

SPERMATOOZOA VE EMBRİYOLARIN GEN EKSPRESYON ANALİZİ ÖNCESİNDE RNA İZOLASYONU VE HÜCRESEL RNA MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

RNA ISOLATION AND DETECTION OF CELLULAR RNA QUANTITY OF SPERMATOOZOA AND EMBRYOS PRIOR TO GENE EXPRESSION ANALYSES

Bilge ÖZSAİT SELÇUK* , Neslihan ÇOBAN** , Dilek SEVER KAYA** , Sibel BULGURCUOĞLU KURAN*** , Selva TÜRKÖLMEZ** , Özlem DURAL***

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı ve İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

**İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

***İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Özsaıt Selçuk B, Çoban N, Sever Kaya D, Bulgurcuoğlu Kuran S, Türkölmez S, Dural Ö. RNA Isolation and Detection of Cellular RNA Quantity of Spermatozoa and Embryos Prior to Gene Expression Analyses. J Ist Faculty Med 2018; 81(4): 119-126.

ÖZET

Amaç: Üreme biyolojisi araştırmalarında kullanılan örnekler genellikle, zor ulaşılabilir, nadir ve tekrarı olmayan hücre gruplarıdır. Diğer yandan, az sayıda hücre ile çalışıldığından dolayı, genetik analizlerde standart olarak kullanılan yöntemlerde modifikasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada amacımız, gen ekspresyonu araştırmalarında kullanılabilecek optimal düzeydeki total RNA'nın elde edilebilmesi amacı ile spermatozoa ve embriyo örneklerinden RNA izolasyon yönteminin geliştirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Yardımla üreme tedavisi kapsamında kullanılmak amacı ile hazırlanan ve fertilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra geriye kalan spermatozoa örneği diğer kontaminant hücrelerden saflaştırılarak dondurulmuştur. Diğer yandan, embriyo transferinden sonra geriye kalan preimplantasyon dönem embriyolar fosfat tamponlu tuz – polivinil alkol (PBS-PVA) karışımı içerisinde dondurularak saklanmıştır. Spermatozoa ve embriyolardan optimal düzeyde total RNA elde edilmesi amacı ile çeşitli optimizasyonlar yapılmıştır. Elde edilen total RNA'lar kaliteleri ve miktarları açısından değerlendirilmiştir. Spermatozoonda 28S ribozomal RNA (rRNA)'nın seçimli olarak degrade olmasından dolayı total RNA kalitesi, Bioanalyzer cihazı ile gerçekleştirilen analize ek olarak gerçek zamanlı kantitatif PCR ile gen amplifikasyonu yapılarak da kontrol edilmiştir.

Bulgular: İzolasyonda yapılan uyarlamalardan sonra, takip eden gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılabilecek kalitede ve miktarda total RNA elde edilmiştir. Ek olarak, örneklerden elde edilen hücresel total RNA miktarlarının önceki çalışmalar ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

ABSTRACT

Objective: Biological samples that are analyzed in reproductive biology are generally rare, difficult to obtain, and a nonreplicable group of cells. Furthermore, investigating low numbers of cells requires modifications to the routine methods used in genetic analyses. The aim of our study was to improve RNA isolation methods for obtaining a sufficient amount of total RNA from spermatozoa and embryo samples for downstream gene expression analyses.

Materials and Methods: Excess spermatozoa samples (that had been prepared in the scope of assisted reproduction treatment) were purified of any contaminant cells and then frozen. Preimplantation stage embryos that had not been selected for embryo transfer were frozen in a phosphate-buffered saline–polyvinyl alcohol (PBS–PVA) solution. Modifications were done to obtain the optimal amount of total RNA from the spermatozoa and embryos, and subsequently both the quality and the quantity of the total RNA samples were assessed. Because of the selective degradation of 28S RNA samples in the spermatozoa, the total RNA quality was evaluated by gene amplification using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) in addition to Bioanalyzer analysis.

Results: Following the modifications to the isolation technique, a sufficient quality and quantity of total RNA were obtained from the spermatozoa and embryo samples, which could be used in downstream gene expression analyses. Furthermore, the amount of cellular total RNAs was consistent to that reported in previous studies.

İletişim kurulacak yazar/Corresponding author: ozsaitb@istanbul.edu.tr

Geliş tarihi/Received Date: 19.04.2018 • **Kabul tarihi/Accepted Date:** 23.07.2018

©Copyright 2018 by J Ist Faculty Med - Available online at jmed.istanbul.edu.tr

©Telif Hakkı 2018 J Ist Faculty Med - Makale metnine jmed.istanbul.edu.tr web sayfasından ulaşılabilir.

Sonuç: Daha sonra yapılması planlanan transkript profillemeye araştırmaları için ön bir çalışma olarak gerçekleştirilen bu deneylerin sonucunda elde edilen bulgular, RNA izolasyon protokollerinde yapılan uyarlamaların etkin olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Spermatozoon, preimplantasyon dönem embriyo, RNA

Conclusion: Results obtained from these experiments - conducted as a preliminary work for further transcript profiling studies - indicate that the modifications used in the RNA isolation techniques were effective.

Keywords: Spermatozoon, preimplantation stage embryo, RNA

GİRİŞ

İnfertilite, üreme çağındaki bireylerin yaklaşık %15'ini etkileyen bir sorundur (1). İnfertil çiftlerin tedavisinde kullanılan yardımcı üreme teknikleri, normal şartlarda gebeliğin oluşamayacağı durumlarda bireylere kendi genetik özelliklerini taşıyan çocuk sahibi olma şansını tanımaktadır. Yardımla üreme tedavisi (YÜT) sırasında oosit ve spermatozoonun özelliklerine ve de infertilite nedenine bağlı olarak çeşitli kalitede embriyolar elde edilebilmektedir. Bu tedavi kapsamında embriyo transferi için kaliteli embriyonun seçimi temel olarak, gelişen embriyoların morfolojik özelliklerine dayanarak yapılmaktadır (2-4). Diğer yandan, YÜT'nin başarısı sadece transfer edilen embriyo kalitesi ile ilişkili değil, anne adayının yaşı, endometrium kalitesi, hormon profili ve çiftin infertilite hikayesi gibi diğer değişkenler ile de bağlantılıdır. Ancak, henüz kesin olarak açıklanamayan moleküler nedenlerden dolayı, bazı olgularda tüm tedavi ve teknik basamaklar en iyi şekilde sonuçlansa bile kaliteli embriyo gelişimi olmamakta ya da kaliteli embriyoların anne adayına transferinden sonra gebelik elde edilememektedir. Güncel verilerin sonuçlarına göre, uygulanan her üç tedavi siklusundan iki tanesi implantasyon başarısızlığı ile sonuçlanmakta ve transfer edilen her on embriyodan sekizi implante olamamaktadır (5).

Fertilizasyondan sonra oosit evresinden zigot aşamasına geçiş ve sonrasında erken bölünme evresindeki embriyonun gelişimi son derece yüksek düzeyde kontrol edilen karmaşık mekanizmalar ile düzenlenmektedir (6). Bu mekanizmaların tanımlanması amacı ile genom, transkriptom, proteom, metabolom ve sekretom analizlerinden oluşan ve geniş bir yelpazeyi kapsayan araştırmalar yapılmaktadır (7-10). Bu analizlerden elde edilen bulgular, preimplantasyon dönem embriyolarının gelişim özellikleri hakkındaki bilgilerimize önemli katkı yapmış olsa da henüz kesinleşmiş verilere ulaşamamıştır (8).

Transkriptom, bir dokuya ya da gelişim evresine özgü gen ekspresyon ürünlerinin (transkriptlerin) tümü olarak tanımlanmaktadır. Transkript profillemeye araştırmalarında güncel olarak kullanılan yöntemler arasında RNA dizileme (RNA-seq) yöntemi, mikroarray analizi ve kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) sayılabilir (11). Üreme biyolojisinde araştırmalarda kullanılan örnekler genellikle, zor ulaşılabilir, nadir ve tekrarı olmayan hücre gruplarıdır. Preimplantasyon dönemde embriyo gelişimi ve araştırılmasında yürütülen transkriptomik analizler, granülosa, kümülüs, oosit, spermatozoa ve embriyolardan elde edilen blastomer hücreleri ve follikül sıvısını kapsamaktadır (12-14).

Diğer yandan, örneğin spermatozoa hücrelerinde olduğu gibi diğer somatik hücrelere kıyasla çok daha az oranda RNA (15-17) ile uğraşıldığından dolayı genetik analizlerde kullanılan standart yöntemlerde modifikasyonlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada amacımız, spermatozoa ve embriyo hücrelerinden gen ekspresyonu araştırmalarında kullanılacak optimal düzeyde total RNA'nın elde edilebilmesi amacı ile RNA izolasyon yönteminin geliştirilmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hasta Seçimi

Çalışmada kullanılan örnekler, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite Bilim Dalı'na infertilite tedavisi amacıyla başvuran ve yardımla üreme tekniklerinden yararlanan çiftlerin rızası ile alınmıştır. Spermatozoa değerlendirilmesi için çalışmaya davet edilme kriterleri, yardımla üreme tekniklerinin uygulanacağı gün yapılan spermiyogram analizinde, Dünya Sağlık Örgütü'nün 2010 kriterlerine (18) göre normozoospermi, oligozoospermi, teratozoospermi veya astenozoospermi gözlenen örneğe sahip erkek bireyin olması ve tanısı koyulan herhangi bir kadın faktörünün olmadığı durumdur. Çalışma dışı bırakılma kriterleri ise, (1) spermiyogramda 1×10^6 /ml ve üzerinde yuvarlak hücre ya da enfeksiyon varlığının belirlenmesi; (2) erkek faktörü haricinde eşlik eden kadın infertilite endikasyonlarının varlığı şeklindedir.

Embriyo değerlendirilmesi için dahil edilme kriterleri, (1) embriyo transferinden sonra geriye kalan fazla sayıda embriyoların olması ancak, embriyoların kriyoprezervasyon için yeterli kalitede olmaması nedeni ile hali hazırda imha edilecek olması, (2) embriyo transferi sonrasında kriyoprezervasyon için uygun kalitede embriyoların var olması ancak, çiftin bu işlemi kabul etmemesi nedeni ile embriyoların hali hazırda imha edilecek olması şeklinde belirlenmiştir.

Bu çalışmada kullanılan örnekler için İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı alınmıştır (Belge No: 737, 937 ve 1360).

Örneklerin Hazırlanması

Bu çalışmada, YÜT'de kullanılmak amacı ile 90:45 yoğunluk gradient yöntemi hazırlanmış olan ve fertilizasyon işlemi sonrasında artan spermatozoa örnekleri çalışılmıştır. Örnekler, semende bulunabilecek olan rezidüel cisim-

çik, epitel ve lenfosit hücre kontaminasyonunu önlemek amacı ile ikinci kere 90:45 yoğunluk gradient yöntemi hazırlanarak saflaştırılmıştır (19). Ardından, ışık mikroskobu altında değerlendirilerek sayım yapılmış ve epitel ve lenfosit hücrelerinin olmadığı doğrulanmıştır. Daha sonra örnekler, 600 g'de 5 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet üzerine RNaz içermeyecek şekilde hazırlanmış olan ve buz soğukluğundaki fosfat tamponlu tuz solusyonundan (PBS) 1,5 mL eklenerek pipetleme yolu ile yıkanmıştır. Sonrasında 600 g'de 5 dk santrifüj ile elde edilen hücre pelleti sıvı azotta şok dondurulmuştur. Genetik analiz yapılabilmek için örnekler sıvı azotta saklanmıştır.

Embriyo transferinden sonra geriye kalan ve kriyoprezervasyon uygulanmayan preimplantasyon dönem embriyolar, RNaz içermeyecek şekilde hazırlanan ve buz soğukluğundaki PBS-polivinil alkol (PBS-PVA) içerisinde iki kere pipetlenme yolu ile yıkanmıştır. Örnekler, sıvı azotta şok dondurulmuş ve genetik araştırma için kullanılabilmek kadar sıvı azotta saklanmıştır. Bu aşamadan sonra tüm örnekler sadece genetik analizlerde kullanılacak niteliktedirler.

Total RNA İzolasyonu

Spermatozoa ve testis biyopsisi dokusundan total RNA izolasyonu

Pellet halinde dondurularak saklanmış olan spermatozoa örneklerinden RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak ve kit protokolünde uyarlamalar yapılarak total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Spermatozoa sayısı az olan örneklerde RNA elde etme verimliliğini arttırmak amacı çeşitli optimizasyonlar yapılmıştır. Kısaca, normozoospermik örneklerden farklı spermatozoa dilusyonları ve ağır oligozoospermi hastalarından elde edilen örnekler kullanılarak farklı koşullarda RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. Bu optimizasyonların sonucunda, kitin önerdiği şekilde RNA izolasyonuna başlamadan önce, spermatozoa pelletinin kitin homojenizasyon tamponu (RLT Buffer, Qiagen) ile enjektörden geçirilmesi ve ardından 65°C'de 30 dk inkübasyon basamakları eklendiği durumda en iyi total RNA eldesinin olduğu belirlenmiştir. Total RNA'lar 30µL RNaz içermeyen su içerisinde çözülerek -80°C'de saklanmıştır.

Testis dokusundan RNA izolasyonu için öncelikle doku homojenizasyonu yapılmış, ardından RNeasy Mini Kit (Qiagen) kullanılarak ve kitin önerdiği şekilde total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Total RNA'lar 50µL RNaz içermeyen su içerisinde çözülerek -80°C'de saklanmıştır.

Preimplantasyon dönem embriyo ve granülosa hücrelerinden total RNA izolasyonu

PBS-PVA solüsyonu içerisinde dondurulmuş olan preimplantasyon dönem embriyolar buz içerisine alınarak çözümleri sağlanmıştır. Ardından, RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit (Ambion) kullanılarak ve kit prosedüründe çeşitli uyarlamalar yapılarak total RNA elde edilmiştir. Kısaca, embriyoları içeren tüpler buz üzerinde çözüldük-

ten sonra 14000 g'de 5 dk santrifüj yapılmıştır. Üst sıvı faz atılarak kit içeriğinde bulunan patlatma tamponundan (Lysis Buffer, Ambion) 100µL tüpe eklenmiş ve 3 dk süresince şiddetli vortex yapılmıştır. Bu süre içerisinde her 30 saniyede bir 15 sn süresince buzda bekletilmiş ve böylece ısınma sonucunda meydana gelecek olan RNA degradasyonu önlenmeye çalışılmıştır. Bu basamakların ardından, kit içerisinde tarif edildiği şekilde izolasyona devam edilmiştir. Bu uygulamaların sonucunda RNA amplifikasyonu ve sonrasında gen ekspresyon analizi (mikroarray ya da RNA-seq) için yeterli olarak kabul edilebilecek kalitede RNA elde edilmiştir.

Ek olarak, farklı embriyo evrelerinin yanı sıra izolasyon kontrolünde kullanılmak amacı ile farklı kalitelere granülosa hücrelerinden de total RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon, RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit (Ambion) kullanılarak ve kit prosedüründe çeşitli uyarlamalar yapılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, RNA izolasyonundan önce homojenizasyon amacı ile granülosa pelleti kitin içerisinde bulunan patlatma tamponu (Lysis Buffer, Ambion) ile enjektörden geçirilmiştir. Bu işlem buz üstünde uygulanmıştır. Ardından, kitin önerdiği şekilde izolasyona devam edilmiştir.

Total RNA kalitesinin ve miktarının değerlendirilmesi

Spermatozoa ve testis biyopsisi dokularından elde edilen total RNA'nın kalitesi ve miktarının değerlendirilmesi, Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı ve Agilent RNA 6000 Nano Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Embriyo ve granülosa hücrelerinden elde edilen total RNA'nın değerlendirilmesi ise Agilent RNA 6000 Pico Kit kullanılarak yapılmıştır. Bu değerlendirmelerde RNA fragmentasyonu ve 18S ve 28S RNA miktarları göz önüne alınmıştır.

Spermatozoa total RNA'sından cDNA sentezi

RNA izolasyon etkinliğinin test edilmesi amacı ile spermatozoal cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem, QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen) ve 100 ng total RNA örneği kullanılarak yapılmıştır.

Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Yöntemi ile Gen Amplifikasyonu

RNA izolasyon etkinliğinin test edilmesi amacı ile spermatozoal cDNA sentezi sonrasında qRT-PCR yöntemi ile beta-aktin (*ACTB*) geninin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlem, LightCycler 480 sistemi, Roche LightCycler 480 SYBR Green I Master Kit (Roche) ve gene özgü primerler kullanılarak yapılmıştır. Tüm örnekler çift çalışılmış ve ortalama değerleri alınmıştır. Amplifikasyonu yapılan genin özgülüğü "melting curve" analizi ile değerlendirilmiştir.

Amplifikasyonda kullanılan primerler manuel olarak tasarlanmıştır ve Oligoanalyzer 3.1 (IDT Technologies) ve GeneWalker (Cybergene AB) programlarından yararlanılmıştır. Primerlerin dizi özgüllükleri Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) veritabanında kontrol edilmiştir.

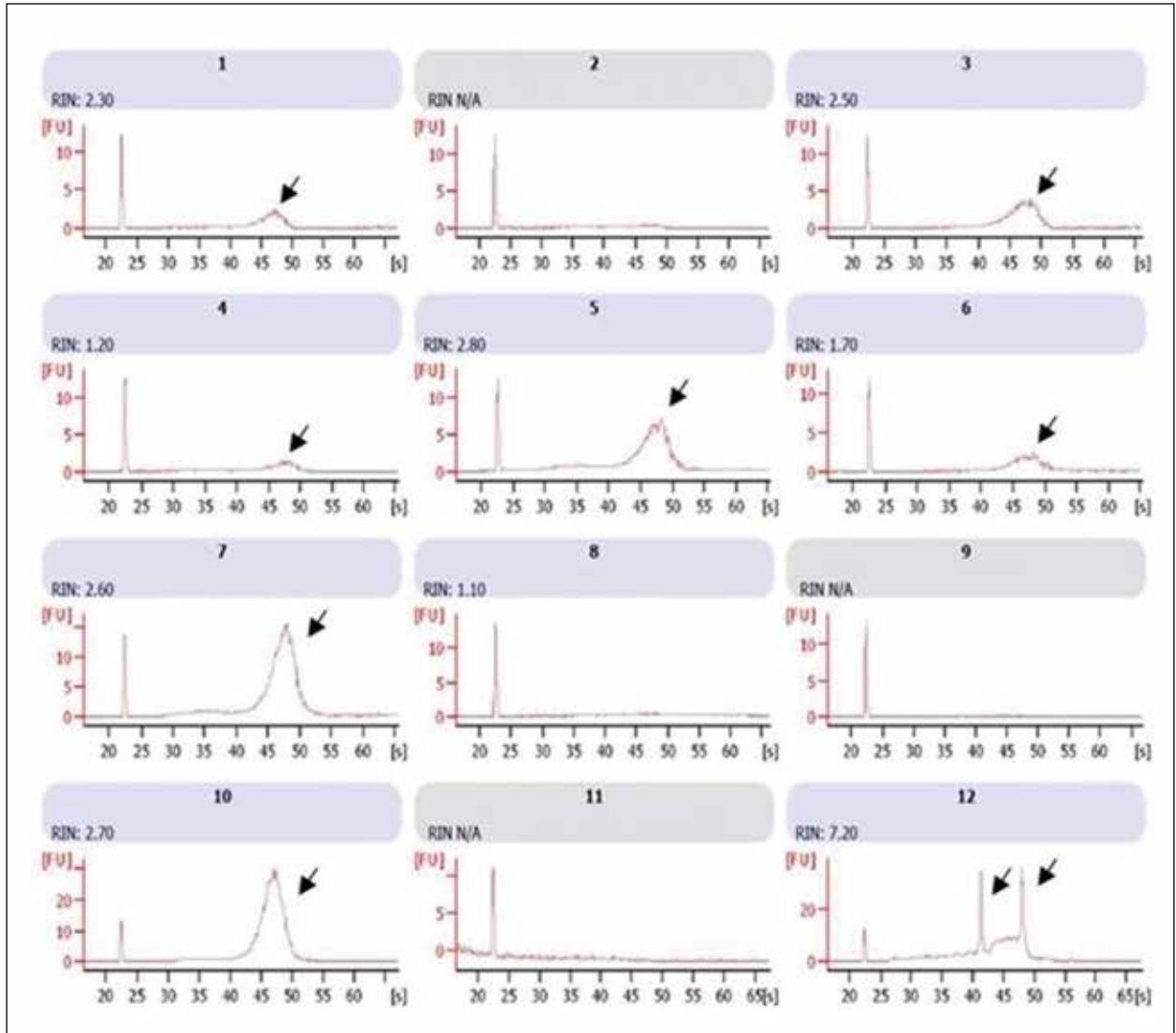
BULGULAR

Spermatozoal RNA İzolasyonu

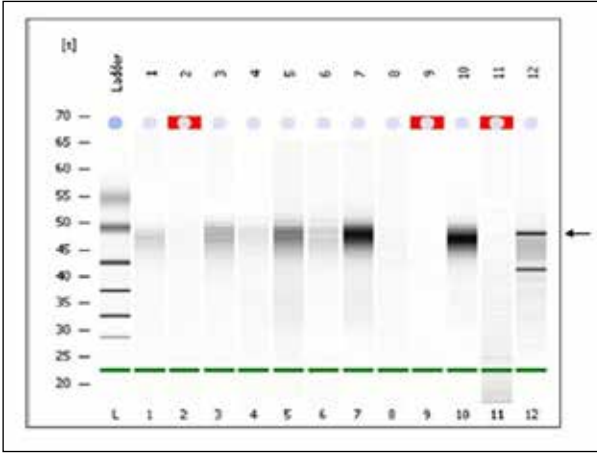
Bu çalışma kapsamında, YÜT gören ve çalışmaya katılmayı kabul eden toplam 41 adet infertil bireyden (9 normozoospermi, 18 teratozoospermi, 12 oligoastenoospermi ve 2 TESE örneği) elde edilen spermatozoa örneği hazırlanarak dondurulmuştur. Kullanılan ticari kitin prosedüründe, düşük miktarda hücre ve RNA içeren örneklerden yeterli miktarda total RNA elde edilebilecek şekilde RNA izolasyon tekniklerinde gerekli optimizasyonlar yapılmıştır. Diğer yandan, testiküler biyopsi dokularından elde edilen total RNA'lar gen ekspresyonlarının analizinde çalışma içi kontrol olarak kullanılmıştır.

Spermatozoa hücrelerinden izole edilen total RNA'ların kaliteleri ve miktarları değerlendirildiğinde elde edilen bulgular beklediğimiz sonuçlar ile uyumludur. Spermatozoal total RNA örneklerinde 28S rRNA'ya ait eğri gözlenmez iken testis dokusuna ait total RNA örneklerinde her iki rRNA eğrisi (18S ve 28S rRNA'lar) net ve degrade olmamış bir şekilde gözlenmiştir. Şekil 1'de 12 örnekten oluşan bir grubun Bioanalyzer cihazı ile analiz sonuçlarına dair elektroferogram görüntüleri sunulmuştur. Şekil 2'de ise aynı örneklerin Bioanalyzer cihazından elde edilen jel-benzeri ortamdaki görüntüsü izlenebilmektedir.

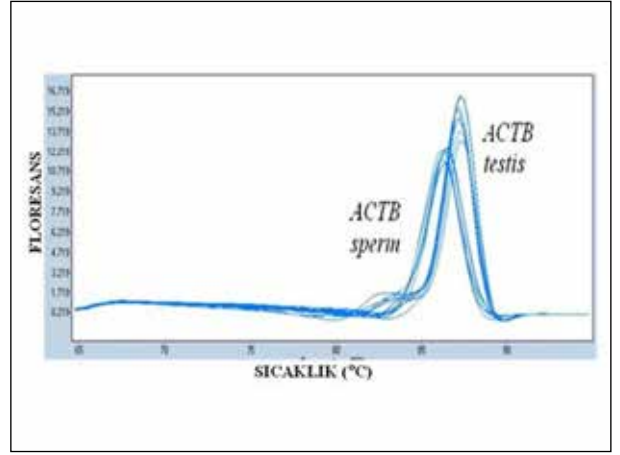
RNA izolasyonundan sonra, elde edilen total RNA miktarının hücre sayıları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Bekle-



Şekil 1. Spermatozoa hücrelerinden izole edilen total RNA'ların Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı kullanılarak yapılan değerlendirilmesi sonucunda elde edilen elektroferogram görüntüsü. İlk 11 örnekte spermatozoal RNA ve 12. örnekte testis dokusuna ait RNA örneklerinin özellikleri görülmektedir. Oklar, spermatozoada degrade durumdaki ve testis dokusundaki intakt haldeki ribozomal RNA'ları göstermektedir. 2, 8, 9 ve 11. örneklerde izolasyon başarılı olmamıştır.



Şekil 2. Spermatozoa hücrelerinden izole edilen total RNA'ların Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı kullanılarak yapılan değerlendirilmesi sonucunda elde edilen jel-benzeri ortamda görüntüsü. İlk 11 örnekte spermatozoal RNA ve 12. örnekte testis dokusuna ait RNA örneklerinin özellikleri görülmektedir. Spermatozoal RNA'larda 28S rRNA'nın degradasyonu belirgin olarak gözlenmektedir (ok).



Şekil 3. Spermatozoa ve testis dokusuna özgü cDNA'lar ve ACTB genine özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR ürünlerinin çözülme eğrisi ("melting curve") analizi. Analizde amplifikasyonu yapılan ürünlerin hücre/doku tipine özgü (spermatozoa ve testis) özgüllüğü izlenmektedir. Her hücre/doku tipine ait amplifikasyon ürünleri aynı sıcaklıkta çözülme göstermektedir.

nildiği üzere, oligozoospermi örneklerinde hücre sayısının azalması ile ilişkili olarak elde edilen RNA oranlarında azalma tespit edilmiştir. İzolasyon sonrasında ortalama 10-60 ng/µL total RNA elde edilmiştir. Spermatozoon başına düşen total RNA oranı ortalama olarak 86 fg (± 61) olarak tespit edilmiştir.

Spermatozoada ACTB gen amplifikasyonu

Spermatozoal RNA'nın kalitesinin değerlendirilmesi amacı ile beta-aktin geninin amplifikasyonu yapılmıştır. Spermatozoa ve testis cDNA örnekleri kullanılarak yapılan bu yöntemde elde edilen amplifikasyon ürünlerinin özgüllüğünün değerlendirildiği "melting curve" analizinde dokuya özgü farklılıkların olduğu gözlenmiştir. Bununla beraber her dokudan elde edilen ürünlerin kendi içerisinde tutarlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 3).

Embriyo total RNA izolasyonu

Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda, yeterli miktarda RNA elde edilebilmesi için her alt grup havuzunda yaklaşık 30 adet embriyonun var olmasının gerektiği tespit edilmiştir. Her izolasyon havuzunda yaklaşık 30 adet embriyo olacak şekilde farklı koşullarda RNA izolasyonu yapılmıştır. Şekil 4'de embriyo havuzu ve granülosa hücrelerinden elde edilen total RNA'ların kalitesini gösteren elektroferogram ve jel benzeri görüntüler görülmektedir. Granülosa hücreleri, kit etkinliğinin belirlenmesi amacıyla karşılaştırma örneği olarak kullanılmıştır. İzolasyonda kullanılan embriyonik hücre sayısı granülosa hücre sayısına göre daha düşüktür, bu nedenle elde edilen total RNA miktarının daha az olması beklenmektedir. Yine aynı nedenle, jel benzeri görüntülerde de görüldüğü gibi (Şekil 5) 18S ve

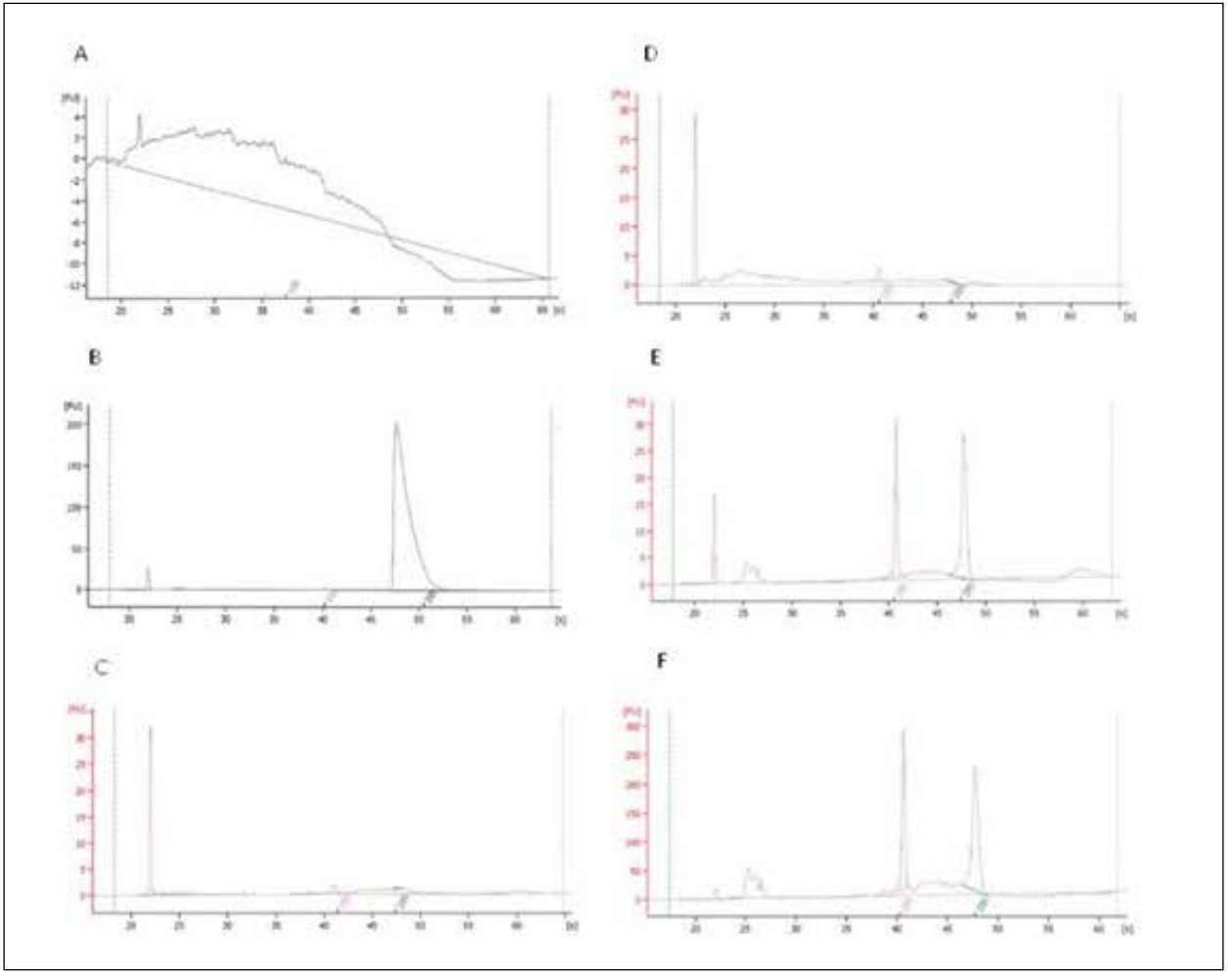
28S rRNA'lara ait bantlar granülosa hücrelerinde olduğu kadar belirgin değildir. Optimizasyon çalışmalarından sonra embriyo havuzlarında 18S ve 28S rRNA'lar daha kaliteli olarak elde edilmiştir. Ek olarak, RNA miktarı transkript profillemeye çalışmasından (RNA-seq ya da mikroarray) önce uygulanacak olan RNA amplifikasyonu için yeterli düzeye yükselmiştir. Şekil 4c ve Şekil 4d'deki görüntülerden 18S ve 28S rRNA elektroferogram görüntüleri benzer olsa da jel benzeri görüntüde bantların çok daha net ve belirgin olduğu, ekstra bantların giderildiği gözlenmektedir (Şekil 5c, d). Şekil 4a ve Şekil 4b'de optimizasyon sürecindeki sonuçlar görülmektedir.

Gelişimin üçüncü gününde 8 hücre aşamasındaki embriyo havuzunun izolasyonu sonucunda elde edilen embriyo başına total RNA eldesi 58.50 pg şeklinde olmuştur. Diğer yandan, 8 hücreli embriyoda hücre başına yaklaşık 7.31 pg total RNA elde edilmiştir.

TARTIŞMA

Hücre ya da doku tipine özel olarak tüm genomdan farklı seviyelerde eksprese olan RNA'lar, o hücre ya da dokunun işlevini yansıtan bir profil sunmaktadır. Çalışmamızda, spermatozoa ve preimplantasyon dönem embriyolardan gen ekspresyon analizi için optimal seviyede total RNA elde edilmesi için araştırma yapılmış ve hücresel total RNA miktarları belirlenmiştir.

Bu çalışmada karşılaşılan güçlüklerden birisi, spermatozoal RNA'ların analizinin diğer hücrelerle karşılaştırıldığında daha zor olmasıdır. Spermatozoada translasyonel sessizliğinin sağlanması amacı ile 28S rRNA seçimli olarak



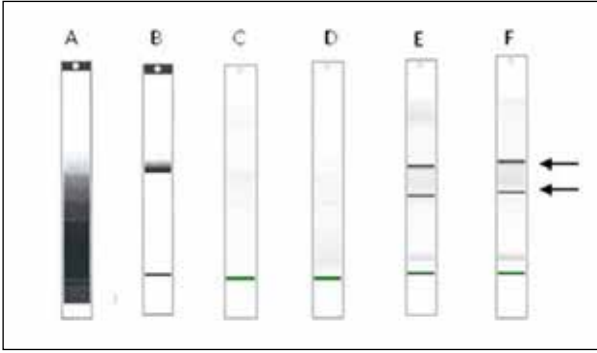
Şekil 4. a-f. Preimplantasyon dönem embriyo ve granülosa hücrelerinden izole edilen total RNA'ların Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı kullanılarak yapılan değerlendirilmesi sonucunda elde edilen elektroferogram görüntüsü. Elektroferogramlar RNA izolasyon optimizasyonu sürecindeki çeşitli aşamaları göstermektedir. a-d embriyolara ait ve e, f granülosa hücrelerine ait görüntülerdir.

yıkıma uğramaktadır (17). Bu durum, normalde RNA kalitesinin değerlendirilmesinde kullanılan 18S/28S RNA oranının tespit edilememesine neden olmaktadır. Dolayısı ile standart bir kalite göstergesi kullanılamamaktadır. Çalışmamızda, hassas bir yöntem olan gerçek zamanlı PCR ile gen amplifikasyonu yaparak elde ettiğimiz total RNA'ların kalitesi dolaylı olarak değerlendirilmiştir. Ardından, melting curve analizi ile amplifikasyon ürünlerinin özgülüğü değerlendirilmiştir.

Spermatozal RNA çalışmalarındaki ikinci zorluk ise total RNA miktarıdır. Somatik bir hücrede yaklaşık olarak 10 pg RNA bulunurken, bu hücrelerden 200 kat daha az sitoplazmaya sahip olan bir spermatozoonda yaklaşık olarak 10-50fg RNA bulunmaktadır (15-17). Bu nedenle, herhangi bir somatik hücre ile kontaminasyon analiz sonrasında gerçek sonuçların maskelenmesine neden olmaktadır

(15). Çalışmamızda, spermatozoa hazırlığı diğer somatik hücreler ve olgun olmayan germ hücrelerinden arındırılacak şekilde yapılmıştır ve izolasyon sonrasında ortalama 10-60 ng/µL total RNA elde edilmiştir. Bu değer literatürdeki diğer araştırmacıların sonuçları ile uyumludur (17, 20, 21). Bu bulgu, uyguladığımız metodun güvenilirliğini desteklemektedir.

İnsan çalışmalarında kullanılan embriyolar yardımıyla üreme tedavisi gören hastalar tarafından bağışlanan ve transfer için seçilmeyen embriyolardan oluşmaktadır (22-24). Yapılan araştırmalarda, gelişimin 2. günündeki insan embriyolarında yaklaşık 12 pg ve 3. gününde yaklaşık 20 pg mRNA olduğu belirlenmiştir (25). Çalışmamızda, mRNA miktarları ayrı olarak değerlendirilmemiştir ancak bu veriye uyumlu olarak gelişim 3. günündeki 8 hücreli embriyoda total RNA miktarı 58.50 pg olarak tespit edilmiştir.



Şekil 5. a-f. Preimplantasyon dönem embriyo ve granülosa hücrelerinden izole edilen total RNA'ların Agilent Bioanalyzer 2100 cihazı kullanılarak yapılan değerlendirilmesi sonucunda elde edilen jel-benzeri ortamda görüntüsü. Jel-benzeri görüntüler RNA izolasyonu optimizasyonu sürecindeki çeşitli aşamaları göstermektedir. a-d embriyolara ait ve e, f granülosa hücrelerine ait görüntülerdir. Üst ok 28S rRNA, alt ok ise 18S rRNA'yı işaret etmektedir.

Örnek miktarının az olması ve embriyoların her zaman kolay elde edilememesi iki sonucu doğurmuştur. Bunlardan birincisi, incelenecek olan embriyoların havuz oluşturacak şekilde toplanmasıdır. Gelişim çalışmalarında örneklerin havuzda toplanarak analiz edilmesinin ek bir avantajı da benzer özellikteki embriyoların bir arada incelenmesi ile bireysel farklılıkların dışlanarak ortak bir sonucun elde edilmesidir (26, 27). Böylece, analiz sonucunda, her bir embriyoya ait özel bir genetik bilgi elde edilmemekte, benzer özellikteki embriyolarda ön plana çıkan genler hakkında toplu olarak bilgi elde edilmektedir. Bu nedenle, bu yaklaşım mikroarray ve diğer gen ekspresyonu çalışmalarında uygulanması önerilen bir yöntemdir (26). Çalışmamızda bu yaklaşım benimsenerek embriyolardan örnek havuzu oluşturduktan sonra total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Embriyo araştırmalarında örnek miktarının ve RNA kaynağının az olmasının doğurduğu ikinci sonuç ise araştırmacıların, diğer doku ve hastalıklara özgü genlerin başarı ile profilendiği ve çok sayıda transkriptin aynı anda incelenebildiği tekniklere yönelmesi olmuştur (25, 28). Embriyolardaki RNA miktarının az olması yapılan çalışmaları kısıtlamakla beraber, PCR temelli diferansiyel display ve "subtractive" cDNA kütüphanelerinin oluşturulması teknikleri başarı ile gerçekleştirilmiştir (29). Bununla birlikte, ancak mikroarray platformlarının geliştirilmesi sayesinde daha kısa bir süre içerisinde oosit ve preimplantasyon dönem embriyolarının global gen ekspresyon profilleri incelenebilmiştir (30).

SONUÇ

Daha sonra yapılması planlanan transkript profillemeye araştırmaları için ön bir çalışma olarak gerçekleştirilen bu

deneyle sonuçta elde edilen bulgular, RNA izolasyonu protokollerinde yapılan uyarlamaların etkin olduğunu göstermektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışmada İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun onayı alınmıştır (Belge No: 737, 937 ve 1360).

Hasta Onamı: Bu çalışmaya katılan hastalardan yazılı hasta onamı alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - B.Ö.S.; Tasarım - B.Ö.S.; Denetleme - B.Ö.S., S.B.K.; Kaynaklar - B.Ö.S., S.B.K., Ö.D.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - B.Ö.S., S.B.K., Ö.D.; Analiz ve/veya Yorum - B.Ö.S., N.Ç., D.S.K., S.T.; Literatür Taraması - B.Ö.S., S.T.; Yazıyı Yazan - B.Ö.S.; Eleştirel İnceleme - N.Ç., D.S.K., S.B.K., Ö.D.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma İstanbul Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: 33527, 53931, 45101, 32661 ve 13930).

Ethics Committee Approval: This study was approved by the Ethics Committee of Istanbul University Istanbul Medical School (No: 737, 937 ve 1360).

Informed Consent: Written informed consent was obtained from patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - B.O.S.; Design - B.O.S.; Supervision - B.O.S., S.B.K.; Resources - B.O.S.; Materials - B.O.S.; Data Collection and/or Processing - B.O.S., S.B.K., O.D.; Analysis and/or Interpretation - B.O.S., N.Ç., D.S.K., S.T.; Literature Search - B.O.S., S.T.; Writing Manuscript - B.O.S.; Critical Review - N.C., D.S.K., S.B.K., O.D.

Conflict of Interest: Authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by the Scientific Research Projects Coordination Unit of İstanbul University (Project numbers: 33527, 53931, 45101, 32661 and 13930).

KAYNAKLAR

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology. Hum Reprod 2009; 24: 2683-7. [CrossRef]
2. Ebner T, Moser M, Sommergruber M, Tews G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. Hum Reprod Update 2003;9:251-62. [CrossRef]

3. Siristatidis C, Komitopoulou MA, Makris A, Sialakouma A, Botzaki M, Mastorakos G, et al. Morphokinetic parameters of early embryo development via time lapse monitoring and their effect on embryo selection and ICSI outcomes: a prospective cohort study. *J Assist Reprod Genet* 2015;32(4):563-70. [\[CrossRef\]](#)
4. Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online* 2017;35(5):511-20. [\[CrossRef\]](#)
5. Bromer JG, Seli E. Assesment of embryo viability in assisted reproductive technologies: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2008;20(3):234-41. [\[CrossRef\]](#)
6. Evsikov AV, de Evsikova CM. Gene expression during the oocyte-to-embryo transition in mammals. *Mol Reprod Dev* 2009;76(9):805-18. [\[CrossRef\]](#)
7. Katz-Jaffe MG, Schoolcraft WB, Gardner DK. Analysis of protein expression (secretome) by human and mouse preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2006;86(3):678-85. [\[CrossRef\]](#)
8. Seli E, Robert C, Sirard M. OMICS in assisted reproduction: possibilities and pitfalls. *Mol Hum Reprod* 2010;16(8):513-30. [\[CrossRef\]](#)
9. Uyar A, Seli E. Metabolomic assessment of embryo viability. *Semin Reprod Med* 2014;32(2):141-52. [\[CrossRef\]](#)
10. Ventura-Juncá P, Irrarázaval I, Rolle AJ, Gutiérrez JI, Moreno RD, Santos MJ. In vitro fertilization (IVF) in mammals: epigenetic and developmental alterations. Scientific and bioethical implications for IVF in humans. *Biol Res* 2015;48:68. [\[CrossRef\]](#)
11. Lowe R, Shirley N, Bleackley M, Dolan S, Shafee T. Transcriptomics technologies. *PLoS Comput Biol* 2017;13(5):e1005457. [\[CrossRef\]](#)
12. Moreno JM, Núñez MJ, Quiñonero A, Martínez S, de la Orden M, Simón C, et al. Follicular fluid and mural granulosa cells microRNA profiles vary in in vitro fertilization patients depending on their age and oocyte maturation stage. *Fertil Steril* 2015;104(4):1037-46.e1. [\[CrossRef\]](#)
13. Burnik Papler T, Vrtacnik Bokal E, Maver A, Kopitar AN, Lovrečić L. Transcriptomic analysis and meta-analysis of human granulosa and cumulus cells. *PLoS One* 2015;10(8):e0136473. [\[CrossRef\]](#)
14. Montjean D, De La Grange P, Gentien D, Rapinat A, Belloc S, Cohen-Bacrie P, et al. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2012;29(1):3-10. [\[CrossRef\]](#)
15. Krawetz SA. Paternal contribution: new insights and future challenges. *Nat Rev Genet* 2005;6(8):633-42. [\[CrossRef\]](#)
16. Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med* 2005;11(4):156-63. [\[CrossRef\]](#)
17. Cappallo-Obermann H, Schulze W, Jastrow H, Baukloh V, Spiess AN. Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly. *Mol Hum Reprod* 2011;17(11):669-78. [\[CrossRef\]](#)
18. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th Ed. WHO, 2010.
19. Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002;360(9335):772-7. [\[CrossRef\]](#)
20. Goodrich RJ, Anton E, Krawetz SA. Isolating mRNA and small noncoding RNAs from human sperm. *Methods Mol Biol* 2013;927:385-96. [\[CrossRef\]](#)
21. Mao S, Sendler E, Goodrich RJ, Hauser R, Krawetz SA. A comparison of sperm RNA-seq methods. *Syst Biol Reprod Med* 2014;60(5):308-15. [\[CrossRef\]](#)
22. Wells D, Bermúdez MG, Steuerwald N, Malter HE, Thornhill AR, Cohen J. Association of abnormal morphology and altered gene expression in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 2005;84(2):343-55. [\[CrossRef\]](#)
23. Kleijkers SH, Eijssen LM, Coonen E, Derhaag JG, Mantikou E, Jonker MJ, et al. Differences in gene expression profiles between human preimplantation embryos cultured in two different IVF culture media. *Hum Reprod* 2015;30(10):2303-11. [\[CrossRef\]](#)
24. Mantikou E, Jonker MJ, Wong KM, van Montfoort AP, de Jong M, Breit TM, et al. Factors affecting the gene expression of in vitro cultured human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 2016;31(2):298-311.
25. Dobson AT, Raja R, Abeyta MJ, Taylor T, Shen S, Haqq C, et al. The unique transcriptome through day 3 of human preimplantation development. *Hum Mol Genet* 2004;13(14):1461-70. [\[CrossRef\]](#)
26. Zhang SD, Gant TW. Effect of pooling samples on the efficiency of comparative studies using microarrays. *Bioinformatics* 2005;21(24):4378-83. [\[CrossRef\]](#)
27. Peng X, Wod CL, Blalock EM, Chen KC, Landfield PW, Stromberg AJ. Statistical implications of pooling RNA samples for microarray experiments. *BMC Bioinformatics* 2003;4:26. [\[CrossRef\]](#)
28. Zhang P, Zucchelli M, Bruce S, Hambiliki F, Stavreus-Evers A, Levkov L, Skottman H, Kerkela E, Kere J, Hovatta O. Transcriptome Profiling of Human Pre-implantation Development. *Plos One* 2009;4(11):e7844. [\[CrossRef\]](#)
29. Zeng F, Schultz RM. Gene expression in mouse oocytes and preimplantation embryos: use of suppression subtractive hybridization to identify oocyte- and embryo-specific genes. *Biol Reprod* 2003;68(1):31-9. [\[CrossRef\]](#)
30. Carter MG, Hamatani T, Sharov AA, Carmack CE, Qian Y, Aiba K, et al. In situ-synthesized novel microarray optimized for mouse stem cell and early developmental expression profiling. *Genome Res* 2003;13(5):1011-21. [\[CrossRef\]](#)