

Yazışma Adresi
Correspondence Address

Gökhan AKKOYUNLU
Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD,
Antalya, Türkiye

akkoyunlu@akdeniz.edu.tr

Geliş Tarihi : Ekim 02, 2021
Received

Kabul Tarihi : Şubat 15, 2022
Accepted

E Yayın Tarihi : Ocak 01, 2023
Online published

Bu makalede yapılacak atıf

Cite this article as

Uysal F, Çelik S, Topal Çelikkhan F,
Çelik Özenci Ç, Özkavukcu S,
Can A, Akkoyunlu G.

Ovaryum Kriyoprezervasyonu ve
Yeniden Transplantasyondan
Sonra Dnmt3a ve Dnmt3b Protein
İfadelerinin Düşmesi Bu Süreçte
DNA Metilasyonunun Bozulduğunu
Gösterir

Akd Tıp D 2023; 9(1): 82-89

Fatma UYSAL

Ankara Medipol Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Histoloji ve
Embriyoloji AD,
Ankara, Türkiye

ORCID ID: 0000-0002-9176-326X

Soner ÇELİK

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD,
Antalya, Türkiye

ORCID ID: 0000-0003-0467-1867

Ferda TOPAL ÇELİKKHAN

Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD,
Ankara, Türkiye

ORCID ID: 0000-0002-8254-0558

Ovaryum Kriyoprezervasyonu ve Yeniden Transplantasyondan Sonra Dnmt3a ve Dnmt3b Protein İfadelerinin Düşmesi Bu Süreçte DNA Metilasyonunun Bozulduğunu Gösterir

Dnmt3a and Dnmt3b Expressions Decrease After Cryopreservation and Re-Transplantation of Ovarian Tissue

ÖZ

Amaç:

DNA metilasyonu sürdürme ve de novo metilasyon süreçlerini içerir ve DNA metiltransferaz (Dnmt) enzimleri tarafından katalizlenir, ovaryum foliküllerinin gelişimi ile ilişkili genlerin metilasyonunda önemli role sahiptir. Çalışmamızın amacı, sıçanlarda ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonu ve yeniden transplantasyonu sonrasında Dnmt3a ve Dnmt3b protein düzeylerinin ekspresyonunun değişip değişmediğini değerlendirmektir.

Yöntemler:

Kontrol (K), donmuş/çözdürülmüş (DÇ), transplante edilmiş (T) ve dondurulmuş/çözdürülmüş ve yeniden transplante edilmiş (DÇT) olmak üzere dört grup oluşturuldu. Ovaryum doku parçalarını dondurmak için yavaş dondurma tekniği kullanıldı ve Dnmt3a ve Dnmt3b proteinlerinin ekspresyonu immünohistokimya yöntemi ile değerlendirildi.

Bulgular:

K ile karşılaştırıldığında, DÇ, T ve DÇT gruplarında ovaryum foliküllerinde Dnmt3a ve Dnmt3b ekspresyonu önemli ölçüde azaldı.

Sonuç:

Hem kriyoprezervasyon hem de yeniden transplantasyondan sonra değişen Dnmt enzimlerinin ekspresyonu sıçan folikülojenezi sırasında DNA metilasyonu süreçlerinin bozulması ile ilişkili olabilir.

Anahtar Sözcükler:

DNA metilasyonu, Dnmt enzimleri, Ovaryum doku kriyoprezervasyonu, Fertilitenin korunması

Çiler ÇELİK ÖZENCİ

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD,
Antalya, Türkiye

ORCID ID: 0000-0003-0370-8680

Sinan ÖZKAVUKÇU

Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD,
Ankara, Türkiye

ORCID ID: 0000-0003-4525-9027

Alp CAN

Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD,
Ankara, Türkiye

ORCID ID: 0000-0002-5393-6115

Gökhan AKKOYUNLU

Akdeniz Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Histoloji ve Embriyoloji AD,
Antalya, Türkiye

ORCID ID: 0000-0003-4500-8068

ABSTRACT**Objective:**

DNA methylation includes maintenance and de novo methylation process that are catalyzed by DNA methyltransferase (Dnmt) enzymes and these enzymes possess crucial roles in methylation of genes associated with the development of ovarian follicles. The aim of this study is to evaluate whether expression of Dnmt3a and Dnmt3b protein levels change after cryopreservation and re-transplantation of ovarian tissue in rats.

Methods:

Four groups were designed as; fresh control (FC), frozen/thawed (FT), fresh re-transplanted (T), and frozen/thawed and re-transplanted (FTT). Slow freezing was used to cryopreserve the ovarian tissue pieces and expression of Dnmt3a and Dnmt3b proteins was assessed by immunohistochemistry.

Result:

Expression of Dnmt3a and Dnmt3b significantly decreased in ovarian follicles in FT, T and FTT groups when compared with FCs.

Conclusion:

Expression of Dnmt enzymes has been altered both after cryopreservation alone and following re-transplantation cycles which may lead to disturbed DNA methylation processes during rat folliculogenesis.

Key Words:

DNA methylation, Dnmt enzymes, Ovarian tissue cryopreservation, Fertility preservation

GİRİŞ

Yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) amacı in vitro olarak dişi ve erkek gonadlarında infertilitenin tedavi edilmesi ve önlenmesidir. YÜT prosedürleri kontrollü over hiperstimülasyonu, in vitro fertilizasyon, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu, embriyo kültürü ve embriyo transferi gibi tekniklerden oluşurken, fertilitenin korunması için kriyoprezervasyon, gamet, embriyo, ovaryum ve testis dokularında yapılmaktadır (1-3). Literatürde, YÜT teknolojileriyle dünyaya gelen çocukların, doğal olarak gebe kalan çocuklara kıyasla epigenetik anomali riskinin daha yüksek olduğu bilinmektedir (4-6).

Epigenetik anomalilere ek olarak; artmış konjenital veya kromozomal anomaliler (7), doğum defektleri, (8) ve imprinting bozukluklarında (9) YÜT ile doğan çocuklarda öngörülmüştür. Çalışmalar, YÜT prosedürlerinin, global DNA metilasyon seviyelerini, Dnmt enzimlerinin ekspresyonunu ve histon modifikasyonlarını etkileyerek imprinting genlerin ekspresyonunu değiştirebildiğini bildirmiştir (1, 10).

DNA metilasyonu, hücrel farklılaşma, X kromozomu inaktivasyonu, tümör oluşumu, transkripsiyonel baskı/aktivasyon ve genomik baskılamada önemli rol oynar (11).

De novo metilasyon ve sürdürme metilasyonu gibi iki farklı DNA metilasyon mekanizması tanımlanmıştır; de novo metilasyon, metillenmemiş DNA zincirinin metilasyonundan sorumluyken, sürdürme metilasyon, DNA replikasyonu sırasında yarı-metillenmiş DNA zincirinin metilasyonunu sağlar. Bu zamana kadar tanımlanmış Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b, Dnmt3l ve Dnmt3c olmak üzere altı farklı DNA metiltransferaz enzimi (Dnmt) vardır. Dnmt3a ve Dnmt3b enzimleri de novo metilasyonda kritik role sahiptir ve yeni imprintlerin oluşmasını sağlar (12).

Kriyoprezervasyon (dondurarak saklama); hücrelerin ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısıya kadar soğutularak, bütün biyolojik aktivitelerinin durdurulması ve gelecekte kullanılması amacıyla saklanmasını ifade eder (13) ve YÜT’nde sıklıkla kullanılır. Kriyoprezervasyon yavaş dondurma ve vitrifikasyon olmak üzere iki farklı yöntemden oluşur. Her iki yöntem de farklı endikasyonlara sahip olsa da; gonad doku dondurmasında yavaş dondurma altın standart olarak kabul edilmektedir (13). Son birkaç yılda, artan sayıda çalışma, donma/çözülme süreçlerinin genetik ve epigenetik değişikliklere neden olduğunu, pluripotens belirteçlerinin ekspresyonunu azalttığını ve hücre sağkalımını ve işlevselliğini, DNA bütünlüğünü ve nükleer yapıları, protein ekspresyonunu ve hücre iskeletini olumsuz etkilediğini ortaya koymuştur (13).

Kriyoprezervasyonun sığır oositlerinde global DNA metilasyonunda düşüşe ve embriyolarında H19 gen ekspresyonunda artışa neden olduğu gösterilmiştir (2, 14).

Gelişim aşamaları boyunca memeli gametlerinde ve embriyolarında metilasyon değişiklikleriyle ilgili veriler olmasına rağmen, dondurarak saklama ve yeniden transplantasyonun dişi gonadların metilasyon durumu üzerindeki etkisi hala araştırmaya ihtiyaç duymaktadır. Bu çalışmanın amacı, kriyoprezervasyon ve transplantasyonunun sıçanlarda ovaryum foliküllerinde Dnmt3a ve Dnmt3b proteinlerinin ekspresyon düzeyi ve lokalizasyonu üzerine etkisini araştırmaktır. Çalışmamızda, hem kriyoprezervasyon hem de yeniden transplantasyon sonrasında ovaryum foliküllerinde Dnmt3a ve Dnmt3b protein seviyelerinin ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir, bu sonuç hem kriyoprezervasyonun hem de yeniden transplantasyonun de novo metilasyon süreçleri ile ilgili epigenetik değişikliklere neden olabileceğini göstermiştir.

GEREÇ ve YÖNTEM**Deneysel tasarımı**

Deneysel protokolü Ankara Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından 2013-14-101 protokol numarası ile ve Akdeniz Üniversitesi 2013.06.03 protokol numarası ile onaylanmıştır. Beş haftalık Wistar dişi sıçanlar (n=24) Ankara Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Birimi’nde 12 saat aydınlık-karanlık döngüsünde tutularak barındırılmıştır.

Hayvanlar arasındaki östrus siklusu farklılıklarını ortadan kaldırmak için; dört gruptan elde edilen ovaryumlar 8 eşit parçaya (~1mm³ doku) ayrılmıştır. Dört grubu oluşturmak

için her sıçandan iki ovaryum parçası kullanılmıştır; i) kontrol (K) grubu, ii) ovaryum parçalarının sıcaklık kontrollü bir yavaş dondurucuda dondurulduğu ve 2 hafta sonra çözüldüğü dondurulmuş/çözdürülmüş (DÇ) grubu, iii) ovaryum parçalarının yeniden aynı sıçanın sırt kasına (M. trapezius) transplante edildiği (oto-transplant, heterotopik transplantasyon (T)), iv) dondurularak/çözüldükten sonra sıçanın sırt kasına transplante edildiği (DÇT) grup. Deneysel protokolün özeti Şekil 1'de sunulmuştur.

Ovaryum dokusu kriyoprezervasyonu

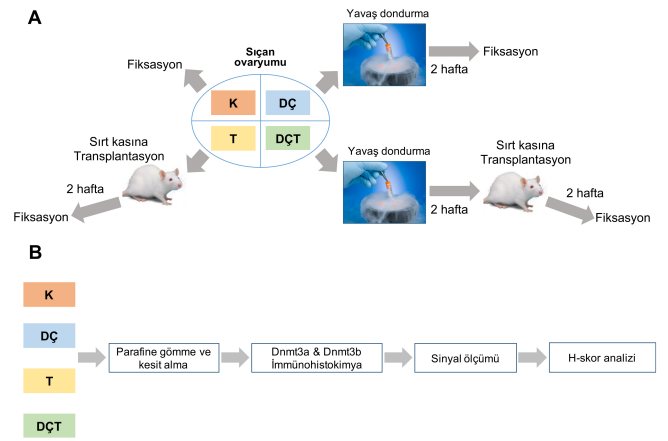
Yavaş dondurma ve çözme:

Ovaryum dokularının kriyoprezervasyonu, daha önce yapılan bir protokole göre yavaş bir dondurucu kullanılarak (IceCube; SyLab, Neupurkersdorf, Avusturya) ile yapılmıştır (21). Dondurucuya yüklenmeden önce, dokular ilk olarak Leibovitz-15 (L-15) ortamında 1.5 M dimetil sülfoksit (DMSO), 0.1 M sukroz ve %20 fetal sıgır serumu (FBS) içeren 1 mL kriyoprotektif solüsyona aktarılıp ve 4°C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Dokular yavaş dondurucuya konulduktan sonra sıcaklık 0°C'den -7°C'ye 2°C/dk hızında soğutulmuş ve ardından -7°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 0.3°C/dk hızla -40°C'ye soğutulup ardından -80°C'ye 5°C/dk hızında soğutma yapılmıştır. Sıvı nitrojene daldırılmadan önce dokular 10°C/dakika hızında -120°C'ye soğutulmuştur.

Çözme işlemi için; iki haftalık kriyoprezervasyondan sonra ovaryum dokularını içeren kriyoviyaller sıvı nitrojenden çıkarılıp oda sıcaklığında 1 dakika tutulmuştur ve tam erime sağlanana kadar 37°C'lik su banyosunda eritilmiştir. Dokular daha sonra 5 dakika süreyle 1M DMSO ve 0.1M sakaroz içeren L-15 ortamında inkübe edilmiştir. Daha sonra numuneler sırasıyla 0.5M DMSO ve 0.1M sukroz içeren L-15 ortamına ve 0.05M sadece sukroz içeren L-15 ortamına konulmuştur. Son olarak L-15 ortamına aktarılan ovaryum parçaları deney gruplarına dağıtılmıştır.

Parafine gömme

Dokular Bouin solüsyonunda (Sigma-Aldrich) oda sıcaklığında 4 saat tutulmuştur ve artan etanol seviyeleri ile dehidre edilip, ksilende şeffaflaştırıldıktan sonra parafine gömülmüştür. Pozitif yüklü slaytlara (Thermo Sci., Rockford, IL, ABD) 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak immünohistokimyasal analiz yapılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Deneysel tasarımı. A) Grupların oluşturulması. B) Elde edilen dokuların histolojik tekniklerde kullanılması. K; kontrol, DÇ; donmuş/çözdürülmüş, T; transplante edilmiş, DÇT; dondurulmuş/çözdürülmüş ve yeniden transplante edilmiş.

İmmünohistokimya

Avidin-biotin peroksidaz yöntemi, Dnmt3a ve Dnmt3b protein ekspresyonunun dağılımını ve yoğunluğunu saptamak için kullanılmıştır. Kısaca, kesitlerin gece boyunca 60°C'de inkübasyonundan sonra dokular ksilen içinde parafinden arındırılmıştır ve ardından azalan etanol konsantrasyon serilerinde rehidre edilmiştir. Ardından, epitoplara açılması için kesitler, mikrodalga fırın (750 watt'ta 2x5 dakika) kullanılarak sitrat tamponu (pH 6.0) içine alınmıştır. Endojen peroksidaz aktivitesi, oda sıcaklığında 20 dakika boyunca %3 hidrojen peroksit içeren metanol içinde bloke edilmiştir. Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) ile birkaç yıkamanın ardından, antikorların spesifik olmayan bağlanmasını önlemek için kesitler, oda sıcaklığında 7 dakika bloke edici tampon (Thermo Scientific) ile bloke edilmiştir. Kesitler primer antikorlarla inkübe edilmiştir: Dnmt3a (1:300; katalog no. ab23565, Abcam) ve Dnmt3b (1:300; katalog no. ab2851, Abcam). Her slayttaki üç kesitten biri, negatif kontrol (primer antikorun olmadığı) olarak kullanılmıştır. Negatif kontrol aşamasının önemi, kullanılan antikorun spesifikliğini göstermek içindir. PBS içinde yıkanan kesitler, sekonder antikor (1:400; katalog no. BA-1000, Vector) ile oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübe edilmiştir. Son olarak kesitler streptavidin-horseradish peroxidase (HRP) kompleksi (katalog no. TS-125, Thermo Scientific) ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilmiştir. İmmün reaksiyonları görselleştirmek için 3,3'-diaminobenzidin (DAB) kromojeni (katalog no. D4168, Sigma-Aldrich) kullanılmıştır ve su ile yıkandıktan sonra kesitler Mayer hematoksilen ile boyanmıştır. Görüntüler x20, x40 ve x100 büyütmelemlerde mikroskoptan (Carl Zeiss, Oberkochen, Almanya) elde edilmiştir.

Total ovaryum değerlendirmeleri için; her gruptaki Dnmt3a ve Dnmt3b proteinlerinin ekspresyon seviyeleri ImageJ yazılımı (NIH, ABD) ile analiz edilirken ovaryum folikülü değerlendirmeleri için; ekspresyon seviyeleri H-Score ile analiz edilmiştir.

H-skor analizi

Dnmt3a ve Dnmt3b H-skorumları, sitoplazmik veya nükleer ekspresyonlarının yoğunluğuna göre her folikül tipi için aşağıdaki formülle elde edilmiştir. Skor, 3x güçlü boyama yüzdesi + 2x orta düzeyde boyama + zayıf boyama yüzdesi olup, 0 ila 300 aralığındadır. Her grupta, Dnmt3a ve Dnmt3b protein ekspresyon seviyeleri için her aşamadan en az 10 ovaryum folikülü değerlendirildi ve ortalama bir puan elde edilmiştir. Değerlendirilen folikül sayıları; Primordiyal folikül: 30-40, Primer folikül: 20-40, Sekonder folikül: 10-30, Tersiyer folikül: 10-30.

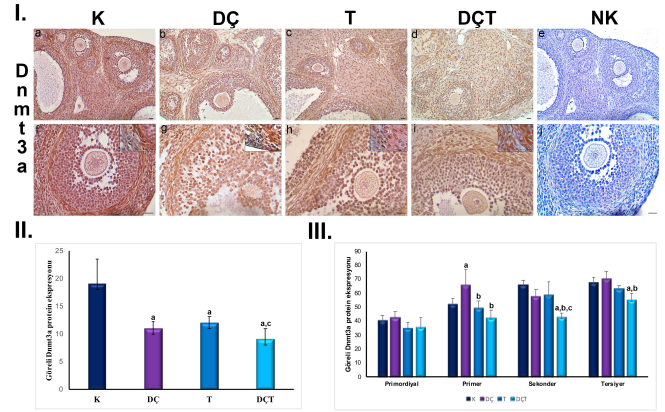
İstatistiksel analiz

Tüm gruplardaki Dnmt3a ve Dnmt3b'nin ifade seviyeleri, ANOVA ile analiz edilmiştir, ardından gruplar arasındaki farklılıkları ele almak için Dunn'in post-hoc testleri yapılmıştır. İstatistiksel analiz için SigmaStat (versiyon 3.5, Jandel Scientific Corp.) program kullanılmıştır ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Şiçan ovaryumlarında ve foliküllerinde Dnmt3a ekspresyonu

DÇ, T ve DÇT gruplarında Dnmt3a'nın ekspresyon seviyeleri ve hücre lokalizasyonları analiz edildi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Kontrol grubunda, granüloza, teka interna ve ovaryum interstisyel hücrelerinin sitoplazma ve çekirdeklerinde Dnmt3a ekspresyonu mevcuttu (Şekil 2/I-a ve f). DÇ, T ve DÇT gruplarının granüloza, teka interna ve ovaryum interstisyel hücrelerinde ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha düşüktü ($p < 0,05$) (Şekil 2/I b, c, d, g, h ve i). Ayrıca kontrol grubundaki foliküllerin oositlerinde Dnmt3a ekspresyonu mevcuttu (Şekil 2/I a ve f). DÇ, T ve DÇT gruplarının oositlerinde Dnmt3a ekspresyonu değişmedi (Şekil 2/I b, c, d, g, h ve i). Negatif kontrol boyaması, antikorun spesifik olmayan bağlanmasını göstermedi (Şekil 2/e, j). İmmün işaretlemeler nicelleştirildiğinde; DÇ, T ve DÇT gruplarında Dnmt3a ekspresyon düzeyinde azalma, DÇT grubunda T grubuna göre Dnmt3a ekspresyonunda daha fazla azalma izlendi (Şekil 2/II).



syonu, kontrol grubunda (K) (a, f), donmuş/çözdürülmüş grup (DÇ) (b, g); transplante edilmiş grup (T) (c, h); dondurulmuş/çözdürülmüş ve yeniden transplante edilmiş grup (DÇT) (d, i), primordiyal foliküller (f-i) ve negatif kontrol (e, j) gösterilmiştir. II) Tüm grupların ovaryumlarında Dnmt3a proteininin görel ekspresyon seviyesi. III) Farklı evrelerdeki ovaryum foliküllerinde Dnmt3a proteininin görel ekspresyon seviyesi. Sütunlardaki harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p < 0,05$). a: K grubundan önemli ölçüde farklı. b: DÇ grubundan önemli ölçüde farklı. c: T grubundan önemli ölçüde farklı. Dnmt3a ekspresyon seviyesi, DÇ, T ve DÇT gruplarında kontrol grubuna (a olarak gösterilen) kıyasla önemli ölçüde daha düşüktü; Dnmt3a ekspresyon seviyesi, DÇT grubunda T grubu ile karşılaştırıldığında (c ile gösterilen) önemli ölçüde daha düşüktü. Ölçek çubukları = 20 μ m.

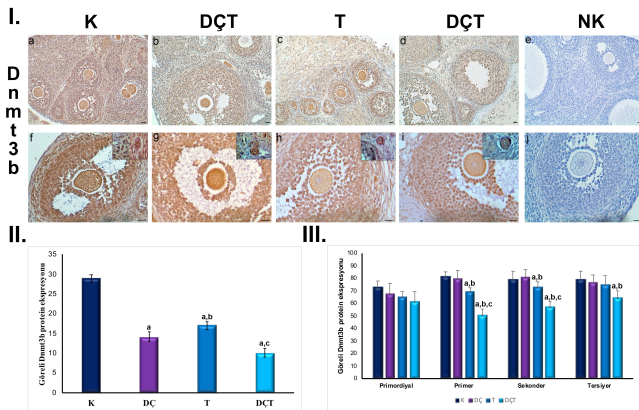
Dnmt3a ekspresyonu ovaryum foliküllerinde değerlendirildi. Primordiyal foliküllerde; Dnmt3a'nın ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DÇ, T ve DÇT gruplarında benzerdi (Şekil 2/III). Primer foliküllerde; Dnmt3a ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DÇ grubunda önemli ölçüde arttı ($p < 0,05$). Ayrıca Dnmt3a ekspresyonu, T ve DÇT gruplarında DÇ grubuna göre azaldı ($p < 0,05$). Sekonder foliküllerde; Dnmt3a ekspresyonu, kontrol, DÇ ve T grupları ile karşılaştırıldığında DÇT grubunda önemli ölçüde azaldı ($p < 0,05$). Tersiyer foliküllerinde; Dnmt3a ekspresyonu DÇT grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalırken ($p < 0,05$), DÇT grubunda DÇ grubuna göre ekspresyonu anlamlı olarak azaldı ($p < 0,05$).

Şiçan ovaryumlarında ve foliküllerinde Dnmt3b ekspresyonu

DÇ, T ve DÇT gruplarında Dnmt3b'nin ekspresyon seviyeleri ve hücre lokalizasyonları analiz edildi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Kontrol grubunda, granüloza, teka interna ve ovaryum interstisyel hücrelerinin sitoplazma ve çekirdeklerinde Dnmt3b ekspresyonu mevcuttu (Şekil 3/I a ve f). DÇ, T ve DÇT gruplarının granüloza, teka interna ve ovaryum interstisyel hücrelerinde ekspresyonu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ($p < 0,05$) (Şekil 3/I b, c, d, g, h ve i) anlamlı olarak daha düşüktü. Ayrıca kontrol grubundaki foliküllerin oositlerinde de Dnmt3b ekspresyonu mevcuttu (Şekil 3/I a ve f). DÇ, T ve DÇT gruplarının oositlerinde Dnmt3b ekspresyonu değişmedi (Şekil 3/I b, c, d, g, h ve i). Dnmt3a ifadesi ile karşılaştırıldığında; Dnmt3b ekspresyonu, çeşitli gelişim aşamalarında tüm foliküllerin oositlerinde daha yüksek immün boyama yoğunluğuna sahipti. İmmün işaretlemeler nicelleştirildiğinde; Dnmt3b ekspresyon düzeyi

T grubunda DÇ grubuna göre daha yüksekti ve Dnmt3b ekspresyonu DÇT grubunda T grubuna göre anlamlı olarak azaldı ($p<0.05$) (Şekil 3/II).

Dnmt3b ekspresyonunun dağılımı ovaryum foliküllerinde değerlendirildi. Primordial foliküllerde; Dnmt3b'nin ifadesi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DÇ, T ve DÇT gruplarında benzerdi (Şekil 3/I f-i girişleri ve Şekil 3/III). Primer foliküllerde; Dnmt3b ekspresyonu, kontrol ve DÇ grupları ile karşılaştırıldığında, T ve DÇT gruplarında önemli ölçüde azaldı ($p<0.05$). Ayrıca, Dnmt3b ekspresyonu, DÇT grubunda T grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldı ($p<0.05$) (Şekil 3/III). Sekonder foliküllerde; Dnmt3b ekspresyonu, kontrol ve DÇ grupları ile karşılaştırıldığında T ve DÇT gruplarında anlamlı olarak azaldı ($p<0.05$). Ayrıca Dnmt3b ekspresyon seviyesi DÇT grubunda T grubuna göre daha düşüktü ($p<0.05$) (Şekil 3/III). Tersiyer foliküllerde; Dnmt3b'nin ekspresyonu, DÇT grubunda kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azalırken ($p<0.05$), DÇT grubunda DÇ grubuna kıyasla ekspresyonu önemli ölçüde azaldı ($p<0.05$) (Şekil 3/III).



Şekil 3. Ovaryum dokularında Dnmt3a'nın ekspresyonu. I) Dnmt3b ekspresyonu, kontrol grubunda (K) (a, f), donmuş/çözdürülmüş grup (DÇ) (b, g); transplante edilmiş grup (T) (c, h); dondurulmuş/çözdürülmüş ve yeniden transplante edilmiş grup (DÇT) (d, i), primordial foliküller (f-i) ve negatif kontrol (e, j) gösterilmiştir. II) Tüm grupların ovaryumlarında Dnmt3b proteininin göreceli ekspresyon seviyesi. III) Farklı evrelerdeki ovaryum foliküllerinde Dnmt3b proteininin göreceli ekspresyon seviyesi. Sütunlardaki harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılıkları göstermektedir ($p<0.05$). a: K grubundan önemli ölçüde farklı. b: DÇ grubundan önemli ölçüde farklı. c: T grubundan önemli ölçüde farklı. Dnmt3b ifadesi, DÇ, T ve DÇT gruplarında, kontrol grubuyla (a olarak gösterilen) karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha azdı; Dnmt3b ekspresyon seviyesi, T grubunda DÇ grubuna göre anlamlı derecede yüksekti (b ile gösterilmiştir); Dnmt3b ekspresyon seviyesi, DÇT grubunda T grubuna göre (c ile gösterilen) önemli ölçüde daha düşüktü. Ölçek çubukları = 20 μ m.

TARTIŞMA

Bu çalışmada, hem tek başına kriyoprezervasyonun hem de yeniden transplantasyon süreçlerinin sıçan ovaryumlarında ve foliküllerinde Dnmt3a ve Dnmt3b ekspresyonlarını değiştirdiğini gösterdik. DÇ, T ve DÇT gruplarındaki Dnmt3a ve Dnmt3b ekspresyonları, kontrol grubuna göre önemli ölçüde azaldı. Bu bulgu, ovaryum dokusu kriyoprezervasyonundan ve yeniden transplantasyondan sonra, olası bozulmuş epigenetik modifikasyonlarla ilişkili olabilecek ve gelecek neslin sağlığı için önemli olan değişen DNA metilasyonunu yansıtmaktadır.

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, YÜT yöntemleriyle dünyaya gelen çocukların, doğal yolla dünyaya gelen çocuklara kıyasla, kromozom anomalilerinde, doğum kusurlarında, epigenetik anomalilerde ve Beckwith-Widemann, Silver Russell, Angelman ve Prader-Willi sendromları gibi imprinting bozukluklarında artış gösterdiğini ortaya koymuştur (9). Genellikle süperovülasyon, in vitro embriyo kültürü ve kriyoprezervasyon gibi YÜT tekniklerinin bu patolojilerin altında yatan sebeplerden olabileceği düşünülmektedir. YÜT'nin bir parçası olan kriyoprezervasyon tekniği, canlı hücre ve dokuların düşük sıcaklıklarda korunmasını sağlar ve genellikle infertilite tedavilerinde kullanılır. Yakın zamanda, Chatterjee ve ark. kriyoprezervasyonun, embriyolarda ve oositlerde DNA metilasyon süreçleri veya Dnmt ifadeleri dahil olmak üzere genetik ve epigenetik mekanizmaları bozduğunu gösteren bir dizi çalışmayı derlemiştir (13).

Vitrifikasyondan sonra sığır oositlerinde DNA metilasyonunun azaldığı gösterilmiştir (15). Milroy ve ark., Oct4 ve Sox2'nin promotör metilasyonunun vitrifiye edilmiş fare oositlerinde kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığını bulmuştur (16). Ek olarak, Cheng ve ark., taze oositlere kıyasla vitrifiye fare oositlerinde Dnmt1, Dnmt3a, Dnmt3b ve Dnmt3l genlerinin ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (17). Yapılmış olan bu çalışmalarda, Dnmt enzimlerinin ekspresyonlarının vitrifikasyon işleminden sonra azaldığı gösterilmiştir. Çalışmamızda ise Dnmt3a ve Dnmt3b ekspresyonlarının oositte değişmediğini gösterdik. Bu farklılığın türler ve teknikler arası farklılıklardan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Stinshoff ve ark. sığır blastokistlerinde konvansiyonel kriyoprezervasyon (yavaş dondurma) ve vitrifikasyonun etkilerini karşılaştırmışlardır ve konvansiyonel olarak kriyoprezerve edilen sığır blastokistlerinde Dnmt3a ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını bildirmişlerdir, ancak vitrifiye blastokistler ile kontrol blastokistleri arasında Dnmt3a'nın gen ekspresyon seviyesinde herhangi bir fark bulmamışlardır (18). Bu çalışmada ise diğer çalışmaların aksine vitrifikasyon işleminden sonra enzim ekspresyonlarının değişmediği rapor edilmiştir. Ek olarak, Hu ve ark. sığır oositlerinde global DNA metilasyonunun hem yavaş dondurma hem de vitrifikasyondan sonra önemli ölçüde azaldığını bulmuştur (2). Bu çalışmalara uygun olarak, sonuçlarımız, kriyoprezervasyonun ve yeniden transplantasyonundan sonra ovaryum dokusunda ve foliküllerinde Dnmt3a ve Dnmt3b ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığını göstermektedir. DNA metilasyonu Dnmt'lar tarafından katalize edilir, bu nedenle azalmış Dnmt ekspresyonu, global DNA metilasyonunda bir azalmaya neden olabilir ve ovaryum dokusu ve foliküllerde epigenetik profili değiştirebilir. Ayrıca, taze yeniden transplante edilmiş veya kriyoprezerve edilip yeniden transplante edilmiş ovaryum dokusunda, Dnmt3a ve Dnmt3b proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin, transplantasyonun kendisinin DNA metilasyon durumunu değiştirebileceğini göstermiştir. Büyüyen foliküllerde, kontrole kıyasla DÇT grubunda Dnmt3a ve Dnmt3b proteinlerinin ekspresyonu önemli ölçüde azalmıştır. Dnmt'ların zamansal ifadesi, ovaryum ve foliküllerinde DNA metilasyonu için kritik olabilir, çünkü

gelişimle ilgili genlerin transkripsiyonel aktivitelerini düzenlemektedirler. Primordiyal folikül rezervini kontrol eden baskılayıcı genlerin/proteinlerin ekspresyonunun, özellikle transplantasyondan sonra, ovaryan kriyoprezervasyonu ardından değiştiği daha önceden gösterilmiştir (19). Çalışmamızda, DNA metilasyonunu gerçekleştiren enzimlerin de yapılan işlemlerden sonra değiştiği gösterilmiştir. Bilindiği üzere; DNA metilasyonu genlerin kontrolünü sağlayan ana şaltire benzetilir. Gen ekspresyonlarındaki değişim DNA metilasyonu ile ilişkili olup genlerin baskılanması ya da aktivasyonu DNA metilasyonunun kontrolündedir. Primordiyal folikül rezervini kontrol eden baskılayıcı genlerin/proteinlerin ekspresyonunun değişmesi DNA metilasyonunun değişiminden kaynaklanıyor olabilir.

Ovaryum graflarının başarılı implantasyonu revaskülarizasyon periyoduna bağlıdır, çünkü doku implantları anjiyogenez oluşana kadar iskemik hasara maruz kalır (20). Hipoksik stresin global DNA metilasyonu veya DNA demetilasyon süreçlerini ve ayrıca çeşitli dokularda Dnmt enzimlerinin ekspresyonunu değiştirdiği bilinmektedir (21-23). Bu nedenle, nakledilen ovaryum dokusunda hipoksik stresin başlıca nedeni olan gecikmiş yeniden damarlanma sürecinin, modelimizde Dnmt3a ve Dnmt3b'nin değiştirilmiş ekspresyonunu indükleyebileceğini tahmin etmek mümkündür.

SONUÇ

Kriyoprezervasyonun Dnmt3a ve Dnmt3b protein ekspresyonu üzerindeki etkisini analiz eden ve yeniden transplantasyon işleminin etkisini test eden çalışmamız, kriyoprezervasyon ve yeniden transplantasyonun sıçan ovaryumlarında Dnmt3a ve Dnmt3b ekspresyonlarını önemli ölçüde değiştirdiğini göstermiştir. Dnmt genlerinin eksikliğinin imprinting bozukluklarına, epigenetik anomalilere, embriyonik ölüme veya maternal baskı kaybına yol açtığı bilindiğinden, DNA metilasyon durumunun dondurarak saklama ve yeniden transplantasyonun ardından değişebileceğini vurgulamak önemlidir. Deney hayvanlarında ve özellikle insanda daha ileri ve moleküler çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Teşekkür:

Verileri sağlayan tüm yazarlara teşekkür ederiz.

Etik Komite Onayı:

Bu araştırma, ilgili tüm ulusal düzenlemelere, kurumsal politikalara ve Helsinki Bildirgesinin ilkelerine uygundur ve Ankara Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Hayvan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (onay numaraları sırasıyla: 2013-14-101 ve 2013.06.03).

Yazar Katkıları:

Fikir - F.U., Ç.Ç.Ö.; Tasarım - F.U., Ç.Ç.Ö., S.Ç., G.A.; Denetleme - Ç.Ç.Ö., G.A.; Kaynaklar - Ç.Ç.Ö., G.A.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - F.U., S.Ç., F.T.Ç., S.Ö.; Analiz ve/veya Yorum - F.U., Ç.Ç.Ö., S.Ç., G.A.; Literatür Taraması F.U., S.Ç.; Yazıyı Yazan - F.U.; Eleştirel İnceleme - Ç.Ç.Ö., A.C., G.A.

Çıkar Çatışması:

Yazarların beyan edecek çıkar çatışması yoktur.

Finansal Destek:

Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, 2013.02.0122.013 ve 2014.02.0122.013 numaralı proje numaraları ile bu araştırmaya kısmen destek vermiştir.

1. Huffman SR, Pak Y, Rivera RM. Superovulation induces alterations in the epigenome of zygotes, and results in differences in gene expression at the blastocyst stage in mice. *Molecular reproduction and development*. 2015;82(3):207-17.
2. Hu W, Marchesi D, Qiao J, Feng HL. Effect of slow freeze versus vitrification on the oocyte: an animal model. *Fertility and sterility*. 2012;98(3):752-60 e3.
3. Zhao XM, Ren JJ, Du WH, Hao HS, Wang D, Qin T, et al. Effect of vitrification on promoter CpG island methylation patterns and expression levels of DNA methyltransferase 1 α , histone acetyltransferase 1, and deacetylase 1 in metaphase II mouse oocytes. *Fertility and sterility*. 2013;100(1):256-61.
4. Halliday J, Oke K, Breheny S, Algar E, D JA. Beckwith-Wiedemann syndrome and IVF: a case-control study. *American journal of human genetics*. 2004;75(3):526-8.
5. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *New Engl J Med*. 2002;346(10):725-30.
6. Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *The New England journal of medicine*. 2002;346(10):731-7.
7. Jwa J, Jwa SC, Kuwahara A, Yoshida A, Saito H. Risk of major congenital anomalies after assisted hatching: analysis of three-year data from the national assisted reproduction registry in Japan. *Fertility and sterility*. 2015;104(1):71-8.
8. Meijerink AM, Oomen RE, Fleischer K, IntHout J, Woldringh GH, Braat DD. Effect of maternal and treatment-related factors on the prevalence of birth defects after PESA-ICSI and TESE-ICSI: a retrospective cohort study. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2015;94(11):1245-53.
9. Pinborg A, Loft A, Romundstad LB, Wennerholm UB, Soderstrom-Anttila V, Bergh C, et al. Epigenetics and assisted reproductive technologies. *Acta obstetrica et gynecologica Scandinavica*. 2016;95(1):10-5.
10. Fauque P, Jouannet P, Lesaffre C, Ripoche MA, Dandolo L, Vaiman D, et al. Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC developmental biology*. 2007;7:116.
11. Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie*. 2015;116:103-13.
12. Turek-Plewa J, Jagodzinski PP. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett*. 2005;10(4):631-47.
13. Chatterjee A, Saha D, Niemann H, Gryshkov O, Glasmacher B, Hofmann N. Effects of cryopreservation on the epigenetic profile of cells. *Cryobiology*. 2017;74:1-7.
14. Zhao XM, Ren JJ, Du WH, Hao HS, Wang D, Liu Y, et al. Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on methylation of the putative imprinted control region of H19 during the in vitro development of vitrified bovine two-cell embryos. *Fertility and sterility*. 2012;98(1):222-7.
15. Magnusson V, Feitosa WB, Goissis MD, Yamada C, Tavares LM, D'Avila Assumpcao ME, et al. Bovine oocyte vitrification: effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. *Animal reproduction science*. 2008;106(3-4):265-73.
16. Milroy C, Liu L, Hammoud S, Hammoud A, Peterson CM, Carrell DT. Differential methylation of pluripotency gene promoters in in vitro matured and vitrified, in vivo-matured mouse oocytes. *Fertility and sterility*. 2011;95(6):2094-9.
17. Cheng KR, Fu XW, Zhang RN, Jia GX, Hou YP, Zhu SE. Effect of oocyte vitrification on deoxyribonucleic acid methylation of H19, Peg3, and Snrpn differentially methylated regions in mouse blastocysts. *Fertility and sterility*. 2014;102(4):1183-90 e3.
18. Stinshoff H, Wilkening S, Hanstedt A, Bruning K, Wrenzycki C. Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*. 2011;76(8):1433-41.
19. Celik S, Celikkan FT, Ozkavukcu S, Can A, Celik-Ozenci C. Expression of inhibitor proteins that control primordial follicle reserve decreases in cryopreserved ovaries after autotransplantation. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(4):615-26.
20. Demeestere I, Simon P, Emiliani S, Delbaere A, Englert Y. Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update*. 2009;15(6):649-65.

21. Alivand MR, Soheili ZS, Pornour M, Solali S, Sabouni F. Novel Epigenetic Controlling of Hypoxia Pathway Related to Overexpression and Promoter Hypomethylation of TET1 and TET2 in RPE Cells. *Journal of cellular biochemistry*. 2017.
22. Skowronski K, Andrews J, Rodenhiser DI, Coomber BL. Genome-wide analysis in human colorectal cancer cells reveals ischemia-mediated expression of motility genes via DNA hypomethylation. *PloS one*. 2014;9(7):e103243.
23. Watson CJ, Collier P, Tea I, Neary R, Watson JA, Robinson C, et al. Hypoxia-induced epigenetic modifications are associated with cardiac tissue fibrosis and the development of a myofibroblast-like phenotype. *Human molecular genetics*. 2014;23(8):2176-88.