



**FARE EMBRİYOLARININ
DONDURULMASINDA
MELATONİNİN
EMBRİYO CANLILIĞI VE
GELİŞMESİ
ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

**Kübra ÇAĞLAR
Yüksek Tezi**

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

I.Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

II.Danışman: Dr. Ali Cihan Taşkın

2019

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FARE EMBRİYOLARININ DONDURULMASINDA MELATONİNİN EMBRİYO
CANLILIĞI VE GELİŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Kübra ÇAĞLAR

TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

I.DANIŞMAN: Prof. Dr. Sezen ARAT

II.DANIŞMAN: Dr. Ali Cihan TAŞKIN

TEKİRDAĞ-2019

Her hakkı saklıdır



**Bu tez çalışması Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK),
Araştırma Destek Programları Başkanlığı (ARDEB) 114O638 numaralı proje ile
desteklenmiştir.**

Prof. Dr. Sezen ARAT birinci danışmanlığında ve Dr. Ali Cihan TAŞKIN ikinci danışmanlığında, Kübra ÇAĞLAR tarafından hazırlanan “Fare Embriyolarının Dondurulmasında Melatoninin Embriyo Canlılığı ve Gelişmesi Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Prof. Dr.Serhat PABUCCUOĞLU

İmza:

Üye: Prof. Dr. Sezen ARAT (I.Danışman)

İmza:

Üye : Prof. Dr. Muzaffer TAŞ

İmza:

Üye : Doç. Dr. Fulya ÖZDİL

İmza:

Üye : Dr. Ali Cihan TAŞKIN (II.Danışman)

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Doç. Dr. Bahar UYMAZ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

FARE EMBRİYOLARININ DONDURULMASINDA MELATONİNİN EMBRİYO CANLILIĞI VE GELİŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Kübra ÇAĞLAR

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

I.Danışman: Prof. Dr. Sezen ARAT

II.Danışman: Dr. Ali Cihan TAŞKIN

Sunulan bu tez çalışmasının amacı, fare embriyolarının katı yüzey vitrifikasyon (SSV) yöntemi ile dondurulması sonrası, embriyo kültür medyumuna melatonin ilavesinin *in vitro* gelişim üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Melatonin oosit olgunlaşması ve embriyo gelişimini desteklediği bilinmektedir. Sunulan çalışmada sekiz hücreli fare embriyolarının katı yüzey vitrifikasyon yöntemi ile dondurulması sonrası melatonin ilaveli kültür medyumlarında *in vitro* gelişimi ve kalitesi araştırılmıştır. Bu amaçla B6CBAF1 ırk fareler, 10 IU PMSG ve 48 saat sonra 10 IU hCG'nin intraperitoneal (IP) enjeksiyonu ile süperovule edilmiş ve pronükleer aşamadaki embriyolar elde edilmiştir. KSOM embriyo kültür medyumuna + 4mg BSA medyumunda 37°C ve %5 CO₂ 'de sekiz hücreli aşamaya kadar inkübe edilmiştir. Sekiz hücreli embriyolar; 37°C, ekilibasyon solüsyonunda 12 dakika bekletildikten sonra dondurma solüsyonunda yıkanarak 20 saniye içerisinde, sıvı azot içerisinde bulunan alimünyum yüzeye damla halinde bırakılarak (SSV) katı yüzey vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmuştur. Çözündürme sonrası elde edilen embriyolar, KSOM medyumuna + 4mg BSA medyumunda 37°C ve %5 CO₂ 'de blastosist aşamaya kadar inkübe edilmiştir. Deneyde toplam üç grup kullanılmıştır; kontrol, SSV grubu ve SSV + 10⁻¹² M melatonin, sırasıyla kullanılan embriyo sayıları; 35, 74 ve 70'dir. Embriyoların *in vitro* gelişim oranları sırasıyla, %97,14, %86,49 ve %92,86 olarak tespit edilmiştir. Diferansiyel boyama sonucu toplam hücre sayıları sırasıyla; 64, 48 ve 33 olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; melatoninin, SSV vitrifikasyon yöntemi ile dondurulan embriyoların *in vitro* gelişimini desteklediği ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fare, embriyo, SSV, kriyoprezervasyon, melatonin, blastosist

2019, 73 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

EXAMINATION OF THE EFFECTS OF MELATONIN ON EMBRYO VIABILITY AND DEVELOPMENT IN FREEZING MOUSE EMBRYOS

Kübra ÇAĞLAR

Tekirdağ Namık Kemal University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Sezen ARAT

2nd Supervisor: Dr. Ali Cihan TAŞKIN

The aim of this thesis is to investigate the effects of melatonin addition on embryo culture medium *in vitro* development after freezing mouse embryos by solid surface vitrification (SSV). It is known that melatonin supports oocyte maturation and embryo development. The purpose of this study is to investigate the *in vitro* growth and quality of melatonin-supplemented culture medium after freezing the eight-cell mouse embryos by solid surface vitrification. For this purpose, B6CBAF1 mice were superovulated with 10 IU PMSG and intra-peritoneal (IP) injection of 10 IU hCG after 48 hours to obtain embryos in the pronuclear stage (PN) embryos. Afterwards, they were incubated up to eight The aim of the thesis study cell steps under the conditions of 37°C and 5% CO₂ in KSOM medium + 4mg BSA medium. Eight-cell embryos were kept frozen in solid surface vitrification method (SSV) by first keeping them 12 minutes at 37°C in the equilibration solution (then washing them in freezing solution) and then dropping them to aluminum surface in liquid nitrogen with in 20 seconds. Embryos obtained after distillation were incubated in KSOM + 4mg BSA medium to 37°C and 5% CO₂ to blastocyst stage. A total of three groups were used in the experiment: control, SSV group and SSV + 10⁻¹² M melatonin. Number of embryos used were 35, 74 and 70 respectively. The growth rates of *in vitro* development were 97,14%, 86,49% and 92,86%, respectively. According to differential staining total cell counts were 64, 48 and 33 respectively. According to the results obtained; this study demonstrates the first time that melatonin supports *in vitro* development of embryos frozen by SSV vitrification.

Key Words: Mouse, embryo, SSV, cryopreservation, melatonin, blastocyst

2019, 73 pages

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	3
2.1. Farelerde Üreme	3
2.2. Farelerde Embriyo Elde Teknikleri	4
2.2.1. Süperovulasyon	4
2.2.2. Embriyoların elde edilmesi.....	4
2.3. Embriyo Kültürünün Gelişimi	5
2.4.Embriyo Dondurma	7
2.4.1.Embriyo Dondurma Teknikleri	10
2.4.2.Kriyoprotektan solüsyonlar	12
2.5.Melatonin.....	16
2.5.1 Genel bilgiler	16
2.5.2. Melatoninin üreme biyoteknolojisinde kullanımı.....	17
2.5.3.Fare embriyosu ve melatonin	23
3.MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	27
3.1.Materyal.....	27
3.2.Yöntem	27
3.2.1.Medyumların hazırlığı	27
3.2.2. Ağız pipeti kapilleri hazırlığı.....	29
3.2.3. Ovidukt eldesi için operasyon odasının hazırlığı	30

3.3. Süperovulasyon ve Embriyo Eldesi.....	30
3.4. Katı Yüzey Vitrifikasyon (SSV)	34
3.5. Deney Gruplarının Dizaynı	36
3.6. <i>İn Vitro</i> Kültür Oranlarının Değerlendirilmesi	37
3.7. Diferansiyel Boyama ile Hücre Sayılarının Belirlenmesi	39
3.8. İstatistik Analizler	39
4.BULGULAR	40
4.1 Süperovulasyonve 48 Saat Kültür Sonrası Embriyo Eldesine Ait Sonuçlar	40
4.2. <i>İn Vitro</i> Kültür Sonuçları.....	40
4.3. Diferansiyel Boyama ile Hücre Sayılarına Ait Sonuçlar.....	41
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
6.KAYNAKLAR.....	50
7.EKLER.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	73

ÇİZELGE DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 4.1. İn vitro gelişim değ�erlendirmesi.....	44
Çizelge 4.2. Diferansiyel floresan boyama ile blastosistlerde hücre sayılarının belirlenmesi.....	45



ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Dişi ve erkeklerde üreme sistemi.....	4
Şekil 2.2. Dondurmada oluşan hücre içi hasarların şematize şekli.....	12
Şekil 2.3. Düşük molekülü kriyoprotektanların yapıları.....	15
Şekil 2.4. Melatoninin şematize bulunduğu yer ve yapısı.....	18
Şekil 3.1. Yıkama medyumunun hazırlanması.....	32
Şekil 3.2. Embriyo kültür medyumunun hazırlanması.....	33
Şekil 3.3. Ağız pipeti kapilleri hazırlığı.....	34
Şekil 3.4. Operasyon odasının hazırlığı.....	35
Şekil 3.5. İntraperitoneal enjeksiyon ile süperovüle edilmesi.....	35
Şekil 3.6. Çiftleşme sonrası farelerde vajinal plak kontrolü.....	36
Şekil 3.7. Oviduktların toplanması ve yıkanması.....	36
Şekil 3.8. Oviduktların enzimli medyum içerisinde açılması	37
Şekil 3.9. Embriyoların kumulus hücrelerinden ayrılması için yıkanması.....	37
Şekil 3.10. Embriyoların kültür medyumuna transferi.....	38
Şekil 3.11. Embriyoların inkübasyon ortamı.....	38
Şekil 3.12. Embriyoların alimünyum yüzeye bırakılması.....	39
Şekil 3.13. Embriyoların vial ile azota aktarılması.....	40
Şekil 3.14. Çözünme sonrası embriyoların kültür medyumuna alınması.....	40
Şekil 3.15. Deney akışı zaman çizelgesi.....	42
Şekil 4.1. Embriyo 8 hücreli fotoğrafı.....	46
Şekil 4.2. Blastosist evresindeki embriyo fotoğrafı.....	46
Şekil 4.3. Differansiyel floresan boyama ile blastosist görüntülemesi.....	47
Şekil 4.4. Deney grupları blastosist değerleri.....	47

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

µl:	: Mikro litre
µm:	: Mikro metre
AD:	: Alzheimer hastalığı
ATP:	: Adenezin Üç Fosfat
BSA:	: Sığır Serum Albümin
cDNA:	: Sentez Deoksiribo Nükleik Asit
C°:	: Santigram derece
CPS-OPS:	: Kapalı-Açık uçlu Pipet Sistemi
DAPI:	: 4'6-diamidino-2 fenilindol
DMSO:	: Dimetil Sülfoksit
DNA:	: Deoksiribo Nükleik Asit
EG:	: Etilen Glikol
ER:	: Endoplazmik Retikulum
EtOH:	: Ethanol
FSH:	: Folikül Uyarıcı Hormon
GSH:	: Glutatyon Peroksidaz
H ₂ O ₂ :	: Hidrojen peroksit
hCG:	: İnsan Korionik Gonodotropin
HTP:	: Dış ortam medyum
ICM:	: İç Hücre Kitlesi
ICSI:	: İntra Sitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IP:	: Karın boşluğuna enjeksiyon
IU:	: Ünite
IVC:	: Bireysel havalandırılmalı kafes sistemi
IVC:	: <i>In Vitro</i> Kültür
IVF:	: <i>In Vitro</i> Fertilizasyon
IVM:	: <i>In Vitro</i> Matürasyon
IVP:	: <i>In Vitro</i> Üretilen
İPS:	: İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücre
KOK:	: Kumulus Oosit Kompleks
KPA:	: Kriyoprotektan
KSOM:	: Embriyo kültür medyum

LH:	: Lüteinleştirici Hormon
LPO:	: Lipit Peroksidasyonu
Mg:	: Mili gram
MII:	: Metafaz II
ml:	: Mili litre
mm:	: Mili metre
mRNA:	: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
MT1-2:	: Melatonin reseptörleri
MZT:	: Maternal Zigotik Geçiş
ng:	: Nano gram
NO:	: Nitrik Oksit
NŞA:	: Normal Şartlar Altında
PA:	: Partenogenetik Aktivasyon
pH:	: Hidrojen kuvveti
PI:	: Propidyum İyodür
PMSG:	: Gebe Kısırak Serum Gonadotropin
PVP:	: Polivinilpirolidin
RNA:	: Ribonükleik Asit
ROS:	: Reaktif Oksijen Türleri
SOD:	: Süper Oksit Dismutaz
SPSS:	: Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı
SSV:	: Katı Yüzey Vitrifikasyonu
TE:	: Trofoektoderm
µM:	: Mikro molar

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tezimin konusunun belirlenmesi, planlanması ve çalışmalarımın yürütülmesinde desteğini ve bilgisini esirgemeyen danışman hocalarım Prof. Dr. Sezen ARAT ve Sayın Dr. Ali Cihan Taşkın'a (KUTTAM Deney Hayvanları Laboratuvarı), yüksek lisans eğitim hayatım boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, laboratuvar çalışmalarım boyunca desteğini, bilgisini, vaktini ve motivasyonunu hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan başta Sayın Ahmet Kocabay'a (KUTTAM Deney Hayvanları Laboratuvarı), Sayın Nilhan Coşkun'a (KUTTAM Deney Hayvanları Laboratuvarı) ve Sayın Prof. Dr. Fulya Yüksel Şahin'e (Yıldız Teknik Üniversitesi) sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yanımda olan sonsuz sevgisi ile desteğini esirgemeyen hayat arkadaşım Onur Berke ERKAL ve ailesine, özel hayatımda da çok büyük yere sahip varlığını ve enerjisini esirgemeyen kardeşim Begüm ERKÖK'e, lise yıllarımdan beri her zaman yanımda olan biricik manevi kız kardeşim Yağmur SEVİNDİK'e, manevi abim Ahmet ERGEN'e, lisans eğitimimden bu yana yanımda olan sevgili dostum Begüm GÖKÇE'ye ve yüksek lisans döneminde hayatıma katılan sınıf arkadaşlarım Ezgi SERTER' e ve Esin İŞCAN'a çok teşekkür ederim.

İlk sarf ettiğim kelime ile gözlerimi açtığımda ilk karşılaştığım güzel yüzü ile başım her sıkıştığında; hayat tecrübesi, fedakarlığı, sonsuz sevgisi ile hayatım boyunca her anımda yanımda olan sevgili annem Aysun ÇAĞLAR, her koşulda desteğini eksik etmeyen babam Muharrem Kemal ÇAĞLAR, olgunlaşmamı ve hayata karşı hazırlanmamı sağlayan ablam Gökçe Esra ÇAĞLAR, hayatım boyunca sevgisini desteğini eksik etmeyen sevgili halam Sevil ÇAĞLAR ve tüm değerli aile üyelerime, tezimin hazırlanması ve hayatım boyunca desteklerini hissettiğim sevgili dost ve arkadaşlarıma, eğitimime katkıda bulunan ağaç gibi büyümeme, yetişmeme, gelişmeme katkıda bulunan tüm kıymetli öğretmenlerime, staj yaptığım yerlerdeki değerli öğreticilerime teşekkür ederim.

Kübra ÇAĞLAR

Mayıs 2019

1. GİRİŞ

Üreme biyoteknolojisi ile ilgili yapılan araştırmalar hem çiftlik hayvanları hemde beşeri alanda birçok yeni gelişmeye öncülük etmiş ve geniş bir uygulama alanı bulmuştur. Çiftlik hayvanlarında embriyo üretimi ve transferi gibi üreme biyoteknolojisi uygulamaları, hayvancılığın ıslahı için yüksek verim özelliklerine sahip olan ve hastalıklardan ari sürülerin oluşturulması amacıyla kullanılacak biyoteknolojik uygulamalar olarak karşımıza çıkmaktadır. Hayvansal üretimde son yıllarda giderek artan dar boğaz üretime biyoteknolojik uygulamaların katılması ile aşılabılır. Üreme biyoteknolojilerinin sağlayacağı katkılarla yüksek oranda gebelik ve yavru elde edilmesi mümkündür. Çeşitli teknolojileri içeren üreme biyoteknolojisi içinde; gelişmiş ülkelerde uygulama alanı bulmuş olanlar özellikle *in vivo* ve *in vitro* embriyo üretimi, kültürü, kriyoprezervasyonu ve transferidir. Bu teknolojilerden daha yüksek başarı elde etmek için laboratuvar hayvanları ile yapılacak ön çalışmalar büyük önem taşımaktadır.

Üreme biyoteknolojisi uygulamaları; suni tohumlama teknikleri, embriyo transferi, çoklu ovülasyon, östrus senkronizasyonu, intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), laparoskopik ovum toplanması, *in vitro* matürasyon, *in vitro* fertilizasyon, üreme hücreleri ve embriyoların dondurulması, sperm ve embriyolarda cinsiyetin belirlenmesi, embriyo bölünmesi, klonlama, gen transferi olarak oldukça çeşitlidir ve üremenin kontrol edilmesi, ıslah sürecinin hızlandırılması, verimin artırılması, sayının çoğaltılması vb. gibi çeşitli amaçlarla tek tek veya birkaçı bir arada kullanılmaktadır.

İnsanlarda olduğu gibi hayvanlarda da infertilite problemleri bulunmaktadır. Bu da bir kuşaktan elde edilecek yavru sayısının düşmesine neden olur (Abu ve ark. 2008). Bu problemin yaygınlığı üreme biyoteknolojisinin geliştirilmesine vesile olmuştur.

Üreme biyoteknolojisindeki gelişmeler özellikle hayvansal üretimde iyileşmeye yol açmıştır. Embriyo dondurma teknolojisi, hayvan ıslahında büyük öneme sahiptir. Hayvan yetiştiriciliği programlarında ve beşerî alanda embriyo dondurma teknikleri ile ilgili gelişmeler halen devam etmektedir. Embriyoların dondurulması, tavşan (Mehaisen ve ark. 2015), fare (Zhang ve ark. 2016, Dehghani-Mohammadabadi ve ark. 2014), domuz (Rodriguez-Osorio ve ark. 2007), sığır (Wang ve ark. 2014), manda (Manjunatha ve ark. 2009), koyun (Succu ve ark.

2014) gibi çiftlik hayvanları ve laboratuvar hayvanlarında sık kullanılan bir biyoteknolojik uygulamadır. Embriyo dondurulmasının temel amaçları, infertilite tedavisi, fazla üretilen embriyoların kullanıma kadar saklanması, gen kaynaklarının uzun yıllar korunması ve ıslah çalışmaları olarak sıralanmaktadır (Konc ve ark. 2014, Choudhary ve ark. 2016).

Embriyo ve üreme hücrelerinin yanı sıra somatik hücreler de son yıllarda gen kaynaklarının korunması amacıyla gen bankalarında dondurularak saklanması için önerilen alternatif biyolojik materyaller olmuştur (Arat ve ark. 2011). Soyu tükenme tehlikesi altında olan türlerden hücre ve doku örneklerinin muhafaza edilmesi, biyoçeşitliliğinin korunma stratejisi için önemlidir. Bu amaçla hücre ve dokular için ideal kriyoprezervasyon yöntemleri oluşturmak çok önemlidir. Biyolojik kaynakların saklanması için oluşturulacak merkezlerde, dondurma sonrası hücrelerin canlılığını kaybetmeden geri kazanılması amacıyla, güvenilir dondurma prosedürleri oluşturulmalıdır (Silvestre ve ark. 2004).

Kriyoprezervasyon, hücre ve dokuların sıfır derecenin altındaki ısıya kadar soğutularak, biyolojik aktivitelerinin durdurulması ve gelecekte kullanılması amacıyla saklanmasıdır. Hücre dondurulurken izotonik ortam ile osmolaritesinin artması ve oluşan hipertonic ortamda hücrenin su kaybetmesi sonucu hücrede dehidrasyon şekillenir. Dehidrasyon hızı hücrenin canlılığının devamı için önemlidir. Dehidrasyon hızını belirleyen parametreler; suya karşı plazma membran geçirgenliğinin yeterliliği, kriyoprotektanın tipi ve kullanılan dondurma yöntemleridir (Karlsson ve Toner 1996).

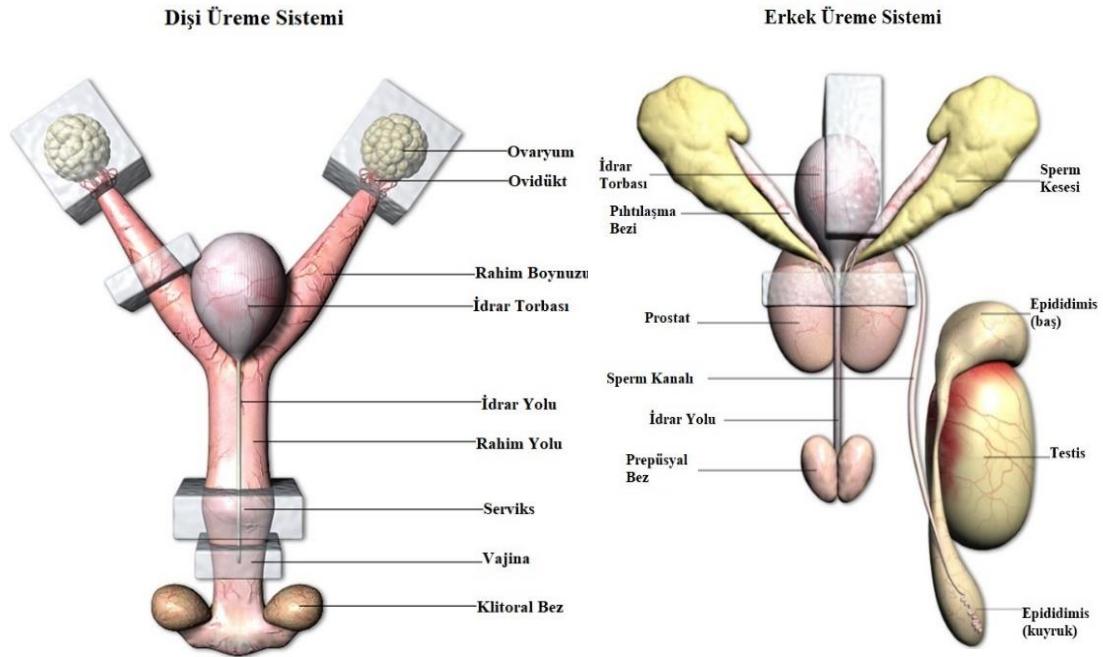
Canlı materyallerin dondurularak saklanmasında büyük gelişmeler kaydedilmiş olmasına karşın hala istenilen başarı tam olarak elde edilememiştir. Bu nedenle hücrelerin dondurma ve çözündürme sonrası canlı kalım başarı oranını artırmak için yeni kriyoprotektanlar, farklı dondurma prosedürleri geliştirilmekte, çözüm sonrası hücrelerde meydana gelecek hasarı önleyici maddeler üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Bu tez çalışmasının amacı da vitrifikasyon ile dondurulan fare embriyolarının çözüm sonrasında *in vitro* kültür ortamına melatonin ilavesinin embriyo gelişimine olumlu katkı sağlayıp sağlamadığını belirlemektir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Farelerde Üreme

Dişi farelerde üreme sistemi, Y şeklinde uterus, çift ovaryum ve ovidukt, klitoral bez, serviks ve kas yapısından oluşan vajinadan oluşur (Şekil 2.1-A). Erginliğe ulaşma süreleri ırklar arasında 28. – 49. günler arasında değişkenlik gösterirken; vajinanın açılması ile anlaşılır. Fareler hamile kalmadıkları süre boyunca belli aralıklarla kızgınlık gösterir ve tüm yıl içerisinde üreyebilirler. Erkek farelerde üreme sistemi ise, penis, seminal vezikül, testis ve epididimis, kas ve sinir yapısından oluşur (Şekil 2.1-B).

Farelerde ovulasyon karanlık zaman diliminde meydana gelir. Gece yarısı meydana gelen çiftleşme sonucu dişilerde oluşan vajinal plug, 16-24 saate kadar gözlemlenebilir. Gebelik ortalama 20-21 gün sürer (Schwiebert 2007, Harkness ve Wagner 1995, Hogan ve ark. 1994).



Şekil 2.1. Dişi (A) ve erkeklerde (B) üreme sistemi

(Anonim 2018a)

2.2. Farelerde Embriyo Elde Teknikleri

2.2.1. Süperovulasyon

Fertil 6-8 haftalık yaşta dişi farelere hormon uygulayarak ovulasyonun senkronize edilmesi ve oosit sayılarının yükseltilmesi işlemine süperovulasyon denir. Uygulama sırasında folikül uyarıcı hormon (FSH) veya onun etkisine sahip olan gebe kısrak serum gonadotropini (PMSG) kullanılarak çok sayıda follikülün gelişimi uyarılır. Gelişen folliküllerin ovulasyonunu sağlamak için lüteinleştirici hormon (LH) benzeri etkisi olan insan korionik gonodotropin (hCG) hormonu kullanılır (Hogan ve ark. 1994). Dişi farelere uygulama günü 10 IU (birey başı $\cong 200\mu\text{l}$) gebe kısrak serum gonadotropin hormonu (SIGMA-PMSG) intraperitoneal (IP) enjeksiyonla uygulanır. Enjeksiyondan 48 saat sonra, 7,5 IU (birey başı $\cong 200\mu\text{l}$) insan koriyonik gonadotropini (SIGMA-hCG) intraperitoneal (IP) enjeksiyonla uygulanır. Protokol sonrası, dişi fareler; 2 dişi x 1 erkek kafes düzeni olacak şekilde çiftleşmeleri için ortamlarına bırakılırlar (Bagis ve Odoman 2004a).

2.2.2. Embriyoların elde edilmesi

2.2.2.1. Zigot eldesi

Süperovüle edilmiş farelerden vajinal plak gösteren dişilere devam eden 0-12 saat içerisinde servikal dislokasyon yapılır. Sakrifiye edilen farelerin abdomenleri; alkol ile temizlenir ve orta hat boyunca kesilir. Kesitten üreme organı bulunup dışarı doğru çekilir ve ovaryuma kadar tüm dokular uzaklaştırılır ve oviduklar dikkatlice yapıdan ayrılır. Toplanan oviduktlar HEPES tamponlu ve 4 mg/ml BSA ile takviye edilmiş medyum (HTF) ile yıkanır. Oviduklar içerisinde 300 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonda hiyalüronidaz enzimi içeren HTF medyumunda, steril dişli pens ile açılır. Pronuklear safhadaki embriyoların kumulus hücrelerinden enzim yardımıyla ayrılması için 3-5 dakika beklenir ve enzimden bağımsız HTF medyumunda bolca yıkanarak ağız pipeti yardımı ile ekilibre olmuş embriyo kültür medyumuna (4mg/ml BSA+KSOM medyum) transfer edilir (Bagis ve ark. 2010, Hogan ve ark. 1994).

2.2.2.2. Morula eldesi

Süperovule edilmiş farelerden vajinal plak gösteren dişilere devam eden 20-68 saat içerisinde servikal dislokasyon yapılır. Sakrifiye edilen farelerin abdomenleri; alkol ile temizlenir ve orta hat boyunca kesilir ve yukarıda anlatıldığı gibi oviduktları toplanır. Dört, sekiz hücreli ve kompakt morula aşamasındaki embriyoların eldesi için, HEPES tamponlu ve 4 mg/ml BSA ile takviye edilmiş medyum (HTF) ile dolu 25 gauge (ga)'lık insülin enjektörü ile çift taraflı akış sağlanarak oviduktlar yıkanır. HTF medyumunda bolca yıkanarak ağız pipeti yardımı ile ekilibre olmuş kültür medyumuna (4mg/ml BSA+ KSOM medyum) transfer edilir (Bagis ve ark. 2010).

2.2.2.3. Blastosist eldesi

Süperovule edilmiş farelerden vajinal plak gösteren dişilere devam eden 3,5-4,5 gün içerisinde servikal dislokasyon yapılır. Sakrifiye edilen farelerin abdomenleri, alkol ile temizlenir ve orta hat boyunca kesilir. Kesitten üreme organı bulunup dışarı doğru çekilir ve ovaryuma kadar tüm dokular uzaklaştırılır. Uterus serviksin gerisinden kesilerek dışarı alınır ve petri kabına yerleştirilir. Blastların eldesi için; HEPES tamponlu ve 4 mg/ml BSA ile takviye edilmiş medyum (HTF) ile dolu 25 gauge (ga)'lık insülin enjektörü ile çift taraflı akış sağlanarak uterus lümeni yıkanır. Blastlar, HTF medyumunda bolca yıkanarak ağız pipeti yardımı ile ekilibre olmuş kültür medyumuna (4mg/ml BSA+ KSOM medyum) transfer edilir (Bagis ve ark. 2010).

2.3. Embriyo Kültürünün Gelişimi

Yirminci yüzyılın ilk yıllarında, memeli embriyolarının gelişimi veya kültürü için ilk girişimler başarısızlıkla sonuçlanmıştır. *İn vitro* kültür embriyoları girişiminin ilk raporu Schengck tarafından 1880 yılında olmuştur (Schenck 1880). Mark ve Long (1987), sıçan ve fare oositlerini dölemeye çalışmış ama başarısız olmuştur. Kan plazmasından oluşan bir büyüme solüsyonu kullanılarak, tavşan embriyo kültür ortamı kurulmuş, kültürde gelişim incelenmiş ancak 40 saatin ötesinde gelişim elde edilememiştir (Bracket 1912-13). Daha sonra Maximov (1925) tavşan kan plazmasından oluşan kültür ortamda tavşan embriyolarının gelişimini araştırmıştır. Bu çalışmadan faydalananlar, kan plazması kültür ortamında; tavşan embriyolarının 1 hücreli aşamadan 8 hücreli aşamaya kadar bölünmesi gözlemlenmiştir (Lewis

ve Gregory 1929). Pincus 1935'te tavşan oositlerinden *in vitro* fertilizasyon ile (IVF) embriyo elde ettiklerini ve bunların transferinden de canlı bir doğum gerçekleştiğini rapor etmiştir.

Hammond (1949), tavuk yumurtası beyazı ve sarısı ile takviye edilmiş fizyolojik tuzlu sudan oluşan bir kültür medyumunda; 8 hücreli fare embriyolarını blastosist aşamasına geliştirmeyi başarmıştır. Hammond'ın bu çalışmaları embriyoların, ilk kez kimyasal olarak tanımlanmış bir medyumda gelişebileceğini göstermiştir.

Chang (1959), siyah tavşanlardan elde ettiği oositleri yine siyah tavşanların spermaları ile fertilize etmiş ve gelişen embriyoları beyaz tavşana transfer ederek, beyaz tavşanın siyah yavrular doğurduğunu göstermiştir. Bu gelişme ile nihayet memelilerde başarılı bir şekilde IVF ile fertilizasyon sorununun çözülebileceği kanıtlanmıştır.

Glikoz, penisilin, streptomisin ve yumurta beyazı ile modifiye edilmiş Ringer bikarbonat çözeltisinde sekiz hücreli aşamada kültüre edilen fare embriyolarının blastosist aşamasına kadar geliştiği gözlemlenmiştir. Bu başarılı sonucun kültür ortamının pH'sının daha iyi kontrol edilmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür (Whitten 1956).

McLaren ve Biggers (1958), Whitten embriyo kültür medyumunda geliştirilen fare embriyolarının transferi ile canlı doğum elde etmişlerdir. Whitten ve Biggers (1968), 2 hücreli embriyoların blastosist aşamasına kadar kültüre edilebildiği embriyo kültür ortamları da geliştirmişlerdir. Bu yeni embriyo kültür medyumuna transfer edilen fare embriyolarının osmotik basınca toleranslı olduğu bulunmuştur. Memeli embriyo kültür ortamları 280 ve 290 milimetre / kg osmotik basınç seviyesindedir (Nielson ve Jaffar 2010).

Bu gibi bir dizi çalışma, ilk nesil embriyo kültür ortamındaki yetersizlikleri ortaya çıkarmıştır. Whitten ve Biggers 1968 yılında, bazı farelerden elde edilen zigotun *in vitro* ortamda blastosist aşamasına kadar gelişebildiğini ancak başka embriyoların gelişimsel bloklar nedeniyle blastosist aşamasına ulaşamadıklarını bildirmişlerdir. Ancak genetik faktörlerin sebep olduğu bu gelişimsel bloklara embriyo kültür ortamlarının engel olduğu da gösterilmiştir (Biggers ve ark. 1962, Biggers 1987).

Whitten'in embriyo kültürü keşfinden sonra embriyo fizyolojisi, metabolizması ve beslenmesi üzerine yapılan sayısız çalışmaların sonuçları, beşeri alanda IVF teknikleri kullanılarak canlı bebek doğumu ile sonuçlanmıştır (Edwards ve ark. 1980). Bu gelişmeden yaklaşık sekiz yıl önce Whittingham ve ark. (1972) ve Wilmot (1972) ilk kez, fare embriyolarının başarılı bir şekilde dondurulduğu bildirmiştir. Embriyo kültürü ile ilgili çok yönlü çalışmalar çiftlik hayvanlarında *in vitro* embriyo üretimi, kriyoprezervasyon, klonlama gibi üreme biyoteknolojisinde önemli tekniklerin gelişimine yardımcı olmuştur.

Fare embriyolarından embriyonik kök hücre eldesi 1981 yılında rapor edilmiştir (Evans ve Kaufman 1981, Martin 1981). Bu gelişmeden sonra Thomson ve ark. (1998) ilk kez insan embriyonik kök hücrelerinin elde edildiğini bildirmişlerdir.

2.4.Embriyo Dondurma

Embriyo kriyoprezervasyonu; embriyoların ihtiyaç duyulana kadar bozulmadan saklanmasını sağlamak amacıyla, hayvancılık endüstrisinde ve insan *in vitro* fertilizasyon programlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Fare ve sığır embriyoları için bir dizi oldukça etkili yavaş ve hızlı soğutma prosedürleri geliştirilmiş olmasına rağmen, bu protokoller diğer türlerin embriyoları için etkili olamamıştır. Hızlı soğutma ve vitrifikasyon protokolleri, ucuz, hızlı ve basit olduklarından embriyolar için özellikle kriyoprezervasyonda kullanılan yöntemlerdir. Memeli türünden embriyoların dondurulması, üreme tıbbında, hayvan yetiştiriciliğinde ve genetik kaynakların korunmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İnfertilite tedavisi için embriyo ve oositlerin kriyoprezervasyonu önemli bir hizmet haline gelmiştir. Bu teknolojinin klinik uygulamasında avantajı, nakil için saklanan ve daha sonra çözülen embriyoların ve oositlerin en iyi sağ kalımının sağlamasıdır (Kuleshova ve Lopata 2002). Embriyoların ve oositlerin kriyoprezervasyonu, infertilite tedavisinin başarı oranını artırmanın ayrılmaz bir parçası olmuştur. Bu nedenle, bu teknolojiyi kullanan klinikler, embriyo ve oosite zarar vermeyen kriyoprezervasyon prosedürlerini kullanmak zorundadır. Bu ise infertilite tedavisi için saklanan canlı materyalin hasarını en aza indireyecek ve hayatta kalma oranlarını artırabilecek düşük sıcaklık teknolojisini seçmeyi gerektirir (Kuleshova ve Lopata 2002). Kriyoprezervasyon, çözüm sonrası embriyoların gelişiminin *in vitro* olarak incelenmesi dışında daha sonra kullanılmak üzere saklanması gibi benzersiz bir fırsat sağlamaktadır (Ashwood ve ark. 1988).

Embriyo kriyoprezervasyonu üreme programları ve genetiği değiştirilmiş farelerin üretildiği hayvan üretim tesisleri için vazgeçilmez bir tekniktir (Wai ve King 2009). Preimplantasyon aşamasındaki embriyoların dondurularak saklanması, insanlar ve hayvanlar için rutin yardımcı üreme programları ve kurumsal hayvan üretim tesislerinde geniş bir amaç yelpazesine hizmet etmektedir. Vitrifikasyon sonrası transfer edilen embriyolardan doğan sağlıklı yavruların elde edilmesi bu yöntemin memeli yumurta ve embriyolarının dondurulmasında tercih edilebilir olmasını sağlamıştır (Kito ve ark. 2003, Vajta ve ark. 1996). Fare (Kono ve ark. 1991), sığır (Vajta ve ark. 1998), insan (Kuleshova ve ark. 1999b) ve tavşana (Jiménez-Trigos ve ark. 2014) ait oositlerin vitrifikasyonu sonrası onlardan elde edilen embriyoların transferi ile sağlıklı yavrular elde edilmiştir. Vitrifiye oositlerin IVF sonrası blastosist gelişim oranlarının; farede % 20-% 42,9 (Abedpour ve Rajaei 2015, Aono ve ark. 2005) sığırda % 13-25,5 (Hou ve ark. 2005, Punyawai ve ark. 2015, Vajta ve ark. 1998) arasında olduğu rapor edilmiştir. Tavşanda ise bu oran %5,5 olarak tespit edilmiştir (Jiménez-Trigos ve ark. 2014). Bununla birlikte, vitrifiye oositlerden elde edilen blastosist oluşumu ve canlı yavru oranları tatmin edici değildir.

Kriyoprezervasyon, hücresel organel fonksiyon bozuklukları (Saunders ve Parks 2000, Stojkovic ve ark. 2000), sitoplazmada organizasyon bozuklukları (Fuku ve ark. 1995) DNA hasarı (Ahn ve ark. 2002) dahil olmak üzere belirgin kromozomal, morfolojik ve biyokimyasal değişikliğe neden olmaktadır. Kriyoprezervasyon sırasında oluşan apoptoz veya nekroz tetikleyicileri için; reaktif oksijen türleri (ROS), hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonlar ve hidroksil radikal üretimindeki artış örnek olarak verilebilir (Mazilli ve ark. 1995, Sohn ve ark. 2002, Cabrita ve ark. 2005).

Doku veya hücrelerdeki su konsantrasyonu, soğutma ve ısıtma işlemi sırasında fiziksel değişimlerin önde gelen belirleyicilerinden biridir. Sulu solüsyonların faz geçişinde buz kristali oluşumu meydana gelmekte ve bu durum dokulara ve hücrelere büyük zarar vermektedir (Fowler ve Toner 2005). Çözünme sırasında hücre içi sıvısında bozulmalar oluşmaması için, hücre membranından nüfuz ederek hücre içi sıvı ile yer değiştiren kriyoprotektan (KPA) maddeler kullanılmaktadır (Cetinkaya ve Arat 2011, Stolzin ve ark. 2012, Caputcu ve ark. 2013). Membranla ilişkili hücre hasarı, zar kompozisyonuna bağlı olarak farklı türler arasında büyük oranda değişebilmektedir (James ve ark. 1999, Muller ve ark. 2008). Artan hücre dışı buz kristalleri, hücre dışı (ekstraselüler) yüzeyde oluşmaktadır. Bu kristal yüzeylerde ortaya

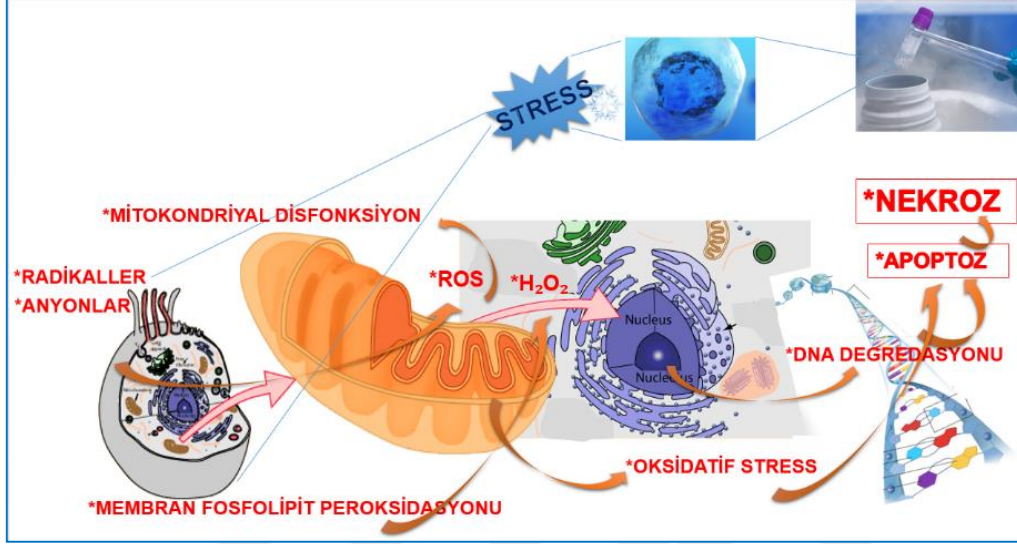
ıkan basınç hücre deformasyonuna neden olabilmektedir (Diller ve Aggarwal 1987, Gage ve Baust 2002). Buz kristali büyümesi ekstraselüler yapıda bir hücreden diğetine aktarılabilir (Irimia ve Karlsson 2002). Buna ek olarak, transmembran proteinleri, "aquaporinler", hücre membranının bir tarafından diğere tarafına buz kristali gelişimini başlatabilir (Gage ve Baust 2002). Hücre içi buz oluşumu, hücre zarı hasar görmeden hücre dışı buz tarafından indüklenebilir. Yüksek konsantrasyonlu hücre dışı çözeltiden ötürü, hücre içi su dışarıya yayılır (osmos) ve hücre dehidrasyonu ile sonuçlanabilir (Karlsson ve Toner 1996). Ozmotik olarak hücre membranından suyun akışı da bir hasar nedeni olarak görülebilir (Muldrew ve McGann 1994).

Aşırı artmış ROS seviyesi, ardından membran fosfolipidlerinin peroksidasyonu, kriyoprezervasyonun hasar verici etkisinin biyokimyasal temellerinden biridir (Alvarez ve Storey 1992). ROS'un hücre bölünmesinin durdurulmasına ve hücre fonksiyonunun kaybına neden olduğu kabul edilmektedir (Ahn ve ark. 2002, Favetta ve ark. 2007, Yoneda ve ark. 2004). Memeli embriyolarında ROS retimindeki artış, gelişimsel bozukluklara neden olmakla birlikte (Nasr-Esfahani ve ark. 1990), kriyoprezervasyon sonrası ROS seviyesinde artış, hücre içi oksidatif sistemleri etkileyerek *in vitro* gelişimi olumsuz olarak etkilemektedir (şekil 2.2) (de Leon ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2016, Tsang ve Chow 2010, Marquez ve ark. 2004, Jurisicova ve ark. 1996, Yang ve ark. 1998, Thomson ve ark. 2009).

Kriyoprezervasyon, antiapoptotik faktörlerin (Baust ve ark. 2000) veya antioksidanların eklenmesiyle apoptozu veya nekrozu azaltıcı yönde indüklenebilmektedir (Jeong ve ark. 2009). Dondurulmuş embriyolar bu süreçte dondurmanın zararlı etkilerinden antioksidanlarla kısmen korunabilir (Hemadi ve ark. 2009, Nedambaleve ark. 2006, Hosseini ve ark. 2009). Çeşitli alışmalar, vitrifiye embriyolarda antioksidan kullanımının yararlı etkilerini göstermiştir (Nedambaleve ark. 2006, Hosseini ve ark. 2009). Melatonin, insandan fareye kadar birçok türün oosit, sperm ve embriyo vitrifikasyonunda başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Hemadi ve ark. 2009).

Kriyoprezervasyon uygulaması ile depolanmış oositlerin ve embriyoların *in vitro* kültür ortam koşullarını iyileştirmek ve hayatta kalmalarına destek olmak için çeşitli antioksidanlar kullanılmaktadır. Bunlar hücreleri kimyasal süreçlerde oluşan oksitlenmelerden ve serbest radikallerden korurlar ve yaşlanma karşıtı özellikleri vardır. ROS bloklayıcılar, onun etkilerini

azaltarak hayatta kalma mekanizmasına yardımcı olmaktadır. Antioksidanların eklenmesi dondurma sırasında oluşabilecek, apoptozu veya nekrozu azaltıcı yönde, pozitif etki yaratmaktadır. Glutasyon, B-merkaptetanol, Taurin E vitamini (a-tokoferol) sık kullanılan antioksidanlara örnektir (Wang ve ark. 2002). Melatonin'nin de etkili antioksidanlar arasında yer aldığı savunulmaktadır (Zhao ve ark. 2016).



Şekil 2.2. Dondurmada oluşan hücre içi hasarların şematize şekli

2.4.1.Embriyo Dondurma Teknikleri

Embriyo kriyopreservasyonunda kullanılan yöntemleri geleneksel yavaş dondurma (slow-freezing), hızlı dondurma (rapid-freezing) ve vitrifikasyon (vitrification) olarak üç grupta inceleyebiliriz.

Yavaş dondurma işleminde embriyo, kısmi embriyo dehidrasyonunu kolaylaştırmak ve dolayısıyla kriyoprezervasyon sırasında hücre içi buz kristali oluşumunu önlemek için 1-1.5 mol / L düşük moleküler ağırlıklı hücre zarını geçebilen kriyoprotektanlar içeren bir hipertonic çözeltiliye yerleştirilmektedir. Embriyolar, programlanabilir bir dondurucu kullanılarak yavaşça (0.2- 2.0°C / dak.) sıfırın altı (-30 ila -70°C) sıcaklıklara kadar soğutulmakta ve sonra sıvı azot (-196°C) içine bırakılmaktadır. Bu prosedürde embriyoların, donmadan önce kriyoprotektan (KPA'lar) çözeltisi ile ozmotik dengeye ulaşması sağlanır (Palasz ve Mapletoft 1996; Youngs ve ark. 2011). Yavaş dondurma prosedürünün fareler, sığırlar ve insan embriyoları için etkili olduğu kanıtlanmıştır (Youngs ve ark. 2011). Bununla birlikte, domuz embriyosu, *in vitro* veya

erken evre embriyolar gibi daha hassas embriyolar için yavaş donma etkin bir yöntem değildir (Youngs ve ark. 2011).

Yüksek donma hızlarının uygulanmasından önce embriyoların yüksek kriyoprotektan çözeltileri kullanılarak kısmen susuz bırakıldığı hızlı dondurma yönteminde, kısa bir ekilibrasyondan sonra, kısmen dehidre duruma geçen embriyolar sıvı azot buharında çok kısa bir süre tutulup sonra sıvı azot içerisine daldırılmaktadır. Ancak bu yöntemde çözündürme sırasında oluşabilen buz kristallerinin embriyoya zarar verebileceği belirtilmektedir (Palasz ve Mapletoft 1996).

Vitrifikasyonun başarısı, embriyo ve onu çevreleyen vitrifikasyon çözeltilisinin camlaştırılması ile hücreler arası buz kristali oluşumunun en aza indirilmesi esasına dayanmaktadır. Embriyoların ozmotik stres ve toksik kriyoprotektana maruz kalma süresinin azalması, yüksek bir canlanma oranına neden olur. Çok küçük hacimde vitrifikasyon çözeltisi içindeki embriyonun sıvı azotla doğrudan ve hızlı teması, daha yüksek soğutma hızlarına ulaşılmasını sağlar ve ilave olarak kriyoprotektana maruz kalma süresinin bu şekilde azaltılmış olmasında bu aşamada olumlu bir etkiye sahiptir. Böylece dondurulacak canlı materyalin kriyoprotektanın toksik etkilerine daha az maruz kalması sağlanır (Kassai 1997, Vajta ve ark. 1997). Embriyoların vitrifikasyonu için kap olarak farklı malzemeler kullanılmıştır. Plastik pipetler, vitrifikasyon için yaygın olarak kullanılmaktadır (Otoi ve ark. 1998). Açık uçlu (OPS) pipetler (Vajta ve ark. 1998) ve çift pipet sistemi (Kuleshova ve Shaw 2000) numune soğutma hızını iyileştirmek ve numuneleri saklama kablalarında biriken olası enfeksiyöz ajanlardan izole etmek için üretilmiştir. Yakın zamanda, soğutma oranını en üst düzeye çıkarmak için elektron mikroskop uç kuyuları (Martino ve ark. 1996, Park ve ark. 2000), kriyoloop (Lane ve ark. 1999a, 1999b), kriyotop (Kuwayama ve ark. 2005), naylon örgü (Matsumoto ve ark. 2001, Fujino ve ark. 2008) ve metal örgü (Fujino ve ark. 2008) gibi yeni malzemeler daha kabul görür hale gelmiştir.

Vitrifikasyon için en sık kullanılan taşıyıcı sistemler, embriyonların sıvı nitrojenle depolanması sırasında enfeksiyon ve patojenlerin hareketi (çapraz bulaşma) gibi potansiyel risklerin altındadır (Lecture-Konirsch ve ark. 2003). Yakın zamanda, kapalı uçlu pipet (CPS) temelli vitrifikasyon protokolünün, çapraz bulaşma olasılığını ortadan kaldırmak için etkili olduğu kanıtlanmıştır (Lecture-Konirsch ve ark. 2003, Chen ve ark. 2001). Fare embriyolarının

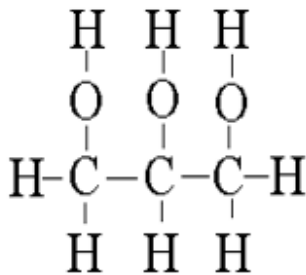
dondurulması üzerindeki çalışmalar gerek insanlarda gerekse hayvanlarda üreme biyoteknolojisinde önemli ilerlemelere destek olmuştur.

Katı yüzey vitrifikasyon tekniğinde (Solid Surface Vitrification, SSV) ise alüminyum folyo ile kaplanmış ve kısmen sıvı azot içerisine batırılmış metal bir cismin üzerine oositleri veya embriyoları içeren 1-2 µl'lik vitrifikasyon solüsyonu damlatılarak donma hızı daha da artırılmış olmaktadır. Bu şekilde, oosit veya embriyoların içerisinde bulunduğu çok küçük vitrifikasyon solüsyonu çok hızlı donar. Halbuki diğer vitrifikasyon yöntemlerinde solüsyonu taşıyan plastik veya cam gibi maddeler soğumayı kısmende olsa yavaşlatmaktadır (Bagis ve ark 2004b).

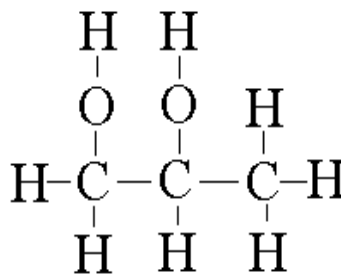
2.4.2.Kriyoprotektan solüsyonlar

Hücre, doku, organ vb. gibi çok sayıda biyolojik materyali uzun süre korumak ve saklamak her zaman zor bir görev olmuştur. Polge ve ark (1949) bu zorluğun aşılması için çok önemli bir keşif yapmışlar, gliserolün spermilerin uzun süre başarılı bir şekilde korunmasında kullanılabileceğini bulmuşlardır. O zamandan beri, pek çok bilim insanı kriyobiyoloji ve onun gelecekteki önemi üzerine daha ileri çalışmalar yapılması gerektiğini düşünmeye başlamıştır. Bu nedenle daha sonra çok daha çeşitlenecek kriyoprotektanlardan biri olan gliserolün keşfi kriyobiyolojide en önemli adım olarak gösterilmektedir.

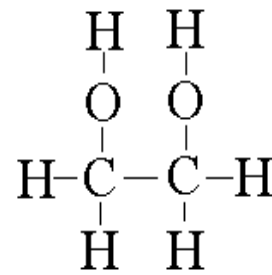
Kriyoprotektan ajanlar (KPA) dokuları ve hücreleri dondurulma sırasında oluşabilecek hasarlardan korumaya yarayan maddelerdir. Genellikle su ve yüksek yağ / su bölmeleri için H-bağlanma yerleri vardır (hücrelere girmeleri gerekir) ve biyomolekülleri stabilize ederler (Şekil 2.3).



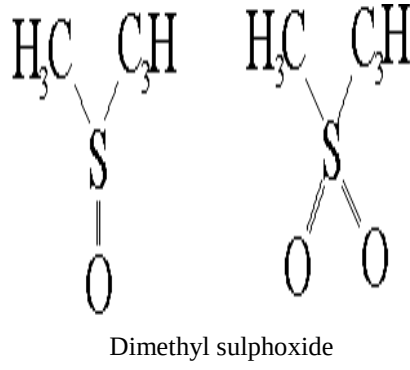
Gliserol



PropanGlikol



EtilenGlikol (EG)



Şekil 2.3. Düşük moleküllü kriyoprotektanların yapıları
(Anonim 2018b)

Kriyoprezarvasyon aşamasında hücrelerin hayatta kalma oranını iyileştirmek için, KPA kullanılır. KPA'ların başlıca görevleri, donma ve erime noktalarını azaltarak, optimum soğutma oranına düşürmektir. Buz bloke ediciler, özellikle çözeltide çekirdeklere bağlanan buzlanma çekirdeğinin oluşmasını önler, soğutma ve ısıtma sırasında buz kristali büyümesini yavaşlatmaktadır. KPA'lar, düşük molekül ağırlıklı ve yüksek molekül ağırlıklı KPA olmak üzere iki farklı gruba ayrılabilir. Gliserol, etilen (propilen) glikol (EG) ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi düşük moleküllü donmadan koruyucu maddeler hücresel membrandan geçerek hücre içine nüfuz etmektedir (McGann 1978, Vandervoort ve ark. 1994, Lehle ve ark. 2005). KPA seçiminde; hücre üzerine olan toksik etkisine dikkat edilmeli, diffüzyon hızı yüksek olan KPA seçilmelidir. En çok kullanılan ve kabul edilen etilen glikol olmakla birlikte kriyoprotektan toksisitesini azaltmak için iki farklı KPA kombinasyonu da kullanılabilir (EG/DMSO).

Buna karşılık, dekstran, hidroksetil ve polivinil-pirolidon ve polivinil alkol gibi yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar genellikle hücrelere girememektedirler. Bunlar hücrelerin dışındaki su/buz geçişlerini bozan polimerler ve şekerlerdir. Optimal kriyojenik dehidrasyona başlamak için kullanılabilirler, toksik etkiyi azaltırlar, çözme işlemleri sırasında osmotik tampon gibi davranarak osmotik şoku engeller, hücre dışı alanda kalarak hücre dehidrasyonuna katkı sağlarlar ve hücre içi buz kristali oluşumunun veya membran stabilizasyonunun minimize edilmesine yardımcı olmaktadır (Takahashi ve ark. 1988, Bakaltcheva ve ark. 2000, Chao ve ark. 1996). Bununla birlikte, çok yüksek moleküllü KPA'ların bile hücrelere girebildiği ve orada

günler veya haftalarca kalabildiği bulunmuştur (Thompson ve ark. 1970, Stander ve ark. 2001). Yine hücre içine giremeyen KPA olarak şeker ve türevleri, bitkilerde ve hayvanlarda doğal kriyoprotektör olarak kullanılmaktadır. Bunlar glikoz, sükroz ve trehaloz gibi şekerlerdir. Hem sükroz hem de trehaloz hücre içine nüfuz etmeyen kriyoprotektanlardır, ancak dehidrasyonu artırarak hücre içi buz oluşumunu azaltmaktadırlar.

Kullanılan şekerin türü ve miktarı, etilen glikol bazlı çözeltilerin fiziksel vitrifikasyon özelliklerini de etkilemektedir (Kuleshova ve ark. 1999a). Böylece, nüfuz eden kriyoprotektan konsantrasyonları düşürülebilirken, çözeltinin vitrifikasyon özellikleri de muhafaza edilmektedir. Bu tür modifikasyonlar, çözeltinin hücrelere toksisitesini azaltma potansiyeline sahip olmalıdır ancak bu çözeltilerin embriyo kriyoprezervasyonu için etkili olup olmadığı da araştırılmalıdır. Eklenebilecek polimer miktarına veya çıkarılabilecek kriyoprotektan miktarına herhangi bir üst sınır bulunup bulunmadığı tam olarak belirlenmemiştir. Bu bağlamda bir çalışmada, fare embriyo kriyoprezervasyonu için optimize edilmiş düşük toksisiteli, proteinsiz, hızlı soğutma çözümleri araştırılmıştır (Kuleshova ve ark. 2001).

Çeşitli çalışmalar kriyoprotektanların buz kristali büyümesini tamamen ortadan kaldırdığını ve embriyoları, soğuma ve çözünme prosedürleri boyunca koruduğunu göstermektedir (Kasai ve ark. 1992, Rall ve Wood 1994, Saha ve ark. 1996). Ancak solüsyonlar yüksek kriyoprotektan konsantrasyonları içerdiğinden embriyolar için toksik etki içermektedirler (Kuleshova ve ark. 2001). Son birkaç yıl boyunca yapılan deneysel çalışmalar kriyoprotektanların dışında, vitrifikasyon çözeltilerine polimerlerin (örn. ficoll) ve şekerlerin (örn. sükroz, trehaloz) dahil edilmesiyle vitrifikasyonun ardından hayatta kalmanın iyileştirildiğini göstermiştir. Bu kapsamda bu yöntem, nüfuz eden kriyoprotektanların konsantrasyonunun azaltılmasına ve daha az toksik vitrifikasyon solüsyonlarının üretilmesine izin vermiştir (Kasai ve ark. 1990, Leibo ve Loskutoff 1993, Saha ve ark. 1996). Bir çalışmada sekiz hücreli aşamada fare embriyolarına, uygun soğutma ve ısınma oranları uygulanarak; %7,5 polivinilpirolidon (PVP) ve 2 M etilen glikol (EG) içeren çözeltilerde hızlı dondurulabildiğini gösterilmiştir (Leibo ve Oda. 1993). Ancak, bu çözümlerde bile kriyoprezervasyon sonrası embriyo gelişimi kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur (Leibo ve Oda 1993). Önceki çalışmalar, fiziksel vitrifikasyon özelliklerini korumak için çözeltilere eklenecek polimer miktarının, kullanılan spesifik polimere göre ayarlanması gerektiğini göstermektedir (Shaw ve ark. 1997).

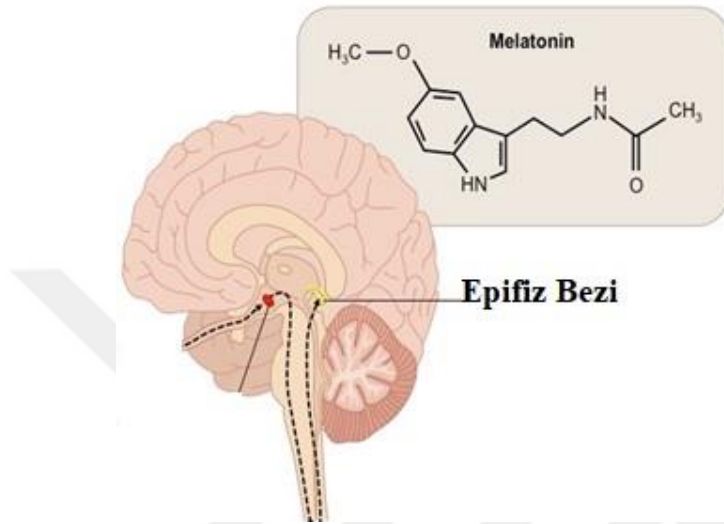
Oksidatif stres, vitrifikasyon işlemi sırasında hayvansal dokuların ölümünde kritik bir faktördür. Spermatogonial kök hücreler ve testis dokuları vitrifikasyon işlemi sırasında çoklu strese maruz kalmaktadır (Gholami ve ark. 2013a, Gholami ve ark. 2013b). Vitrifikasyon süreçleri, hayvan doku yapılarının farklılıkları nedeniyle, türlerden türe optimizasyon gerektirir. DMSO ve etilen glikol bazlı medyumlar; vitrifikasyonun neden olduğu hasarı azaltmada, yeterli olmamıştır. Gliserol kökenli vitrifikasyon ortamının, melatonin ile takviye edilmesinin testiküler doku hasarını azalttığı savunulmuştur (Gholami ve ark. 2015).



2.5.Melatonin

2.5.1 Genel bilgiler

Melatonin, kan beyin bariyerinin dışında yer alan epifiz bezinden (Şekil 2.4) salgılanmaktadır ve endokrin hormonu olarak görev yapmaktadır (Kaur ve ark. 2008).



Şekil 2.4. Melatoninin şematize bulunduğu yer ve yapısı

(Anonim 2018c)

Melatonin ve metabolitleri, antioksidan, antiapoptoz özellikli güçlü serbest radikal önleyicisidir (Tamura ve ark. 2008, Yoo ve ark. 2011). Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin), sirkadiyan ritim regülasyonu, mevsimsel üreme ve sıcaklık regülasyonu gibi hayvanlarda çok sayıda önemli fizyolojik fonksiyonu düzenler (Hoffman ve Reiter 1965, Arendt 1998, Zarazaga ve ark. 2010, Barrett ve Bolborea 2012, Tamura ve ark. 2013). Diğer bilinen süpürücülere kıyasla, lipofilik özelliklerinden dolayı melatonin hidrofobik bir antioksidan olarak düşünülmektedir. (Kucukakin ve ark. 2009). Melatonin, mitokondriyal fonksiyon ve homeostazda, mitokondriyal oksidatif stresin azaltılması ve önlenmesinde koruyucu bir rol oynamakta ve bu da apoptozu düşürmektedir (Rodriguez ve ark. 2007, Ishizuka ve ark. 2000, Kang ve ark. 2009). Melatoninin en önemli görevi, sirkadiyan ritim ile biyoritmi belirlemesidir. Melatonin, çok farklı türlerin (insan, fare, tavşan, inek, domuz, koyun, tavuk ve balık) *in vitro* embriyo kültür gelişimini desteklediği bilinen çok güçlü antioksidan ve antiapoptotik ajandır. Ayrıca melatoninin fetal epigenetik mekanizmalar üzerinde de etkili

olduğu da gösterilmiştir (Yu-Chieh ve ark. 2013, Hoffman 1965, Arendt 1986, Tan ve ark. 1994, Galano ve ark. 2011).

Bir çalışmada melatoninin, apoptozun mitokondriyal yolağının aktivasyonunu önleyerek, sıçanlarda indometazinle indüklenen oksidatif strese ve buna bağlı gastropati'ye karşı koruduğu bildirilmektedir (Pallab ve ark. 2009, Adlam ve ark. 2005, Smith ve ark. 2003).

2.5.2. Melatoninin üreme biyoteknolojisinde kullanımı

Sirkadik ritimlerin üreme sistemi üzerine önemli fizyolojik işlevleri vardır (Brzezinski 1997). Endoplazmik retikulum (ER), protein sentezi, lipid biyosentezi, kalsiyum regülasyonu ile hücrede önemli bir rol oynadığından memeli embriyonik gelişimini etkilemektedir (Sharma ve ark. 2014, Latham 2015, Lin ve ark. 2016). Melatoninin oosit maturasyonu ve embriyo gelişimindeki endoplazmik retikulum gerilimi üzerindeki olası mekanizmalarına odaklanan sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada melatoninin, *in vitro* matürasyon sırasında ER stresine karşı UPR sinyal genlerinin düzenlenmesiyle; domuz oosit olgunlaşma hızını arttırabileceği öne sürülmektedir (Park ve ark. 2017). *In vitro* kültür ortamının, embriyo gelişmesine zarar veren ER streslerinin artmasına yol açabileceği bildirilmiştir (Zhang ve ark. 2012, Lin ve ark. 2016). Böylece melatonin, ER stresini nötralize edebileceği ve buna bağlı olarak embriyonik gelişme kapasite artışına yol açabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte embriyo gelişimi sırasında ER stresi üzerinde bu olası melatonin etkisinin mekanizması daha fazla araştırılması gerektiği vurgulanmıştır (Lin ve ark. 2017).

In vitro oosit olgunlaşması sırasında ROS varlığı; embriyo gelişiminde embriyoda ciddi oksidatif hasara ya da apoptoza neden olarak gelişimi durdurabilmektedir. *In vivo* koşullar altında, foliküler sıvılar ve canlının bünyesindeki sıvılar bazı serbest radikal toplayıcı antioksidanlar içermekte ve oositleri oksidatif strese karşı koruyabilmektedirler (Wang ve ark. 2002). Bununla birlikte, bu antioksidatif ortam *in vivo* kültür koşullarında *in vivo* koşullara göre daha zayıf hale gelir (Nagina ve ark. 2016). *In vitro* kültür koşullarında, oositler veya embriyolar ciddi oksidatif strese maruz kalmaktadırlar. Bu sorunun üstesinden gelmenin en etkili yolu, kültür ortamını antioksidan ajanlarla desteklemektir. Diğer serbest radikal süpürücülere kıyasla, melatonin suda ve lipidlerde çözünürlüğü nedeniyle en çok tercih edilen ajan olarak kabul edilir (Hardeland 2005, Do ve ark. 2015).

Oositlerin kriyoprezervasyonunun oositlerin apoptoz oranını ve gelişimsel potansiyellerini azalttığı bildirilmiştir (Hwang ve ark. 2013, Morato ve ark. 2010, Vallorani ve ark. 2012, Zhao ve ark. 2016). Melatoninin vitrifiye oositler üzerindeki gözlenen yararlı etkileri, apoptoz, ROS seviyesi ve DNA fragmentasyonunu inhibe etme yeteneğine bağlanmaktadır (Zhao ve ark. 2016).

Memeli üreme biyoteknoloji alanında farklı türler üzerinde melatonin ile ilgili çeşitli araştırmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda fare, sığır, koyun ve domuz embriyolarında melatonin ilavesinin antioksidan etkisiyle embriyo gelişimini desteklediği, apoptoz ve ROS düzeyini azalttığı gösterilmiştir (Shi ve ark. 2009, Abecia ve ark. 2002, Gao ve ark. 2012, Succu ve ark. 2014, Kang ve ark. 2009, Li ve ark. 2015).

Ishizuka ve ark. (2000), melatonin ilaveli *in vitro* kültür medyumlarının fare embriyo gelişimini desteklediğini rapor etmişlerdir. Glutatyon (GSH), hücreleri zehirli maddelerden ve ROS'dan koruyan büyük bir hücre içi serbest tiyol grubudur (Ozawa ve ark. 2006, Salmen ve ark. 2005). Preimplantasyon embriyolarının GSH oksitleyici ajana maruz kalmasının intrasellüler GSH düzeylerini düşürdüğü ve blastosiste gelişimi durdurduğu, buna karşın melatoninin GSH düzeyini artırarak vitrifiye 2 hücreli IVF fare embriyolarının blastosist evresine gelişimini desteklediği bildirilmiştir (Salmen ve ark. 2005).

Gao ve ark (2012), melatoninin vitrifiye 2-hücreli fare embriyolarının gelişimine olan etkisini araştırmışlar ve potansiyel mekanizmaları incelemişlerdir. Çalışmada iki hücreli fare embriyoları, açık uçlu pipet (OPS) yöntemi ile vitrifiye edilmiş, daha sonra embriyolar çözölmüş ve farklı konsantrasyonlarda (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M) melatonin kültür ortamına eklenmiştir. Melatonin, ROS üretimini önemli derecede bastırdığı ve vitrifiye embriyoların gelişimini, tedavi edilmemişlere kıyasla yükselttiği saptanmıştır. Ortama 10^{-11} M melatonin ilave edildiğinde, blastosist oranının, blastosistin hücre sayısının önemli ölçüde arttığı, bunlara ek olarak, blastosistlerdeki apoptoz hızının ve blastosistin ortalama apoptotik hücre sayılarını içeren apoptotik indeksin, muamele edilmemiş numunelere kıyasla yarıya düştüğü belirlenmiştir.

Mevcut verilere dayanarak, melatoninin güçlü serbest radikal temizleme ve antioksidan kapasitesinin, vitrifiye edilmiş 2 hücreli embriyoların gelişimi üzerinde koruyucu etkileri

olduğu öne sürülmüştür. Bununla birlikte, melatoninin en yüksek dozunun (10^{-3} M) aslında embriyolar için zararlı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmalar melatoninin vitrifiye 2 hücreli fare embriyolarına faydalı etkilerinin melatonin reseptöründen (MT1 ve MT2) bağımsız olduğunu göstermiştir. Melatoninin doğrudan serbest radikal aktivitesi, endojen glutasyon düzeylerini artırılması ve antiapoptotik kapasitesi, vitrifiye embriyonik gelişim üzerindeki koruyucu etkileri olarak açıklanmıştır. Vitrifiye edilmiş ve çözünmüş iki hücreli fare embriyolarının kültür ortamına melatonin (10^{-9} M) ilavesi artmış hücre içi glutasyon seviyeleri ve azaltılmış ROS üretimi ile sonuçlanmıştır. Bu değişiklikler, blastosistlerin ortalama apoptotik hücre sayılarında azalmaya neden olmuştur. Çalışmalar, vitrifikasyon sonrasında glutasyon (GSH) düzeyinin düştüğünü ve melatoninin eklenmesinin GSH düzeylerini arttırdığını göstermiştir (Gao ve ark. 2012).

Melatoninin antioksidan ve antiapoptotik etkileri değerlendirmek, *in vitro* (IVF) ortamda fertilize edilmiş ve vitrifiye edilmiş 2 hücreli fare embriyolarının gelişimine olan etkisini araştırmak için yapılan bir çalışmada; embriyolar farklı konsantrasyonlarda melatonin ile (10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} M) ve melatonin olmaksızın KSOM medyumunda kültüre edilmiştir. Melatoninin antioksidan ve antiapoptotik etkileri araştırıldığı çalışmanın sonucunda; 10^{-9} , 10^{-12} M gruplarındaki GSH'nin hücre içi düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede iyileştiği, embriyolarının blastosist evreye gelişiminin kontrole göre daha yüksek olduğu, apoptotik hücrelerin sayısının önemli ölçüde azaldığı, melatoninin 10^{-9} M konsantrasyonunun blastosistlerin toplam iç hücre kitlesi ve trofektoderm hücre sayılarında artışa neden olduğu gösterilmiştir (Dehghani-Mohammadabadi ve ark. 2014).

Benzer şekilde *in vitro* 2 hücreli fare embriyolarının melatoninle kültüre edilmesinin toplam hücre sayılarını ve blastosist oluşum hızını arttırdığı, gözlemlenmiştir (Tian ve ark. 2010).

Ayrıca, embriyo kültür ortamına melatoninin eklenmesi, partenogenetik embriyoların embriyonik gelişimini desteklemiş ve 4-hücreli embriyolardaki ROS seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır (Nakano ve ark. 2012).

Melatonin, fare embriyolarının *in vitro* gelişimini ve ilave olarak buradan gelişen embriyoların transferi sonrası implantasyon oranlarını arttırmıştır (Asgari ve ark. 2012, Bahadori ve ark. 2013).

Bir başka çalışmada da *in vitro* ortamda melatonin ilavesi blastosistlerde artmış hücre sayısı ve yüksek embriyonik gelişim ile sonuçlanmıştır. Melatonin sadece blastosist oluşum oranlarını arttırmakla kalmamış, aynı zamanda kriyopreservasyon sonrası embriyo gelişim kalitesini ve gelişime bağlı gen ekspresyonunu olumlu olarak desteklediği rapor edilmiştir (Wang ve ark. 2014).

Somatik nükleer transfer yapılmış fare embriyolarının kültürlerine melatonin eklenmesi, blastosist formasyonunda ciddi artışa sebep olduğu bildirilmiştir (Salehi ve ark. 2014).

Bir başka çalışmada tavşan embriyolarının preimplantasyon gelişimi sırasında *in vitro* kültür veya vitrifikasyonun neden olduğu oksidatif stresin zararlı etkilerinden korunmasında melatoninin rolü araştırılmıştır. Vitrikiye embriyolardaki blastosist gelişim oranları kontrol grubunda %69 iken melatonin ile vitrikiye grubunda %81 olarak bulunmuştur (Mehaisen ve Saeed 2015).

In vitro kültür ortamına ilave edilen melatonin, IVF sığır embriyolarının blastosist aşamasına kadar kriyotolerans geliştirmesine destek olarak önemli ölçüde blastosist oranını arttırmıştır. Aynı zamanda yüksek kriyotolerans ile indüklenen embriyoların kalitesini ve gelişime bağlı genlerin yukarı regüle ekspresyon seviyelerini de iyileştirmiştir (Wang ve ark. 2014, Lin ve ark. 2017). Nakano ve ark. (2012) kültür ortamına melatonin ilavesinin, somatik hücre nükleer transfer (SCNT) embriyolarının gelişim oranını arttırmamasına rağmen, klon embriyolarında ROS oluşumunu önemli ölçüde azalttığını tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise *in vitro* kültür ortamında 10^{-6} M konsantrasyonda melatonin ilavesinin oksidatif stresi azalttığı, fertilizasyonu desteklediği ve *in vitro* fertilizasyonda (IVF) erken embriyo gelişiminin desteklediği tespit edilmiştir (Succu ve ark. 2014). Sığır oositlerinde, maturasyon medyumuna melatonin takviyesi oosit olgunlaşması ve kumulus hücresi gelişimi ile ilişkili genlerin ekspresyonlarını önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir (Tian ve ark. 2014). Sığır oositlerinin maturasyon aşamasında ve vitrifikasyon solüsyonuna melatoninin ilavesinin apoptoz ve ROS düzeyini azalttığı ve *in vitro* gelişim kapasitelerini desteklediği tespit edilmiştir (Zhao ve ark. 2016). Sığır oositlerinin maturasyon ortamında melatoninin takviyesi oosit olgunlaşma oranını ve sığırlarda kumulus hücresi genişlemesini desteklemiştir (El-Raey ve ark. 2011a, 2011b). Başka bir çalışmada tanımlanan bir ortamda IVM sırasında melatonin takviyesinin sığır oositinin nükleer olgunlaşmasını tam olarak iyileştiremediğini, muhtemelen

serum, foliküler sıvıdaki veya başka ortamlardaki diğer hormonların melatonin fonksiyonunu etkileyebileceğini bildirmişlerdir. Sığırlarda, IVM ortamında melatonin takviyesi, kumulus hücrelerini nükleer parçalanmadan korur, antioksidan enzimlerin ekspresyon seviyelerini artırır ve oositlerde ROS oluşumunu azaltmıştır (Rodrigues-Cunha ve ark. 2016). Bir başka çalışmada ise farklı yüksek oksijen konsantrasyonu altında melatonin uygulaması da *in vitro* sığır embriyo gelişiminin desteklendiği bildirilmiştir (Papis ve ark. 2007). Manda oositlerinin, *in vitro* olgunlaşma sırasında melatonin takviyesi, oksidatif stres ve DNA hasarını azaltarak oosit olgunlaşma oranını da arttırmıştır (Manjunatha ve ark. 2009).

Domuzun (Shi ve ark. 2009) veya sığırın (Tian ve ark. 2014) foliküler sıvılarında melatonin yüksek seviyelerde tespit edilmiş bu da melatoninin *in vivo* oosit matürasyonunu etkileyebileceğini düşündürmüştür. Domuzda, *in vitro* matürasyon (IVM) ve *in vitro* kültür (IVC) ortamı sırasında melatoninin takviyesi matürasyon oranını önemli ölçüde arttırmış (Kang ve ark. 2009), reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumu azaltmış ve apoptozu inhibe etmiş (Kang ve ark. 2009, Nakano ve ark. 2012, Li ve ark. 2015) ve embriyonik gelişimini desteklediği saptanmıştır (Shi ve ark. 2009, Do ve ark. 2015). Shi ve ark. (2009) domuz oositlerinde, melatonin (10^{-9} M) ilavesinin oositlerin maturasyonunu ve aynı zamanda partonogenetik blastosist gelişimini desteklediğini rapor etmişlerdir. Kang ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada domuzda melatoninli oosit maturasyon ortamının oositlerin nükleer ve sitoplazmik olgunlaşması üzerinde faydalı etkileri olduğunu ve böylece daha sonraki embriyonik gelişime de destek olduğunu belirtmişlerdir. Melatonin, domuz oosit olgunlaşması ve embriyonik gelişim sırasında histon asetilasyonu ve otofajiyi etkileyebilir (Chen ve ark. 2017).

Resveratrol ve melatoninin, domuz oositlerini ısı stresinden korumak üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada; melatonin, ısı stresinde oosit maturasyonu sırasında tek başına resveratrol'den daha güçlü bir koruyucu aktivite sergilediği saptanmıştır (Li ve ark. 2015). Nakano ve ark. (2012) kültür ortamına melatonin takviyesinin, somatik hücre nükleer transfer (SCNT) embriyolarının gelişim oranını arttırmamasına rağmen, SCNT embriyolarında ROS oluşumunu önemli ölçüde azalttığını, bunun da melatoninin embriyo kültürü üzerindeki yararlı etkisini gösterdiğini bildirmişlerdir. Domuzlarda, *in vitro* kültür sırasında melatonin takviyesi (Kang ve ark. 2009, El-Raey ve ark. 2011a, Zhao ve ark. 2015) artmış GSH seviyesi ve azalmış ROS seviyesi ile sonuçlanmıştır (Li ve ark. 2015). Domuzda, *in vitro* matürasyon (IVM) ve *in vitro* kültür (IVC) ortamı sırasında melatoninin takviyesi matürasyon oranını önemli ölçüde arttırmış (Kang ve ark. 2009), ROS oluşumu azaltmış, apoptozu inhibe etmiş (Kang ve ark.

2009, Nakano ve ark. 2012, Li ve ark. 2015) ve embriyonik gelişimini desteklediği saptanmıştır (Shi ve ark. 2009, Do ve ark. 2015). *In vitro* domuz kültürlerinde melatonin varlığı, partenogenetik embriyoların ROS hasarını azaltarak, apoptotik hızında anlamlı bir azalma ile birlikte blastosist oranlarını, blastosist toplam hücre sayısını (Nakano ve ark. 2012) ve gelişimsel yeterliliği arttırmıştır (Choi ve ark. 2008).

Koyun embriyoları vitrifikasyon sonrası çözölmüş melatonin ilavesinin embriyonal gelişimi desteklediği bildirilmiştir (Abecia ve ark. 2002). Keçide yapılan bir çalışmada *in vitro* olarak melatonin kullanımının, bölünme oranlarını, toplam hücre sayısını ve blastosit gelişimini desteklediği bildirilmiştir (Berlinguer ve ark. 2009).

DNA metilasyonu, gen ifadesinde kritik olarak yer alan epigenetik mekanizmalardan biridir. Bu fenomene DNA metil-transferazlar aracılık eder ve oositlerin *in vitro* matürasyonu (IVM) dahil olmak üzere çevresel strese etkilenir. Melatonin, bir antioksidan olarak, reaktif oksijen türlerinin azaltılması yoluyla teorik olarak epigenetik düzenlemeye katılabilir. Bir grup araştırmacı farklı konsantrasyonlarda melatonin ile keçi oositlerinin tedavisinden sonra DNA metilasyonunu ve gelişimini araştırmıştır. Kumulus hücresi ile birlikte gelen düzgün biçimli, sitoplazmalı oositler seçilmiş ve 10^{-6} M, 10^{-9} M, 10^{-12} M ve 0 M farklı konsantrasyonlarda melatonin ile olgunlaştırmaları için kültüre edilmiştir. Her bir deney grubunda nükleus durumu, glutatyon içeriği ve oositlerin gelişimsel yeterliliği değerlendirilmiş, DNA metiltransferaz 1 (DNMT1), DNA metiltransferaz 3b (DNMT3b) ve DNA metiltransferaz 3a (DNMT3a) dahil olmak üzere DNA metilasyonu ile ilişkili genlerin ifadesi, kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile değerlendirilmiştir. M-II evresine ulaşan oositlerin yüzdesi 10^{-12} M grubunda belirgin olarak artmışken, melatonin ile tedavi edilen oositlerde önemli bir glutatyon artışı gözlenmiştir. Blastosist oluşumunun analizi, oositlerin gelişimsel yetkinliğinin kontrol grubundan daha yüksek olduğunu ortaya çıkarmış, melatonin tedavisinin DNA metil-transferazların (DNMT) ekspresyon düzeylerini ve global DNA metilasyonunu azalttığı görölmüş, melatoninin reseptörü 1A (MTNR1A) ekspresyonu hem oositte hem de kumulus hücrelerinde tespit edilmiştir ($P < 0.05$). Çalışmada melatoninin, DNA metilasyon mekanizmasını etkilediğini ve oositlerin gelişimsel yetkinliğinde bir gelişmeye yol açtığını göstermiştir (Saeedabadi ve ark. 2018).

In vitro üretilen blastosistler koyun oviduktlarına implante edilmişlerse, donma ve çözülme sırasında hayatta kalabilmek için daha yüksek potansiyele sahiptirler. Bununla birlikte, eğer bu blastosistler, sentetik ovidukt sıvısı gibi serum destekli ortamlarda kültüre edildiyse, düşük kriyotolerans sergilemişlerdir (Thompson 1996). İyileşen blastosist kalitesinin, transplantasyon sonrası gebelik oranını önemli ölçüde artırdığı ve daha sağlıklı bir yavruya yol açtığı (Sandra ve ark. 2011, Assou ve ark. 2010) ve *in vitro* kültür koşullarının da embriyonun gen ekspresyonunu değiştirebileceği iyi bir şekilde belgelenmiştir (Rizos ve ark. 2002, Doherty ve ark. 2000, Minami ve ark. 2001). *In vitro* üretilen embriyoda melatoninin kompleks yapısının, embriyo gelişimi üzerinde yetkinliğinin (bölünme, 8-hücre ve blastosist oranları) ve ilgili gen ekspresyonu ile kriyotoleransının araştırıldığı bazı çalışmalarda, embriyo kalitesi ve yaşayabilirliğinin esas olarak IVF'yi takiben kültür sistemi tarafından etkilendiği ortaya çıkarılmıştır (Rizos ve ark. 2002, Galli ve ark. 2001). Bir başka çalışmada ise *in vitro* kültür ortamında 10^{-6} M konsantrasyonda melatonin tedavisinin oksidatif stresi azalttığı, fertilizasyonu desteklediği ve *in vitro* fertilizasyonda (IVF) erken embriyo gelişimini desteklediği tespit edilmiştir (Succu ve ark. 2014).

Farklı konsantrasyonlarda melatoninin içeren kriyoprotektan medyumları ile vitrifiye edilen, çözülen seminifer tübüllerin histolojik yapısı üzerine melatonin antioksidan etkileri araştırılmıştır. Çalışmada 6 günlük BALB/c erkek fare yavrularının testis dokuları; melatonin ve melatoninden bağımsız farklı vitrifikasyon ortamları ile vitrifiye edildikten sonra çözülmüş ve testisler hematoksilin-eozin ile boyanarak seminifer tübüllerin histolojik yapısı incelenmiştir. Sonuç olarak gliserin bazlı ortamlara eklendiğinde antioksidan özelliklerinden dolayı melatoninin donma-çözülme sürecinin zararlı etkilerini azalttığı ve seminifer tübüllerin histolojik yapısını oksidatif hasardan koruduğu saptanmıştır (Gholami ve ark. 2015).

2.5.3.Fare embriyosu ve melatonin

Melatonin vitrifiye embriyoların gelişiminde ya bir antioksidan olarak veya reseptör aracılı mekanizmalar yoluyla spesifik etkilere sahip olabilmektedir. Bir çalışmada, melatoninin vitrifiye 2-hücreli fare embriyoların gelişimine olan etkisi araştırılmış ve potansiyel mekanizmaları incelenmiştir. İki hücreli fare embriyoları, açık uçlu pipet (OPS) yöntemi ile vitrifiye edilmiştir. Vitrifiye edilmiş embriyolar çözülmüş ve farklı konsantrasyonlarda (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M) melatonin kültür ortamına eklenmiştir. Melatonin, ROS üretimini

önemli derecede bastırıldığı ve vitrifiye embriyoların embriyonik gelişimini, tedavi edilmemişlere kıyasla yükselttiği saptanmıştır. Melatonin 10^{-11} M ilave edildiğinde, blastosist oranının, blastosistin hücre sayısının önemli ölçüde arttığı, bunlara ek olarak, blastosistlerdeki apoptoz hızının ve blastosistin ortalama apoptotik hücre sayılarını içeren apoptotik indeksin, muamele edilmemiş numunelere kıyasla yarıya düştüğü belirlenmiştir (Gao ve ark. 2012).

Vitrifiye edilmiş ve çözünmüş iki hücreli fare embriyolarının kültür ortamına melatonin (10^{-9} M) ilavesi artmış hücre içi glutasyon seviyeleri ve azaltılmış ROS üretimi ile sonuçlanmıştır. Bu değişiklikler, blastosistlerin ortalama apoptotik hücre sayılarında azalmaya neden olmuştur (Gao ve ark. 2012). Bu nedenle embriyoların DNA ve protein sentezinin yeniden başlatılmasını tamamlamak için yüksek metabolizma aktivitesine ihtiyaç duydukları, çözünme ve kültüre alınma sırasında melatonin takviyesinin embriyonun ROS detoksifikasyonunu kolaylaştırabileceği savunulmuştur (Leoni ve ark. 2003). Bu eylem, kriyoprezervasyonda *in vitro* üretilen embriyoların düşük kriyotoleransı göz önüne alındığında özellikle etkilidir.

Gametlerin ve embriyoların *in vitro* ortamda manipüle edilmesi, bu hücrelerin ROS'un suprafizyolojik düzeylerine maruz kalma riskini arttırmaktadır. Embriyolar, oksidatif fosforilasyon, nikotin amid adenin dinükleotid fosfat oksidaz ve ksantinoksidaz sistemleri gibi çeşitli yollarla ROS üretirler (Guerin ve ark. 2001). *In vivo* ile karşılaştırıldığında ROS üretiminin, *in vitro* ortamda kültüre edilen embriyolarda arttığı dikkati çekmektedir (Goto ve ark. 1993). Sonuç olarak ROS, *in vitro* memeli embriyolarının gelişim bozukluğunda rol oynamaktadır (Nasr-Esfahani ve ark. 1990, Kitagawa ve ark. 2004). Güçlü bir antioksidan olan melatonin ilavesi, çözünme sonrası embriyo kültürü ortamının toplam antioksidan kapasitesini sadece en yüksek konsantrasyonda (10^{-3} M) önemli ölçüde arttırdığı tespit edilmiştir. Öte yandan, bu yüksek seviyenin, blastosistin yetersiz genişlemesi, zona pellusidadan çıkma hızının düşmesi, düşük toplam hücre sayısı, daha düşük hücre içi ATP konsantrasyonu ve daha yüksek apoptotik ve oksidatif indeks ile, embriyo canlılığı ve metabolik durumu üzerinde olumsuz bir etkiye sahiptir. *In vitro* embriyo kültürü sırasında yüksek dozda melatonin (10^{-3} M) neden olduğu zararlı etki başka makalelerce de desteklenmiştir (Gao ve ark. 2012, Cebrian ve ark. 2013, Shi ve ark. 2009, Rodriguez ve ark. 2007).

Vitrifikasyonun yüksek başarı oranı için, EG ve DMSO gibi kriyoprotektanların varlığı embriyo stres maruziyeti süresini en aza indirmektedir. Bunlar ozmotik stresi azaltır ve buz

kristallerinin oluşmasını engeller (Tsang ve Chow 2009). İşlem sırasında ROS oluşumu ana problemdir (Matsuzuka ve ark. 2005). Buna ek olarak ROS, mitokondriye bağımlı apoptotik cevabı indüklemektedir (Juknat ve ark. 2005). Oksidatif strese yanıt olarak pro-apoptotik (Bax, Bak, Bad) ve antiapoptotik (Bcl-2, Bclw, Bcl-xl) mitokondriyal proteinlerin fonksiyonel dengesinin değişimi sonunda sonuçta apoptoza yol açmaktadır (Maity ve ark. 2009).

Normal koşullar altında, embriyolar ROS'a karşı savunma kapasitesine sahiptir, ancak embriyoların vitrifikasyonunu takiben bu destek azalabilir (Ali ve ark. 2003). ROS'dan korunması için preimplantasyon embriyolarının kültür ortamına antioksidan ilavesi üzerinde durulmalıdır (Lane ve ark 2002). Diğer bilinen süpürücülere kıyasla, lipofilik özelliklerinden dolayı melatonin hidrofobik bir antioksidan olarak düşünülür. Bu özellik morfofizyolojik bariyerleri reseptörsüz veya belirli bir yere kolayca geçirmeyi sağlar (Kucukakın ve ark. 2009).

Özellikle melatonin, mitokondriyal fonksiyon ve homeostazda, mitokondriyal oksidatif stresin azaltılması ve önlenmesinde koruyucu bir rol oynar ve bu da apoptoz yüzdesini düşürür (Rodriguez ve ark. 2007, Ishizuka ve ark. 2000, Kang ve ark. 2009). Melatonin, farklı hücreleri güçlü topalayıcı etkilerle korurken, melatonin membran reseptörleri [MT1 (Mtnr1a), MT2 (Mtnr1b) ve MT3] hücre korumasında önemli bir rol oynamaktadır (Espino ve ark. 2011). Melatoninin antioksidan ve antiapoptotik etkileri değerlendirmek, *in vitro* (IVF) ortamda fertile edilmiş ve vitrifiye edilmiş 2 hücreli fare embriyolarının gelişimine olan etkisini araştırmak için bir çalışmada; farklı konsantrasyonlarda melatonin ile (10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} M) ve melatonin olmaksızın KSOM medyumunda kültürlenmiştir (Dehghani-Mohammadabadi ve ark. 2014). Önceki çalışmalarda, vitrifikasyon sonrasında GSH düzeyinin düştüğünü ve melatoninin eklenmesinin GSH düzeylerini arttırdığını gösterilmiştir (Gao ve ark. 2012). Melatoninin antioksidan ve antiapoptotik etkileri araştırıldığı çalışmanın sonucunda; 10^{-9} , 10^{-12} M gruplarındaki GSH'nin hücre içi düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede iyileştiğini gösterilmiştir (Dehghani-Mohammadabadi ve ark. 2014). Önceki çalışmalarda, vitrifikasyon sonrasında GSH düzeyinin düştüğü ve melatoninin eklenmesinin GSH düzeylerini arttırdığı tespit edilmiştir (Gao ve ark. 2012).

GSH düzeylerindeki artışın preimplantasyon embriyo gelişimini iyileştirdiği gösterilmiştir (Ozawa ve ark. 2006). Ayrıca preimplantasyon embriyolarının GSH oksitleyici ajana maruz kalması intrasellüler GSH düzeylerini düşürür ve blastosiste gelişimi durdurur. Melatonin GSH düzeyini artırır ve vitrifiye 2 hücreli IVF fare embriyolarının blastosist evreye

gelişimini destekler (Salmen ve ark. 2005). Önceki çalışmalarda da embriyo gelişimi üzerine melatoninin faydalı etkileri gösterilmiştir (Ishizuka ve ark. 2000, Kang ve ark. 2009, Tian ve ark. 2010, Abecia ve ark. 2002, Liu ve ark. 2012, Papis ve ark. 2007).

Bax ve Bcl-xl ekspresyonu melatonin tarafından düzenlenmesine rağmen birçok çalışma melatoninin Bax'ın üzerindeki baskılayıcı ve Bcl-xl'in üzerindeki arttırıcı etkilerini belgelemektedir (Choi ve ark. 2008, Jang ve ark. 2010). Bcl-2 ve diğer antiapoptotik üyeler (Bcl-2, Bcl-w, Bclxl) proapoptotik protein Bax işlevsel olarak inhibe ederek apoptozu önler. Ölüm sinyalleri, sitokrom c'nin salınması, apoptozom kompleksi oluşumu, prokapaz aktivasyonu ve apoptoz basamakları ile mitokondriyel membran geçirgenliğinde değişikliğe neden olur (Choi ve ark. 2008, Jang ve ark. 2005). Melatoninin kaspaz-3 ve Bax'ın ekspresyon düzeylerini azalttığı, buna karşılık Bcl-2'nin ekspresyon düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir (Jang ve ark. 2005). Güçlü bir antioksidan olan melatoninin toksik hidroksil radikallerini ortadan kaldırdığı ve nöronların hayatta kalmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Wang ve ark. 2006).

Bir başka grup melatoninin, kriyoprezervasyon sonrası MII oositlerinin gelişim potansiyeline etkisini araştırdıkları bir çalışmada; fare MII oositleri açık uçlu pipet (open-pulled straws - OPS) yöntemi ile vitrifiye edildikten sonra çözünme sonrası 2 saat melatonin ile kültüre ederek partenogenetik aktivasyonun (PA) ardından embriyoların *in vitro* kültüre sonuçlarını incelenmişlerdir. Taze oositler kontrol olarak kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda melatonin (0 , 10^{-9} , 10^{-6} mol / L) her iki aşamada ortamlara eklenmiştir. Melatonin her iki aşamada kullanıldığında, 10^{-9} mol / L melatonin ile tedavi edilen grup, kontrol ile karşılaştırıldığında, benzer oranlarda bölünme ve 4-hücreli embriyo gelişimi göstermişken, bu oranların melatonin içermeyen gruba göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Melatonin içermeyen veya 10^{-6} mol / L melatonin ile tedavi edilen grupların partenogenetik skoru kontrol grubundan anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Oosit vitrifikasyonu sonrasında ısınması ve partenogenetik aktivasyonu sonrası ROS seviyeleri anlamlı olarak artmış ve maternal-zigotik geçiş (MZT) ile ilişkili genlerin (Dcp1a, Dcp2, Hspa1a, Eif1ax, Pou5f1, Sox2) ekspresyonu anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte, 10^{-9} mol / L melatonin takviyesi sonrasında, ROS seviyeleri melatonin içermeyen grupla karşılaştırıldığında anlamlı olarak azaldığı gen ifadeleri kontrol grubuna göre neredeyse düzeldiği saptanmış, bu konsantrasyonun vitrifiye fare MII oositlerinin gelişme potansiyelini arttırabileceği sonucuna varılmıştır (Zhang ve ark. 2016).

3.MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1.Materyal

Bu yüksek lisans tezi kapsamında, 6-8 haftalık 18 adet dişi B6CBAF1/J (C57BL/6JxCBA/J) ırk fare kullanılmıştır. Bu fareler daha önce çiftleştirilmemiş erişkin fertiller arasından seçilmiştir.

Tüm hayvanların bakımı bireysel havalandırmalı hepafiltreli kafeslerde (IVC) yapılmış ve günlük sağlık kontrolleri veteriner hekim tarafından gerçekleştirilmiştir. Kafes sistemlerinin bulunduğu odalar, ışıklandırma 330 lüks seviyesinde ve 12 aydınlık/12 saat karanlık ışık döngüsüdür. Oda içi iklimlendirme koşulları, sıcaklık 20-24°C ve nisbi nem %45-65 şeklindedir.

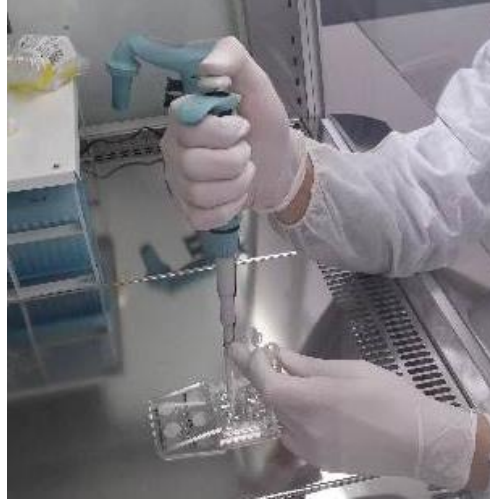
Bu araştırmanın, Koç Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (KU-HADYЕК) tarafından verilen, 2017.HADYЕК.018 numaralı etik kurul onayı mevcuttur. Bu tez araştırmasında kullanılan deney hayvanları, Koç Üniversitesi, Translasyonel Tıp Araştırma Merkezi (KUTTAM), Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilmiş ve embriyo deneyleri Embriyo Manipulasyon Laboratuvarında yapılmıştır.

3.2.Yöntem

3.2.1.Medyumların hazırlığı

3.2.1.1.Yıkama medyumunun hazırlanması

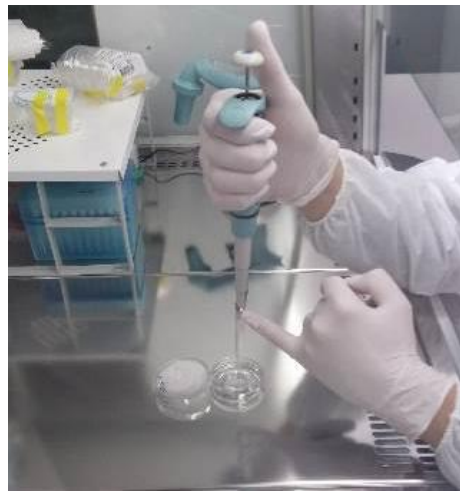
Hepafiltreli çalışma kabini embriyo eldesi ve *in vitro* ortamda yapılan manipulasyonlar sırasında kullanılmak üzere deney günü steril olacak şekilde hazırlanmıştır. Dış ortam embriyo manipulasyonlarında CO₂ gereksinim duymayan HEPES tamponlu GLOBAL W/HEPES ticari medyum kullanılmıştır. Protein ilavesi olarak 3 mg/ml BSA (SIGMA A3311) eklenmiştir. Medyum BSA'nın çözünmesinden sonra, 5 ml'lik enjektör ucuna yerleştirilmiş 0,22 µm'lik milliporluk filtreden geçirilmiştir (Şekil 3.1). Hazırlanan HEPES tamponlu medyum, 37 °C ayarlı ısıtıcı yüzeyde 10 dakika deneyde kullanılana kadar bekletilmiştir.



Şekil 3.1. Yıkama medyumunun hazırlanması

3.2.1.2.Sekiz hücreli embriyo eldesi için kültür medyumunu hazırlanması

Embriyo kültür medyumunu olarak KSOM (GlobalStem) kullanılmıştır. Hazırlıklar embriyo eldesinden 12-16 saat öncesi başlanmıştır. Oligotlara ayrılmış olarak +4 °C buzdolabında bulunan embriyo kültür medyumuna protein desteği olarak 4 mg/ml BSA (SIGMA 3311) eklendikten sonra 5 ml'lik plastik pistonsuz enjektör ucuna takılmış 0,22 µm'lik milliporluk filtreden geçirilmiştir. Filtrelenen embriyo kültür medyumunu otomatik pipet yardımı ile 35 mm (falcon grainer)'lik embriyo kültür petrisi yüzeyine 10 µl'lik damlalar halinde dağıtılmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Embriyo kültür medyumunun hazırlanması

Kontamine olmasını ve buharlaşmasını önlemek amacıyla damla olarak hazırlanan embriyo kültür medyumları, üzeri 2,5 ml mineral yağ (Lifeguard-Life Global) ile kaplanmış ve %5 CO₂ ve 37°C ısı olan inkübatöre gazlanması için kaldırılmıştır.

3.2.1.3. Vitriyifiye embriyoların çözüm sonrası kültürü için medyum hazırlığı

Katı yüzey vitrifikasyonu işleminden 12-16 saat öncesi embriyo kültürü hazırlığı başlamaktadır. Melatonin içermeyen ve içeren olmak üzere iki farklı medyum hazırlanmıştır.

Melatonin içermeyen medyum: Embriyo kültür medyumuna (KSOM medyum) 4 mg/ml BSA (Sigma A3311) ilave edilmiştir.

Melatonin içeren medyum: Embriyo kültür medyumuna (KSOM medyum) 4 mg/ml BSA (Sigma A3311) ve 10⁻¹² M Melatonin (M5250 Sigma) ilave edilmiştir.

Hazırlanan medyumlar 5 ml enjektör ucuna yerleştirilmiş 0,22 µm'lik milliporluk filtrede filtre edildi. Filtre edilen embriyo kültür medyumunu otomatik pipet yardımı ile 35 mm (Falcon 353001)'lik embriyo kültür petrisi yüzeyinde 10 µl'lik damlalar halinde petri zeminine dağıtıldı ve üzeri mineral yağı ile kaplanmış %5 CO₂ ve 37°C ısıda olan inkübatöre gazlanması için kaldırılmıştır.

3.2.2. Ağız pipeti kapilleri hazırlığı

Embriyoların toplanması ve medyumlar arası aktarımları için; ağız pipet hortumuna bağlı 50 µl lik kapiller pipetler kullanılmıştır. Kapiller cam pipetlerin bir gaz ocağı üstünde orta bölgeleri yumuşayana kadar ısıtılmış ve cam pipet alev kaynağından uzaklaştırılarak yumuşayan orta bölge pipetin zıt uçlarından çekilerek inceltilmiş, uzayan bölge (≈150 µm çapta) ortasından bir cam taşı yardımıyla kesilmiştir. Kullanımdan önce dikey akışlı güvenlik kabini içinde, sterilizasyon için UV'ye maruz bırakılmıştır. Ağız pipetinin hortum kısmına

takılmadan önce, mikroskop altında cam taşı ile düz ağızlı olarak kesilerek embriyo manipülasyonu için hazırlanmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Ağız pipeti kapilleri hazırlığı

3.2.3. Ovidukt eldesi için operasyon odasının hazırlığı

Ovidukt eldesi için operasyon odasında cerrahi alan kullanılmıştır. Bu cerrahi alan, steril cerrahi set (3 adet mikro uçlu cerrahi pens, 3 adet cerrahi makas ve 1 adet göz cerrahi), soğuk ışık kaynağı ve 37°C'lik ısıtıcı yüzey olarak hazırlanmıştır (Şekil 3.4). Embriyo elde öncesi tüm operasyon masası yüzeyi temizlenmiş ve tek kullanımlık cerrahi örtü serilmiştir.



Şekil 3.4. Operasyon odasının hazırlığı

3.3. Süperovulasyon ve Embriyo Eldesi

Protokolün uygulandığı gün, 6-8 haftalık B6CBAF1/J (C57BL/6JxCBA/J) dişi farelere saat 13:00'da 10 IU (birey başı $\cong$ 200 μ l) gebe kısarak serum gonadotropin hormonu (SIGMA G4877-PMSG) intraperitoneal (IP) enjeksiyon olarak uygulanmıştır. Enjeksiyondan 48 saat sonra 13:00'da 10 IU (birey başı $\cong$ 200 μ l) insan koriyonik gonadotropini (SIGMA C8554-hCG) intraperitoneal (IP) enjeksiyon olarak uygulanmıştır (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. İntraperitoneal enjeksiyon ile süperovüle edilmesi

Superovule dişi fareler, hCG enjeksiyonu sonunda erkek B6CBAF1/J (C57BL/6JxCBA/J) fareler ile çiftleştirilmiştir. Çiftleştirme için 2 dişi ve 1 erkek aynı kafese konulmuştur. Ertesi sabah, çiftleşmenin tespiti için vajinal plak kontrolü yapılmıştır (Şekil 3.6).



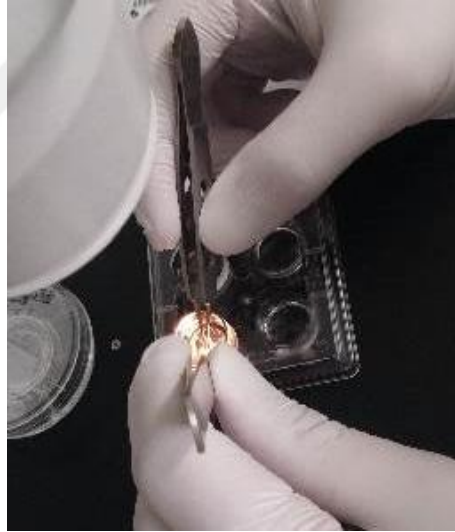
Şekil 3.6. Çiftleşme sonrası farelerde vajinal plak kontrolü

Vajinal plak tespit edilen fareler operasyon odasına transfer edilmiştir. Dişi fareler servikal dislokasyon ile sakrifiye edilmiş ve operasyon masasına alınmıştır. Sakrifiye edilen farelerin abdomenleri; alkol ile temizlenmiş ve orta hat boyunca kesilmiştir. Kesikten ovaryuma kadar tüm dokular uzaklaştırılmış ve oviduklar dikkatlice yapıdan ayrılmıştır. Ovidukları toplanmış, HEPES tamponlu ve 4 mg/ml BSA ile takviye edilmiş medyum (HTF) ile yıkanmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Oviduktların toplanması ve yıkanması

Embriyo eldesi için oviduklar 300 µg/ml hiyalüronidaz + HTF medyum içine transfer edilmiştir. Bu medyum içinde stereril dişli pens yardımı ile oviduktun ampulla bölgesine küçük bir kesik yapılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Ovidukların enzimli medyum içerisinde açılması

Pronuklear aşamadaki kumuluslu embriyolar hyalurinidazlı medyum içerisinde 3 dakika bekletilmiş, ardından HTF medyumunda 3 farklı kuyuda yıkanmıştır (Şekil 3.9). Son kuyuda embriyoların en iyi kalitede olanları seçilmiştir.



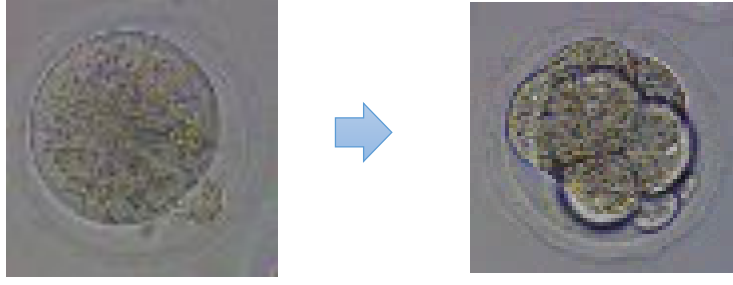
Şekil 3.9. Embriyoların kumulus hücrelerinden ayrılması için yıkanması

Yıkama medyumunda elde edilen embriyolar, 16 saat önce hazırlanmış inkübatörde dengelenmiş embriyo kültür medyumuna (4mg/ml BSA+KSOM medyum) transfer edilmiş ve pipet değişimi yapılmıştır. Kültür medyumuna içerisine transfer edilen embriyolarda 3 farklı damla içerisinde yıkanmış (Şekil 3.10) ve her aşamada cam pipet değiştirilmiştir (Hogan ve ark 1994).



Şekil 3.10. Embriyoların kültür medyumuna transferi

Tek hücreli embriyolar kültür medyumuna KSOM (GlobalStem) içerisinde % 95 nem ve 37 °C ve %5 CO₂'li inkübatörde sekiz hücreli aşamaya kadar kültüre edilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11.Embriyoların inkübasyon ortamı

3.4. Katı Yüzey Vitrifikasyon (SSV)

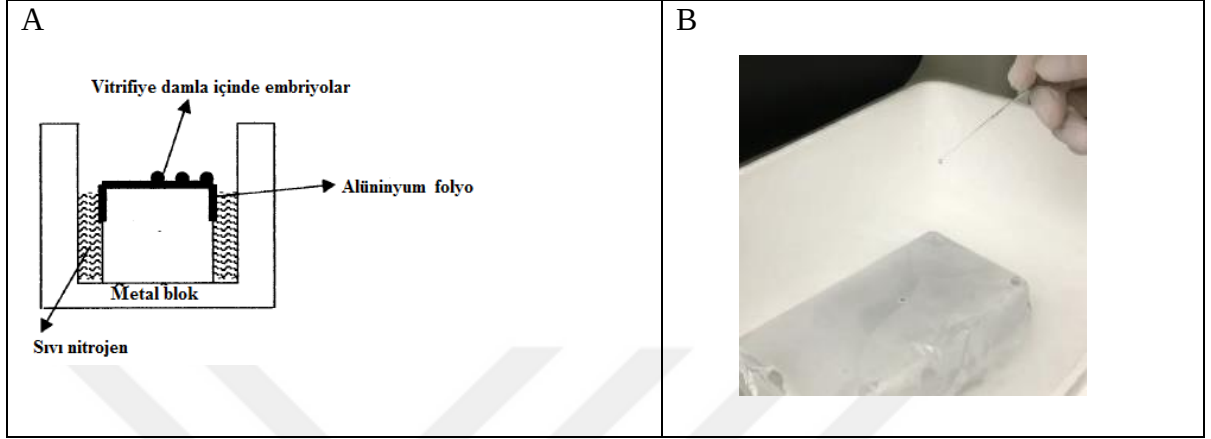
Sekiz hücreli aşamaya gelmiş embriyolar için ekilibrasyon, dondurma solusyonları ve dondurma sonrası kültür medyumları hazırlanmıştır.

Ekilibrasyon solüsyonu: 0,2 ml. EG (Sigma EG E-9129)+ 4,8 ml. HTF-HEPES + 20 mg BSA (Sigma A3311). Hazırlanan solüsyon fitreden geçirildikten sonra 200 µl'lik otomatik pipet yardımı ile 100µl'lik damlalar halinde 60'lık petri (Falcon353004) içine aktarılmış ve dondurma işlemine kadar 37 °C'lik ısıtıcı tablada bekletilmiştir.

Dondurma solüsyonu: 0,875 ml EG + 1,625 ml HTF-HEPES+0,3785 gr Trehalose (Sigma-T0167) + 125 mg PVP (Sigma P0930) + 10 mg BSA olarak hazırlanmış ve filtrelenmiştir. Merkez petrinin orta kuyusuna (Oosafe Oopw-Cw04) 500 µl dondurma solusyonu hazırlanmış ve oda sıcaklığında dondurma aşamasına kadar bekletilmiştir.

Çözündürme solüsyonu: 0,5675 gr Trehalose + 5 ml HTF-HEPES+ 20 mg BSA olarak hazırlanmış ve filtrelenmiştir. Hazırlanan çözündürme solüsyonu, 4 kuyulu petrinin (Nunc-144444) bir kuyusuna 500 µl konulmuş ve diğer 3 kuyuya HTF-HEPES koyularak petri 37°C'de ısıtıcı tablada bekletilmiştir. Ekilibrasyon, dondurma ve çözündürme solusyonları deney günü hazırlanmıştır.

Embriyolar, ekilibrasyon damlasında 12-14 dk bekletilmiştir. Dondurma damlasında 3 kez yıkanmış ve cam pipet yardımı ile , 20-25 saniye içerisinde -150 °C — -180 °C derece aralığındaki sıvı azot içerisindeki alüminyum yüzeye damla halinde bırakılmıştır (Şekil 3.12).



Şekil 3.12. SSV düzeneği (A), embriyoların alüminyum yüzeye bırakılması (B).

Alüminyum yüzeydeki donmuş damlalar soğutulmuş pens yardımıyla alüminyum yüzeyden alınarak vial içerisine bırakılmış ve vial hemen sıvı azota daldırılmıştır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Embriyoların vial ile azota aktarılması

Embriyolar aynı gün içerisinde azottan alınıp çözündürme solüsyonu içerisinde bırakılmıştır. Embriyolar çözündürme solüsyonu içerisinde 3 dakika kadar bekletilmiş sonrasında embriyolar 3 adet HTF kuyusunda toplam 8 dakika boyunca yıkanmıştır. Deney günü önceden hazırlanmış ve ekilibre olmuş embriyo kültür medyumunda en az 3 kez yıkanarak transfer edilmiştir (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Çözünme sonrası embriyoların kültür medyumuna alınması

Embriyo gelişimlerinin değerlendirilebilmesi için bütün embriyolar embriyo kültür medyumuna transfer edilmiştir. Embriyo kültür ortamları aşağıda verilmiştir.

3.5. Deney Gruplarının Dizaynı

Kontrol grubu: Pronüklear aşamada elde edilen *in vitro* geliştirilen 35 adet embriyo, 4 mg/ml BSA içeren embriyo kültür medyumunda (KSOM medyum) hiç bir muameleye marul bırakılmadan 96-120 saat süresince inkübatörde (%5 CO₂, ve 37°C) kültüre edilmiştir.

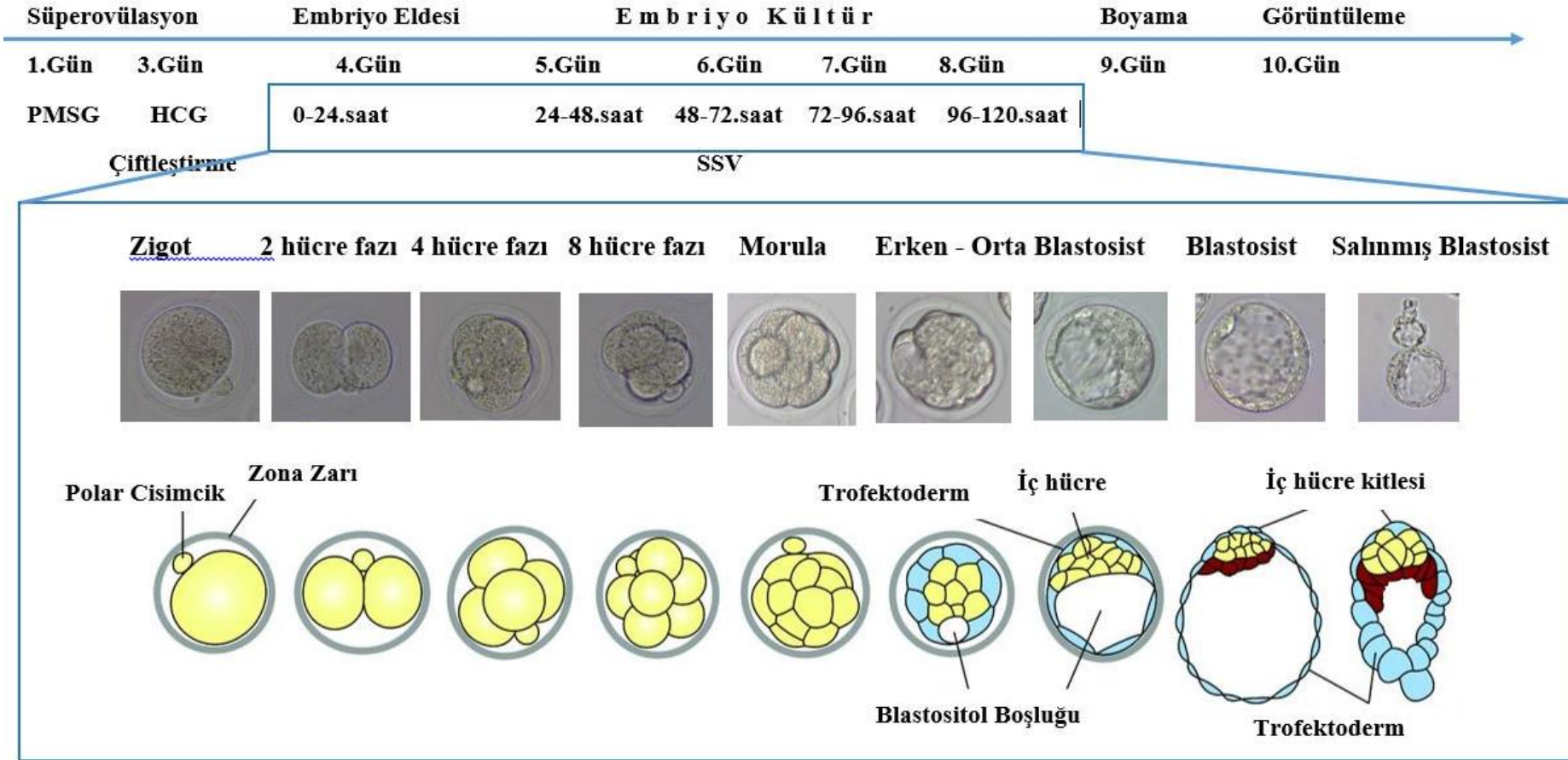
SSV grubu: *In vitro* olarak geliştirilen, sekiz hücreli aşamada SSV yöntemi ile vitrifiye edilen ve çözülen 74 adet embriyo 4 mg/ml BSA içeren embriyo kültür medyumunda (KSOM medyum) 48 saat inkübatörde (%5 CO₂, ve 37°C) kültüre edilmiştir.

SSV melatonin grubu: *İn vitro* olarak geliştirilen, sekiz hücreli aşamada SSV yöntemi ile vitrifiye edilen ve çözülen 70 adet embriyo 4 mg/ml BSA + 10^{-12} M melatonin içeren embriyo kültür medyumunda (KSOM medyum) 48 saat inkübatörde (%5 CO₂, ve 37°C) kültüre edilmiştir.

Kültür bitiminde tüm embriyolar gelişim oranları ve hücre sayıları bakımından değerlendirilmiştir (Şekil 3.15).

3.6. *İn Vitro* Kültür Oranlarının Değerlendirilmesi

İn vitro olarak geliştirilen, sekiz hücreli aşamada dondurulan embriyolar çözüldükten sonra melatoninli ve melatoninsiz medyumda 48 saat kültüre edilmiş ve gelişim oranları değerlendirilmiştir.



Şekil 3.15. Deney akışı zaman şekili

3.7.Diferansiyel Boyama ile Hücre Sayılarının Belirlenmesi

Blastosit aşamasına gelen embriyoların gelişim kalite değerlendirmesi için trofektoderm ve iç hücre kitlesi hücre sayılarının hesaplaması için diferansiyel boyama yapılmıştır.

A- Solüsyonu: 2 µl PI (100µg/ml (P-4170 Sigma))+ 998 HTF+10 µl %1 Tritonx100

B- %100 ethanolden 780µl + 40 µl Hoeschst (H33258 Sigma)

Solüsyonlar karanlıkta hazırlanmıştır. Çözüm sonrası 48 saat kültüre edilen blastosistler, A solüsyonunda 10-12 saniye arasında bekletildikten sonra B solüsyonuna transfer edilmiş ve 4°C da bir gece karanlıkta bekletilmiştir.

Ertesi gün lam üzerine 5 µl lik gliserol damlaları oluşturulmuş ve içlerine embriyolar tek tek transfer edilerek üstleri lamelle kapatılmıştır. Hazırlanan preparatlar kırmızı ve mavi floresan ataçmanlı ters mikroskopta (Carl Zeiss) görüntülenerek, trofektoderm ve iç hücre sayıları hesaplanmıştır (Thouas ve ark. 2001). Boyanan blastosistlerin iç hücre kitle hücreleri mavi renk, trofektoderm hücreleri kırmızı renk olarak gözlenmiştir.

3.8. İstatistik Analizler

Deneyler en az dört tekrarlı olarak yapılmıştır. Araştırma sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde MS Windows için geliştirilen SPSS Statistics 22.0 program versiyonu kullanılmıştır. Gruplar arası farkın kontrolü için bağımsız *t*-Test uygulanmıştır.

4.BULGULAR

4.1 Süperovulasyon ve 48 Saat Kültür Sonrası Embriyo Eldesine Ait Sonuçlar

Süperovulasyon uygulanan 18 dişi B6CBAF1 fareden 11'i vaginal plak göstermiş ve bu farelerden toplam 205 adet pronüklear aşamada kaliteli embriyo elde edilmiştir. Hayvan başına ortalama 18,64 adet embriyo elde edilmiştir. Elde edilen tek hücreli embriyoların 48 saat kültürü sonrasında 179 adet. sekiz hücreli embriyo elde edilmiştir. Embriyoların *in vitro* kültür sonucu sekiz hücreye gelişim oranı %78 olarak bulunmuştur.

4.2. *İn Vitro* Kültür Sonuçları

İn vitro kültür sonunda yapılan gelişim değerlendirmelerine göre sırasıyla; kontrol grubunda 34 adet (%97,14^a ±5,77), SSV grubunda 64 adet (%86,49^b ±4,82) ve SSV+ 10⁻¹² M melatonin ilave grubunda ise 65 adet (%92,86^a ±3,23) blastosist gözlenmiştir. Kontrol grubu ile SSV grubu arasında (P<0,05) ve SSV ve SSV+melatonin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir (P<0,05). Kontrol grubu ile SSV+melatonin grubu arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır (p<0.05). Sonuçlar Çizelge 4.1 ve Şekil4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. *İn vitro* gelişim değerlendirmesi

Grup	Embriyo sayısı	<i>İn vitro</i> gelişen blastosist Sayısı	<i>İn vitro</i> Gelişim oranı (%)
Kontrol	35	34	97,14 ^a ±5,77
SSV	74	64	86,49 ^b ±4,82
SSV+Melatonin	70	65	92,86 ^a ±3,23

^{ab}Aynı kolonda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0.05)

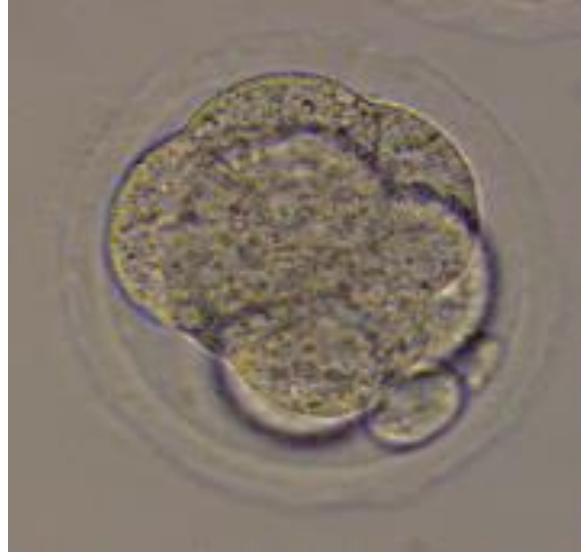
4.3. Diferansiyel Boyama ile Hücre Sayılarına Ait Sonuçlar

Diferansiyel floresan boyama (Şekil 4.3) sonucunda kontrol, SSV ve SSV+ 10^{-12} M melatonin gruplarında ortalama hücre sayıları sırasıyla; $64\pm2,97$, $48,33\pm2,33$ ve $64\pm2,07$ olarak hesaplanmıştır. İç hücre kitlesi sayısı, trofektorderm hücre sayıları ve toplam hücre sayıları bakımından kontrol grubu ile SSV+ 10^{-12} M grubu arasında anlamlı bir fark tespit edilmez iken SSV grubunda tüm değerler kontrol ve SSV+ 10^{-12} M grubundan düşük bulunmuş ve aradaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.2’de verilmiştir.

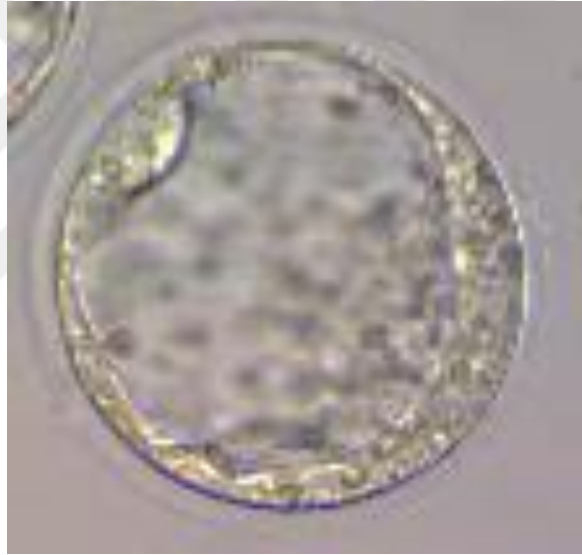
Çizelge 4.2.Diferansiyel floresan boyama ile blastosistlerde hücre sayılarının belirlenmesi

Grup	İç hücre kitlesi sayısı	Trofektorderm hücre sayıları	Toplam hücre sayıları
Kontrol	$18,67\pm0,82^a$	$45,33\pm4,76^a$	$64\pm2,97^a$
SSV	$13,33\pm1,08^b$	$35\pm2,55^b$	$48,33\pm2,33^b$
SSV+Melatonin	$17,33\pm0,82^a$	$46,67\pm1,36^a$	$64\pm2,07^a$

^{ab} Aynı kolonda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki farklar önemlidir ($p<0.05$)

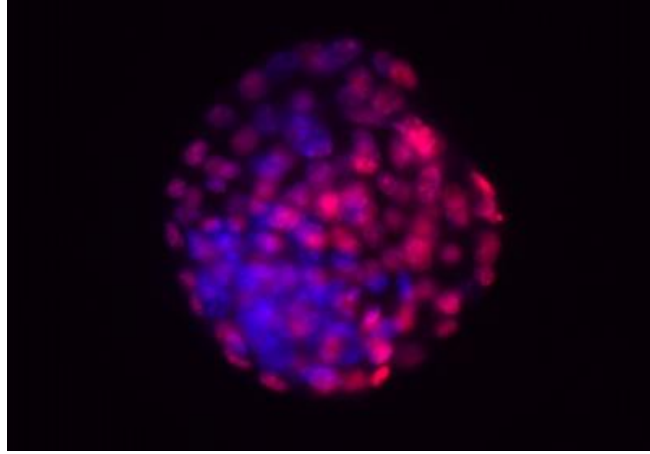


Şekil 4.1. Embriyo 8 hücreli fotoğrafı

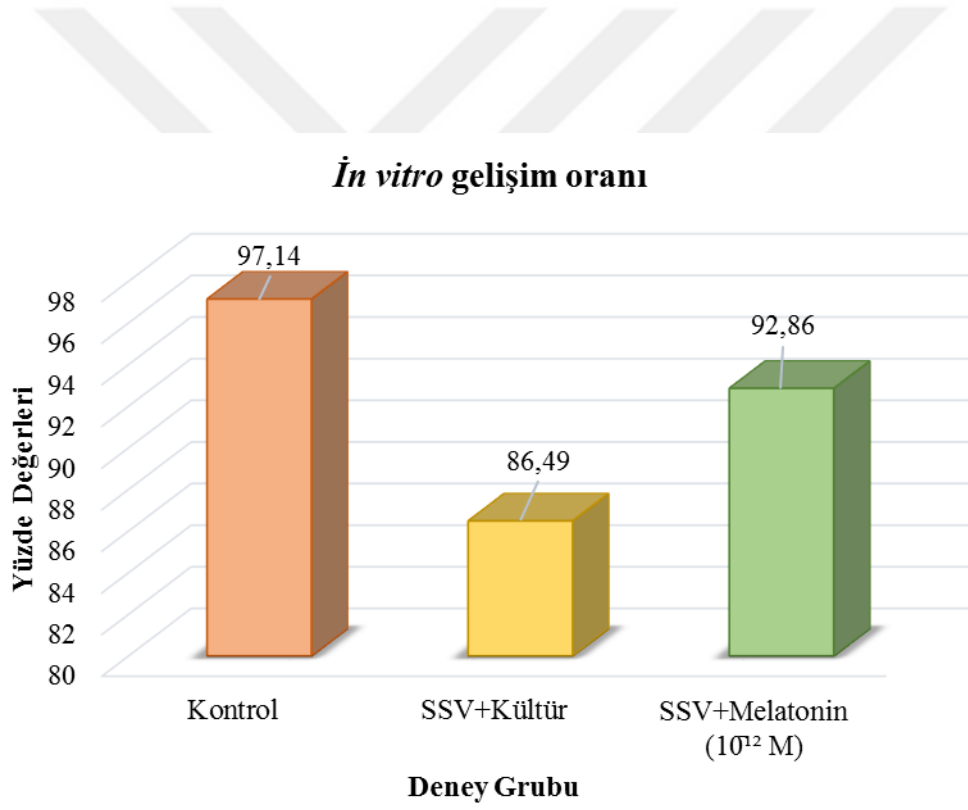


Şekil 4.2. Blastosist evresindeki embriyo fotoğrafı

Şekil 4.3. de gösterildiği gibi differansiyel florasın boyama yöntemi ile blastosistler boyanmış; mavi florasın ile iç hücre kitlesi (ICM), kırmızı florasın ile trofektoderm hücreleri sayılmış ve blastosist oluşumunda ortaya çıkan toplam hücre sayıları saptanmıştır (Çizelge 4.2).



Şekil 4.3. Differansiyel floresan boyama ile blastosist görüntülemesi



Şekil 4.4. Deney grupları blastosist değerleri

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Embriyo dondurma teknolojisi, deney hayvanları ve çiftlik hayvanlarına ait değerli genetik kaynakların uzun süreli korunmasını sağlamak amacı ile kullanılan önemli ve gerekli bir teknolojidir. Bununla birlikte, oositler ve erken embriyolar dondurarak saklamaya karşı çok hassastır ve son birkaç yılda yeni ilerlemeler kaydedilmesine rağmen mükemmel bir protokol henüz kurulmamıştır. Tüm oositler ve embriyolar, kriyoprezervasyon sırasında önemli morfolojik ve fonksiyonel hasara uğrarlar, ancak sağkalım ve gelişim oranlarındaki farklılıkların yanı sıra hasar görme derecesi, türlere, gelişim aşamasına ve kökene (örneğin, *in vitro* üretilen veya *in vivo*) bağlı olarak oldukça değişkenlik gösterir. Meydana genel hasarlar *in vitro* gelişimde ve sonrasında da implantasyonda sorunlar yaratabilmektedir. Bu problemi çözümü için hala çalışmalar devam etmekte, farklı dondurma teknikleri, farklı kriyoprotektan konsantrasyonları ve kombinasyonları, kriyoprotektana destek ilave katkılar kullanılması dışında embriyo çözündürme sonrası kültür medyumları geliştirilmesi amacıyla farklı ROS, apoptoz ve hücre içi hasar önleyici antioksidanların kullanımı üzerinde durulmaktadır. Günümüzde gamet ve embriyoların dondurarak saklanması için yavaş donma ve vitrifikasyon olmak üzere temelde iki yöntem vardır.

Vitrifikasyon, özellikle *in vitro* üretilen veya mikro manipule edilmiş embriyolar ve oositlerle çalışırken, geleneksel yaklaşımlara kıyasla daha uygulanabilir ve umut verici bir alternatif haline gelmiştir (Bagis ve ark. 2002, Pereira ve Marques 2008). Bu tez çalışmasının da amacı SSV vitrifikasyon tekniği ile dondurulan fare embriyolarının *in vitro* kültürüne melatonin ilavesinin embriyonun gelişimine etkisini incelemektir.

Erken dönem embriyolarda yavaş dondurmaya göre daha başarılı olan vitrifikasyon ile dondurma için bugüne kadar çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bunların çoğunda embriyonun içinde bulunduğu solusyonu taşıyan cam veya plastik malzemeler kullanılmakta ve bu maddelerde donma hızını kısmen de olsa olumsuz etkileyebilmektedir. Vitrifikasyon yöntemlerinden biri olan SSV yönteminde diğerlerinden farklı olarak sadece vitrifiye edilecek oosit veya embriyoların içinde bulunduğu çok küçük kristal damla dondurulmaktadır. Bu damla hiçbir ekstra malzemenin içinde değildir ve soğukla direk temas halindedir. Bu yöntem ilk defa

özldkten sonra gen transferi yapılarak transgenik fare elde etmek için tek hücreli fare embriyolarının dondurulmasında başarı ile uygulanmıştır (Bagis ve ark. 2002). Daha sonrasında da değişik çalışmalarda yavaş dondurma ve diğer vitrifikasyon yöntemleriyle kıyaslanmış ve daha iyi sonuçlar alındığı gösterilmiştir (Bagis ve ark.2004b, Bagis ve ark.2005, Bagis ve ark. 2010). Kaynaklar incelendiğinde SSV vitrifikasyon tekniği kullanılarak immatur oosit (Peng ve ark. 2007, Pan ve ark. 2018), pronuklear embriyo (Bagis ve ark. 2002, 2004b, 2005, 2009, 2010), sekiz hücreli (Boonkusol ve ark. 2006), morula ve blastosit (Baranyai ve ark. 2005) aşamasında fare embriyolarının dondurulduğu görülmektedir. Bu tez çalışmasında daha önce başarıyla uygulandığı belirtilen SSV vitrifikasyon tekniği kullanılmış ancak ilk defa kültür medyumuna melatonin ilavesinin bu yöntem ile vitrifiye edilen fare embriyolarının çözüm sonrası gelişimine etkisi araştırılmıştır.

Ghandy ve Malekshah (2017) vitrifikasyonun (cryotop) hangi embriyonik dönemde daha başarılı uygulanacağını araştırdıkları bir çalışmada 2 hücreli, 4 hücreli, 8 hücreli, morula ve blastosist dönemindeki embriyoları kullanmışlar, erime sonrası blastosist gelişimini incelemişlerdir. Bu alışma sonucunda araştırmacılar vitrifikasyonun, fare embriyonik gelişiminin tüm aşamalarında kriyo konservasyon için uygun olduğunu, bununla birlikte çözüm sonrası en iyi sonuçların 4 ve 8 hücreli gelişim aşamalarında vitrifiye edilen embriyolarda gözlendiğini bildirmişlerdir. Bu tez çalışmasında da benzer şekilde *in vitro* geliştirilen 8 hücreli embriyolar kullanılmış ancak farklı bir vitrifikasyon (SSV) yöntemi uygulanmıştır.

In vivo koşullar altında, foliküler sıvılarda bulunan bazı serbest radikal toplayıcı antioksidanlar oositleri oksidatif strese karşı koruyabilmelerine (Wang ve ark. 2002) karşın bu antioksidatif ortam *in vitro* kültür koşullarında daha zayıf (Nagina ve ark. 2016) olduğundan oositler veya embriyolar ciddi oksidatif strese maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle tek başına embriyo kültürü bile embriyonal gelişim üzerinde olumsuz etkiler yaratabilmekte ve bu nedenle her zaman *in vitro* retilen embriyolar, *in vivo* gelişen embriyolar ile karşılaştırıldığında, daha dayanıksız olmaktadır. Bu nedenle *in vitro* embriyo kültür ortamının geliştirilmesi için çeşitli takviyeler üzerinde araştırmalar hala devam etmektedir. Bu sorunun üstesinden gelmenin en etkili yolu, kültür ortamını antioksidan ajanlarla desteklemektir. Diğer serbest radikal süpürücülere kıyasla, melatonin suda ve lipidlerde çözünürlüğü nedeniyle en çok tercih edilen ajan olarak kabul edilir (Hardeland 2005, Do ve ark. 2015). Embriyo kültür ortamındaki

melatoninin takviyesinin sıçan, fare ve tavşan embriyo gelişimini ve implantasyonunu arttırdığını gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (Ishizuka ve ark. 2000, Smith ve ark. 2003, Salmen ve ark. 2005, Adlam ve ark. 2005, Dair ve ark. 2008, Pallab ve ark. 2009, Tian ve ark. 2010, Asgari ve ark. 2012, Bahadori ve ark. 2013, Wang ark. 2013, Gao ve ark. 2013, Salehi ve ark. 2014, Mehaisen ve Saeed 2015). Bu çalışmalardan birinde melatoninin hem *in vitro* fertilizasyon hem de embriyonik gelişme üzerindeki etkisini incelemek için, *in vitro* fertilizasyondan sonra fare embriyoları 10^{-8} M, 10^{-6} M ve 10^{-4} M konsantrasyonlarda melatonin içeren veya içermeyen bir ortamda kültüre edilmiş, melatoninin, *in vitro* fertilizasyon oranını ve sonrasında da erken embriyo gelişimini desteklediği gösterilmiştir (Ishizuka ve ark. 2000).

Benzer şekilde melatoninin embriyo kültür medyumuna ilavesinin, koyun (Abecia ve ark. 2002, Va'zquez ve ark. 2010, Succu ve ark. 2014), keçi (Saeedabadi ve ark. 2018), manda (Manjunatha ve ark. 2009, El-Sokary ve ark. 2017), sığır (Yoshioka ve ark. 1997, Gutierrez ve ark. 2001, Tian ve ark. 2014, Wang ve ark. 2014, Zhao ve ark. 2016, El-Raey ve ark. 2011b, Rodrigues-Cunha ve ark. 2016, Lin ve ark. 2017), ve domuz (Rodriguez-Orsorio ve ark. 2007, Choi ve ark. 2008, Kang ve ark. 2009, Shi ve ark. 2009, El-Raey ve ark. 2011a, Nakano ve ark. 2012, Zhao ve ark. 2015, Do ve ark. 2015, Li ve ark. 2015, Li ve ark. 2016, Chen ve ark. 2017) gibi çiftlik hayvanlarının oosit olgunlaşması ve embriyo gelişimi üzerine yararlı etkilerini gösteren birçok çalışma sonuçları rapor edilmiştir.

ROS, hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit anyonlar ve hidroksil radikal üretimindeki artış kriyoprezervasyon sırasında oluşan apoptoz veya nekroz tetikleyiciler olarak sıralanabilir (Mazilli ve ark. 1995, Sohn ve ark. 2002, Cabrita ve ark. 2005). *İn vitro* gelişimi olumsuz olarak etkileyen faktörlerden biri kriyopreservasyon sonrası ROS seviyesindeki artışın, hücre içi oksidatif sistemleri etkilemesidir (de Leon ve ark. 2012, Zhang ve ark. 2016, Tsang ve Chow 2010, Marquez ve ark. 2004, Jurisicova ve ark. 1996, Yang ve ark. 1998, Thomson ve ark. 2009). Oksidatif stres, vitrifikasyon işlemi sırasında hayvansal hücre ve dokuların ölümünde kritik bir faktördür. Spermatogonial kök hücreler ve testis dokuları vitrifikasyon işlemi sırasında çoklu strese maruz kalmaktadır (Gholami ve ark. 2013a, 2013b). Bu durum embriyolar içinde geçerlidir ve dondurulmuş embriyolar bu süreçte dondurmanın zararlı etkilerinden antioksidanlarla kısmen korunabilir (Hemadi ve ark. 2009, Nedambale ve ark. 2006, Hosseini ve ark. 2009). Melatoninin etkili antioksidanlar arasında yer aldığı savunulmaktadır (Zhao ve ark. 2016). Melatonin ve metabolitleri, antioksidan, antiapoptoz

özellikli güçlü serbest radikal önleyicisi olarak gösterilmesinden ötürü (Tamura ve ark. 2008, Yoo ve ark. 2011) çeşitli hayvan türlerinde vitrifikasyon sonrası embriyonik gelişimi desteklemek amacıyla birçok çalışmada kullanılmıştır.

Baranyai ve ark. (2005), *in vivo* gelişen sekiz hücreli embriyoları SSV tekniği ile dondurmuşlar ve çözüm sonrası *in vitro* blastosit gelişim oranlarını kontrol grubunda %100 ve SSV grubunda ise %95 olarak tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Boonkusol ve ark. (2006) *in vivo* gelişen sekiz hücreli embriyolarda SSV vitrifikasyonu uygulamışlar ve embriyoların çözüm sonrası *in vitro* gelişim oranını %94 olarak bulmuşlardır. Bu tez çalışmasında *in vitro* gelişen sekiz hücreli embriyolar SSV yöntemi ile vitrifiye edilmiş ve çözüm sonrası blastosit gelişim oranı kontrol grubunda %97,14, SSV grubunda %86,49 ve SSV+ 10^{-12} M melatonin grubunda %92,86 olarak bulunmuştur. *In vivo* gelişen embriyoların kriyotoleransı *in vitro* embriyolardan daha yüksek olmasına karşın bu tez çalışmasında vitrifiye edilen *in vitro* embriyoların çözüm sonrası melatonin ile kültüre edildiğinde *in vivo* embriyolarla yapılan önceki çalışmalara yakın bir gelişim gösterdiği görülmektedir.

Çeşitli çalışmalarda vitrifikasyon ile dondurulmuş embriyoların çözüm sonrası kültür ortamlarına 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} , 10^{-11} M (Gao ve ark. 2012), 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} M (Dehghani-Mohammadabadi ve ark. 2014), 10^{-6} , 10^{-9} M (Zhang ve ark. (2016) melatonin ilavelerinin etkisi araştırılmıştır. Gao ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada 2-hücreli fare embriyolarını açık uçlu pipet (OPS) yöntemi ile vitrifiye etmişler, çözüm sonrasında da farklı konsantrasyonlarda melatonin (10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} ve 10^{-11} M) içeren M16 kültür medyumunda kültüre etmişlerdir. Araştırmacılar sonuç olarak 10^{-11} M, 10^{-9} M, 10^{-7} ve 10^{-5} M melatonin ile muamele edilmiş vitrifiye 2 hücreli embriyoların blastosit oranını sırasıyla % 71.3 ± 7.45 , % 76.8 ± 8.56 , % 79.8 ± 8.72 ve % 71.3 ± 7.28 olarak saptamışlar ve bu oranların melatonin ile muamele edilmemiş vitrifiye 2 hücreli embriyonun blastosit oranından (%59.6) anlamlı derecede yüksek olduğunu belirlemişlerdir ($P < 0.05$). Bu tez çalışmasında da 10^{-12} M melatonin konsantrasyonu kullanılmış benzer şekilde melatoninin dondurup çözülen embriyoların gelişme oranını desteklediği sonucuna varılmıştır.

Dehghani-Mohammadabadi ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada NMRI fare ırk farelerde iki hücreli aşamada kriyotop tekniği ile vitrifiye edilen embriyolar çözüm sonrası 10^{-6} , 10^{-9} , 10^{-12} M melatonin içeren KSOM embriyo kültür medyumlarında kültüre edilmiş ve *in vitro* gelişim oranları araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda, 10^{-12} M melatonin ilaveli kültür

medyumu grubunda blastosist gelişim oranı diğer gruplara göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. Ayrıca trofektoderm ve iç hücre kitlesi hücre sayısının 10^{-9} M ve 10^{-12} M melatonin gruplarında anlamlı oranda artışı rapor edilmiştir. Yapılan tez çalışmasında ise 10^{-12} M melatonin uygulanan SSV grubunda benzer şekilde blastosist gelişim oranı kontrol grubunun gelişim oranına benzer ancak melatonin uygulanmayan SSV grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Ayrıca embriyo hücre sayılarının da melatonin uygulanan grupta uygulanmayandan yüksek ve kontrol grubuna benzer olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.05$).

Zhang ve ark. (2016) tarafından yapılan araştırmada, Kun Ming ırk farelerin metafaz II aşamasındaki oositleri OPS vitrifikasyon yöntemi ile dondurulmuş, çözüm sonrası, kimyasal aktivasyon uygulanan oositler parthenogenetik gelişim için 10^{-6} , 10^{-9} M melatonin içeren KSOM medyumunda kültürü edilmiştir. Araştırma sonucunda 10^{-9} M melatoninin parthenogenetik blastosist gelişimini desteklediği sonucuna varılmıştır.

Mehaisen ve ark. (2015)'nin çalışmasında tavşan morula aşamasında embriyolara vitrifikasyon uygulanmış ve çözündürme sonrası embriyo kültür medyumuna melatonin (10^{-3} M) ilave edilmiştir. *In vitro* kültür sonunda melatonin uygulanmayan ve uygulanan vitrifikasyon grupları karşılaştırılmış, blastosist gelişim oranı melatonin grubunda (%81), melatonin uygulanmayan grupta (%69) olarak tespit edilmiştir. Bu tez çalışmasında da melatonin vitrifikasyon grubu melatonin uygulanmayandan daha yüksek blastosist gelişimi ile sonuçlanmıştır.

Succu ve ark. (2014), koyun embriyolarında vitrifikasyon sonrası kullanılan melatonin (10^{-9} M) ilaveli embriyo kültür medyumunun embriyo gelişimini desteklediğini tespit etmişlerdir. Manjunatha ve ark (2009) manda oositleri üzerinde yaptıkları bir çalışmada; farklı konsantrasyonlarda taurin ve melatonin (kontrol; kontrol + 0.5 mM taurin; kontrol + 1 mM taurin; kontrol + 3 mM taurin; kontrol + 5 μ M melatonin; kontrol + 10 μ M melatonin ve kontrol + 50 μ M melatonin) içeren kültür ortamının *in vitro* oosit olgunlaşması ve embriyo gelişimi üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar kültür ortamının taurin ve melatonin ile zenginleştirilmesinin, *in vitro* embriyo üretim verimliliğini artırdığını, özellikle kültür ortamına 10 μ M melatonin ilavesinin çalışmamıza benzer şekilde TE sayısını artırdığını tespit etmişlerdir.

Son yıllarda serbest bir radikal olan melatonin, üreme ile ilişkili dokuların oksidatif stresine karşı korunma amacıyla kullanılmaktadır. Memelilere ait gamet ve embriyolarda yüksek lipid konsantrasyonu nedeniyle, oksidatif strese karşı oldukça hassas olduğu düşünülmektedir. Gametlerin dondurularak korunması, hayvancılık endüstrisi için ilerlemesi ve nesli tükenmekte olan türlerin korunmasına katkıda bulunmasına rağmen, gamet içi plazma membranında morfolojik hasara uğramaktadır (Succu ve ark. 2014).

Sonuç olarak; fare embriyoları ile yapılan daha önceki çalışmalarda vitrifikasyon yöntemi olarak OPS tekniği (Gao ve ark. 2012, Zhang ve ark.2016) kriyotop tekniği (Dehghani-Mohammadabadi ve ark. 2014) kullanılmış ve kültür ortamına melatonin takviyesinin etkisi araştırılmıştır. Ancak şimdiye kadar SSV tekniği ile vitrifiye edilen fare embriyolarının gelişimi üzerinde melatonin katkısının çalışıldığı başka bir araştırmaya rastlanmamış, ilk defa bu tez çalışmasında SSV ile melatonin birlikte uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, *in vitro* gelişen sekiz hücreli aşamada fare embriyolarına SSV vitrifikasyon uygulanması ve çözündürme sonrası embriyo kültür medyumuna melatonin ilavesinin; *in vitro* gelişimi desteklediğini, toplam hücre sayısını artırdığını göstermektedir. Bu bilgiler ışında, laboratuvar hayvanları, çiftlik hayvanları ve beşeri alanda uygulanan vitrifikasyon yöntemlerinde destekleyici olarak çözündürme sonrası kültür medyumlarına melatonin ilavesi önerilebilir.

Konu ile ilgili yapılan birçok araştırmada embriyonun ve germ hücrelerinin korunmasında da melatonin önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Kültür ortamının melatonin ile takviyesinin canlılığı önemli ölçüde artırdığı, oosit maturasyonu, *in vitro* fertilizasyonu ve *in vitro* blastosit gelişimini desteklediği görülmektedir. Melatonin ile ilgili bundan sonraki araştırmalarda, farklı türlere ait, farklı aşamalarındaki embriyoların *in vitro* gelişimini destekleyen ideal melatonin konsantrasyonların belirlenmesi ve melatoninin *in vitro* gelişimi desteklemesi ile ilgili moleküler mekanizmaların araştırılması önemli olacaktır.

6.KAYNAKLAR

- Anonim (2018a). Ulusal çevre sağlığı bilimleri enstitüsünden alıntı
<https://www.niehs.nih.gov/research/resources/visual-guides/guides/male-repro/index.cfm> Erişim tarihi: 04.04.2017
- Anonim (2018b). <https://www.benbest.com/cryonics/viable.html> Erişim tarihi: 07.04.2018
- Anonim (2018c). <https://enki-institut.com/de/wissenswertes/qualitativer-schlaf.html> Erişim tarihi: 09.04.2018
- Abecia J, Forcada F, Zuniga O. (2002). The effect of melatonin on the secretion of progesterone in sheep and on the development of ovine embryos in vitro. *Veterinary research communications*, 26(2):151-8.
- Abedpour N, Rajaei F. (2015). Vitriification by Cryotop and the Maturation, Fertilization, and Developmental Rates of Mouse Oocytes. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 17(10):e18172.
- Abu Nasar M, Rahman A, Abdullah RB and Khadijah WEW. (2008). A review of reproductive biotechnologies and their application in goat. *Biotechnology*, 7: 371-384.
- Adlam VJ1, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, Sammut IA. (2005). Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *The FASEB Journal*, 19(9):1088-95.
- Ahn HJ, Sohn IP, Kwon HC, Jo DH, Park YD, Min CK. (2002). Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozen-thawed two-cell mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*, (4):466-76.
- Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA. (2003). Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59(3-4):939-49.
- Alvarez JG, Storey BT. (1992). Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *Journal of Andrology*, 13(3):232-41.
- Aono N, Abe Y, Hara K, Sasada H, Sato E, Yoshida H. (2005). Production of live offspring from Mouse germinal vesicle-stage oocytes vitrified by a modified stepwise method, SWEID. *Fertility & Sterility*, 84 Suppl 2:1078-82.
- Arat S, Caputcu AT, Akkoc T, Pabuccuoglu S, Sagirkaya H, Cirit U, Nak Y, Koban E, Bagis H, Demir K, Nak D, Senunver A, Kilicaslan R, Tuna B, Cetinkaya G, Denizci M, Aslan O. (2011). Using cell banks as a tool in conservation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. *Reproduction Fertility and Development*, 23(8):1012-23.
- Arendt J. (1986). Role of the pineal gland and melatonin in seasonal reproductive function in mammals. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, 8:266-320.

- Arendt J. (1998). Melatonin and the pineal gland: Influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Reviews of Reproduction*, 3(1):13-22.
- Asgari Z, Ghasemian F, Ramezani M, Bahadori MH. (2012). The effect of melatonin on the developmental potential and implantation rate of mouse embryos. *Cell Journal*, 14(3): 203–208.
- Ashwood-Smith MJ, Morris GW, Fowler R, Appleton TC, Ashoren R. (1988). Physical factors are involved in the destruction of embryos and oocytes during freezing and thawing procedure. *Human Reproduction*, 3(6):795-802.
- Assou S, Haouzi D, De Vos J, Hamamah S. (2010). Human cumulus cells as biomarkers for embryo and pregnancy outcomes. *Molecular Human Reproduction*, 16(8):531-8.
- Bagis H, Odaman H, Sagirkaya H, Dinye'ss A. (2002). Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 61(2):173-9.
- Bagis H, Odaman Mercan H. (2004a). Effect of chemically defined culture medium supplemented with beta-mercaptoethanol and amino acids on implantation and development of different stage *in vivo* or *in vitro*-derived mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 69(1):52-9.
- Bagis H, Sagirkaya H, Mercan HO, Dinnye's A. (2004b). Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos on solid surface (SSV) versus in cryotube: comparison of the effect of equilibration time and different sugars in the vitrification solution. *Molecular Reproduction and Development*, 67: 186–192.
- Bagis H, Cetin S, Sekmen S. (2005). The effect of equilibration time on survival and development rates of mouse pronuclear- stage embryos vitrified in solid surface (SSV) and conventional straws: *in vitro* and *in vivo* evaluations. *Molecular Reproduction and Development*, 72(4):494–501.
- Bagis H, Arat S, Tas AC, Akkoc T, Cetinkaya G, Taskin AC, Turgut G, Sekmen S. (2009). Yardımcı üreme teknikleri ve transgenik hayvan üretiminde kullanılan yöntemler uygulamalı eğitim kursu. TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü. Gebze. sayfa 1-50.
- Bagis H, Akkoc T, Taskin C and Arat S. (2010). Comparison of Different Cryopreservation Techniques: Higher Survival and Implantation Rate of Frozen–Thawed Mouse Pronuclear Embryos in the Presence of Beta-Mercaptoethanol in Post-Thaw Culture. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6):e332-7.
- Bahadori MH, Ghasemian F, Ramezan M, Asgari Z. (2013). Melatonin effect during different maturation stages of oocyte and subsequent embryo development in mice. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 11(1): 11–18.
- Bakaltcheva I, Ganong JP, Holtz BL, Peat RA, Reid T. (2000). Effects of highmolecular- weight cryoprotectants on platelets and the coagulation system. *Cryobiology*, 40(4):283-93.

- Baranyai B, Bodo SZ, Dinnyes A and Góczy E. (2005). Vitrification of biopsied mouse embryos. *Acta Veterinaria Hungarica*, 53(1), 103-112.
- Barrett P, Bolborea M. (2012). Molecular pathways involved in seasonal body weight and reproductive responses governed by melatonin. *Journal of Pineal Research*, 52(4):376-88.
- Baust JM, Van B, Baust JG. (2000). Cell viability improves following inhibition of cryopreservation-induced apoptosis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 36(4):262-70.
- Berlinguer F, Leoni G.C, Succu S, Spezzigu A, Madeddu M, Satta V, Bebbere D, Contreras-Solis I, Gonzalez-Bulnes A, Naitana S. (2009). Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. *Journal of Pineal Research*, 46(4):383-91.
- Biggers JD. (1987). Pioneering mammalian embryo culture. In: *The Mammalian Preimplantation Embryo*. Bavister B (ed.) Plenum Publishing Corporation, New York. syf 1 – 22.
- Biggers JD, Gwatkin RB, Brinster RL. (1962). Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. *Nature*, 26;194: 747-9.
- Boni R, Tosti E, Roviello S, Dale B. (1999). Intercellular communication in *in vivo*- and *in vitro*-produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 61(4):1050-5.
- Boonkusol D, Gal AB, Bodo S, Gorhony B, Kitiyanant Y and Dinnyes A. (2006). Gene expression profiles and *in vitro* development following vitrification of pronuclear and 8-cell stage mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 73(6), 700-708.
- Bracket A. (1912) Development *in vitro* de blastodermes et de jeunes embryons de mammifères. *CR Hebd Seances Acad Science Journal*, 155,1191-1193.
- Bracket A. (1913). Reserches sur le determinisme hereditaire de l'oeuf des mammifères. Development *in vitro* de jeunes vesicules blastodermiques du lapin. *Archives of Biological*, 28:447-503.
- Brzezinski A. (1997). Melatonin in humans. *The New England Journal of Medicine*, 336(3):186-95.
- Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herraiz MP. (2005). Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology*, 50(2):144-53.
- Caputcu AT, Akkoc T, Cetinkaya G, Arat S. (2013). Tissue cryobanking for conservation programs: effect of tissue type and storage time after death. *Cell Tissue Bank*, 14(1):1-10.

- Cebrian-Serrano A, Salvador I, Raga E, Dinnyes A, Silvestre M. (2013). Beneficial effect of melatonin on blastocyst *in vitro* production from heat stressed bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(5):738-46.
- Cetinkaya G, Arat S. (2011). Cryopreservation of cartilage cells and tissue for biobanking. *Cryobiology*, 63(3):292-7.
- Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, Choi DH, Han SY, Yoon TK. (1991). Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. *Fertility and Sterility*, 55(1):109-13.
- Chang CC, Sung LY, Tian CX, Yang X, Kort HI, Nagy ZP. (2007). Parallel comparison of parthenogenetic development following oocyte cryopreservation vitrification vs. slow freezing. *Fertility and Sterility*, 88:S350.
- Chang MC. (1959). Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature*, 8;184(Suppl 7):466-7.
- Chao H, Davies PL, Carpenter JF. (1996). Effects of antifreeze proteins on red blood cell survival during cryopreservation. *Journal of Experimental Biology*, 199(Pt 9):2071-6.
- Chen C. (1986). Pregnancy after human oocyte cryopreservation. *Lancet*, 19;1(8486):884-6.
- Chedid S, Van den Abbeel E, Van Steirteghem AC. (1992). Effects of cryopreservation on survival and development of interphase- and mitotic-stage 1-cell mouse embryos. *Human Reproduction*, 7(10):1451-6.
- Chen SU, Lien YR, Cheng YY, Chen HF, Ho HN, Yang YS. (2001). Vitrification of mouse oocytes using closed pulled straws (CPS) achieves a high survival and preserves good patterns of meiotic spindles, compared with conventional straws, open pulled straws (OPS) and grids. *Human Reproduction*, 16(11):2350-6.
- Chen Z, Zuo X, Li H, Hong R, Ding B, Liu C, Gao D, Shang H, Cao Z, Huang W, Zhang X, Zhang Y. (2017). Effects of melatonin on maturation, histone acetylation, autophagy of porcine oocytes and subsequent embryonic development. *Animal Science Journal*, 88(9):1298-1310.
- Choi J, Park S.M, Lee M, Kim J.H, Jeong Y.I, Lee J.Y, Park S.W, Kim H.S, Hossein M.S, Jeong Y.W, Kim S, Hyun S.H, Hwang W.S. (2008). Antiapoptotic effect of melatonin on porcine parthenogenic embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 75(7):1127-35.
- Choudhary KK, Kavya KM, Jerome A, Sharma RK. (2016). Advances in reproductive biotechnologies. *Veterinary World*, 9(4): 388-395.
- Dair EL, Simoes RS, Simoes MJ, Romeu LR, Oliveira-Filho RM, Haidar MA, Baracat EC, Soares JM, Jr. (2008). Effects of melatonin on the endometrial morphology and embryo implantation in rats. *Fertility and Sterility*, 89(5 Suppl):1299-305.
- de Leon PM, Campos VF, Corcini CD, Santos EC, Rambo G, Lucia TJr, Deschamps JC, Collares T. (2012). Cryopreservation of immature equine oocytes, comparing a solid surface vitrification process with open pulled straws and the use of a synthetic ice blocker. *Theriogenology*, 77(1):21-7.

- Dehghani-Mohammadabadi M, Salehi M, Farifteh F, Nematollahi S, Arefian E, Hajjarizadeh A, Parivar K, Nourmohammadi Z. (2014). Melatonin modulates the expression of BCL-xl and improve the development of vitrified embryos obtained by IVF in mice. *The Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 31(4):453-61.
- Diller KR, Aggarwal SJ. (1987). Computer automated cell size and shape analysis in cryomicroscopy. *Journal of Microscopy*, 146(Pt 2):209-19.
- Do LT, Shibata Y, Taniguchi M, Nii M, Nguyen TV, Tanihara F, Takagi M, Otoi T. (2015). Melatonin supplementation during *in vitro* maturation and development supports the development of porcine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(6):1054-8.
- Doherty AS, Mann MR, Tremblay KD, Bartolomei MS, Schultz RM. (2000). Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the preimplantation mouse embryo. *Biology of Reproduction*, 62(6):1526-35.
- Edwards RG, Steptoe PC, Purdy JM. (1980). Establishing full-term human pregnancies using cleaving embryos grown *in vitro*. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 87(9):737-56.
- El-Raey M, Abdel-Ghaffar AE, Sosa GA, Abou El-Roos MEA, Nagai T. (2011a). Some trials for improving the in-vitro fertilization capacity of bovine oocyte. Ph.D. Thesis. Faculty of Veterinary Medicine, Benha University, Egypt; 1-247.
- El-Raey M, Geshi M, Somfai T, Kaneda M, Hirako M, Abdel-Ghaffar AE, Sosa GA, El-Roos ME, Nagai T. (2011b). Evidence of melatonin synthesis in the cumulus oocyte complexes and its role in enhancing oocyte maturation *in vitro* in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, 78(4):250-62.
- El-Sokary MM, El-Raey M, Mahmoud KG, Abou El-Roos ME, Sosa GM. (2017). Effect of melatonin and/or cysteamine on development and vitrification of buffalo embryos. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 6(4):176-180.
- Espino J, Ortiz A, Bejarano I, Lozano GM, Monllor F, Garcia JF, Rodríguez AB, Pariente JA. (2011). Melatonin protects human spermatozoa from apoptosis via melatonin receptor- and extracellular signal-regulated kinasemediated pathways. *Fertility and Sterility*, 95(7):2290-6.
- Evans MJ, Kaufman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from Mouse embryos. *Nature*, 292(5819):154-6.
- Favetta LA, St. John EJ, King WA, Betts DH. (2007). High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. *Free Radical Biology and Medicine*, 42(8):1201-10.
- Fowler A, Toner M. (2005). Cryo-injury and biopreservation. *Annals of the New York Academy of Science*, 1066:119-35.

- Fujino Y, Kojima T, Nakamura Y, Kobayashi H, Kikuchi K and Funahashi H. (2008). Metal mesh vitrification (MMV) method for cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology*, 70(5):809-17.
- Fuku E, Xia L, Downey BR. (1995). Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 32(2):139-56.
- Gage AA, Baust JG. (2002). Cryosurgery – a review of recent advances and current issues. *Cryo Letters*, 23(2):69-78.
- Galano A, Tan DX, Reiter RJ. (2011). Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *Journal of Pineal Research*, 51(1):1-16.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 55(6):1341-57.
- Gao C, Han HB, Tian XZ, Tan DX, Wang L, Zhou GB, Zhu SE, Liu GS. (2012). Melatonin promotes embryonic development and reduces reactive oxygen species in vitrified mouse 2-cell embryos. *Journal of Pineal Research*, 52(3):305-11.
- Gao S, Wang ZL, Di KQ, Chang G, Tao L, An L, Wu FJ, Xu JQ, Liu YW, Wu ZH, Li XY, Gao S, Tian JH. (2013). Melatonin Improves the Reprogramming Efficiency of Murine Induced Pluripotent Stem Cells Using a Secondary System Inducible. *Journal of Pineal Research*, 55(1):31-9
- Ghandy N, Ve Malekshah AAK. (2017). Which stage of mouse embryos is more appropriate for vitrification? *International Journal of Fertility and Sterility*, 10(4): 357–362.
- Gholami M, Hemadi M, Saki G, Zendedel A, Khodadadi A, Mohammadi-Asl J. (2013a). Does prepubertal testicular tissue vitrification influence spermatogonial stem cells (SSCs) viability? *Journal of Assisted Reproduction and Genetic*, 30(10): 1271–1277.
- Gholami M, Saki G, Hemadi M, Khodadadi A, Mohammad-di-Asl J. (2013b). Effect of Melatonin on the Expression of Apoptotic Genes in Vitrified-thawed Spermatogonia Stem Cells Type A of 6-Day-Old Mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(8): 906–909.
- Gholami M, Saki G, Hemadi M, Khodadadi A, Mohammadiasl J. (2015). Melatonin Effect on Immature Mouse. *Jentashapir Journal of Health Research*, 6 (3): e28704.
- Goto Y, Noda Y, Mori T, Nakano M. (1993). Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. *Free Radical Biology and Medicine*, 15(1):69-75.
- Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7(2):175-89.
- Gutierrez-Adan A, Lonergan P, Rizos D, Ward FA, Boland MP, Pintado B, de la Fuente J. (2001). Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, 55(5):1117-26.
- Hammond Jr J. (1949). Recovery and culture of tubal mouse ova. *Nature*, 163(4131):28.

- Hardeland R. (2005). Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. *Endocrine*, 27(2):119-30.
- Harkness JE, Wagner JE. (1995). *The biology and medicine of rabbits and rodents*. Baltimore Williams and Wilkins, page 62-63.
- Hasler JF. (2000). In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction*, Suppl 5:47-58.
- Hemadi M, Abolhassani F, Akbari M, Sobhani A, Pasbakhsh P, Ahrlund-Richter L, Modaresi MH, Salehnia M. (2009). Melatonin promotes the cumulus-oocyte complexes quality of vitrifiedthawed murine ovaries with increased mean number of follicles survival and ovary size following heterotopic transplantation. *European Journal Pharmacology*, 618(1-3):84-90.
- Hoffman RA, Reiter RJ. (1965). Pineal gland: Influence on gonads of male hamsters. *Science*, 148(3677):1609-11.
- Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. (1994). *Manipulating the Mouse Embryo* (2nd) Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Tennessee, page 217-252.
- Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Asgari V, Abedi P, Hosseini L, Ostadhosseini S, Moulavi F, Safahani Langrroodi M, Sadegi H, Bahramian H, Eghbalsaied SH, Nasr-Esfahani Mohammad H. (2009). Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; Which is the most important? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(6): 355–364.
- Hou YP, Dai YP, Zhu SE, Zhu HB, Wu TY, Gong GC, Wang HP, Wang LL, Liu Y, Li R. (2005). Bovine oocytes vitrified by the open pulled straw method and used for somatic cell cloning supported development to term. *Theriogenology*, 64(6):1381-91.
- Hwang IS, Hara H, Chung HJ, Hirabayashi M, Hochi S. (2013). Rescue of vitrified-warmed bovine oocytes with rho-associated coiled-coil kinase inhibitor. *Biology of Reproduction*, 89(2):26, 1–6
- Irimia D, Karlsson JO. (2002). Kinetics and mechanism of intercellular ice propagation in a micropatterned tissue construct. *Biophysical Journal*, 8:1858–68.
- Ishizuka B, Kuribayashi Y, Murai K, Amemiya A, Itoh MT. (2000). The effect of melatonin on *in vitro* fertilization and embryo development in mice. *Journal of Pineal Research*, 28(1): 48–51.
- James PS, Wolfe CA, Mackie A, Ladha S, Prentice A, Jones R. (1999). Lipid dynamics in the plasma membrane of fresh and cryopreserved human spermatozoa. *Human Reproduction*, 14(7):1827–32.
- Jang HY1, Ji SJ, Kim YH, Lee HY, Shin JS, Cheong HT, Kim JT, Park IC, Kong HS, Park CK, Yang BK. (2010). Antioxidative effects of astaxanthin against nitric oxide-induced oxidative stress on cell viability and gene expression in bovine oviduct

- epithelial cell and the developmental competence of bovine IVM/IVF embryos. *Reproduction in Domestic Animal*, 45(6): 967–74.
- Jang MH, Jung SB, Lee MH, Kim CJ, Oh YT, Kang I, Kim J, Kim EH. (2005). Melatonin attenuates amyloid beta 25-35 induced apoptosis in Mouse microglial BV2 cells. *Neuroscience Letters*, 380(1–2):26–31.
- Jeong YJ, Kim MK, Song HJ, Kang EJ, Ock SA, Kumar BM, Balasubramanian S, Rho GJ. (2009). Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*, 58(2):181–9
- Jiménez-Trigos E, Vicente JS, Marco-Jiménez F. (2014). First pregnancy and live birth from vitrified rabbit oocytes after intraoviductal transfer and *in vivo* fertilization. *Theriogenology*, 82(4): 599-604.
- Juknat AA, MendezMdelV, QuaglinoA, Fameli CI, Mena M, Kotler ML. (2005). Melatonin prevents hydrogen peroxide-induced Bax expression in cultured rat astrocytes. *Journal of Pineal Research*, 38(2):84–92.
- Juriscova A, Varmuza S, Casper RF. (1996). Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Molecular Human Reproduction*, 2(2):93–98.
- Kaidi S, Donnay I, Van Langendonck A, Dessy F, Massip A. (1998). Comparison of two co-culture systems to assess the survival of *in vitro* produced bovine blastocysts after vitrification. *Animal Reproduction Science*, 52(1): 39–50.
- Kang JT, Koo OJ, Kwon DK, Park HJ, Jang G, Kang SK, Lee BC. (2009). Effects of melatonin on *in vitro* maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. *Journal of Pineal Research*, 46(1):22-28.
- Karlsson JO, Toner M. (1996). Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*, 17(3):243–56.
- Kaur C, Sivakumar V, Lu J, Tang FR, Ling EA. (2008). Melatonin Attenuates Hypoxia-Induced Ultrastructural Changes and Increased Vascular Permeability in the Developing Hippocampus. *Brain Pathology*, 18(4):533-47.
- Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T and Machida T. (1990). A simple method for mouse embryo cryopreservation in low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *Journal of Reproduction Fertility*, 89(1): 91–97.
- Kasai M, Nishimori M, Zhu SE, Sakurai T and Mashida T. (1992). Survival of mouse morulae vitrified in an ethylene glycol-based solution after exposure to the solution at various temperatures. *Biology Reproduction*, 47(6): 1134–1139.
- Kassai M. (1997). Cryopreservation of mammalian embryos. *Molecular Biotechnology*, 7,173–9.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T. (2004). Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen

- species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, 62: 1186– 97.
- Kito S, Noguchi Y, Ohta Y, Ohhata T, Abe M, Shiomi N, Shiomi T. (2003). Evaluation of developmental competence of vitrified-warmed early cleavage stage embryos and their application for chimeric mouse production. *Experimental Animals*, 52(2): 179–183.
- Konc J, Kanyó K, Kriston R, Somoskyi B, and Cseh S. (2014). Cryopreservation of Embryos and Oocytes in Human Assisted Reproduction. *BioMed Research International*, 1-9
- Kono T, Kwon O, Nakahara T. (1991). Development of vitrified mouse oocytes after *in vitro* fertilization, *Cryobiology*, 28:50-54.
- Kucukakin B, Gogenur I, Reiter RJ, Rosenberg J. (2007). Oxidative stress in relation to surgery: is there a role for the antioxidant melatonin? *Journal of Surgical Research*, 152(2):338–47.
- Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO, and Shaw JM. (1999a). Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have low toxicity to embryos and oocytes. *Cryobiology*, 38:119–130
- Kuleshova LL, Gianaroli L, Magli C, Ferraretti A, Trounson A. (1999b). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Human Reproduction*, 14:3077-3079.
- Kuleshova LL, Shaw JM. (2000). A strategy for rapid cooling of mouse embryos within a double straw to eliminate the risk of contamination during storage in liquid nitrogen. *Human Reproduction*, 15:2604-2609.
- Kuleshova LL, Shaw JM, and Trounson AO. (2001). Studies on Replacing Most of the Penetrating Cryoprotectant by Polymers for Embryo Cryopreservation. *Cryobiology*, 43, 21–31
- Kuleshova LL, Lopata A. (2002). Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertility and Sterility*, 78(3):449-54.
- Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, and Kato O. (2005). Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. *Reproductive Biomedicine Online*, 11(5):608-614.
- Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. (1999a). Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nature Biotechnology*, 17:1234–6
- Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. (1999b). Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*, 72:1073–78.
- Lane M, Maybach JM, Gardner DK. (2002). Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. *Human Reproduction*, 17(10):2686–93.

- Latham KE. (2015). Endoplasmic reticulum stress signaling in mammalian oocytes and embryos: Life in balance. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 316:227-265.
- Lehle K, Hoenicka M, Jacobs VR, Schmid FX, Birnbaum DE. (2005). Cryopreservation of human endothelial cells for vascular tissue engineering. *Cryobiology*, 50(2):154–61.
- Leibo SP, Loskutoff N. (1993). Cryobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, 39:81–94.
- Leibo SP and Oda K. (1993). High survival of mouse zygotes and embryos cooled rapidly or slowly in ethylene glycol plus polyvinylpyrrolidone. *Cryo-Letters*, 14:133–144
- Leoni G, Berlinguer F, Rosati I, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S. (2003). Resumption of metabolic activity of vitrified/warmed ovine embryos. *Molecular Reproduction Development*, 64:207–13.
- Lecture-Konirsch H, Collin G, Sifer C, Devaux A, Kuttann F, Madelenat P, Feldmann G, Benifla JL. (2003). Safety of cryopreservation straws for human gametes and embryos: a study with human immunodeficiency virus- 1 under cryopreservation conditions. *Human Reproduction*, 18:140–4.
- Lewis WH and Gregory PW. (1929). Cinematographs of living developing rabbit-eggs. *Science*; 69, 226-229. Cited In: Biggers, JD. Pioneering mammalian embryo culture. In *Mammalian Preimplantation Embryo*. Eds. Bavister BD, Plenum, New York. 1- 22.
- Li Y, Zhang Z, He C, Zhu K, Xu Z, Ma T, Tao J, Liu G. (2015). Melatonin protects porcine oocyte *in vitro* maturation from heat stress. *Journal of Pineal Research*, 59:365-375.
- Li Y, Wang J, Zhang Z, Yi J, He C, Wang F, Tian X, Yang M, Song Y, He P, Liu G. (2016). Resveratrol compares with melatonin in improving *in vitro* porcine oocyte maturation under heat stress. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(1):33-43.
- Lin T, Lee JE, Shin HY, Oqani RK, Kim SY, Jin DI. (2016). Supplement of tauroursodeoxycholic acid in vitrification solution improves the development of mouse embryos. *Korean Journal of Agricultural Science*, 43:575-580.
- Lin T, Lee JE, Kang JW, Kim SY, Jin DI. (2017). The influence and role of melatonin on *in vitro* oocyte maturation and embryonic development in pig and cattle. *Korean Journal of Agricultural Science*, 44:309-317.
- Liu Y, Zhang L, Zhang H, Liu B, Wu Z, Zhao W, Wang Z. (2012). Exogenous melatonin modulates apoptosis in the mouse brain induced by high- LET carbon ion irradiation. *Journal Pineal Research*, 52(1):47–56.
- Maity P, Bindu S, Dey S, Goyal M, Alam A, Pal C, Reiter R, Bandyopadhyay U. (2009) Melatonin reduces indomethacin-induced gastric mucosal cell apoptosis by preventing mitochondrial oxidative stress and the activation of mitochondrial pathway of apoptosis. *Journal of Pineal Research*, 46(3): 314–23.

- Manjunatha BM, Devaraj M, Gupta PS, Ravindra JP, Nandi S. (2009). Effect of taurine and melatonin in the culture medium on buffalo *in vitro* embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*, 44:12-16.
- Manjunatha BM, Gupta PSP, Ravindra JP, Devaraj M, Nandi S. (2008). *In vitro* embryo development and blastocyst hatching rates following vitrification of river buffalo embryos produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries or live animals by ovum pick-up. *Animal Reproduction Science*, 104: 419-426.
- Mark FL, Long JA. (1987). Studies on the early stages of development in the rat and mice. *Univ Cal Zool Pub.*1912; 9,105. Cited In: Biggers, JD. Pioneering mammalian embryo culture. In *Mammalian Preimplantation Embryo*. Eds. Bavister BD, New York, USA:Plenum;1-22
- Marquez-Alvarado YC, Galina CS, Castilla B, Leon H, Moreno- Mendoza N. (2004). Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the TUNEL technique. *Reproduction Domestic Animal*, 39:141–5.
- Martin GR. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(12): 7634-8
- Martino, A, Songsasen N, and Leibo SP. (1996). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biology Reproduction*, 54:1059-1069.
- Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E. (2001). Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*, 42:139–44.
- Matsuzuka T, Sakamoto N, Ozawa M, Ushitani A, Hirabayashi M, Kanai Y. (2005) . Alleviation of maternal hyperthermia-induced early embryonic death by administration of melatonin to mice. *Journal of Pineal Research*, 39(3):217–23.
- Maximov, A. (1925). Tissue cultures of young mammalian embryos. *Contr. Embryol. Carneg. Instn*, 16:47-113. Cited In: Kirby DRS. The development of Mouse blastocysts transplanted to the scrotal and cryptorchid testis. *J Anal(Lond)*. 1963; 97(1):119-30
- Mazzilli F, Rossi T, Sabatini L, Pulcinelli FM, Rapone S, Dondero F, Gazzaniga PP. (1995). Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. *Acta Europaea Fertilitatis*, 26(4):145–8.
- McAnulty JF, Huang XQ. (1997). The efficacy of antioxidants administered during low temperature storage of warm ischemic kidney tissue slices. *Cryobiology*, 34(4):406–15.
- McGann LE. (1978). Differing actions of penetrating and nonpenetrating cryoprotective agents. *Cryobiology*, 15(4):382–90.
- McLaren A, Biggers JD. (1958). Successful development and birth of mice cultivated *in vitro* as early embryos. *Nature*, 182:877 – 8 .

- Mehaisen GM, Saeed AM. (2015). *In vitro* development rate of preimplantation rabbit embryos cultured with different levels of melatonin. *Zygote*, 23:111-115.
- Mehaisen GM, Saeed AM, Gad A, Abass AO, Arafa M, El-Sayed A (2015). Antioxidant Capacity of Melatonin on Preimplantation Development of Fresh and Vitrified Rabbit Embryos: Morphological and Molecular Aspects. *PLoS ONE*, 10(10): e0139814.
- Mehlmann LM. (2013). Losing Mom's Message: Requirement for DCP1A and DCP2 in the Degradation of Maternal Transcripts During Oocyte Maturation¹, *Biology of Reproduction*, 88: 1-2.
- Minami N, Sasaki K, Aizawa A, Miyamoto M, Imai H (2001). Analysis of gene expression in mouse 2-cell embryos using fluorescein differential display: comparison of culture environments. *Biology of Reproduction*, 64: 30–35.
- Mishima O, Suzuki Y. (2002). Propagation of the polyamorphic transition of ice and the liquid-liquid critical point. *Nature*, 419(6907):599–603.
- Morato R, Izquierdo D, Paramio MT, Mogas T. (2010). Survival and apoptosis rates after vitrification in cryotop devices of *in vitro*-produced calf and cow blastocysts at different developmental stages. *Reproduction Fertility and Development*, 22:1141-1147.
- Muldrew K, McGann LE. (1994). The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophys Journal*, 66, 532–41.
- Muller K, Muller P, Pincemy G, Kurz A, Labbe C. (2008). Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 78(3),390–9.
- Nagina G, Asima A, Nemat U, Shamim A. (2016). Effect of melatonin on maturation capacity and fertilization of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. *Open Veterinary Journal*, 6:128-134.
- Nakano M, Kato Y, Tsunoda Y. (2012). Effect of melatonin treatment on the developmental potential of parthenogenetic and somatic cell nuclear-transferred porcine oocytes *in vitro*. *Zygote*, 20:199-207.
- Nasr-Esfahani MH, Aitken JR, Johnson MH. (1990). Hydrogen peroxide levels in mouse oocytes and early cleavage stage embryos developed *in vitro* or *in vivo*. *Development*, 109:501–507.
- Nedambale TL, Du F, Yang X, Tian XC. (2006). Higher survival rate of vitrified and thawed *in vitro* produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with b-mercaptoethanol. *Animal Reproductive Science*, 93:61– 75.
- Nielsen H.I. , Jaffar A. (2010). Embryo culture media, culture techniques and embryo selection: A tribute to Wesley Kingston Whitten J. *Reprod Stem Cell Biotechnology*, 1(1):1-29.

- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, and Suzuki T. (1998). Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology*, 37:77-85.
- Ozawa M, Nagai T, Fahrudin M, Karja NW, Kaneko H, Noguchi J, Ohnuma K, Kikuchi K. (2006) Addition of glutathione or thioredoxin to culture medium reduces intracellular redox status of porcine IVM/IVF embryos, resulting in improved development to the blastocyst stage. *Molecular Reproduction Development*, 73(8):998–1007.
- Palasz AT, Mapletoft RJ. (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 14:127-149.
- Pallab Maity, Samik Bindu, Sumanta Dey, Manish Goyal, Athar Alam, Chinmay Pal, Russel Reiter and Uday Bandyopadhyay. (2009). Melatonin reduces indomethacin-induced gastric mucosal cell apoptosis by preventing mitochondrial oxidative stress and the activation of mitochondrial pathway of apoptosis *Journal Pineal Research*, 46:314–323
- Pan B, Yang H, Qazi IH, Liu G, Han h, Meng Q, Zhou G. (2018). Melatonin Improves Parthenogenetic Development of Vitrified–Warmed Mouse Oocytes Potentially by Promoting G1/S Cell Cycle Progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12): 4029.
- Papis K, Poleszczuk O, Wenta-Muchalska E, Modlinski JA (2007). Melatonin effect on bovine embryo development *in vitro* in relation to oxygen concentration. *Journal of Pineal Research*, 43: 321–326.
- Park SP, Kim EY, Oh JH, Nam HK, Lee KS, Park SY, Yoon SH, Chung KS, Lim JH. (2000). Ultra rapid freezing of human multipronuclear zygotes using electron microscope grids. *Hum Reprod*, 15:1787–90.
- Park JY, Park HJ, Kim JW, Park SY, Yang SG, Jung JM, Kim MJ, Koo DB. (2017). Melatonin alleviates the endoplasmic reticulum stress through the regulating of unfolding protein response signaling during porcine oocyte maturation *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, 29:195-195.
- Peng LF, Luo GB and Zhu ZJ. (2007). A Comparison of OPS and SSV Vitrification Freezing Preservation of KM Mouse's Immature Oocytes. *Laboratory Animal Science*, 5.
- Pereira RM, Marques CC. (2008). Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Banking*, 9:267–277.
- Pincus G. (1935). Cited In: Biggers, JD. Pioneering mammalian embryo culture. In *Mammalian Preimplantation Embryo*. Eds. Bavister BD, Plenum, New York, USA: 1987; 1-22
- Polge C, Smith AU, Parkers AS. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*, 164:666.
- Punyawai K, Anakkul N, Srirattana K, Aikawa Y, Sangsritavong S, Nagai T, Imai K, Parnpai R. (2015). Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts, *Journal of Reproduction Development*, 61 431-437.

- Rajaei F, Karja NW, Agung B, Wongsrikeao P, Taniguchi M, Murakami M, Sambuu R, Nii M, Otoi T. (2005). Analysis of DNA fragmentation of porcine embryos exposed to cryoprotectants. *Reproduction in Domestic Animal*, 40:429–32.
- Rall, WF and Wood MJ. (1994). High *in vitro* and *in vivo* survival of day 3 mouse embryos vitrified or frozen in a non-toxic solution of glycerol and albumin. *Journal Reproduction Fertility*, 101: 681–688.
- Rizos D, Lonergan P, Boland M, Arroyo-Garcia R, Pintado B, de la Fuente J, Gutierrez-Adan A. (2002). Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biology of Reproduction*, 66: 589–595.
- Rodrigues-Cunha MC, Mesquita LG, Bressan F, Collado MD, Balieiro JC, Schwarz KR, de Castro FC, Watanabe OY, Watanabe YF, de Alencar Coelho L, Leal CL. (2016). Effects of melatonin during IVM in defined medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. *Theriogenology*, 86:1685-1694.
- Rodriguez-Osorio N, Kim IJ, Wang H, Kaya A, Memili E. (2007). Melatonin increases cleavage rate of porcine preimplantation embryos *in vitro*. *Journal Pineal Research*, 43:283–8.
- Saeedabadi S, Abazari-kia AH, Rajabi H, Parivar K, Salehi M. (2018). Melatonin improves the developmental competence of goat oocytes. *International Journal of Fertility and Sterility*, 12(2): 157-163.
- Saha S, Otoi T, Takagi M, Boediono A, Sumantri C, and Suzuki T. (1996). Normal calves obtained after direct transfer of vitrified bovine embryos using ethylene glycol, trehalose, and polyvinylpyrrolidone. *Cryobiology*, 33:291–299.
- Salehi M, Kato Y and Tsunoda Y. (2014). Effect of melatonin treatment on developmental potential of somatic cell nuclear-transferred mouse oocytes *in vitro*. *Zygote*, 22(2):213-7.
- Salmen JJ, Skufca F, Matt A, Gushansky G, Mason A, Gardiner CS. (2005). Role of glutathione in reproductive tract secretions on mouse preimplantation embryo development. *Biological Reproduction*, 73(2):308–14.
- Sandra O, Mansouri-Attia N, Lea RG. (2011). Novel aspects of endometrial function: a biological sensor of embryo quality and driver of pregnancy success. *Reproduction, Fertility and Development*, 24: 68–79.
- Saunders KM, Parks JE. (2000). Effects of cryopreservation procedures on the cytology and fertilization rate of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biological Reproduction*, 61:178–87.
- Schenck S L. (1880). Das Säugethierei künstlich befruchtet ausserhalb des mütterthieres. *Mitt. Embr. Inst. K. K. Univ. Wien.*; 1,107. Cited in: Brinster RL. (1968). *In vitro* culture of mammalian embryos. *Journal of Animal Science*, 27:1-14

- Schultz R.M. (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays News and Reviews in Molecular Cellular and Developmental Biology*, 15:531-538.
- Schwiebert R. (2007). The Laboratory Mouse. Laboratory Animals Centre National University of Singapore, page 10-11.
- Sharma S, Sarkar J, Haldar C, Sinha S. (2014). Melatonin reverses Fas, E2F-1 and endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis and dysregulation of autophagy induced by the herbicide atrazine in murine splenocytes. *Plos One*, 9:e108602.
- Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, and Trounson AO. (1997). Vitricification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll or Dextran. *Cryobiology*, 35:219–229.
- Shi JM, Tian XZ, Zhou GB, Wang L, Gao C, Zhu SE, Zeng SM, Tian JH, Liu GS. (2009). Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves *in vitro* maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *Journal of Pineal Research*, 47:318-323.
- Silvestre MA, Sanchez JP, Gomez EA. (2004). Vitricification of goat, sheep and cattle skin samples from whole ear extirpated after death and maintained at different storage times and temperatures. *Cryobiology*, 49 221–229.
- Smith RA, Porteous CM, Gane AM and Murphy MP. (2003). Delivery of bioactive molecules to mitochondria *in vivo*. *PNAS*, 100:5407–5412.
- Sohn IP, Ahn HJ, Park DW, Gye MC, Jo DH, Kim SY, Min CK, Kwon HC. (2002). Amelioration of mitochondrial dysfunction and apoptosis of twocell mouse embryos after freezing and thawing by the high frequency liquid nitrogen infusion. *Molecules and Cells*, 13(2):272–80.
- Stander S, Szepfalusi Z, Bohle B, Stander H, Kraft D, Luger TA, Metze D. (2001). Differential storage of hydroxyethyl starch (HES) in the skin: an immunoelectron-microscopical long-term study. *Cell Tissue Research*, 304(2):261–9.
- Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Goncalves PB, Wolf E. (2000). Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. *Biological Reproduction*, 64:904–9.
- Stolzin A, Naaldijk Y, Fedorova V, Sethe S. (2012). HES in cryopreservation-Mechanisms, benefits and problems. *Transfusion and Apheresis Science*, 46:137-147.
- Succu S, Pasciu V, Manca ME, Succu C, Laura TR, Leoni GG, Zinellu A, Carru C, Salvatore N, Berlinguer F. (2014). Dose-dependent effect of melatonin on postwarming development of vitricified ovine embryos. *Theriogenolog*, 81:1058–1066

- Takahashi T, Hirsh A, Erbe E, Williams RJ. (1988). Mechanism of cryoprotection by extracellular polymeric solutes. *Biophysical Journal*, 54(3):509–18.
- Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ, Sugino N. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, 44(3):280–7.
- Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y. (2013). Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocrine Journal*, 60:1-13.
- Tan DX, Chen L, Reiter RJ. (1994). Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 17:419-20.
- Thompson JG (1996). Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro*-produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reproduction, Fertility, and Development*, 9: 341–354.
- Thompson WL, Fukushima T, Rutherford RB, Walton RP. (1970). Intravascular persistence, tissue storage, and excretion of hydroxyethyl starch. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, 131(5):965–72.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391):1145-1147.
- Thomson LK, Fleming SD, Aitken RJ, De Iuliis GN, Zieschang JA, Clark AM. (2009). Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. *Human Reproduction*, 24(9):2061–70.
- Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. (2001). Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reproductive Biomedicine Online*, 3(1):25-29.
- Tian X, Wang F, He C, Zhang L, Tan D, Reiter RJ, Xu J, Ji P, Liu G. (2014). Beneficial effects of melatonin on bovine oocytes maturation: A mechanistic approach. *Journal of Pineal Research*, 57:239-247.
- Tian XZ, Wen Q, Shi JM, Liang W, Zeng SM, Tian JH, Zhou GB, Zhu SE, Liu GS. (2010). Effects of melatonin on *in vitro* development of mouse two-cell embryos cultured in HTF medium. *Endocrine Research*, 35:17-23.
- Tsang WH, Chow KL. (2009). Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *Biotechniques*, 46(7): 550–2.
- Tsang WH, Chow KL. (2010). Cryopreservation of mammalian embryos: Advancement of putting life on hold. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*, 90 163-175.

- Va'zquez M, Abecia J, Forcada F, Casao A. (2010). Effects of exogenous melatonin on *in vivo* embryo viability and oocyte competence of undernourished ewes after weaning during the seasonal anestrus. *Theriogenology*, 74: 618–626.
- Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H. (1996). Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Animal Reproduction Science*, 45:191–200.
- Vajta G, Booth PJ, Holm P, Greve T, Callesen H. (1997). Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the Open Pulled Straw (OPS) method. *CryoLetters*, 18:191–5.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. (1998). Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction Development*, 51:53-58.
- Vallorani C, Spinaci M, Bucci D, Porcu E, Tamanini C, Galeati G. (2012). Pig oocyte vitrification by cryotop method and the activation of the apoptotic cascade. *Animal Reproduction Science*, 135:68-74.
- Van Soom A, Boerjan ML, Bols P, Vanroose G, Lein A, Coryn M. and Kruif A. (1997). Timing of compaction and inner cell allocation in bovine embryos produced *in vivo* after superovulation. *Biology of Reproduction*, 57: 1041–1049.
- Vandevoort CA, Shirley CR, Hill DL, Leibo SP. (2008). Effects of cryoprotectants and cryopreservation on germinal vesicle-stage cumulus-oocyte complexes of rhesus monkeys. *Fertility and Sterility*, 90(3):805–16.
- Wai Hung Tsang and King L. (2009). Chow Mouse embryo cryopreservation utilizing a novel high-capacity vitrification spatula. *BioTechniques*, 46:550-552.
- Wang J, Sauer MV. (2006). *In vitro* fertilization (IVF): a review of 3 decades of clinical innovation and technological advancement. *Therapeutic and Clinical Risk Management*, 2(4):355–64.
- Wang JZ, Sui HS, Miao DQ, Liu N, Zhou P, Ge L, Tan JH. (2009). Effects of heat stress during *in vitro* maturation on cytoplasmic versus nuclear components of mouse oocytes. *Reproduction*, 137:181-189.
- Wang F, Tian X, Zhang L, Tan D, Reiter RJ, Liu G. (2013). Melatonin promotes the *in vitro* development of pronuclear embryos and increases the efficiency of blastocyst implantation in murine. *Journal of Pineal Research*, 55:267–274.
- Wang F, Tian X, Zhou Y, Tan D, Zhu S, Dai Y, Liu G. (2014). Melatonin Improves the Quality of *In Vitro* Produced (IVP) Bovine Embryos: Implications for Blastocyst Development, Cryotolerance, and Modifications of Relevant Gene Expression. *PLoS ONE*, 9(4): e93641.
- Wang X, Falcone T, Attaran M, Goldberg JM, Agarwal A, Sharma RK. (2002). Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and Sterility*, 78:1272-1277.
- Whitten WK. (1956). Culture of tubal ova. *Nature*, 179:1081-82.

- Whitten WK. (1957). The effect of progesterone on the development of mouse eggs *in vitro*. Journal of Endocrinology, 16:80-5.
- Whitten WK, Biggers JD. (1968). Complete development *in vitro* of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. Journal Reproduction and Fertility, 17: 399-401.
- Whitten WK. (1971). Nutrient requirement for the culture of preimplantation embryos *in vitro*. Advances in The Bioscience, 6:129-41.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196°C and - 269°C. Science (Wash DC), 178:411- 4.
- Wilmut I. (1972). Effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development on survival of mouse embryos during cooling and thawing. Life Science, 11:1071-9.
- Yamamoto HA, Mohanan PV. (2002). Melatonin attenuates brain mitochondria DNA damage induced by potassium cyanide *in vivo* and *in vitro*. Toxicology, 179:29–36.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS. (1998). Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. Human Reproduction, 4:998–1002.
- Yoneda A, Suzuki K, Mori T, Ueda J, Watanabe T. (2004). Effects of delipidation and oxygen concentration on *in vitro* development of porcine embryos. Journal of Reproduction and Development, 50:287–295.
- Yoo YM, Jung EM, Choi KC, Jeung EB. (2011). Effect of melatonin on mRNA expressions of transcription factors in murine embryonic stem cells. Brain Research, 1385:1–7.
- Yoshioka K, Othman AM, Taniguchi T, Yamanaka H, Sekikawa K. (1997). Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. Theriogenology, 48: 997–1006.
- Youngs CR, Leibo SP, Godke RA. (2011). Embryo cryopreservation in domestic mammalian livestock species. In: Hemming D (Ed). Animal Science Review. Oxfordshire, UK: CABI. pp. 245-256.
- Yu-Chieh Chen, Jiunn-Ming Sheen, Miao-Meng Tiao¹, You-Lin Tain and Li-Tung Huang (2013). Roles of Melatonin in Fetal Programming in Compromised Pregnancies. International Journal of Molecular Science, 14:5380-5401.
- Zarazaga LA, Celi I, Guzman JL, Malpoux B. (2010). Melatonin concentrations in the two jugular veins, and relationship with the seasonal reproductive activity in goats. Theriogenology, 74:221-228.

- Zhang JY, Diao YF, Oqani RK, Han RX, Jin DI. (2012). Effect of endoplasmic reticulum stress on porcine oocyte maturation and parthenogenetic embryonic development *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 86:128.
- Zhang Y, Li W, Ma Y, Wang D, Zhao X, Zeng C, Zhang M, Zeng X, Meng Q, Zhou G. (2016). Improved development by melatonin treatment after vitrification of mouse metaphase II oocytes. *Cryobiology*, 73(3):335-342
- Zhao XM, Min JT, Du WH, Hao HS, Liu Y, Qin T, Wang D, Zhu HB. (2015). Melatonin enhances the *in vitro* maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. *Zygote*, 23:525-536.
- Zhao XM, Hao HS, Du WH, Zhao SJ, Wang HY, Wang N, Wang D, Liu Y, Qin T, Zhu HB. (2016). Melatonin inhibits apoptosis and improves the developmental potential of vitrified bovine oocytes. *Journal of Pineal Research*, 60:132-141.

7.EKLER

EK 1

Kullanılan Çözeltiler

- **Çözdürme solüsyonu: 5,5 ml**

0,5675 gr Trehalose, 5 ml HTF ve 20 mg BSA ile 15 ml santrifüj tüpünde karıştırılıp, filtrelenip, +4°C de saklanarak kullanıldı.

- **Ekibilasyon solüsyonu: 5 ml**

0,2 ml Etilen glikol, 4,8 ml HTF ve 20 mg BSA 15 ml santrifüj tüpünde karıştırılıp, filtrelenerek, +4°C da saklanarak kullanılır.

- **Enzimli HTF: 30 ml**

3000IU/mg hiyalüronidaz 300 µg/ml konsantrasyon için ; -20°C da bekleyen 0.5mg hiyalüronidaz enzimi tartılarak, 15ml HTF ile karıştırılır. Kriyoviol tüplere aligotlanarak parafilmlemlenir, -20°C da saklanır.

- **Etanol % 70: 100 ml**

70 ml saf etanole 30 ml distile su eklenerek hazırlanır.

- **Dondurma solüsyonu: 2,5 ml**

0,875 ml EG, 1,625 ml HTF, 0,3785 gr Trehalose, 125 mg PVP ve 10 mg BSA ile 15 ml santrifüj tüpünde karıştırılıp filtrelenerek deney günlerinde taze hazırlanarak kullanılır.

- **HCG solüsyonu: 1 ml**

1500 IU PregnylFalkon tüpe 1,5 ml serum fizyolojik eklendi. 30 adet ependorfa 50 µl olacak şekilde bölündü. Üstlerine 950 µl SF koyularak 1 ml'e tamamlandı. Parafilmlemlendi ve -80 °C de saklandı.

- **HTF Dış ortam manipülasyon medyumu: 50 ml**

Manyetik karıştırıcının üzerinde, steril beherin içine 49 ml MCZB eklendi ve içine balık yerleştirildi. İyiyce karışıp çözünmeleri beklenerek kimyasallar sırayla çözeltiye eklendi; 260 mg HEPES tartıldı ve eklendi. 21 mg NaHCO₃ tartıldı ve eklendi. 12,5 mg CaCl₂ · 2H₂O tartıldı ve eklendi. pH ölçüldü ve 7,5 a sabitlendi. 4 mg/ml BSA eklendi ve milipor filtreden geçirilerek yapım tarihinden sonra 1 ay kullanılmak üzere +4°C a kaldırıldı.

- **KSOM medyum: 15 ml**

Firmadan hazır gelen medyum 1ml miktarlar ile bölüştürüldü. Parafilmendi. +4°C da saklandı. Medyumlar kullanımdan hemen önce 4mg/ml BSA ile karıştırıldı. Filtrelenerek kullanıldı.

- **Melatoninli medyum: 1 ml**

Deneyden hemen önce hazırlanan 4mg/ml BSA + KSOM medyum filtrelendi. 10^{-9} M olarak hazırlanmış melatonin çözeltisinden 0,5 µl çekildi. 499,5 µl KSOM medyum ile karıştırılarak 10^{-12} M melatonin(medyum=4mg/ml BSA + KSOM medyum + 10^{-12} M melatonin) konsantrasyona getirildi. 10µl'lik damlacıklar halinde hazırlandı ve mineral yağ ile kaplandı. Deney günlerinde taze hazırlanarak gazlanması için inkübatörde saklandı.

- **Master Stok Solüsyonu(MCZB)(250 ml):**

Manyetik karıştırıcının üzerinde, steril beherin içine 100 ml otoklavlı distile su(dH_2O)(26°C) eklenerek içine balık yerleştirildi. İyice karışıp çözünmeleri beklenerek kimyasallar sırayla çözeltiye eklendi; 1190 mg NaCl tartıldı, eklendi. 90 mg KCl tartıldı, eklendi. 72,5 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartıldı eklendi. 40 mg KH_2PO_4 tartıldı, eklendi. 10 mg EDTA tartıldı, eklendi. 250 mg D—glukoz tartıldı, eklendi. 1,325 ml EDTA eklendi. 2,5 ml pen-streptomisin eklendi. En son üstüne 144,1 ml dH_2O eklenerek medyum milipor filtreden geçirilerek yapım tarihinden sonra 3-4 ay kullanılmak üzere +4°C a kaldırıldı.

- **PMSG solüsyonu: 1 ml**

-80°C 'den alınan stok MSD; 1000µl-1000UI' den 20 adet santrifüj tüpüne 50µl miktarlarla ayrıldı. Üstlerine 950 µl SF koyularak 1 ml'e tamamlandı. Parafilmendi ve -80 °C de saklandı.

- **HCl (pH 7,5)**

1 N HCl kullanılarak pH'sı 7.5 e ayarlanır.

EK 2**KULLANILAN CİHAZLAR****ÜRÜN KODU****FİRMA ADI**

Ağız Pipeti

P1049-1PAK

Sigma-Aldrich

Buzdolabı, Derin Dondurucu

Arçelik

Cam Serolojik Pipet Uçları

StripettePipets

Corning

Cerrahi Set

Mouse Surgical Kit

Kent Scientific

Criovial tüp

607001

Nest

Dikey akışlı güvenlik kabini

0000045372

Alpina

Distile Su Cihazı

Milli Q integral 5

Millipor

Dondurucu (-80°C)

Ultra
TempetureFreezer
Premium U570New Brunswick
Scientific

Filtre steril (0,22 µm)

27415069

Corning

Floresan ataçmanlıinvert mikroskop

Carl Zeiss

Güç Kaynağı

Nikon

Hassas Tartı

M-power

Sartorius

Hayvan Kafes Sistemi

Ecoflow

IVC

Invert Mikroskop

SZM 745

Nikon

Isıtıcı tabla

Linkam

İnkübatör

Galaxy 14S

New Brunswick
Scientific

Kar-buz makinası

AF80

Scotsman

Manyetik Karıştırıcı

BPX000613180

Benchmark

Mikropipetler (10µl-20µl-200µl-1000µl)

Axygen

Motopet

12627305

Axygen

Lam, Lamel

5501083

Thermo

Otoklav

OT-100V

Nüve

Petri (35 mm, 60mm)

353001-4

Falcon

Petri (merkez petri, 4 kuyulu petri)

30004

Oosafe

pH Metre

Starter 3000

Ohaus

Santrifüj tüpü (2ml, 15ml, 50ml)

SCT-ml-25S

Axygen

Sıvı azot tankı ve ikmal tankı

M4493

MV

Vorteks

BW100

Benchmark

EK3**KULLANILAN KİMYASALLAR****ÜRÜN KODU FİRMA ADI**

BSA	A3311	Sigma
D-glukoz	G6152	Sigma
DMSO	D2550	Sigma
EDTA disodyum tuzu	ED2SS	Sigma
Etanol (%99 Saf Ethanol)	1.00983.2511	Millipor
Etilen Glikol, EG	EG E-9129	Sigma
HCG	Chorulon	MSD
HCl	1.09060.1000	Millipor
HEPES	H3784	Sigma
Hiyolürinidaz	H3884	Sigma
Hoeschst	H33258	Sigma
Kalsiyum KloridDehidrat, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	C5080	Sigma
KSOM medyum	CE 0086	Life Global Stem
LaktatSodik %60 (v/v)	L1375	Sigma
Melatonin, <i>N-Acetyl-5-methoxytryptamine</i>	M5250	Sigma
Magnezyum Sülfat Heptahidrat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	M5921	Sigma
Mineral yağ	CE 0086	Life Global
Penisilin-Streptomisin	15140122	ThermoFisher
PropidiumIodide, PI	P-4170	Sigma
PMSG	Folligon	MSD
Potasyum Klorür, KCl	S5405	Sigma
Potasyum dihidrojen Fosfat, KH_2PO_4	P5379	Sigma
PVP	P0930	Sigma
Serum Fizyolojik, SF	P1710056	Polifarma
Sodyum Bikarbonat, NaHCO_3	S5761	Sigma
Sodyum Klorür, NaCl	S7653	Sigma
Trehalose	T0167	Sigma

ÖZGEÇMİŞ

Kübra ÇAĞLAR: 18.11.1993 tarihinde İstanbul’da doğdu. İlköğretimini Emlak Kredi Bankası İlköğretim Okulu’nda, ortaöğretimini İMKB Ortaokulu’nda, lise öğrenimini Hadımköy Örfi Çetinkaya Anadolu Lises’nde tamamladı. İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümünden 2016 yılında mezun oldu. 2016 yılında Namık Kemal Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2016 yılı güz döneminden günümüze yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

