar 3 x 10 dakika süreyle TBS ile yıkama işlemi yapılmıştır. Spesifik olmayan bağlanmaları bloke etmek amacıyla, dokulara 20 dakika süreyle oda sıcaklığında (25 °C) bloking serum uygulanmıştır. Daha sonra bazal hücrelerin belirlenmesi amacıyla, primer antikor olarak anti-p63 (4A4, 1:100, mouse monoclonal, sc-25268) kullanılmıştır. Dokular +4 °C'de bir gece primer antikor ile inkübe edilmişlerdir. Ertesi gün primer antikor uzaklaştırılarak, dokular 3 x 10 dakika süreyle TBS ile yıkanmışlardır. Yıkamadan sonra, kesitler biyotin işaretli sekonder antikor (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) ile 37°C'de 1 saat

süreyle inkübe edilmişlerdir. Kesitler, 3 x 10 dakika süreyle TBS ile yıkandıktan sonra HRP (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen) ile 37°C'de 1 saat süreyle inkübe edilmişlerdir. Antijeni eksprese eden immünpozitif hücrelerin varlığı 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; 3 mg/ml in Tris-HCl, pH 7.6 supplemented with 3% H₂O₂) solüsyonu ile belirlenmiştir. Çekirdek boyası olarak hematoksilin kullanılmıştır. Kesitler, etanol ve xylol serilerinden geçirilerek entellan ile kaplanmıştır.

2. 11. İstatistiksel Analizler

Nümerik değişkenlerde öncelikli olarak normal normal dağılıma uygunluk testi yapılmıştır. Normal dağılıma uygun olduğu saptanan verilere daha sonra iki grup karşılaştırması için daha sonra iki grup karşılaştırması için bağımsız t-testi uygulanmıştır. Bağımsız t-testi uygulanan Deney grubu ve Kontrol gruplarına ait örneklerde fötüs ağırlıkları, hücre sayıları, trakeya epitel kalınlıkları ve trakeya lümeni yüzey alanları karşılaştırılmıştır. İstatistiksel analizler, SPSS 20.0 paket programı ile gerçekleştirilmiştir. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilerek ve sonuçlar ortalama \pm Standart Sapma (SD) olarak verilmiştir. Değişkenler arasındaki ilişkinin ortaya konması amacıyla Pearson korelasyon testi uygulanmıştır.

3. BULGULAR

Sunulan çalışmada Deney grubunu oluşturmak amacıyla zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar atmosferik oksijen konsantrasyonunda *in vitro* embriyo kültürü gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, toplam 75 adet zigot kullanılmıştır. Deney grubunu oluşturmak üzere gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültür çalışmalarında elde edilen embriyo gelişim oranları Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Quinn’s Advantage vasat sistemleri kullanılarak elde edilen embriyo gelişim oranları.

Zigot sayısı	3. gün Kompakt	4. gün Ex. Bl.	4. gün Ht. bl. C	4. gün Top. Bl.	5. gün Ex. Bl. E	5. gün Ht. Bl. F	5. gün Top. Bl.
	A	B	C	D	E	F	G
75	63	32	36	68	24	61	85

A. 46 saat embriyo kültürü sonrasında kompakt/morula aşamasına gelen embriyoların yüzde oranı

B. 78 saat embriyo kültürü sonrasında expanded blastosist (Ex. Bl.) aşamasına gelen embriyoların oranı

C. 78 saat embriyo kültürü sonrasında hatching blastosist (Ht. Bl.) aşamasına gelen embriyoların oranı

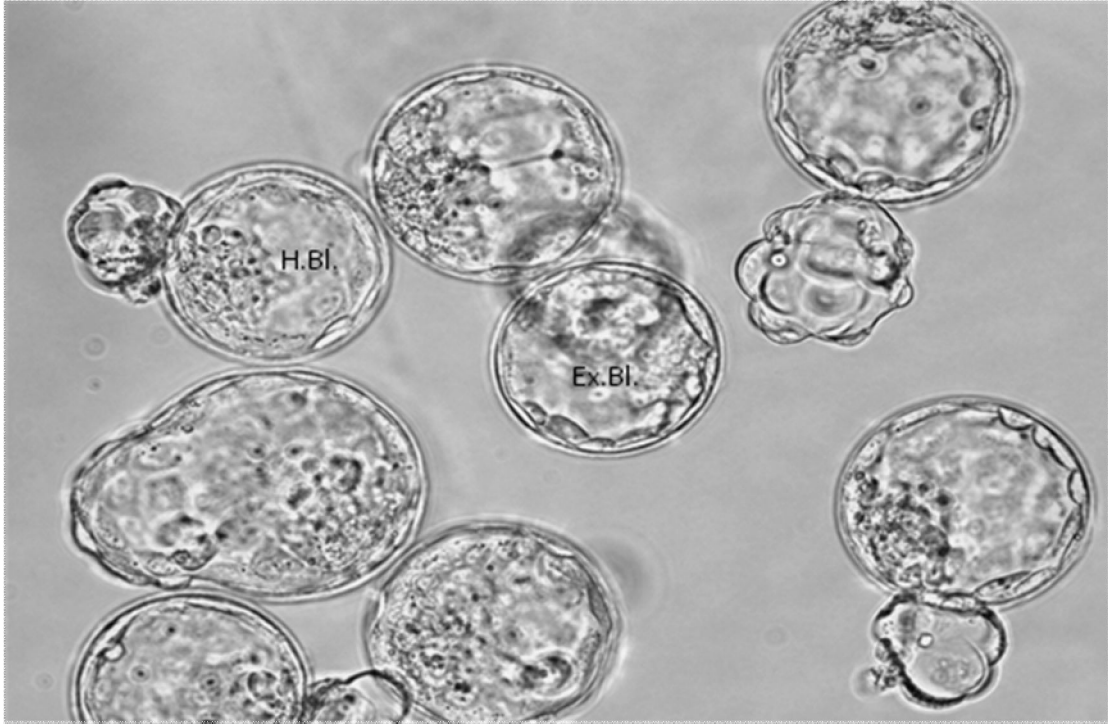
D. 78 saat embriyo kültürü sonrasında expanded ve hatching blastosist aşamalarına gelen embriyoların toplam oranı

E. 95 saat embriyo kültürü sonrasında expanded blastosist (Ex. Bl.) aşamasına gelen embriyoların oranı

F. 95 saat embriyo kültürü sonrasında hatching blastosist (Ht. Bl.) aşamasına gelen embriyoların oranı

G. 95 saat embriyo kültürü sonrasında expanded ve hatching blastosist aşamalarına gelen embriyoların toplam oranı

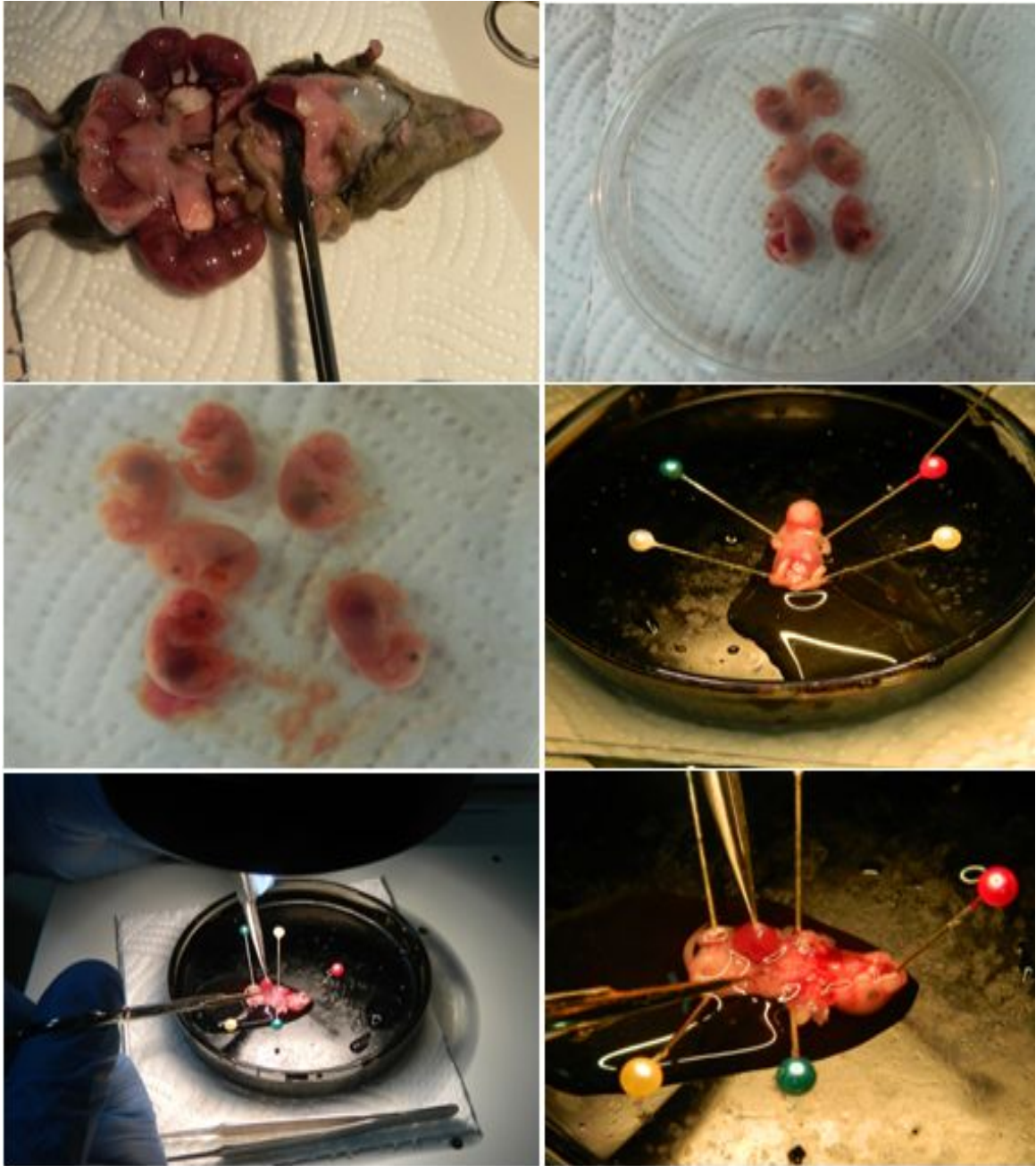
Deney grubunu oluşturmak üzere zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar atmosferik oksijen konsantrasyonunda gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültürü ile elde edilen ve blastosist aşamasında bulunan embriyolar (Şekil 3.1) üç adet yalancı gebe dişiye transfer edildi. Embriyo transferini takiben, gebe dişilerden birisi gebeliğin 18. gününde (18.5 d.p.c) ötenazi edilerek fetal gelişiminin değerlendirilmesinde kullanılmıştır. Yapılan inceleme sonrasında, implantasyon oranının %100 (10/10) olduğu belirlenmiştir. İmplant olan dört (4) adet fetusun (%40) canlılığını sürdürmediği ve rezorbe olduğu, altı (6) adet fetusun (%60) ise canlılığını devam ettirdiği belirlenmiştir. Canlılığı devam eden altı adet fetus (D1-6) izole edilerek Deney grubunun oluşturulmasında kullanılmıştır. Embriyo transferi yapılan iki adet yalancı gebe dişinin gebelik süreci doğum gerçekleşene dek takip edilmiştir. Bu iki fareden toplam dokuz (9) adet yavru elde edilmiş olup, yavruların erişkin döneme ulaşmaları beklenmektedir.



Şekil 3.1. Deney grubunu oluşturmak üzere zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar 95 saat süreyle gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültürü sonrasında embriyo gelişimi. Beşinci gün genişlemiş (expanded) blastosist (Ex. Bl.) ve hatching blastosist (H. Bl.) aşamasında bulunan embriyolar.

Sunulan tez çalışmasında, Kontrol grubunu oluşturmak amacıyla gonodotropin hormon uygulaması yapılmayan iki adet 8-12 haftalık dişi farenin aynı yaş grubundaki erkek fareler ile çiftleştirilmelerinden elde edilen 9 adet 18 günlük (18.5 d.p.c) fetus

Kontrol grubunun (K1-K9) oluşturulmasında kullanılmıştır. Bunlardan 1 adet fötüs (K1) tek bir fareden elde edilirken, geri kalan 8 adet fötüs (K2-8) diğer gebe fareden izole edilmiştir. K-1 kodlu fötüsa ait hücre sayıları ve histolojik analizler gerçekleştirilmiş olmasına karşın, söz konusu fötüsün normal bir gebelik sürecini takip etmemiş olabileceği düşünülmüş ve deney dışı bırakılmıştır. Ayrıca, K-3 örneğinden yeterli sayıda kesit alınamamasından dolayı; K9 kodlu fötüsa ait trakeya ve akciğer dokuları ise fotoğraf çekiminde kullanılması nedeniyle deney dışı bırakılmışlardır. Gebeliğin 18. gününde (18.5 d.p.c) fötüs ve trakeya izolasyon aşamaları Şekil 3.2’de sunulmuştur.



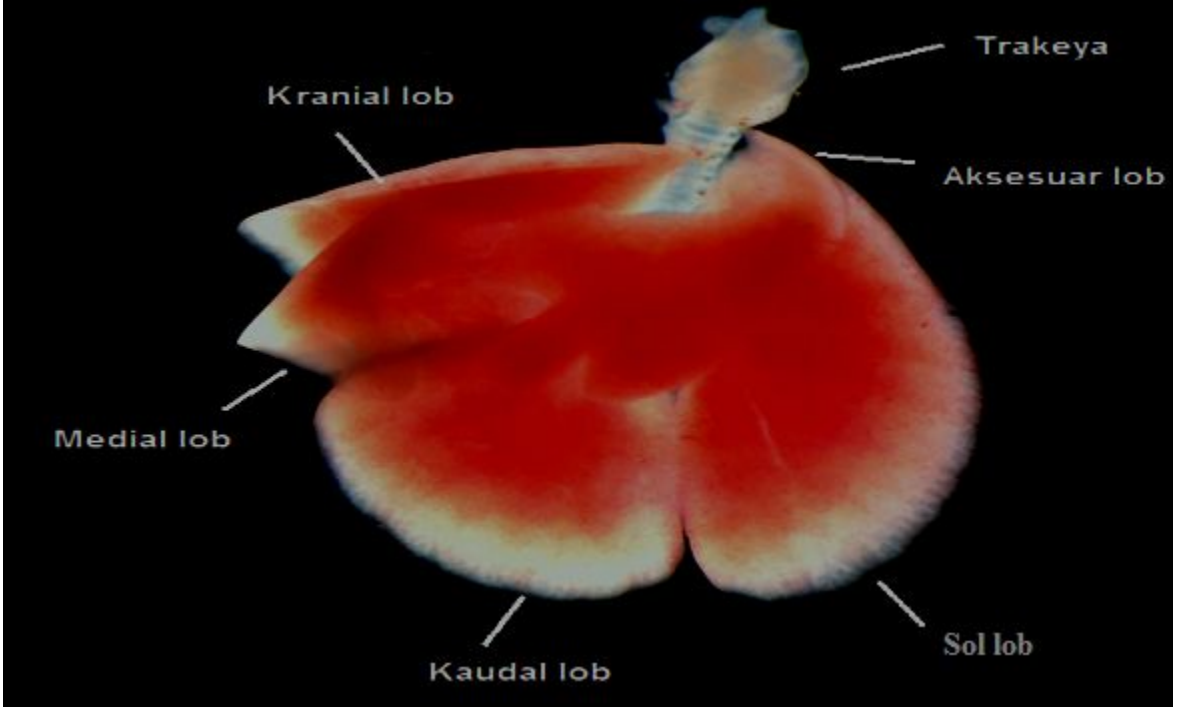
Şekil 3.2. Gebeliğin 18. Gününde (18.5 d.p.c.) fötüs ve trakeya dokularının izolasyonu.

Yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı, K1, K-3 ve K-9 numaralı fötüslara ait veriler istatistik analizlerde kullanılmamıştır. Her iki grupta izole edilen fötüslerin canlı ağırlıkları Çizelge 3.2’te verilmiştir.

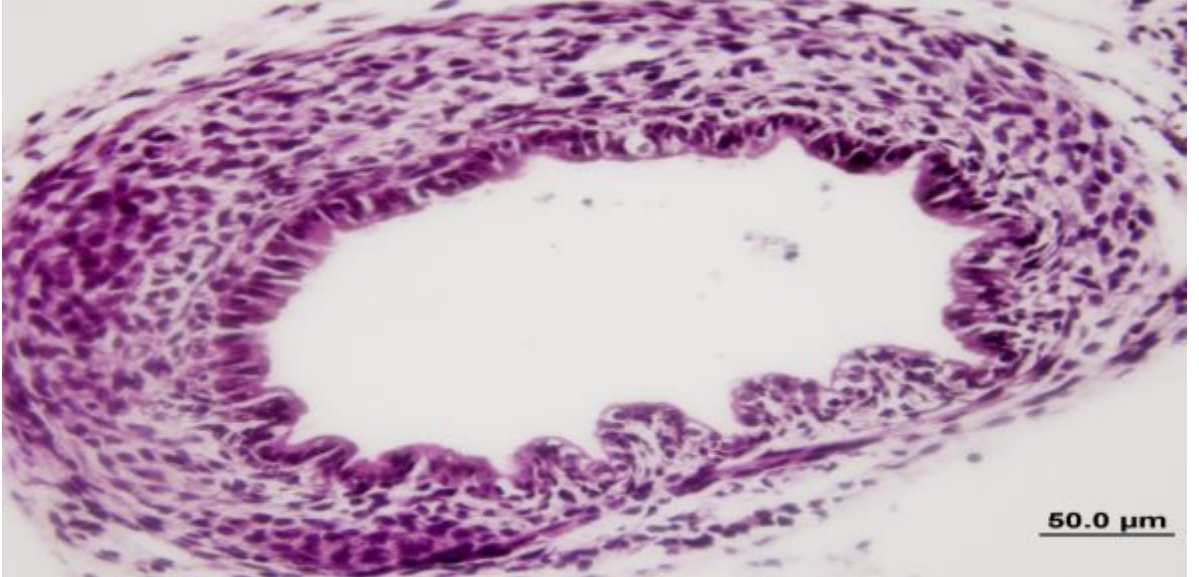
Çizelge 3.2. Kontrol ve Deney gruplarını oluşturmak üzere izole edilen fötüslerin canlı ağırlıkları.

Gruplar	Fötüs Kodu	Fötüs Ağırlıkları (g)
Kontrol Grubu	K1	0,5936
	K2	1,0106
	K3	1,0064
	K4	0,9998
	K5	0,9206
	K6	0,9694
	K7	0,9872
	K8	0,9006
	K9	1,0855
Deney grubu	D1	0,6257
	D2	0,6092
	D3	0,5095
	D4	0,5178
	D5	0,5812
	D6	0,5397

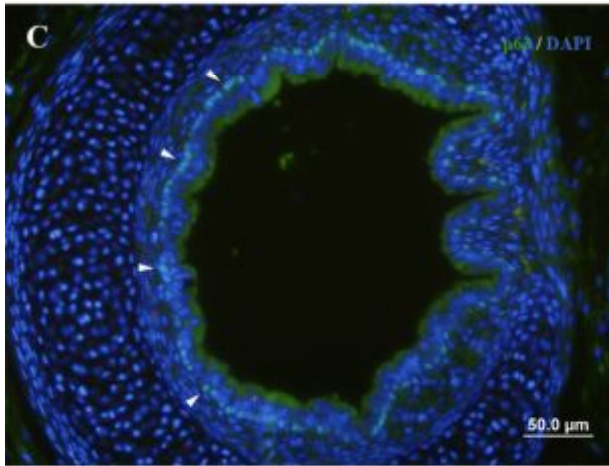
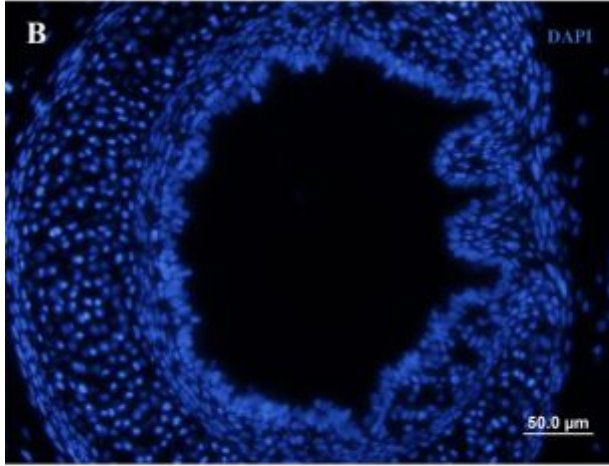
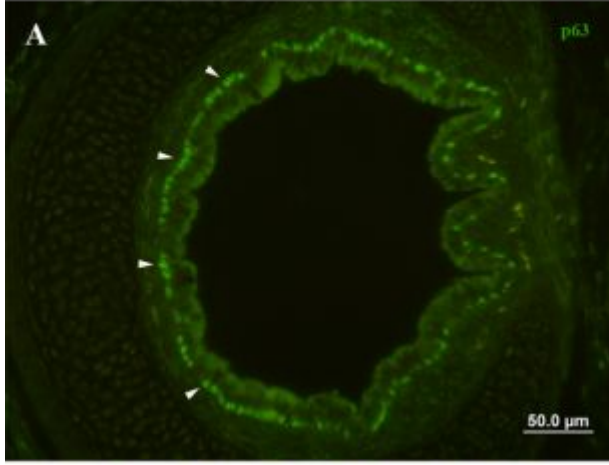
Kontrol grubunda gebeliğin 18. gününde (18.5 d.p.c.), steryomikroskop altında K9 fötüsünden izole edilen trakeya ve akciğer loplalarının genel görünümü Şekil 3.3’de sunulmuştur. Trakeya dokusunun genel histolojik yapısı Şekil 3.4’te gösterilmiştir. Trakeya dokusunda bazal hücrelerin belirlenmesinde gerek immunoflüoresan (Şekil 3.5), gerekse immunohistokimya boyama yöntemlerinden (Şekil 3.6) olumlu sonuç alınmıştır. İmmunohistokimya boyaması sonucunda, trakeya dokusunda bazal membran üzerine oturmuş halde bulunan immunopozitif hücreler tespit edilmiştir (Şekil 3.6). İmmunohistokimya yöntemi ile kıyaslandığında, immunflöresan boyama yönteminde fazla miktarda background boyama olduğu saptanmıştır. Bu nedenle, hücre sayımları ve tüm histolojik analizler immunohistokimya yöntemi uygulanan kesitler üzerinde gerçekleştirilmiştir.



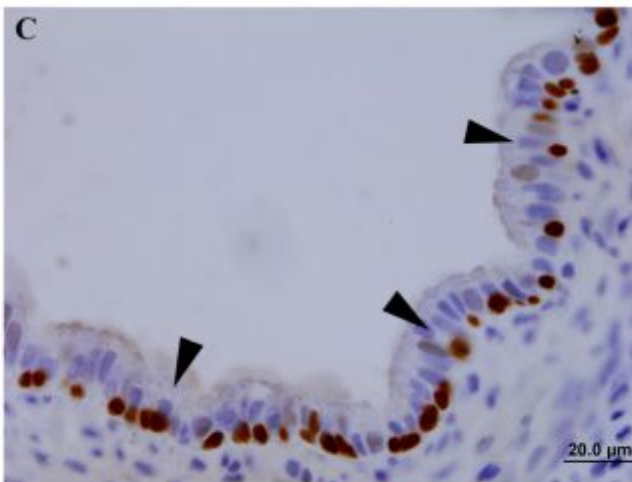
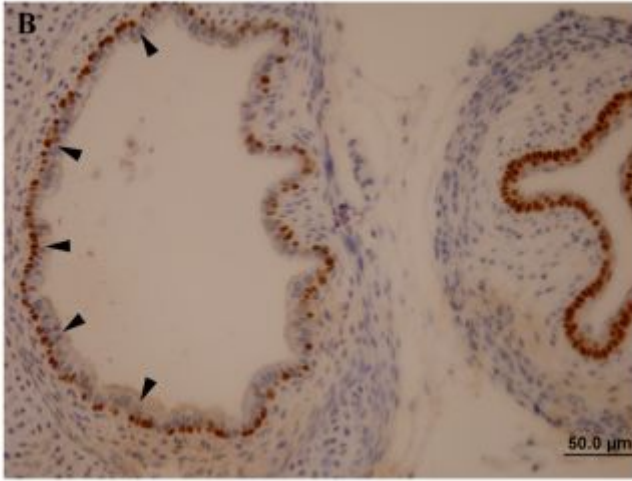
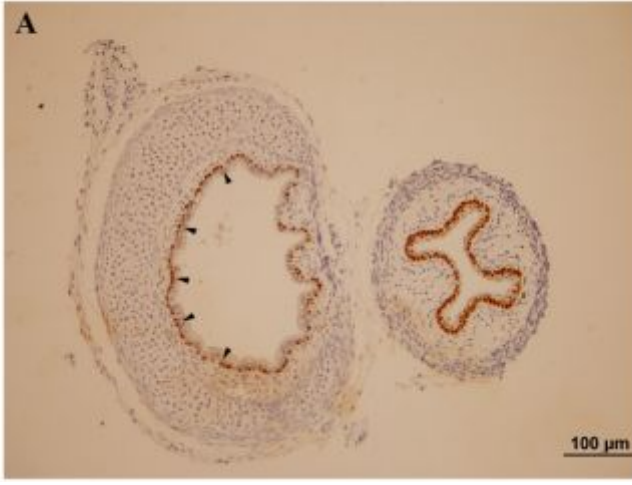
Şekil 3.3. Gebeliğin 18. Gününde (18.5 d.p.c) izole edilen K9 fötusunda trakeya ve akciğer loblarının genel görünümü (Orijinal). Farelerde akciğer lobları sağda dört ve solda tek lob olarak bulunmaktadır. Sağda kranial, medial, kaudal ve aksesuar loblar bulunurken, solda ise sadece bir lob bulunur.



Şekil 3.4. Fötal (18.5 d.p.c.) trakeya dokusunun genel histolojik görünümü. Kesitler üçlü boyama yöntemi ile standart prosedürlere göre gerçekleştirilmiştir. Bazal membran üzerine oturmuş olan epitel hücreleri ayırt edilmektedir.



Şekil 3.5. Fötal (18.5 d.p.c.) trakeya dokusunda imünofloresan boyama yöntemi ile bazal hücrelerin belirlenmesi. Kesitler, sadece bazal hücreler tarafından eksprese edilen p63 (Clone 4A4) monoklonal antikor ile boyanmıştır. İmmunpozitif hücrelerin belirlenmesi amacıyla Alexa Fluor 488 sekunder flöresan antikor kullanılmıştır. Çekirdek boyası DAPI ile gerçekleştirilmiştir. Bazal membran üzerine yerleşmiş immunpozitif hücreler (ok başları) yeşil renkte görülmektedir (A). DAPI ile gerçekleştirilen çekirdek boyasında tüm hücre çekirdekleri mavi renkte görülmektedir (B). C, A ve B’de verilen resimlerin çakıştırılması ile elde edilmiştir.



Şekil 3.6. Fötal (18.5 d.p.c.) trakeya dokusunda immünohistokimya boyama yöntemi ile bazal hücrelerin belirlenmesi. Kesitler, sadece bazal hücreler tarafından ekspres edilen p63 (Clone 4A4) monoklonal antikor ile boyanmıştır. Çekirdek boyası, hematoxilen ile gerçekleştirilmiştir. Bazal membran üzerine yerleşmiş immunopozitif hücreler (ok başları) kahverengi görülmektedir (A). Trakeya dokusunun yanı sıra özefagus dokusunda da benzer bir hücre popülasyonunun varlığı dikkat çekmektedir. B,C aynı kesitten farklı büyütmelemlerde alınan fotoğrafları göstermektedir.

Kontrol ve Deney gruplarına ait fötuslarda bazal hücre sayılarının belirlenmesinde, immunohistokimya yöntemi ile boyanan trakeya doku örnekleri kullanılmıştır. Yapılan sayımlar sonucunda, Deney grubuna ait trakeya dokularında ($169,5 \pm 3,92$), Kontrol grubu ($155,8 \pm 9,75$) ile kıyaslandığında daha fazla sayıda bazal hücre bulunduğu ($p=0.017$) belirlenmiştir.

Bazal hücre sayılarının belirlenmesini takiben aynı doku kesitlerinde epitel katmanının kalınlığı belirlenmiştir. Bu amaca yönelik olarak, trakeya dokusunda mukoza kıvrımının bulunduğu bölge baz alınarak (saat 3 hizasında), saat 6, 9 ve 12 yönlerinde üç farklı bölgede epitel kalınlıkları ölçülmüş ve elde edilen değerlerin ortalaması alınarak, her bir örnek için ortalama trakeya epitel kalınlığı belirlenmiştir. Yapılan incelemelerde, Kontrol grubu ($18,1 \pm 2,11$) ve Deney grubu ($18,2 \pm 1,44$) arasında epitel kalınlığı (μm) açısından önemli bir fark olmadığı ($p=0.896$) belirlenmiştir.

Hücre sayımı ve epitel kalınlıklarının belirlenmesinde kullanılan kesitler aynı zamanda lümen yüzey alanlarının belirlenmesinde de kullanılmıştır. Yapılan incelemeler, Kontrol grubuna ait fötuslarda (39.601 ± 5.844), Deney grubuna ait fötuslar (12.374 ± 3.014) ile kıyaslandığında trakeya lümen alanının (μm^2) daha yüksek olduğu ($p=0.000$) saptanmıştır. Kontrol ve Deney gruplarında, vücut ağırlığı, bazal hücre sayısı, trakeya epitel kalınlığı ve lümen yüzey alanına ilişkin olarak elde edilen veriler Çizelge 3.3'de özetlenmiştir. Bazal hücre sayıları ile canlı ağırlık, epitel kalınlığı ve lümen yüzey alanı arasında herhangi bir ilişkinin var olup olmadığını test etmek amacıyla korelasyon analizleri gerçekleştirilmiştir. Tüm veriler dikkate alınarak gerçekleştirilen korelasyon analizleri sonucunda, vücut ağırlığı ile bazal hücre sayıları arasında negatif bir korelasyon olduğu (Korelasyon katsayısı = $-0,628$, $p=0,038$) belirlenmiştir. Ayrıca, vücut ağırlığı ile lümen yüzey alanı arasında yüksek düzeyde pozitif bir korelasyon (Korelasyon katsayısı = $0,946$, $p=0,000$) olduğu belirlenmiştir. Buna karşın, bazal hücre sayısı ile epitel kalınlığı (Korelasyon katsayısı = $0,468$, $p=0,146$) ve lümen yüzey alanı (Korelasyon katsayısı = $-0,575$, $p=0,064$) arasında anlamlı bir ilişkinin var olmadığı saptanmıştır. Aynı şekilde vücut ağırlığı ile epitel kalınlığı (Korelasyon katsayısı = $0,010$, $p=0,976$) arasında da anlamlı bir ilişkinin var olmadığı belirlenmiştir.

Çizelge 3.3. Kontrol ve Deney gruplarına ait trakeya dokularında bazal hücre sayıları, epitel kalınlıkları, lümen yüzey alanları ve vücut ağırlıkları

Parametre	Grup	n	Ortalama \pm SD	P değeri
Bazal hücre sayısı	Kontrol	6	155,8 \pm 9,75 ^a	0,017
	Deney	5	169,5 \pm 3,92 ^b	
Epitel kalınlığı (μ m)	Kontrol	6	18,1 \pm 2,11	0,896
	Deney	5	18,2 \pm 1,44	
Lümen yüzey alanı (μ m ²)	Kontrol	6	39601 \pm 5844 ^a	0,000
	Deney	5	12374 \pm 3014 ^b	
Vücut ağırlığı (g)	Kontrol	6	0,9647 \pm 0,044 ^a	0,000
	Deney	5	0,5747 \pm 0,045 ^b	

a,b: Her bir sütün içerisinde üst simge olarak belirtilen farklı harfler, gruplar arasında ilgili parametre için istatistiksel farklılığın önemli olduğunu ifade etmektedir. **SD:** Standart sapma. $p < 0.05$ değeri istatistiksel olarak önemli kabul edilmiştir.

4. TARTIŞMA

Optimum olmayan koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültürü, implantasyon öncesi embriyo gelişimini geriletği gibi implantasyon sonrası fetal gelişim bozukluklarına da neden olabilmektedir. Embriyo kültürü sırasında kullanılan vasatların yanı sıra embriyoların maruz kaldıkları oksijen konsantrasyonu da dahil olmak üzere, ısı, ışık ve kullanılan vasatın pH'sı gibi çevresel ve fiziksel faktörler de embriyonal ve fetal gelişim üzerine etki etmektedir (Gardner ve Lane, 2005).

In vitro embriyo kültürünün normal oda koşullarında gerçekleştirilmesi durumunda embriyolar atmosferik oksijen konsantrasyonuna (yaklaşık olarak %20-21) maruz kalmaktadırlar. *In vitro* fertilizasyon çalışmalarında embriyoların zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar atmosferik oksijen konsantrasyonunda büyütülmeleri, farelerde ve çeşitli hayvan türlerinde oksidatif strese bağlı olarak embriyonal ve fetal gelişimi olumsuz yönde etkilediği bilinen bir embriyo kültür modelidir. Sunulan projede de kullanılmış olan bu model, optimum olmayan koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültürünün embriyonal ve fetal gelişimi hangi mekanizmalarla geriletği konusunda önemli ipuçları sunmaktadır.

In vivo koşullarda embriyoların ovidukt ve uterusunda maruz kaldıkları oksijen konsantrasyonu türler arasında farklılık göstermekle birlikte %2-8 arasında değişmektedir (Fischer ve Bavister, 1993). Bir diğer ifadeyle, embriyolar fizyolojik koşullarda hiçbir zaman atmosferik oksijen konsantrasyonuna maruz kalmamaktadırlar. Buna karşın tüm dünyada ve ülkemizde tüp bebek laboratuvarlarında *in vitro* fertilizasyon ya da mikroenjeksiyon yöntemleriyle döllenmiş ovum (zigot), blastosist aşamasına kadar atmosferik oksijen konsantrasyonunda geliştirilebilmektedir. Parsiyal oksijen basıncı (pO_2), oksidatif strese neden olabilecek en önemli çevresel faktörlerden birisi olduğundan (Agarwal ve ark 2006), bu durum embriyoların yüksek oksijen konsantrasyonuna bağlı olarak hücre içerisinde oluşan superoksit anyon radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali gibi serbest oksijen radikallerinin yıkıcı etkilerine maruz kalma

olasılığını artırmaktadır (Guérin ve ark 2001). Yapılan çalışmalar, atmosferik oksijen konsantrasyonunda geliştirilen embriyolarda H_2O_2 gibi serbest oksijen radikallerinin konsantrasyonunda belirgin bir artışın olduğunu ve buna bağlı olarak embriyo gelişiminin olumsuz yönde etkilendiğini doğrulamaktadır (Kwon ve ark 1999). Bu bulgulara paralel olarak, değişik hayvan türlerinde yapılan pek çok çalışma embriyoların atmosferik oksijen konsantrasyonunda geliştirilmeleri sonucunda embriyo metabolizmasının olumsuz yönde etkilendiğini, blastosist gelişim oranının gerilediğini, blastosist hücre sayılarında ise önemli bir azalmanın olduğunu göstermektedir (Bavister, 2004). Konuyla ilgili olarak, sunulan projede de kullanılmış olan F1 (C57BL/6 X BALBc) fare embriyoları ile yapılan bir çalışmada, %20 oksijen konsantrasyonunda geliştirilen zigotlarda üçüncü gün (kompakt) embriyo gelişimi ve beşinci gün blastosist gelişiminde herhangi bir azalma görülmemekle birlikte, elde edilen blastosistlerdeki toplam hücre sayısı ve daha da önemlisi iç hücre kitle sayısı %5 oksijen konsantrasyonunda geliştirilen embriyolara göre önemli ölçüde düşük bulunmuştur (Karagenç ve ark 2004a). Fötusun tamamen iç hücre kitlesini oluşturan hücreler tarafından oluşturuluyor olması (Gardner ve Papaioannou, 1975) ve iç hücre kitlesini oluşturan hücrelerin sayısı ile fötus gelişimi arasında doğrusal bir ilişkinin bulunması (Lane ve Gardner, 1997) dolayısıyla, iç hücre kitlesinde saptanan bu azalma büyük önem taşımaktadır. Bütün bu nedenlerden dolayı, bir embriyonun uterus duvarına tutunabilme (implantasyon) ve sonrasında sağlıklı bir fötus oluşturabilme yeteneği olarak tanımlanan embriyo gelişim potansiyeli, zigot aşamasından blastosist aşamasına kadar atmosferik oksijen konsantrasyonuna maruz kalan embriyolarda önemli bir düşüş göstermekte ve fötal gelişimin aksamasına neden olmaktadır (Karagenç ve ark 2004a). Sunulan tez çalışmasından elde edilen veriler, *in vitro* embriyo kültürü/embriyo transferi sonucunda elde edilen fötusların düşük canlı ağırlığa sahip olduklarını gösteren çalışmalardan elde edilen veriler ile (Schieve ve ark 2004, Alukal ve Lipshultz 2008) örtüşmektedir. Sunulan tez çalışmasında Deney grubunu oluşturmak üzere transfer edilen blastosistlerde hücre sayım işlemleri gerçekleştirilmemiştir. Buna karşın, birimimizde sunulan tez çalışması ile bağlantılı olarak yürütülen çalışmalardan (TÜBİTAK, 112O259 numaralı proje) elde edilen veriler, atmosferik oksijen konsantrasyonunda gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültürü sonucunda gerek toplam hücre sayısı ve özellikle de iç hücre kitlesini oluşturan hücrelerin sayıları ile iç hücre kitlesini oluşturan hücrelerin toplam hücre sayısına oranında önemli bir azalma olduğunu göstermektedir. Daha da önemlisi, sunulan tez çalışmasından daha fazla sayıda embriyo transfer işlemi gerçekleştirilerek elde etmiş olduğumuz veriler, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi sonucunda,

gebeliğin 18. gününde (18.5 d.p.c.) fetal canlı ağırlığının yaklaşık % 50 oranında azaldığını göstermektedir. Bu veriler, sunulan tez çalışmasından elde edilen verileri destekler niteliktedir. Sunulan tez çalışmasından elde edilen veriler, vücut ağırlığı ile lümen yüzey alanı arasında yüksek düzeyde (0,946, p=0,000) korelasyon bulunduğunu göstermektedir. Buna karşın, elde edilen veriler vücut ağırlığı ve lümen yüzey alanının artmasına bağlı olarak trakeya dokusunda bulunan bazal hücrelerin sayısında bir artış olmadığını göstermektedir. Bu verilerin, sunulan tez çalışmasında kullanılan denek sayısının göreceli olarak az olmasından kaynaklanmış olabileceği ihtimali göz önüne alarak, ileride yapılması düşünülen çalışmaların daha fazla fetus kullanılarak gerçekleştirilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir. Buna karşın, sınırlı olmakla birlikte elimizdeki veriler, Deney grubuna ait trakeya dokularında bazal hücre sayılarında görülen artışın vücut ağırlığı ve trakeya lümen alanından bağımsız olarak ortaya çıktığını düşündürmektedir.

Sunulan çalışmada bazal hücreler, TRP63 transkripsiyon faktörünü tanıyan p63 (Clone 4A4) monoklonal antikor kullanılarak belirlenmişlerdir. TRP63, bazal hücreler tarafından eksprese edilmektedir (Evan ve ark 2001, Daniely ve ark 2004, Schoch ve ark 2004, Rock ve ark 2009). Elde edilen veriler, Kontrol grubu ile kıyaslandığında Deney grubunda trakeya dokusunda bulunan bazal hücrelerin sayısında belirgin bir artışın var olduğunu göstermektedir. İlgili hücre popülasyonunda p63 ekspresyon profillerinin transkripsiyonel ve translasyonel düzeylerde kantitatif olarak ortaya konması ve elde edilen sonuçların doğrulanması amacıyla, ileride yapılacak olan çalışmalarda polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve western blot analizlerinin gerçekleştirilmesi planlanmaktadır. Ayrıca, TRP63 transkripsiyon faktörünün ekspresyonu ile karakterize olan bazal hücreler, sitokeratinlerden KRT 5 ve KRT 14'ü de eksprese etmektedirler (Evan ve ark 2001, Daniely ve ark 2004, Schoch ve ark 2004, Rock ve ark 2009). Dolayısıyla, ileride yapılması planlanan benzer çalışmalarda p63 bazal hücre popülasyonunun yanı sıra KRT 5 ve KRT 14 bazal hücre alt popülasyonlarının da incelenmesi gerekmektedir.

Tüm bazal hücreler tarafından eksprese edilen ve sunulan tez çalışmasında trakeya dokusunda bazal hücrelerin belirlenmesinde kullanılan TRP63 transkripsiyon faktörü, bazal hücre biyolojisinde son derece önemli bir rol oynamaktadır (Şekil 1.5). Bunlar arasında, bazal hücrelerin kendi kendisini yenileyebilmesi (self-renewal), diğer hücre tiplerine farklılaşması ve apoptozisin düzenlenmesi son derece önemli yer tutmaktadır (Li ve ark 2011). Bu bilgiler doğrultusunda, sunulan tez projesinde Deney ve Kontrol grupları

arasında bazal hücre sayıları açısından gözlemlenen farklılığın hücre proliferasyonu ve/veya apoptosis ya da bazal hücrelerin silli hücreler ile sekretorik hücrelere farklılaşması ile ilişkili olup olmadığının test edilmesi gerekmektedir.

Trakeya dokusunda bulunan bazal hücreler, kök hücre işlevine sahip olup (Randell 2006, Rawlins ve Hogan 2006, Rock ve ark 2010), epitel dokusu içerisinde yer alan silli hücreler ile sekretor karakterdeki hücreleri oluşturmaktadırlar (Hong ve ark 2004b). Bu nedenle, bazal hücre sayılarının fizyolojik sınırların dışına çıkması, yukarıda belirtilen hücre popülasyonlarını da etkilemektedir. Dolayısıyla, ileride yapılması düşünülen çalışmalarda *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin trakeya dokusunda bazal hücrelerin yanı sıra, bazal hücrelerden köken alan silli ve sekretorik karakterdeki hücre popülasyonlarını da etkileyip etkilemediğinin araştırılması gerekmektedir.

Sunulan tez çalışmasında Kontrol grubu ile kıyaslandığında *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen fötuslara ait trakeya dokularında bazal hücre sayılarının artış göstermesi son derece ilginçtir. Fizyolojik koşullarda yetişkin trakeya dokusunda hücre farklılaşması, yavaş bir biçimde gerçekleşmektedir (Kauffman 1980). Ancak, sunulan çalışmasında deney materyallerinin fötuslardan oluşması nedeni ile trakeya dokusunda bazal hücre dinamiklerinin yetişkinlerden farklı olabileceği düşünülmektedir. Fötal dönemde epitelyum dokusu içerisinde yer alan hücrelerin sayı ve oranları ile ilgili herhangi bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Buna karşın, yetişkin bir bireyde normal koşullarda trakeya dokusuna ait yalancı çok katlı epitelde bazal hücreler, toplam hücre sayısının yaklaşık %30'unu oluştururken (Rock ve ark 2009), silli hücreler tüm hücrelerin %50'sini oluşturmaktadırlar (Knight ve Hogate, 2003). Fötal dönemde trakeya epitelyum dokusunda hücre dinamiklerinin belirlenebilmesi ve bu durumun yetişkin döneme ait hücre dinamikleri ile olabilecek olan ilişkisinin ortaya konulabilmesi amacıyla, fötal dönemde bazal hücre sayılarının yanısıra, silli ve sekretör hücre sayılarının da belirlenmesi gerekmektedir.

Fötal gelişim sürecinde trakeya dokusunda bulunan bazal hücreler, Sox-2, Nkx-2-1, Nkx-2-5, p63 ve Foxa-2 transkripsiyon faktörlerini eksprese eden progenitor hücrelerden köken almaktadırlar (Morrisey ve Hogan 2010). Dolayısıyla, sunulan tez çalışmasında Kontrol ve Deney grupları arasında bazal hücrelerin sayısına ilişkin olarak gözlenen farklılığın söz konusu progenitor hücre popülasyonundan kaynaklanmış olma ihtimali

bulunmaktadır. Konuyla ilgili olarak yapılan çalışmalar, Sox2 transkripsiyon faktörünün çok fazla eksprese edilmesi (over expression) durumunda, p63 eksprese eden hücrelerin sayılarında önemli bir artışın olduğunu göstermektedir (Gontan ve ark 2008). Que ve ark (2009)'nın yaptığı bir çalışmada ise, erken ventral ön barsak (early ventral foregut) epitelindeki Sox2 delesyonunun, trakeya epitelinde anormal farklılaşmalara sebep olduğunu göstermişlerdir. Ancak bu anormal trakea farklılaşması, trakeya dokusundaki hücre poliferasyonuna etki etmeden olmaktadır. Sunulan çalışmada, Deney grubunda bazal hücre sayılarında görülen artış ile ilişkili olarak Sox2 transkripsiyon faktörünün ekspresyonunda bir değişikliğin olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir.

Sunulan tez çalışmasında, bazal hücre belirteci olarak kullanılan p63'ün ilişkili olduğu biyolojik fonksiyonlar ve çeşitli hastalıklar özetlenmiştir (Şekil 1.5). p63 ekspresyonu hem normal, hem de tümörlü epitelde, epitel hücrelerinin transkripsiyonel regülasyonunda son derece önemli işlevler üstlenmektedir. IPA analizleri (Ingenuity pathways analysis) ve literatür incelemelerine dayanılarak p63'ün 2 upstream ve 77 downstream geni, Li ve ark (2011)'nin çalışmasında özetlenmektedir. Li ve ark (2011) yaptıkları çalışmada, microarray analizlerine göre, Nasal Polyposis hastaları ile kontrol gruplarını karşılaştırdıklarında, p63 pozitif hücre sayılarının arttığını ve bu durumun p63'ün hedef ve regülatör genlerini 1,5 kattan daha fazla eksprese ettiklerini göstermişlerdir. Bu bulgular, p63 ekspresyonunda görülen artışın, nükleer faktör kB (NF-kB) sinyal yolağı ve epitel hücre farklılaşması, hücre siklusu, hücre poliferasyonu/büyümesi, hücre adezyonu, hücre göçü, apoptozis, hücre içi protein kinaz sinyal yolakları ve oksidasyon-redüksiyonu reaksiyonları da dahil pek çok işlevden sorumlu olan p63'ün hedef ve regülatör genlerinin ekspresyon artışı ile paralel olarak ortaya koymaktadır. Sunulan tez çalışmasında, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen fötuslara ait trakeya dokularında bazal hücre sayılarında görülen artışta rol oynayan moleküler mekanizmaların aydınlatılması amacıyla mikroarray analizlerinin gerçekleştirilmesinde yarar olduğu düşünülmektedir. Bir kök hücre olarak görev yapan bazal hücreler, gerektiğinde sekretorik hücrelere ve sili hücrelere farklılaşabilmektedirler. Rock ve ark (2011)'nin ileri sürdüğü modelde, bazal hücreler kendilerini yenilerken, Notch sinyal yolağına gereksinim duymamaktadırlar. Ancak bazal hücrelerin, olgun silli ve sekretör hücrelere farklılaşması için Notch sinyal yolağının aktivasyonu gerekmektedir. Dolayısıyla, *In vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin,

fötal trakeya dokusunda Notch sinyal yolağı üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığının incelenmesi gerekmektedir.

Sunulan tez çalışması, trakeya dokusunda bazal hücre sayılarının fötal dönemde belirlenmesi açısından özgün bir değer taşımaktadır. Trakeya dokusunda bazal hücrelere ilişkin olarak yapılan pek çok çalışma erişkin dönemde gerçekleştirilmiştir (Randell ve ark 1991, Liu ve ark 1994, Hong ve ark 2004b, Schoch ve ark 2004, Rock ve ark 2009). Sunulan tez çalışması kapsamında, embriyo transferi yapılan ve gebe kalan iki adet fareden toplam dokuz adet yavru elde edilmiştir. Bu şekilde elde edilen erişkin farelerde, trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısının belirlenmesi planlanmaktadır. Elde edilecek olan verilerin, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transfer işlemlerine bağlı olarak fötal dönemi de kapsayacak şekilde erişkin dönemde bazal hücre sayılarının nasıl etkileceğine dair önemli bazı veriler sunacağı tahmin edilmektedir.

5.SONUÇ

Sunulan tez çalışması, atmosferik oksijen konsantrasyonunda gerçekleştirilen in vitro embriyo kültürünün fotal trakeya dokusunun genel histolojik yapısı ve trakeya dokusunda kök hücre olarak görev yapan bazal hücrelerin sayısı üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını test etmeye yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler, in vitro embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen ve Deney grubunu oluşturan fotalarda canlı ağırlığın önemli ölçüde azaldığını göstermektedir. Erken doğum (prematüre doğum) ve düşük doğum ağırlığı ÜYTE uygulamalarının en yaygın komplikasyonları olarak bilinmektedir. Bununla birlikte, ÜYTE uygulanarak dünyaya gelen bebeklerde, trakeya dokusunda bazal hücreleri ve dolaylı olarak epitel hücre popülasyonlarını etkileyip etkilemediğine dair herhangi bir literatür bilgisi bulunmamaktadır. Dolayısıyla, sınırlı olmakla birlikte sunulan tez çalışmasından elde edilen verilerin konuyla ilgili literature özgün ve önemli katkılar sağlayabilecek nitelikte olduğu düşünülmektedir. Fotal canlı ağırlığın yanısıra, in vitro embriyo kültürü ve embriyo transferine bağlı olarak trakeya dokusunda bazal hücre sayısının da etkilendiğini göstermektedir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, düşük canlı ağırlığa sahip olan Deney grubunda bazal hücre sayısının önemli ölçüde azalmış olması sunulan tez çalışmasından elde edilen en ilginç veri setlerinden birisini oluşturmaktadır. Elde edilen veriler doğrultusunda, bu durumun vücut ağırlığı ve lumen yüzey alanından bağımsız olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Mevcut literature bilgileri doğrultusunda, sunulan tez projesinde Deney ve Kontrol grupları arasında bazal hücre sayıları açısından gözlemlenen farklılığın hücre proliferasyonu ve/veya apoptosiz ya da bazal hücrelerin silli hücreler ile sekretorik hücrelere farklılaşması ile ilişkili olup olmadığını test edilmesi gerekmektedir.

ÖZET

İnsan hekimliğinde çiftlerin bir yıl boyunca düzenli olarak ve korunmaksızın cinsel ilişkiye girmelerine karşın çocuk sahibi olamamaları olarak tanımlanan infertilite, tüm dünya genelinde toplumun %7'sini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Günümüzde, infertilite tedavisinde başta *in vitro* fertilizasyon (tüp bebek), *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi olmak üzere çeşitli üremeye yardımcı tedavi (ÜYTE) yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, infertilite tedavisi sonucunda dünyaya gelen bebeklerin normal bebeklere oranla enfeksiyonlara ve astım gibi alerjik solunum yolu hastalıklarına daha duyarlı olduklarını göstermektedir. Buna karşın, optimum olmayan koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültürünün fetal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerine her hangi bir etkisinin olup olmadığı bilinmemektedir. Trakeyadan başlayarak akciğerlere kadar uzanan solunum yollarının yüzeyini örten epitel dokusu, sürekli olarak kendini yenilemektedir. Solunum sisteminin trakeyadan başlayarak bronşiyollere kadar uzanan kısmında bazal membran ile sıkı bir bağlantı içerisinde olan ve transkripsiyon faktörü transformasyon-ilişkili protein 63 (TRP63)'ü, sitokeratin 5 ve 14 (KRT 5 ve KRT 14) faktörlerini eksprese etmeleri ile karakterize olan bazal hücreler, bu yenilenme sürecinde rol oynayan en önemli hücre popülasyonunun oluşturmaktadırlar. Bir kök hücre olarak işlev görerek kendilerini yenileme (self-renewal) yeteneğine sahip olan bazal hücreler bu işlevlerini, gerektiğinde Clara hücrelerine ve silli epitel hücrelere farklılaşabilme yetenekleri sayesinde gerçekleştirmektedirler. Sunulan tez çalışmasının amacı, fizyolojik olmayan atmosferik oksijen konsantrasyonunda gerçekleştirilen *in vitro* fare embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerine herhangi bir etkisinin olup olmadığını test etmektir. Sunulan tez çalışmasında, bir adet kontrol grubu ve bir adet deney grubu olmak üzere toplam iki grup bulunmaktadır. Kontrol grubu, süperovulasyonu sağlamak amacıyla *in vitro* fertilizasyon çalışmalarında rutin olarak kullanılan PMSG ve hCG uygulaması yapılmamış olan 8-12 haftalık dişilerin, aynı yaştaki erkeklerle çiftleştirilmelerinden elde edilmiş olan fötuslardan oluşturulmuştur. Deney grubu ise, süperovulasyon uygulanan dişilerden hCG uygulamasından 22 saat sonra oviduktun ampulla kısmından toplanan döllenmiş yumurta hücrelerinin (zigot) atmosferik oksijen

konsantrasyonunda 95 saat süreyle büyütülmesiyle elde edilen, dolayısıyla *in vitro* ortamda gelişen, blastosist aşamasındaki embriyoların yalancı gebe dişilere transferiyle elde edilmiş olan fötuslardan oluşturulmuştur. Embriyo transferi yapılan Deney grubunda, embriyo gelişim oranları belirlenmiştir. Deney grubunu oluşturmak amacıyla, toplam 30 adet blastosist aşamasında bulunan embriyo, üç adet yalancı gebe dişiyeye transfer edilmiştir. Her iki grupta da, gebeliğin 18. gününde (18.5 d.p.c) servikal dislokasyonla ötenazi edilerek, gebe dişilerden izole edilen fötuslar uzaklaştırılarak, canlı ağırlıkları belirlenmiş ve bireysel olarak trakeya doku örnekleri alınmıştır. Her bir fötusa ait trakeya dokusunda, dokunun genel histolojik görünümünü belirlemek amacıyla üçlü boyama yöntemi uygulanmıştır. Dokuda bulunan bazal hücrelerin sayılarını, belirlemek amacıyla immunoflüoresan ve immunohistokimya yöntemleri kullanılmıştır. İmmunohistokimya yöntemi uygulanan kesitlerde ayrıca epitel kalınlıkları ve lümen yüzey alanları da belirlenmiştir. Sunulan tez çalışmasından elde edilen bulgular, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi ile elde edilen ve Deney grubunu oluşturan fötuslarda canlı ağırlığın önemli ölçüde azaldığını göstermektedir. Kontrol grubuna ait fötuslarda lümen yüzey alanının Deney grubuna ait fötuslardan önemli ölçüde yüksek olduğu, epitelyum kalınlığında ise iki grup arasında bir fark olmadığı belirlenmiştir. Fötal canlı ağırlığın yanısıra, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferine bağlı olarak trakeya dokusunda bazal hücre popülasyonunun da etkilendiği belirlenmiştir. Kontrol grubu ile kıyaslandığında, düşük canlı ağırlığa sahip olan Deney grubunda bazal hücre sayısının önemli ölçüde artmış olması sunulan tez çalışmasından elde edilen en ilginç veri setlerinden birisini oluşturmaktadır. Elde edilen veriler, bu durumun vücut ağırlığı ve lümen yüzey alanından bağımsız olarak ortaya çıktığını göstermektedir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, Deney ve Kontrol grupları arasında bazal hücre sayıları açısından gözlemlenen farklılığın hücre proliferasyonu ve/veya apoptosiz ya da bazal hücrelerin silli hücreler ile sekretorik hücrelere farklılaşması ile ilişkili olup olmadığının test edilmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Fötal trakeya, bazal hücre, p63, *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferi

SUMMARY

Infertility, defined as the failure to conceive after a year of regular intercourse without contraception, is an important health problem affecting about 7% of the world population. Today, various assisted reproductive Technologies, including in vitro fertilization, embryo culture and embryo transfer, are commonly used in the treatment of infertility. Recent studies indicate that children born following infertility treatment are more susceptible to infections and allergic respiratory diseases like asthma when compared to naturally conceived children. However, there is no information in the literature concerning the effect of in vitro embryo culture performed under sub-optimal culture conditions on the number of basal cells in fetal tracheal tissue. Epithelial tissue covering the surface of the respiratory tract extending from the trachea to the lungs constantly renews itself. Basal cells that are present in the respiratory tract between the trachea and bronchioles and that are characterized by the expression of TRP63, cytokeratin 5 and 14 constitute the major cell population playing a role in this self-renewal process. Basal cells that function as stem cells with the ability of self-renewal realize this function by their ability to differentiate to Clara cells as well as to ciliated epithelial cells when necessary. The aim of the present thesis is to test whether or not *in vitro* embryo culture and embryo transfer performed under atmospheric concentrations of oxygen affects the number of tracheal basal cells in mouse fetuses. The present thesis had two study groups in total: One Control group and one Experimental group. Control group consisted of fetuses obtained from the mating of 8-12 weeks-old female mice with male mice of the same age. Female mice in the Control group did not receive PMSG and hCG that are regularly used in in vitro fertilization studies for super-ovulation and ovulation induction. Experimental group consisted of fetuses that will be generated through embryo transfer of in vitro-developed blastocysts obtained with the culture of zygotes collected from the ampulla of the oviduct of super-ovulated female mice at 22 hours following the administration of hCG under atmospheric concentrations of oxygen for a period of 95 hours. Embryos scores will be determined in the Experimental group. In order to obtain fetuses for the Experimental group, a total of thirty blastocysts were transferred to three pseudo-pregnant mice. In both groups, pregnant mice were sacrificed on day 18 of gestation (18.5 d.p.c.) and fetuses were

weighed individually and tracheal tissue samples were obtained. Triple-staining procedure was used to reveal general histological structure of the trachea. Immunofluorescence and immunohistochemistry were used to reveal basal cells in the trachea. Surface area of the tracheal lumen along with the thickness of the epithelial layer was also measured in sections stained with immunohistochemistry. Data gathered from the present thesis revealed that fetuses in the Experimental group weighed significantly less compared to those of the Control group. The surface area of the tracheal lumen was significantly higher in the Control group, whereas the thickness of the epithelial layer did not differ between the two groups. The number of basal cells was significantly reduced in the Control group compared to the Experimental group, which constitute the most interesting finding of the present study. Evidence gathered from the present study suggests that this increase in the number of basal cells in the Experimental group is independent of the fetal weight and the surface area of the tracheal lumen. Further experiments are warranted in the light of the evidence gathered in the present study to determine whether or not the difference observed between the two groups as for the number of basal cells is due to cell proliferation and/or apoptosis or due to the differentiation of basal cells to ciliated as well as to secretory cells.

Keywords: Fetal trachea, basal cell, p63, *in vitro* embryo culture and embryo transfer

KAYNAKLAR

Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril* 2006;86:503-512.

Alukal JP, Lipshultz LI. Safety of assisted reproduction, assessed by risk of abnormalities in children born after use of in vitro fertilization techniques, *Nat Clin Pract Urol*. 2008;5:140-50.

Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, Bhattacharya S, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren K.G.European IVF-monitoring (EIM) Consortium, Assisted reproductive technology in Europe, 2004. Results generated from European registars by Eshre, *Human Reproduction*. 2008;23:756-771.

Barker DJ. The developmental origins of adult disease, *J Am Coll Nutr*. 2004;23:588S-595S.

Barker DJ. The origins of the developmental origins theory, *J Intern Med*.2007;261:412-417.

Basetemur E,Sutcliffe A. Follow-up of children born after ART, *Placenta*. 2008;S135-S140.

Bavister B. Oxygen concentration and preimplantation development. *Elsevier* 2004;9(5): 484-486.

Berthiaume Y, Voisin G, Dagenais A. The alveolar type I cells the new knight of the alveolus? *J Physiol* 2006;572:609-10.

Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of basal and parabasal cells in normal human airway epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 1998;157:2000–6.

Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG, International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care, *Human Reproduction* 2007;22:1506–12.

Bonduelle M, Wennerholm UB, Loft A, Tarlatzis BC, Peters C, Henriët S, Mau C, Victorin-Cederquist A, Van Steirteghem A, Balaska A, Emberson JR, Sutcliffe AG. A multi-center cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilisation and natural conception, *Human Reproduction* 2005;20:413-419.

Brody SL, Yan XH, Wuerffel MK, Song SK, Shapiro SD. Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2000;23:45–51

Burns AR, Smith CW, Walker DC. Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung. *Physiol. Rev*. 2003;83:309–36.

Calkins K, Devaskar SU. Fetal origins of adult disease, *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2011;41:158-76.

Chen J, Knowles HJ, Hebert JL, Hackett BP. Mutation of the mouse hepatocyte nuclear factor/forkhead homologue 4 gene results in an absence of cilia and random left-right asymmetry. *J. Clin. Investig.* 1998; 102:1077–82.

Chen G, Korfhagen TR, Xu Y, Kitzmiller J, Wert SE, Maeda Y, Gregorieff A, Clevers H, Whitsett JA. SPDEF is required for mouse pulmonary goblet cell differentiation and regulates a network of genes associated with mucus production. *The Journal of Clinical Investigation* 2009; 119: 2914-2924.

Costa RH, Kalinichenko VV, Lim L. Transcription factors in mouse lung development and function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001; 280:L823–L838.

Crossman GC. A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion on the principles involved. *The Anatomical Record* 1937;69(1); 33-38.

Crum CP, McKeon FD. p63 in epithelial survival, germ cell surveillance, and neoplasia. *Annu. Rev. Pathol.* 2010; 5:349–71

Daniely Y, Liao G, Dixon D, Linnoila RI, Lori A, Randell SH, Oren M, Jetten AM. Critical role of p63 in the development of normal esophageal and tracheobronchial epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004; 287:C171–81.

De mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Adamson D, World collaborative report on Assisted Reproductive Technology, 2002, *Human Reproduction* 2009;24: 2310-2320.

Ecker DJ, Stein P, Xu Z, Williams CJ, Kopf GS, Bilker WB, Abel T, Schultz RM. Long-term effects of culture of preimplantation mouse embryos on behavior, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:1595-1600.

Ericson A, Nygren KG, Olausson PO, Källén B. Hospital care utilization of infants born after IVF. *Human Reproduction* 2002;17:929-932.

Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Exp. Lung Res.* 2001; 27:401–15.

Evans MJ, Plopper CG. The role of basal cells in adhesion of columnar epithelium to airway basement membrane *Am Rev Respir Dis* 1988;138:481-3.

Evcil EH. Fetal dönem boyunca akciğer gelişimi. Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Isparta, Türkiye. 2010.

Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits, *Journal of Reproduction and Fertility.* 1993;99:673–679.

Finnström O, Källén B, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Olausson PO. Maternal and child outcome after in vitro fertilization--a review of 25 years of population-based data from Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2011;90:494-500.

Fleming T, Kwong W, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller D, Watkins A, Eckert J. The embryo and its future. *Biology of Reproduction* 2004;71:1046–1054.

Gardner RL, Papaioannou VE. Differentiation in the trophectoderm and inner cell mass. Ed: Balls ME, Wild AE. In: *The Early Development of Mammals*, Cambridge University Press, Cambridge, Pp. 107., 1975.

Gardner D. K., Lane M., *Culture of the Mammalian Preimplantation Embryo*, ed: Gardner D.K., Lane M., Watson A.J., In: *A Laboratory Guide To The Mammalian Embryo*, Oxford University Press, New York, 2004.

Gardner D.K., Dissection of culture media for embryos: the most important and less important components and characteristics, *Reprod Fertil Dev* 2008;20:9-18.

Gontan C, De Munck A, Vermeij M, Grosfel F, Tibboel D, Rottier R. Sox2 is important for two crucial processes in lung development: Branching morphogenesis and epithelial cell differentiation. *Developmental Biology* 2008;317:296–309.

Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the preimplantation embryo and its surroundings, *Human Reproduction Update* 2001;7: 175–189.

Hackett TL, Shaheen F, Johnson A, Wadsworth S, Pechkovsky DV, Jakoby DB, Kicic A, Stick SM, Knight DA. Characterization of sidepopulation cells from human airway epithelium. *Stem Cells* 2008;26:2576–85.

Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am. J. Pathol.* 2004a;164:577–88.

Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. In vivo differentiation potential of tracheal basal cells: evidence for multipotent and unipotent subpopulations. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004b;286:L643–49.

<http://www.saglik.gov.tr/THGM/belge/1-6484/saglik-bakanligi-ruhsatli-uremeye-yardimci-tedavitup-be-.html>.

<http://www.ankaratupbebek.com.tr/Yazi-tup-bebegin-tarihcesi--1-4.aspx>.

Hvidtjørn D, Grove J, Schendel DE, Vaeth M, Ernst E, Nielsen LF., Thorsen P. Cerebral palsy among children born after in vitro fertilization: the role of preterm delivery--a population-based, cohort study, *Pediatrics* 2006;118:475-482.

Kapanci Y, Ribaux C, Chaponnier C, Gabbiani G. Cytoskeletal features of alveolar myofibroblasts and pericytes in normal human and rat lung. *J. Histochem. Cytochem.* 1992;40:1955–63.

Karagenc L, Sertkaya Z, Ciray N, Ulug U, Bahçeci M. Impact of oxygen concentration on embryonic development of mouse zygotes, *Reprod Biomed Online* 2004a;9: 409-17.

Karagenc L, Lane M, Gardner DK. Oestradiol, cyclodextrin-encapsulated 17beta-oestradiol and the oestradiol solubilizer 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin all impair preimplantation mouse embryo development, *Reprod Biomed Online* 2004b;9; 280-286.

Karagenc L, Lane M, Gardner DK. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates mouse blastocyst inner cell mass development only when media lack human serum albumin, *Reprod Biomed Online* 2005;10: 511-518.

Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 2003;8:432-46.

Kauffman SL. Cell proliferation in the mammalian lung. *Int Rev Exp Pathol.* 1980;22:131-191.

Kwon H.C., Yang H.W., Hwang K.J., Yoo J.H., Kim M.S., Lee C.H., Ryu H.S., Oh K.S., Effects of low oxygen condition on the generation of reactive oxygen species and the development in mouse embryos cultured in vitro, *Journal of Obstetrics and Gynecological Research* 1999;25:359–366.

Lane M, Gardner DK. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids, *Journal of Reproduction and Fertility* 1997;109:153–164.

Lane M, Gardner DK., Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development, *Reprod Fertil Dev.* 2005;17:71-378.

Lane M, Gardner DK., Embryo culture medium: which is the best? , *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.*, 2007;21:83-100.

Li CW, Shi L, Zhang KK, Li TY, Lin ZB, Lim MK, McKeon F, Xia W, Wang DY. Role of p63/p73 in epithelial remodeling and their response to steroid treatment in nasal polyposis. *Allergy Clin Immunology* 2011;127:765-72.

Liu JY, Nettesheim P, Randell SH. Growth and differentiation of tracheal epithelial progenitor cells. *Am. J. Physiol.* 1994; 266:L296–307.

Lumsden AB, McLean A, Lamb D. Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. *Thorax* 1984;39:844-9.

Ludwig AK, Katalinic A, Thyen U, Sutcliffe AG, Diedrich K, Ludwig M, Physical health at 5.5 years of age term-born singletons after intracytoplasmic sperm injection : results of a prospective, controlled, single-blinded study, *Fertil Steril.* 2009;91:115-124.

Maher ER., Brueton LA., Bowdin SC., Luharia A, Cooper W, Cole TR, Macdonald F, Sampson JR, Barratt CL, Reik W, Hawkins MM. Beckwith-Wiedemann syndrome and assisted reproduction technology (ART), *J Med Genet.* 2003;40: 62-64.

McGeady TA, Quinn PJ, FitzPatrick ES, Ryan MT. Respiratory system. *Veterinary Embryology* 2006. Çelik İ ve Öznurlu Y. Solunum Sistemi. *Veteriner Embriyoloji (Çeviri).* Medipres Matbaacılık Ltd. Şti. Eylül 2011; 235-242

Moore KL, Persaud TVN. The developing human clinically oriented embryology. Yıldırım M, Okan İ, Dalçı H (çev. ed) *İnsan Embriyolojisi.* 6.Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.

Morimoto M, Liu Z, Cheng HT, Winters N, Bader D, Kopan R. Canonical Notch signaling in the developing lung is required for determination of arterial smoothmuscle cells and selection of Clara versus ciliated cell fate. *J. Cell Sci.* 2010;123:213–24.

Morrissey EE, Hogan BL. Preparing for the first breath: genetic and cellular mechanisms in lung development. *Dev. Cell* 2010;18:8–23.

Morrissey EE and Hogan BLM. Preparing for the First Breath: Genetic and cellular mechanisms in lung development. *Developmental Cell* 2009;18:Elsevier Inc. 23. DOI 10.1016/j.devcel.2009.12.010.

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the mouse embryo: A Laboratory Manual, Third Edition*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2003.

Ørstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, Spetalen S, Kierulf K, Skjeldal O, Buiting K. Another case of imprinting defect in a girl with Angelman Syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection, *Am J Hum Genet* 2003;72: 218-219.

Pool TB. An update on embryo culture for human assisted reproductive technology: media, performance, and safety, *Semin Reprod Med.* 2005;23:309-18.

Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:726-33.

Que J, Luo X, Swartz RJ, Hogan BLM. Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. *Development* 2009;136:1899-1907.

Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam KT, Kurotani R, Morrissey EE, Taranova O, Pevny LH, Hogan BL. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development* 2007;134:2521–31.

Que J, Choi M, Ziel JW, Klingensmith J, Hogan BL. Morphogenesis of the trachea and esophagus: current players and new roles for noggin and Bmps. *Differentiation* 2006; 74:422–37.

Randell SH. Airway epithelial stem cells and the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2006;3:718–25.

Randell SH, Comment CE, Ramaekers FC, Nettesheim P. Properties of rat tracheal epithelial cells separated based on expression of cell surface α -galactosyl end groups. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1991;4:544–54.

Rawlins EL, Clark CP, Xue Y, Hogan BL. The Id2+ distal tip lung epithelium contains individual multipotent embryonic progenitor cells. *Development* 2009a;136:3741–45.

Rawlins EL, Okubo T, Xue Y, Brass DM, Auten RL, Hasegawa H, Wang F, Hogan BLM. The role of Scgb1a1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. *Cell Stem Cell* 2009b;4:525–34.

Rawlins EL, Hogan BL. Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development* 2006;133:2455–65.

Rock JR, Hogan BLM. Epithelial progenitor cells in lung development, maintenance, repair, and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2011;27:493–512.

Rock JR, Randell SH, Hogan BL. Airway basal stem cells: a perspective on their roles in epithelial homeostasis and remodeling. *Dis. Model. Mech.* 2010; 3:545–56.

Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, Randell SH, Hogan BLM. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2009; 106:12771–75.

Schieve LA, Rasmussen SA, Buck GM, Schendel DE, Reynolds MA, Wright VC. Are children born after assisted reproductive technology at increased risk for adverse health outcomes? *Obstet Gynecol.* 2004;103:154-63.

Schoch KG, Lori A, Burns KA, Eldred T, Olsen JC, Randell SH. A subset of mouse tracheal epithelial basal cells generates large colonies *in vitro*. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2004; 286:L631–42.

Sinclair KD, Young LE, Wilmut I, McEvoy TG. In-utero overgrowth in ruminants following embryo culture: lessons from mice and a warning to men. *Human Reproduction*, 2000;15(5):68-86.

Srianni FE, Chu FS, Walker DC. Human alveolar wall fibroblasts directly link epithelial type 2 cells to capillary endothelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2003;168:1532–37.

Stephoe PC, Edwards RG. Birth after the re-implantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:366-366.

Tsao, PN, Vasconcelos M, Izvolsky KI, Qian J, Lu J, Cardoso WV. Notch signaling controls the balance of ciliated and secretory cell fates in developing airways. *Development* 2009;136:2297–2307.

Türk neonatoloji derneği yardımcı üreme teknikleri ve çoğul gebelikler çalışma grubu. Yardımlı Üreme Tekniklerinin neonatal mortalite ve morbidite üzerine etkileri. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2010;53:258-266.

Vajta G, Rienzi L, Cobo A, Yovich J, Embryo culture: can we perform better than nature? *Reprod Biomed Online* 2010;20:453-69.

Van Lommel A. Pulmonary neuroendocrine cells (PNEC) and neuroepithelial bodies (NEB): chemoreceptors and regulators of lung development. *Paediatr. Respir. Rev.* 2001;2:171–176.

Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lungmorphogenesis. *Mech Dev.* 2000; 92:55–81.

Watkins AJ, Ursell E, Panton R, Papenbrock T, Hollis L, Cunningham C, Wilkins A, Perry VH, Sheth B, Kwong WY, Eckert JJ, Wild AE, Hanson MA, Osmond C, Fleming TP. Adaptive responses by mouse early embryos to maternal diet protect fetal growth but predispose to adult onset disease, *Biology of Reproduction* 2008;78:299-306.

Wright VC, Chang J, Jeng G, Macaluso M. Assisted reproductive technology surveillance-United States, 2005, *MMWR Surveill Summ.* 2008;57:1-23.

Yayla M, Baytur Y, Çok merkezli çoğul gebelik alışması 1-Epidemiyoloji, *Perinatoloji Dergisi* 2008;16:1-8.

6 .3.2010 tarih, 27513 sayılı Resmi Gazete.

EKLER

Ek 1. Araştırmada kullanılan solüsyon ve kimyasallar

Tris-bufferedsaline (TBS) stok solüsyonu

- 0.2 M Trizma base (Sigma Aldrich), 24.23 g Tris 1L distile suda çözündürülür.
- 0.1 M HCl (Merck), 8.5 ml konsantre HCl 1L distile suda çözündürülür.
- % 0.9'luk fizyolojik tuzlu su (9 g NaCl 1L distile suda çözündürülür.

1L TBS (pH 7.6) hazırlamak için, stok solüsyonlardan sırası ile, 250 ml 0.2 M Tris çözeltisi, 375 ml 0.1 M HCl çözeltisi ve 375 ml %0.9'luk fizyolojik tuzlu su çözeltisinden ilave edilir. Fizyolojik tuzlu su ilavesi yapılırken hacim 800 ml'ya ayarlanır. pH 7.6'ya ayarlandıktan sonra fizyolojik tuzlu su ile kalan hacim 1L'ye tamamlanır.

Phosphate- buffered saline (PBS, pH 7.4) solüsyonu

- 8 g NaCl (Sigma Aldrich)
- 0.2 g KCl (Sigma Aldrich)
- 1.44 g Na₂HPO₄ (Merck)
- 0.24 g KH₂HPO₄(Merck)

800 ml distile suda çözündürülerek, pH değeri 7.4'e ayarlanmış ve elde edilen solüsyonun volümü distile su ile 1L'ye tamamlanmıştır.

%4'lük Paraformaldehid- PBS

- 2 g paraformaldehide (Sigma Aldrich)
- 50 ml PBS

2 g paraformaldehide 40 ml PBS içerisine konular ve mikro dalga fırında en yüksek sıcaklıkta yaklaşık 30 saniye çözündürülür. Üzerine yaklaşık bir damla 2N NaOH ilave edilir ve iyice karıştırılır. Tamamen kaynatmadan alınır ve soğumaya bırakılır. Soğumadan sonra pH 7.4'e ayarlanır ve üzeri 50 ml'ye tamamlanır. Buzdolabında +4 °C 'de 1 gün içerisinde kullanılmak üzere muhafaza edilir.

%0.1PBS-Tween20 (PBT)

- 1 ml Tween 20 (Merck)
- 1000 ml PBS

500µl tween 20 1000 ml PBS içerisine eklenir ve iyice karıştırılır. Oda sıcaklığında muhafaza edilebilir.

%15, %20 ve %30'luk Sukroz solüsyonları

- % 15, %20, %30 sukroz solüsyonları hazırlamak için sırası ile 15,20 ve 30g sukroz
- 100 ml PBS

Sukroz (Merck) tartılır ve son hacimleri 100 ml olacak şekilde PBS içerisinde çözündürülür. Buzdolabında +4 °C 'de 1 gün içerisinde kullanılmak üzere muhafaza edilir.

Sodyum Sitrat Buffer

10 mM tri-sodyum sitrat buffer hazırlamak için,

- 2,94 g tri- sodyum sitrat
- 1000 ml distile su
- 0,5 ml tween 20

2,94 g tri-sodyum sitrat (Merck) 800 ml distile suda çözdürülür ve pH 6'ya ayarlanır, daha sonra üzeri 1L'ye tamamlanır ve 0.5 ml tween 20 eklenir, iyice karıştırılır. Oda sıcaklığında 3 ay ya da +4°C 'de daha uzun süre saklanabilir.

PMSG (Folligon)

- 1000 IU/ml stok PMSG (Folligon)
- 20 ml PBS

Sulandırma işlemi yapılarak 1ml'lik enjektörlere 50 IU olarak hazırlandı ve -80°C 'de muhafaza edildi.

hCG (Pregnyl)

- 5000 IU/ml stok hCG (Pregnyl)
- 100 ml PBS

Sulandırma işlemi yapılarak 1ml'lik enjektörlere 50 IU olarak hazırlandı ve -80°C 'de muhafaza edildi.

%3'lük H₂O₂

- 1 ml %30'luk stok H₂O₂ (Merck)
- 9 ml PBS

1 ml %30'luk stok H₂O₂ alınarak üzeri PBS ile 10 ml'ye tamamlandı.

Ksilazin/ Ketamin

- 0.8 ml ksilazin (Xylazinbio %2, bioveta)
- 1 ml ketamin (rp Ketamol)
- 8.2 ml PBS

0.8 ml ksilazin ve 1 ml ketamin, 8.2 ml PBS içerisine ilave edilir ve +4°C 'de muhafaza edilir.

Primer antikor (P63 (D-9); sc-25268, mouse monoclonal antibody)

- 25 µl stok P63 antikor (Santa Cruz)
- 2.475 ml PBS

25 µl stok P63 antikor alınır ve içerisinde 2.475 ml PBS bulunan steril tüpe ilave edilir. Böylece 1/100 sulandırma yapılmış olur.+4°C 'de buzdolabında muhafaza edilir.

Sekonder antikor (A21131, Alexa Fluor® 488 goat anti- IgG2a(γ 2a))

- 15 μ l stok (200 μ g/ml) sekonder antikor (Life Biotechnologies)
- 6 ml PBS

15 μ l sekonder antikor 6 ml PBS içerisine ilave edilir, böylece 5 μ g/ml'lik konsantrasyonda sekonder antikor hazırlanmış olur.

3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB) Solüsyonu

- 10 mg'lık DAB tableti (Sigma Aldrich)
- 16.6 ml TBS
- 10 μ l %3'lük H₂O₂

DAB tableti karanlıkta TBS içerisinde çözündürülür ve filtre kağıdından geçirilerek süzdürülür. Hızlıca 990 μ l alınır ve -20°C 'de muhafaza edilir. Gerektiğinde çözündürülür ve kullanmadan önce üzerine 10 μ l %3 'lük H₂O₂ ilave edilir.

Üçlü (Triple) Boyama Solüsyonları

Hematoksilen

Solüsyon A

- 1 g hematoksilen kristal
- 100 ml %96 alkol

Solüsyon B

- 99 ml / 95 ml distile su
- 1g / 4 ml (sıvı ise) FeCl₃ (Merck)
- 1 ml HCl

Metil Karbonat

- 125 ml distile su
- 125 ml metanol
- Distile suda eritilmiş çok az miktarda sodyum karbonat (Na₂CO₃, Merck)

Asit Fuksin

- 700 mg asit fuksin (Merck)
- 300 mg Orange G (Merck)
- 200 ml distile su
- 130 mg timol (Merck)
- 2 ml asetik asit (Merck)

Fosfofungustik Asit

- 3 g fosfofungustik asit (Fluka)
- 100 ml distile su

Anilin Blue

- 2 g anilin blue (Carlo Erba)
- 100 ml distile su
- 2 ml asetik asit

Asetik asit

- 2 ml glasiyal asetik asit (Merck)
- 100 ml distile su

Ek 2. Araştırmada kullanılan diğer malzeme, araç ve gereçler

- Paraplast (Fluka)
- Xsylvol (Merck)
- Etanol (Merck)
- Metanol (Merck)
- Parafin yağ (Sigma Aldrich)
- APES (Sigma Aldrich)
- Keçi serumu (Santa Cruz)
- Cam malzemeler (Invitrogen)
- Pastör pipetleri (Invitrogen)
- Steril petri kapları (Invitrogen)
- Entellan (Merck)
- Kaplama solüsyonu (Invitrogen)
- Sterio mikroskop (Olympus SZX7)
- Işık mikroskobu (Olympus CX21, Leica DC 200)
- Flöresan mikroskop (Olympus BX51)
- Floid mikroskop (Floid Cell Imaging Station, İnvitrogen)
- Isıtıcı tabla (Thermo plate, Tokai Hit Olympus)
- Block Heater (Stuart, SBH 130D/3)
- Laminar kabin (Nuaire, NU-437-400S)
- CO₂'li inkübatör (Nuaire, NU-5500E)
- Etüv (Memmert)
- Vakumlu parafin etüv (Thermo scientific, Heraeus)
- Mikrodalga fırın (Vestel)
- Buzdolapları (Vestel)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Göksel DOĞAN

Doğum Tarihi: 17.05.1985

Yazışma Adresi: Adnan Menders Üniversitesi

Veteriner Fakültesi

Histoloj-Embriyoloji Anabilim dalı

PK 17, 09016 Işıklı, Aydın, TÜRKİYE

Tel: 05434499813

Email : gksldogan@hotmail.com



ÖĞRENİM DURUMU

Yüksek Lisans (2009-2012) : Pamukkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü - Biyoloji Anabilim Dalı

Lisans (2004-2008) : Pamukkale Üniversitesi-Biyoloji Bölümü

Lisans Bitirme Tezi ve Tez Danışmanı: “Termofilik Bacillus (*Bacillus stearothermophilus* ve *B. Licheniformis*) türlerinin Cr (VI) indirgemesi ve eksopolisakkarit(EPS) üretimi” Doç. Dr. Nazime MERCAN DOĞAN, PAÜ, Denizli, 2008

Yüksek Lisans Tezi ve Tez Danışmanı: “*Pseudomonas* cinsi bakterilerde hegzavalent krom indirgemeye organik moleküllerin etkisi” Doç. Dr. Nazime Mercan Doğan, PAÜ, Denizli, 2012.

Yüksek Lisans Tezi Başlığı ve Tez Danışmanı: “Farelerde *in vitro* embriyo kültürü ve embriyo transferinin fetal trakeya dokusunda bazal hücrelerin sayısı üzerine etkisi” Doç. Dr. Levent Karagenç, ADÜ, Aydın, 2014.

TEŞEKKÜR

2014 yılında Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloj-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, Doç. Dr. Levent Karagenç'in danışmanlığı altında yürütülen bu çalışma yüksek lisans tezi olarak hazırlanmıştır. Tez çalışmamın başından sonuna kadar, öncesinde ve sonrasında, maddi ve manevi destek ve yardımlarını hiçbir zaman benden esirgemeyen, tecrübe ve eşsiz bilgilerinden yararlandığım değerli hocam Doç. Dr. Levent Karagenç'e,

İstatistiksel analizlerin yapılmasında bizden yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Mehmet Nurullah Orman'a, laboratuvar çalışmalarında destek ve yardımlarından dolayı Kerem Esmen'e, tez yazım aşamasındaki katkılarından dolayı değerli arkadaşım Ayşegül Yüksel'e, ve beni bugünlere getiren değerli aileme, özellikle de annem ve babama sonsuz teşekkürlerimi sunarım.