

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUN'I TOHUMLAMA
ANABİLİM DALI

80008

DANIŞMAN
Prof. Dr. İ. Kamuran İLERİ

FARE EMBRİYOLARININ İN VİTRO KÜLTÜRÜNDE FARKLI BSA ORANLARININ GELİŞİME ETKİSİ

DOKTORA TEZİ

Veteriner Hekim
MİTHAT EVECEN

İSTANBUL - 1999

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

80008



Bu alışma İ.Ü. Araştırma Fonu tarafından T- 248/360696 numaralı proje ile desteklenmiştir.

1. İçindekiler	
2. Teşekkür	
3. Giriş ve Amaç.....	1
4. Genel Bilgiler.....	3
4.1. Dişi Farelerde Reprodüksiyon.....	3
4.1.1. Reprodüktif Organlar ve Puberteye Ulaşma Yaşı.....	3
4.1.2. Seksüel Aktivite ve Östrus Siklusları.....	3
4.1.3. Ovulasyon Mekanizması	3
4.1.4. Gebeliğin Oluşması ve Embriyonun Gelişme Aşamaları.....	4
4.2. Farelerde Embriyo Eldesi.....	5
4.2.1. Verici Farelerin Eldesi ve Seçimi	5
4.2.2. Verici Farelerde Süperovulasyon.....	5
4.2.2.1. Gonadotropinlerin Uygulama Zamanı.Ve Çiftleşme Kontrolü.....	7
4.2.3. Embriyoların Kazanılması.....	7
4.2.3.1. Yıkama Medyumu ve Hazırlanması.....	7
4.2.3.2. Ovidukt'tan Embriyo Eldesi.....	8
4.2.4. Kazanılan Embriyoların Değerlendirilmesi.....	9
4.3. Embriyoların İn Vitro Kültürü.....	9
4.3.1. İn Vitro Kültür Sistemleri.....	9
4.3.2. İn Vitro Kültür Ortamının Gaz Bileşenleri.....	10
4.3.3. İn Vitro Kültür Medyumları.....	11
4.3.4. İn Vitro Kültür Medyumlarının pH' sı.....	12
4.3.5. İn Vitro Kültür Medyumlarının Enerji Kaynakları	12
4.3.6. İn Vitro Kültür Medyumlarının Protein Kaynakları.....	13
4.4. İn Vitro Kültür Periyotları ve Embriyoların Gelişimsel Kontrolleri.....	14
4.4.1. Embriyoların Hücre Sayılarının Tespiti.....	16
5. Gereç ve Yöntem.....	18
5.1. Gereç.....	18
5.1.1. Çalışmada Kullanılan Farelerin Üretilmesi ve Bakımı.....	18
5.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	18
5.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	20
5.1.4. Gonadotropinlerin Hazırlanması.....	21
5.1.5. Yıkama Medyumunun (M2) Hazırlanması.....	21

5.1.6. Kùltür Medyumlarının Hazırlanması.....	22
5.1.7. BSA Konsantrelerinin Hazırlanması ve Dozlanması.....	24
5.1.8. İn Vitro Kùltür Kapları.....	25
5.2. Yöntem.....	26
5.2.1. Verici Farelerden Embriyo Eldesi.....	27
5.2.1.1. Verici Farelerin (Donor) Süperovulasyonu.....	27
5.2.1.2. Verici Farelerden Ovidukt Eldesi.....	28
5.2.1.3. Oviduktlardan Embriyo Eldesi.....	28
5.2.1.4. Kazanılan Embriyoların Değerlendirilmesi.....	29
5.3. Kùltür Periyodları ve Embriyoların Gelişimsel Kontrolleri.....	29
5.3.1. Embriyoların Fikzasyonu ve Boyanması.....	30
6.Bulgular.....	32
6.1. Süperovulasyon Sonuçları.....	32
6.2. İn Vitro Kùltür Sonuçları.....	34
6.2.1. M 16 ve Whitten's Medyumlarında Kùltüre Alınan Embriyoların Gelişim Oranları.....	42
6.2.2. İn Vitro Kùltür Periyodunun İlk 24 Saatlik Dönemine Ait Gruplar Arası Gelişim Oranları	44
6.2.3. İn Vitro Kùltür Periyodunun 48 Saatlik Dönemine Ait Gruplar Arası Gelişim Oranları	45
6.2.4. İn Vitro Kùltür Periyodunun İlk 72 Saatlik Dönemine Ait Gruplar Arası Gelişim Oranları	46
6.2.5. İn Vitro Kùltür Periyodunun İlk 96 Saatlik Dönemine Ait Gruplar Arası Gelişim Oranları	46
6.2.6. M 16 Medyumunda Gelişen Hatching Blastosist Oranları.....	47
6.2.7. M 16 Medyumunda Gelişen Hatched Blastosist Oranları.....	47
6.2.8. M 16 Medyumunda Gelişen Hatching + Hatched Blastosist Oranları.....	48
6.2.9. Whitten's Medyumunda Gelişen Hatching Blastosist Oranları.....	48
6.2.10. Whitten's Medyumunda Gelişen Hatched Blastosist Oranları.....	49
6.2.11. Whitten's Medyumunda Gelişen Hatching+Hatched Blastosist Oranları.....	49
6.3. Medyumlar ve Gruplar Arasında Gelişen Hatching Blastosist Oranları.....	50
6.4. Medyumlar ve Gruplar Arasında Gelişen Hatched Blastosist Oranları.....	51
6.5. Medyumlar ve Gruplar Arasında Gelişen Hatching+ Hatched Blastosist Oranları.....	51

6.6. Embriyoların İn Vitro Kùltürü ve Embriyonik Hücre Sayılarının Tespiti.....	52
6.6.1. Süperovulasyon Sonuçları.....	53
6.6.2. M 16 Medyumunda Kùltüre Alınan Embriyoların Hücre Çekirdek Sayıları.....	55
6.6.3. Whitten's Medyumunda Kùltüre Alınan Embriyoların Hücre Çekirdek Sayıları.....	55
7. Tartışma.....	60
8. Özet.....	73
9. Summary.....	77
10. Kaynaklar.....	80
11. Özgeçmiş.....	85



2.TEŞEKKÜR

Öncelikle, beni büyük bir özveriyle okutarak bu günlere gelmemi sağlayan aileme ve çalışmalarımda bana her zaman destek olan sevgili eşime şükranlarımı sunarım.

Çalışmalarımızda engin bilgi ve birikimleriyle bizlere her zaman ışık tutan Anabilim Dalı Başkanımız ve danışman hocam sayın Prof. Dr. İ. Kamuran İLERİ başta olmak üzere, doktora çalışmamın her aşamasında gerek bilgi ve gerekse de becerilerinden yararlandığım Anabilim Dalımız öğretim üyesi Doç. Dr. Serhat PABUÇÇUOĞLU' na ve yine her zaman tecrübelerinden yararlandığım Anabilim Dalımız öğretim üyeleri Doç. Dr. Sema BİRLER ile Doç. Dr. Kemal AK'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca çalışmamın değişik aşamalarında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalımızın diğer çalışanlarına da teşekkürü borç bilirim.



3. Giriş ve Amaç

Nüfusu hızla artan dünyamızda, bu artışa paralel olarak hayvansal gıda ve ürün ihtiyacı da gitgide artmaktadır. Dünya hayvan yetiştiriciliğinde bilimsel yöntemlerin kullanılmaya başlanmasıyla birlikte bilim adamları bu konuya dikkat çekmiş ve tedbir olarak, üstün nitelikli hayvanları kullanarak düşük verimli hayvan popülasyonunun fenotipik ve genotipik özelliklerini iyileştirme çabası içine girmişlerdir.

Bu amaçla, başlangıçta iyi kalitedeki erkek hayvanlar kullanılarak sun'i tohumlama yöntemiyle melezleme çalışmaları başlatılmış ve sonuçta saf ırka ulaşmak hedeflenmiş ancak bu yöntemle istenilen sonuca uzun bir sürede ulaşılması, hayvan ıslah çalışmaları açısından bir dezavantaj oluşturmuştur.

Sonraki yıllarda araştırmacılar, yüksek verim özelliklerine sahip dişi hayvanları da kullanarak daha kısa sürede ve tek bir jenerasyonda istenilen sonucu veren Embriyo Transferi Teknolojisini geliştirerek uygulamaya koymuşlardır. Ancak bu yöntemde embriyo başına düşen maliyetin yüksek olması nedeniyle araştırmacılar, mezbaha materyali ovaryumlardan elde edilen oositlerin in vitro olgunlaştırılması, in vitro fertilizasyonu ve in vitro kültürü sonucunda çok daha ucuz yoldan kaliteli embriyo eldesi yoluna giderek, İn Vitro Fertilizasyon-Embriyo Transferi teknolojisini geliştirmişlerdir.

Bununla birlikte araştırmacılar, iyi kalitedeki bir embriyodan maksimum düzeyde yararlanmak amacıyla, embriyo cerrahisi teknolojisi ve embriyonun uzun süreli saklanması ve uluslararası transportuna imkan veren embriyo dondurma teknolojilerini devreye sokmuşlardır.

Araştırmacılar bunlarla yetinmeyip, özellikle son birkaç yıl içinde büyük gelişmeler kaydeden ve mevcut bir bireyin kopyasını yapmaya yönelik olan Genetik Kopyalama yöntemini de başarıyla uygulamışlardır.

Yukarıda bahsi geçen biyoteknolojik yöntemlerin tamamında dişi genital organlarında mevcut olan ve değişik gelişme dönemlerindeki oosit ve ya embriyoların dış ortama (in vitro ortama) alınarak bir süre bekletilmesi, incelenmesi, geliştirilmesi ve ya birtakım manipülasyonlara tabi tutulması gerekmektedir.

Embriyo veya oositlerin, in vitro ortamda canlılığını sürdürebilmesi ve geliştirilmesi için ortam sıcaklığının, gaz bileşenlerinin, enerji ve protein kaynaklarının, pH ve osmolaritenin optimal derecede in vivo koşullara benzerlik göstermeleri gerekmektedir. Böylece kısa sürede, ucuz ve kaliteli embriyo elde edilme hedefi; in vitro kültür sistemlerinin geliştirilmesi ve optimize edilmesini gerektirmektedir.

Bu çalışma, in vivo olarak gelişmiş iki hücreli fare embriyolarının 96 saat boyunca in vitro kültüre tabi tutularak, in vitro kültür ortamında gelişim aşamalarını sırasıyla

izlemek, ideal bir embriyonal gelişim için gereken en iyi medyum tipini ve optimum protein miktarını tayin etmek amacıyla yapılmıştır.



4. Genel Bilgiler:

4.1. Dişi Farelerde Reprodüksiyon :

Dişi farelerde reprodüksiyon dört ana başlık altında incelenebilir.

4.1.1. Reprodüktif Organlar ve Puberteye Ulaşma Yaşı

Dişi farelerde ovaryumlar, darı tanesi büyüklüğünde ve böbreklerin hemen kaudalinde yer alırlar. Ovaryum ve infundibulum şeffaf bir ovaryan kapsül ile kuşatılmıştır. Puberteye ulaşmamış farelerde ovaryum yüzeyi parlak ve kaygan, puberteye ulaşanlarda ise oluşan follikül ve corpus luteumlardan dolayı girintili-çıkıntılı olarak görülür (21,33).

Ovidukt, 1.7 cm. uzunluğunda kıvrımlı bir boru olup, kornu uteri ve ovaryumun periovaryan yüzü ile temastadır (21).

Ovidukt 3 segmentten oluşur : Ovaryumla bağlantılı infundibulum, genişleyen kısımla devam eden ampulla ve kornu uteri ile birleşmiş olan istmus kısmıdır (23,33).

Uterus, Y biçiminde olup iki kornu ve bir gövdeden oluşarak serviks uteri ile vaginaya açılır (21,23).

Dişi farelerde puberteye ulaşma yaşının ırka ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte, ortalama 6 hafta olduğu ve puberteye ulaşmış bir farenin her bir ovaryumunda değişik gelişme dönemlerindeki 10^4 adet oositi içerdiği bildirilmektedir (23).

Ovaryumlarda mevcut oositlerde, mayoz bölünmelerin fetal hayatın erken dönemlerinden başlayarak doğuma kadar devam ettiği, doğumda bu bölünmelerin 1. metafazın diplotene safhasında durduğu ve bu duraklamanın puberteyle birlikte preovulatr gonadotropik hormonların etkisinin başlamasına değin devam ettiği bildirilmektedir. (22).

4.1.2. Seksüel Aktivite ve Östrus Siklusu

Fareler, mevsime bağlı olmayan poliöstrus gösteren hayvanlardır. Östrus siklusu 4 - 5 gün, östrusta kalma süresi 9 - 20 saat arasında olurken, ovüle olan ovanın yaşama süresi de 10 - 12 saat civarındadır (22).

4.1.3. Ovulasyon Mekanizması

Fare ovaryumlarında mevcut çok sayıdaki oositin doğumdan sonraki 2 - 3 hafta içerisinde 300'e kadar indiği ve bu sistemi kontrol eden mekanizmalar hakkındaki bilgilerin henüz yetersiz olduğu bildirilmektedir (23).

Ovulasyon olayı, ovaryum hücrelerinin ve oositin hormonal stimülasyona; uygun koşullar altında, koordineli bir cevap vermesine bağlı olarak gelişen bir fenomendir (23).

Ovulasyon her dört günde bir spontan olarak meydana gelmesine karşın, bu süreç çevresel faktörlerce etkilenebilmektedir. Her bir siklusta hipofiz bezinden salınan FSH'nın yükselen dozlarına sadece birkaç follikül cevap verir. Böylece follikül gelişerek, ovaryumun yüzeyine doğru harekete geçer ve artık son olgunlaşma dönemiyle birlikte oositi bırakmak için hazırdır (23).

Bu sırada, yükselen LH seviyesi oositin nüklear olgunlaşmasını ve 1.ci kutup cisimciğinin perivitellin boşluğa atılmasını sağlarken oosit follikül dışına atılır. Ovulasyon olarak adlandırılan bu olay; karanlık periyodun ortasında meydana gelir (23,33).

Ovule olan oositler, oviduktun açık olan infundibulum bölümünden içeri girer ve fertilizasyon bölgesi olan ampulla bölgesine birkaç dakika içinde ulaşır (22).

Araştırmacılar, doğal bir ovulasyonda, farenin ırkına bağlı olarak değişmekle birlikte ortalama 8 - 12 yumurtanın bırakıldığını bu olayın senkronize olmayıp 2 - 3 saat içinde tamamlandığını ve ovule olan bir oositin de ortalama 87 µm çapında olduğunu bildirmişlerdir (23,33).

4.1.4. Gebeliğin Oluşması ve Embriyonun Gelişim Safhaları

Hogan ve ark (23), doğal bir çiftleşmede her bir ejakülatta yaklaşık olarak 58×10^6 adet spermatozoonun dişi genital kanalına bırakıldığını, bazı spermatozoonların 5 dakika içinde fertilizasyon yeri ampullaya ulaştıkları halde fertilizasyonun 1 saatten önce gerçekleşemediğini ve bu sürenin de mekanizması tam olarak açıklanamayan kapasitasyon için gerekli olduğunu bildirmişlerdir (23).

Fertilizasyon olayının, 2. mayoz bölünmeyi aktive ederek ikinci polar cismin perivitellin boşluğa atılmasını sağladığını bildiren araştırmacılar, haploid kromozom taşıyan erkek ve dişi pronukleusların, spermatozoonun içeriye girmesinden 6 saat sonra oluştuğunu, bunun ardından 2 - 4 saat içinde DNA replikasyonu meydana geldiğini ve bu sırada pronukleus membranları kaybolan kromozomların serbest kalarak birleştiği (Singami), ve ardından 1. bölünme aşamasının meydana geldiğini bildirmişlerdir (22,23,33).

Farelerde vaginal plakın görüldüğü günü, gebeliğin 0.5'nci günü kabul eden araştırmacılar, çiftleşme zamanını başlangıç noktası olarak aldıklarında, in vivo ortamda; 1. polar cismin bundan 2 - 5 saat sonra atıldığını, 1. bölünme aşamasının 17 - 20 saat sonra meydana geldiğini, iki hücreli dönemin 1.5 gün, kompakt morula döneminin 2. - 3.5 gün, blastosist döneminin 3.5 - 4 gün sonra geliştiğini ve implantasyonun da 4.5 gün sonra oluştuğunu bildirmişlerdir (22,23,33, 37).

4.2.Farelerden Embriyo Eldesi

Farelerden maksimum sayıda embriyo eldesi, uygun verici farelerin seçimi ve bunların uygun gonadotropinlerle süperovulasyonu sonrasında mümkün olmaktadır (23).

4.2.1.Verici Farelerin (Donor Farelerin) Eldesi ve Seçimi

In vitro kültür çalışmalarında kullanılan fare ırklarının farklı sonuçlar vermesi nedeniyle, çalışılacak ırkların özenle seçilmesi gerekmektedir (23,37,50,56).

Fare üretim programının da amaca hizmet edecek şekilde planlanması ve kullanılacak materyal sayısının göz önüne alınarak programlı bir şekilde yürütülmesi gerekmektedir (5,23).

Embriyo eldesi amacıyla senkronizasyon ve süperovulasyon çalışmalarında elde edilecek embriyo sayısının göz önünde bulundurulması gerektiği ve ırka bağlı olarak değişmekle birlikte, süperovulasyona verilecek cevabın da ortalama % 50-% 80 civarında olabileceği bildirilmiştir (23, 37).

Araştırmacılar bu tip çalışmalarda managmentin önemine dikkat çekerek, farelerin 22 - 24°C ısı ve % 50 - 55 nem içeren LABORATUAR koşullarında add libitum yem ve su ile beslenmeleri gerektiğine işaret etmişlerdir (3,5,23,44).

İdeal bir östrus periyodunun sağlanması amacıyla birçok araştırmacı, ortam aydınlatmasının 10 saat karanlık - 14 saat aydınlık programına göre ayarlanabileceğini bildirirken (3,23,24,35,38,39,44,45,62), bazı araştırmacılar da 12 saat karanlık-12 saat aydınlık periyodunun da aynı amaca hizmet edebileceğini belirtmişlerdir. (5,37,58).

Hogan ve ark. (23), hem C57BL6J ve BALB/C ırklarını, hem de bunların F1 melezlerini (C57BL6J X BALB/C) yüksek ovulasyon yeteneğine sahip ırklar arasında göstermişlerdir.

Farelerde en iyi ırkları embriyo verimi ve doğurganlık yönünden inceleyen Arat ve ark (4), (C57BL6J X BALB/C) F1 hibritlerini, gerek süperovulasyon uygulaması sonuçları ve gerekse embriyo transferi sonrası doğum oranları yönünden diğer ırklardan daha üstün bulmuştur.

Birçok araştırmacı, yüksek sayıda embriyo eldesine imkan vermesinden dolayı yaptıkları benzer çalışmalarda aynı hibritleri tercih etmişlerdir. (2, 3, 5, 37,67).

4.2.2.Verici Farelerde Süperovulasyon

Gonadotropik hormonların (PMSG, FSH, HMG) eksojen yolla verilmesiyle dişilerin östrusta daha fazla ovum üretmesini sağlayarak embriyo sayısını artırma olayı "süperovulasyon" olarak tanımlanmaktadır (23).

Hipofiz ön lobundan salgılanan ve glikoprotein yapısında olan FSH bir gonadotropindir. Yarılanma ömrünün kısa olması, bu hormonun süperovulasyon çalışmalarında tekrarlı dozlar halinde kullanılmasını gerektirmektedir (27).

Gebe kısırakların endometriumlarında fetal trofoblast hücreleri tarafından salgılanan PMSG ise, daha çok FSH ve az olarak da LH benzeri etkiye sahip olmakla birlikte, yarılanma ömrünün uzun olmasından dolayı, follikül gelişimini sağlamak ve süperovulasyon yaptırmak amacıyla kullanılabilmesi için tek enjeksiyonun yeterli olacağı bildirilmektedir (23,27). hCG ise süperovulasyonun indüklenmesi amacıyla kullanılan LH karakterli bir gonadotropindir (23).

Süperovulasyon amacıyla kullanılacak farelerin birkaç gün aydınlık-karanlık döngüsüne tabi tutulması gerektiği ve bununla birlikte, hCG enjeksiyonundan önce, endogen LH salınımının ırklara göre değişmekle birlikte PMSG enjeksiyonunu takip eden 2. karanlık periyodun orta noktasında şekillendiği bildirilmiştir (23).

Örnek olarak, ışığın sabah 5'te yakılıp akşam 7'de söndürüldüğünde, PMSG enjeksiyonunun öğleyin saat 1 - 2' de uygulanması, bundan 46 - 48 saat sonra hCG enjeksiyonunun yapılmasının gerektiği ve bunun hemen ardından her bir dişinin bir erkeğin yanına konması ve ertesi sabah çiftleşmenin kanıtı olarak vaginal plakların kontrol edilmesi gerektiği bildirilmiştir (23).

Dişilerde çiftleşmenin kanıtı olan vaginal plağın, erkeğin seminal sıvısının koagüle olmuş proteinlerinden oluştuğu ve bunun pek çok ırkta rahatça görülebildiği bildirilmiştir (23).

Vaginal plağın çiftleşmeden 12 - 24 saat sonra kaybolacağı ve dolayısıyla plak kontrolünün sabah erken saatlerde yapılması gerektiği bildirilmiştir (23).

Üretim amacıyla kullanılacak farelerin ırka bağlı olarak değişmesiyle birlikte, erkeklerin 6 - 8 haftalık, dişilerin ise 4 - 16 haftalıkken kullanılabilecekleri, ancak süperovulasyonda kullanılacak dişilerin ise genellikle 3 - 5 haftalık yaşlarda olması gerektiği bildirilmiştir (23).

Bazı araştırmacılar çalışmalarında optimal embriyo eldesi için immature fareleri kullanırken (18,35,49,59,64), bazıları da, tercihen puberteye ulaşmış fareleri kullandıklarını bildirmişlerdir (3,7,8,26,31,34, 38, 43,45,48,55,61,63).

Nitekim Neal ve Baker.(49), buna paralel olarak, PMSG ve hCG ile yaptıkları süperovulasyon çalışmalarında gonadotropinlere en iyi yanıtın 28 günlük immature farelerden alındığını bildirmişlerdir.

Pek çok fare ırkında optimal PMSG ve hCG dozlarının 5 i.ü.. olduğu bildirilirken, PMSG'nin s.c. ve ya tercihen i.p. verilmesi gerektiği, ancak hCG' nin süperovulasyon yaptırabilmesi için endogen LH salınımından önce sirkülasyona girmesi gerektiği dolayısıyla da i.p. yolla verilmesinin şart olduğu bildirilmiştir (23).

4.2.2.1. Gonadotropinlerin Uygulama Zamanı ve Çiftleşme Kontrolü

PMSG ve hCG'nin farelerde kullanımı, ışık döngüsüyle ayarlanarak, hem yumurtlamada gelişimsel birörneklilik, hem de yeterli sayıda embriyo kazanımı sağlanabilir. Çoğu fare ırklarında; PMSG enjeksiyonu ile hCG enjeksiyonu arasındaki 42-48 saatlik zaman aralığı optimaldir. Ovulasyon genel olarak hCG enjeksiyonundan sonra 10 - 13 saatlik bir süre içerisinde oluşur. PMSG' ye bir cevap olarak salınan endogen LH' nin aydınlık ve karanlık periyot ile regüle edildiği ve dolayısıyla ovulasyonun zamanını tam olarak kontrol etmek için endogen LH salınımına paralel olarak hCG uygulamak gerektiği bildirilmiştir (23).

Çeşitli araştırmacıların kullandıkları ışık döngüsü ve gonadotropin dozları hemen hemen birbirine yakınlık göstermektedir. Pek çok araştırmacı, ışık döngüsünü 14 saat ışık - 10 saat karanlık periyoduna göre ayarlamış ve PMSG 'yi 5 - 10 i.ü. ve 46 - 48 saat sonra 5 - 10 i.ü. hCG 'yi yine i.p. yolla yaparak, dişileri fertil erkeklerin yanına almış ve ertesi sabah çiftleşmenin kanıtı olarak vaginal plak kontrolü yapmışlardır (1,3,37,44,45, 46,59, 60,61,62).

4.2.3. Embriyoların Kazanılması

Embriyoların, kronolojik yaşlarına göre dişi genital kanalın uygun yerlerinden çeşitli yıkama vasatları yardımı ile yıkamak suretiyle toplanabilecekleri; ancak bunun için yıkama vasatlarının önceden hazırlanmış ve uygun ısıya getirilmiş olmasının gerektiği bildirilmiştir (23).

4.2.3.1. Yıkama Medyumu ve Hazırlanması

Bazı araştırmacılar, çalışmalarında yıkama medyumu olarak değişik vasatlar kullanmışlarsa da (34,45,64), birçok araştırmacı bu amaçla uzun süreli in vitro ortamlarda pH stabilitesini sağlamadaki güvenilirliğinden dolayı, M2 yıkama medyumunu tercih etmiştir (2,3,18,37,40,59).

Yıkama ve kültür medyumları yoğun konsantrasyondaki stoklar halinde hazırlandığı takdirde 3 ay boyunca -20°C'de saklanabileceği, ancak medyumun ana stoklardan taze olarak hazırlandığı durumlarda +4°C'de 1 hafta içerisinde kullanılması gerektiği bildirilmiştir (23).

M2 medyumuna pH 'sının 0.2 N. NaOH ile 7.2 - 7.4'e ayarlanması gerektiği bildirilirken; bir süre CO₂ inkübatörünün dışında tutulan medyumun pH' sınırını aşırı alkaliye kayacağından dolayı, yapısındaki bikarbonatın azaltılarak yerine hepes tamponu kullanıldığı bildirilmiştir (23).

Petri kutusu içine M2 medyumu konulduktan sonra üzerinin mineral yağ ile örtülmesi gerektiği (23), ardından 37°C' de 1-6 saat inkübe edildikten sonra embriyo kazanım işlemine başlanabileceği bildirilmiştir (23,59,60).

Hogan ve ark.(23)'nın bildirdiğine göre, fare embriyolarının eldesinde kullanılan ve embriyoların CO₂ inkübatörüne ihtiyaç duymaksızın uzun süre dışarıda tutulabilmesine olanak sağlayan M 2 medyumu bu denli araştırmalarda tercihen kullanılmaktadır.

4.2.3.2. Ovidukt' tan Embriyo Eldesi

İki hücreli fare embriyoları elde edilmek istendiğinde, süperovüle edilmiş dişilerden vaginal plak gösterenlerinin hCG enjeksiyonundan 26 - 47 saat sonra servikal dislokasyon yöntemiyle öldürülebilecekleri (23,46,60,62) ve ardından operasyona alınabilecekleri bildirilmiştir (1,23,26, 44,46,58,60,61).

Öldürülen farelerin abdominal bölgesi bir makas yardımı ile kesilir ve üreme organlarından ovidukt ve ovaryumlar, etrafındaki yağ tabakası ile birlikte çekilerek abdominal boşluğun dışına alınır. Ardından ovidukt, ovaryum ile cornu uteri arasından dikkatlice kesilir ve yıkama medyumu içerisine alınır. Burada ovidukt, çevresindeki dokulardan temizlenir ve embriyo kazanımına hazır hale getirilir (23).

Kraemer ve Bowen (35), vaginal plağın görüldüğü günün birinci gebelik günü kabul edilmesi halinde, tubal dönem embriyolarının üçüncü güne kadar ovidukt'tan toplanabileceğini ve bu amaçla iki farklı yöntemin bulunduğunu belirtmişlerdir. Birinci yöntemde: Ovidukt, utero - tubal bağlantı yeri ve ovaryum yüzeyinden kesildikten sonra, yıkama medyumu içeren bir petriye alınır ve ardından ovidukt ikiye bölündükten sonra, her iki yarımı 30 gauge'lik bir hipodermik iğne ile ayrı ayrı; ikinci yöntemde ise, ovidukt tek parça halinde, yine ampulla kısmından istmus'a doğru 30 gauge'lik bir hipodermik iğne ile yıkandığını belirtmişlerdir.

Pek çok araştırmacı, bu tip çalışmalarda embriyoları çevre ısılarının olumsuz etkilerinden korumak amacıyla, kültür aşamasına gelene değin, toplama ve bekletme ısılarının 32 - 37°C' de sabit tutulması gerektiğini bildirmişlerdir (3,5,11,23).

Bununla birlikte araştırmacılar, in vitro ortamda embriyo toplama işleminin mümkün olan en kısa sürede bitirilmesi gerektiğini bildirirlerken, bu sürenin de iki saati aşmaması gerektiğini vurgulamışlardır (23,39).

Pike ve Alikani. (55), çalışmalarında farelerin öldürülmesi ve embriyoların ovidukt'tan toplanması arasında geçen süre ile bu embriyoların in vitro kültürü sonucunda blastosiste ulaşma oranları arasında ters bir korelasyon olduğunu ve bu olaydaki dejenerasyona embriyoların ovidukt' ta beklemesi esnasında kısmi O₂ basıncındaki azalmayla birlikte, CO₂ ve laktik asit gibi solunum ürünlerinin lokal konsantrasyonundaki artışların yol açmış olabileceğini bildirmişlerdir.

4.2.4.Kazanılan Embriyoların Değerlendirilmesi

Embriyo transfer çalışmalarında kazanılan embriyoların sınıflandırılması ve kalitesi hakkında karar vermek,embriyo transfer çalışmalarında sonucu etkileyen önemli bir kriterdir. Morfolojik incelemede normal büyüklükte ve daire şeklinde olan, zona pellusidası katlanmamış veya buruşmuş olmayan embriyoların sağlıklı olarak değerlendirilebileceği bildirilmiştir (4,52).

Hafez (21), değişken büyüklükte, uniform yapıda olmayan, köpük görünümlü blastomer içeren, ovalleşmiş zona pellusidaya sahip, dejenere stoplazmik ve nükleer materyale sahip embriyoların bu tip çalışmalarda kullanılmaması gerektiğini bildirmiştir.

Pabuççuoğlu (54) da, çalışmasında tavşan embriyolarının morfolojik muayenesinde zona pellusidanın yapısına, blastomerlerin eşit büyüklükte ve zona içini doldurma durumlarına, blastomer sitoplazmasının homojen yapısına, vakuolleşme ve dejenaratif değişikliklerin varlığına bakarak, sağlık durumları hakkında karar verdiğini bildirmiştir.

4.3. Embriyoların İn Vitro Kültürü

İn vitro kültür çalışmalarında dişi genital kanalından dış ortama alınan embriyoların yaşayabilirlikleri üzerine ortam koşullarının etkisi oldukça büyüktür. Bu açıdan in vitro ortamın belirli şartlara sahip olması gerekmektedir (6,10).

İdeal bir embriyonal gelişim için in vitro kültür sistemlerinin, kültür ortamı gaz bileşenlerinin, medyumların kimyasal yapısının, pH' sının, enerji ve protein kaynaklarının, optimum oranda in vivo koşullara benzerlik göstermesi zorunludur.

4.3.1. İn Vitro Kültür Sistemleri

Memeli embriyolarının in vitro kültüründe plastik ve cam petriyer yaygın olarak kullanıla gelmiştir.

Araştırmacılar, petri kalitesinin, sonuçları etkileyen önemli faktörlerin başında geldiğini, bununla birlikte düşük kaliteli petriyerin embriyotoksik etki gösterebileceği ve bundan dolayı da petri seçiminde dikkatli davranmak gerektiğini bildirmişlerdir (32,34,69).

Fare embriyolarının in vitro hatching gelişimleri üzerinde, plastik petriyeri cam petriyerle karşılaştıran Konwinski ve ark. (34), in vivo blastosistlerin in vitro Hatching Blastosist oranlarında plastik petriyeri cam petriyere nazaran daha üstün bulduklarını bildirmişlerdir.

Fare embriyolarının in vitro kültüründe 15x60 mm.lik plastik kültür petriyerini kullanan Brinster (10), bu petriyerin içerisinde 0.05 ile 0.1ml arasında değişen hacimlerde medyum damlaları oluşturularak, embriyoların kültüre edilebileceklerini bildirmiştir.

Chatot ve ark (13), fare embriyolarının in vitro kültüründe 60 mm'.lik plastik petrilere kullandıklarını ve 50µl' lik damlalardan oluşan medyumların üzerini mineral yağ ile örttüklerini ve kültür işlemine geçmeden önce medyumları bu şekliyle 37°C' lik inkübatörde % 5 CO₂'li ortamda 4 - 5 saat inkübe ettiklerini bildirmişlerdir.

Kültür petrilерinin sterilizasyon şeklinin iki hücreli fare embriyolarının blastosiste ulaşmasında önemli bir faktör olduğunu belirten William ve Shapiro. (69), gerek cam gerekse plastik malzemelerin tekrar kullanılmadan önce iyi kalitede bir temizleyici ile temizlenmeleri ve ardından yine iyi kaliteli distile su ile iyice durulanması gerektiğini bildirmişlerdir.

Bazı araştırmacılar petrilere yerleştirilmiş ve üzerleri mineral yağ ile örtülmüş kültür medyumlarını embriyo toplama işlemine başlamadan önce 4 -12 saat süreyle %5 CO₂'li ortamda ve 37°C' de bir ön inkübasyon işlemine tabi tuttıklarını ve ondan sonra kültür işlemine başladıklarını bildirmişlerdir (3,13,38,39).

Buna karşın Willey ve ark. (68), kültür öncesi medyumların uzun süreli inkübasyonunun sakıncalı olduğunu ve medyuma katılan Sodyum Piruvat gibi maddelerin stabilitesinin bu yolla zayıflatıldığı görüşünü savunmuşlardır. Aynı araştırmacılar, embriyoların kültüre edildikleri medyumların da iki günde bir değiştirilmesi gerektiğini bildirmiş ve buna gerekçe olarak medyuma katılan penisilin gibi antibiyotiklerin inkübatör ortamında yarılanma ömürlerinin 27 saat gibi bir süre olmasını göstermişlerdir.

Fare embriyolarının in vitro kültüründe 60 mm'.lik plastik petrilere günümüzde birçok araştırmacı tarafından sıklıkla kullanılırken, araştırmacılar bu petrilere 10 ila 100 µl' lik damlalar halinde yerleştirdikleri medyumlar içerisine 2 ile 45 arasında değişen sayılarda embriyo koyarak kültür çalışmaları yaptıklarını bildirmişlerdir (2, 3, 13, 31, 43,68).

Kültür medyumlarından oluşan damlaların hacmi ve embriyo yoğunluğunun in vitro kültür ortamında bir hücreli hamster embriyolarının gelişimi üzerine etkisini araştıran Kite ve ark. (32), en yüksek oranda morula blastosist gelişiminin, 100µl' lik medyum damlalarına 40 - 45 embriyonun yerleştirildiği gruplarda meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Benzer bir çalışmada Willey ve ark. (68), iki hücreli fare embriyolarının morula-blastosiste ulaşmasında en iyi sonucun, 10-12 µl medyuma 20 embriyonun yerleştirildiği gruplardan alındığını ve embriyo dansitesinin yükselmesi ile sonuçların olumlu yönde etkilendiğini bildirmişlerdir.

4.3.2. İn Vitro Kültür Ortamının Gaz Bileşenleri

Fare embriyolarının in vitro kültür süresi boyunca karbon kaynağı olarak CO₂'ye ihtiyaç duydukları ve in vitro ortamda pH' sı alkaliye kayma eğilimindeki kültür

medyumlarının pH' sınırın stabilize edilmesinde CO₂'nin rolünün büyük olduğu bildirilmiştir (35).

Bunun yanı sıra, embriyoların in vitro ortamda oksijen solunumu yaptıkları ve oksijensiz bir ortamda yaşayamadıkları vurgulanırken, gaz karışımındaki N₂ (Azot) gazının ise etkisiz (inert) olduğu bildirilmiştir (35).

Daniel (17), in vitro gelişen tavşan blastosistlerinin yaşayabilirlikleri açısından oksijen' in gerekliliğini ve optimal konsantrasyonunu araştırdığı çalışmasında, tavşan blastosistlerinin in vitro gelişimi için oksijen' in şart olduğunu, %10'luk O₂ konsantrasyonunun ise optimal olduğunu ve % 95 gibi yüksek O₂ düzeylerinin de embriyolarda dejeneratif değişikliklere yol açtığını bildirmiştir.

Birçok araştırmacı memeli embriyolarının in vitro kültürü çalışmalarında % 5 CO₂ gazını kullanırken (1,2,3,15,16,47,48,57,62), bazı araştırmacılar da, % 5 CO₂, % 5 O₂ ve % 90 N₂ gaz karışımını aynı amaca yönelik olarak başarı ile kullanmışlardır (14 ,35, 54, 58).

4.3.3. İn Vitro Kültür Medyumları

Kraemer ve Bowen (35), memeli embriyolarının in vitro kültür medyumlarında bulunması gereken başlıca iyonların "K⁺, Ca ⁺⁺, Na⁺, Mg⁺⁺, Cl⁻, PO₄ ⁻³, ve HCO₃ ⁻ olduğu ve buna rağmen bu iyonların embriyonal gelişimde nasıl bir rol oynadıklarının bilinmediğini belirtmişlerdir.

Ancak bu gün için kalsiyum iyonlarının embriyodaki membran stabilitesi ve permeabilitesini desteklediği, aynı zamanda morulanın kompakt hale geçmesinde önemli rol oynadığı bildirilmiştir. (23, 35).

Bunun yanı sıra, NaCl' nin primer olarak medyumun osmotik basıncını ayarladığı ve medyum osmolaritesinin fare embriyoları için optimum 250-300 miliosmol olarak ayarlanması gerektiği bildirilmiştir (35).

Fare embriyolarının in vitro kültüründe kullanılan kültür medyumları hemen hemen birbirine benzerlik göstermektedir. Pek çok araştırmacı fare embriyolarının in vitro kültürü çalışmalarında M 16 ve Whitten's kültür medyumlarını başarı ile kullanmışlardır (2,3,13, 18,30,31,46,48,56).

M 16 medyumunu yapı olarak Whitten's medyumuna büyük benzerlik göstermekle beraber, Whitten's medyumunu CaCl₂ yerine Ca-lactate içerirken aynı zamanda içeriğindeki NaCl ve Bikarbonat azaltılarak modifiye edilmiştir (66).

Araştırmacılar kültür medyumlarının hazırlandıktan sonra +4°C'de saklanabileceklerini, ancak saklama süresinin 1 - 2 haftayı geçmemesi gerektiğini bildirmişlerdir (23, 39).

Medyum hazırlamada en az bidistile edilmiş su kullanılması gerektiği ve hazırlanan medyumların da sterilizasyon amacıyla 0,22 - 0,45 µ milipore filtreden geçirilmesi gerektiği bildirilmiştir (5,23,24,48).

4.3.4. İn Vitro Kültür Medyumlarının pH' sı

İn vitro kültür medyumunun pH' sı kültüre edilecek olan embriyoların yaşayabilirlikleri üzerinde son derece etkili ve kritik bir faktördür (27,69). Medyumun pH' sını etkileyen başlıca faktörlerin, medyuma bulunan karbonhidrat enerji kaynakları olduğu bildirilmiştir (28).

Kraemer ve Bowen (35)'i medyuma katılan bikarbonat iyonlarının, medyumun pH' sının kontrol altında tutulması amacıyla ilave edildiği, bununla birlikte in vitro kültürde medyumların pH' sının kültür kabini içerisindeki CO₂'nin yardımı ile de dengelendiği bildirilmiştir (23,35).

Tavşan embriyolarının in vitro kültürü esnasında değişik konsantrasyonda bikarbonat içeren farklı pH' daki medyumların blastosist çapı ve hatched blastosist oranı üzerindeki etkisini araştırdığı çalışmada Kane (29), pH değişimlerinin her iki parametre açısından da kritik olduğunu bulmuştur.

Pek çok araştırmacı memeli embriyolarının in vitro kültüründe kullandıkları medyumların pH' sını 7,2 - 7,6 arasında ayarlayarak kullandıklarını bildirmişlerdir (8,16,23,31,41).

4.3.5. İn Vitro Kültür Medyumlarının Enerji Kaynakları

Fare embriyolarının erken cleavage dönemde enerji kaynağı olarak piruvat ve laktat'a daha fazla ihtiyaç duydukları, en önemli enerji kaynağı olan glikozdan ise erken dönemlerde çok az yararlandıkları, özellikle 8 hücreli evreden sonraki aşamalarda glikozu daha çok kullandıkları bildirilirken (10), in vitro ortamda Hatching Blastosist ve sonrası (outgrowth) gelişimlerin ise, glikozla yakından ilgili olduğu bildirilmiştir. (33, 35).

Buna karşın Chatot ve ark. (13), fare embriyolarının 3-4 hücreli dönemden 16 hücreli döneme kadar glikozu ihtiyaç duyduklarını, ancak bu dönemlerden öncesinde ve sonrasında embriyoların glikozu ihtiyaç duymadıklarını belirtmişlerdir.

Brinster (10) ise, piruvat, oksalasetat, malate, sitrat ve α-ketoglutarate gibi karbonhidratların, fare embriyolarının her dönem gelişimlerinde Krebs Siklusuna girerek embriyoları destekleyici etkiler yaptığını, ancak en yüksek blastosist eldesini glikoz,

bulunduğu medyumlarda, bunları ayrı ayrı içeren medyumlara nazaran daha yüksek oranda meydana geldiğini bildirmiştir.

4.3.6. İn Vitro Kültür Medyumlarının Protein Kaynakları

Memeli embriyolarının in vitro kültüründe medyum kompozisyonunun kritik bir faktör olduğunu bildiren Kraemer ve Bowen (35), in vitro kültür çalışmalarında medyuma embriyoların ihtiyaç duyduğu bir takım maddeleri karşılamak üzere protein katılması gerektiğini, bu amaçla kültür medyumlarına hayvansal kaynaklı serumların katılabileceğini, ancak katılacak olan serum oranının % 10'u geçmemesi gerektiğini; aksi halde bunun düşük sonuçların alınmasına yol açabileceğini bildirmiştir. Aynı araştırmacı, özellikle uzun süren kültür periyotlarında BSA (Bovine Serum Albumin)'nin olumlu katkılar yaptığını ve % 1'den yüksek dozlarının kullanılması halinde ise medyumun pH'ında olumsuz değişikliklerin olabileceğini bildirilmiştir.

Buna paralel olarak Kane (29), yaptığı çalışmada düşük moleküllü BSA'nın yüksek dozlarda (5 mg/ml) kullanılması halinde, tavşan embriyolarının in vitro kültüründe toksik etkiler yaratacağını bildirmiştir.

Hope ve Whitten (25), fare embriyolarının in vitro fertilizasyonu sırasında albuminin, spermatozoa ve yumurtanın stabilitesini sağladığı, toksik inorganik iyonları bağladığı ve CO₂ transportunu düzenlediğini bildirmişlerdir.

Willey ve ark. (68) ise, maternal serumlar ve bovine serumların tanımlanmamış birtakım maddeler içerdiğini, bu maddelerin in vitro kültür esnasında embriyotoksik etki gösterdiklerini, ancak fare embriyolarının in vitro kültüründe serum proteinlerinin ve özellikle BSA'nın içerdiği yağ asitleri gibi iz elementlerin gelişimi destekleyici etkiler yaptığını bildirmişlerdir.

1 mg/ml BSA içeren Brinster medyumunda kültüre ettiği iki hücreli fare embriyolarının %60-100 oranında blastosiste ulaştıklarını bildiren Brinster (8), yaptığı benzer bir çalışmada, iki hücreli fare embriyolarının in vitro ortamda blastosiste gelişmelerinde, protein kaynağı olarak BSA (Bovine Serum Albumin)'nin 1mg/ml dozlarının optimal olduğunu ve medyuma katılan BSA'nın 0,01mg/ml'ye indirilmesi halinde, embriyoların kullanılan cam veya plastik yüzeylere yapışarak maniplasyon güçlüklerine yol açtığını ve aynı zamanda in vitro kültür ortamında blastosiste ulaşmada zorlandığını bildirmiştir (9). Araştırmacı, çalışmasında iki hücreli fare embriyolarının blastosiste gelişiminde esansiyel amino asitlerin şart olmadığını; fare embriyolarının iki hücreli dönemde, hidrolize olmuş enzim ve albuminleri hücre içine alarak kullanabildiğini ve dolayısıyla BSA'nın, amino asitlerin sağladığı etkileri karşılayabildiğini belirtmiştir.

İn vitro kültür ortamında, fare embriyolarının gelişimi üzerine protein kaynağı olarak serumun gerekliliğini ve optimum miktarını araştıran Saito ve ark (58),

embriyoların erken dönemde nitrojen kaynağına ihtiyaç duymadıklarını, ancak kompakt morula ve blastosist gelişimleri için serumla ihtiyaç gösterdiklerini bildirmiştir. Aynı araştırmacı medyuma % 10'luk serum katkısının in vitro embriyonal gelişim için optimal olduğunu, daha yüksek dozların ise (%20-30) toksik olmadığını buna karşın in vitro gelişimi de daha fazla indüklemediğini saptamıştır.

Shirley ve ark. (61), Ham's F-10 medyumuna serum veya plazma katılmasının fare embriyolarının in vitro ortamdaki blastosist oranını arttırdığını bildirmişlerdir.

Değişik tipteki protein kaynaklarının fare embriyolarının gelişimi üzerine etkilerini araştıran Mehta ve Kiessling (42), in vitro kültür esnasında aminoasitlerin olumlu katkı yaptığını, ancak Fötal Buzağı Serumunun (FCS) aminoasitlerden daha iyi sonuç verdiğini bildirmiştir. Araştırmacılar çalışmalarında, medyuma serum katılmasının pronükleer dönem fare embriyoları üzerinde toksik etki yarattığını, buna bağlı olarak blastosist gelişimini inhibe ettiğini bildirirken, serum ilaveli medyuma kültür edilen iki hücreli fare embriyolarının blastosiste ulaşma oranlarının arttığını ancak implantasyon sonrası fetal gelişimin azaldığını izlemişlerdir.

Çalışmasında DBS (Donor Bovine Serum) albumininin fare embriyolarının in vitro kültürüne etkisini araştıran Millham ve ark. (47) da, serum veya serum fraksiyonlarının fare embriyolarının in vitro kültür ortamında hatching ve hatched blastosist oranını arttırdığını bildirmişlerdir.

Fare embriyolarının in vitro kültüründe protein kaynağı olarak BSA ve hAF (Human Amniotic Fluid) kattıkları çalışmalarında Pike ve Alikani (55), blastosiste ulaşma açısından her iki protein kaynağı arasında herhangi bir fark bulamamışlar, blastosistlerde hatching olma (zona pellusidadan çıkma) açısından BSA' nın hAF' den daha etkili olduğunu ve BSA içermeyen gruplarda hiç hatching blastosist gelişiminin olmadığını gözlemlemişlerdir.

4.4. İn Vitro Kültür Periyotları ve Embriyoların Gelişimsel Kontrolleri

Fare embriyosunun in vitro ortamda DNA polimeraz aktivitesinin düştüğü, böylece embriyonun cleavage dönemde in vitro ortamda, in vivo ortama göre en az iki saatlik bir gecikmeyle bölündüğü, bu gecikmenin blastosist aşamasına gelindiğinde ise bir tam günü bulduğu bildirilmiştir (33).

Özkoca (53), büyüme olmaksızın oluşan hücre bölünmesine "Cleavage" denildiğini, bu olayın implantasyon dönemine kadar sürdüğünü, cleavage'in başlangıcından blastosel görülene kadar ki dönem içerisinde embriyonik hücrelere "Blastomer" denildiğini, bununla birlikte hücre bölünmesi esnasında senkronizasyonun mükemmel olmadığını ve 3 – 5 – 6 - 7 hücreli dönemlerin görülebileceğini belirtmiştir.

Yine Özkoca (53), 16 - 32 hücreli dönemde hücrelerin sıkışık halde zona pellusida içerisinde bulunduklarını ve bu haliyle embriyoya "Morula" adı verildiğini bildirmiştir.

Araştırmacılar farelerde genellikle 32 hücreli dönemden sonra hücreler arasındaki boşluklara sıvı toplandığını, böylece embriyoda "Blastosel" adı verilen bir iç boşluk oluştuğunu ve bu dönemdeki embriyoya da "Blastosist" adı verildiğini bildirmişlerdir (33,53).

Daha sonra blastosistin genişleyerek şiştiği, bu dönemde embriyoya "Expanded Blastosist" adı verildiği, farelerde 4 - 4.5 günde zona pellusidayı yırtarak dışarı çıktığı ve bu olaya "Hatching" adı verildiği bildirilmiştir (44,33).

Blastosistin ekspansiyonu esnasında fare embriyosunda hücre bölünmesinde asinkroni artarken, bölünme hızının yavaşladığı, bu esnada % 10'luk bir hücre kaybı meydana geldiği ve bu dönemde ICM (Inner Cell Mass) hücrelerinde total hücre sayısına oranla bir azalma meydana geldiği, bunun sebebinin de trophodectoderm hücrelerinin mitozla bölünmelerine devam ederken ICM hücrelerinin kısmen ölmesinden kaynaklandığını savunmuştur (33).

İki hücreli fare embriyolarının in vitro kültür ortamında iki hücreli dönemden, 4 hücreli döneme 14 saatte, 8 hücreli döneme 24 saatte, morulaya 36-45 saatte, erken blastosiste 60 saatte, hatching blastosiste 72 saatte ve hatched blastosiste 96 saatte ulaştıkları saptanmıştır (8, 20,31).

Gardner ve Lane (19), yaptıkları çalışmalarında fare embriyolarının in vitro gelişim kontrollerini 24.,48.,72. ve 96'nci saatlerde Phase Contrast mikroskopta X 200 büyütmede yaptıklarını ve embriyoların morfolojik değerlendirmesini aşağıdaki gibi yaptıklarını bildirmişlerdir.

Morula: Embriyonun blastomer sınırlarının kaybolduğu ve tamamen kompakt hale geldiği dönem.

Erken Blastosist : Embriyoda oluşan ve blastosel olarak adlandırılan boşluğun total hücre hacminin, en çok 2 / 3'ünü doldurduğu dönem.

Expanded Blastosist : Blastosel boşluğunun total hücre hacminin 2/3'ünden büyük olduğu dönem.

Hatching Blastosist : Trophodectoderm hücrelerinin zona pellusidayı yırtarak dışarıya çıkmaya başladığı dönem.

Bazı araştırmacılar embriyoların in vitro gelişim kontrollerinin 12 saatte bir yapılabileceğini (31,52), kimileri de bu kontrollerin 24 saatte bir gerçekleştirilmesinin yeterli olduğunu bildirmişlerdir (9,55,60).

Lane ve Gardner (36); fare embriyolarının yaşayabilirlikleri üzerine aminoasitlerin etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, tüm aminoasit gruplarının ve özellikle esansiyel aminoasit içeren grupların fare embriyolarının implantasyon kabiliyeti ve fetal ağırlıkları yönünden, kontrol grubuna nazaran çok daha iyi sonuçlar verdiğini ve bunun da kültür medyumlarının yenilenme periyodu ile yakından ilgili olduğunu bildirmişlerdir. Aynı

araştırmacılar, aminoasit içeren medyumların her 48 saatte bir yenilenmesinin, aminoasitlerin yıkımlanması ile ortaya çıkan amonyum birikiminin hafifletilmesi amacıyla yönelik olduğunu belirtmişlerdir.

Araştırmacılar embriyoların morfolojik muayenesinde, genel olarak zona pellusidanın yapısına, blastomerlerin eşit büyüklükte ve zona içini doldurma durumlarına, blastomer sitoplazmasının homojen yapısına, vakuolleşme ve dejeneratif değişikliklerin varlığına bakarak embriyoların sağlık durumları hakkında karar verilebileceğini bildirmişlerdir (21, 37,54).

4.4.1. Embriyoların Hücre Sayılarının Tespiti

Bu tip çalışmalarda embriyoların sağlıkları hakkında karar vermede morfolojik muayenelerin yanı sıra, embriyonik hücre sayılarının tespiti önemi de vurgulanmaktadır (12,13,29,41,51,57, 58,68,70).

Butler ve Bigger (12) , embriyoların gelişimsel kontrollerinin muayenesinde morfolojik incelemelerin önemli olmasına karşın subjektif kriterlere dayanmasından dolayı yanıltıcı sonuçlar verebildiğini ve ideal bir muayenenin embriyoların hücre çekirdek sayılarının tespiti ile mümkün olabileceğini bildirmişlerdir.

Willey ve ark. (68), çalışmalarında düşük hücre sayısına sahip embriyoların uterusu transferinden düşük gebelik sonuçlarının alındığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar fare embriyolarının in vitro kültüründe morulaya en hızlı ulaşan embriyoların, en düşük embriyonik hücre sayısına sahip embriyolar olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu nedenle, morfolojik olarak hızlı gelişen embriyoların çekirdek bölünmesi ile her zaman bir korelasyon içinde olamayacağını bildirmişlerdir.

Memeli embriyolarının hücre sayılarının tespiti amacıyla çoğunlukla benzer yöntemler kullanılmaktadır (13,41,58,68,70).

Xu ve ark. (70), in vitro fertilizasyon yöntemiyle elde ettikleri sığır embriyolarının hücre sayılarının tespiti amacıyla öncelikle embriyoları hipotonik sodyum sitrat solüsyonunda (%0,88 w/v) 3 dakika beklettikten sonra tek olarak lam lamel arasında fikse etmiş ve 1/1 oranındaki asetik asit-etanol karışımına tabi tuttukten sonra havada kurutmuş ve ardından x1000 büyütmede hücre çekirdeklerini sayarak kaydetmişlerdir. Bu yöntemde bazı teknik güçlüklerin bulunduğunu savunan araştırmacılar, fikzasyon aşamasında özellikle hatching ve hatched blastosist dönemindeki embriyolarda hücre kayıplarının söz konusu olduğunu, dolayısıyla hücre çekirdek sayılarının sağlıklı bir şekilde belirlenememesine rağmen bu yöntemin mitotik indexi ortaya koyması ve böylece embriyonun yaşayabilirliğini göstermesi bakımından kolay ve geçerli bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir.

Willey ve ark. (68) ise, fare embriyolarının hücre sayılarının tespiti amacıyla; embriyoları % 0.5'lik sodyum sitrat solüsyonunda kısa süre beklettikten sonra 1/1

oranındaki etanol asetik asit karışımına tabi tuttuklarını, ardından lam lamel arasına tek tek alarak fikse ettiklerini ve preparatların havada kurutulduktan sonra hücre çekirdeklerinin rahat görülmesi için % 2'lik aceto - orcein boyası ile boyadıklarını bildirmişlerdir.

Saito ve ark. (58) da yaptıkları çalışmalarında bu amaçla, fare embriyolarını öncelikle 10 dakika boyunca % 0.9'luk sodyum sitrat solüsyonunda beklettiklerini, ardından lam lamel arasında fikse ettikleri embriyoları 3/1 oranındaki metanol -asetik asit karışımına maruz bıraktıklarını ve sonrasında havada kuruttukları preparatları 0,5 µg/ml yoğunluğundaki Hoechst 33258 boyasıyla boyadıklarını ve 15 dakikalık boyama süresinin sonunda preparatları, pH' sı 7.0' a ayarlanmış olan ve 6,5 kısım 0,1 M sodyum sitrat, 43,6 kısım 0,2 M dibazik sodyum fosfat ve 49.9 kısım distile sudan oluşan bir solüsyonla yıkadıktan sonra hücre çekirdeklerini saydıklarını bildirmişlerdir.

Chatot ve ark. (13) ise, bu amaçla biraz daha farklı bir yöntem kullanmışlardır. Araştırmacılar çalışmalarında, hücre çekirdekleri sayılacak embriyoların diğer tekniklerden farklı olarak öncelikle, % 4 formaldehit içeren PBS solüsyonunda fikse etmiş ve ardından PBS ile yıkamışlardır. Daha sonra, hazırladıkları preparatları Hoechst 33258 boyası ile boyayarak, hücre çekirdeklerinin flöresan bir görüntü vermesini sağlayan araştırmacılar, Nikon Diaphot Inverted Phase Contrast mikroskop altında hücre çekirdeklerinin verdikleri yansıma yardımıyla saymışlardır.

Gardner ve Lane (19), ise fare embriyolarının hücre sayılarını tespit etmek amacıyla, embriyoları % 0,4'lük trisodyum sitrat solüsyonunda 5 dakika bekleten, ardından temiz bir lam üzerine mümkün olan en küçük hacimle alan araştırmacılar, burada bulunan embriyoları 3/1 oranındaki etanol-asetik asit solüsyonunu ile fikse ederek, blastomer sayılarını pH' sı 6,8'e ayarlanmış Gurr's solüsyonundaki % 10'luk Giemsa boyası ile boyadıktan sonra saydıklarını bildirmişlerdir.

5. Gereç ve Yöntemler

5.1.Gereç:

Çalışmada hayvan materyali olarak C57BL/6J x BALB/C ırkı farelerin çaprazlamasından doğan CB6 hibridi (F₁) toplam 169 dişi ve aynı ırktan toplam 40 erkek fare kullanıldı. 169 dişiden plak gösteren 122 tanesi öldürülerek embriyoları toplandı.

5.1.1. Çalışmada Kullanılan Farelerin Üretilmesi ve Bakımı

Üretim ünitemizde yetiştirdiğimiz farelerin damızlıkları, TÜBİTAK Marmara Araştırma Enstitüsü (GMBAE)'den temin edildi. Fare ırklarının (BALB/C ve C57 BL/6J) erkekleri her kafeste birer tane olmak üzere ayrı ayrı tutuldu ve seçimlerinde 8-10 haftalık yaş grubundan ve iri fenotipte olmalarına dikkat edildi. Sonra 6-8 hafta yaşındaki dişi fareler, damızlık erkeklerin yanına alınarak inbred ırk üretmek amacıyla bire bir olarak çiftleştirildi ve her 24 saatte bir dişi fareler, çiftleşmenin kanıtı olan vaginal plak yönünden kontrol edildiler. Vaginal plak gösteren dişiler, ayrı bir doğum kafesine alınarak 21 günlük gebelik sürelerinin sonunda doğumları beklendi. Doğumdan 3 hafta sonra ise cinsiyet ayrımı yapılan yavrular ayrı kafeslere alındılar.

Üretilen bu farelerden C57 BL/6J erkek ile BALB/C dişi fareler 6 - 8 haftalık yaşa eriştikten sonra, yukarıda anlatılan metot kullanılarak bu defa hibrit elde etmeye yönelik olarak kendi aralarında çiftleştirildi ve çalışmanın esas materyalini oluşturacak ve embriyo eldesi amacıyla kullanılacak olan CB6 F₁ ırkı hibritler elde edildi.

Hibrit farelerin ve diğer inbred ırkların üretimi çalışmanın gidişine göre ayarlandı ve haftada 8-10 fare elde edilecek şekilde programlandı.

Farelerin bulunduğu odanın ısısı 20 - 24°C' ye ayarlandı. Işık bir zaman ayarlayıcı ile 14 saat ışık - 10 saat karanlık olacak şekilde programlandı ve fareler günlük Add - Libitum beslendi. Odanın havalandırılması da yine bir zaman ayarlayıcısına bağlı olarak her 15 dakikada bir havalandırılmak üzere programlandı. Ayrıca haftada iki kere olmak üzere, farelerin altlıkları temizlendi ve 15 günde bir olmak üzere su şişeleri dezenfekte edildi.

5.1.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada, cam ve plastik malzemeler (kültür petripleri hariç) tekrar tekrar kullanıldı, temizlenmeleri Sigma Clean (Sigma. S-4142) ile yıkanarak sağlandı.

Çalışma sırasında, gerek embriyoların eldesinde, gerekse elde edilen embriyoların in vitro kültüründe aşağıda belirtilen kimyasal maddeler kullanıldı.

<u>Kimyasal Maddeler</u>	<u>Katalog No</u>	<u>Firma Adı</u>	<u>Molekül Ağırlığı (g/ mol)</u>
NaCl	S-5886	Sigma	58.84
KCl	P-5405	Sigma	74.55
CaCl ₂ . 2H ₂ O	C-7902	Sigma	147.0
KH ₂ PO ₄	4871	Merck	136.09
MgSO ₄ .7H ₂ O	13142	Riebel-de Haen	246.47
NaOH (1.0 N)	S-2770	Sigma	-
HCl (1.0 N)	H-9892	Sigma	-
NaHCO ₃	L-1703	Seromed	-
Hepes	H-0763	Sigma	260.3
Na-lactate	L-1375	Sigma	112.1
Na-pyruvate	15220	Serva	110.0
Glucose	G-7021	Sigma	180.2
Bovine Serum Albumin	A-3311	Sigma	-
(BSA Fraction V Powder, Embryo Tested)			
Ca-lactate	L-4388	Sigma	109.1
Phenol Red	P-5530	Sigma	376.4
Penicillin-G. Potassium Salt	-	Faco	-
Streptomycin Sulfate	-	Deva	-
Gentamycin	-	Eczacıbaşı	-
Enjeksiyonluk Distile Su	-	Eczacıbaşı-Boxter	-
PMSG	-	Vetimex	-
hCG	-	Organon	-
Ethyl Alcohol	41468	Carlo Erba	46.07
(Absolute %99.8)			
Acetic Acid	302011	Carlo Erba	60.053
(Glacial %99.5)			
pH Meter Buffer Solution	486451	Carlo Erba	-
(pH: 7.00±0.02)			
Mineral Oil	M-5904	Sigma	-
Orcein	E426291	Merck	-

5.1.3.Çalışmada Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

<u>Cihaz</u>	<u>Marka</u>	<u>Model</u>
Otoklav	Nüve	OT-4060
Inverted Mikroskop	Olympus	M 021
Faz-Kontrast Mikroskop	Nikon	50773
Deep-Freeze	Philco	-
Buzdolabı	AEG	-
CO ₂ Inkübatörü	Dedeoğlu	E-49 TB
CO ₂ Tüpü	Habaş	-
Sterilizatör	Elif	-
Distile Su Cihazı	Nüve	NS 212
Hassas Terazı	Sartorius	2442
Magnetik Karıştırıcı	Cole Parmer	4803-02
Stereo- Mikroskop	Olympus	VMZ-1x-4x
pH metre	Schott-Geräte	-
Sıcak Tabla	Elektromag	-
Mikropipetler	Biohit-Proline	-
<u>Malzemeler</u>	<u>Firma</u>	<u>Katalog No.</u>
Plastik Petriler (15x60 mm)	Grainer/Labortechnik	-
Plastik Petriler (15x35 mm)	Grainer/Labortechnik	-
Eppendorf Tüpleri	Grainer/Labortechnik	-
Mikropipet ucu	Grainer/Labortechnik	-
Milipore Filtreler (0.22µ)	Bedford	04700
Pasteur Pipetleri	-	-
Cam Petriler	-	-
Cam Şişeler	Schott	GL-45
Saat Camları	-	-
Lam	Marina Glade	-
Lamel (24x24)	Marina Glade	-
Steril Tüpler	Terumo	VT-100 P

5.1.4 Gonadotropinlerin Hazırlanması

Dişi farelerin senkronizasyonu ve süperovulasyonu amacıyla kullandığımız gonadotropinler aşağıdaki şekilde hazırlandı.

PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin): Ticari olarak Synchroject (Vetimex) adıyla satılan 600 I.U. ılık liyofilize halindeki PMSG hormonu, 12 ml % 0.9'luk NaCl ile sulandırıldı.

Hazırlanan bu stok solüsyon 1'er ml hacimde 12 adet ependorf tüpüne alındı ve -20°C' de derin dondurucuda 3 ay boyunca kullanılmak üzere saklandı. Böylece her bir tüpteki süspansiyon 10 fareye göre hazırlandı ve fare başına düşen hormon dozu da 5 I.U./0.1 ml olacak şekilde hesaplandı.

hCG(Human Chorionic Gonadotropin): Ticari olarak Pregnyl (Organon) adıyla 1'er ml'lik ampul formunda satılan ve 1 ml'sinde 5000 I.U. bulunan hCG hormonu, öncelikle 9 ml %0,9'luk NaCl içerisinde 500 I.U./1ml olacak şekilde sulandırıldı. Hazırlanan bu ana stoktan 100'er µl alınarak, içine önceden 900'er µl %0,9'luk NaCl bulunan ependorf tüplerine aktarıldı ve -20°C'de derin dondurucuda 3 ay boyunca kullanılmak üzere saklandı. Bu şekilde her bir tüp içerisinde 1ml/ 50 I.U. dozunda hCG hazırlanmış oldu. Böylece her bir tüpteki süspansiyon 10 fareye göre hazırlandı ve fare başına düşen hormon dozu da 5 I.U./ fare olacak şekilde hesaplandı.

5.1.5. Yıkama Medyumunun (M 2) Hazırlanması

Araştırmada Hogan ve ark (23)'ün bildirdiğine göre fare embriyolarının eldesinde kullanılan ve embriyoların CO₂ inkübatöre ihtiyaç duymaksızın uzun süre dışarıda tutulabilmesine olanak sağlayan M2 medyumunu kullanıldı. M 2 medyumunun yapısı aşağıdaki gibidir.

M 2 Yıkama Medyumunu

İçerik	g/lt.
NaCl	5.533
KCl	0.356
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.252
KH ₂ PO ₄	0.162
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.293
NaHCO ₃	0.349
HEPES	4.969
Na lactate	2.610
Na pyruvate	0.036
Glucose	1.000
Bovine Serum Albumin (BSA)	4.000
Penicillin G. potassium salt	0.060
Streptomycin sulfate	0.050
Phenol Red	0.010
Bidistilled H ₂ O	qsp. 1 lt.

Embriyoların ovidukt'tan toplanması amacıyla kullanılan M2 yıkama medyumunu Hogan ve ark.(23)' nın önerdiği şekilde aşağıdaki prosedüre göre ve tridistile su ile hazırlandı.

1. 0.2484g HEPES tartılarak, 10 ml su içerisinde eritildi.
2. 0.0030g Penisilin ve 0.0005g Streptomisin tartılarak, 5 ml suda eritildi.
3. BSA ve laktat haricindeki tüm kimyasallar ayrı ayrı tartılarak (KCL: 0.0178 g, CaCl₂ 2H₂O :0.0126g, KH₂PO₄ : 0.0081g, MgSO₄ .7H₂O : 0.0146g, NaHCO₃ : 0.0174, Na pyruvate : 0.0018g, Glucose : 0.050 g, Phenol Red: 0.0005g) 20 ml suda eritildi.
4. 0.2766g NaCl, 5 ml suda eritildi.
5. 1., 2., 3. ve 4. maddedeki kimyasallar üst üste eklendi.
6. 0.1305g Laktat, bu karışıma eklendi ve karışım 50 ml' ye tamamlandı.
7. Ardından 0.200g BSA tartılarak, bu medyuma yavaşça eklendi ve medyum çalkalanmadan BSA' nın erimesi için 37°C' lik etüvde 10 dk bekletildi.
8. Daha sonra pH kontrol edilerek, gereğinde 1.0 N NaOH veya 1.0 N HCl ile 7.2-7.4'e ayarlandı.
9. Medyum bu şekli ile 0.22 milipor filtreden süzülerek, steril şişeler içerisinde saklandı.
10. Medyum gereğinde kullanılmak üzere +4°C' lik buzdolabında bir hafta boyunca muhafaza edildi.

5.1.6. Kültür Medyumlarının Hazırlanması

Çalışmada embriyoların kültürü amacıyla kullandığımız M16 medyumunu Hogan ve arkadaşlarının (23) bildirdiği şekli ile aşağıdaki prosedüre göre ve tridistile su kullanılarak (BSA içermeyecek şekilde) hazırlandı.

Hogan ve ark. (23)'nın bildirdiğine göre M 16 medyumunu aşağıdaki gibidir.

M16 Kültür Medyumunu	
İçerik	g / lt
NaCl	5.533
KCl	0.356
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.252
KH ₂ PO ₄	0.162
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.293
NaHCO ₃	2.101
Na lactate	2.610
Na Pyruvate	0.036
Glucose	1.000
Bovine Serum Albumin	4.000
Penicillin G. Potassium salt	0.060
(final konstr. 100 IU/ml)	
Streptomycin sulfate	0.050
(final konsantrasyonu 50µg /ml)	
Phenol Red	0.010
Bidistilled H ₂ O	qsp 1 lt.

1. 0.0030g Penisilin ve 0.0025g Streptomisin tartılarak, 5 ml suda eritildi.
2. 0.0126g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ tartılarak, 5 ml suda eritildi.
3. Laktat ve BSA dışındaki kimyasal maddeler tartılarak (NaCl: 0.2766g, KCl : 0.0178g, KH_2PO_4 : 0.0081g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.0146g, NaHCO_3 : 0.1050g, Na Pyruvate : 0.0018g, Glucose :0.0500g, Phenol Red : 0.0005g) 20 ml suda eritildi.
4. 1., 2. ve 3. maddedeki kimyasal maddeler üst üste eklendi.
5. 0.1305g Laktat 10 ml suda eritildi ve medyum hacmi 50 ml' ye tamamlandı.
6. Medyum bu şekli ile %5 CO_2 'li inkübatör ortamına alınarak 10 dk bekletildi ve pH'ın 7.4'e gelmesi sağlandı.
7. Gerektiğinde pH' ın 7.2-7.4 sınırlarına getirilmesi için, 0.1 N HCl veya 0.1 N NaOH'den yararlanıldı.
8. Son aşamada medyum, 0.22 milipor filtreden geçirilerek süzüldü ve steril cam şişelere aktarıldı.
9. Medyum gereğinde kullanılmak üzere +4°C'lik buzdolabında bir hafta boyunca muhafaza edildi.

Çalışmada kullanılan bir diğer kültür medyumunu olan Whitten's medyumunu da, Whitten'ın (66) önerdiği şekilde ve tridistile su ile aşağıdaki gibi (BSA içermeyecek şekilde) hazırlandı:

Whitten's medyumunun bileşimi aşağıdaki gibidir (66).

Whitten's Medyumunu

İçerik	g / lt
NaCl	5.140
KCl	0.356s
KH_2PO_4	0.162
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.294
NaHCO_3	1.900
Glucose	1.000
Ca-lactate	0.527
Na- lactate (%50)	4.444
Na- pyruvate	0.025
Gentamycin	1.000 ml
Phenol Red (%1)	1.000 ml
Bovine Serum Albumin	3.000
Bidistilled H_2O	qsp 1 lt.

1. 0.0263 g Ca Laktat tartılarak, 5 ml suda eritildi.
2. Na Laktat ve BSA dışındaki kimyasal maddeler (NaCl : 0.2570g, KCl : 0.0178g, KH₂PO₄: 0.0081g, MgSO₄. 7H₂O :0.0147g, NaHCO₃ : 0.0950g, Glucose : 0.0500g, Na- pryuvate : 0.0012g, Phenol Red : 0.0005g) tartılarak, 30 ml suda eritildi.
3. %50 'lik Laktat şurubundan. 0.2222 g tartılarak 10 ml suda eritildi.
4. 1., 2. ve 3. maddelerdeki kimyasal maddeler üst üste eklendi.
5. Gentamisin sülfat, 0.005ml miktarında bu karışıma eklendi ve karışım 50 ml' ye tamamlandı.
6. Medyum bu şekliyle %5 CO₂'li inkübatöre alınarak 10 dk bekletildi ve pH' ın 7.4'e gelmesi sağlandı.
7. Gerektiğinde pH' ın 7.2-7.4 sınırlarına getirilmesi için 0.1 N HCl veya 0.1 N NaOH' den yararlanıldı.
8. Son aşamada medyum, 0.22 milipor filtreden geçirilerek süzüldü ve steril cam şişelere aktarıldı.
9. Medyum gereğinde kullanılmak üzere +4°C' lik buzdolabında bir hafta boyunca muhafaza edildi.

Gerek M16 gerekse Whitten's kültür medyumları hazırlanırken, medyuma BSA (Bovine Serum Albumin) katılmadı. Bir sonraki bölümde açıklanacağı üzere, BSA konsantreleri ayrıca hazırlandı ve çalışmanın amacına uygun olarak farklı miktarlarda BSA içeren medyum grupları oluşturuldu.

5.1.7. BSA Konsantrelerinin Hazırlanması ve Dozlanması

Çalışmada, protein kaynağı olarak BSA (Bovine Serum Albümin)'nın farklı dozlarını içeren M16 ve Whitten's kültür medyumunda fare embriyolarının in vitro gelişimi araştırıldığından, BSA' nın her iki medyum grubu için ayrı ayrı dozlanması yapıldı.

Bu amaçla öncelikle BSA (Fraction V , Povder. A-3311. Embryo Tested, Sigma), 0.5 gr. miktarında hassas terazide tartıldı ve önceden hazırlanmış olan M16 medyumunun 10 ml'si içerisinde eritildi. Aynı işlem Whitten's medyumunu için de tekrarlandı. Böylece 10 ml'de 500 mg. BSA içeren stok solüsyonlar hazırlanmış oldu. Bu arada BSA katılmaksızın hazırlanmış olan her iki medyumdan (M16 ve Whitten's) 7'şer olmak üzere toplam 14 adet steril tüp içerisine, birer mililitre hacminde medyum alındı ve tüplere 0'dan 6'ya kadar numaralar verildi.

Çalışmada, BSA' nın 0 (kontrol), 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml miktarlarının, embriyoların in vitro kültürdeki gelişimleri üzerine etkisi araştırılacağından dolayı, 1'er ml BSA içermeyen M16 ve Whitten's medyumlarını içeren tüplere şu prosedür uygulandı:

- a. 0 no'lu tüp: Bu tüp, kontrol grubu için ayrıldı ve BSA katılmadı (0 mg/ml BSA).
- b. 1 no'lu tüp: 6 µl. hacminde medyum dışarı alındı ve yerine BSA konsantresinden aynı hacimde eklendi.
- c. 2 no'lu tüp: 20 µl. hacminde medyum dışarı alındı ve yerine BSA konsantresinden aynı hacimde eklendi.
- d. 3 no'lu tüp: 60 µl. hacminde medyum dışarı alındı ve yerine BSA konsantresinden aynı hacimde eklendi.
- e. 4 no'lu tüp: 180 µl. hacminde medyum dışarı alındı ve yerine BSA konsantresinden aynı hacimde eklendi.
- f. 5 no'lu tüp: 360 µl. hacminde medyum dışarı alındı ve yerine BSA konsantresinden aynı hacimde eklendi.
- g. 6 no'lu tüp: 720 µl. hacminde medyum dışarı alındı ve yerine BSA konsantresinden aynı hacimde eklendi.

Bu uygulama sonrasında 2'si kontrol (0 mg/ml BSA) ve 12'si deney olmak üzere, toplam 14 çalışma grubu oluşturuldu. Böylece; 0, 1, 2, 3, 4, 5 ve 6 no'lu tüplerdeki medyumlar sırasıyla 0, 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml BSA içeren medyumlar haline getirildi. Daha sonra ağızları sıkıca kapatılan tüpler +4°C' de bir hafta boyunca kullanılmak üzere saklandılar.

5.1.8. İn Vitro Kültür Kapları

Çalışmada, Brinster (10) tarafından önerilen 15x60 mm. ebatlarındaki tek kullanımlık steril, plastik, kültür petripleri (Grainer) kullanıldı. Petri kutuları; taban kısmının dış tarafından, asetatlı kalem yardımı ile M16 ve Whitten's medyumları için iki eşit yarıma ayrıldı. Her bir yarıma, eşit büyüklükte 7'şer kare çizildi. Bu karelerin üzerlerine denk gelecek şekilde, petrinin içerisine 30'ar µl 'lik damlalardan oluşan ve farklı miktarlarda BSA içeren medyumlar yerleştirildi ve üzerleri buharlaşmayı önlemek ve aynı zamanda gaz alış-verişini düzenlemek amacıyla, steril mineral yağ ile (Mineral Oil, Sigma, M-5904) örtüldü.

Kültür medyumlarına aktarılmadan önce embriyolar, hücre döküntülerinden temizlenmek amacıyla M2 (yıkama) medyumunda 3 defa pasajlandılar. Bundan sonra embriyolar, hangi medyum içerisinde kültüre edileceklerse, o medyumun BSA içermeyen ve en az bir saat önceden %5 CO₂, %5 O₂ ve %90 N₂ gaz karışımında gazlanmış olan damlalarında 3 defa pasajlandılar. Böylece M2 medyumundan gelen BSA katkıları elimine edildi.

Bu işlemlerden sonra da embriyolar, en az bir saat önceden CO₂ inkübatöründe gazlanmış ve kültür medyumundan oluşan damlalar içerisine 10 - 20'şerli gruplar halinde steril pastör pipeti yardımıyla aktarıldılar.

Çalışmada embriyoların kültüründe kullanılan kültür kabini olarak (Şekil 1), temelde ortam sıcaklığını otomatik olarak ayarlayabilen ancak, gaz giriş - çıkışının ise manuel olarak kontrol edildiği bir anaerobik jar kullanıldı. Ayrıca ortamın nem oranı (% 100' e yakın nem) da anaerobik jar'ın içerisine konulan yaklaşık 300 – 400 ml hacmindeki steril distile su aracılığı ile sağlandı.



Şekil 1: Embriyoların kültüründe kullanılan inkübatör ve in vitro kültür kabini anaerobik jar.

5.2. Yöntem

Çalışma temelde iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada, farklı iki tip medyumun değişik miktarlarda protein içeren gruplarındaki in vitro gelişimleri natif olarak incelenirken, ikinci aşamada ise, aynı şartlarda kültüre edilen embriyoların gelişimleri hücre çekirdek sayıları tespit edilerek yapıldı.

Çalışmanın birinci aşamasında iki hücreli dönemde elde edilen fare embriyoları %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ tan oluşan gaz karışımı ortamda M16 ile ve Whitten's medyumları içerisinde protein kaynağı olarak BSA (Bovine Serum Albumin)' nın değişik miktarları kullanılarak gelişim düzeyleri izlendi.

Her medyum grubu için ayrı ayrı olmak üzere 0 (kontrol), 0,3 , 1 ,3 ,9 , 18 ve 36 mg/ml oranlarında BSA eklenerek toplam 14 çalışma grubu oluşturuldu. Bu şekilde değişik miktarlarda BSA içeren gruplar, in vitro kültüre tabi tutularak embriyoların in vitro gelişiminde protein kaynağı BSA' nın yararlılığı ve optimum konsantrasyonu belirlenmeye çalışıldı. Bu aşamada embriyo eldesi amacıyla kullanılan 94 dişinin vaginal plak gösteren 72 tanesi öldürüldü ve her bir çalışma grubu için 100'er adet olmak üzere toplam 1400 adet iki blastomerli embriyo kullanıldı. Bu şekilde farklı gruplar içerisinde in vitro kültüre alınan embriyoların gelişim kontrolleri 96 saat boyunca her 24 saatte bir olmak üzere inverted mikroskopta x200 büyütmede yapıp sonuçlar kaydedilirken medyumlar da tazeleri ile değiştirildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, yukarıda bahsedildiği şekliyle kültüre edilen embriyoların in vitro gelişimlerinin tespitinde kullanılan natif muayene yönteminin sadece morfolojik yapıları hakkında bilgi vermesi nedeniyle, hücre çekirdek sayılarının tespiti yöntemiyle embriyoların gelişim durumları ve yaşayabilirlikleri konusunda daha detaylı bir sonuca varmak hedeflendi. Bu amaçla embriyolar değişik gelişme dönemlerinde aseto - orsein çekirdek boyası ile boyanarak hücre çekirdek sayılarının tespiti yapıldı.

Bu amaçla da çalışmanın birinci aşamasındaki prosedürler bu aşamada da aynen tekrar edildi ve 75 adet dişinin plak gösteren 50 tanesi öldürüldü ve her bir çalışma grubunda 60'ar embriyo olmak üzere ve toplam 840 adet embriyo kullanıldı. 96 saat süren kültür periyodu boyunca 24 saatte bir olmak üzere, her bir gruptan 20'şer embriyo alındı ve medyum, taze ile yenilendi. Alınan embriyolar % 2' lik aseto orsein ile boyanarak faz kontrast mikroskopta x400 büyütmede hücre çekirdekleri sayılan embriyolar kaydedildi.

5.2.1. Verici Farelerden Embriyo Eldesi

Verici farelerden embriyo eldesi aşağıdaki prosedüre göre yapıldı.

5.2.1.1. Verici Farelerin (Donor) Süperovulasyonu

Farelerde ovulasyon ve çiftleşme günlük ışık periyodu ile ilgili olduğundan elde edilecek embriyoların ne zaman iki hücreli dönemde olacakları yaklaşık olarak belirlenebilmektedir.

Fare üretim ünitesinde 14 saat ışık - 10 saat karanlık periyoduna tabi tutulan CB6 F₁ hibridi 8 haftalık dişi farelere süperovulasyon amacıyla aşağıdaki program uygulandı.

Süperovulasyon Programı

1. Işık sabah 5⁰⁰'te yanıp akşam 19 ⁰⁰'da sönecek şekilde zaman ayarlayıcı (Timer) ile otomatik ayarlandı.

2. Operasyondan 4 gün önce (Pazartesi), 5 I.U. PMSG saat 12⁰⁰'de intra peritoneal olarak verildi.

3. PMSG uygulamasından 48 saat sonra (Çarşamba), hCG yine intraperitoneal olarak verildi. hCG enjeksiyonundan hemen sonra, dişiler önceden damızlık olarak ayrılmış bulunan, aynı ırktan 10-12 haftalık erkeklerle birebir olarak çiftleşmeye bırakıldı.

4. Genellikle aynı günün (Çarşamba) akşamı, saat 24⁰⁰ 'te östrusun başlaması ve,

5. Aynı gece (Çarşamba), saat 1⁰⁰ - 2⁰⁰ 'de ovulasyon ve çiftleşmenin gerçekleşmesi beklendi.

6. Ertesi gün (Perşembe), sabah saat 7.³⁰ - 8.³⁰ da, vericilere vaginal plak kontrolü yapıldı. Vaginal plak gösteren verici fareler ayrılarak embriyo eldesi için ayrı bir kafeste bekletildi.

7. Operasyon günü (Cuma), sabah saat 10⁰⁰ 'da iki blastomerli embriyolar oviduktan toplandılar.

5.2.1.2.Verici Farelerden Ovidukt Eldesi

Çalışmada kullanılan ışık programına göre cuma günü sabah saat 9.³⁰'da (Gebeliğin1.günü) oviduktların eldesine başlandı. Fareler öldürülmeden önce 35 mm.'lik iki petri kutusunun birincisine (M2) yıkama medyumun' dan 3ml, ikincisine ise 100'er µl lik hacimlerden oluşan 4 damla konuldu. İkinci petrinin üzeri, buharlaşmayı ve kontaminasyonları önlemek amacıyla mineral yağ ile kapatıldı. Daha sonra bu petriler 37°C'de 1 saat süreyle ekilibrasyona bırakıldı. Bunlardan birinci petri oviduktların toplanması için, ikincisi ise oviduktlardan elde edilen embriyoların toplanması ve pasajlanması için kullanıldı. Süperovulasyon sonucunda vaginal plak gösteren tüm fareler servikal dislokasyon yöntemiyle öldürüldükten sonra temiz bir kurutma kağıdı üzerine alındı ve karın bölgeleri alkollendi. Ardından, fareler tek tek batın bölgelerinden bir makas yardımıyla açıldı ve karın boşluğuna girildi. Bağırsaklar ve diğer organlar karın boşluğunun üst tarafına alındıktan sonra, kornu uterilerle onlara bağlı ovidukt, ovaryum ve buradaki yağ tabakaları disseke edildi. Saatçi pensi ile kornu uteriler tutularak oviduktlar infundibulum ile ovaryumlar arasından göz makası yardımıyla kesildi. Böylece verici farelerin tüm oviduktları, steril 35 mm.lik petri kutusundaki M2 medyumuna alındılar. Embriyolar oviduktların yıkanmasıyla elde edileceğinden dolayı, dışarı alınırken ovidukta herhangi bir hasar verilmemesine özen gösterildi.

5.2.1.3. Oviduktlardan Embriyo Eldesi

Oviduktların içinde bulunduğu petriler, 37°C'ye ayarlı ısıtma tablası üzerine alındıktan sonra embriyo eldesine geçildi. Steril saat camının içine 1 ml M2 medyumuna alındı ve bunun içerisine ovidukt bırakıldı. Stereo mikroskop altında x 20 büyütmede önce

oviduktun ampullası bulundu, daha sonra ampulla x 40 büyütmede saatçi pensi ile yakalandı ve diğer taraftan ağız kontrolündeki ve tahminen 150 - 200 µm çapındaki pastör pipeti ile buradan içeri girildi ve ovidukt 0.5 ml M2 medyumunu ile yıkandı. Böylece oviduktun dışına çıkan embriyolar önceden hazırlanmış ve üzeri mineral yağ ile örtülmüş M2 medyum damlalarına alındı. Embriyolar, burada yeni çekilmiş bir pastör pipeti ile 2-3 defa pasajlanarak partiküllerden temizlendiler. Ardından embriyolar değerlendirilmek üzere inverted mikroskoba alındılar.

5.2.1.4. Kazanılan Embriyoların Değerlendirilmesi

İn Vitro kültür amacıyla kullanılacak embriyoların 2 hücreli dönemde olması istendiğinden, embriyoların hangi zamanda bu döneme geldiklerini hesaplamak için süperovulasyonda kullanılan ışığın periyodu ve gonadotropinlerin enjeksiyon zamanı amaca uygun bir şekilde programlandı. Çalışmada kullanılan 14 saat ışık - 10 saat karanlık periyoduna göre embriyoların 2 hücreli döneme gelmesi gereken zaman, hCG enjeksiyonundan 40-45 saat sonrası olarak belirlendi. İn vitro kültüre alınacak embriyoların değerlendirilmesi ve seçimi inverted mikroskopta, x 20 büyütmede şu kriterler göz önüne alınarak yapıldı.

- a. Embriyonun 2 hücreli dönemde olması
- b. Zona pellucidanın yuvarlak ve düzgün görüntüsü
- c. Blastomerlerin eşit büyüklüğü
- d. Blastomer sitoplazmasının homojenliği ve,
- e. Blastomerlerin zona içini doldurma durumları

Bu kriterlere sahip embriyolar daha sonra, BSA içermeyen ve önceden gaz karışımında (%5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂) gazlanmış olan kültür medyumlarında üç defa pasajlanarak, M 2 medyumundan gelen BSA katkıları elimine edildi. Daha sonra embriyolar farklı oranlarda BSA içeren uygun medyum gruplarına alındı ve kültür aşamasına geçildi.

5.3. Kültür Periyotları ve Embriyoların Gelişimsel Kontrolleri

İn Vitro kültür ortamına alınan embriyoların gelişimlerinin belirlenmesi ve bulundukları medyumların tazelenmesi amacıyla her 24 saatte bir inkübatör dışına alındılar. Dışarıya alınan embriyolar gelişim durumları, bölünmelerin homojenliği, blastomer büyüklüklerinin eşitliği, blastomerlerin zona içini doldurma durumları, stoplazmalarının sağlıklı görüntüsü ve dejeneratif değişiklikler dikkate alınarak sağlık kontrolleri yapıldı. Kontrolleri yapılan embriyolar 2 saat önceden hazırlanıp 37 °C 'de ve gaz karışımında gazlanmış olan taze kültür medyumları içeren yeni petriyer içine

konuldular. Petriler kültür kabini içine yerleştirilip tekrar gazlandılar ve bu işlem 96. saate kadar her 24 saatte bir tekrarlandı ve sonuçlar kaydedildi.

5.3.1. Embriyoların Fikzasyonu ve Boyanması

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, in vitro kültüre alınan embriyoların gelişim durumlarını daha sağlıklı ve güvenilir bir şekilde belirleyebilmek amacıyla embriyoların hücre çekirdek sayılarının tespiti amaçlandı.

Bu aşamada, süperovulasyon amacıyla değişik çalışma gruplarında olmak üzere toplam 75 adet CB6 F1 ırkı dişi fare kullanıldı. Bunlardan 50 tanesinde vaginal plak gözlemlendi ve böylece çiftleşmiş olduğu anlaşılan bu fareler öldürülerek, oviduktlarındaki mevcut hücreler toplandı. Bu farelerin oviduktlarından, 1024 adet iki hücreli embriyo, 127 adet fertilize olmamış oosit ve 79 adet dejenere embriyo toplandı.

Çalışmanın bu bölümünde, birinci aşamadaki embriyo toplama ve in vitro kültür şartları değiştirilmezken, ancak bu defa her bir çalışma grubu için 60'ar embriyo kültüre alındı. İn vitro kültürün 24,48,72 ve 96. saatlerinde medyumlar tazelenildi ve her 24 saatlik kültür periyodu sonunda her gruptan 20'şer embriyo alınarak boyandı.

Ancak in vitro kültürün ilk 24. saatlik periyodunda embriyolar genellikle 2-8 blastomerli dönemde olduklarından ve bu dönemde hücre sayıları rahatça sayılabildiğinden dolayı boyama yapılmadı ve bu embriyolar ikinci 24 saatlik periyoda bırakıldılar ve 48.saatte boyandılar. Böylece çalışmada 48., 72. ve 96. saatlere ait hücre çekirdekleri boyanmış embriyoların kayıtları tutulmuş oldu.

Boyama için ayrılan embriyolar, öncelikle, hücre çekirdeklerinin şişirilerek daha rahat sayılabilmesine olanak vermesi amacıyla % 0.7 KCl solüsyonunda yaklaşık 3 – 5 dakika bekletildiler. Daha sonra, önceden temizlenmiş ve dört köşesine bir kısım parafin likit + bir kısım vazelinden oluşmuş karışımdan birer damlanın yerleştirildiği lamel üzerine tahminen 50µl. hacmindeki % 0.7'lik KCl solüsyonu içerisine embriyolar alındı. Stereo mikroskop altında, pastör pipeti yardımıyla embriyolar bir araya (damlanın ortasına) toplandı. Ardından lamelin üzerine yine önceden temizlenmiş olan lam dikkatlice kapatılarak preperat hızlı bir şekilde ters çevrildi. Yine stereo mikroskop altında x 20 büyütmede, ortamdaki sıvının fazlası ağız kontrollü pastör pipeti yardımıyla çekildi ve embriyolar lam lamel arasına sabitlendi. Bu aşamada, ortamdaki sıvının fazlası çekilirken dikkatli davranıldı ve embriyoların patlatılmamasına özen gösterildi. Embriyoların sabitlenmesindeki kriter ise, gerek embriyoların, gerekse parafin damlalarının yassılaşıp lam - lamel arasına yayılması oldu. Bu şekilde tespit edilen embriyolar; gerek kendi yapılarından ve gerekse medyumlardan kaynaklanan proteinlerin parçalanarak çözülmesi ve sağlıklı bir görüntü alınmasına engel oluşturması nedeniyle, vakit geçirilmeden bir kısım asetik asit + üç kısım etil alkol karışımından oluşan fikzatif solüsyonuna maruz

bırakıldılar. Fikzatif, yine ağız kontrollü pastör pipeti yardımıyla lam-lamel arasından yavaşça verildi. 5 dakika boyunca süren bu işlemden sonra boyama işlemine geçildi.

Embriyoların hücre çekirdek sayılarının tespiti amacıyla, çekirdek boyası aseto-orseinden yararlanıldı. Bu amaçla, önceden hazırlanmış ve filtre edilmiş olan % 2'lik aseto-orsein boyasından pastör pipetine 1 ml çekildi ve yine lam-lamel arasından kontrollü bir şekilde verildi. Stereo mikroskop altında ve x 40 büyütmede, hücre çekirdeklerinin kırmızı bir renk aldığı görüldü, boyama işleminin tamamlandığı şeklinde değerlendirildi. Yaklaşık 5 - 10 dakika süren boyama işleminden sonra preparat, % 25'lik asetik asit solüsyonu ile aynı şekilde yıkandı Mikroskop sahasında kolay bulunabilmesi amacıyla, lamin arka yüzeyinden olmak üzere embriyoların bulunduğu alan, asetatlı kalem yardımıyla işaretlendi. Preparat bu şekilde, boyanın uçmasına müsaade etmeden çabuk bir şekilde faz-kontrast mikroskobuna alındı. x 100 büyütmede saha bulunduktan sonra embriyonik hücre sayıları, boya alan çekirdeklerinin x 400 büyütmede sayılmasının ardından kaydedildi. Bu işlem toplam 14 farklı çalışma grubu için tekrar edildi ve 96 saatlik kültür periyodu süresince her 24 saatte bir her gruptan 20'şer embriyo alınarak boyandı ve çalışmanın materyal – metot kısmı sonuçlandırıldı.

Çalışma sonuçlarının istatistiksel değerlendirmelerinde, t testi ve anova varyans analiz yöntemleri kullanıldı.

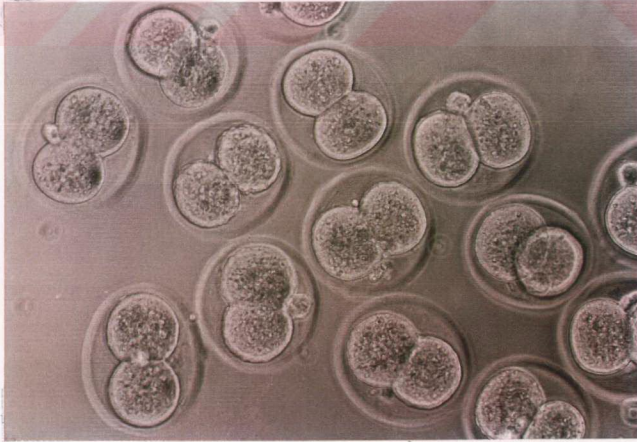
6. Bulgular

Çalışmadaki bulgular araştırmanın birinci ve ikinci aşamasındaki sonuçlar olmak üzere iki bölümde verilecektir. Birinci aşamada süperovulasyon sonuçları ile birlikte M 16 ve Whitten's Kültür medyumlarının farklı miktarlarda BSA içeren ve toplam 14 gruptan oluşan in vitro kültür çalışmasının sonuçları verilirken; ikinci aşamada ise, yine süperovulasyon sonuçları ile birlikte, bu defa ayrı bir çalışma olarak in vitro kültüre alınan ve yine 14 gruptan oluşan embriyoların, hücre çekirdek sayılarının sayıldığı çalışmanın sonuçları verilecektir.

6.1. Süperovulasyon Sonuçları:

Birinci aşamada; süperovulasyon amacıyla değişik çalışma gruplarında olmak üzere toplam 94 adet CB6 F₁ ırkı dişi fare kullanıldı. Bunlardan 72 tanesinde vaginal plak gözlendi ve böylece çiftleşmiş olduğu anlaşılan bu fareler servikal dislokasyon yöntemiyle öldürülerek oviduktlarındaki mevcut hücreler toplandı. Bu aşamada 1400 adet iki hücreli embriyo (Şekil 2), 96 adet fertilize olmamış oosit ve 33 adet dejenere embriyo (Şekil 3) toplandı.

Buna göre, fare başına düşen iki hücreli embriyo ortalaması 18.16 ± 8.65 , döllelenmemiş oosit ortalaması 1.26 ± 0.96 ve dejenere embriyo ortalaması da 0.39 ± 0.70 olarak hesaplandı (Tablo 1).



Şekil 2: Süperovulasyon sonucu ovidukt yıkaması ile elde edilen 2 blastomerli embriyolar

6.2. İn Vitro Kültür Sonuçları :

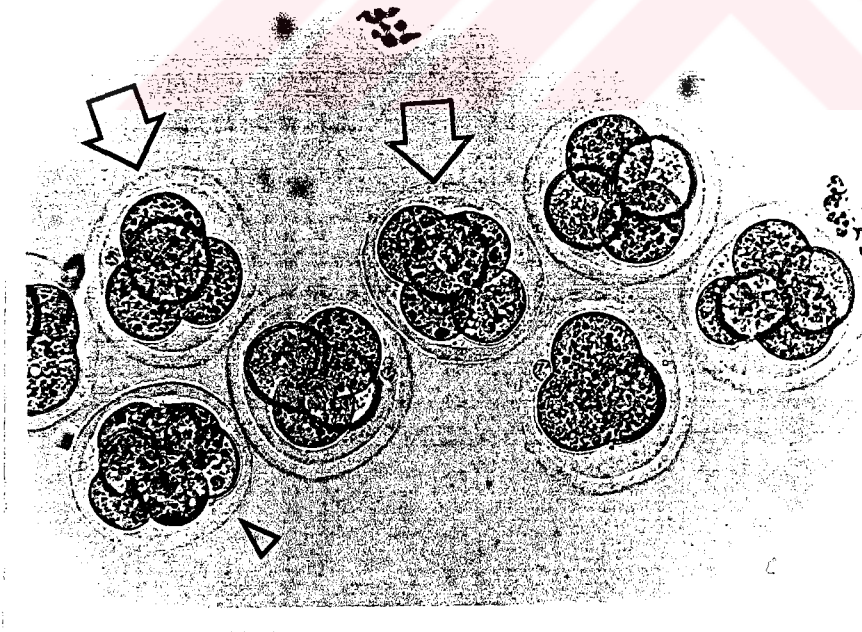
Bu aşamada, materyal metot bölümünde bahsedilen kriterlere uygun durumdaki iki blastomerli embriyolar in vitro kültür amacıyla ayrıldılar.

M 16 ve Whitten's medyumlarının sırasıyla 0, 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml miktarında BSA (Bovine Serum Albumin) içeren grupların her birinde 100'er embriyo olmak üzere kültüre toplam 1400 embriyo kültüre alındı. Her 24 saatte bir, inverted mikroskopta ve x 200 büyütmede gelişim kontrolleri yapılarak medyumları tazelenen embriyoların gelişim durumları aşağıda verilmiştir (Tablo 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9).

Her 24 saatlik kültür süresi sonunda tablolardaki n sayısındaki azalma, dejenere embriyoların kültürden çıkartılmasının bir sonucudur.

M 16 ve Whitten's medyumlarında kültüre alınan 2 blastomerli embriyoların , in vitro kültür periyodunun :

24. saatinde 4-8 blastomerli döneme (Şekil 4)
48. saatinde morula – kompakt morula dönemine (Şekil 5)
72. saatinde erken blastosist, blastosist (Şekil 6), expanded blastosist dönemlerine (Şekil 7)
96. saatinde ise hatching ve hatched blastosist dönemlerine (Şekil 8) gelişimleri takip edildi.



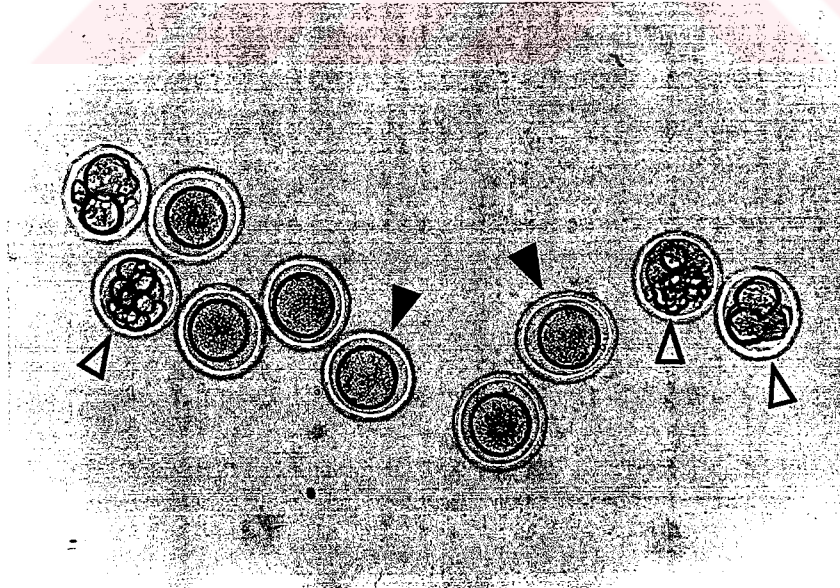
Şekil 4: İn vitro kültürün 24 saati sonucu 4 ve 8 blastomerli aşamaya gelişmiş embriyolar.

4 Blastomerli embriyo  ; 8 Blastomerli embriyo: 

Tablo 1. Çalışmanın birinci aşamasında kullanılan fareler ve bunlara ait ortalama değerler.

Çalışma Sıra Numarası	Kullanılan Fare Sayısı (n)	Çiftleşen Fare Sayısı (n)	Ovidukt'tan Kazanılan Hücre Sayıları (n)		
			2 bl.Embriyo	Oosit	Dejenere
1. Çalışma	7	5	83	10	0
2. Çalışma	7	6	94	0	0
3. Çalışma	6	4	82	0	0
4. Çalışma	7	5	72	0	0
5. Çalışma	7	5	44	12	0
6. Çalışma	8	6	96	4	0
7. Çalışma	8	6	86	12	6
8. Çalışma	7	5	56	5	2
9. Çalışma	7	6	42	8	0
10. Çalışma	8	7	225	20	15
11. Çalışma	12	9	260	15	0
12. Çalışma	10	8	260	10	10
Toplam:	94	72	1400	96	33
Fare Başına Düşen Ortalama Değerler.			18.16 ± 8.65	1.26 ± 0.96	0.39 ± 0.70

bl. : Blastomer. Dej. : Dejenere



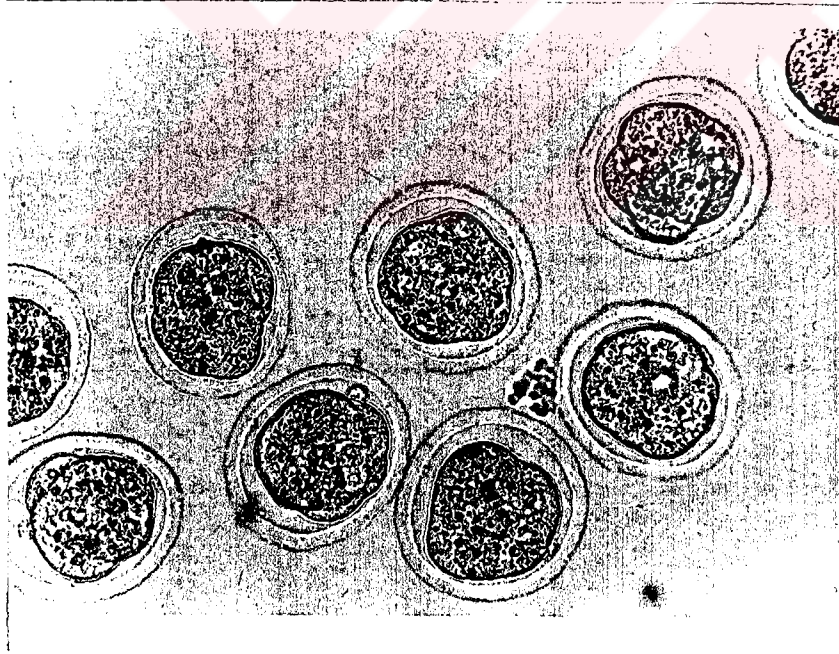
Şekil 3: Süperovulasyon sonucu ovidukt yıkaması ile elde edilen döllenmemiş oosit ve dejenere embriyolar.

Oosit:  Dejenere embriyolar: 

Tablo 2. M 16 medyumunda kültüre alınan embriyolara ait 24. saat gelişimleri.

BSA (mg/ml)	n	2bl	4bl	8bl	16bl	Kompakt Morula	Dejenere
0	100	35	46	17	-	2	-
0.3	100	8	41	32	-	19	-
1	100	12	35	27	-	26	-
3	100	5	30	36	2	27	-
9	100	2	48	36	-	13	1
18	100	13	40	22	-	25	-
36	100	27	19	23	-	26	5

bl: Blastomer

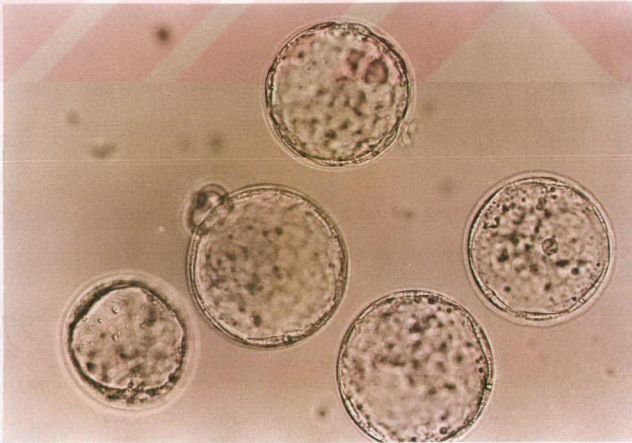


Şekil 5: İn vitro kültürün 48 saati sonucu kompakt morula aşamasına gelişmiş embriyolar.

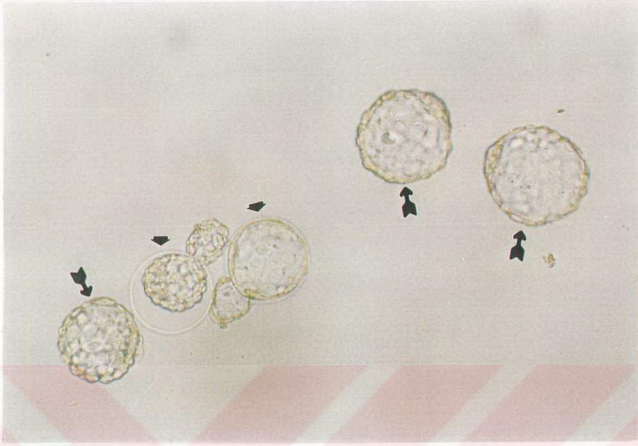


Şekil 6: İn vitro kültürün 72 saati sonucu erken blastosist, blastosist ve hatching blastosist aşamasına gelişmiş embriyolar.

Erken blastosist: ➡ Blastosist: ➡ Hatching blastosist: ➡



Şekil 7: İn vitro kültürün 72 saati sonucu expanded blastosist aşamasına gelişmiş embriyolar.



Şekil 8: İn vitro kültürün 96 saati sonucu hatching blastosist ve hatched blastosist aşamasına gelişmiş embriyolar.

Hatching blastosist:  Hatched Blastosist: 

Tablo 3. M 16 medyumunda kültüre alınan embriyolara ait 48. saat gelişimleri

BSA (mg /ml)	n	2bl	4bl	8bl	16bl	KM	E. Bl	Bl.	Exp.Bl.	Dejenere
0	100	3	16	15	-	33	-	-	2	31
0.3	100	2	14	18	1	35	18	1	-	11
1	100	-	10	11	-	52	23	1	-	3
3	100	1	11	5	-	60	22	1	-	-
9	99	-	-	16	-	66	5	-	-	12
18	100	1	1	3	-	62	8	1	-	24
36	95	1	-	-	-	60	5	-	-	29

bl: Blastomer KM: Kompakt Morula E.Bl: Erken Blastosist Bl.: Blastosist

Exp.Bl: Expanded Blastosist

Tablo 4. M 16 medyumunda kültüre kültüre alınan embriyolara ait 72. saat gelişimleri

BSA (mg/ml)	n	4bl	8bl	16bl	KM	E.BI	Bl.	Exp. Bl.	Hatching Bl.	Hatched Bl.	Dej.
0	69	-	1	-	11	18	4	7	-	1	27
0.3	89	-	-	-	18	27	20	11	1	-	12
1	97	-	2	-	24	19	14	25	-	1	12
3	100	-	1	-	6	27	19	28	-	1	18
9	87	-	-	-	16	21	23	16	-	-	11
18	76	-	-	-	21	29	17	1		-	8
36	66	1	1	-	27	21	11	-	-	-	5

bl: Blastomer KM: Kompakt Morula E.BI: Erken Blsatosist Bl.: Blastosist
Exp.BI: Expanded Blastosist Dej: Dejenere.

Tablo 5. M 16 medyumunda kültüre kültüre alınan embriyolara ait 96. saat gelişimleri

BSA (mg/ml)	n	KM	E.BI	Bl	Exp. Bl.	Hatching Bl.	Hatched Bl.	Dejenere
0	42	6	4	8	9	5	5	5
0.3	77	-	13	13	22	15	9	5
1	85	-	9	6	30	19	14	7
3	82	-	6	16	19	25	15	1
9	76	-	8	20	18	18	6	6
18	68	11	8	27	7	6	1	8
36	61	9	5	12	12	4	3	16

KM: Kompakt Morula E.BI: Erken Blsatosist Bl: Blastosist
Exp.BI: Expanded Blastosist

Tablo 6 . Whitten's medyumunda kültüre alınan embriyolara ait 24. saat gelişimleri

BSA (mg/ml)	n	2bl	4bl	8bl	16bl	KM	E.BI	BI	Dejenere
0	100	11	21	45	-	20	-	2	1
0.3	100	10	12	47	-	30	1	-	-
1	100	6	19	37	-	35	2	-	1
3	100	6	5	45	-	41	3	-	-
9	100	14	21	27	-	38	-	-	-
18	100	14	20	25	-	37	-	-	4
36	100	20	23	25	-	31	-	-	1

bl: Blastomer KM: Kompakt Morula E.BI: Erken Blsatosist BI: Blastosist

Tablo 7. Whitten's medyumunda kültüre alınan embriyolara ait 48. saat gelişimleri

BSA (mg/ml)	n	2bl	4bl	8bl	16bl.	KM	E.BI	BI	Exp. BI.	Hatching BI.	Dej.
0	99	-	1	12	-	42	26	2	-	-	16
0.3	100	1	-	3	-	54	32	3	-	-	7
1	99	1	1	-	-	40	39	5	1	1	11
3	100	-	-	4	-	38	56	-	1	-	1
9	100	1	-	-	-	36	35	-	-	-	28
18	96	2	-	5	-	41	28	1	-	-	19
36	99	-	1	2	-	46	20	1	-	-	29

bl: Blastomer KM: Kompakt Morula E.BI: Erken Blsatosist BI: Blastosist
Exp.BI: Expanded Blastosist Dej: Dejenere.

Tablo 8. Whitten's medyumunda kültüre alınan embriyolara ait 72. saat gelişimleri

BSA (mg/ml)	n	8bl	16bl	KM	E.BI	Bl.	Exp. Bl.	Hatching Bl.	Hatched Bl.	Dej.
0	83	-	-	10	18	26	20	3	-	6
0.3	93	12	-	7	8	25	34	1	-	6
1	88	-	-	8	5	41	26	4	2	2
3	99	-	-	6	10	36	41	5	-	1
9	72	-	-	3	25	24	18	-	-	2
18	77	5	-	14	26	15	9	-	-	8
36	70	-	-	20	24	16	2	-	-	8

bl: Blastomer KM: Kompakt Morula E.BI: Erken Blastosist Bl.: Blastosist
Exp.BI: Expanded Blastosist Dej: Dejenere.

Tablo 9. Whitten's medyumunda kültüre alınan embriyolara ait 96. saat gelişimleri

BSA (mg/ml)	n	KM	E.BI.	Bl.	Exp. Bl	Hatching Bl.	Hatched Bl.	Dej.
0	77	-	1	10	27	18	8	13
0.3	87	-	7	2	42	19	17	-
1	86	-	3	8	18	32	25	-
3	98	6	3	5	22	31	29	2
9	70	1	9	22	20	14	4	-
18	69	6	7	20	20	1	-	15
36	62	4	5	18	7	-	2	26

bl: Blastomer KM: Kompakt Morula E.BI: Erken Blastosist Bl.: Blastosist
Exp.BI: Expanded Blastosist Dej: Dejenere.

Gerek M 16, gerekse Whitten's medyumlarında 96 saat boyunca kültüre alınan iki blastomerli embriyoların 96. saat sonunda ulaştıkları gelişim durumları medyum gruplarına göre değerlendirildiğinde ise, şöyle bulundu:

M16 medyumunun (Tablo 10); 0 mg/ml BSA içeren grupta (Kontrol Grubu), gelişen 37 embriyonun 6 tanesi morulaya, 21 tanesi blastosiste, 5 tanesi hatching blastosiste ve 5 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, 63 tanesi dejenere oldu.

0.3 mg/ml BSA içeren grupta ise gelişen 72 embriyonun 48 tanesi blastosiste, 15 tanesi hatching blastosiste ve 9 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, 28 tanesi dejenere oldu.

BSA'nın 1 mg/ml'ye çıkartıldığı grupta, gelişen 78 embriyonun 45 tanesi blastosiste, 19 tanesi hatching blastosiste ve 14 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, 22 tanesi dejenere oldu.

3 mg/ml BSA içeren gruba gelindiğinde ise; Bu grupta 81 embriyo gelişti ve bunlardan 41 tanesi blastosiste, 25 tanesi hatching blastosiste ve 15 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, 19 tanesi dejenere oldu.

BSA'nın 9 mg/ml'ye çıkarıldığı grupta da, gelişen 70 embriyonun, 46 tanesi blastosiste, 18 tanesi hatching blastosiste ve 6 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, 30 tanesi dejenere oldu.

Bunun yanı sıra, 18 mg/ml BSA içeren grupta, gelişen 60 embriyonun 11 tanesi morulaya, 42 tanesi blastosiste, 6 tanesi hatching blastosiste ve 1 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, 40 tanesi dejenere oldu.

Son olarak 36 mg/ml BSA içeren grupta ise, gelişen 45 embriyonun 9 tanesi morulaya, 29 tanesi blastosiste, 4 tanesi hatching blastosiste ve 3 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, 55 tanesi dejenere oldu.

Tablo 10. M16 medyum gruplarında kültüre edilen embriyoların 96. saat sonundaki gelişim durumlarına göre dağılımları.

BSA (mg/ml)	Başlangıç embriyo sayısı (n)	Morula (n)	Bl. (n)	Hatching Bl. (n)	Hatched Bl. (n)	Toplam Gelişenler (n)	Toplam Dejenere (n)
0	100	6	21	5	5	37	63
0.3	100	-	48	15	9	72	28
1	100	-	45	19	14	78	22
3	100	-	41	25	15	81	19
9	100	-	46	18	6	70	30
18	100	11	42	6	1	60	40
36	100	9	29	4	3	45	55

bl: Blastomer; Bl.: Blastosist

Bunun yanında Whitten's medyumunda aynı miktarlarda BSA içeren gruptaki gelişimler de sırasıyla şöyle oldu: (Tablo 11). 0 mg/ml BSA içeren grupta, gelişen 64 embriyonun, 38 tanesi blastosiste, 18 tanesi hatching blastosiste, 8 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, 36 tanesi dejenere oldu. 0.3 mg/ml BSA içeren grupta ise, gelişen 87 embriyonun 51 tanesi blastosiste, 19 tanesi hatching blastosiste, 17 tanesi hatched blastosiste, 13 tanesi dejenere oldu.

BSA 'nın 1mg/ml miktarını içeren grupta da 86 embriyo gelişme gösterdi ve bunların 29 tanesi blastosiste, 32 tanesi hatching blastosiste, 25 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, 14 tanesi dejenere oldu. 3 mg/ml BSA içeren gruba gelindiğinde, gelişen 96 embriyonun 6 tanesi morulaya, 30 tanesi blastosiste, 31 tanesi hatching blastosiste, 29 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, 4 tanesi dejenere oldu. BSA 9 mg/ml'ye çıkartıldığında ise, bu grupta gelişen 70 embriyonun 1 tanesi morulaya, 51 tanesi blastosiste, 14 tanesi hatching blastosiste, 4 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, 30 tanesi dejenere oldu. 18 mg/ml BSA içeren grupta bu defa meydana gelen embriyonik gelişim düşük oldu ve bu grupta gelişen 54 embriyonun 6 tanesi morulaya, 47 tanesi blastosiste, 1 tanesi hatching blastosiste, ulaşırken hiç hatched blastosist gelişimi olmadı ve 46 embriyo da dejenere oldu. 36 mg/ml BSA içeren son grupta ise, gelişen 36 embriyonun 4 tanesi morulaya, 30 tanesi blastosiste, 2 tanesi hatched blastosiste ulaşırken, hiç hatching blastosist gelişimi olmadı ve 64 embriyo da dejenere oldu.

Tablo 11. Whitten's medyum gruplarında kültüre edilen embriyoların 96. saat sonundaki gelişim durumlarına göre dağılımları.

BSA (mg/ml)	Başlangıç embriyo sayısı (n)	Morula (n)	Bl. (n)	Hatching Bl. (n)	Hatched Bl. (n)	Toplam Gelişenler (n)	Toplam Dejenere (n)
0	100	-	38	18	8	64	36
0.3	100	-	51	19	17	87	13
1	100	-	29	32	25	86	14
3	100	6	30	31	29	96	4
9	100	1	51	14	4	70	30
18	100	6	47	1	-	54	46
36	100	4	30	-	2	36	64

bl: Blastomer; Bl.: Blastosist

6.2.1. M 16 ve Whitten's Medyumlarında Kültüre Alınan Embriyoların Başlangıç Embriyo Sayısına Göre Gelişim Oranları

M16 ve Whitten's medyumlarının 0, 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml miktarlarında BSA (Bovine Serum Albumin) içeren gruplarında, in vitro kültür periyodunun 24, 48, 72 ve 96. saatlerdeki gelişim oranları Tablo 12 ve 13' te verilmiştir.

Tablo 12. M 16 medyumunda kültüre alınan embriyolarda gözlenen ortalama gelişim oranları (%)

Gruplar BSA (mg/ml)	Başlangıç Embriyo Sayısı (n)	Saatlere göre gelişim oranları (%)*			
		24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
0	100	100.00 ± 0.00 ^a	74.36 ± 33.07 ^c	40.26 ± 32.08 ^d	33.43 ± 30.69 ^c
0.3	100	100.00 ± 0.00 ^a	89.31 ± 20.25 ^{ab}	70.85 ± 28.87 ^{bc}	65.57 ± 27.44 ^b
1	100	100.00 ± 0.00 ^a	95.83 ± 14.43 ^a	85.92 ± 16.82 ^a	79.22 ± 16.64 ^{ab}
3	100	100.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a	88.01 ± 16.06 ^a	84.74 ± 17.61 ^a
9	100	97.92 ± 7.22 ^a	87.95 ± 20.14 ^{ab}	78.41 ± 21.36 ^{ab}	77.02 ± 19.79 ^{ab}
18	100	100.00 ± 0.00 ^a	81.06 ± 23.44 ^{bc}	68.48 ± 30.56 ^{bc}	45.94 ± 32.20 ^c
36	100	98.81 ± 4.13 ^a	73.39 ± 29.22 ^c	63.59 ± 32.47 ^c	37.80 ± 26.07 ^c

^{abcd} Dikey kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (Anova Varyans Analizi)

*Oranlar Başlangıç Embriyo Sayısı Göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

Tablo 13. Whitten's medyumunda kültüre alınan embriyolarda gözlenen ortalama gelişim oranları (%)

Gruplar BSA (mg/ml)	Başlangıç Embriyo Sayısı (n)	Saatlere göre gelişim oranları (%)*			
		24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
0	100	98.33 ± 5.77 ^a	88.23 ± 15.79 ^{abcd}	75.13 ± 30.53 ^c	63.88 ± 35.06 ^c
0.3	100	100.00 ± 0.00 ^a	94.04 ± 10.18 ^{ab}	89.35 ± 16.62 ^{ab}	88.00 ± 13.87 ^{ab}
1	100	98.81 ± 4.13 ^a	90.69 ± 13.20 ^{abc}	89.50 ± 12.92 ^{ab}	86.97 ± 13.29 ^{ab}
3	100	100.00 ± 0.00 ^a	96.52 ± 6.70 ^a	94.57 ± 7.43 ^a	94.57 ± 7.43 ^a
9	100	100.00 ± 0.00 ^a	84.58 ± 25.21 ^{cd}	78.33 ± 30.53 ^{bc}	78.33 ± 30.53 ^b
18	100	98.33 ± 5.77 ^a	85.97 ± 18.00 ^{bcd}	72.57 ± 18.65 ^{cd}	51.96 ± 17.10 ^c
36	100	98.61 ± 4.81 ^a	81.07 ± 21.31 ^d	60.29 ± 32.96 ^d	32.64 ± 22.70 ^d

^{abcd} Dikey kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (Anova Varyans Analizi)

*Oranlar Başlangıç Embriyo Sayısı Göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

Buna göre: M 16 Medyumunun 0, 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml miktarlarında BSA (Bovine Serum Albumin) içeren ve toplam 12 tekrar sonucunda tamamlanan gruplarında, in vitro kültürün ilk 24 saatlik döneminde meydana gelen ortalama gelişim oranları sırasıyla; 100 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 , 97.92 ± 7.22 , 100.00 ± 0.00 ve 98.81 ± 4.13 olarak hesaplandı (Tablo 12).

Aynı gruplarda in vitro kültürün 48. saatlik döneminde meydana gelen ortalama gelişim oranları sırasıyla; 74.36 ± 33.07 , 89.31 ± 20.25 , 95.83 ± 14.43 , 100.00 ± 0.00 , 87.95 ± 20.14 , 81.06 ± 23.44 ve 73.39 ± 29.22 olarak hesaplandı (Tablo 12).

In vitro kültürün 72. saatlik döneminde de aynı gruplarda meydana gelen ortalama gelişim oranları sırasıyla; 40.26 ± 32.08 , 70.85 ± 28.87 , 85.92 ± 16.82 , 88.01 ± 16.06 , 78.41 ± 21.36 , 68.48 ± 30.56 ve 63.59 ± 32.47 olarak hesaplandı (Tablo 12).

In vitro kültürün 96. saatlik dönemine gelindiğinde ise yine aynı gruplarda meydana gelen ortalama gelişim oranları da sırasıyla; 33.43 ± 30.69 , 65.57 ± 27.44 , 79.22 ± 16.64 , 84.74 ± 17.61 , 77.02 ± 19.79 , 45.94 ± 32.20 ve 37.80 ± 26.07 olarak hesaplandı (Tablo 12).

Bunun yanında Whitten's Medyumunun 0, 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml miktarlarında BSA (Bovine Serum Albumin) içeren gruplarında, in vitro kültürün ilk 24 saatlik döneminde meydana gelen ortalama gelişim oranları sırasıyla; 98.33 ± 5.77 , 100.00 ± 0.00 , 98.81 ± 4.13 , 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 , 98.33 ± 5.77 ve 98.61 ± 4.81 olarak hesaplandı (Tablo 13).

Aynı gruplarda in vitro kültürün 48. saatlik dönemde meydana gelen ortalama gelişim oranları da sırasıyla; 88.23 ± 15.79 , 94.04 ± 10.18 , 90.69 ± 13.20 , 96.52 ± 6.70 , 84.58 ± 25.21 , 85.97 ± 18.00 ve 81.07 ± 21.31 olarak hesaplandı (Tablo 13).

Devam eden in vitro kültürün 72. saatlik döneminde de aynı gruplarda meydana gelen ortalama gelişim oranları sırasıyla; 75.13 ± 30.53 , 89.35 ± 16.62 , 89.50 ± 12.92 , 94.57 ± 7.43 , 78.33 ± 30.53 , 72.57 ± 18.65 ve 60.29 ± 32.96 olarak hesaplanırken (Tablo 13).

Doksanaltı saatlik dönemde ise, yine aynı gruplarda meydana gelen ortalama gelişim oranları da sırasıyla; 63.88 ± 35.06 , 88.00 ± 13.87 , 86.97 ± 13.29 , 94.57 ± 7.43 , 78.33 ± 30.53 , 51.96 ± 17.10 ve 32.64 ± 22.70 olarak hesaplandı (Tablo 13).

6.2.2. İn Vitro Kültür Periyodunun İlk 24 Saatlik Dönemine Ait Gruplar Arası Gelişim Oranları

Embriyoların in vitro kültür periyodunun ilk 24 saatlik döneminde M16 ve Whitten's medyum gruplarının 0, 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml miktarlarında BSA (Bovine Serum Albumin) içeren gruplarındaki, gelişim oranları değerlendirildiğinde ise, M16 medyumundaki gelişim oranları sırasıyla; 100 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 , 100.00 ± 0.00 ,

%100.00 $\pm$ 0.00, %97.92 $\pm$ 7.22, %100.00 $\pm$ 0.00, 98.81 $\pm$ 4.13 olurken, aynı değerler Whitten's medyumunda sırasıyla; %98.33 $\pm$ 5.77, %100.00 $\pm$ 0.00, %98.81 $\pm$ 4.13, %100.00 $\pm$ 0.00, %100.00 $\pm$ 0.00, %98.33 $\pm$ 5.77 ve %98.61 $\pm$ 4.81 olarak gerçekleşti (Tablo 14)

Tablo 14. Embriyoların in vitro kültür periyodunun ilk 24 saatlik dönemine ait gruplar arası gelişim oranları (%).

Medyum Tipi	Embriyo Sayısı (n)	BSA (Bovine Serum Albumin) (mg/ml)						
		0	0.3	1	3	9	18	36
M 16	100	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	97.92 $\pm$ 7.22 ^a	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	98.81 $\pm$ 4.13 ^a
Whitten's	100	98.33 $\pm$ 5.77 ^a	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	98.81 $\pm$ 4.13 ^a	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	98.33 $\pm$ 5.77 ^a	98.61 $\pm$ 4.81 ^a

^a Dikey kolonlarda aynı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir. (p > 0.05) (t testi).

6.2.3. İn Vitro Kültür Periyodunun 48 Saatlik Dönemine Ait Gruplar Arası Gelişim Oranları

Embriyoların in vitro kültür periyodunun 48 saatlik döneminde M 16 ve Whitten's medyum gruplarının aynı BSA miktarlardaki gelişim oranları incelendiğinde, M 16 medyumundaki gelişim oranları sırasıyla; %74.36 $\pm$ 33.07, %89.31 $\pm$ 20.25, %95.83 $\pm$ 14.43, %100.00 $\pm$ 0.00, %87.95 $\pm$ 20.14, %81.06 $\pm$ 23.44 ve %73.39 $\pm$ 29.22 olurken, aynı değerler Whitten's medyumunda sırasıyla, %88.23 $\pm$ 15.79 , %94.04 $\pm$ 10.18 , %90.69 $\pm$ 13.20, %96.52 $\pm$ 6.70, %84.58 $\pm$ 25.71, %85.97 $\pm$ 18.00 ve %81.07 $\pm$ 21.31 olarak gerçekleşti (Tablo 15).

Tablo 15. Embriyoların in vitro kültür periyodunun 48 saatlik dönemine ait gruplar arası gelişim oranları (%).

Medyum Tipi	Başlangıç Embriyo Sayısı (n)	BSA (Bovine Serum Albumin) (mg/ml)						
		0	0.3	1	3	9	18	36
M 16	100	74.36 $\pm$ 33.07 ^b	89.31 $\pm$ 20.25 ^a	95.83 $\pm$ 14.43 ^a	100.00 $\pm$ 0.00 ^a	87.95 $\pm$ 20.14 ^a	81.06 $\pm$ 23.44 ^a	73.39 $\pm$ 29.22 ^a
Whitten's	100	88.23 $\pm$ 15.79 ^a	94.04 $\pm$ 10.18 ^a	90.69 $\pm$ 13.20 ^b	96.52 $\pm$ 6.70 ^a	84.58 $\pm$ 25.71 ^a	85.97 $\pm$ 18.00 ^a	81.07 $\pm$ 21.31 ^a

^{a b}

Dikey kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p < 0.05) (t testi).

6.2.4. İn Vitro Kültür Periyodunun 72. Saatlik Dönemine Ait Gruplar Arası Gelişim Oranları

İn vitro kültür periyodunun 72 saatlik döneminde M 16 ve Whitten's medyum gruplarının aynı BSA miktarlarındaki gelişim oranları değerlendirildiğinde ise, M 16 medyumundaki gelişim oranları BSA miktarlarına göre sırasıyla; %40.26 $\pm$ 32.08, %70.85 $\pm$ 28.87, %85.92 $\pm$ 16.82, %88.01 $\pm$ 16.06, %78.41 $\pm$ 21.36, %68.48 $\pm$ 30.56 ve %63.59 $\pm$ 32.47 olurken, aynı değerler Whitten's medyumunda sırasıyla; %75.13 $\pm$ 30.53, %89.35 $\pm$ 16.62, %89.50 $\pm$ 12.92, %94.57 $\pm$ 7.43, %78.33 $\pm$ 30.53 , %72.57 $\pm$ 18.65 ve %60.29 $\pm$ 32.96 olarak gerçekleşti (Tablo 16).

Tablo 16 Embriyoların in vitro kültür periyodunun 72 saatlik dönemine ait gruplar arası gelişim oranları (%).

Medyum Tipi	Başlangıç Embriyo Sayısı (n)	BSA (Bovine Serum Albumin) oranları (mg/ml)						
		0	0.3	1	3	9	18	36
M 16	100	40.26 $\pm$ 32.08 ^b	70.85 $\pm$ 28.87 ^a	85.92 $\pm$ 16.82 ^a	88.01 $\pm$ 16.06 ^b	78.41 $\pm$ 21.36 ^a	68.48 $\pm$ 30.56 ^a	63.59 $\pm$ 32.47 ^a
Whitten's	100	75.13 $\pm$ 30.53 ^a	89.35 $\pm$ 16.62 ^a	89.50 $\pm$ 12.92 ^a	94.57 $\pm$ 7.43 ^a	78.33 $\pm$ 30.53 ^a	72.57 $\pm$ 18.65 ^a	60.29 $\pm$ 32.96 ^a

^{a b} Dikey kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (t testi)

6.2.5. İn Vitro Kültür Periyodunun 96 Saatlik Dönemine Ait Gruplar Arası Gelişim Oranları

İn vitro kültür periyodunun sonuna (96. saatlik dönemine) gelindiğinde ise, M 16 ve Whitten's medyum gruplarının aynı BSA miktarlardaki gelişim oranları değerlendirildiğinde, M 16 medyumundaki gelişim oranları sırasıyla %33.43 $\pm$ 30.69, %65.57 $\pm$ 27.44, %79.22 $\pm$ 16.64, % 84.74 $\pm$ 17.61, %77.02 $\pm$ 19.79, %45.94 $\pm$ 32.20 ve %37.80 $\pm$ 26.07 olurken, aynı değerler Whitten's medyumunda sırasıyla; %63.88 $\pm$ 35.06, %88.00 $\pm$ 13.87, %86.97 $\pm$ 13.29, %94.57 $\pm$ 7.43, %78.93 $\pm$ 30.53, %51.96 $\pm$ 17.10 ve %32.64 $\pm$ 22.70 olarak gerçekleşti (Tablo 17).

Tablo 17. Embriyoların in vitro kültür periyodunun 96 saatlik dönemine ait gruplar arası gelişim oranları (%).

Medyum Tipi	Başlangıç Embriyo Sayısı (n)	BSA (Bovine Serum Albumin) oranları (mg/ml)						
		0	0.3	1	3	9	18	36
M 16	100	33.43 ± 30.69 ^b	65.57 ± 27.44 ^b	79.22 ± 16.64 ^a	84.74 ± 17.61 ^b	77.02 ± 19.79 ^a	45.94 ± 32.20 ^b	37.80 ± 26.07 ^a
Whitten's	100	63.88 ± 35.06 ^a	88.00 ± 13.87 ^a	86.97 ± 13.29 ^a	94.57 ± 7.43 ^a	78.93 ± 30.53 ^a	51.96 ± 17.10 ^a	36.64 ± 22.70 ^a

^{a b} Dikey kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (t testi)

6.2.6. M 16 Medyumunda Gelişen Hatching Blastosist Oranları

M 16 medyumunun 0, 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml miktarlarında BSA içeren gruplarında in vitro kültüre alınan embriyolarda 96. saatte meydana gelen hatching oranları karşılaştırıldığında bu oranlar sırasıyla; %2.92 ± 6.89, %10.77 ± 13.64, %17.05 ± 17.39, %25.26 ± 22.98, %17.47 ± 17.98, %2.86 ± 5.19 ve %1.81 ± 4.58 olarak gerçekleşti (Tablo 18).

Tablo 18. M 16 medyumunda gelişen embriyoların 96 saatlik kültürü sonucundaki hatching blastosist oranları: (%)*

BSA (Bovine Serum Albumin) oranları (mg/ml)						
0	0.3	1	3	9	18	36
2.92 ± 6.89 ^c	10.77 ± 13.64 ^b	17.05 ± 17.39 ^b	25.26 ± 22.98 ^a	17.47 ± 17.98 ^{ab}	2.86 ± 5.19 ^c	1.81 ± 4.58 ^c

^{a b} Yatay kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (Anova Varyans Analizi)

*Oranlar Başlangıç Embriyo Sayısı Göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

6.2.7. M 16 Medyumunda Gelişen Hatched Blastosist Oranları

M 16 medyumunun aynı miktarlarda BSA içeren gruplarında in vitro kültüre alınan embriyolarda 96. saatte meydana gelen Hatched oranları karşılaştırıldığında bu oranlar sırasıyla; %6.81 ± 19.34, %8.05 ± 12.51, %17.00 ± 24.21, %19.08 ± 19.92, %3.14 ± 6.43, %0.42 ± 1.44 ve %3.61 ± 9.79 olarak bulundu (Tablo 19).

Tablo 19. M 16 medyumunda gelişen embriyoların 96 saatlik kültürü sonucundaki hatched blastosist oranları (%)^{*}

BSA (Bovine Serum Albumin) oranları (mg/ml)						
0	0.3	1	3	9	18	36
6.81 ± 19.34 ^b	8.05 ± 12.51 ^b	17.00 ± 24.21 ^a	19.08 ± 19.92 ^a	3.14 ± 6.43 ^b	0.42 ± 1.44 ^b	3.61 ± 9.79 ^b

^{a b} Yatay kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (Anova Varyans Analizi)

^{*}Oranlar Başlangıç Embriyo Sayısı Göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

6.2.8. M 16 Medyumunda Gelişen Hatching+Hatched Blastosist Oranları

M 16 medyumunun 0, 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml miktarlarında BSA içeren gruplarında in vitro kültüre alınan embriyolarda 96. saatte meydana gelen hatching + hatched blastosist oranları karşılaştırıldığında bu oranlar sırasıyla; %9.72± 20.47, %18.83 ± 21.31, %34.05 ± 26.32, %44.34 ± 25.94, %20.61 ± 18.68, %3.27± 5.96 ve %5.42 ± 11.39 olarak bulundu (Tablo 20).

Tablo 20. M 16 medyumunda gelişen embriyoların 96 saatlik kültürü sonucundaki hatching+hatched blastosist oranları (%)^{*}

BSA (Bovine Serum Albumin) oranları (mg/ml)						
0	0.3	1	3	9	18	36
9.72 ± 20.47 ^c	18.83 ± 21.31 ^{bc}	34.05 ± 26.32 ^a	44.34 ± 25.94 ^a	20.61 ± 18.68 ^b	3.27 ± 5.96 ^c	5.42 ± 11.39 ^c

^{abcd} Yatay kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (Anova Varyans Analizi)

^{*}Oranlar Başlangıç Embriyo Sayısı Göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

6.2.9. Whitten's Medyumunda Gelişen Hatching Blastosist Oranları

Whitten's medyumunun aynı gruplarında, in vitro kültüre alınan embriyolarda 96. saatte meydana gelen hatching blastosist oranları karşılaştırıldığında bu oranlar sırasıyla; %23.77 ± 23.67, %17.66 ± 18.48, %33.27 ± 31.92, %35.50 ± 19.68, %15.81± 20.73, %0.83± 2.89 ve %0.00± 0.00 olarak bulundu (Tablo 21).

Tablo 21. Whitten's medyumunda gelişen embriyoların 96 saatlik kültürü sonucundaki hatching blastosist oranları (%)*

BSA (Bovine Serum Albumin) oranları (mg/ml)						
0	0.3	1	3	9	18	36
23.77 ± 23.67 ^{bc}	17.66 ± 18.48 ^c	33.27 ± 31.92 ^{ab}	35.50 ± 19.68 ^a	15.81 ± 20.73 ^c	0.83 ± 2.89 ^d	0.00 ± 0.00 ^d

^{abcd} Yatay kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (Anova Varyans Analizi)

*Oranlar Başlangıç Embriyo Sayısı Göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

6.2.10. Whitten's Medyumunda Gelişen Hatched Blastosist Oranları

Whitten's medyumunun aynı gruplarında, in vitro kültüre alınan embriyolarda 96. saatte meydana gelen hatched blastosist oranları karşılaştırıldığında bu oranlar sırasıyla; %12.52 ± 17.65, %14.89 ± 20.40, %22.04 ± 29.89, %32.21 ± 25.79, %3.33±11.55 %0.00 ± 0.00 ve % 1.67± 5.77 olarak bulundu (Tablo 22).

Tablo 22. Whitten's medyumunda gelişen embriyoların 96 saatlik kültürü sonucundaki hatched blastosist oranları: (%)*

BSA (Bovine Serum Albumin) oranları (mg/ml)						
0	0.3	1	3	9	18	36
12.52 ± 17.65 ^{bc}	14.89 ± 20.40 ^b	22.04 ± 29.89 ^{ab}	32.21 ± 25.70 ^a	3.33 ± 11.55 ^c	0.00 ± 0.00 ^c	1.67 ± 5.77 ^c

^{abcd} Yatay kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (Anova Varyans Analizi)

*Oranlar Başlangıç Embriyo Sayısı Göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

6.2.11. Whitten's Medyumunda Gelişen Hatching+Hatched Blastosist Oranları

Whitten's medyumunun aynı gruplarında, in vitro kültüre alınan embriyolarda 96. saatte meydana gelen Hatching+ Hatched blastosist oranları karşılaştırıldığında ise bu oranlar sırasıyla; %36.30 ± 36.93, %32.55 ± 24.60,% 55.31 ± 32.35, %67.70 ± 25.22, %19.15 ± 24.36,% 0.83 ± 2.89 ve %1.67 ± 5.77 olarak bulundu (Tablo 23).

Tablo 23. Whitten's medyumunda gelişen embriyoların 96 saatlik kültürü sonucundaki hatching+hatched blastosist oranları (%)*

BSA (Bovine Serum Albumin) oranları (mg/ml)						
0	0.3	1	3	9	18	36
36.30 ± 36.93 ^b	32.55 ± 24.60 ^{bc}	55.31 ± 32.35 ^a	67.70 ± 25.22 ^a	19.15 ± 24.36 ^c	0.83 ± 2.89 ^d	1.67 ± 5.77 ^d

^{abcd} Yatay kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (Anova Varyans Analizi)

*Oranlar Başlangıç Embriyo Sayısı Göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

6.3. Medyumlar ve Gruplar Arasında Gelişen Hatching Blastosist Oranları Değerlendirmesi (%)

Gerek M 16, gerekse Whitten's medyumlarının in vitro kültür periyodunun sonu (96. saat) itibarıyla 0, 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg / ml miktarlarında BSA içeren grupları arasındaki Hatching Blastosist Oranları açısından karşılaştırılmasında (Tablo 24), bu değerler M 16 medyum grupları için sırasıyla; %2.92 ± 6.89, %10.77 ± 13.64, % 17.05 ± 17.39, %25.26 ± 22.98, %17.47 ± 17.98, % 2.86 ± 5.19 ve 1.81 ± 4.58 olurken, aynı değerler Whitten's medyum gruplarında sırasıyla %23.77 ± 23.67, %17.66 ± 18.48, %33.27 ± 31.92, %35.50 ± 19.68, %15.81 ± 20.73, %0.83 ± 2.89 ve %0.00 ± 0.00 olarak bulundu (p< 0.05).

Tablo 24. Medyumlar ve gruplar arasında 96. saate ait hatching blastosist oranları: (%)*

Medyum	BSA (Bovine Serum Albumin) oranları (mg/ml)						
	0	0.3	1	3	9	18	36
M 16	2.92 ± 6.89 ^b	10.77 ± 13.64 ^a	17.05 ± 17.39 ^b	25.26 ± 22.98 ^a	17.47 ± 17.98 ^a	2.86 ± 5.19 ^a	1.81 ± 4.58 ^a
Whitten's	23.77 ± 23.67 ^a	17.66 ± 18.48 ^a	33.27 ± 31.92 ^a	35.50 ± 19.68 ^a	15.81 ± 20.73 ^a	0.83 ± 2.89 ^a	0.00 ± 0.00 ^a

^{ab} Dikey kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (t testi)

*Oranlar Başlangıç Embriyo Sayısı Göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

6.4. Medyumlar ve Gruplar Arasında Gelişen Hatched Blastosist Oranları Değerlendirmesi (%)

Gerek M 16, gerekse Whitten's medyumlarının in vitro kültür periyodunun sonu (96. saat) itibarıyla aynı miktarlarda BSA içeren grupları arasındaki Hatched Blastosist Oranları açısından karşılaştırılmasında (Tablo 25), bu değerler M 16 medyum grupları için sırasıyla; %6.81 $\pm$ 19.34, %8.05 $\pm$ 12.51, %17.00 $\pm$ 24.21, 19.08 $\pm$ 19.92, %3.14 $\pm$ 6.43, %0.42 $\pm$ 1.44 ve %3.61 $\pm$ 9.79 olurken, aynı değerler Whitten's medyum gruplarında sırasıyla %12.52 $\pm$ 17.65, %14.89 $\pm$ 20.40, %22.04 $\pm$ 28.89, %32.21 $\pm$ 25.70, %3.33 $\pm$ 11.55, %0.00 $\pm$ 0.00 ve 1.67 $\pm$ 5.77 olarak bulundu ($p < 0.05$).

Tablo 25. Medyumlar ve gruplar arasında 96. saate ait hatched blastosist oranları (%)*

Medyum	BSA (Bovine Serum Albumin) oranları (mg/ml)						
	0	0.3	1	3	9	18	36
M 16	6.81 $\pm$ 19.34 ^a	8.05 $\pm$ 12.51 ^a	17.00 $\pm$ 24.21 ^a	19.08 $\pm$ 19.92 ^b	3.14 $\pm$ 6.43 ^a	0.42 $\pm$ 1.44 ^a	3.61 $\pm$ 9.79 ^a
Whitten's	12.52 $\pm$ 17.65 ^a	14.89 $\pm$ 20.40 ^a	22.04 $\pm$ 28.89 ^a	32.21 $\pm$ 25.70 ^a	3.33 $\pm$ 11.55 ^a	0.00 $\pm$ 0.00 ^a	1.67 $\pm$ 5.77 ^a

^{ab} Dikey kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. ($p < 0.05$) (t testi)

*Oranlar Başlangıç Embriyo Sayısı Göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

6.5. Medyumlar ve Gruplar Arasında Gelişen Hatching+ Hatched Blastosist Oranları Değerlendirmesi (%)

In vitro kültür periyodunun sonu (96. saat) itibarıyla aynı miktarlarda BSA içeren grupları arasındaki Hatching +Hatched Blastosist Oranları açısından karşılaştırılmasında ise (Tablo 26) bu değerler M 16 medyum grupları için sırasıyla; %9.72 $\pm$ 20.47, %18.83 $\pm$ 21.31, %34.05 $\pm$ 26.32, %44.34 $\pm$ 25.94, %20.61 $\pm$ 18.68, %3.27 $\pm$ 5.96, %5.42 $\pm$ 11.39 olurken, aynı değerler Whitten's medyum gruplarında sırasıyla; %36.30 $\pm$ 36.93, %32.55 $\pm$ 24.60, %55.31 $\pm$ 32.35, %67.70 $\pm$ 25.22, %19.05 $\pm$ 24.36, %0.83 $\pm$ 2.89 ve %1.67 $\pm$ 5.77 olarak bulundu ($p < 0.05$).

Tablo 26. Medyumlar ve gruplar arasında 96. saate ait hatching+hatched blastosist oranları: (%)*

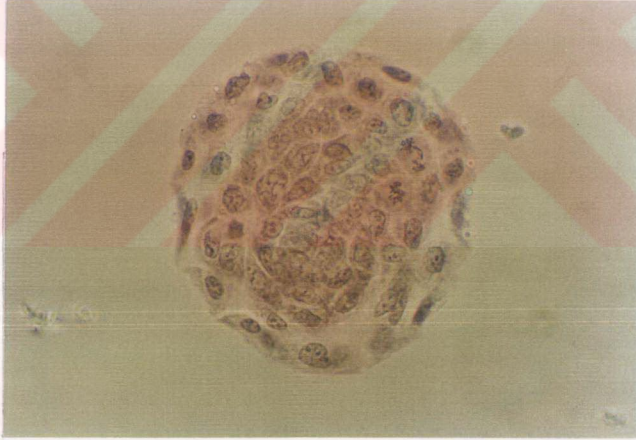
Medyum	BSA (Bovine Serum Albumin) oranları (mg/ml)						
	0	0.3	1	3	9	18	36
M 16	9.72 ± 20.47 ^b	18.83 ± 21.31 ^b	34.05 ± 26.32 ^b	44.34 ± 25.94 ^a	20.61 ± 18.68 ^a	3.27 ± 5.96 ^a	5.42 ± 11.39 ^a
Whitten's	36.30 ± 36.93 ^a	32.55 ± 24.60 ^a	55.31 ± 32.35 ^a	67.70 ± 25.22 ^a	19.05 ± 24.36 ^a	0.83 ± 2.89 ^a	1.67 ± 5.77 ^a

^{ab} Dikey kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (t testi)

*Oranlar Başlangıç Embriyo Sayısı Göz önüne alınarak hesaplanmıştır.

6.6. Embriyoların İn Vitro Kültürü ve Embriyonik Hücre Sayılarının Tespiti.

Çalışmanın bu bölümünde süperovulasyon sonuçlarıyla birlikte, embriyonik hücre sayıları tespit edilen embriyolara ait sonuçlar verilecektir (Şekil 9,10).



Şekil 9: 96 saatlik in vitro kültür sonucu aseto-orsein boyama tekniği ile boyanan blastosist aşamasına gelişmiş embriyodaki hücrelerin görünümü.



Şekil 10: 96 saatlik in vitro kültür sonucu aseto-orsein boyama tekniği ile boyanan hatching blastosist aşamasına gelişmiş embriyodaki hücrelerin görünümü.

6.6.1. Süperovulasyon Sonuçları

İkinci aşamada, süperovulasyon amacıyla değişik çalışma gruplarında olmak üzere toplam 75 adet CB6 F1 ırkı dişi fare kullanıldı. Bunlardan 50 tanesinde vaginal plak gözlendi ve böylece çiftleşmiş olduğu anlaşılan bu fareler operasyona alınarak, oviduktlarındaki mevcut hücreler toplandı. Bu aşamada 1024 adet iki hücreli embriyo, 127 adet fertilize olmamış oosit ve 79 adet dejenere embriyo toplandı.

Buna göre fare başına düşen iki hücreli embriyo ortalaması 20.20 ± 4.06 , döllenmemiş oosit oranı 2.54 ± 1.61 ve dejenere embriyo oranı da 1.57 ± 1.09 olarak hesaplandı (Tablo 27).

Tablo 27.Çalışmanın ikinci aşamasında kullanılan fareler ve bunlara ait ortalama değerler.

Çalışma Sıra Numarası	Kullanılan Fare Sayısı (n)	Çiftleşen Fare Sayısı (n)	Ovidukt'tan Kazanılan Hücre Sayıları (n)		
			2 Bl. Embriyo	Oosit	Dejenere
1.Çalışma	8	7	175	8	4
2.Çalışma	8	5	63	16	8
3.Çalışma	8	4	76	10	3
4.Çalışma	9	7	123	41	24
5.Çalışma	10	8	180	20	12
6.Çalışma	8	5	135	16	7
7.Çalışma	6	4	75	4	6
8.Çalışma	5	3	63	0	5
9.Çalışma	7	4	72	6	0
10.Çalışma	6	3	62	6	10
Toplam	75	50	1024	127	79
Fare Başına Düşen Ortalama Değerler.			20.20 ± 4.06	2.54 ± 1.61	1.57 ± 1.09

bl. : Blastomer

6.6.2. M 16 Medyumunda Kültüre Alınan Embriyoların Hücre Çekirdek Sayıları

Tablo 28'de M 16 Medyum gruplarında gelişen embriyoların hücre çekirdek sayılarına göre dağılımı verilmiştir.

Tablo 28. M 16 medyum gruplarında gelişen embriyoların kültür süreleri ve hücre çekirdek sayılarına göre dağılımı.

BSA mg/ml	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96.Saat
0	4.2 ± 2.14 ^c	11.44 ± 4.36 ^e	21.26 ± 11.65 ^d	29.6 ± 14.93 ^f
0,3	7.2 ± 1.6 ^b	23.45 ± 8.14 ^c	43.15 ± 11.88 ^c	69.94 ± 19.09 ^c
1	9.6 ± 3.2 ^a	43.65 ± 9.65 ^a	69.60 ± 17.29 ^a	95.45 ± 9.61 ^a
3	7.8 ± 3.99 ^b	34.05 ± 10.61 ^b	57.65 ± 17.54 ^b	81.37 ± 18.31 ^b
9	4.2 ± 2.1 ^c	21.65 ± 10.95 ^c	65.00 ± 16.56 ^{ab}	57.06 ± 23.15 ^d
18	3.8 ± 2.3 ^c	16.20 ± 9.38 ^d	53.07 ± 23.84 ^b	58.69 ± 18.75 ^d
36	3.2 ± 1.0 ^c	17.58 ± 10.56 ^d	28.00 ± 11.96 ^d	47.35 ± 15.75 ^e

^{abcdef} Dikey kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (Anova Varyans Analizi)

• İn vitro kültürün ilk 24 saatlik periyodunda embriyonik hücre sayıları boyanmaksızın natif olarak sayıldı.

6.6.3. Whitten's Medyumunda Kültüre Alınan Embriyoların Hücre Çekirdek Sayıları

Tablo 29'da Whitten's Medyum gruplarında gelişen embriyoların hücre çekirdek sayılarına göre dağılımı verilmiştir.

Tablo 29. Whitten's medyum gruplarında gelişen embriyoların hücre çekirdek sayılarına göre dağılımı

BSA (mg/ml)	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
0	4.8 ± 1.64 ^c	15.84 ± 12.05 ^e	36.1 ± 6.05 ^d	33.41 ± 9.86 ^e
0,3	7.6 ± 1.23 ^b	31.2 ± 11.93 ^c	69.5 ± 9.61 ^b	80.88 ± 20.42 ^b
1	7.6 ± 3.40 ^b	67.72 ± 22.90 ^a	92.75 ± 7.18 ^a	105.60 ± 11.52 ^a
3	9.6 ± 5.09 ^a	47.18 ± 18.20 ^b	86.30 ± 6.73 ^a	107.65 ± 10.27 ^a
9	4.0 ± 2.51 ^c	23.83 ± 12.38 ^d	57.94 ± 27.18 ^c	60.87 ± 35.59 ^c
18	3.8 ± 2.33 ^c	26.61 ± 3.17 ^{cd}	52.73 ± 34.36 ^c	52.06 ± 21.33 ^d
36	3.4 ± 0.94 ^c	27.07 ± 10.91 ^{cd}	26.18 ± 19.23 ^e	40.83 ± 17.91 ^e

^{abcde} Dikey kolonlarda farklı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemlidir. (p< 0.05) (Anova Varyans Analizi)

• In vitro kültürün ilk 24 saatlik periyodunda embriyonik hücre sayıları boyanmaksızın natif olarak sayıldı.

İlk 24 saatlik kültür periyodunun sonunda boyanmaksızın, blastomerleri mikroskopik bakı ile (Natif Muayene Yöntemi) sayılan ve sonraki 48. , 72. ve 96.. saatlerde boyanarak hücre çekirdek sayıları tespit edilen embriyolara ait sayısal ortalamalar Tablo 30'da verilmiştir.

Buna göre BSA' nın 0 mg / ml miktarındaki dozlarında gelişen embriyolara ait hücre çekirdek sayıları 24, 48, 72 ve 96. saatlerde M 16 medyumunu için sırasıyla; 4.2 ± 2.14, 11.44 ± 4.36, 21.26 ± 11.65 ve 29.6 ± 14.93 olurken, aynı değerler Whitten's medyumunda sırasıyla; 4.8 ± 1.64, 15.84 ± 12.05, 36.1 ± 6.05 ve 33.41 ± 9.86 olarak bulundu (Tablo 30)

Tablo 30. 0 mg/ml BSA içeren M 16 ve Whitten's medyumlarında gelişen embriyoların hücre çekirdek sayıları ortalaması

Medyum	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
M 16	4.2 ± 2.14 ^a	11.44 ± 4.36 ^a	21.26 ± 11.65 ^a	29.6 ± 14.93 ^a
Whitten's	4.8 ± 1.64 ^a	15.84 ± 12.05 ^a	36.1 ± 6.05 ^a	33.41 ± 9.86 ^a

^a Dikey kolonlarda aynı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir. (p >0.05) (t testi)

• In vitro kültürün ilk 24 saatlik periyodunda embriyonik hücre sayıları boyanmaksızın natif olarak sayıldı.

BSA' nın 0.3 mg / ml miktarındaki dozlarında gelişen embriyolara ait hücre çekirdek sayıları ise aynı saatlerde ve M 16 medyumunu için sırasıyla; 7.2 ± 1.6 , 23.45 ± 8.14 , 43.15 ± 11.88 ve 69.94 ± 19.09 olurken, aynı değerler Whitten's medyumunda sırasıyla; 7.6 ± 1.23 , 31.2 ± 11.93 , 69.5 ± 9.61 ve 80.88 ± 20.42 olarak bulundu (Tablo 31).

Tablo 31. 0.3 mg/ml BSA içeren M 16 ve Whitten's medyumlarında gelişen embriyoların hücre çekirdek sayıları ortalaması

Medyum	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
M 16	7.2 ± 1.6^a	23.45 ± 8.14^a	43.15 ± 11.88^a	69.94 ± 19.09^a
Whitten's	7.6 ± 1.23^a	31.2 ± 11.93^a	69.5 ± 9.61^a	80.88 ± 20.42^a

^a Dikey kolonlarda aynı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir. ($p > 0.05$) (t testi)

· In vitro kültürün ilk 24 saatlik periyodunda embriyonik hücre sayıları boyanmaksızın natif olarak sayıldı.

BSA' nın 1 mg / ml miktarındaki dozlarında gelişen embriyolara ait hücre çekirdek sayıları da aynı saatlerde ve M 16 medyumunu için sırasıyla; 7.8 ± 3.99 , 34.05 ± 10.61 , 57.65 ± 17.54 ve 81.37 ± 18.31 olurken, aynı değerler Whitten's medyumunda sırasıyla; 7.6 ± 3.40 , 67.72 ± 22.90 , 92.75 ± 7.18 ve 105.60 ± 11.52 olarak bulundu (Tablo 32).

Tablo 32. 1 mg/ml BSA içeren M 16 ve Whitten's medyumlarında gelişen embriyoların hücre çekirdek sayıları ortalaması

Medyum	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
M 16	7.8 ± 3.99^a	34.05 ± 10.61^a	57.65 ± 17.54^a	81.37 ± 18.31^a
Whitten's	7.6 ± 3.40^a	67.72 ± 22.90^a	92.75 ± 7.18^a	105.60 ± 11.52^a

^a Dikey kolonlarda aynı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir. ($p > 0.05$) (t testi)

· In vitro kültürün ilk 24 saatlik periyodunda embriyonik hücre sayıları boyanmaksızın natif olarak sayıldı.

3 mg / ml BSA' nın bulunduğu grupta gelişen embriyolara ait hücre çekirdek sayıları aynı saatlerde ve M 16 medyumunu için sırasıyla; 7.8 ± 3.99 , 34.05 ± 10.61 , 57.65 ± 17.54 ve 81.37 ± 18.31 olurken aynı değerler Whitten's medyumunda sırasıyla; 9.6 ± 5.09 , 47.18 ± 18.20 , 86.3 ± 6.73 ve 107.65 ± 10.27 olarak bulundu (Tablo 33).

Tablo 33. 3 mg/ml BSA içeren M 16 ve Whitten's medyumlarında gelişen embriyoların hücre çekirdek sayıları ortalaması

Medyum	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
M 16	7.8 ± 3.99 ^a	34.05 ± 10.61 ^a	57.65 ± 17.54 ^a	81.37 ± 18.31 ^a
Whitten's	9.6 ± 5.09 ^a	47.18 ± 18.20 ^a	86.3 ± 6.73 ^a	107.65 ± 10.27 ^a

^a Dikey kolonlarda aynı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir. (p >0.05) (t testi)

• İn vitro kültürün ilk 24 saatlik periyodunda embriyonik hücre sayıları boyanmaksızın natif olarak sayıldı.

BSA' nın 9 mg / ml miktarına artırılması sonucunda ise, bu grupta gelişen embriyolara ait hücre çekirdek sayıları aynı saatlerde ve M 16 medyumuna için sırasıyla; 4.2 ± 2.1, 21.65 ± 10.95, 65.00 ± 16.56 ve 57.06 ± 23.15 olurken aynı değerler Whitten's medyumunda sırasıyla; 4.00 ± 2.51, 23.83 ± 12.38, 57.94 ± 27.18 ve 60.87 ± 35.59 olarak bulundu (Tablo 34) .

Tablo 34. 9 mg/ml BSA içeren M 16 ve Whitten's medyumlarında gelişen embriyoların hücre çekirdek sayıları ortalaması

Medyum	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
M 16	4.2 ± 2.1 ^a	21.65 ± 10.95 ^a	65.00 ± 16.56 ^a	57.06 ± 23.15 ^a
Whitten's	4.0 ± 2.51 ^a	23.83 ± 12.38 ^a	57.94 ± 27.18 ^a	60.87 ± 35.59 ^a

^a Dikey kolonlarda aynı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir. (p >0.05) (t testi)

• İn vitro kültürün ilk 24 saatlik periyodunda embriyonik hücre sayıları boyanmaksızın natif olarak sayıldı.

BSA' nın 18 mg / ml konsantrasyonuna çıkartıldığı grupta gelişen embriyolara ait hücre çekirdek sayıları aynı saatlerde ve M 16 medyumuna için sırasıyla; 3.8 ± 2.3, 16.20 ± 9.38, 53.07 ± 23.84 ve 58.69 ± 18.75 olurken, aynı değerler Whitten's medyumunda sırasıyla; 3.8 ± 2.33, 26.61 ± 3.17, 52.73 ± 34.36 ve 52.06 ± 21.33 olarak bulundu (Tablo 35).

Tablo 35. 18 mg/ml BSA içeren M 16 ve Whitten's medyumlarında gelişen embriyoların hücre çekirdek sayıları ortalaması

Medyum	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
M 16	3.8 ± 2.3 ^a	16.20 ± 9.38 ^a	53.07 ± 23.84 ^a	58.69 ± 18.75 ^a
Whitten's	3.8 ± 2.33 ^a	26.61 ± 3.17 ^a	52.73 ± 34.36 ^a	52.06 ± 21.33 ^a

^a Dikey kolonlarda aynı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir. (p >0.05) (t testi)

• İn vitro kültürün ilk 24 saatlik periyodunda embriyonik hücre sayıları boyanmaksızın natif olarak sayıldı.

BSA' nın 36 mg / ml miktarındaki dozlarında gelişen embriyolara ait hücre çekirdek sayıları ise aynı saatlerde ve M 16 medyumunu için sırasıyla; 3.2 ± 1.0 , 17.58 ± 10.56 , 28.00 ± 11.96 ve 47.35 ± 15.75 olurken, aynı değerler Whitten's medyumunda sırasıyla; 3.4 ± 0.94 , 27.07 ± 10.91 , 26.18 ± 19.23 ve 40.83 ± 17.91 olarak bulundu(Tablo 36).

Tablo 36. 36 mg/ml BSA içeren M 16 ve Whitten's medyumlarında gelişen embriyoların hücre çekirdek sayıları ortalaması

Medyum	24. Saat	48. Saat	72. Saat	96. Saat
M 16	3.2 ± 1.0^a	17.58 ± 10.56^a	28.00 ± 11.96^a	47.35 ± 15.75^a
Whitten's	3.4 ± 0.94^a	27.07 ± 10.91^a	26.18 ± 19.23^a	40.83 ± 17.91^a

^a Dikey kolonlarda aynı harfler taşıyan değerler arasındaki fark önemsizdir. ($p > 0.05$) (t testi)

• In vitro kültürün ilk 24 saatlik periyodunda embriyonik hücre sayıları boyanmaksızın natif olarak sayıldı.

7. TARTIŞMA

Son yıllarda, İn Vitro Kültür ve Embriyo Transfer çalışmaları tüm dünyada büyük bir yaygınlık kazanmıştır. Bu tip çalışmalar, Veteriner hekimliği alanında daha çok hayvan ıslahı amacına yönelik olarak sürdürülürken, insan hekimliğinde genetik çalışmalar ve tüp bebek konularında rutin olarak uygulanmaktadır.

Sunulan çalışma temelde, embriyoların in vitro ortamda 96 saat süreyle yaşayabilecekleri uygun medyum ve optimum nitrojen miktarını tayin etmek amacıyla yapılmıştır.

Bu amaçla iki hücreli dönemdeki fare embriyolarını in vitro ortamda kültüre etmek için, M16 ve Whitten's medyumlarından hangisinin daha uygun olacağı saptanmak istenirken, embriyoların bu kültür süreci içerisinde ihtiyaç duydukları protein kaynağının da ideal olarak BSA'nın hangi dozlarından karşılanabileceği düşüncesiyle gruplar, her iki kültür medyumuna için sırasıyla: 0 (Kontrol), 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ ml BSA içerecek şekilde ayarlandı.

M 16 medyumunun farklı miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre edilen 2 blastomerli embriyoların ilk 24 saatlik kültür periyodu sonunda ulaştıkları gelişim düzeyleri incelendiğinde; 0 ve 36 mg/ml BSA gruplarındaki embriyoların bu süre sonunda büyük çoğunlukla 2 - 4 blastomerli dönemlerde bulundukları görülürken, 0.3, 1, 3, 9 ve 18 mg/ml BSA gruplarında embriyoların daha çok 4 - 8 blastomerli dönemlerde oldukları gözlemlendi (Tablo 2).

İn vitro kültürün 48 saatlik sürecinin sonunda ise BSA içermeyen (0 mg/ml) grubundaki gelişimler çoğunlukla kompakt morula döneminde yoğunlaşırken, 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml BSA gruplarında daha çok kompakt morula ve erken blastosist gelişim evreleri gözlemlendi. Bununla birlikte bu saatteki en fazla dejenere embriyo sayısı da BSA'nın bulunmadığı (0 mg/ml) ve yoğun olarak bulunduğu (18 ve 36 mg/ml) gruplarda saptandı (Tablo 3).

İn vitro kültür periyodunun 72. saatine gelindiğinde 0, 0.3, 18 ve 36 mg/ml BSA gruplarındaki embriyolar kompakt morula ve erken blastosist dönemlerinde yoğunlaşırken, 1, 3 ve 9 mg/ml BSA içeren gruplarda daha çok blastosist ve expanded blastosist evreleri görüldü. Bu saatte en fazla dejenere embriyo ise yine BSA içermeyen grupta tespit edildi (Tablo 4).

Kültür periyodunun son aşaması olan 96. saatte ise, aynı medyumun 0, 9, 18 ve 36 mg/ml BSA gruplarında daha çok blastosist dönemlerinde bir yığılma gözlenirken en fazla embriyo dejenerasyonu da BSA'nın en yoğun bulunduğu 36 mg/ml grubunda

görüldü. 0.3, 1 ve 3 mg/ml BSA gruplarında ise expanded blastosist ve hatching/hatched blastosist dönemlerinde bir yoğunluk belirlendi (Tablo 5). Buradaki bulgularımız özellikle uzun süren in vitro kültür periyotlarında BSA'nın yüksek dozlarının medyum pH'sını olumsuz yönde etkilediğini ve dolayısıyla da embriyonik gelişimlerin sekteye uğradığını bildiren Kraemer ve Bowen (35)'nin verdikleri bilgiler doğrultusunda gerçekleşti. Aynı şekilde Brinster (9)'ın yoğun BSA oranlarının, embriyoların in vitro kültür ortamında dejenerasyonlarına yol açtığı, çok düşük dozlarının ise embriyonal gelişim üzerine etkisiz kaldığı şeklindeki bulgularını da destekler niteliktedir.

Whitten's medyumunun farklı miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre edilen 2 blastomerli embriyoların ilk 24 saatlik kültür periyodu sonunda ulaştıkları gelişim düzeyleri incelendiğinde ; BSA içermeyen (0 mg/ml) grupta embriyoların büyük çoğunlukla 4 - 8 blastomerli dönemlerde oldukları gözlenirken, diğer BSA gruplarında daha çok 8 blastomer ve kompakt morula dönemlerinde yığılmalar oldu (Tablo 6).

Aynı gruplarda; in vitro kültürün 48. saatlik bölümünde bütün BSA oranlarındaki embriyoların büyük çoğunlukla kompakt morula ve erken blastosist dönemlerinde bulundukları saptanırken, BSA' nın ortamda 9 mg/ml ye çıkartılmasıyla dejenere embriyo sayısındaki artışın başladığı, 18 ila 36 mg/ml gruplarında bu artışın hızlandığı, en yüksek embriyo dejenerasyonunun 0 mg/ml BSA grubunda olduğu tespit edildi (Tablo 7).

In vitro kültür periyodunun 72. saatinde aynı gruplarda meydana gelen gelişim düzeyleri incelendiğinde 0, 0.3, 1 ve 3 mg/ml BSA içeren gruplarda gelişen embriyoların büyük çoğunluğunun blastosist ve expanded blastosist dönemlerinde bulundukları, BSA miktarının 9 ve 18 mg/ml ye artırıldığı gruplarda ise embriyonal gelişimlerin daha çok erken blastosist ve blastosist dönemlerinde yoğunlaştığı, bununla birlikte BSA'nın 36 mg/ml ye çıkartıldığı grupta ise embriyonal gelişimlerin diğer gruplara nazaran daha yavaş geliştiği ve bu grupta da kompakt morula ve erken blastosist dönemlerinde bir yoğunlaşma olduğu tespit edildi (Tablo 8).

In vitro kültürün 96. saatlik periyodu sonunda ise, en hızlı embriyonal gelişimin 1 ve 3 mg/ml BSA gruplarında meydana geldiği ve bu gruplardaki gelişimlerin daha çok hatching ve hatched blastosist dönemlerinde olduğu gözlemlendi. Bunların dışındaki diğer BSA gruplarında embriyonal gelişimlerin daha yavaş olduğu ve bu gruplardaki gelişimlerin daha çok expanded blastosist ve blastosist aşamalarında kaldığı saptandı. Bununla birlikte in vitro kültür periyodunun sonu itibarıyla en fazla dejenere embriyo oranı da BSA'nın en yoğun olarak bulunduğu 36 mg/ml grubunda bulundu. Böylece Whitten's medyumunun 1 ve 3 mg/ml BSA içeren gruplarında kültüre edilen embriyoların en iyi ve en hızlı şekilde geliştikleri gözlenirken, medyumda bulunan BSA miktarının 0 ve 36 mg/ml miktarlarına doğru yaklaşması ile embriyo gelişimlerinin yavaşladığı ve 36 mg/ml

miktarlarındaki BSA grubunda embriyoların hızla dejenere olmaya başladıkları gözlemlendi (Tablo 9).

Bu sonuçlar, Brinster (9)'in yoğun BSA oranlarının embriyolar üzerinde dejeneratif etkiler yaptığını bildiren çalışmasının sonuçlarını desteklerken, Menino ve ark. (43)'nin Whitten's medyumuna BSA'nın değişik dozlarını deneyerek yaptıkları in vitro kültür çalışmalarında 1 mg/ml BSA'nın embriyonal gelişimi optimum düzeyde desteklediğini bildirdikleri çalışmalarındaki sonuçlarla paralellik taşımaktadır.

M 16 medyumunun farklı miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre edilen embriyoların gelişim oranları gruplara ve saatlere göre karşılaştırıldığında (Tablo 12); ilk 24 saatlik in vitro kültür periyodu sonunda embriyolarda meydana gelen gelişimler bu medyumun 0, 0.3, 1, 3 ve 18 mg/ml BSA içeren gruplarında en yüksek düzeyde (%100.00) gerçekleşirken, 9 ve 36 mg/ml BSA içeren gruplardaki gelişimler biraz daha düşük düzeyde bulundu. Yapılan istatistiki değerlendirmede tüm gruplar arasındaki gelişimsel farklılıkların önemsiz olduğu saptandı ($p>0.05$).

In vitro kültür periyodunun 48. saatinin sonunda ise, M 16 medyumunun aynı gruplarında meydana gelen embriyonal gelişimler karşılaştırıldığında ise, en yüksek gelişim oranı (% 100.00) 3 mg/ml BSA içeren grupta meydana gelirken 0.3, 1 ve 9 mg/ml BSA içeren gruplardaki gelişimler ile 3 mg/ml BSA içeren gruplardaki gelişimler arasındaki farkların, yapılan istatistiki değerlendirmede, önemsiz oldukları gözlemlendi ($p>0.05$). Bunun yanı sıra medyumda BSA'nın bulunmaması (0 mg/ml) ve ya yoğun olarak bulunması (18 ve 36 mg/ml BSA) durumlarında ise embriyonal gelişim düzeylerinin zayıf kaldığı ve bu gruplardaki gelişimlerle 3 mg/ml BSA grubundaki gelişim oranları arasındaki farkların bu grup lehine olmak üzere önemli olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

Devam eden kültür periyodunun 72. saatine gelindiğinde en yüksek embriyonal gelişim düzeyi M 16 medyumunun yine 3 mg/ml BSA içeren grubunda (% 88.01) gerçekleşti. Yapılan istatistiki değerlendirmede bu değer ile 1 ve 9 mg/ml BSA gruplarında saptanan değerler arasındaki farklılıklar önemsiz bulunurken ($p>0.05$), 0, 0.3, 18 ve 36 mg/ml gruplarında tespit edilen değerler arasındaki farklılıklar ise önemli bulundu ($p<0.05$).

In vitro kültür periyodunun sonunda ise (96. saat) en yüksek embriyonal gelişim düzeyi yine 3 mg/ml BSA grubunda (% 84.74) meydana gelirken, bu değer ile 9 mg/ml BSA içeren medyum grubundaki değer arasındaki farkın istatistiki açıdan önemsiz olduğu, buna karşın diğer gruplarla arasındaki farkların önemli olduğu bulundu ($p<0.05$).

Bu sonuçlar Brinster (9)'in de işaret ettiği gibi kültür medyumlarının BSA'dan yoksun olması veya aşırı miktarda BSA içermesi halinde embriyonik gelişimleri inhibe edeceği yönündeki bilgileri destekler niteliktedir.

Whitten's medyumunun farklı miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre edilen embriyoların gelişim oranları karşılaştırıldığında (Tablo 13), ilk 24 saatlik periyot sonunda en yüksek gelişim oranları 0.3, 3 ve 9 mg/ml gruplarında gerçekleşirken (% 100), bu değer ile diğer gruplarda meydana gelen gelişim düzeyleri arasında istatistiksel açıdan fark bulunmadı ($p>0.05$). Bu sonuçlar Saito ve ark. (58)'nin fare embriyolarının erken dönemde nitrojen kaynağına ihtiyaç duymadıkları yönündeki bulgularını desteklemektedir.

In vitro kültür periyodunun 48 saatlik döneminin sonunda, en yüksek embriyo gelişim düzeyi (%96.52) bu defa 3 mg/ml BSA grubunda gerçekleşirken, 0, 0.3, 1, 3, 18 ve 36 mg/ml BSA grupları arasındaki gelişim farklılıkları istatistiki açıdan önemsiz bulundu ($p>0.05$). Bununla birlikte 9 mg/ml BSA grubu ile 3 mg/ml BSA içeren grup arasında gelişim yönünden 3 mg/ml grubu lehinde olmak üzere fark oldukça önemli bulundu ($p<0.05$).

Devam eden kültür periyodunun 72. saatlik dönemine gelindiğinde, en yüksek embriyonal gelişim düzeyi yine, 3 mg/ml BSA içeren grupta gerçekleşirken (%94.57), bu grup ile 0.3 ve 1 mg/ml BSA gruplarında gerçekleşen gelişim düzeyleri arasındaki farklar istatistiksel açıdan önemsiz bulunurken, aynı değerle, 0, 9, 18 ve 36 mg/ml BSA gruplarında meydana gelen gelişimler arasındaki farklılıklar 3 mg/ml BSA grubu lehine olmak üzere önemli bulundu ($p<0.05$).

In vitro kültür periyodunun sonunda ise (96. saat), aynı medyumun aynı gruplarındaki gelişim düzeyleri incelendiğinde, en yüksek embriyonal gelişim düzeyi yine 3 mg/ml BSA içeren grupta gerçekleşti (%94.57). Yapılan istatistiki değerlendirmede bu gruptaki değer ile 0.3 ve 1 mg/ml BSA gruplarındaki değerler arasındaki farkların önemsiz olduğu görülürken ($p>0.05$), diğer gruplardaki değerlerle arasındaki farkların 3 mg/ml grubu lehine olmak üzere önemli olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

In vitro kültür periyodunun sonunda elde ettiğimiz bu sonuçlar, embriyoların in vitro gelişimlerinin medyumdaki protein düzeyi ile yakından ilgili olduğunu bildiren Menino ve ark. (43)'nin Whitten's medyumuna değişik oranlarda BSA katarak yaptıkları kültür çalışmalarında en yüksek oranda blastosist elde ettikleri 1 mg/ml BSA grubundaki bulgularla aynı paralelde bulundu.

M 16 ve Whitten's medyumlarının değişik miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre alınan embriyoların gelişim düzeyleri farklı medyumların aynı miktarlarda BSA içeren grupları arasında karşılaştırıldığında ise (Tablo 14), in vitro kültür periyodunun ilk 24 saatlik döneminde, 0 (kontrol), 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml BSA içeren gruplar arasında istatistiksel açıdan herhangi bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Bu bulgular Hsu (26)'nın fare embriyolarının erken bölünme dönemi boyunca dış kaynaklı nitrojene ihtiyaç duymadıkları şeklindeki bulgularını destekler nitelikte gerçekleşti.

Devam eden in vitro kültür periyodunun 48. saatlik bölümünde aynı gruptaki embriyonal gelişim düzeyleri medyumlar açısından karşılaştırıldığında (Tablo 15).; BSA içermeyen M 16 medyum grubundaki gelişim oranı % 74.36 olurken, aynı durumdaki Whitten's medyum grubunda ise bu değer % 88.23 olarak bulundu. Bu iki değer arasında ve Whitten's medyum grubu lehine bulunan 13.44'lük farkın istatistiki açıdan önemli olduğu belirlendi ($p<0.05$). Böylece BSA yokluğunda embriyonal gelişimi, in vitro kültürün 48. saatinde Whitten's medyumunun M 16 medyumundan daha iyi desteklediği tespit edildi. Bununla beraber 1 mg/ml BSA içeren medyum gruplarında bu sefer M 16 medyum grubu lehine olmak üzere 5,14'lük bir fark gözlemlendi. Yapılan istatistiki değerlendirmede bu değerlerin de önem taşıdığı bulunurken ($p<0.05$), 0.3, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml BSA içeren M 16 ve Whitten's medyum grupları arasındaki farkların ise istatistiksel açıdan önemsiz oldukları bulundu ($p>0.05$). Burada da medyumda 1 mg/ml bulunması halinde M 16 medyumunun embriyonal gelişimi desteklemede Whitten's medyumundan daha başarılı olduğu görüldü .

Kültür periyodunun 72. saatinde de (Tablo16), 0 ve 3 mg/ml BSA içeren M 16 ve Whitten's medyum grupları arasındaki gelişimler karşılaştırıldığında sırasıyla, 34,78 ve 6,56'lık Whitten's medyumuna lehine olan gelişimsel farkların istatistiki açıdan önemli olduğu saptandı ($p<0.05$). Bu aşamada BSA içermeyen Whitten's medyumunun embriyonal gelişimi aynı durumdaki M 16 medyumundan çok daha iyi bir şekilde desteklediği gözlemlenirken, 3 mg/ml BSA içeren Whitten's medyumunun da aynı miktarlarda BSA içeren M 16 medyumundan daha iyi desteklediği görüldü. Bununla birlikte bu saatte, 0.3, 1, 9, 18 ve 36 mg/ml BSA içeren M 16 ve Whitten's medyum gruplarındaki gelişim oranları arasındaki küçük farkların ise, istatistiksel açıdan önemsiz olduğu belirlendi ($p>0.05$).

96 saat süren in vitro kültür periyodunun sonunda ise yine aynı medyumların aynı miktarlarda BSA içeren gruplarının karşılaştırılmasında (Tablo 17); 1, 9 ve 36 mg/ml BSA içeren medyum grupları arasındaki farkların istatistiki açıdan önemsiz olduğu görüldü ($p>0.05$). Buna karşın aynı saatte 0, 0.3, 3 ve 18 mg/ml BSA içeren M 16 ve Whitten's medyum grupları arasında yine Whitten's medyum grupları lehine olmak üzere sırasıyla 30.45, 22.43, 5.83 ve 6.02'lik farklar bulundu ve bu farkların istatistiki açıdan önem taşıdığı belirlendi ($p<0.05$).

Böylece Whitten's medyumunun, kültür periyodunun sonunda 2 blastomerli fare embriyolarının gelişimini özellikle BSA'dan yoksun ve ya 0.3, 3 ve 18 mg/ml BSA miktarlarında M 16 medyumundan daha iyi desteklediği görüldü. Bu çerçevede, M 16 medyumuna 4 mg/ml BSA katarak, 2 hücreli fare embriyolarını 96 saat kültüre eden Kato ve Tsunoda (30)'nın buldukları % 99'luk blastosist gelişimine en yakın değer çalışmamızdaki M 16 medyum grupları arasında 3 mg/ml BSA içeren grupta bulduğumuz % 84.74'lük değer olurken, diğer bütün gruptaki değerler bunun altında gerçekleşti.

Bunun yanı sıra Whitten's medyumunun 3 mg/ml BSA içeren grubunda en yüksek değer olarak bulduğumuz % 94.57'lik gelişim düzeyi, Chung ve ark.(14)'nin aynı medyuma aynı miktarlarda BSA katarak yaptıkları in vitro kültür çalışmasında buldukları % 85'lik blastosist düzeyinin üzerinde gerçekleşti.

M 16 medyumunun değişik miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre alınan embriyolarda, in vitro kültür periyodunun 96 saatlik süresinin sonu itibarıyla gözlenen hatching blastosist oranları karşılaştırıldığında (Tablo 18); en yüksek hatching blastosist oranı 3 mg/ml BSA içeren grupta gerçekleşti (% 25.26). Bu oran ile, 9 mg/ml BSA grubunda bulduğumuz (% 17.47) hatching blastosist oranı arasındaki 7.79'luk farkın istatistiki açıdan önemli olmadığı görülürken ($p>0.05$), bu değer ile 0, 0.3, 1, 18 ve 36 mg/ml BSA içeren gruplardaki hatching blastosist oranları arasındaki farkların ise önemli oldukları bulundu ($p<0.05$). Bununla birlikte en düşük Hatching blastosist oranları da M 16 medyumunun BSA içermeyen (0 mg/ml) ve yoğun olarak BSA içeren gruplarında (18 ve 36 mg/ml) gözlemlendi. Çalışmanın bu aşamasında bulduğumuz düşük hatching blastosist oranları, M 16 medyumunun BSA' sız olması veya yoğun BSA içermesi durumunda embriyonal gelişimi desteklemede yetersiz kaldığını göstermesi bakımından önemlidir. BSA içermeyen M 16 medyum grubunda bulduğumuz % 2.92'lik hatching blastosist oranı, Tornesi ve ark. (65)'nin BWW medyumuna albümin katmaksızın yaptıkları çalışmada elde ettikleri % 18.8'lik hatching blastosist oranının oldukça altında kaldı. Ayrıca 36 mg/ml BSA içeren M 16 medyum grubunda bulduğumuz % 1.81'lik hatching blastosist oranı, yine Tornesi ve ark.(65)'nin aynı çalışmalarında BWW medyumuna 40 mg/ml BSA kattıkları grupta elde ettikleri % 38.8'lik değerinin oldukça altında kaldı. Buradaki farklılıkların kullanılan kültür medyumunun tipine bağlı olarak meydana gelmiş olabileceği düşünüldü.

M 16 medyumunun aynı gruplarındaki gelişim düzeyleri hatched blastosist oranları açısından karşılaştırıldığında ise (Tablo 19), en yüksek değer yine 3 mg/ml BSA içeren grupta (% 19.08) bulundu. Bununla birlikte 1 mg/ml BSA grubundaki (% 17.00) hatched blastosist oranıyla bu değer arasında istatistiki açıdan bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Hatched blastosist açısından BSA'nın medyumda mevcut olmadığı veya çok az bulunduğu 0 ve 0.3 mg/ml gruplarında ve BSA'nın yoğun olarak bulunduğu 9, 18 ve 36 mg/ml gruplarındaki gelişimlerin 1 mg/ml grubundaki değerinin altında kaldıkları görüldü. ($p<0.05$).

M 16 medyumunun aynı gruplarında kültüre edilen embriyolar bu defa hatching + hatched blastosist' e ulaşma yönünden incelendiğinde ise (Tablo 20), en yüksek toplam değer yine 3 mg/ml BSA içeren grupta % 44.34 ile gerçekleşirken, % 34.05 ile ikinci sırayı da 1 mg/ml BSA içeren grup aldı ve bu iki değer arasındaki farkın istatistiki açıdan önemsiz olduğu gözlemlendi ($p>0.05$). Bu hatching + hatched toplam değerleri açısından da

BSA oranlarının minimuma indiği ve maksimuma doğru çıktığı gruplarda yine önemli oranlarda düşüşler gözlemlendi ($p < 0.05$).

Tornesi ve ark (64)'nın BWV medyumuna 20 mg/ml BSA katarak kültüre ettikleri 16 - 32 hücreli fare embriyolarında buldukları % 13.4'lük hatching blastosist oranı, çalışmamızda M 16 medyumuna 18 mg/ml BSA katarak yaptığımız çalışmada ulaştığımız % 2.86'lık değerin oldukça üstünde gerçekleşmiştir. Sonuçlar arasındaki gelişim farkının bu denli büyük olması, araştırmacıların çalışmalarında fare embriyolarını 16-32 hücreli dönemde elde ederek kültüre etmeleri ve kültür medyumunu olarak farklı bir medyum kullanmış olmalarından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Whitten's medyumunun farklı miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre alınan 2 blastomerli fare embriyolarının in vitro kültür periyodunun 96. saati sonunda ulaştıkları hatching blastosist oranları açısından karşılaştırılmasında (Tablo 21) en yüksek hatching blastosist oranının (% 35.50) 3 mg/ml BSA grubunda bulunduğu gözlenirken, ikinci sırayı ise (% 33.27) 1 mg/ml BSA grubunun aldığı görüldü. Yapılan istatistiki değerlendirmede bu iki değer arasındaki farkın önemsiz olduğu gözlemlendi ($p > 0.05$). Whitten's medyumunda BSA oranları sıfıra doğru yaklaştıkça hatching blastosist oranlarında küçük düşüşler (% 23.77) gözlenirken ($p < 0.05$); BSA'nın fazla yoğun olduğu 18 ve 36 mg/ml gruplarında ise hatching blastosist oranlarında büyük düşüşler (% 0.83 ve % 0.00) gözlemlendi. Bulgularımız, Whitten's kültür medyumunun BSA içermediği durumlarda dahi embriyoların in vitro hatching proseslerini kısmen de olsa destekleyebildiğini, buna karşın yoğun BSA miktarlarının ise embriyolar üzerinde dejeneratif etkiler göstererek hatching olma olaylarına engel oluşturduğu gözlemlendi. Çalışmanın bu aşamasında BSA içermeyen Whitten's medyum grubunda elde ettiğimiz % 23.77'lik hatching blastosist oranı, Tornesi ve ark. (65)'nin 16-32 hücreli fare embriyolarını proteinsiz BWV medyumunda kültüre ederek elde ettikleri % 18.8'lik hatching blastosist değerinin üzerinde gerçekleşti ve böylece proteinsiz ortamda Whitten's medyumunun embriyoları BWV medyumundan daha iyi desteklediği görüldü. Çalışmalarında kullanılan medyum tipi seçiminin ne denli önem taşıdığı görüldü.

Aynı medyumun aynı gruplarında in vitro kültür periyodunun 96. saatinin sonunda meydana gelen hatched blastosist oranları karşılaştırıldığında (Tablo 22), en yüksek hatched blastosist oranının yine 3 mg/ml BSA içeren grupta meydana geldiği görüldü (% 32.21). BSA oranlarının 0.3 ve 0 mg/ml'ye düştükçe hatched blastosist oranlarının 3 mg/ml grubundaki sonuçlarla önem arz edecek şekilde azaldığı, bununla birlikte BSA'nın 9 mg/ml'nin üzerine çıktıkça da hatched blastosist oranlarının şiddetli bir şekilde düştüğü gözlemlendi ($p < 0.05$). 3 mg/ml BSA lı medyum grubunda bulduğumuz en yüksek değer olan % 32.21'lik hatched blastosist oranı Chung ve ark. (14)'nin aynı miktarda BSA içeren

Whitten's medyumunda kültüre ettikleri 2 blastomerli fare embriyolarında elde ettikleri % 31.3'lük değer az da olsa üzerinde gerçekleşti.

Whitten's medyumunun değişik miktarlarda BSA içeren gruplarında gelişen toplam hatching + hatched blastosist oranları karşılaştırıldığında ise (Tablo 23), en yüksek oran, yine 3 mg/ml BSA içeren grupta bulunurken (%67.70); ikinci sırayı da yine 1 mg/ml BSA içeren grubun aldığı görüldü (% 55.31). Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu iki değer arasındaki farkın önem taşımadığı ($p>0.05$), buna karşın bu iki gruptaki sonuçlar ile BSA'nın 0, 0.3, 9, 18 ve 36 dozlarını içeren gruplardaki sonuçlar arasındaki farkların önemli olduğu bulundu ($p<0.05$).

Böylece, Whitten's medyumunda kültüre edilen fare embriyolarının in vitro kültür ortamında ideal olarak 1 ve 3 mg/ml miktarlarında BSA içeren gruplarında gelişebildiği, BSA miktarlarının gerek sıfıra doğru indirilmesi ve gerekse de 36 mg/ml'ye çıkartılmasının, embriyoların hatching ve hatched blastosiste ulaşmalarını olumsuz yönde etkilediği gözlemlendi. Ayrıca Whitten's medyumunda gözlenen hatching + hatched blastosist gelişimlerin, BSA' dan yoksun grupta, BSA'nın çok yoğun olarak bulunduğu gruplara nazaran çok daha iyi olduğu saptandı ($p<0.05$).

Buradaki bulgularımız, Brinster (9) 'in fare embriyolarının in vitro kültür ortamındaki gelişimlerinin ideal olarak 1 mg/ml miktarındaki BSA tarafından desteklendiği ve yoğun BSA oranlarının ise gelişimi inhibe ettiği şeklindeki bulguları ile bağdaşmaktadır.

Gerek M16 ve gerekse Whitten's medyumlarının değişik miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre alınan embriyolarda gözlenen hatching blastosist oranları, medyum tipine ve içerdiği BSA miktarına göre bire bir olarak karşılaştırıldığında (Tablo 24), her iki medyum grubundaki en yüksek hatching blastosist oranlarının 3 mg/ml miktarında BSA içeren gruplarda gerçekleştiği görülürken bu iki değer arasında ve Whitten's medyum grubu lehine olarak bulunan 10.24' lük pozitifliğin istatistiksel açıdan önem taşımadığı görüldü ($p>0.05$).

Bununla birlikte, embriyoların in vitro kültür ortamında hatching + hatched blastosist'e ulaşma bakımından, bazı BSA miktarları yönünden Whitten's medyumunun M 16 medyumundan daha etkili olduğu görüldü. Dolayısıyla 0 ve 1 mg/ml BSA gruplarında, Whitten's medyumunu lehine olmak üzere, bulunan 26.58 ve 21.26'lık pozitif değerlerin istatistiksel açıdan önem taşıdıkları gözlenirken ($p<0.05$), 0.3, 9, 18 ve 36 mg/ml miktarlarında BSA içeren gruplar arasında her iki medyum tipi açısından istatistiksel anlamda bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Böylece, 1 mg/ml BSA içeren Whitten's medyumunun in vitro hatching blastosist oranını aynı miktarda BSA içeren M16 medyumundan daha fazla desteklediği ve bununla birlikte, BSA yokluğunda da Whitten's medyumunun embriyolardaki hatching blastosist gelişimini M16 medyumuna oranla çok daha fazla indüklediği görüldü. Buradaki etkinlik

farkı, in vitro kültürde kullanılacak medyum tipinin seçiminde titiz davranmak gerektiğini ortaya koymaktadır.

Aynı medyumların aynı miktarlarda BSA içeren gruplarının, in vitro kültürün 96. saati itibarıyla embriyolarda meydana gelen hatched blastosist oranları açısından karşılaştırılmalarında ise (Tablo 25), 3 mg/ml BSA içeren gruplarda Whitten's medyumuna lehine olmak üzere bulunan 13.13'lük farkın istatistiksel açıdan önemli olduğu ($p<0.05$), buna karşın diğer tüm gruplardaki hatched blastosist gelişim oranları arasındaki farkların ise önemsiz olduğu görüldü ($p>0.05$). Bu sonuçlar, Whitten's medyumunun embriyoları hatching blastosiste ulaşma açısından M 16 medyumundan daha iyi desteklediğini gösterdi.

Aynı grupların bu defa toplam hatching + hatched blastosist oranları açısından yapılan karşılaştırmalarında (Tablo 26); 3, 9, 18 ve 36 mg/ml BSA gruplarındaki toplam gelişimlerin, her iki medyum tipi açısından istatistiksel anlamda önem taşımadığı bulundu ($p>0.05$). Buna karşın, 0, 0.3 ve 1 mg/ml BSA gruplarında Whitten's medyum grupları lehine olmak üzere sırasıyla 26.58, 13.72 ve 21.26'lık farkların önemli oldukları tespit edildi ($p<0.05$). Bu sonuçlar doğrultusunda; embriyoların in vitro kültüründe hatching + hatched blastosist gelişimi açısından en yüksek değerlerin, her iki medyumun 3 mg/ml BSA içeren gruplarında meydana geldiği, ancak BSA'nın 0 mg/ml' ye doğru yaklaştığı gruplarda (1, 0.3 ve 0 mg/ml) Whitten's medyumunun embriyonal gelişimleri, M16 medyumundan çok daha iyi destekleyebildiği görüldü. Buna karşın, BSA'nın yoğun olarak bulunduğu (9, 18 ve 36 mg/ml) gruplarda embriyonal gelişimlerin her iki medyum grubunda da zayıf kaldığı ve aynı zamanda hatching / hatched blastosiste ulaşmada zorlandıkları gözlemlendi.

Bu sonuçlar Millham ve ark. (47)'nin serum veya serum fraksiyonlarının, fare embriyolarının in vitro ortamda hatching blastosiste ulaşmalarını desteklediği yönündeki verilerini desteklerken, Kraemer ve Bowen (35)'nin yoğun protein miktarlarının medyum pH' sını olumsuz yönde etkilediği ve dolayısıyla uygun olmayan medyum pH' sının in vitro kültür ortamında embriyonal gelişimleri engellediği yönündeki bilgilerini de doğrular niteliktedir.

Çalışmanın son aşamasında (Tablo 28), M16 medyumunun aynı miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre alınan embriyoların, kültür periyodunun 24. saatinde yapılan hücre çekirdek sayımlarında en yüksek hücre sayısı ortalaması, 1 mg/ml BSA içeren grupta bulundu (9.6). Yapılan istatistiksel değerlendirmede, bu değer ile M16 medyumunun değişik miktarlarda BSA içeren diğer tüm gruplarından elde edilen veriler arasındaki farkların önemli olduğu bulundu ($p<0.05$). Kültür periyodunun bu döneminde bulduğumuz 9.6'lık maksimum hücre sayısı ortalaması, Saito ve ark. (58)'nin insan fötüsü göbek kordonu (Human Fetal Cord) serumunun değişik konsantrasyonlarını kullanarak, iki

hücreli fare embriyolarını kültüre ettiği araştırmasında ve in vitro kültür periyodunun 29. saatinde bulunduğu 10.1'lik hücre sayısı ortalamasına yakın gerçekleşti.

Aynı medyumun aynı gruplarında kültüre alınan embriyoların in vitro kültür periyodunun 48. saatlik döneminde en yüksek embriyonik hücre sayısı ortalaması yine 1 mg/ml BSA içeren grupta bulunurken (43.65), bu değer ile diğer tüm gruplardaki değerler arasındaki farkların istatistiksel anlamda önemli oldukları bulundu ($p<0.05$).

In vitro kültürün 72. saatine gelindiğinde en yüksek embriyonik hücre sayısı ortalaması yine 1 mg/ml BSA içeren grupta bulunurken (69.90), BSA'nın sıfıra doğru azaldığı ve 36 mg/ml 'ye doğru çıktığı gruplarda bulunan değerler ile bu rakam arasındaki farkların istatistiksel açıdan önem arz edecek şekilde arttığı gözlemlendi ($p<0.05$). Ancak bu saatte sadece 9mg/ml BSA grubunda bulunan 65.00'lık hücre sayı ortalaması ile bu değer arasındaki farkın, istatistiksel anlamda önem taşımadığı görüldü ($p>0.05$).

In vitro kültür periyodunun 96. saatinin sonunda ise, aynı medyum gruplarındaki embriyonik hücre sayıları kendi içinde karşılaştırıldığında, en yüksek hücre sayı ortalaması 1 mg/ml BSA grubunda 95.94 ile bulunurken bu değer ile diğer tüm gruplardaki hücre sayı ortalamaları arasındaki farkların istatistiki açıdan önemli olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

Sonuçta M 16 medyum grubunda, in vitro kültür periyodunun 24, 48, 72 ve 96. saatlerinde embriyolarda gerçekleşen en yüksek embriyonik hücre sayısı ortalamasının 1 mg/ml BSA grubunda gerçekleştiği, buna karşın en düşük hücre sayısı ortalamasının ise BSA içermeyen (0 mg/ml) grupta gerçekleştiği görüldü. M16 medyumunda kültüre edilen iki hücreli fare embriyolarının gelişim durumlarının natif yolla muayene edildiği çalışmanın ilk aşamasında, en yüksek gelişim düzeyinin yakalandığı (%84.74) 3 mg/ml BSA grubundaki embriyonik hücre sayısı, bu sefer natif yolla yapılan muayenede gelişim düzeyi bu gruptakinden daha az olarak belirlenen (%79.22), 1mg/ml BSA grubundaki hücre sayısından daha düşük olarak gerçekleşti (81.37'ye, 95.45). Yapılan istatistiki değerlendirmede bu iki grupta bulunan değerler arasındaki farkın önem taşıdığı belirlendi ($p<0.05$).

Bu sonuçtan hareketle , M 16 medyumunda kültüre edilen fare embriyolarının, 1 mg/ml BSA içeren grubunda ideal olarak gelişebildikleri, buna karşın BSA'nın sıfıra yaklaşan ve 9 mg/ml'yi aşan dozlarda iyi gelişemedikleri ve dolayısıyla da embriyonik hücre sayılarının da düşük seviyelerde kaldıkları gözlemlendi.

Elde edilen bu veriler Willey ve ark. (68)' nın morfolojik olarak hızlı gelişen embriyoların gelişimlerinin, hücre çekirdek bölünmesiyle her zaman bir korelasyon içinde olmayabileceği yönündeki bulgularını desteklemektedir.

Çalışmada in vitro kültürün 48. saatlik döneminde 1 mg/ml BSA içeren M 16 medyum grubunda bulduğumuz 43.65'lik hücre sayısı ortalaması, Chatot ve ark.(13)'nin bir hücreli fare embriyolarını 4mg/ml BSA içeren M 16 medyumunda 48 saat kültüre ettikleri çalışmalarında buldukları 14.5 morula ve 35.0 blastosist hücre sayılarının her ikisinden de yüksek bulunurken, çalışmamızın 3 mg/ml BSA grubunda bulduğumuz 34.05'lik ortalama değere yakın olmuştur. Buradaki farklılığın BSA miktarlarındaki farklılıktan ve araştırmacıların fare embriyolarını in vitro bolk'a maruz kalabilecekleri dönem olan bir hücreli dönemden itibaren kültüre etmeğe başlamalarından ileri gelmiş olabileceği düşünüldü.

Whitten's medyumunun değişik miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre edilen 2 hücreli fare embriyolarında (Tablo 29), in vitro kültür periyodunun ilk 24 saatinde meydana gelen en yüksek hücre sayısı ortalaması 9.6 ile 3 mg/ml BSA grubunda meydana gelirken, bu değer diğer tüm gruplardaki hücre sayı ortalamaları ile arasındaki farklar önemli bulundu ($p<0.05$).

Aynı medyumun aynı gruplarında kültür periyodunun 48. saatlik dönemindeyse en yüksek hücre sayısı ortalaması 67.72 ile bu defa 1 mg/ml BSA grubunda olurken 3 mg/ml BSA grubundaki hücre sayısı ortalaması ise 47.18'de kaldı. Yapılan istatistiki değerlendirmede 1 mg/ml BSA grubundaki değer ile diğer tüm gruplardaki değerler arasındaki farkların önemli olduğu görüldü ($p<0.05$).

Devam eden kültür periyodunun 72. saatinde de en yüksek hücre sayısı ortalaması yine 1 mg/ml BSA içeren grupta 92.75 ile bulunurken, bu değer ile aynı saatte 3 mg/ml BSA grubunda bulunan 86.3'lük ortalama değer arasındaki farkın istatistiksel anlamda önemsiz olduğu bulundu ($p>0.05$).

İn Vitro kültür periyodunun sonuna gelindiğinde ise, 107.65'lik en yüksek hücre sayısı ortalaması 3 mg/ ml BSA içeren grupta gözlenirken, ikinci en yüksek değer de 105.60 ile 1 mg/ml BSA grubunda bulundu. Yapılan istatistiki değerlendirmede bu iki değer arasındaki farkın önemsiz olduğu ($p>0.05$), bununla birlikte BSA miktarlarındaki azalma ve artışların embriyonik hücre sayısında önemli oranlarda azalmalara neden olduğu gözlemlendi ($p<0.05$).

Gerek M16, gerekse Whitten's medyumlarının aynı miktarlarda BSA içeren gruplarında gözlenen embriyonik hücre sayıları ortalamalarının in vitro kültür periyodunun 24, 48, 72 ve 96. saatlerinde grupların birebir karşılaştırılmalarında , istatistiki açıdan hiçbir grup arasında önemli bir fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36).

Sonuç olarak; gerek M 16 gerekse Whitten's kültür medyumlarında kültüre edilen iki hücreli fare embriyolarında, kültür periyodunun ilk 24 saatinde BSA içermeyen

gruplarda meydana gelen yüksek oranlı gelişimler ilk bakıda embriyoların bu dönemde proteine ihtiyaç duymadıkları şeklinde bir kanı uyandırmaktadır. Ancak, aynı gruplar bu defa embriyonik hücre sayısı bakımından incelendiğinde, BSA' nın 0.3, 1 ve 3 mg/ml miktarlarda bulunduğu gruplarda embriyonik hücre sayılarının yüksek oranda şekillendiği; buna karşın da BSA' dan yoksun (0 mg/ml) grup ile BSA' yı 9 mg/ml' den daha yoğun olarak bulunduran gruplarda bu sayıların hızla düştüğü görüldü. Kültür periyodunun 48., 72. ve 96. saatlerinde de yine her iki kültür medyumunda benzer sonuçlar elde edildi. Bu sonuçlar Hsu (26)' nın fare embriyolarının Cleavage (yarıklanma) dönemi boyunca nitrojen kaynağına ihtiyaç duymadıkları yönündeki bulgularıyla bağdaşmazken, İki hücreli fare embriyolarının bu dönemde medyumdaki hidrolize olmuş enzim ve albüminleri kullanabildiğini bildiren Brinster (10)' in bulgularıyla aynı paralelde gerçekleşti.

Çalışmada elde edilen bir diğer bulgu da BSA' nın bulunmadığı gruplarda Whitten's medyumunun embriyoların gerek toplam gelişim oranlarında, gerekse Hatching/ Hatched Blastosiste ulaşma yönünden M 16 medyumundan daha üstün olduğu ancak 9 mg/ml 'yi aşan BSA yoğunluklarında ise her iki medyumun da olumsuz etkilendiği ve embriyoları geliştirmede zayıf kaldığıdır.

In vitro kültür periyodunun sonunda ulaşılan toplam Hatching + Hatched Blastosist oranları açısından her iki medyum grubunun aynı miktarlarda BSA içeren gruplarının birbirleriyle yapılan karşılaştırmalarında, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml BSA grupları arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunmazken, BSA miktarlarının azaldığı (0.3 mg/ml) ve bulunmadığı gruplarda (0 mg/ml) yine Whitten's medyumunun M 16 medyumuna olan üstünlüğü bariz bir şekilde saptanabildi.

M 16 medyumunda kültüre edilen embriyolara ait, embriyonik hücre sayılarının tespit edildiği çalışmada ise bu sefer; 1 mg/ml BSA grubunda tespit edilen hücre sayısı ortalamalarının diğer tüm gruplardan daha üstün gerçekleştiği görülürken, BSA içermeyen (0 mg/ml) grupta ise, hücre sayısı ortalamalarının en düşük düzeyde kaldığı saptandı. Oysa ki, çalışmanın bundan önceki aşamasında embriyoların natif yolla yapılan muayenesinde en yüksek oranda gelişim gösteren 3 mg/ml BSA grubundaki embriyoların, embriyonik hücre sayısı ortalamaları bakımından incelendiğinde, 1 mg/ml BSA grubundaki çekirdek sayısı ortalamalarının oldukça altında kaldığı görüldü ($p < 0.05$).

Bu sonuç, embriyoların gelişim düzeyinin belirlenmesinde sadece natif muayene yönteminin yanıltıcı sonuçlar verebileceğini ortaya koymasından önem taşımaktadır.

Whitten's medyum gruplarında kültüre edilen embriyoların yapılan hücre çekirdek sayımı sonuçları, aynı medyumun aynı gruplarında natif yolla yapılan muayenede elde edilen sonuçlarla büyük çoğunlukla benzer gerçekleşti. Dolayısıyla 3 mg/ml BSA grubunda en yüksek oranda gelişim gösteren embriyoların, hücre çekirdek sayılarının da

diğer gruplara nazaran istatistiksel anlamda önemli olacak biçimde yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$).

Whitten's medyumunun BSA içermeyen grubundaki gelişim oranlarının natif muayenede, yoğun oranda (36 mg/ml) BSA içeren gruptaki gelişimlerden önemli oranda yüksek olduğu tespit edilmişti ($p<0.05$). Ancak yapılan hücre çekirdek sayımlarında bu iki grupta tespit edilen hücre çekirdek sayısı ortalamaları arasında istatistiksel açıdan her hangi bir fark gözlenmedi ($p>0.05$). Bununla birlikte, natif muayenede BSA içermeyen (0 mg/ml) grup ile benzer gelişim oranlarına sahip olduğu bulunan 18 mg/ml grubundaki hücre sayısı ortalamasının, BSA' sız gruptaki hücre sayısı ortalamasından daha yüksek olduğu saptandı ($p<0.05$).

Bu sonuçlar Willey ve ark. (68)' nın da belirttiği gibi, in vitro ortamdaki hücre bölünmelerinin çekirdek bölünmesi ile her zaman bir paralellik içinde olmayabileceğini ortaya koydu. Dolayısıyla embriyoların in vitro gelişim kontrollerinde sadece natif yolla yapılacak muayenelerin yeterince sağlıklı sonuç vermediği, bununla birlikte çalışmamızda kullandığımız ve embriyonik hücre çekirdek sayılarının boyanarak sayılmasına dayalı muayene yönteminin daha güvenilir olduğu belirlendi.

Elde edilen verilere göre;

1. İki hücreli fare embriyolarının in vitro ortamda kültüre edilmelerinde medyum olarak gerek M16 ve gerekse Whitten's medyumlarının kullanılabileceği,
2. Embriyonal gelişim düzeylerinin sadece natif yolla (direkt bakı) belirlenmeye çalışılmasının yanıltıcı sonuçlar verebileceği, sağlıklı bir muayenenin embriyonik hücre sayılarının tespiti ile yapılabileceği,
3. İki hücreli fare embriyolarının in vitro kültüründe medyumlara protein kaynağı olarak BSA (Bovine Serum Albumin Fraction V)'nın katılması halinde başarılı sonuçların alınabileceği,
4. BSA'nın bulunmadığı (kontrol) ve yoğun olarak bulunduğu (özellikle 18 ve 36 mg/ml) gruplarda embriyonal gelişimin olumsuz yönde etkilendiği ve,
5. Optimal sonucu elde etmek için BSA'nın; M16 medyumuna kullanılıyorsa 1 mg/ml, Whitten's medyumuna kullanılıyorsa, 3 mg/ml miktarlarında kullanılmasının uygun olacağı kanısına varıldı.

8.ÖZET.

Çalışma iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşama farelerde süperovulasyon, embriyoların kazanılması ve kazanılan embriyoların değişik miktarlarda BSA içeren farklı kültür medyumlarında 96 saat süreyle kültürlerini ve bu süreç içerisinde direkt mikroskopik bakı (natif muayene) ile embriyonik gelişimsel kontrollerini kapsamaktadır. İkinci aşama ise, aynı şekilde kazanılan embriyoların yine aynı şartlar altında 96 saat süreyle kültürü ve in vitro kültürün her 24 saatinde bir olmak üzere hücre çekirdeklerinin boyanarak, embriyonik hücre sayılarının tespiti yöntemiyle embriyonik gelişim kontrollerinin yapılmasını içermektedir.

Çalışmanın birinci aşamasında, embriyo eldesi amacıyla 94 dişi farenin plak gösteren 72 tanesi ve bunların tohumlanması içinde 20 adet erkek fare kullanıldı. Süperovulasyon, 5 I.U PMSG enjeksiyonunu müteakip 48 saat sonra yine 5 I.U. hCG enjeksiyonu ile gerçekleştirildi. Yapılan ovidukt yıkamalarında fare başına ortalama 18.16 ± 8.65 adet iki blastomerli embriyo, 1.26 ± 0.96 adet döllenmemiş oosit ve 0.39 ± 0.70 adet dejenere embriyo düştüğü tespit edildi.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise, embriyo eldesi amacıyla 75 farenin plak gösteren 50 tanesi kullanıldı. Senkronizasyon aynı yöntemle yapılırken bu gruptaki farelerden elde edilen iki blastomerli embriyoların fare başına ortalaması, 20.20 ± 4.06 , döllenmemiş oosit ortalaması 2.54 ± 1.61 ve dejenere embriyo ortalaması da 1.57 ± 1.09 olarak bulundu.

Birinci aşamada elde edilen iki blastomerli embriyolar, M16 ve Whitten's medyumlarının sırasıyla 0 (kontrol), 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml BSA içeren gruplarında ve aynı koşullar altında (% 5 CO₂, % 5 O₂, % 90 N₂'li gaz ortamı ve % 100'e yakın rutubetin sağlandığı 37°C'lik inkübatör ortamı) 96 saat süreyle kültüre edildiler. Embriyoların gelişimsel kontrolleri in vitro kültür periyodunun her 24 saatinde bir kere olmak üzere natif yöntemle yapıldı.

M 16 medyumunun 0 (Kontrol), 0.3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml miktarlarında BSA içeren gruplarında kültüre edilen embriyoların gelişim oranları arasında, in vitro kültürün ilk 24 saati itibarıyla istatistiksel açıdan herhangi bir fark bulunmadı ($p>0.05$). Kültür periyodunun 48 saatlik döneminde ise en yüksek gelişim düzeyi 100.00 ± 0.00 ile 3 mg/ml BSA içeren grupta meydana geldi. Bu değer ile 0.3, 1 ve 9 mg/ml BSA içeren gruplardaki değerler arasında istatistiksel anlamda herhangi bir fark saptanmadı ($p>0.05$). Buna karşın, bu değer ile BSA'nın bulunmadığı (0 mg/ml) ve yoğun olarak bulunduğu (18 ve 36 mg/ml) gruplardaki değerler arasındaki farkların istatistiksel açıdan önem taşıdığı saptandı ($p<0.05$). In vitro kültür periyodunun 72 ve 96. saatlerinde ise en yüksek gelişim

oranları % 88.01 ± 16.06 ve % 84.74 ± 17.61 ile yine 3 mg/ml BSA grubunda saptanırken bu değer ile 1 ve 9 mg/ml gruplarındaki değerlerle arasındaki farkların istatistiki açıdan önemsiz ($P>0.05$), buna karşın diğer gruplarla ise arasındaki farkların önem taşıdığı saptandı ($P<0.05$).

Whitten's medyumunun farklı miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre edilen embriyoların yapılan gelişimsel kontrollerinde kültür periyodunun 24. saati itibari ile en yüksek gelişim oranı % 100.00 ± 0.00 ile 3 mg/ml BSA grubunda gözlenirken hiçbir grup arasında istatistiksel açıdan herhangi bir gelişimsel farklılık gözlenmedi ($p>0.05$). İn vitro kültürün 48 saatlik döneminde ise en yüksek gelişim oranı % 96.52 ± 6.70 ile yine 3 mg/ml BSA grubunda saptandı. Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu değer ile 0,0.3 ve 1 mg/ml BSA gruplarında bulunan değerler arasındaki farkların önem taşımadığı gözlenirken ($p>0.05$), bu değer ile BSA'nın yoğunlaştığı (9, 18 ve 36 mg/ml) gruplarındaki değerler arasındaki farkların 3 mg/ml BSA grubu lehine olmak üzere önem taşıdığı saptandı ($p<0.05$). İn vitro kültürün 72 ve 96. saatlerinde ise en yüksek embriyonal gelişim oranı % 94.57 ± 7.43 ile yine 3 mg/ml BSA grubunda gerçekleşti. Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu değer ile 0.3 ve 1 mg/ml BSA gruplarındaki değerler arasındaki farkların önem taşımadığı belirlendi ($p>0.05$). Buna karşın bu değer ile BSA'nın bulunmadığı (0 mg/ml) ve yoğun olarak bulunduğu (9, 18 ve 36 mg/ml) gruplarda bulunan değerlerle arasındaki farkların, 3 mg/ml BSA grubu lehine olmak üzere önem taşıdığı belirlendi ($p<0.05$).

M16 ve Whitten's medyumlarının aynı miktarlarda BSA içeren gruplarında kültüre alınan embriyoların in vitro kültür periyodunun sonunda ulaştıkları hatching + hatched blastosist toplam oranları açısından birbirleriyle yapılan karşılaştırmalarında, BSA'nın sıfıra yaklaşan miktarlarında (0, 0.3 ve 1 mg/ml) Whitten's medyum grupları lehine olmak üzere istatistiksel açıdan önemli oranlarda farklılıklar saptandı ($p<0.05$). Buna karşın, BSA'nın yoğun olarak bulunduğu (9, 18 ve 36 mg/ml) gruplar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmelerde herhangi bir fark gözlenmedi. ($p>0.05$). M16 ve Whitten's medyumlarının her ikisinde de en yüksek hatching + hatched blastosist toplam oranlarının sırasıyla % 44.34 ± 25.94 ve % 67.70 ± 25.22 ile 3 mg/ml BSA içeren gruplarında gerçekleştiği görüldü. Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu iki değer arasında , Whitten's medyum grubu lehine bulunan 23.36'lık farkın önem taşımadığı belirlendi ($p>0.05$).

İkinci aşamada ise; iki blastomerli fare embriyoları yine aynı medyumların aynı miktarlarda BSA içeren gruplarında 96 saat süreyle kültüre alındılar. Bu aşamada, embriyoların gelişimsel kontrollerinin daha sağlıklı bir şekilde yapılmasına yönelik olarak, in vitro kültür periyodunun her 24 saatlik döneminde bir olmak üzere (ilk 24 saat hariç) embriyolar hücre çekirdek boyası ile boyanarak embriyonik hücre sayıları tespit edildi.

M16 medyumunun 24 ve 48 saatlik kültür periyotlarında en yüksek embriyonik hücre sayısı ortalamaları sırasıyla 9.6 ± 3.2 ve 43.65 ± 9.65 ile 1 mg/ml grubunda gözlenirken, bu değer ile diğer tüm gruplarda bulunan değerler arasında istatistiksel açıdan önemli oranlarda farklılıklar gözlemlendi ($p < 0.05$). İn vitro kültür periyodunun 72. ve 96. saatlerinde de benzer veriler alındı ve sonuçta en yüksek embriyonik hücre sayısı ortalamasına sahip embriyoların 1 mg/ml BSA içeren grupta gelişmeler olduğu belirlenirken (95.45 ± 9.61), bu değer diğer tüm gruplardaki değerlere oranla istatistiki açıdan üstün olduğu saptandı ($p < 0.05$). Oysa; embriyonal gelişim oranlarının natif muayene yöntemiyle belirlendiği çalışmanın ilk aşamasında, en yüksek gelişim oranına sahip olarak bulunan 3 mg/ml BSA grubundaki embriyoların hücre çekirdek sayılarının ancak 81.37 ± 18.31 de kaldığı ve 1 mg/ml'deki değer olan 95.45 ± 9.61 'lik hücre sayısı ortalaması ile arasındaki 14.08'lik farkın istatistiksel açıdan önem taşıdığı saptandı ($p < 0.05$).

Aynı miktarlarda BSA içeren Whitten's medyum gruplarında kültüre edilen embriyolara ait hücre çekirdek sayılarının, in vitro kültür periyodunun ilk 24 saatlik döneminde en yüksek olarak 9.6 ± 5.09 ortalama ile 3 mg/ml BSA grubunda meydana geldiği saptandı. Yapılan istatistiksel değerlendirmede bu değer ile diğer tüm BSA gruplarında bulunan ortalama değerler arasındaki farkların bu grup lehine olmak üzere önemli olduğu belirlendi ($p < 0.05$). Kültür periyodunun 48 saatlik döneminde ise en yüksek ortalama değer 67.72 ± 22.90 ile 1 mg/ml BSA grubunda gözlenirken, bu değer ile diğer tüm gruplardaki ortalama değerler arasındaki farkların istatistiksel anlamda önemli oldukları tespit edildi ($p < 0.05$). Devam eden kültür periyodunun 72 ve 96. saatlerinde ise, en yüksek embriyonik hücre sayısı ortalaması yine 3 mg/ml BSA gruplarında ve sırasıyla 86.3 ± 6.73 ve 107.65 ± 10.27 olarak saptandı. Her iki saatte gözlenen bu değerler ile 1 mg/ml grubunda bulunan 92.75 ± 7.18 ve 105.60 ± 11.52 'lik ortalama değerlerle aralarında istatistiksel açıdan herhangi bir fark gözlenmedi ($p > 0.05$). Buna karşın diğer tüm BSA gruplarında saptanan ortalama değerler, 3 mg/ml BSA grubundaki bu değerlerin oldukça altında gerçekleşti ($p > 0.05$).

Gerek M16 ve gerekse Whitten's medyumlarında, BSA miktarlarının sıfıra doğru azalması ve 36 mg/ml'ye doğru artması durumlarında embriyonik hücre sayısı ortalamalarında önemli oranlarda düşüşler gözlemlendi. Farklı medyumların aynı miktarlarda BSA içeren gruplarının birbirleriyle yapılan karşılaştırmalarında hiçbir BSA miktarı ve hiçbir saat açısından gruplar arasında istatistiksel anlamda önemli farklara rastlanmadı ($p > 0.05$).

Sonuç olarak, iki hücreli fare embriyolarının in vitro kültüründe protein kaynağı olarak BSA'nın olumlu katkılar yapabildiği ve kültür medyumları olarak gerek M16 ve gerekse de Whitten's medyumlarının rahatlıkla kullanılabileceği görüldü. Ancak in vitro kültür periyodu sonunda optimal sonucu elde etmek için; M16 medyumları kullanılacaksa 1

mg/ml, Whitten's medyumu kullanılacaksa 3 mg/ml BSA yoğunluklarının tercih edilmesi gerektiği ortaya çıktı. Ayrıca embriyoların in vitro kültür ortamındaki gelişimlerinin sadece natif yolla yapılmasının yanıltıcı sonuçlar verebileceği, bunun yanında araştırmada kullandığımız hücre çekirdeklerinin boyanmasına dayalı yöntemin daha sağlıklı sonuçlar verebileceği kanısına varıldı.



9.SUMMARY

EFFECT OF VARIOUS BSA LEVELS ON DEVELOPMENT OF MOUSE EMBRYOS IN IN VITRO CULTURE

The study was performed in two stages. In the first stage, mice were superovulated, embryos were recovered, cultured in different culture media containing various levels of BSA for 96 hours and the control of embryonic developments by direct microscopic observation were done. In the second stage the culture of the embryos under same conditions for 96 hours and control of embryonic development at every 24 hour during the in vitro culture period by nuclear staining were performed.

Out of 94 female mice, 72 with vaginal plug and 20 male mice for matings were used. Superovulation was achieved by 5 i.u. PMSG injection and 5 i.u. hCG injection 48 hours after that. 18.16 ± 8.65 two blastomere embryos, 1.26 ± 0.96 non fertilized oocyte and 0.39 ± 0.70 degenerated embryo per female were recovered by oviduct flushings.

In the second stage of the study 50 plug bearing female out of 75 were used for embryo collection. By the same superovulation method 20.20 ± 4.06 two blastomere embryos, 2.54 ± 1.61 non fertilized oocytes and 1.57 ± 1.09 degenerated embryos Per female were recovered in this group.

The two blastomer embryos collected in the first group were cultured for 96 hours in M 16 and Whitten's media containing 0 (control), 0.3, 1, 3, 9, 18 and 36 mg/ml BSA respectively under same conditions (at 37°C incubator under air containing 5% CO_2 , 5% O_2 , 90% N_2 and nearly 100% humidity). Developmental stages of embryos were observed at every 24 hour during in vitro culture period by neat observation technique. No statistical differences was observed among the M 16 medium groups containing 0 (control), 0.3, 1, 3, 9, 18 and 36 mg/ml BSA at the first 24 hours ($p > 0.05$). Highest development ($100 \pm 0.00\%$) was observed in 3 mg/ml BSA containing group at 48. hour. No statistical difference was observed between these results and the groups ($p > 0.05$). Although there were important statistical differences ($p < 0.05$) between these results and the results of the groups containing lowest (0 mg/ml) and highest (18 and 36 mg/ml) BSA levels. Highest development rates at 72. and 96. hours of the in vitro culture period were $88.01 \pm 16.06\%$ and $84.74 \pm 17.61\%$ in 3 mg/ml BSA containing group. The difference between these values and the values of 1 and 9 mg/ml BSA containing groups was insignificant ($p > 0.05$), and between the values of other groups was significant ($p < 0.05$).

When the developments of the embryos cultured in Whitten's medium containing various levels of BSA were evaluated, highest development rate for the first 24 hour (100

± 0.00 %) was observed in 3 mg/ml BSA containing group. No statistical difference was observed among the groups ($p > 0.05$). Highest development rate at the 48 hour of in vitro culture was 96.52 ± 6.70 % in 3 mg/ml BSA group. No important statistical difference was observed between this value and the values of 0, 0.3 and 1 mg/ml BSA containing groups ($p > 0.05$). Whilst the difference between this value and the values of the groups containing higher levels of BSA (9, 18 and 36 mg/ml) was important ($p < 0.05$) in favor of 3 mg/ml BSA group. At 72 and 96 hours of in vitro culture highest embryonic development rate was 94.57 ± 7.43 % in the 3 mg/ml BSA group. There were no important statistical difference between this result and the result of 0.3 and 1 mg/ml BSA containing groups ($p > 0.05$). The difference between this result and the results of the group without BSA (0 mg/ml) and the groups with higher BSA (9, 18 and 36 mg/ml) were statistically important in favor of 3 mg/ml BSA group ($p < 0.05$).

When the groups of M 16 and Whitten's media containing same amounts of BSA were compared at the end of in vitro period relating to their total hatching + hatched blastocyst rates, important statistical differences were observed in favor of 0, 0.3 and 1 mg/ml BSA containing groups of Whitten's medium ($p < 0.05$). Contrary to this, no statistical importance were found among the high BSA (9, 18 and 36 mg/ml) containing groups ($p > 0.05$). Highest total hatching + hatched blastocyst rates in both M 16 and Whitten's media were 44.34 ± 25.94 % and 67.70 ± 25.22 % respectively in 3 mg/ml BSA containing groups. Statistical evaluations showed that 23.36 difference in favor of Whitten's medium was not significant ($p > 0.05$).

In the second stage of the study, two blastomere mouse embryos were cultured for 96 hours in groups containing same amounts of BSA. At this stage, in order to control the developments embryos were stained with nucleus stains and nuclei were counted every 24 hours during in the in vitro culture period (except the first 24 hour). The highest embryonic cell numbers of M 16 medium at 24 and 48 hours culture period were 9.6 ± 3.2 and 43.65 ± 9.65 respectively in 1 mg/ml BSA containing group, and these values were superior statistically to the values of all other groups ($p < 0.05$). At 72. and 96. Hours of in vitro culture period similar results were achieved. Highest embryonic cell containing embryos were 69.60 ± 17.29 and 95.45 ± 9.61 in 1 mg/ml BSA containing group and these values were seen to be superior statistically to all the other groups ($p < 0.05$). However, in the first stage of the study where the embryonic development rates were evaluated by neat observations, highest development rate was observed in 3 mg/ml BSA group but the cell numbers of the embryos in this group remained at 81.37 ± 18.31 . The 14.08 difference between this value and the value of 1 mg/ml group (95.45 ± 9.61) was important statistically ($p < 0.05$). In embryos cultured in similar BSA the highest embryonic cell number was mean 9.6 ± 5.09 in 3 mg/ml BSA group at 24 hours of the culture period.

containing Whitten's medium groups. The statistical evaluations of the results revealed that the difference between this value and the values of all BSA groups was important ($p<0.05$) in favor of this group. At 48 hour of culture period, highest value was 67.72 ± 22.90 in 1 mg/ml BSA group and the differences between this group and other groups were important statistically ($p<0.05$). At 72 and 96 hours of culture period, highest embryonic counts were 86.30 ± 6.73 and 107.65 ± 10.27 respectively in 3 mg/ml BSA containing groups. No statistical difference was observed between these values and the values 92.75 ± 7.18 and 105.60 ± 11.52 of 1 mg/ml BSA group ($p>0.05$). However mean values of all BSA groups, were lower than this value of 3 mg/ml BSA group ($p>0.05$).

Important decreases were observed in embryonic cell counts with the decrease of BSA amount in both M16 and Whitten's media towards 0 and also with increase to 36 mg/ml. In comparison of the different media containing similar BSA amount no important statistical difference was seen among all BSA groups and all time periods ($p>0.05$). In conclusion, it was observed that BSA is a good protein resource and could be added to M16 and Whitten's media in in vitro culture of two cell mouse embryos. It is suggested to add 1 mg/ml BSA to M16 and 3 mg/ml BSA to Whitten's media in order to get optimal results from in vitro culture also the observation of developmental stages of the embryos in in vitro culture can be achieved more accurately by nuclei staining procedures instead of using neat observation method only.

TE. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
BİLİMSEL ARAŞTIRMA MERKEZİ

10. KAYNAKLAR

1. Alexandre, H.L. (1974): Effects of X-Irradiation on Preimplantation Mouse Embryos Cultured In-Vitro. J. Reprod. Fert. 36: 417 - 420.
2. Arat, S. (1995): Culture and Transfer of Eight and Sixteen Cell Zona Free Mouse Embryos Into Uterus. Tr. J. of. Veterinary and Animal Sciences. 19: 321 - 323.
3. Arat, S. (1997): Suitable Recipients for Successful Development of Cultured Eight-Sixteen Cell Zona Free Mouse Embryos. Tr. J. of. Veterinary and Animal Sciences. 21: 307 - 311.
4. Arat, S., Başı, H., Çirakoğlu, B. (1994): Fare Irklarında Tek Hücreli Embriyoların Ovidukta Transfer Çalışmaları. Tr. J. of. Veterinary and Animal Sciences. 18: 169 - 173.
5. Başı, H. (1994): Transgenik Fare Eldesine Yönelik Çalışmalar. Doktora Tezi. İ.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, İstanbul.
6. Bavister, B. D. (1988): Role of Oviductal Secretions in Embryonic Growth In-Vivo and In-Vitro. Theriogenology. 29 (1): 143 - 154.
7. Biery, K.A., Kraemer, B. C. (1988): Comparison of Ham's F-10 Modified Whitten's and Eagle's Media Supplemented with Either Bovine Serum Albumin or Newborn Calf Serum for the In-Vitro Culture of 8-Cell Mouse Embryo. Theriogenology. 29 (1): 225 abst.
8. Brinster, R.L. (1963): A Method for In-Vitro Cultivation of Mouse Ova from Two-Cell to Blastocyst. Exp. Cell Res.32:205 - 208
9. Brinster, R.L. (1965): Studies on the Development of Mouse Embryos In Vitro. 3.The Effects of Fixed Nitrogen Source. J. Exp. Zoology. 158: 69 - 77.
- 10.Brinster, R.L. (1966): Development of Eight-Cell Mouse Embryos In-Vitro. Exp. Cell Research. 42: 308 - 315.
- 11.Brinster, R.L. (1967): Protein Content of the Mouse Embryo During the First Five Days of Development. Jour. Reprod. Fert. 13: 413 - 420.
- 12.Butler, J.E., Biggers, J. D.(1989): Assessing The Viability of Preimplantation Embryos In-Vitro. Theriogenology. 31 (1): 115 - 125.
- 13.Chatot, C. L., Ziomek, C.A., Bavister, B. D., Lewis, J.L., Torres, I. (1989): An Improved Culture Medium Supports Development of Random-Bred 1-Cell Mouse Embryos In-Vitro. J. Reprod. Fert. 86: 679 - 688.
- 14.Chung, K. S., Kim, J.H., Seung, K.R., Lee, H.T. (1995): Development and Outgrowth of Mouse Embryos in Whitten's Medium Supplemented With Human Amniotic Fluid (hAF). Theriogenology. 43 (1) abst.:187

15. Cross, P.C., Brinster, R.L. (1970): In-Vitro Development of Mouse Oocytes. *Biology of Reproduction*. 3: 298 - 307.
16. Dandekar, P. V., Glass, R.H. (1987): Development of Mouse Embryos In-Vitro is Affected by Strain and Culture Medium. *Gamete Research*. 17: 279 - 285.
17. Daniel, J. C. Jr. (1968): Oxygen Concentrations for Culture of Rabbit Blastocysts. *Jour. Reprod. Fert.* 17: 187 - 190.
18. Fleming, T.P. (1987): A Quantitative Analysis of Cell Allocation to Trophectoderm and Inner Cell Mass in the Mouse Blastocyst. *Developmental Biology*. 119: 520 - 531.
19. Gardner, D. Lane., M. (1993): Amino Acids and Ammonium Regulate Mouse Embryos Development in Culture. *Biology of Reproduction*. 48: 377 - 385.
20. Ginberg, L., Hillman, N. (1975): Shifts in ATP Synthesis During Preimplantation Stages of Mouse Embryos. *J. Reprod. Fert.* 43: 83 - 90.
21. Hafez, E.S.E. (1987): *Reproduction in Farm Animals*. 5th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
22. Hafez, E.S.E. (1993): *Reproduction in Farm Animals*. 6th Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
23. Hogan, B., Costantini, F., Lacy, E. (1986): *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Newyork.
24. Hoppe, P.C. (1973): Fertilization In-Vitro and Development of Mouse Ova. *Biology of Reproduction*. 8: 420 - 426.
25. Hoppe, P.C., Whitten, W.K. (1974): An Albumin Requirement for Fertilization of Mouse Eggs In-Vitro. 39: 433 - 436.
26. Hsu, Y.C. (1980): Embryo Growth and Differentiation Factors in Embryonic Sera of Mammals. *Developmental Biology*. 76: 465 - 474.
27. İleri, İ.K., Ak, K., Pabuççuoğlu, S., Birler, S. (1998): Evcil Havanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. *İ.Ü. Veteriner Fakültesi Ders Notu*. No: 84.
28. Kane, M. T. (1974): The Effects of pH on Culture of One-Cell Rabbit Ova to

32. Kite, S., Irritani, A., Bavister, B. D. (1997): Effects of Volume, Culture Media and Type of Culture Dish on In-Vitro Development of Hamster 1-Cell Embryos. *Theriogenology*. 47: 541 - 548.
33. Knobil, E., Neil, J. D. (1994):: The Physiology of Reproduction. 2th Ed. Vol.1. Lea and Febiger. New York.
34. Konwinski, M., Solter, D., Koprowski, H. (1978): Effect of Removal of the Zona Pellucida on Subsequent Development of Mouse Blastocysts In-Vitro. *J. Reprod. Fert.* 54: 137 - 143.
35. Kraemer, D.C., Bowen, M.J. (1986): Embryo Transfer in Laboratory Animals. In: *Current Therapy in Theriogenology* (ed. D. A. Morrow). Philadelphia, W. P. Saunders. Co. 73-76.
36. Lane, M., Gardner, D.K. (1994): Amino Acids Increase Mouse Embryo Viability. *Theriogenology*. 41 abstr.: 233
37. Langton, R.E.G., Surani, M.A.E. (1976): Uterine Luminal Proteins of Mice *J. Reprod. Fert.* 46: 271 - 274.
38. Lawitts, J. A., Biggers, J. D. (1991): Optimization of Mouse Embryo Culture Media Using Simplex Methods. *J. Reprod. Fert.* 91: 543 - 556.
39. Lawitts, J. A., Biggers, J. D. (1991): Overcoming the 2-Cell Block by Modifying Standard Components in a Mouse Embryo Culture Medium. *Biology of Reproduction*. 45: 245 -251.
40. Leal, C.L.V., Filho, E.B.O., Malheiros, E.B. (1992): Evaluation of the Effects of Month and Superovulation on the Yield of Mice Embryos. *Theriogenology*. 4: 2069 - 2071.
41. McCaffrey, C., McEvoy, T. G., Diskin, M.G., Gwazdauskas, F.C., Kane, M. T., Sreenan, J.M. (1991): Successful Co-Culture of 1-4-Cell Cattle Ova to the Morula or Blastocyst Stage. *J. Reprod. Fert.* 91: 119 - 124.
42. Mehta, T.S., Kiessling, A. A. (1990): Development Potential of Mouse Embryos Conceived In-Vitro and Cultured in Ethylenediaminetetraacetic Acid With or Without Amino Acids or Serum. *Biology of Reproduction*. 43: 600 - 606.

46. Menino, A. R. Jr., Williams, J.S., Gardner, C. S., John, T. L. (1989): Mouse Embryo Development in Media Containing Growth Factors. *Animal Reproduction Science* 18: 125 - 137.
47. Millham, C.N., Tornesi, M. B., Palasz, A.T., Archer, J. (1994): Effect of Donor Bovine Serum Fractionation on Preimplantation Mouse Embryos in Culture. *Theriogenology*. 41 abstr.: 257
48. Minami, N., Utsumi, K., Iritani, A. (1992): Effects of Low Molecular Weight Oviductal Factors on the Development of Mouse One-Cell Embryos In-Vitro. *J. Reprod. Fert.* 96: 735 - 745.
49. Neal, P., Baker, T. G. (1974): Response of Mouse Ovaries In Vivo and in Organ Culture to PMSG and hCG. *J. Reprod. Fert.* 39: 411 - 414.
50. Noda, Y., Matsumoto, H., Umaoka, Y., Tatsumi, K., Kishi, J., Mori, T. (1991): Involvement of Superoxide Radicals in the Mouse Two-Cell Block. *Molecular Reproduction and Development*. 28: 356 - 360.
51. Ohboshi, S., Etoh, T., Sakamoto, K., Fujihara, N., Yoshida, T., Tomogane, H. (1996): Effects of Bovine Serum Proteins in Culture Medium on Post-Warming Survival of Bovine Blastocysts Developed In-Vitro. *Theriogenology*. 47: 1237 - 1243.
52. Overström, E.W. (1996): In Vitro Assessment of Embryo Viability. *Theriogenology*. 45: 3 - 16
53. Özkoca, A. (1986): Sığırlarda Reprodüksiyon ve İnfertilite. İ.Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları (3433). Gür-Ay Matbaası, İstanbul.
54. Pabuççuoğlu, S. (1991): Tavşan Embryolarının Kazanılması ve Kültüre Edilmelerinden Sonra Transferleri Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, İstanbul.
55. Pike, I. L., Alikani, M. (1988): Time Dependent Loss of Development Potential When Two-Celled Mouse Embryos Were Retained in Culture in Excised Oviducts *Annals New York Academy of Sciences*. 541: 419 - 423
56. Pomp, D., Critser, E.S., Rutledge, J.J. (1988): Lower Sodium Lactate in Whitten's Medium Improves In Vitro Developmental Capacity of One-Cell Mouse Embryos. *Theriogenology*. 29(5): 1019 - 1025
57. Roblero, L., Izquierdo, L. (1976): Effect of Progesterone on the Cleavage of Mouse Embryos In Vitro. *Jour. Reprod. Fert.* 46: 475 - 476
58. Saito, H., Berger, T., Mishell, D. R. Jr., Marrs, R. P. (1984): Effect of Variable Concentration of Serum on Mouse Embryo Development. *Fertility and Sterility*. 41(3): 460 - 464

- 59.Sakkas, D., Trounson A. O. (1991): Formulation of A Complex Serum- Free Medium (CSM) for Use in the Co-Culture of Mouse Embryos With Cells of the Female Reproductive Tract. *Reprod. Fertil. Dev.* 3: 99 - 108
- 60.Shirley, B.(1993): Tests of the Ability of Two-Cell Mouse Embryos to Utilize Selected Precursors of Phosphoenolpyruvic Acid and Pyruvic Acid. *The Journal of Experimental Zoology.* 267: 454 - 459
- 61.Shirley, B., Wortham, J. W. E., Witmyer, J., Mahony, M.C., Fort. G. (1985): Effects of Human Serum and Plasma on Development of Mouse Embryos in Culture Media. *Fertility and Sterility.* 43(1): 129 - 134
- 62.Spindle, A. I., Goldstein, L. S. (1975): Induced Ovulation in Mature Mices and Developmental Capacity of the Embryos In-Vitro. *J. Reprod. Fert.* 44: 113 - 116.
- 63.Tekeli, T. Güler, M., Aksoy, M. (1991): Fare Ovumlarının İn Vitro Fertilizasyonu Üzerine Çalışmalar. *S. Ü. Vet Fak.Derg.*6(1): 13 - 15
- 64.Tornesi, B., Palasz, A.T., Tan, L., Campo, D.L.R., Rousseaux, C.G., Mapletoft, R. J. (1992): Culture of Mouse Embryo And Limb Buds With Various Sera At Concentrations Based On Albumin Content. *Theriogenology.* 3: 1351 - 1353
- 65.Tornesi, B., Palasz, A.T., Tan, L., Campo, D.L.R., Rousseaux, C.G., Mapletoft, R. J.(1992):The Effect of Concentration of Different Sera on Mouse Embryos and Limb Buds in Culture. *Therigenology.* 37(1) abstr.: 310
- 66.Whitten, W.K.(1971): Nutrient Requirements for the Culture of Preimplantation Embryos In-Vitro. *Adv. Biosci.* 6: 129 - 141.
- 67.Whittingam, D.G. (1968): Fertilization of Mouse Egg In Vitro. *Nature.* 220: 592 - 593
- 68.Willey, L.M., Yamami, S. ,Muyden, D.V. (1986): Effect of Potassium Concentration Type of Protein Supplement and Density on Mouse Preimplantation Development In Vitro. *Fertility and Sterility.* 45(1): 111 - 119
- 69.William, R.B., Shapiro, S. S. (1990): Quality Control in the In Vitro Laboratory. *Theriogenology.* 33 (1): 23 - 51
- 70.Xu, K.P., Yadav, B. R., Rorie, R.W., Plante, L., Betteridge, K.J., King, W. A. (1992): Development and Viability of Bovine Embryos Derived From Oocytes Matured and Fertilized In Vitro and Co-Cultured With Bovine Oviductal Epithelial Cells. *Jour. Reprod. Fert.* 94: 33 – 43

11. ÖZGEÇMİŞ

1972 yılında Hatay'ın Samandağ ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Hatay'da tamamladım.

1988 yılında girdiğim İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 1993 yılında mezun oldum. 1994 yılının Mart ayında İ. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nde doktora öğrencisi olarak kayıt oldum. Aynı yılın Temmuz ayında da İ. Ü. Veteriner Fakültesi Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım.

Halen aynı görevime devam etmekteyim.

