

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**SIĞIRLARDA IN VİTRO KOŞULLARINDA ÜRETİLEN SIĞIR
EMBRYOLARININ KALİTELERİNİN İYİLEŞTİRİLMESİ OLANAKLARI**

Shahram BOHLOOLİ

Zootekni Anabilim Dalı

**ANKARA
2015**

Her hakkı saklıdır

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

28.09.2015

Shahram BOHLOOLI

ÖZET

Doktora Tezi

SIĞIRLARDA IN VİTRO KOŞULLARINDA ÜRETİLEN SIĞIR EMBRİYOLARININ KALİTELERİNİN İYİLEŞTİRİLMESİ OLANAKLARI

Shahram BOHLOOLI

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootečni Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Fatin CEDDEN

Bu araştırma üç aşamadan oluşturulmuştur. İlk araştırmada kümülüs oosit kompleks (KOK) ve embriyo üretim üzerine farklı ovaryum taşıma ortamı ve sıcaklıkların etkisi incelenmiştir. İkinci aşamada oosit maturasyonu ve üretilmiş olan zigot ve embriyoların miktarı ve kalitesi üzerine üç farklı somatik hücre ile beş farklı ortamın ko-kültür edilmesinin etkisi incelenmiştir. Son aşama olarak ikinci aşamada üretilmiş olan 2-8 blastomerli zigotlar tavuk embriyo amniyotik boşluğu (TEAB) içinde inkübe edilerek blastosist oluşum oranı ve diğer özellikleri incelenmiştir. İlk aşamanın sonuçlarına göre ovaryum taşıma ortamı ve sıcaklıkları KOK'lerin maturasyonunu etkileyerek en çok maturasyon oranı, 4 °C sıcaklık ve CR1 ortamında görülmüştür. Ancak blastosist oluşum oranı, iç hücre kümesi (İHK) ve terfoktoderm (TE) hücre sayısı özellikleri bu faktörlerden etkilenmemiştir. İkinci araştırmanın sonuçlarına göre ovidukt hücreleri ile tavuk embriyo amniyotik sıvısı (TEAS) ortamında ko-kültüre tabi tutulan zigotlarda maturasyon, fertilizasyon, blastosist oluşum oranı ve blastosistlerin diğer özellikleri iyileşmiştir. Üçüncü araştırmanın sonuçları ise TEAB içinde zigotların inkübasyonu hücre içermeyen sistemlerden daha çok blastosist oluşumuna neden olmuştur. Sonuç olarak, ovaryum taşıması için en iyi sıcaklık ve ortam olarak 4 °C sıcaklıkta CR1 ortamı bulunmuştur. Ayrıca KOK ve zigotların ovidukt hücresi ile beraber TEAS ortamı içinde ko-kültür edildiğinde oositlerin gelişme yetenekleri ve üretilen embriyoların özellikleri iyileşmiştir.

Eylül 2015, 102 sayfa

Anahtar Kelime: KOK, Ko-kültür, Embriyo, IVP, IVF, IVC, Blastosist, Apoptozis

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

POSSIBILITIES FOR IMPROVING QUALITY OF IN-VITRO PRODUCED EMBRYOS IN CATTLE

Shahram BOHLOOLI

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. Fatin CEDDEN

This study was composed from three examinations. The first examination was conducted to investigate the effects of ovary transportation medium and temperature on cumulus oocyte complexes (COCs) and characteristics of embryos. The second examination was investigated for the effects of co-culturing of COCs and zygotes with three somatic cells in five media on oocyte maturation and quality and quantity of produced embryos. In the final examination chick embryonic amnion cavity was used for the incubation of 2-8 cell zygotes which produced by the second examination. The result of first examination was revealed that the COC's maturation rate was affected by medium and temperature. It was found that, 4 °C resulted in high maturation rate than other transportation temperatures. The Charles Rosenkrans medium (CR1) has given better maturation cleavage rate compared to the others. There was neither significant difference in blastocyst formation rate and nor inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells counts regarding transportation factors. The second examination was shown that co-culturing of the COCs and zygotes with oviductal epithelial cells in check embryo amniotic fluid (ChEAF) resulted in higher rate of maturation, fertilization, blastocyst formation and quality. The third examination demonstrated that incubation of zygotes in check embryo amniotic cavity (ChEAC) only improved blastocyst formation rate in culturing systems without any somatic cells. In conclusion, the transport of ovaries in CR1 at 4 °C is effective for maintaining early developmental competence of cattle oocytes. And co-culturing of COCs and zygotes with bovine oviductal epithelial cells in ChEAF was improved the developmental competence of oocytes and embryos.

September 2015, 102 pages

Key Words: COC, Co-culture, Embryo, IVP, IVF, IVC, Blastocyst, Apoptosis

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesinde bana yol gösteren ve desteğini esirgemeyen, kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Fatin CEDDEN 'e (Ankara Üniversitesi Zootekni Anabilim Dalı), ayrıca bilgi ve görüşlerini her fırsatta bana aktaran değerli hocalarım Prof. Dr. Gürsel DELLAL (Ankara Üniversitesi Zootekni Anabilim Dalı), Prof. Dr. Birol DAĞ (Selçuk Üniversitesi Zootekni Anabilim Dalı) ve Prof. Dr. Vasfi GENÇER (Ankara Üniversitesi Zootekni Anabilim Dalı), Arş. Gör. Yasin KAHYA, Dr. Erkan PEHLİVAN, Arş. Gör. Serdar ÖZLÜ'ye Teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca tezin her aşamasında bana yardımcı olan değerli arkadaşım Şeyma BOZOĞLU'na teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince bana her zaman destek olan sevgili eşim ve İRAN'daki ailelerim BOHLOOLI ve GHAVAMİ'ye en derin duygularla teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, BAP (Proje No: 12B4347012) tarafından desteklenmiştir.

Shahram BOHLOOLI

Ankara, Eylül 2015

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI SAYFASI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	4
2.1 İn Vitro Embriyo Üretimi	4
2.1.1 Ovaryum toplama işlemi ve laboratuvara aktarımı	4
2.1.2 İn vitro maturasyon	5
2.1.3 İn vitro’da dölleme (IVF)	9
2.1.4 İn vitro koşullarında kültür etme (IVC)	12
2.2 Embriyo Kalitesini Belirlemek Amacıyla Kullanılan Kriterler	19
2.2.1 İHK:TE oranı	19
2.2.2 Apoptozis.....	21
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	23
3.1 Materyal.....	23
3.2 İn Vitro Embriyo Üretimi	24
3.2.1 Oosit toplama.....	24
3.2.2 İn vitro maturasyon	25
3.2.3 İn vitro fertilizasyon.....	26
3.2.4 İn vitro koşullarında kültür etme	26
3.3 Somatik Hücre Ayırma ve Kültür Etme Yöntemleri.....	28
3.3.1 Ovidukt epitelyal hücre ayırımı.....	28
3.3.2 Granüloza hücrelerin ayırımı	30
3.3.3 Kümüls hücrelerin ayırımı.....	31
3.3.4 Somatik hücrelerin kültür etme yöntemleri	32
3.4 Tavuk Embriyosu.....	32
3.4.1 Tavuk embriyosundan amniyotik sıvı (TEAS) toplama metodu.....	33
3.4.2 Sığır zigotlarının tavuk embriyo amniyotik boşluğu içinde inkübasyonu	33
3.5 Oosit, Zigot ve Embriyoların Değerlendirilmesi	34
3.5.1 Oositlerin değerlendirme ve sınıflandırılmaları.....	34
3.5.2 Oosit maturasyonu (kümüls hücrelerin genişlemesi)	35
3.5.3 Ayrımcı nükleer boyama yöntemi	36
3.5.4 TUNEL metoduyla apoptozis belirtilmesi	38
3.5.5 Oran hesaplamaları	39
3.5.6 İstatistik analizler.....	40
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	41
4.1 Oositlerin ve Üretilen Embriyoların Kalitesi ve Miktarı Üzerine Ovaryum Taşıma Ortamı ve Sıcaklığının Etkisi	41

4.1.1 Maturasyon üzerine farklı taşıma ortamı ve sıcaklıklarının etkisi	41
4.1.2 Fertilizasyon üzerine farklı taşıma ortamı ve sıcaklıklarının etkisi	43
4.1.3 Embriyo oluşumu üzerine farklı taşıma ortam ve sıcaklıklarının etkisi	45
4.2 Üretilen Embriyoların sayısı ve Kalitesi Üzerine Farklı Ortamlarda Farklı Somatik Hücrelerle beraber Kültür etmenin Etkisi	53
4.2.1 Oosit maturasyonu üzerine farklı ortamlarda farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi	53
4.2.2 Oosit fertilizasyonu üzerine farklı ortamlarda farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi	56
4.2.3 Embriyo üretimi üzerine farklı ortamlarda farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi	58
4.3 Kültür Ortamı ve Sistemi Olarak Tavuk Embriyosunun Amniyon Kesesinin Kullanımı	67
4.3.1 Blastosist oluşum oranı	68
4.3.2 İH, TE, THS ve TE'ye İH kümesinin oranı	68
4.3.3 Apoptozis indeksi	74
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	75
5.1 Ovaryum Taşıma Ortamı ve Sıcaklığının Etkisi	75
5.2 Farklı Ortamlar, Somatik Hücreler ve kültür sistemlerinin Etkisi	77
KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	102

KISALTMALAR DİZİNİ

ART	Üremeye yardımcı teknolojiler
BCS	Braun-Collins solüsyonu
BME	Bazal Eagle ortamı
BOEC	Sığır ovidukt epitelyal hücre
BSA	Sığır serum albumin
CDM	Chemically defined media
CR1	Charles Rosenkrans medium 1
CS	Buzağı serumu
CZB	Chatot, Ziomek and Bavister
DMSO	Dimethyl sulfoksit
DPBS	Dullbecco Fosfat Tampon Tuzu
DPI	Tohumlamadan sonraki gün
EAA	Esansiyel aminoasitEssential amino acids
EB	Erken blastosist
EDTA	Ethylenediaminetetraasetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
ET	Embriyo transfer
FBS	Sığır cenin serumu
FCS	Sığır cenin serumu
FS	Folikül sıvısı
FSH	Folikül uyarıcı hormon
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
GCM	Granüloza hücre tek katmanı
GOEC	Keçi ovidukt epitelyal hücre
GV	Germinal Vezikül
GVBD	Germinal vezikül yıkımı
HECM	Hamster embriyo kültür ortamı
HEPSE	Hydroksiethylpiperazine-ethanesulfonik asit
HTF	İnsan tubal sıvısı
IAA	İndole3 asetik asit
IVC	In vitro koşullarında kültür etme
IVF	In vitro koşullarında dölleme
IVM	In vitro koşullarında olgunlaştırma
IVP	In vitro koşullarında embriyo üretimi
İH	İç hücre
İHK	İç hücre kümesi
İHS	İş hücre sayısı
KOK	Kümüls-oosit kompleks
KSOM	Basit K optimize edilmiş ortam
LIF	Leukemia inhibitory factor
LH	Luteinleştirici hormon
LOPU	Laparoskopik ovum pick-upyöntemle oosit toplama
MAPK	Mitogene bağlı olan- activated aktif hale gelen protein kinase

MEM	Minimum gerekli ortam
MGC	Mural granüloza hücre
MOET	Çoklu ovulasyon ve embriyo transfer
MPF	M-faza gelişmesine yardımcı olan faktör
mSOF	Değiştirilmiş sentetik ovidukt sıvı ortamı
NEA	Esansiyel olmayanNonessential aminoasitleramino acids
NS	Serum fizyolojik
OPU	Ovum pick-up
PBS	Fosfat-tamponlu tuz solüsyonu
PI	Propidium iodide
POEC	Domuz oviduktunun epitelyal hücresi
PVA	Polyvinyl alkol
PVP	Polyvinylprrolidone
SCNT	Somatik hücre çekirdek aktarımı
SOF	Sentetik ovidukt sıvısı
SOFaaBSA	Sığır serum albomini ve asit amine içeren sentetik ovidukt sıvısı
TALP	Tyrode's-albumin-lactate-pyruvate ortamı
TCM-199	Doku kültür ortamı
TE	Terfoktoderin
TEAB	Tavuk embriyonik amniyon boşluğu
TEAS	Tavuk embriyonik amniyon sıvısı
TL HEPES	Tyrodes laktats HEPES
TGF	Transforming growth factor
VS	Vitrifikasyon solüsyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Farklı aşamalarda sığır embriyosu	27
Şekil 3.2 Ovidukt epitelyal hücresinin toplama metodu	29
Şekil 3.3 Kültürle etmeden 7 gün sonra inek ovidukt epitelyal hücrelerinin faz-kontrast mikroskop görüntülenmesi (büyütme x100).....	29
Şekil 3.4 Kültürlemeden 2 gün sonra inek granüloza hücrelerinin faz-kontrast mikroskop görüntüsü (büyütme x100).....	30
Şekil 3.5 Kültürlemeden 7 gün sonra inek kümülüs hücrelerinin faz-kontrast mikroskop görüntülenmesi (büyütme x100).....	31
Şekil 3.6 Kabuksuz tavuk embriyo üretimi.....	33
Şekil 3.7 Oosit sınıflandırması.....	34
Şekil 3.8 Kümülüs hücre dağılımına göre oosit maturasyonunun sınıflandırılması	36
Şekil 3.9 Ayrımcı boyama tekniği ile embriyo hücrelerinin boyayarak ayırmak.....	37
Şekil 3.10 TUNEL etiketleme metodu ile apoptozis hücrelerin belirlemesi	39
Şekil 4.1 KOK'leri üzerine farklı ovaryum taşıma sıcaklıklarının etkisi	42
Şekil 4.2 KOK'leri üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi.....	43
Şekil 4.3 Döllenme (%) üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi	44
Şekil 4.4 Döllenme (%) üzerine farklı taşıma sıcaklığının etkisi.....	45
Şekil 4.5 Bloke zigot (%) üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi.....	46
Şekil 4.6 Bloke zigot (%) üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi.....	46
Şekil 4.7 Blastosist oluşum (%) üzerine farklı taşıma sıcaklıklarının etkisi.....	48
Şekil 4.8 Blastosist oluşum (%) üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi.....	48
Şekil 4.9 İç hücre kümesi, trofektoderm ve toplam hücre sayısı üzerine farklı taşıma sıcaklıklarının etkisi.....	50
Şekil 4.10 İç hücre kümesi, trofektoderm ve toplam hücre sayısı üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi.....	50
Şekil 4.11 İHK/TE ve apoptozis üzerine ovaryum taşıma sıcaklıklarının etkisi	52
Şekil 4.12 İHK/TE ve apoptozis üzerine ovaryum taşıma ortamlarının etkisi	52
Şekil 4.13 KOK'lerin olgunlaşması üzerine farklı maturasyon ortamlarının etkisi	55
Şekil 4.14 KOK'lerin maturasyonu üzerine farklı somatik hücrelerinin etkisi	55
Şekil 4.15 Dölleme (%) üzerine farklı somatik hücrelerin etkisi.....	57
Şekil 4.16 Döllenme (%) üzerine farklı ortamların etkisi.....	57
Şekil 4.17 Bloke zigot oranı üzerine farklı kültür ortamlarının etkisi	58
Şekil 4.18 Bloke zigot oranı üzerine farklı somatik hücrelerinin etkisi.....	60
Şekil 4.19 Blastosist oluşum üzerine farklı kültür ortamının etkisi.....	61
Şekil 4.20 Blastosist oluşumu üzerine farklı somatik hücrelerin etkisi	61
Şekil 4.21 İç hücre kümesi, trofektoderm, toplam hücre sayısı ve İHK/TE oranı üzerine farklı kültür ortamının etkisi	64
Şekil 4.22 İç hücre kümesi, trofektoderm, toplam hücre sayısı ve İHK/TE oranı üzerine farklı somatik hücrelerinin etkisi	64
Şekil 4.23 Apoptozis indeksi üzerine farklı kültür ortamının etkisi	65
Şekil 4.24 Apoptozis indeksi üzerine farklı somatik hücrenin etkisi.....	66
Şekil 4.25 Apoptozis indeksi üzerine somatik hücreler ile ortamların interaksiyonları.....	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Çiftlik hayvanlarında IVC süresi	12
Çizelge 2.2 Sığır ve koyun için tam tanımlanmış veya yarı tanımlanmış koşulların altında kullanılan ortam seçiminin bileşimi	18
Çizelge 3.1 Ovaryum yıkama ve taşımasında kullanılan ortamların içeriği	24
Çizelge 3.2 Oosit toplama, IVM, IVF ve IVC aşamalarında kullanılan ortamların bileşimleri.....	25
Çizelge 3.3 Ko-kültür için kullanılan farklı ortamların bileşimleri	27
Çizelge 4.1 KOK'lerinin maturasyonu üzerine farklı ovaryum taşıma sıcaklık ve ortamlarının etkisi.....	42
Çizelge 4.2 Oositlerin fertilizasyonu üzerine farklı ovaryum taşıma sıcaklık ve ortamlarının etkisi	43
Çizelge 4.3 Embriyoların gelişmesi üzerinde farklı ovaryum taşıma sıcaklıklarının ve ortamlarının etkisi.....	47
Çizelge 4.4 Embriyo kalitesi üzerine farklı ovaryum taşıma sıcaklık ve ortamlarının etkisi	49
Çizelge 4.5 KOK'lerinin maturasyonu üzerine farklı ortamlarda farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi.....	54
Çizelge 4.6 Oositlerin fertilizasyonu üzerine farklı ortamlarda farklı somatik hücreler ile beraber kültür edilmenin etkisi.....	56
Çizelge 4.7 Embriyoların gelişmesi ve kalitesi üzerinde farklı ortamlarla farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi	59
Çizelge 4.8 Embriyo kalitesi üzerinde farklı kültüre ortamlarında farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi.....	62
Çizelge 4.9 Apoptozis üzerinde farklı kültür ortamlarında farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi.....	66
Çizelge 4.10 Blastosist oluşumu üzerine TEAB ve farklı ortamlarının ikili kıyaslama sonuçları	70
Çizelge 4.11 Embriyo kalitesi üzerine TEAB ve farklı ortamlarının t-test kıyaslama sonuçları	71
Çizelge 4.12 Embriyo kalitesi üzerine TEAB ve farklı ortamlarının etkisi.....	72

1. GİRİŞ

Dünya nüfusunun çoğalmasından dolayı hayvansal ürünlere artan talepleri karşılamak için yeni teknolojilerin zootekni biliminde kullanımı zorunlu hale gelmiştir. Tüm çiftlik hayvanlarının genetik, üreme ve yetiştirmesinde pratikte kullanılabilir yeni bilgiler, buluşlar ve teknolojilerin katılımı zootekninin ilerlemesi açısından hayati önem taşımaktadır (Joan vd. 2010).

Hayvansal üretimi artırmak amacıyla evcil hayvan türünün üremesinde uygulanan yeni teknolojilerin ilk nesli (kızgınlığın senkronizasyonu, sperma toplama, sperma dondurma ve yapay tohumlama) genellikle günümüzde kullanılmaktadır. Üreme teknolojisinin ikinci nesli ise embriyo üzerindeki teknikleri (süperovulasyon, embriyo toplama, dondurma ve aktarma) içermektedir (Mermillod vd. 2006). Üreme üzerinde kullanılan IVP, üreme biyoteknolojisinin üçüncü nesli olarak adlandırılabilir.

1990'lı yıllar üreme biyolojisinin ilerlemesine tanık olunan yıllar olarak bilinmektedir. Bu ilerleme, kısmen biyoteknoloji, veteriner ve tıp alanlarında gamet ve embriyo kültürünün başarıyla kullanılmasıyla birlikte, bugünkü topluluğun zorunlu ihtiyaçlarından dolayı da ortaya çıkmıştır. Tıp biliminde, üremeye yardımcı teknolojiler (ART) döl verimi düşüklüğünü azaltabilmek için geliştirilirken, hızla çoğalan dünya nüfusunun artan ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla zootekni biliminde de gelişmektedir (Kay ve Brian 2003).

Her bir ovaryum doğumda yüz binlerce oosit içerir, ama bunların çoğunluğu atrezi yoluyla kaybolurlar. Hatta bu işlem doğumdan önce başlar. Genetik materyalinin bu büyük kaybı ovaryumlardan oositleri toplayarak, in vitro embriyo üretim yöntemlerini kullanarak azaltılabilir (David vd. 2004, Mapletoft ve Hasler 2005). Ayrıca bu teknikler saf ve melez üretiminde de uygulanabilirken (Michael vd. 2002) kesilen hayvanların oositlerini de kullanarak onlardan da yararlanma olanağını sağlayabilmektedir (Galli ve Lazzari 2005). İn vitro koşullarında embriyo üretimi; embriyo aktarımı ve geleneksel

süperovulasyonla kıyaslandığında birkaç avantaja sahiptir. İlk olarak, süperovulasyon uygulamasına yanıt vermeyen sorunlu ineklerde IVP kullanılabilir. İkincisi, geleneksel superovulasyona yanıt vermeyen sağlıklı dişilerle embriyo toplamaya yanıt vermemesi beklenen ölümcül derecede hasta olan dişilerin genetik potansiyelinden yararlanmak amacıyla IVP uygulanabilir. Üçüncüsü, bir dişi hayvandan toplanmış oositleri dölemek için farklı boğaların spermasını kullanarak, aynı zamanda farklı babadan embriyolar elde edilebilir. Dördüncüsü ise, IVP için transvajinal oosit toplama yöntemlerini kullanarak oositleri canlı verici hayvanın ovaryumlarından veya kesilmiş hayvanların ovaryumlarından elde edilebilmesini mümkün kılmaktadır (Suthar ve Shah 2009).

Ovaryum yanıtında yüksek değişkenlik, döllenmenin başarısızlığı, embriyo aktarımı ve geleneksel çoklu ovulasyon ile üretilmiş embriyolarda dejenerasyonun oluşmasından dolayı son zamanlarda IVP oldukça geliştirilmiştir (Gibbons vd. 2006). Yani IVP, uygulanabilirliği ve avantajlarından dolayı MOET ile birleştirilmiş veya ona bir alternatif olarak, çiftlik hayvanlarında embriyo üretimi için önem taşımaktadır (Havlicek vd. 2005).

Dünya çapında yoğun araştırma programlarının sayesinde, 1982’de ilk IVP buzağının doğumundan sonra, sığır IVP’sı önemli şekilde ilerlemekle birlikte bu ümit verici tekniğin daha geniş ticari kullanımı, hala bazı artakalan eksiklikler nedeniyle sınırlanmaktadır (Mermillod vd. 2006).

IVP birkaç yöntemin beraber kullanımı olarak, altı basamaktan oluşmaktadır (Kay ve Brian 2003, Mermillod vd. 2006):

- | | |
|---------------------------------|--------------------------|
| 1. Oosit Toplama | 4. İn Vitro Kültür (IVC) |
| 2. İn Vitro Maturasyon (IVM) | 5. Dondurma |
| 3. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) | 6. Embriyo Aktarım (ET) |

Bu tekniğin iyileştirilmesi yalnızca bu metotların bütününe uygun şekilde yürütülmesi ile mümkündür ve her bir aşamadaki eksiklik, kusur veya küçük bir değişiklik, elde edilen

embriyoların miktarı ve kalitesi üzerinde önemli derecede etkili olmaktadır. Bu yüzden IVP'nı iyileştirmek amacıyla yapılan çalışmalar, bu metotta uygulanan tüm yöntemleri göz önüne almalıdır.

Kaynak özeti bölümünde gözden geçirilen kaynaklar bu metodun iyileştirilmesine ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymuştur. Bu yüzden yapılacak olan bu çalışma bir dizi aşamalardan oluşturularak aşağıdaki amaçlara varabilmek için planlanmıştır:

1. Ovaryum taşımak için genelde serum fizyolojik ve PBS kullanılmaktadır. Ovaryum taşımak için yeni ortamlar ve onlar için en iyi sıcaklığı belirlemek bu aşamanın amacıdır.
2. Somatik hücrelerle beraber kültür etmenin etkisini IVM, IVF ve IVC aşamalarında belirleyerek IVP'nın her aşaması için en uygun ortam ve somatik hücrelerini tanımlamaktır.
3. Farklı somatik hücreler ve ortamlarla beraber kültür etme metodu sonucuyla elde edilen zigotları tavuk embriyosunun amniyon boşluğu içinde kültür ederek bu sistemin iyileştirilmesi ve sonuç olarak elde edilen embriyoların miktar ve kalitesinin artırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 İn Vitro Embriyo Üretimi

2.1.1 Ovaryum toplama işlemi ve laboratuvara aktarımı

Sığır, keçi, koyun ve manda ovaryumlarının taşınmasında yaygın olarak % 0.9 serum fizyolojik (Yang ve Rajamahendran 2002, Rodriguez-Dorta vd. 2007, Amer vd. 2008, Shi vd. 2009) ve PBS (Thibodeaux vd. 1992, Wani vd. 2000, Silva vd. 2004, Laiq Akbar Lodhi vd. 2009) kullanılmaktadır. Farklı sıcaklıkların etkisini belirlemek amacıyla yapılmış olan bir çalışmada serum fizyolojik için en uygun sıcaklık 15 °C olarak belirlenmiştir (Wang vd. 2011). Ancak Wongsrikeao vd. (2005) tarafından yapılmış olan araştırmada serum fizyolojik ortamında 4, 15, 25 ve 35 °C sıcaklıkta ovaryum aktarımı gerçekleştirildiğinde 25-35 °C daha uygun bulunmuştur.

Granüloza hücrelerinde apoptozisi önlemek için kısrağ folikülleri Hepes ve Hanks tuzları ile tamamlanmış M199 ortamında 20-30 °C'de 3 saatten daha az süre kalmalıdır. Ancak kümülüs hücrelerinin morfolojisini korumak için ovaryumlar oosit toplama işleminden 2 saat önce 35-37 °C'de tutulmalıdırlar. Ayrıca, oositin kromatin biçim değişimini önlemek için ovaryumlar 35-37 °C'de 6 saatten az saklanmalıdır. Sonuç olarak eğer ovaryumlar oosit maturasyon amaçlı çalışmalarda kullanılacaksa ovaryumların 4-6 saat oosit toplamadan önce 35-37 °C'de saklanması gerekmektedir (Pedersen vd. 2004). Ancak TCM199 ve IAA (indole3-asetik asit) ile tamamlanmış TCM199 ortamında 4, 20 ve 39 °C sıcaklıklarda kısrağ ovaryum parçalarının transportu gerçekleştirildiğinde 20 °C sıcaklıkta 4 saat süresince bekletme için TCM199+IAA daha uygun bulunmuştur (Ferreira vd. 2001).

Gomez vd. (2012) tarafından yürütülmüş olan bir araştırmada kısrağ ovaryum parçaları PBS ve MEM solüsyonlarında 4, 20 ve 39 °C sıcaklıkta 4, 12 ve 24 saat süre boyunca tutulduğunda morfolojik değerlendirme sonuçlarına dayanarak 4 saat sürede 4 °C

sıcaklıklı PBS uygun bulunmuştur. Ayrıca Garcia-Alvarez vd. (2011) göre 5-8 °C sıcaklıklı serum fizyolojik ortamında taşınan Iber kırmızı geyik ovaryumları 20-25 °C sıcaklıkta taşınanlara göre daha çok bölünme oranına sahip olmuştur. Ancak Di Francesco'ya (2007) göre düşük sıcaklıkta serum fizyolojik ortamında ovaryum transportu hem bölünme oranını, hem de blastosist oranını iyileştirmiştir.

Wang vd. (2011) çalışmalarında mezbahada kesilmiş ineklerin ovaryumlarından elde edilen oositler, OPU (Ovum Pick Up) yöntemiyle canlı hayvanlardan elde edilenlerle karşılaştırıldığında gelişim yeteneğinde bir düşüklük görülmüştür. Oositlerin kalitesindeki bu farklılıkların, IVP esnasında oosit üzerine yüklenen strese bağlı olduğuna inanılmaktadır. Ovaryumlar hayvandan ayrıldığı zaman stres başlar, depolama sıcaklığında veya ovaryum taşınırken koruma solüsyonunda hafif bir değişim, in vitro fertilizasyonu (IVF) veya somatik hücre nükleer aktarımını (SCNT) izleyen oositlerin gelişimsel yeteneği üzerinde önemli etki oluşturmuştur.

2.1.2 İn vitro maturasyon

Foliküller oluşuktan sonra durmuş (resting) olan primordial aşamasına girerler. Foliküler gelişimini başlatan mekanizma (primordial folikül aktivasyonu) ve gelişim zamanını ayarlayan mekanizma tamamen bilinmemektedir (Fortune vd. 2000).

Dişi hayvanın puberteye eriştiği zaman, ovaryumların içindeki foliküller de gelişir. Her kızgınlık döngüsünde, oositlerin bir ya da birkaçı (hayvan türüne bağlı olmak üzere) ovulasyondan bir gün önce olgun yumurta/yumurtalar olarak gelişir. Oositin maturasyonu hipofiz gonadotropinlerinin etkisiyle başlayıp, desteklenir (Brackett 1985). Ovaryumlarda, bütün primer foliküllerin gelişimi esnasında mayotik ilerlemenin bloku, oositi çevreleyen somatik hücreler veya teka hücreleri tarafından üretilmiş, bilinmeyen faktörler ile kontrol edilir (Tremoleda vd. 2003, Mermillod vd. 2006). Preantral ve büyük antral foliküllerdeki oositler her ikisi de birinci profazda durdurulurlar, ancak bu iki oosit gruplarındaki mayotik durdurmayı sağlayan mekanizma esas olarak farklıdır. Büyük

antral foliküllerin oositleri, foliküllerinden ayrıldıktan sonra in vitro'da gonadotropinden bağımsız olarak maturasyona, spontan (kendi kendine) bir biçimde uğrayabilir, ancak preantral foliküllerin oositi bu yeteneğe sahip değildir. Bu nedenle, antral foliküllerin oositleri eş foliküler somatik hücrelerden ortaya çıkan faktörler ile mayotik aşamasında durdurulur, ancak preantral foliküllerin oositleri otonom düzenleyici mekanizma aracılığıyla profazda durdurulmaktadır. Bu yüzden, preantral foliküllerin oositleri mayozu kaldığı yerden devam ettirmek için gereken yetkiye sahip değildir (Hasler 1998). Oosit maturasyonu, çekirdek ve sitoplazmik olgunlaşmayı içerir.

2.1.2.1 Çekirdek maturasyonu

Oositin nükleer maturasyonu çekirdeksel değişiklikleri içerir. Bu değişiklikler önceki diploit durumundan bir haploit kromozumlu kopyanın üretimi mayoz döneminde meydana gelir. Oosit I. profazda germinal vezikül (GV) olarak adlanan görülebilir çekirdek konumunda durdurulur. Mayoz yeniden başlarken nükleer örtüsünün bozulması gibi germinal vezikül yıkımını oosit geçirir. Birinci metafazda kromozom kondenzasyonu, iğ iplikçilerinin üzerinde çift olarak homolog kromozomlar dizilir. Anafaz ve telofaz esnasında bivalentlara (iki değerliler) ayrılırken homolog kromozomlar da ayrılarak ikinci metafaz ortaya çıktığı zaman ayrılma işlemi tamamlanmış olur. Bu aşamada birinci kutup cisimciğın görülmesiyle ayırt edilebilir. İkinci kutup cisimciğın bulunuşu, başarılı fertilizasyonu izleyen mayozun tamamlanmasıyla ortaya çıkar (Christian 2008).

Çekirdek maturasyonu, LH surge'una yanıt olarak II. Metafaz aşamasına kadar ilerleyip daha sonra mayoz, ovulasyonun gerçekleşmesine kadar durdurulur (Brackett 1985, Peng vd. 1991).

2.1.2.2 Sitoplazmik maturasyon

Oositin sitoplazmik maturasyonu, nükleer maturasyonun tamamlanması, fekdasyon ve erken embriyogenezizin kapasitesi için oosit üzerine yavaş yavaş aşılın olayları içermektedir. Bu yüzden implantasyona, gebeliğin başlamasına ve fetüsün normal gelişimine zemin sağlamaktadır (Watson 2007). Sitoplazmada ortaya çıkan önemli değişiklikler organellerin yapısal değişikliği, majör translasyonel faaliyeti (birçok yeni protein sentezlenirken diğerlerinin sentezinin bitişi) ve mRNA, proteinler, kalsiyum düzenleyici mekanizmaların gelişimi, MAPK ve MPF'in faaliyetindeki değişiklikler, substratlar ve besinlerin birikimidir (Memili vd. 2007, Watson 2007, Rahman vd. 2008). Sitoplazmik maturasyon ooplazmanın kortikal bölgesinde kortikal granüllerinin göçü gibi iyi tanınan morfolojik değişiklikleri içerir (Mermillod vd. 2006). Muhtemelen in vitro embriyo üretiminin bütün işlemleri arasında en kritik olan işlem in vitro maturasyondur (Mermillod vd. 2006). Günümüze kadar in vivo koşullarında olgunlaşan oosit ile in vitro ortamında olgunlaşan oositlerin arasında belli başlı farklılıklar görülmektedir (Sirard ve Blondin 1996).

Canlı doğum, implantasyon ve blastosist oluşum oranları gibi ölçülen parametreler dikkate alındığında, IVM'in başarı oranı yaklaşık olarak IVF' in yarısı kadardır (Albuz vd. 2010). Düşük gebelik oranlarının bir nedeni ise in vitro maturasyonunda kullanılan ortamların optimum altında olduğundan kaynaklanmaktadır (Roberts vd. 2002).

In vitro koşullarında insan embriyolarının üretimi hayvan embriyoları üretiminden farklıdır. İnsan embriyo üretiminde standart yöntemler tamamen gelişmiş foliküllerden MII oositlerinin aspirasyonu ile başlamaktadır. Bu yüzden oosit maturasyonu in vivo'da gerçekleşmektedir (Fulvio ve Tiziana 2010). Ancak memeli çiftlik hayvanlarında embriyo üretiminde kullanılan oositler olgunlaşmamış oositlerdir. Kültürde, olgunlaşmamış oositler mayoza kaldığı yerden devam ederek germinal vezikülden mayozun ikinci bölünmesinin metafazına (MII) kadar ilerler (Krisher 2004). Ruminant oositleri genellikle nemlendirilmiş atmosferde %5 CO₂ altında 39 °C'de olgunlaşırlar. Optimal olgunlaşma süresi (oositlerin % 90'ından daha fazlası II. metafaz aşamasına

eriştiği zaman) 22-24 saattir. Oosit sitoplazmasının yüksek lipid içeriğinden dolayı kültürlenme sırasında nükleer durumunun ilerlemesinin takibi mümkün olmamaktadır. Buna ek olarak, IVP verimini artırmak için sitoplazmik maturasyon için kümülüs hücrelerinin hazır bulunması gereklidir. Oosit, bu hücrelerle örtüldüğünden dolayı kümülüs hücrelerinin genişlemesi IVM esnasında oosit maturasyonunun yalnız görünebilen belirtisidir. Bu hücreler hyaluronik asit üretirler. Hyaluronik asit salgılanıp ekstrasellüler matrikste polimerleşerek hücre arası boşluğunun artışına neden olur (Mermillod vd. 2006).

İn vitro'da oosit'in maturasyonunda kullanılan kültür ortamları yaygın olarak basit ve kompleks kültür ortamlarına bölünebilirler. Basit ortamlar genellikle tamponlanmış bikarbonat sistemleri olarak serum fizyolojikle birlikte pirüvat, laktat ve glikozu içerir. Basit ortamların çeşitli türleri arasındaki belli başlı farklılıklar, ortamların içindeki iyon yoğunluğu ve enerji kaynağının konsantrasyon farklılıklarına bağlıdır. Bu ortamlara genellikle serum veya albumin eklenir. Ayrıca, çok düşük (trace) miktarlarda antibiyotikler eklenir (penisilin, streptomisin, gentamisin). Kompleks ortamlar, diğer taraftan, basit ortamların bileşenlerine ilaveten, esasen serumda bulunan düzeylerde amino asit, vitaminler, pürinler ve diğer maddeleri içermektedir (Mermillod vd. 2006).

Oosit IVM'sinde en yaygın kullanılan kompleks ortam %10-20 ısı ile inaktife edilmiş serum (sığır fetüsünün serumu, buzağı serumu, dana serumu veya bir kızgın sığırın serumu olabilir) ile tamamlanmış Earle's tuzu, L-Glutamine ve 25 mM HEPES'le birlikte 199 doku kültür ortamıdır (TCM-199). Ham's-F12, MEM, IVMD 101, RPMI, Waymouth, Sentetik Sığır Oviduktal Sıvı ortamı, kullanılan diğer kültür ortamlarıdır. Ancak bunların hepsi maturasyonun ilerlemesi için başka tamamlayıcılara ihtiyaç duymaktadır (Danila 2000, Mermillod vd. 2006). Ortam genellikle surfactant etkisi olan yüksek moleküler ağırlıklı moleküller ile tamamlanıp, ayrıca hormonlar ve büyüme faktörlerini de temin etmektedir (Mermillod vd. 2006).

İn vivo koşullarında oositin sitoplazmik ve nükleer maturasyonunun doğal ortamı foliküler sıvısı olduğu için oosit kültürüne uygun olduğu tavsiye edilir. Epidermal

büyüme faktörü (EGF) ve FSH'nin ayrıca sitoplazmik ve nükleer maturasyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir. Oksidatif hasardan hücreleri koruyan glutathionun sentezini cysteamine (Cys) artırdığı (Alabart vd. 2010) için ortamda bulunması yararlı olabildiği söylenmektedir.

2.1.3 İn vitro'da dölleme (IVF)

Dölleme, erkek ve dişi gametlerinin birleşimiyle sonuçlanan bir dizi olaylardır. Bu olaylar: (1) bir spermatozoit, bir oositin kümülüs hücre örtüsüne temas ederek nüfuz etmesi; (2) zona pellusidanın içine girmesi; (3) spermatozoit ile oositin dış zarlarının kaynaşması ve (4) pronükleusların kaynaşması (syngamy) ve ilk bölünme iğinin üzerinde her pronükleusun kendi kromozomunun sıralanmasını kapsamaktadır (Wright ve Bondioli 1981). In vitro fertilizasyon, olgun oositlerin dişi genital kanalının dışında döl1enmesidir.

Spermanın direkt uygulamasıyla in vitro'da oositi döllemek amacıyla başlangıçtaki çabalar başarısız olmuştur. Daha sonra, tohumlanmış sığırın uterusundan 12 saat sonra geri alınan spermi kullanarak başarılı fecondasyon elde edildiği, sperm kapasitasyonunun gerekli olduğunu göstermiştir (Kay ve Brian 2003). Bu yüzden IVF'te kullanılan ortam, kimyasal sinyaller ve besinlerle sperm hücrelerini destekleyerek sperm hareketliğinin artışı ve kapasitasyon indüksiyonunu sağlamalıdır. Bu yüzden, IVF ortamları gametlerin kaynaşmasını kolaylaştırmak suretiyle embriyonik gelişimin başlamasına imkân sağlamaktadır.

2.1.3.1 Sperm seçme metodu

IVF programında sperm seçme metodu yaşayabilen, hareketli ve morfolojisi normal spermatozoanın seçilmesi için kullanılmalıdır (Batista vd. 2006). IVF sistemi üzerinde düzenli olarak sperm seçme metotları, seminal plazma veya kriyoprotektant'ı kaldırma ve spermin kalite özelliklerini artırma amacıyla kullanılmaktadır (Dode vd. 2002). Sperm

seçimi için yıkama/santrifüjleme, yoğunluk gradyentte üzerinde santrifüje etme, cam yünü kolonu içinden yumuşak filtrasyon ve kendi-göçme yöntemi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Swim-up ve Perkol veya Ficoll santrifüjü en yaygın kullanılan teknikler olup, sırasıyla kendi-göçme ve yoğunluk gradyentte santrifüjleme yöntemine aittirler (Dode vd. 2002). Ficoll veya Perkol yoğunluk gradyentte santrifüjleme ile swim-up kıyaslanırken, swim-up ile daha çok yüksek derecede hareketli spermatozoa elde edilebilir. Ancak, taze semen ile IVF'ten sonra oositin içine girme (penetrasyon) ve bölünme oranı açısından hiçbir farklılık görülmemektedir. Konvansiyonel olarak donmuş-erimiş semen için hareketli sperm kesintili Perkol gradyenti üzerinde santrifüjleme ile elde edilir (Paramio 2010).

2.1.3.1.1 Yoğunluk gradyentte santrifüjleme yöntemi

Bu yöntemde sperm ayırma amacıyla sıvılaştırılmış seminal plazma yumuşak bir biçimde orijinal semen örneğinin kalitesine bağlı olarak tek (%90) veya kat kat yapılmış çift kolon yoğunluklu perkol (%40/80 veya %45/90) üzerine pipet ile yerleştirilir. Ayırma sadece ejakülatta yüzen spermin yüzdesine dayanmayıp, diğer hücre türlerinden bu hareketli popülasyonu ayırmak için yumuşak santrifüjün kuvvetine de dayanmaktadır (Tucker ve Jansen 2002).

2.1.3.1.2 Kendi-göçme yöntemi

Yoğunluk gradyent tekniği olmayan swim-up tekniği, en çok kullanılan teknik olarak belli bir ejakülatta sperm popülasyonunun yalnızca kendine özgü etkinliğine dayanarak seminal plazmadan hareketli spermin ayrılmasına yol açmaktadır (Tucker ve Jansen 2002). Bu yöntemde dikkatlice, 100 µl semen 1 ml sp-TALP içeren konik tüpün altına yerleştirilip 1 saat süresince 38°C'li su banyosuna daldırılarak sağlanır. 4 ml sp-TALP'in içine su banyosundaki sp-TALP ortamının üst tabakasından 800 µl transfer edilip, 50 x g'de 10 dk. Santrifüj edilir. Oositi dölemek için peletten 200 µl'i toplanıp, seçilir. (Younis vd. 1991, Wolf vd. 2008).

2.1.3.2 Sperm kapasitasyonu

Memeli spermi ejakülasyondan hemen yumurtaları dölleme yeteneğine sahip değildir. Sperm sınırlı bir zaman içinde dişi organında kaldıktan sonra dölleme kapasitesini kazanır. Dişi organ ortamı, spermde bir dizi fizyolojik değişikliklere neden olur. Bu değişikliklerin tümüne kapasitasyon denir (Salicioni vd. 2007). Kapasitasyon da ki tüm değişiklikler tam olarak bilinmemektedir. Ancak, akrozom ve sperm baş zarının anterior kısmındaki enzimik ve yapısal değişim gibi bazı değişiklikleri içermektedir. Bu değişiklikler aşağıda sıralamaktadır:

- Kalsiyum iyonuna membran geçirgenliğinin artışı
- Membran yapısının değişimi
- Adenil siklaz enziminin aktivasyonu
- Proakrosin proteininin akrosine dönüşümü (Ball ve Peters 2004).

Heparine benzer bir tür glikozaminoglikan, kapasitasyonu hızlandıran faktördür. İn vitroda spermin kapasitasyonu heparin kullanımıyla gerçekleşir. Heparin özellikle sıgır spermine bağlanarak hücre dışı kalsiyum varlığında kapasitasyonu ilerletir (Agca vd. 1998).

2.1.3.3 Oositin döllemesi

Fertilizasyon için çeşitli ortamlar mevcuttur. Ancak, TALP veya SOF temeline dayanan ortamlar, genellikle IVF için kullanılan ortamlardır. Bu ortamlar IVF amacıyla kullanıldığında glikoz içermeyip, farklı heparin konsantrasyonlarıyla tamamlanırlar. Sperm ve yumurtanın beraber kültür edilmesinden 18-20 saat sonra IVF tamamlanır (Galli ve Lazzari 2005).

2.1.4 İn vitro koşullarında kültür etme (IVC)

Olgunlaşmamış oositlerin yaklaşık olarak %90'ı, kızgınlık döngüsünün farklı aşamalarında foliküllerinden toplandıktan sonra nükleer maturasyonu geçirirler; bunların aşağı yukarı %80'i döllenabilir ve en az bir bölünmeyi geçirip, iki-hücre aşamasına ulaşabilir. Ama bu zigotların %30-40'ı blastosist aşamasına erişebilir. Döllenme sonrası düşük blastosist üretimi, döllenmeden sonra embriyo kültür ortamının önemini açıklar. Oositin kendine özgü kalitesi, onların blastosist aşamasına gelişim oranlarını belirlerken, fertilizasyon sonrası kültür ortamı, blastosist kalitesi üzerinde en büyük etkiye sahiptir (Rizos vd. 2003). Fertilizasyon sonrası kültür ortamı sadece embriyoları geliştiren ortam değildir; ayrıca beraber kültür tabi tutulan embriyoların sayısı, kültür ortamına embriyonun oranı ve diğer etmenleri de kapsamaktadır (Lonergan vd. 2006).

Fertilizasyondan sonra, varsayımsal zigotlar fertilizasyon ortamından alınıp, çiftlik hayvanlarının çoğunda (Çizelge 2.1) 7 gün boyunca kültür ortamında inküde edildikten sonra blastosist aşamasına erişir.

Çizelge 2.1 Çiftlik hayvanlarında IVC süresi

Hayvan türü	In vitro'da kültür süresi (gün)	Kaynak
Sığır	7	(Galli ve Lazzari 2005)
Keçi	5-7	(Samake vd. 2000, Izquierdo vd. 2002)
Koyun	7	(Baldassarre vd. 1996)
Deve	7	(Khatir ve Anouassi 2006)

In vitro'da embriyo gelişimi, somatik hücreler ile beraber kültürleşme, kültür ortamına antioksidan eklenmesi ve oksijen yoğunluğu gibi birkaç faktör tarafından etkilenmektedir. Kültür damlacığında mevcut embriyoların sayısı diğer faktördür; embriyolar grup halinde kültür edildiğinde, tek tek kültür edilen embriyolardan daha iyi

gelişmektedir. Embriyo gelişiminde grubun etkisi muhtemelen autokrine-parakrine tarzında etki eden embriyotropik faktörlerin salgılanmasından dolayı ortaya çıkmaktadır (Pereira vd. 2005).

In vitro'da üretilmiş sığır zigotları koyun oviduktu içinde kültür edildiği zaman blastosist aşamasına erişen oositlerin oranı etkilenmeden önemli ölçüde blastosistlerin soğuğa karşı dayanıklılığını iyileştirmektedir. Bu farklılıkların en az bir kısmı, doğrudan doğruya ultrastrüktürel düzeydeki farklılıklara bağlanabilir. Rutin in vivo embriyo kültürü hem pratikteki güçlükler hem de hayvan refahı ile ilgili kurallardan dolayı tercih edilmemektedir (Rizos vd. 2001).

Yüksek yıpranma oranı biyolojik veya genetik kusurlardan dolayı ortaya çıkabilir. Bu kusurlar, kısırılık gösteren bireylerin embriyoları, optimum olmayan kültür ortamlarının bileşimi, kültür sisteminin fiziksel parametreleri veya bunların hepsinin birleşimidir (Melin vd. 2009). Bu yüzden yüksek kaliteli embriyo üretimini garanti altına almak için in vitro kültür sistemlerinin iyileştirilmesi gerekmektedir.

2.1.4.1 Kültür sistemi

İki ortam, iki metabolizma

İn vivo'da gelişen embriyo oviduktan, atmosfer gazı ve sıvı bileşimleri muhtemelen uterus lümeninden farklıdır. Erken embriyo gelişiminde ilerlemiş bilim ve maternal reproduktif sisteminin mikro-çevresi, embriyo kültürü sırasında iki ortam kullanımını önerir. Sıralı (sequential) ortam, gelişmekte olan embriyonun ölçülebilen ihtiyaçlarına yanıt olarak geliştirilmiştir. Sıralı ortamın tasarımı, blastulasyon, farklılaşma ve büyümeye göre artmış enerji isteğini karşılamak için kompaksiyondan dönem esnasında pirüvat metabolitinden glikoz metabolitine değişimi üzerine dayanmaktadır. Ayrıca, daha erken embriyonik aşamalarında kısıtlanmış altküme amino asitlere ayarlanırken, genomik aktivasyondan sonra yirmi amino asitin tüm dizisine ayarlanmaktadır. Yan ürün birikim

miktarının azaltılmasıyla (mesela amonyum) G1.2/G2.2 gibi sıralı ortamından elde edilmiş sığır embriyolarının miktarı ve niteliği ko-kültür sisteminden elde edilmiş embriyolar ile karşılaştırılabilir. KSOM/SOF, eSOF-98/LSOF-98, SOF1/SOF2 ve SOF-A/SOF-B sıralı ortamının diğer örnekleridir. G1.2/G2.2 sistemi, sığır embriyo kültüründe ticari kullanım amacıyla önerilmiştir (Feugang vd. 2009).

Embriyonun değişen ihtiyaçlarını karşılamak için dinamik kültür sistemleri uygun görülmektedir. Bu sistem için birkaç kere oosit ve embriyoların toplanılması ve yeni ortamda yerleştirilmesi gereklidir.

2.1.4.2 Kültür ortamı

İn vitro'da döllenmiş oositler için farklı kültür ortamları vardır. Onlar formülasyonlarına bağlı olarak sınıflandırılabilirler:

Tanımlanmamış ortamlar

Serum, bu kültür sistemlerinin ana parçasından birisidir. İn vitro embriyo üretiminde en çok tartışılan konu, serum kullanımıdır. Çünkü kimi araştırmalar in vitro embriyo üretim esnasında serum bulunan kültür ortamında bazı gelişim bozukluklarının ortaya çıktığını göstermişlerdir (Thompson vd. 1995, Sinclair vd. 1998). Hâlbuki çoğu araştırmaların sonucuna göre kültür ortamına serum eklenmesi oositin gelişme yeteneğine ve implantasyon öncesi embriyoların üzerine olumlu etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (Vanderhyden ve Armstrong 1989, Carolan vd. 1995, Thompson vd. 1998, Tavares vd. 2008, Leivas vd. 2011).

Serum yerine makromoleküller veya sentetik serum konulduğunda embriyo üretiminin azaldığı gösterilmiştir (Wang vd. 1997, Sagirkaya vd. 2004). Ancak serum konusundaki tartışmalara rağmen, embriyo üretiminde kullanılan ortamların hemen hemen hepsinde serum kullanılmaktadır (Gomez vd. 2008). BSA veya serum içermeyen kültür

ortamlarında üretilen embriyolarda metabolik faaliyetinde farklılıklar göstermekle birlikte daha düşük gelişme yeteneğine ve daha az hücre sayısına sahip oldukları bildirilmiştir (Duque vd. 2003).

Amino asitler, vitaminler, enerjik substratlar ve büyüme faktörleri gibi embriyoya çok yararlı faktörleri sağlayan serum, kültür ortamlarını embriyotoksik faktörlerle de bulaştırabildiği söylenilmektedir. Serum genellikle bifazik etki (ilk hücre bölünmesini engelleyip daha ileri embriyo gelişimini uyarır) ile blastosistin oranını artırır (Camargo vd. 2006). Blastosist ürününün artırmasına rağmen, serum ayrıca sitoplazmik lipidlerin birikimini arttırıp, kriyopreservasyondan sonra embriyonun yaşama yeteneğini azaltıp (Abe vd. 2002, Sudano vd. 2011), dişi embriyoya göre erkek embriyonun oranını (erkek:dişi) artırdığı gösterilmiştir.

Somatik hücreler ile beraber kültür sistemleri de tanımlanmamış kültür sistemlerinde yer almaktadır. Somatik hücrelerin embriyotrofik etkiye sahip oldukları iyice kanıtlanmıştır. Bu etkiler daha hızlı bölünme, daha yüksek blastosist oranı, az parçalanma oranı, blastosist hücre sayılarının artması, morfolojik görünüş veya dereceyi iyileştirme, genişlenmiş blastomerlerin kalitesini iyileştirme, apoptozisin azalışı, hatching'i kolaylaştırma, transferden önce yaşam yeteneğini koruma, gebelik oranını iyileştirme ve canlı doğumları artırmak gibi özellikleri içermektedir (Orsi ve Reischl 2007).

Kültür koşullarını iyileştirme amacıyla uygulanan çeşitli teknikler arasında ovidukt epitelyal hücreleri, uterus fibroblastları, kümülüs hücreleri ve trofoblastik keseleri gibi somatik hücreler ile ko-kültür sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır (Hosseini vd. 2008). Ko-Kültür, potansiyel olarak in vivo çevresini taklit eden basit bir modeldir (Orsi ve Reischl 2007). Oositler ile somatik hücreler beraber ko-kültür edildiğinde genellikle yüksek gelişim oranı ve iyi kaliteli blastosist elde edilir. Bu blastosistler in vitroda üretilen embriyolarla karşılaştırıldığında soğuğa daha dayanıklı (cryotolerance) ve daha yüksek gebelik oranlarına sahip olduğunu göstermişlerdir (Feugang vd. 2009). Yardımcı veya besleyici somatik hücreler tarafından kültür ortamına çeşitli büyüme faktörlerinin eklendiği kanıtlanmıştır. Bu hücreler büyüme faktörleri eklemekle kalmayıp ayrıca kültür

ortamından toksin maddeleri uzaklaştırarak morfolojik yönden sağlıklı embriyo gelişimini olumlu yönde de etkilemektedir (Parikh vd. 2006).

Oosit ve zigotlar üzerine somatik hücrelerin etkisi çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Somatik hücrelerin kültür metodu, kültür ortamı, somatik hücresinin türü ve somatik hücrenin eklendiği aşama (IVP aşaması) ko-kültür sonuçlarını etkileyen en önemli faktörlerdendir. Tek katman (monolayer) ovidukt hücreleri üzerine %10 FCS ile tamamlanmış M199'lı ortamda kültür edilen tek-hücreli zigotun tek katman olmayan süspansiyon ortamındaki zigottan daha iyi geliştiğini göstermiştir. M199+FCS ve Hams-F10+FCS ortamlarıyla tek katman ovidukt hücreleri üzerine ko-kültür edilen koyun zigotlarının gelişimi araştırıldığında, M199+FCS en yüksek düzeyde etkili olduğu görülmüştür (Rexroad vd. 1988).

IVM aşamasında olgun olmayan sığır oositleriyle granüloza hücreleri beraber ko-kültür edildiğinde mayozun yeniden başlamasının engellendiği Sirard ve Bilodeau (1990) tarafından rapor edilmiştir. Goto vd. (1992) tarafından gerçekleştirilmiş oldukları bir çalışmada granuloza, ovidukt, uterus, deri ve testis hücreleri ile dört-sekiz hücreli embriyolarla ko-kültür edilmiştir. Bu çalışmada blastosist aşamasına gelen embriyolar muameleler arası istatistik olarak farklılık göstermemelerine rağmen gelişim hızı bakımından ovidukt hücreleri en hızlı gelişimi sağlarken, testis hücreleri en düşük gelişim hızına sahip olduğunu göstermiştir.

Başlangıçtaki ümit verici raporlar ovidukt hücreleri ile beraber kültür edilen fare ve ruminant embriyolarında bölünme oranı, hücre sayısı ve yaşama yeteneği bakımından in vivo embriyoları ile kıyaslanabildiğini göstermiştir. Ancak, in vitro'da üretilen embriyolar üzerinde yapılan daha sonraki araştırmalar ko-kültür sistemi ile elde edilen ruminant ve tavşan embriyolarının hala in vivo embriyolarından daha az geliştiklerini göstermişlerdir. Bundan başka, gelişim, morfoloji ve yaşama yeteneği üzerine ko-kültürün varsayılan embriyotrofik etkilerinin az veya hiç olmadığını diğer araştırmacılar rapor ederken, olumsuz etkiye sahip olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Hatta implantasyondan önce embriyo gelişimi üzerine ko-kültürün görünen faydaları olsa

da iç hücre kümesinin trofektoderm hücre oranı (İÇK/TH) gibi yaşama yeteneğini belirleyen kriterler hiçbir zaman kullanılmamıştır (Orsi ve Reischl 2007).

Somatik hücre kaynağı ve tedavisi (örneğin kriyoprezervasyon, hormona maruz kalma, perfusion gibi), temel ortamın kompozisyonu, kültür metodu, serumun varlığı, mikro damlacık/açık kültür, gaz/oksijen yoğunluğu, sıcaklık, somatik hücre substratı ve ortama dahil edilmiş tamamlayıcılar (glütasyon, glisin, alanin, hemoglobin,...) gibi çeşitli parametrelerin etkileşimiyle ko-kültürün sonucu değişmektedir (Orsi ve Reischl 2007).

Yarı tanımlanmış ortamlar

Embriyonik ve fetal gelişimi üzerine serumun zararlı etkilerinin şüphelerinden dolayı serumsuz kültür sistemleri incelenmiştir. Yarı tarif edilmiş kültür sistemi genellikle serumun yerine albumin katılarak yapılır. Böylece serumun potansiyel olarak zararlı bileşenlerinin çoğu yok edilir (Camargo vd. 2006). Memelilerin reproduktif sisteminin çok yaygın proteinlerinden biri albumindir. Fareden elde edilen sonuç, albuminin hücre içi rolleri ve ayrıca ek hücre dışı destekleme rolleri olabildiğini önermektedir (Thompson 2000). Bir kültür ortam araştırmasında, BSA ve serum birbiriyle kıyaslandığında, BSA ortamı, vitrifikasyondan sonra daha iyi yaşama yeteneğine sahip olan embriyo üretmiştir. Yine de, BSA bir biyolojik bileşen gibi bulaşabilir. Embriyo ve fetal gelişimini de bozabilir. BSA'nın rolü in vitro kültüründe net değildir. Embriyonik gelişiminde BSA'nın olası rolü embriyo metabolizması için amino asit substratlarını sağlamak olabilir. BSA bulaşmasını azaltmak amacıyla rekombinant BSA kullanımı bir alternatiftir. Rekombinant BSA de kriyoprezervasyondan sonra aynı blastosist gelişimini ve aynı yaşama gücü oranlarını sağlayabilmesi mümkündür (Camargo vd. 2006).

Tamamen tanımlanmış ortam

Albuminin yerini polivinil alkol ve polivinil pirrolidon (PVP) gibi makromoleküller alan, protein içermeyen ortamlar olarak tanımlanmaktadır. Gösterildiğine göre in vitro'da

fertilize edilmiş sığır embriyoları protein içermeyen kültür sistemlerinde gelişebilirler. Serum, ko-kültür ve albuminin olası zararlı etkilerinin eliminasyonu bu sistemin avantajıdır. Ayrıca bu sistem kültür koşullarının daha iyi kontrolüne izin vererek, embriyo kültür ihtiyaçlarını değerlendirme amacıyla planlanmış araştırmaları kolaylaştırır. Ancak, tam tarif edilmiş kültür sistemleri kullanımıyla blastosist ürünü, araştırmalar arasında istikrarlı olmayıp çoğunlukla yarı tarif edilmiş sistemlerle kıyaslandığında daha az embriyo üretilir. Bu nedenle bu tür kültür sisteminin ticari kullanımı kısıtlanmaktadır. Tam tarif edilmiş kültür sisteminde ko-kültür veya serumun koruyucu etkisi olmadığı için bu sistem zehirli bulaşmaya ve oksidatif strese karşı daha duyarlıdır (Camargo vd. 2006).

Çizelge 2.2 Sığır ve koyun için tam tanımlanmış veya yarı tanımlanmış koşulların altında kullanılan ortam seçiminin bileşimi (Thompson 1996)

Bileşen	CDM	CR1	CZB	HECM	SOFaaBSA
NaCl (mM)	81	114.7	81.62	98	107.7
KCl (mM)	8	3.1	4.83	3.2	7.16
KH ₂ PO ₄ (mM)	-	-	1.18	-	1.19
MgCl ₂ (mM)	0.5	-	-	0.5	0.48
MgSO ₄ (mM)	-	-	1.18	-	-
NaHCO ₃ (mM)	25	26.2	25.12	25	25
CaCl ₂ (mM)	2	-	1.7	2	1.71
Na Pyruvat (mM)	0.5	0.4	0.27	0.5	0.33
Na Laktat (mM)	5	-	31.3	10	3.3
Ca Laktat (mM)	-	5	-	-	-
Glikoz (mM)	2	-	-	-	1.5
Glutamin (mM)	1	1	1	1	1
Gerekli amino asit solüsyon	MEM	BME	-	karıştırılmış	MEM
Gereksiz amino asit solüsyon	MEM+5mg gly	MEM	-	karıştırılmış	MEM
EDTA	0.1	-	0.11	-	-
BSA (mg/ml)	-	3	4	-	8
PVA (mg/ml)	0.1	-	-	1	-
Antibiyotikler çizelgede dahil edilmemiştir. Ancak düzenli olarak kullanılır.					

2.2 Embriyo Kalitesini Belirlemek Amacıyla Kullanılan Kriterler

Başta sığır olmak üzere çiftlik hayvanları ile insan üzerinde yapılan araştırmalarda en iyi dereceye sahip olan embriyoların aktarımından sonra daha yüksek gebelik oranları elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre embriyo morfolojisi ile ET arasında bir ilişki söz konusudur (Pomar vd. 2005). Ayrıca, in vitro'da üretilen embriyoların ET sonuçları ile in vivo embriyolarının ET sonuçları kıyaslandığında önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. ET'den sonra kuzulama, buzağılama ve oğlaklama oranı in vivo embriyolarında sırasıyla %75, %76 ve %71 olurken in vitro embriyolarında ise sırasıyla %32, %30 ve %47'dir (Cognie vd. 2003, Pedersen vd. 2004). Ayrıca, kromozomlarda anormal gelişimler in vivo embriyolarının morfolojisinde belirli değilken, IVP embriyolarında ise daha belirgindir (Pomar vd. 2005). Dev yavru sendromu gibi büyüme ile ilgili anomalilerin IVP embriyoları aktarımıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Embriyoların değerlendirilmeleri için yalnız morfolojik kriterlerin kullanımı iyi kriter olmadığından hücre sayısı değerli bir kriter oluşturmaktadır. Gerçekten, in vivo blastosistlerinde kalite azalırken blastosistlerde ortalama hücre sayısı da azalmaktadır (Iwasaki vd. 1990). Bu yüzden embriyo kalitesi değerlendirilirken iç hücre kümesinin (İHK) trofektoderm hücrelerine (TH) oranı, apoptozis, soğuğa karşı dayanıklılık (kriyotolerans), gen ifadesi ve metabolik aktivasyon gibi kriterlerin ölçümü önem taşımaktadır.

2.2.1 İHK:TE oranı

İn vitro koşullarında üretilen embriyolarının kalitesi çok değişken olarak morfolojik veya zona pellusidadan çıkma sadece bir kriterle ölçülememektedir. Yaklaşık %82'si normal morfolojik görüntüye sahip olan embriyoların sadece % 17'si normal gebeliğe neden oldukların gösteren Papaioannou ve Ebert (1986)'e göre in vitro koşullarında büyüyen embriyolarda hücre sayısı in vivo embriyolarından daha az bulunmaktadır. Ayrıca, normal implantasyon öncesi gelişimi için hem İHK ve hem de TE hücrelerinin yeterince olmaları gereklidir (van Soom vd. 1997). Bu yüzden embriyo kalitesi ölçümü için bu ölçüm en önemli kriterlerden birisi olarak göze alınmıştır.

Tüm memeli türlerinin erken embriyonik gelişiminin ortak morfolojik olayı blastulasyondur. Morula aşamasında ilk farklılaşma olayı moleküler ve pozisyonel sinyallerle birlikte sitoskeletal bileşenler ve organellerinin asimetrik dağılımı, hücre bölünmesi üzerinde hücre ilişkileri tarafından uyarılmaktadır. Bu uyarı basit epitelyum ile sarılmış sıvı-dolusu boşluğun biçimlenmesine neden olmaktadır. Placentali blastosistini oluşturan hücreler, İHK ve TE hücreleridir. Bu hücreler farklı morfolojik, immünolojik, endokrinolojik ve metabolik özelliklere göre tanımlanmaktadır (de la Fuente ve King 1997). İHK embriyonun bütün dokusunun ve embriyonun dış zarlarının bir kısmının oluşumunda payı olurken TE hücreleri genellikle plasentanın dış tabakasını oluşturur (Koo vd. 2002).

Bir blastosistin kalitesi hem belirgin blastosol hem de orak biçiminde hücrelerden meydana gelen TE ile belirlenmektedir (Ebner vd. 2003). Embriyolarda canlılık azalışı, İHK'indeki hücre sayısı azalışla belirlenmektedir. Bu nedenle, IVF blastosistleriyle elde edilen düşük gebelik oranları İHK hücrelerinde hücre proliferasyonunun düşük olduğundan dolayı ortaya çıkabilmekte olduğu söylenmektedir. Fetüsün başarılı şekilde büyümesi, implantasyon zamanındaki İHK ve TE hücrelerinin yeterli miktarda bulunmasına bağlı olup İHK:TE oranı embriyonun yaşına, üretim koşullarına ve sistemlerine bağlı olmaktadır. Koo vd. (2002) nin sonuçları İHK:TE oranını in vivo, in vitro ve NT embriyolarında sırasıyla yaklaşık olarak 0.525, 0.731 ve 0.982 olarak bulmuştur. Domuz embriyosu üzerinde yapılan bir çalışmaya göre erken blastosist ve blastosist aşamasındaki in vivo embriyolarında İHK/TE oranı 0.469 olurken genişlemiş blastosistlerde bu oran 0.296 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca beş günlük in vivo ve in vitro fare blastosistlerinde İHK/TE oranı sırasıyla 0.55 ve 0.59 olarak belirlenmiştir (Brison ve Schultz 1997). Iwasaki vd. (1990) ise İHK/TE oranını erken, genişlemiş ve zonadan çıkan sığır blastosistlerde ise sırasıyla 0.22, 0.16 ve 0.15 olarak bildirmiştir.

İHK ve TE hücrelerini ayırmacı boyama tekniğini ile ayırmak, embriyo kalitesini değerlendirmesi için kullanışlı bir yöntem olduğu önerilmektedir (Iwasaki vd. 1990).

2.2.2 Apoptozis

Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), çok hücreli organizmaların sağlıklı ve normal şekilde gelişmesinin bir parçasıdır. Çeşitli uyarıcıların etkisiyle hücre ölümü ortaya çıkmaktadır ve bu ölümler apoptozis esnasında kontrollü olarak gerçekleşmektedir. Kontrollü hücre ölümüne neden olan apoptozis, hücre ölümlerinin diğer biçimi olan nekrozisten bu nedenle ayrılmaktadır. Yani, nekroziste hücre ölümleri kontrolsüz olarak ortaya çıkıp hücrelerin çözülmesi, iltihaplara neden olmakla birlikte olası veya ciddi sağlık sorunlarına da yol açmaktadır. Hücrelerin veya dokuların büyük bir kısmı nekrozisten etkilenip hücre şişmesine ve hücre zarı yırtılmasına neden olmaktadır (Dash 2014). Nekrozisin aksine apoptozis işleminde hücreler aktif rol oynayarak kendi ölümlerine neden olurlar. Ayrıca apoptozis tipik olarak yalnızca tek hücreyi etkilerken, nekrozis hücre kümesini veya dokuları etkilemektedir (Betts ve King 2001).

Büyüme aşamasında olan iyi kaliteli embriyolarda kompaksiyon aşamasına kadar apoptozisin ortaya çıkması için çok az kanıt bulunmaktadır (Hardy 1999). Örneğin, TUNEL yöntemiyle IVP sistemi ile üretilmiş olan oositler, 8-hücreli embriyolar, morula ve blastosistlerde çekirdek DNA'sının parçalandığı belirlenmiştir, Ancak ne bölünmenin ileri aşamalarında olan zigotlarda ne de süper ovule yöntemiyle elde edilen in vivo sığır embriyolarında bu durum ortaya çıkmamıştır (Byrne vd. 1999, Matwee vd. 2000, Betts ve King 2001).

Apoptozis, implantasyon öncesi büyüme aşamasında olan embriyolardaki fazla hücreler, anormal hücreler veya potansiyel olarak tehlikeli hücrelerin yok edilmesinde kritik bir işlemdir (Gjorret vd. 2003). Ayrıca, apoptotik hücrelerin yüksek seviyede bulunması anormal embriyo morfolojisi ile bağlantılıdır. Apoptozis indeksinin belli bir eşikten geçmesi durumunda embriyonik büyümenin devamının tehlikeye girdiğini göstermektedir (Hardy 1999).

Ayrıca apoptozis işleminin görevi, embriyolardan anormal hücrelerin çıkarılmasıdır (Hardy 1999). Nükleer ve kromozoma bağlı anormallikler hem insan hem de sığır embriyolarında tespit edilmiştir. Özellikle, insan embriyolarının yaklaşık olarak %20'si kromozoma bağlı anormallik göstermektedir. Embriyonik insan hücrelerinin %40'ından daha fazlası mozaik (yani bir embriyonun içinde kimi hücreler diploit olurken diğerleri anoploit, haploit veya triploittirler) olduğu gösterilmiştir (Harper vd. 1995). Benzer bir şekilde, in vivo sığır embriyolarının %25'i ve in vitro sığır embriyolarının %72'si mozaik olarak belirlenmiştir (Viuff vd. 1999). Apoptozis, in vivo embriyonik gelişiminin normal bir parçası olmasına rağmen in vitro embriyo üretim sistemlerinde muhtemelen optimum altı koşullardan dolayı ortaya çıkabildiği (Hardy 1999, Matwee vd. 2000) için IVP embriyolarının kalitesini belirlemek amacıyla kullanılan bir metot haline gelmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Tezin amaçlarına varabilmek için bu çalışma üç aşamadan oluşturulmuştur. İlk aşamada, ovaryumlardan elde edilen oositlerin ve üretilen embriyoların kalitesi ve miktarı üzerine beş farklı ovaryum taşıma ortamının (NS, PBS, CR1, KSOM, CZB) etkisi üç farklı sıcaklıkta (4, 25, 38 °C) incelenmeye alınmıştır. Bu çalışmanın sayesinde en iyi taşıma metodu belirlendikten sonra tezin daha sonraki aşamalarında kullanılmıştır.

İkinci aşama, farklı ortamlar ve farklı somatik hücreler ile ko-kültür etmenin etkisini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Birinci incelemeden elde edilen yöntemle oositler toplanıp değerlendirildikten sonra 5 farklı ortamda, her birisi de 4 farklı somatik hücrelerle beraber (somatik hücre içermeyen (HS), Granüloza hücreleri (G), Kümülüs hücreleri (K) ve ovidukt hücreleri (O) kültür edilmiştir. Bu aşamada IVM, IVF ve IVC sonuçları değerlendirilerek en iyi ko-kültür sistemi belirlenip çalışmanın sonraki aşamalarında kullanılmıştır.

Son aşamada ise tavuk embriyo amniyonu, kültür ortamı ve sistemi olarak kullanılmıştır. İkinci aşamada kullanılan yöntemlerle 2-8 hücreli zigotlar tavuk embriyosunun amniyon boşluğunun içine yerleştirilmiştir. Bu aşamada tavuk embriyo amniyonu içinde en uygun ko-kültür ortamı belirtilmiştir.

3.1 Materyal

Sığır ovaryumları hayvanların ırk, yaş, ağırlık ve üreme özelliği dikkate alınmaksızın Çubuk mezbahasında kesilen ineklerden toplanmıştır.

İncelemede kullanılan kimyasal maddeler ve ortamlar Sigma firmasından temin edilmiştir. Diğer firmalardan temin edilen maddeler ilgili bölümün içinde verilmiştir.

3.2 İn Vitro Embriyo Üretimi

3.2.1 Oosit toplama

Ovaryumlardan elde edilen oositlerin ve üretilen embriyoların kalitesi ve miktarı üzerine ovaryum taşıma ortamının ve sıcaklığının etkisini belirlemek amacıyla sığır ovaryumları mezbahadan toplanmıştır. Kesimden hemen sonra ovaryumlar normal salin (NS) ile iyice yıkayıp, kan ve atıklardan temizlendikten sonra 500 ml taşıma ortamını (Çizelge 3.1) içeren kapların içine konulmuştur. Ovaryumlar üç farklı sıcaklıkta (4°C, 25 °C, 38 °C) termos ile A.Ü. Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü'ndeki fizyoloji ve üreme biyolojisi laboratuvarına aktarılmıştır. Birinci aşamanın sonuçlarına göre 4 °C'lik CR₁ ortamı, ovaryum taşıma ortamı olarak araştırmanın diğer kısmında kullanılmıştır.

Ovaryumlar taşıma ortamı ile yıkandıktan sonra %70 etanol ile temizlenip doğrama tekniği (Soto vd. 2003) kullanılmıştır. Bu yöntemde steril cerrahi bıçağı ile ovaryumun yüzeyine narin kesikler açıldıktan hemen sonra ovaryumlar toplama ortamında çalkalanarak hafif vuruşlarla KOK'ler 200 ml'lik beherin içine serbest bırakılmıştır. Daha sonra KOK'ler 3-4 kere toplama ortamında yıkandıktan sonra ayrılmıştır. KOK'ler değerlendirmesi kümülüs hücre yatırımları ve ooplazmanın morfolojisine (Raman vd. 2007) dayanarak yapılmıştır.

Çizelge 3.1 Ovaryum yıkama ve taşımasında kullanılan ortamların içeriği (mM)

Madde	SKU	NS	PBS	CR1	KSOM	CZB
NaCl	S5886	150	130	135	125	100
KCl	P5405	-	2.70	10	2.50	4.86
Na₂HPO₄	S5136	-	10	-	-	-
KH₂PO₄	P5655	-	1.80	-	0.35	1.17
MgCl	63068	-	-	-	0.20	1.18
CaCl₂	C7902	-	-	-	1.71	1.71
Na Lactate	L4263	-	-	-	10	30.10
Na Pyruvate	P4562	-	-	-	0.2	-
HEPES	H6147	-	-	10	10	100

* Ortamlara 100 iu/ml Penicillin G sodium (P3032) ve 100 µg/ml Streptomycin (S1277) eklenmiştir

** Ortamlarda pH 7.4'e ayarlanmıştır

3.2.2 İn vitro maturasyon

Oositler kümülüs-korona kompleksleri değerlendirildikten sonra grup halinde 20 uygun KOK mineral yağ altında 100µl TCM-199 temeline dayanan maturasyon ortamında (Çizelge 3.3) 38,5 °C’de %5 O₂, %5 CO₂’li nemli atmosferli havada 24 saat kültür edilerek olgunlaştırılmıştır (Gardner vd. 2004, Romaguera vd. 2010).

Çizelge 3.2 Oosit toplama, IVM, IVF ve IVC aşamalarında kullanılan ortamların bileşimleri

	SKU	Birim	OTO	IVM	IVF (Fert-SOF)	IVC SOF-BE1
TCM199 (Earle’s tuzlu)	M3769	ml	100	-	-	-
TCM199 (Hanks’ tuzlu)	M0393	ml	-	100	-	-
NaHCO ₃	S5761	mM	5.00	25	27.70	25.07
Hepes	H6147	mM	20.00	-	-	-
L-Glutamine	G8540	mM	1.00	1.00	-	1.00
Na Pyuvate	P4562	mM	-	0.40	0.40	0.40
Na Lactate	L4263	mM	-	-	5.30	5.30
Cysteamine	M9768	mM	-	0.1	0.10	-
NaCl	S5886	mM	-	-	107.70	107.70
KCl	P5405	mM	-	-	7.16	7.16
KH ₂ PO ₄	P5655	mM	-	-	1.19	1.19
CaCl ₂	C7902	mM	-	-	1.17	1.17
MgCl ₂	63068	mM	-	-	0.49	0.49
Tri-Na Citrate	S3-320-60	mM	-	-	-	0.50
Myo-inositol	I7508	mM	-	-	-	2.77
MEM none essential AA	M145	µl/ml	-	-	-	10
BME essential AA	B6766	µl/ml	-	-	-	20
BSA	A2153	mg/ml	-	4.00	-	-
EFAF-BSA	A7030	mg/ml	-	-	6.00	4.00
Caffeine	C0750	mM	-	-	2.00	-
Heparin	H3149	µg/ml	2.00	-	10.00	-
PMSG		IU/ml	-	40	-	-
FSH***		µg/ml	-	20	-	-
Estradiol	E2758	µg/ml	-	1	-	-
Fetal bovine Serum	BI04-007-1B	%	4	10	-	10**

* Bütün ortamlara 100 µg/ml Sterptomysin, 100 IU/ml Penicilin ve 0.03 mM Phenol red (P3532) eklenmiştir.

** Zigotların kültür edilmesinden 48 sonra ortama eklenmiştir.

*** Ortama ya PMSG veya FSH eklenmiştir.

Tezin ikinci aşamasında da birinci aşamada belirlenen metot ile KOK’ler olgunlaştırılmıştır. Ancak maturasyon ortamı olarak 5 farklı ortam (Çizelge 3.4) her birisi de somatik hücre içermeyen (HS) veya 3 farklı somatik hücrelerle beraber (GH, KH, OH) kültür edilmişlerdir.

Bu aşamada, 7 gün önceden 3 farklı somatik hücreler ayrı ayrı olarak her bir ortamda kültür edilmiştir (somatik hücre ayırma yöntemleri 3.3 başlığı altında detaylı olarak yazılmıştır).

3.2.3 İn vitro fertilizasyon

IVF için dondurulmuş semen kullanıldığından dolayı sperm seçme, kesintili Perkol yoğunluğuyla yapılmıştır (Paramio 2010). Kısaca, iki tabaka halinde hazırlanan Perkolün (% 90 ve % 45) üzerine 500 µl çözölmüş sperma boşaltılıp oda sıcaklığında 10 dk boyunca 120 x g'de santrifüj edilmiştir (Wolf vd. 2008). Tüpün altında oluşmuş olan sperm pelleti, yüzen kısımdan ayrıldıktan sonra SP-TL eklenerek 5 ml hacme tamamlanmıştır. Tekrar 10 dk 50 x g'de santrifüj edilip, üst kısmın tamamen atılmasından sonra dipteki pellet ayrılıp sperm yoğunluğu belirlenip her mililitre IVF ortamı yaklaşık olarak 1×10^6 sperm içerebilecek şekilde IVF ortamıyla (Çizelge 3.2) sulandırılmıştır (Rosenkrans vd. 1993). 10-20 olgun oositler IVF medyumunda 3 kere yıkanıp, sperm içeren 200 µl fertilizasyon ortamında mineral yağ altında, 38.5 °C sıcaklıkta, % 5 O₂, %5 CO₂'li ortamda 18 saat inkübe edilmiştir (Bavister vd. 1992, Galli ve Lazzari 2005). Fertilizasyon belirtisi olarak ilk bölünme kullanılmıştır.

3.2.4 İn vitro koşullarında kültür etme

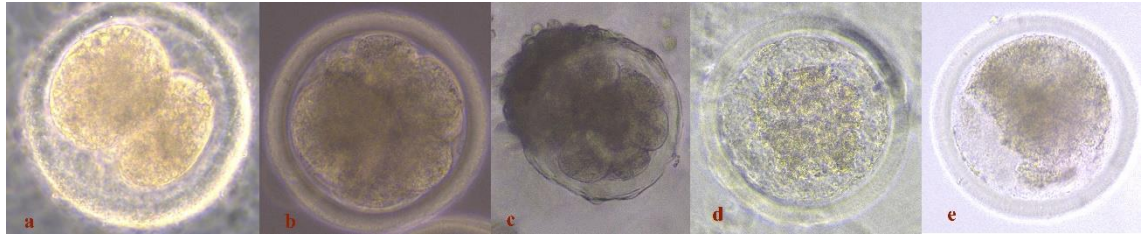
Fertilizasyondan sonrasındaki varsayımsal zigotlar 2 dk süresince H-SOF ortamında vorteks edilerek kümölös hücrelerinden ayrılmıştır. KOK hücreleri ayrılmış olan oositler incelenip kendine ait IVC ortamında üç kere yıkanıp (Çizelge 3.3) morula-blastosist aşamasına (Şekil 3.1) erişince 10 varsayımsal zigot 50 µl IVC ortamında 38,5 °C'de %5 O₂, %5 CO₂'li nemli atmosferli havada inkübe edilmiştir. 48 saat tohumlamadan sonra her kültür ortamına % 10 fötal buzağı serumu eklenmiştir (Pereira vd. 2005, Romaguera vd. 2010).

Çizelge 3.3 Ko-kültür için kullanılan farklı ortamların bileşimleri

	Birim	TCM199	Ham's F12	mSOF	FS	TEAS	*
TCM199 (M3769)	%	10	-	-	*	**	
Ham's F12	%	-	10	-	-	-	
NaHCO ₃	mM	25	25	25			
L-Glutamine	mM	1.00	-	1.0			
Na Pyuvate	mM	0.40	0.40	0.33			
Na Lactate	mM	-	-	3.30			
Cysteamine	mM	0.1	0.1	0.1			
NaCl	mM	-	-	107.7			
KCl	mM	-	-	7.16			
KH ₂ PO ₄	mM	-	-	1.19			
CaCl ₂	mM	-	-	1.71			
MgCl ₂	mM	-	-	0.49			
BSA	mg/ml			3			
PMSG	IU/ml	40	40	40	40	40	
Estradiol	µg/ml	1	1	1	1	1	
Fetal bovine Serum	%	10	10	10	10	10	
Penicillin G sodium	iu/ml	100	100	100	100	100	
Sterptomycin	µg/ml	100	100	100	100	100	
Phenol red	mM	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03	

*Hazırlanmış TCM 199 ortamına %50 FS eklenmesiyle oluşturmuştur.

** Hazırlanmış TCM 199 ortamına %50 TEAS eklenmesiyle oluşturmuştur.



Şekil 3.1 Farklı aşamalarda sığır embriyosu

a. İki blastomerli zigot, b. ~6-8 blastomere sahip zigot, c. ~16 hücreye sahip embriyo, d. Morula, e. blastosist

Bu aşamada, 7 gün önceden 3 farklı somatik hücreler ayrı ayrı olarak her bir ortamda kültür edilmiştir. Araştırmanın bu kısmının amacı ise embriyo üretimi için en uygun ortam ve ko-kültür sisteminin belirlenmesidir.

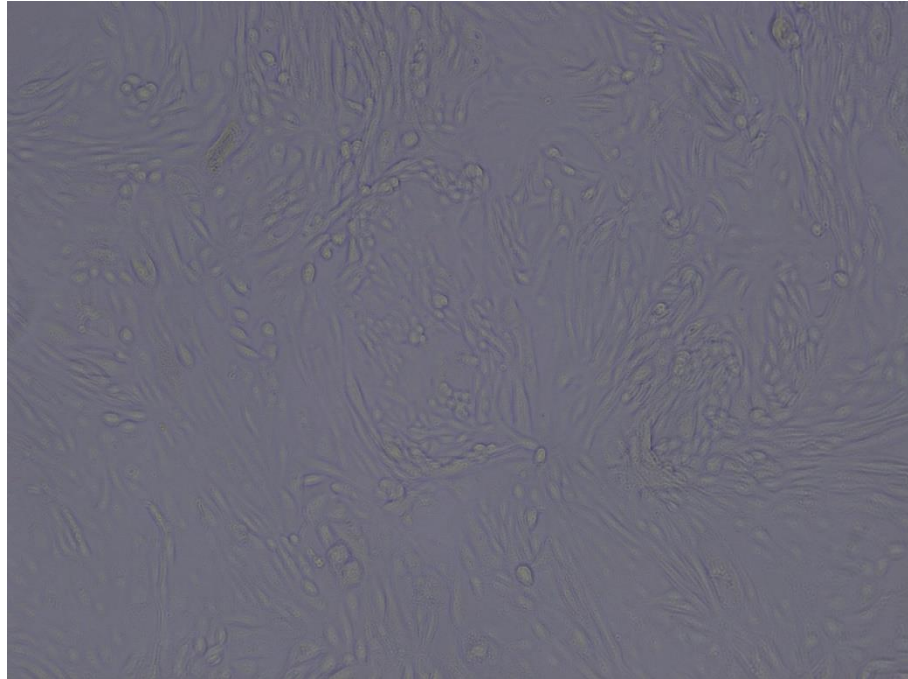
3.3 Somatik Hücre Ayırma ve Kültür Etme Yöntemleri

3.3.1 Ovidukt epitelyal hücre ayırımı

Mezbahadan toplanan oviduktlar laboratuvara taşındıktan sonra iyice yıkanıp %70 alkol ile temizlenip çevresindeki dokulardan arındırılmıştır. Şekil 3.2’de gösterildiği gibi hazırlanan oviduktlar steril lam aracılığıyla isthmus’tan infundibuluma doğru hafif bir şekilde sürülerek ovidukt epitelyal hücreleri toplanmıştır (Rexroad vd. 1988). Toplanan epitelyal hücreleri 10 ml 38 °C sıcaklıklı kültür ortamı içeren cam beherin içine konulmuştur. Daha sonra 38 °C sıcaklıkta olan 10 ml trypsin-EDTA eklenip karıştırılarak 30-40 dakika boyunca 38 °C’de inkübe edilmiştir. Beher dibinde doku parçalarının çökmesini sağlamak amacıyla 2-3 dakika bekletildikten sonra steril pipet aracılığıyla tek hücreleri içeren süpernatant toplanıp 50 ml’lik santrifüj tüpünün içine 0.5-1.0 mm deliğe sahip filtreden geçirilerek kan pıhtısı ve doku parçaları ayrılmıştır. Hücreler 250 g’de 5 dakika santrifüje edilerek toplanıp tekrar 2 ml ortamda süspanse edilmiştir. Süspanse edilen hücreler 4 ml %50 perkol’un üzerine yerleştirildikten sonra 20 dakika 250 g’de santrifüje edilerek epitelyal hücre yığınları, eritrositler ve lökositler ovidukt epitelyal hücrelerinden ayrılmıştır. Son santrifüj işlemi de 250 g’de 5 dakika boyunca yapıldıktan sonra pellet tekrar süspanse hale getirilmiştir (Freshney ve Freshney 2002). Ayırma işlemi bittikten hemen sonra hücre yoğunluğu hemositometr ile belirlendikten sonra kültür edilmiştir (Şekil 3.3).



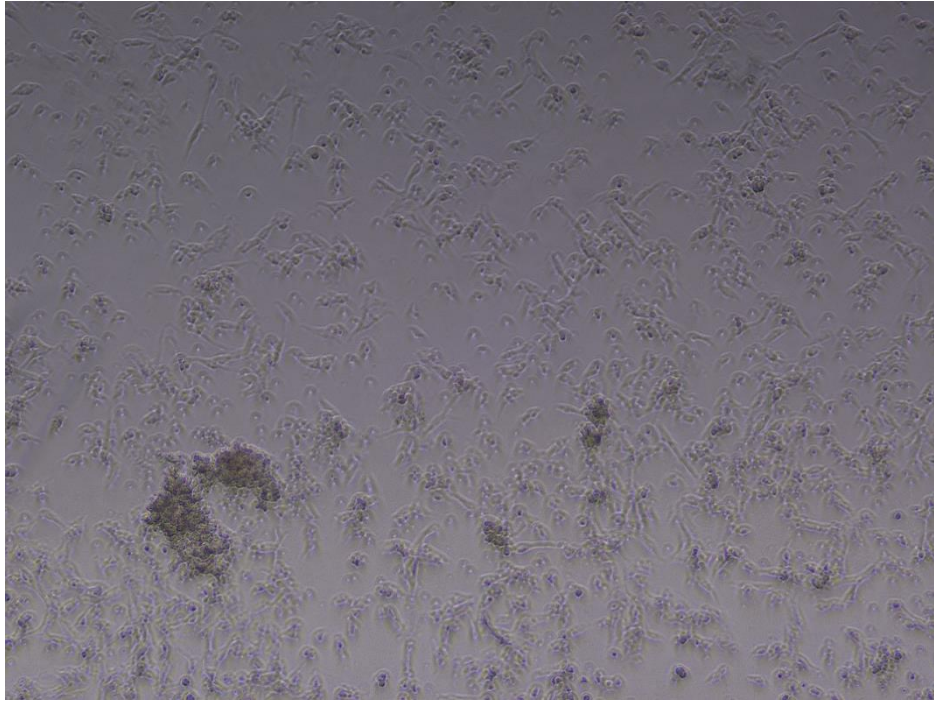
Şekil 3.2 Ovidukt epitelyal hücresinin toplama metodu



Şekil 3.3 Kültürle etmeden 7 gün sonra inek ovidukt epitelyal hücrelerinin faz-kontrast mikroskop görüntülenmesi (büyütme x100)

3.3.2 Granüloza hücrelerin ayırımı

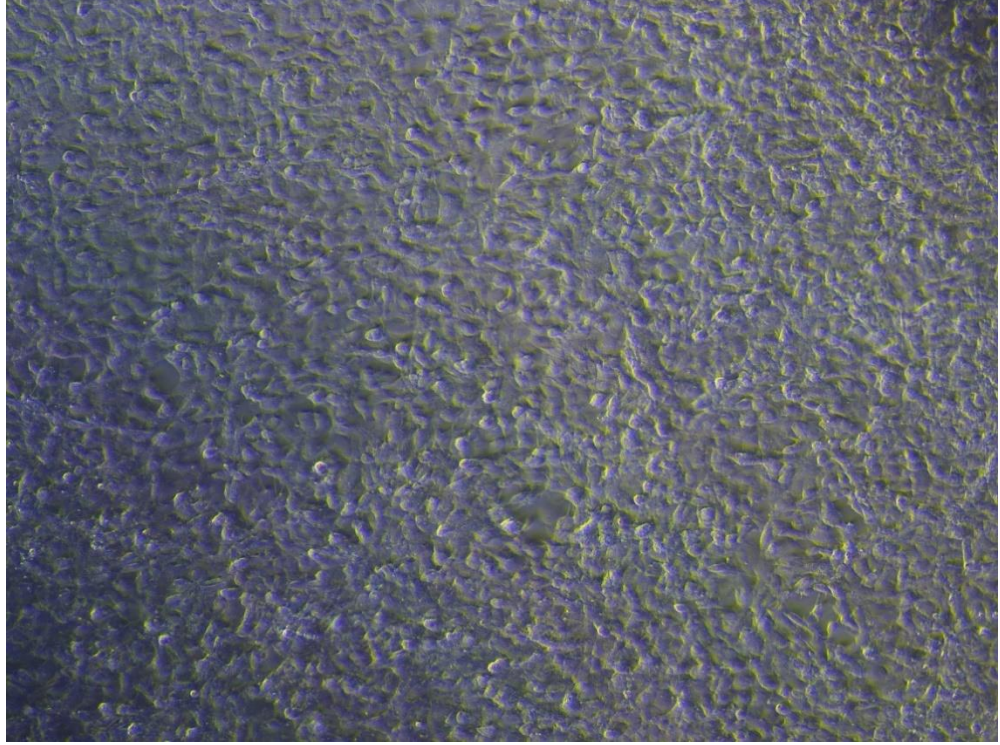
Ovaryum dilimleme yöntemi ile KOK toplanması esnasında toplama kabının yüzey kısmı 5 dakika bekletildikten sonra santrifüj tüpüne aktarılıp 250 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek ayrılmıştır. Elde edilen pellet 38 °C sıcaklıklı % 0.2 hyaluronidase içeren 5 ml ortama eklenerek süspanse edilip, 20-30 dakika boyunca 38 °C'de inkübe edilmiştir. Daha sonra hücreler 250 g'de santrifüje edilerek toplanıp tekrar 2 ml ortamda süspanse edilip, 4 ml %50 perkol'un üzerine yerleştirilip 20 dakika 250 g'de santrifüje edilerek granüloza hücreleri ayrılmıştır. Son santrifüj işlemi 250 g'de 5 dakika boyunca yapıp, pellet'e tekrar ortam eklenerek ayırma işlemi tamamlanmıştır (Wen vd. 2010). Ayırma işlemi bittikten sonra hemositometre aracılığıyla hücre yoğunluğu belirlenip hücre kültür ortamında hücre yoğunluğu 4×10^4 hücre/cm² olacak şekilde sulandırıldıktan sonra kültür edilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Kültürlemeden 2 gün sonra inek granüloza hücrelerinin faz-kontrast mikroskop görüntüsü (büyütme x100)

3.3.3 Kümülüs hücrelerin ayırımı

Kümülüs hücreleriyle sarılan oositler 500 µg/ml hyaluronidase içeren 5 ml 38 °C’li ortama aktarılıp 2-5 dakika beklettirildikten sonra vorteks edilmiştir. Oositler ortamdan ayrıldıktan sonra kümülüs hücrelerini içeren ortam iki kere 5 dakika boyunca 250 g’de santrifüj edilerek yıkanmıştır (Totey vd. 1993). Elde edilen pellet tekrar süspanse hale getirildikten sonra hemositometre aracılığıyla hücre yoğunluğu belirlenmiştir. İşlem tamamlandıktan sonra tek katman kümülüs hücre elde etmek amacıyla kültür edilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Kültürlemeden 7 gün sonra inek kümülüs hücrelerinin faz-kontrast mikroskop görüntülenmesi (büyütme x100)

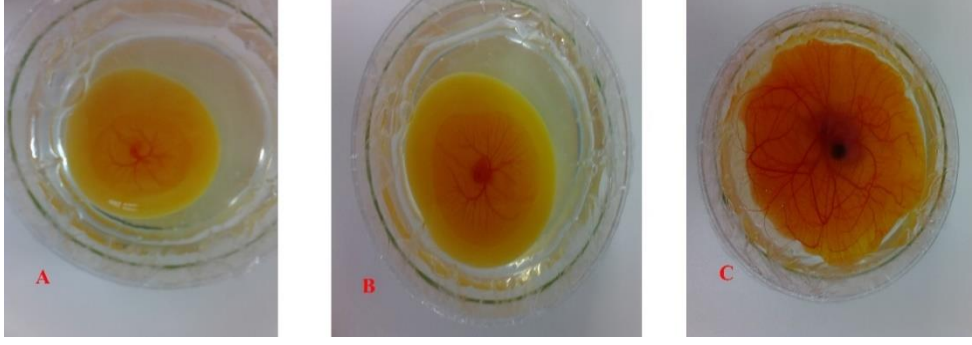
3.3.4 Somatik hücrelerin kültür etme yöntemleri

Dokudan ayrıldıktan sonra hücreler kültür flaskın içine en az 4×10^4 hücre/cm² aktarımıyla primer hücre kültür işlemi gerçekleştirilmiştir. Kültür ortamına aktarılan hücreler 38.5 °C sıcaklıkta, % 5 O₂, %5 CO₂'li nemli atmosferde inkübe edilmiştir. Kültür ortamının yenileme işlemi ilkte 24 saat içinde yapılmıştır. Ancak daha sonraki ortam değiştirme işlemi ortamın rengini ve hücrelerin durumuna bağlı olarak yapılmıştır.

Hücre pasajlama işlemi, hücrelerin izdihamı %80-%90'a eriştiği zaman yapılmıştır (Şekil 3.3-3.5). Hücre tek tabakası DPBS ile yıkandıktan sonra hücre tek tabakasını örtecek kadar trypsin-EDTA (L0940, Biowest) eklenip 38 °C'de hücrelerin flask tabanından serbestleştiği zamana kadar inkübe edilmiştir. Sonraki aşamada uygun miktarda yeni ortam eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra uygun hücre yoğunluğuna (4×10^4 hücre/cm²) pasaj edilmiştir (Freshney ve Freshney 2002).

3.4 Tavuk Embriyosu

Çalışmadan 7 gün önce taze ve döllenmiş tavuk yumurtaları (T) inkübe edilmiştir. 72 saat inkübasyondan sonra yumurtalar %70 etanol ile temizlenip daha sonra yatay biçimde havada kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra yumurtalar çatlatılarak içeriği selofan mutfak örtüsü ile örtülmüş olan plastik kabın içine boşaltılmıştır. Yumurta içeriğini içeren kaplar gevşekçe plastik kapakla kapatılıp 96 saat süresince 38.5 °C'de inkübe edilerek amniyotik sıvı toplamasına veya sığır zigotlarının inkübasyonu için hazırlanmış hale getirilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Kabuksuz tavuk embriyo üretimi

a. inkübasyonun 3. günü, b. inkübasyonun 4. günü, c. inkübasyonun 8. günü

3.4.1 Tavuk embriyosundan amniyotik sıvı (TEAS) toplama metodu

Amniyotik sıvı toplamak için 7. günde amniyon sıvısı şırıngaya bağlı olan 18'lik iğne kullanımıyla emilerek toplanıp 0.2 µm filtre ile sterilize edilerek mikro santrifüj tüplerin içinde kullanım zamanına kadar -20 °C'de depolanmıştır.

3.4.2 Sığır zigotlarının tavuk embriyo amniyotik boşluğu içinde inkübasyonu

Son aşamada ise, kültür ortamı ve sistemi olarak tavuk embriyosunun amniyonu kullanılmıştır. En uygun tavuk embriyoları seçildikten sonra ikinci aşamada kullanılan yöntemlerle 2-8 hücreli sığır zigotları 50µl, ~37 °C'li DPBS solüsyonunda eritilmiş olan düşük sıcaklıkta eriyen agaroz (A9539) solüsyonunda yerleşerek eğimli cam pipetin içine emilmiştir. Embriyoları içeren agaroz, yaklaşık olarak 30 saniye havaya maruz kaldıktan sonra oda sıcaklığında silindir jel biçiminde her embriyo grubunun kendine ait olan ortamının içine aktarılmıştır. Embriyoları içeren agaroz silindiri, eğimli cam pipetin içine tekrar emdirilip dikkatli bir şekilde 4 günlük tavuk embriyosunun amniyotik boşluğunun içine bırakılmıştır. Daha sonra sığır embriyolarını içeren tavuk embriyoları 4 gün boyunca 38.5 °C'de inkübe edilmişlerdir (Davidson 2004). Embriyolar tavuk amniyosundan toplanıp agar silindirinden ayrıldıktan sonra yıkanıp incelenmiştir.

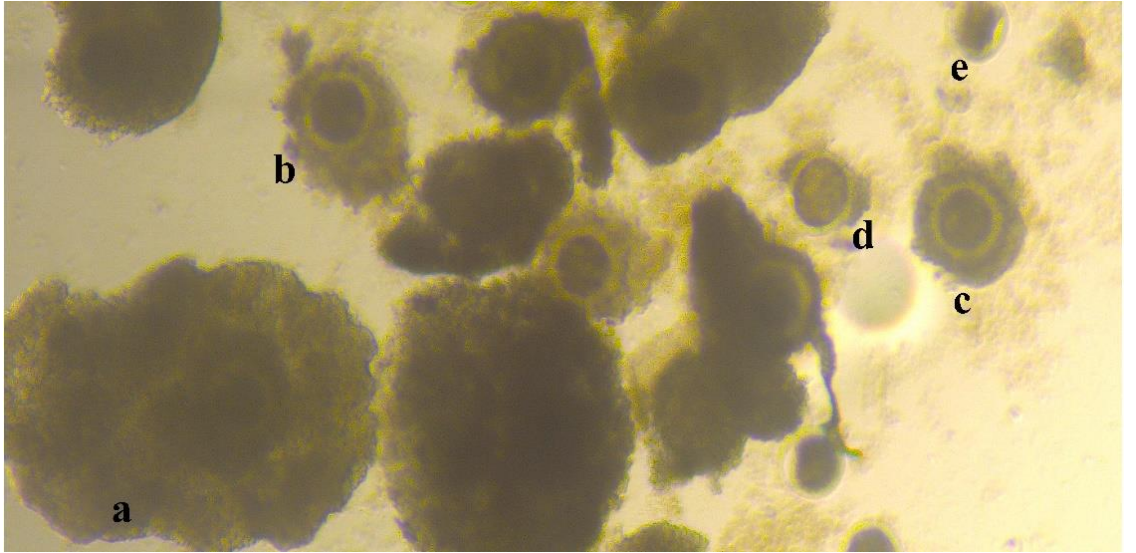
3.5 Oosit, Zigot ve Embriyoların Değerlendirilmesi

3.5.1 Oositlerin değerlendirme ve sınıflandırılmaları

Toplanan KOK'lerin değerlendirme işlemleri faz kontrast mikroskop altında yapılmıştır. Değerlendirmeler, kümülüs-korona hücre yatırımları ve ooplazmanın morfolojisine (Raman vd. 2007, Rahman vd. 2008) dayanarak yapılmıştır. Bu yöntemde KOK'ler beş sınıfa ayrılır (Şekil 3.7):

A sınıfında 5 tam tabakadan fazla kümülüs-ooforus ve korona radiata (kümülüs-korona) hücreleri ve ince ince granüle edilmiş homojen ooplazmalı KOK'ler yer almaktadır (Şekil 3.7.a).

B sınıfı ise 3-5 tam tabaka kümülüs-korona hücreleri ve çok iyi bir biçimde granüle edilmiş homojen ooplazmalı KOK'leri içerir (Şekil 3.7.b).



Şekil 3.7 Oosit sınıflandırması

C sınıfı ise 1-2 tam tabakalı kümülüs-korona hücreleri veya 3-5 kısmen kümülüs-korona hücre tabakasıyla örtülen ve çok iyi bir biçimde granüle edilmiş homojen ooplazmalı KOK'leri içermektedir (Şekil 3.7.c).

D sınıfı eksik yatırımlı kümülüs-korona hücreleri olan oositleri ve çok iyi bir biçimde granüle edilmiş homojen ooplazmaya sahip oositleri içermektedir (Şekil 3.7.d).

E sınıfı (Kötü sınıf) ise çıplak oosit, dejenere olan veya boyut ve biçimi anormal oositleri ve heterojen ooplazma veya jöle benzeri kümülüs-korona hücre yatırımı olan atreziye uğrayan oositleri içerir (Şekil 3.7.e).

E sınıfı hariç diğer sınıflarında (A, B, C ve D sınıflar) yer alan KOK'ler in vitro maturasyon için seçilmiştir.

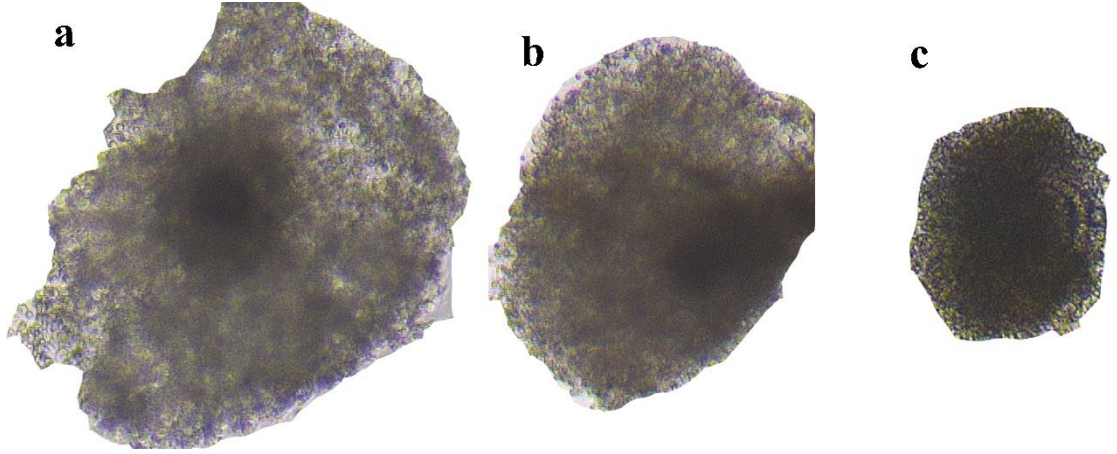
3.5.2 Oosit maturasyonu (kümülüs hücrelerin genişlemesi)

İn vitro maturasyonun sonunda kümülüs hücreleri genişleme gösteren oositlerin oranı saptanmıştır. Kümülüs hücrelerinin morfolojisi ile kümülüs genişlemesi değerlendirilmiştir. Bu metoda göre maturasyonu kümülüs hücrelerinin durumuna bağlı olarak A, B ve C derecesine ayrılmıştır (Kobayashi vd. 1994):

Derece A: Kümülüs hücreleri homojen olarak ayrılmış ve hücre kümeleri artık görünmemektedir (Şekil 3.8.a).

Derece B: Kümülüs hücreleri heterojen olarak ayrılmış ve hücre kümeleri görünmektedir (Şekil 3.8.b).

Derece C: Kümülüs hücrelerinde hiç genişleme görünmemektedir (Şekil 3.8.c).



Şekil 3.8 Kümülüs hücre dağılımına göre oosit maturasyonunun sınıflandırılması

3.5.3 Ayrımcı nükleer boyama yöntemi

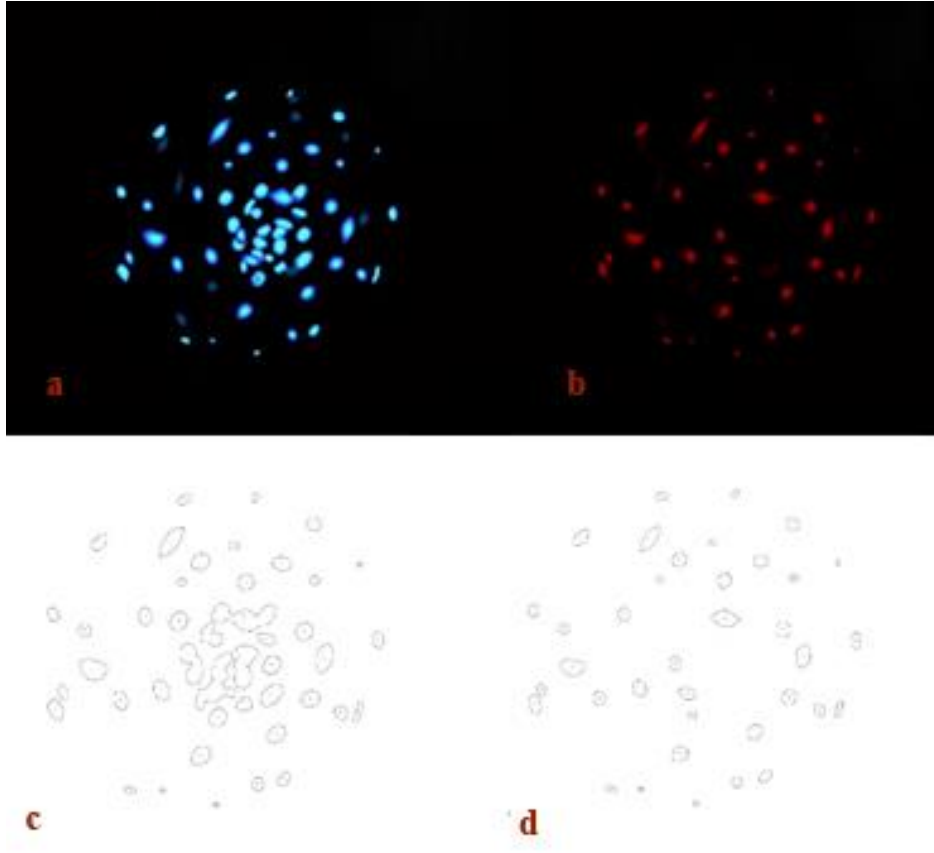
Embriyolarda toplam blastomerlerin sayısı ve İHK/TE oranını belirlemek amacıyla ayrımcı nükleer boyama yöntemi kullanılmıştır (Gardner vd. 2004).

Materyal ve solüsyonlar:

- **PBS/PVP solüsyonu:** PBS solüsyonunda 1 mg/mL PVP'nin (P0930) eklenmesi.
- **Propidium Iodide (PI solüsyonu):** %0.5 Triton X-100 (T8787) içeren PBS/PVP solüsyonu içine 100 µg/mL PI'nin (P4170) eklenmesi.
- **Hoechst 33340 (H solüsyonu):** %0.5 Triton X-100 içeren PBS/PVP solüsyonu içine 100 µg/mL Hoechst 33340'nın (14533) eklenmesi.

Dört kuyucuklu plate'in birinci kuyucuğunun içine 500 µl H solüsyonu (1 µg/mL Hoechst 33342 (14533) florsan boyası %4 paraformaldehyde içeren PBS/PVP solüsyonunda) yerleştirilmiştir. İki, üç ve dördüncü kuyucukların içi sırasıyla, 500 µl PI solüsyonu (% 0.5 Triton X-100 (T8787) PBS/PVP solüsyonunda), PI solüsyonu (PBS/PVP solüsyonunda 100 µg/mL Propidium iodide (P4170)) ve 1 mg/mL PVP (P0930) içeren

PBS ile doldurulmuştur. Boyama işlemi başlamadan 5-10 dakika önce dört kuyusu dolmuş olan tabak 39 °C'e kadar ısıtılmıştır. Daha sonra 4-5 blastosist mümkün olduğu ölçüde az ortam ile kültür ortamından alınıp yıkandıktan sonra PI solüsyonu içeren kuyucuğun içine 30 dakika süresince yerleştirilmiştir. PI solüsyonunun içinde inkübe edildikten sonra, embriyolar PBS/PVP içeren dördüncü kuyucuğun içinde yıkanıp T solüsyonu içeren kuyucuğun içine yerleştirilip bir dakika oda sıcaklığında inkübe edilmişlerdir. Embriyolar İnkübasyondan sonra PBS ile yıkanıp 35-40 saniye PI solüsyonu içeren kuyucuğun içinde yerleştirildikten sonra tekrar PBS'de yıkanmıştır.



Şekil 3.9 Ayrımcı boyama tekniği ile embriyo hücrelerinin boyayarak ayırmak

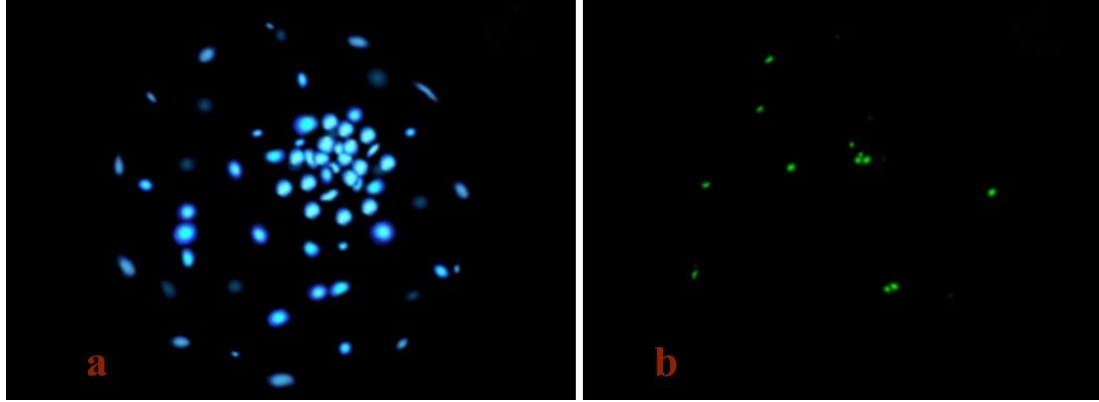
a. Hoechst ile bütün hücreler mavi olarak boyanmaktadır; b. PI boyası ile kırmızı boyanan trofektoderm hücreleri; c ve d Image J programının görüntüsü (büyütme 400x).

Son olarak embriyolar az miktarlarda gliserin solüsyonunun içinde mikroskop lamı üzerine aktarılıp lamel ile monte edilmişlerdir. Embriyolar kısa zaman içinde floresan ataçmanlı Leica DM LED mikroskobu altında A4 (360-470 nm) ve N2.1 (515-590 nm) filtreleriyle incelenmiştir. Bütün hücrelerin çekirdeği hoechst ile boyanırken (Şekil 3.9 a) trofektoderm hücrelerin çekirdeği ise kırmızı ile boyanmaktadır (Şekil 3.9 b). Mikroskop kamerasıyla fotoğraflar çekildikten sonra Image J programı ile hücre sayımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9.c, d).

3.5.4 TUNEL metoduyla apoptozisin belirlenmesi

Embriyolar kültür ortamından alınıp PBS/PVP’de üç kere yıkandıktan sonra oda sıcaklığında 1-2 saat süresince %3.7 paraformaldehid/PBS’te sabitleştirilmiştir. Sabitleştirildikten sonra embriyolar PBS/PVP’te iki kere yıkanıp oda sıcaklığında % 0.5 Triton X-100/PBS’te 1 saat süresince inkübe edilip daha sonra 2 kere PBS/PVP’te yıkanmıştır. 3-5 embriyo TUNEL etiketleme işleminden önce 37 °C’de 20 dk süresince DNase’da (D5025) inkübe edilerek pozitif kontrol grubunu oluşturmuştur. Embriyolar 10-15 µl dUTP-FITC (FERR0101) etiketleme karışımında 10 dakika oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edilerek ön-inkübasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra embriyolar 10-15 µl TUNEL etiketleme karışımı oluşturan dUTP-FITC (dUTP ile birleşmiş fluorescein isothiocyanate) ve TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) karanlıkta 1 saat/37 °C’de inkübe edilmiştir (TdT buz üzerinde tutularak 1:9 oranıyla TUNEL karışımına eklenir). 3-5 embriyo TUNEL yerine TdT içermeyen etiketleme karışımında inkübe edilerek negatif kontrol grubunu oluşturmuştur. Daha sonra embriyolar iki kere PBS/PVP solüsyonunda yıkanmıştır. İşlemin devamında embriyolar Hoechst 33342 solüsyonunda 1 saat süresince oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra mikroskop lamı üzerine aktarılıp antifade ile monte edilerek kısa zaman içinde floresan ataçmanlı Leica DM LED mikroskobu altında A4 (360-470 nm) ve I3 (450-515 nm) filtreleriyle incelenmiştir. Bütün hücrelerin çekirdeği mavi boyanmıştır (Şekil 3.10.a) ancak apoptotik hücrelerin çekirdeği ise yeşil boya ile işaretlenmiştir (Şekil 3.10.b).

Kameraya donanmış Leica DM LED mikroskobu ile fotoğraflar çekildikten sonra Image J programı ile hücre sayımı gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.9.c, d).



Şekil 3.10 TUNEL etiketleme metodu ile apoptozis hücrelerin belirlenmesi

a. Hoechst ile bütün hücrelerin çekirdeği mavi görünmektedir; b. apoptozise uğrayan hücreler FITC boyasıyla boyanarak yeşil görüntülenmektedir (büyütme 400x).

3.5.5 Oran hesaplamaları

$$A \text{ kategorili KOK } \% = \frac{A \text{ kategorili KOK sayısı}}{\text{Damlacık altında kültüre edilen KOK sayısı}} \times 100$$

$$B \text{ kategorili KOK } \% = \frac{B \text{ kategorili KOK sayısı}}{\text{Damlacık altında kültüre edilen KOK sayısı}} \times 100$$

$$C \text{ kategorili KOK } \% = \frac{C \text{ kategorili KOK sayısı}}{\text{Damlacık altında kültüre edilen KOK sayısı}} \times 100$$

$$\text{Bölünen zigot } \% = \frac{\text{Bölünen zigot sayısı}}{\text{Damlacık altında IVF'e tabi tutulan KOK sayısı}} \times 100$$

$$\text{Bloke zigot } \% = \frac{\text{Bloke zigot sayısı}}{\text{Bölünen zigot sayısı}} \times 100$$

$$\text{Blastosist oluşum \%} = \frac{\text{Blastosist sayısı}}{\text{Damlacık altında kültüre edilen zigot sayısı}} \times 100$$

$$\text{Apoptozis indeksi} = \frac{\text{Apoptozis hücre sayısı}}{\text{Blastosistin toplam hücre sayısı}} \times 100$$

3.5.6 İstatistik analizler

Araştırmanın ilk aşaması 3x5 faktöriyel denemesi (sıcaklık faktörü 3 düzeyde ve ovaryum taşıma ortamı faktörü ise 5 düzeyde) olarak 3 tekerrürde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca ikinci aşama da 4x5 faktöriyel denemesi (somatik hücre faktörü 4 düzeyde ve kültür ortamı faktörü 5 düzeyde) olarak 3 tekerrürde gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise bütün muamelelerin birlikte incelenmesi varyans analizi ile yapılırken; maturasyon, fertilizasyon ve ilk gelişmelerini aynı ortamda gerçekleştirmiş ancak daha sonraki gelişim aşamalarını, ilk ortamda (maturasyon temeli ortamda) ya da tavuk embriyo amniyotik boşluğu içinde gerçekleştirmiş olanlar arasındaki farklılıklar t testi ile yapılmıştır.

Elde edilen maturasyon, bölünme, embriyo oluşumu, İHK hücre sayısı, TE sayısı, İHK:TE oranı ve apoptozis indeksi verileri tek yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. İstatistik analizinden önce veriler normal dağılım testi olan Shapiro w-test ile denenip gerektiğinde yüzde verileri için data transformasyonu yapılmıştır. Ortalamaların kıyaslanması Duncan testi ile yapılmıştır ($p < 0.05$). İstatistik analizler R programıyla yapıp Duncan testi ise R paketi olan Agricolae ile gerçekleştirilmiştir (Seefeld ve Linder 2007, de Mendiburu 2014).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Oositlerin ve Üretilen Embriyoların Kalitesi ve Miktarı Üzerine Ovaryum Taşıma Ortamı ve Sıcaklığının Etkisi

4.1.1 Maturasyon üzerine farklı taşıma ortamı ve sıcaklıklarının etkisi

Çizelge 4.1 de görüldüğü gibi araştırma muameleleri arasında istatistik olarak önemli farklılıklar bulunmuştur ($P<0.01$). Elde edilen sonuçlara göre A kategorili olgunlaşma 4 °C sıcaklıkta CR1 ortamında taşınan ovaryumlarda en çok olurken 25 °C sıcaklıkta PBS ortamında taşınan ovaryumlarda en az miktarda bulunduğu tespit edilmiştir. B kategorili olgunlaşan KOK'ler açısından ise muameleler arası istatistik olarak önemli farklılıklara saptanmamasına ($p > 0.1384$) rağmen 25 °C'li PBS muamelesinde en yüksek, 38 °C'li KSOM ortamında taşınan ovaryumlarda en düşük seviyede bulunmuştur. C kategorisinde yer alan olgun KOK'lerin sayısı ise 38 °C'li PBS ortamında taşıma ovaryumlarda en fazla ve 4 °C'li CZB ortamında taşınanlarda en düşük olduğu istatistik olarak ($p<0.01$) tespit edilmiştir. Taşıma ortamı ve sıcaklık faktörleri arasındaki interaksiyonlar istatistik olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$).

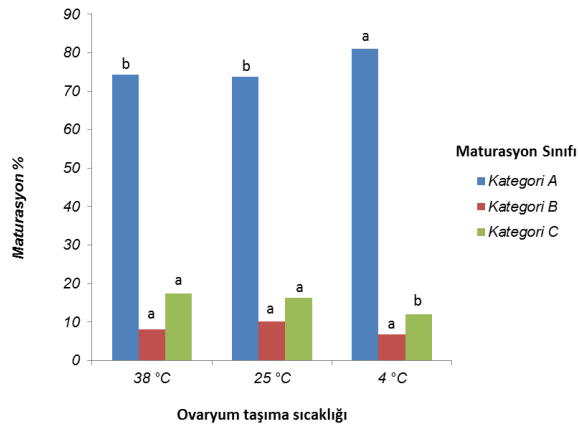
Ayrı ayrı olarak faktörler incelendiğinde 4 °C'lik taşıma sıcaklığı diğer sıcaklık seviyelerinden daha çok A kategorili KOK'leri (81.05 ± 4.75) içerirken 25 °C'lik sıcaklık seviyesi en düşük orana (73.66 ± 8.37) sahip olmuştur. Şekil 4.1'de görüldüğü gibi B ve C kategori olgunlaşma sınıfında yer alan KOK'lerin sayısı sırasıyla 25°C (10.10 ± 6.0 , 16.25 ± 4.16) ve 38 °C (8.14 ± 3.85 , 17.48 ± 2.96) sıcaklıklarında en çok olurken 4 °C (6.79 ± 2.27 , 12.02 ± 3.44) sıcaklığında en az bulunmuştur.

Şekil 4.2'de görüldüğü gibi CR1 (80.45 ± 3.24) taşıma ortamı diğer ortamından daha çok A kategorili olgun KOK'lere neden olmuştur ($p<0.01$). PBS ortamı, diğer ortamlara göre daha çok B kategorili olgunlaşmaya (11.94 ± 6.90) yol açarken en az B sınıflı olgunlaşma

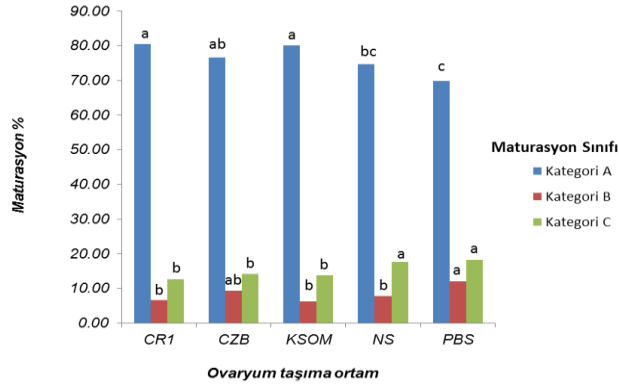
Çizelge 4.1 KOK'lerinin maturasyonu üzerine farklı ovaryum taşıma sıcaklık ve ortamlarının etkisi

Sıcaklık	Ortam	N	Kategori (%±SD)		
			A	B	C
38 °C	NS	180	69.80±5.36 ^{bcd}	9.60±5.13	20.19±1.06 ^{ab}
	PBS	180	66.84±3.05 ^{cd}	12.43±3.16	20.72±1.88 ^a
	KSOM	180	80.69±0.29 ^{ab}	4.55±2.68	14.76 ±2.39 ^{bcd}
	CZB	180	75.15±1.31 ^{abcd}	7.85±0.36	17.00±0.95 ^{abcd}
	CR1	180	79.08±1.29 ^{ab}	6.18±1.99	14.74±0.70 ^{bcd}
25 °C	NS	180	73.08±4.14 ^{abcd}	8.10±1.52	18.82±4.33 ^{abc}
	PBS	180	65.74±15.81 ^d	15.46±11.69	18.80±7.22 ^{abc}
	KSOM	180	77.99±3.83 ^{ab}	6.62±1.54	15.40±2.42 ^{bcd}
	CZB	180	72.78±5.85 ^{abcd}	12.0±5.24	15.22±0.77 ^{bcd}
	CR1	180	78.70±3.51 ^{ab}	8.31±2.44	13.00±2.41 ^{de}
4 °C	NS	180	80.95±7.10 ^a	5.35±3.26	13.70±3.85 ^{cde}
	PBS	180	76.92±5.14 ^{ab}	7.92±0.69	15.17±4.58 ^{bcd}
	KSOM	180	81.83±4.13 ^a	7.29±3.11	10.87±1.37 ^e
	CZB	180	81.96±4.57 ^a	7.94±2.27	10.11±2.58 ^e
	CR1	180	83.57±2.48 ^a	5.49±0.59	10.27±2.74 ^e
			P<0.01	P>0.05	P<0.01

KSOM (6.15±2.52) ortamında görünmüştür (p<0.05). C kategorili olgunlaşma özelliği açısından ovaryum taşıma ortamı istatistik olarak önemli farklılıklara neden olmuştur (p<0.05). C sınıf olgunlaşma en fazla PBS ortamında (18.23±5.01) görünürken en az miktarı ise CR1 ortamında (12.67±2.69) tespit edilmiştir.



Şekil 4.1 KOK'leri üzerine farklı ovaryum taşıma sıcaklıklarının etkisi



Şekil 4.2 KOK'leri üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi

4.1.2 Fertilizasyon üzerine farklı taşıma ortamı ve sıcaklıklarının etkisi

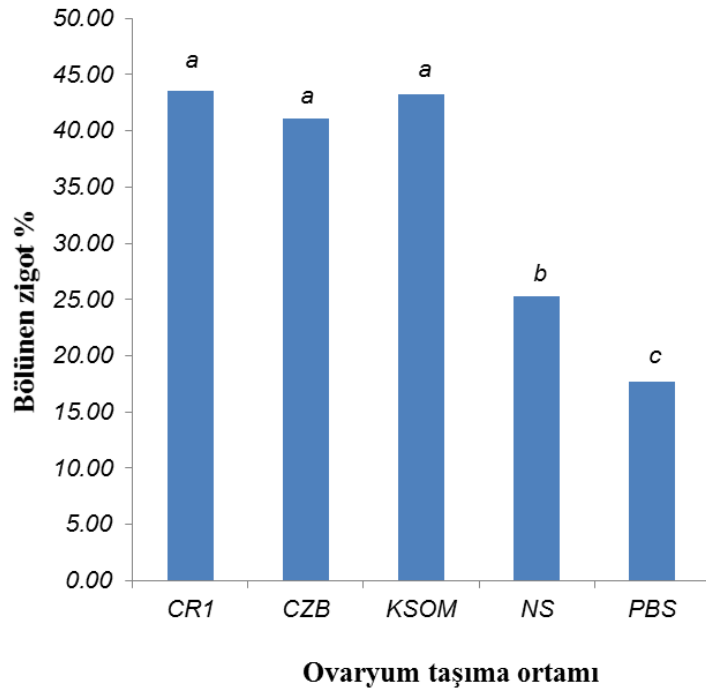
Fertilizasyon üzerinde sıcaklık ve taşıma ortamlarının etkisini belirlemek amacıyla yapılan incelemeler, 4 °C'li CR1 muamelesi diğer muamelelerden daha iyi bulunmuştur ($p < 0.001$).

Çizelge 4.2 Oositlerin fertilizasyonu üzerine farklı ovaryum taşıma sıcaklık ve ortamlarının etkisi

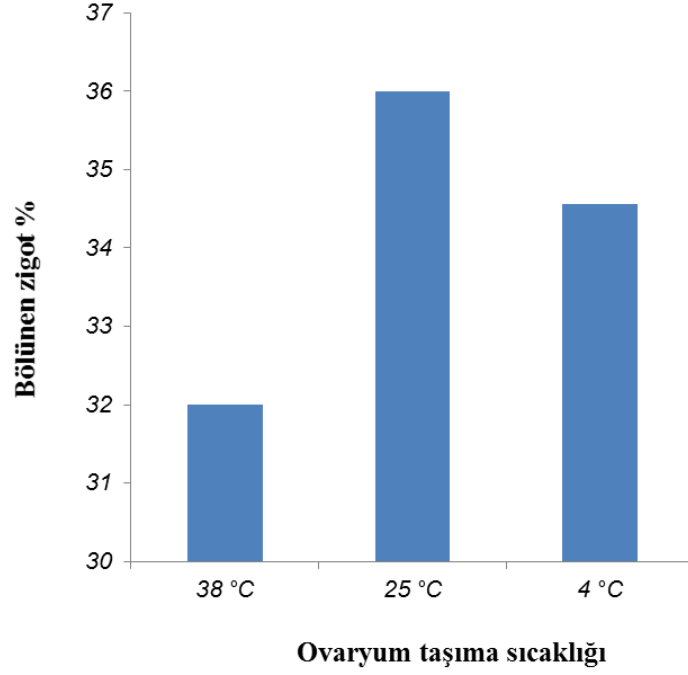
Sıcaklık	Ortam	N	Bölünme (%±SD)
38 °C	NS	120	31.67±5.20 ^{bc}
	PBS	120	15.83±8.04 ^d
	KSOM	120	43.15±6.29 ^a
	CZB	120	44.17±3.82 ^a
	CR1	120	44.17±2.89 ^a
25 °C	NS	120	24.17±8.78 ^{cd}
	PBS	120	14.17±6.29 ^d
	KSOM	120	41.67±8.04 ^{ab}
	CZB	120	38.33±7.22 ^{ab}
	CR1	120	41.67±8.04 ^{ab}
4 °C	NS	120	20.00±3.33 ^d
	PBS	120	23.06±3.37 ^{cd}
	KSOM	120	43.89±0.96 ^a
	CZB	120	40.83±1.44 ^{ab}
	CR1	120	45.00±1.67 ^a
$p < 0.001$			

Çizelge 4.2'ye göre 25 °C'li PBS muamelesi en düşük fertilizasyon gerçekleştiren muamele olarak tanımlanmıştır.

Şekil 4.3 ve 4.4'de bölünme üzerine sıcaklık ve taşıma ortamı faktörlerinin ayrı ayrı olarak incelenmesi sonucunu göstermektedir. Bölünme üzerine sıcaklık faktörünün etkisi istatistik olarak önemli farklılıklara neden olmamıştır ($P > 0.05$). Ancak, taşıma ortamları arasındaki görünen farklılıklar istatistik olarak önemli bulunup ($P < 0.001$) CR1 ortamı en çok (43.61 ± 4.60) döllenmiş oositleri içerirken PBS ortamı en düşük orana (17.67 ± 6.75) neden olmuştur.



Şekil 4.3 Döllenme (%) üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi



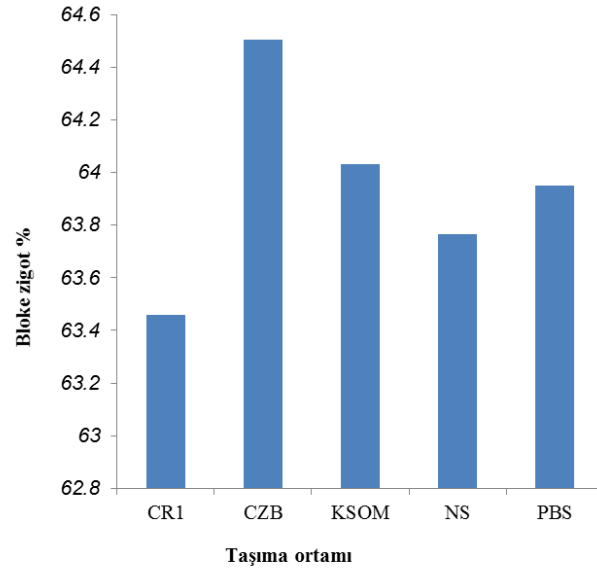
Şekil 4.4 Döllenme (%) üzerine farklı taşıma sıcaklığının etkisi

4.1.3 Embriyo oluşumu üzerine farklı taşıma ortam ve sıcaklıklarının etkisi

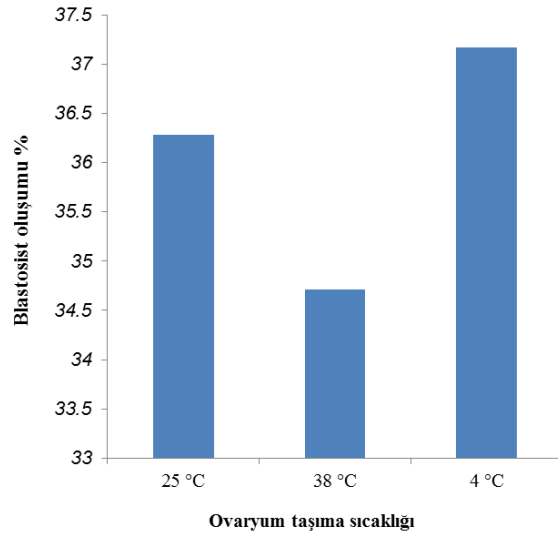
4.2.3.1 Bloke edilen zigot oranı

Zigot blokesi üzerine muamelelerin etkisi istatistik olarak önemli bulunmamıştır ($p=0.3844$). Ancak en çok zigot blokesi CZB ortamında 4 °C (68.79 ± 5.46) sıcaklıkta taşınan ovaryumlardan elde edilirken en düşük zigot bloke oranı ise 4 °C sıcaklıkta NS ortamında taşınan ovaryumlarda görünmüştür (Çizelge 4.3).

İki faktör bağımsız olarak incelendiği halde, ne sıcaklık faktörü ($p=0.3046$) ne de taşıma ortamı faktörü ($p= 0.9904$) istatistik olarak önemli farklılıklara neden olmamıştır. Ancak şekil 4.5’de görüldüğü gibi en çok bloke oranı CZB taşıma ortamında görünürken en düşük miktar CR1 ortamında elde edilmiştir. Ovaryum Taşıma sıcaklığı açısından ise en yüksek zigot blokesi 38 °C’de görünürken en düşük oran, 4 °C sıcaklığında görünmüştür (Şekil 4.6).



Şekil 4.5 Bloke zigot (%) üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi



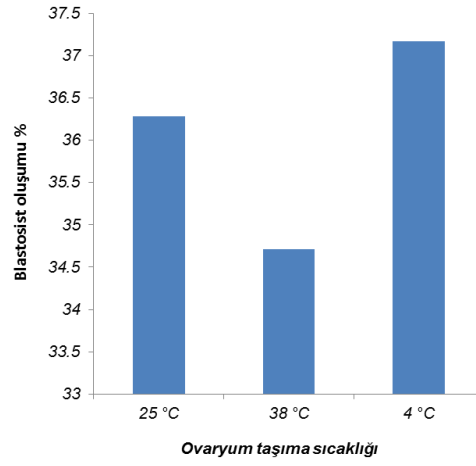
Şekil 4.6 Bloke zigot (%) üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi

4.1.3.2 Blastosist oluşum oranı

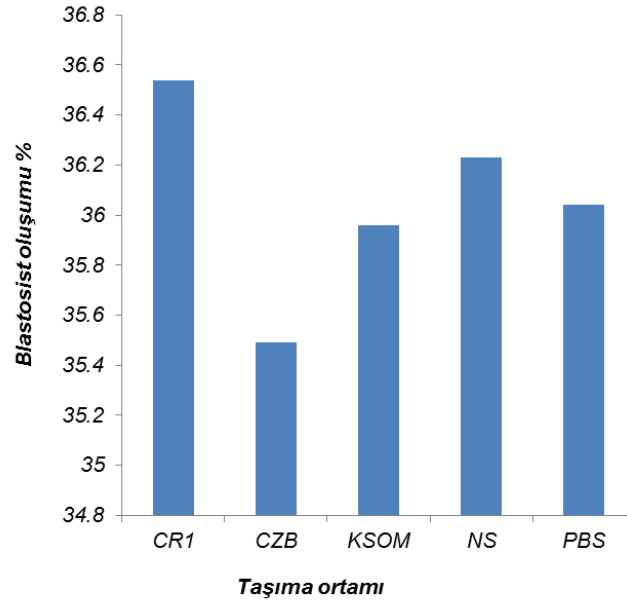
Embriyo sayısı açısından 4 °C ovaryum taşıma sıcaklığı şekil 4.7’de en yüksek seviyeyi gösterirken 38 °C sıcaklık çizelgenin en düşük seviyesinde yer almasına rağmen bu farklılıklar istatistik olarak önemli ($p>0.05$) bulunmamıştır. Ayrıca blastosist oluşumu üzerine taşıma ortamı farklılıklara neden olsa da bu farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$).

Çizelge 4.3 Embriyoların gelişmesi üzerinde farklı ovaryum taşıma sıcaklıklarının ve ortamlarının etkisi

Sıcaklık	Ortam	N	Bloke (SD)	Blastosist (SD)
38 °C	NS	60	68.69±3.50	31.131±3.50
	PBS	60	65.00±8.66	35.00±8.66
	KSOM	60	64.44±3.84	35.55±3.85
	CZB	60	64.10±2.24	35.89±2.24
	CR1	60	64.19±0.89	35.81±089
25 °C	NS	60	62.73±3.49	37.26±3.49
	PBS	60	65.27±2.41	34.72±2.41
	KSOM	60	66.25±4.47	33.75±4.47
	CZB	60	60.62±3.55	39.38±3.55
	CR1	60	63.69±4.10	36.31±4.10
4 °C	NS	60	59.88±2.68	40.12±2.68
	PBS	60	61.57±5.61	38.42±5.62
	KSOM	60	61.39±0.24	38.60±0.25
	CZB	60	68.79±5.47	31.21±5.46
	CR1	60	62.49±6.16	37.51±6.16
			$p>0.05$	$p>0.05$



Şekil 4.7 Blastosist oluşum (%) üzerine farklı taşıma sıcaklıklarının etkisi



Şekil 4.8 Blastosist oluşum (%) üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi

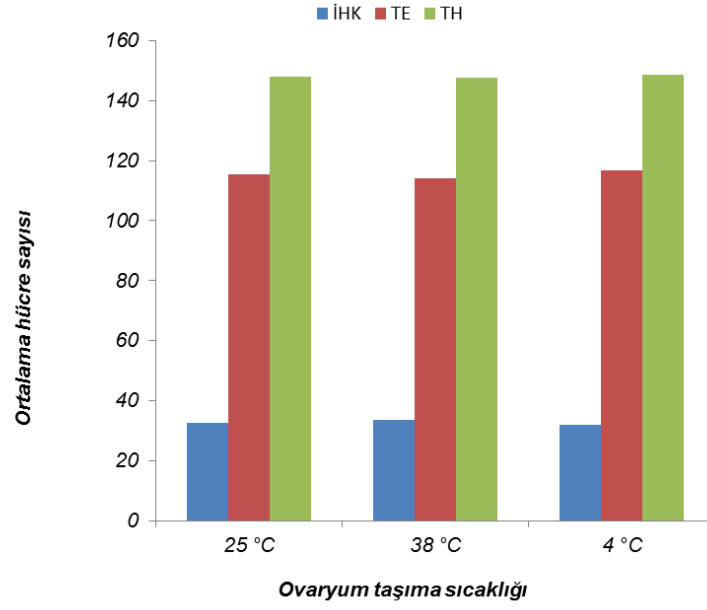
Blastosist oluşum özelliği açısından muameleler arasındaki farklılıklar istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak çizelge 4.3'de de görüldüğü gibi, 4 °C'lik sıcaklıkta NS taşıma ortamı, embriyo sayısı açısından en iyi sonuçlara neden olurken 4 °C sıcaklıktaki CZB ortamı en az embriyo sayısına neden olmuştur.

4.1.3.3 İH, TE, toplam hücre sayıları ve İHK/TE oranı

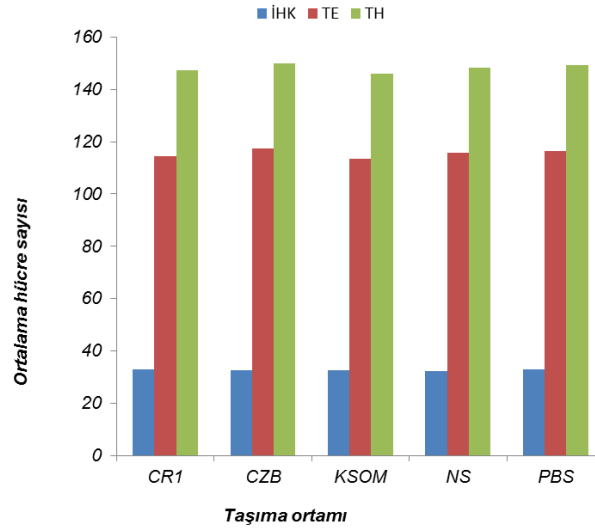
Çizelge 4.4’de belirlendiği gibi İH, TE, toplam hücre sayısı ve İHK:TE oranı kriterleri için muameleler arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemli ($P>0.05$) bulunmamıştır. Ancak görüldüğü gibi İH sayısı CR1-38 °C muamelesinde en çok ve NS-25°C’de en az bulunmuştur. TE ve toplam hücre sayısı ise en çok Czb-38 °C’de bulunurken PBS-25 °C muamelesinde en düşük miktarlara sahip olmuştur. Ancak, İHK/TE oranı PBS-25 °C muamelesinde en çok olup NS-25 °C’de en düşük olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4 Embriyo kalitesi üzerine farklı ovaryum taşıma sıcaklık ve ortamlarının etkisi

Sıcaklık	Ortam	İç Hücre Sayısı	Trofektoderm Sayısı	Toplam Hücre Sayısı	İHK/TE	Apoptozis İndeksi
38 °C	NS	33.25±2.06	113.75±8.616	147.00±9.35	29.33±2.47	13.46±4.54
	PBS	31.50±2.12	113.00±4.24	144.5±2.12	27.93±2.92	16.26±0.72
	KSOM	33.57±3.20	111.57±2.15	145.14±2.34	30.13±3.36	15.27±2.53
	CZB	33.40±2.19	121.00±11.42	154.40±10.45	27.84±3.53	11.27±2.19
	CR1	35.00±2.83	110.75±9.32	145.75±8.88	31.84±4.54	14.23±3.74
25 °C	NS	31.00±2.16	120.00±4.32	151.00±6.48	25.81±0.85	11.39±4.81
	PBS	35.00±2.83	108±15.55	143.00±12.72	32.93±7.36	15.49±2.37
	KSOM	32.25±2.21	114.00±5.71	146.25±5.85	28.35±2.59	15.25±3.01
	CZB	33.66±3.98	114.66±12.07	148.33±10.28	29.79±5.53	13.62±4.92
	CR1	31.50±2.89	116.75±11.47	148.25±10.71	27.28±4.68	13.20±7.85
4 °C	NS	33.00±3.55	113.75±8.34	146.75±5.56	29.26±4.9	19.12±1.60
	PBS	32.40±4.27	121.00±8.00	153.40±5.5	27.03±5.31	16.35±3.56
	KSOM	31.80±2.28	115.40±5.18	147.20±4.91	27.62±2.63	17.92±5.15
	CZB	31.33±4.03	116.83±12.60	148.16±11.94	27.18±5.18	14.74±4.12
	CR1	32.20±4.08	115.40±12.56	147.60±10.57	28.36±6.00	15.92±2.24
		P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05



Şekil 4.9 İç hücre kümesi, trofektoderm ve toplam hücre sayısı üzerine farklı taşıma sıcaklıklarının etkisi



Şekil 4.10 İç hücre kümesi, trofektoderm ve toplam hücre sayısı üzerine farklı taşıma ortamlarının etkisi

Sıcaklık ve taşıma ortamı faktörleri ayrı ayrı olarak incelendiğinde, İH, TE, toplam hücre sayısı kriterleri üzerine etkileri şekil 4.9 ve 4.10’da verilmiştir. Bu sonuçlara göre bulunan farklılıkların istatistik olarak önemli olmamasına rağmen ($P>0.05$) İH sayısı 38 °C en fazla ve 4 °C’de en az bulunmuştur. Ancak, TE ve toplam hücre sayısı 4 °C sıcaklıkta taşınan ovaryumlardan elde edilen embriyolarda en çok bulunurken 38 °C en az hücre sayısına sahip olan embriyoları üretmiştir.

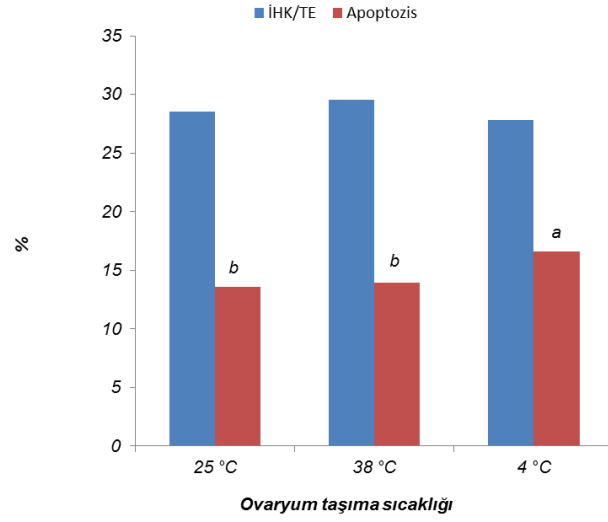
CR1 ve NS ovaryum taşıma ortamları sırasıyla en çok ve en az İH hücre sayısına neden olmuştur. Ancak TE ve toplam hücre sayısı ise sırasıyla CZB ve KSOM ortamlarında en çok ve en az olarak belirlenmiştir.

İstatistik bakımdan farklılıkların önemli bulunmamasına rağmen ($P>0.05$), ayrı ayrı olarak faktörler incelendiğinde 38 °C sıcaklıkta taşınan ovaryumlar diğer sıcaklık seviyelerinden daha yüksek İHK/TE oranları içerirken 4 °C sıcaklık seviyesi en düşük orana sahip olmuştur (Şekil 4.11). Şekil 4.12’de görüldüğü gibi CR1 (29.1 ± 5.15) ovaryum taşıma ortamı diğer ortamlardan daha yüksek oranları içermiştir.

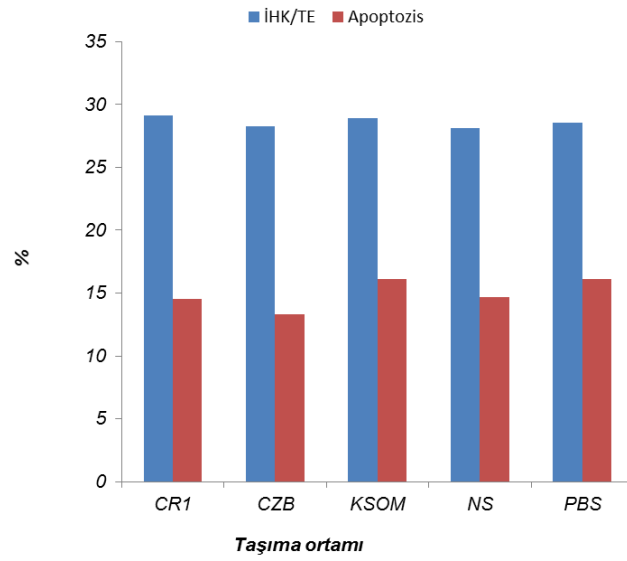
4.1.3.4 Apoptozis indeksi

Muameleler için apoptozis sonuçları çizelge 4.4’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre muameleler arasındaki farklılıkların istatistik olarak önemli olmamasına rağmen ($p=0.265$) NS ortamında 4 °C sıcaklıkta taşınan ovaryumlar en fazla apoptotik hücre sayısını içeren embriyoları kapsarken 38 °C’lik sıcaklıkta CZB ortamında taşınan ovaryumlar en az apoptotik hücre sayısına sahip olan embriyolara neden olmuştur.

Şekil 4.11’de gösterildiği gibi, sıcaklık faktörünün etkisi istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Bu faktör için en fazla apoptotik hücre sayısı 4 °C taşıma sıcaklığında (16.64 ± 3.69) görünürken, en düşük miktarı ise 25 °C’lik sıcaklıkta ortaya çıkmıştır (13.61 ± 4.85). Şekil 4.12’de görüldüğü gibi apoptozis indeksi üzerine ovaryum taşıma faktörünün etkisi istatistik olarak ($p=0.3030$) önemli bulunmamıştır.



Şekil 4.11 İHK/TE ve apoptozis üzerine ovaryum taşıma sıcaklıklarının etkisi



Şekil 4.12 İHK/TE ve apoptozis üzerine ovaryum taşıma ortamlarının etkisi

4.2 Üretilen Embriyoların sayısı ve Kalitesi Üzerine Farklı Ortamlarda Farklı Somatik Hücrelerle beraber Kültür etmenin Etkisi

4.2.1 Oosit maturasyonu üzerine farklı ortamlarda farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi

KOK olgunlaşma üzerine ko-kültür sisteminde kullanılan ortam ve somatik hücrelerin etkisi çizelge 4.5'te göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre A kategorili olgunlaşma üzerine muamelelerin etkisi istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Muameleler arasında TEAS ortamında ovidukt hücreleri ile beraber kültür edilen KOK'lerde en çok A sınıf olgunlaşma görünürken folikül sıvısında granüloza hücresi ile kültür edilen KOK'lerde en düşük seviyede olduğu tespit edilmiştir. B kategorili olgun KOK'lerin oranı da ovidukt hücresi içeren TEAS ortamında en düşük olurken, granüloza hücresi içeren mSOF ortamında kültür edilen KOK'lerde en yüksek olmuştur ($P<0.001$). Muamelelerin etkisi C kategorisi olgunlaşma üzerine istatistik olarak önemli bulunup ($P<0.01$) FS ortamında granüloza hücreleri ile beraber kültür edilen KOK'lerde en fazla olurken TEAS ortamında ovidukt hücreleriyle beraber kültür edilenlerde en düşük orana sahip olduğu tespit edilmiştir.

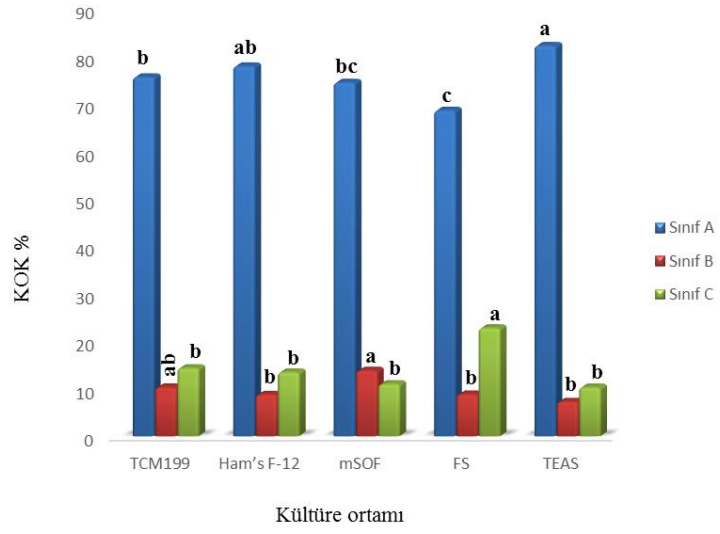
A ($p=0.2299$) ve C ($p=0.2284$) olgunlaşma sınıfı için faktörler arası interaksiyonlar istatistik olarak önemli bulunmamasına rağmen B kategori olgunlaşma için faktörler arası interaksiyonlar ($p<0.05$) önemli bulunmuştur.

Faktörler ayrı ayrı olarak incelendiğinde şekil 4.13'de görüldüğü gibi A kategori olgunlaşma özelliği üzerine ortamın etkisi önemli bulunmuştur ($p<0.001$). TEAS ortamı (82.20 ± 18.41) diğer maturasyon ortamlarından daha çok A kategorili KOK'lerin oluşumunu sağlarken FS ortamı en düşük orana (68.56 ± 21.27) sahip olmuştur. B sınıflı olgunlaşma üzerine FS ortamı (13.83 ± 8.49) diğer ortamlardan daha çok olarak bulunmuştur ($p<0.05$). Şekil 4.13'de görüldüğü gibi C kategori olgunlaşma FS ortamında (22.77 ± 16.66) en çok olarak bulunmuştur ($P<0.001$).

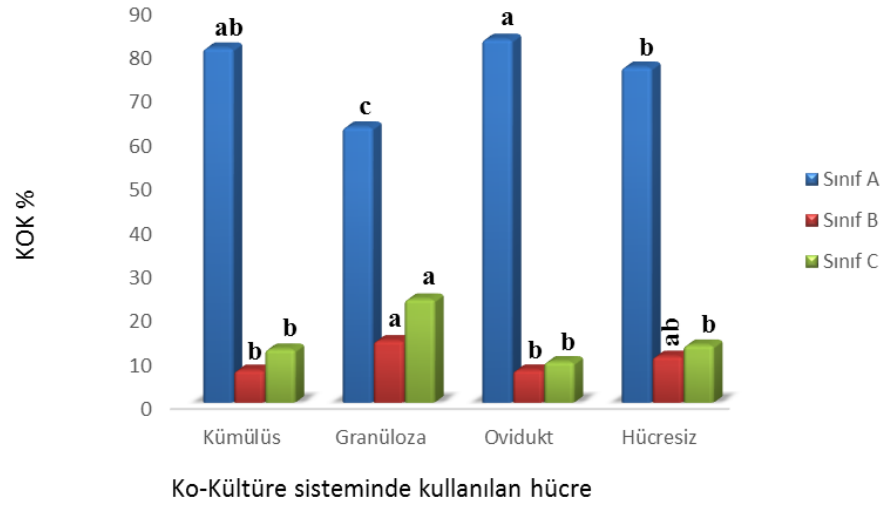
Çizelge 4.5 KOK'lerinin maturasyonu üzerine farklı ortamlarda farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi

Ortam	Hücre	N	Kategori %		
			A	B	C
TCM199	K	80	83.16±16.70 ^{abcd}	6.51±5.48 ^{abcd}	10.45±6.92 ^{def}
	G	80	59.88±14.21 ^{fg}	14.83±7.41 ^{defg}	26.56±11.14 ^{abc}
	O	80	79.92±6.86 ^{bcde}	8.42±2.02 ^{abcdef}	11.66±6.35 ^{bcdef}
	HS	80	77.01±2.70 ^{cde}	12.15±2.02 ^{bcdefg}	11.12±2.46 ^{cdef}
Ham's F-12	K	80	77.52±11.91 ^{cde}	12.67±4.00 ^{cdefg}	9.85±5.69 ^{def}
	G	80	67.74±13.11 ^{efg}	6.71±2.91 ^{abcde}	27.57±11.34 ^{ab}
	O	80	89.21±7.59 ^{ab}	5.1±2.07 ^{abc}	5.71±2.71 ^{ef}
	HS	80	74.36±6.57 ^{cdef}	11.23±2.08 ^{abcdefg}	15.07±3.31 ^{bcde}
mSOF	K	80	79.33±13.1 ^{bcde}	8.00±6.70 ^{abcde}	13.01±4.00 ^{bcdef}
	G	80	65.53±1.29 ^{efg}	19.94±7.60 ^g	13.44±9.56 ^{bcde}
	O	80	75.31±20.64 ^{cdef}	17.71±12.6 ^{fg}	6.17±3.55 ^{ef}
	HS	80	76.78±6.32 ^{cde}	11.14±1.37 ^{abcdefg}	12.32±5.21 ^{bcdef}
FS	K	80	74.57±11.26 ^{cdef}	6.27±6.07 ^{abcd}	19.54±10.0 ^{abcd}
	G	80	54.09±8.8 ^g	14.63±12.0 ^{defg}	32.43±10.86 ^a
	O	80	71.23±27.63 ^{def}	4.27±3.94 ^{abc}	26.80±20.74 ^{abc}
	HS	80	72.83±25.97 ^{def}	11.29±5.21 ^{abcdefg}	14.23±18.83 ^{bcde}
TEAS	K	80	86.86±1.46 ^{abc}	4.10±1.78 ^{ab}	9.22±1.60 ^{def}
	G	80	65.06±6.32 ^{efg}	15.82±3.66 ^{efg}	19.83±7.73 ^{abcd}
	O	80	92.38±6.57 ^a	3.66±0.74 ^a	3.07±4.26 ^f
	HS	80	79.63±4.52 ^{bcde}	7.06±6.97 ^{abcde}	12.83±6.05 ^{bcdef}
			p<0.001	p<0.001	p<0.01

KOK'lerin olgunlaşması üzerine farklı somatik hücrelerinin etkisi şekil 4.14'de gösterilmiştir. Bu incelemeye göre ovidukt hücresi diğer somatik hücrelerinden daha çok A kategorili olgun (82.50±20.87) KOK'ler üretmiştir (p<0.001). Granüloza hücresi ise diğer somatik hücrelerine göre daha çok B ve C kategorili olgunlaşmaya neden olmuştur (p<0.001).



Şekil 4.13 KOK'lerin olgunlaşması üzerine farklı maturasyon ortamlarının etkisi



Şekil 4.14 KOK'lerin maturasyonu üzerine farklı somatik hücrelerinin etkisi

4.2.2 Oosit fertilizasyonu üzerine farklı ortamlarda farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi

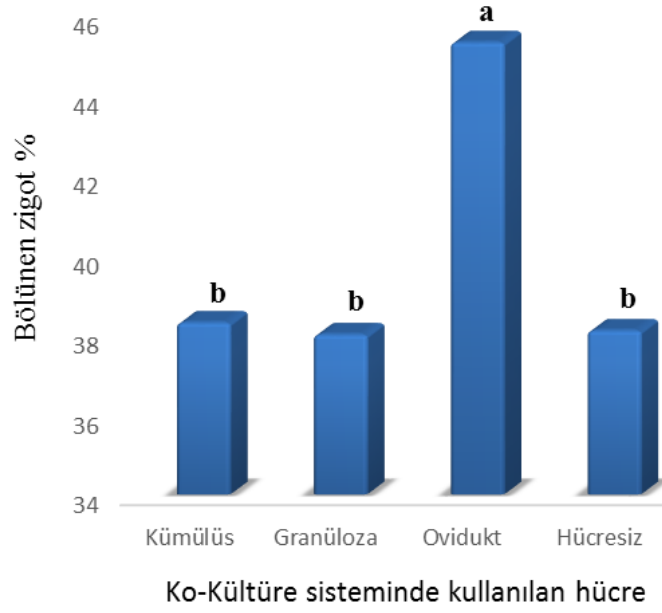
Fertilizasyon üzerinde farklı ortamlarda farklı somatik hücrelerinin etkisini belirlemek amacıyla yapılan incelemelerde çizelge 4.6’da gösterildiği gibi TEAS ortamında ovidukt hücreleri ile beraber ko-kültür edilen KOK’lerin cleavage oranı diğer muamelelerden daha çok (57.54 ± 10.36) bulunurken hücre içermeyen mSOF muamelesinde ise en düşük (21.65 ± 7.58) seviyede olduğu belirlenmiştir ($p < 0.001$).

Çizelge 4.6 Oositlerin fertilizasyonu üzerine farklı ortamlarda farklı somatik hücreler ile beraber kültür edilmenin etkisi

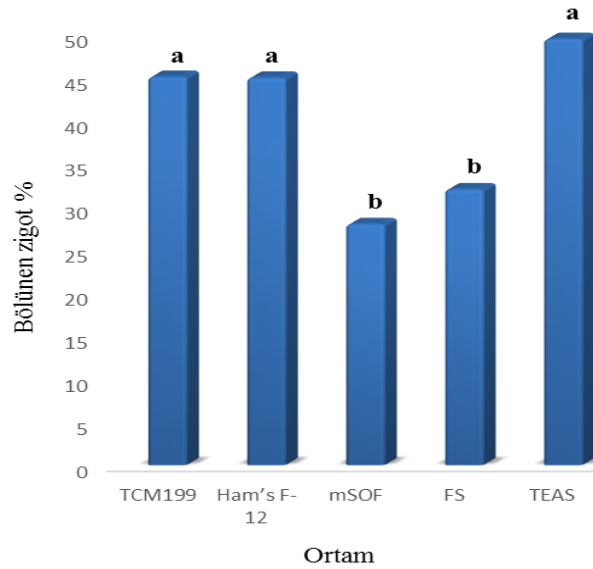
Ortam	Hücre	N	Bölünme (% $\pm$ SD)
TCM199	K	60	49.30 ± 8.80^{abc}
	G	40	41.25 ± 6.29^{bcde}
	O	60	49.13 ± 9.00^{abc}
	HS	60	40.76 ± 5.77^{bcde}
Ham’s F-12	K	60	42.60 ± 3.55^{abcde}
	G	50	40.33 ± 5.39^{bcde}
	O	66	50.41 ± 4.44^{ab}
	HS	54	46.66 ± 7.66^{abc}
mSOF	K	60	22.34 ± 8.90^f
	G	50	29.50 ± 6.25^{def}
	O	60	38.45 ± 8.00^{bcde}
	HS	60	21.65 ± 7.58^f
FS	K	50	28.32 ± 5.23^{ef}
	G	40	34.18 ± 10.54^{cdef}
	O	50	31.01 ± 14.22^{def}
	HS	50	34.64 ± 15.11^{cdef}
TEAS	K	60	48.94 ± 14.04^{abc}
	G	50	44.72 ± 14.29^{abcd}
	O	60	57.54 ± 10.36^a
	HS	60	46.78 ± 5.18^{abc}
$p < 0.001$			

Faktörler ayrı ayrı olarak değerlendirildiğinde şekil 4.15’te görüldüğü gibi somatik hücre faktörü arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemli bulunup ($P < 0.05$) ovidukt hücresi

fertilizasyon için (45.31 ± 12.96) en uygun koşulları temin ederken granüloza hücresi en düşük (38.00 ± 9.90) fertilizasyon oranına neden olmuştur. Şekil 4.16'da kültür ortamı faktörünün etkisi gösterilmiştir. Görüldüğü gibi TEAS ortamı en çok döllenen oositleri (49.50 ± 11.51) içerirken mSOF ortamı en düşük orana (27.99 ± 9.85) neden olmuştur ($p < 0.001$).



Şekil 4.15 Dölleme (%) üzerine farklı somatik hücrelerin etkisi



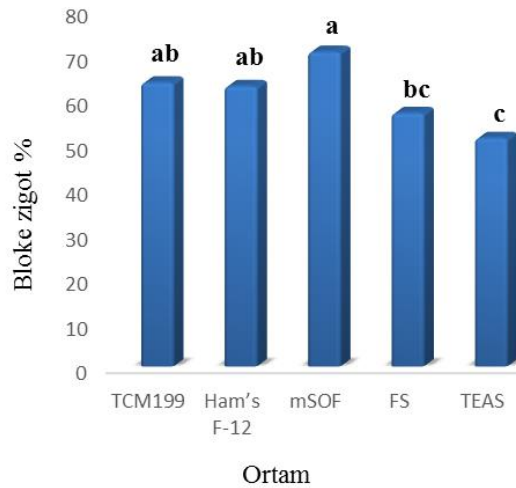
Şekil 4.16 Dölleme (%) üzerine farklı ortamların etkisi

4.2.3 Embriyo üretimi üzerine farklı ortamlarda farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi

4.2.3.1 Bloke edilen zigot oranı

Zigot blokesi üzerine muamelelerin etkisi istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). En çok bloke olan zigot oranı hücre içermeyen mSOF, TCM 199 ve Ham's F12 ortamlarında kültür edilen oositlerde görünürken ovidukt hücresi içeren TEAS ortamı en düşük orana neden olmuştur (Çizelge 4.7).

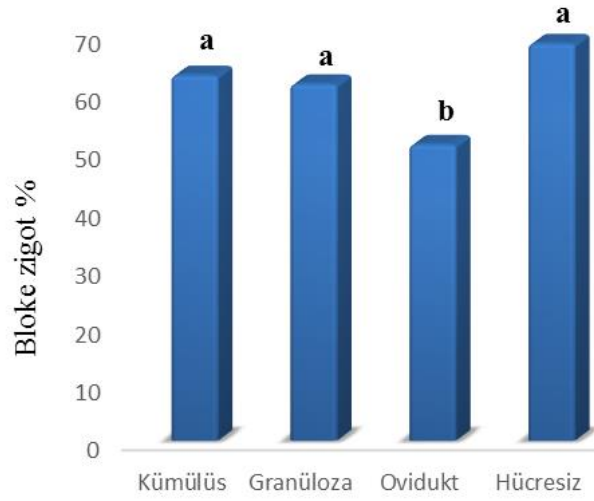
İki faktör bağımsız olarak incelendiği halde (Şekil 4.17-4.18) hücre faktörü önemli farklılıklara neden olmuştur ($p<0.001$). Hücreler arasında, ovidukt hücresi en iyi koşulları sağlayarak en düşük bloke zigot oranına (50.85 ± 14.24) sahip olurken, hücre içermeyen sistem en yüksek bloke zigot oranına (68.20 ± 11.29) neden olmuştur. Somatik hücrelerden bağımsız olarak ortamların etkisi incelendiği halde TEAS ortamı diğer ortamlardan daha az zigot blokesine (51.00 ± 13.04) neden olurken mSOF ortamı en çok zigot blokesine (70.23 ± 14.74) yol açtığını şekil 4.17 göstermiştir ($P<0.001$).



Şekil 4.17 Bloke zigot oranı üzerine farklı kültür ortamlarının etkisi

Çizelge 4.7 Embriyoların gelişmesi ve kalitesi üzerinde farklı ortamlarla farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi

Ortam	Hücre	N	Bloke % (n)	Blastosist% (n)
TCM199	K	28	68.69±10.66 ^{ab}	31.30±10.67 ^{cd}
	G	16	63.53±4.49 ^{abc}	36.47±4.49 ^{bcd}
	O	28	47.65±4.86 ^{cd}	52.34±4.87 ^{ab}
	HS	22	73.67±4.52 ^a	26.33±4.53 ^d
Ham's F-12	K	24	60.35±13.27 ^{abcd}	39.64±13.28 ^{abcd}
	G	20	61.07±6.1 ^{abcd}	38.93±6.10 ^{abcd}
	O	30	55.89±6.97 ^{abcd}	44.11±6.97 ^{abcd}
	HS	24	72.98±14.65 ^a	27.01±14.66 ^d
mSOF	K	12	72.23±16.21 ^a	27.77±16.21 ^d
	G	20	73.19±9.03 ^a	26.80±9.03 ^d
	O	12	60.35±21.96 ^{abcd}	39.65±21.96 ^{abcd}
	HS	14	75.15±8.91 ^a	24.85±8.91 ^d
FS	K	14	56.66±8.16 ^{abcd}	43.33±8.17 ^{abcd}
	G	12	60.41±7.21 ^{abcd}	39.58±7.22 ^{abcd}
	O	14	49.05±19.98 ^{bcd}	50.95±19.98 ^{abc}
	HS	16	60.23±10.07 ^{abcd}	39.77±10.08 ^{abcd}
TEAS	K	28	55.8±4.82 ^{abcd}	44.19±4.83 ^{abcd}
	G	22	47.91±21.91 ^{cd}	52.08±21.92 ^{ab}
	O	30	41.31±5.98 ^d	58.69±5.99 ^a
	HS	26	58.96±7.59 ^{abcd}	41.03±7.60 ^{abcd}
			$p<0.01$	$p<0.01$



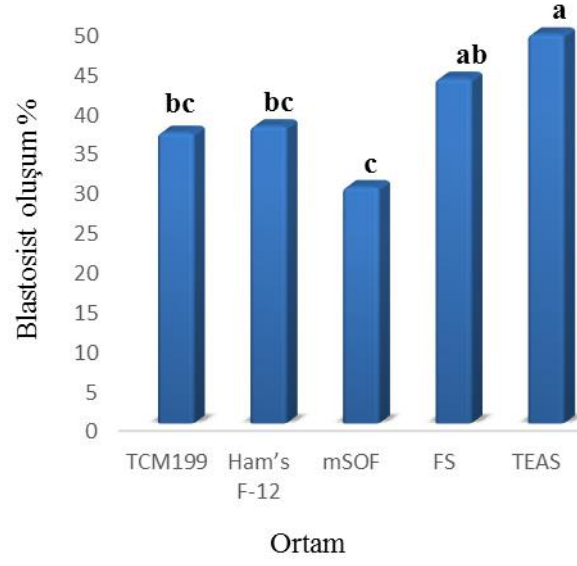
Ko-Kültüre sisteminde kullanılan hücre

Şekil 4.18 Bloke zygote oranı üzerine farklı somatik hücrelerinin etkisi

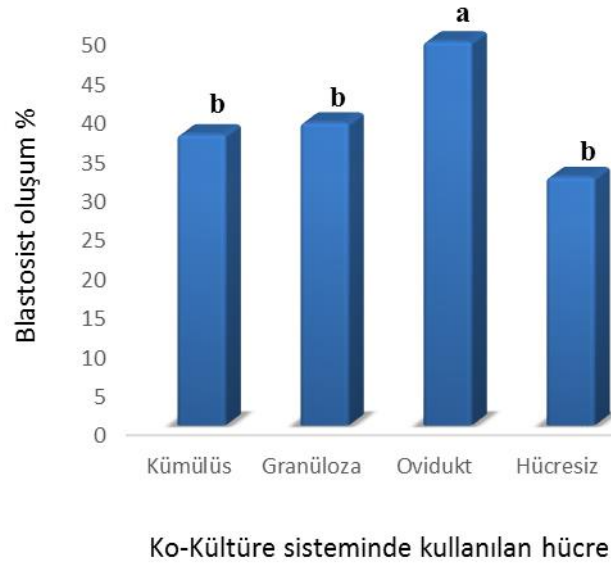
4.2.3.2 Blastosist oluşum oranı

Blastosist oranı açısından TEAS ortamında ovidukt hücresi ile beraber kültür edilen zigotlarda çizelge 4.7’de de gösterildiği gibi en çok orana sahip olurken hücre içermeyen mSOF ortamı en düşük olarak bulunmuştur ($P<0.001$).

Şekil 4.20’de gösterildiği gibi faktörler ayrı ayrı olarak incelendiğinde ko-kültürde kullanılan somatik hücresi açısından ovidukt hücresi (49.15 ± 14.24) en iyi embriyo gelişim sonuçlarını içerirken hücre içermeyen sistem (31.80 ± 11.29) en düşük sonuçlara neden olmuştur ($p<0.001$). Somatik hücrelerden bağımsız olarak kültür ortamları incelendiğinde ortamlar arası farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmuştur ($P<0.001$). Ortamlarda TEAS (49.00 ± 13.04) ortamı, embriyo oluşumu için diğer kültür ortamlarından daha iyi zemin hazırladığı açıkça belirlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Blastosist oluşum üzerine farklı kültür ortamının etkisi



Şekil 4.20 Blastosist oluşumu üzerine farklı somatik hücreleri ile ko-kültür etmenin etkisi

4.2.3.3 İH, TE, toplam hücre sayıları ve İHK/TE oranı

Çizelge 4.8’de de görüldüğü gibi İH sayısı FS ortamında ovidukt hücreleri ile beraber kültür edilen blastosistlerde en çok olurken somatik hücre içermeyen mSOF ortamında kültür edilen embriyolarda en az olarak bulunmuştur ($P<0.01$). Şekil 4.21’de de gösterildiği gibi ortamlar arası İH sayısı için farklılıklar önemli bulunmuştur ($p<0.001$). En fazla İHK sayısı TEAS ortamında (33.01 ± 2.32) bulunurken en düşüğü TCM 199 ortamında (28.01 ± 4.19) bulunmuştur. Somatik hücre faktöründen olan ovidukt hücresi en çok İH sayısına (32.66 ± 3.53) neden olurken granüloza hücresi en düşük (28.85 ± 3.87) İHK hücre sayısını içeren embriyoları oluşturmuştur ($p<0.001$).

Çizelge 4.8 Embriyo kalitesi üzerinde farklı külüre ortamlarında farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi

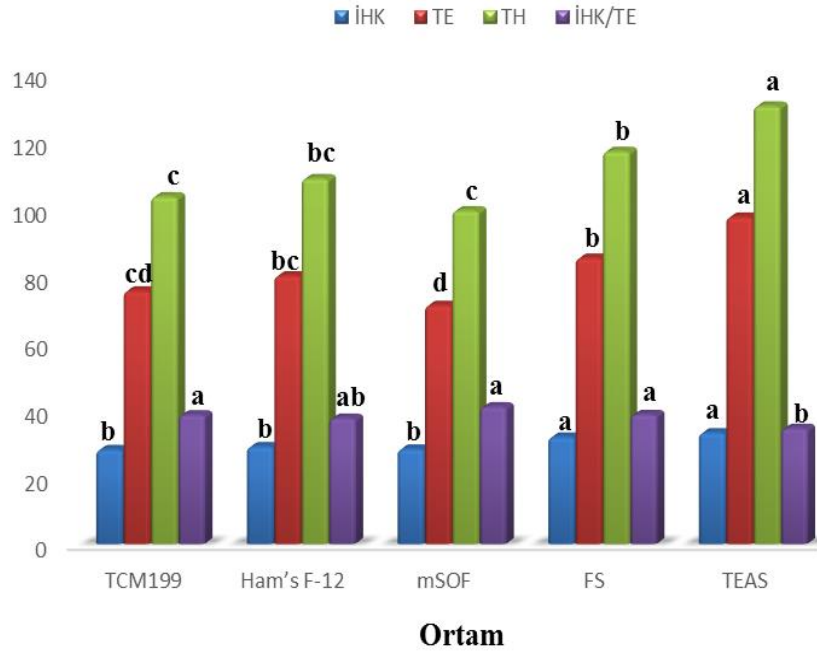
Ortam	Hücre	İç hücre sayısı	Trofektoderm Hücre sayısı	Toplam hücre sayısı	İHK/TE
TCM 199	K	26.22±4.91 ^{bcd}	71.54±7.09 ^{fgh}	97.76±8.51 ^{fgh}	0.37±0.07 ^{bcdefg}
	G	26.46±1.44 ^{bcd}	68.64±11.30 ^{gh}	95.10±11.29 ^{fgh}	0.39±0.06 ^{abcdef}
	O	31.51±2.98 ^{abc}	99.39±10.62 ^{abc}	130.90±12.47 ^{abc}	0.32±0.03 ^{efg}
	HS	27.84±5.38 ^{abcd}	61.11±2.73 ^{ghi}	88.94±7.87 ^{gh}	0.45±0.07 ^{ab}
Ham’s F-12	K	26.98±3.90 ^{bcd}	69.97±10.27 ^{gh}	96.95±11.80 ^{fgh}	0.39±0.08 ^{abcdefg}
	G	25.59±4.71 ^{cd}	66.46±12.09 ^{ghi}	92.04±16.34 ^{gh}	0.39±0.04 ^{abcdefg}
	O	33.45±2.29 ^a	110.76±9.35 ^a	144.20±7.36 ^a	0.30±0.05 ^{fg}
	HS	29.52±3.59 ^{abcd}	71.56±7.57 ^{fgh}	101.08±11.02 ^{defg}	0.41±0.02 ^{abcd}
mSOF	K	28.88±4.25 ^{abcd}	70.86±5.19 ^{fgh}	99.74±8.68 ^{efg}	0.41±0.05 ^{abcde}
	G	28.12±3.33 ^{abcd}	70.84±10.36 ^{fgh}	98.96±11.35 ^{efg}	0.40±0.07 ^{abcde}
	O	31.16±5.25 ^{abc}	88.76±19.15 ^{bcdef}	119.92±23.17 ^{bcde}	0.36±0.05 ^{cdefg}
	HS	24.50±3.70 ^d	52.98±2.27 ⁱ	77.48±3.33 ^h	0.46±0.08 ^a
FS	K	30.79±3.50 ^{abc}	79.29±12.78 ^{defg}	110.08±13.70 ^{cdefg}	0.39±0.07 ^{abcdef}
	G	32.25±1.34 ^{ab}	83.33±9.97 ^{cdefg}	115.58±10.65 ^{cdef}	0.39±0.04 ^{abcdefg}
	O	33.67±4.59 ^a	103.38±15.28 ^{ab}	137.05±19.36 ^{ab}	0.33±0.03 ^{defg}
	HS	30.21±2.22 ^{abcd}	73.67±20.11 ^{efgh}	103.88±21.88 ^{defg}	0.43±0.08 ^{abc}
TEAS	K	33.42±0.77 ^a	94.33±7.61 ^{abcd}	127.75±8.26 ^{abc}	0.36±0.02 ^{cdefg}
	G	31.84±2.81 ^{ab}	88.98±8.85 ^{abcd}	120.83±9.42 ^{bcd}	0.36±0.04 ^{cdefg}
	O	33.49±2.85 ^a	111.22±11.89 ^a	144.71±13.98 ^a	0.30±0.02 ^g
	HS	33.31±2.81 ^a	93.87±8.96 ^{abcd}	127.18±11.75 ^{abc}	0.36±0.01 ^{cdefg}
		$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.001$	$P<0.001$

Muamelelerin etkisi TE hücre sayısı üzerine etkili bulunmuştur ($p<0.001$). Çizelge 4.8’de belirlendiği gibi en çok TE hücre sayısı ovidukt hücresi içeren TEAS ortamında görünürken en az TE hücre sayısı ise hücre içermeyen mSOF ortamında bulunmuştur.

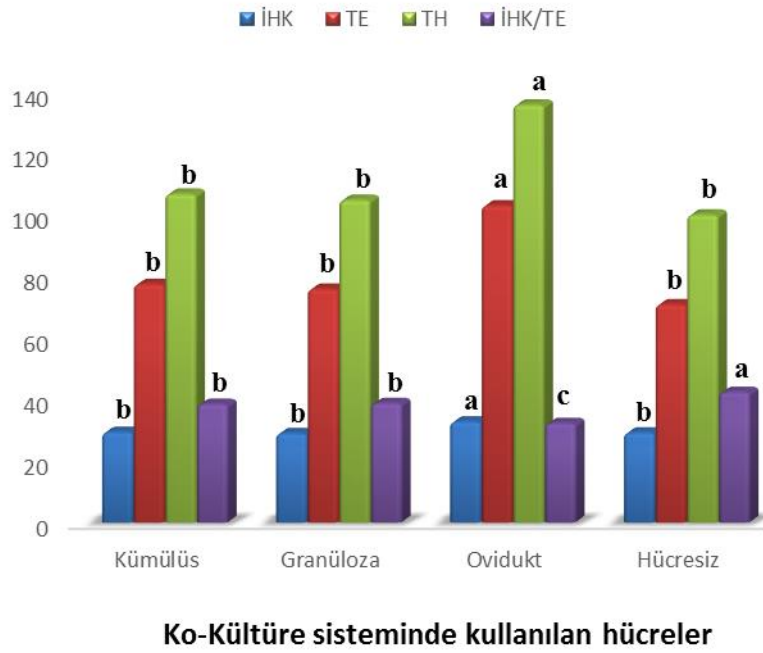
Ortam ve somatik hücre faktörleri ayrı ayrı olarak incelendiğinde ortaya çıkan farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Şekil 4.21’de gösterildiği gibi TEAS ortamı (97.10 ± 12.13) en çok TE hücre sayısına neden olurken yine de mSOF ortamı (70.86 ± 16.49) az miktar TE hücresi içeren embriyoları üretmiştir. Somatik hücre faktörü içinde ovidukt hücresi en çok (102.70 ± 14.87) TE hücre sayısına neden olurken hücre içermeyen ortamda kültür edildiğinde (70.64 ± 16.97) en az TE hücre sayısı içeren blastosistler elde edilmiştir.

Çizelge 4.8’de de görüldüğü gibi İHK/TE oranı hücre içermeyen mSOF ortamında kültür edilen blastosistlerde en çok olurken ovidukt hücresi ile TEAS ortamında kültür edilen embriyolarda en az bulunmuştur ($P<0.01$). Şekil 4.21-4.22’de de gösterildiği gibi ortamlar arası İHK/TE oranı için farklılıklar önemli bulunmuştur ($p<0.05$). En fazla İHK/TE oranı mSOF ortamında (40.73 ± 06.96) bulunurken en az oran ise TEAS ortamında (34.33 ± 3.49) bulunmuştur. Somatik hücre faktörü olan ovidukt hücresi en az İHK/TE oranına (32.15 ± 3.81) neden olurken kültür ortamında somatik hücrelerin bulunmaması İHK/TE oranının artışına (42.22 ± 6.61) neden olduğu tespit ($p<0.001$) edilmiştir.

Toplam hücre sayısı özeliği muameleler arasında istatistik olarak önemli farklılıklar ($p<0.001$) göstermiştir. Çizelge 4.8’de görüldüğü gibi bu özellik, TEAS ortamında ovidukt hücresi ile beraber kültür edilen blastosistlerde en çok olurken hücre içermeyen mSOF ortamında kültür edilen blastosistlerde en az olarak bulunmuştur. Faktörler ayrı ayrı olarak incelendiğinde TEAS ortamı toplam hücre sayısının artışına (130.12 ± 19.17) neden olurken mSOF ortamı en az toplam hücre sayısına (99.03 ± 19.77) neden olmuştur ($p<0.001$).



Şekil 4.21 İç hücre kümesi, trofektoderm, toplam hücre sayısı ve İHK/TE oranı üzerine farklı kültür ortamının etkisi



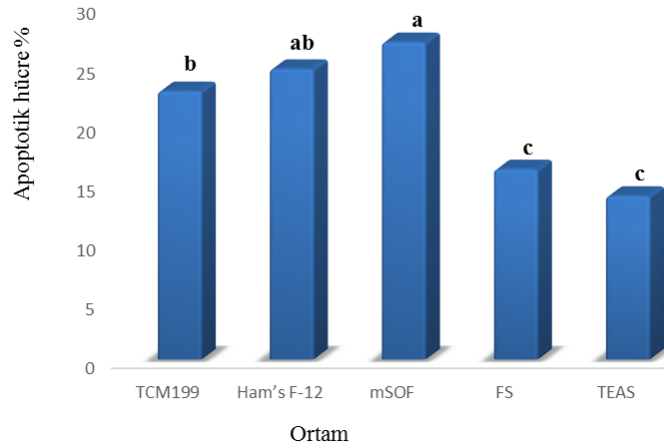
Şekil 4.22 İç hücre kümesi, trofektoderm, toplam hücre sayısı ve İHK/TE oranı üzerine farklı somatik hücrelerinin etkisi

İH, TE, İHK/TE oranı ve toplam hücre sayısı özellikleri için faktörler arası interaksiyonların istatistik önemlilik değerleri sırasıyla $p=0.49$, $p=0.16$, $p=0.96$ ve $p=0.18$ olarak hesaplanmıştır.

4.2.3.4 Apoptozis

Çizelge 4.9’da belirtildiği gibi hücre içermeyen mSOF ortamı en çok apoptozise neden olurken TEAS ortamında ovidukt hücresi ile beraber kültür edilen embriyolarda en düşük olarak bulunmuştur ($p<0.001$).

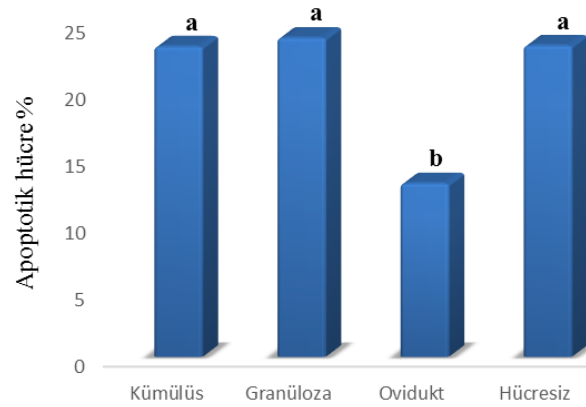
Ayrı ayrı olarak faktörler incelendiğinde mSOF ortamı (26.78 ± 7.06) diğer ortamlardan daha yüksek apoptozis oranına neden olurken TEAS (13.80 ± 4.16) ortamı en az orana sebep olmuştur (Şekil 4.23). Şekil 4.24’da görüldüğü gibi granüloza hücresi (23.78 ± 6.69) en çok apoptotik hücreleri içeren embriyolara neden olurken ovidukt hücresi en düşük orana (12.93 ± 4.32) sebep olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$).



Şekil 4.23 Apoptozis indeksi üzerine farklı kültür ortamının etkisi

Çizelge 4.9 Apoptozis üzerinde farklı kültür ortamlarında farklı somatik hücreler ile beraber kültür etmenin etkisi

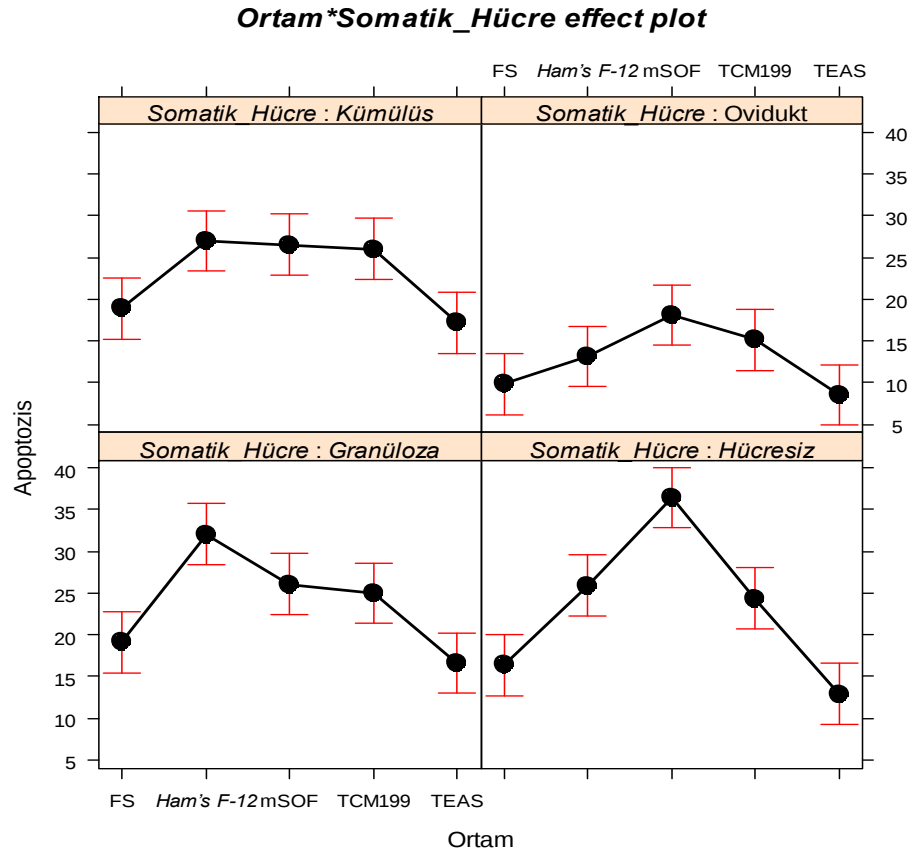
Ortam	Hücre	Apoptozis
TCM 199	K	26.04±4.35 ^c
	G	24.99±6.64 ^c
	O	15.15±3.64 ^{defg}
	HS	24.38±3.50 ^c
Ham's F-12	K	26.98±5.06 ^{bc}
	G	32.07±7.07 ^{ab}
	O	13.12±2.51 ^{efgh}
	HS	25.92±3.09 ^c
mSOF	K	26.55±1.21 ^c
	G	26.09±1.50 ^c
	O	18.07±3.90 ^{def}
	HS	36.42±2.15 ^a
FS	K	18.90±3.40 ^{de}
	G	19.11±1.57 ^d
	O	9.82±1.49 ^{gh}
	HS	16.39±4.80 ^{def}
TEAS	K	17.17±2.05 ^{def}
	G	16.62±3.04 ^{def}
	O	8.50±0.82 ^h
	HS	12.89±2.89 ^{fgh}
		p<0.001



Ko-Kültüre sisteminde kullanılan hücreler

Şekil 4.24 Apoptozis indeksi üzerine farklı somatik hücrenin etkisi

Faktörler arası interaksiyonlar istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.001$). Şekil 4.25’ de de görüldüğü gibi ortamlar faktöründen olan FS ve TEAS ortamları somatik hücre faktörü olan ovidukt hücresi ve hücre içermeyen sistem ile interaksiyon göstererek apoptozis düşüşüne neden olmuşlardır.



Şekil 4.25 Apoptozis indeksi üzerine somatik hücreler ile ortamların interaksiyonları

4.3 Kültür Ortamı ve Sistemi Olarak Tavuk Embriyosunun Amniyon Kesesinin Kullanımı

İkinci araştırma muameleleri ile elde edilen 2-8 hücreli zigotlar, kültür sistemi ve ortamı olarak tavuk embriyo amniyotik boşluğunun içine yerleştirilip dört gün boyunca inkübe edildikten sonra değerlendirmeye alınmıştır. Maturasyon, fertilizasyon ve ilk gelişmelerini aynı ortamda gerçekleştirmiş ancak daha sonraki gelişme aşamalarını, ilk ortamda (maturasyon temeli ortamda) yada tavuk embriyo amniyotik boşluğu içinde

gerçekleştirmiş olanlar arasındaki farklılıklar t testi ile incelenip sonuçları çizelge 4.10 ve 4.11’de verilmiştir. çizelge 4.13 ise muamelelerin birlikte kıyaslanmasından ortaya çıkan sonuçları sunmuştur.

4.3.1 Blastosist oluşum oranı

Blastosist oluşumu üzerine t sınaması sonuçları çizelge 4.10’da verilmiştir. Bu veriler dikkatle incelendiğinde TEAB sistemi, hücre içermeyen TCM 199 ($p \leq 0.05$), Ham’s F-12 ($p \leq 0.01$), mSOF ($p \leq 0.01$) ve FS ($p \leq 0.05$) ortamlarından daha çok blastosist oluşumuna neden olduğu görülebilmektedir.

Muameleler birlikte incelendiğinde en çok blastosist oluşumu TEAS+O-TEAB (TEAS ortamında ovidukt hücresi ile beraber kültür edilerek zigot aşamasına gelip ancak daha sonraki gelişmelerini TEAB ortamında gerçekleştiren embriyolar) sisteminde (67.62 ± 9.39) elde edilirken mSOF+HS-mSOF+HS sistemi en az (17.08 ± 6.14) blastosist oluşumuna neden olmuştur (Çizelge 4.12).

4.3.2 İH, TE, THS ve TE’ye İH kümesinin oranı

İH sayısının t sınaması sonuçları çizelge 4.11’de verilmiştir. Bu çizelgeye göre iç hücre sayısı özelliği bakımından aynı ortamda zigot aşamasına gelip ancak daha sonraki gelişmelerini TEAB veya maturasyon ortamı temeline dayanan koşullarda gerçekleştirenler arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$). Ayrıca muameleler birlikte incelendiğinde de ortalamalar arasındaki farklılıklar (Çizelge 4.12) önemli bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Çizelge 4.11’de görüldüğü gibi TE hücre sayısının t sınaması sonuçlarına göre hücre sayısı TCM199+G, TCM199+O, TCM199+HS, mSOF+K, mSOF+HS ve FS+G ile aynı

ortamda zigot aşamasına kadar gelişip ancak daha sonra TEAB sisteminde gelişmesini gerçekleştiren embriyolarla önemli farklılıklar göstermiştir (Çizelge 4.11).

Muameleler birlikte incelendiğinde çizelge 4.12’de de gösterildiği gibi en çok TE hücre sayısı TCM199+O-TEAB (115.58 ± 10.77) sisteminde görünürken en az hücre sayısı mSOF+HS-mSOF+HS (55.31 ± 11.12) sistemi ile ortaya çıkmıştır ($p \leq 0.001$).

IHK:TE oranına ait t sınaması sonuçları çizelge 4.11’de sunulmuştur. Bu çizelgede görüldüğü gibi İHK:TE hücre sayısı açısından istatistik olarak sadece Ham’sF12+HS-Ham’sF12+HS (0.38 ± 0.04) ile Ham’sF12+HS-TEAB (0.28 ± 0.04) sistemleri arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$).

Muamelelerin birlikte incelenmesi sonuçlarına göre İHK:TE oranı özelliği TCM199+O-TEAB (0.2575), Ham’sF12+O-TEAB (0.2575), TCM199+K-TEAB (0.265) ve TEAS+O-TEAB (0.265) sistemlerinde en düşük olurken mSOF+HS (0.465) ortamında en yüksek olarak bulunmuştur.

Toplam hücre sayı kriterinin t sınaması sonuçlarına göre TCM199+G, TCM199+HS, mSOF+K, mSOF+HS ve FS+G ortamları ile aynı ortamlarda zigot aşamasına kadar gelişip ancak daha sonraki gelişmelerini TEAB sisteminde gerçekleştiren embriyolar arasındaki TH sayı farklılıkları istatistik olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.11).

Muameleler birlikte incelendiğinde çizelge 4.12’de de gösterildiği gibi farklılıklar önemli bulunmuştur ($p \leq 0.001$). En çok TH sayısı TEAS+O-TEAS+O (147.34 ± 10.71) sisteminde görünürken en az hücre sayısı mSOF+HS-mSOF+HS (80.12 ± 12.20) sisteminde görünmüştür ($p \leq 0.001$).

Çizelge 4.10 Blastosist oluşumu üzerine TEAB ve farklı ortamlarının ikili kıyaslama sonuçları

Ortam	Hücre	Kültür sistemi	Block %	Blastosist %	P değeri
TCM 199	K	TCM-199+K	62.05±8.39	37.95±10.18	0.127
		TEAB	42.14±10.20	57.86±8.11	
	G	TCM-199+G	60.879±12.55	39.13±12.55	0.245
		TEAB	51.07±8.11	48.93±8.11	
	O	TCM-199+O	44.84±9.73	55.16±9.73	0.45
		TEAB	51.11±12.04	48.89±12.04	
	HS	TCM-199+HS	68.34±8.39	31.66±8.39	0.020
		TEAB	50.00±8.16	50.00±8.16	
Ham's F-12	K	Ham's F-12	61.46±7.89	38.54±7.89	0.52
		TEAB	56.55±12.04	43.45±12.04	
	G	Ham's F-12	60.95±18.71	39.05±4.04	0.33
		TEAB	55.00±10.0	45.00±10.0	
	O	Ham's F-12	53.57±14.22	46.43±14.22	0.84
		TEAB	51.67±11.06	48.33±11.06	
	HS	Ham's F-12	68.97±7.51	31.03±7.05	0.010
		TEAB	48.5±8.24	51.50±8.24	
mSOF	K	mSOF-K	74.38±16.63	25.62±16.63	0.114
		TEAB	55.62±10.48	44.38±10.48	
	G	mSOF-G	74.44±9.69	25.55±9.69	0.056
		TEAB	50.14±16.89	49.86±16.89	
	O	mSOF-O	62.32±14.47	37.68±14.47	0.11
		TEAB	42.36±15.61	57.64±15.61	
	HS	mSOF-HS	82.91±6.14	17.09±6.14	0.003
		TEAB	57.29±8.59	42.71±8.59	
FS	K	FS-K	60.42±13.79	39.58±13.58	0.274
		TEAB	49.17±12.58	50.83±12.58	
	G	FS-G	58.33±19.54	41.67±19.54	0.641
		TEAB	53.12±6.25	46.88±6.25	
	O	FS-O	51.67±11.06	48.33±11.06	0.572
		TEAB	45.42±17.50	54.58±17.50	
	HS	FS-HS	61.88±10.28	38.12±10.28	0.014
		TEAB	39.16±7.88	60.84±7.88	
TEAS	K	TEAS-K	58.06±7.05	41.94±7.05	0.503
		TEAB	54.17±8.34	45.83±8.34	
	G	TEAS-G	45.42±17.50	54.58±17.50	0.534
		TEAB	38.22±12.85	61.78±12.85	
	O	TEAS-O	43.33±10.03	56.67±10.03	0.16
		TEAB	32.38±9.40	67.62±9.4	
	HS	TEAS-HS	57.64±6.05	42.36±6.05	0.13
		TEAB	44.45±12.83	55.55±12.83	

Çizelge 4.11 Embriyo kalitesi üzerine TEAB ve farklı ortamlarının ikili (t-test) kıyaslama sonuçları

Ortam	Hücre	Kültür sistemi	İH	p	TE	p	THS	p	İHK/TE	p	Apoptozis	p
TCM 199	K	TCM-199+K	25.91±3.42	0.21	73.00±10.25	0.10	98.91±8.14	0.22	0.36±0.09	0.11	24.84±0.91	0.020
		TEAB	22.78±2.94		86.16±8.89		108.94±11.83		0.26±0.01		15.90±4.15	
	G	TCM-199+G	27.25±7.08	0.85	68.62±3.25	0.06	95.88±9.7	0.008	0.40±0.09	0.09	24.38±0.98	0.006
		TEAB	26.52±1.08		93.64±8.47		120.16±7.44		0.29±0.04		15.61±2.96	
	O	TCM-199+O	30.94±4.48	0.67	95.26±13.72	0.06	126.20±15.07	0.10	0.33±0.05	0.07	13.88±2.88	0.78
		TEAB	29.68±3.47		115.59±10.78		145.26±13.05		0.26±0.02		13.29±3.02	
Ham's F-12	HS	TCM-199+HS	27.88±3.6	0.98	62.88±3.65	0.002	90.75±5.03	0.007	0.44±0.06	0.16	24.32±3.25	0.013
		TEAB	27.93±4.6		73.0±10.25		118.76±10.47		0.31±0.04		16.24±0.74	
	K	Ham's F-12+K	27.94±5.06	0.52	70.06±9.73	0.086	98.00±13.98	0.088	0.40±0.05	0.17	26.49±3.15	0.007
		TEAB	29.81±1.77		93.57±19.06		123.38±20.16		0.32±0.06		17.30±3.36	
	G	Ham's F-12+G	25.31±3.59	0.24	68.44±10.05	0.14	93.75±12.20	0.137	0.38±0.05	0.32	31.25±6.78	0.02
		TEAB	29.06±4.51		91.42±22.74		120.49±26.45		0.33±0.07		17.33±5.22	
mSOF	O	Ham's F-12+O	31.44±3.44	0.32	107.74±14.85	0.73	139.18±15.76	0.979	0.30±0.05	0.24	14.73±2.17	0.15
		TEAB	28.29±4.68		111.17±11.63		139.46±14.55		0.26±0.03		12.38±1.81	
	HS	Ham's F-12+HS	27.64±2.28	0.78	72.16±6.7	0.09	99.97±8.0	0.14	0.38±0.04	0.02	26.18±3.22	0.004
		TEAB	28.73±6.97		101.23±24.01		129.96±30.12		0.28±0.05		16.41±1.39	
	K	mSOF-K	27.81±5.21	0.68	71.50±6.79	0.02	99.31±7.49	0.015	0.40±0.09	0.094	25.12±3.31	0.005
		TEAB	29.06±2.09		103.85±16.49		132.92±15.63		0.29±0.06		13.55±4.11	
FS	G	mSOF-G	26.41±4.46	0.70	72.25±11.24	0.11	98.66±13.65	0.13	0.37±0.07	0.30	25.12±3.31	0.014
		TEAB	27.50±2.35		86.25±10.47		113.75±10.13		0.32±0.05		13.55±4.11	
	O	mSOF-O	31.33±2.45	0.25	87.58±10.38	0.083	118.91±9.30	0.13	0.36±0.05	0.075	17.85±2.34	0.057
		TEAB	28.00±4.5		100.46±4.63		128.46±4.13		0.28±0.05		14.52±1.13	
	HS	mSOF-HS	24.81±3.52	0.09	55.31±11.12	0.000	80.12±12.20	0.000	0.46±0.12	0.055	34.32±3.61	0.0004
		TEAB	28.94±1.51		104.52±5.43		133.46±6.76		0.28±0.01		17.48±2.64	
FS	K	FS-K	30.31±3.5	0.76	77.06±13.27	0.056	107.38±13.86	0.079	0.4±0.08	0.068	17.13±4.18	0.2
		TEAB	29.57±3.09		99.16±13.10		128.73±14.70		0.3±0.04		13.68±0.86	
	G	FS-G	31.61±2.77	0.34	81.66±4.75	0.008	113.27±7.17	0.03	0.38±0.02	0.053	19.56±2.0	0.026
		TEAB	28.61±5.02		97.71±6.46		126.31±5.44		0.29±0.06		15.84±0.88	
	O	FS-O	31.73±6.93	0.95	107.09±15.67	0.80	138.81±22.47	0.863	0.29±0.03	0.47	9.26±3.29	0.13
		TEAB	31.96±1.06		104.61±10.19		136.56±10.20		0.31±0.03		12.79±2.22	
FS	HS	FS-HS	28.04±2.24	0.25	70.62±5.36	0.16	98.67±7.37	0.157	0.4±0.02	0.24	14.72±5.5	0.74
		TEAB	30.69±3.47		94.27±25.60		124.96±28.10		0.34±0.08		15.86±3.11	

Çizelge 4.11 Embriyo kalitesi üzerine TEAB ve farklı ortamlarının ikili (t-test) kıyaslama sonuçları (devamı)

Ortam	Hücre	Kültür sistemi	İH	p	TE	p	THS	p	İHK/TE	p	Apoptozis	p
TEAS	K	TEAS-K	31.37±2.21	0.99	91.92±11.08	0.14	123.28±13.14	0.182	0.34±0.02	0.087	16.51±1.12	0.092
		TEAB	31.39±2.70		103.27±19.15		137.39±13.34		0.3±0.04		14.40±1.71	
	G	TEAS-G	30.73±4.82	0.69	89.14±7.39	0.47	119.88±10.64	0.48	0.34±0.05	0.933	15.32±2.0	0.126
		TEAB	31.89±2.62		94.50±11.75		126.39±13.75		0.34±0.03		13.06±1.53	
	O	TEAS-O	33.16±4.72	0.26	114.18±12.16	0.50	147.34±10.72	0.30	0.3±0.06	0.397	7.93±0.94	0.092
		TEAB	28.88±5.01		108.81±8.46		137.69±12.99		0.26±0.03		11.55±3.03	
	HS	TEAS-HS	31.64±2.84	0.76	95.56±5.32	0.487	127.20±8.12	0.622	0.33±0.01	0.153	15.55±1.79	0.19
		TEAB	30.69±5.23		103.27±19.15		133.96±23.83		0.3±0.03		13.38±2.37	

Çizelge 4.12 Embriyo kalitesi üzerine TEAB ve farklı ortamlarının etkisi

Maturasyon u ortamı	Ko-külüre hücre	Kültür sistemi	Blok%	Blastosist%	İHK	TE	İHK/TE	THS	Apoptozis%
TCM 199	K	TCM-199+K	62.05±18.71 ^{cdef}	45.09±10.17 ^{bcdef}	25.91±3.41	72.99±10.25 ^{abcdef}	0.36±0.089 ^{bcdefgh}	98.91±8.14 ^{abcd}	24.84±0.91 ^g
		TEAB	42.14±10.20 ^{abc}	57.85±10.20 ^{efg}	22.78±2.94	86.15±8.88 ^{cdefghi}	0.265±0.0057 ^a	108.94±11.82 ^{bcdefg}	15.90±4.15 ^{cdef}
	G	TCM-199+G	60.86±12.54 ^{cdef}	39.13±12.54 ^{bcde}	27.25±7.07	68.62±3.25 ^{abc}	0.395±0.091 ^{fghi}	95.87±9.69 ^{abc}	24.38±0.97 ^g
		TEAB	51.07±8.11 ^{abcd}	48.93±8.11 ^{cdefg}	26.52±1.08	93.64±8.46 ^{fhgijkl}	0.285±0.035 ^{abcd}	120.16±7.43 ^{cdefghi}	15.60±2.95 ^{cdef}
	O	TCM-199+O	44.83±9.73 ^{abc}	55.16±9.73 ^{efg}	30.93±4.48	95.26±13.72 ^{ghijklm}	0.327±0.054 ^{abcdefg}	126.20±15.07 ^{fghijk}	13.88±2.77 ^{bcde}
		TEAB	51.11±12.03 ^{abcd}	48.88±12.03 ^{cdefg}	29.67±3.46	115.58±10.77 ^m	0.2575±0.0206 ^a	145.26±13.05 ^{jk}	13.28±3.01 ^{bcde}
	HS	TCM-199+HS	68.33±8.38 ^{defg}	31.66±8.38 ^{abcd}	27.87±3.59	62.87±3.65 ^{ab}	0.4425±0.0639 ^{hi}	90.75±5.02 ^{ab}	24.32±3.25 ^g
		TEAB	50.00±8.16 ^{abcd}	50.00±8.16 ^{cdefg}	27.92±4.59	90.83±7.32 ^{defghijk}	0.3075±0.0427 ^{abcdef}	118.76±10.47 ^{cdefghi}	16.23±0.73 ^{cdef}
Ham's F-12	K	Ham's F-12+K	61.46±7.88 ^{cdef}	38.54±7.88 ^{bcde}	27.93±5.05	70.06±9.73 ^{abcd}	0.3975±0.0478 ^{fghi}	98.00±13.59 ^{abcd}	26.49±3.15 ^g
		TEAB	56.55±12.04 ^{bcdef}	43.45±12.04 ^{bcdef}	29.81±1.77	93.57±19.06 ^{fghijkl}	0.325±0.062 ^{abcdefg}	123.38±20.16 ^{efghijk}	17.29±3.35 ^{def}

Çizelge 4.12 Embriyo kalitesi üzerine TEAB ve farklı ortamlarının etkisi (devamı)

Maturasyon ortamı	Ko-külüre hücresi	Kültür sistemi	Blok%	Blastosist%	İHK	TE	İHK/TE	THS	Apoptozis%
Ham's F-12	G	Ham's F-12+G	60.95±4.04 ^{cdef}	39.04±4.04 ^{bcde}	25.31±3.59	68.43±10.05 ^{abc}	0.3750±0.0506 ^{defgh}	93.75±12.19 ^{ab}	31.25±6.77 ^h
		TEAB	55.00±10.00 ^{bcdef}	45.00±10.00 ^{bcdef}	29.06±4.50	91.42±22.74 ^{efghijk}	0.327±0.07 ^{abcdefg}	120.48±26.44 ^{defghij}	17.33±5.22 ^{def}
	O	Ham's F-12+O	53.57±14.22 ^{bcd}	46.43±14.22 ^{cdef}	31.43±3.48	107.73±14.84 ^{jklm}	0.2975±0.0505 ^{abcde}	139.17±15.76 ^{ijk}	14.73±2.16 ^{cdef}
		TEAB	51.66±11.05 ^{abcd}	48.33±11.05 ^{cdefg}	28.29±4.68	111.16±11.62 ^{klm}	0.2575±0.0340 ^a	139.46±14.54 ^{ijk}	12.37±1.80 ^{abcd}
	HS	Ham's F-12+HS	68.97±7.51 ^{defg}	31.03±7.51 ^{abc}	27.63±2.27	72.15±6.701 ^{abcde}	0.3825±0.0368 ^{efghi}	99.79±8.00 ^{abcde}	26.17±3.21 ^g
		TEAB	48.49±8.24 ^{abcd}	51.50±8.24 ^{defg}	28.73±6.97	101.23±24.00 ^{hijklm}	0.285±0.0479 ^{abcd}	129.96±30.12 ^{fghijk}	16.4f±1.39 ^{lcde}
mSOF	K	mSOF-K	74.37±16.63 ^{efg}	25.62±16.63 ^{ab}	27.81±5.20	71.50±6.79 ^{abcde}	0.395±0.0881 ^{fghi}	99.31±7.49 ^{abcde}	25.12±3.30 ^{def}
		TEAB	55.62±10.48 ^{bcdef}	44.37±10.48 ^{bcdef}	29.06±2.08	103.85±16.49 ^{ijklm}	0.2875±0.0562 ^{abcd}	132.91±15.63 ^{ghijk}	13.54±4.10 ^{bcde}
	G	mSOF-G	74.44±9.68 ^{fg}	25.55±9.68 ^{ab}	26.40±4.63	72.25±11.24 ^{abcde}	0.373±0.0713 ^{cdefgh}	98.65±13.65 ^{abcd}	25.70±4.18 ^g
		TEAB	50.14±16.89 ^{abcd}	49.86±16.89 ^{cdefg}	27.50±2.34	86.25±10.47 ^{cdefghi}	0.323±0.052 ^{abcdefg}	113.75±10.13 ^{bcdefgh}	15.77±1.31 ^{cdef}
	O	mSOF-O	62.32±14.46 ^{cdef}	37.67±14.46 ^{bcde}	31.33±2.44	87.58±10.38 ^{cdefghi}	0.362±0.056 ^{bcdefgh}	118.91±9.29 ^{cdefghi}	17.85±2.33 ^{ef}
		TEAB	42.36±15.61 ^{abc}	57.63±15.61 ^{efg}	27.99±4.49	100.46±4.63 ^{hijklm}	0.2±0.0535 ^{abc}	128.45±4.13 ^{fghijk}	14.51±1.12 ^{cdef}
	HS	mSOF-HS	82.91±6.14 ^g	17.08±6.14 ^a	24.81±3.52	55.31±11.12 ^a	0.465±0.1245 ⁱ	80.12±12.20 ^a	34.31±3.60 ^h
		TEAB	57.29±8.59 ^{bcdef}	42.70±8.59 ^{bcdef}	28.93±1.50	104.52±5.43 ^{ijklm}	0.275±0.0057 ^{ab}	133.45±6.76 ^{ghijk}	17.48±2.64 ^{def}
FS	K	FS-K	60.41±13.79 ^{cdef}	39.58±13.79 ^{bcde}	30.31±3.49	77.06±13.27 ^{bcdefg}	0.4025±0.0763 ^{fghi}	107.37±13.85 ^{bcdef}	17.12±4.17 ^{def}
		TEAB	49.16±12.58 ^{abcd}	50.83±12.58 ^{cdefg}	29.57±3.09	99.15±13.10 ^{hijklm}	0.30±0.0355 ^{abcde}	128.72±14.69 ^{fghijk}	13.67±0.85 ^{bcde}
	G	FS-G	58.33±19.54 ^{bcdef}	41.66±19.54 ^{bcdef}	31.61±2.76	81.65±4.74 ^{bcdefgh}	0.385±0.0191 ^{efghi}	113.26±7.16 ^{bcdefgh}	19.56±2.00 ^f
		TEAB	53.12±6.25 ^{bcd}	46.87±6.25 ^{cdef}	28.60±5.01	97.7±6.46 ^{ghijklm}	0.293±0.0618 ^{abcde}	126.31±5.44 ^{fghijk}	15.83±0.87 ^{cdef}
	O	FS-O	51.66±11.05 ^{abcd}	48.33±11.05 ^{cdefg}	31.72±6.93	107.08±15.67 ^{ijklm}	0.2925±0.0263 ^{abcde}	138.81±22.47 ^{ijk}	9.26±3.29 ^{ab}
		TEAB	45.41±17.50 ^{abc}	54.58±17.50 ^{efg}	31.95±1.05	104.60±10.19 ^{ijklm}	0.3075±0.0287 ^{abcdef}	136.56±10.19 ^{hijk}	12.79±2.22 ^{bcde}
	HS	FS-HS	61.87±10.28 ^{cdef}	38.12±10.28 ^{bcef}	28.04±2.23	70.62±5.35 ^{abcd}	0.395±0.0173 ^{fghi}	98.66±7.36 ^{abcd}	14.72±5.49 ^{cdef}
		TEAB	39.16±7.87 ^{ab}	60.83±7.87 ^{fg}	30.68±3.47	94.27±25.60 ^{ghijkl}	0.34±0.0752 ^{abcdefg}	124.95k±28.09 ^{fghij}	15.85±3.11 ^{cdef}
TEAS	K	TEAS-K	58.05±7.05 ^{bcdef}	41.94±7.05 ^{bcdef}	31.36±2.21	91.9±11.07 ^{efghijk}	0.345±0.0238 ^{abcdefg}	123.28±13.13 ^{fghij}	16.51±1.12 ^{cdef}
		TEAB	54.16±8.33 ^{bcde}	45.83±8.33 ^{cdef}	31.38±2.69	106.00±12.44 ^{ijklm}	0.30±0.0355 ^{abcde}	137.38±13.34 ^{hijk}	14.40±1.71 ^{ecde}
	G	TEAS-G	45.41±17.50 ^{abc}	54.58±17.50 ^{efg}	30.73±4.82	89.14±7.38 ^{cdefghij}	0.343±0.0478 ^{abcdefg}	119.87±10.63 ^{cdefghi}	15.31±2.00 ^{cdef}
		TEAB	38.21±12.85 ^{ab}	61.78±12.85 ^{fg}	31.88±2.62	94.50±11.74 ^{ghijklm}	0.30±0.0316 ^{abcdefg}	126.38±13.74 ^{fghijk}	13.06±1.52 ^{bcde}
	O	TEAS-O	43.33±10.03 ^{abc}	56.66±10.03 ^{efg}	33.16±4.71	114.17±12.15 ^{lm}	0.295±0.0568 ^{abcde}	147.34±10.71 ^k	7.92±0.94 ^a
		TEAB	32.38±9.39 ^a	67.62±9.39 ^g	28.87±5.01	108.81±8.45 ^{ijklm}	0.265±0.0300 ^a	137.68±12.98 ^{hijk}	11.55±3.02 ^{abc}
	HS	TEAS-HS	57.64±6.05 ^{bcdef}	42.36±6.05 ^{bcdef}	31.64±2.83	95.56±5.31 ^{ghijklm}	0.33±0.0115 ^{abcdefg}	127.20k±8.12 ^{fghij}	15.55±1.78 ^{cdef}
		TEAB	44.44±12.83 ^{abc}	55.55±12.83 ^{efg}	30.68±5.22	103.27±19.14 ^{ijklm}	0.30±0.0316 ^{abcde}	133.95±23.82 ^{hijk}	13.38±2.36 ^{bcd}
			p<0.001	p<0.001	p>0.05	p<0.001	p<0.05	p<0.001	p<0.001

4.3.3 Apoptozis indeksi

Apoptozis indeksi için t sınaması sonuçları çizelge 4.11’de sunulmuştur.

Muameleler birlikte incelendiğinde çizelge 4.12’de de gösterildiği gibi en az apoptozis indeksi TEAS+O-TEAS+O (7.92 ± 0.94) sisteminde görülürken mSOF+HS-mSOF+HS (34.31 ± 3.60) sistemi en çok apoptozisin ortaya çıkmasına neden olmuştur ($p \leq 0.001$).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1 Ovaryum Taşıma Ortamı ve Sıcaklığının Etkisi

Bu araştırmanın bulgularına göre KOK'ler CR1 ve KSOM ortamlarında diğer ortamlardan daha fazla maturasyona uğramıştır. Lin vd. (2011) domuz oosit maturasyonu üzerine; PBS, BCS ve NS ovaryum taşıma ortamlarının etkisini incelemiştir. Araştırma sonuçlarına göre PBS ve BCS ortamlarından daha çok maturasyon oranlarına neden oldukları tespit edilmiştir. Yorum olarak bu farklılıkların, PBS ve BCS ortamlarında bulunan ve NS'de bulunmayan bileşimlere bağlı olduğu öne sürülmüştür. Ancak çizelge 3.2'de görüldüğü gibi CR1, hemen hemen Hepes içeren NS solüsyonu gibidir. Bu yüzden, araştırma sonuçlarındaki farklılıkların Hepes tamponundan kaynaklandığı kanıtlanabilmektedir. BCS ortamı, yoğun CO₂ atmosferinde etkili olan bikarbonat tamponunu içermektedir (Silva vd. 2000). Ancak bu çalışmada bikarbonat tamamen çevresel CO₂'den bağımsız olarak etki gösteren Hepes ile değiştirilmiştir. Buna ek olarak Hepes'in pKa'ları (4 °C = 7.77; 25 °C = 7.48 ve 37 °C = 7.31) bu çalışma şartları ve sıcaklıklarına en uygun koşulları sağladığı (Anonymous 2008) düşünülmüştür.

At ovaryum parçaları üzerinde depolama ortamının ve sıcaklığının etkisi Gomes vd. (2012) tarafından araştırılmıştır. Araştırmada MEM ve PBS ortamları taşıma ortamı olarak 4, 20 ve 39 °C'de 4, 12 veya 24 saat boyunca depolanmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığı halde, kısır ovaryum parçalarının aktarımında kullanılan her iki ortamda da zaman ve sıcaklığın artmasıyla morfolojik olarak normal foliküllerin azalmasına neden olmuştur. Primordial ve gelişmekte olan foliküller dikkate alındığında, 4 saat süresince 4 °C sıcaklıklı PBS morfolojik olarak normal foliküller oranına göre MEM ortamından daha üstün olduğu tespit edilmiştir. Diğer bir çalışmada ise Chaves vd. (2008) ovaryum parçalarının taşınması için en uygun sıcaklığın 4 °C olduğunu belirlemiştir. Bilimsel açıklama olarak düşük sıcaklığı, metabolik hızı azaltarak besin ve oksijen ihtiyaçlarını düşürüp foliküler direnci artırdığı belirtilmektedir. Ayrıca başarılı foliküler korumanın

nedeni olarak basit ortamlardaki düşük metabolik ihtiyaçları karışlayabilecek taşıma ortamının bileşenleri dikkate alınabilmektedir (Gomes vd. 2012).

Vücut sıcaklığına yakın sıcaklıkların, hücre otolizine neden olarak sığır oosit maturasyonunun azalmasına ve oositlerin gelişme yeteneğı üzerine de olumsuz etkiye sahip olduğuna inanılmaktadır (Pedersen vd. 2004). Ancak, olgunlaşan oositlerin bölünme oranı 38 °C'deki CR1, CZB ve KSOM ortamlarında daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar Love vd. (2003) ve Young vd. (1998) ile uzlaşmakta iken, Wongsrikeao vd. (2005) ve Evecen vd. (2010)'nin bildirişleri ile çelişki içindedir. Bu farklılığın bir kısmı bu araştırmalarda kullanılan uzun depolama süresinden kaynaklanabilirken bir kısmı da alışmamızdaki Hepes tampon sisteminden kaynaklanabilmektedir. Bilindiğı gibi Hepes tampon sistemi pH'ı uygun fizyolojik aralıkta tutarak hormon ve enzimleri koruyabilmektedir. Uygun tampon sisteminin bulunmaması, pH düşüşünden kaynaklanan ekirdek DNA parçalanmalarının artışına yol açabilmektedir. Bu açıdan oosit plazma zarının H⁺ iyonuna son derece geçirgen olduğ u, oosit zarının pH ayarlama mekanizmaya sahip olmadığını öne sürmektedir. Eğer ortamın tampon kapasitesi pH artışını korursa, proton akımı uzun süre boyunca devam edebilir. Sonuç olarak hücre içi pH'nin düşüşü azalır (Salehi vd. 2004). Hücre içi pH'nin düşüşü hücre zarı geçirgenliğini etkileyen amino asitlerin net elektrik yükünün belirlenmesinde biyolojik olarak öneme taşımaktadır (Patel vd. 1973). Dolayısıyla pH'nın azalması hücre zarının geçirgenliğini değıştirerek hücre fonksiyonlarını bozabilmektedir.

Taşıma ortamı ve sıcaklığın morula ve blastosist oluşumunu etkilediğı sonucu Wang vd. (2011) bildirişleri ile örtüşmektedir. Onların raporuna göre blastosist oluşum oranı taşıma sıcaklığı ile etkilenmemektedir, ancak yedi günlük SCNT embriyolarında toplam hücre sayısı bakımından 15 °C sıcaklıkta depolanan ovaryumlardan elde edilen blastosistlerde diğ er sıcaklıklara göre (25 °C ve 35 °C) daha çok hücreye sahip oldukları tespit edilmiştir. Ovaryum aktarma koşullarının erken embriyo gelişim yeteneğı üzerinde etkili olduğ u görülebilmektedir (Guignot vd. 1999). Ancak in vitro koşullarında üretilen embriyoların kalitesi taşıma ortamı ve sıcaklığından etkilenmemektedir.

Sonuç olarak, araştırma bulgularına göre 4 °C’de inek ovaryum aktarımı, in vitro maturasyonu etkilemektedir. Ayrıca, ovaryum taşımada kullanılan ortamın in vitro maturasyon üzerinde de etkili olduğu görünmüştür. CR1 ve KSOM ortamları taşıma medyumları olarak kullanıldığında en yüksek olgunlaşma oranı elde edilmiştir. Ancak, bölünme oranı sadece ovaryum taşıma ortamından etkilenip CR1 4 °C ve 38 °C’de en yüksek seviyede olarak tespit edilmiştir. Bu yüzden ovaryum taşımada Hepes içeren ortamın kullanılmasının yerinde olacağı ifade edilebilir. Araştırma sonuçlarına göre 4 °C’li CR1 gibi Hepes içeren ortamların ovaryum taşımada kullanımı uygun bulunmuştur.

5.2 Farklı Ortamlar, Somatik Hücreler ve kültür sistemlerinin Etkisi

Maturasyon üzerine farklı somatik hücreleri ile beraber kültür etmenin etkisini belirlemek amacıyla yapılan çalışmanın sonuçlarına göre ovidukt hücreleri ile beraber TEAS ortamı en iyi koşulları sağlayarak en çok A kategorili kümülüs hücrelerin genişlemesine sebep olurken granüloza hücresi içeren FS ortamında kültür edilen KOK’ler en düşük orana sahip olmuştur. Ortam ve somatik hücreler, bağımsız olarak incelendiğinde FS ortamı en fazla C kategorili kümülüs hücre kompleksinin genişlemesine sebep olduğu halde en çok A sınıf kümülüs hücre genişlemesi TEAS ortamında bulunmuştur. Ovidukt hücre ko-kültürü en çok A sınıf olgunlaşmaya neden olurken bu oran granüloza hücresinde en az olarak tespit edilmiştir.

Oosit maturasyonu üzere FS ortamında granüloza hücresi ile beraber kültür edilen KOK’lerin en çok C kategorisinde yerleşmesi, Leibfried ve First’ın (1980) elde ettiği sonuçla uyum içinde olmuştur. FS ile gerçekleştirdikleri çalışmada granüloza tek katmanı üzerine kültür edilen domuz oositlerinde GVBD önlenmiştir. Ancak FS veya granüloza hücreler ile temas etmeden kültür edilen oositlerde GVBD gerçekleşerek mayoz yeniden başlamıştır. Sato ve Ishibashi (1977)’ye göre granüloza hücrelerinin yüzeyindeki faktörler mayozun durmasına neden olmaktadır. Ancak daha sonra belirlendiği gibi haypoxanthine veya ondan kaynaklanan maddeler granüloza

hücrelerinden gap bağlantılar vasıtasıyla oositin içine geçerek mayozun durmasına neden olduğu kanıtlanmıştır (Eppig vd. 1985).

Maturasyon üzerine farklı ortamların etkisi dikkate alındığında FS en fazla C kategorili KOK maturasyonuna neden olmuştur. Bu sonuç Chauhan vd. (1997)'nin bildirişiyle çelişkide olmuştur. Sözü geçen araştırmalarında FSH içeren ortam (%74) ile %20 (%67) ve %40 (%67) manda FS içeren ortamla aynı grupta yer alarak daha iyi maturasyona neden olurken FSH veya manda FS'i içermeyen ortamlar daha az (%47) maturasyon oranına neden olmuştur. Bu çelişkinin bir kısmı muhtemelen örneğin az olmasından veya ortam kıyaslamasında kullanılan istatistik metottan kaynaklanabilmektedir. Ancak, Ocanan vd. (1995), Romero-Arredondo ve Jr (1996), Choi vd. (1998), Cruz vd. (2014)'nin sonucuyla uyum içindedir. FS maturasyon engelleyici maddeler içerdiğinden (Ocana vd. 1995, Choi vd. 1998) maturasyon ortamına eklenmesi olumsuz sonuçlara yol açmıştır. Ayrıca, Dell'Aquila vd. (1997)'nin araştırmasına göre kısırak oosit maturasyonu üzerine FS olumlu etkiye sahip olmayıp (%68.5), kızgın kısırak serumu eklenen kontrol grubu (81.1) daha çok maturasyona neden olmuştur. Cruz vd. (2014)'ne göre sığır oositlerinde maturasyon FS eklenmesi ile yavaşlamıştır. Diğer bir çalışmada ise inek kümülüs hücrelerinin genişlemesi üzerine GnRH uygulamasının farklı zamanlarında (0, 8 ve 20 saat) elde edilen FS'nin farklı yoğunluklarında (kontrol, 10%, 40%) maturasyonlarını gerçekleştiren inek KOK'lerine de 20 saat GnRH enjeksiyonundan sonra toplanan %40 FS ortamı ve kontrol grubu birlikte en çok kümülüs hücre genişlemesine yol açmıştır. Ancak, GnRH uygulamasından hemen sonra toplanan FS, her iki yoğunluklarda kümülüs hücre genişlemesini engellemiştir (Romero-Arredondo ve Jr 1996). Olgunlaşma üzerine FS'nin yavaşlatması veya mayozun durdurulmasının bir nedeni küçük molekül ağırlıklı olan hypoxanthine olduğu belirlenmiştir (Eppig vd. 1985).

A sınıf olgunlaşan KOK oranlarının TEAS ortamında en çok olarak bulunuşu, Ocana vd. (1995)'nin sonucuyla uyum içindedir. Sığır oosit maturasyonu üzerine BAF (Bovine amniotic fluid), kızgın inek serumu ve sığır folikül sıvısının etkisini inceleyen Ocana Quero vd. (1995)'ne göre %20 BAF en fazla MII olgunlaşmaya sebep olmuştur.

Gelişmekte olan fetüs ile direkt temasta olan amniyotik sıvı ultra filtre sistemi ile uterustan üretilmektedir. Kimyasal bileşenleri serumdan daha az değişmekte olup büyüme faktörleri, hormonlar ve embriyo için yararlı olan diğer kimyasalları içerdiğinden (Ocana vd. 1995) oositleri direkt ve dolaylı olarak destekleyip olgunlaşmalarını sağlayabildiği öne sürülmektedir. Amniyotik sıvısı IGF-1 (Mcmurtry ve Brocht 1997), EGF ve TGF (Underwood vd. 2005) gibi hormon ve faktörleri içermektedir. IVM için EFG'in yararlı olduğunu birçok araştırmalar göstermiştir. EGF kümülüs hücre genişlemesini, oosit maturasyonunu ve blastosist gelişmesini uyarabilmekte (Lin vd. 2009) olduğundan dolayı olgunlaşma için TEAS ortamı diğer ortamlardan daha iyi zemin hazırlayarak söz konusu özelliklerin iyileşmesi sağlamıştır.

Kümülüs genişlemesi üzerine somatik hücrelerinin etkisine bakıldığında ovidukt hücrelerinin en iyi koşulları sağladığı belirlenmiştir. Ancak granüloza hücresi diğer hücrelere göre daha az olgunlaşmaya neden olmuştur. Elde edilen sonuçlar, manda oosit maturasyonu üzerine farklı somatik hücrelerin ko-kültürünün etkisini inceleyen Jamil vd. (2011)'nin sonucuyla uyumlu değildir. Jamil vd. (2011)'ne göre granüloza (%84.24) ve kümülüs (%83.44) hücrelerinin ko-kültürü, manda ovidukt epitelyal hücreleri (%73.37) ile beraber kültüründen daha fazla maturasyon oranına neden olmuştur. Ancak, granüloza hücreleri ile ko-kültür edilen oositlerin %36'sının GV aşamasında kaldıklarını tespit eden Richard ve Sirard (1996)'ın bildirişi ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Menezo B2 ortamı Vero hücre tek katmanında kullanıldığında embriyo gelişimi % 25-30 arası bulunurken ortam olarak HTF ko-kültür sisteminde kullanıldığında daha az gelişim elde edilmiştir (Duszevska vd. 2000). Ayrıca normal üç boyutlu organizasyonun eksikliğinden, hücre yapısı iki boyutlu kültür sistemi ile değişmektedir. Ek olarak, bazal zara özgü bileşimler ile bağlantının eksikliğinin granüloza hücrelerinin yanıtlarını etkileyebileceği düşünülmektedir (Vanderhyden vd. 1992).

Gruppen ve Armstrong (2010) tarafından yapılan bir araştırmada domuz oosit maturasyonu, kümülüs hücrelerinin apoptozisi ve progesteron salgısı üzerine FS'nin etkisi incelenmiştir. Sonuca göre in vitro maturasyon ortamının ilk 22 saatinde FS'nin

eklenmesi maturasyon oranını iyileştirmiştir. Ancak ikinci 22 saatten sonra eklenen FS'nin, oositlerin çekirdek maturasyonu üzerine olumlu etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu yüzden mayozun yeniden başlamasının başlangıcında maturasyon ortamına foliküler sıvısının eklenmesi çekirdek olgunlaşması üzerinde etkili olarak oosit olgunlaşmasını artırmıştır.

Araştırma sonuçlarına göre bölünme oranı en fazla TEAS ortamında görünürken en düşük olarak mSOF ve FS ortamlarında ortaya çıkmıştır. Elde edilen sonuçlar Romero-Arredondo ve Jr (1996)'ın sonuçlarıyla uyum içindedir. Romero-Arredondo ve Jr (1996) çalışma sonuçlarına göre FS içermeyen ortamlar en çok (85 ± 5.1) bölünmüş zigot oranına neden olurken en az oranlar ise %20 (36 ± 12.2) ve %40 (45 ± 18.9) FS içeren ortamlarda görünmüştür.

Somatik hücre faktörleri için elde edilen sonuçlar Romar vd. (2001) ve Mugnier vd. (2009) ile uyum içinde bulunmuştur. Domuz IVF'inde monospermi ve sperm geçişi için domuz oositini POEC hücreleri ile ko-kültür eden Romar vd. (2001)'nın sonuçlarına göre oositlerde fertilizasyon iyileşerek %70'in üzerinde bulmuştur. Ancak Mugnier vd. (2009)'i kısarak oosit IVM'inde ovidukt hücresi ile beraber kültür edilen oositlerde hücre içermeyen kültür sisteminden daha çok fertilizasyon oranı elde etmişlerdir. Ama sadece IVF aşamasında ovidukt hücreleri ile kültür edilen gametlerde elde edilen sonuçlar hücre içermeyen kültür ortamı ile önemli farklılıklar göstermemiştir.

Bölünme üzerine ovidukt hücresinin olumlu etkisi en az üç yolla gerçekleşmektedir:

- 1) spermin yaşam gücünü artırması suretiyle;
- 2) polisperminin azaltılması yoluyla
- 3) bölünme için destekleyici maddelerin salgılanması ile (Mermillod vd. 1993, Smith 1998, Coy vd. 2008).

İn vivo ve in vitro koşullarında spermier geçici olarak ovidukt hücrelerine yapışarak yaşam süreleri artmaktadır (Smith 1998). Ayrıca ovidukt sıvısında bulunan glikoproteinler ZP'e yapışarak polispermii engellemek için ZP'i düzenlemektedir. Sözü geçen mekanizma aracılığıyla ovidukt glikoproteinlerini ve diğeri elemanları içeren ZP ağı, oositi sararak GAG'lara bağlanma suretiyle oositi daha istikrarlı kılıp sperm geişı için oositin direncini artırmaktadır (Coy vd. 2008). Dolayısıyla oositlerde polispermii engellenmektedir. Ek olarak, ovidukt kültür ortamlarında bulunan düşük molekül ağırlıklı (<~10 kDa) protein (veya proteinler) zigotların erken bölünmelerini (5-8 blastomer aşamasına kadar) desteklemektedir (Mermillod vd. 1993).

Blastosist oluşumu ve embriyo canlılığını iyileştirme amacıyla çeşitli ortamlar ve ko-kültür sistemleri kullanılmıştır. Kimileri tanımlanmış ortamları iyileştirerek blastosist oluşum oranının yükseltme için çaba gösterirken kimileri farklı somatik hücreler ile beraber ko-kültür edilmenin etkisini incelediğinde embriyo üretiminin iyileştiğini göstermişlerdir. Ancak kimi araştırmacılar tarafından belirlendiğı gibi bazı hücre hatlarının embriyo gelişimi için yararlı olmadığı kanıtına varmışlardır. Halbuki ko-kültür esnasında temel sorun hem hücre büyümesini hem de embriyo gelişimi sağlayan karmaşık ortamın bulunmasıdır (Leppens vd. 1996). Zira somatik hücrelerin sağlığı ve gelişimi, birlikte kültür edilen oosit, zigot veya embriyoların gelişim yeteneğı ve hatta hayatta kalmalarını belirleyebilmektedir. Bu yüzden ortam aynı zamanda hem somatik hücre ve hem de oosit veya zigot için uygun olmalıdır. Bu nedenle kimi araştırmalarda ortam yetersizliğinden dolayı somatik hücreler ile birlikte ko-kültür etme zaman zaman olumsuz sonuçlara yol açabilmektedir.

Araştırmamızda ovidukt hücresi içeren TEAS muamelesi diğeri muamelelerden daha çok blastosist oluşumuna yol açarken hücre içermeyen mSOF ortamı en az blastosist oluşumuna neden olmuştur. Faktörler ayrı ayrı olarak incelendiğinde TEAS ortamı en iyi koşulları sağlayarak en çok blastosist oluşumuna neden olmuştur. Ancak mSOF ortamının en az blastosist oluşurma kapasitesine sahip olduğı tespit edilmiştir. Ko-kültür sisteminde kullanılan somatik hücre açısından blastosist oluşumu ovidukt hücresinde en çok olurken hücre içermeyen ortamlarda en az olarak belirlenmiştir.

Fare zigotunun blastosist aşamasına erişim yüzdesini 6 ve 10 günlük TEAS ortamında kontrol grubundan (insan serum albümini ile tamamlanan Ham's F-10) daha yüksek bulan Esmaili ve Valojerdi (2004)'nin sonucu ile araştırmamızın sonucu bağdaşmaktadır. Bilindiği gibi amniyon sıvısındaki polyaminler, epitelyal hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını sağlamaktadır. Ayrıca, IGF-I, EGF, TGF- α , G-CSF gibi faktörleri içeren amniyotik sıvının (Underwood vd. 2005, Mirzajani vd. 2011) blastomerlerin çoğalmasını sağlayarak blastosist oluşumunu olumlu yönde destekleyebildiğine inanılmaktadır.

Çalışmamızda somatik hücreleri ile beraber ko-kültür edilen zigotlarda belirlenen blastosist oluşumu sonuçları, Yadav vd. (1998) ve Jamil vd. (2011) elde ettiği sonuçlarla uyum içindedir. Manda zigot gelişimi üzerine hemolog ve heterolog ovidukt hücrelerinin etkisini inceleyen Yadav vd. (1998) göre keçi ve manda ovidukt hücresi kullanıldığında hem keçi ovidukt hücresi hem de manda ovidukt hücresi manda zigot kültüründe bölünme, morula, blastosist ve embriyo blokesinin ortadan kaldırması üzerine önemli etkiye sahip olduğunu kanıtlamıştır. Ayrıca, Jamil vd. (2011)'ne göre manda embriyolarında erken embriyo gelişimi bakımından manda ovidukt epitelyal hücreleri ile kültür edilen zigotlar, hücre içermeyen TCM-199 ortamından daha etkili olduğunu kanıtlamıştır.

Rexrod ve Powell (1988)'in sonuçlarına göre ovidukt hücreleri ile beraber ko-kültür etmek bir ve iki blastomerli koyun zigotunun inkübasyonun beşinci gününde bölünme sayısında artışa neden olmamıştır. Ancak %10 FCS içeren TCM-199, %10 FCS içeren F10 ortamından daha çok bölünme sayısına neden olmuştur. Bu çalışmanın diğer bir bölümünde ise tek katman böbrek, uterus ve ovidukt hücrelerinin ko-kültürü araştırılıp ovidukt hücre tek katmanı, hücre içermeyen ortamdan veya diğer hücre tiplerinden daha çok bölünmeyi sağladığı tespit edilmiştir.

Blastosist oluşumu üzere ortam faktörü etkili olup TEAS ortamı en iyi ortam olarak bulunurken en düşük sonuçlar mSOF ortamında görülmüştür. Şekil 4.19'da görüleceği gibi FS ortamı ikinci sırada yer almıştır. Bu sonuç, Romero-Arredondo ve Jr (1996)'nın sonucuyla uyum sağlamaktadır. Sözü geçen çalışmada blastosist oluşumu üzerine %20

ve %40 FS içeren ortamlar kontrol grubundan daha çok blastosist oluşumuna neden olmuştur (Romero-Arredondo ve Jr 1996).

İn vitro embriyo üretimi üzerine keçi ovidukt epitelyal hücresi (GOEC) içeren SOF ortamının etkisi Rodriguez-Dorta vd. (2007) tarafından araştırılmıştır. Bu araştırmaya göre GOEC içermeyen SOF ortamı %28 blastosist üretirken GOEC tek katmanı ile beraber kültür edilen KOK'lerde bu değer sadece % 20 olarak elde edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar araştırmamız sonucu ile çelişki oluşturmaktadır. Rodriguez-Dorta vd. (2007) tarafından gerçekleştirilmiş olan bu araştırmada SOF ortamı sadece 3mg/mL BSA ile tamamlanmıştır. Ancak bilindiği gibi hücre kültürü için FCS'nın eklenilmesi kaçınılmaz olup somatik hücrelerin gelişimi ve salgısı için hayati önem taşımaktadır. Muhtemelen söz konusu araştırmada FCS'ın bulunmaması somatik hücrelerin salgı değişikliklerine veya hatta ölümlerin artmasına sebep olabilmektedir. Sonuç olarak embriyo gelişiminin olumsuz yönde etkilenmesinin nedeni FCS'nın ko-kültür ortamına eklenmemesi olabilmektedir.

Sığır zigotlarının gelişmesi üzerinde de hücre içermeyen SOF ortamı, TCM-199 temeline dayanan granüloza hücreleri ile kültür edildiğinde daha iyi sonuçlar alınmıştır (Rizos vd. 2001). Bu araştırmada Rizos vd. (2001) 7. ve 8. gün blastosist oluşum miktarını temel olarak SOF ortamında % 31.3 ve 36.8 elde ederken granüloza hücre tek katmanı ile beraber ko-kültür edilen zigotlarda sırasıyla %13.2 ve 23.7 bulmuşturlar. Bu araştırmada SOF ortamı çok gazlı inkübatör kullanılarak %5 CO₂ ve %5 O₂ kontrol edilirken TCM-199-GCM ko-kültüründe tek gazlı inkübatör kullanılıp sadece %5 CO₂ kontrol edilmiştir. Hâlbuki oosit fertilizasyonu ve embriyo gelişimi üzerinde O₂ gazının olumsuz etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Lim vd. 1999, Gordon 2003). Sığır zigotlarının gelişme yetenekleri BRL hücreleri ile beraber Menezo B2 (B2) ortamında ko-kültür edilmesi Hasler (1998) tarafından incelenmiştir. Hasler'e göre B2-BRL ko-kültürü (%47), B2 (%5.6) ve B2+serumdan (%17.8) daha çok blastosist oluşumuna neden olmuştur.

Zigot gelişimi üzerinde kümülüs hücreleri ile beraber ko-kültür etmenin etkisini inceleyen Farouk vd. (2011)'e göre 2 blastomerli zigot oluşumu bakımından Cook ortamı ile ko-

kültür edilen zigotlar arasında farklılıkların bulunmamasına rağmen blastosist oluşumu açısından önemli farklılıklar ortaya çıkmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre blastosist oluşum oranı hücre içermeyen Cook ortamında 27.3 ± 0.06 olurken tek katman kümülüs hücreleri ile beraber ko-kültür etmede ise 47.0 ± 0.04 oluşmuştur.

Vero hücresi, BRL hücresi ve Vero/BRL karışımli hücrelerin etkisi sığır zigot gelişimi üzerinde incelendiğinde 7'inci gönde Vero/BRL hücre karışımı (% 40), BRL (% 36) ve Vero (%27) hücre tek katmanlarından daha çok morula/blastosist oluşumuna neden olmuştur (Duszewska vd. 2000).

Çizelge 4.8'den anlaşıldığı gibi İH sayısı ovidukt hücresi içeren FS, TEAS ve Ham's F12 muamelesinde daha çok olarak bulunduğu halde en az olarak hücre içermeyen mSOF muamelesinde ortaya çıkmıştır. İH sayısı için elde edilen sonuçlar %50 FS ile tamamlanmış olan TCM199 ortamında (35.49 ± 3.83), FS içermeyen TCM199 ortamından (29.91 ± 3.83) daha çok bulan Cruz vd. (2014) sonucuyla benzerlik göstermektedir. Ayrıca TE ve toplam hücre sayısı da %50 FS içeren ortamda diğer ortamlardan daha çok bulmuşlardır. Çizelge 4.8'e bakıldığında ovidukt hücresi içeren FS ortamı hücre içermeyen mSOF ortamından daha çok TE hücre sayısında neden olduğu Cruz vd. (2014) sonucu ile bağdaşmaktadır.

Cruz vd. (2014)'ine göre %75 veya %100 FF'in erken bölünme ve blastosist oluşum üzerine negatif etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ancak %50 FF İHK ve toplam hücre sayısı üzerine olumlu etkiye sahip olduğu kanıtına varmıştır. TEAS ve FS içeren ortamlarda hücre sayısının daha çok bulunulmasının nedeni olarak bu tür kompleks ortamların içeriğinden kaynaklanabilmesidir. Yukarıda belirtildiği gibi bu ortamlar daha çok ve optimum seviyesinde besleyici ve destekleyici maddeler içerdiğinden dolayı ortaya çıkabilmektedir.

Hücre çoğalması diğer memeliler gibi sığır IVP embriyolarında da apoptotik hücre ölümleri ile birleşmiş olup genellikle İHK'sinde ortaya çıkmaktadır (Byrne vd. 1999).

Apoptozis indeksi en düşük olarak TEAS ortamında ovidukt hücresi ile birlikte kültür edilen embriyolarda bulunurken, içermeyen mSOF muamelesinde en yüksek bulunmuştur. Ancak faktörler ayrı ayrı incelendiğinde en az apoptozis isabeti TEAS ve FS ortamlarında görünürken en çok olarak mSOF ortamında bulunmuştur. Somatik hücre faktörleri arasında ovidukt hücresi diğer hücelere göre en düşük apoptozis isabetine yol açmıştır. Çalışmamızda belirlenen apoptozis isabet sonucu Brison ve Schultz (1997)'nın sonuçları ile uyum içindedir. Brison ve Schultz (1997)'in araştırmasına göre iki hücreli fare embriyoları yalnızca kültür edildiğinde hücre ölüm isabeti in vivo blastosistlerinin 3 katı olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, kültür ortamında embriyo sayısının artışı blastosistlerde hücre ölümlerinin azalışını sağlayarak hücre sayısının artışına sebep olmuştur.

İn vivo koşullarında elde edilen 92 h fare blastosistlerinin yaklaşık olarak %23 'de en az bir apoptotik hücresi bulunmuştur. Bu grupta apoptozis isabeti nispeten az (yaklaşık %1.19) bulunmuştur. Ancak 24 saat sonra in vitro veya in vivo blastosistlerinde apoptozis isabeti artmıştır. Ayrıca, in vitro koşullarında kültür edilen embriyolarda apoptotik hücre sayısı önemli bir şekilde artarak kültür edilen embriyolarda %93 olup in vivo blastosistlerinde ise %68 olarak tespit edilmiştir (Fabian vd. 2009).

Sudano vd.'nin (2011) araştırmasında apoptozis isabetinin FCS'nin artışına paralel olarak arttığını göstermiştir. İnceleme sonuçlarına göre in vitro embriyo üretiminde kullanan FCS %0, %2.5, %5 ve %10 olduğunda apoptozisin isabet yüzdesi sırasıyla 13.8, 19.1, 20.7 ve 28.4 olarak bulunmuştur. Halbuki, in vivo blastosistlerinde apoptozis isabeti %6.3 olarak belirlenmiştir. Ayrıca blastosistlerde toplam hücre sayısı ile apoptotik hücre ölümleri arasında negatif bağlantı olduğu Byrne vd. (1999) tarafından belirlenmiştir.

Apoptozis indeksi TEAS ortamında diğer ortamlardan daha düşük bulunmuştur. Apoptozisin azalması, TEAS ortamında mevcut olan TGF- α faktöründen dolayı ortaya çıkabilmektedir. Zira, TGF- α faktörü apoptozis indeksinin azalmasına sebep olduğu kanıtlanmıştır (Brison ve Schultz 1997). Ayrıca, Esfandiari vd. (2005) göre HTF ortamına protein kaynağı olarak serum içeriğine benzer bir içeriğe sahip olan tamamlayıcının

eklenmesi embriyolarda apoptozis indeksinin azalışına neden olmuştur. Yorum olarak ise reaktif oksijen türlerinin ortadan kaldırılmasıyla hücre ölümlerinin azalması öne sürülmüştür.

Apoptozis isabet oranı iç (hayvan türü, ırkı, yaşı) ve dış faktörler (farklı kültür ortamı, kültür ortamındaki embriyo yoğunluğu, apoptozis belirleme metodu) tarafından belirlenmektedir (Fabian vd. 2009). Ek olarak, in vitro koşullarında üretilen blastosistlerdeki hücre ölümlerinin artışı büyüme ve/veya yaşayabilme faktörlerini salgılayan anne sisteminin yokluğundan veya kültür ortamlarının optimum altında olduğundan dolayı ortaya çıkabildiği inanılmaktadır (Brison ve Schultz 1997). Kültür ortamına serum eklemesi apoptozis oranını azalttığı kanıtına varan Esfandiari vd. (2005) göre serum oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türleri gibi embriyotoksik bileşenleri temizleyerek veya büyüme hormonlarını kültür ortamına ekleyerek in vivo koşullarına yakın benzetme yaptığı kanıtına varmıştır.

Blastosist oluşumu ve kalitesi üzerine serum etkisi Esfandiari vd. (2005) tarafından araştırılmıştır. Araştırmanın sonucuna göre kültür ortamına %10 FBS eklemesi fare zigotlarında ne morula ve blastosist oluşumunu nede toplam hücre sayısını ve iç hücre kümesini etkilememiştir. Ancak blastosistlerde apoptozis isabeti serum içermeyen HTF ortamında daha yüksek (5.8 ± 1.1) bulunmuştur. Ancak, Byrne vd. (1999) sonucuna göre FBS sığır blastosistlerinde hem hücre sayısının azalışına hem de apoptozisin artışına yol açtığını göstermiştir. Ayrıca, FBS ve BSA'nın embriyo gelişimi üzerindeki destekleyici etkisi yığından yığına değişmekte olduğunun kanıtına varmıştır (Byrne vd. 1999).

Daha önceki çalışmalar sonuçlarına göre İHK:TE oranı embriyo üretim koşullarıyla etkilenmektedir. Koo vd. (2002) nin sonuçları İHK:TE oranı in vivo, in vitro ve NT embriyolarında sırasıyla yaklaşık olarak 0.525, 0.731 ve 0.982 olarak bulmuştur. Domuz embriyosu üzerinde yapılan bir çalışmaya göre erken blastosist ve blastosist aşamasındaki in vivo embriyolarında İHK/TE oranı 0.469 olurken genişlemiş blastosistlerde bu oran sadece 0.296 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca kültür ortamları İHK:TE oranı üzerine şiddetli etkiye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Rath vd. 1995). Beş günlük in vivo ve in vitro

fare blastosistlerinde İHK/TE oranı sırasıyla 0.55 ve 0.59 olarak belirlenmiştir (Brison ve Schultz 1997). Iwasaki vd. (1990) ise İHK/TE oranını erken, genişlemiş ve zonadan çıkan sığır blastosistlerde sırasıyla 0.22, 0.16 ve 0.15 olarak elde etmiştir. Ancak bu oran van Soom vd. (1997)'nin sonuçlarına göre İHK/TE oranı 30 ve 36 saat döllemeden sonra ilk bölünmesini gerçekleştiren sığır blastosistlerinde 0.33, 42 saat sonra bölünenlerde 0.47 ve 48 sonra ilk bölünmelerini gerçekleştiren blastosistlerde ise 0.41 elde edilmiştir. Bu yüzden blastosistlerin kalitesi sadece embriyo kültür sisteminden etkilenmediğini aynı zamanda önceki aşamalardan ve hatta kalıtsal özelliklerden dolayı ortaya çıkabildiği öne sürülebilmektedir.

Muamelelerin birlikte incelenme sonuçları dikkate alındığında TCM199+O-TEAB, Ham'sF12+O-TEAB, TEAS+O-TEAB sistemleri en az İHK:TE oranlarına neden olurken en büyük oranlar mSOF+HS-mSOF+HS sisteminde görünmüştür. Sonuçlarda görüldüğü gibi TEAB içinde ovidukt hücresi içeren ortamlar daha iyi sonuçlara (düşük oranlara) neden olmuştur. Elde edilen bu sonuçlar de La Fuente vd. (1997) nin elde ettiği sonuçlar ile uyum sağlamaktadır. de La Fuente vd. (1997) İHK:TE özelliğini BOEC ko-kültür sistemi ile elde edilen fare, domuz ve sığır embriyolarında incelemiştir. Araştırmanın sonuçlarına göre 5 günlük fare blastosistlerinde İHK:TE oranı 0.36, 6 günlük domuz blastosistlerinde 0.25 ve 8 günlük sığır blastosistlerde ise 0.30 olarak belirlemiştir.

Esfandiari vd. (2005) HTF ortamına serumun etkisini incelemek amacıyla yaptıkları araştırmada İHK/TE oranını HTF ortamında 0.35 bulurken serum içeren HTF'de ise 0.37 bulmuşlardır. Embriyo kalitesi üzerine sperm ayırma metotlarının etkisini inceleyen Samardzija vd. (2006)'ne göre BoviPure sperm ayırma metodunda İHK/TE oranı 0.39 olurken Swim up metodunda ise 0.35 olarak elde etmiştir. Bu yüzden görüldüğü gibi embriyo hücre sayısı ve oranlarının araştırmadan araştırmaya değişken olduğu yukarıda açıklanmış olan nedenlerle ortaya çıkabildiği öne sürülmektedir.

İn vivo yöntemi ile elde edilen embriyolardan daha az gelişme hızına sahip olan in vitro embriyolarında aynı hücre sayısına varabilmek için in vivo embriyolarından bir ya da iki gün daha uzun inkübe edilmelidir. Diğer bir deyişle, in vitro embriyoları in vivo

embriyolarından yaş olarak 1 (domuz, koyun, keçi, inek) veya 2 (at) gün geride kaldıkları bilinmektedir (Pomar vd. 2005).

Teorik olarak embriyo gelişimi için tavuk embriyo sistemi daha uygun fizyolojik ortam sağlamalıdır. Zira canlı tavuk embriyosu aktif olarak pH, osmolariti ve O₂ içeriğini ayarlamaktadır. Memeli embriyo gelişimi için amniyon sıvısı günümüzde kullanımda olan statik in vitro kültür ortamlarından daha sabit çevre sağlamalıdır. Ayrıca, tavuk embriyoları kendi gelişimine gerekli olan büyüme faktörlerini sürekli olarak sentezlemektedir. Söz konusu büyüme faktörleri memeli embriyolarının gelişmesi üzerinde uyarıcı etkiye neden olabilmektedir (Davidson 2004).

Çizelge 4.10 verilerine göre bütün muameleler birlikte kıyaslandığında TEAS+O-TEAB sistemi diğer sistemlerden daha çok blastosist oluşumuna zemin sağlayarak en çok blastosist oluşumuna yol açarken mSOF+HS-mSOF+HS sistemi en az blastosist oluşumuna neden olmuştur. Elde edilen bu sonuçlar Blakewood vd. (1989) ve Davidson (2004)'un bildirdiği elde edilen sonuçlarla uyum içindedir. Blakewood vd. (1989) ile zigot gelişimi üzerinde tavuk embriyo amniyon sisteminin etkisini araştırmıştır. Bu araştırmada in vivo koşullarında üretilen keçilerin bir hücreli zigotları, fibroblast tek katmanı, tavuk embriyo amniyon boşluğu ve kontrol grubuna aktarılarak gelişmeleri kaydedilmiştir. Sonuç olarak fibroblast ko-kültürü ile tavuk embriyo amniyonu arasındaki farklılıkların önemli bulunmamasına rağmen kontrol gruptan daha iyi embriyo gelişimine neden olduğu tespit edilmiştir. Davidson'nun (2004) sonuçlarına göre sığır embriyoları embriyotrofik ortam olan tavuk embriyo amniyonun içinde gelişebilir. Ancak bu gelişme yarı tanımlanmış ortamlar (CR1aa) kıyaslandığında önemli farklılıklar göstermemiştir.

Sadece cMTF ortamında kültür edilen embriyolarla MDBK hücreleri ile beraber kültür edilen embriyolar kıyaslandığında ko-kültür yöntemi ile elde edilen blastosistlerde İHK/TE oranı daha yüksek bulunmuştur. MDBK hücreleri tarafından salgılanan faktörler blastosistlerde İHK hücre artışına neden olduğunu öne sürülmüştür. Ancak araştırma sonuçlarına göre İHK sayısı etkilenmeyip sadece TE hücre sayısının çoğalışı tespit edilmiştir. TE hücre sayısının artışı TEAS'ındaki EGF ve LIF faktörlerden dolayı ortaya

çıkabilmektedir. Zira EGF ve LIF faktörleri TE hücre sayısı artışına neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca fare embriyosu üzerinde gerekli olmayan asit aminler ve glutamin TE gelişmesine neden olurken gerekli asit aminler İHK'sinin gelişmesine neden olduğu gösterilmiştir (Leppens vd. 1996). Daha önce gösterildiği gibi fare blastosistlerinde İHK hücrelerinin sayısı olumlu olarak insülin ile etkilenmektedir (Leppens vd. 1996).

OAF, FBS ve koyun serumu protein kaynağı olarak TCM ve RPMI maturasyon ortamlarına eklendiğinde TCM ortamında daha etkili oldukları kanıtlanmıştır. Ayrıca bu araştırmanın sonuçlarına göre OAF eklendiğinde KOK'lerin bozulması %0.0 olmuştur (Farag vd. 2010).

Muhtemelen, apoptozisin başlaması embriyonun gelişme aşamaya özel bir yol ile ayarlanmaktadır, ancak apoptozisin kimi özellikleri farklı olarak düzenlenmekte olup bağımsız biçimde IVP sığır embriyo üretimindeki metotları ile ayarlanmaktadır. Fiksasyon esnasında DNA iplikleri kırılabilir veya uygun olmayan doku manipülasyon metodu DNA hasarlarına yol açarak normal çekirdek de işaretlenebilir. Bu yüzden apoptozis belirlemelerinde birden çok apoptotik özelliği incelenmelidir (Opiela 2009).

Araştırmaların sonuçlarına göre in vitro koşullarında kültür etme ve kültür sisteminde kullanılan ortamların bileşenleri fare ve sığır embriyolarındaki hücre ölümlerinin isabetini sırasıyla artmakta ve değiştirmektedirler. Bir çok kanıta göre hem maternal ve hem de embriyodan salgılanan büyüme faktörleri embriyo gelişimi üzerinde önemli role sahip olduklarını göstermiştir. Kültür ortamını büyüme faktörlerinden olan TGF-a veya IGF-I'nın eklenmesi, muhtemelen hücre ölümlerini azaltarak blastosist oluşum oranını ve blastosist hücre sayısının artışına neden olmuştur (Betts ve King 2001).

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre ovaryum taşıması için en uygun ortam ve sıcaklık olarak 4 °C sıcaklıkta CR1 ortamı önerilmektedir. Ayrıca KOK'lerin olgunlaştırması, döllenmesi, embriyo oluşumu ve kalitesi kriterleri için en uygun sistem olarak ko-kültür sistemi bulunmuştur. Bu yüzden in vitro embriyo üretimi için ovidukt

hücreler iler beraber tavuk embriyosunun amniyotik sıvısında ko-kültür etme sistemi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T. and Hoshi, H. 2002. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serumcontaining media. *Mol Reprod Dev.*, 61; 57-66.
- Agca, Y., Monson, R.L., Northbey, D.L., Abas Mazni, O., Schaefer, D.M. and Rutledge, J.J. 1998. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology*, 50; 147-162.
- Alabart, J.L., Lahoz, B., Folch, J., Sanchez, P., Echegoyen, E. and Cocero, M.J. 2010. Effect of a defined or an undefined in vitro maturation medium on cleavage rate and embryo development in sheep. In 26th Annual Meeting AETEA.
- Albuz, F.K., Sasseville, M., Lane, M., Armstrong, D.T., Thompson, J.G. and Gilchrist, R.B. 2010. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Human Reproduction*, 1-13.
- Amer, H.A., Hegab, A.O. and Zaabal, S.M. 2008. Effects of ovarian morphology on oocyte quantity and quality, granulosa cells, in vitro maturation, and steroid hormone production in buffaloes. *Animal Reproduction*, 5(1/2); 55-62.
- Anonymous. 2008. Biological buffers. [Online] Available at: <https://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/BioBuffer.pdf> [Accessed 10 May 2014].
- Baldassarre, H., Fumus, C.C., de Matos, D.G. and Pessi, H. 1996. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*, 45; 707-717.
- Ball, P.J.H. and Peters, A.R. 2004. *Reproduction in cattle*. 3rd ed. USA: Blackwell Publishing.
- Batista, M., Baptista, M.C., Marques, C.C., Barbas, J.P., Vasques, M.I., Horta, A.M., Silva Pereira, M. and Pereira, R.M. 2006. Effect of ram sperm capacitation by swim-up or percoll on in vitro fertilization. *Reprod Domest Anim*, 41(4); p.342.
- Bavister, B.D., Teresa, A. and Pinyopummintr, T. 1992. Development of in vitro matured/ in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37(1); 127-146.
- Brackett, G.B. 1985. In vitro oocyte maturation and fertilization. *Anim Sci*, 61 (Suppl. 3); 14-24.
- Betts, D.H. and King, W.A. 2001. Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*, 55; 171-191.
- Blakewood, E.G., Pool, S.H., Pritchard, J.F. and Godke, R.A. 1989. Culturing two-to eight-cell caprine embryos using domestic chicken eggs. *Theriogenology*, 31; 176.
- Brison, D.R. and Schultz, R.M. 1997. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol. Reprod.*, 56(5); 1088-1096.
- Byrne, A.T., Southgate, J., Brison, D.R. and Leese, H.J. 1999. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fert*, 117; 97-105.

- Camargo, L.S.A., Viana, J.H.M., Sá, W.F., Ferreira, A.M., Ramos, A.A. and Vale Filho, V.R. 2006. Factors influencing in vitro embryo production. *Anim Reprod*, 3(1); 19-28.
- Carolan, C., Lonergan, P., Van Langendockt, A. and Mermillod, P. 1995. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 43; 1115-1128.
- Chauhan, M.S., Palta, P., Das, S.K., Katiyar, P.K. and Madan, M.L. 1997. Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro. *Theriogenology*, 48; 461-469.
- Chaves, R.N., Martins, F.S., Saraiva, M.V.A., Celestino, J.J.H., Lopes, C.A.P., Correia, J.C., Lima-Verde, I.B., Matos, M.H.T., Bão, S.N., Name, K.P.O., Campello, C.C., Silva, J.R.V. and Figueiredo, J.R. 2008. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 20; 640-647.
- Choi, Y.H., Takagi, M., Kamishita, H., Wijayagunawardane, M.P.B., Acosta, T.J. and Miyazawa, K.S.K. 1998. Developmental capacity of bovine oocytes matured in two kinds of follicular fluid and fertilized in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, 50; 27-33.
- Christian, G. 2008. Oocyte maturation. *Dan Med Bull*, 55; 1-16.
- Cognie, Y., Baril, G., Poulin, N. and Mermillod, P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59; 171-188.
- Coy, P., Cvaryans analisis, S., Mondejar, I., Saavedra, M.D., Romar, R., Grullon, L., Matas, C. and Aviles, M. 2008. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm-zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105(41); 15809-15814.
- Cruz, M.H.C., Saraiva, N.Z., da Cruz, J.F., Oliveira, C.S., Collado, M.D., Fernandes, H., de Castro, F.C. and Garcia, J.M. 2014. Effect of follicular fluid supplementation during in vitro maturation on total cell number in bovine blastocysts produced in vitro. *R. Bras. Zootec.*, 43(3); 120-126.
- Danila, H.D. 2000. Technical aspect of in vitro embryo production. Taipei: Food & Fertilizer Technology Center.
- Dash, P. 2014. Apoptosis. [Online] Available at: <http://www.ppgorgsistem.ics.ufba.br/arquivos/fatima/Apoptosis.pdf> [Accessed 23 December 2012].
- David, K.G., Michelle, L. and Andrew, J.W. 2004. A laboratory guide to the mammalian embryo. New York: Oxford University press.
- Davidson, T.R. 2004. The chick embryo amnion as an in vitro culture system for IVF and NT embryos. Louisiana State University.
- de la Fuente, R. and King, W.A. 1997. Use of a chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. *Zygote*, 5(4); 309-320.
- de Mendiburu, F. 2014. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. Lima, Peru: National Engineering University.
- Dell'Aquila, M.E., Cho, Y.S., Minoia, P., Traina, V., Lacalandra, G.M. and Maritato, F. 1997. Effects of follicular fluid supplementation of in-vitro maturation medium

- on the fertilization and development of equine oocytes after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 12(12); 2766-2772.
- Di Francesco, S., Boccia, L., Di Palo, R., Esposito, G., Attanasio, L., De Rosa, A. and Gasparri, B. 2007. Influence of temperature and time during ovary transportation on in vitro embryo production efficiency in the buffalo species (*Bubalus bubalis*). *Italian Journal of Animal Science*, 6(Suppl. 2); 755-758.
- Dode, M.A., Rodovalho, N.C., Ueno, V.G. and Fernandes, C.E. 2002. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *Bos Indicus* oocytes. *Animal Reproduction Science*, 69(1-2); 15-23.
- Duque, P., Gomez, E., Diaz, E., Facal, N., Hidalgo, C. and Diez, C. 2003. Use of two replacements of serum during bovine embryo culture in vitro. *Theriogenology*, 59; 889-899.
- Duszczyńska, A.M., Reklewski, Z., Pieńkowski, M., Karasiewicz, J. and Modliński, J.A. 2000. Development of bovine embryos on Vero/BRL cell monolayers (mixed co-culture). *Theriogenology*, 54(8); 1239-1247.
- Ebner, T., Moser, M., Sommergruber, M. and Tews, G. 2003. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. *Human Reproduction Update*, 9(3); 251-262.
- Eppig, J.J., Ward-Bailey, P.F. and Coleman, D.L. 1985. Hypoxanthine and adenosine in murine ovarian follicular fluid: concentrations and activity in maintaining oocyte meiotic arrest. *Biol. Reprod.*, 33; 1041-1049.
- Esfandiari, N., Falcone, T., Agarwal, A., Attaran, M., Nelson, D.R. and Sharma, R.K. 2005. Protein Supplementation and the Incidence of Apoptosis and Oxidative Stress in Mouse Embryos. *Obstetricians and Gynecologists*, 105(3); 653-660.
- Esmaili, F. and Valojerdi, M.R. 2004. Effect of six-and ten-day-old chick embryo amniotic fluid on development of two-cell mouse embryos. *Exp. Anim.*, 53(3); 453-456.
- Evecen, M., Cirit, Ü., Demir, K., Özdaş, Ö.B., Taş, M., Birler, S. and Pabuccuoğlu, S. 2010. Effects of estrous cycle stage and transport temperature of ovaries on in vitro maturation of canine oocytes. *Animal Reproduction*, 117; 160-165.
- Fabian, D., Bystriansky, J., Makarevič, A.V., Chrenek, P. and Koppel, J. 2009. Variability in apoptosis incidence in mouse blastocysts in relation to their age and the type of their derivation. *Slovak J. Anim. Sci.*, 42(4); 155-158.
- Farag, I.M., Girgis, S.M., Hassan, N.H.A., Khalil, W.K.B., Sakr, A.A.M. and Ali, N.I. 2010. Effect of protein additives on in vitro maturation of Egyptian sheep oocytes with reference to seasonal variation effects on yield and quality of oocytes. *J. Am. Sci.*, 6(10); 588-599.
- Farouk, O., Naomi, F., Stott, D. and Marcela, V. 2011. Mouse embryo co-culture with autologous cumulus cells and fetal development post-embryo transfer. *Journal of Animal Science*, 82(3); 420-427.
- Ferreira, M.A.L., Brasil, A.F., Silva, J.R.V., Andrade, E.R., Rodrigues, A.P.R. and Figueiredo, J.R. 2001. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in ml99 with or without indole-3-acetic acid supplementation. *Theriogenology*, 55; 1607-1617.

- Feugang, J., Camargo-Rodríguez, O. and Memili, E. 2009. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*, 121(1); 141–149.
- Fortune, J.E., Cushman, R.A., Wahl, C.M. and Kito, S. 2000. The primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163; 53–60.
- Freshney, R.I. and Freshney, M.G., 2002. *Culture of Epithelial Cells*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Fulvio, G. and Tiziana, A.L.B. 2010. In vitro maturation of farm animal oocytes: a useful tool for investigating the mechanisms leading to full-term development. *Reproduction, Fertility and Development*, 22; 495–507.
- Galli, C. and Lazzari, G. 2005. Embryo technologies in dairy cattle. In *The 26th European Holstein and Red Holstein Conference*. Prague.
- García-Álvarez, O., Maroto-Morales, A., Berlinguer, F., Fernández-Santos, M.R., Estes, M.C., Mermillod, P., Ortiz, J.A., Ramon, M., Pérez-Guzmán, M.D., Garde, J.J. and Soler, A.J. 2011. Effect of storage temperature during transport of ovaries on in vitro embryo production in Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*). *Theriogenology*, 75; 65-72.
- Gardner, D.K., Michelle, L. and Andrew, J.W. 2004. *A laboratory guide to the mammalian embryo*. New York: Oxford University press.
- Gibbons, A., Bonnet, F.P., Cuto, M.I., Catala, M., Salamone, D.F. and Gonzalez-Bulnes, A. 2006. Procedure for Maximizing Oocyte Harvest for In vitro Embryo Production in Small Ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(4); 423-26.
- Gjorret, J.O., Knijn, H.M., Dieleman, S.J., Avery, B., Larson, L.I. and Maddox-Hyttel, P. 2003. Chronology of apoptosis in bovine embryos produced in vivo and in vitro. *Biology of Reproduction*, 69; 1193-1200.
- Gomes, R.G., Andrade, E.R., Lisboa, L.A., Ciquini, A., Barreiros, T.R.R., Fonseca, N.A.N. and Seneda, M.M. 2012. Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. *Theriogenology*, 78; 731-736.
- Gomez, E., Rodríguez, A., Muñoz, M., Caamaño, J.N., Hidalgo, C.O., Morán, E., Facal, N. and Díez, C. 2008. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*, 69(8); 1013-1021.
- Gordon, I. 2003. *Laboratory Production of Cattle Embryos*. 2nd ed. Cambridge: CAB International.
- Goto, K., Iwai, N., Takuma, Y. and Nakanishi, Y. 1992. Co-culture of in vitro fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *Journal of Animal Science*, 70; 1449-1453.
- Gruppen, C.G. and Armstrong, D.T. 2010. Relationship between cumulus cell apoptosis, progesterone production and porcine oocyte developmental competence: temporal effects of follicular fluid during IVM. *Reproduction, Fertility and Development*, 22; 1100-1109.
- Guignot, F., Bezar, J. and Palmer, E. 1999. Effect of Time during Transport of Excised Mare Ovaries on oocyte Recovery Rate and Quality after in Vitro Maturation. *Theriogenology*, 52; 757-766.
- Hardy, K. 1999. Apoptosis in the human embryo. *Reviews of Reproduction*, 4; 125-134.

- Harper, J.C., Coonen, E., Handyside, A.H., Winston, R.M., Hopman, A.H. and Delhanty, J.D. 1995. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. *Prenat Diagn*, 15; 41-49.
- Hasler, J.F. 1998. The current status of oocyte recovery, in vitro embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *Journal of Animal Science*, 76; 52-74.
- Havlicek, V., Lopatarov, M., Cech, S., Dolezel, R., Huber, T., Pavlok, A., Brem, G. and Besenfelder, U. 2005. In vivo culture of bovine embryos and quality assessment of in vivo vs. in vitro produced embryos. *Veterinary Medicine - Czech*, 50(4); 149-157.
- Hosseini, S.M., Moulavi, F., Hajian, M., Abedi, P., Forouzanfar, M., Ostad Hosseini, S., Hosseini, L., Pirestani, A., Ghasemzadeh Nava, H., Tajik, P., Shahverdi, A.H. and Nasr-Esfahani, M.H. 2008. Highly Efficient In Vitro Production of Bovine Blastocyst in Cell-Free Sequential Synthetic Oviductal Fluid vs. TCM199 Vero Cell Co-Culture System. *International Journal of Fuzzy Systems*, 2(2); 66-73.
- Iwasaki, S., Yoshida, N., Ushijima, H., Watanabe, S. and Nakahara, T. 1990. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility*, 279-284.
- Izquierdo, D., Villamediana, P. and López-Bejar, M. 2002. Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*, 57; 1431-1441.
- Jamil, H., Samad, H.A., Rehman, N., Qureshi, Z.I. and Lodhi, L.A. 2011. Effect of somatic cell types and culture medium on in vitro maturation, fertilization and early development capability of buffalo oocytes. *Pakistan Veterinary Journal*, 31(2); 105-108.
- Joan, E., Carmina, N. and Max, R. 2010. Adapting animal production to changes for a growing human population. In International Conference. Lleida.
- Kay, E. and Brian, D., 2003. In vitro fertilization. US: Cambridge university press.
- Khatir, H. and Anouassi, A.H. 2006. The first dromedary (*Camelus dromedarius*) offspring obtained from in vitro matured, in vitro fertilized and in vitro cultured. *Theriogenology*, 65; 1727-1736.
- Kobayashi, K., Yamashita, S. and Hoshi, H. 1994. Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on in vitro maturation of cumulus cell enclosed bovine oocytes in a defined medium. *J Reprod Fertil*, 100; 439-446.
- Koo, D.-B., Kang, Y.-K., Choi, Y.-H., Park, J.S., Kim, H.-N., Oh, K.B., Son, D.-S., Park, H., Lee, K.-K. and Han, Y.-M. 2002. Aberrant Allocations of Inner Cell Mass and Trophectoderm Cells in Bovine Nuclear Transfer Blastocysts. *Biol. Reprod.*, 67; 487-492.
- Krisher, R.L. 2004. The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82(E); 14-23.
- Laiq Akbar Lodhi, U., Ahmad, S., Sultan, S. and Khan, Y. 2009. In vitro Maturation of Oocytes in Different Maturation Media Containing Oestrous Buffalo Serum, Oestrous Cow Serum and Follicular Fluid From Buffalo. *Pakistan Journal of Zoology*, 9(Suppl. Ser.); 213-218.

- Leibfried, L. and First, N.L. 1980. Effect of bovine and porcine follicular fluid and granulosa cells on maturation of oocytes in vitro. *Biol. Reprod.*, 23; 699-704.
- Leivas, F.G., Brum, D.S., Fialho, S.S., Saliba, W.P., Alvim, M.T.T., Bernardi, M.L., Rubin, M.I.B. and Silva, C.A.M. 2011. Fetal calf serum enhances in vitro production of *Bos Taurus indicus* embryos. *Theriogenology*, 75; 429-433.
- Leppens, G., Gardner, D.K. and Sakkas, D. 1996. Co-culture of 1-cell outbred mouse embryos on bovine kidney epithelial cells: effect on development, glycolytic activity, inner cell mass:trophoblast ratios and viability. *Human Reproduction*, 11; 598-603.
- Lim, J.M., Reggio, B.C., Godke, R.A. and Hansel, W. 1999. Development of in-vitro-derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. *Human Reproduction*, 14(2); 458-464.
- Lin, Y.-H., Hwang, J.-L., Seow, K.-M., Huang, L.-W., Chen, H.-J. and Tzeng, C.-R. 2009. Effects of growth factors and granulosa cell co-culture on in-vitro maturation of oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, 19(2); 165-170.
- Lin, Y.-A., Tsai, H.-B., Liao, M.-H. and Chen, M.-C. 2011. Effects of preservation media on in vitro maturation of porcine oocytes. *Chinese Journal of Physiology*, 54(1); 1-6.
- Lonergan, P., Fair, F., Corcoran, D. and Evans, A.C.O. 2006. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, 65; 137-152.
- Love, L.B., Chi, Y.H., Love, C.C., Varner, D.D. and Hinrichs, K. 2003. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. *Theriogenology*, 59; 765-774.
- Mapletoft, R.J. and Hasler, J.F. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev Sci Tech Off int Epiz*, 24(1); 393-403.
- Matwee, C., Betts, D.H. and King, W.A. 2000. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote*, 8; 57-68.
- Mcmurtry, J.P. and Brocht, D.M. 1997. Developmental changes in embryonic and extra-embryonic insulin-like growth factor-I tissue concentrations in the turkey embryo. *Poult. Sci.*, 76; 894-900.
- Melin, J., Lee, A., Foygel, K., Leong, D.E., Quake, S.R. and Yao, M.W. 2009. In vitro embryo culture in defined, sub-microliter volumes. *Developmental Dynamics*, 238(4); 950-955.
- Memili, E., Peddinti, D., Shack, L.A., Nanduri, B., McCarthy, F., Sagirkaya, H. and Burgess, S.C. 2007. Bovine germinal vesicle oocyte and cumulus cell proteomics. *Reproduction*, 133(6); 1107-1120.
- Mermillod, P., Locatelli, Y., Dalbiès-Tran, R., Uzbekova, S., Baril, G., Guignot, F., Perreau, C., Poulin, N., Touzé, J.L., Pennetier, S., Schmaltz, B. and Cognié, Y. 2006. In vitro production of ruminant embryos: results, limits and perspectives. In Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture. Tainan.
- Mermillod, P., Vansteenbrugge, A., Wils, C., Mourmeaux, J.L., Massip, A. and Dessy, F. 1993. Characterization of the embryotrophic activity of exogenous protein-free oviduct-conditioned medium used in culture of cattle embryos. *Biol. Reprod.*, 49(3); 582-587.

- Michael, J.F., Robert, S.S. and Joel, V.Y. 2002. Factors affecting calf crop: Biotechnology of Reproduction. USA: CRC Press.
- Mirzajani, E., Dejhagah, S., Mashayekhi, F., Nikpay, A. and Siyam, S. 2011. Amniotic fluid TGF- β 1 concentration during chick embryonic development. *Ann. Biol. Res.*, 2(5); 185-190.
- Mugnier, S., Kervella, M., Douet, C., Canepa, S., Pascal, G., Deleuze, S., Duchamp, G., Monget, P. and Goudet, G. 2009. The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine in vitro fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? *Reprod. Biol. Endocrin.*.
- Ocana Quero, J.M., Moreno Millan, M., Valera Cordoba, M., Pinedo Merlin, M. and Rodero Franganillo, A. 1995. The effect of bovine amniotic fluid on in vitro maturation of bovine oocytes. *Br. Vet. J.*, 151(5); 547-554.
- Opiela, J. 2009. Apoptosis in preimplantation bovine embryos and methods used for its detection. *Ann. Anim. Sci.*, 9(1); 3-16.
- Orsi, N.M. and Reischl, J.B. 2007. Mammalian embryo co-culture: Trials and tribulations of a misunderstood method. *Theriogenology*, 67; 441-458.
- Papaioannou, V.E. and Ebert, K.M. 1986. Development of fertilized embryos transferred to oviducts of immature mice. *J. Reprod. Fertil.*, 76(2); 603-08.
- Paramio, M.T. 2010. In vivo and in vitro embryo production in goats. *Small Ruminant Research*, 89; 144-148.
- Parikh, F.R., Nadkarni, S.G., Naik, N.J., Naik, D.J. and Uttamchandani, S.A. 2006. Cumulus coculture and cumulus-aided embryo transfer increases pregnancy rates in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 86(4); 839-847.
- Patel, K.K., Hartmann, F. and Cohen, M.M. 1973. Effect of pH on metabolism and ultrastructure of guinea pig cerebral cortex slices. *Stork*, 4; 221-231.
- Pedersen, H.G., Watson, E.D. and Telfer, E.E. 2004. Effect of ovary holding temperature and time on equine granulosa cell apoptosis, oocyte chromatin configuration and cumulus morphology. *Theriogenology*, 62; 468-480.
- Peng, X.R., Hsueh, A.J., LaPol, P.S., Bjersing, L. and Ny, T. 1991. Localization of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid expression in ovaryuman cell types during follicle development and ovulation. *Endocrinology*, 129; 3200-3207.
- Pereira, D.C., Dode, M.A.N. and Rumpf, R. 2005. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, 63; 1131-1141.
- Pomar, F.J.R., Teerds, K.J., Kidson, A., Colenbrander, B., Tharasanit, T., Aguilar, B. and Roelen, B.A.L. 2005. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: a comparative study. *Theriogenology*, 63; 2254-2268.
- Rahman, A.N.M.A., Abdullah, R.B. and Wan-khadijah, W.E. 2008. Recover and grading of goat oocytes with special reference to laparoscopic ovum pick-up technique: A review. *Biotechnology*, 7(4); 599-661.
- Raman, A.N.M.A., Abdullah, R.B. and Wan-Khadijah, W.E. 2007. Goat embryo development from in vitro matured oocytes of heterogeneous quality through intracytoplasmic sperm injection technique. *Biotechnology*, 6(3); 373-382.

- Rath, D., Niemann, H., Tao, T. and Boerjan, M. 1995. Ratio and number of inner cell mass and trophoblast cells of in vitro and in vivo produced porcine embryos. *Theriogenology*, 43(1); 304.
- Rexroad, C. Jr and Powell, A. 1988. Co-culture of ovine ova with oviductal cells in medium 199. *J Aim Sci*, 66; 947-953.
- Richard, F.J. and Sirard, M.-A. 1996. Effects of Follicular Cells on Oocyte Maturation. I: Effects of Follicular Hemisections on Bovine Oocyte Maturation In Vitro. *Biology of Reproduction*, 54; 16-21.
- Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., de la Fuente, J., Boland, M. and Lonergan, P. 2003. Bovine Embryo Culture in the Presence or Absence of Serum: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Messenger RNA Expression. *Biology of Reproduction*, 68; 236-243.
- Rizos, D., Ward, F., Boland, M.P. and Lonergan, P. 2001. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology*, 56; 1-16.
- Roberts, R., Franks, S. and Hardy, K. 2002. Culture environment modulates maturation and metabolism of human oocytes. *Human Reproduction*, 17(11); 2950–2956.
- Rodriguez-Dorta, N., Cognié, Y., González, F., Poulin, N., Guignot, F., Touzé, J.L., Baril, G., Cabrera, F., Álamo, D., Batista, M., Gracia, A. and Mermillod, P. 2007. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. *Theriogenology*, 68; 908-913.
- Romaguera, R., Casvaryans analisis, A., Morato, R., Izquierdo, D., Catala, M., Jimenez-Macedo, A.R., Mogas, T. and Paramio, M.T. 2010. Effect of follicle diameter on oocyte apoptosis, embryo development and chromosomal ploidy in prepubertal goats. *Theriogenology*, 74; 363-373.
- Romar, R., Coy, P., Campos, I., Gadea, J., Matas, C. and Ruiz, S. 2001. Effect of co-culture of porcine sperm and oocytes with porcine oviductal epithelial cells on in vitro fertilization. *Animal Reproduction Science*, 68; 85-98.
- Romero-Arredondo, R. and Jr, G.E.S. 1996. Effects of follicular fluid during in vitro maturation of bovine oocytes on in vitro fertilization and early embryonic development. *Biol. Reprod.*, 55; 1012-1016.
- Rosenkrans, C.F., Zeng, G.Q., Mc Namara, G.T., Schoff, P.K. and First, N.L. 1993. Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*, 49; 459-462.
- Sagirkaya, H., Yagmur, M., Nur, Z. and Soylu, M.K. 2004. Replacement of Fetal Calf Serum with Synthetic Serum Substitute in the In Vitro Maturation Medium: Effects on Maturation, Fertilization and Subsequent Development of Cattle Oocytes In Vitro. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28; 779-784.
- Salehi, P., Spratlin, J., Chong, T.-F. and Churchill, T.A. 2004. Beneficial effects of supplemental buffer and substrate on energy metabolism during small bowel storage. *Cryobiology*, 48; 245-253.
- Salicioni, A.M., Platt, M.D., Wertheimer, E.V., Arcelay, E., Allaire, A., Sosnik, J. and Visconti, P.E. 2007. Signalling pathways involved in sperm capacitation. In E.R.S.a.G.M. Roldan, ed. *Spermatology*. Nottingham, England: Nottingham University Press. 245.

- Samake, S., Amoah, E.A., Mobini, S., Gazal, O. and Gelaye, S. 2000. In vitro fertilization of goat oocytes during the non-breeding season. *Small Ruminant Research*, 35; 49-54.
- Samardzija, M., Karadjole, M., Getz, I., Makek, Z., Cergolj, M. and Dobranic, T. 2006. Effects of bovine spermatozoa preparation on embryonic development in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 4; 58.
- Sato, E. and Ishibasi, T. 1977. Meiotic arresting action of the substance obtained from cell surface of porcine ovarian granulosa cells. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 48(1); 22-26.
- Seefeld, K. and Linder, E. 2007. *Statistics using R with biological examples*. Durham: University of New Hampshire.
- Shi, L., Yue, W., Zhang, J., Lv, L., Ren, Y. and Yana, P. 2009. Effect of ovarian cortex cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. *Animal Reproduction Science*, 113; 299–304.
- Silva, J.R.V., Hurkb, R.V.D., Costa, S.H.F., Andrade, E.R., Nunes, A.P.A., Ferreira, F.V.A., Lôbo, R.N.B. and Figueiredo, J.R. 2004. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, 81; 273–286.
- Silva, J.R.V., Lucci, C.M., Carvalho, F.C.A., Biio, S.N., Costa, S.H.F., Santos, R.R. and Figueiredo, J.R. 2000. Effect of coconut water and braun-collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in vitro. *Thenogenology*, 54; 809-822.
- Sinclair, K.D., McEvoy, T.G., Carolan, C., Maxfield, E.K., Maltin, C.A., Young, L.E., Wilmut, I., Robinson, J.J. and Broadbent, P.J. 1998. Conceptus growth and development following in vitro culture of ovine embryos in media supplemented with bovine sera. *Theriogenology*, 49; 218.
- Sirard, M.A. and Bilodeau, S. 1990. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes in vitro. *Biology of Reproduction*, 43; 777-783.
- Sirard, M.A. and Blondin, P. 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*, 42; 417-426.
- Smith, T.T. 1998. he modulation of sperm function by the oviductal epithelium. *Biol. Reprod.*, 58; 1102-1104.
- Soto, P., Natzke, R.P. and Hansen, P.J. 2003. Identification of Possible Mediators of Embryonic Mortality Caused by Mastitis: Actions of Lipopolysaccharide, Prostaglandin F₂ α , and the Nitric Oxide Generator, Sodium Nitroprusside Dihydrate, on Oocyte Maturation and Embryonic Development in Cattle. *American Journal of Reproductive Immunology*, 50; 263-272.
- Sudano, M.J., Paschoal, D.M., Rascado, T.S., Magalhaes, L.C.O., Crocomo, L.F., de Lima-Neto, J.F. and Landim-Alvarenga, F.C. 2011. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, 75; 1211-1220.
- Suthar, V.S. and Shah, R.G. 2009. Bovine In vitro Embryo Production : An Overview. *Veterinary World*, 2(12); 478-479.
- Tavares, L.M.T., Feitosa, W.B., Mello, M.R.B., Nicácio, A.C., Lima, A.S., Assumpção, M.E.O.A. and Visintin, J.A. 2008. Is the early reduction of fetal calf serum

- concentration in bovine in vitro embryo culture beneficial? *Animal Reproduction Science*, 5; 34-38.
- Thibodeaux, J.K., Myers, W., Goodeaux, L.L., Ménézo, Y., Roussel, J.D., Broussard, R. and Godke, R.A. 1992. Evaluating an in vitro Culture System of Bovine Uterine and Oviduct Epithelial Cells for Subsequent Embryo Co-culture. *Reproduction, Fertility and Development*, 4; 573-583.
- Thompson, J.G. 1996. Defining the requirements for bovine embriyo culture. *Theriogenology*, 45; 27-40.
- Thompson, J.G. 2000. In vitro culture and embriyo metabolism of cattle and sheep embriyos - a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, (60-61); 263-275.
- Thompson, J.G., Allen, N., McGowan, L.T., Bell, A.C.S., Lambert, M.G. and Tervit, H.R. 1998. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology*, 49; 1239-1249.
- Thompson, J.G., Gardner, D.K., Pugh, P.A., McMillan, W.H. and Tervit, H.R. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biology of Reproduction*, 53; 1385-1391.
- Totey, S.M., Paeshe, C.H. and Singh, G.P. 1993. Effects of bull and heparin, and sperm concentration on in vitro fertilization of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 39; 887-898.
- Tremoleda, J.L., Tharasanit, T., Van Tol, H.T.A., Stout, T.A.E., Colenbrander, B. and Bevers, M.M. 2003. Effects of follicular cells and FSH on the resumption of meiosis in equine oocytes matured in vitro. *Reproduction*, 125; 565-577.
- Tucker, K.E. and Jansen, C.A.M. 2002. Sperm separation techniques: comparison and evaluation of gradient products. In R.a.M.D. Basuray, ed. *Proceedings 2nd International workshop for Embriyologists: Troubleshooting Activities in the ART lab*.
- Underwood, M.A., Gilbert, W.M. and Sherman, M.P. 2005. Amniotic Fluid: Not Just Fetal Urine Anymore. *J. perinatol.*, 25; 341-348.
- van Soom, A., Ysebaert, M.T. and de Kruif, A. 1997. Relationship between timing of development, morula morphology, and cell allocation to inner cell mass and trophoctoderm in in vitro-produced bovine embryos. *Mol. Teprod. Dev.*, 47(1); 47-56.
- Vanderhyden, B.C. and Armstrong, D.T. 1989. Role of Cumulus Cells and Serum on the In Vitro Maturation, Fertilization, and Subsequent Development of Rat Oocytes. *Biology of Reproduction*, 40(4); 720-728.
- Vanderhyden, B.C., Telfer, E.E. and Eppig, J.J. 1992. Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biology of Reproduction*, 46(6); 1196-1204.
- Viuff, D., Rickords, L., Offenbergh, H., Hyttel, P., Avery, B., Greve, T., Olsaker, I., Williams, J.L., Callesen, H. and Thomsen, P.D. 1999. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. *Biol. Reprod.*, 60; 1273-1278.

- Wang, S., Liu, Y., Holyoak, G.R. and Bunch, T.D. 1997. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M 199 media. *Animal Reproduction Science*, 48; 37-45.
- Wang, Y.S., Zhao, X., Su, J.M., An, Z.X., Xiong, X.R., Wang, L.J., Liu, J., Quan, F.S., Hua, S. and Zhang, Y. 2011. Lowering storage temperature during ovary transport is beneficial to the developmental competence of bovine oocytes used for somatic cell nuclear transfer. *Animal Reproduction Science*, 124; 48-54.
- Wani, N.A., Wani, G.M., Khan, M.Z. and Salahudin, S. 2000. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Ruminant Research*, 36; 63-67.
- Watson, A.J. 2007. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*, 85; E1-E3.
- Wen, X., Li, D., Tozer, A.J., Docherty, S.M. and Iles, R.K. 2010. Estradiol, progesterone, testosterone profiles in human follicular fluid and cultured granulosa cells from luteinized pre-ovulatory follicles. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8; 117-126.
- Wolf, C.A., Brass, K.E., Rubin, M.I.B., Pozzobon, S.E., Mozzaquatro, F.D. and de la Corte, F.D. 2008. The effect of sperm selection by Percoll or swim up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. *Journal of Animal Reproduction*, 5(3-4); 110-115.
- Wongsrikeao, P., Otoi, T., Karja, N.W.K., Agung, B., Nii, M. and Nagai, T. 2005. Effects of Ovary Storage Time and Temperature on DNA Fragmentation and Development of Porcine Oocytes. *J. Reprod. Dev.*, 51; 87-97.
- Wright, R.W.J. and Bondioli, K.R. 1981. Aspects of in vitro fertilization and embryo culture in domestic animal. *Journal of Animal Science*, 53; 702-729.
- Yadav, P.S., Saini, A., Kumar, A. and Jain, G.C. 1998. Effect of oviductal cell co-culture on cleavage and development of buffalo IVF embryos. *Animal Reproduction Science*, 51(4); 301-306.
- Yang, M.Y. and Rajamahendran, R. 2002. Expression of Bcl-2 and Bax proteins in relation to quality of bovine oocytes and embryos produced in vitro. *Animal Reproduction Science*, 70; 159-169.
- Young, L.E., Sinclair, K.D. and Wilmut, I. 1998. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*, 3; 155-163.
- Younis, A.I., Zuelke, K.A., Harper, K.M., Oliveira, M.A.L. and Brackett, B.G. 1991. In vitro fertilization of goat oocyte. *Biology of Reproduction*, 44; 1177-1182.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Shahram BOHLOOLI
Doğum Yeri : İran - Ardebil
Doğum Tarihi : 22/06/1977
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Farabi Lisesi (1995)
Lisans : Rasht İslami Azad Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü (2000)
Yüksek Lisans: Giulan Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü (2006)

Yayınlar (Hakemli Dergiler)

- Bohlooli, Sh.**, Bozoğlu, Ş., Cedden, F. 20015. Effect of different harvesting techniques on recovery and quality of cattle cumulus oocyte complex. Iranian J. Appl. Anim. Sci. 5(3), 741-744.
- Bozoğlu, Ş., Cedden, F., **Bohlooli, Sh.** 2013. Effect of vaginal administration of PGE1 on reproductive traits in non-seasonal Ak Keçi's does. International Journal of Engineering and Applied sciences, 2(1), 23-26.
- Najafi, G., Cedden, F., Kohram, H., Sulu, N., Dellal, G., **Bohlooli, Sh.** 2012. Effect of Various Doses of PMSG Administrations on Reproductive Performance in Ghezel Sheep of Iran, Annals of Biological Research, 3, 7, 3300-3304.
- Bohlooli, Sh.**, Cedden, F., Pishjang, J., Rezzaghzadeh, S. and Bozoğlu, Ş. 2012. The Effect of Different Extenders on Post-thaw Sperm Viability, Motility and Membrane Integrity in Cryopreserved Semen of Zandi Ram, J. Basic. Appl. Sci. Res., 2,2, 1120-1123(2012).
- Bohlooli, Sh.**, Cedden, F., Bozoğlu, Ş., Rezzaghzadeh, S. and Pishjang, J., Correlation between Conventional Sperm Assay Parameters in Cryopreserved Ram Semen, Annals of Biological Research, 3,2, 884-889(2012).