

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ A.D.

Kriyoprezervasyonun Yardımcı Üreme Teknikleriyle Elde Edilen
Büyükbaş Hayvan Embriyoları Üzerine Etkilerinin
Histolojik Yöntemlerle İncelenmesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
UZMANLIK TEZİ

Dr. Türker ÇAVUŞOĞLU

İZMİR

2012

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ A.D.

Kriyoprezervasyonun Yardımcı Üreme Teknikleriyle Elde Edilen
Büyükbaş Hayvan Embriyoları Üzerine Etkilerinin
Histolojik Yöntemlerle İncelenmesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
UZMANLIK TEZİ

Dr. Türker ÇAVUŞOĞLU

Danışman Öğretim Üyesi

Doç.Dr. Utku ATEŞ

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
KISALTMALAR	III
TABLolar	VII
ŞEKİLLER.....	VIII
GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM - I	2
1.1. OVER GELİŞİMİ VE YAPISI	2
1.2. FOLİKÜLOGENEZ	3
1.3. OOGENEZ.....	6
1.4. TESTİS GELİŞİMİ VE YAPISI.....	7
1.5. SPERMATOGENEZ.....	9
1.6. FERTİLİZASYON.....	11
1.7. İNFERTİLİTE VE NEDENLERİ.....	16
1.7.1. İnfertilite.....	16
1.7.2. İnfertilite Nedenleri.....	18
1.8. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ.....	19
1.8.1. Tarihçesi	19
1.8.2. Endikasyonları ve Uygulanan Teknikler.....	20
1.8.2.1. İntrauterin İnseminasyon (IUI)	21
1.8.2.2. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)	23
1.8.2.2.1. Kontrollü Overyan Hiperstimülasyon (KOH) ve hCG Uygulaması.....	24
1.8.2.2.2. Oosit Toplama İşlemi (OPU).....	25
1.8.2.2.3. Oosit Morfolojisi ve Maturasyonunun Değerlendirilmesi.....	26
1.8.2.2.4. Oosit Maturasyonunda Kullanılan Mediumlar.....	29
1.8.2.2.5. İn Vitro Maturasyon (IVM) İşlemi.....	30
1.8.2.2.6. Semen Özellikleri Ve Semen Analizinde Terminoloji	31

1.8.2.2.6.1. Semen	31
1.8.2.2.6.2. Normal Semen Parametreleri	31
1.8.2.2.6.3. Semen Analizinde Terminoloji	32
1.8.2.2.7. Semen Örneğinin Toplanması.....	32
1.8.2.2.8. Sperm Hazırlama Yöntemleri.....	33
1.8.2.2.8.1. Basit Yıkama Yöntemi.....	34
1.8.2.2.8.2. Swim-down Yöntemi.....	34
1.8.2.2.8.3. Swim-up Yöntemi.....	34
1.8.2.2.8.4. Gradient Yöntemi.....	35
1.8.2.2.8.5. Filtrasyon Yöntemi.....	35
1.8.2.2.9. İn Vitro Fertilizasyon Uygulaması Ve Embriyo Gelişimi.....	36
1.8.2.3. Zona Drilling (ZD) ve Parsiyel Zona Disseksiyonu (PZD)	38
1.8.2.4. Subzonal İnseminasyon (SUZI)	39
1.8.2.5. İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)	39
1.8.2.6. Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi ve Embriyo Transferi.....	42
1.8.2.6.1. Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi.....	42
1.8.2.6.2. Embriyo Transferi (ET).....	44
1.8.2.7. Kriyoprezervasyon Ve Kriyoprotektanlar	45
1.8.2.7.1. Embriyo Kriyoprezervasyonu.....	46
1.8.2.7.2. Kriyoprezervasyon Yöntemleri.....	48
1.8.2.7.2.1. Geleneksel Yavaş Dondurma (Slow Freezing).....	48
1.8.2.7.2.2. Vitrifikasyon Yöntemi.....	50
1.8.2.7.2.3. Hızlı Dondurma Yöntemi.....	51
1.8.2.7.3. Çözdürme İşlemi.....	51
BÖLÜM – II.....	52
GEREÇ VE YÖNTEM.....	52
2.1. DENEYSEL GEREÇ VE YÖNTEM.....	52
2.1.1. Deneysel Gereç ve Malzemeler.....	52
2.1.2. Deneysel Yöntem.....	53
2.1.2.1. Oositlerin Eldesi	55
2.1.2.2. Oositlerin İn Vitro Maturasyonu.....	57
2.1.2.3. Spermilerin Hazırlanması.....	58
2.1.2.4. Oositlerin İn Vitro Fertilizasyonu	60
2.1.2.5. Embriyoların İn Vitro Kültürü	61

2.1.2.6. Embriyoların Kriyoprezervasyonu.....	61
2.1.2.6.1. Slow Freezing Yöntemi.....	61
2.1.2.6.2. Vitrifikasyon Yöntemi.....	62
2.1.2.7. Embriyoların Çözdürülmesi	64
2.2. MİKROSKOPİK GEREÇ VE YÖNTEM.....	65
2.2.1. Işık Mikroskop Gereç Ve Yöntem.....	65
2.2.1.1. Işık Mikroskobik Gereç.....	65
2.2.1.2. Işık Mikroskobik Yöntem.....	65
2.2.1.2.1. Boyama.....	65
2.2.1.2.1.1. Toluidine Blue Boyama.....	65
2.2.1.2.1.2. AzurII- Metilen Blue –Basic Fuksin Boyama.....	66
2.2.2. Elektron Mikroskobik Gereç ve Yöntem.....	67
2.2.2.1. Elektron Mikroskobik Gereç.....	67
2.2.2.2. Tampon ve Fiksatifler.....	68
2.2.2.2.1. 0,2 M Cacodylate Tamponu.....	68
2.2.2.2.2. Fiksatifler	68
2.2.2.3. Elektron Mikroskobik Yöntem.....	69
2.2.2.3.1. Fiksasyon.....	69
2.2.2.3.2. Dehidratasyon	69
2.2.2.3.3. Gömme	70
2.2.2.3.4. Kesit Alma.....	70
2.2.2.3.5. Boyama.....	70
2.2.2.3.5.1. Uranil Asetat Hazırlanması.....	70
2.2.2.3.5.2. Kurşun Boyası Hazırlanması.....	71
2.2.2.3.5.3. Kesitlerin Uranil Asetat İle Boyanması.....	71
2.2.2.3.5.4. Kesitlerin Kurşun İle Boyanması.....	71
2.2.3. Floresan Mikroskop Gereç Ve Yöntem.....	72
2.2.3.1. Floresan Mikroskobik Gereç.....	72
2.2.3.2. Floresan Mikroskobik Yöntem.....	72
2.2.3.2.1. Solüsyonların Hazırlanması.....	72
2.2.3.2.2. Boyama.....	73
2.2.4. Konfokal Mikroskop Gereç ve Yöntem.....	75
2.2.4.1. Konfokal Mikroskop Gereç.....	75
2.2.4.2. Konfokal Mikroskop Yöntem.....	76

2.2.4.2.1. Yolanda Bloklama Solüsyonunun Hazırlanışı.....	76
2.2.4.2.2. Boyama.....	77
2.3. İSTATİKSEL YÖNTEM.....	78
BÖLÜM-III.....	79
BULGULAR.....	79
3.1. Oosit Aspirasyon ve IVM Bulguları.....	79
3.2. İn Vitro Kültür Ve Kriyoprezervasyon Bulguları.....	79
3.3. Işık Mikroskop Bulguları.....	80
3.4. Transmisyon Elektron Mikroskop Bulguları.....	88
3.5. Floresan Mikroskop Bulguları.....	99
3.6. Konfokal Mikroskop Bulguları.....	100
3.7. İstatiksel Bulgular.....	105
BÖLÜM- IV.....	106
TARTIŞMA	106
BÖLÜM-V.....	118
SONUÇ.....	118
BÖLÜM-VI.....	120
ÖZET	120
ABSTRACT	122
BÖLÜM-VII.....	124
KAYNAKLAR	124
ÖZGEÇMİŞ	140

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, her zaman desteğini yanımda hissettiğim, kişiliğini ve vizyonunu örnek aldığım, değerli hocam, sevgili ağabeyim Doç.Dr. Utku Ateş'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özgür ve demokratik bir Anabilim Dalında eğitim almamıza imkan sağlayan, sorumlu olduğu tüm öğrencilerine şefkatli, adaletli ve eşit mesafede olduğuna inandığım Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof.Dr. Ayşegül Uysal'a, teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince tecrübelerinden yararlandığım, bilgisi ve yön göstericiliği ile bizlere örnek olan, hayata diklenmeden dik durulabileceğini öğreten değerli hocam Prof.Dr. Meral Baka'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince her konuda yardımcı olan, konfokal mikroskop incelemelerini gerçekleştirmek için yapmış olduğum yolculukta tüm korkularına rağmen 3 saatlik uçak yolculuğuna katlanarak bana eşlik eden Doç.Dr. Yiğit Uyanıkgil'e yaşatmış olduğum sıkıntılardan dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca deneyimlerini benimle paylaşan Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri, eğitim sorumlum Doç.Dr. Gülperi Öktem'e, Doç Dr.Altuğ Yavaşoğlu'na ve Doç.Dr.Hüseyin Aktuğ'a teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte çalıştığımız süre boyunca aynı odayı paylaştığımız, Dr.Şirin Baktı Demiray'a, Dr. Fatih Oltulu'ya, uzmanımız Dr.Özlem Yılmaz Dilsiz'e, başta sevgili dostum Erdinç Yılmaz olmak üzere laboratuvarımızda görevli Sevim Balkız'a, Belgin Terzi'ye ve Anabilim Dalımızda görevli tüm çalışanlarımıza teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında laboratuvarlarından ve deneyimlerinden yararlandığım, başta sevgili ağabeyim Tuna Güngör olmak üzere Ludwig Maximilians Üniversitesi Moleküler Hayvan Araştırmaları ve Bioteknoloji Enstitüsünde görevli değerli bilim insanları, Dr. Mryem Reichenbach'a, Jens Popken'e, Doç.Dr.Valeri Zakhartchenko'ya ve enstitü müdürü Prof.Dr.Bernhard Aigner'e teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Tez çalışmamda, elektron mikroskop incelemeleri sırasında desteklerini aldığım Gülhane Askeri Tıp Akademisi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Hava Tabib Albay Prof.Dr. Emin Öztaş'a teşekkürlerimi sunarım.

Beni yetiştirip bugünlere gelmemi sağlayan her zaman kalbimde yaşattığım anneme, babama, en zor anlarımda hep yanımda olan ağabeyim Dr.İbrahim avuşoğlu ve kardeşim Gözde avuşoğlu'na hüznü ve kederi yaşamımdan silip atan hudutsuz sevdam, yoldaşım, sevgili eşim Dr.Gülhan avuşoğlu'na, hayatımızın anlamı, evimizin neşesi oğlum Poyraz'a ve ailemize yeni katılacak olan kızım Leylim'e teşekkür ederim, iyi ki varsınız ve benimsiniz.

Dr. Türker AVUőOėLU

KISALTMALAR

AL: Annulat Lamel

AMH: Anti-Müllerian Hormon

BMP: Bone Morphogenetic Protein

BSA: Bovin Serum Albumin

BO Medium: Brackett-Oliphant Medium

BWW Medium: Biggers-Whitten-Whittingham Medium

cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

CCC: Kümüls Korona Kompleksi

CSF: Sitostatik Faktör

DAPI: 4',6-diamidin-2-fenilidin

DER: Düz Endoplazmik Retikulum

DM: Dilüsyon Medium

DMA: Dimetilasetamid

DMSO: Dimetilsülfoksit

EG: Etilen Glikol

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

FCS: Fetal Calf Serum

FGF: Fibroblast Growth Faktörü

FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon

GDF: Büyüme Farklanma Faktörü

GER: Granüllü Endoplazmik Retikulum

GnRH: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

GVBD: Germinal Vezikül Yıkılımı

hCG: İnsan Koryonik Gonadotropin

HFF: İnsan Foliküler Sıvı

HM: Holding Medium

HPF: İnsan Peritoneal Sıvı

ICM: Inner Cell Mass (iç hücre kitlesi)

ICSI : Intra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu

IVF: İn Vitro Fertilizasyon

IVM: İn Vitro Maturasyon

KGF: Keratinosit Büyüme Faktörü

KOH: Kontrollü Overyan Hiperstimülasyon

KRB Medium: Krebs Ringer bikarbonat Medium

LH: Luteinize Edici Hormon

LIF: Leukemia İnhibe edici Faktör

mDM: Modify Defined Medium

MESA: Mikrocerrahi Epididimal Sperm Aspirasyonu

MPF: Maturasyon Promoting Faktör

NoBox : Newborn Ovary Homeobox Geni

NPC: Nuklear Por Kompleksi

OAF: Oosit Aktivasyon Faktörü

OCS: Östrus İnek Serumı

OHSS: Overyan Hiperstimölasyon Sendromu

Oİ + IUI: Ovulasyon İndüksiyonu+İntrauterin İnseminasyon

OPS: Open Pulled Straw

OPU: Oosit Toplama İşlemi

PBS: Tuzlu FosfatTamponu

PESA: Perkütan Sperm Aspirasyonu

PGH: Primordiyal Germ Hücresi

PGT: Preimplantasyon Genetik Tanı

PMSG: Gebe Kısırak Serum Gonadotropini

PROH: Propilen Glikol

PVP: Poli Vinil Piroolidon

PZD: Parsiyel Zona Diseksiyonu

SF-1: Steriyodogenik Faktör- 1

SOF: Sentetik Ovidük Sıvısı

SUZI: Subzonal Sperm İnjesiyonu

TALP: Tyrode's Laktat

TCM-199: Tissue Cell Medium-199

TDF: Testis Belirleyici Faktör

TE: Trofoektoderm

TEM: Transmisyon Elektron Mikroskobu

TET: Tubal Embriyo Transferi

TESA: Testiküler Sperm Aspirasyonu

TESE: Testiküler Sperm Ekstraksiyonu

TGF- β : Transforme Edici büyüme Faktörü- Beta

TVUSG: Transvaginal Ultrasonografi

TYB Medium: TEST-Yolk Buffer Medium

WT-1: Wilms tümör geni-1

VM: Vitrifikasyon Medium

WHO: World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

YBB: Yolanda Bloklama Tamponu

YÜT: Yardımcı Üreme Teknikleri

ZD: Zona Drilling

ZP: Zona Pellusida

TABLolar

Tablo 1: İnfertilite Etiyolojilerinin Relatif Prevalansı.....	17
Tablo 2: KümüLüs korona kompleksine Göre Oosit Maturasyon Sınıflaması	27
Tablo 3: Oosit maturasyonunun Çevre Hücrelerle Birlikte Değerlendirilmesi.....	29
Tablo 4: 1999 ve 2010 WHO kriterlerine göre normal semen parametreleri.....	32
Tablo 5: ICSI Endikasyonları.....	40
Tablo 6: Farklı evredeki embriyoların değerlendirme parametreleri.....	42
Tablo 7: Fragmentasyon oranları ve blastomer büyüklüğüne göre embriyo kalitesinin sınıflaması.....	43
Tablo 8: Fragmentasyon oranlarına göre embriyo kalite sınıflaması.....	44
Tablo 9: Hücre membranından geçebilme özelliklerine göre kriyoprotektan çeşitleri.....	46
Tablo 10: Çalışmada kullanılan over ve oosit sayıları. Maturasyon ve over başına düşen oosit oranı.....	79
Tablo 11: Matür Oositlerin Fertilizasyon Sonrası Bölünme Oranı.....	80

ŞEKİLLER

Şekil 1: Over kesitinin şematik çizimi.....	5
Şekil 2: Spermatogoniumdan spermatozoon oluşuncaya kadar geçen dönemler.....	10
Şekil 3: Sperm başının bileşenleri.....	14
Şekil 4: Sperm başının bileşenleri.....	22
Şekil 5: İnek ovaryum dokusunun laboratuara transferi foliküler aspirasyon ve oosit eldesi.....	57
Şekil 6: Over folikül aspirasyonu sonrası maturasyon işlemine alınan oositler.....	57
Şekil 7: Sperm hazırlanması ve inseminasyon işlemi.....	59
Şekil 8: Slow Freezing yönteminin uygulanması.....	62
Şekil 9: Vitrifikasyon yönteminin uygulanması.....	64
Şekil 10: Floresan Boyalar, takip ve kullanılan bilgisayar yazılımı.....	74
Şekil 11: . Axiovert 200M model Floresan mikroskop ve analiz sırasındaki görünüm.....	75
Şekil 12: Konfokal mikroskopi için hazırlık, boyama ve kapatma işlemleri.....	76
Şekil 13: . Leica TCs SP5 model konfokal mikroskopta görüntü eldesi.....	78
Şekil 14: İki hücreli inek embriyosu (X20-40 Büyütme)	81
Şekil 15: Dört hücreli inek embriyosu (X20-40 Büyütme).....	82
Şekil 16: İnek blastosistlerinin görünümü (X100 Büyütme).....	82
Şekil 17: Slow Freezing solüsyonu içindeki embriyoların görünümü(X40-100 Büyütme).	83
Şekil 18: Vitrifikasyon solüsyonu içindeki embriyoların görünümü (X40-100 Büyütme)..	83
Şekil 19: Slow Freezing işlemi sonrası çözündürülen embriyoların görünümü (X10-20-40 büyütme)	84

Şekil 20: Vitrifikasyon işlemi sonrası çözündürülen embriyoların görünümü (X20-40 büyütme).....	84
Şekil 21: Slow Freezing işlemi sonrası çözündürülüp blastosist aşamasına gitmeyen embriyoların görünümü (X20-40 büyütme).....	85
Şekil 22: Vitrifikasyon işlemi sonrası çözündürülüp blastosist aşamasına gitmeyen embriyoların görünümü (X10-20-40 büyütme).....	85
Şekil 23: Toluidin Blue ile boyalı kontrol ve çalışma gruplarına ait embriyoların görünümleri.....	87
Şekil 24: Azur II- Metilen blue- Basic fuksin ile boyalı kontrol ve çalışma gruplarına ait embriyoların görünümleri.....	87
Şekil 25: Kontrol grubuna ait TEM Görüntüsü.....	89
Şekil 26: Kontrol grubuna ait TEM Görüntüsü.....	90
Şekil 27: Kontrol grubuna ait TEM Görüntüsü.....	90
Şekil 28: Kontrol grubuna ait TEM Görüntüsü.....	91
Şekil 29: Kontrol grubuna ait TEM Görüntüsü.....	91
Şekil 30: Slow freezing grubu TEM görüntüsü.....	93
Şekil 31: Slow freezing grubu TEM görüntüsü.....	93
Şekil 32: Slow freezing grubu TEM görüntüsü.....	94
Şekil 33: Slow freezing grubu TEM görüntüsü.....	94
Şekil 34: Slow freezing grubu TEM görüntüsü.....	95
Şekil 35: Vitrifikasyon grubu TEM görüntüsü.....	96

Şekil 36: Vitrifikasyon grubu TEM görüntüsü.....	97
Şekil 37: Vitrifikasyon grubu TEM görüntüsü:.....	97
Şekil 38: Vitrifikasyon grubu TEM görüntüsü.....	98
Şekil 39: Vitrifikasyon grubu TEM görüntüsü.....	98
Şekil 40: Çalışma gruplarının Hoescht, PI ile floresan boyanmaları.....	99
Şekil 41: Blastosistlerin Hoescht, PI ile floresan boyanmaları.....	100
Şekil 42: Çalışma gruplarına ait tübülün ve aktin ile floresan boyalı preparatların konfokal mikroskopta görünümü.....	103
Şekil 43: Çalışma gruplarına ait tübülün ve aktin ile floresan boyalı preparatların konfokal mikroskopta Z eksenini boyunca tarama modülünde görünümü.....	104
Şekil 44: 4 hücreli büyükbaş hayvan embriyolarında kriyoprezervasyonun ZP kalınlığı üzerine etkisinin çalışma grupları arasında karşılaştırılması.....	105

GİRİŞ VE AMAÇ

Yardımcı üreme teknikleri içerisinde birçok tekniği barındıran, infertil çiftlere canlı doğum sonucu sağlıklı bebek sahibi olabilme şansı sağlamak amacıyla klinik uygulamalarda kullanımı giderek artan tekniklerdir. İn vitro şartlarda embriyo üretimiyle, insanlarda reproduktif sorunların çözümüne yardımcı olunabildiği gibi yüksek verim kabiliyetine sahip hayvan ırklarının devamlılığı da sağlanabilmektedir. Reprodüktif biyoteknolojilerin hayvancılık sektöründe uygulanmaya başlanmasıyla hayvan ıslahı amacıyla üremenin düzenlenmesi, denetlenmesi, planlı bir şekilde yönlendirilmesi ve ülkelerin gereksinimlerine paralel üretim planlaması yapılabilmektedir.

Bununla birlikte özellikle atık materyal olan mezbaha kaynaklı oositlerin yardımcı üreme tekniklerinde kullanılmaya başlanmasıyla, bunlardan in vitro şartlarda embriyo elde edilmesi ve elde edilen embriyoların dondurularak saklanabilir olması, araştırmacıların konuya olan ilgisini artırmakta ve çok sayıda çalışmanın yapılmasına sebep olmaktadır. İnsan materyaliyle çalışılması yasak olan bu tür araştırmalar, in vivo incelenmesi çok güç olan oosit ve erken dönem embriyoların gelişimleri için gerekli şartların öğrenilmesi, gen transferi ve klonlama gibi ileri tekniklerdeki bilinmezlerin aydınlatılması ve bu alanlarda ilerleme kaydedilmesi konusunda önemli katkılar sağlamaktadırlar.

Özellikle son yıllarda klinik uygulamalarda, transfer edilen embriyo sayısına getirilen kısıtlamalar infertil çiftlerden yardımcı üreme teknikleriyle elde edilen fazla sayıdaki embriyoların sağlıklı bir şekilde saklanabilmesi amacıyla araştırmacıları yeni araştırmalar yapmaya yöneltmiştir. Bu çalışmalarda embriyoların dondurulması ve kullanım aşamasında çözdürüldükten sonra canlılıklarını kaybetmeden korunmalarını sağlayacak yeni tekniklerin geliştirilmesi hedeflenmiştir. İlk defa 1972 yılında Whittingham tarafından fare embriyolarında uygulanan, ilerleyen yıllarda diğer hayvan türleri ve insanlarda uygulanmaya başlanan embriyo kriyoprezervasyonu yöntemleri, yardımcı üreme tekniklerinin bir parçası olup in vitro şartlarda elde edilen çok sayıda embriyonun sağlıklı bir şekilde saklanması ve gerektiğinde kullanıma hazır olabilmesi için vazgeçilmez bir teknik halini almıştır (1).

Değişik hayvan türleri ve insanlarda, farklı kriyoprezervasyon yöntemleri ve kriyoprotektanlar kullanılarak yapılan çalışmalarda genellikle embriyoların daha uzun süreler dejenere olmadan saklanabilmesi ve nakiller sonucunda daha yüksek bir fertilite oranı elde edilmesi hedeflenmektedir.

Ancak yöntemden yönteme değişen, kriyoprotektanlara maruz kalma süreleri ve onların toksisite düzeylerindeki farklılıklar ile uygulanan ısı ve dondurma-çözme hızlarındaki farklılıklar nedeniyle, kriyoprezervasyon teknikleri embriyo yapılarında farklı sonuçlara sebep olmaktadır.

Kriyoprezervasyon işlemi sırasında kriyoprotektanların toksik etkilerine, donma ve çözme sırasında oluşabilen buz kristallerine bağlı olarak embriyoların, ZP'sinde kırılma, hücre membranları ve hücre iskeletinde hasar meydana gelebilmektedir (2,3). Bu durum hücrenin metabolik fonksiyonlarının aksamasına, Apoptoz ve Nekrozla hücrenin ölümüne yol açabilmekte ve çözünme sonrası embriyoların kültürüne devam edilmesi durumunda ise istenilen başarıya ulaşılamamaktadır (2,4).

Bu çalışmada kriyoprezervasyonun yardımcı üreme teknikleriyle elde edilen büyükbaş hayvan embriyoları üzerine etkilerinin histolojik yöntemlerle incelenmesi hedeflenmektedir.

BÖLÜM-I

1.1.OVER GELİŞİMİ VE YAPISI

Gonadlar (testisler ve overler) posteriyor karın duvarını döşeyen sölom epiteli bunun altındaki mezenşim ve primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç kaynaktan köken alarak gelişirler. Epiblasttan köken alan ve primitif hat boyunca göç eden primordiyal germ hücreleri gelişimin 5. haftasında primitif gonadlara ulaşırlar. Bu hücreler gonadal sırtlara ulaşamazsa gonadlar gelişemezler. Gonad gelişiminin ilk aşamaları, 5. haftada ortaya çıkar ve mezonefrozun mediyalinde, sölom epitelinde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin çoğalımıyla, mezonefrozun mediyalinde gonadal kabarıklık (gonadal ridge veya taslakları) oluşur (5). Epitel hücreleri proliferasyon olarak mezenşim içine gömülürler ve primitif seks kordonları denilen düzensiz kordonları oluştururlar. 6. haftada primordiyal germ hücreleri mezenşim içine girer ve primer seks kordonları ile birleşirler. Erkek ve dişi gonadlardaki farklılaşma 7. haftaya kadar başlamaz. Bu evredeki gonada farklılaşmamış gonad denir. XX cinsiyet kromozomlarına sahip dişi embriyolarda primitif seks kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılırlar. Bu hücre kümeleri bir süre sonra kaybolarak yerlerini vasküler bir stromaya (ovariyan medulla) bırakırlar. Dişi gonadın yüzey epiteli proliferasyon olmaya devam eder ve 7. haftada bu epitelden kortikal kordonlar gelişir ve medüller kordonlar

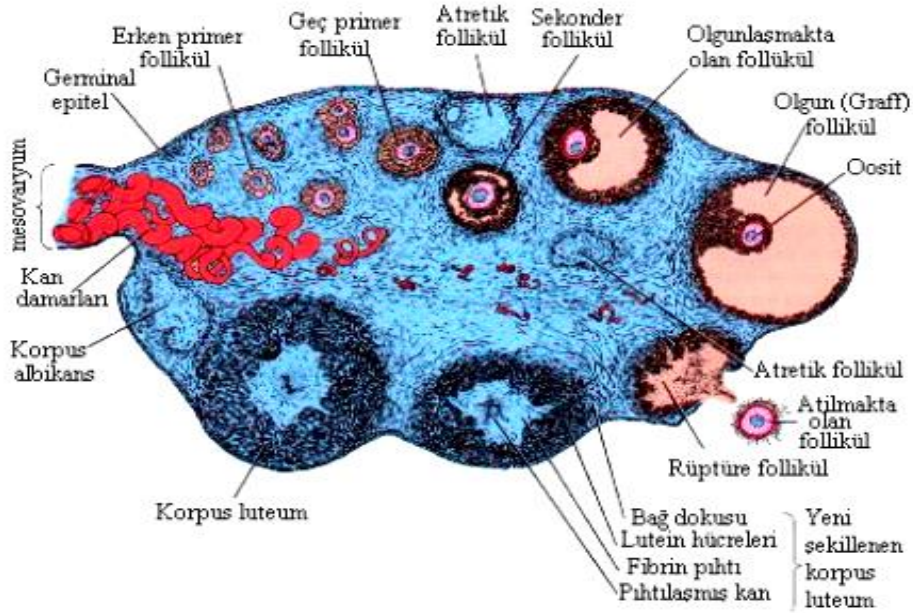
dejenere olur. Farklanmamış gonad XX cinsiyet kromozomuna sahip embriyoda over yönünde değişim gösterir (6). Primitif gonadın kortikal bölgesinden gelişen overler sağda ve solda olmak üzere pelvis boşluğunun her iki yanında yer alan yaklaşık 3 cm uzunlukta 1,5 cm genişlikte ve 1 cm kalınlıkta oosit üretimi gibi endokrin östrojen ve progesteron üretimi gibi ekzokrin fonksiyonlara sahip organlardır. Over yüzeyi, dıştan germinal epitel adı verilen tek katlı yassı veya izoprizmatik hücrelerle örtülüdür. Epitel altında, bağ dokusu yapısındaki tunica albuginea yer alır. Yapısal olarak içte, organın orta kısmında, gevşek bağ dokusu içinde bol elastik fibriller, düz kas, ven ve spiral arterler bulunduran medullar bölge, dışta oositlerin bulunduğu gelişimin değişik dönemlerindeki over folliküllerini içeren korteks bölgesi yer alır (7). Follikül yapısı overlerin ana fonksiyonel ünitesidir. Overlerde bulunan folliküller gelişim evrelerine göre; Primordiyal folikül, primer folikül, sekonder folikül, antral folikül ve matür folikül (graaf folikül) olarak adlandırılırlar (8).

1.2.FOLİKÜLOGENEZ

Foliküllerin, primordiyal folikülden graaf folikülüne gelişimi için geçen süreç folikülogenezis denir. Primordiyal folliküller, kortekste, tunika albuginea'nın hemen altına yerleşmiş içinde yaklaşık 25-30 µm çapında, belirgin nükleus ve nükleolusa sahip etrafı tek katlı yassı folikül hücreleriyle çevrili primer oositi içeren ve doğumdan önce var olan en küçük ve en çok bulunan foliküllerdir. Puberteye girişle birlikte her ovarial siklusa 5-15 kadar primordiyal folikülün olgunlaşmaya başlamasıyla primer oositler büyümeye başlar ve primer oositi çevreleyen yassı epitel hücreleri (foliküler hücreler) önce kübikleşir ve primer oositi tek sıralı çevreler. Oluşan foliküle unilaminer (tek tabakalı) primer folikül adı verilir. Daha sonra tek katlı kübik folikül hücreleri mitoz bölünmelerle çoğalırlar ve oosit etrafında çok katlı epitel tabakası (granüloza tabakasını) oluştururlar. Çoğalan bu hücelere granuloza hücreleri denir. Oluşan foliküle multilaminer (çok tabakalı) primer folikül adı verilir (7,9). Araştırmacılar yıllarca primordiyal folikülden primer folikül gelişimini nelerin aktive ettiği sorusuna cevap bulabilmek için uğraş vermişlerdir. Son yıllarda hayvanlarda yapılan çalışmalarda over stroması ve teka hücrelerinden salınan TGF-β ailesi üyesi olan BMP-4, BMP-7 ve GDF-9 (10-13), teka hücreleri ve stromadan salınan KGF diğer ismiyle FGF-7 ve FGF-2 (14), LIF (15), Nobox (=Og2X) ve Foxo3'ün bu gelişimin aktivasyonunda rol oynadıkları bildirilmiştir (16-19). Yine bu çalışmalarda infertil farelerde GDF-9 geninin olmadığı ve primer aşamadan ileri folikül gelişiminin izlenmediği belirtilmiştir (20). GDF-9 ve diğer TGF-β ailesi üyesi olan faktörlerin insanda etkileri hala tam olarak netleşmemiş

olmakla birlikte fare, sıçan, koyun ve insanlarda folliküler gelişim açısından önemli faktörler olduğunu belirten yayınlar mevcuttur (21). İnsanda folikül büyümesinin midantral safhasına kadar granüloza hücrelerinden salınmakta olan AMH'nin (22) farelerde primordiyal folikülden primer foliküle geçişi inhibe ettiği bilinmektedir (23).

Primordiyal foliküller FSH reseptörü içermedikleri için bu süreçte FSH rol oynamamaktadır (24). Primer folikül evresinde primer oosit, folikül hücrelerini oositin ayıran ZP adı verilen ve tüm memeli oositlerinde bulunan glikoprotein bir kılıf sentezlemeye başlar. İnsanda ZP'nin kalınlığı 10-15 μm 'dir ve oosit çapı 80 μm 'ye ulaştığında ZP ışık mikroskobu ile gözlemlenebilir. Folikül büyümeye devam ederken ZP'nin kalınlığı artar, folikül çevresindeki ovaryum stroması sıklaşır ve teka folikülü şeklinde farklılaşır. Teka folikülü kan damarları ve salgı yapan hücrelerden zengin teka interna ve sıkı bağ dokusu özelliğinde teka eksternaya ayrılır. Foliküler hücrelerin ince sitoplazmik uzantıları ZP'yı geçip oositin mikrovillus yapılarıyla temas eder. Bu temas noktalarında oluklu bağlantılar (gap junctions) bulunur (5,8). Primer folikül yaklaşık 0,2 mm kadar büyüklüğe eriştiğinde granüloza hücreleri arasında düzensiz ve içi granüloza hücreleri tarafından salgılanan folikül sıvısı ile dolu boşluklar oluşmaya başlar. Bu dönemdeki foliküle sekonder folikül adı verilir. FSH bu dönemde folikül büyümesinin kritik bir belirleyicisi olmaktadır.



Şekil 1: Over kesitinin şematik çizimi.(7)

Boşlukların birleşmesiyle antrum adı verilen at nalı şeklinde büyük tek bir boşluk oluşur. Primer oositin büyümesi devam ederken granuloza hücrelerinin dağılımında

farklılıklar ortaya çıkar. Oosit folikülün bir tarafına doğru itilir, oositi çevreleyen granuloza hücreleri oositi folikül duvarına bağlayan bir yığılma yapar, bu yapıya kümülüs ooforus adı verilir. Kümülüs ooforus adı verilen bu hücre kitlesi genişlemiş antruma doğru uzanır. Oositin çevresindeki granuloza hücreleri ışınal tarzda dizilerek korona radiata'yı meydana getirirler. Genital siklusun 14. gününe yakın dönemde yaklaşık 2 cm'lik bir çapa erişen çevresinde kan damarlarından zengin teka interna ve over stromasıyla kaynaşan teka eksterna bulunan bu foliküle, matür folikül denir (7).

Ovulasyondan sonra yırtılan graaf folikülünün duvarında kalan granuloza hücreleri ve teka interna hücreleri büzüşür, katlanır ve kollabe olarak polihedral bir yapı haline dönüşür. Bu yapı çevresinde bulunan damarlar tarafından vaskülarize edilir. Luteinizan hormon (LH) etkisiyle yapıyı oluşturan hücrelerin sitoplâzmasında sarımsı bir pigment birikmeye başlar ve luteal hücrelere dönüşürler. Bu hücrelerin oluşturduğu, progesteron ve az miktarda östrojen salgılayan glandüler yapıya korpus luteum denir. Korpus luteumdan salgılanan hormonlar endometriyumun blastosist implantasyonu için hazırlanmasına neden olur (6).

1.3.OOGENEZ

Oositlerin oluşumunda ilk ana hücre primordiyal germ hücreleridir (PGH). Oosit ve spermilerin ana başlangıç öncüleri olan PGH'leri fetal hayatın 2. haftasında proksimal epiblasttan gelişir (25). Hayvanlarda yapılan çalışmalarda TGF- β ailesi üyesi olan ekstraembryonik ektodermal kaynaklı BMP-4 ve BMP-8b ile ekstraembryonik endodermal kaynaklı BMP-2 sinyallerinin PGH'lerinin gelişiminde rol oynadıkları bildirilmiştir (25,26). PGH'leri epiblasttan ayrılarak ameboid hareketlerle önce embriyonun kaudalinde bulunan ekstraembriyonik mezoderme gelirler ve 3. haftada yolk kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler. 4. haftada sonbarsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftada primitif gonadlara gelip yerleşirler (6). Hem göç sırasında hem de gonadlarda mitozla sayılarını artırırılar. PGH'lerinin izlediği bu yola germ hattı denir. PGH'leri insanda ilk kez 3.-4. gebelik haftalarında yolk kesesinin dorsal duvarının endoderminde açık renk sitoplâzmaları daha az organel içermeleri, oval şekilleri ve daha büyük olmalarıyla endodermal hücrelerden ayırtedilebilirler. PGH'lerinin plazma membranı alkalin fosfataz enziminden zengin olduğu için (9) alkalin fosfataz enzim işaretlemesiyle belirlenebilirler (5,25,27). Yolk kesesi duvarını çevreleyen endoderm hücreleri aralarında bulunan oogonyumlar primordiyal germ hücrelerinden farklırlar (6). Farelerde yapılan

çalışmalarda, oogonyumların çoğunun mitoz bölünme ile sayılarını artırdığı, fetal hayatın 3. ayının başlangıcından ilk folikül oluşumunun izlendiği 4.aya kadar bir kısmının I.mayoz bölünmenin profazına girdiği ve premayotik DNA sentezinin başlamasıyla oogonyal dönemin bitip, oosit döneminin başladığı ve primer oosit haline dönüştükleri belirtilmiştir. Oogonyal dönemden oosit dönemine geçişte Stra-8 geninin önemli bir rol üstlendiği, bu genin olmadığı durumlarda pre-mayotik DNA replikasyonunun gerçekteşmediği bildirilmiştir (25,28). Seri mitotik bölünmelerin ardından oogoniumların bir kısmı primer oositleri oluşturmak üzere I. mayozun profaz evresinde duraklar. Eş zamanlı olarak çok sayıda oogonyum ve primer oosit atrezik hale gelir. 7. ayda yüzeye yakın yerleşmiş olan az sayıda oogonyum dışında oogonyumların çoğu dejenere olmuştur (6). Yenidoğan overinde oogonyum mevcut değildir. Doğumda tüm primer oositler I. mayozun profaz evresindedirler ve puberteye kadar bu aşamada dinlenme evresinde kalırlar. Bu süre boyunca oositin olgunlaşması folikül hücrelerince salgılanan oosit olgunlaşmasını inhibe eden madde (OMI) tarafından baskılanır. Doğumda overlerde yaklaşık 2 milyon kadar primer oosit bulunur. Doğumdan sonra primer oosit oluşmaz (29).

Puberteye kadar over foliküllerinde I. mayozun profaz evresinde bekleyen primer oositler LH seviyesi pik yaptığında ovulasyondan hemen önce I. mayoz bölünmeyi tamamlar. Bu bölünme sonucunda oluşan hücrelerde sitoplâzma dağılımı eşit değildir. Sonuçta, sitoplâzma yönünden zengin büyük sekonder oosit ile sitoplâzmadan fakir, küçük, fonksiyonsuz daha sonra dejenere olan I. kutup cisimciği (I. kutup cismi) oluşur. Ovulasyonda sekonder oositin çekirdeği II. mayoz bölünmeye başlar ancak bu bölünmenin metafaz evresinde bekler. Eğer bir sperm sekonder oosite penetre olursa II. mayoz bölünme tamamlanır. Sitoplâzmanın hemen hemen tümünü alan hücreye fertilize oosit denir. Diğeri II. kutup cisimciği olarak adlandırılan küçük fonksiyonsuz bir hücredir ve daha sonra dejenere olur. Genellikle her siklusta iki ovaryumun birinden dönüşümlü olarak bir adet sekonder oosit atılır. (7)

1.4.TESTİS GELİşİMİ VE YAPISI

Farklılaşmamış gonadlar mezodermden oluşur. Mezoderm erkek fetusta testisin somatik yapılarına dönüşürler. Embriyonik gelişimin beşinci haftasında Wilms tümör geni (WT1) ve steryodogenik faktör 1 (SF1) gibi genlerin aktivasyonu sonucu, korteks ve medullası olan bipotansiyel gonad oluşur (30). Gelişimin ilerleyen aşamalarında korteks

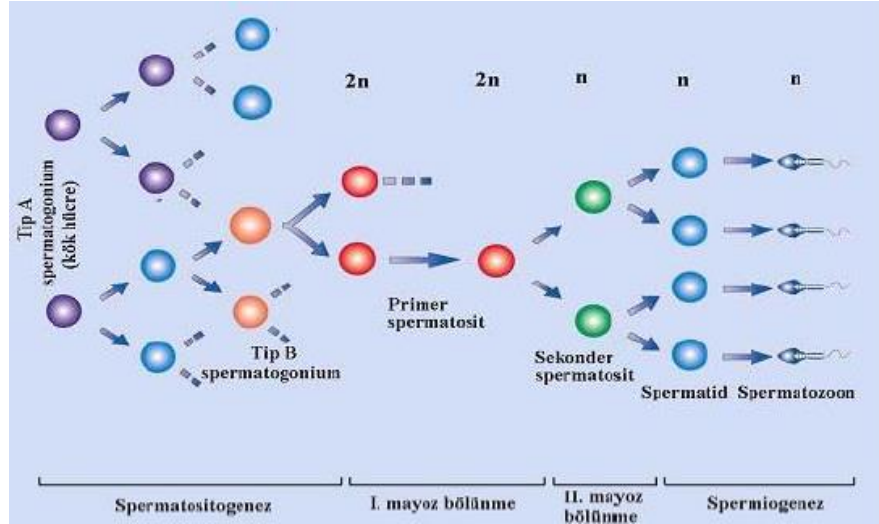
dokusu gerileyerek medüller testiküler yapılar oluşmaya başlar. Gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkek veya dişiye ait morfolojik özelliklere sahip değildirler. Memelilerde, farklanmamış gonadın testis yönünde farklılaşması testis belirleyici faktörü (Testis Determining Faktor, TDF) kodlayan Y kromozomunun kısa kolu üzerinde bulunan Sry (Sex Determining Region on Y Chromosome) geninin ekspresyonu ve varlığına bağlıdır. Testis gelişiminde rol oynayan bir başka gen ise öncü sertoli hücrelerinin AMH ekspresyonunu düzenleyen Sox-9 genidir (6,8). AMH dişi üreme kanallarının gelişimini baskılayarak erkek ürogenital kanalların gelişimini sağlar. Ayrıca FGF9 ve DAX1 gibi diğer testis belirleyici genlerin aktivasyonunun da testis gelişiminde etkili olduğu bildirilmiştir (31). Testisler karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişen, intrauterin dönemde göç etmeye başlayan ve doğumdan hemen önce inguinal kanal aracılığıyla skrotuma inerek spermatik kordonlara asılı halde bulunan bir çift organdır. Skrotuma doğru gerçekleştirdikleri bu göç nedeniyle peritondan gelişmiş tunika vajinalis adı verilen seröz bir kese taşırlar. Testisler bağ dokusundan oluşan tunika albuginea adı verilen bir kapsülle çevrilidir. Tunika albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinumu yapar. Mediastinumdan testisin içine giren septumlar organı yaklaşık 250-300 kadar lobüle ayırır. Her lobülde 1-4 adet, 150-250 µm çapında, 30-70 cm uzunluğunda seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüllerin duvarını bazal membran üzerine oturmuş çok katlı kübik epitele benzer germinal epitel (seminifer epitel) döşer (32). Germinal epitel, spermatogenik hücreleri ve destek hücreleri olarak tanımlanan sertoli hücrelerini içerir. Sertoli hücreleri seminifer tübüllerin bazal membranından lümene doğru uzanan piramidal hücrelerdir. Nükleusları oval ve çentiklidir, çevrelerinde protein kristalloidleri izlenir. Nükleolusları iyi seçilir. Sitoplâzmaları mikrofilyaman yönünden zengindir ve çok miktarda lipid ve glikojen inklüzyonları içerir (33). Spermatogenik hücreleri sararak germ hücre farklılaşması için uygun ortam hazırlamaktadırlar. Sertoli hücrelerinin bir diğer görevi ise fagositozudur. Spermiogenez sırasında artık spermatid sitoplâzmasını fagosite ederek ortadan kaldırırlar. Sertoli hücreleri hem çevresindeki sertoli hücreleriyle hem de gelişmekte olan spermatogenik hücrelerle sıkı bağlantılar ve gap junction'lar yapar. Sertoli-sertoli hücreleri arası bağlantı kompleksleri kan-testis bariyeri oluşumuna katılırlar. Kan-testis bariyerinin immünolojik açıdan çok önemli bir görevi vardır. Spermatogenez puberteyle başladığı için spermiumlar ve diğer spermatogenik hücreler immün sistem tarafından yabancı olarak algılanırlar. Ancak kan-testis bariyeri spermatogenik hücrelerle immün sistem arasındaki etkileşimi engellediği için seminifer tübül içine immünglobulin geçişine izin vermez ve spermatogenik hücreleri otoimmün reaksiyonlara karşı korur (7,8). Spermatogenik hücreler bazal membrandan itibaren lümene kadar alttan üste doğru sırası ile

spermatogoniumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatozoon olarak sıralanırlar. Seminifer tübüllerin arasındaki boşluklar, gevşek bağ dokusu, kan ve lenf damarları, asidofil boyanan leydig hücreleri, sinuzoidler ve makrofajlar tarafından doldurulmuştur (7). Lobüllerin içinde bulunan seminifer tübüller lob l n tepesine doğru düzleşir. Duvarı tek katlı prizmatik epitelle d şeli tubuli rekti denilen boşaltıcı tübüllerin ilk bölümünü oluşturur. Tubuli recti, seminifer tübülleri rete testise bağlar. Rete testis, mediastinum içinde yerleşmiş, seminifer tübüllerin ürünlerini toplayan, tek katlı kübik veya yassı epitele sahip, birbirleriyle anastomoz yapan kanallar ağıdır. Testis hem ekzokrin hem de endokrin fonksiyonlu bileşik tübüler bez özelliğine sahip bir organdır. Testisin ekzokrin salgısı, testiküler sıvısı ve spermatozoondur. Salgılama biçimi aktif holokrin tiptedir. Endokrin salgısı ise Leydig hücrelerinde yapılan testosterondur (9,32).

1.5 SPERMATOGENEZ

PGH'lerin farklanması dişilerde intrauterin dönemde başlarken, erkeklerde puberteyle başlar. Büyük ve soluk renkli hücreler olarak fark edilebilen primordiyal germ hücreleri, doğumda testisin seks kordonları içinde sertoli hücreleri tarafından  evrenmiştir. Pubertenin başlangıcından hemen önce seks kordonları içinde lümen meydana gelir ve seminifer tübüllere d n ş rl r. Eş zamanlı olarak primordiyal germ hücreleri de spermatogoniumlara farklanırlar (6). Spermatogenez, seminifer tübüllerde spermatogoniumlardan başlayarak erkek germ hücrelerinin oluşumunu, sayılarının artışını ve spermatozoonlara dönüşümünü ifade eden bir süreçtir. Bu süreç pubertede hipotalamustan GnRH salgılanmasına bağlı olarak hipofiz  n lobundan FSH ve LH salgılanmasıyla başlar ve hızı yavaşlamakla birlikte yaşlılığın son dönemlerine kadar sürebilir. LH; Leydig hücrelerinden testosteron sentezini, FSH ise sertoli hücrelerinde inhibin sentezini stimüle eder. FSH ve testosteron birlikte seminifer tübüllerde spermatogenezi uyarır. Spermatogenezde ısı  ok önemli bir faktördür. 37 C olan vücut sıcaklığı spermatozoon gelişimini olumsuz yönde etkiler. Ayrıca uyuşturucu madde ve sigara kullanımı, kötü beslenme ve alkolizm spermatozoon oluşumunda azalmaya ve bozuk spermatozoon yapısının gelişimine neden olmaktadır (5). Spermatogenez, spermatositogenez, mayoz dönemi ve spermiogenez olmak üzere 3 dönemi kapsar. Spermatositogenez dönemi, bazal lamina üzerine oturmuş spermatogoniumların bir dizi mitoz bölünme geçirdikleri dönemdir. Mitoz bölünmeler sonucunda ya kök hücre özelliğindeki farklılaşmamış Tip-A spermatogoniumlar ya da Tip-B spermatogoniumlar oluşur (7). İnsan testisinde Tip-A-Koyu spermatogonium,

Tip-A-Soluk spermatogonium ve Tip-B spermatogonium olmak üzere 3 tip spermatogonium tanımlanmıştır. Tip-A spermatogoniumların bir kısmı kaynak hücresi olarak kalırken, bir kısmı da daha iri görümlü Tip-B spermatogoniumlara dönüşür. Oluşan Tip-B spermatogoniumlar mitoz bölünme ile primer spermatositleri meydana getiren hücrelerdir (8).



Şekil 2: Spermatogoniumdan spermatozoon oluşuncaya kadar geçen dönemler (7).

Primer spermatositlerin oluşumu ile spermatositogenez dönemi tamamlanır. Daha sonra diploid kromozomlu (44+XY) primer spermatositler yaklaşık 22 gün süren profaz evresinin ardından indirgenme bölünmesi olan I. mayoz bölünmeyi tamamlayarak haploid kromozomlu (22+X veya 22+Y) sekonder spermatositlere dönüşürler (7). I. mayozun profaz evresinde crossing-over oluşur ve genetik çeşitlilik sağlanır. Oluşan sekonder spermatositler II. mayoz bölünmeyi geçirerek 23 kromozomlu spermatidler'in oluşmasını sağlarlar. II. mayozda kromozom sayısı değişmez ancak DNA sayısı yarıya iner. Bu işlemin tamamlanması ile bir spermatogoniumdan 4 adet spermatid meydana gelmiş olur. Spermatidler yuvarlak çekirdekli, iyi gelişmiş golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri, bir çift sentriol ve düzensiz şekilli bazofilik kromatid içeren 65-70 µm çapında polygonal ya da yuvarlak hücrelerdir. Spermatidler ve spermatositler aralarındaki sitoplazmik köprülerle birbirleriyle etkileşim halindedirler. Spermatogenezin düzenlenmesinde bu köprüler rol oynarlar. İnsanlarda spermatogenez yaklaşık olarak 2 ay (60-64 gün) sürer. Spermatidlerin oluşumundan sonra spermiogenezis dönemi başlar. Spermiogenezis spermatidlerin yaklaşık 8-10 gün süren, 50-70 µm uzunluğunda hareketli olgun erkek germ hücreleri olan

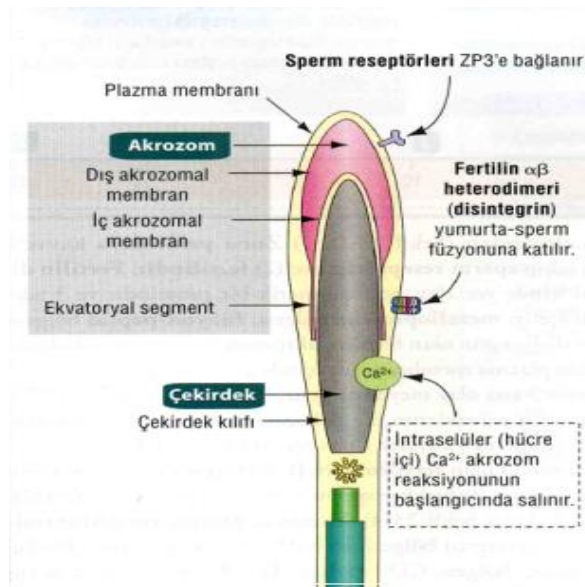
spermatozoonlara dönüşüm sürecidir. Her bir spermatiddan 4 adet spermatozoon oluşur. Bu süreçte; akrozom gelişimi, nükleus şekil ve büyüklüğünün değişmesiyle birlikte nükleer yoğunlaşma, distal sentriyolden flagellumun gelişmesi, spermin boyun ve orta parçasının gelişimi ile artık spermatid sitoplazmasının atılması gibi değişiklikler meydana gelir (5-7).

1.6.FERTİLİZASYON

Embriyonik gelişimin başlangıcı olan fertilizasyon genellikle tuba uterinanın en geniş ve uzun parçası olan ampulla bölgesinde gerçekleşir. Sperm ve oositin temasıyla başlar ve birbiriyle ilişkili, düzenli moleküler olaylar dizisi sonucu oluşan tek hücreli embriyo olan zigotun I.mitoz bölünmesinin metafaz plağında anne baba kromozomlarının bir araya gelmesi ile sonlanır. Bu süreç yaklaşık 24 saat içinde gerçekleşir. Tuba uterinanın diğer kısımlarında da fertilizasyon gerçekleşebilir. Fertilize olmayan oosit dejenere olur ve atılır. Oositin fertilize olabilmesi için olgun bir oosit özelliğini kazanması yani I.mayoz bölünmeyi tamamlayarak I.kutup cisimciğini atması, matur spermelerinde, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu tamamlayarak döleyebilme kapasitesine sahip olmaları gerekmektedir (5,29). Spermin oositi fertilize edebilme potansiyeli kazanması için, dişi genital sistemi içerisine girdikten sonra geçirdiği sürece kapasitasyon denir. Kapasitasyon süreci insanlarda yaklaşık 7 saat sürer (6) ve genellikle uterus yada uterin tüplerden geçerken buralardan salgılanan maddeler yardımı ile olur. Kalsiyum (Ca^{++}), redoks, G-proteini, cAMP ve kinaz bağımlı olan kapasitasyon tipik ligand-reseptör etkileşim mekanizmasına dayanır ve gerçekleşebilmesi için serum albumini, Ca^{++} , bikarbonat ve glikoz gibi maddelerin ortamda bulunması gerekmektedir. Kapasitasyonun başlamasında ilk basamak sperm membranı üzerinde bulunan kaveolalar içerisinde kaveolin adı verilen proteinlere bağlı halde bulunan kolesterolün dışarı çıkmasıdır. Dişi genital sistemi sekresyonlarında özellikle folliküler sıvıda bol bulunan albuminin kolesterol bağlayıcı özelliği vardır. Eğer ortamda albumin varsa, sperm membranındaki kolesterolü kendisine bağlayarak membrandan uzaklaştırır. Bunu takiben Ca^{++} ve bikarbonat sperm membranından içeri girer. Ardından adenil siklaz enziminin aktive olmasıyla hücre içi cAMP artar ve protein kinazların (Protein Kinaz-A ve Fosfolipaz-C yoluyla Protein Kinaz-C) aktive olması sonucu proteinlerin tirozinle fosforilasyonu gerçekleşir. Proteinlerin fosforilasyonu hem sperm membranı ve akrozom dışı membranı arasında füzyon oluşmasını hem de artan Ca^{++} ile birlikte kuyruk hareketlerinin hiperaktif forma geçmesini sağlar (34). Spermin, erkek genital sisteminde bulunduğu dönemde ve dişi genital sisteminde ilerlemesi sırasında erkenden fertilize edebilme özelliğinin bulunmamasının sebebi bir kısmı epididimden kaynaklanan, bir kısmı ise seminal

veziküllerden salgılanarak ejakulasyon sırasında semene katılan dekapasitan faktörler olarak adlandırılan kapasitasyon önleyici bazı faktörlere sahip olmasıdır. Sperm dışı genital sistemine girdikten sonra serviks, uterus ya da tubuller içerisinde dekapasitan faktörler sperm hücrelerinden uzaklaştırılırlar. İn vitro kapasitasyon sırasında seminal plazmadaki dekapasitan faktörler uzaklaştırılmaktadır ve ortama bu faktörler eklendiğinde veya kapasite olan spermier yeniden seminal plazma içine alındıklarında kapasitasyon sürecinde kazandıkları özelliklerini kaybederler. Bu durum kapasitasyonun reversible bir olay olduğunu göstermektedir (8). Kapasitasyonun türe ve organa özgü bir olay olmadığı, boğa spermierinin tavşan uterusunda, tavşan spermierinin sıçan ve köpek uterusunda, keçi spermierinin domuz uterusunda kapasite olabildiği, kolon, idrar kesesi, vezikula seminalis ve gözün anterior kamarasında tavşan spermierinin kapasite edilebildiği bildirilmiştir. Kapasitasyonun başladığı ve tamamlandığı bölgeler türe özgü farklılık göstermekle birlikte kapasitasyonun asıl gerçekleşme yeri oviduktur (35). Kapasitasyon sürecinde spermierde morfolojik değişim meydana gelmez. Bu süreçte intrasellüler iyonların reorganizasyonu gerçekleşmekte, metabolik ve moleküler değişiklikler görülmekte, nükleus proteinlerinde değişiklikler meydana gelmekte, akrozomal kep bölgesindeki plazma membranından seminal plazma proteinleri ve glikoprotein örtü uzaklaştırılmaktadır. Kapasitasyon, sperme akrozom reaksiyonunu geçirebilme, ZP bağlanabilme ve hipermotilite özelliğini elde edebilme imkânı sağlar (8). Sperm kapasitasyonu dışı genital kanalında gerçekleşmekle beraber uygun şartlarda ve nitelikli medyumlarda kısa süreli inkübasyonla in vitro ortamda da gerçekleşebilmektedir. Başarılı bir IVF’de kapasitasyon en önemli basamaklardan biri olarak karşımıza çıkmaktadır. İn vitro kapasitasyon için Ca^{++} , piruvat, glukoz, heparin, laktat ve albumin gibi protein içeren kültür medyumuna veya serum ya da foliküller sıvı gibi biyolojik sıvı içeren kültür medyumuna ihtiyaç vardır. Bu amaçla sığırlarda yapılan çalışmalarda sperm hiperozmotik bir medium ile muamele edilmiş ve sıklıkla tuzlu solüsyonlar kullanılmıştır. Özellikle BSA destekli TALP, mDM, BO medium, BWW medium, TYB medium ve KRB medium in vitro kapasitasyon için en çok kullanılan medyumlardır (36). Araştırmacılar bu medium’lara heparin, epinefrin, hipotaurin, kondriotin sülfat, folikül sıvısı, oviduktal sıvı ve Ca^{++} gibi maddeleri ilave ederek kapasitasyonu indüklemişlerdir. Büyükbaş hayvanlarda, ineğin genital kanalı içerisinde bulunan glukozaminoglikanlar sperm membranının destabilizasyonuna neden olarak kapasitasyonu etkilerler. Bir tür glukozaminoglikan olan heparin günümüzde IVF’de kullanılan boğa spermierinin kapasitasyonu için yaygın biçimde kullanılmaktadır. Heparinden başka kafeinle birlikte veya kafein olmaksızın kalsiyum iyonofor da kapasitasyon için başarılı biçimde kullanılır. Ayrıca taurin ve hipotaurinin sperm

canlılığını ve kapasitasyonunu etkilediği ve antioksidant olarak peroksidatif zararlara karşı koruyucu etkisi olduğu bildirilmiştir. Bazı araştırmacıların ise hipotaurin, heparin ve epinefrini birlikte kullanarak sperm motilitesini ve kapasitasyonunu indükledikleri bildirilmiştir (37). Aynı ejakülattaki spermlerden bir bölümü daha kısa sürede kapasite olurken bir kısmı ise daha geç kapasite olabilmektedir. Kapasitasyon süreci aynı ejakülattaki spermler arasında farklılık gösterebildiği gibi epididimden elde edilen spermleer ile ejakülatuvar spermleer arasında da farklılıklar gösterebilmektedir. Ejakülatuvar spermleer, seminal plazma ile karışmaları ve plazma membranının daha stabil olması nedeniyle daha geç kapasite olurken epididimal spermleer kapasitasyon sürecini daha erken tamamlarlar (38). Kapasitasyonunu tamamlamış spermin, oositi fertilize edebilme özelliğine sahip olabilmesi için akrozom reaksiyonu geçirmesi gerekmektedir. Bu değişim süreci spermin oositle temas ettiği yerde meydana gelir (8). Sperm başı plazma membranı, kondanse nükleus ve akrozomal kese olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Sperm reseptörleeri ve fertilin plazma membranı elemanlarıdır. Akrozomun ekvatoryal bölgesinin ön tarafındaki sperm plazma membranının içinde yer alan fertilin sperm-oosit plazma membranlarının füzyonuna katılır. Akrozom, spermatogenesis sırasında golgi kompleksinden gelişen, nükleusun ön kısmında yer alan ve hemen hemen yarısını örten, büyüklüğü türlere göre değişiklik gösteren kese şeklinde bir yapıdır. Akrozomal kesede dış akrozomal membran, iç akrozomal membran ve hidrolitik enzimleer bulunur. Bu enzimleerin bir kısmı iç akrozomal membranda bulunurken bir kısmı da matriks içinde bulunur. Akrozomal kesenin incelmış bölümü kuyruğa doğru uzayarak ekvatoryal segmenti oluşturur (9).



Şekil 3: Sperm başının bileşenleri (9)

İn vivo şartlarda fallop tüplerinde gerçekleşen akrozom reaksiyonu spermin korona radiataya teması ve ZP'ya tutunarak zona penetrasyonunu gerçekleştirene kadar geçen bir dizi olayları içerir. Kapasitasyonunu tamamlamış ve ampulla'ya ulaşmış bulunan sperm hücre membranlarında bulunan yüzey reseptörleri vasıtasıyla oosite tutunurlar. Spermin oosite temasıyla, sperm içine Ca^{++} girişi hızlanır ve akrozomal reaksiyon başlar. Spermin, plazma membranı ve akrozomun posterior kısmındaki ekvatoryal segmenti hariç dış akrozomal membranı birçok noktada birbiriyle birleşerek küçük veziküller oluştururlar. Bu veziküller arasındaki boşluklardan akrozomal enzimler dışarı çıkar. Serbest kalan hyaluronidaz enzimi kümülüs ooforus hücrelerini birbirine bağlayan ve bir hyaluronorik asit kompleksi olan bağları eritir. Korona radiatadaki foliküler hücreler birbirinden ayrılarak ZP ortaya çıkar (8,39). Oositin ZP'sinde değişik tür glikoproteinlerden oluşan, spermdeki yüzey reseptörlerine uygun moleküller bulunur. ZP'deki primer sperm bağlanma molekülü ZP3'tür. Sperm ve oosit-lerin yüzeyindeki karbonhidrat bağlayıcı proteinler, fertilizasyon sırasında sperm ve oositin bir-birini tanıyıp birleşmesinde rol oynar. Farelerin spermlerinde bulunan zona pellusidadaki ZP-3 proteinini tanıyan 95 kD proteini ve sp56 gibi sperm yüzey reseptörlerinin varlığı yayınlarda bildirilmiştir. sp56, ZP-3'e bağlanma proteini olarak tanımlanmakla birlikte henüz kesinlik kazanmasada akrozom reaksiyonunu başlatan sinyal molekülü olabileceği de düşünülmektedir (40,41). ZP3 molekülünün 2 bölgesi vardır bunlar:

1) Sperm plazma membranındaki integral proteinleri tanıyan sperm reseptörü.

2) Akrozom reaksiyonunu tetikleyen, sperm başındaki reseptör proteinlerine bağlanan bölgelerdir.

Akrozomal enzimlerden olan akrozin, nöraminidaz ve esteraz (29) gibi enzimlerle ZP yüzeyinde spermin geçişini sağlayan ince bir yarık oluşmaktadır. Fertilizasyonun başlangıcı için spermin ZP'dan geçişi önemli bir aşamadır. İnseminasyonu takiben yaklaşık bir saatlik süreçte ZP aşılmış olur. Sperm ve oosit plazma membranlarının birleşmesi sperm akrozomunun üzerindeki hücre zarı akrozom enzimlerinin salınması sırasında eridiği için postakrozomal bölge ile oolemma arasında başlar. Spermin, oolemmaya füzyonuyla birlikte oolemmada oluşan kortikal granüllerin perifere göç etmesi ve içeriğinin perivitellin aralığa boşalmasıyla ZP'nin yapısında değişiklik meydana gelir ve zona reaksiyonu tetiklenir. Zona reaksiyonu sonucunda ZP'nin kalınlığında bir miktar azalma, sıkılaşma ve porlarda kaybolma görülür. Başka bir spermin ZP'ye penetrasyonuna imkan vermeyen yapıya dönüşerek

polispermi önlenmiş olur. Spermin oosit sitoplâzması içine girmesinden sonra oosit aktivasyonunu takiben fertilizasyonun tamamlanabilmesi için gametlerin kendilerine ait nükleus materyallerinin reorganize olması ve bu şekilde erkek ve dişi pronükleuslarının oluşması gereklidir. Spermlle birleşen oositte, bu iki hücrenin birlikte oluşturacakları yeni canlıyı meydana getirmek üzere oosit sitoplâzmasında yapısal ve biyokimyasal bazı değişiklikler gözlenir. Oositte gözlenen bu değişiklikler oosit aktivasyonu olarak adlandırılır (39). Oosit aktivasyonu birçok türde araştırılmış ve başlıca iki gelişim yolu olabileceği üzerinde durulmuştur. Birinci görüşe göre oosit, sıvı karakterde olan, sperm sitoplâzmasında bulunan ve sperm tarafından taşınan OAF tarafından uyarılmaktadır. Spermlle oositin membranlar düzeyinde birleşmesinin oosit aktivasyonu için yeterli olmadığı ve oosit aktive edici faktörün türlere özgü olduğu belirtilmiştir. İkinci görüşü savunanlara göre ise oosit aktivasyonu reseptörler tarafından yönlendirilen bir süreç sonrası gerçekleşmektedir (8). Memelilerde oositin aktive olduğunun ilk göstergesi kortikal granüllerin salınması ve II. mayoz bölünmenin tamamlanmasıdır. Spermin oosit sitoplâzmasına girmesinin hemen ardından oosit II. mayoz bölünmesini tamamlar. Bu bölünme sonucunda hemen hemen hiç sitoplâzma içermeyen II. polar cisim ve ergin dişi cins hücresi olan ovum oluşur. Ovumun nükleusu dişi pronükleus olarak adlandırılır. Sperm oosit sitoplâzması içine girdikten sonra pasif hareketlerle sitoplâzmanın iç kısımlarına doğru ilerler. Bu sırada spermin kuyruğu baş kısmından ayrılarak dejenere olur. Spermin nükleus zarı erir, kondanse sperm kromatini sitoplâzmadaki dağılır (5,38). Ooplazmada kromatinin çevresinde yaygın olarak bulunan endoplazmik retikulumun yer yer birleşmeye başlaması ve bu sürecin devam etmesi sonucu erkek pronükleus membranı şekillenir. Bu oluşuma bazı türlerde sperm çekirdek zarı da katılır (8). Çoğu zaman fertilize oositin merkezinde gelişen dişi pronükleus erken dönemde gelişim yeri nedeniyle daha periferde gelişen erkek pronükleusdan ayırt edilebilir. Erkek ve dişi pronükleuslar oluştukları bölgeden hareket ederler ve genellikle ooplazmanın ortasında yanyana veya üst üste binmiş gibi görülürler. Pronükleus membranlarının erimesiyle beliren erkek ve dişi kromozom grupları birleşir ve fertilizasyon tamamlanarak zigot oluşur. Pronükleusların hareketinde hücre iskeleti elemanlarından olan mikrotubuller rol oynamaktadır. Pronükleuslar, mikrotubullerin uzaması sırasında onlarla birlikte pasif olarak hareket etmektedir. Spermin ooplazma içine getirdiği sentriol çiftinden kaynaklanan mikrotubul yapısında yer alan motor proteinlerin erkek pronükleusun ilk hareketinde rol oynadığı anlaşılmıştır. İnsanlarda yapılan IVF uygulamalarında, pronükleus hareketleri belirgin bir şekilde gözlemlenebilmektedir. IVF’de pronükleusların ilk belirledikleri bölgelerde kalmalarının infertiliteye neden olabileceği düşünülmektedir (38,39). Fertilizasyon, sekonder

oositi uyarak II. mayotik bölünmenin tamamlanmasını ve oluşan zigotun normal diploid kromozom sayısına sahip olmasını sağlar (29). Fertilizasyon ile kromozomal cinsiyeti belirlenir ve kromozomların, yarısı anneden, yarısı babadan geldiği için genetik çeşitlilik sağlanmış olur. Fertilizasyon sonrası zigotta yarıklanma (cleavage) başlar (6)

1.7. İNFERTİLİTE VE NEDENLERİ

1.7.1. İNFERTİLİTE

İnfertilite, çocuk sahibi olmak isteyen bir çiftte, bir yıl süreyle düzenli ve korunmasız ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi durumudur. Daha önce hiç gebelik oluşmamış ise primer infertilite, en az bir gebelik öyküsü varsa sekonder infertilite olarak adlandırılarak sınıflandırılır. Üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık % 10-15’de infertilite görülmektedir (42).

Bir menstrüel siklusta gebe kalabilme olasılığı fekundabilite, canlı doğum olma olasılığı ise fekundite olarak tanımlanmaktadır. Normal çiftlerde fekundabilite % 20-25 olarak tahmin edilmektedir. Kadın yaşındaki artışa, sigara, alkol ve kafein kullanımına bağlı olarak fekundabilite oranlarında azalma görülmektedir (43). Fertilite, kadınlarda 20-25 yaşları arasında, erkeklerde 20-30 yaşları arasında pik yapar. Kaliteli oosit sayısındaki azalmanın başlamasıyla beraber, 35 yaşından sonra kadınlarda fertilite azalmaya başlar. 3.dekatin sonlarındaki kadınlarda infertilite görülme oranı % 25’e ulaşırken 4. dekattan itibaren fertilitedeki azalama daha hızlı olur. Erkeklerde ise 4. dekattan itibaren fertilitede hafif bir azalma olmakla beraber ileri yaşlara kadar devam eder (44,45). Sosyokültürel ve sosyoekonomik düzey gibi demografik özellikler toplumlarda görülenin fertilite oranlarıyla yakından ilgilidir. Son yıllarda, kariyer planlaması, çalışma hayatındaki kadın popülasyonunda artış, geç yaşta yapılan evliliklerin sayısında artma, kontrasepsiyon yöntemlerinin ve etkinliklerinin artması, çiftlerin çocuk sahibi olma isteklerini yaşamlarının daha ileriki dönemlerine ertelemeleri ve medyanın infertilite ve tedavi yöntemleri hakkında toplumun bilgi düzeylerini artırmasına bağlı olarak infertilite kliniklerine başvurularda çoğalma görülmektedir. İnfertilite prevelansı ırka ve etnik yapıya bağlı olarak önemli bir değişiklik göstermemektedir. İnfertilite tedavisine başvuran çiftlerin büyük bir bölümü yüksek sosyoekonomik düzeyden gelmesine rağmen aslında infertilite oranı düşük sosyoekonomik grupta daha yüksektir (46).

Tablo 1: İnfertilite Etiyolojilerinin Relatif Prevalansı (47)

İnfertilite Etiyolojilerinin Relatif Prevalansı	
Erkek faktörü	% 25 – 40
Kadına bağlı faktörler	% 40 – 55
Her ikisine bağlı faktörler	% 10
Açıklanamayan İnfertilite	%10

İnfertilite, çiftlerden birine veya her ikisine de bağlı olabilir. Bunun için infertilite kliniğine başvuran çiftlere tedaviye başlamadan önce anemnez ve fizik muayeneyi takiben tanı amaçlı testler eksiksiz olarak yapılmalı ve çıkan sonuçlara göre tedavi planlaması düzenlenerek kişiye özel bir tedavi yapılmalıdır. Medikal ve cerrahi tedaviden sonuç alınamayan vakalar da ise yardımcı üreme tekniklerinden, kişiye en uygun olan yöntem seçilerek uygulanmalıdır (48).

1.7.2.İNFERTİLİTE NEDENLERİ

1) Erkek Faktörüne Bağlı Nedenler

- Varikosel
- İdiopatik
- Testiküler yetmezlik
- Kanal obstrüksiyonları
- Kriptorşidizm
- Genetik nedenler:
 - Kromozomal Bozukluklar
 - Y Kromozom Delesyonları
 - Gen Mutasyonları
- Diğer nedenler:
 - İmmünolojik nedenler
 - Endokrin nedenler
 - Seksüel faktörler

2) Kadına Faktörüne Bağlı Nedenler

- Over rezervinde azalma
- Ovulasyon bozuklukları

- Uterin nedenler:
 - Uterusun konjenital ve edinsel anomalileri
 - Endometrial fonksiyon bozuklukları ve Luteal faz defekti
- Tubal zedelenme, blokaj, paratubal adezyonlar
- Servikal ve immünolojik nedenler
- Diğer nedenler:
 - Enfeksiyonlar
 - Endokrin nedenler
 - Ağır sistemik hastalıklar

3) Açıklanamayan infertilite:

İki yıl düzenli cinsel ilişkiye rağmen çocuk sahibi olamayan çiftlerde, tanı amaçlı detaylı testler ve kapsamlı değerlendirmeler sonucunda tanımlanabilen etyolik bir nedenin tespit edilemediği infertilite durumudur. Kadın yaşının ve infertilite süresinin fazla olmadığı açıklanamayan infertilite tanısı almış çiftlerde iki yıllık gözlem ve takip sonrasında % 35-50, üç yıl sonunda ise % 40-70 'lik kümülatif gebelik oranlarına ulaşılmaktadır. Açıklanamayan infertilite tanısı almış çiftlerin tedavisinde amaç siklus fekunditesini arttırmaya yönelik tedavi protokollerinin uygulanmasıdır. Bu olgularda tedavi yaklaşımları gözlem- takip, O.I, O.I + IUI ya da ileri teknikler, IVF veya ICSI tekniklerini içermektedir. Kadının yaşının 38'in üzerinde olduğu olgularda IUI uygulamaksızın direk IVF-ICSI yapılabilir (49-51).

1.8. YARDIMCI ÜREME TEKNİKLERİ

1.8.1. TARİHÇESİ

İnfertilite tedavisinde son 30-40 yıl içerisinde gerek yardımcı üreme teknikleri (YÜT) uygulamalarının yaygınlaşması gerekse yeni tekniklerin geliştirilmesine bağlı olarak büyük aşamalar kaydedilmiş ve önceleri tedavi edilemez gözüyle bakılan vakalarda çiftlere çocuk sahibi olma imkanı tanınmıştır. YÜT'nin gelişimindeki tarihsel sürece bakıldığında hiç şüphe yok ki 25 Temmuz 1978 yılı insanoğlu için çok özel bir yer tutmaktadır. Bu tarihte İngiltere'nin Oldham şehrinde jinekolog Patrik Steptoe, hayvan fizyoloğu Robert Edwards ve ekip arkadaşları tarafından IVF+ET yöntemi uygulanarak elde edilen gebeliğin sonuçlanması ile ilk canlı doğum olan Louise Brown'nın doğumu gerçekleştirilmiştir. Ancak bu büyük başarının yıllardır süre gelen araştırmaların ve hayvan çalışmalarının bir sonucu olduğu unutulmamalıdır.

İnfertilite tedavisi için yapılan çalışmalara kronolojik olarak bakıldığında 1776 yılında John Hunter ilk kez kocasında hipospadias bulunan kadına eşinin spermiyle suni dölleme yaparak bu konuda yeni bir tedavi uygulayan kişi olmuştur. Eş spermi ile suni dölleme sonucu ilk doğum ise 1790 yılında İngiltere’de gerçekleşmiştir. 1890 yılında Walter Heape tavşanlarda preimplantasyon evresindeki embriyoları tubal yıkama ile elde ederek başka tavşan türüne transferini gerçekleştirmiş ve sağlıklı yavruların doğabileceğini göstermiştir. Bu uygulama TET, uygulamalarının başlangıcı olmuştur. 1949-1950’li yıllarda Walter Heape’nin klasik tavşan ET modeli çiftlik hayvanlarından keçi, koyun, buzağı, domuz cinslerinde genetik olarak üstün türlerin doğurtulması uygulamalarına yönlendirilmiştir. 1959 yılında M.C. Chang tavşanlarda oositin in vitro ortamda fertilize olabileceğini göstermiş ve Walter Heape’nin transfer tekniğini kullanarak IVF + ET uygulaması sonrası tavşanlardaki ilk canlı doğumu gerçekleştirmiştir. Hayvanlardaki gözle görülür bu başarılar 1960-1970’li yıllarda insanlarda da bu yöntemlerin uygulanması konusunda baskıları arttırmıştır. 1973 yılında Carlwood Melbourne ve ekibi iki kez IVF + ET yöntemiyle gebelik elde etmiş olsada canlı doğum gerçekleşmemiştir. 1978 yılında Patrik Steptoe, Robert Edwards ve arkadaşlarının IVF+ET yöntemiyle insanlardaki ilk canlı doğumu gerçekleştirmesinden sonra 1980’li yıllarda sperm parametrelerindeki bozuklağa bağlı infertilite nedenlerinin çözümünde az sayıda veya düşük motilitedeki spermilerin oositi fertilize edebilmesini kolaylaştırıcı yöntemlerin geliştirilmesi konusundaki çalışmalar yoğunlaştırılmıştır. 1980’lerin sonları ile 1992 yılları arasında bilim insanları spermin ZP’ya bağlanma ve penetrasyon bozukluğu olan durumlarda mikroasiste fertilizasyon yolu ile ZP’yı geçmeyi ve sorunu bu yolla aşmayı amaçlamışlardır. Bunun için PZD ve SUZİ gibi mikroasiste fertilizasyon yöntemlerini uygulamışlardır. Tek bir spermin SUZI uygulaması sırasında oolemma içine kaçması ile tesadüfen oluşan ICSI sonrası başarılı gebelik oluşması YÜT’e yeni bir boyut kazandırmıştır (52).

1.8.2. ENDİKASYONLARI VE UYGULANAN TEKNİKLER

Bu zamana kadar uygulanmış olan yardımcı üreme teknikleri, erkek ve dişi üreme hücrelerinin doğal yollardan bir araya gelemediği, açıklanamayan infertilite, idiyopatik erkek infertilitesi ve cerrahi ya da medikal yöntemlerle başarılı olunamamış kadın veya erkeğe bağlı infertilite durumlarında yaygın olarak kullanılmakta olan tekniklerileri içeren tedavi yöntemleridir. Günümüzde infertilite kliniklerinde uygulanmakta olan tipik yardımcı üreme siklusunun basamakları şu şekildedir:

1- GnRH agonistleri ile downregülasyon

- 2- Gonadotropinlerle kontrollü KOH uygulaması
- 3- HCG ile oosit matürasyonu
- 4- Oositlerin toplanması
- 5- Sperm elde edilmesi (Doğal yollarla veya uygun yöntemler kullanılarak)
- 6- IVF veya ICSI ile fertilizasyonun sağlanması
- 7- İn vitro embriyo kültürü
- 8- Luteal destek veya endometriumun hazırlığı için progesterone kullanılması
- 9- Taze embriyo transferi ve fazla embriyoların dondurulması
- 10- Gebeliğin ilk üç ayında gebelik izlemi

YÜT'de infertilite sorununu çözmeye yönelik olarak infertilitenin süresi, etiyojisi ve hastanın yaşı gibi birçok faktör göz önüne alınarak en avantajlı olan tekniğin seçilip uygulanması amaçlanmaktadır. Bu teknikler sadece sperm elde etme ve uygulanımı için kullanıldığı gibi sperm, oosit ve/veya embriyoların elde etme, manüplasyonu ve kriyoprezervasyonunda da kullanılmaktadır.

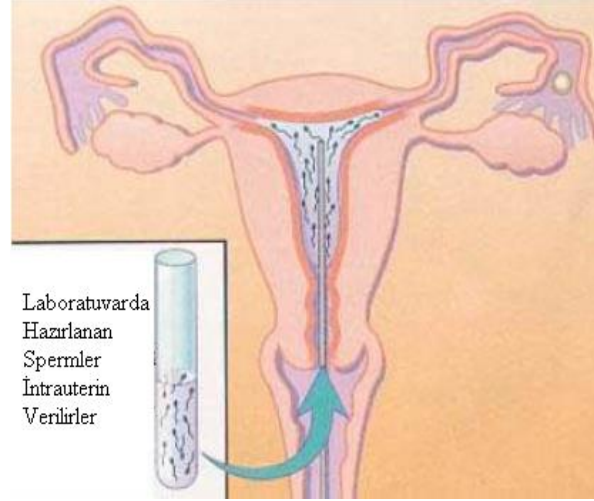
Bu amaçla uygulanan teknikler şunlardır:

- 1) Perkütan sperm aspirasyonu (PESA)
- 2) Testiküler sperm aspirasyonu (TESA)
- 3) Mikrocerrahi epididimal sperm aspirasyonu (MESA)
- 4) Testiküler sperm ekstraksiyonu (TESE)
- 5) Ovulasyon induksiyonu + İntrauterin inseminasyon (OI+IUI)
- 6) İn vitro fertilizasyon + Embriyo Transferi (IVF+ET)
- 7) ZD ve PZD
- 8) Subzonal Sperm Enjeksiyonu (SUZI)
- 9) Intrazitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI)
- 10) Kriyoprezervasyon

1.8.2.1. İNTRAUTERİN İNSEMİNASYON (IUI) :

En eski yardımcı üreme tekniği olan IUI, sperm seminal plazmadan uygun yöntemlerle ayrıştırılıp hazırlandıktan sonra bir kateter aracılığı ile direk olarak uterus kavitesine

aktarılmasıdır. IUI'da fallop tüplerine çok sayıda, hareketli, morfolojisi normal, fertilitesi yüksek spermin ulaşması ve gebelik şansının artırılması hedeflenir. 15 -20 dakika süren, anestezi gerektirmeyen ağrısız bir uygulamadır.



Şekil 4: IUI: İntrauterin İnseminasyon (53)

Semen örneği 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası genellikle laboratuvarda alınmaktadır. Eğer dışarıda alınıp getirilecek ise vücut ısısında korunarak 1-2 saat içinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. IUI'da gebelik başarısında önemli yer tutan sperm hazırlama yöntemleri dikkat edilmesi gereken bir konudur. İUI'da en çok uygulanan sperm hazırlama yöntemleri: standart sperm yıkama yöntemi, swim-up yöntemi ve gradient yöntemidir (54). Hareketli sperm sayısının yeterli olduğu kişilerde spermin standart sperm yıkama yöntemi ile başarılı bir şekilde hazırlanabileceği, ancak semen kalitesinin düşük olduğu olgularda gradient yönteminin daha uygun olacağı bildirilmiştir (54). Başka bir çalışmada ise gradient yöntemiyle hazırlanan spermier swim up yöntemine göre daha kaliteli olduğu rapor edilmiştir (55). İnseminasyon işlemi sperm hazırlandıktan sonra en geç 1 saat içinde yapılmalıdır. IUI daha ucuz bir yöntem olduğu için hafif ya da orta şiddette erkek faktörüne bağlı infertilite olgularında, sıklıkla ilk başvuru olan yardımcı üreme yöntemidir. Eğer sonuç alınamazsa IVF veya ICSI yöntemi uygulanır (56). İnfertilite süresinin çok uzun olmadığı 35 yaş altındaki vakalarda, hazırlık sonrası toplam motil sperm sayısının 5 milyonun üzerinde olduğu olgularda, IVF öncesi düşünülen bir tedavi seçeneğidir. Ayrıca açıklanamayan infertilite, minimal endometriozis, luteal faz defektleri, dispareni, vajinusmus, şiddetli hipospadias, retrograd ejakulasyon, bazı erektil disfonksiyon olguları ve servikal faktöre bağlı infertilite olgularında da IUI tekniği kullanılmaktadır. IUI, şiddetli hipospadias, erektil

disfonksiyon, ejakulasyon bozukluğu ve vajinusmus gibi olgularda over stimölasyonu yapılmadan kadının doğal siklusunda uygulanabilmektedir (52). IUI'da en başarılı sonuçlar total motil sperm sayısı 10 milyondan fazla ve normal sperm morfolojisi $> \% 4$ olduğunda elde edilmektedir (57,58). Semen hazırlandıktan sonra en az 1 milyon ileri hareketli spermin elde edildiği çiftlere IUI önerilmektedir. Total motil sperm sayısı 1 milyondan az ve normal sperm morfolojisi $< \% 4$ ise başarı şansı yok denecek kadar azdır IUI'nın başarı şansı IVF'e oranla çok düşüktür. Bebek sahibi olma oranı yaklaşık olarak $\% 10-15$ 'dir. Bir çok infertilite vakasında yardımcı üreme tekniklerinin ilk basamağını IUI oluştursa da bu vakaların çoğu daha sonra IVF'e yönlendirilmektedir (59).

1.8.2.2. IN VİTRO FERTİLİZASYON (IVF)

IVF yöntemi; erkek faktörüne bağlı infertilite, immünolojik infertilite, tubal faktöre bağlı infertilite, endometriozis ve açıklanamayan infertilite gibi olgularda, yeterli sayıda ve kalitede oosit elde etmek için yapılan kontrollü overyan hiperstimölasyonu takiben oositlerin toplanmasını, sperm elde edilmesini ve elde edilen spermelerin hazırlanarak in vitro şartlarda fertilizasyonun gerçekleştirilmesini içeren yardımcı üreme tekniğidir. IVF ile elde edilen embriyoların kültürü uygun ortam ve mediumlarda transfer edileceği döneme kadar gerçekleştirilir. Embriyoların kalite sınıflaması yapılarak transfer edilecek olan embriyo seçilir ve bir kateter aracılığıyla uterusu transservikal yerleştirilir. Kadının yaşı, IVF uygulamalarının en önemli kısıtlayıcı faktörüdür. Yaş artışıyla beraber over rezervlerindeki azalmaya paralel olarak gebelik oranları 37 yaşından itibaren belirgin bir şekilde azalmakta ve 45 yaş üzerinde bu oranlar sıfıra kadar inmektedir. 40 yaş üzerinde kontrollü ovaryan hiperstimölasyona olan yanıtaki azalmaya bağlı daha az sayıda oosit elde edilmekte ve IVF sonrası transfer için yeterli sayıda embriyo bulunamamaktadır. IVF uygulamalarının bir dezavantajı $\%10$ oranında görülen poliploidi durumudur. Büyük çoğunluğu dispermik fertilizasyon ile oluşmakta olan poliploidi, uygulamada postmatür veya immatür oosit kullanımı ve fazla konsantrasyonda sperm kullanımı gibi nedenlere bağlı olarak görülebilmektedir. Matür oositlerin yaklaşık $\% 75$ 'nin IVF uygulamaları sırasında fertilize olması ve fertilize olanların yaklaşık $\% 85$ 'nin de embriyoner gelişim göstermesi beklenmektedir (8). IVF yöntemi insanlarda üremeye yardımcı yöntemlerden biri olarak reproduktif sorun- ların çözümünde kullanılmakla birlikte özellikle fertilizasyon ve erken embriyonik gelişim gibi bazı konuların aydınlatılması amacıyla hayvanlarda yapılan bilimsel araştırmalarda uzun yıllardır uygulanmaktadır. Ayrıca nesli tükenmekte olan hayvanların

veya yüksek verim özelliğine sahip çiftlik hayvanlarının üremelerinin sağlanması amacıyla kullanılmakta olan bir yöntemdir (37).

1.8.2.1.1. Kontrollü Overyan Hiperstimülasyon (KOH) ve hCG Uygulaması

Normal doğal sikluslarda sadece bir olgun oosit elde edilmekte hem IVF başarısı şansı düşük olmakta hem de uygulama iptalleri çok görülmektedir. (60) Bu yüzden IVF tekniğinde ilk hedef fertilizasyon yeteneğine sahip yeterli sayıda oositin elde edilmesidir. Bunun için her hastaya kendi drumuna özel KOH protokolü uygulanır. Günümüzde uygulanmakta olan KOH protokolleri, başlama zamanı ve uygulama sürelerine göre isimlendirilen GnRH analogları ve gonodotropinlerin kombinasyonu ile oluşturulan uzun, kısa, ultrakısa, mikrod doz protokolleriyle doz bağımlı etki gösteren GnRH antagonistlerinin dahil olduğu antagonist protokolüdür. En çok uygulanan KOH protokolü uzun protokoldür (61). KOH'nun amacı en az 1 tane 18 mm büyüklüğünde ve 3-4 tane de 14 mm'den büyük folikül elde etmektir. KOH sonrası USG takibinde yeterli sayı ve büyüklükte folikül tespit edildiğinde oosit matürasyonu ve ovulasyonun indüklenmesi için 5000 - 10000 IU hCG enjeksiyonu yapılır. hCG enjeksiyonundan 34 -36 saat sonra oosit toplama işlemine geçilir (62). KOH'nun en tehlikeli komplikasyonu vücutta yaygın kapiller geçirgenliğin olduğu şiddetli hidrotoraks, dispne, böbrek fonksiyon bozuklukları, koagülasyon bozuklukları ve abdominal distansiyonun görüldüğü ölümcül olabilen overyan hiperstimülasyon sendromu (OHSS)'dur. IVF sikluslarında insidansı % 1-10 arasında değişmekte, olguların % 0,5-2 'inde şiddetli formu görülmektedir (63). YÜT'lerinde, yeterli sayıda folikül gelişiminin elde edilememesi ve yüksek prematür ovulasyon oranlarının görülmesi nedeniyle ovulasyon indüksiyonunda en sık kullanılan ajan olan CC'ın tek başına kullanımı tercih edilmemekte gonodotropinlerle kombine şekilde kullanımı tercih edilmektedir. (64). Günümüzde deneysel amaçlı yapılan IVF, embriyo transferi ve gen transferi gibi pek çok çalışmada da daha fazla sayıda oosit elde etmek için folikül sayısını ve gelişimini artıran, ovulasyonu sağlayan gonadotropinler eksojen yolla uygulanmaktadır. Bu amaçla genellikle fare, sıçan gibi memelilerde folikül gelişimini uyarmak ve süperovulasyonu sağlamak için pregnant mare serum gonadotropin PMSG kullanılmakta ve uygulamasından 42-48 saat sonra ovulasyon indüksiyonu için hCG uygulaması yapılmaktadır. Bu uygulamalarda deney hayvanlarının ağırlığı, yaşı, gonodotropinlerin uygulanma zamanı ve seksüel olgunlukları elde edilecek oosit sayısını etkileyen önemli faktörlerdendir (65).

1.8.2.2.2. Oosit Toplama İşlemi (OPU)

OPU'daki temel hedef; gerek fertilizasyon gerekse transfer edilecek kaliteli embriyoların elde edilebilmesi için kullanılacak olan yeterli sayı ve özellikteki oositleri temin etmektir. Geçmiş yıllarda genel anestezi altında laparoskopi ile yapılmakta olan OPU işlemi günümüzde transvaginal ultrasonografi (TVUSG) rehberliğinde lokal anestezi ve IV sedasyon altında uygulanmaktadır. OPU'ya başlamadan önce mesane kateterle boşaltılmalı, vajen steril salin ile yıkanmalıdır. OPU'dan yaklaşık 1 saat önce profilaktik antibiotik tedavisine başlanır. OPU uygulaması kolay ve genellikle komplikasyonu az olan bir işlemdir. KOH'nu takiben yapılan hCG enjeksiyonu oosit ile granuloza hücreleri arasındaki hücresel ilişkileri yıkar. Ooplazmadaki kortikal granüller perifere doğru göç etmeye başlar ve oosit I. mayoz bölünmenin profaz evresini tamamlayıp 2.mayoz bölünmenin metafaz evresine geçerek bu evrede kalır. Bu gelişmelerin sonucunda çekirdek zarı yıkılır ve I.kutup cisimciği atılır. Tüm bu olayların gerçekleşmesi için gerekli olan süreç 35-36 saattir. Bu yüzden OPU, hCG enjeksiyonundan yaklaşık 36 saat sonra yapılmaktadır. Transvaginal proba tutturulmuş klavuz içinden ilerlitilen 16-17 G kalınlığında, 25-35 cm uzunluğunda aspirasyon iğnesiyle foliküller en büyük çaptakinden başlanarak yaklaşık 100 mmHg vakum gücü ile ısıtılmış steril tüpe aspire edilir. Elde edilen oositlerin yaklaşık %30 kadarı immatürdür. Metafaz-I oositler, I.kutup cisimciği atmamış ve korona hücreleri daha yoğun olarak gözlenir. Profaz-I oositler ise tamamen immatürdürler, GV'leri ve nukleolusları görünmektedir. Yeterli sayı ve büyüklükte uygun folikül bulunmasına rağmen aspirasyon ile oosit elde edilemeyen durumlarda boş follikül sendromu akla gelmelidir. Bu sendromun en sık nedeni hCG'nin yanlış dozda ve yanlış zamanda uygulanmasıdır (66). İnsanlarda yapılan uygulamaya benzer şekilde büyükbaş hayvanlarda da OPU işlemi uygulanmaktadır.

1.8.2.2.3. Oosit Morfolojisinin Ve Maturasyonunun Değerlendirilmesi

OPU sonrası laboratuvara getirilen aspirasyon materyali mikroskop altında incelenir. Aspirasyon materyali içindeki oositler, kan hücreleri ve pıhtı gibi kalıntılardan arındırılarak toplanır. Oositler yıkama mediumunda birkaç kez yıkandıktan sonra morfolojik olarak değerlendirip sınıflaması yapılır. IVF uygulamaları sırasında fertilizasyon başarısızlığının görüldüğü olgularda oositlerin morfolojik anomalilerinin olduğunun tespit edilmesi konuya olan ilgiyi daha da artırmıştır. Fertilizasyon başarısını artırmak için IVF işlemine alınacak oositlerin morfolojik olarak normal görünüme sahip parlak renkli, oositi kesintisiz çevreleyen, yuvarlak, renksiz, berrak görünümlü ZP, şeffaf veya hafifçe granüler sitoplazma, dar perivitellin aralık içinde fragmente olmayan I. polar cisimle karakterize bir yapıya sahip

olması gereklidir. Bu morfolojik özelliklere sahip oositlerin metafaz-II maturasyonunda olduğu kabul edilmekte ve matür oosit olarak tanımlanmaktadır (67). Korona-kümülüs kompleksinin daha hafif çıkıntılı olduğu, germinal vezikül ve I.polar cisimciğin bulunmadığı oositler intermediate oositler olarak tanımlanmaktadır. Bu morfolojideki oositlerin metafaz-I maturasyonunda olduğu kabul edilir. Metafaz-I oosit uygun kültür ortamında 1-24 saat içinde I. mayoz bölünmeyi tamamlar ve I. kutup cisimciği atılır. 3-5 saat sonra inseminasyon veya injeksiyon yapılabilir. İmmatür oositler çevresinde, ışınal yayılım göstermeyen kümülüs hücreleri, genişleme göstermeyen kompakt korona hücreleri ve germinal veziküle sahiptirler. Matür oositlere göre daha küçük görünümündedirler. Bu morfolojideki oositlerin profaz-I maturasyonunda olduğu kabul edilir. Oosit büyüdükçe başlangıçta gözlenen germinal vezikül kaybolmaya başlar. Germinal vezikülün kaybolduğunun gözlenmesi mayozun tekrar başladığının göstergesidir. İmmatür oositler uygun kültür ortamlarında 24 saat süreyle inkübe edilirse % 80 oranında metafaz-I, metafaz-II aşamalarını tamamlayabilmektedirler (68). CCC hücrelerin miktar ve dağılım düzenlerinin sadece oositlerin maturasyonları hakkında bilgi vermekte olduğu morfolojisi konusunda yeterince aydınlatıcı olmadığı bildirilmiştir (**Tablo 2**)(8).

Tablo 2: Kümülüs korona kompleksine Göre Oosit Maturasyon Sınıflaması (8)

Grade-1 (A)	Kümülüs hücreleri olmayabilir veya seyrek, 1-3 sıralı kalın ve yoğun korona hücreleri içerir.
--------------------	---

Grade-2 (B)	Yoğun görünümlü kümülüs hücreleri ve sıkıca bir arada bulunan korona hücreleri ile karakterizedir.
Grade-3 (C)	3-4 mm çapta gevşek dağılımlı yaygın kümülüs hücreleri ve ışınal dağılımlı korona hücreleri vardır.
Grade-4 (D)	Az sayıda dağınık kümülüs hücreleri vardır. Korona hücreleri azalmaya başlamış olabilir ve dağınıktır.

Tüm oogenezi sırasında oositin yeterliliği bir dizi sürece bağlıdır fakat bunların son basamağı oosit maturasyonudur. Vertebralılarda oosit I.mayotik bölünmenin profazında haftalar, aylar veya yıllar boyunca duraklar. Oosit maturasyonu mayozun kaldığı yerden devam etmesi ile başlar. MPF duraksayan oositteki mayotik bloğun ortadan kalkmasını sağlar. Oosit maturasyonunda görev alan moleküller ve yollar türler arasında farklılık gösterse de MPF'nin rolü aynıdır (8). İmmatur oositte MPF'nin inaktif formda (Pre-MPF) bulunduğu bildirilmektedir (69). İmmatür oositte görülmeyen ve bir protoonkogen olan c-Mos'un, MPF'nin regülasyonunda rol oynadığı ve insan oositlerinde bulunduğu belirtilmiştir (70).Konuyla ilgili yapılmış deneysel hayvan çalışmasında MPF aktivasyonunun germinal vezikülün yıkılımdan (GBVD) hemen önce ortaya çıktığı ve I. mayotik bölünmenin sonunda etkisinin kalktığı daha sonra II. mayotik bölünmenin başında tekrar ortaya çıkarak CSF'nin MPF'yi sabitleyici etkisine bağlı olarak fertilizasyona kadar yüksek kaldığı bildirmiştir (69).

Oositlerin maturasyon derecelerinin belirlenmesi hem in vitro maturasyon sürelerinin hem de fertilizasyon işlemine başlama zamanının ayarlanması için temel kriterdir. Oosit maturasyonunun tamamlanması oositin ovulasyon ve fertilizasyona hazır olmasını sağlar. Oosit maturasyonunun değerlendirilmesi; kümülüs hücrelerinin morfolojisine veya I. kutup cisimciğinin varlığına bakılarak yapılmaktadır. I. kutup cisim morfolojisinin yardımcı üreme teknikleri ile elde edilen embriyoların kalitesinin belirlenmesinde belirteç olabileceği öne sürülmüştür (71,72). Oosit maturasyonu, çekirdek ve sitoplazmik maturasyon süreçlerini içerir. Oositte, GBVD'yi takiben I.mayoz bölünmenin sonuçlanmasıyla I.kutup cisimciğinin atılması ve metafaz-II evresine ilerleyip fertilizasyona kadar bu evrede beklemesini içeren bu süreç oositin çekirdek maturasyonu olarak tanımlanmaktadır (52). Çekirdek maturasyonunun tamamlanma süresi türe özgüdür. İnsanlarda 16-24 saatte tamamlanırken, ineklerde 24-48 saatte tamamlanmaktadır. Oositin çekirdek maturasyonu, fertilizasyon oranında artış ve kaliteli embriyo elde edilebilmesi için gerekli olan sitoplazmik maturasyonla birlikte

gerçekleşmektedir (73). Sitoplazmik maturasyon sırasında, perivitellin boşluğun genişlemesi

Grade-1 (Matür veya Preovulatuvar)	Çok geniş yayılım gösteren kümülüs hücreleri,ışınsal tarzda yayılım gösteren korona radiata, bariz, çok net görülebilen zona pellusida, berrak, parlak, saydam bir ooplazma ve yaygın şekilde bir araya toplanmış genişlemiş granüloza hücreleri gözlenir.
---	--

ve şekillenmesi, mitokondrilerin sayılarının artması ve yapısal değişimleri, oolemmaya doğru göç eden kortikal granüllerin golgi cisimciklerinden sentezi, endoplazmik retikulum ve serbest ribozom sayılarında artış, golgi kompleksindeki artışa bağlı sitoplazmik viskozite artışı, lipid damlacıklarının küçülmeleri ve azalmaları merkezden perifer doğru yönelmeleri gibi bazı değişiklikler görülmektedir. Sitoplazmik maturasyonda mitokondrilerin önemli görevleri vardır. Hücre içi metabolik olaylarda, farklılaşma ve proliferasyon süreçlerinde mitokondriler anahtar rolü üstlenirler (74). Oosit maturasyonu konusunda yapılan bir başka çalışmada, maturasyonun değerlendirilmesi ve oosit sınıflandırılmasının kümülüs hücreleri, korona radiata, ooplazma, ZP ve granüloza hücrelerinin özelliklerine göre yapıldığı bildirilmiştir. Bu sınıflandırmada oosit çevre hücrelerle birlikte değerlendirilmektedir (8).

Tablo 3: Oosit maturasyonunun Çevre Hücrelerle Birlikte Değerlendirilmesi (8)

Grade-2 (Kismen Matür)	Yer yer koyuluklar içeren yaygın kümülüs hücreleri, hafif kompaktlaşma sergileyen korona radiata ve yaygın granüloza hücreleri içerir.
Grade- 3 (immatür)	Eğer varsa koyu ve kompakt kümülüs hücreleri, bir arada bulunan korona hücreleri, görülebiliyorsa ooplazmada germinal vezikül ve kompakt dağılmamış granüloza hücreleri vardır.
Grade-4 (Postmatür)	Kümelenme gösteren ve yaygın kümülüs hücreleri, ışınal yayılım gösteren ve çoğu zaman henüz kümelenmeye başlamış irregüler korona radiata, belirgin görülebilen ZP, hafif granüler ve koyu görünümlü ooplazma, küçük bir alana yayılan tam olarak kümelenme göstermeyen granüloza hücreleri içerir.
Grade-5 (Atretik)	Seyrek kümülüs hücresi, eğer varsa irregüler dağılım gösteren kümelenmiş korona radiata hücreleri, sıklıkla koyu renkli biçimsiz ooplazma, belirgin bir zona pellusida ve küçük kümeler şeklinde izlenen granüloza hücreleri vardır.

1.8.2.2.4. Oosit Maturasyonunda Kullanılan Mediumlar:

IVM'da kullanılacak olan medium hem çekirdek maturasyonu hem de sitoplazmik maturasyonun sağlanmasında etkili olmalıdır. Serum, FSH, LH ve östradiol ilaveli Doku Kültür Medium-199 (TCM-199), Ham's F-10, Eagle'ın Minimal Essansiyel Mediumu ve Chang's mediumu, IVM'da yaygın olarak kullanılmakta olan mediumlardır (75). Ayrıca Ham's F-12, Brinters BMOC-3, MEM, Menezo-B2, KRB, SFRE 199-2 ve Waymouth's mediumu gibi kültür ortamlarına hormon (FSH, LH), serum (Oestrus cow serum, Fetal calf serum), bikarbonat, piruvat, laktat ve antibiyotik ilaveleri yapılarak birçok araştırmada kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda, glukoz, piruvat, laktat, BSA, EGF, FCS, HFF, HPF ve bazı aminoasitlerin farklı miktar ve kombinasyonlarla mediumlara eklenmesiyle elde edilen in vitro kültür ortamlarının oosit maturasyonu üzerine farklı etkilerinin olduğu görülmüş sadece oosit maturasyonunu değil fertilizasyon oranlarını ve embriyonel gelişimi de etkilediği anlaşılmıştır (36,76). Mediumların optimal pH'sının 7,2-7,4 osmolaritenin ise 280-300 mOsm arasında olması istenir. Mediumlara pH indikatörü olarak genellikle fenol red

eklenmektedir. Uzun süreli, CO₂ içermeyen ortamda kalması muhtemel mediumlarda pH'ı dengelemek amacıyla HEPES kullanılabilmektedir (77).

1.8.2.2.5. In Vitro Maturasyon İşlemi (IVM)

Laboratuvara getirilen aspirasyon materyalinde follikül sıvısı, oosit ve çevresindeki hücrelerle birlikte kan bulunabilir. Folikül sıvısı saman sarısı rengindedir. Follikül sıvısı içindeki oositler çıplak gözle görülemeyebilir. Fakat kan içeren aspirasyon materyali içindeki oositler çevresindeki hücrelerle birlikte parlak gri-beyaz renkli yapışkan yapısıyla çıplak gözle kolayca seçilebilir. Aspirasyon materyali laboratuvara getirildiğinde embriyolog tarafından çıplak gözle kontrol edildikten sonra stereomikroskop altında incelenir. Bulunan oositler en kısa sürede kanlı ortamdan kurtararak yıkama mediumuna alınmalı ve birkaç kez yıkanmalıdır. Yıkama işlemi sonrası oositler HEPES tamponlu dış ortam mediumuna alınır ve hızlıca maturasyon değerlendirilmesi yapılarak sınıflandırılır. Oositlerin maturasyon durumlarına göre matür oositler için 2-6 saat, immatür oositler için 12-24 saat maturasyon mediumunda 37°C ve % 5 CO₂'li inkübatörde in vitro maturasyonları gerekir. Matur oositlere IVM uygulanmasının sebebi; OPU işleminden önce yapılan hCG enjeksiyonundan 38-40 saat sonra oositlerin tam matür olduğunun kabul edilmesidir. OPU işlemi hCG enjeksiyonundan 36 saat sonra yapıldığı için OPU ile elde edilen ve yapılan sınıflamada matür oldukları kabul edilen oositlerin yaklaşık olarak 2-6 saat in vitro maturasyonunun yapılması gereklidir. Ancak OPU sonrası in vitro maturasyonları sağlanan bu oositlerin fertilizasyon sonrası gelişim düzeyleri in vivo matür hale gelmiş oositlere oranla daha düşüktür (78,79).

1.8.2.2.6. Semen Özellikleri Ve Semen Analizinde Terminoloji

1.8.2.2.6.1. Semen

Semen (meni ya da ejakulat); seminal plazma, sperm, lökositler, kontamine bakteriler ve hücresel artıklar içerir. Semen hacminin % 10'nunu sperm, % 90'nını seminal plazma oluşturur. Sperm, ejakülatın ilk kısmında bulunurlar. Ejakülatın sıvı bölümünü oluşturan seminal plazma çeşitli salgı bezlerinin (prostat bezi, epididimis, vas deferens, seminal vezikül

ve üretral bezlerin) sekresyonundan oluşan bir karışımdır ve mevsimsel farklılık gösterebilir. Seminal plazmanın 1/3'ü prostat sekresyonundan, 2/3'ü seminal kese sekresyonundan oluşur. Seminal veziküllerin ana sekretuar ürünü olan fruktoz spremelerin temel besin kaynağıdır. Gri-beyaz veya mat-beyaz renkli, vizköz, homojen görünümlü ejakulatın, prostat salgılarından kaynaklandığı düşünülen cinsel perhiz süresine ve enfeksiyon varlığına bağlı olarak değişebilen kendine has bir kokusu vardır. Sperm konsantrasyonu düşükse daha az mat görülür. Ejekulat eritrosit içeriyorsa kırmızı-kahverengi, uzun süreli cinsel perhiz veya vitamin kullanımı varsa sarı renkte görülebilir (80,81). Erkek faktörüne bağlı infertilite olgularında uygulanacak yardımcı üreme tekniğinin seçiminde semen parametreleri temel kriterleri oluşturmaktadır. Semen analizi ve normal semen parametrelerinin standardizasyonu için WHO dünyada en çok kullanılan referans kitaplar haline gelen. “WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen” adlı kitabı yayınlamıştır. Bir önceki basımı 1999 yılına ait olan kitabın beşinci basımı 2010 yılında yapılmış ve semen analizinde birçok parametrenin normal aralıkları değiştirilmiştir. WHO 2010 kitabındaki normal değerler, toplam sekiz ülkede bir yıllık evlilik süresinde eşleri hamile olan 900'ün üzerinde fertil erkeğin semen örnekleri incelenerek saptanmıştır.

1.8.2.2.6.2. Normal Semen Parametreleri :

Semen analizi, WHO 2010 kriterleri dikkate alınarak donanımlı laboratuvarlarda deneyimli kişiler tarafından en az iki kez yapılmalıdır. iki örnek arasında geçen zaman en az 1 hafta, en fazla 3 hafta olmalıdır. Sonuçlar birbirinden çok farklı ise üçüncü bir değerlendirme yapılması gerekir Fertilite başarısında tüm parametrelerin klinik önemi olmakla birlikte gebelik oranlarını etkileyen en önemli parametre toplam hareketli sperm sayısıdır (82).

Tablo 4: 1999 ve 2010 WHO kriterlerine göre normal semen parametreleri (82,83).

PARAMETRE	WHO 1999	WHO 2010
Semen Hacmi (ml)	≥ 2	1,5
Toplam Sperm sayısı (Ejakulat)	40 milyon	39 milyon (33-46 milyon)
Sperm Sayısı / ml	20 milyon	15 milyon (12-16 milyon)
Toplam Hareketli Sperm (a+b+c)	-----	> % 40

Toplam Progressif Hareketli (a+b, İleri hareketli sperm)	> % 50	> % 32
Vitalite (Canlı Sperm)	> % 75	> %58
Sperm Morfolojisi (Normal form)	> % 15	> % 4
pH	≥ 7.2	≥ 7.2
Peroksidaz (+) Lökosit / ml	< 1 milyon	< 1 milyon

1.8.2.2.6.3. Semen Analizinde Terminoloji :

- **Normozoospermia:** Normal semen
- **Aspermia:** Semen olmaması
- **Azoospermia:** Semende sperm olmaması
- **Oligozoospermia:** Semende sperm konsantrasyonunun 20 mil/ml den az. olması
- **Teratozoospermia:** Normal morfolojideki spermilerin %50'den az olması
- **Asthenospermia:** İleri progresyon 3. ve 4. derecede olan spermier %50'den az

1.8.2.2.7. Semen Örneğinin Toplanması

Semen örneği 3-5 günlük cinsel perhiz sonrası steril şartlarda mümkünse bu amaçla düzenlenmiş sperm verme odaları kullanılarak mastürbasyonla, toksik madde içermediği kanıtlanmış steril kaplara alınmalıdır. Ejakulatın tamamının örneklem kabına alınmasına dikkat edilmeli, örnek toplanması sırasında krem ya da kayganlaştırıcı bir madde kullanılmamalıdır. Yapılan araştırmalarda kısa süreli cinsel perhizde semendeki sperm sayısının az olduğu, uzun süreli cinsel perhizde ise sperm motilitenin düşük olduğu gözlenmiştir. Semen örneği laboratuvar dışında toplanmışsa laboratuvara getirilirken 20-37°C arasında tutulmalı ve bir saat içinde laboratuvara ulaştırmalıdır. Semen toplanması için özel kondomlar kullanılabilmektedir ancak lateks kondomlar kullanılmamalıdır (82).

1.8.2.2.8. Sperm Hazırlama Yöntemleri

OPU işlemi yapılmadan önce erkekten mastürbasyon yoluyla semen örneği alınır. Eğer ejakülatta sperm yoksa MESA, TESA, PESA, TESE gibi cerrahi yöntemler kullanılarak

sperm elde edilmeye çalışılır. Ayrıca daha önceden dondurularak saklanmış olan spermelerde çözündürme işlemi sonrası kullanılabilir. Spermin fertilizasyon yeteneği kazanabilmesi için kapasitasyon sürecini tamamlaması gerekmektedir. Sperm kapasitasyonu cinsel ilişki sonrası 5-6 saat içinde kadın genital kanalında tamamlanır. Doğal ilişki sırasında sperm servikal mukus içerisinden geçerken seminal plazmadan fizyolojik bir filtrasyon ile ayrılır. İn vitro şartlarda spermin kapasitasyonunun gerçekleşebilmesi için semende bulunan dekapasitan faktörlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için IVF işlemi öncesi uygulanan sperm hazırlama işlemi sırasında kullanılmak üzere glukoz kalsiyum, piruvat, heparin, laktat, albumin serum veya foliküller sıvı içeren uygun mediumlara ihtiyaç duyulur. BWW, Hams F-10, HTF gibi solüsyonlar sperm hazırlamada kullanılmaktadır. Sperm bu solüsyonlarla yıkanarak semenden ayrılır ve uygun şartlardaki kısa süreli inkübasyon ile dişi üreme kanalı olmadan in vitro ortamda da kapasitasyonunu gerçekleştirebilir. Sperm hazırlama yöntemlerinin primer amacı, semen içindeki spermi, seminal plazma ve kontamine bakterilerden kurtarmak, semen örneğindeki gerek morfolojik gerekse hareket özellikleri açısından en iyi olan spermleri ayırt edebilmek ve bunların kapasitasyonuna yardımcı olabilmektir. Bu amaçla günümüzde sperm hazırlanmasında basit yıkama, swim-up, swim-down, density gradient centrifugation (yoğunluk farkı ve santrifüj) ve filtrasyon (glass-wool) yöntemleri uygulanmaktadır (82,84).

1.8.2.2.8.1. Basit Yıkama Yöntemi

Konik tüp içerisinde 1/2 volüm oranında sperm yıkama mediumu ile karıştırılan likefiye olmuş semen 300 g'de, 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki supernatant kısım atıldıktan sonra 1ml medyum eklenerek 300 g'de, 3 dakika birkez daha santrifüj edilir. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan supernatant atılır ve dipte kalan pellet 0,5 ml medium ile resüspanse edilerek kullanılır. İleri derecede oligozoospermi olgularında sadece 1 kez santrifüj yapılmalıdır. Bu teknikle yüksek sperm konsantrasyonu elde edilebilir ancak motilite oranı yüksek değildir. Pellet içerisinde hücresel artıklar ve ölü sperm kalabileceğinden yalnızca sperm hücrelerinin izolasyonunu sağlar. En basit sperm hazırlama yöntemidir. Bu yöntemin avantajı çabuk ve ucuz olmasıdır ancak yardımcı üreme tekniklerinde tek başına yıkama yöntemi uygulaması tercih edilmez.(83)

1.8.2.2.8.2. Swim-down Yöntemi

Bu yöntemde konik tüp içerisine dansitesi seminal sıvıdan daha fazla olan bir solüsyon konulur. Yıkama aşamasından geçirilen semen örneği bu solüsyonun üzerine katmanlandırılıp 37°C de 1 saat süreyle %5 CO₂'li ortamda 45° eğimli pozisyonda inkübe edilir. İnkübasyon sonunda dipteki sıvının 3/4'ü pipetle alınarak sayım yapılır ve inseminasyon için kullanılır (8).

1.8.2.2.8.3. Swim-up Yöntemi

Bu yöntemde esas amaç, hareketli sperm hücrelerinin hareketsiz olanlardan ayrılmasını sağlamaktır. İçinde 1,2 ml medyum bulunan konik tüpün dip kısmına 1 ml semen örneği dağılmayacak şekilde yerleştirilerek 37°C de 1 saat süreyle %5 CO₂'li ortamda 45° eğimli pozisyonda inkübe edilir. Hareketli sperm bu süreçte yüzerek tüpün üst kısmına ulaşırlar. İnkübasyon sonunda üstteki 1 ml 'lik medyum + hareketli spermlerden oluşan süspansiyon pipetle alınır ve üzerine 2 ml medyum eklenerek 300 g'de 5 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrası pellet 0,5 ml medyum ile tekrar süspansiyon edilerek kullanıma hazır hale getirilir. Swim-up yönteminde çok miktarda progresif hareketli sperm elde edilmekle birlikte sperm sayısında önemli ölçüde düşüş görülmektedir. Bu yöntemin dezavantajı ileri derecede oligozoospermi ya da astenozoospermi olgularında yeteri kadar sperm elde edilememesidir (83).

1.8.2.2.8.4. Gradient Yöntemi

Yoğunluk farkı ve santrifüjü temel alan yöntemin uygulamasında ilk kullanılan solüsyon ficol olmuştur. Daha sonraları polivinilprolidon kaplı silika partiküllerden oluşan perkol kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemde temel amaç, canlı spermilerin, ölü olanlardan ayrılmasıdır. Ölü spermilerin ağırlıkları canlı olanlardan daha az olduğu için, yoğunlukları farklı iki tabaka oluşturarak bunları ayırmak mümkündür. Bunun için %80 ve %40'lık veya %90 ve %45'lik 1'er ml perkol yoğunluğu fazla olan altta olacak şekilde konik tüp içine yerleştirilerek 2 katman oluşturulur. Konik tüpün en üst kısmına yine katman oluşturacak biçimde 1ml ejakülat yayılarak 300-400g'de 15-30 dakika süreyle santrifügasyon yapılır. Santrifüj işlemi sonrası ölü sperm hücreleri iki perkoll katmanı arasında kalır, tüpün dibinde progresif hareketli sperm yönünden zengin pellet toplanır. Supernatant kısım atıldıktan sonra pellet pipetle alınır, 5 ml medium eklenerek 200g'de 4-10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj

sonrası dipte kalan pellet 0.5 ml medium ile resüspanse edilerek kullanılmaya hazır hale getirilir (83). Ayrıca bu yöntemde %90, %70 ve %50'lik gradient solüsyonu kullanılarak 3 tabakalı uygulama da yapılabilir.

1.8.2.2.8.5. Filtrasyon Yöntemi:

Filtrasyon yönteminin temel prensibi; ölü, anormal membranı olan, yavaş hareketli veya hareketsiz spermlerin yüzeylere yapışma özelliğinin kullanılmasıdır. Hücre artıklarının ve yabancı hücrelerin uzaklaştırılması ve progresif hareketli spermlerin ayrıştırılması hedeflenir. Sperm, glass wool (cam yünü) veya polisakkarit (sephadex) taneciklerinden oluşturulan katmanlardan filtre edilir (85,86). Bu yöntemde 15 mg glass-wool, 1 mm'lik enjektör tabanından 3 mm yükseklikte olacak şekilde yerleştirilerek 2 kez medium ile yıkanır. Bu sırada 37°C'de likefiye olmuş ejakulat 1/1 oranında medium ile dilüe edilerek 1600 rpm'de 5 dakika süre ile santrifüj edilir. Üstteki süpernatant atıldıktan sonra pellete 0,5 ml medium eklenir ve daha önceden mediumla yıkanmış olan glass-wool üzerine konularak filtrasyon işlemi tamamlanana kadar 37°C'deki %5 CO₂'li inkübatörde bekletilir. İnkübasyon işlemi sonrası glass wool katmanları 0,2 ml mediumla tekrar yıkanır ve elde edilen filtrat kullanılır. Glass-wool filtrasyon yönteminin uygulamasında farklı şekillerde dizayn edilmiş glass-wool katmanları oluşturulabilmektedir (87).

Bu yöntemin kolay hazırlanabilir olması, yeterli sayıda progresif hareketli sperm elde edilebilir olması gibi olumlu yönleri olmakla birlikte pahalı olması, spermlerde hasar oluşabilmesi, spermler arasında cam yünü lif artıklarının bulunabilmesi gibi olumsuz yönleride vardır. Sperm hazırlama yöntemleri arasında hangi yöntemin en iyisi olduğu konusunda tam bir görüş birliğine henüz varılamamıştır. Hastaya ve yapılacak uygulamaya (IUI, IVF veya ICSI) göre sperm hazırlama metodunun seçilmesi tavsiye edilmekle birlikte (88) günümüzde en çok uygulanmakta olan yöntemler swim-up ve gradient (perkoll) yöntemidir. Ancak unutulmamalıdır ki her yöntemin kendisine göre avantajları olduğu gibi dezavantajları da vardır.

1.8.2.2.9. IVF Uygulaması ve Embriyo Gelişimi

Başarılı bir IVF uygulamasında temel koşul, oosit maturasyonun sağlanması, uygulamada kullanılacak nitelikte spermlerin hazırlanarak en uygun zamanda inseminasyon

işleminin yapılmasıdır. Bunun için KOH'nu takiben yapılan OPU işlemi sonrası elde edilen ve yıkama mediumuna alınan oositler, maturasyon değerlendirmesi yapıldıktan sonra uygun kültür ortamlarında inkübatöre alınırlar. Matür oositler ortalama 3-4 saat, immatür oositler 12-24 saat süreyle inkübe edilirler. Oositlerin maturasyon derecelerinin belirlenmesi inseminasyonun doğru zamanda yapılabilmesi açısından önemlidir. Matür oositlerde inseminasyon işlemi, OPU'dan 3-4 saat sonra yapılırken, immatür oositlerde daha geç yapılmaktadır. Postmatür oositlerde ise inseminasyon işleminin hemen yapılması tavsiye edilmekte, diğer oositlerle birlikte yapılması halinde dejenere olabileceği veya poliploidi görülebileceği belirtilmektedir. İnseminasyon IVF uygulamasının en önemli aşamalarından birisidir. Kullanılacak olan spermin motilitesi, morfolojisi ve sayısı fertilizasyon başarısında direkt etkilidir. İnseminasyondan 2 saat önce semen örneği toplanır ve değerlendirmesi yapıldıktan sonra uygun bir yöntemle sperm hazırlama işlemi gerçekleştirilir. Motilite ve konsantrasyon değerlendirmesi yapılarak 37°C'deki %5 CO₂'li inkübatörde en az 30 dakika inkübe edilir. Bu sürenin sonunda, maturasyonlarını tamamlamaları için daha önceden inkübatöre alınmış olan oositler inkübatörden çıkartılır. Maturasyon durumları tekrar değerlendirilerek önceden hazırlanan ve inkübatörde bekletilen inseminasyonun yapılacağı kültür ortamına aktarılırlar. İnseminasyon işleminden hemen önce spermler inkübatörden çıkartılarak tekrar değerlendirilir. İnseminasyonda kullanılacak miktar, oosit başına 50000 motil sperm/ml olacak şekilde hesaplandıktan sonra micropipetle alınır ve oositlerin üzerine yavaşça bırakılarak inseminasyon işlemi tamamlanır. İnseminasyon işlemi sonrası oosit ve spermlerin bulunduğu kültür kabı uygun şartlardaki inkübatöre kaldırılır. Klasik IVF uygulamalarında inseminasyondan 16-20 saat sonra, inkübatörden çıkarılan ve HEPES veya MOPS tamponlu medium içine alınan oositlere 190 mm çaplı steril ince pipetler yardımıyla dekoronizasyon (oositin kümulus-korana-kompleksinden temizlenmesi) işlemi yapıldıktan sonra fertilizasyon kontrolü yapılır (52). Oosit sitoplâzmasında erkek ve dişi pronükleusun görülmesi, I. ve II. polar cisimciğin saptanması, fertilizasyonun gerçekleştiğini gösteren bulgulardır. IVF uygulamalarında immatür veya postmatür oosit kullanımı, inseminasyonda kullanılan spermlerin in vitro kapasitasyonlarını gerçekleştirememiş olması, kullanılacak olan sperm miktarının yanlış hesaplanması ve inkübatör şartlarının uygun olmaması gibi durumlarda fertilizasyon gerçekleşmeyebilir. Fertilizasyonun inseminasyondan 48 saat sonra gözlenmesi, gecikmiş fertilizasyon olarak tanımlanır ve bu şekilde gelişen zigotların embriyonik gelişim potansiyellerinin düşük olduğu belirtilmektedir (8). Fertilizasyon kontrolü HEPES tamponlu medium içinde yapılıyorsa oositler 5 dakika sonra yeni mediuma aktarılmalıdırlar. MOPS tamponlu medium daha uzun süre dış ortamda çalışma olanağı

sağlamaktadır. Fertilize olmuş oosit embriyo kültüründe kullanılacak olan mediumla en az 2 kez yıkandıktan sonra kültür vasatına alınır (52). İnseminasyondan 20-34 saat sonra dişi ve erkek pronükleusların birleşmesi ile singami oluşur. Bunu takiben ortalama 35,6. saatte sitoplâzmanın ikiye bölünmesiyle zigot iki blastomerli embriyo haline gelişir. Kültür mediumunda bulunan embriyolar inseminasyondan ortalama 45,5-45,7 saat sonra 4 blastomerli, 54,3-56,4 saat sonra 8 blastomerli aşamaya gelirler. Embriyonun bölünmesi sırasında her yeni bölünme sonrası oluşan blastomerler bir öncekinden küçüktür bu yüzden embriyo hacminde bir artış görülmez. Blastomerlerin bölünmesi sırasında asenkronizasyon olabildiği için 5 ve 7 blastomer içeren embriyolarda görülebilmektedir. Blastomerlerin herbiri totipotent özelliktedirler ve embriyoyu oluşturacak herhangi bir dokuya ait hücrelere farklılaşabilirler. İnsanlarda, embriyonun dört blastomerli evreden sekiz blastomerli evreye geçişi sırasında maternal genomun etkinliği sona erer ve embriyonik genom aktivasyonu başlar (8). Embriyonik genomik aktivasyonun başlama zamanı türler arasında farklılık gösterir. Kara kurbağasında blastula, farede 1-2 hücre, sığırdan 9-16 hücre aşamalarında (89) domuzda 4 hücre aşamasında (90) embriyonik genomik aktivasyon başlar. Fertilizasyondan sonraki 4. günde, blastomerler arasında gevşek ve sıkı bağların olduğu embriyonun kompaktlaşmaya başladığı döneme morula dönemi adı verilir. Morula evresinde hücreler arasında kavite olduğu zaman embriyo blastosist adını alır. İnseminasyondan sonraki 5.-7.günlerde in vitro blastosist gelişimi görülür. Kavite ile birlikte blastomerlerin kutuplaşmasıyla ICM ve TE olarak adlandırılan iki farklı hücre grubu belirginleşmeye başlar, embriyo erken blastosist adını alır. Blastosist hacim olarak büyür, genişlemeye başlar ve genişleyen blastosist (expanded blastosist) adını alır. Genişleyen blastosistin ZP'da açılan delikten çıkmasına hatching, 6-7.günlerde tamamen dışarı çıkmasıyla oluşan blastosiste ise hatch olmuş blastosist denir (8). YÜT ile elde edilen embriyoların gelişim süreçleri, bölünme hızları, morfolojik özellikleri, gerek embriyo kalitesi ve implantasyon potansiyellerinin belirlenmesinde gerekse klinik gebelik başarısının artırılmasında etkili olan dikkate alınması gereken faktörlerdir.

1.8.2.3. ZONA DRİLLİNG (ZD) VE PARSİYEL ZONA DİSSEKSİYONU (PZD)

ZP, bileşiminde sülfatlanmış glikoproteinler bulunan, fertilizasyon ve embriyo gelişiminde çok sayıda fonksiyonu olan asellüler bir yapıdır. Fertilizasyondan sonra zona pellüsidanın ana görevi embriyonun bütünlüğünün korunmasıdır. Gerek fertilizasyon için oosit içine yapılacak girişimler gerekse embriyo içine yapılacak tanı amaçlı girişimlerde bu glikoprotein yapının delinmesi gerekmektedir (91,92).

ZD tekniği ilk kez 1986 yılında Gordon ve Talasky tarafından uygulanmıştır. ZD'in insan infertilitesinde ilk kullanım alanı spermin ZP'yi kolayca geçmesini sağlayacak uygulamalara yönelik olmuştur. Günümüzde ise en çok kullanım alanı PGT amacı ile yapılan blastomer biyopsileridir. Daha sonraki yıllarda ZD tekniğinden yararlanılarak ucu sivri bir mikropipet yardımı ile ZP'da düz, ince bir yarık açılmasına dayanan PZD tekniği geliştirilmiştir. YÜT'leri açısından PZD uygulamasının amacı ZP'da mikromanplasyonla mekanik olarak suni bir delik oluşturup fertilizasyon için oosite ait bir engeli ortadan kaldırmaktır. Bu teknikte oosit holding pipet tarafından sabitlenir ve saat 1 hizasından çok sivri uçlu bir mikropipet oosite sokularak saat 11 hizasından çıkartılır. Daha sonra holding pipet gevşetilererek oosit serbestleştirilir. Mikropipete takılı olan oosit holding pipet üzerinde bira kez ileri geri hareket ettirilip ZP üzerinde kesi oluşturularak delik açılır. Oosit bu işlemden sonra sperm solüsyonunun içine bırakılır. Böylece sperm için oositteki en önemli engel olan ZP daha kolay aşılmış olur. PZD uygulaması sonrası fertilizasyon ve gebelik oranlarının düşük olması ve ICSI tekniğiyle daha başarılı sonuçlar elde edilmesi nedeniyle günümüzde PZD tekniği infertilite tedavilerinde kullanılmamaktadır (93,94).

1.8.2.4. SUBZONAL SPERM ENJEKSİYONU (SUZI):

Erkek infertilitesi açısından alternatif bir tedavi seçeneği olan SUZI, ZP'ya bağlanmadan mikromanplatr aracılığı ile bir veya bira spermin zona altına, perivitellin aralığa yerleştirildiği remeye yardımcı bir tekniktir. Tek bir spermin, oolemma ile füzyonu sonrası erkek pronükleus oluşturabilme oranı % 14'dr. Bu yüzden fertilizasyon oranının arttırılabilmesi için daha fazla sayıda sperm kullanılması gerekmektedir. Ancak oluşabilecek polispermi riski gözönüne alındığında uygulanacak sperm sayısının 20'den az olmasına dikkat edilmelidir. Çünkü 20 civarında sperm uygulamasında polispermi oranı %50'yi geçebilir. İlk kez SUZI uygulaması yapılacak olgularda sperm sayısı en fazla 8'le sınırlandırılmalıdır. Genellikle böyle durumlarda 3-7 arası sperm yeterli olmaktadır. Eğer SUZI uygulaması için çok sayıda oosit varsa veya önceki uygulamada başarısız olunmuşsa 8'den fazla sperm denenebilir. SUZI uygulaması sırasında spermler ICSI'deki gibi PVP içine konulmaz. SUZI yöntemiyle ilk canlı doğum Mann tarafından farelerdeki çalışmalarda elde edilmiştir. Sonraki yıllarda insanlarda da çok sayıda canlı doğum gerçekleşmiştir. Sığırlarda sınırlı sayıda SUZI alışması yapılmış ve fertilizasyon oranları düşük bulunmuştur. SUZI tekniği kullanılan sperm sayılarına bağlı polispermi riski, istenilen fertilizasyon oranlarının elde edilememesi ve ICSI uygulamalarının yaygın olarak hayata geçmesine bağlı olara, daha çok fertilizasyon için gerekli mekanizmaların aydınlatılması amacıyla kullanılmıştır (95,96).

1.8.2.5. İNTRASİTOPLAZMİK SPERM ENJEKSİYONU (ICSI)

Mikromanipulator yardımıyla enjeksiyon pipeti içerisine alınan tek bir spermin, ZP ve oolemma bariyerlerinden mekanik olarak geçirilerek doğrudan oosit sitoplazmasına aktarılması olan ICSI yöntemi günümüzde şiddetli erkek infertilitesinde en etkin yardımcı üreme tekniğidir. ICSI yöntemi ile elde edilen ilk canlı doğum tavşanlarda bildirilmiş daha sonra fare ve sığırlarda canlı doğum gerçekleştirilmiştir (97). Yapılan çalışmalarda sığır oositlerinin ICSI sürecine fare ve tavşan oositlerine oranla daha az duyarlı olduğu, sperm enjeksiyonu sonrası sığır oositlerinin ancak %2'sinin aktive olması nedeniyle elde edilen canlı embriyo oranlarının diğer türlerden daha düşük bulunduğu belirtilmiştir (98). ICSI tekniği ile sadece başı olan sperm, hareketsiz, ölü veya kusurlu sperm kullanılarak kapasitasyon ya da akrozom reaksiyonuna gerek kalmadan fertilizasyonun sağlanabildiği bildirilmiştir (96). Büyükbaş hayvanlarda ICSI tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada in vitro şartlarda maturasyonu sağlanan oosit sitoplazmasına ölü sperm enjekte edilerek embriyo gelişiminin sağlandığı, bu embriyonun transferi sonrası sağlıklı, canlı ve normal bir buzağının doğduğu belirtilmiştir (99). ICSI tekniğinin avantajı sonuçlarının kullanılan spermin sayısı, motilitesi ve morfolojisine bağlı olmamasıdır. Bu yöntemin en önemli komplikasyonu uygulama sırasında oluşabilecek oosit hasarıdır. İnsanlarda ICSI tekniği kullanılarak ilk elde edilen gebelik 1992 yılında gerçekleştirilmiştir (100).

Günümüzde ICSI tekniği ile elde edilen başarılı sonuçlar tekniğin endike olduğu durumlar dışında da uygulanmasına ve aşırı kullanımına neden olmaktadır. Travmatik bir işlem olan ICSI tekniğinin insanlarda yaklaşık 20 yıllık bir geçmişe sahip olduğu düşünülürse yöntemin güvenliği klinik araştırmalar ile tam anlamıyla test edilene kadar endikasyonları çerçevesinde uygulanmasına dikkat edilmelidir.

Tablo 5: ICSI Endikasyonları (101-103).

Daha önceki klasik IVF denemelerinde fertilizasyon başarısızlığı görülen olgular
Epididimal veya testiküler sperm örneklerinin kullanımı gereken durumlar
Şiddetli Oligo-Astheno-Teratozoospermi varlığı
Yüksek titrede antisperm antikor varlığı
Kötü sürvi gösteren dondurulmuş sperm kullanılması gereken olgular
Hiperstimülasyon sonucu gelişen oosit sayısının < 3 olduğu durumlar

Young sendromu
İmmotil Silya Sendromu

I

CSI işleminde kullanılan spermier taze ejakulattan uygun sperm hazırlama yöntemleriyle elde edilebildiği gibi PESA, TESA, TESE ve mikrocerrahi ile MESA gibi cerrahi yöntemler kullanarak testis veya epididimiden de elde edilebilmektedir. Ayrıca daha önce dondurulmuş olan spermierde uygun şartlarda çözdürüldükten sonra ICSI işleminde kullanılmaktadır. ICSI işleminde kullanılan oositler I.kutup cisimciği görünen metafaz-II evresindeki matür oositlerdir. ICSI işlemine başlamadan önce aspirasyon yöntemi ile toplanan ve en az 2 kez yıkama yapılan oositlerin matür olup olmadıklarını anlamak için oositi çevreleyen kümülüs hücreleri enzimatik yolla oositten uzaklaştırılır ve I.kutup cisimciği kontrol edilir. Matür oositler seçilerek petri kabında damlacık şeklinde hazırlanmış olan medyuma aktarılır. Spermin hareketini yavaşlatarak pipete çekilmesini kolaylaştırmak amacı ile kullanılan spermierin konulacağı PVP damlacık şeklinde aynı petri içerisinde oositlerin bulunduğu damlacığın karşısına hazırlanır. İçerisine spermier konularak damlacıkların üzeri mineral yağ ile kapatılır. Oosit holding pipetle tutularak I.kutup cisimciği saat 6 veya 12 yönünde olacak şekilde sabitlenir. Mikroenjeksiyon işleminde kullanılan normal morfolojiye sahip, motil sperm mikroenjeksiyon pipetine alınır. Sperm, pipetin ucu ile boyun kısmına yakın bir bölgede immobilize edilir. Kuyruğa doğru pipet ucu ileri geri hareket ettirilerek sperm kendi etrafında döndürölürken ani bir hareketle kuyruğun kıvrılarak kırılması ve sperm membranının zedelenmesi sağlanır. Daha sonra mikroenjeksiyon pipetiyle saat 3 yönünde ZP ve oolemma aşılaraq ooplazma içine yavaşca girilir ve çok az miktarda ooplazma aspire edilir. Mikroenjeksiyon pipeti içerisinde ooplazmanın ve geriye doğru hareket eden spermin görülmesi oolemmının aşıldığının göstergesidir. Ooplazmanın içine girildiğinden emin olununca aspire edilen ooplazma ve spermin geri verilmesiyle işlem tamamlanır. Mikroenjeksiyon sonrası oositler 3 kez pipetlenerek Hepes'li solüsyonda temizlendikten sonra uygun medium ve inkübatör şartlarında fertilizasyon amacıyla 12-18 saat süreyle inkübatöre kaldırılır. ICSI uygulaması sırasında insan ve fare oositlerinde herhangi bir aktivasyon işlemine gerek duyulmaksızın embriyo ve canlı doğum elde edilebilirken sığır oositlerinde aktivasyon işlemi uygulanmadan ancak %2 oranında embriyo elde edilebildiği, sığırlarda ICSI uygulamalarında normal fertilizasyon olayının (pronükleer formasyon) gerçekleşebilmesi için oosit aktivasyon yöntemlerine ihtiyaç duyulduğu bildirilmiştir (98,104).

1.8.2.6. EMBRİYO KALİTESİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ VE EMBRİYO TRANSFERİ

1.8.2.6.1. Embriyo Kalitesinin Değerlendirilmesi :

Yardımcı üreme teknikleri ile elde edilen embriyolar bulundukları evreye özgü bazı parametreler dikkate alınarak değerlendirilirler.

Tablo 6: Farklı evredeki embriyoların değerlendirme parametreleri (8).

EVRELER	PARAMETRELER
Pronükleer Evre	▪ Pronükleusların pozisyonu ve boyutu ▪ Nükleolar Prekürsor Body'nin sayısı, büyüklüğü, dağılımı ▪ Kutup cisimciklerinin yerleşimi ▪ Sitoplazmik halonun varlığı
Bölünme Evresi	▪ Erken bölünme ▪ Bölünme hızı ▪ Blastomer büyüklüğü ▪ Fragmentasyon derecesi ▪ Blastomerlerin nuklear özellikleri ▪ Sitoplazmik görünüm ▪ Perivitellin alan ve zona pellusida özellikleri ▪ Erken kompaktlaşma
Blastosist Evresi	▪ Blastosel büyüklüğü ▪ İç hücre kitlesinin özellikleri ▪ Trofoektodermal hücrelerin özellikleri

YÜT'leri uygulamalarında başarının gerçek göstergesi eve götürülen canlı bebek oranıdır. Başarılı sonuçların alınmasında en kritik faktör transfer edilecek olan embriyonun kalitesidir (105). Gerek IVF gerekse ICSI uygulamaları ile elde edilen embriyoların kalitesi; transfer edilecek embriyonun bulunduğu güne uygun hücre sayısına sahip olup olmadığına, hücrelerin eşit büyüklükte olup olmamasına, sitoplazmik özelliklerine, fragmentasyon varlığı ve bunun embriyo hacmine göre oransal yüzdesine bakılarak değerlendirilmektedir (38). Veeck, L.L. fragmentasyon oranları ve blastomer özelliklerine göre embriyo kalitesini 5 alt birimde sınıflamıştır (106).

Tablo 7: Fragmentasyon oranları ve blastomer büyüklüğüne göre embriyo kalitesinin sınıflaması (106).

Grade-1	Fragmentasyon içermeyen, Eşit büyüklükte blastomerlere sahip embriyolar
Grade-2	%10 oranında fragmentasyon içeren, Eşit büyüklükte blastomerlere sahip embriyolar
Grade-3	Değişen oranlarda fragmentasyon içeren ve Farklı büyüklükte blastomerlere sahip embriyolar
Grade-4	%10 'dan fazla fragmentasyon içeren ve eşit büyüklükte veya Farklı büyüklükte blastomerlere sahip embriyolar
Grade-5	%50 'den fazla fragmentasyon içeren ve Farklı büyüklükte blastomerlere sahip embriyolar

Fragmentasyon oranları dikkate alınarak yapılan embriyo kalite sınıflamasında, embriyoların iyi, orta ve zayıf kalite olmak üzere 3 grupta değerlendirildiği bildirilmiştir (107).

Tablo 8: Fragmentasyon oranlarına göre embriyo kalite sınıflaması (107).

İYİ KALİTE (Grade-1)	Fragmentasyon içermeyen, eşit sayı ve büyüklükte blastomere sahip embriyolar
ORTA KALİTE (Grade-2)	Embriyo hacminin %30'undan az fragmentasyon içeren embriyolar
ZAYIF KALİTE (Grade-3)	Embriyo hacminin %30'undan fazla fragmentasyon içeren embriyolar

Fragmentasyon, canlı olmayan hücre artıklarıdır. Fragmentasyon arttıkça, embriyo kalitesi (grade) düşer ve gebelik şansı azalır. Ancak unutulmamalıdır ki morfolojik olarak iyi kaliteli embriyo, her zaman sağlıklı bir bebek için ideal genetik ve biyokimyasal içeriği göstermeyebilir. Embriyoların kalitelerine göre sınıflandırılması sadece transfer edilecek embriyoların belirlenmesinde değil aynı zamanda dondurularak saklanacak olan embriyoların seçiminde de önemli bir kriterdir.

1.8.6.2.2. Embriyo Transferi (ET) :

IVF ve ICSI gibi yardımcı üreme teknikleriyle elde edilen embriyoların steril bir kateter aracılığıyla uterusu bırakılmasına ET denir. Uygun şartlardaki inkübatörde kültür edilen embriyolar transfer günü inkübatörden çıkarılarak son bir kez daha değerlendirilir. Bu sırada 2 saat süreyle etüvde ısıtılan transfer kateteri etüvden çıkartılır ve 1 ml transfer medyumunu ile yıkanır. Kateterin ucuna Hamilton enjektörü takılarak önce hava, ardından 5µL medyum ve tekrar hava çekildikten sonra kültür petrisi içinde bulunan embriyolar yaklaşık 10µL medyum ile katatere çekilir. Daha sonra 10 µL hava çekilerek kateterin iki ucunda hava bulunması sağlanır. Kataterin iki ucunda bulunan hava transfer sırasında embriyoların hava basıncıyla rahatça uterus boşluğuna verilmesini sağlar. Katater, ultrasonografi eşliğinde yavaşça serviksten geçirilerek uterus boşluğuna ulaşılır ve embriyolar bırakılır. Embriyo transferi genellikle inseminasyondan yaklaşık 40-48 saat sonra embriyo 2-8 hücre aşamasında iken yapılmakla birlikte pronükleer fazdan, blastosist oluşumuna kadar herhangi bir dönemde de yapılabilmektedir (108). Blastosist transferinin klinik gebelik oranlarını

belirgin bir şekilde arttırdığını iddia eden yayınlar olduğu gibi anlamlı bir farklılık olmadığını bildiren yayınlarda vardır (109,110). Embriyoların geç dönem transferlerinin en büyük avantajı, daha iyi gelişim gösteren embriyoların seçilebilmesine olanak sağlamasıdır. Ancak embriyoların büyük bir bölümünün uzayan in vitro kültür sürecinde blastosist evresine gelememesi ve dejenere olması nedeniyle transfer işleminin daha erken dönemlerde yapılması gerektiğini savunan görüşlerde vardır. Son yıllarda çoğul gebelikleri önlemek amacıyla transfer edilen embriyo sayısına getirilen kısıtlamalar nedeniyle transfer edilecek olan embriyonun seçimi daha da önem kazanmıştır. Embriyo transferinde embriyonun evresi ve kalitesi, embriyo transfer tekniği ve endometriyal reseptivite transfer sonrası gebelik başarısını etkileyen önemli parametrelerdir (8).

1.8.2.7. Kriyoprezervasyon ve Kriyoprotektanlar

Hücrelerin ve dokuların canlılıklarını kaybetmeden, kriyoprotektanlar kullanılarak düşük sıcaklıklarda dondurulup saklanmasına kriyoprezervasyon denir (111).

Kriyoprotektanlar dondurma-çözündürme işlemlerinde hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan toksik etkileri olabilen kimyasal maddelerdir. Hücreye penetrasyon kapasitelerine göre hücre membranından geçebilen (Permeabl) intrasellüler kriyoprotektanlar ve hücre membranından geçemeyen (Non-Permeabl) ekstrasellüler kriyoprotektanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (8). İntrasellüler kriyoprotektanlar, hücre içi su ile yer değiştirir ve dehidrasyonu sağlar. Donma ve çözünme sürecinde hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engelleyerek hücre yapısının korunmasını sağlarlar (112). Dondurma solüsyonlarının içerisinde en az bir tane intrasellüler kriyoprotektan bulunmalıdır (113).

Ekstrasellüler kriyoprotektanlar tek başlarına kriyoprotektan olarak kullanılmazlar hücre membranındaki fosfolipidlerin stabilizasyonunu ve kontrollü dehidrasyon oluşumunu sağlarlar (8). Diğer kriyoprotektanlarla birlikte kullanılmaları halinde ozmotik değişikliğe bağlı sıvı geçişinde etkili olup, çözme esnasında hücresel şişmeyi engelleyerek hücrede oluşabilecek zararı en aza indirmeye çalışırlar (113).

Tablo 9: Hücre membranından geçebilme özelliklerine göre kriyoprotektan çeşitleri (112-115).

Farklı hücrelerin ve farklı türlere ait embriyoların kriyoprotektanlara yanıtı da farklılık

Permeabl İntrasellüler Kriyoprotektanlar	Non-Permeabl Ekstrasellüler Kriyoprotektanlar	
Dimetilsülfoksit (DMSO)	MAKROMOLEKÜLLER	SAKKARİTLER
Gliserol	Dekstran	Glukoz
Etilen Glikol (EG)	Ficoll 70	Sükroz
Propilen Glikol (PROH)	Mannitol	Trehaloz
2,3 Bütanediol	Poliviliniilprolidon	Raffinoz
Dimetilasetamid (DMA)	Bovin serum albumin(BSA)	Galaktoz

solüsyonun içeriği, dengeye ulaşma süresi ve dengeye ulaştığı sıcaklık değerleri önemlidir ve her hücre tipi için farklıdır (116). Kriyoprezervasyona bağlı ortaya çıkan patolojilerde başlıca faktörler; donma hasarı, ozmotik stres, buz kristallerinin etkileri ve kriyoprotektan toksisitesidir (117).

1.8.2.7.1. Embriyo Kriyoprezervasyonu

Embriyo kriyoprezervasyonu insanlarda üremeye yardımcı yöntemlerin başarı şansını arttıran, çiftlik ve laboratuvar hayvanlarında deneysel amaçlı biyomedikal çalışmaların yapılabilmesine, üstün genetik niteliklerin gelecek kuşaklara aktarılarak hayvan ıslahının sağlanmasına ve nesli tükenmekte olan türlerin korunmasına olanak sağlayan YÜT'dir (113).

Günümüzde kriyoprezervasyon yöntemi yardımcı üreme merkezlerinde in vitro şartlarda elde edilen transfer fazlası embriyoların uygun şekilde saklanabilmesi amacıyla sıkça kullanılan bir yöntem olarak uygulanmaktadır (118). Özellikle son yıllarda klinik uygulamalarda çoğul gebeliklerin önlenmesi için transfer edilecek olan embriyo sayısına getirilen kısıtlamalar kriyoprezervasyon yöntemlerinin geliştirilmesi yönünde yapılan araştırmaların artmasına neden olmuştur. Embriyo kriyoprezervasyonu, memelilerde reproduksiyonun kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. YÜT'lerinde dondurulmuş embriyoların kullanımının en büyük avantajı uterin polip varlığı, endometrial kavite içinde

sıvı birikimi, kötü kalitede endometriyum, transfer öncesinde oluşan vajinal kanamalar, OHSS gibi taze embriyo transferinin kontrendike olduğu vakalarda uygulanabilmesi ve kadına KOH uygulamasına gerek kalmadan bir kez daha embriyo transferi şansı vermesidir (119). Spermin gliserol ile başarılı bir şekilde dondurulması embriyo kriyoprezervasyonu araştırmalarının yapılması için bir başlangıç olmuştur (120). İlk başarılı embriyo kriyoprezervasyonu işlemi fare embriyolarında gerçekleştirilmiş (1), ilerleyen yıllarda insanlarda ve farklı hayvan türlerinde de uygulanmıştır (121-124). Embriyo kriyoprezervasyonu zigot aşamasında, erken bölünme döneminde ve blastosist aşamasında uygulanabilmektedir. Zigotlarda, kriyoprezervasyon işlemi inseminasyondan 20-22 saat sonra pronükleusların halen ayırık olduğu belirgin ve net olarak gözlenebildiği dönemde yapılmalıdır. Kriyoprezervasyon işlemi bölünme dönemindeki embriyolarda uygulanacak ise hücreler eşit büyüklükte olmalı ve sitoplazmik fragmentasyonun %20'nin altında olmasına dikkat edilmelidir. Blastosist aşamasında dondurulacak embriyoların belirgin blastosel kavitesine sahip olması, sıkıca kümelenmiş iç hücre kitlesi ve düzenli bir trofoektodermal hücre tabakası içermesi gerekmektedir (8).

Embriyo kriyoprezervasyonunun başlıca hedefi dondurma işleminden sonra çözdürülen embriyolarda yüksek canlılık oranlarının sağlanmasıdır (125). Kriyoprezervasyon sonrası çözdürülen klivaj dönemi (2. ve 3. gün) embriyolarda canlılık ve gelişime devam etme olasılığı sağlam kalan blastomer sayısına bağlıdır. Blastomerlerin tamamı sağlam kalmış ise embriyoların yaşama ve gelişime devam etme olasılığı taze embriyolarınki ile aynıdır. Pronükleer dönemde uygulanan kriyoprezervasyonda bu değerlendirme hem morfolojik olarak hem de çözülme sonrası bölünme oranına bakılarak yapılırken blastosist aşamasındaki embriyolarda 37°C'da reekspanse olup olmamalarına göre yapılmaktadır (8).

Embriyo kriyoprezervasyonu alanında çok sayıdaki gelişmeye rağmen, embriyo kriyoprezervasyonunun yapılacağı optimal gelişim evresiyle ilişkili henüz bir uzlaşmaya varılmamıştır. Pronükleer evre, bölünme (klivaj) evresi veya blastosist evrelerinde dondurulan insan embriyolarındaki IVF-ET sonuçlarını karşılaştırılan bir çalışmada; implantasyon, klinik gebelik, çoklu gebelik, ikiz gebelik ve erkek/kız oranlarında üç evre arasında bir fark görülmemiştir. Bulunan tek fark, çözme sonrasındaki sağkalım oranı olup, 3. gün embriyolarında 1. gün embriyoları veya blastosistlere göre sağkalımın daha düşük olduğu bildirilmiştir (126).

Bir başka çalışmada, zigot, 2. gün ve 3. gün evrelerinde dondurulup-çözündürülen embriyoların transferi sonrası implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarında bir fark saptanmadığı bildirilmiştir (127).

In vitro şartlarda elde edilen embriyolarda dondurma-çözdürme işlemi sonrası canlılık oranlarının in vivo embriyolara göre daha düşük olması bunların kriyoprezervasyona karşı daha duyarlı olduklarını göstermektedir (3,128). Embriyoların dondurma-çözündürme sonrası canlılık oranlarında, uygulanan dondurma ve çözdürme hızına, embriyoların büyüklükleri ve gelişim evrelerine, hücrelerin geçirgenlik özelliklerine, kullanılan kriyoprotektanların toksisiteleri ve ozmotik özelliklerine bağlı olarak türler arasında bazı farklılıklar görüldüğü bildirilmiştir (129,130). Kriyoprezervasyon, embriyoların hücrel organizasyonu üzerine yıkıcı etkilere neden olabilmektedir. Kriyoprezervasyon sonrası, membran lipid ve proteinlerinde destabilizasyon ve denatürasyon, hücre içi organellerde fonksiyon kayıpları, ZP'da fraktürler, hücrenin yapısal bütünlüğünde rol oynayan mikrofilaman, mikrotübül ve arafilemanların oluşturduğu hücre iskeletinde hasar oluşumu görülebilmektedir (131). Bunların sonucunda, serbest radikal oluşumu, ATP sentezinde azalma, hücrelerin metabolik fonksiyonlarında bozulma, apoptoz (132) ve nekroz (132,133) gelişimi olabilmektedir.

1.8.2.7.2. Kriyoprezervasyon Yöntemleri :

Günümüzde yardımcı üreme merkezlerinde ve deneysel çalışmalarda embriyo kriyoprezervasyonu için Geleneksel Yavaş Dondurma (Slow Freezing), Camsı Yapıda Dondurma (Vitrifikasyon) ve Hızlı Dondurma (Rapid Freezing) yöntemleri yaygın olarak uygulanmaktadır (112,134-136).

1.8.2.7.2.1. Geleneksel Yavaş Dondurma (Slow Freezing)

Slow freezing yöntemi embriyoların daha az konsantrasyonda kriyoprotektanlar kullanılarak programlanabilir dondurma cihazı yardımıyla yavaş, kademeli olarak dondurulduğu kriyoprezervasyon tekniğidir. Dondurulan embriyolar -196°C'deki sıvı azot içinde çözdürülme işlemine kadar saklanabilmektedir. Bu amaçla insanlarda ilk uygulanan ve her evredeki embriyolarda kullanılabilen kriyoprotektan DMSO'dur (137,138). Blastosis aşamasındaki embriyoların dondurul-masında gliserol'ün (139), zigot ve erken bölünme dönemindeki embriyolarda ise çoğunlukla PROH (140) kullanımının tercih edildiği görülmektedir.

Slow freezing yöntemi sırasıyla şu aşamalardan oluşur (113):

- 1) Dondurulacak embriyoların oda ısısında artan konsantrasyonlarda permeable, intrasellüler kriyoprotektanlar ile osmotik dengesinin sağlanması (Ekilibrasyon) ve dondurma işlemi için taşıyıcılara (payetlere) çekilmesi,
- 2) Soğuk şoku hasarını azaltmak için kristalizasyon şekillenmeden buz kristallerinin oluşumunun -5°C ile -7°C arasında indüklenerek kontrollü olarak başlatılması (Seeding),
- 3) Embriyoların, kontrollü bir biçimde embriyo dondurma cihazıyla -30°C ile -70°C 'ler arasındaki bir sıcaklığa gelinceye kadar dakikada $0,2^{\circ}\text{C}$ - 2°C olacak şekilde kademeli olarak yavaş yavaş soğutulması,
- 4) İstenilen sıcaklığa ulaşıncaya embriyoları içeren payetler -196°C 'deki sıvı azot içine daldırılarak saklanması.

Dondurma işlemi sırasında oluşan küçük buz kristalleri daha büyük buz kristallerine dönüşüm eğilimindedir. Bunun önlenmesi amacıyla yavaş soğutma oranları uygulanmakta ve büyük buz kristallerine dönüşüm engellenmeye çalışılmaktadır. Slow freezing yönteminde uygulanan seeding işlemi buz kristallerinin kontrolsüz bir şekilde oluşumunu engelleyerek ekstrasellüler ortama sıvı geçişi için yeterli süreyi sağlar. Çözdürülme sonrası embriyo canlılığı için dikkat edilmesi gereken önemli bir aşamadır (141). Çözdürülme işlemi için embriyoları içeren taşıyıcılar (straw, plastik pipet) sıvı nitrojen tankından çıkartılarak oda ısısında 10 saniye bekletildikten sonra $25-28^{\circ}\text{C}$ 'deki su banyosuna konularak 15-20 saniye burada tutulur. Bu sürenin sonunda embriyolar taşıyıcılardan çıkartılır ve rehidrasyonun sağlanması amacıyla 15-20 dakika süreyle azalan konsantrasyondaki kriyoprotektanlardan geçirildikten sonra yıkanır. Çözdürülen embriyolar transfer zamanına kadar kültür medyumunda bekletilir (142).

1.8.2.7.2.2. Vitrifikasyon

Hücre, doku ve organların, yüksek konsantrasyonda kriyoprotektanlarla hazırlanan viskozitesi artırılmış vitrifikasyon solüsyonları kullanılarak hızlı soğutma oranları ile buz kristalizasyonu oluşmadan cam benzeri bir yapıda dondurulmasıdır. Viskozitenin yoğun olması yöntemin başarısını doğrudan etkiler. Hücre içerisinde camsı bir görünüm elde edilir. Vitrifikasyon solüsyonlarından geçirilen hücre ve dokular sıvı azot içerisine alınır ve hızlı soğutma ile dondurularak çözdürüleceği zamana kadar saklanır (143).

Vitrifikasyon solüsyonları, yüksek konsantrasyondaki kriyoprotektanların embriyo üzerindeki zararlı etkilerini elimine etmek için permeabl ve nonpermeabl iki veya daha fazla kriyoprotektanın birlikte kullanımı ile hazırlanmalıdır (144).

Vitrifikasyon solüsyonlarında kriyoprotektan olarak ilk yıllarda DMSO ve gliserol kullanılmıştır. İlerleyen yıllarda düşük toksisiteli olmaları nedeniyle bunların yerine 1,2-propanediol, propilen glikol ve EG gibi kriyoprotektanların kullanımı tercih edilmeye başlanmıştır (145). EG, yüksek permeabilite özelliğine sahip olması ve çözündürme sonrası doğrudan embriyo transferine imkan vermesi nedeniyle büyükbaş hayvan endüstrisinde sıklıkla kullanılmakta olan bir kriyoprotektandır (146).

Vitrifikasyon işleminde kullanılan kriyoprotektanlar az miktarda ve yüksek konsantrasyonda olduğundan oda ısısı gibi yüksek bir sıcaklıkta hızla buharlaşarak embriyo için toksik seviyeye gelebilir. Vitrifikasyonda uygulanan soğutma hızı kriyoprotektan solüsyonunun miktarıyla ters orantılıdır. Kriyoprotektan solüsyonunun miktarı ne kadar az ise sıvı azot içerisindeki soğutma oranı da o kadar hızlı olur (147). Bu nedenle embriyoda oluşabilecek toksik ve osmotik hasarın önlenmesi için vitrifikasyon işleminde çok hızlı davranılmasına, kriyoprotektanların yüksek konsan-trasyonda düşük hacimde kullanılmasına ve soğutma ısılarının artırılmasına dikkat edilmektedir (148).

Embriyolarda vitrifikasyon tekniği ilk olarak 0,25 ml'lik plastik pipetler (straw) kullanılarak yapılmıştır. Daha sonraki yıllarda yapılan uygulamalarda embriyoların vitrifikasyonu naylon halkalar, ısıtılarak çekilmiş açık pipetler (open pulled straw, OPS), kriyoloop ve kriyotop adı verilen farklı embriyo taşıyıcıları, elektron mikroskop gridleri ve sıvı azot içerisine kısmen batırılmış alimünyum folyo ile kaplı metal cisimler kullanılarak yapıldığı bildirilmiştir (149).

1.8.2.7.2.3. Hızlı Dondurma Yöntemi:

Bu yöntemde embriyolar, 2M-4,5M'lık permeable kriyoprotektanlardan birinin 0.25M-0,5M'lık impermeable kriyoprotektanlardan biriyle karıştırılması ile oluşturulan solüsyonunda dondurulur (113). Embriyolar, dondurma solüsyonu içerisinde kısa bir süre dengelendikten sonra taşıyıcılara aktararak doğrudan sıvı nitrojen içerisine koyulur.

1.8.2.7.3. Çözdürme İşlemi :

Çözdürme işleminde embriyoları içeren taşıyıcılar sıvı azot tankından çıkartılarak 10 saniye oda ısısında bekletildikten sonra 37°C'deki su banyosu içine daldırılır ve 10 saniye beklendikten sonra sudan çıkartılarak iyice kurulanır. Kriyoprotektanların embriyodan uzaklaştırma işlemi ya tek aşamada ya da 3 aşamada yapılır. Tek aşamada yapılan kriyoprotektan uzaklaştırmasında genellikle çözündürme işleminden hemen sonra payetler elle sallanarak payet içindeki solüsyonların karışması sağlanır ve embriyoların direkt transferi gerçekleştirilir. Eğer bu yöntem uygulanmayacaksa embriyolar taşıyıcıdan alınarak kriyoprotektanların zararlı etkilerini önlemek amacıyla farklı konsantrasyonlardaki sakkaritlerden geçirilerek kriyoprotektif maddelerin hücre dışına çıkması sağlanır. Çözdürülme işleminin de dondurma işlemi gibi çok hızlı yapılmasına dikkat edilmelidir. Çözdürülen embriyolar transfer zamanına kadar kültür medyumunda bekletilebilir (113). Vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan embriyolarda çözdürülme sonrası canlılık oranları karşılaştırıldığında, blastosist aşamasında dondurulan embriyolarda çözdürülme sonrası canlılık oranlarının bölünme döneminde dondurulup çözdürülen embriyolara göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (150,151). Maliyet açısından daha uygun olması, daha kısa sürede ve cihaz kullanımına gerek kalmadan yapılabilir olması, daha az ekipmana ihtiyaç duyulması nedeniyle uygun çalışma alanlarında rahatça uygulanabilir olması vitrifikasyon yönteminin önemli avantajlarından (152).

BÖLÜM - II

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hayvan Etik Kurulu'nun 25/02/2011 tarih ve 2009-025 sayılı onayı ile gerçekleştirilmiştir.

2.1. DENEYSEL GEREÇ VE YÖNTEM

2.1.1. DENEYSEL GEREÇ VE MALZEMELER

- İnek Overi
- Dondurulmuş Boğa Spermi Payetleri

- Termos Kap
- Kurutma Kağıdı
- % 0,9'luk NaCl
- Tuzlu Fosfat tamponu (PBS)
- Penisilin
- Amfoterisin-B
- 21 Gauge'luk steril iğne ucu
- Lastik pistonlu 10 ml'lik enjektör
- 50 ml'lik falkon tüp
- 90 mm'lik petri kapları
- 35 mm'lik petri kapları
- Pasteur pipeti
- Konik tüpler
- 10µl'lik transfer pipet
- Stereomikroskop
- Santrifüj Cihazı
- İnkübatör
- TCM 199 OMM
- LH flakon
- FSH flakon
- OCS
- TL Sperm Kapasitasyon Mediumu
- BSA
- Toz Piruvat
- Toz Heparin
- TL Fertilizasyon Mediumu
- BME Amino Asit Solüsyonu
- MEM Non-Esansiyal Amino Asit Solüsyonu
- Sentetik OvidukSıvısı (SOF)
- Na-Piruvatsız Kültür Mediumu
- Sükroz içeren EG
- Slow freezing cihazı
- Vitrifikasyon kiti

- Köpük Kutu
- Goblet
- Cane Holder
- Plastik payet
- -196°C'de sıvı azot içeren saklama tankı

2.1.2. DENEYSEL YÖNTEM :

Çalışmada kullanılacak olan 4 hücreli inek embriyolarının eldesi amacıyla dişi gamet (oosit) kaynağı olarak mezbahaya kesime getirilen 4-8 yaş aralığındaki sağlıklı Holstein cinsi ineklerin overleri, erkek gamet (sperm) kaynağı olarak ise ticari satışı yapılan payetlerde dondurulmuş Holstein cinsi boğa spermleri kullanıldı. Farklı seferlerde toplanan overlerden laboratuvar ortamında folikül aspirasyon yöntemi ile oositler elde edildi. Bu oositler arasından ZP'sı sağlam, çevresinde sıkı şekilde 4 ve daha fazla kümülüs hücre katı ile sıkıca çevrili, kumlu bir ooplazma görüntüsüne sahip oositler seçilerek IVM işlemleri uygulandı. Matür oositler seçilerek IVF işlemlerine alındı ve 4 hücreli embriyo oluşana kadar kültürü yapıldı. Elde edilen 4 hücreli embriyolardan embriyo gradeleme kriterlerine göre iyi kalitede olan 1120 embriyo çalışmaya dâhil edildi. Bu embriyolardan kriyoprezervasyon işlemi uygulanmayan 350 adet embriyo ile kontrol grubu, slow freezing yöntemi uygulanan 385 adet embriyo ile slow freezing grubu ve vitrifikasyon yöntemi uygulanan 385 adet embriyo ile vitrifikasyon grubu olmak üzere 3 çalışma grubu oluşturuldu.

Kontrol grubunu oluşturmak için farklı seferlerde toplam 118 adet overden folikül aspirasyon yöntemiyle 766 adet oosit aspire edildi. Bunlar arasından ZP'sı sağlam, çevresinde sıkı şekilde 4 ve daha fazla kümülüs hücre katı bulunan 671 adet oosite IVM işlemleri uygulandı. İn vitro şartlarda maturasyonları gerçekleşen 572 adet matür oosit IVF işlemlerine alındı ve 4 hücreli embriyo oluşana kadar kültürü yapıldı. Elde edilen 368 adet 4 hücreli embriyodan embriyo gradeleme kriterlerine göre iyi kalitede olan 350 adet embriyo seçilerek kontrol grubu oluşturuldu. Slow freezing grubunu oluşturmak için farklı seferlerde toplam 130 adet overden aspirasyon yöntemiyle 840 adet oosit aspire edildi. Bunlar arasından ZP'sı sağlam, çevresinde sıkı şekilde 4 ve daha fazla kümülüs hücre katı bulunan 749 adet oosite IVM işlemleri uygulandı. İn vitro şartlarda maturasyonları gerçekleşen 650 adet matür oosit IVF işlemlerine alındı ve 4 hücreli embriyo oluşana kadar kültürü yapıldı. Elde edilen 420

adet 4 hücreli embriyodan embriyo gradeleme kriterlerine göre iyi kalitede olan 385 adet embriyo seçilerek slow freezing grubu oluşturuldu. Vitrifikasyon grubunu oluşturmak için farklı seferlerde toplam 126 adet overden aspirasyon yöntemiyle 817 adet oosit aspire edildi. Bunlar arasından ZP'sı sağlam, çevresinde sıkı şekilde 4 ve daha fazla kümülüs hücre katı bulunan 720 adet oosite IVM işlemleri uygulandı. İn vitro şartlarda maturasyonları gerçekleşen 618 adet matür oosit IVF işlemlerine alındı ve 4 hücreli embriyo oluşana kadar kültürü yapıldı. Elde edilen 405 adet 4 hücreli embriyodan embriyo gradeleme kriterlerine göre iyi kalitede olan 385 adet embriyo seçilerek vitrifikasyon grubu oluşturuldu.

Kontrol grubundaki 350 adet embriyodan; 10 tanesi Hoesct ve PI boyaması sonrası fluoresan mikroskop incelemesinde kullanıldı, 100 tanesi blastosist oluşumu için kültüre edildi, 230 tanesi transmisyon elektron mikroskop (TEM) ile inceleme yapılabilmesi için histolojik takip işlemleri sonrası epona gömülerek epon bloklar oluşturuldu, 10 tanesi ise konfokal mikroskop incelemesinde kullanıldı. Blastosist gelişimi için kültüre edilen 100 adet 4 hücreli embriyodan 22 adet blastosist elde edildi ve bunlardan 10 tanesi Hoesct ve PI boyaması sonrası fluoresan mikroskop incelemesinde kullanıldı.

Vitrifikasyon grubunu oluşturan 385 adet 4 hücreli embriyo farklı seferlerde vitrifikasyon yöntemi ile dondurularak 1 gün süreyle -196 °C'deki sıvı azot içinde saklandı. Çözdürme işlemleri sonrası morfolojik olarak ZP'si sağlam bütünlüğü korunmuş, 370 adet embriyo tespit edildi. Bunlardan: 10 tanesi Hoesct ve PI boyaması sonrası fluoresan mikroskop incelemesinde kullanıldı, 100 tanesi blastosist oluşumu için kültüre edildi, 250 tanesi TEM incelemelerinin yapılabilmesi için fiksasyon ve takip işlemleri sonrası epona gömülerek epon bloklar oluşturuldu, 10 tanesi ise konfokal mikroskop incelemesinde kullanıldı.

Slow freezing grubunu oluşturan 385 adet 4 hücreli embriyo farklı seferlerde slow freezing yöntemi ile dondurularak 1 gün süreyle -196 °C'deki sıvı azot içinde saklandı. Çözdürme işlemleri sonrası morfolojik olarak ZP'si sağlam bütünlüğü korunmuş 362 adet embriyo tespit edildi. Bunlardan: 10 tanesi Hoesct ve PI boyaması sonrası fluoresan mikroskop incelemesinde kullanıldı, 100 tanesi blastosist oluşumu için kültüre edildi, 242 tanesi TEM incelemelerinin yapılabilmesi için fiksasyon ve takip işlemleri sonrası epona gömülerek epon bloklar oluşturuldu, 10 tanesi ise konfokal mikroskop incelemesinde kullanıldı.

Her grup için epon bloklardan 0,5 µm'luk ve 1 µm'luk yarı ince kesitler alındı. 1 µm'luk kesitler Azur II-Metilen Blue-Basic Fuksin ve Toluidine Blue boyaları ile boyanarak ışık

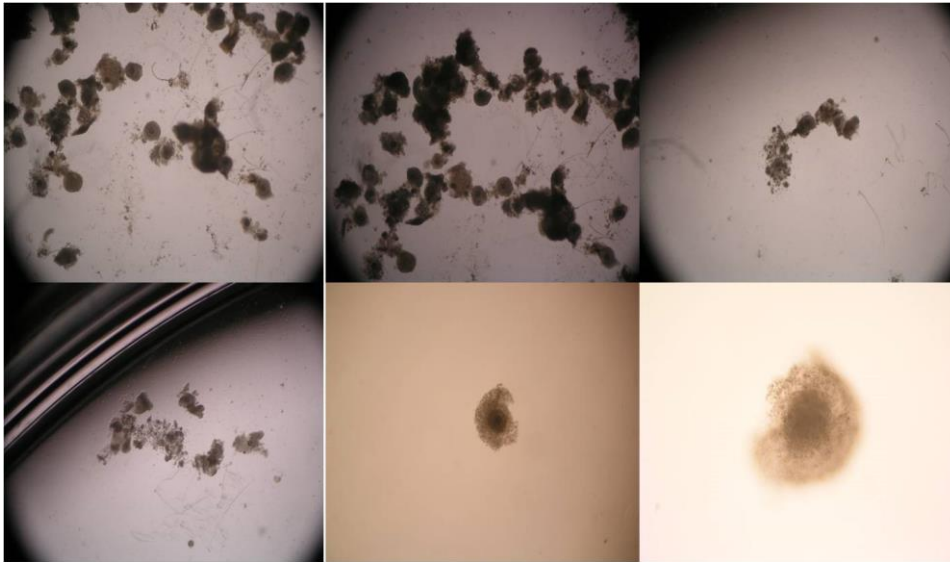
mikroskobunda incelendi. 0,5 μm 'luk kesitler uygun protokollerde boyandıktan sonra TEM ile incelendi.

2.1.2.1. Oositlerin Eldesi:

IVF işleminde kullanılmak amacıyla dişi gamet kaynağı olarak mezbahaya kesime getirilen 4-8 yaş aralığındaki sağlıklı Holstein cinsi ineklerin overleri kullanıldı. Overler kesimi takiben içinde taşıma vasatı bulunan termoslara konularak en fazla 3 saat içinde laboratuara getirildi. Taşıma vasatı olarak Penisilin (50-100 IU/ml) ve Amfoterisin-B (50 ng/ml) eklenmiş ısısı 30°C'ye ayarlanmış steril PBS kullanıldı. Taşıma vasatı her çalışmada taze olarak hazırlandı. Laboratuvara getirilen overler kan ve taşıma vasatından uzaklaştırılmak amacıyla 2 kez % 0,9'luk NaCl ile yıkandı ve kurutma kâğıdı ile kurutulduktan sonra aspirasyon işlemine geçildi. Aspirasyon işlemi amacıyla ucuna 21 gauge'lık steril iğne takılmış lastik pistonlu 10 ml'lik enjektör kullanıldı. Aspirasyon işlemi overler üzerinde bulunan 2-10 mm çaplı folliküllerden gerçekleştirildi. Elde edilen follikül sıvısı 50ml'lik falcon tüplerinde toplandı. Toplanan follikül sıvısında bulunan kümülüs oosit komplekslerinin dibe çökmesi için tüpler oda ısısında 20 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda follikül sıvısı içinde tüpün dibine çöken kümülüs oosit kompleksleri Pasteur pipet yardımıyla alınarak alt kısımları dışarıdan bistüri ile ızgara deseni şeklinde çizilen 90x15 mm'lik petri kaplarına alındı. 90x15 mm'lik petri kapları stereomikroskop altında incelendi. ZP'si sağlam, çevresinde sıkı şekilde 4 ve daha fazla kümülüs hücre katı ile sıkıca çevrili, kumlu bir ooplazma görüntüsüne sahip oositler 10 μl 'lik transfer pipet yardımıyla toplanarak daha önceden hazırlanan ve inkübatörde bekletilen içinde maturasyon mediumu bulunan 35 ml'lik petri kaplarına aktarıldı. Daha sonra arka arkaya 2 kez daha aynı medyumunu içeren 35 ml'lik petri kaplarına aktararak yıkama işlemi yapılan oositler maturasyon işlemine alındı. Dejenere ve etrafında 4'den az kümülüs hücre katı bulunan oositler çalışmaya dahil edilmedi.



Şekil 5. İnek ovaryum dokusunun laboratuara transferi foliküler aspirasyon ve oosit eldesi. Ok işareti elde edilen oositleri göstermektedir.



Şekil 6. Over folikül aspirasyonu sonrası maturasyon işlemine alınan oositler (X4-10-20-40 Büyütme)

2.1.2.2. Oositlerin In Vitro Maturasyonu :

Oositlerin maturasyonu için her uygulamada 5µl/ml FSH, 5 µl/ml LH ve 50 µl/ml Östrus inek serumu (OCS) ilave edilen TCM 199 (Minitube:19990/0010) kullanıldı. Maturasyon solüsyonları her uygulamada taze olarak hazırlandı. IVM'si yapılacak oositler,

önceden hazırlananarak inkübatörde bekletilen maturasyon solüsyonunda üç kez yıkandıktan sonra her bir gözünde 400 µl maturasyon solüsyonu bulunan 4'lü petri kaplarına 40'ar tane olmak üzere aktarıldı. 4'lü petri kapları oositlerin maturasyonunun sağlanması amacıyla 24 saat süreyle % 5 CO₂'li, 39°C'deki inkübatöre konuldu. Bu sürenin sonunda oositler inkübatörden çıkarıldı ve mikroskop altında maturasyon kontrolleri yapıldı. Kümüls ekspansiyonu ve perivitellin boşlukta birinci kutup hücresi görülerek matür oldukları belirlenen oositler seçildi ve fertilizasyon işlemine geçildi.

OCS Hazırlanışı: Östrus dönemindeki ineklerden alınan kan örneklerinin 4°C'de 4000 devirde 10 dakika santrifüjü sonrası açığa çıkan serumun 65°C'de 30 dakika inaktive edilmesiyle hazırlandı ve alikotlanarak -20°C'de kullanıma hazır halde saklandı.

LH Stok Hazırlanışı: 1 adet LH (Sioux Biochemical İNC-725) flakon içine 10 ml % 0,9'luk NaCl eklenerek hazırlandı ve alikotlanarak -20°C'de kullanıma hazır halde saklandı.

FSH Stok Hazırlanışı: 1 adet FSH (Sioux Biochemical İNC-715) flakon içine 10 ml % 0,9'luk NaCl eklenerek hazırlandı ve alikotlanarak -20°C'de kullanıma hazır halde saklandı.

2.1.2.3. Spermilerin Hazırlanması

IVF işleminde kullanılmak amacıyla erkek gamet kaynağı olarak ticari satışı yapılan payetlerde dondurulmuş spermier kullanıldı. -196°C derecede depolanan donmuş sperm payetleri IVF'nun yapılacağı gün çıkarıldı ve 38°C derecedeki su banyosunda 20 saniye tutularak çözdürüldü. Payetler iyice kurulandıktan sonra uçları kesilerek konik santrifüj tüpüne spermier boşaltıldı. Spermierin kapasitasyonu için TL Medium for Sperm Cell Capacitation (Minitube: 19990/0020) içine 6mg/ml BSA ve 50 µl/ml piruvat eklenerek hazırlanan medium kullanıldı.

Piruvat stok hazırlanışı: 11 mg Piruvat (Sigma P-4562) + 5 ml NaCl

İşlemden 1 saat önce hazırlanan ve inkübatörde bekletilen mediumdan konik tüpler içerisine 1'er ml konuldu. 100'er µl sperm, medium içeren tüplerin diplerine yerleştirildi ve tüpler 1 saat süreyle inkübatörde 45° açıyla kapakları tam kapatılmadan bekletildi. 1 saatlik inkübasyon sonrasında medium içinde yüzerek tüpün üst kısmına ulaşan hareketli spermier almak için pipet yardımıyla mediumun üst kısmından yaklaşık 900 µl alınarak boş santrifüj tüpüne aktarıldı ve 2400 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası üstte kalan

kısım pipetle alınarak atıldı. Tüpün alt kısmına çöken spermlerden 5 μ l alınarak 95 μ l çeşme suyu ile karıştırıldı. Bu karışımdan 10 μ l alınarak Thoma lamında sperm sayımı yapıldı.



Şekil 7. Sperm hazırlanması ve inseminasyon işlemi.

2.1.2.4. Oositlerin In Vitro Fertilizasyonu

Fertilizasyon medyumunu olarak içerisinde 6mg/ml BSA; (Sigma A-3311), 10 μ l/ml pyruvat ve 30 μ l/ml Heparin eklenerek hazırlanan TL Fertilization Medium (Minitube:

19990/0030) kullanıldı. Fertilizasyon mediumu her uygulamada taze olarak hazırlandı. Sperm kapasitasyon mediumu ile aynı zamanda hazırlanan fertilizasyon mediumu sperm hazırlama işlemi tamamlanana kadar inkübatörde bekletildi

Sperm hazırlama işlemi sonrası oositler fertilizasyon işlemi için hazırlandı. 24 saat süreyle maturasyon mediumu içinde inkübatörde bekletilen oositler çıkartılarak en az 3 kez fertilizasyon mediumunda yıkandı. Oositler yıkama sonrası her bir gözünde 400 µl fertilizasyon mediumu bulunan 4'lü petrilere her bir gözde 40'ar tane olacak şekilde yerleştirildi. Daha önce hazırlanmış olan santrifüj tüpü içindeki spermden sonuç konsantrasyonu 1.10^6 sperm/ml olacak miktarda sperm alınarak içinde oositlerin bulunduğu 4 gözlü petrilerin her bir gözüne aynı miktarda eklendi. Petriler fertilizasyonun gerçekleşmesi için 24 saat süre ile %5 CO₂'li 39°C'deki inkubatöre alındı.

Heparin Stok Hazırlanışı: 1mg Heparin (Sigma H-3149)+5ml Fertilizasyon mediumu

2.1.2.5. Embriyoların İn Vitro Kültürü

24 saatlik fertilizasyon sürecinin sonunda kültürü yapılacak zigotlar inkübatörden alınarak içerisinde 1 ml kültür mediumu bulunan santrifüj tüplerine alındı. Kültür mediumu olarak içerisine 40 µl/ml BME Amino Acids Solution (Sigma B-6766), 10 µl/ml MEM Non-Esansiyal Amino Acids Solution (Sigma M-7145), 50 µl/ml OCS ve 0,363mg/ml pyruvat (Sigma P-4562) eklenerek hazırlanan SOF (Synthetic Oviduct Fluid) Culture Medium without Na-Piruvat (Minitube: 19990/0040) kullanıldı. Kültür mediumu her uygulamada taze olarak hazırlandı. Santrifüj tüpleri içindeki zigotlar 3 dakika vortekslenerek çevrelerindeki hücrelerin ayrılması sağlandı. Santrifüj tüpünden alınan zigotlar içinde kültür mediumu bulunan 35 ml'lik petri kaplarına aktararak yıkandı. Zigotlar, yıkama işlemi sonrası her bir gözünde 400 µl kültür mediumu bulunan 4'lü petrilere her bir göze 40'ar tane olacak şekilde yerleştirildi. Petriler, 4 hücreli embriyo oluşana kadar % 5 CO₂, % 5 O₂ ve 39 °C'ye ayarlanmış inkübatöre konuldu.

Her 3 grupta blastosist aşamasına kadar kültürü yapılan embriyolar için aynı kültür mediumu ve aynı inkübatör şartları kullanıldı.

2.1.2.6. Embriyoların Kriyoprezervasyonu:

Elde edilen 4 hücreli embriyolardan, embriyo gradeleme kriterlerine göre iyi kalitede olan 770 adet embriyo slow freezing ve vitrifikasyon yöntemleri uygulanak payetler içerisinde donduruldu. Payetler, embriyoların çözündürülecekleri zamana kadar -196°C’de sıvı azot içeren tanklarda saklandı.

2.1.2.6.1. Slow Freezing Yöntemi :

Embriyoların, slow freezing yöntemi ile dondurulmasında, dondurma solüsyonu olarak süktroz içeren EG solüsyonu (Vigro Ethlene Glycol Freeze (with Sucrose) Plus, Bioniche) kullanıldı. Slow freezing işlemi Consarctic CL-5500 cihazı ile yapıldı. -196°C’deki sıvı azot dondurma işleminin yapılacağı kaba konuldu ve slow freezing cihazı açılarak -0,6°C’ye gelene kadar beklendi, cihaz -0,6°C’ye ulaştığında dondurma işlemine başlandı. İnkübatörde 4 hücreli evreye kadar kùltüre edilen embriyolar, inkübatörden çıkarıldı ve mikroskop altında 10’arlı gruplar şeklinde toplanarak PBS’e alındı. Bu arada 3 ml, dondurma solüsyonu enjektörle çekildi ve steril filtreyle filtre edilerek 35mm’lik petri kabına aktarıldı. PBS içinde 10’arlı gruplar halindeki embriyolar, aynı şekilde 10’arlı gruplar halinde dondurma solüsyonu içine alındı. Solüsyon içindeki embriyolar 1 payette 10 embriyo olacak şekilde payetlere çekildi. Embriyolar payetlere alınırken şu sıra izlendi; payetlere önce dondurma solüsyonu, sonra hava, sonra 10 adet embriyo ardından tekrar hava ve en sona tekrar dondurma solüsyonu çekildi ve payetlerin tıpası takılarak kapatıldı. Payetler slow freezing cihazının dondurma kabına yerleştirildi ve 4 dakika sonra seeding işlemi yapıldı. Daha sonra slow freezing cihazının run düğmesine basıldı ve cihazın -35°C’ye kadar her 1 dakikada ısıyı 0,5°C düşürerek payetler içinde bulunan embriyoları dondurması sağlandı. Cihazın derecesi -35°C’ye gelince payetler cihazdan çıkarıldı ve çözündürüleceği zamana kadar, -196°C’deki sıvı azot tankında saklandı.



Şekil 8. Slow Freezing yönteminin uygulanması

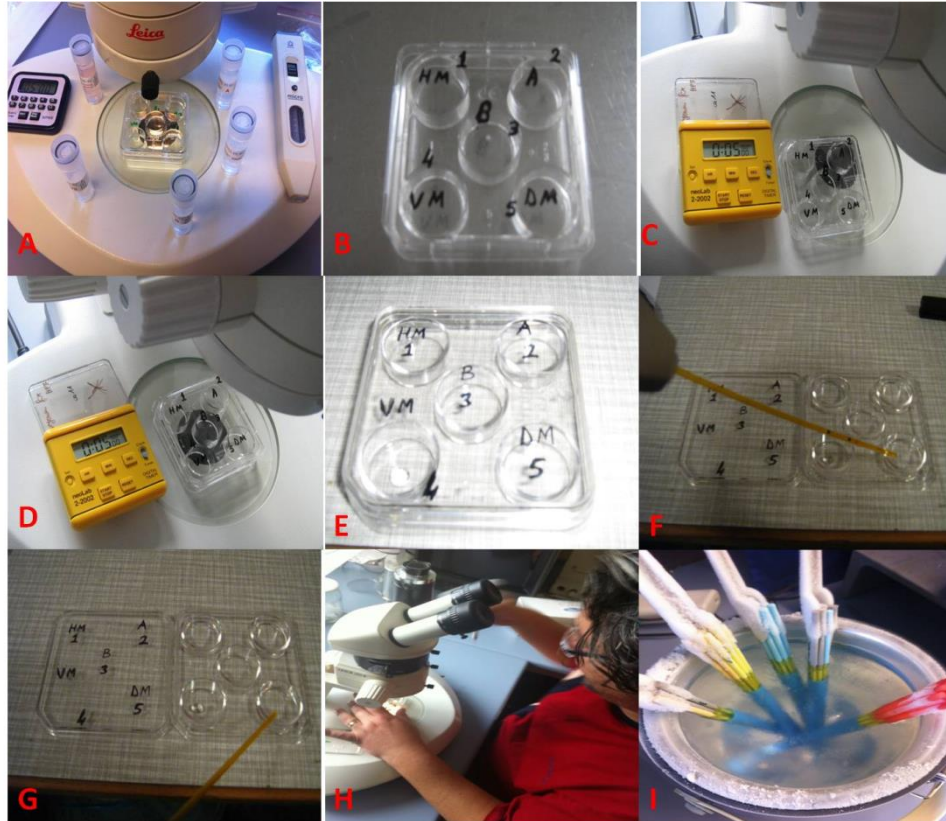
2.1.2.6.2. Vitrifikasyon Yöntemi :

Embriyoların, vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmasında Bovipro Vit-Kit (Minitube,19500/1000) vitrifikasyon kiti kullanıldı.

Vitrifikasyon işlemine başlamadan önce vitrifikasyon kiti içinde yer alan tüm mediumlar (Holding Medium (HM), Equilibration Medium-A, Equilibration Medium-B, Vitrifikasyon Mediumu (VM) ve Dilüsyon Mediumu (DM)) oda ısısına getirildi. Kit içinde yer alan 5 gözlü petrilerin üzerindeki gözler numaralandırıldı ve gözler hangisi hangi mediumlar konulduysa isimleri yazıldı.

Embriyoların çekileceği payetlerin üzerine nereye kadar DM, nereye kadar hava çekileceği işaretlendi. Köpük kutunun içine yüksekliği yaklaşık 15 cm olacak şekilde sıvı azot konuldu. Goblet-Cane Holder aparatı, köpük içindeki sıvı azottan 2,5cm yukarıda olacak şekilde köpük kutu üzerine asıldı ve sıvı azotun goblet içine girmemesine dikkat edildi. Köpük kutu içindeki sıvı azot seviyesi düştükçe sıvı azot eklenerek bu mesafe her zaman 2,5 cm olacak şekilde ayarlandı. Vitrifikasyon yöntemi ile dondurulacak olan embriyolar her uygulamada inkübatörden çıkarılarak 5'erli gruplar halinde PBS içine alındı. 5 gözlü petrinin

1. gözüne 1 ml HM, 2. gözüne 1 ml Equilibration Medium-A, 3. gözüne 1 ml Equilibration Medium-B, 5.gözüne ise 1ml DM konuldu. PBS içindeki embriyolar 5'erli gruplar halinde önce 1.göze (HM içine) alınarak yıkandı. Bu sırada embriyoların çekileceği payete önce, işaretlenmiş olan yere kadar 5.gözden DM ardından yine işaretlenmiş olan yere kadar hava çekildi. 1.gözdeki embriyolar 2.göze (Equilibration Medium-A içine) alındı ve burada 5 dakika tutuldu. Bu sürenin sonunda 2.gözden alınan embriyolar 3.göze (Equilibration Medium-B içine) aktararak 5 dakika tutuldu. 5 dakika tamamlanmadan boş olan 4.göze her embriyo için 30 µl VM damla şeklinde konuldu. 5 dakika dolunca 3.gözdeki embriyolar tek tek 4.gözdeki damlalara aktarıldı. 4.gözde damla şeklindeki VM içinde bulunan embriyolar VM ile birlikte 1 dakika içinde tek tek daha önceden DM ve hava çekilmiş olan payetlere alındı ve üzerlerine önce aynı miktarda hava sonra aynı miktarda DM'ü çekilerek tıpaları kapatıldı. Payetler 1 dakika süre ile Goblet-Cane Holder aparatı içine konularak buhar fazında soğutulduktan sonra aparattan çıkartılarak çözdürüleceği zamana kadar -196°C'deki sıvı azot tankında saklandı.



Şekil 9. Vitrifikasyon yönteminin uygulanması

2.1.2.7. Embriyoların Çözdürülmesi:

Bir gün süreyle -196 C'deki sıvı azot tankında saklanan payetler  z d rme uygulamaları sırasında dışarı çıkarıldı. Oda sıcaklığında 10 saniye bekletildikten sonra 37 C'deki sıcak su banyosuna alındı ve 10 saniye bekletildi. Payetler sıcak su banyosundan çıkartılarak kurulandı.

Payetler sallanarak solüsyonların karışması sağlandı. Payetler kesilerek 35 mm'lik petri kaplarına boşaltıldı ve 10 dakika dengelenmesi için beklendi. Bu sürenin sonunda  z d r len embriyolar kültür mediumuna alınarak yıkandı.

2.2. MİKROSKOPİK GEREÇ VE YÖNTEM

2.2.1. Işık Mikroskop Gereç ve Yöntem

2.2.1.1. Işık Mikroskopik Gereç

- Toluidin Blue (Sigma T3260-25gr)
- Boraks (Merck Art.6303)
- Azur-II (Sigma)
- Metilen Blue (Difco)
- Basic Fuksin
- Gliserol
- Metanol
- Distile su
- PBS
- Işık mikroskobu (Olympus BX-51 light microscope)
- Dijital kamera (Olympus C-5050)

2.2.1.2. Işık Mikroskopik Yöntem

Toluidine Blue ve Azur II –Metilen Blue–Basic Fuksin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelenen kesitler epon bloklardan Reichert, Austria Nr.313864 ultramikrotomda 1 µm kalınlıkta polilizinli lamlara alındı ve boyama işlemlerine geçildi.

2.2.1.2.1. Boyama

2.2.1.2.1.1. Toluidine Blue Boyama

Gereç:

1) Stok Solüsyonu:

Toluidin Blue...0,1 gr

Boraks.....1 gr

Distile su.....50 cc

Hazırlana bu karışım bir gün bekletildi.

2) Çalışma Solüsyonu:

Çalışma solüsyonu, stok solüsyonunun distile su ile 1:1 oranında seyreltilmesi ile elde edildi. Stok solüsyondan 30 cc alınıp üzerine 30 cc distile su ilave edilerek çalışma solüsyonu hazırlandı.

Yöntem:

Preparatlar 65°C'deki etüvde, hazırlanan bu çalışma solüsyonu ile 1-2 dakika boyandı. Akarsuda yıkanan preparatlar kurutularak üzerine bir damla entellan damlatıldı ve kapatıldı.

2.2.1.2.1.2. Azur II– Metilen Blue – Basic Fuksin Boyama :

Gereç :

1) Stok – A Solüsyonu:

0,130 gr Metilen Blue

0,020 gr Azur-II

10 ml Gliserol

10 ml Methanol

30 ml PBS

50 ml Distile su

Hazırlanan karışım hava almayacak şekilde kahverengi şişede oda ısısında saklanır.

2) Solüsyon – A :

Boyamanın yapıldığı gün Stok – A Solüsyonunun 1:5 distile su ile dilüe edilmesiyle hazırlandı ve buzdolabında +4 °C’de saklandı.

3) Stok – B Solüsyonu :

0,1 gr Basic Fuksin

100 ml % 50’lik Etanol

Hazırlanan karışım hava almayacak şekilde kahverengi şişede oda ısısında saklanır.

4) Solüsyon – B :

Boyamanın yapıldığı gün Stok – B Solüsyonunun 1.20 distile su ile dilüe edilmesi ile hazırlandı ve buzdolabında + 4 °C’de saklandı.

• Yöntem :

- Solüsyon–A ve Solüsyon–B, iki ayrı şalede 55°C’deki etüvde ısıtıldı.
- Preperatlar önce Solüsyon–A’ya alındı ve 2 saat bekletildi.
- Solüsyon–A içinden çıkartılan preperatlar çeşme suyunda yıkandı.
- Preperatlar Solüsyon–B içine alındı ve 40 dakika bekletildi.
- Çeşme suyuna daldır çıkar yapılarak yıkanan preperatlar oda ısısında kurutuldu.
- Preperatlar üzerlerine entellan damlatıldıktan sonra kapatıldı.

2.2.2. Elektron Mikroskopik Gereç Ve Yöntem

2.2.2.1. Elektron Mikroskopik Gereç:

- Cacodylate (Sigma C-0250)
- Glutaraldehit (% 25’lik)(Merck 8.20603.1000)

- Toz Paraformaldehit (Merck 1.04.005.1000)
- Osmium tetroksit- OSO_4 (Sigma 05500)
- Propilenoksit (Merck 8.07027.1000)
- Epon 812 (Fluka 45345)
- DDSA (Fluka 45346)
- MNA (Fluka 45347)
- DMP 30 (Fluka 45348)
- Kurşun nitrat (Merck Art. 7396)
- Uranil asetat (Electron Microscopy Sciences 22400)
- NaOH (Merck 1.06462.5000)
- BEEM 036 kapsül
- 3,05 mm çaplı G 200 Gilder grid
- Etüv (Heraeus FB420)
- Reichert, Austria Nr.313864 ultramikrotom
- Libra 120 Plus Transmisyon Elektron mikroskop (Carl Zeiss)

2.2.2.2. Tampon Ve Fiksatifler:

2.2.2.2.1. 0,2 M Cacodylate Tamponu :

- 9,6 gr Cacodylate
- 150 cc distile su

2.2.2.2.2. Fiksatifler:

1-) (0.1M) Cacodylate Tamponlu % 2'lik Glutaraldehyde % 2'lik Paraformaldehide Fiksatif solüsyonu:

- 8 cc % 25'lik glutaraldehit
- 25 cc % 8'lik paraformaldehit
- 17 cc distile su
- 50 cc 0.2M'lik cacodylate tamponu

2-) % 8'lik Paraformaldehit Solüsyonu :

- 40 gr Paraformaldehit (Merck, 1.04.005.1000)
- 500 cc Distile suda çözülür.

58-60 °C'de 30 dakika karıştırılarak çözünmesi kolaylaştırılır. Soğutulur, süzülür ve pH'ı 7,2-7,4 arasına getirilir.

3) Osmium Tetroksit (Postfiksasyon için):

1 gr toz Osmiyum Tetroksit 50 cc. distile su içinde çözündürülür. 1:1 oranında cacodylate tamponu ile dilüe edilerek postfiksasyon işleminde kullanılır.

2.2.2.3. Elektron Mikroskopik Yöntem:

2.2.2.3.1. Fiksasyon:

Embriyolar (0.1M) Cacodylate Tamponlu % 2'lik Glutaraldehyde solüsyonunda 24 saat fikse edildi. Cacodylate tamponunda 1 gün bekletildi Osmium Tetroksit ile 30 dakika postfiksasyon yapıldı. Postfiksasyon işlemi için 1:1 oranında hazırlanan osmium tetroksit (OsO₄) + Cacodylate tampon karışımı kullanıldı ve ışık görmemesi için karanlık ortam sağlandı. Postfiksasyon sonrası embriyolar Cacodylate tamponunda 5 dakika bekletildi. Daha sonra dehidratasyon işlemine geçildi.

2.2.2.3.2. Dehidratasyon :

- % 50 Alkol' de 5 dakika, 4°C'de,1000 rpm'de santrifüj edildi.
- % 50 Alkol'de 5 dakika, 4°C'de,1000 rpm'de santrifüj edildi.
- % 70 Alkol'de 5 dakika, 4°C'de, 1000 rpm'de santrifüj edildi.
- % 95 Alkol'de 5 dakika, 4°C'de,1000 rpm'de santrifüj edildi.
- % 100 Alkol'de 5 dakika, 4°C'de,1000 rpm'de santrifüj edildi.
- % 100 Alkol'de 5 dakika, 4°C'de,1000 rpm'de santrifüj edildi.

Alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon işlemi tamamlandı

- 1:1 oranında % 100 Alkol- Propilenoksit'te,
10 dakika 4°C'de 1000 devirde santrifüj edildi.
- Saf propilenoksit 10 dakika 4°C'de 1000 devirde santrifüj edildi.
- Saf propilenoksit 10 dakika 4°C'de 1000 devirde santrifüj edildi

Propilenoksit uygulamaları ile şeffaflaştırma işlemi tamamlandı. Daha sonra embriyolar temiz tüplere alındı.

- 2:1 oranında propilenoksit + Epon karışımında
30 dakika 4°C'de 1000 devirde santrifüj edildi.
- 1:2 oranında propilenoksit + Epon karışımında
30 dakika 4°C'de 1000 devirde santrifüj edildi

Santrifüj sonrası embriyoların üzerindeki pellet pipetle alınarak atıldı. Embriyolara DMP-30'suz Epon karışımı konuldu ve embriyoların dibe çökmesinin sağlanabilmesi için 1 gece buzdolabında 4 °C de bekletildi.

2.2.2.3.3. Gömme :

- Buzdolabında bekletilen embriyolar dibe çöktükten sonra, üzerlerine % 1,5 oranında DMP-30 içeren epon karışımı eklenerek BEEM 036 kapsüllere gömüldü.
- Kapsüller, 37 °C'deki etüvde 24 saat tutuldu.
- Etüv ısısı 45°C ye yükseltildi ve 24 saat tutuldu.
- Etüv ısısı 60°C ye yükseltildi ve 24 saat tutuldu.
- Etüvden çıkarılan kapsüller, tamamen sertleşmesi ve kesime hazır hale gelmesi için oda ısısında 3 gün bekletildi.

2.2.2.3.4. Kesit Alma:

Reichert, Austria Nr.313864 ultramikrotom ile elektron mikroskop incelemeleri için 0,5 µm kalınlıkta kesitler alındı.

2.2.2.3.5. Boyama:

2.2.2.3.5.1. Uranil Asetat Hazırlanması :

- Uranil Asetat3,75 gr.
- Distile su.....50 cc.

250 ml'lik erlenmayer kabına 50 cc. kaynatılmış-soğutulmuş distile su 3,75 gr. uranil asetat konur ve 15 dakika karıştırılır. Erlenmayer parafilm ile kapatılır. En az 1-2 saat buzdolabında bekletilir. 15 ml.lik konik santrifüj tüpüne 5 ml etanol ve 5 ml stok solüsyonundan konulur , 1800 devirde + 4°C 'de 20 dakika soğuk santrifüj yapılır. Süpernatant boyamada kullanılır.

2.2.2.3.5.2. Kurşun Boyası Hazırlanması:

- Kurşun nitrat ($Pb(NO_3)_2$)1,33 gr.
- Sodyum sitrat $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 5H_2O$ 2,137 gr.

50 ml. şişeye 30 ml. kaynatılmış distile su konur. Kurşun nitrat+sodyum sitrat ikisi bir arada karıştırılır. Üzerine 8 ml. 1 N NaOH eklenir. Toplam hacim 50 ml. distile suyla tamamlanarak stok solüsyonu hazırlanır. 15 ml.'lik santrifüj tüpüne 10 ml. stok solüsyonu konulur ve soğutmalı santrifüjde 1800 devirde 20 dakika santrifüj yapılır. Süpernatant boyamada kullanılır.

2.2.2.3.5.3. Kesitlerin Uranil Asetat İle Boyanması:

Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant boya kaplarına yetecek miktarda konur içerisine parlak yüzey yukarı, mat yüzey aşağı gelecek şekilde gridler yerleştirilir ve üzeri kapatılır. 9,5 dakika bekletildikten sonra gridler pens yardımıyla çıkarılıp distile su ile yıkanır ve kurumaya bırakılır.

2.2.2.3.5.4. Kesitlerin Kurşun İle Boyanması:

Gridler kuruduktan sonra ikinci boyama olan kurşun boyamasına geçildi. Önceden hazırlanmış olan 4 mm'lik dişli mumlu petri kutularına grid sayısı kadar damlatılan kurşun boyası üzerine gridler mat tarafı solüsyona temas edecek şekilde yerleştirildi. Havadaki karbondioksiti alması için hazırlanmış olan petri kutusunun bir kenarına sodyum hidroksit (NaOH) konuldu. 20 dakika sonunda gridler boyadan çıkarılıp yıkandı.

Bütün bu işlemlerden sonra gridler Carl Zeiss Libra 120 plus Transmission Elektron Mikroskopta incelenerek değerlendirildi ve gerekli fotoğraflar değişik büyültmelerde çekildi.

2.2.3. Floresan Mikroskop Gereç Ve Yöntem

2.2.3.1. Floresan Mikroskopik Gereç:

- PBS
- PVP
- Triton X-100
- Propidium Iodide (PI, Sigma P4170)
- Hoescht 33258 (Sigma B2883)
- Toz Paraformaldehit (Merck 1.04.005.1000)
- Gliserol
- 4 Gözlü Petri (4-Well Plate)
- Lam-Lamel (Menzel-Glose Polysine-25x75x1 mm & Surgipath Precleaned)

2.2.3.2. Floresan Mikroskopik Yöntem

2.2.3.2.1. Solüsyonların Hazırlanması :

1) PBS Solüsyonu

NaH₂PO₄.H₂O -----4,8 gr

NaCl -----7,8 gr

Distile Su ----- 1000 ml (pH: 7.2)

2) PBS/PVP Solüsyonu Hazırlanması :

1 ml 0,1 M PBS içinde 1 mg PVP olacak şekilde hazırlanır.

3) %0,5 Triton X-100 Hazırlanması :

Triton-X 0,1 M PBS içinde sonuç konsantrasyonu % 0,5 (v/v) olacak şekilde dillüe edilerek hazırlandı.

4) PI Stok Solüsyonunun Hazırlanması :

2,5 mg/ml stok PI hazırlandı ve kullanıma kadar +4°C’de saklandı.

5) PI Boyama Solüsyonunun Hazırlanması :

Sonuç konsantrasyonu 100µg/ml olacak şekilde, 1 ml PI stok solüsyonu, 25 ml % 0,5 Triton X-100 solüsyonu ile karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan solüsyon boyama sonrası tekrar kullanım amacıyla +4°C’de 3 hafta süreyle karanlıkta saklanabilir.

6) Hoescht Stok Solüsyonunun Hazırlanması:

Sonuç konsantrasyonu 10 mg/ml olacak şekilde 25 mg Hoescht 2,5 ml distile suda çözündürüldü ve kullanıma kadar +4°C’de saklandı.

7) % 4’lük Paraformaldehit Solüsyonu :

20 gr Paraformaldehit (Merck, 1.04.005.1000), 500 ml distile suda 58-60°C’de 30 dakika karıştırılarak çözülür. Daha sonra soğutulup, süzülerek pH 7 2-7,4 arasında olacak şekilde ayarlanır

8) Hoescht Boyama Solüsyonunun Hazırlanması :

Hoescht Stok Solüsyonu 1/1000 oranında %4 paraformaldehit ile karıştırılarak hazırlandı. Hoescht boyama solüsyonu boyamanın yapılacağı gün hazırlanır ve boyama sonrası atılır tekrar kullanılmaz.

2.2.3.2.2. Boyama:

- 4-Well Plate’in 1. gözüne 500 µl PI boyama solüsyonu, 2. 3. ve 4. gözlerine 500 µl PBS/PVP solüsyonu konularak 39°C’de 10 dakika hotplate’te ısıtıldı.

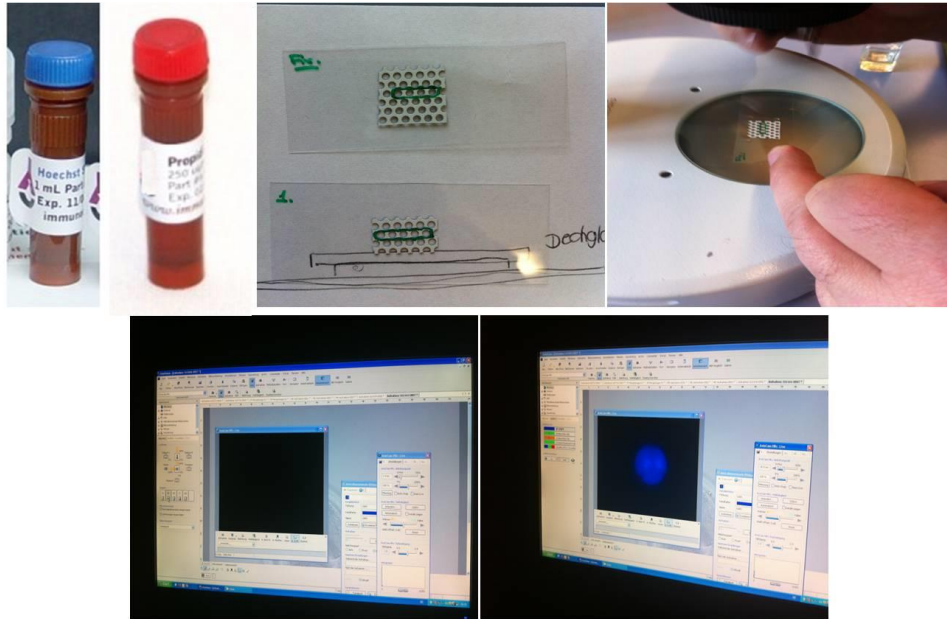
- Embriyolar kültür mediumundan alınarak 1.göze yerleştirildi ve 30 saniye bekletildi. Embriyolar 1.gözden alınarak sırasıyla PBS/PVP içeren 2. 3. ve 4. gözlerden geçirilerek yıkandı.

- Hoescht boyaması için 1. gözünde 50 µl Hoescht boyama solüsyonu, 2. 3. ve 4. gözlerinde ise 500 µl PBS/PVP solüsyonu bulunan başka bir 4-Well Plate hazırlandı.

Embriyolar, birinci 4-Well Plate'den alınarak, hazırlanan ikinci 4-Well Plate'in 1. gözüne yerleştirildi ve 15 dakika beklendi.

- Embriyolar 1. gözden alındı ve sırasıyla PBS/PVP içeren 2. 3. 4. gözlerden geçirilerek yıkandı.

- Yıkama işlemi sonrası embriyolar lam üzerine yapıştırılan film kaplama materyalinin gözenekleri içine alındı ve Zeiss Axiovert 200M Floresan mikroskop ile incelenerek görüntüleme işlemleri yapıldı.



Şekil 10.Floresan Boyalar, takip ve kullanılan bilgisayar yazılımı



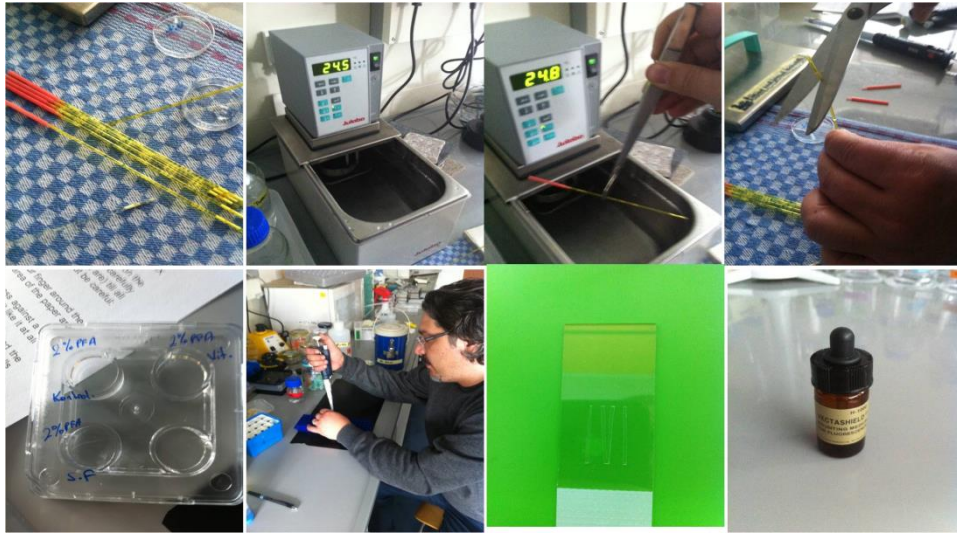
Şekil 11. Axiovert 200M model Floresan mikroskop ve analiz sırasındaki görünüm.

2.2.4. Konfokal Mikroskop Gereç ve Yöntem:

2.2.4.1. Konfokal Mikroskop Gereç:

- PBS
- Toz Paraformaldehit (Merck 1.04.005.1000)
- Glisin
- YBB
- Mouse Monoclonal anti- α -Tübülün Antibody (Sigma Clone B-5-1-2)
- Phalloidin Tetrametilrhodamin B isotiyosiyonat (Sigma, P1951)
- Goat Anti-Mouse IgG (H&L) Fluorescein Conjugated, Secondary Antibody (Chemicon, AP124F)
- DAPI
- Vectashield hard set (Vector Laboratories USA; H1000)

- Lam-Lamel (Menzel-Glose Polysine-25x75x1 mm & Surgipath Precleaned Adhesive 00210 White, Unilab Lamel 24x 50 mm)
- Selo Bant
- Tırnak Ojesi
- Işık Mikroskobu (Olympus BX-51 light microscope)
- 10 µl Transferpettör Fixed-Volume (Brand; 701858),
- 10 µl Transferpettör pipet ucu (Brand;701902)
- Konfokal Mikroskop (Leica TCS SP5)



Şekil 12. Konfokal mikroskopi için hazırlık, boyama ve kapatma işlemleri

2.2.4.2. Konfokal Mikroskop Yöntem :

2.2.4.2.1. Yolanda Bloklama Solüsyonunun Hazırlanışı:

- 5 ml NaCl
- 1,5 ml HEPES/KOH (pH= 7,4)
- 200 µl MgCl
- 25 µl EGTA/ NaOH
- 200 µl Triton-X
- 1,1 ml Fish Skin Jelatin
- 2 g BSA

- 92 ml Distile su

2.2.4.2.2. Boyama :

Kültür mediumundan alınan embriyolar;

- 2x5 dakika PBS içinde yıkandı.
- 10 dakika 20 mM Glisin içeren PBS'e alındı.
- 2 x 5 dakika PBS içinde yıkandı.
- 10 dakika % 0,3 Triton X-PBS Solüsyonunda bekletildi.
- 2 saat YBB içerisinde inkübe edildi.
- Mouse monoklonal anti- α -Tübülün antibody ve Phalloidin Tetramethylrhodamine B isothiocyanate son konsantrasyonları 1:2000 oranında olacak şekilde YBB ile dilüe edidildi ve embriyolar 2 saat bu solüsyonda karanlık ortamda primer antikor ile inkübe edildi.
- 4 kez YBB ile yıkandı.
- 1 saat karanlık ortamda sekonder antikor ile inkübe edildi
- 6 kez YBB ile yıkandı.
- 2 kez PBS ile yıkandı.
- 10 dakika % 4 PFA'lı PBS'e alındı.
- 2 kez PBS ile yıkandı.
- DAPI 2,5 μ g/ml olacak şekilde PBS ile dilüe edildi.
- Embriyolar 8 dakika hazırlanan DAPI ile boyandı.
- 2x5 kez PBS ile yıkandı. Bu sırada lam üzerine yapıştırılan selo bant'ta ışık mikroskobu altında embriyoların yerleştirileceği oluklar oluşturuldu.
- Embriyolar damla şeklinde hazırlanan Vectashield içine alındı ve 1 dakika içerisinde görüntüleme aşaması için oluklar içerisine yerleştirilerek üzerleri lamelle kapatıldı. Lamel çevesine tırnak ojesi sürüldü ve kuruması için beklendi.
- Hazırlanan preperatlar Leica TCS SP5 model konfokal mikroskopta incelenerek değerlendirildi ve gerekli fotoğraflar değişik büyültmelerde çekildi.



Şekil 13. Leica TCs SP5 model konfokal mikroskopta görüntü eldesi.

2.3. İstatiksel Yöntem:

Çalışmada elde edilen veriler ortalama $\pm$ standart hata hesaplanarak sunuldu. Embriyolara ait Zona Pellusida kalınlıkları açısından gruplar arası farkın anlamlılığının analizinde bağımsız örnekler için nonparametrik bir test olan Kruskal Wallis testi kullanıldı. Anlamlılık eşiği 0.001 olarak değerlendirildi. P değeri 0.001'in altında gözlendiğinde posthoc analiz uygulandı ve hangi iki grup arasında anlamlı farklılık olduğu Mann Whitney U testiyle analiz edildi. Slow Freezing ve Vitrifikasyon gruplarına ait ZP kalınlıkları arasındaki farkın test edilmesinde de direkt Mann-Whitney U testi uygulandı. Tüm analizler SPSS 11.00 programı kullanılarak yapıldı.

BÖLÜM III

BULGULAR:

3.1. Oosit Aspirasyon ve IVM Bulguları:

Çalışma gruplarını oluşturacak embriyoların eldesi için mezbahaya kesime getirilen Holstein Cinsi 4-8 yaş aralığındaki sağlıklı ineklerden farklı seferlerde toplanan toplam 374 overden laboratuvar ortamında folikül aspirasyon yöntemi ile over başına ortalama 6,47 oosit aspire edilerek toplam 2423 adet oosit elde edildi. Aspire edilen oositlerden 3 ve daha fazla kümülüs hücre tabakasına sahip olan 2140 adet oosit IVM işlemine alındı ve 1840 matür oosit elde edilerek maturasyon oranının % 85,98 olduğu tespit edildi.

Tablo 10: Çalışmada kullanılan over ve oosit sayıları.Maturasyon ve over başına düşen oosit oranı.

Gruplar	Kullanılan Over Sayısı	Aspire Edilen Oosit Sayısı	Over başına düşen oosit Oranı	IVM'na Alınan Oosit Sayısı	Matür Oosit Sayısı	Maturasyon Oranı (%)
Kontrol	118	766	6,49	671	572	85,24
Slow Freezing	130	840	6,46	749	650	86,78
Vitrifikasyon	126	817	6,48	720	618	85,83
TOPLAM	374	2423	6,47	2140	1840	85,98

3.2. İn Vitro Kültür ve Kriyoprezervasyon Bulguları:

Farklı serilerde fertilizasyon işlemine alınan toplam 1840 matür oosit, fertilizasyon işlemi sonrası kültür periyodunu takiben 1193 adet 4 hücreli embriyo elde edildi.

Tablo 11: Matür Oositlerin Fertilizasyon Sonrası Bölünme Oranı

Gruplar	Fertilizasyona Alınan Matür Oosit Sayısı	4 Hücreye Ulaşan Embriyo Sayısı	Bölünme Oranı
---------	--	---------------------------------	---------------

Kontrol	572	368	64,33
Slow Freezing	650	420	64,61
Vitrifikasyon	618	405	64,53
TOPLAM	1840	1193	64,49

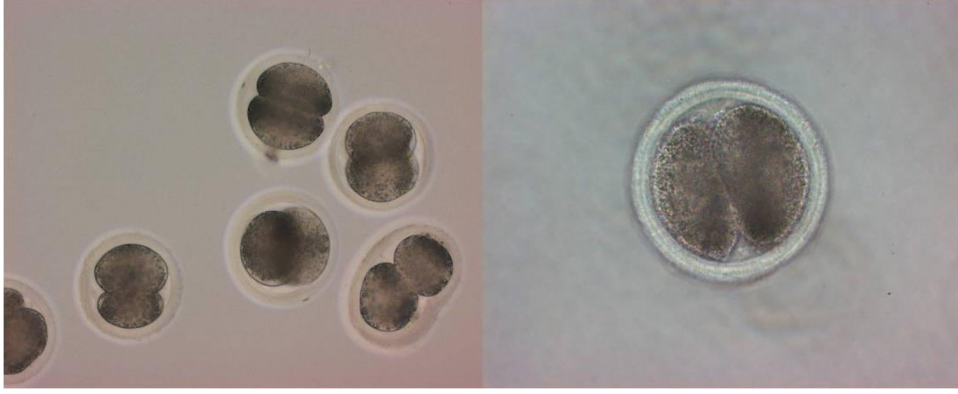
Blastosist gelişimi amacıyla kültürü yapılan kontrol grubuna ait 100 adet embriyodan 22 adet blastosist, slow freezing grubuna ait 100 adet embriyodan 1 adet geliştiği belirlendi. Slow freezing yöntemi ile dondurulan 385 adet embriyonun çözdürülmesi sonrası morfolojik olarak embriyo bütünlüğü korunmuş, 362 adet embriyo tespit edildi. Bu embriyolardan blastosist gelişimi için kültürü yapılan 100 adet embriyodan 1 adet blastosist geliştiği saptandı.

Vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan 385 adet embriyonun çözdürülmesi sonrası morfolojik olarak embriyo bütünlüğü korunmuş, 370 adet embriyo tespit edildi. Bu embriyolardan blastosist gelişimi için kültüre edilen 100 adet embriyodan 3 adet blastosist gelişimi izlendi.

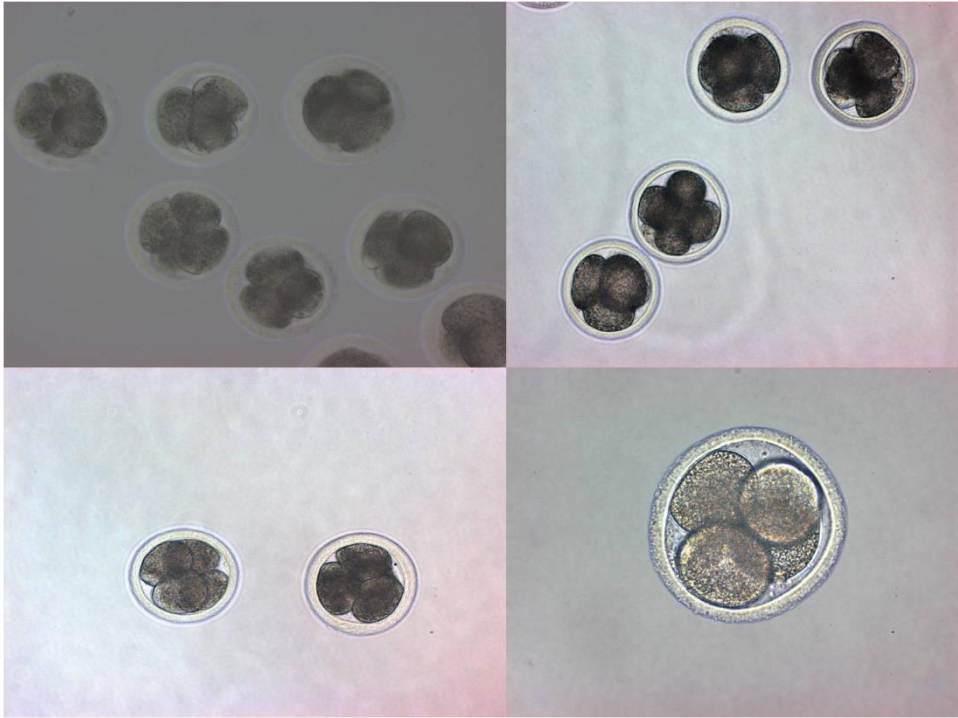
3.3. Işık Mikroskop Bulguları:

Çalışmada kullanılacak 4 hücreli inek embriyolarının eldesi amacıyla folikül aspirasyonu yöntemi ile toplanan oositlerin ışık mikroskobu altında yapılan incelemesinde, gri-beyaz renkli yapışkan yapı özelliği gösteren kumlu bir ooplazma görüntüsüne sahip etrafında farklı sayıda kümülüs hücre katmanı içeren, ZP'sı intakt, farklı boyutlarda oositler gözlemlendi. Bazı oositlerin çıplak olduğu etrafında oositi çevreleyen kümülüs hücre katmanının olmadığı dikkati çekti. Maturasyon işlemine alınan oositlerde maturasyon kontrolü amacıyla yapılan ışık mikroskobu incelemesinde kümülüs ekspansiyonu gözlemlendi. Oositi kesintisiz çevreleyen, yuvarlak, renksiz, berrak görünümlü ZP, şeffaf veya hafifçe granüler kumlu görünüme sahip sitoplazma ve dar perivitellin aralık içinde fragmente olmayan I. kutup cismine sahip matur oositler izlendi. Matur oositlerin IVF işlemini takiben yapılan kültür işlemi sonucu elde ettiğimiz embriyoların ışık mikroskobu ile yapılan incelemelerinde; geniş subzonal aralığa sahip, intakt ZP ile çevrili, sınırları düzgün fragmentasyon içermeyen eşit büyüklükte 4 adet blastomer yapısı içeren embriyo yapıları gözlemlendi. Kriyoprezervasyon işlemi için kriyoprezervasyon solüsyonları içine alınan embriyoların ışık mikroskop

incelemede; Embriyoyu oluşturan blastomer yapılarının merkeze doğru büzüştüğü, blastomerler ve ZP arasında geniş boşlukların oluştuğu, blastomerlerin yuvarlak görünümlerinin kaybolduğu, blastomerlerin ZP'ye bakan yüzeylerinin küntleştiği görüldü. Dondurulan embriyoların çözündürme işlemini takiben yapılan ışık mikroskop incelemesinde; kriyoprezervasyon solüsyonu içinde büzüşen embriyoların henüz tam ekspanse olmadığı, bazı blastomerlerin dejenere olduğu, slow freezing grubundaki embriyolarda daha fazla sayıda olmak üzere her iki grupta da bazı embriyoların ZP'sinde kırılmalar olduğu gözlemlendi.



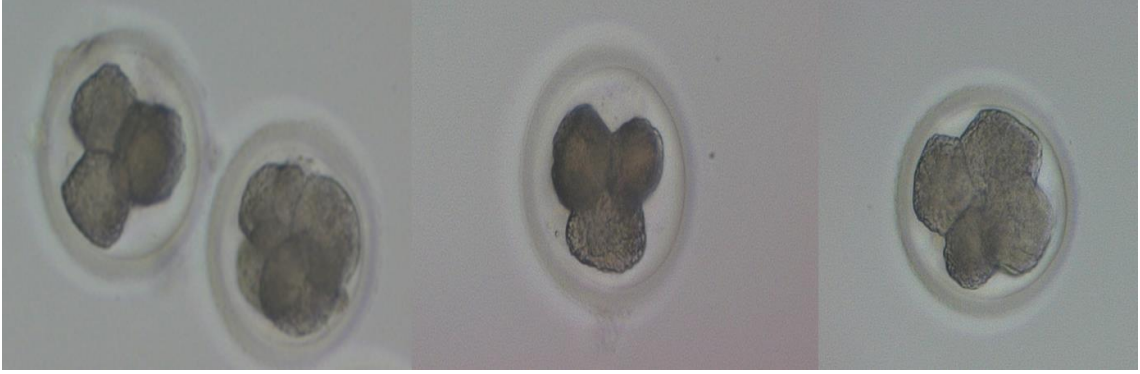
Şekil 14. İki hücreli inek embriyosu (X20-40 Büyütme)



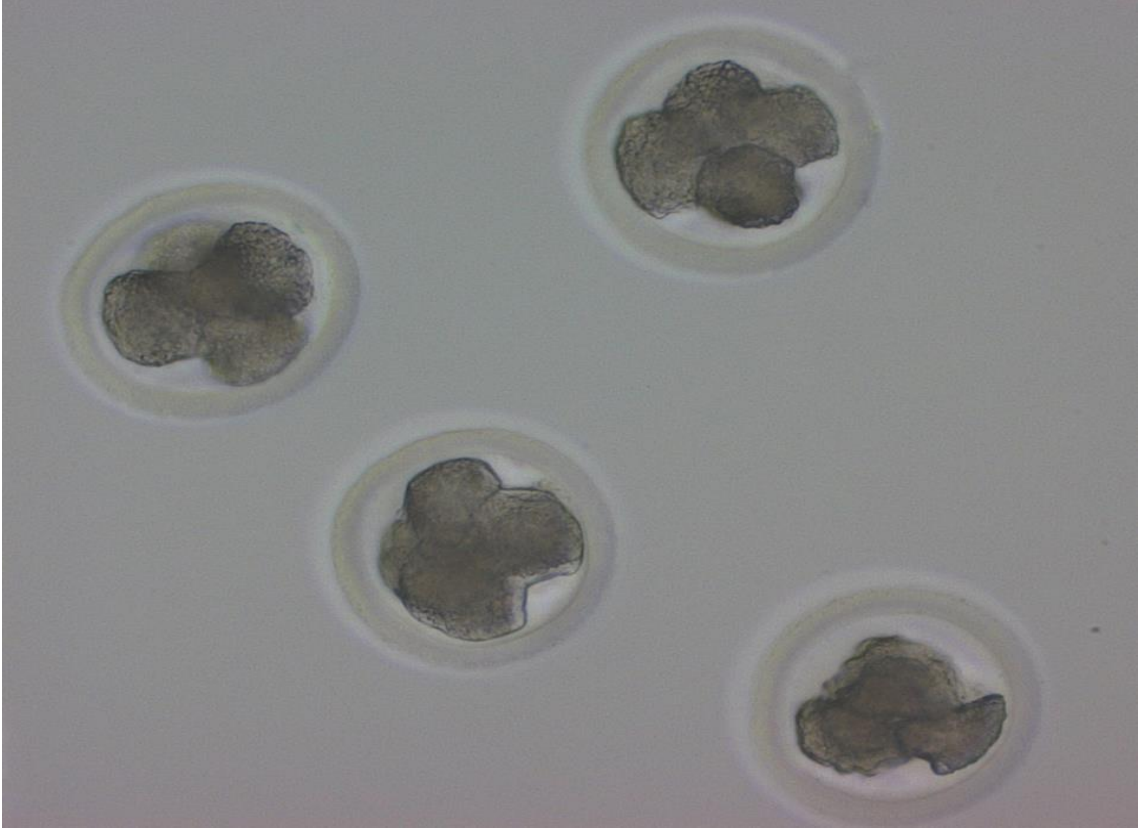
Şekil 15. Dört hücreli inek embriyosu (X20-40 Büyütme)



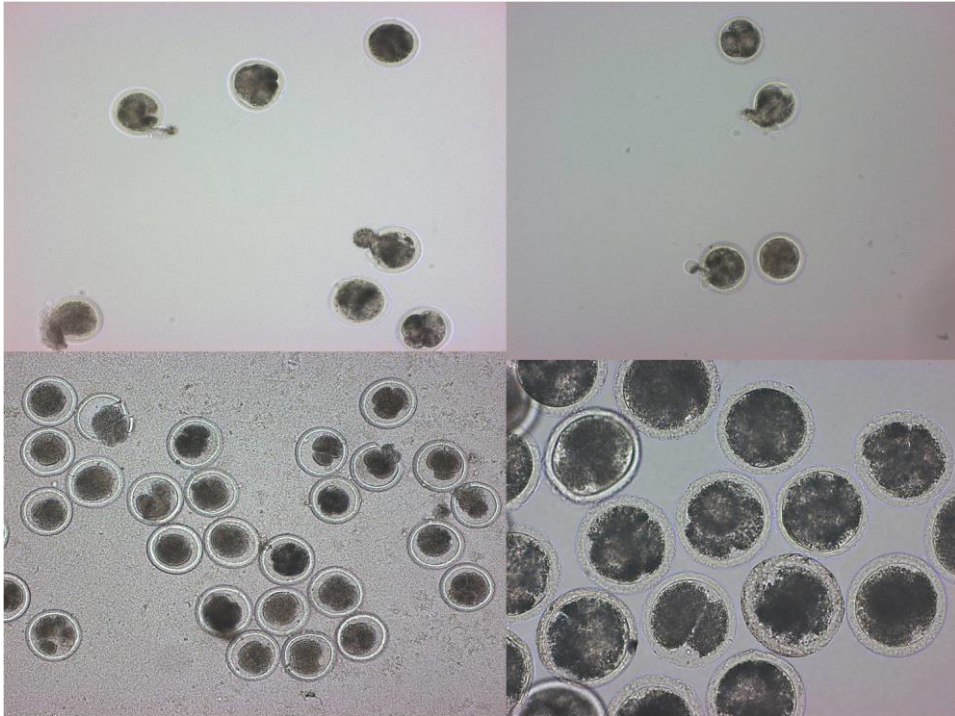
Şekil 16. İnek blastosistlerinin görünümü (X100 Büyütme)



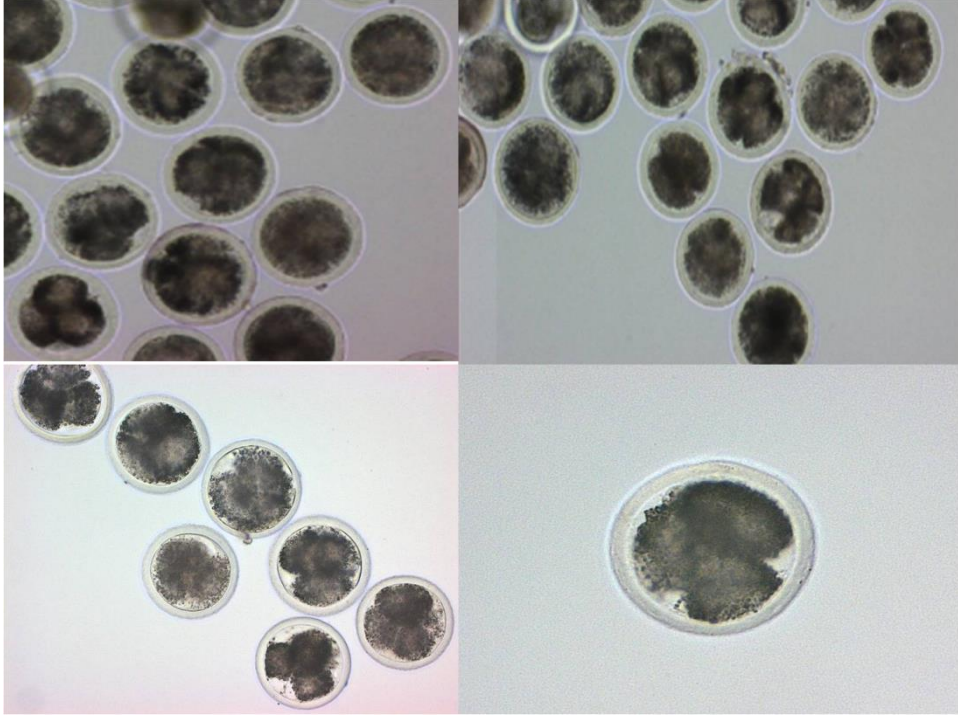
Şekil 17. Slow Freezing solüsyonu içindeki embriyoların görünümü (X40-100 Büyütme)



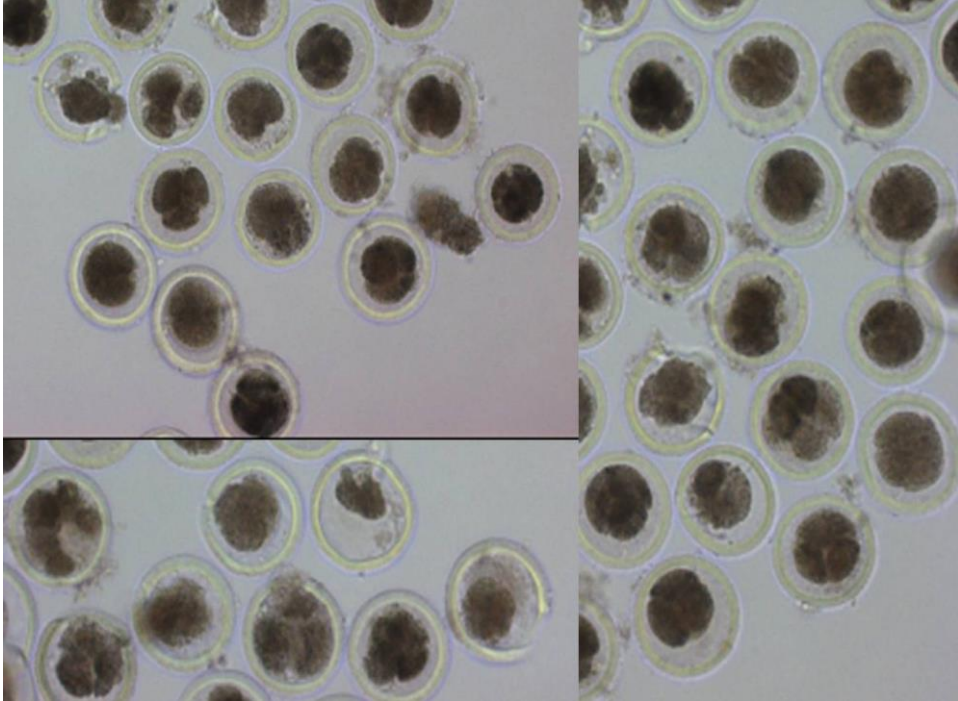
Şekil 18. Vitrifikasyon solüsyonu içindeki embriyoların görünümü (X40-100 Büyütme)



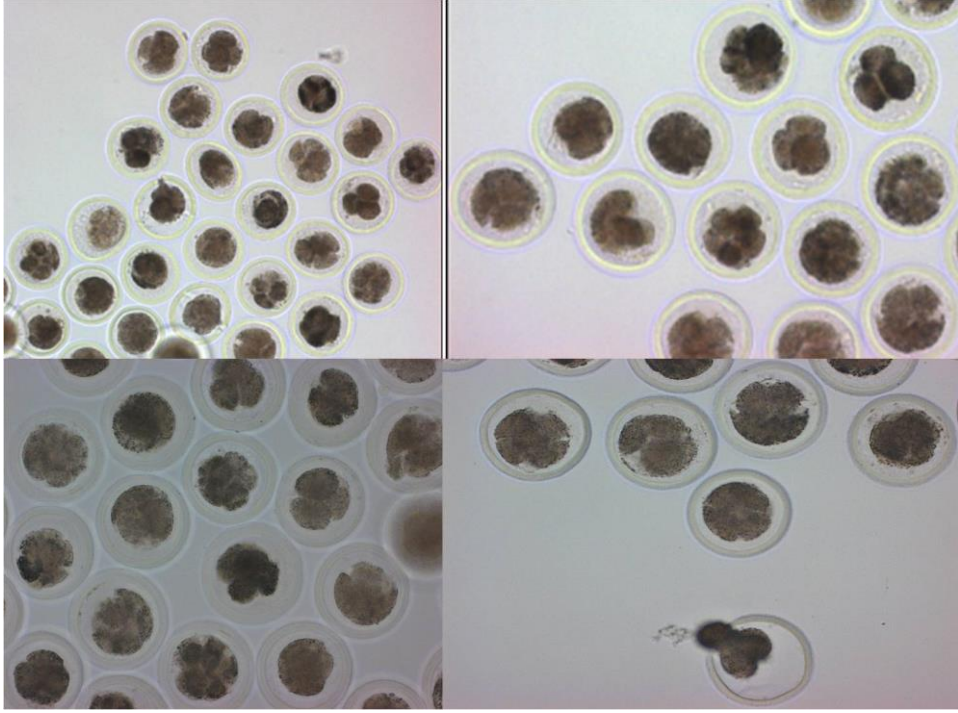
Şekil 19. Slow Freezing işlemi sonrası çözdüğülen embriyoların görünümü (X10-20-40 büyütme)



Şekil 20. Vitrifikasyon işlemi sonrası çözündürülen embriyoların görünümü (X20-40 büyütme)



Şekil 21. Slow Freezing işlemi sonrası çözündürülüp blastosist aşamasına gitmeyen embriyoların görünümü (X20-40 büyütme)

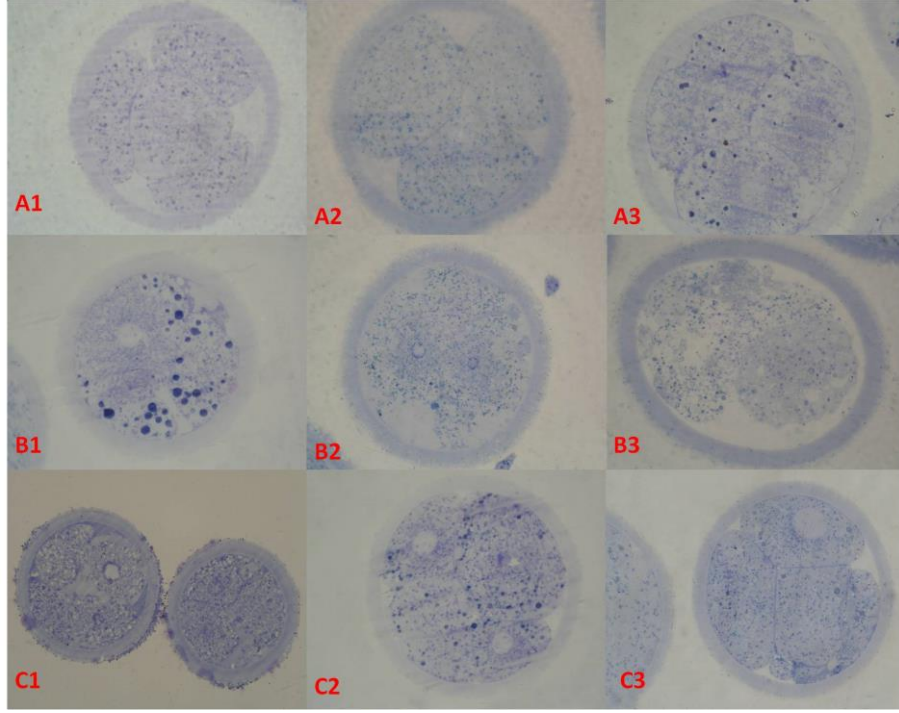


Şekil 22. Vitrifikasyon işlemi sonrası çözündürülüp blastosist aşamasına gitmeyen embriyoların görünümü (X10-20-40 büyütme)

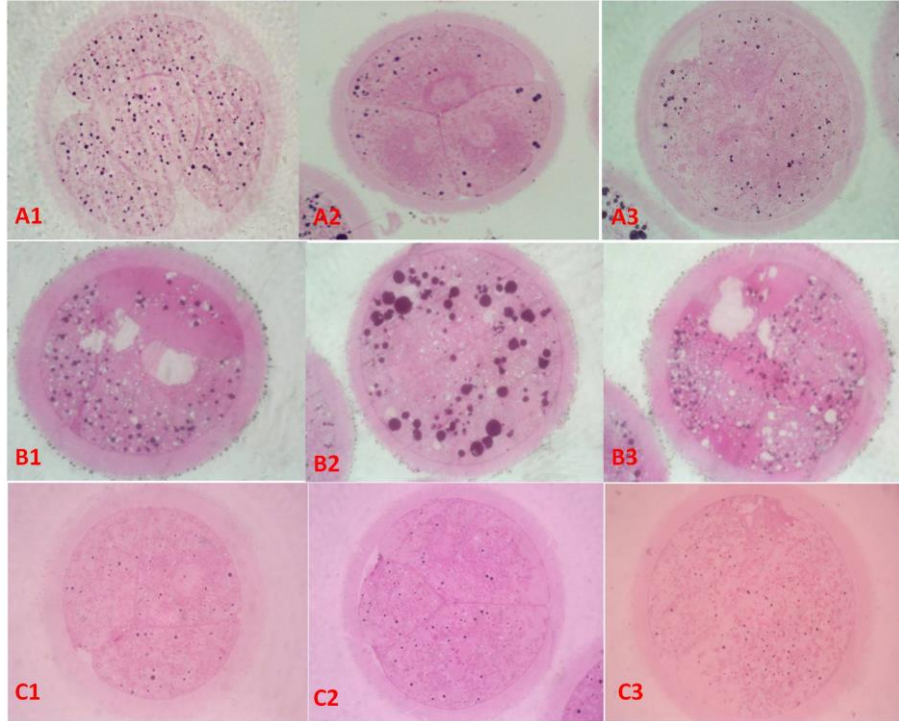
Her 3 çalışma grubuna ait 1µm’luk yarı ince epon kesitlerin AzurII–Metilen Blue–Basic Fuksin ve Toluidine Blue boyaları ile boyanarak ışık mikroskopunda yapılan incelemelerinde; Kontrol grubu embriyolarının sınırları belirgin, fragmentasyon içermeyen, eşit büyüklükte blastomer yapıları içerdiği, blastomerler arasında geniş subzonal alanların bulunduğu, blastomerleri çevreleyen ZP’nin sınırlarının belirgin olduğu gözlemlendi. Farklı kesitlerde blastomer yapıları içinde konturları düzgün, yuvarlak görünümlü nükleus yapıları ve sitoplazma içinde dağınık bir şekilde yer alan farklı büyüklüklerde çok sayıda lipid damlacıkları izlendi (Şekil 19A1-A2-A3- Şekil 20A1-A2-A3).

Slow freezing ve vitrifikasyon grubu embriyolarının incelemesinde; bazı embriyolarda blastomer sınırları belirgin olarak görülmekle birlikte genel olarak blastomer sınırlarında düzensizleşme, embriyoları oluşturan blastomerlerde fragmentasyon ve/veya dejenerasyonlar görüldü. Slow freezing grubuna ait embriyoların ZP kalınlıklarının TEM incelemelerinde yapılan ölçümlerle uyumlu olarak vitrifikasyon grubuna ait embriyolara kıyasla daha kalın olduğu gözlemlendi. Slow freezing grubuna ait embriyolardaki subzonal aralıkların vitrifikasyon grubundakilere kıyasla daha dar olduğu görüldü. Slow freezing grubu embriyolarında daha fazla olmakla birlikte her iki gruba ait embriyolarda sitoplazma içinde

yer yer vakuoalizasyonlar, interblastomer ve subzonal aralıklarda hücrel atıklar görüldü. Farklı kesitlerde kesit düzlemine bağı olarak blastomer yapıları içinde konturları düzgün, yuvarlak görünümlü nükleus yapıları izlendi. Blastomer yapıları içerisinde dağınık şekilde yer alan farklı büyüklüklerde çok sayıda lipid damlacıkları görüldü (**Şekil 23** B1-B2-B3-C1-C2-C3, **Şekil 24** B1-B2-B3-C1-C2-C3).



Şekil 23. Toluidin Blue ile boyalı kontrol ve çalışma gruplarına ait embriyoların görünümleri **A1-A3:** Kontrol, **B1-B3:** Slow freezing, **C1-C3:** Vitrikasyon (X40-100 Büyütme)



Şekil 24. Azur II- Metilen blue- Basic fuksin ile boyalı kontrol ve çalışma gruplarına ait embriyoların görünümleri **A1-A3:** Kontrol, **B1-B3:** Slow freezing, **C1-C3:** Vitrikasyon (X100 Büyütme)

3.4. Transmisyon Elektron Mikroskop Bulguları:

Kontrol grubuna ait embriyoların TEM incelemesinde; Konturları düzgün ve belirgin, yuvarlak görünümlü ve bazal tarafa doğru eksantrik yerleşimli ökromatik nükleus ile nükleus zarına ait çift membran yapısı görülmektedir.

Sitoplâzma içinde yer yer matür mitokondri yapıları ve özellikle perinüklear bölgede olmak üzere çok sayıda dağınık şekilde bulunan, yuvarlak veya ovoid şekilli, kristalları periferik yerleşimli, dens matriks içinde vakuole sahip, başlık şeklinde (hooded) yapı içeren gelişmekte olan immatür mitokondriler gözlenmektedir. Nükleusun dış zarıyla devam eden bir zar tarafından çevrelenmiş, büyük çoğunluğu gelişmekte olan birbirlerinden ayrılmış gibi görülen, yassı üstüste dizilmiş kese şeklinde GER sisternaları ve zarın sitozolik tarafında izlenen poliribozomlar dikkati çekmektedir. Gelişim aşamasında, mitokondrilere eşlik etmekte olduğu görülen yarı saydam, veziküler düz endoplazmik retikulum yapıları izlenmektedir. Hızlı gelişen yada farklılaşan hücrelerde genellikle sitoplazma içinde bulunan, nüklear zar yapısından türediği düşünülen kromatinden yoksun, nüklear por kompleksine (NPC) benzer yapıdaki çok yoğun biçimde paketlenmiş por kompleksleri ile yassılaştırmış membran sisterna yığınlarından oluşan anulate lameller görülmektedir. Sitoplâzma içinde dağınık yerleşimli büyük düzensiz yuvarlak görünümlü, elektron yoğun sekonder lizozomlar ve çok daha küçük görünümlü primer lizozomlar izlenmektedir. Blastomerler arasında bağlantı komplekslerinin oluşmadığı ve intersellüler aralıkta birbirlerine kenetlenmiş kısa küt mikrovillus yapılarının bulunduğu dikkati çekmektedir.

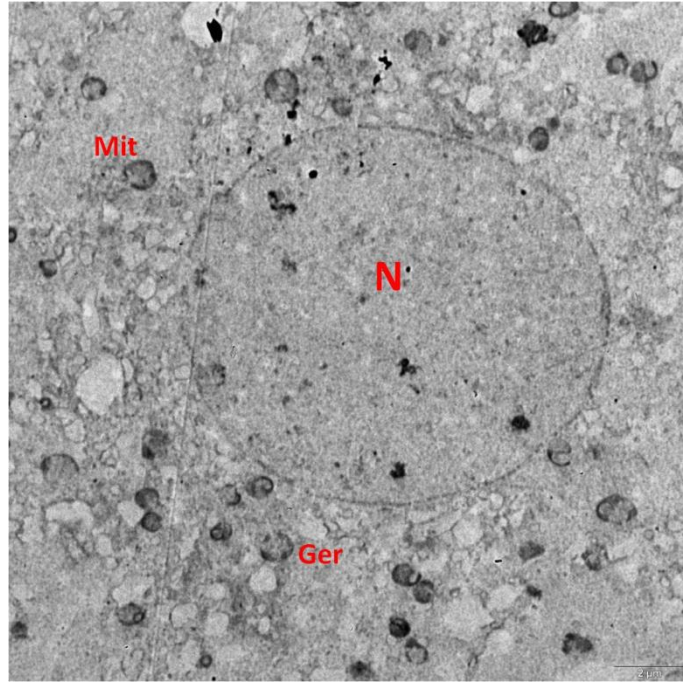
İntersellüler aralıkta yer alan hücrel debris yapılarını içeren elektron yoğun veziküler debris cisimciği gözlemlenmektedir Blastomer membranına yakın endositoz ve ekzositozda görevli küçük, tek tek dağınık yerleşimli, kaplı veziküller (coated vezikul) izlenmektedir.

Organellere eşlik eden sitoplâzma içinde daha yoğun olmak üzere, blastomer zarının altında da görülmekte olan yuvarlak düzgün çeperli, transfers kesitlerinde uzun ince görünümlü mikrotübül yapıları dikkati çekmektedir. Mikrovillus yapılarının iskeletini oluşturan ve blastomer zarına dayanıklılık veren transfers kesitlerde noktasal, longitudinal kesitlerde kırık görünümlü mikrofilaman yapıları blastomer membranı altında görülmektedir.

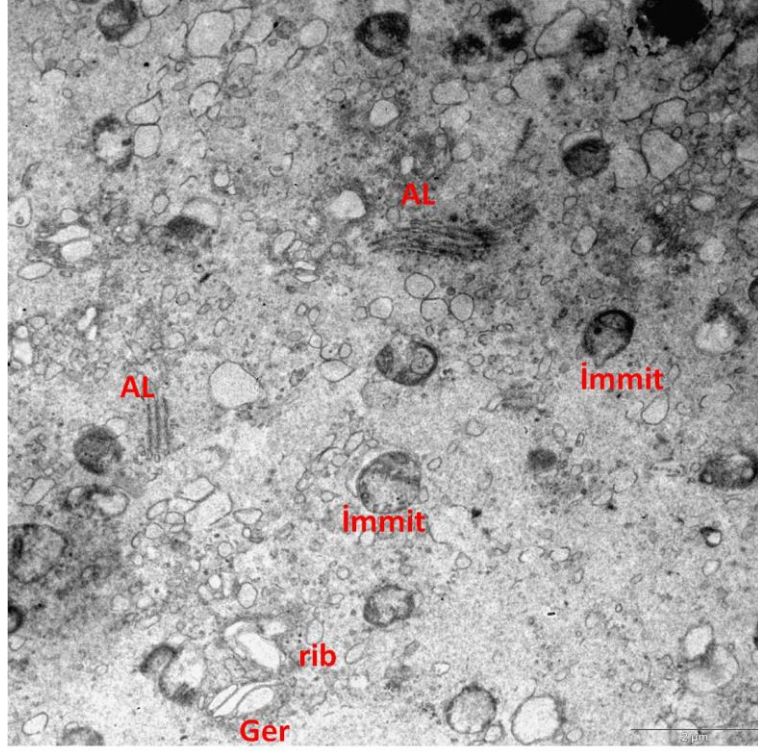
Blastomer membranı ile ZP arasında içerisinde, çeşitli şekillerde ve büyüklükte sitoplazmik parçacıklar ve hücrel atıklar bulunan subzonal aralık gözlemlenmektedir. Embriyoyu oluşturan blastomer yapılarını çevreleyerek embriyoyu saran, koruma ve blastomer

kaybını önleme gibi fonksiyonları olan yüzey sınırları düzgün, homojen yapılı ZP görülmektedir (**Şekil 25-29**).

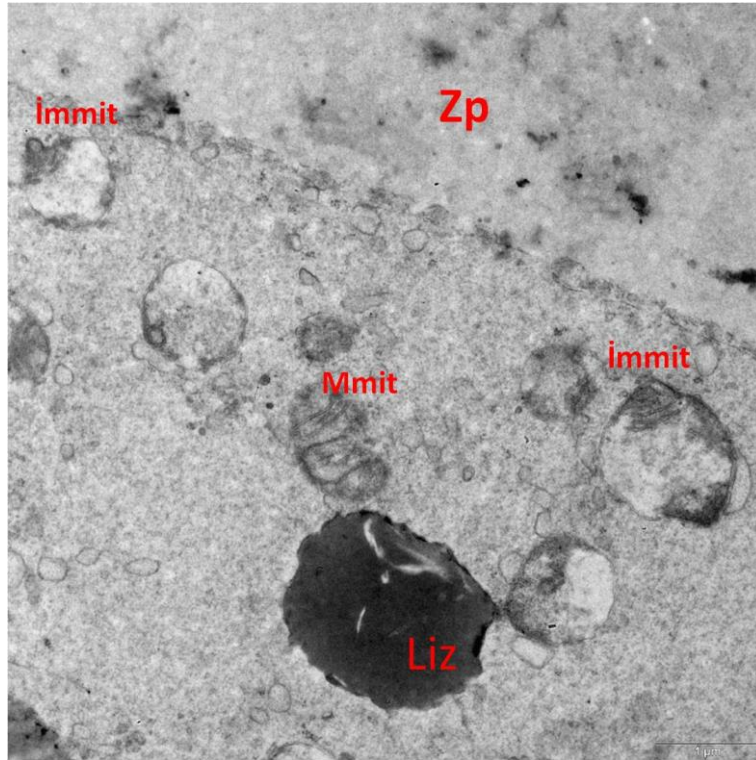
TEM incelemesi sırasında 15 embriyoda her embriyo için 3 farklı yerden ölçülerek elde edilen ortalama ZP kalınlıklarının vitrifikasyon ve slow freezing grubu embriyolarına göre daha kalın olduğu dikkati çekmektedir.



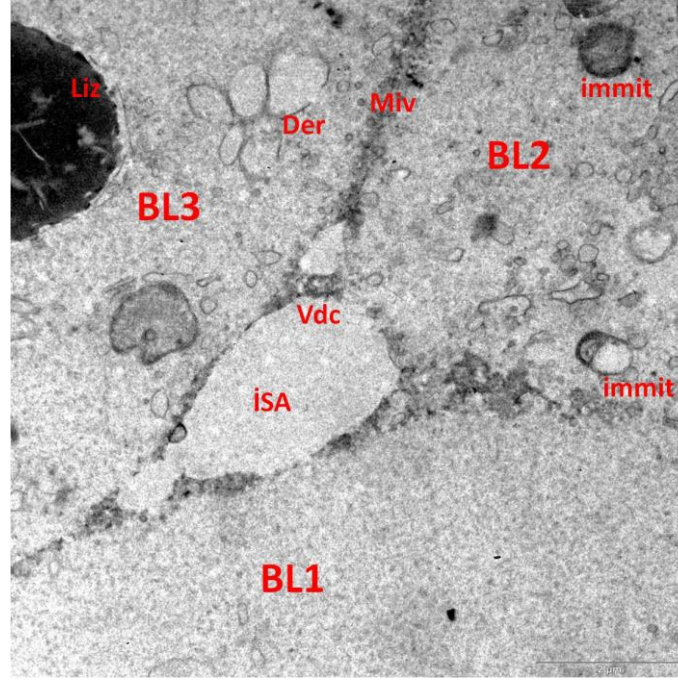
Şekil 25. Kontrol grubuna ait TEM Görüntüsü (*N*, Nükleus, *Mit*, mitokondri, *Ger*; Granüllü Endoplazmik Retikulum)



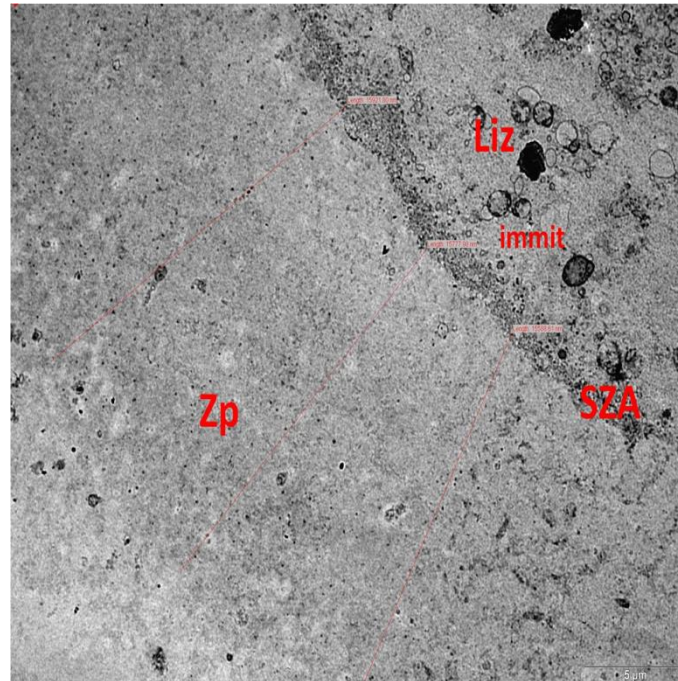
Şekil 26. Kontrol grubu TEM görüntüsü (**rib**, RiboZom, **AL**, Annulat lamel, **İmmit**, immatür mitokondri, **Ger**; Granüllü Endoplazmik Retikulum)



Şekil 27. Kontrol grubu TEM görüntüsü (**Zp**, Zona pellucida, **Liz**, Lizozom, **İmmit**, immatür mitokondri, **Mmit**; Matür mitokondri)



Şekil 28. Kontrol grubu TEM görüntüsü (**BL**, Blastomer, **Liz**, Lizozom, **immit**, immatür mitokondri, **Der**, Düz endoplazmik retikulum, **ISA**, İnterselüler aralık, **Vdc**, Veziküler debris cisimciği, **Miv**, Mikrovillus)

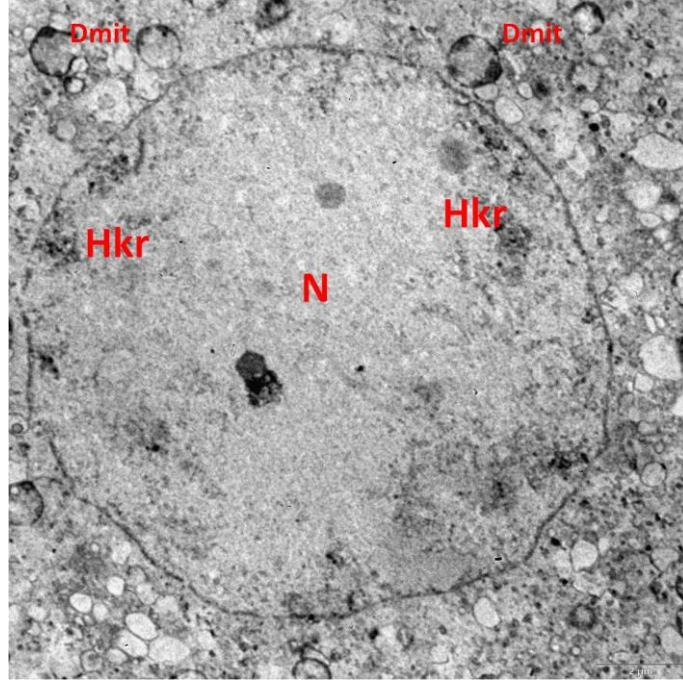


Şekil 29. Kontrol grubu TEM görüntüsü (**Zp**, Zona pellusida, **Liz**, Lizozom, **immit**, immatür mitokondri, **SZA**, Subzonal aralık)

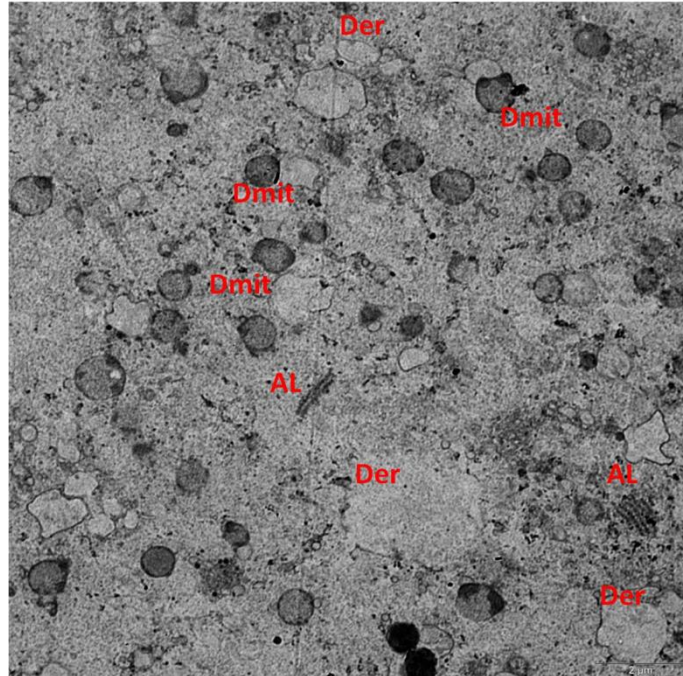
Slow freezing grubuna ait embriyoların TEM incelemesinde; konturları düzensiz nükleus zarı ile çevrili periferik yerleşimli heterokromatin odaklara sahip ökromatik nükleus yapısı izlenmektedir.

Kontrol grubuyla kıyaslandığında, sitoplazma içinde yer yer matür ve immatür mitokondrilere ilave olarak periferik kısımlarında elektron yoğun matriks yapısı ile santral kısımlarında krista ve matriks yapısında silinmelerin görüldüğü çok sayıda dejenere mitokondriler gözlemlenmektedir. Sitoplazma içinde yer yer elektron yoğun lizozomlar, veziküller, mitokondrilere eşlik etmekte olan şeffaf, dilate, endoplazmik retikulum sisternaları, annulate lamel yapıları ve lipid damlacıkları görülmektedir (**Şekil 30-34**).

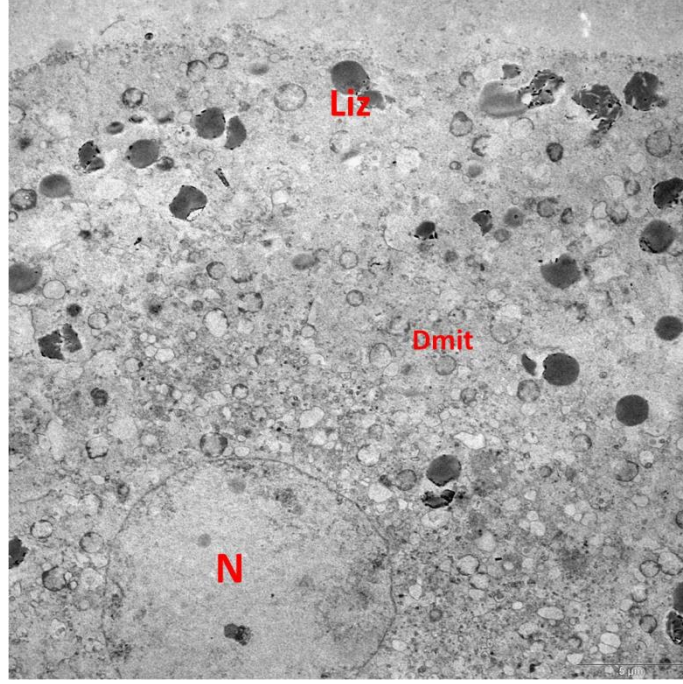
Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında subzonal aralığın daraldığı ve daralan subzonal aralıkta hücrel atıkların bulunduğı izlenmektedir. TEM incelemesi sırasında 15 embriyoda yapılan ölçümler sonucunda; her embriyo için 3 farklı yerden ölçülerek elde edilen ortalama ZP kalınlığının kontrol grubuna kıyasla daha az, vitrifikasyon grubuna göre ise daha fazla olduğı görülmüştür. Mikrofilaman yapılarının blastomer membranına yakın bölgelerde daha fazla yoğunlaştığı, sitoplazma içinde dağınık bir şekilde bulunduğı, gözlemlenmektedir. Genel olarak kontrol ve vitrifikasyon grubu ile karşılaştırıldığında mikrofilaman yapılarının azaldığı izlenmektedir. Kontrol gruplarında organeller etrafında yoğun bir şekilde izlenmekte olan mikrotübül yapılarının bu grupta yoğunluğunun azaldığı ve blastomerlerin ZP'ya komşu bölgelerinde daha fazla bulunduğı dikkati çekmektedir.



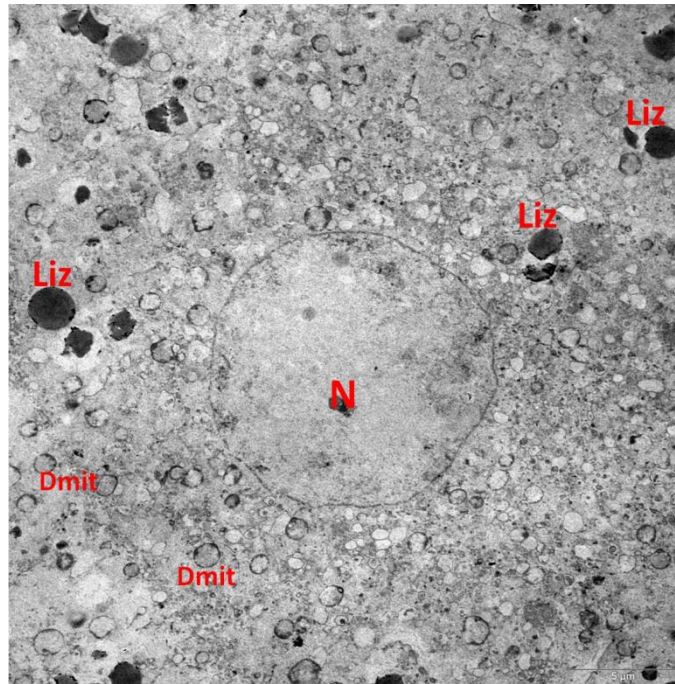
Şekil 30. Slow freezing grubu TEM görüntüsü (*Np*, Nükleus, *Dmit*, Dejenere mitokondri, *Hkr*, Heterokromatin odaklar)



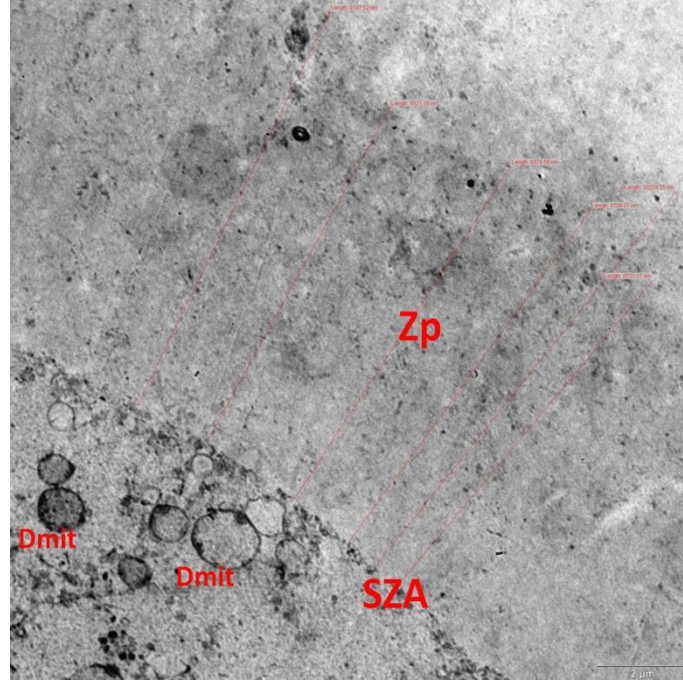
Şekil 31. Slow freezing grubu TEM görüntüsü (*Der*, Düz endoplazmik retikulum, *Dmit*, Dejenere mitokondri, *AL*, Annulat lamel)



Şekil 32. Slow freezing grubu TEM görüntüsü (*N*, Nükleus, *Dmit*, Dejenere mitokondri, *Liz*, Lizozom)



Şekil 33. Slow freezing grubu TEM görüntüsü (*N*, Nükleus, *Dmit*, Dejenere mitokondri, *Liz*, Lizozom)

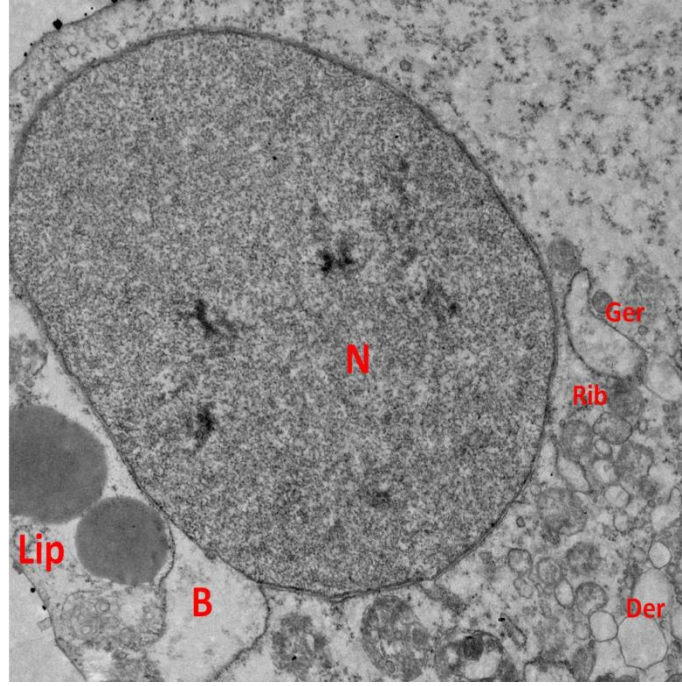


Şekil 34. Slow freezing grubu TEM görüntüsü (**Zp** Zona pellusida, **Dmit**, Dejenere mitokondri, **SZA** Subzonal aralık)

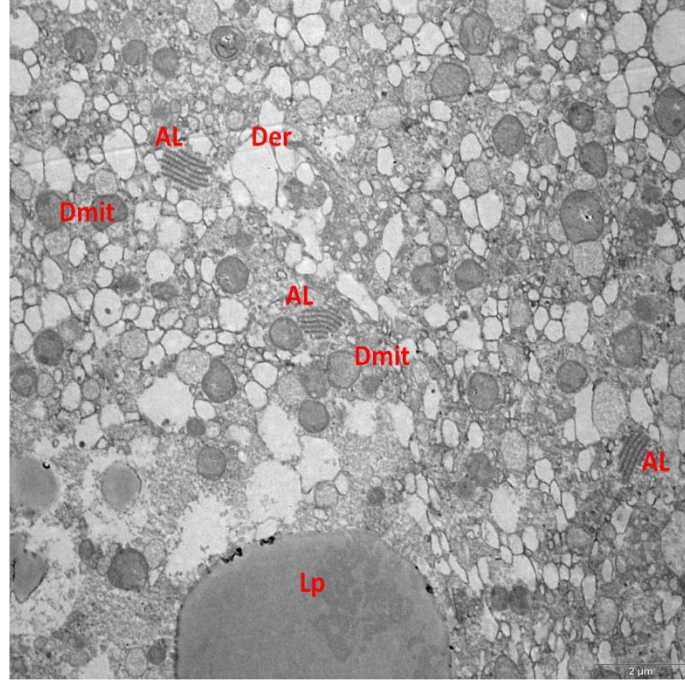
Vitrifikasyon grubuna ait embriyoların TEM incelemesinde; ovoid görünümlü, santral olmayan yerleşimde, iç ve dış membranları belirgin, ökromatik nükleus yapısı izlenmektedir. Nükleus membranlarının geniş kıvrımlar gösterdiği, içinde nükleoplazma olduğu düşünülen ve dış zarın dilatasyonu sonucu geliştiği görülen blep yapısı dikkati çekmektedir. Sitoplazma içinde dağınık bir şekilde bulunan matür mitokondrilerle birlikte, morfolojik olarak ovoid görünümde olmayan düzensiz şekilli, yer yer kristalarda ve matrikste silinmeler görülen, iç ve dış zar dilatasyonları gözlenen dejenere mitokondriler ile krista gelişimleri geri kalmış, başlık yapıları içeren, matriks içinde vakuollere sahip immatür mitokondriler izlenmektedir. Sitoplazma içinde dağınık bir şekilde yerleşimli gösteren büyük düzensiz yuvarlak görünümlü, elektron yoğun sekonder lizozomlar, daha küçük görünüme sahip primer lizozomlar, dilate anulate lamel yapıları, veziküller, dejenere mitokondrilere eşlik eden dilate DER yapıları ve büyüklü küçüklü lipid damlacıkları izlenmektedir (Şekil 35-39).

Blastomer membranı ve ZP arasında yer alan içerisinde sitoplazmik parçacıklar ve hücresel atıklar bulunan subzonal aralığın slow freezing grubu embriyolarına kıyasla daha geniş olduğu ve kontrol grubu embriyolarına benzerlik gösterdiği gözlemlenmektedir. Blastomer membranına komşu bölgelerden ZP'ya paralel subzonal aralığa doğru uzanan mikrovillus yapılarının dağılımının bozulduğu, buna bağlı olarak mikrofilaman yapılarının

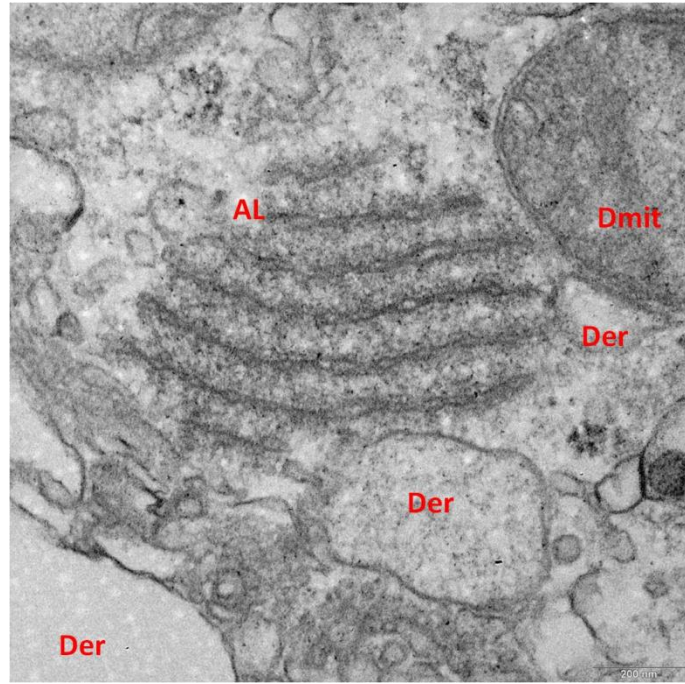
kontrol grubu embriyolar ile karşılaştırıldığında relatif azalma gösterdiği dikkati çekmektedir. Blastomerler içerisindeki gözlemlenen mikrotübül yapılarının sitoplazma içerisinde dağınık bir şekilde bulunduğu, blastomerlerin periferine doğru yoğunluğunun azaldığı izlenmektedir. ZP kalınlığının incelenmesi amacıyla 15 embriyoda yapılan ölçümler sonucunda; her embriyo için 3 farklı yerden ölçülerek elde edilen ortalama ZP kalınlığının kontrol ve slow freezing grubuna kıyasla daha az olduğu görülmektedir.



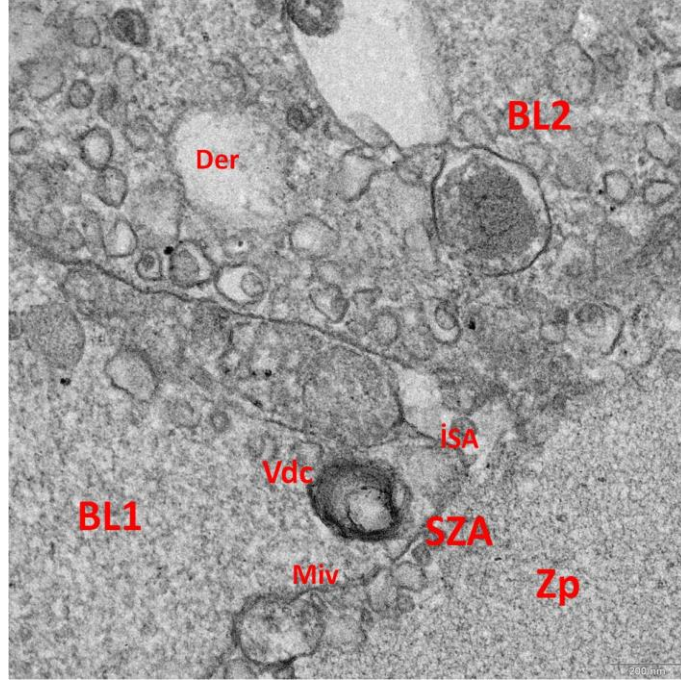
Şekil 35. Vitrifikasyon grubu TEM görüntüsü (*N* Nükleus, *Der*, Düz endoplazmik retikulum, *Ger*, Granüllü endoplazmik Retikulum, *rib*, Ribozom, *Lip*, Lipid damlacığı, *B*, Blep yapısı)



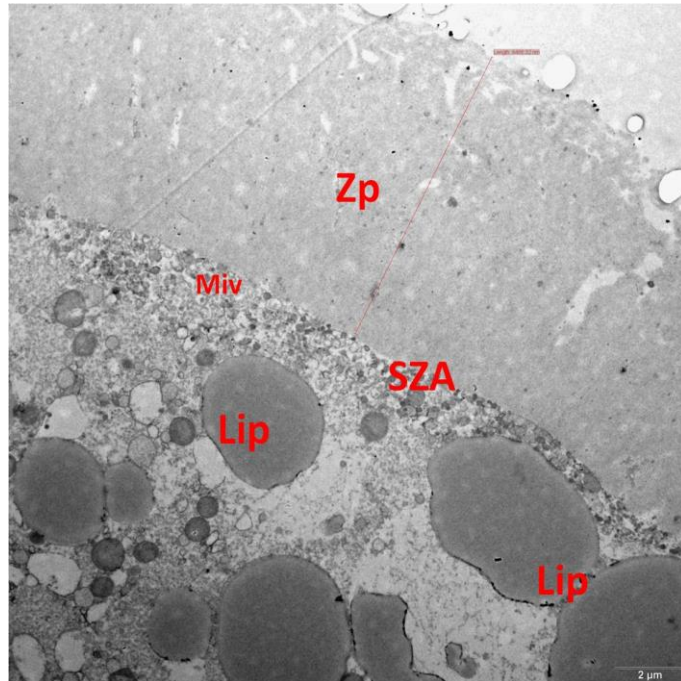
Şekil 36. Vitrifikasyon grubu TEM görüntüsü (**Dnit**, Dejenere mitokondi **Der**, Düz endoplazmik retikulum, **AL**, Annulat lamel, **Lp**, Lipid damlacığı)



Şekil 37. Vitrifikasyon grubu TEM görüntüsü (**Dnit**, Dejenere mitokondi **Der**, Düz endoplazmik retikulum, **AL**, Annulat lamel)



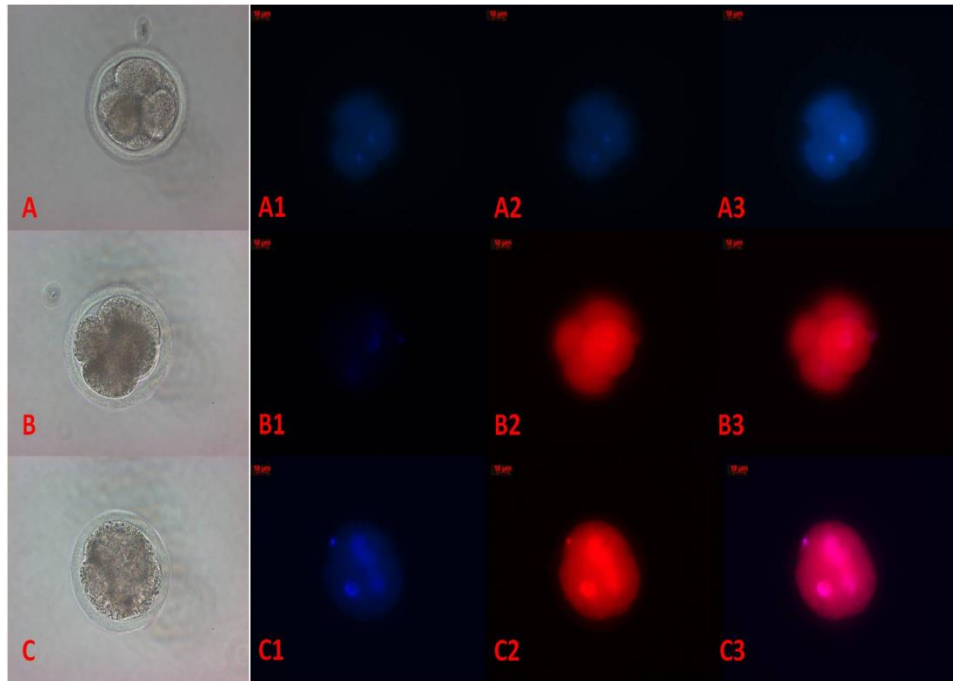
Şekil 38. Vitrifikasyon grubu TEM görüntüsü (**Der**, Düz endoplazmik retikulum, **BL** Blastomer, **SZA**, Subzonal aralık, **Zp** Zona pellusida, **Vdc**, Veziküler debris cisimciği, **İsa** İnterseüler aralık, **Miv**, Mikrovillus)



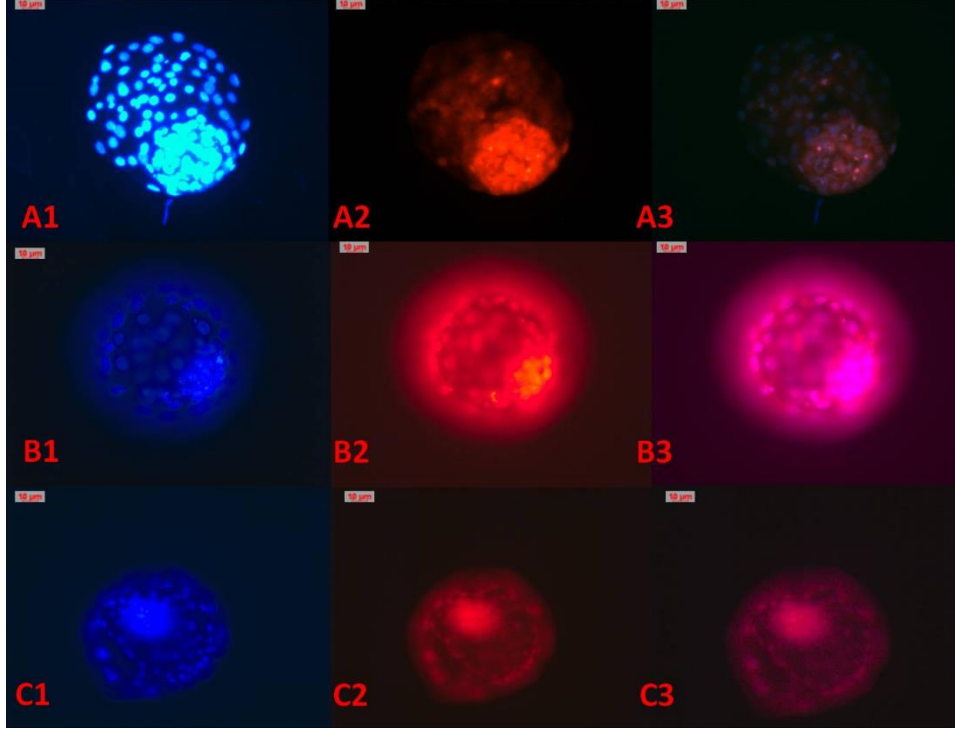
Şekil 39. Vitrifikasyon grubu TEM görüntüsü (**Lip** Lipid damlacığı, **SZA**, Subzonal aralık, **Zp** Zona pellusida, **Miv**, Mikrovillus)

3.5. Floresan Mikroskop Bulguları

Her 3 çalışma grubundan alınan 10'ar adet embriyoda Hoechst ve PI ile boyama sonrası yapılan Floresan mikroskop incelemesinde kontrol grubuna ait embriyoların Hoechst boyası ile boyandığı, PI ile boyanmadığı ve blastomerlere ait nükleusların mavi renkte floresan verdiği ve embriyoların canlı olduğu görüldü. Slow freezing ve vitrifikasyon gruplarında yapılan incelemede embriyoların hem PI hem de Hoechst boyası ile boyandığı, blastomerlere ait nükleusların mavi ve kırmızı renkte floresan verdiği, fragmentasyon içermediği izlendi ve embriyoların ölü olduğu görüldü. Kriyoprezervasyon sonrası çözündürülerek blastosist aşamasına kadar kültürü yapılan vitrifikasyon ve slow freezing grubuna ait embriyoların floresan mikroskop incelemesinde blastosistlerin hem PI hem de Hoechst boyası ile boyandığı, blastosist'e ait TE ve ICM hücre sayılarının kontrol grubundakilere kıyasla azaldığı izlendi. TE ve ICM'deki hücre azalışının vitrifikasyon grubuna kıyasla slow freezing grubunda daha fazla olduğu görüldü (Şekil 40-41).



Şekil 40. Çalışma gruplarının Hoescht, PI ile floresan boyanmaları (A Kontrol grubu, A1 Hoescht boyaması, A2: PI boyama, A3: Her iki görüntünün merge edilmesi. B. Slow freezing grubu B1 Hoescht boyaması, B2: PI boyama, B3: Her iki görüntünün merge edilmesi. C. Vitrifikasyon grubu. C1 Hoescht boyaması, C2: PI boyama, C3: Her iki görüntünün merge edilmesi)



Şekil 41. Blastosistlerin Hoescht, PI ile floresan boyanmaları (**A1-A3**.Kontrol grubu, **A1** Hoescht boyaması, **A2**: PI boyama, **A3**: Her iki görüntünün merge edilmesi. **B1-B3**. Slow freezing grubu **B1**: Hoescht boyaması, **B2**: PI boyama, **B3**: Her iki görüntünün merge edilmesi.**C1-C3**. Vitrikasyon grubu. **C1** Hoescht boyaması, **C2**: PI boyama, **C3**: Her iki görüntünün merge edilmesi)

3.6. Konfokal Mikroskop Bulguları

Kontrol grubu embriyosuna ait konfokal mikroskop incelemesinde TEM görüntüleri ile uyumlu geniş subzonal aralığa sahip, intakt ZP ile çevrili, sınırları düzgün fragmentasyon içermeyen eşit büyüklükte 3 adet blastomer yapısı içeren embriyo görülmektedir. Blastomerler içerisinde DAPI ile boyanan, santral olmayan yerleşimli nükleus yapıları izlenmektedir. Embriyo hücre isketi aktin ve tübülün komponentleri açısından incelendiğinde; embriyoya ait Aktin yapılarının genel olarak blastomerler içerisinde dağınık bir şekilde bulunduğu özellikle komşu blastomerlere bakan yüzeydeki blastomer membranlarının altında ve nükleus çevresinde daha yoğun floresan ışıma yaptığı görülmektedir. Embriyoya ait tübülün yapılarının blastomerler içerisinde yaygın dağılım gösterdiği, primer olarak nükleus yapısı içerisinde ve ZP' ye bakan yüzeydeki blastomer membranlarına yakın bölgelerde daha yoğun floresan ışıma yaptığı dikkati çekmektedir.

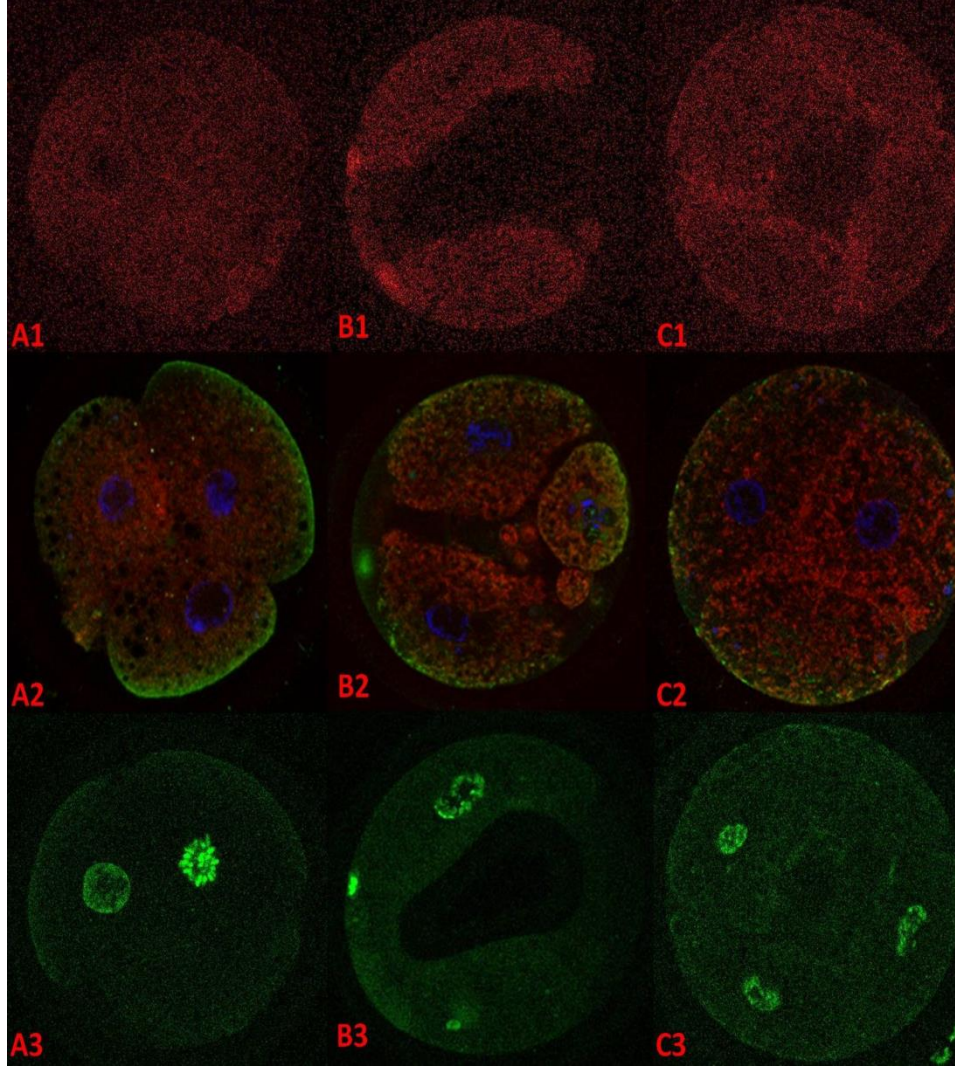
Slow freezing grubu embriyosuna ait konfokal mikroskop incelemesinde; kontrol grubuna kıyasla daha dar subzonal aralığa sahip, sınırları düzgün ZP ile çevrili 1 adet fragmente blastomer, 1 adet membran bütünlüğü bozulmuş dejenere blastomer ve 1 adet normal görünümde blastomer olmak üzere farklı büyüklüklerde 3 adet blastomer içeren dejenere embriyo yapısı görülmektedir. Blastomerler arası intersellüler alanda kontrol ve vitrifikasyon grubuna kıyasla belirgin olarak genişleme görüldüğü ve blastomerler arası intersellüler alanda yer alan dejenere blastomer parçalarında aktin ve tübülün açısından floresan pozitif görünümün bulunduğu dikkati çekmektedir.

Blastomerler içerisinde DAPI ile boyanan, santral olmayan yerleşimli nükleus yapıları gözlemlenmektedir. Embriyo hücre iskeleti aktin ve tübülün komponentleri açısından incelendiğinde; Aktin yapılarının genel olarak blastomerler içerisinde dağınık bir şekilde bulunduğu, sitoplazma içinde bazı bölgelerde yoğunlaşırken bazı bölgelerde azaldığı fragmente blastomerde silinme gösterdiği görülmektedir. Özellikle blastomerler arası intersellüler alana komşu bölgelerdeki blastomer membranının altında daha fazla aktin yapıları görülmekte ve bu bölgelerde daha yoğun floresan ışımaya izlenmektedir. Kontrol grubunda belirgin olarak görülen nükleus çevresindeki aktin yoğunlaşmasının bu grupta daha az olduğu dikkati çekmektedir. Kontrol ve vitrifikasyon grubu ile karşılaştırıldığında embriyoya ait aktin yapılarının yoğunluğunun belirgin bir şekilde azaldığı izlenmektedir. Tübülün yapılarının ise blastomerler içinde dağınık bir şekilde yer aldığı özellikle nükleus yapısı içerisinde ve blastomerlerin ZP'ye komşu bölgelerinde daha yoğun floresan ışımaya yaptığı izlenmektedir. Fragmente ve dejenere blastomerde yer yer tübülün yapılarında silinme gözlemlenmektedir. Kontrol ve vitrifikasyon grubu ile karşılaştırıldığında embriyoya ait tübülün yapılarının yoğunluğunun belirgin bir şekilde azaldığı dikkati çekmektedir.

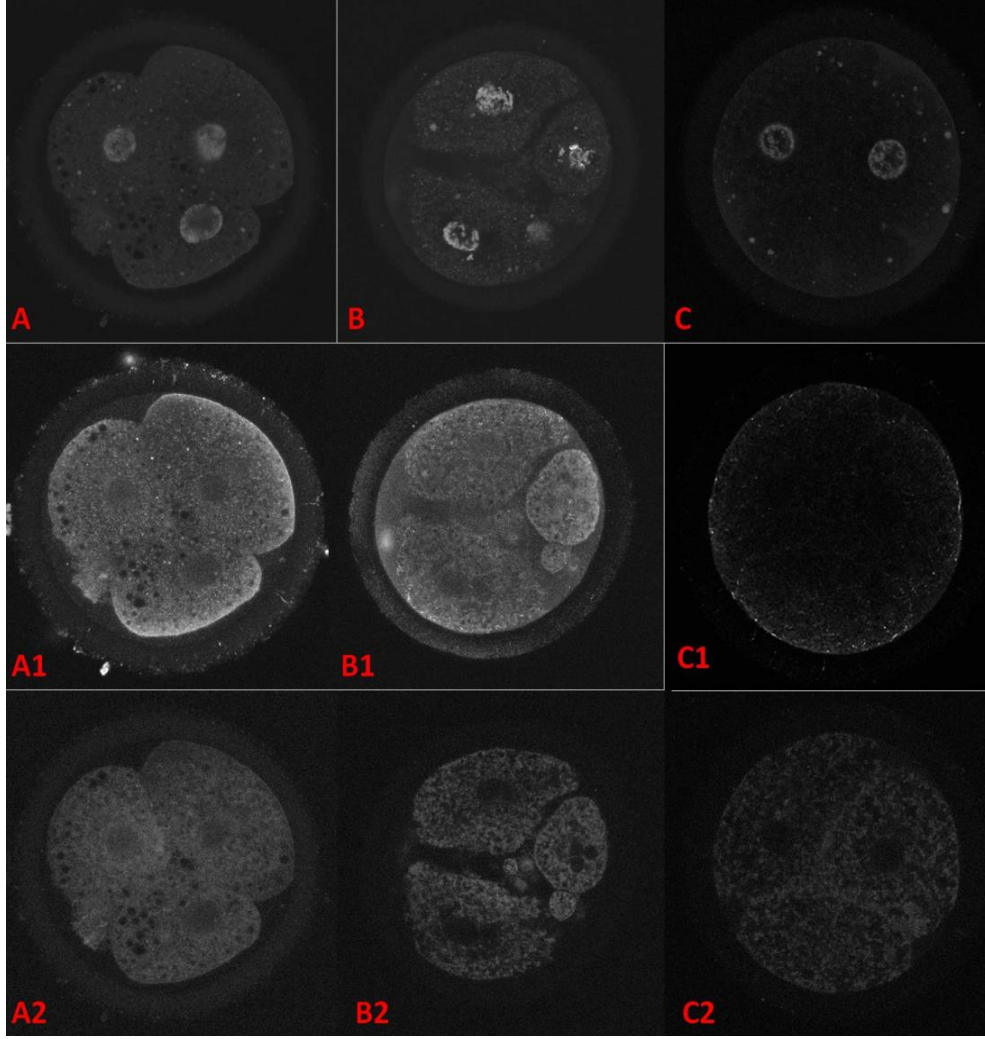
Vitrifikasyon grubu embriyoya ait konfokal mikroskop incelemesinde; kontrol grubuna kıyasla daha dar subzonal aralığa sahip, sınırları düzgün ZP ile çevrili, 1 adet membran bütünlüğü bozulmuş dejenere blastomer ve 2 adet normal görünümde blastomer olmak üzere farklı büyüklüklerde 3 adet blastomer içeren dejenere embriyo yapısı görülmektedir. Blastomerler arası intersellüler alanın kontrol grubuna kıyasla çok büyük, slow freezing grubundan ise belirgin olarak çok küçük olduğu ve intersellüler alanda yer alan dejenere blastomer parçalarında aktin ve tübülün açısından floresan pozitif görünümün bulunduğu dikkati çekmektedir. Blastomerler içerisinde DAPI ile boyanan, santral olmayan yerleşimli nükleus yapıları gözlemlenmektedir. Embriyodaki hücre iskeletine ait aktin ve tübülün komponentleri incelendiğinde; aktin yapılarının genel olarak blastomerler içerisinde dağınık bir

şekilde bulunduğu, özellikle intersellüler alana komşu blastomer bölgelerinde kompaktlaştığı ve bu bölgelerde daha yoğun floresan ışıma yaptığı gözlemlenmektedir. ZP'ye komşu blastomer bölgelerinde ise aktin yapılarında silinme görülmekte ve bu bölgelerde daha az floresan ışıma izlenmektedir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aktin yapılarının yoğunluğunun daha az, slow freezing grubu ile karşılaştırıldığında ise daha fazla olduğu gözlemlenmektedir. Tübülün yapılarının blastomerler içerisinde dağınık şekilde bulunduğu, genel olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha az slow freezing grubuyla karşılaştırıldığında daha fazla yoğunluk gösterdiği dikkati çekmektedir. Kontrol ve slow freezing grubunda görülen ZP'ye komşu blastomer bölgelerindeki tübülün yoğunluğu bu grupta görülmemektedir. Tübülün yapıları özellikle nükleuslarda daha yoğun floresan vermekte blastomer periferlerinde ise tübülün silinmeleri izlenmektedir (**Şekil 42**).

Her gruba ait örneklerde konfokal mikroskop incelemesi sırasında embriyolarda derinlemesine hacimsel Z eksen tarması yapıldı. Nükleus, aktin ve tübülün yapıları sadece kendilerine ait renkler dikkate alınarak tarandı ve siyah beyaz görüntüler elde edildi . Bu görüntüleme sırasında embriyonun ZP'si, blastomerleri içerisinde bulunan lipid damlacıkları, veziküller ve diğer organellere ait olduğu düşünülen yapıların topografik görüntüleri gözlemlendi (**Şekil 43**).



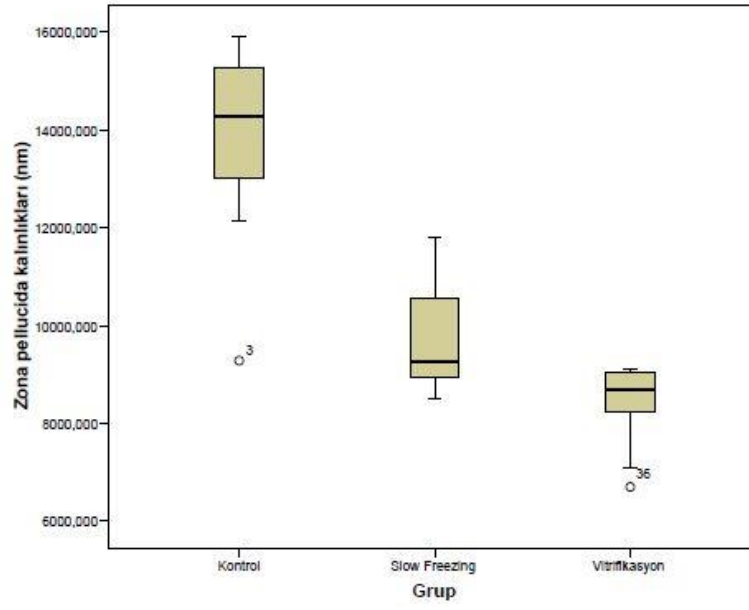
Şekil 42. Çalışma gruplarına ait tübülün ve aktin ile floresan boyalı preparatların konfokal mikroskopta görünümü (**A1-A3**.Kontrol grubu, **A1** Aktin boyama, **A2** Her iki görüntünün merge edilmesi. (Nükleuslara mavi renk DAPI tarafından verilmektedir), **A3**, Tübülün boyama, **B1-B3**. Slow freezing grubu **B1** Aktin boyama, **B2** Her iki görüntünün merge edilmesi:, **B3**, Tübülün boyama, **C1-C3**. Vitrikasyon grubu. **C1** Aktin boyama, **C2**,Her iki görüntünün merge edilmesi: **C3**, Tübülün boyama)



Şekil 43. Çalışma gruplarına ait tübülün ve aktin ile floresan boyalı preparatların konfokal mikroskopta Z eksenini boyunca tarama modülünde görünümü (**A-A1-A2**. Kontrol grubu, **A**, DAPI ile nükleus taraması, **A1**, Tübülün taraması, **A2**, Aktin taraması. **B-B1-B2**. Slow freezing grubu **B**, DAPI ile nükleus taraması, **B1** Tübülün taraması, **B2**, Aktin taraması, **C-C1-C2**. Vitrifikasyon grubu **C**, DAPI ile nükleus taraması, **C1**, Tübülün taraması, **C2**, Aktin taraması)

3.7. İstatiksel Bulgular

Zona pellucida kalınlıkları (nm)



Şekil 44. 4 hücreli büyükbaş hayvan embriyolarında kriyoprezervasyonun ZP kalınlığı üzerine etkisinin çalışma grupları arasında karşılaştırılması. n:15; Kontrol ve Slow freezing grupları kıyaslandığında: $P < 0.001$, Kontrol ve vitrifikasyon grupları kıyaslandığında: $P < 0.001$, Slow freezing ve Vitrifikasyon grupları kıyaslandığında: $p=0.004$.

BÖLÜM IV

TARTIŞMA:

YÜT ile elde edilen memeli embriyolarının kriyoprezervasyonu reproduktif biyoteknoloji uygulamaları açısından önemi her geçen gün artarak yaygınlaşan bir yöntemdir. Günümüzde kriyoprezervasyon, endüstriyel hayvancılıkta, deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda ve özellikle son yıllarda çoğul gebeliklerin önlenmesi için transfer edilecek olan embriyo sayısına getirilen kısıtlamalar nedeniyle transfer fazlası embriyoların dondurularak saklanması amacıyla yardımcı üreme merkezlerinde sıkça uygulanan bir yöntem olarak yerini almıştır. Başarılı embriyo kriyoprezervasyonu ile ilgili ilk çalışmalar Whittingham ve arkadaşlarına aittir ve fare embriyolarında yapılmıştır (1).

Araştırmacılar, embriyo kriyoprezervasyonu ile ilişkili gerekli reproduktif tekniklerin geliştirilmesi sürecinde laboratuvar ve çiftlik hayvanlarından yararlanmışlardır. Bu çalışmalarda farklı kriyoprezervasyon yöntemlerinin geliştirilmesi, kriyoprezervasyonun etkilerinin belirlenmesi, kriyoprezervasyon sonrası çözdürülen farklı evrelerdeki embriyolarda gelişim süreçlerinin incelenmesi ve kriyoprezervasyon başarısını artırmada etkili olabilecek faktörlerin tespit edilmesi amacıyla araştırmalar yapıldığı belirtilmekte ve şimdiye kadar, embriyo kriyoprezervasyonu uygulanmış 40 civarında türün olduğu bildirilmektedir (149). Memeli embriyolarında kriyoprezervasyonun ilk hedefi çözdürme işleminden sonra transfer edilecek canlı embriyo oranının artırılmasıdır. İn vitro şartlarda elde edilen embriyoların gerek yardımcı üreme merkezlerinde gerekse endüstriyel hayvancılıkta uygulamasını sınırlayan önemli faktörlerden biri de bu embriyolarda görülen kriyoprezervasyon sonrası düşük sağkalım oranlarıdır.

Günümüzde embriyo kriyoprezervasyonunda slow freezing ve vitrifikasyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır (149). Bununla birlikte kriyoprezervasyonun embriyo üzerinde olumsuz etkilerinin bulunduğunu bildiren pek çok yayın mevcuttur. Bu yayınlarda kriyoprezervasyonun etkilerinin; türler arasında değiştiği, embriyoların kalitesine, dondurma sırasında bulundukları evreye, kriyoprezervasyon işlemi sırasında kullanılan kriyoprotektanlara, uygulanan yöntem ve embriyoların in vivo veya in vitro oluşuna bağlı olarak farklılıklar gösterdiği belirtilmiştir (112,153-155).

Bu tez çalışmasında, kriyoprezervasyonun etkilerinin incelenmesi amacıyla öncelikle in vitro şartlarda kaliteli embriyo elde edilebilmesi amaçlanmış ve bunun için çalışmanın belirli bir standartta yapılmasına dikkat edilmiştir. Bu standartın

sağlanabilmesi için aynı cins ve yaş aralığına sahip sağlıklı ineklere ait overler çalışmaya dâhil edilmiş, fertilizasyon işleminde ticari olarak satışı yapılan kontrolleri yapılmış aynı cins boğalara ait donmuş spermier kullanılmıştır. Overlerin hazırlanması, oosit aspirasyonu, IVM ve IVF, kültür, kriyoprezervasyon ve çözödürme işlemleri bireysel etkilerin karışmaması ve sonuçların etkilenmemesi amacıyla aynı araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiş her uygulama sırasında aynı teknikler kullanılmıştır.

İn vitro şartlarda kaliteli embriyo elde edilmesinde önemli faktörlerden biri oosit maturasyonudur. Oositlerin IVM'si amacıyla kullanılan mediumların, IVF ve sonraki embriyonik gelişim oranlarını önemli derecede etkilediği yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (156-158). İnek oositlerinin maturasyonunda, bikarbonat tampon sistemlerinin kullanıldığı temel fizyolojik tuzlardan oluşan basit mediumlar ve basit medium içeriklerine aminoasit, pürin ve vitamin gibi maddelerin ilave edilmesi ile hazırlanan kompleks mediumlar kullanılmaktadır. Kompleks maturasyon mediumlarından en yaygın olarak kullanılanı TCM-199'dur (159). Greve ve Madison oosit maturasyonunda %10 oranında FCS katkılı TCM-199 mediumu kullanımı sonrası maturasyon oranının %80 olduğunu belirtmişlerdir (160). MacCallum ve arkadaşları oosit maturasyonunda TCM-199 mediumunu hiçbir katkı maddesi eklemeyen kullanmışlar ve 18 saatlik inkübasyon sonunda maturasyon oranının %39 olduğunu bildirmişlerdir (161). Leibfried-Rutledge ve arkadaşları TCM-199'a LH, FSH ve östrojen gibi çeşitli hormonların eklenmesi ile maturasyon oranının %90'a yükseldiğini belirtmişlerdir (162). Greve ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada %20 oranında östrus inek serumu eklenmiş TCM-199 mediumu kullandıklarını ve elde ettikleri oosit maturasyon oranının %83 olduğunu ifade etmişlerdir (163). Bu tez çalışmasında over foliküllerinin aspirasyonu sonucu Brackett ve Zuelke (164)'nin tarif ettiği yönteme göre seçilerek IVM işlemine alınan oositler 5µl/ml FSH, 5 µl/ml LH ve 50 µl/ml OCS ilave edilen TCM 199 mediumunda 24 saat inkübe edilerek matüre edildi. Yapılan maturasyon kontrolünde kümölüs ekspansiyonu ve perivitellin boşlukta birinci kutup hücresinin bulunup bulunmadığına bakılarak oosit matürasyon oranının %85,98 olduğu belirlendi. Tez çalışmasında elde edilen maturasyon oranının %20 oranında OCS eklenmiş TCM-199 mediumu kullanan Greve arkadaşlarının sonuçlarından yüksek olduğu göröldü. Çalışmada kullanılan medium daha az OCS içermesine rağmen daha fazla maturasyon oranı elde edilmesi mediuma ilave edilen LH ve FSH'ın Leibfried-Rutledge ve arkadaşlarının çalışmalarında da belirttiği gibi

oosit maturasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Çalışmada elde edilen maturasyon oranının, maturasyon mediumu olarak %10 oranında FCS katkılı TCM-199 mediumu kullanan Greve ve Madison'un maturasyon sonuçları ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu görüldü. Bu sonuçlara bakılarak OCS'nin oosit maturasyonunda FCS'den daha etkili olabileceği düşünüldü.. Memeli preimplantasyon embriyo kültürlerinde, serum sıklıkla besiyeri için sabit azot kaynağı olarak kullanılmakta ve büyüme faktörleri, ağır metal şelatları gibi embriyonik gelişim için faydalı olan çeşitli maddeler içermektedir. Bu nedenle, sığır embriyo kültürleri sıklıkla serum eklenen mediumlarda yapılmaktadır (165). Oositlerin IVM sürecine olumlu katkıları olan serumun, inek embriyo gelişimi üzerine bifazik etkisi olduğu unutulmamalıdır. Serum ilk yarıklanma bölünmesini inhibe ederek (166) erken dönem embriyo gelişimini azaltır (167) blastosist gelişmesini de stimüle eder (168). Bulgularımız arasında yer alan 4 hücre aşamasına kadar yapılan kültür sürecindeki % 64,49'luk bölünme oranının kütür mediumuna ilave ettiğimiz BSA'ya bağlı olabileceğini akla getirmektedir. Yapılan çalışmalarda in vitro embriyo eldesi amacıyla kültür ortamına serum eklenmesinin metabolik ve morfolojik sapmalara neden olabildiğini bildiren yayınlar mevcuttur (169,170). İn vivo elde edilen inek embriyolarında standard kriyoprezervasyon yöntemleriyle yüksek sağkalım oranları elde edilirken, in vitro geliştirilen embriyolar için sağkalım oranlarının düşük bulunduğu ve bunların kriyoprezervasyona karşı daha duyarlı oldukları gösterilmiştir (171). Bu durumun in vitro embriyo eldesinde kullanılan kültür mediumlarına eklenen seruma bağlı olduğu belirtilmiş ve serum içeren mediumlarla kültürü yapılan embriyoların sitoplâzmalarında büyüklü küçüklü yoğun lipid damlacıklarının oluştuğu ve bunların kriyoprezervasyona duyarlılığı artırdığı ileri sürülmüştür (172). İntrasellüler lipidlerin rolü tam olarak anlaşılmamakla beraber bazı araştırmacılar gerek embriyo gerekse oosit içindeki intrasellüler lipidlerin gelişmekte olan oosit ve embriyo için bir enerji kaynağı olarak kullanıldığını ve hücre bölünmesi için lipid kaynağı olarak gerekli olduklarını iddia etmişlerdir (173,174). Romek ve arkadaşları intrasellüler lipid içeriğinin embriyonun gelişim evresine bağlı olduğunu ve morula evresinden sonra belirgin bir azalma gösterdiğini belirtmiş, buna bağlı olarak da erken gelişim evrelerinin ileri evrelere kıyasla düşük ısı derecelerine daha duyarlı hale geldiğini ifade etmişlerdir (175).

Yapılan başka bir çalışmada, serum eklenmiş besiyerinde kültürü yapılarak in vitro şartlarda elde edilen inek embriyolarının kriyoprezervasyona toleransının,

sitoplazmik lipid damlacıklarının santrifüjlenerak uzaklaştırılmasından sonra arttırılabileceği, bunun da sitoplazmik lipid damlacıklarının embriyoların soğuğa ve kriyoprezervasyona duyarlılığını doğrudan etkileyebildiğinin bir göstergesi olduğu bildirilmiştir (176). Domuzlarda yapılan çalışmalarda blastomerlerinde dağınık şekilde yüksek konsantrasyonda intrasellüler lipid bulunduran domuz embriyolarının kriyoprezervasyona karşı duyarlılığının arttığı, intrasellüler lipidlerin heterojen intrasellüler buz çekirdeklenmesini veya lipid faz değişikliklerini indükleyebildiğini göstermiştir (177,178). Nagashima ve arkadaşları erken bölünme evresindeki embriyolardan sitoplazmik lipidlerin kriyoprezervasyon öncesinde uzaklaştırılmasının çözündürme sonrası embriyoların sağkalım oranını artırdığı ve gelişimlerini devam ettirmelerini sağladığını bildirmişlerdir (179). Bu çalışmalar erken bölünme dönemindeki, domuz embriyolarında bulunan yüksek lipid içeriğinin kriyoprezervasyon sırasında geri döndürülemez değişikliklere yol açabildiğini, embriyonun kullanamayacağı nitelikte hücrel atık maddeler oluşturduğunu, böylelikle embriyonun gelişimsel yeterliliğini ve/veya yeteneğini bozduğunu ortaya koymuştur.

Tez çalışmasına konu olan bu araştırmada da 4 hücreli embriyoların elde edilmesi amacıyla serum eklenen mediumlar kullanılmıştır. Gerek TEM incelemeleri gerekse yarı ince epon kesitlerin Toluidine Blue ve Azur II–Metilen Blue–Basic Fuksin boyamaları sonrası ışık mikroskop incelemelerinde in vitro şartlarda elde edilen embriyoların blastomerlerinin sitoplâzmalarında çok sayıda büyüklü küçüklü lipid damlacıkları tespit edilmiştir. Gerek blastomerler arasındaki intrasellüler aralıkta gerekse subzonal aralıkta kriyoprezervasyonun sitoplâzma içindeki lipid damlacıklarına etkilerine bağlı oluştukları düşünülen hücrel atıklar gözlemlenmiştir. Kriyoprezervasyon işlemi uygulanan slow freezing ve vitrifikasyon grubuna ait embriyolardan çözündürme sonrası canlılıkların belirlenebilmesi amacıyla Hoescht ve PI ile boyanan 10'ar adet embriyonun floresan mikroskop altında yapılan incelemesi sonucunda seçilen populasyondaki embriyoların ölü oldukları görülmüştür. Kontrol grubunun floresan mikroskop incelemesinde seçilen populasyondaki embriyoların hepsinin canlı olduğu belirlenmiştir. Her 3 gruptan blastosist gelişiminin incelenmesi amacıyla kültürü yapılan embriyolardan, kontrol grubunda 22, slow freezing grubunda 1, vitrifikasyon grubunda ise 3 adet blastosist gelişimi görülmüştür. Slow freezing ve vitrifikasyon grubunda blastosist gelişimi izlenmeyen embriyoların ışık mikroskobu ile incelenmesi sırasında bazı embriyoların dejenere olduğu bazı embriyoların 4 hücreli

aşamada kaldığı ve hiçbir gelişme göstermediği, bazı embriyoların ise daha ileriki aşamalara ulaştığı ancak blastosist aşamasına ulaşamadığı belirlenmiştir. Bu bulguların yukarıda belirtilen çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüş, belirtildiği gibi kriyoprezervasyonun olumsuz etkilerinden olan çözündürme sonrası düşük sağkalım oranlarının in vitro şartlarda serum içeren mediumların kullanımı ile elde edilen embriyoların sitoplazmalarında oluşan aşırı lipid damlacığı oluşumuna bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Embriyo kriyoprezervasyonu alanındaki çok sayıdaki gelişmeye rağmen, embriyo kriyoprezervasyonunun yapılacağı optimal gelişim evresiyle ilişkili henüz bir uzlaşmaya varılamamıştır. Pronükleer (1.gün), bölünme/klevaj (3.gün), ve blastosist evrelerinde dondurulan insan embriyolarında IVF-ET sonuçlarını karşılaştıran bir çalışmanın sonuçlarına göre, implantasyon, klinik gebelik, çoklu gebelik, ikiz gebeliği, ve erkek/kız oranlarında üç evre arasında bir fark görülmemiştir. Bulunan tek fark, çözündürme sonrasındaki sağkalım oranı olup, 3. gün embriyolarında 1. gün embriyoları veya blastosistlere göre sağkalım oranlarının daha düşük olduğu bildirilmiştir (126). Domuz embriyolarında yapılan çalışmalarda; domuz embriyolarının düşük ısılara, özellikle 15°C'nin altındaki ısılara toleransının çok düşük olduğu (170), konvansiyonel dondurma yöntemleri ile kriyoprezervasyon başarısının sınırlı kaldığı (179), vitrifikasyon yöntemi ile yapılan dondurma işleminde embriyoların sağ kalabildiğini ve embriyoların sağkalımlarının işlemin yapıldığı embriyonik gelişim evresiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Domuz embriyoları ile yapılan çalışmaların çoğunda, blastosit aşamasındaki embriyoların kriyoprezervasyonu en iyi tolere eden embriyonik evre olduğu ifade edilmiştir (180,181). İneklerde yapılan çalışmalarda 16 hücreli evrede (3) ve morula evresinde (182) yapılan dondurma çözündürme işlemi sonrası canlılık oranlarının düşük olduğu bu yüzden blastosist aşamasından önce dondurulup çözündürülen embriyoların transfer işleminde kullanılmasının yararının olmayacağı ifade edilmiştir (183). Tez çalışmasında 4 hücreli inek embriyolarına slow freezing ve vitrifikasyon yöntemleri uygulanmış çözündürme sonrası çalışmalarda belirtilenlere paralel olarak embriyo sağkalımlarının her iki yöntemde de aralarında anlamlı bir fark olmayacak şekilde düşük olduğu gözlemlenmiştir. Deneysel olarak yapılan çalışmalarda in vitro şartlarda elde edilmiş, blastosist aşamasından önceki erken evre embriyolarda kriyoprezervasyon uygulaması sonrası sağkalım ve gebelik oranları düşük olarak değerlendirilse de, literatürde bu düşük oranların nedenlerini açıklayan pek fazla çalışmaya rastlanmamıştır (184,185). İneklerde yapılan çalışmalarda In vitro fertilizasyon işlemi sonrası blastosiste gidiş

oranı ortalama % 32,5 olarak belirtilmiştir (186). Blastosist aşamasında yapılan kriyoprezervasyon işlemi sonrası sağ kalım oranlarının incelendiği çalışmalarda bu oranların slow freezing işlemi sonrası %83, vitrifikasyon işlemi sonrası %97 olduğu bildirilmiştir (187). Yapılan başka bir çalışmada in vitro geliştirilmiş inek blastosistlerinin vitrifikasyonu sonrası % 60-94 oranında hatchinge ulaşıldığı, hatched olmuş in vitro embriyoların, çözündürme sonrası 24 saatlik kültürü sonunda %81 reekspansiyon görüldüğü ifade edilmiştir (188). Her ne kadar blastosist aşamasında kriyoprezervasyon işlemi uygulanan embriyolarda sağkalım oranları daha yüksek bulunmuşsa da blastosist aşamasına kadar yapılan in vitro kültür sürecinde yaşanan embriyo kayıpları düşünüldüğünde kriyoprezervasyon işlemlerinin daha erken evrelerde yüksek sağkalım oranları sağlanarak gerçekleştirilmesi durumunda transfer edilebilecek canlı embriyo sayısının daha fazla olabileceğini akla getirmektedir. Bu nedenle çalışmamızda in vitro şartlarda elde edilen erken embriyonik gelişim dönemindeki 4 hücreli inek embriyoları slow freezing ve vitrifikasyon yöntemleri kullanılarak dondurulmuş çözündürme işlemi sonrası kriyoprezervasyonun genel anlamda sağkalım ve embriyoyu oluşturan hücre bileşenleri üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak histolojik açıdan incelenmek istenmiştir. Kriyoprezervasyon sırasında ya da ona bağlı olarak sonrasında oluşan hücresel hasarların belirlenmesi, kriyoprezervasyona karşı hücresel duyarlılığın anlaşılmasında yararlı bilgiler sağlayacağı gibi embriyoların kriyoprezervasyonu için gelişmiş protokollerin oluşturulmasına da imkan sağlayacağı düşünülmüştür. Hücreleri ölüme götürebilecek kriyoprezervasyon hasarlarında başlıca faktörlerin kriyoprotektan toksisitesi, soğuk şoku, ozmotik stres, donma hasarı ve buz kristalizasyonu ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (117,189). Kriyoprezervasyon, embriyoların hücresel organizasyonu üzerine aşırı şekilde yıkıcı etkili olabilir. Buz kristal formasyonu plazma membranlarını parçalayabilir. Hücresel plazma membranı soğutmaya karşı çok duyarlıdır ve kriyoprezervasyon sonrasında sıklıkla hasar görür (190). Akıcı mozaik tarzında düzenlenmiş protein, glikoprotein ve glikolipidlerin yer aldığı iki sıralı fosfolipid katmanından oluşan hücre membran yapılarında % 65-70 oranında doymamış fosfolipidler bulunduğu için soğutma sonrası sıvı fazdan jel fazına geçiş olduğu, irreversibl faz değişimlerinin görülebildiği, faz değişimlerine bağlı membran içi enzimlerin kinetiğinde meydana gelen değişimlerin çözündürme sonrası membran stabilizasyonunda bozulmaya neden olduğu ve buna bağlı olarak hücrede gelişen soğuk şokunun hücre sağkalımlarını azalttığı bildirilmektedir (114). Ayrıca

membranların doymamış fosfolipidlerce zengin olmasının, lipid peroksidasyonuna karşı duyarlılığa neden olduğu ve hücrelerin kısa ya da uzun süreli saklanması sırasında hücre hasarı şekillendirdiği ve kriyoprezervasyonun embriyo üzerindeki zararlarının hem sitoplazmanın hem de sitoplazmik membranın fazla oranda lipid içermesinden dolayı donma-çözdürme işlemine duyarlı olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (114). Kriyoprezervasyonun etkilerini araştırdığımız çalışmamızda hem kontrol grubu hem de kriyoprezervasyon sonrası çözdürülen embriyolardan seçilen popülasyonda blastomer membranlarının, nükleusların ve hücrelerin canlılık durumlarının belirlenmesi amacıyla Hoechst ve propidium iyodür ile boyama sonrası Floresan mikroskop incelemesi yapılmıştır. Canlı ve ölü hücre ayırımını yapabilmek için, canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen Hoechst boyası gibi bir boya ile sadece ölü hücreleri boyayabilen Propidium iyodür gibi ikinci bir boya beraber kullanılmaktadır. Membranı sağlam olan canlı hücreler, propidium iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş ölü hücreleri boyayan bir madde ile boyanmazlarken, ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen Hoechst boyası ile boyanmaktadırlar. Kontrol grubu embriyolarımızın floresan mikroskop incelemesinde PI ile boyanmadığı sadece Hoechst boyası ile boyandığı görülmüştür. Bu bulgu kontrol grubu embriyolarında blastomer membran bütünlüğünün bozulmadığını ve blastomerlerin canlı olduğunu göstermiştir. Slow freezing grubuna ait embriyolarda hem PI ile hem de Hoechst boyası ile boyanma görülmekte, blastomer membran bütünlüğünün bozulduğu ve embriyoları oluşturan blastomerlerin ölü olduğu anlaşılmaktadır. Vitrifikasyon grubuna ait embriyoların hem PI ile hem de Hoechst boyası ile boyandığı, Hoechst ve PI boyamaları sonrası iki boyama görüntüsünün üst üste çakıştırılması ile elde edilen merge görüntüsünde, PI'e bağlı oluşan floresan ışımaya yoğunluğunun slow freezing grubundan daha az olduğu görülmüştür. Bu bulgu vitrifikasyon grubundaki embriyoları oluşturan blastomerlerin ölü olduğunu, membran bütünlükleri kaybolmakla beraber slow freezing grubundaki embriyolara kıyasla membran hasarına bağlı geçirgenliğin daha az olabileceğini akla getirmiştir. Floresan mikroskop incelemesi ile elde edilen veriler, kriyoprezervasyonun embriyoda hücre ölümlerine neden olabildiğini, membran hasarına yol açtığını, vitrifikasyon yönteminin slow freezing yöntemine kıyasla blastomer membranında daha az hasar meydana getirdiğini düşündürmüştür. Bu sonuçlar membranda meydana gelen hasarın sadece lipid peroksidasyonuna bağlı olamayacağını başka faktörlerin de rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Konfokal mikroskop incelemesi sırasında

gözlemlediğimiz kriyoprezervasyon sonrası blastomer membranına komşu bölgelerdeki aktin yapılarındaki silinmenin membranda görülen hasarda etkili olabileceğini akla getirmiştir. Günümüzde kriyoprezervasyon işleminde kullanılmakta olan slow freezing ve vitrifikasyon yöntemlerindeki en temel farklılık hücrelerin canlılığı ve yapısal bütünlüklerini koruma mekanizmasıdır. Slow freezing yönteminde hücre canlılığı düşük konsantrasyonlarda kademeli soğutma uygulanarak hücre etrafında ekstrasellüler buz kristallerinin oluşumu ile sağlanırken, vitrifikasyon yönteminde ani ısı düşüşüyle birlikte yüksek konrantrasyonda kriyoprotektanlar kullanılarak hücre etrafında camsı katı yüzey oluşumuyla sağlanmaya çalışılır. Kriyoprotektanlar kriyoprezervasyon işlemi sırasında hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şoku zararına ve intrasellüler buz kristali oluşumuna karşı hücreleri hasardan korurken, kimyasal toksisitesi veya ozmotik etkileri nedeniyle hasar oluşturabilen maddelerdir (131).

Kriyoprotektanların bu etkilerine bağlı olarak kriyoprezervasyon sonrası embriyolardaki hücre iskeleti yapısında hasarların oluşabileceği bildirilmiştir (191). Hücre iskeleti hasar görürse veya destabilize olursa, embriyo intrasellüler iletişim yolunu kaybedebilir, embriyoda onarılmaz bir yıkıma neden olabilir. Hücre iskeleti sitoplâzmaya yayılmış protein filamentlerinin oluşturduğu karmaşık yapıda bir ağıdır, yapısal organizasyonu ve hareketi koordine eder. Hücreye üç boyutlu formunu veren oldukça dinamik bir yapıdır (9,32).

Hücre iskeleti sitoplâzmanın organizasyonunu belirleyerek hücreye dayanıklılık sağlayan, hücre şeklinin korunmasında, hücrenin polaritesinin belirlenmesinde, hücre içi organellerin sitoplazma içinde taşınmasında, sitokinez ve fagositozda rol oynar. Bu yapı hücre içindeki lokalizasyonları, büyüklükleri ve şekilleri farklı mikrofilaman, mikrotübül ve arafilaman adı verilen üç tür protein filamentinden oluşur. Her bir filament farklı bir protein alt biriminden meydana gelir (9,32). Mikrofilamentler polimerize aktin parçalarından veya filamentöz aktinden (f-aktin) oluşur, plazma zarının hemen altında uzanan ve aktin bağlayıcı proteinler ile hücre korteksinde bir ağ içine çapraz bağlanırlar (192). Mikrofilamentlerin büyüyen ya da pozitif ucu plazma membranındaki integral proteinlere bağlanmıştır ve yarıklanma ve bölünme döneminde meydana gelen kontraktıl olaylar üzerinde büyük bir etkisi vardır (193). Hücresel f-aktinin dağılımını gelişimsel olarak düzenleyen değişiklikler ile morula ve blastosist gelişimi sırasında embriyonun dokuya ve evreye özel yeniden

biçimlenme olgusu örtüşmektedir. Erken bölünme aşamasındaki embriyolarda, filamentöz aktin blastomerlerin hücre korteksinde yoğunlaşmıştır ve hücre-hücre temas bölgelerinde organize olmaktadır. Blastosist aşamasında, aktin yapıları trofektodermal hücrelerde perisellüler dağılımları ile karakterizedir. Sitoplâzmadaki mikrotübüller genellikle birbirinden ayrı şekilde organize olsalarda, mikrofilamentler ağlar veya demetler halinde davranırlar (194). Sitoplazmik mikrotübüller, herbirisi α -ve β -tübülün olarak bilinen, birbiriyle yakından ilişkili ve non-kovalen bağlı globüler polipeptidleri içeren heterodimer yapısındaki tübülün moleküllerinden oluşur (195). Mikrotübüller, veziküller ve diğer membrana bağlı organellerin geçebileceği fibriller sistemini sağlayarak, hücreye polarite katabilir ve hücrenin şeklini, hücre hareketini, ve hücre bölünmesinin düzlemini düzenleyebilirler (196).

Hücre iskeletini meydana getiren organize ağ şeklindeki filamentler, hücre içinde büyük bir hacim oluşturan sitoplazma için, genellikle hücre yapısı, mimarisi olarak adlandırılan bir iç çerçeve oluşturur. Hücre iskeleti erken embriyo gelişiminde olduğu kadar germ hücre gelişiminde ve fertilizasyonda da hayati öneme sahiptir. Oositin büyümesi, matürasyonu ve fertilizasyonu hücresel organellerin doğru lokalizasyonunu ve aktif hareketliliğini gerektirmektedir, bu da tübül ve aktin yapılarının yeniden organizasyonu ile gerçekleşmektedir (197). Kriyoprezervasyon'a bağlı olarak embriyoların hücre içi fonksiyonlarının bozulabileceği, organellerinin denatüre olabileceği, plazma membranlarının parçalanabileceği ve embriyonun santral hücre yapısının hasar görebileceği belirtilmiştir (131). Kriyoprotektanlar, kriyoprezervasyon öncesinde mikrofilamanları ve mikrotübülleri depolimerize ederek etki gösterirler, böylelikle hücre iskeleti bileşenlerinin onarılmaz hasarlarını önlerler. Kriyoprezervasyonda kullanılan gliserol, propilen glikol, etilen glikol gibi bazı kriyoprotektanların toksik olabileceği (155) veya intraselüler olarak etkileşerek mikrofilament ve mikrotübül yapılarının geri dönüşü olmayacak şekilde bozulmasını indükleyerek embriyonun canlılığını etkileyebileceği ileri sürülmüştür (194). Kriyoprotektanların sürekli aynı etkiyi göstermediği farklı türler ve farklı embriyonik gelişim evreleri arasında hücresel organeller ve embriyoların hücre iskeleti ile etkileşimlerinde değişiklikler görülebildiği bildirilmiştir (154,198). Morula ve erken blastosist evresindeki domuz embriyolarındaki geri döndürülemez hasarların -196°C'de soğutma ile bağlantılı olduğu kullanılan kriyoprotektanlara maruz kalma ile bağlantılı olmadığı ifade edilmiştir (131).

At embriyoları ile yapılan başka bir çalışmada blastosist aşamasındaki embriyoların kriyoprezervasyon işleminde gliserol kullanıldığı çözündürme sonrası hücre iskeletinde bozulma ve kayda değer oranda hücre ölümlerinin görüldüğü bildirilmiştir. Embriyolarda görülen aktin yapılarındaki hasarın gliserol toksisitesinden çok dondurma ve çözündürme işlemlerine bağlı olduğu belirtilmiştir (199). Tez çalışmasında yapılan TEM ve konfokal mikroskop incelemelerinde embriyoların hücre iskeleti komponentlerinden olan aktin ve tübülün yapılarının kriyoprezervasyonun etkilerine bağlı olarak slow freezing ve vitrifikasyon grubu embriyolarında silinme gösterdiği izlenmiştir. Embriyolarda flouresan mikroskop incelemelerinde görülen hücre ölümlerinin aktin ve tübülün yapılarındaki bozulmaya bağlı hücre membranlarında ve hücre iskeletinde meydana gelen hasar sonucu hücrenin metabolik fonksiyonlarının aksamasıyla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Özellikle blastomer yapılarındaki dejenerasyon ve embriyoları çevreleyen ZP’de görülen kırılmalar dikkate alındığında kriyoprezervasyon sonrası görülen bu durumun hücre iskeletindeki hasara bağlı olarak geliştiği ancak kriyoprotektanların toksik etkilerinden çok, soğuk hasarı ve dondurma çözündürme işlemlerine bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Oositlerin kriyoprezervasyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda, donma-çözme işleminin bir sonucu olarak, prematür kortikal granül eksositozu meydana geldiği buna bağlı olarakda ZP’ nin sertleştiği bildirilmiştir (200,201). Başka bir çalışmada da kriyoprezervasyonun embriyodaki ZP’yi sertleştirdiği bildirilmiştir (202). Çalışmamızda ZP kalınlığının incelenmesi amacıyla her gruptan 15 embriyoda her embriyo için 3 farklı yerden ölçülerek elde edilen ortalama ZP kalınlığının slow freezing ve vitrifikasyon grubu embriyolarında azaldığı, bu azalmanın vitrifikasyon grubundakilerde daha fazla olduğu görülmüştür. ZP’deki bu incelmeyin, gerek kriyoprezervasyon sırasındaki dehidratasyona gerekse çok düşük ısıdaki dondurma işlemine bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Fair ve arkadaşlarının IVF’yi takiben blastosist aşamasına kadar kültürü yapılan inek embriyolarının kriyoprezervasyon sonrası ultrastrüktürel yapılarındaki değişiklikleri araştırdığı çalışmada, subzonal aralığın genişlediği ve debris içerdiği, mikrovillusların parçalandığı, dağılımının bozulduğu, GER ve mitokondrilerde şişme, mitokondri kristallerinde silinme görüldüğü, in vivo embriyolarla karşılaştırıldığında daha ince bir ZP’ye sahip olduğu, dejenere nükleusların ve apoptotik cisimlerin izlendiği ve bunlara bağlı hücre kayıplarının yaşandığını ifade edilmiştir (203).

Tez çalışmasındaki mikroskopik incelemelerde elde

edilen bulgular, Fair ve arkadaşlarının çalışmasında bahsedilen bulgulara benzemekle beraber 4 hücreli inek embriyolarının kriyoprezervasyonu sonrası apoptotik cisimcik oluşumu ve nuklear dejenerasyon gibi apoptoz bulgularına rastlanmamış embriyoda görülen hücre ölümlerinin apoptoza bağlı olmadığını düşündürmüştür. İnek, fare ve insan embriyolarında apoptozun ortaya çıkışı ile ilk embriyonik genom aktivitesinin aynı döneme denk geldiği bildirilmiş, inek embriyolarında embriyonik genom aktivasyonunun ve apoptozun 9-16 hücreli aşamada ortaya çıktığı belirtilmiştir (204). TUNEL ve / veya nükleer morfoloji kullanılarak, ineklerde apoptozun en erken bulguları 8 hücreli evre civarında gözlemlendiği bildirilmiştir (205-207). Elde ettiğimiz bulgular arasında yer alan sitoplazma içinde vakuolizasyonların bulunması, mitokondrial dejenerasyonların görülmesi, plazma membran bütünlüğünün bozulması, organellerin disintegrasyonu gibi nekroz bulgularının varlığı embriyolardaki hücre ölümlerinin nekroz sonucu oluşabileceğini düşündürmüştür.

BÖLÜM V

SONUÇ

1. Oositlerin IVM'nu için kullanılan maturasyon mediumlarına OCS'nin eklenmesinin oosit maturasyonunda FCS eklenmesinden daha etkili olabileceği, LH ve FSH'ın oosit maturasyonu üzerinde olumlu etkileri olduğu anlaşıldı.
2. Serum içeren mediumlarla yapılan inek embriyo kültürlerinde embriyolarda görülen sitoplazmik lipid birikiminin kriyoprezervasyonun etkileri üzerinde nasıl bir rol oynadığının anlaşılabilmesi için daha geniş kapsamlı araştırmaların yapılması gerektiği düşünüldü.
3. Büyükbaş hayvanlarda in vitro şartlarda elde edilmiş, 4 hücreli aşamadaki erken evre embriyolarda slow freezing ve vitrifikasyon uygulamaları sonrası sağkalım oranlarının düşük olduğu görüldü.
4. İn vitro elde edilen inek embriyolarında 4 hücreli aşamada tight junctions ve gap junction'ların olmadığı görüldü.
5. İn vitro şartlarda elde edilen embriyolarda kriyoprezervasyon sonrası yüksek canlılık oranı elde etmek için maturasyon ve kültür tekniklerinin geliştirilmesi gerektiği kanaatine varıldı.
6. Blastosist gelişim oranları açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında slow freezing ve vitrifikasyon grubu embriyolarda çözdüme sonrası blastosist gelişim oranları daha düşüktür.
7. Kriyoprezervasyonun embriyoları çevreleyen ZP'nın kalınlığında azalmaya neden olduğu görüldü.
8. Vitrifikasyon yönteminin ZP kalınlığını daha fazla azalttığı anlaşıldı.
9. Slow freezing yöntemi uygulanan embriyoların çözdüme sonrası subzonal aralıklarının vitrifikasyon yöntemi uygulananlara kıyasla daha dar olduğu görüldü.
10. Slow freezing yönteminin vitrifikasyon yönteminden daha fazla embriyo dejenerasyonuna, hücre iskeleti hasarına ve ZP fraktürüne neden olduğu görüldü.

11. Kriyoprezervasyon sonrası embriyoda görülen hücre ölümlerinde aktin ve tübülün yapılarındaki bozulma sonucu hücre iskeleti yapısında meydana gelen hasarın etkili olduğu düşünüldü.
12. İn vitro elde edilen 4 hücreli aşamadaki embriyoların kriyoprezervasyonu sonrası görülen hücre ölümlerinin apoptoza bağlı olarak gelişmediği ölümlerin kriyoprezervasyonun zararlı etkilerine bağlı olarak gelişen nekroz sonucu olduğu düşünüldü.

BÖLÜM VI

ÖZET:

Amaç: Bu çalışmada yardımcı üreme teknikleri ile elde edilen büyükbaş hayvan embriyolarına uygulanan kriyoprezervasyon yöntemlerinin embriyolar üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Mezbahaya kesime getirilen Holstein Cinsi 4-8 yaş aralığındaki sağlıklı ineklerden toplanan overlerden laboratuvar ortamında folikül aspirasyon yöntemi ile elde edilen oositlerden; 3 tabakalı granüloza hücrelerine sahip olanlarına in vitro maturasyon işlemini takiben; ticari olarak satın alınan dondurulmuş boğa spermleri ile in IVF işlemi uygulandı. Slow freezing ve Vitrifikasyon gruplarındaki embriyolar dondurma işlemini takiben, -196 °C'deki sıvı azot içinde 1 gün süreyle saklandı. Kriyoprezervasyonun olası etkilerini histolojik yöntemlerle incelemek amacıyla 1gün sonra çözündürülen embriyolar; histolojik takip prosedürlerinden sonra ışık mikroskop, transmisyon elektron mikroskop, konfokal mikroskop ve floresan mikroskop ile incelendi.

Bulgular: Slow freezing ve vitrifikasyon grubundaki embriyolarda çözündürme sonrası ZP'da incelme ve kırılma, hücre iskeleti hasarları ve blastomerler içerisinde yer alan organellerde meydana gelen dejenerasyonlara bağlı olduğu düşünülen hücre ölümleri gözlemlenmiştir. Mikroskopik incelemeler sonucunda hücre ölümlerinin nekroza bağlı geliştiği saptanmış, apoptotik bir sürece bağlı olacağını düşündüren bulgulara rastlanmamıştır. Kriyoprezervasyon ZP kalınlığında azalmaya neden olmaktadır. Blastosist gelişim oranları açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında slow freezing ve vitrifikasyon yöntemiyle dondurulan embriyolarda çözündürme sonrası blastosist gelişiminin daha düşük olduğu, her iki grup arasında ise anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir.

Sonuç: Embriyo kriyoprezervasyonunun başlıca hedefi dondurma işleminden sonra çözündürülen embriyolarda yüksek canlılık oranlarının sağlanmasıdır. Dondurma-çözündürme sonrası canlılık oranları, uygulanan yöntem, embriyoların büyüklükleri ve gelişim evrelerine, hücrelerin geçirgenlik özelliklerine, kullanılan kriyoprotektanların toksisiteleri ve ozmotik özelliklerine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Büyükbaş hayvanlarda in vitro şartlarda elde edilmiş, 4 hücreli aşamadaki erken evre embriyolarda

slow freezing ve vitrifikasyon uygulamaları sonrası sağkalım oranlarının düşük olduğu görölmüştür. Elde edilen bulgulara göre 4 hücreli inek embriyolarında kriyoprezervasyon sonrası görölen hücre ölümlerinin nekroza bağlı geliştiği düşünölmüştür. Uygulanan yönteme ve döneme özgü özelliklere bağlı kriyoprezervasyonun zararlı etkilerin anlaşılması ve azaltılması amacıyla daha geniş kapsamlı araştırmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: İnek, 4 hücreli Embriyo, Kriyoprezervasyon, TEM, Konfokal mikroskop, Floresan mikroskop

ABSTRACT :

Purpose: Searching the effects of cryopreservation method that apply to the embryos derived with assisted reproductive technology, is aimed in this study.

Method: The over taking out 4-8 aged healthy Holstein bovine brought from butchery and the oocytes derived with follicle aspiration method at laboratory from this over that have the 3 layers granulosa cells following IVF maturation with the frozen bull sperm bought commercially are implemented IVF. The embryos belong to slow freezing and vitrification groups, following the frozen process, saved 1 day in the fluid nitrogen at -196°C. The embryos melted after 1 day, aimed determining cryopreservation effects with histologic methods, examined light microscopy, transmission electron microscopy, confocal microscopy and fluorescein microscopy after histologic following procedure.

Findings: The cell death connected with degeneration in organelles, been in blastomers, cell skeleton damages, shrinking and breaking in ZP in embryos of vitrification and slow freezing, after melting, observed. As result of microscopic examines, the cell death development connected with necrosis, not determined anything about apoptotic process. Cryopreservation cause decreasing at thickness of ZP. When comparison the control group with the embryos frozen with slow freezing and vitrification methods as blastocyst development rates, observed less blastocyst development in frozen embryos with slow freezing and vitrification group and determined no meaning difference between two groups.

Result: The aim of embryo cryopreservation is providing high viability rates melted embryos after frozen process. The viability rates after freezing-melting show changes up to size of embryos and development phase, permeability species of cells, toxicities of used cryoprotectants and osmotic species. In the embryos in 4 cell stage early phase, derived from bovines in vitro conditions, survival rates are seemed low after slow freezing and vitrification applications. According to findings, the cell death seen in the 4 cell bovine embryos after cryopreservation, thought developed up to necrosis. Aiming of understanding and decreasing the damaged effects of cryopreservation up to applying method and species special to term, more wide searches should be entailed.

Key words: Bovine, 4 cells embryo, Cryopreservation, TEM, Confocal microscopy, Fluorescein microscopy.

BÖLÜM VII

KAYNAKLAR

1. Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. Science. 1972;178:411-414.
2. Uysal O. Sığır embriyolarının vitrifikasyonu. Veteriner Hekimler Derneği Dergisi. 2007;78(4):45-50.
3. Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in vitro derived Bovine embryos. Theriogenology. 1993; 39:81-94.
4. Baguisi A, Lonergan P, Overstrom EW, Boland MP. Vitrification of Bovine embryos: incidence of necrosis and apoptosis. Theriogenology. 1999;51:62.
5. Şeftalioğlu A. Genel & Özel insan embriyolojisi. 1998.
6. Sadler TW. Langman medikal embriyoloji. 11. Baskı. Çeviri Editörü : Başaklar, A.C. Palme Yayıncılık. 2011.
7. Özdamar S, Sorkun HÇ. Genel embriyoloji. T.C. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 2002.
8. İn vitro fertilizasyon (IVF) laboratuvar yöntemleri. Editör : Delilbaşı L. Güneş Tıp Kitabevleri. 2008.
9. Kierszenbaum AL. Histoloji Ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Çeviri Editörü: Demir, R. Palme Yayıncılık. 2006.
10. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. Reproduction. 2006;132(2):191-206.
11. Juengel JL, McNatty KP. The role of proteins of the transforming growth factor-β superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. Human Reproduction Update. 2005;11(2): 144–161.
12. Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. Biol Reprod. 2001; 65: 994- 9.
13. Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. Biol Reprod 2003; 69: 1265-72.
14. Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. Biology of Reproduction. 2005;73: 967–973.

15. Nilsson EE, Kezele P, Skinner MK. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 188: 65-73.
16. Pangas SA, Rajkovic A. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Human Reproduction Update*. 2006;12(1) :65–76.
17. Rajkovic A, Pangas SA, Ballow D, et al.. NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*. 2004; 305: 1157- 9.
18. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*. 2003; 301: 215-218.
19. John GB, Gallardo TD, Shirley LJ, Castrillon DH. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Dev Biol*. 2008; 321: 197- 204.
20. Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DF. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol*. 1998; 204:373- 84.
21. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(8):2744-50.
22. Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2005; 234: 81- 6.
23. Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, et al. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the Mouse ovary. *Endocrinology*. 2002; 143: 1076- 84.
24. Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82: 3748- 51.
25. Öktem Ö, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Human Reproduction*. 2010;25(12): 2944–2954.
26. Ohinata Y, Ohta H, Shigeta M, et al. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*. 2009;137: 571- 84.
27. Schoenwolf, G.C., Bleyl, S.B., Brauer, PR. and Francis-West, PH.. *Larsen's Human Embryology* (4th ed.). New York; Edinburgh: Churchill Livingstone, 2009.
28. Baltus AE, Menke DB, Hu YC, et al. In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes Premeiotic DNA replication. *Nat Genet*. 2006; 38: 1430- 4.
29. Moore KL, Persaud TVN. *Klinik yönleriyle insan embriyolojisi*. 8. İngilizce baskı. Çeviri Editörleri : Dalçık H, Yıldırım, M.: Nobel Tıp Kitapevleri. 2. Baskı, 2009.

30. Wilhelm D, Koopman P. The makings of maleness: towards an integrated view of male sexual development. *Nat Rev Genet* 2006;7:620-31.
31. Burgu, B., Telli, O. Testiküler Embriyoloji ve Testiküler İniş Mekanizmalarına Dair Hipotezler. *Türk Üroloji Seminerleri*. 2010; 1: 47-51.
32. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*. 10. baskı. Çeviri Editörleri: Aytekin Y, Solakoğlu S. Nobel Tıp Kitapevleri. 2006.
33. Tekelioğlu M. İnsanın üremesi ve gelişmesi. 1995.
34. http://www.androloji.info/kapasitasyon_patofizyoloji.php.
35. Akyol N. Sığırlarda in vivo ve in vitro fertilizasyon. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*. 2005;45(2):53-61.
36. Tekin N, Daşkın A, Akçay E. Boğa spermatozoonlarında in vitro kapasitasyon ve fertilizasyon. *Türk J Vet Anim Sci*. 2001;25:349-358.
37. Sağırkaya H. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Döllenme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı Reprodüksiyon Bilgisi İn Vitro Fertilizasyon Notları. 1999.
38. Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B. Gametler (Sperm/Oosit) Fertilizasyon Ve Embriyoner Gelişim Bölüm – I. Serono Yayınları. 2000-01.
39. Korkmaz C. Yardımcı üreme tekniklerinde (IVF, ICSI) farklı hücre kültürleri ile elde edilen insan embriyolarının blastomer fragmentasyonlarının azaltılması açısından incelenmesi. *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Tezi*. 2002.
40. Cohen N, Wassarman PM. Association of egg zona pellucida glycoprotein mzp3 with sperm protein sp56 during fertilization in mice. *Int. Journal Development Biology*. 2001;45(3):569-576.
41. Cheng A, Le T, Palacios M, et al. Sperm-Egg Recognition in the Mouse: Characterization of sp56, A Sperm Protein Having Specific Affinity for ZP3. *The Journal of Cell Biology*. 1994;125(4): 867-878.
42. Speroff L, Fritz MA. *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 7 th edition Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2005:1027-1028.
43. Cramer DW, Walker AM, Schiff I. Statistical methods in evaluating the outcome of infertility therapy. *Fertil Steril*. 1979;32:80-86.
44. Hugues JN. Ovarian stimulation for assisted reproductive technologies. In Vayana E, Rowe PS, Griffin PD (eds), *Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting*. Geneva: WHO, 2002;102-125.

45. Forti G, Krausz C. Evaluation and treatment of the infertile couple. *Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1998;83:4177-88.
46. Chandra A, Mosher WD. The demography of infertility and the use of medical care for infertility. *Infert reprod. med. clin. north america*. 1994;5:283-296.
47. Berek JS. Novak's Gynecology 13.ingilizce baskıdan çeviri. Çeviri Editörü: Erk A: Nobel Tıp Kitabevleri.2004
- 48.http://www.androloji.org.tr/images/File/EAU_Kilavuzlari/eau_infertilite_kilavuzu.
49. Templeton AA, Penney GC. The incidence, characteristics and prognosis of patients whose infertility is unexplained. *Fertil Steril*. 1982;37:175-182.
50. Navot D, Muasher SJ, Oehinger S, Liu HC, Veeck LL, Kreiner D, et al. The value of in vitro fertilization for the treatment of unexplained infertility. *Fertil Steril*. 1984; 41:260-264.
51. Tıraş MB, Aybar F. İn vitro Fertilizasyon (IVF)–İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu (ICSI) Endikasyonları. *Türkiye Klinikleri, J Surg Med Sci* 2006; 2(5):37-41.
52. İnfertil olgulara klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamaları. Editör : Hassa H. Osmangazi Üniversitesi yayınları.: Eskişehir, 1. Baskı, 2003.
53. <http://www.androloji.org.tr/icerik.asp?lang=&action=single&id=21>
54. Depypere H, Milingos S, Comhaire F. Intrauterine insemination in male subfertility: A comparative study of sperm preparation using a commercial Perikoll kit and conventional sperm wash. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1995; 62: 225-229,
55. Allamaneni SSR, Agarwal A. Rama S, et al. Comparative study on density gradients and swim-up preparation techniques utilizing neat and cryopreserved spermatozoa. *Asian J Androl*. 2005;7: 86-92.
56. Goverde AJ, McDonnell J, Vermeiden JP, et al: Intrauterine insemination or in-vitro fertilisation in idiopathic subfertility and male subfertility: A randomized trial and cost-effectiveness analysis. *Lancet*. 2000;355: 13-18.
57. Lee RK, Hou JW, Ho HY, et al. Sperm morphology analysis using strict criteria as a prognostic factor in intrauterine insemination. *Int J Androl*. 2002;25(5):277-80
58. Van Voorhis BJ, Barnett M, Sparks AE, et al. Effect of the total motile sperm count on the efficacy and cost-effectiveness of intrauterine insemination and in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2001;75(4):661-8.
59. Campana A, Sakkas D, Stalberg A, et al. Intrauterine insemination: evaluation of the results according to the woman's age, sperm quality, total sperm count per insemination and life table analysis. *Hum Reprod*. 1996;11(4):732-6

60. Fahy UM, Cahill DJ, Wardle PG, Hull MG. In vitro fertilization in completely natural cycles. *Hum Reprod.* 1995; 10:572-575.
61. Surrey ES, Schoolcraft WB. Evaluating strategies for improving ovarian response of the poor responder undergoing assisted reproductive techniques. *Fertil Steril.* 2000;73(4):667-76.
62. Speroff L, Glass RH, Kase NG. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility.* 6th. Edition.1999. Chapter 31 Lippincott Williams & Wilkins.
63. Delvigne A, Rozaberg S. Epidemiology and prevention of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS) : a review. *Hum. Reprod update.*2002; 8(6):559-77.
64. Beers MH, Porter RS, Jones JL, Berkwits M. *The Merck Manual Of Diagnosis And Therapy (The Merck Manual Tanı Ve Tedavi El Kitabı) / 18. baskı. Çeviri Editörü: Solakoğlu Z. Yüce Yayım.*2008.
- 65.Hogan B, Constantini F, Lacy E. Summary of mouse development.1994;21-189. *Manuplating The Mouse Embryo.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.
66. Quintans CJ, Donaldson MJ, Blanco LA, Pasqualini RS. Empty follicle syndrome due to human errors: its occurrence in an in-vitro fertilization programme. *Hum Reprod.* 1998;13(10):2703-5.
67. Xia P. Intracytoplasmic sperm injection: correlation of oocyte grade based on polar body, perivitelline space and cytoplasmic inclusions with fertilization rate and embryo quality. *Hum Reprod.* 1997; 12: 1750–1755.
68. Veeck LL. The morphological estimation of mature oocytes and their preparation for insemination. In Jones HW Jr, Jones GS, Hodgen GD, Rosenvvaks Z, (eds), *In Vitro Fertilization-Norfolk.* Baltimore: Williams&Wilkins 1986;81–86.
69. Marteil G, Richard-Parpaillon L, Kubiak JZ. Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reproductive Biology.* 2009; 9(3): 203-224.
70. Heikinheimo O, Lanzendorf SE, Baka SG, Gibbons WE. Cell proliferation and apoptosis: Cell cycle genes c-mos and cyclin-B1 are expressed in a specific pattern in human oocytes and preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* 1995;10 (3): 699-707.
71. Ebner T, Moser M, Yaman C, Feichtinger O, Hartl J, Tews G. Elective transfer of embryos selected on the basis of first polar body morphology is associated with increased rates of implantation and pregnancy. *Fertil Steril.* 1999;72: 599–603.
72. De Santis L, Cino I, Rabellotti E, Calzi F, Persico P, Borini A, Coticchio G. Polar body morphology and spindle imaging as predictors of oocyte quality. *Reprod Biomed Online.*2005; 11: 36–42.

73. Cupps PT. Reproduction in Domestic Animals. Fourth edition, Academic Press Inc. 1991. Oxford, UK.
74. Krisher RL, Bavister BD. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. *Theriogenology*. 1998; 49(1):103-14.
75. Chian RC. In vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2004; 8; 148-166.
76. Gordon I. In Vitro Maturation Culture Systems. 1994; 99 –106. In : Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab International, Cambridge
77. Hafez ESE. Assisted Reproductive technology: ovulation manipulation, in vitro fertilization/ embryo transfer. 1993; 461-502. In: Reproduction in farm animals. 6th Ed. Lea Febiger. Philadelphia.
78. Moor RM, Dai Y, Falka J-Jr. Oocyte maturation and embryonic failure Human Reprod. Update. 1998; 4; 223-36
79. Gosden RG. Oocyte development throughout life. In Grudzinkas JG, Yovich JL (eds), Cambridge. 1995; 119-149
80. Pankaj T. Manual of Assisted Reproductive Technologies and Clinical Embryology. First edition. Jaypee Brothers Medical Pub. 2011; 16 : 161-165.
81. Kayıkçı MA. Çam HK, Akman Y, Erol A. Erkek İnfertilitesini Değerlendirmede Semen Analizinin Özellikleri ve Rolü. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002; 4 (3): 35-38.
82. World Health Organization: WHO laboratory Manual for the examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction. Cambridge, England, Cambridge University, 1999.
83. The WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm–cervical Mucus interaction. 5th. Edition. 2010. “WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen”
84. Ding D, Liou S, Huang L, Liu J, Wu G. Effects of four methods of sperm preparation on motion characteristics and nitric oxide concentration in laboratory-prepared oligospermia. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2000; 63:822–827.
85. Cheapau C, Gagnon C. Nitrocellulose and polyvinyl coatings prevent sperm adhesion to glass without affecting the motility of intact and demembranated human spermatozoa. *J Androl*. 1987; 8:34-40.
86. Engel S, Weber H, Petzoldt R, Seidl B, Wiehe W, Sperl J. An improved method of sperm selection by glass wool filtration. *Andrology*. 2001; 33:223-230.

- 87.** Demiral OÖ, Daşkın A. Dondurulmuş tavşan spermasında spermatozoon seperasyonu ve dölverimi. Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi.2004;1(2): 97-103.
- 88.** Monqaut AL, Zavaleta C, López G, Lafuente R, Brassesco M. Use of high magnification microscopy for the assessment of sperm recovered after two different sperm processing methods. Fertil Steril.2011;95(1):277-80.
- 89.** Brison RD. Apoptosis in mammalian preimplantation embryos: regulation by survival factors. Hum Fert.2000;3 (1): 36-47.
- 90.** Davis DL. Culture and storage of pig embryos. J. Reprod. Fertil.Suppl.1985; 33:115-124.
- 91.** Dean, J. Biology of mammalian fertilization: role of the zona pellucid. J. Clin Invest. 1992;89(4):1055-9.
- 92.** Cohen J. Assisted hatching of human embryos. J In Vitro Fert Embryo Transf. 1991;8(4): 179-90.
- 93.** Gordon J, Talansky B. Assisted fertilization by zona drilling: a mouse model for correction of oligozoospermia. J. Exp Zool.1986;239:347-54.
- 94.** Cohen J, Malter H, Fehilly C, et al. Implantation of embryos after partial zona opening of oocyte zona pellucid to facilitate sperm penetration. Lancet.1988; 2:162.
- 95.** Mann JR. Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoan microinjected under the zone pellucida. Biol. Reprod. 1988; 38: 1077-1083.
- 96.** Gordon I. Laboratory Production of Cattle Embryos, second edition. 2003. Wallingford: CAB International, UK.
- 97.** Iritani A. Micromanipulation of gametes for in vitro assisted fertilization. Mol Reprod Dev.1991; 28:199.
- 98.** Chung JT, Keefer CL, Downey BR. Activation of Bovine oocytes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Theriogenology.2000;53: 1273-1284.
- 99.** Goto K, Kinoshita A, Takuma Y, Ogawa K. Fertilization of Bovine Oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. Vet. Rec.1990;24: 517-520.
- 100.** Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril.1993; 5:826.
- 101.** Stelf T, Herrero J, Turley H, Hinz V. et. al. Different cumulative pregnancy rates in patients with repeated IVF or ICSI cycles: possible influence of a male factor. Andrologia 1999;49:31-41.

- 102.** Nagy ZP, Joris H, Verheyen G et al. Correlation between sperm motility of testicular spermatozoa, testicular histology and the outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* 1998;13:890-895.
- 103.** Geyter CD, Geyter MD, Meschede D, Behre HM. Assisted fertilization. In: Nieschlag E, Behre HM, eds. *Andrology: Male reproductive health and dysfunction*. New York: Springer-Verlag. 2001;337-365.
- 104 .** Keefer CL, Younis AI, Brackett BG. Cleavage development of Bovine oocytes fertilized by sperm injection. *Mol. Reprod Dev* 1990. **25**: 281-285.
- 105.** Roseboom T, Vermeiden J. Evaluation of embryo scoring systems and their value in predicting in vitro fertilization outcome. *Assist Reprod Rev* 1995;5:53-59.
- 106.** Veeck LL: *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses*. The Parthenon Publishing Group New York. 6. Chapter. 48, 1999.
- 107.** Saito H, Hirayama T, Koike K et al. Cumulus Mass Maintains Embryo Quality. *Fertil Steril*.1994;62:555-558.
- 108.** Marek D, Langley M, Gardner DK, et al. Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril*.1999;72:1035-40.
- 109.** Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, et al. Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Hum Reprod* 2000;15:1947-52.
- 110.** Bungum M, Bungum L, Humaidan P, Yding Andersen C . Day 3 versus day 5 embryo transfer: a prospective randomized study. *Reprod Biomed Online* 2003;7:98-104.
- 111.** Fahy GM. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. *Cryobiology*. 1991; 28: 467-73.
- 112.** Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnol. Adv.* 1996; 14: 127-149.
- 113.** Sağırkaya H, Bağış H. Memeli Embriyoların Kriyoprezervasyonu, Uludağ Univ. J. Fac. Vet. Med.2003;22:121-129
- 114.** Bucak MN, Tekin N. Kriyoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kriyoprotektif etki. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*2007;54: 67-72.
- 115.** Luz MR, Holanda CC, Pereira JJ, et al. Survival rate and in vitro development of in vivo-produced and cryopreserved dog embryos. *Reproduction, Fertility, and Development*.2009; 22:208–209
- 116.** Shaw JM, Jones GM. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Human Reproduction Update*. 2003;9(6):583-605.

- 117.** Saragusty J, Gacitua H, Rozenboim I, Arav A. Do physical forces contribute to cryodamage? *Biotechnology and Bioengineering*. 2009;104 (4):719–728.
- 118.** Campbell BK, Picton HM. Oocyte storage. *Curr. Obstet. Gyn.* 1999; 9: 203-209.
- 119.** Brian Dale and Kay Elder. Eds. *In vitro fertilization, Cryopreservation; Embryo freezing and thawing*. 1997.
- 120.** Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*.1949; 164: 666-667.
- 121.** El-Gayar M, Holtz W. Technical note: Vitrification of goat embryos by the open pulled straw method. *J. Anim. Sci.* 2001; 79: 2436-2438.
- 122.** Dattena M, Ptak G, Loi P, Cappai P. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. *Theriogenology* 2000; 53: 1511-1519.
- 123.** Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril*.1999; 72: 1073-1078.
- 124.** O'kearney-Flynn M, Wade M, Dufy P, et al. Effect of cryopreservation on IVP cattle development in vitro and in vivo. *Theriogenology*.1998; 49: 173.
- 125.** Martinez AG, De Matos DG, Furnus CC, Brogliatti GM. In vitro evaluation and pregnancy rates after vitrification of in vitro produced Bovin embryos. *Theriogenology* 1998;50: 757-767.
- 126.** Moragianni VA, Cohen JD, Smith SE, et al. Outcomes of day-1, day-3, and blastocyst cryopreserved embryo transfers. *Fertil Steril*.2010;93:1353–1355.
- 127.** Salumets A, Tuuri T, Makinen S, et al. Effect of developmental stage of embryo at freezing on pregnancy outcome of frozen–thawed embryo transfer. *Human Reproduction* 2003;18(9):1890–1895.
- 128.** Leibo SP, Pollard JW, Martino PA. 1995. Chilling and freezing sensitivity of 'reassembled' in vitro-derived Bovin embryos. *Theriogenology (Abstr)* 43:265.
- 129.** Edashige K, Asano A, AN TZ, Kasai, M. Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology* 1999; 38(4): 273-280.
- 130.** Ludwig M, Muschalla H, Al-Hasani S, Diedrich K. The effect of multiple cryopreservation procedures and blastomere biopsy on the in-vitro development of mouse embryos. *Hum Reprod.* 1998; 13(11): 3165-8.
- 131.** Dobrinsky, JR. Cellular approach to cryopreservation of embryos. *Theriogenology*,1996; 45:17-26
- 132.** Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*,2000; 53: 59-72.

- 133.** Baguisi, A., Lonergan, P., Overstrom, E. W., Boland, M. P. Vitrification of Bovin embryos: Incidence of necrosis and apoptosis. *Theriogenology*,1999; 51: 62.
- 134.** Kasai, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. *Reprod. Med. Biol.* 2002; 1:1-9.
- 135.** Rall, WF. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 28: 237-245
- 136.** Uechi, H., Tsutsumi,O., Morita,Y., Takai,, Taketani, Y. Comparison of the effects of controlled-rate cryopreservation and vitrification on 2-cell Mouse embryos and their subsequent development. *Human Reproduction* 1999; 14(11): 2827-2832.
- 137.** Trounson, A., Mohr, L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight cell embryo. *Nature*,1983;305:707-9.
- 138.** Van der Elst J, Camus, M. Van den Abbeel E., Maes, R., Devroey, P., Van Steirteghem AC. Prospective randomized study on the cryopreservation of human embryos with dimethylsulfoxide or 1,2-propanediol protocols. *Fertil Steril*.1995;63:92-100.
- 139.** Camus, M., Van den Abbeel E., Waesberghe, LV., Wisanto, A., Devroey, P.,Van Steirteghem AC. Human embryo viability after freezing with dimethylsulfoxide as acryoprotectant. *Fertil Steril*,1989; 51:460-465.
- 140.** Lassalle, B., Testart, J., Renard, JP. Human embryo features that influence the success of cryopreservation with the use of 1,2-propanediol. *Fertil Steril*,1985; 44:645-651.
- 141.** De Paz P, Sanchez AJ, Fernandez JG, Carbajo M, Dominguez JC, Chamoro CA, Anel, L. Sheep embryo cryopreservation by vitrification and conventional freezing. *Theriogenology*.1994; 42: 327–338
- 142.** Park SP, Kim EY, Kim, DI, Park NH, Won YS, Yoon SH, Chung KS, Lim JH. Simple, efficient and successful vitrification of Bovin blastocysts using electron microscope grid. *Human Reprod*.1999;14: 2838-2843
- 143.** Zheu SE, Zeng SM, Yu W L, Li SJ, Zhang Z, Chen Y.F. Vitrification of in vivo and in vitro produced ovine blastocysts. *Animal Biotechnology*.2001;12: 193-203.
- 144.** Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. *Cryo-Letters* 1997;18: 191–195.
- 145.** Shaw JM, Kola I, MacFarlane DR, Trounson AO. An association between chromosomal abnormalities in rapidly frozen 2-cell mouse embryos and the ice-forming properties of the cryoprotective solution. *J Reprod Fertil* 1991;91:9–18.

- 146.** Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C & Suzuki T 1996 Normal calves obtained after direct transfer of vitrified Bovin embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology* 33:291–299
- 147.** Chian RC, Kuwayama M, Tan L, et al. High survival rate of Bovin oocytes matured in vitro following vitrification. *Journal of Reproduction and Development*.2004; 50: 685-696.
- 148-** Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A. Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Human Reproduction*.2009;24:797–804.
- 149.** Saragusty, J., Arav, A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 2011; 141: 1–19
- 150.** Mukaida, T., Wada, S., Takahashi, K. Vitrification of human embryos based on the assessment of suitable conditions for 8 cell mouse embryos. *Human Reproduction*.1998;13:2874-5.
- 151.** Yokota, Y., Sato, S., Yokota, M. Successfull pregnancy following blastocyst vitrification. *Human Reproduction*. 2000;15:1802-3.
- 152.** van Wagendonk-de Leeuw AM, den Daas JHG, Kruip TH, Rall WF. Comparison of the efficacy of conventional slow freezing and rapid cryopreservation methods for Bovin embryos. *Cryobiology*. 1995; 32:157-167.
- 153.** Desai N, Blackmon H, Szeptycki J, Goldfarb J. Cryoloop vitrification of human day 3 cleavage-stage embryos: post-vitrification development, pregnancy outcomes and live births. *Reproductive BioMedicine Online*.2007;14(2):208-13.
- 154.** Vincent C, Johnson MH. Cooling, cryoprotectants, and the cytoskeleton of the mammalian oocyte. *Oxford Rev Reprod Biol*.1992; 14:71-100.
- 155.** Weber PK, McGinnis LK, Youngs CR. An evaluation of potential vitrification solutions forcryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology* 1992; 37:321 abstr.
- 156.** Bavister BD, Rose TAH, Pinyopummintr T. Development of in vitro matured/in vitro fertilized Bovin embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*. 1992; 37 (1): 127-146.
- 157.** Goto K, Iritani A. Oocyte maturation and fertilization. *Anim. Reprod. Sci.* 1992; 28: 407-413.
- 158.** Zuelke KA, Brackett BG. Increased glutamine metabolism in Bovin Cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*. 1992; 48: 815-820.

- 159.** Akyol N. Sığırlarda İn Vitro Oosit Maturasyonu. Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg. 2006;46 (1) 59 – 69
- 160.** Greve T, Madison V. In vitro fertilization in cattle: A review. *Reprod Nutr Dev*, 1991;31:147-157.
- 161.** MacCallum C, Salamone D, Palasz AT. Effect of maturation medium supplements on Bovin oocyte fertilization and embryo development. *Theriogenology*, 1997;47: 193-196.
- 162.** Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Parrish JJ, First NL (1989): In vitro maturation and fertilization of Bovin oocytes. *Theriogenology*, 31, 61-74.
- 163.** Greve T, Avery B, Callesen H. Viability of in vivo and in vitro produced Bovin embryos. *Reprod Dom Anim*.1993;28: 164-169
- 164.** Brackett BG, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of Bovin embryos. *Theriogenology*.1993; 39:43-64.
- 165.** Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle MB. Cryopreservation of porcine embryos. *Nature*. 1995; 374:416.
- 166.** Pinyopummintr T, Bavister BD.. In vitro-matured/in vitrofertilized Bovin oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined protein-free culture media. *Biol Reprod*. 1991;45:736-742.
- 167.** Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts *Human Reproduction Update*.1995;1: 91–148.
- 168.** Van Langendonck A, Donnay I, Schuurbiens N, Auquier P, Carolan C, Massip A, Dessy F. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of Bovin embryos in synthetic oviduct fluid medium. *J Reprod Fertil*.1997; 109:87-93.
- 169.** Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, et al. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod* .1995;53:1385-1391.
- 170.** Gardner DK. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. *Cell Biol Int*.1994; 18:1163-1178.
- 171.** Abe H, Otoi T, Tachikawa S, et al. Fine structure of Bovin morula and blastocysts in vivo and in vitro. *Anat Embryol*. 1999;199:519-527.
- 172.** Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, et al. Production, freezing and transfer of Bovin IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*.1995;43:141-152.
- 173.** Pugh PA, Ankersmit AE, McGowan LT & Tervit HR Cryopreservation of in vitro-produced Bovin embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on postthaw survival. *Theriogenology*.1998; 50 :495–506.

- 174.** Sturmey RG, Reis A, Leese HJ & McEvoy TG Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*.2009; 44:50–58.
- 175.** Yoneda A, Suzuki K, Mori T, Ueda J, Watanabe T. Effects of delipidation and oxygen concentration on in vitro development of porcine embryos. *Journal of Reproduction and Development*. 2004; 50: 287–295.
- 176.** Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E & Smorg Z 2009 Lipid content of non-cultured and cultured pig embryo. *Reproduction in Domestic Animals* 44 24–32.
- 177.** Ushijima H, Yamakawa H, Nagashima H. Cryopreservation of Bovin pre-morula-stage in vitro matured/in vitro fertilized embryos after delipidation and before use in nucleus transfer. *Biol Reprod*.1999;60:535-539.
- 178.** Toner M, Cravalho EG, Ebert KM, Overstrom EW. Cryobiophysical properties of porcine embryos. *Biol Reprod* 1986; 34(suppl.):98 abstr.
- 179.** Kashiwazaki N, Ohtani S, Miyamoto K, Ogawa S. Production of normal piglets from hatched blastocysts frozen at -196OC. *Vet Ret*.1991; 128:256-257.
- 180.** Pollard J, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology* 1994; 4 1: 101 -106.
- 181.** Nagashima H, Yamakawa H, Niemann H. Freezability of porcine blastocysts at different perihatching stages. *Theriogenology*.1992; 37:839-850.
- 182.** Dobrinsky JR, Johnson LA. Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: A study of in vitro development. *Theriogenology*.1994; 42:25-35.
- 183.** Hochi S, Semple E, Leibo SP. Effect of cooling and warming rates during cryopreservation on survival of in vitro produced Bovin embryos. *Theriogenology*. 1996;46 837-847.
- 184.** Tominaga K. Cryopreservation and sexing of in vivo and in vitro produced Bovin embryos for their practical use. *Journal of Reproduction and Development* 2004; 50: 29-38
- 185.** Anderson AR, Weikert ML, Crain JL. Determining the most optimal stage for embryo cryopreservation. *Reproductive BioMedicine Online*. 2004;8(2):207-211.
- 186.** Veeck LL, Bodine R, Clarke RN, Berrios R, Libraro J, Moschini RM, et al. High pregnancy rates can be achieved after freezing and thawing human blastocysts. *Fertility and Sterility*. 2004;82(5):1418-1427.
- 187.** Park S, Kim EY, Yoon SH, Chung KS, Lim JH. Animal Experimentation Enhanced Hatching Rate of Bovin IVM/IVF/IVC Blastocysts Using a 1.48-μm Diode Laser Beam. *Journal of Assisted Reproduction And Genetic*. 1999;16: (2) 97-101

- 188.** Keskinetepe L, Sher G, Machnicka A, Tortoriello D, Bayrak A, Fisch J, Agca Y. Vitrification of human embryos subjected to blastomere biopsy for Pre-implantation genetic screening produces higher survival and pregnancy rates than slow freezing. *J Assist Reprod Genet.*2009;26:629–635.
- 189.** Quinn PJ. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology.*1985; 22 128–146.
- 190.** Zeron Y, Tomczak M, Crowe J, Arav A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of Bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology.*2002; 45:143–152.
- 191.** Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biology of Reproduction.*2000; 62:564–570.
- 192.** Euteneuer U, Schliwa M. Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. *Nature.*1984;310:58-61.
- 193.** Lee J, Ishihara A, Theriot JA, Jacobson K. Principles of locomotion for simple shaped cells. *Nature.*1993; 362:167-171.
- 194.** Overstrom EW, Duby RT, Dobrinsky JR, Rob1 JM, Baguisi A, Lonergan P, DufQ P, Walsh JH, Roche JF, Boland MP. Cytoskeletal damage in vitrified and frozen embryos. *Theriogenology.*1993; 39: 276.
- 195.** Wade RH, Chretien D. Cryoelectron microscopy of microtubules. *J Struct Biol.* 1993; 110: 1-27.
- 196.** Skoufias DA, Scholey JM. Cytoplasmic microtubule-based motor proteins. *Curr Opin Cell Biol.*1993; 5:95-104.
- 197.** Sun QY, Schatten H. Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction.*2006;131: 193–205.
- 198.** Parks JE, Ruffing NA. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. *Theriogenology.*1992; 37: 59-73.
- 199.** Tharasanit T, Colenbrander B, Stout T.A.E. Effect of cryopreservation on the cellular integrity of equine embryos. *Reproduction.* 2005; 129: 789–798
- 200.** Carroll J, Depypere H, Matthews CD. Freeze–thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen–thawed mouse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility.*1990; 90: 547–553.

- 201.** Mavrides A & Morroll D 2005 Bypassing the effect of zona pellucida changes on embryo formation following cryopreservation of Bovin oocytes. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology* 118; 66–70.
- 202.** Schiewe MC, Hazeleger NL, Scimenti C, Balmaceda JP. Physiological characterization of blastocyst hatching mechanisms by use of a mouse antihatching model. *Fertil Steril*. 1995 Feb;63(2):288-94.
- 203.** Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP. Ultrastructure of Bovin Blastocysts Following Cryopreservation: Effect of Method of Blastocyst Production *Molecular Reproduction And Development*.2001;58:186-195.
- 204.** Brison RD, 2000. Apoptosis in mammalian preimplantation embryos:regulation by survival factors. *Hum Fert*, 3 (1): 36-47.
- 205.** Neuber E, Luetjens CM, Chan AW, Schatten GP. Analysis of DNA fragmentation of in vitro cultured Bovin blastocysts using TUNEL. *Theriogenology*.2002; 57(9):2193-202.
- 206.** Gjorret JO, Wengle J, Maddox-Hyttel P, King WA. Chronological appearance of apoptosis in Bovin embryos reconstructed by somatic cell nuclear transfer from quiescent granulosa cells. *Reprod Domest Anim*.2005;40(3):210-6.
- 207.** Gjorret JO, Fabian D, Avery B, Maddox-Hyttel P. Active caspase-3 and ultrastructural evidence of apoptosis in spontaneous and induced cell death in Bovin in vitro produced pre-implantation embryos. *Mol Reprod Dev*. 2007;74(8):961-71.

ÖZGEÇMİŞ

08.11.1974 yılında Eskişehirde doğdu. İlk ve orta öğretimini Gölcükte, lise öğretimini Kabataş Erkek Lisesi ve Barbaros Hayrettin Lisesinde tamamladı. 2000 yılında Samsun Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesinden mezun oldu. 2001 yılında Çankırı Orta İlçesi Elmalık Sağlık Ocağında göreve başladı. 2003-2008 yılları arasında İzmir İl Sağlık Müdürlüğüne bağlı kurumlarda pratisyen hekim ve/veya idareci olarak görev yaptı. 2008 yılında Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.'da araştırma görevlisi olarak çalıştı. 2009 yılında İzmir Atatürk Eğitim Araştırma Hastanesi Acil ve İlk Yardım A.D'da araştırma görevlisi olarak çalıştı. 2009 yılı temmuz ayında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.'da araştırma görevlisi olarak uzmanlık eğitimine başladı. Halen aynı görevinde çalışmaya devam etmektedir. Evli ve bir çocuk babasıdır.

