



T.C.

BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİTRO ÜRETİLEN SIĞIR EMBRİYOLARININ KÜLTÜR
MEDYUMUNA L-KARNİTİN EKLENMESİNİN EMBRİYO
DONDURULMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

Araş. Gör. Mehmet YILDIZ

DOKTORA TEZİ

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Yunus ÇETİN

BURDUR-2022



T.C.
BURDUR MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İN VİTRO ÜRETİLEN SIĞIR EMBRİYOLARININ KÜLTÜR
MEDYUMUNA L-KARNİTİN EKLENMESİNİN EMBRİYO
DONDURULMASI ÜZERİNE ETKİSİ**

Mehmet YILDIZ

DOKTORA TEZİ

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Yunus ÇETİN

Bu Araştırma, “*Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü*” tarafından “0640-DR-20” proje numarası ile desteklenmiştir.

BURDUR-2022

TEŞEKKÜR

Bu çalışma ve lisansüstü eğitimim süresince, bana bilimsel düşünmeyi ve çalışmayı öğreten, beni geliştiren, doktora tezimin her aşamasında desteğini esirgemeyen, sadece bilimsel olarak değil aynı zamanda fikir, düşünce, hayata karşı duruş ve karakteriyle devamlı örnek almaktan onur duyduğum danışman hocam sayın Prof. Dr. Yunus ÇETİN'e sonsuz teşekkür ederim.

Çalışmanın her aşamasında maddi, manevi desteklerini üzerimde eksiltmeyen, beni yönlendiren, olumsuzlukları çözüme ulaştırmamda yardımlarını esirgemeyen tez izleme komite üyeleri; Prof. Dr. Yunus ÇETİN, Prof. Dr. Ali Reha AĞAOĞLU ve Prof. Dr. Barış Atalay USLU'ya teşekkür ederim. Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden, Prof. Dr. İbrahim TAŞAL, Prof. Dr. Örsan GÜNGÖR, Dr. Öğr. Üyesi Afşin KÖKER, Dr. Öğr. Üyesi Mesih KOCAMÜFTÜOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Gökhan BOZKURT ve Arş. Gör. Dr. Atakan ÇORTU'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında ovaryumların mezbahadan toplanıp laboratuvara getirilme aşamasında her zaman yanımda olan, zaman zaman laboratuvarda desteklerini esirgemeyen arkadaşlarım, Öğr. Gör. Süleyman ŞENSOY, Vet. Hek. Büşra Nur KILIÇ YILDIZ, Vet. Hek. Büşra GÜLBENLİ ve Vet. Hek. Tuğçe DAĞ'a teşekkür ederim.

Mezbahadan getirilen ovaryumlardan oositlerin toplanması, embriyo üretimi, embriyoların dondurulup çözülmesi aşamalarında yardımlarını esirgemeyen, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Genetik ve Embriyo Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi Öğr. Gör. Şöhret GÜLER'e, Moleküler Biyoloji ve Teknoloji öğrencisi Fatma Rabia YÖNTEM'e teşekkür ederim.

Akademik yolda yürümem için bana en büyük desteği veren, beni bu yola yönelten, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen, her koşulda arkamda duran, canım annem Azzet YILDIZ ve babam Abdulvahap YILDIZ'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın tüm aşamasında bana hertürlü desteğini sağlayan, sıkıştığım her anda yanımda olan, sabır ve hoşgörüsüyle beni devamlı destekleyerek motive eden sevgili hayat arkadaşım Vet. Hek. Büşra Nur KILIÇ YILDIZ'a teşekkür ederim.

Yapılan tez çalışması 0640-DR-20 proje numarası ile desteklenmiştir. Tez projemi destekleyen Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK SAYFASI	i
KABUL VE ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN SAYFASI	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
TÜRKÇE ÖZET	x
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Embriyo Kriyoprezervasyon Tarihçesi	2
1.2. Embriyo Dondurmanın Avantajları	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Embriyo Kültür Sistemleri	7
2.1.1. Ko-kültür	8
2.1.2. İçeriği tanımlanmış medyumlarda IVK	8
2.2. Embriyo Gelişimini Etkileyen Faktörler	12
2.3. Embriyoların Morfolojik Değerlendirilmesi	16
2.3.1. Embriyoların kalite sınıflandırması	18
2.4. Embriyoların Kriyoprezervasyonunda Kullanılan Maddeler	21
2.4.1. Kriyoprotektanlar	21
2.4.1.1. Hücre içine geçebilen kriyoprotektanlar	23
2.4.1.1.1. Dimetil sülfoksit	23
2.4.1.1.2. Etilen glikol	23
2.4.1.1.3. Gliserol	23
2.4.1.1.4. Propilen glikol	24
2.4.1.1.5. Bütilen glikol	24
2.4.1.1.6. Metanol	24
2.4.1.2. Hücre içine geçemeyen kriyoprotektanlar	25
2.4.1.2.1. Şekerler	25
2.4.1.2.2. Yüksek moleküler ağırlıklı polimerler	26
2.5. Embriyoların Kriyoprezervasyonu	27
2.5.1. Geleneksel yavaş dondurma	28
2.5.2. Vitrifikasyon	30
2.5.3. Ultra hızlı vitrifikasyon	33
2.6. IVP Embriyoların Kriyoprezervasyon Sorunları	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM	40
3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar	40
3.2. Ovaryumların Toplanması ve Laboratuvara Getirilmesi	40
3.3. Folliküllerin Aspirasyonu ile Oositlerin Elde Edilmesi	41
3.4. Oositlerin Kalite Değerlendirilmesi ve Oosit Seleksiyonu	43
3.5. İn Vitro Maturasyon	44

3.5.1. Maturasyon değeriendirilmesi	45
3.6. Spermanın Hazırlanması	45
3.6.1. Sperma yoğunluğunun hesaplanması	46
3.7. İn Vitro Fertilizasyon	47
3.8. İn Vitro Kültür	47
3.9. Deney Düzeneginin Oluşturulması	49
3.10. Dondurma ve Çözdürme Medyumlarının Hazırlanması	51
3.10.1. Vitrifikasyon medyumunu	51
3.10.2. Vitrikiye edilen embriyoların çözdürme medyumunu	51
3.10.3. Yavaş dondurma medyumunu	51
3.10.4. Yavaş dondurulan embriyoların çözdürme medyumunu	51
3.10.5. L-Karnitin stok medyumunu	52
3.11. Embriyoların Vitrifikasyonu	52
3.12. Embriyoların Klasik Yavaş Dondurulması	54
3.13. Vitrikiye Embriyoların Çözdürülmesi	56
3.14. Yavaş Dondurulan Embriyoların Çözdürülmesi	58
3.15. İstatistik Analiz	59
4. BULGULAR	61
4.1. İn Vitro Maturasyon Bulguları	61
4.2. İn Vitro Kültür Bulguları	62
4.2.1. Kültürün 3. günü klivaj bulguları	62
4.2.2. Kültürün 6. gün bulguları	64
4.3. Kültür Grubu Embriyoların Gelişimlerinin İncelenmesi	66
4.4. Embriyoların Yavaş Dondurulması ve Çözdürme Sonrası Bulguları	67
4.5. Embriyoların Vitrifikasyonu ve Çözdürme Sonrası Bulguları	68
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	80
KAYNAKLAR	81
EKLER	101
ÖZGEÇMİŞ	103

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.	Embiyoların gelişim aşamaları	14
Şekil 2.2.	Grade 1 görüntü	19
Şekil 2.3.	Grade 2 görüntü	19
Şekil 2.4.	IETS kriterlerine göre sınıflandırılan blastosistler	20
Şekil 2.5.	Yıllara ait kaydedilen sığır embriyolarının sayısı	27
Şekil 2.6.	Yıllara göre dondurulmuş sığır embriyolarının transfer oranı	28
Şekil 3.1.	Mezbahadan getirilen ovaryumlara ait görüntü	41
Şekil 3.2.	Aspirasyon ve filtreleme işlemi	42
Şekil 3.3.	İmmatür oositlerin görüntüsü	43
Şekil 3.4.	İmmatür oositlerin matürasyon medyumuna konulması	44
Şekil 3.5.	IVM sonrasında kumulus hücre genişlemesinin görüntülenmesi	45
Şekil 3.6.	Swim up aşamalarına ait görüntü	46
Şekil 3.7.	Spermanın fertilizasyon medyumuna eklenmesi	47
Şekil 3.8.	Fertilizasyon sonrasında muhtemel zigotların görüntüleri	48
Şekil 3.9.	Çalışmanın şematik gösterimi	50
Şekil 3.10.	Embriyonun vitrifikasyonu şematik gösterimi	52
Şekil 3.11.	Embriyonun vitrifikasyon payetine yüklenmesinin şematik ve gerçek görüntüsü	53
Şekil 3.12.	Embriyonun vitrifikasyonu	54
Şekil 3.13.	Embriyonun yavaş dondurma işlemi şematik gösterimi	54
Şekil 3.14.	Embriyonun yavaş dondurma payetine yüklenmesinin şematik ve gerçek görüntüsü	55
Şekil 3.15.	Embriyoların yavaş dondurulması	56
Şekil 3.16.	Yavaş dondurma programı	56
Şekil 3.17.	Vitrifiye edilen embriyoların çözündürülmesi	57
Şekil 3.18.	Vitrifiye edilen embriyoların çözündürülmesinin şematik ve gerçek görüntüsü	58
Şekil 3.19.	Yavaş dondurulan embriyoların çözündürülmesinin şematik ve gerçek görüntüsü	59
Şekil 4.1.	Kültürün 3. gününde embriyoların klivaj oranları	62
Şekil 4.2.	Kültürün 3. günü embriyoların klivaj görüntüleri	63
Şekil 4.3.	Kültürün 6. gününde gruplarındaki embriyo gelişim oranları	64
Şekil 4.4.	Fertilizasyonun 7. günü embriyolara ait görüntüler	65
Şekil 4.5.	Embriyoların gelişim aşamaları	67
Şekil 4.6.	Yavaş dondurma sonrası çözündürülen embriyolarda görülen zona pellusida kırıkları	68
Şekil 4.7.	Embriyoların vitrifikasyonu sırasında alınan görüntüler	69
Şekil 4.8.	Vitrifiye edilen embriyoların çözündürülme aşamasında alınan görüntüler	70

TABLÖLAR

Tablo 1.1.	Embriyo kriyoprezervasyonun tarihi gelişimi	3
Tablo 2.1.	Embriyo gelişim aşamalarına göre tahmini yaşlar	13
Tablo 2.2.	Oositlerin ve embriyoların dondurularak saklanması için yaygın olarak kullanılan kriyoprotektanlar	22
Tablo 2.3.	Kriyoprotektanların avantajları ve dezavantajları	25
Tablo 2.4.	Yavaş dondurma, vitrifikasyon ve ultra hızlı vitrifikasyon yöntemlerinin karşılaştırılması	35
Tablo 4.1.	Elde edilen toplam oosit, ovaryum başına düşen kaliteli oosit sayıları	61
Tablo 4.2.	Oosit maturasyon bilgileri	61
Tablo 4.3.	Kültürün 3. gününde embriyolarda bölünme oranlarının karşılaştırılması	63
Tablo 4.4.	İn vitro kültürün 6. gününe ait bulgular	65
Tablo 4.5.	Direkt kültüre edilen embriyoların gelişim durumları	66
Tablo 4.6.	Yavaş dondurulan embriyoların çözündürüldükten sonra gelişim oranlarının karşılaştırılması	68
Tablo 4.7.	Vitrifiye embriyoların çözündürüldükten sonra gelişim oranlarının karşılaştırılması	69
Tablo 4.8.	Tüm gruplarda bulunan embriyoların gelişim oranlarının karşılaştırılması	70

SİMGELER ve KISALTMALAR

BSA	Bovine serum albümin
CL	Korpus luteum
CR	Soğutma Hızı
CR1	Charles Rosencrans
CR1aa	Amino asit destekli Charles Rosencrans
DMA	Dimetilasetamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DT	Direkt transfer
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EG	Etilen glikol
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
G1	Gardner 1
G2	Gardner 2
GSH	Glutasyon
GSX	Stabil bir GSH izotopu
IETS	Uluslararası Embriyo Transfer Derneği
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IVD	İn vivo üretilen
IVF	İn vitro fertilizasyon
IVK	İn vitro kültür
IVP	İn vitro üretim
ITS	İnsülin-transferrin-selenyum
mSOF	Modifiye Sentetik oviduct sıvısı
OPU	Ovum Pick-up
PG	Propilen glikol
PN	Pronukleus
PVP	Polivinilpirolidon
QAM	Quinn's Advantage Medium
ROT	Reaktif oksijen türleri
SOF	Sentetik oviduct sıvısı
SOFaa	Amino asit ilaveli sentetik ovidukt sıvısı
TG	Trigliserit
Tg	Cam geçiş sıcaklığı
TLM	Time-lapse monitoring
UFO	Unfertil oosit
VÇ1	Vitrifikasyon çözdüme 1
VÇ2	Vitrifikasyon çözdüme 2
VS1	Vitrifikasyon solüsyonu 1
VS2	Vitrifikasyon solüsyonu 2
WR	Isınma Hızı
YDÇ1	Yavaş dondurma çözdüme 1
YDÇ2	Yavaş dondurma çözdüme 2
YDS1	Yavaş dondurma solüsyonu 1
YDS2	Yavaş dondurma solüsyonu 2

ÖZET

İn Vitro Üretilen Sığır Embriyolarının Kültür Medyumuna L-Karnitin Eklenmesinin Embriyo Dondurulması Üzerine Etkisi

Sığır embriyolarının in vitro üretimi (IVP) dünya genelinde giderek artmaktadır. Ancak IVP embriyoların özellikle yavaş dondurmaya karşı oldukça hassas olduğu bilinmektedir. Bunun nedenleri arasında; anormal oositlerden oluşan embriyolar, yüksek sitoplazma lipit içeriği, farklı lipit damlacık düzeni, reaktif oksijen türleri (ROT) seviyelerinin yüksek olması ve iç hücre kütesinin az olması gibi nedenler bulunmaktadır. L-karnitin ROT ve lipit miktarını düşürerek, hücreleri DNA hasarından koruyan antioksidan olduğu bildirilmektedir. L-karnitin hücresel lipit içeriğini düşürücü ve antioksidan etkisi ile, IVP embriyolarında kriyotolerans ve gelişimsel yeteneğini iyileştirebileceği düşünülmektedir. Bu tezin amacı; kültür medyumuna L-karnitin eklenmesinin kültür sırasında ve kriyoprezervasyon sonrasında embriyoların hayatta kalma ve gelişim oranları üzerine etkisi araştırmaktır. Çalışma materyalini, mezbahada kesilen hayvanlardan toplanan 508 ovaryum oluşturdu. Toplanan A ve B kaliteli oositlerden IVP embriyolar üretildi. Kültürün 3. günü klivaj oranları ve 6. günü embriyo gelişimleri değerlendirildi. Erken blastosist ve blastosist aşamasına ulaşan embriyolardan 6 farklı grup oluşturuldu. L-karnitin içeren gruplarda 0-75 mM L-karnitin içermekteydi. Kontrol ve IVK-LK grubunda bulunan embriyolara herhangi bir işlem yapılmadan kültür işlemine devam edildi. Grup YD ve Grup LK-YD’de bulunan embriyolar yavaş dondurma, Grup VİT ve Grup LK-VİT’de bulunan embriyolara vitrifikasyon yapıldı. Dondurulan embriyolar en az bir gün sıvı azot içerisinde bekletilip çözündürüldü. Embriyolar çözündürüldükten sonra 3 gün boyunca gelişimleri gözlemlendi. Kültürün 3. gün ve 6. gün değerlendirilmesinde kültür medyumuna L-karnitin eklenmesinin klivaj ve embriyo gelişimi üzerine etkisi bulunmadı ($p>0,05$). Kontrol ve Grup LK-IVK incelendiğinde, kültür medyumuna L-karnitin eklenmesinin 24. saat ve 72. saat sonunda expanded blastosist ve hatching blastosist oranları üzerine etkisinin olmadığı tespit edildi ($p>0,05$). Ancak 48. saat incelemesinde Grup LK’nın hatching oranlarının Grup Kontrol’e göre daha düşük olduğu belirlendi ($p<0,05$). L-karnitin, yavaş dondurulan ve vitrifiye edilen embriyolarda çözdürme sonrasında 24, 48 ve 72 saat sonrasında expanded blastosist ve hatching blastosist oranları üzerine etkisinin olmadığı görüldü ($p>0,05$). Sonuç olarak; IVP embriyoların kültür medyumuna L-karnitin eklenmesi kültürün 3 ve 6. gününde klivaj ve embriyo gelişim oranlarına, vitrifikasyon ve yavaş dondurulan embriyolarda hayatta kalma ve gelişim oranları üzerine etkisinin olmadığı tespit edildi. İlerleyen araştırmalarda materyal sayısını arttırarak çalışmanın tekrarlanması önerilmektedir. Çalışmalarda ticari medyum kullanılacaksa kullanılan medyumun antioksidan içeriğinin ve yoğunluğunun bilinmesi gerekir. Embriyolarda L-karnitin etkinliğinin değerlendirilmesinde lipit içeriklerinin ve ROT seviyelerinin ölçülmesi önerilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Embriyo, Lipit, Vitrifikasyon, Yavaş Dondurma.

ABSTRACT

Effect of addition of L-carnitine to the culture media on cryopreservation of bovine embryos produced in vitro

The in vitro production (IVP) of bovine embryos is increasing worldwide. However, it is known that IVP embryos are very particularly sensitive to slow freezing. Among the reasons for this; There are reasons such as embryos formed from abnormal oocytes, high cytoplasm lipid content, different lipid droplet arrangement, high reactive oxygen species (ROS) levels and low inner cell mass. It is reported that L-carnitine is an antioxidant by reducing the amount of ROS and lipids and protecting cells from DNA damage. L-carnitine is thought to improve cryotolerance and developmental ability in IVP embryos, with its cellular lipid content lowering and antioxidant effect. The aim of this thesis was to investigate the effect of adding L-carnitine to a culture medium on the survival and development rates of embryos during culture and after cryopreservation. The study material consisted of 508 ovaries collected from slaughtered animals. IVP embryos were produced from the collected A and B quality oocytes. The cleavage rates on the 3rd day of culture and the embryo development on the 6th day were evaluated. Six different groups were formed from embryos reaching the early blastocyst and blastocyst stage. L-carnitine-containing groups contained 0.75 mM L-carnitine. The culture process was continued without any treatment on the embryos in the control and LK-IVK groups. Embryos in Group YD and Group LK-YD were slow frozen, and embryos in Group VIT and Group LK-VIT were vitrified. Frozen embryos were kept in liquid nitrogen for at least one day and thawed. After the embryos were thawed, their development was observed for 3 days. In the evaluation of the culture on the 3rd and 6th days, the addition of L-carnitine to the culture medium did not effect cleavage and embryo development ($p>0.05$). When the control and Group LK-IVK were examined, it was determined that the addition of L-carnitine to the culture medium did effect the expanded blastocyst and hatching blastocyst rates at the end of the 24th and 72nd hours ($p>0.05$). However, at the 48th hour examination, the hatching rates of Group LK were found to be lower than those of Group Control ($p<0.05$). L-carnitine did not effect expanded blastocyst and hatching blastocyst rates at 24, 48 and 72 hours after thawing in slowly frozen and vitrified embryos ($p>0.05$). As a result; It was determined that the addition of L-carnitine to the culture medium of IVP embryos did not affect the cleavage and embryo development rates at the 3rd and 6th days of culture, and the survival and development rates of vitrification and slow-frozen embryos. It is recommended to repeat the study with more numbers in future studies. If commercial medium is to be used in studies, the antioxidant content and density of the medium used must be known. It is recommended to measure lipid contents and ROS levels in evaluating the efficacy of L-carnitine in embryos.

Keywords: Antioxidant, Embryo, Lipid, Vitrification, Slow Freezing.

1. GİRİŞ

Canlı hücrelerin biyolojik ve kimyasal reaksiyonları düşük sıcaklıklarda önemli ölçüde azalmaktadır. Ultra düşük sıcaklıklarda ise biyokimyasal ve metabolik aktiviteler neredeyse tamamen durmaktadır. Bu durum hücre veya dokuların uzun süre soğukta saklanabileceğini göstermektedir (Jang ve ark., 2017). Hücreler saklama sürecinde fiziksel yapılarını ve canlılıklarını korumakta ve sonrasında normal fizyolojik fonksiyonlarına geri dönebilmektedir. Kriyoprezervasyon olarak bilinen bu teknik ile canlı hücreler ultra düşük sıcaklıklarda (-196°C) genetik ve fizyolojik olarak stabilize halde korunabilir (Dhali ve ark., 2018). Temel araştırmalarda olduğu kadar birçok tıbbi uygulamada da kullanım potansiyeline sahip olan kök hücreler ve canlı dokular bulunmaktadır. Bu doku ve hücreler basit soğutma veya dondurma sırasında meydana gelen, buz kristali oluşumu, ozmotik şok ve hücresel hasar nedeniyle uzun süre saklanamamaktadır. Dondurulup çözödürölen hücrelerde ölümler meydana gelebilmektedir. Hücre ve dokuların başarılı kriyoprezervasyonu son yıllarda kriyoprotektan maddeler ve sıcaklık kontrol ekipmanlarının kullanılmasıyla giderek artmaktadır. Bu durum hücrelerin veya dokuların başarılı bir şekilde dondurularak saklanması ve kriyoprezervasyon tekniğinin daha yaygın hale gelmesine neden olmuştur (Jang ve ark., 2017).

Oositlerin ve embriyoların kriyoprezervasyonu yardımcı üreme teknolojilerinin ayrılmaz bir parçasını oluşturmaktadır. Kriyoprezervasyon in vitro embriyo üretim (IVP), embriyo transfer teknolojileri ve genetik ıslahda daha hızlı ilerlemelere imkân sağlamaktadır. Memeli embriyoları ilk kez 1972 yılında başarılı bir şekilde dondurulmuştur. Materyal olarak fare embriyoları kullanılmış ve -196°C’de saklanmıştır. Çözödürölen embriyoların %50-70’inin hayatta kaldığı bildirilmektedir (Whittingham ve ark., 1972). Sonraki yıllarda ise çiftlik hayvanları da dâhil olmak üzere birçok memeli türlerinde oosit ve embriyo dondurulmuştur. Gamet kriyobiyolojisi alanı son yıllarda oldukça gelişmiştir. Genetik olarak üstün hayvanlardan elde edilen oositlerin ve embriyoların kriyoprezervasyonu, planlı üreme programlarının geliştirilmesi için umut verici olmaktadır. Kriyoprezervasyon nesli tükenmekte olan hayvanlar ve üstün genetik özelliklere sahip hayvanlarının biyolojik çeşitliliğini korumak için oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca IVP, embriyo transferi,

kök hücre üretimi ve genetik mühendisliği gibi yardımcı üremenin birçok alanında kullanılması için oositlerin ve embriyoların dondurularak saklanması sağlamaktadır (Dhali ve ark., 2018).

Kriyoprezervasyon, hücrenin metabolik faaliyet hızını yavaşlatarak uzun süre saklanmasını sağlamaktadır. Ancak, dondurulan hücrelerde hasarlar meydana getirebilmektedir (Mandawala ve ark., 2016). Temel olarak, oosit ve embriyoların dondurularak saklanması için yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır (Dhali ve ark., 2018). Yavaş dondurulan embriyolarda çözündürme süresinin uzaması zona pellusida da hasarlar meydana getirebilmektedir (Liebermann ve Tucker, 2002). Vitrifikasyon ile ilgili olarak; kristalleşme, devitrifikasyon ve camı çözeltinin kırılması gibi sorunları bulunmaktadır. Ayrıca kriyoprotektan madde yoğunluğu oldukça fazladır. Kriyoprotektan maddelerin embriyotoksik etkisine bağlı olarak yoğunluğun fazla olması hasarlara neden olabilmektedir (Arav, 2014). Son yıllarda yapılan çalışmalarda IVP embriyolarının, kriyoprezervasyona karşı oldukça hassas oldukları gösterilmektedir. Ayrıca IVP ve in vivo üretilen (IVD) embriyoların moleküler düzeyde olduğu kadar morfolojik ve metabolik düzeyde de farklılık gösterdiği bildirilmektedir. Ticari sığır yetiştirme programlarında sığır embriyolarının IVP'sinin artan önemi, kriyoprezervasyonun iyileştirilmesini gerektirmektedir (Leese ve ark., 2008; Rizos ve ark., 2002).

1.1. Embriyo Kriyoprezervasyon Tarihçesi

Kriyoprezervasyona yönelik ilk girişimler 1930 yıllarında Luyet'in yaptığı çalışmalara dayanmaktadır. Ferdows ve ark. 1958 yılında, tavşan zigotlarını dondurarak saklamaya çalışmışlardır. Ancak istenilen başarıya ulaşamadıkları bildirilmektedir (Ali, 1992). Whittingham (1971) polivinilpirolidon (PVP) içinde dondurulup çözödrölen fare embriyolarının hayatta kalmasını başarmıştır. Ancak başarı oranı oldukça düşöktür (Whittingham, 1971). Whittingham daha sonra arkadaşlarıyla yaptığı çalışmalarda kriyoprezervasyon tekniğini geliştirerek asıl başarılı dondurma işlemi gerçekleştirmiştir. Fare embriyoları büyüklöğündeki hücrelerde, hücre içi buz oluşumunu önlemek için soğuma hızının 1 °C'den daha hızlı olmaması gerektiğini bulmuşlardır. Daha sonra fare embriyolarının

kriyoprezervasyonu ile yaptığı çalışmada benzer sonuçlar elde etmiştir (Whittingham ve ark., 1972). Whittingham ve Whitten (1974), sıvı nitrojen içinde transatlantik taşımadan sonra donmuş fare embriyolarının hayatta kaldığını bildirmektedir. Yapılan çalışmalarda embriyoların tek adımda kriyoprotektanlara maruz kaldığında yüksek embriyonik ölümlere neden olduğu tespit edilmiştir. Böylece embriyo kaybını önlemek için kademeli olarak kriyoprotektan kullanımını geliştirilmiştir (Willadsen ve ark., 1976).

Embriyo kriyoprezervasyonu üzerine yapılan ilk çalışmalar genellikle fare embriyoları üzerindedir. Sonraki çalışmalarda, sığırlar (Wilmot ve Rawson, 1973), tavşanlar (Bank ve Maurer, 1974), sıçanlar (Whittingham, 1975), koyunlar (Willadsen ve ark., 1974), keçiler (Bilton ve Moore, 1977), kısıraklar (Yamamoto ve ark., 1982), babunlar (Pope ve ark., 1984), marmoset maymunları (Summers ve ark., 1987), kediler (Dresser ve ark., 1988) ve insanlarda (Zeilmaker ve ark., 1984) başarılı embriyo kriyoprezervasyonu gerçekleştirilmiştir. Embriyo kriyoprezervasyonuna ait yapılan çalışmalar Tablo 1.1’ de verilmektedir.

Tablo 1.1. Embriyo kriyoprezervasyonun tarihi gelişimi (Leibo and Songsasen, 2002).

Yıl	Tür	Araştırmacı
1972	Fare	Whittingham ve ark.
1973	İnek	Wilmot ve Rowson
1974	Tavşan	Bank ve Maurer
1974	Koyun	Willadsen ve ark.
1975	Sıçan	Whittingham
1977	Keçi	Bilton ve Moore
1982	At	Yamamoto ve ark.
1984	Babun	Pope ve ark.
1984	İnsan	Zeilmaker ve ark.
1985	Hamster	Ridha ve Dukelow
1987	Marmoset Maymunları	Summers ve ark.
1988	Kedi	Dresser ve ark.
1989	Domuz	Hayashi ve ark.
1989	Rhesus Maymunu	Wolf ve ark.

Dünya çapında 1980'lerin ortalarına gelindiğinde laboratuvar ortamlarında çok sayıda türe ait embriyoların yavaş kontrollü dondurma tekniği ile başarı şekilde dondurulduğu belgelenmiştir. Ancak yavaş dondurma tekniğinin maliyetli ve laboratuvar çalışanları için zaman isteyen bir teknik olması gibi dezavantajları olduğu bildirilmektedir. Yavaş dondurma işlemi ortalama 3-4 saat sürmektedir. Dolayısıyla yapılan çalışmalarla hızlı ve ultra hızlı dondurma teknikleri geliştirilmiştir. Gliserol ve sakkaroz veya propilen glikol (PG) ve sakkaroz kullanılarak çok sayıda türe ait embriyolarla hızlı ve ultra hızlı dondurma çalışmaları denenmiştir. Dondurulan embriyoların çözündürüldükten sonra hayatta kalma oranlarının yüksek olması umut verici sonuçlar gösterse de, o yıllarda evrensel olarak kabul görmemekteydi (Chupin ve De Reviers, 1986; Szell ve Shelton, 1987). Mazur ve ark. (1974) sığır kan hücrelerinin kısmi dehidrasyonu için sakkarozu kullanmışlardır. Sonraki çalışmalarda sakkaroz embriyo dondurulmasında kullanılmaya başlanmıştır (Kasai ve ark., 1980). Sonraki yıllarda hızlı dondurma tekniğiyle, dondurulan fare embriyolarının hayatta kalma oranları %95'lere kadar yükseltilmiştir (Szell ve Shelton, 1987). Benzer şekilde fare embriyo kriyoprezervasyonunda kriyoprotektan olarak dimetil sülfoksit (DMSO) ve sakkaroz kullanıldığında çözülme sonrası hayatta kalma oranlarının %92 civarında olduğu bildirilmektedir (Shaw ve Trounson, 1989). Ali ve Shelton (1993) DMSO'nun ultra hızlı dondurma prosedürleri için gliserolden daha etkili olduğunu bildirmektedir. Ancak ultra hızlı dondurmanın vitrifikasyon tekniğinin yeniden ortaya çıkmasıyla gölgelendiği bildirilmektedirler. Ultra hızlı dondurma çalışmaları 1990'ların ilk çeyreğinden sonra vitrifikasyon tekniğine yönlendiği görülmektedir. Vitrifikasyonda hem hücre içi hem de hücre dışı buz oluşumu önlenebileceğinden daha iyi hayatta kalma oranları beklenmiştir (Mazur, 1984).

Vitrifiye edilen fare embriyolarından, 1980 yılında canlı yavru doğumlarıyla vitrifikasyon tekniğine büyük ilgi oluşmuştur (Rall ve Fahy 1985; Rall ve ark., 1987). Yardımcı üreme teknikleri için sığır embriyolarında etilen glikol (EG), DMSO ve sakkaroz kullanılmasıyla vitrifikasyon tekniğinde önemli gelişmeler olmuştur (Ishimori ve ark., 1993). Böylelikle ultra hızlı dondurma tekniklerinden olan vitrifikasyona ilgi artmıştır. Vitrifikasyon tekniği, yavaş dondurma yöntemine alternatif olarak geliştirilmiştir. Vitrifikasyon kullanılan konsantre çözelti

soğutulduğunda, "cam" adı verilen çok viskoz katı hale gelmesi ilginç bir durum olarak nitelendirilmektedir. Bu viskoz özellikteki katı madde, sıvı moleküler yapısına ve katı mekanik özelliklerine sahiptir (Kasai ve ark., 1990). İlk başarılı vitrifikasyon işleminin 1985'te fare embriyolarının -196°C'de buz oluşmadan kriyoprezervasyonu ile gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Rall ve Fahy, 1985). Daha sonra bu teknik üzerinde, farklı türdeki oosit ve embriyoların dondurarak saklaması için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Böylelikle vitrifikasyon kanıtlanmış bir kriyoprezervasyon yöntemi olarak kabul edilmiştir (Jang ve ark., 2017). Günümüzde IVP embriyolar için en popüler dondurma yöntemi hâlâ vitrifikasyondur (Vajta, 2000). Embriyolarının kültür ortamlarının geliştirilmesiyle birlikte, dondurulmuş embriyoların transfer sayısında artış olduğu gözlenmiştir (Ferré ve ark., 2020).

1.2. Embriyo Dondurmanın Avantajları

Embriyo transfer teknolojisi suni tohumlama uygulamalarından sonra hayvan ıslahının ilerlemesinde oldukça önemli yere sahiptir. İlk çalışmalarda taze embriyo transferi uygulanmaktaydı. Dondurma tekniğinin geliştirilmesiyle embriyonun taze transfer edilme sorunu ortadan kalktı ve embriyo üretimi ticari bir hâl aldı. Taze transferin önemli sorunları arasında taşıyıcı hayvanın önceden senkronize edilmesi yer almaktaydı. Ayrıca bir embriyo transferi için en az iki taşıyıcı hayvanın senkronize edilerek, transfer için hazır hâle getirilmesi gerekmektedir. Bu yüzden fazla sayıda taşıyıcı hayvanın senkronizasyonu ekonomik maliyetin artışına neden olmaktaydı (Sağırkaya ve Bağış, 2003).

Embriyo kriyoprezervasyonun geliştirilmesiyle birlikte fazla sayıda taşıyıcı hayvanın senkronize edilmesi ortadan kalmaktadır. Böylelikle ekonomik maliyet oranları da oldukça düşmektedir. Ayrıca genetik özellikleri yüksek hayvanlardan elde edilen embriyoların dondurulmasıyla birlikte embriyolar farklı bölgelere taşınabilmekte ve bu durum ticari bir hâli ortaya çıkartmaktadır. Dondurulmuş spermanın kullanılması ile sadece babadan gelen genetik özellikler taşınırken, embriyo transferi ile anne ve babanın her ikisinin genetik özellikleri nesillere aktarılabilmektedir. Embriyo dondurulmasıyla birlikte embriyo bankaları kurulmuştur. Böylelikle üstün genetik özellikler, nesilden nesile aktarılabilmekte, soyu

tükenmekte olan hayvanların soyları devam ettirilebilmekte, gen mühendisliği ve biyomedikal çalışmalarda büyük gelişmelere imkân sağlanabilmektedir (Sağırkaya ve Bağış, 2003).



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Embriyo Kültür Sistemleri

İn vitro fertilizasyon (IVF) sonrasında embriyoların uygun ısı, gaz, nem koşulları ve belirli medyumlar içerisinde inkübe edilerek gelişimleri devam etmektedir. Bu inkübasyon işlemine embriyo kültürü denilmektedir (Feugang ve ark., 2009; Gordon, 2003). İn vitro basamaklardan biri olan in vitro kültür (IVK) aşamasında, başarı birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Bu faktörler; kültür sistemleri (ko-kültür, sıralı kültür sistemleri vb.), kullanılan medyumları, kültür koşulları (sıcaklık, gaz konsantrasyonu ve ortam ısısı), kültür süresi ve kullanılan katkı maddelerden (hormonlar, serum, antioksidanlar vb.) oluşmaktadır. Ayrıca kültür ortamı maksimum seviyede tutulsa bile, laboratuvar ortamları sonuçları olumsuz etkileyebilmektedir (Şen, 2014).

Ovidukt epitel hücreleri ile yapılan IVK işlemlerinde başarılı sonuçlar alınmıştır. Koyunlarda uygulanan oviduktal tek tabakalı kültür sistemleri IVF’de embriyo kültür aşaması için önemli bir dönüm noktası olmuştur. Bu yöntem ile embriyoların expanded blastosist aşamasına kadar gelebildiği bildirilmektedir (Gandolfi ve ark., 1986). Sonraki yapılan çalışmalar ile somatik hücrelerin de embriyonik gelişim için uygun ortam barındırdığı tespit edilmiştir (Gordon, 2003).

Fertilizasyon aşaması tamamlanan embriyoların kültüre edilmesi ile embriyoların ihtiyaç duydukları besin maddeleri karşılanmakta ve gelişimleri sağlanmaktadır. Kültür işlemi genellikle ko-kültür ve içeriği tanımlanmış kültür solüsyonları ile yapılmaktadır. Ko-kültür yöntemi herhangi bir hücre kültürüne gereksinim duyulmadan uygulanabilmektedir. Kültür medyumları olarak içeriği bilinen medyumlar ve ticari olarak sunulan hazır medyumlar (Quinn’s Advantage Medium (QAM), Gardner 1 (G1) ve Gardner 2 (G2)) kullanılmaktadır (Bucak ve ark., 2010; Cooke ve ark., 2002; Çevik ve ark., 2014). Kültür aşamasında modifiye sentetik oviduct sıvısı (mSOF) kullanılarak elde edilen blastosistlerin taşıyıcı hayvanlara transfer edilmesiyle %6,7 oranında gebelik gözlenirken, G1-G2 sıralı medyumlarda %27,9 oranında gebelik gözlemlendiği bildirilmektedir (Wang ve ark. 2011). Kültür

medyumları içerisinde temel olarak aminoasit, mineral ve glikoz bulunmasına rağmen, medyumlarda basit farklılıklar olabilmektedir. Ticari amaçlı üretilen tüm medyumların temel amacı mevcut uterus ortamını taklit etmek, embriyonik gelişim ve beslenmeyi desteklemektir (Gordon, 2013; Şen, 2014). IVK aşamasında en çok tercih edilen medyumlar düşük oksijen konsantrasyonları (%5) ile yüksek oranda blastosist verimi sağlayan sentetik oviduct sıvısı (SOF), doku kültür medyumları (TCM-199) ve CR1aa medyumlarıdır (Feugang, 2009; Suthar ve Shah, 2009).

2.1.1. Ko-kültür

Ko-kültür yönteminde embriyolar ovidukt epitel hücreleri, granuloza ve fibroblast gibi hücreler ile birlikte kültüre edilmektedirler. Ayrıca ovidukt epiteli, granuloza ve fibroblast gibi hücreler kültür medyumundan alındıktan sonra kalan medyum ile de kültür işlemine devam edilebilmektedir. Ko-kültür yönteminin temel amacı kültüre edilen hücreler tarafından salgılanan büyüme faktörleri ile embriyoların gelişim ve büyümesinin sürdürülmesidir (Czlonkowska ve ark., 1991, Kuran, 1999; Kelly ve ark., 2007). Ayrıca, somatik hücrelerden yapılmış ko-kültürlerin, embriyo gelişimine zarar verecek bileşenlerin etkisini azaltan ve embriyonik gelişimi destekleyen yapıları oluşturduğu bildirilmektedir (El Mouatassim ve ark., 2000; Gordon, 2013; Nematollahi–Mahani ve ark., 2009). Ancak ko-kültürle kültür edilen embriyolarda transfer sonrasında oldukça fazla gebelik komplikasyonları görülmektedir. Örnek olarak, fetal kayıp oranlarının artması, fazla sayıda abortların görülmesi gösterilebilir. Ayrıca doğan yavruların normalden daha büyük olması gibi anomalilere neden olduğu için, günümüzde kullanımı pek tercih edilmemektedir (Carolan ve ark., 1999; Kuran ve ark., 1999; Şen, 2014).

2.1.2. İçeriği tanımlanmış medyumlarda IVK

Sığır embriyolarının IVK aşamasında çeşitli ticari ve tanınmış kültür medyumları kullanılmaktadır. Bu medyumlar SOF ve amino asit ilaveli sentetik ovidukt sıvısı (SOFaa), Chatot–Ziomek–Bavister (CZB), Charles Rosencrans (CR1 ve amino asit destekli Charles Rosencrans (CR1aa), KSOM, ardışık ticari veya tanımlanmış G1.1/G2.2, QAM, TCM 199, Hams-F10, Tyrods, CR1 ve KSOM gibi

kültür medyumlarıdır. Medyumlar arasında bazı basit farklılıklar bulunmaktadır. Ancak temel olarak tüm medyumlar bovine serum albumin (BSA), fetal calf serum (FCS), aminoasitler, büyüme faktörleri, antioksidanlar vb. maddeleri içermektedir. Embriyonik gelişim, medyumların yanı sıra laboratuvar ortamından da etkilenmektedir. Dolayısıyla in vitro embriyonik gelişim birçok faktöre bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir (Bavister ve ark., 1992; Bucak ve ark., 2010; Camargo ve ark., 2006).

Antioksidan bir madde olan kuersetin farklı konsantrasyonlarda IVK medyumlarında kullanılarak blastosist üzerine etkileri araştırılmıştır. Düşük konsantrasyon (1 ve 5 μ M) uygulanan kuersetinli medyumlarda kültür edilen embriyolarda blastosist oranlarının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonlarının (20 ve 50 μ M) ise blastosist gelişimini olumsuz etkilediği bildirilmektedir (Maturana ve ark., 2019).

Karanfil (*Syzygium aromaticum*) yağı IVK medyumlarında kullanılabilen bir başka antioksidandır. Santos ve ark. (2019) karanfilin (20 μ g/mL) IVP sırasında meydana gelen oksidatif stresi azalttığını, embriyonik gelişimi olumlu etkilediğini belirtmişlerdir (Santos ve ark., 2019). Karanfil esansiyel yağı, lipid peroksidasyonunu inhibe etme, protein hasarını azaltma, DNA fragmentasyonunu önleme ve murin makrofajlarında serbest radikal oluşumunu azalttığı saptanmıştır (Mahapatra ve ark., 2009).

Bir diğer antioksidan madde ise L-karnitin (β -hidroksi-gama-trimetil amino bütirik asit)'dir. Kültür ortamına eklenmesi, embriyo lipid içeriğini azaltmakta ve gelişimsel yeterliliği artırmaktadır. Buna bağlı olarak bu maddenin in vitro embriyolarda gelişim ve hatching oranlarını artırdığı bildirilmektedir (Ghanem ve ark., 2011; Hwang ve Hochi, 2014).

Reaktif oksijen türlerinin (ROT) embriyo gelişimi üzerine olumlu etkilerine rağmen, fazla olması veya antioksidan miktarının düşük olması; DNA hasarı, metabolik değişiklikler, mitokondriyal stres ve hücre ölümü gibi olumsuzluklara yol açabilmektedir (Van Hoeck ve ark., 2015). Kültür sırasındaki krosetin takviyesi ile

embriyolar oksidatif strese karşı korunabilmektedir. Dos Santos ve ark. (2018), IVP embriyoların kültür aşamasında, kültür medyumlarına krosetin takviyesini incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda kültür medyumuna krosetin eklenmesi ile embriyolar üzerindeki oksidatif stresin kalktığı, embriyoların stres ortamına adaptasyon sağladığı, blastosist aşamasına ulaşan embriyo sayı ve kalitelerinin arttığı bildirilmektedir (Dos Santos ve ark., 2018).

Glutasyon (GSH) ROT'u temizleyerek kültür sistemini optimize etmektedir. Ancak eksojen GSH'nin hücre içi GSH'yi nasıl etkilediği ve embriyo gelişim hızını nasıl artırdığı bilinmemektedir. Kültür medyumlarına 7 gün boyunca GSH veya GSX (stabil bir GSH izotopu) eklenerek embriyo üzerine etkileri araştırılmıştır. GSH'ye benzer şekilde, GSX de in vitro gelişim hızını ve embriyo kalitesini artırdığı tespit edilmiştir (Li ve ark., 2019).

İneklerde fertilizasyon sonrası embriyonun gelişimi ve enerji ihtiyacı uterus tarafından salgılanan esansiyel ve esansiyel olmayan aminoasitler tarafından karşılanmaktadır. Sığır embriyolarının kültüründe en yaygın olarak, SOFaa kullanılmaktadır. Serum içermeyen bu medyumlara amino asit ilavesinin embriyonik gelişim üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır. Kullanılan amino asitlerin antioksidan gibi davranıp kültür medyumunun pH ve ozmotik basıncını kontrol altına aldığı düşünülmektedir. Böylece amino asitler embriyonik gelişimi olumlu etkilemektedir. Tüm bu etkilerin yanı sıra amino asitler embriyo kültür aşamasında hücre bölünmesini artırmakta ve embriyo üzerindeki çevresel stresi ortadan kaldırmaktadır (Şen, 2014). Ayrıca kültür medyumlarına epidermal büyüme faktörü (EGF) ve IGF'lerin eklenmesi ile embriyonik gelişim iyileştirilebilmektedir (Ravelich ve ark., 2004).

Kültür medyumlarında, genellikle BSA gibi protein kaynakları bulunmaktadır. Mevcut bu proteinler ise embriyo gelişimde toksik maddelerin etkilerini ortadan kaldırmaktadır. Flood ve Shirley, (1991) düşük kaliteli saf suyla hazırlanan kültür medyumunu BSA içeren ve BSA içermeyen kültür medyumunu olarak kıyaslamışlardır. Araştırmacılar kültür medyumlarının BSA ile desteklenmesinin embriyonik gelişim oranlarını artırdığını bildirmektedirler (Flood ve Shirley, 1991).

İçeriği bilinen kültür medyumları ile klasik tekli kültür işlemi yapılabilmektedir. Bu yöntem ile inkübasyona alınan embriyoların medyumları değiştirilmeden kültür işlemine devam edilmektedir. Tekli kültür yöntem medyumları hormon, mineral tuzlar, enerji, antibiyotik gibi maddeler konulan (SOFaa, KSOM, CR1aa) medyumlardır. Ayrıca ticari olarak bulunan (QAM) medyumda kullanılmaktadır (Cooke ve ark., 2002; Feugang ve ark., 2009; Suthar ve Shah, 2009). Ticari bulunan IVF bioscience BO-IVC kültür medyumuna da ortam değişikliği gerektirmeyen sıralı olmayan, tek adımlı sistem olarak bilinmektedir (Pryor ve ark., 2022).

Bir başka embriyo kültürü yöntemi ise, sıralı (ikili) kültür yöntemidir. Bu yöntemde kullanılan medyumların 72. saat sonrasında değiştirilmesi önerilmektedir. Böylece medyum içerisinde birikmiş olan toksik metabolitler uzaklaştırılmaktadır. Embriyolar erken dönemde piruvat kullanırken, gelişimin ilerlediği komplaktlaşma aşamasında ise glikoz kullanılmaktadırlar. Kullanılan glikoz ile gelişim aşamasında embriyonun ihtiyaç duyduğu enerji karşılanmaktadır. Erken embriyonik gelişim döneminde amino asit kullanımının sınırlı olması gerektiği bilinmektedir. İkili embriyo kültür sisteminde amonyak birikiminin önüne geçilmektedir. Ayrıca dev yavru oluşumunu da engellemektedir. İkili kültür sisteminde G1/G2, KSOM/SOF, SOF1/ SOF2 ve SOF-A/SOF-B gibi medyumlar kullanılmaktadır (Cooke ve ark., 2002; Gordon, 2003; Suthar ve Shah, 2009).

Mikro akışkan kültür sistemi ile dereceli olarak kültür medyumuna değiştirilmektedir. Böylece embriyo üzerindeki stres faktörleri ortadan kaldırılmaktadır. Bu yöntemde embriyo hareket ettirilmeden kontrollü bir şekilde ortama sıvı akışı yapılmaktadır. Normal kültür işleminde embriyo kültür medyumunun miktarı 50 µl iken mikro akışkan yöntemi ile bu miktar 0,125 µl'ye inmektedir (Beebe ve ark., 2002).

Bir başka embriyo kültür sistemi ise mikrokültür yöntemidir. Bu yöntem az miktarda ve yüksek konsantrasyonda kültür medyumundan oluşmaktadır. Embriyo, embriyotrofik büyüme faktörlerini korumak için kendine bir mikro çevre oluşturmaktadır. Fakat dış ortamda bulunan yüksek hacimli sıvı ile içeriye küçük

hacimli moleküllerin geçişi engellenememektedir. Bu sistemde IVK işleminin gerçekleştirildiği petri kabının tabanına uygun bir cihaz ve ısı yardımıyla kuyucuklar açılmaktadır. Böylece embriyolar için ayrı bir mikro sistem oluşturulmaktadır (Vajta ve ark., 2008).

Başka bir IVK sistem ise perfüzyon sistemidir. Bu yöntem ile devamlı sıvı akışı uygulanmaktadır. Bu yöntemde diğer yöntemlerin aksine inkübasyon süresinde kültür medyumlarını çevreleyen mineral yağlar kullanılmamaktadır. Bu yöntemde kültür medyumlarının gaz ile teması oldukça azdır. Perfüzyon sisteminin bazı mineral maddelerin ortamdan rahatlıkla uzaklaştırılabilmesi ve ölçülebilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bu metot insan hekimliğinde kullanılırken maliyet ve özel malzeme gereksiniminden dolayı sığırlardaki kullanımı sınırlı kalmıştır (Feugang ve ark., 2009).

2.2. Embriyo Gelişimini Etkileyen Faktörler

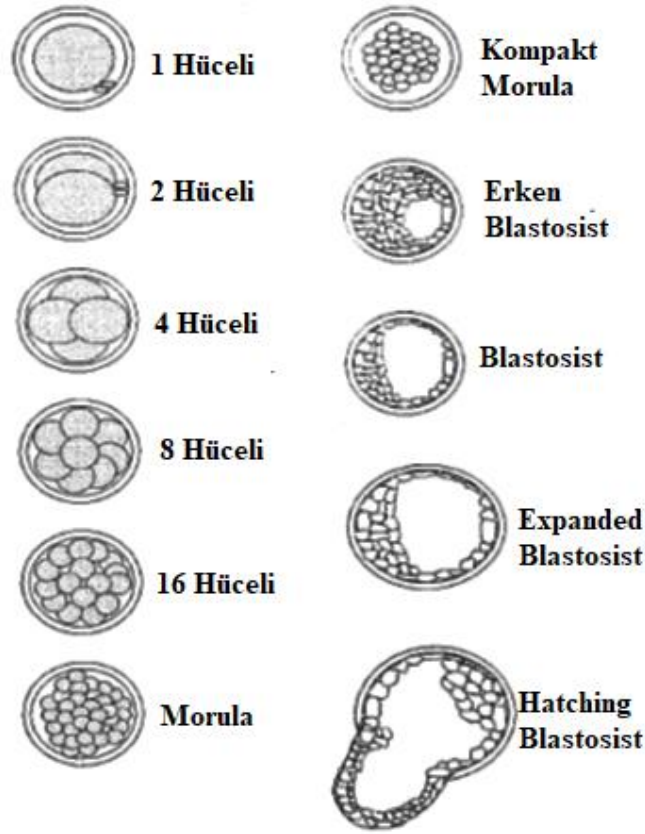
Embriyo üretimi çeşitli faktörler tarafından etkilenmektedir. Bu faktörler temel olarak; toplanan sığır oositlerinin büyüklüğü, kullanılacak olan spermanın motilitesi (Parrish ve ark., 1995), oositlerin toplandığı ineklerin laktasyon sayısı, (Snijders ve ark., 2000), oositlerin toplandığı ovaryum fazı (De Wit ve ark., 2000), vücut kondüsyon skoru (Snijders ve ark., 2000), ısı stresi (Báez ve ark., 2019), oositlerin toplandığı mevsim (Al-Katanani ve ark., 2002), büyüme faktörlerin varlığı (Purohit ve ark., 2005), oositlerin toplandığı ovaryumlarda korpus luteum (CL) varlığı (Boediono ve ark., 1995), oositlerin toplandığı ineklerde plazma progesteron konsantrasyonları sayılabilmektedir (Saad ve ark., 2019).

İn vitro olarak embriyo üretmek; oositlerin elde edilmesi, maturasyon, sperm kapasitasyonu, fertilizasyon ve embriyo kültürü gibi birçok aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar dışında çeşitli faktörlerden de etkilenmektedir. Donör yaşı, spermatozoon hasarı ve oosit çapı gibi maternal ve paternal faktörler, tekli veya sıralı kültür sistemleri, büyüme faktörü, hormon, protein kaynakları, pH, su kalitesi ve osmolarite, medyum içerikleri, süre, ışık, ısı, atmosfer gibi inkübasyon koşulları embriyo kültürünü etkileyen faktörlerdir (Elder ve Dale., 2003; Gordon, 2003; Hafez ve Hafez, 2000; Leibfried- Rutledge, 1999).

Genellikle IVP’de embriyoların morula aşamasını geçmiş olması istenilmektedir. Kültür işleminin ortalama 6-7. günlerinde embriyolar, erken blastosist, blastosist veya expanded blastosist aşamasına ulaşmaktadır (Tablo 2.1 ve Şekil 2.1). Bu aşamaya ulaşmış embriyoların transferi ile gebelik başarı oranları artmaktadır (Gordon, 2003; Menezo, 2004).

Tablo 2.1. Embriyo gelişim aşamalarına göre tahmini yaşlar (Seidel ve Seidel, 2019).

Gelişim Aşamaları	Tahmini Yaş (gün)
1-hücreli	0-2
2-hücreli	1-3
4-hücreli	2-3
8-hücreli	3-5
16-hücreli	4-5
Erken Morula	5-6
Kompakt Morula	5-7
Erken Blastosist	7-8
Blastosist	7-9
Expanded Blastosist	8-10
Hatching Blastosist	9-11



Şekil 2.1. Embriyoların gelişim aşamaları (Gordon, 2003)

Kültürün gerçekleştirileceği inkübatörde IVF sonrası sığır embriyolarının IVK işlemi 38,5-39 °C'lik ısılar arasında yapılmalıdır. Ortam ısısının 40 °C ve üzerine çıkması ise IVF işleminde önemli derecede hasarlara yol açtığı bildirilmektedir (Greve ve ark., 1993; Goto ve ark., 1989). İnkübatör CO₂ ve O₂ seviyesinin %5, N₂ seviyesinin ise % 90 civarında olması gerekmektedir. İnkübatör CO₂ seviyesinin daha yüksek ve düşük olması bölünmeyi ve embriyo gelişimini olumsuz etkilediği saptanmıştır (Pinyopummintr ve Bavister, 1994; Shioya, 1993). Özellikle O₂ konsantrasyonun % 20 ve üzerinde olması embriyo gelişimini olumsuz etkilemektedir. Ayrıca memeli embriyolarının kültür medyumlarının osmolaritesinin 290-300 mOsm civarında ve pH'sının 7,2-7,6 aralığında olması istenilmektedir (Abdoon, 2022; Gordon, 2003).

Embriyo kültür medyumlarını daha etkili hale getirmek için içerisine erken embriyonik gelişimde önemli yeri olan çeşitli maddeler kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak; aminoasitler, glutatyon, büyüme faktörleri, süperoksit taurin, sisteamin dismutaz, betamerkaptoetanol ve melatonin gibi antioksidanlar, desferrioksamin veya

etilendiamintetraasetik asit (EDTA) gibi şelatörler, koenzim Q10 ve vitaminler, insülin-transferrin-selenyum (İTS) ve hiyalüronan, sodyum sitrat ve miyoinositol, leptin gibi diğer moleküller sayılabilir (Abdoon, 2022; An ve ark., 2019; Gordon, 2003; Rizos ve ark., 2008). Ayrıca güneş ışığı veya yapay ışığa maruz kalınması, embriyo üretimi için olumsuz sonuçlar doğurmaktadır. Dolayısıyla yapılan işlemlerin mümkün olduğunca karanlık ortamlarda gerçekleştirilmesi istenilmektedir (Abdoon, 2022; Gordon, 2003).

Embriyo kültürlerinde embriyo gelişimi için bazı antioksidanlar; sistein, IGF, EGF ve lösemi inhibitör faktörleri etkili olarak kullanılmaktadır (Koçyiğit, 2014, Yang ve ark., 2019). Yapılan çalışmalarda insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1), epidermal büyüme faktörü ve sistein kombinasyonlarının IVM ve IVK ortamlarına eklenmesi ile Yak (Bos Grunniens) ırkı ineklerde oosit maturasyonu, bölünme ve blastosist oranları üzerine olumlu etkilerin sağlandığı bildirilmektedir (Yang ve ark., 2019).

Time-lapse monitoring (TLM) teknolojisi ile embriyolar sürekli ve noninvazif olarak değerlendirilebilmektedir. Bu görüntüleme yöntemine hızlı sinematografi denilmektedir. Bu teknoloji ile embriyoların erken bölünme aşamasında anormal gelişme gibi spesifik dismorfizmlerin prevalansı ortaya konulabilmektedir. Sığır embriyolarında anormal bölünmenin prevalansı ve sonuçları hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Magata ve ark. (2019), IVF ile üretilen embriyoları kültüre edildikleri kaplar içinde in vitro gelişme kinetiği 20 dakika aralıklarla 10'ar dakika boyunca TLM ile gözlemlemişlerdir. Embriyoların yaklaşık olarak %36'sında anormal bölünmeler tespit edilmiştir. Morfokinetik değerlendirmelerde ters bölünme (RC; tam ayrılmadan sonra yeniden birleşen iki yavru blastomer veya bölündükten sonra yeniden birleşen blastomerlerin tamamlanmamış ayrılması olarak tanımlandı), doğrudan bölünme (DC; bir blastomerin beklenen aksine iki yerine üçe bölünmesi) ve düzensiz membrana sahip embriyoların, normal bölünme gösteren embriyolara göre daha yavaş bölündüğünü tespit edilmiştir. Ayrıca, RC ve DC kromozomal anöploid artışına neden olmaktadır. Sonuç olarak embriyoların sinematografi yöntemi ile değerlendirilmesi ile yaşama yeteneği yüksek kaliteli embriyolar belirlenebildiği tespit edilmiştir (Magata ve ark., 2019).

2.3. Embriyoların Morfolojik Değerlendirilmesi

Dünya genelinde IVP embriyoları sayıları, 1990'lı yıllardan beri katlanarak artmaktadır. Yapılan araştırmalara göre 2014 yılında, 500.000 IVP embriyo üretilmiştir. Üretilen bu embriyoların ise dünya genelinde üretilen embriyoların %50'si kadar olduğu düşünülmektedir (Blondin, 2017). IVP teknolojisinin gelişiminde önemli ilerlemelere rağmen, yapılan transferler sonucunda gebelik oranları %19,8 ile % 55,9 civarında değişim gösterdiği bildirilmektedir (Sousa ve ark., 2017). Embriyoların transferi sonrası başarı oranlarını artırmak için, temel teknolojik konulara, embriyo üretim aşamaları ve embriyoların doğru değerlendirmelerine dikkat edilmelidir. Genel olarak, sığır embriyo kalitesinin değerlendirilmesi, Uluslararası Embriyo Transfer Derneği (IETS) sınıflandırmasına göre yapılmaktadır. Sınıflandırma tohumlamadan 7 ile 8 gün sonra morfolojik derecelendirme yoluyla yapılmaktadır. Transfer edilebilir olarak kabul edilen embriyoların gebelik başarı oranı sadece % 30–50 civarında olduğu bildirilmektedir (Bó ve Mapletoft, 2013; Ferraz ve ark., 2016; Sugimura ve ark., 2017).

İnsan yardımcı üreme teknolojilerinde ışık mikroskobu ile hızlandırılmış sinematografi kullanılarak embriyoların kalitesinin değerlendirilmesi son zamanlarda oldukça popüler bir hâl almıştır. Pronukleus (PN) veya nukleus sayısı, yarılanma sayısı, blastomer sayısı gibi morfokinetik parametrelerin görüntülenmesi insanlarda yapay üreme teknolojilerinin başarısını artırmaktadır (Gardner ve ark., 2015; Petersen ve ark., 2016). İneklerde sinematografi kullanılarak embriyoların morfokinetik parametrelerin görüntülenmesinin embriyo canlılığının ve kalitesinin değerlendirilmesinde yararlı olduğu bildirilmektedir. Bu yöntemin IETS morfolojik derecelendirmesinden daha yararlı bir değerlendirme yöntemi olabileceği düşünülmektedir (Sugimura ve ark., 2012). Ancak IVF sırasında sığır embriyolarının lipit bakımından zengin koyu bir sitoplazmaya sahip olması nedeniyle PN / nukleer gözlem sınırlanmaktadır. Dolayısıyla sinematografi ile elde edilen biyolojik bilgiler sınırlı kalmaktadır (Yao ve ark., 2018).

Embriyoların morfolojik olarak değerlendirilmesi için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler ile embriyolar transfer öncesinde

değerlendirilebilmektedir. Böylece kaliteli embriyolar kullanılarak gebelik oranları artırılabilir. Embriyoların transfer öncesi değerlendirilmesi ile gebelik oranları artırılabilir gibi, embriyoların bireysel olarak gelişimine devam edip edemeyeceği hakkında yorumlar da yapılabilmektedir (Sturmey ve ark., 2009). Günümüzde embriyo değerlendirilmesinde morfolojik ve hücrel değerlendirmeler kullanılmaktadır. Embriyoların morfolojik değerlendirilmesinde temel olarak şu özellikler aranmaktadır. Embriyo kompakt ve küre şeklinde olmalıdır. Blastomerler benzer büyüklük ve renkte olmalıdır. Perivitellin boşluk açık olmalı ve kalıntı içermemelidir. Stoplazma kabarcıklı veya taneli olmamalıdır. Zona pellusidada yırtık, çöküntü ve yüzeyinde herhangi bir göçük bulunmamalıdır (Bó ve Mapletoft, 2013). Embriyoların çapı 150-190 µm arasında olmalıdır. Sığır embriyolarının değerlendirilmesinde en yaygın olarak, embriyoların gerekli gelişme aşamalarına ulaşmış olup olmadığı kontrol edilerek yapılmaktadır (Lindner ve Wright, 1983; Gardner ve Schoolcraft, 1999; Gordon, 2003).

Embriyoların enzim aktivitesi, glikoz, amino asit tüketim ve üretimi gibi metabolik özelliklerinin embriyo kalitesi ve transfer sonrası gelişimine devam etmesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Fakat bu metabolik özelliklerin belirlenebilmesi için çeşitli biyokimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin pahalı, laboratuvar ortamına gereksinimi ve zaman alması gibi dezavantajlarının yanı sıra embriyoların morfolojik değerlendirilmesi kadar pratik bir yöntem olmadığı bildirilmektedir. Dolayısıyla embriyoların morfolojik olarak değerlendirilmesi ekonomik ve zaman anlamında avantaj sağladığı için yaygın olarak kullanılmaktadır (Donnay ve ark., 1999; Şen, 2014).

Embriyoların kalitesinin değerlendirilmesinde embriyoların renk, şekil, sağlıklı hücre sayısı, dejenere hücre sayısı ve hacmi, kompakt yapı, perivitellin boşluk ve genişliğine bakılması gerektiği belirtilmiştir (Lindner ve Wright, 1983; Wright ve Ellington, 1995). Embriyoların değerlendirilmesinde çeşitli tanımlamalar kullanılmaktadır. Bazı çalışmalarda iyi ve zayıf embriyo olarak sınıflandırma yapılırken, bazı çalışmalarda da çok iyi, iyi ve daha az iyi embriyolar diyerek sınıflandırma kullanılmaktadır. Embriyoların iyi, orta ve zayıf olarak sınıflandırılması basit ve güvenilir sistemler olarak kullanılmaktadır. Sığır embriyolarının kalite

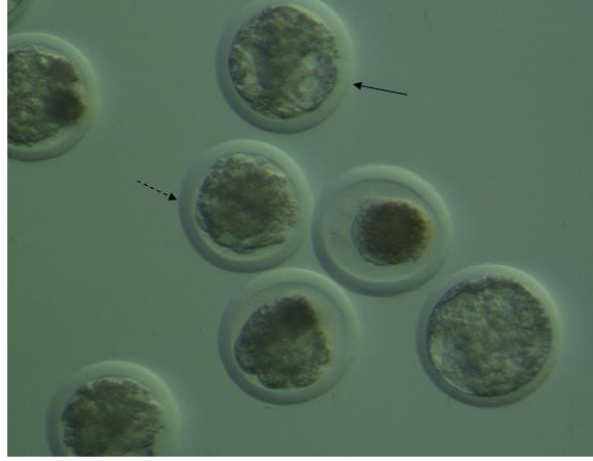
değerlendirilmesi en yaygın olarak gelişim aşamalarına ulaşmasına bakılarak yapılmaktadır (Gordon, 2003; Şen, 2014).

2.3.1. Embriyoların kalite sınıflandırması

Embriyonun kalitesi morfolojik bütünlüğe göre genellikle sayısal olarak yapılmaktadır (Bó ve Mapletoft, 2013). Uzman kişiler tarafından birince derecede kaliteli embriyonun belirlenmesi kolaylıkla yapılabilmektedir. Ancak embriyoların ikinci veya üçüncü kalitede olması durumunda ayırt edilmesi zor olabilmektedir. Ayrıca IVP embriyoların daha değişken morfolojiye sahip olması nedeniyle derecelendirilmesini daha zor olduğu belirtilmektedir (Wright ve Ellington, 1995). Embriyoların yaşam süreleri oda ısısında (ortalama 20 °C) yaklaşık olarak 8 saattir. Elde edilen embriyoların transferi veya dondurma işlemi yapılacak ise bu sürenin 3-4 saat içerisinde yapılması istenilmektedir (Bó ve Mapletoft, 2013; Smith, 2009). Elde edilen embriyoların kalite değerlendirilmesi; eğitim, deneyim ve uygun ekipman ile başarılı şekilde yapılabilmektedir (Seidel ve Seidel, 2019).

Günümüzde embriyo kalitesinin değerlendirmesinde en yaygın olarak IETS'nin yapmış olduğu sınıflandırma sistemi kullanılmaktadır (Stringfellow ve Givens, 2013). Bu sınıflandırmaya göre embriyolar grade 1, grade 2 grade 3 ve grade 4 olmak üzere 4 sınıfa ayrılmaktadır (Bó ve Mapletoft, 2013).

Grade 1: Bu sınıfta bulunan blastosistler kalite bakımından en iyi sınıfı temsil etmektedirler (Şekil 2.2). Hücre kitlesi, renk, boyut ve yoğunluk bakımından homojen bir dağılım gösteren embriyolar, küre şeklinde simetrik bir yapıya sahiptir. Ayrıca beklenen gelişim evresine paralel olarak gelişmektedir. Hücreler arası düzen oldukça yüksek, hücre materyallerinin ise %85 kadarı bütünlük içerisinde ve canlı hücrelerden oluşmaktadır. Bu yüzde oran perivitellin boşlukta bulunup, zona pellusida dışına çıkacak embriyonik hücreleri temsil etmektedir. Embriyoların zona pellusida kısmı pürüzsüzdür. Dolayısıyla petri kapına veya pipete yapışmasına neden olan iç bükü ve yassı yüzeyleri yoktur. Bu sınıfta yer alan embriyolar dondurma çözündürme işlemine dayanıklı yapıya sahiptir (Bó ve Mapletoft, 2013; Kara, 2018; Şen, 2014).



Şekil 2.2. Grade 1 görüntü; kompakt morula siyah ok: çok iyi erken blastosist, çizgili ok: kompakt morula (Kara, 2018).

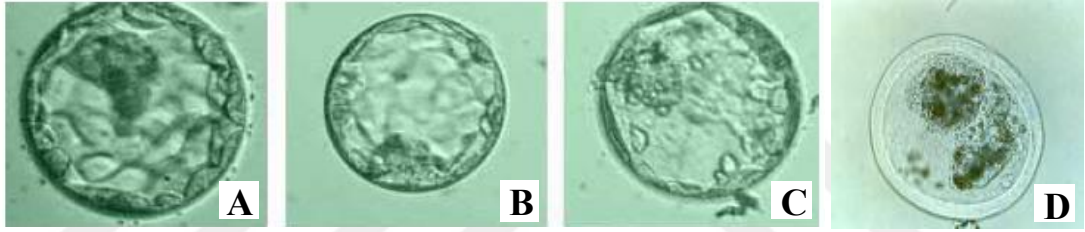
Grade 2: Bu sınıfta bulunan blastosistler kalite bakımından kabul edilebilir seviyede olan ve iyi kaliteli olarak sınıflandırılan blastosistlerdir (Şekil 2.3). Hücre kitlesinde, renk, boyut ve yoğunluk bakımından orta derecede düzensizlik bulunmaktadır. Hücre materyallerinin %50 kadarı bütünlük içerisinde ve canlı hücrelerden oluşmaktadır. Taze transferde için kullanılabilir embriyolardır. Ancak dondurma çözündürme işlemi için grade 1 sınıfına göre daha düşük dayanıklılık seviyesine sahiptirler. Dolayısıyla genellikle taze transfer için kullanılması önerilmektedir. Dondurma için uygun olmadığı, ancak dondurmak gerekiyorsa dondurulabileceği bildirilmektedir (Bó ve Mapletoft, 2013; Kara, 2018).



Şekil 2.3. Grade 2 görüntü (İyi): Kompakt morula (Kara, 2018).

Grade 3: Zayıf blastosistler olarak adlandırılırlar. Bu sınıftaki embriyolarda hücre kitlesi, renk, boyut ve yoğunluk bakımından büyük derecede düzensizlik bulunmaktadır (Şekil 2.4). Hücre materyallerinin %25 kadarı bütünlük içerisinde ve canlı hücrelerden oluşmaktadır. Bu sınıfta bulunan embriyolar dondurma çözündürme işlemine dayanamazlar. Taze transfer için kullanılabilir. Bu sınıfta bulunan embriyolar ile yapılan transfer sonrasında gebelik oranı oldukça düşüktür (Bó ve Mapletoft, 2013; Kara, 2018).

Grade 4: Bu sınıfta ölü veya dejenere olmuş blastosistler yer almaktadır. Çok sayıda bozulmuş, değişik şekillerde ve dejenere olmuş hücre kitlesi bulunmaktadır. Hücreler genellikle canlı değildir. Kullanım için uygun olmayan atılması gereken blastosistlerdir (Bó ve Mapletoft, 2013; Kara, 2018).



Şekil 2.4. IETS kriterlerine göre sınıflandırılan blastosistler; A: grade I, B: Grade II, C: Grade III, D: Grade IV (Bó ve Mapletoft, 2013).

Embriyoların başarılı bir şekilde değerlendirilmesi embriyo transferi uygulamalarının en kritik aşamalarından biridir. IETS, embriyoların görsel olarak değerlendirilmesinin, biyolojik bir sistemin subjektif değerlendirmesi olduğunu belirtmektedir. Dolayısıyla embriyo transferi sonrası gebelik oranlarındaki başarı; taşıyıcı hayvanın kalitesi, uygulayan yapan pratisyenin deneyimi, yetenek ve başarısı, çevre gibi faktörlere bağlı olarak değişebilmektedir. Embriyo transferlerinde ise genellikle grade 1 embriyoların kullanılması tavsiye edilmektedir (Bó ve Mapletoft, 2013; Kara, 2018).

2.4. Embriyoların Kriyoprezervasyonunda Kullanılan Maddeler

2.4.1. Kriyoprotektanlar

Kriyoprezervasyon, sıfırın altındaki sıcaklıkları kullanarak canlı hücreleri ve dokuları uzun süre koruma yöntemidir (Karlsson ve Toner, 1996). Yavaş dondurma ve vitrifikasyon olmak üzere iki farklı kriyoprezervasyon tekniği kullanılmaktadır (Yong ve ark., 2016). Yavaş dondurma, programlanabilir bir cihaz kullanılarak içerisinde sıvı bulunan canlı hücre veya dokuları düşük soğutma hızlarıyla (örneğin, 1 °C/dk) dondurma tekniğidir (Hubel ve ark., 2014). Vitrifikasyon, içerisinde sıvı bulunan canlı hücre veya dokuları, yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanlar sayesinde, ani ısı düşüşü sağlanarak hücre etrafında hızla cam bir katı yüzey oluşması sağlanmaktadır (Rall ve Fahy, 1985).

Genel olarak vitrifikasyon, soğutma sırasında buz oluşumunu önlemek için viskoz ve yüksek konsantrasyonlu (6-8M) kriyoprotektanlar kullanılarak yapılmaktadır (Karlsson ve Toner, 1996). Kriyoprotektanlar genellikle hücre içi (permeabl) ve hücre dışı (non permeabl) olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Hücre içine giren EG, DMSO, PG ve gliserol gibi kriyoprotektanlar, plazma zarına nüfuz edebilmektedir. Bu kriyoprotektanlar hücre içi ve hücre dışı buz oluşumunu önlemek için su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturabilen küçük moleküllerdir (Karlsson, 2002; Shaw ve Jones, 2003). Memeli dokularının vitrifikasyonu için en az bir tane hücre içine geçebilen kriyoprotektan kullanılmalıdır. Hücre içine geçebilen kriyoprotektanın yüksek konsantrasyonu aşırı derecede sitotoksiktir. Vitrifikasyonda genellikle her bir kriyoprotektanın konsantrasyonunu düşürmek için iki veya daha fazla hücre içine girebilen kriyoprotektan kullanılmaktadır. Böylelikle kriyoprotektanın sitotoksik etkisi azaltılabilmektedir (Ali ve Shelton, 1993; Fahy ve ark., 1984; Wusteman ve ark., 2004).

Embriyolar için en yaygın olarak EG ve DMSO veya kombinasyonları kullanılmaktadır. Düşük toksisitesi nedeniyle hücre içine girebilen kriyoprotektan olarak ilk sırada EG tercih edilmektedir. Hücre içi kriyoprotektanlar toksisitesi azdan

çoğa olarak; EG, metanol, gliserol, DMSO, PG, bütillen glikol olarak sıralanmaktadır (Ali ve Shelton, 1993).

Hücre içine geçemeyen kriyoprotektanlar, plazma membranına nüfuz etmeyen ve soğutma sırasında cam oluşumunu uyaran hücre dışı büyük moleküllerdir (Hunt, 2017). Soğutma öncesi buz kristallerinin oluşumunu azaltmakta ve hücre membranını korumaktadır. Hücre içine geçemeyen kriyoprotektanlar arasında şekerler (glukoz, sakaroz ve trehaloz) ve yüksek moleküler ağırlıklı polimerler (polivinil piroolidon ve Ficoll) bulunmaktadır (Amorim ve ark., 2011). Yapılan bazı çalışmalarda hücre içine geçen kriyoprotektanlar ile geçemeyen kriyoprotektanların birlikte kullanılmasının vitrifiye embriyolarda, çözündürme sonrasında hayatta kalma oranlarını iyileştirdiği bildirilmektedir (De Castro ve ark., 2010; Yacoub ve ark., 2013). Trehaloz, sükroz, glikoz, galaktoz ve fruktoz gibi hücre dışı kriyoprotektanların toksik etkilerinin neredeyse olmadığı bildirilmektedir (Kasai, 1996). Trehalozun sükroza göre daha az zararlı etkiye sahip olduğu belirtilmektedir (Arav ve ark., 1993). Oositlerin ve embriyoların dondurularak saklanması çeşitli kriyoprotektanlar kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan kriyoprotektanlar Tablo 2.2’de gösterilmektedir (Dhali ve ark., 2018).

Tablo 2.2. Oositlerin ve embriyoların dondurularak saklanması için yaygın olarak kullanılan kriyoprotektanlar (Dhali ve ark., 2018).

İntrasellüler Kriyoprotektanlar	Ekstrasellüler Kriyoprotektanlar	
Dimetilsülfoksit	Makromoleküller	Sakaroz
Gliserol	Dekstran	Glikoz
Etilen Glikol	Ficoll 70	Sükroz
Propilen Glikol	Polivinilprolidon	Trehaloz
2,3 Bütanediol	Bovin serum albumin	Galaktoz
Dimetilasetamid	Mannitol	Raffinoz
Asetamid		

2.4.1.1. Hücre içine geçebilen kriyoprotektanlar

2.4.1.1.1. Dimetil sülfoksit

Dimetil sülfoksit, $(CH_3)_2SO$ formülüne sahip bir organokükürt bileşimidir. Renksiz ve sıvı halde olup, polar ve polar olmayan bileşikler için çözücü özelliğe sahiptir. Düşük maliyetli ve küçük sitotoksik etkiye sahiptir. Dolayısıyla kriyoprezervasyonda oldukça sık tercih edilmektedir. Ayrıca kriyoprezervasyon sırasında biyolojik bir hücrenin içindeki ve çevresindeki soğutulmuş içeriklerdeki elektrolitik konsantrasyonunu azaltmaktadır. Donma noktası $-18,5^{\circ}C$ 'dir. Oda sıcaklığının altında DMSO'nun katıya dönüşmesi onu kriyoprotektan için ideal hale getirmektedir (Bhattacharya, 2018). Camsı yapı oluşturma, geçirgenlik özelliği ve düşük sitotoksik etkisinden dolayı vitrifikasyonda sıklıkla kullanılmaktadır (Elbarbary, 2004).

2.4.1.1.2. Etilen glikol

Etilen glikol, $(CH_2OH)_2$ formülüne sahip bir diol türüdür. Suyla karıştırıldığında hidrojen bağına sahiptir. Saflaştırılmış EG yaklaşık $-12^{\circ}C$ 'de donma noktasına sahiptir. Ancak %40 su ve %60 EG ile karıştırıldıktan sonra karışımın donma noktası düşmekte ve karışım kristalli maddeler oluşturamaz hale gelmektedir. Böylece solüsyonun donma noktası $-45^{\circ}C$ 'ye düşmektedir. EG'nin bu özelliği onu kriyoprezervasyon için başarılı kılmaktadır (Bhattacharya, 2018). Dondurma çözme sırasında gamet hücrelerinde meydana getirdiği zarar gliserole eşit orandadır (Aydiner, 2008).

2.4.1.1.3. Gliserol

Gliserin veya gliserol sıvı halde bulunan polar organik bir trihidroksi alkoldür. Yüksek oranda hidrofilik özellik gösteren poliol bileşimidir. Hafifçe tatlı, zehirli olmayan bir sıvıdır. Gliserol iyi kozmotropik özelliklere sahiptir. Su molekülleri ile hidrojen bağları oluşturmaktadır. Dolayısıyla sıcaklık $-37,8^{\circ}C$ gibi çok düşük olmadıkça (%70 gliserol ve %30 su) buz kristallerinin oluşturulması zorlaşmaktadır. Diğer kriyoprotektanlar ile karşılaştırıldığında gliserol, yüksek konsantrasyonda daha

az toksik etkiye sahiptir (Bhattacharya, 2018). Toksik etkisi hücre membran biyoenerjisindeki değişiklikler ve ozmotik strese bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Alvarenga ve ark., 2000).

2.4.1.1.4. Propilen glikol

Propilen glikol, UPAC adı: propan-1,2-dioldür. Kimyasal formülü $C_3H_8O_2$ şeklindedir. Renksiz ve kokusuz özellikleri ile oldukça tatlı bir tada sahiptir. İki alkol grubu içeren, diol olarak sınıflandırılmaktadır. Su, kloroform ve aseton ile karışabilmektedir (Bhattacharya, 2018). Vitrifikasyonda kullanılmaktadır. Fakat toksik özelliği oldukça yüksektir (Şaylan, 2011). Oldukça toksik özelliğe sahip PG'nin, %10 konsantrasyonu dahi toksik etki gösterebilmektedir. Dolayısıyla kriyoprezervasyon işleminde çok düşük konsantrasyonlarda kullanılması önerilmektedir (Fahy ve ark., 1984).

2.4.1.1.5. Bütilen glikol

Vitrifikasyonda kullanılan bir kriyoprotektandır. Toksik etkisi oldukça yüksek olduğu için embriyo kriyoprezervasyonunda pek tercih edilmemektedir. Genellikle 1 mol/l oranlarını aşmayacak şekilde kullanılmaktadır (Şaylan, 2011).

2.4.1.1.6. Metanol

Oldukça düşük toksik etkiye sahiptir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda bile vitrifiye etmediği için vitrifikasyonda pek tercih edilmemektedir (Şaylan, 2011). Kriyoprotektanlara ait avantaj ve dezavantajlar Tablo 2.4'de verilmektedir.

Tablo 2.3. Kriyoprotektanların avantajları ve dezavantajları (Kumar, 2014).

Kriyoprotektan	Avantajlar	Dezavantajlar
DMSO	-Kolayca hücre içine nüfuz edebilmektedir. -Buz oluşumunu azaltarak, donma işlemi sırasında hücre ölümünü önlemektedir - Yüksek kaynama noktasına 189°C sahiptir. -Normal atmosferik basınçta yavaş yavaş buharlaşmaktadır. -Anti-inflamatuar göreviyle hücresel hasarı önlemektedir.	-Hücre için yüksek konsantrasyonu ölümcüldür. -Düşük sıcaklıkta, asit klorürlere maruz kaldığında patlayıcı reaksiyon üretir. -Medyumdaki serumu denatüre etmektedir.
EG	-Yüksek kaynama noktası ve suya olan affinitesi nedeniyle faydalı kurutucudur. -Sıcaklığı düşürmek için kullanılmaktadır. -Hücre içine nüfuz edebilen KP'lardır. -İç buz kristal oluşumunu önlemektedir.	-Tek başına kullanımı hücreler için toksiktir. -Hücre içine nüfuz etme oranı oldukça yüksektir. -Hücre sel mikro organellere zarar vermektedir.
PG	-Kolayca hücre içine nüfuz edebilir. -Non-korozif (aşındırmayan). -Çok az buharlaşmaktadır. -Çok düşük toksisiteye sahiptir. -Suyun erime noktasını düşürmektedir.	-Hücreler için yüksek konsantrasyonları tehlikelidir.
Gliserol	-Medyumun tahriş olmasını önler. -Yatıştırıcı etkisi ile hücrelere yardım etmektedir. -Buz kristalleri tarafından oluşan hasarı azaltmak için suda çözünürler. -Sperm dondurması kullanılmaktadır.	-Bir kriyoprotektan olarak kullanılması için yüksek konsantrasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır.
PVP	-Suda çözünürlük sağlamaktadır. -Nispeten yüksek viskoziteye sahiptir. -Hücreler için daha az toksiktir.	-Nadiren KP olarak kullanılmaktadır. -Hücrelere zarar verir ve yüksek viskozitesi nedeniyle çözülmesi daha fazla zaman almaktadır.

2.4.1.2. Hücre içine geçemeyen kriyoprotektanlar

2.4.1.2.1. Şekerler

Memeli dokularının vitrifikasyonunda sükroz, trehaloz ve rafinoz gibi bazı şekerler kullanılabilir (Brito ve ark., 2018; Nakashima ve ark., 2010). Sükroz, glikoz ve fruktozdan oluşan bir disakkarittir. Sükroz nektarlarda, meyvelerde ve birçok bitkinin köklerinde bulunmaktadır. Trehaloz, iki glikoz parçasından oluşan bir disakkarittir. Bazı hayvanlarda, böceklerde, bitkilerde, mantarlarda ve bakterilerde

bulunmaktadır. Organizmalar tarafından donma ve dehidrasyonun üstesinden gelmek için kullanılmaktadır. Raffinoz, fruktoz, glikoz ve galaktozdan oluşan bir trisakkarittir. Raffinoz tam tahıllarda ve bazı sebzelerde bulunabilmektedir (Clemens ve ark., 2016; Crowe ve ark., 1983). Genel olarak şekerler, vitrifikasyon çözeltisinin viskozitesini artırmaktadır. Ayrıca hücre dışı çözeltiyi vitrifiye etmek için gereken cam geçiş sıcaklığını yükseltmektedirler (Amorim ve ark., 2011). Böylece hücrelerde fiziksel hasara neden olan ekstraselüler buz oluşumunu azalmaktadır. Ayrıca şekerler donma sırasında hidrojen bağı yoluyla plazma zarlarını stabilize etmekte ve hücre hasarını azaltmaktadır. Örneğin trehaloz, plazma membranlarının fosfolipitleri ile etkileşmekte ve hücre dışı buzların neden olduğu fiziksel hasardan korunmak için hücreleri çevreleyen camsı kabuklar oluşturmaktadır (Quan ve ark., 2012). Isıtma ve kriyoprotektanlardan uzaklaştırma sırasında dokuları ve hücreleri yoğun ozmotik şoktan korumaktadır (Amorim ve ark., 2011). Isınma sırasında, hücre içine giremeyen kriyoprotektan yoğunluğu hızlı şekilde düşmesi ozmotik dengesizliklere neden olmakta, hücrelerde şişmeye ve lizise neden olabilmektedir (Hunt, 2017). Hücre şişmelerinin derecesini azaltmak, hücre içerisine su giriş hızını kontrol etmek için çözündürme ortamına şeker eklenmektedir. Vitrifikasyonda hücre içerisine girebilen kriyoprotektanları desteklemek için şeker eklenmektedir. Böylelikle vitrifikasyon medyumunun tonisite ve viskozitesine katkıda bulunarak, hücre içine girebilen kriyoprotektanın sitotoksik ve ozmotik şok etkisini azaltabilmektedir (Amorim ve ark., 2011).

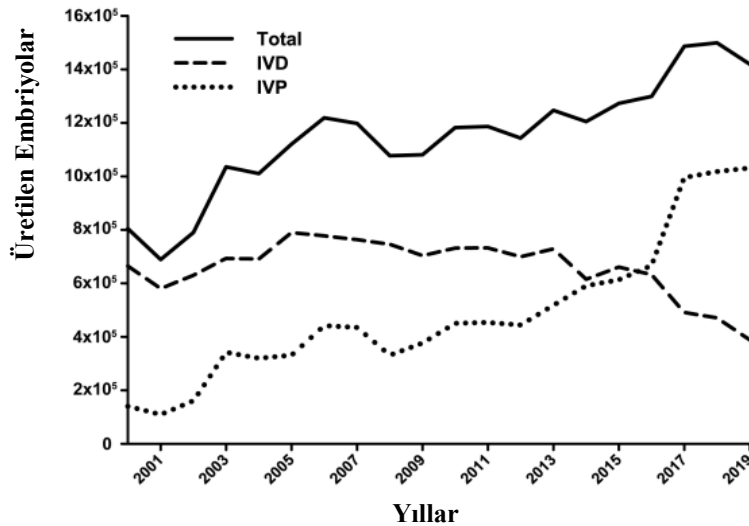
2.4.1.2.2. Yüksek moleküler ağırlıklı polimerler

Polietilen glikol, polivinil pirolidon, Ficoll, dekstran ve karboksilatlı ϵ -poli-l-lisin (COOH-PLL) gibi yüksek moleküler ağırlıklı polimerler, memeli dokularının vitrifikasyonunda kullanılmaktadır (De Castro ve ark., 2010; dos Santos Neto ve ark., 2015; Fujihara ve ark., 2019; Lunardi ve ark., 2016). Ficoll ve dekstran şeker bazlı polimerlerdir. Ficoll, sakkaroz ve epiklorohidrinin kopolimerizasyonu ile oluşturulan sentetik bir polisakkarittir (Huebinger ve ark., 2016). Dekstran, laktobasil ailesinden bazı laktik asit bakterileri tarafından sakkarozdan üretilen bir polisakkarittir (Precht ve ark., 2018). Yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin vitrifikasyonda birkaç rolü vardır. Şekerlere benzer şekilde, yüksek moleküler ağırlıklı polimerler genellikle

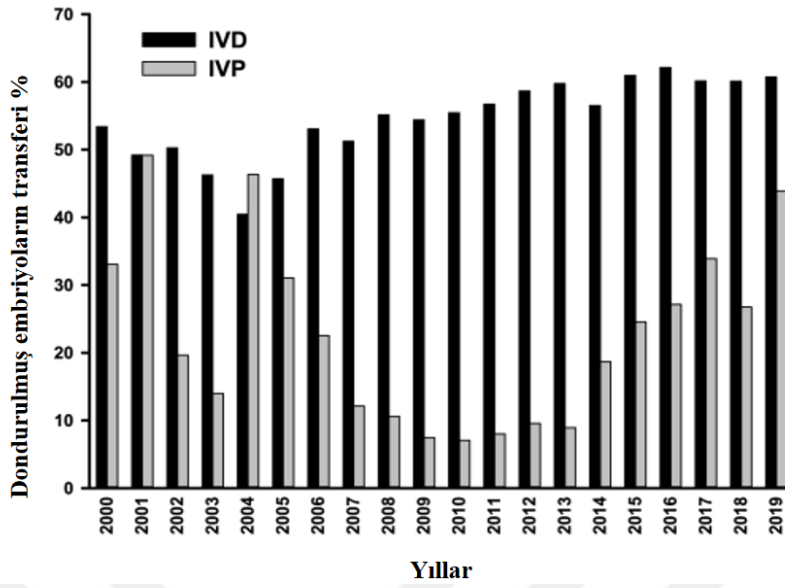
vitritfikasyon ortamının viskozitesine katkıda bulunmakta ve hücre dışı buz oluşumunu azaltmaktadır (Fuller, 2004). Yüksek moleküler ağırlıklı polimerlerin kullanılması vitritfikasyon sırasında kriyoprotektanların sitotoksik etkisini azaltmaktadır (Amorim ve ark., 2011). Bazı yüksek moleküler ağırlıklı polimerler antioksidan olarak kullanılabilir. Ayrıca buz oluşumunda kristalleşme inhibitörü olarak hareket edebilmektedir. Polietilen glikol soğutma ve ısınma sırasında oluşan serbest radikallerden koruyarak plazma membranlarına zarar veren lipid peroksidasyonunu engelleyebilmektedir (Puts ve ark., 2015).

2.5. Embriyoların Kriyoprezervasyonu

Embriyoların dondurularak saklanmasına yönelik çalışmalar 1950'li yıllara dayanmaktadır. Bu kapsamda ilk olarak tavşanlarda in vivo fertil olan pronükleer embriyolar dondurulmuştur (Smith, 1952). Bu çalışmadan yararlanılarak dondurulup çözödürölen fare morularının transferi sonrası canlı yavrular elde edilmiştir (Whittingham ve ark., 1972). Kriyoprezervasyon tekniğinin gelişmesiyle birlikte IETS verilerine göre dünya çapında yılda ortalama 1.419.334 sığıır embriyosu üretilmektedir (Şekil 2.5). Embriyo üretimine paralel olarak embriyo kriyoprezervasyonu giderek artış göstermektedir (Şekil 2.6) (Viana, 2020).



Şekil 2.5. Yıllara ait kaydedilen sığıır embriyolarının sayısı (Dhali ve ark., 2018) (IVD, IVP ve toplam embriyo sayıları).



Şekil 2.6. Yıllara göre dondurulmuş sığır embriyolarının transfer oranı (Dhali ve ark., 2018)

Kriyoprezervasyon hücrenin metabolik faaliyetlerinin hızını yavaşlatarak uzun süre saklanmasını sağlamaktadır. Ancak, dondurulan hücrelerde çeşitli hasarlar meydana getirebilmektedir (Mandawala ve ark., 2016). Temel olarak, oosit ve embriyoların dondurarak saklanması için yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasındaki en büyük fark, kullanılan kriyoprotektan madde konsantrasyonu ve dondurma işlemi sırasında embriyo veya oositin soğuma hızıdır. Geleneksel vitrifikasyon yöntemi geliştirilerek son derece yüksek soğutma hızına sahip ultra hızlı vitrifikasyon yöntemi ortaya çıkmıştır (Dhali ve ark., 2018).

2.5.1. Geleneksel yavaş dondurma

Yavaş dondurma tekniği ilk olarak oosit ve embriyoların dondurularak saklanması için tanıtıldı. Bu teknik 1970'lerin başında geliştirilerek oosit ve embriyoların dondurularak saklanmasında altın standart olarak kabul edildi (Whittingham, 1971; Whittingham ve ark., 1972; Wilmut, 1972). Örnekler, kimyasal ve ozmotik toksisiteyi en aza indirmek ve hücre hasarını etkileyen faktörler arasında bir denge sağlamak için düşük yoğunlukta kriyoprotektan (1-2M) konsantrasyonlarıyla dengelenmektedir (Pereira ve Marques, 2008). Dengeleme işlemi oda ısısında gerçekleştirilmektedir. Dengeleme işleminde sonra örnekler payetlere yüklenmekte ve 1-2°C/dk hızıyla 5 ile -7°C'ye kadar soğutulmaktadır. Daha sonra hücre dışı dondurmaya başlatmak için

seeding yapılmaktadır. Dondurma işlemi yavaş bir şekilde ($0,3-1^{\circ}\text{C}/\text{dk}$) devam etmekte -30 ile -70°C 'ye kadar soğutulmaktadır (Rienzi ve ark., 2017; Saragusty ve Arav, 2011). Donma işlemi tamamlanan örnekler sıvı azot içerisine daldırılmaktadır. Örneklerin kontrollü olarak soğutulması programlanabilir dondurma makinası ile sağlanmaktadır. Yavaş dondurma sırasında, hücre dışı ve hücre içi sıvılar arasında su moleküllerinin değişimi ters ozmotik etkiler olmaksızın gerçekleşmektedir (Vajta ve Kuwayama, 2006). Bununla birlikte, hücre dışı ve hücre içi su, yavaş soğutma sırasında çökelmekte ve buz kristalleri oluşmaktadır (Prentice ve Anzar, 2011).

Seeding işlemi genellikle -5 ile -9°C arasında yapılmakta ve kontrollü buz kristali oluşumu uyarılmaktadır. Bu işlem uygulandıktan sonra ekstraselüler ortam donmaya başlamakta ve buz kristalleri oluşmaktadır (Shaw ve ark., 2000). Buz kristallerinin boyutunun artmasıyla ekstraselüler sıvı, katı forma geçmektedir. Böylece ekstraselüler ortam yoğunluğu artmakta ve hücre içi su daha yoğun olan ekstraselüler ortama doğru geçmektedir. Bunun sonucu intraselüler solüsyon konsantrasyon olarak hücre dehidre hale gelmektedir. Hücrede meydana gelen bu değişikliklere bağlı olarak hücrenin donma noktası ortalama -35°C 'ye kadar düşmektedir. Dolayısıyla bu noktada donacak olan hücrede su miktarı yok denilecek kadar az olduğu için oluşabilecek buz kristalleri göz ardı edilebilmektedir (Rama Raju ve ark., 2006).

Yavaş dondurma yönteminin sistemik olması, yanılma ve hata payının düşük olması gibi avantajları bulunmaktadır. Kullanılan kriyoprotektan madde yoğunlukları da oldukça düşük seviyelerdedir. Bu yöntemde soğutma hızının 2°C 'den az olması hücrelerde devamlı dehidrasyonu sağlamaktadır. Dolayısıyla hücrelerin ozmotik dengelenmesi soğutma sırasında meydana gelmektedir. Tekniğinin, pahalı olması ve dondurma makinalarıyla yapılması gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Massip, 2001; Sağırkaya, 2001).

Yavaş dondurulan embriyoların payet içerisinde oda ısısında çözündürülmesi (-196°C 'den, $+37^{\circ}\text{C}$ 'ye) çözündürülme süresini artırmaktadır. Yavaş dondurma yöntemiyle dondurulan sığır blastosistlerinin çözündürülme süresinin uzaması ise embriyoların hayatta kalma oranlarının düşürmektedir. Payetin su banyosu içerisinde çözündürülmesi, çözülme süresini kısaltmaktadır. Dolayısıyla payetlerin su banyosu içerisinde

çözdürülmesi gerekmektedir. Aksi taktirde zona pellusida da hasarlar meydana gelebilmektedir (Liebermann ve Tucker, 2002).

2.5.2. Vitrifikasyon

Vitrifikasyon tekniği, yavaş dondurma yöntemine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu yöntemde, buz kristallerinin oluşumu engellenerek hücrenin ve hücre dışı ortamın cam benzeri bir duruma katılaşması gerçekleşmektedir. İlk başarılı vitrifikasyon işleminin 1985'te fare embriyolarının -196°C 'de buz oluşmadan kriyoprezervasyonu ile gerçekleştirildiği bildirilmektedir (Rall ve Fahy, 1985). Daha sonra bu teknik üzerinde farklı türdeki oositlerin ve embriyoların dondurarak saklaması için çok sayıda çalışma yapılmıştır. Böylelikle vitrifikasyon artık kanıtlanmış bir kriyoprezervasyon yöntemi olarak kabul edilmektedir. Bu teknikte hücreler, düşük viskoziteden yüksek viskoziteye kadar kriyoprotektan solüsyonlarında inkübe edilmekte, payete yüklenmekte ve doğrudan sıvı azot içerisine daldırılmaktadır. Vitrifikasyon işlemi ile embriyolar daha hızlı soğutulmada ve yüksek kriyoprotektan konsantrasyonlarına maruz kalmaktadır (Jang ve ark., 2017). Vitrifikasyon işlemi sırasında üç önemli faktör bulunmaktadır. Bunlar; kriyoprotektan solüsyonunun viskozitesi, soğutma hızı ve numune hacmidir (Arav, 2014).

Kriyoprotektan solüsyonunun viskozitesi: Embriyoların vitrifiye edilmeden önce dengelendiği ortamın viskozitesi veya düşük sıcaklıklardaki solüsyonun cam geçiş katsayısı, kriyoprotektanların ve diğer katkı maddelerinin konsantrasyonu ile belirlenmektedir. Kullanılan kriyoprotektan madde yoğunluğu ne kadar yüksek olursa, cam geçiş sıcaklığı (T_g) o kadar yüksek olmaktadır. Dolayısıyla T_g yüksekliği ise buz nükleasyonu ve kristalleşme ihtimalini düşürmektedir. Kullanılan kriyoprotektan ve katkı maddelerine bağlı olarak farklı toksisite, penetrasyon hızı ve T_g oluşmaktadır. Embriyoların dengelendiği ortam viskozitesi, kullanılan kriyoprotektan, katkı maddelerinin yoğunluğu ve etkilerine göre değişmektedir. Kullanılan kriyoprotektanların temel amacı, T_g 'yi artırmak ve toksisiteyi azaltmaktır (Arav, 2014).

Soğutma Hızı ve Isıtma Hızı: Yüksek soğutma hızı sıvı azot veya sıvı azot buharı, ısıtma hızı ise ılık su banyolarıyla sağlanabilmektedir. Örnekler sıvı azot içerisine daldırıldığında, kap, hacim, termal iletkenlik, çözelti bileşimi vb.'ne bağlı olarak dakikada 2000–2500°C soğutma hızı elde edilebilmektedir (Palasz ve Mapletoft, 1996; Yavin ve Arav, 2007). Soğutma hızı, özellikle soğutmanın ilk aşamasında, oda sıcaklığından, 0 °C'ye soğutulurken artırılır. Soğutma hızı 0,25 ml'lik pipetler, açık-uçlu pipetler veya elektron mikroskop ızgaraları gibi materyallerle sıvı azota (-196 °C) daldırıldığında 2-6 kat daha fazla artar (Arav ve Zeron, 1997). Oosit ve embriyolar için soğutma hızının artırılması hayatta kalma oranlarını %37'ye kadar iyileştirmektedir (Saragusty ve Arav, 2011).

Numune Hacmi: Vitrifikasyonda hacmin küçük olması başarıyı artırmaktadır. Hacmin küçük olması daha iyi ısı transferine izin verdiği için yüksek soğutma hızları elde edilmektedir. Yapılan çalışmalarda numune hacmini azaltmaya yönelik birçok çalışma bulunmaktadır (Arav, 2014).

Çalışmalarda genel olarak yüzey ve tüp teknikleri olmak üzere 2 teknik kullanılmaktadır. Yüzey teknikleri arasında elektron mikroskop ızgaralığı, minimum damla boyutu tekniği, kriyotop, kriyoloop, yarım-payet, katı yüzey vitrifikasyonu, naylon mesh (ağ), kriyoleaf, direct cover vitrification (doğrudan örtülü vitrifikasyon), fiber tıkaç, vitrifikasyon spatulası, kriyo-E, plastic blade (bıçak) ve Vitri-Inga teknikleri yer almaktadır. Tüp tekniklerinde taşıyıcı sistemler, plastik payet, açık uçlu modifiye payet, kapalı uçlu modifiye payet, flexipetdenuding pipette, superfine OPS, kriyotip, pipet tip, yüksek-güvenilir vitrifikasyon, mühürlenmiş modifiye payet, kriyopette, Rapid-i, ve JY payet teknikleri bulunmaktadır. Her iki tekniğinde kendine özgü avantajları bulunmaktadır. Yüzey yöntemlerinde damlanın hacmi (0,1 ml) kontrol edilebilmektedir. Bu teknikler açık olduğu için yüksek bir soğutma hızı elde edilebilmekte ve ısıtma solüsyonuna doğrudan maruz bırakılarak yüksek ısınma oranları elde edilmektedir. Tüp teknikleri ile kapalı sistemlerde yüksek soğutma hızları elde edilebilmektedir. Ayrıca daha güvenli ve kullanımı daha kolay bir teknik olması gibi avantajı da bulunmaktadır. Vitrifiye hacminin azaltılması ve soğutma hızının artırılması, toksik ve ozmotik zararlı etkilerini en aza indirmek için kriyoprotektan

konsantrasyonunda orta derecede bir azalmaya izin vermektedir (Arav, 2014; Yavin ve ark., 2009).

Başarılı vitrifikasyon elde etmek için kriyoprotektan solüsyonunun viskozitesi, soğutma hızı, numune hacmi gibi faktörler arasında hassas bir dengenin sağlanması gerekmektedir (Jang ve ark., 2017). Vitrifikasyon 5-7 M'lik bir kriyoprotektan konsantrasyonu ve yaklaşık 2500°C/dk'lık bir soğutma hızı ile gerçekleştirilmektedir (Palasz ve Mapletoft, 1996). Vitrifikasyonun, donma hasarı riskinin düşük olması ve böylece yeterince yüksek oranda hücrenin hayatta kalmasını sağlamak gibi avantajları bulunmaktadır (Dhali ve ark., 2018).

Vitrifikasyon işleminde hücreler yüksek konsantrasyonlarda kriyoprotektanlara maruz bırakılarak dehidre hale geçmektedir. Dehidre hücreler kriyoprotektan madde içerisinde süspanse edilmekte ve sıvı azot içerisine daldırılmaktadır. Hücreler cam benzeri hâl alarak vitrifiye olmaktadır. Böylece hücre içi buz oluşumu engellenmektedir. Fakat vitrifikasyonda hücreler yoğun kriyoprotektana maruz kalmakta ve hasar alma gibi dezavantajlara sahiptir. Ancak ekonomik olması ve dondurma makinasına ihtiyaç olmaması gibi avantajlara sahiptir (Kumar, 2007).

Vitrifikasyon ile ilgili olarak; kristalleşme (soğutma sırasında), devitrifikasyon (depolama sırasında veya ısıtma sırasında kristalleşme) ve camsı çözeltinin kırılması (enerjinin serbest kalması nedeniyle devitrifikasyon) gibi üç ana problem bulunmaktadır. Şaşırtıcı bir şekilde, vitrifikasyon konsantrasyonu yüksek olduğunda (%100 VS = %38 etilen glikol, 0,5 mol/l Trehaloz, %4 BSA içeren TCM medyum) kırılmalar görülebilirken, yalnızca 1 µl gibi küçük hacimlerde kırıklar görülmemektedir (Arav ve ark., 2002). Bu durum, Tg'nin veya VS'nin viskozitesinin artmasıyla kırılma olasılığının arttığı anlamına gelmektedir. Düşük vitrifikasyon konsantrasyonunda (%50 VS), kırılmalar sadece çok yüksek soğutma hızında gözlenmektedir. Dolayısıyla aşağıda ki denklem ile açıklama yapılabilir.

$$\text{Kırılma Olasılığı} = \text{Soğutma Hızı}(CR) \text{ ve Isınma Hızı}(WR) \times \text{Viskozite}(\mu) \times \text{Hacim}(V)$$

$$\text{Vitrifikasyon İhtimali} = \frac{\text{Soğutma Hızı (CR) ve Isınma Hızı (WR)} \times \text{Viskozite}(\mu)}{\text{Hacim (V)}}$$

Denklemden de görüldüğü gibi;

- CR'nin artırılması, vitrifikasyon olasılığını yükseltmektedir. Ancak aynı zamanda kırık olasılığını da artırmaktadır.
- Viskozite artışı vitrifikasyon olasılığını artırmaktadır. Çünkü Tg'nin ve kırılma olasılığının artmasına neden olmaktadır.
- Vitrifikasyon olasılığını artıran ve aynı zamanda kırılma olasılığını azaltan tek parametre hacimdir. Minimum damla boyuta indirmek vitrifikasyon olasılığını artırmakta ve kırılma olasılığını azaltmaktadır (Arav, 2014).

Yüksek vitrifikasyon konsantrasyonlarında kırılma olasılığının artmasının sebebinin Tg ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Kırıkların yalnızca Tg sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda ve sıvı azot sıcaklığının (-196 °C) üzerinde oluşabilmektedir. Ayrıca, daha yüksek kriyoprotektan konsantrasyonuna sahip bir solüsyonun daha yüksek bir Tg'ye sahip olduğunu bilinmektedir. Dolayısıyla, Tg'nin daha yüksek olduğu durumda sıcaklık gradyanı artarsa, kırılma olasılığı da artmaktadır. Düşük vitrifikasyon konsantrasyonları içeren yeni vitrifikasyon prosedürünün, küçük hacimlerle aşırı soğutulmuş sıvı azota doğrudan teması ile soğuk hasarını azalttığı ve cam kırıklarının olmaması gibi yüksek bir vitrifikasyon olasılığı sağladığı bildirilmektedir (Arav, 2014).

2.5.3. Ultra hızlı vitrifikasyon

Dondurma işleminde oosit ve embriyoların 0°C'ye kadar soğutmaya duyarlı olması nedeniyle vitrifikasyon prosedürü modifiye edilerek ultra hızlı vitrifikasyon tekniği geliştirilmiştir. Ultra hızlı soğutma ve ısınmanın elde edilmesini sağlayan ve böylece soğuk hasarı önleyen çok küçük elektron mikroskopik ızgaralar (3 mm çapında ve 0,04 mm kalınlığında) kullanılmaktadır (Martino ve ark., 1996). Sığır oositlerinin hayatta kalma oranı, bu yöntemle önemli ölçüde iyileştirilmiştir. Yapılan farklı çalışmalarla araştırmacılar tarafından ultra hızlı vitrifikasyon için birkaç küçük yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında açık uçlu payetler (Vajta ve ark., 1998),

cryoloop'lar (Lane ve ark., 1999), gel-loading tips (Tominaga ve Hamada, 2001), ince çubuklar (Kuwayama ve Kato, 2000), naylon mesh (Matsumoto ve ark., 2001) ve katı yüzey vitrifikasyonu (Dinnyes ve ark., 2000) yer almaktadır. Bu yöntemde vitrifikasyon ortamının viskozitesi ve soğutma hızı ters orantılıdır. Böylece, örnekler daha düşük konsantrasyondaki kriyoprotektan ve katkı maddeleri içeren bir ortamda ve daha yüksek soğutma hızıyla verimli bir şekilde vitrifiye edilebilmektedir. Teorik olarak, vitrifikasyon 15.000°C/dk'lık soğutma hızıyla 1,5 M kriyoprotektan konsantrasyonu ile gerçekleştirilebilmektedir (Palasz ve Mapletoft, 1996). Ultra hızlı vitrifikasyon tekniğinde, geleneksel yavaş dondurma veya vitrifikasyon yöntemlerine göre son derece yüksek soğutma ve ısıtma oranları kullanılmaktadır. Yüksek soğutma hızı nispeten düşük konsantrasyonda bir kriyoprotektan çözeltisinin vitrifikasyonuna izin vermektedir. Böylelikle vitrifiye hücrelere yönelik bir kriyoprotektan kaynaklı toksisite ve ozmotik stresi azaltılmaktadır. Şu anda, bu yöntem sıklıkla tercih edilmektedir. Ultra hızlı vitrifikasyon yöntemi ile farklı memeli türlerinde oositlerin ve embriyoların donma-çözülme sonrası yüksek hayatta kalma oranları elde edilmektedir (Dhali ve ark., 2018). Ultra hızlı vitrifikasyon sadece soğuğa duyarlı hücreler için değil, aynı zamanda daha az geçirgen hücreler için de etkili olduğu bildirilmektedir. Çünkü ultra hızlı vitrifikasyon buz oluşumu olasılığını azaltmaktadır (Mukaida ve ark., 2003).

Ultra hızlı vitrifikasyon tekniği embriyo ve solüsyonların dikkatli bir şekilde işlenmesini gerektirmektedir. Çünkü vitrifikasyon çözeltisinin hacmi minimum olduğu için embriyoyu çevreleyen çözelti hacmi vitrifikasyon medyumunun konsantrasyonunu değiştirebilmektedir. Örneğin, embriyoları çevreleyen düşük konsantrasyonlu kriyoprotektan solüsyonu, vitrifikasyondan çok kısa bir süre önce (örneğin 25-30s) vitrifikasyon solüsyonu ile yer değiştirebilmektedir. Bu nedenle, teknik beceri ve hatta pipetin iç çapı bile önemli bir fark yaratabilmektedir. Ayrıca, vitrifikasyon çözeltisinin hacminin küçük olması nedeniyle, kısa bir hazırlık ve embriyo işleme periyodu sırasında bile özellikle yüksek sıcaklıkta buharlaştırılarak konsantre hale gelebilmektedir (Mukaida ve ark., 2003).

Tablo 2.4. Yavaş dondurma, vitrifikasyon ve ultra hızlı vitrifikasyon yöntemlerinin karşılaştırılması (Dhali ve ark., 2018).

Ayrıntılar	Yöntemler		
	Yavaş Dondurma	Vitrifikasyon	Ultra Hızlı Vitrifikasyon
Kriyoprotektanların konsantrasyonu	Düşük konsantrasyon, 1-2 M	Yüksek konsantrasyon, 5-7 M	Orta derece konsantrasyon, 3,5- 5,5 M
Numune hacmi	> 100 µl	50- 100 µl	≤ 5-10 µl
Soğutma prosedürü	Programlanabilir bir dondurma makinesi yardımıyla yavaş ve kontrollü soğutma sağlar	Dondurma makinesi gerekmez; numuneler doğrudan sıvı azot içine daldırılır	Dondurma makinesi gerekmez; numuneler doğrudan sıvı azot içine daldırılır veya sıvı azot sıcaklığına soğutulmuş bir yüzeye yerleştirilir
İşlem süresi	Uzun, 2-3 saat	Kısa, < 10 dk	Kısa, < 10 dk
Buz kristali oluşumu	Var	Yok	Yok
Osmatik hasar ihtimali	Düşük	Yüksek	Orta derece
Toksik hasar ihtimali	Düşük	Yüksek	Orta derece
Soğuk hasar ihtimali	Yüksek	Düşük	Düşük
Çözdürme sonra hayatta kalma	Yüksek	Yüksek	Yüksek
Numune kabı	Klasik 0,25 ml'lik payet	Klasik 0,25 ml'lik payet	Kapsız veya klasik payet dışındaki özel kaplar
Sistem durumu	Kapalı	Kapalı	Kapalı veya açık
Maliyet	Pahalı dondurma makinasına ihtiyaç vardır	Ucuz, özel makinalara gerek yoktur	Ucuz, özel makinalara gerek yoktur
Tecrübe gereksinimi	Gerçekleştirilmesi kolay	Gerçekleştirilmesi zor	Gerçekleştirilmesi zor

2.6. IVP Embriyoların Kriyoprezervasyon Sorunları

Uluslararası Embriyo Teknolojisi Derneği 2018 yılı istatistik verilerine göre dünya çapında ortalama 470.000 IVD ve 1.000.500 IVP sığır embriyosu üretilmektedir. Üretilen IVD embriyoların %61,9'u taze transfer edilirken, %39,1'i dondurulmaktadır. IVP embriyoların ise büyük çoğunluğu taze olarak transfer edilmektedir. Taze transfer edilmesi IVP embriyoların kriyoprezervasyona karşı daha duyarlı olduğunun bir göstergesidir (Ferré ve ark., 2020; Viana, 2020). Embriyo kriyotolerans bakımından IVP embriyoların hassas olması, anormal oosit, yüksek sitoplazma lipid içeriği, farklı lipid damlacık düzeni ve iç hücre kütlelerinin az olmasından kaynaklanabilmektedir (del Collado ve ark., 2016; McEvoy ve ark., 2000; Seidel, 2006). Serum ile desteklenen kültür ortamlarındaki IVP embriyolarının lipid içeriğinin IVD embriyolarına göre neredeyse iki kat fazla olduğu bildirilmektedir. Serumsuz kültür ortamındaki IVP embriyoların lipid miktarı ise IVD embriyoların lipid oranına benzer seviyelerdedir (Abe ve ark., 2002). Lipid birikiminin nedeni tam olarak anlaşılamamış olsa da, serum takviyelerinden elde edilen lipoproteinlerin embriyo tarafından emildiği ve bunun sonucunda TG'lerin sentezinin arttığı tahmin edilmektedir (Sata ve ark., 1999). Özellikle serum eklenen IVK ortamları, TG'lerin ve serbest yağ asitlerinin miktarının artmasına, mitokondriyal ve endoplazmik retikulum fonksiyonlarının hasar görmesine neden olmaktadır. Buna bağlı olarak embriyonik gelişimsel yeterliliğin azaldığı ileri sürülmektedir (Wu ve ark., 2011b). Kriyo hasar, lipid faz geçişi ve donma-çözülme sırasında lipid peroksidasyonu sırasında ortaya çıkmaktadır (Tarín ve Trounson, 1993; Quinn, 1985). Fizyolojik sıcaklıklarda (normal vücut ısısı) lipid damlacıkları sıvı fazda olup, genellikle hücre içi yapılara ve zarlara esneklik sağlamaktadır. Soğutulduğu esnada hidrofobik moleküllerin difüzyon hızı ve zarların geçirgenliği azalmaktadır. Bu da zarların sertliğine, hücre içi lipidlerin yeniden dağılımına ve lipid damlacıkları ile bağlantılı organellerin potansiyel olarak bozulmasına yol açmaktadır (Sudano ve ark., 2011; Quinn, 1985). Ayrıca, lipid miktarı tür, ırk ve embriyonik evreye bağlı olarak farklılık göstermektedir (Baldoceda ve ark., 2016; Ordonez-Leon ve ark., 2014; Romek ve ark., 2011). Block ve ark. (2010) sığır embriyolarındaki sitoplazmik lipid damlacıklarının vitrifikasyon sonrasında canlılık

üzerinde hiçbir etkisi olmadığını bildirmektedir. Ancak sitoplazmik lipit damlacık düzeni ve miktarı hakkında bilgi bulunmamaktadır (Block ve ark., 2010).

Sitoplazmadaki lipit içeriğini azaltmak ve kriyotoleransı geliştirmek için kültür koşullarını modifiye eden çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmaların temel amacı kültür ortamlarından serumun azaltılması (≤ 5 v/v) veya hiç kullanılmaması olmuştur (Braga ve ark., 2019; Gómez ve ark., 2020; Holm ve ark., 2002; Rizos ve ark., 2003; Sudano ve ark., 2011). Yeterli konsantrasyonda serum kullanarak ve yağ asidi sentezini kısıtlayan lipolitik maddeler ekleyerek, kriyoprezervasyondan sonra embriyo kalitesi ve canlılığı artırılabilir (Barcelo- Fimbers ve Seidel, 2007; Paschoal ve ark., 2014; Sudano ve ark., 2011). Son yıllarda L-karnitin lipit metabolizmasında önemli bir rol oynadığı ve hücreleri DNA hasarından koruyan bir antioksidan madde olduğu bildirilmektedir (Phongnimitr ve ark., 2013; Sutton-McDowall ve ark., 2012). Bu madde hücre lipit metabolizmasını zenginleştiren ve antioksidan koruma sağlayan etkisi ile, IVP embriyolarında kriyotolerans ve gelişimsel yeteneğini iyileştirmektedir (Takahashi ve ark., 2013). Ayrıca kültür medyuma L-karnitin eklenmesi ile lipolitik maddeler eklenmeden embriyo lipit içeriğinin azaltıldığı bildirilmektedir (Murillo ve ark., 2017). Domuz embriyolarının kültür medyuma L-karnitin eklenmesi ile dondurulan embriyoların hayatta kalma oranlarının arttığını bildirmektedir (Somfai ve ark., 2011).

Kriyoprezervasyon sırasında ROT seviyelerinin arttığı bildirilmektedir (Ahn ve ark., 2002). Artan ROT miktarı embriyolarda hasara veya ölüme yol açabilmektedir (Valencia ve Moran 2004). Atmosferik oksijen seviyesinde ($20\% O_2$) kültürlenmiş oositler de yüksek konsantrasyonda ROT üretilmektedir (Ali ve ark., 2003). Ayrıca β -oksidasyonun yetersizliği de, ROT oluşumunu teşvik etmekte ve DNA hasarına neden olmaktadır. Aşırı ROT üretiminin, β -oksidasyonu bozarak mitokondriyal fonksiyonu etkilediği ve lipit birikimine yol açtığı bildirilmektedir (Van Hoeck ve ark., 2015). Embriyolarda yüksek hücre içi ROT, gelişimsel blok ve embriyo fragmentasyonu ile sonuçlanan DNA parçalanmasına ve apoptoz dahil olmak üzere çeşitli hücre hasarına neden olmaktadır (Guerin ve ark., 2001). İmplantasyon öncesi gelişimin erken aşamalarında, enerjinin temel kaynağı mitokondridir. Bunu oksidatif fosforilasyon tarafından üretilen ATP ile gerçekleştirmektedir (Dumollard ve ark.,

2007). Dolayısıyla oksidatif fosforilasyon, oksidatif stresi oluşturan ROT'un artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, kültür ortamına L-karnitin gibi antioksidanların eklenmesi mitokondriyal fonksiyonu desteklemekte, ROT seviyelerini azaltmakta ve DNA'yı parçalanmaya karşı korumaktadır. Böylelikle embriyo gelişimini olumlu etkilemekte ve kriyoprezervasyon sırasında meydana gelen ROT seviyelerini de azaltarak, embriyoları kriyohasara karşı korumaktadır (Gülçin, 2006; Silva ve ark., 2015; Somfai ve ark. 2011; Yuan ve ark., 2012).

Kriyoprezervasyon, sığır embriyo transfer ticaretinin önemli bir basamağıdır (Hasler, 2014). Yavaş dondurulan embriyonun transferi sonrasında ilk buzağının 1990 yılında doğduğu bildirilmektedir. Vitrifikasyon ile dondurulan embriyonun transferi sonrası ilk canlı buzağının doğumu ise 1980'lerin ortalarında rapor edilmiştir (Massip ve ark., 1987). O zamanlardan günümüze kadar embriyo üretimi, transferi, dondurma ve çözündürme teknikleri geliştirilmektedir (Vajta ve Kuwayama, 2006; Dochi, 2019). Son gelişmelere rağmen, uygun bir protokol için çalışmalar hala devam etmektedir. Sığır embriyo kriyoprezervasyonu için yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Her iki tekniğin de avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Yavaş dondurulan embriyoların direkt transfer (DT)'i mümkün olmasına rağmen, buz kristali oluşumu gibi sıkıntıları bulunmaktadır. Vitrifikasyon ile buz kristali oluşum sorunu çözülmüştür. Ancak vitrifikasyon ile dondurulan embriyolar DT'ye uygun olmadığından ticarisi sınırlanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda vitrifiye edilen embriyoların payet içerisinde dilusyonu da bildirilmektedir (Ferré ve ark., 2020). Günümüzde her ne kadar IVP embriyolar için en popüler kriyoprezervasyon yöntemi vitrifikasyon olsada (Vajta, 2000), yavaş dondurma yöntemine talep giderek artmaktadır (Bruyere ve ark., 2012; Gómez ve ark., 2020).

İn vitro embriyo üretimi oositlerin toplanması, maturasyonu, fertilizasyon ve kültür aşamalarından oluşmaktadır. Bu aşamalarda çeşitli medyumlar kullanılarak IVP embriyoların kalitesi arttırılmaya çalışılmaktadır. Üretilen embriyoların dondurulma işlemi ise genellikle kültürün 7. ve 8. gününde yapılmaktadır. Bu süreçte genellikle iyi kalitede embriyoların dondurulması istenilmektedir. IVP embriyolarının kalitelerinin IVD embriyolarının kalitelerine göre daha düşük olması IVP embriyoları IVD embriyolara göre kriyoprezervasyona karşı daha duyarlı hale getirmektedir.

Kriyoprezervasyona karşı duyarlılık embriyoların optimal olmayan kültür koşulları ile ilişkilidir. Dolayısıyla IVK medyumuna çeşitli antioksidan maddeler eklenerek kültür koşulları iyileştirilebilmektedir (Abe ve ark., 2002). IVP sırasında medyumlara L-karnitin eklenmesinin, lipit içeriğini ve ROT seviyelerini düşürdüğü bildirilmektedir (Ghanem ve ark., 2011; Silva ve ark., 2015). Dolayısıyla sığır IVP embriyolarında lipit içeriğinin ve ROT seviyelerinin yükseldiği kültür ortamına, L-karnitin eklenmesi lipit miktarını ve ROT seviyelerini düşürerek embriyonik gelişimi iyileştirebilir. Ayrıca dondurulan embriyoların hayatta kalma ve gelişim oranları arttırılabilir. Sunulan çalışmada, IVK medyumuna L-karnitin eklenmesinin, kültür sırasında, vitrifikasyon ve yavaş dondurma sonrasında embriyoların hayatta kalma ve gelişim oranları üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Doktora tez çalışmasına ait izinler, Burdur Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Deney Hayvanları Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 19.02.2020 tarih ve 626 sayılı karar ile alınmıştır.

3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Solüsyonlar

- ✓ Maturasyon medyum; BO-IVM (IVF Bioscience-katalog no: 71002)
- ✓ Fertilizasyon medyum; BO-IVF (IVF Bioscience-katalog no:71004)
- ✓ Kültür medyum; BO-IVC (IVF Bioscience-katalog no: 71005)
- ✓ Minarel yağ; BO-OIL (IVF Bioscience-katalog no: 51003)
- ✓ BO-Semenprep (IVF Bioscience-katalog no: 71003)
- ✓ %0,9 İzotonik Sodyum Klorür (Polifleks®)
- ✓ TCM medyum; Medium 199 (Sigma Aldrich-katalog no: M2620-11)
- ✓ Fetal Bovine Serum (Sigma Aldrich-katalog no: F9665)
- ✓ Etilen Glikol (Sigma Aldrich-katalog no: 293237)
- ✓ Gentamisin (Vetaş-Gentavet® %10-100ml)
- ✓ L-Carnitine Inner Salt (Sigma Aldrich-katalog no: C0158)
- ✓ Ficoll^(R) PM 70 (Sigma Aldrich-katalog no: F2878)
- ✓ Sperma (Atadeon-TR45880214)
- ✓ Sukroz (Sigma Aldrich-katalog no: S7903)
- ✓ Hidroklorik asit (Sigma Aldrich-katalog no: H1758)
- ✓ Sodyum hidroksit (Sigma Aldrich-katalog no: S2770)
- ✓ Sodyum Bikarbonat (Sigma Aldrich-katalog no: S-5761)

3.2. Ovaryumların Toplanması ve Laboratuvara Getirilmesi

Çalışma Ekim 2020-Ağustos 2021 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan ovaryumlar Burdur ilinde bulunan 2 farklı mezbahada kesilen sığırlardan temin edildi. Ovaryumlar dişi sığırların pedigri ve kaynağına bakılmaksızın toplandı. Üzerinde kist veya patolojik durum tespit edilen ovaryumlar çalışmaya alınmadı.

Mezbahaya gidilmeden 1 gün önce 1lt %0,9 izotonik sodyum klorür içerisine 1 ml gentamisin eklendi. Hazırlanan solüsyon, ovaryumların mezbahadan laboratuvara getirilmesinde taşıma medyum olarak kullanıldı. Mezbahaya gidildiğinde çift bölmeli termosun alt kısmına sıcak su eklendi. Üst kısımda bulunan bölmeye ise taşıma medyum konuldu. Taşıma medyum sıcaklığı 37°C olacak şekilde ısınması sağlandı. Kesimden sonra karkas üzerinde ineğin ovaryumları cerrahi makas yardımıyla alındı. Taşıma medyum ile yıkanarak, termos içerisinde biriktirildi. Yeterli sayıya ulaşıldığında ovaryumlar Budur Mehmet Akif ERSOY Üniversitesi Genetik ve Embriyo Teknolojileri Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne ait laboratuvara getirildi. Kesim başladıktan sonra ovaryumların toplanıp laboratuvara ulaşması ortalama 2-3 saat içerisinde gerçekleştirildi. Laboratuvara gelindiğinde ovaryumların içinde bulunduğu termos ısı 25-30°C civarındaydı. Ovaryumlar laboratuvara ulaştıktan sonra taşıma medyumuyla yıkanıp steril serviyet üzerinde kurutuldu (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Mezbahadan getirilen ovaryumlara ait görüntü. A, B: Ovaryumların taşıma kabı içerisindeki görüntü, C: Ovaryumların steril serviyet ile kurutulmasında sonrası görüntü.

3.3. Folliküllerin Aspirasyonu ile Oositlerin Elde Edilmesi

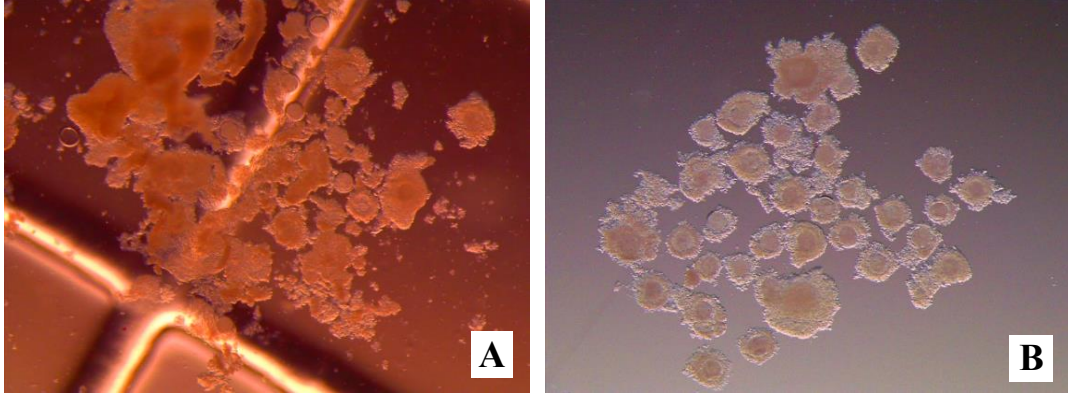
Oositlerin aspirasyonu işleminde %1 FBS içeren TCM199 medyum (aspirasyon medyum) kullanıldı. Aspirasyon medyum çalışma günü kesim başlamadan önce hazırlandı. Medyum kullanılmadan 2 saat öncesinde vinkübatörde (pHcbi, O₂/CO₂ incubatör MCO-170M-PE) ısınma ve dengelenmeye bırakıldı.

Serviyet üzerine alınan ovaryumlardan foliküllerin aspirasyonu yapıldı. Ovaryum üzerindeki foliküllerin aspirasyonu için 10 ml'lik enjektörler ve ucunda steril 18 Gauge'luk (G) enjektör iğnesi kullanıldı. Aspirasyon işlemine başlamadan önce, aspirasyon medyumuyla enjektörün içi ve toplama filtresi yıkandı. Daha sonra enjektör içerisine 0,5 ml aspirasyon medyumunu konulduktan sonra, çapları yaklaşık 2-8 mm olan foliküller aspire edildi. Aspirasyon sırasında iğne ucunun kesik kısmının yukarı bakacak şekilde tutulmasında dikkat edildi. Ovaryuma iğne ile girdikten sonra iğneyi çıkartmadan mümkün olduğunca çok sayıda folikül aspire edildi (Şekil 3.2). Enjektör içerisinde biriktirilen folikül sıvısı yavaş bir şekilde filtreye boşaltıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Aspirasyon ve filtreleme işlemi, A: Folikül aspirasyonu, B: Aspirasyon sırasında iğnenin pozisyonu, C: Enjektör içerisinde biriktirilen folikül sıvısını filtreye boşaltılması.

Foliküllerin aspirasyonundan sonra, filtre 200 ml aspirasyon medyumunu ile iyice (4 kez) yıkandı. Filtre içerisinde medyum berrak bir görüntü aldı. Filtre içerisi enjektör yardımıyla tekrar yıkanarak, 100x20 mm'lik petri içerisine aktarıldı (Şekil 3.3). Oosit ve embriyolara ait mikroskop görüntülerin tümü, mikroskoba entegre olan kamera (Leica, IC90-E) yardımıyla çekildi.



Şekil 3.3. İmmatür oositlerin görüntüsü. A: Aspirasyon sonrası immatür oositlerin stereo mikroskop altında ilk görüntüsü, B: Toplanan immatür oositlerin seçildikten sonraki görüntüsü.

3.4. Oositlerin Kalite Değerlendirilmesi ve Oosit Seleksiyonu

Foliküllerin aspirasyonu sonucunda elde edilen foliküler sıvı petri içerisine aktarılarak stereo mikroskop (Leica, M125-C) altında tarandı. Tarama işlemi sırayla 'S' şeklinde tüm kareler taranarak gerçekleştirildi. İşlem en az iki defa tekrarlandı. Toplanan immatür oositler, içerisinde aspirasyon medyumunu bulunan 60 mm'lik petrilere konuldu. İmmatür oositlerin kalitelerinin belirlenmesinde A, B, C ve D kalite sınıflandırması kullanıldı.

A Kalite: Zona pellusida etrafında kumulus hücre yoğunluğu oldukça fazla (en az 4 kat) ve homojen sitoplazmaya sahip immatür oositlerdir. Bu gruptaki oositler kaliteli immatür oositlerdir.

B Kalite: Sitoplazma homojen, kumulus hücreleri A kaliteye göre daha az katmana sahip immatür oositlerdir. Zona pellusidanın 2/3 veya daha fazlası kumulus hücrelerine sahiptir. Bu gruptaki oositlerde kaliteli immatür oositlerdir.

C Kalite: Oositler soyulmuş çıplak görünümündedir. Çok az kumulus hücresi ile çevrelenmiştir. Sitoplazma homojen olmayan görünümündedir. Bu gruptaki oositler düşük kaliteli immatür oositlerdir.

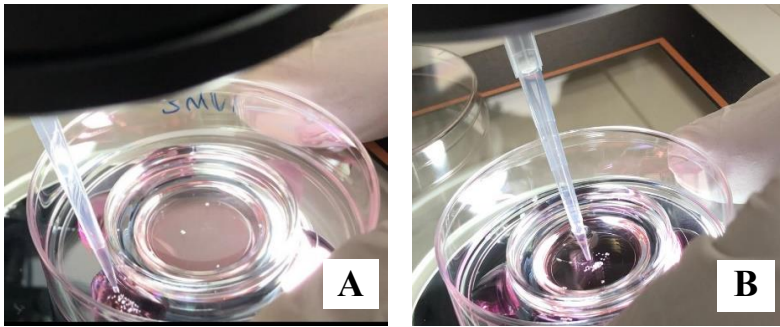
D Kalite: Gevşek ve genişlemiş ağsı yapıda kumulus hücrelerine sahip immatür oositlerdir. Ayrıca kararmış şekilde görünmektedir. Bu gruptaki oositler kalitesiz immatür oositlerdir (Kakkassery ve ark., 2015).

Çalışmada A ve B kalitesine sahip immatür oositler kullanıldı. Düşük ve kalitesiz olan (C ve D) immatür oositler ise çalışmada kullanılmadı.

3.5. İn Vitro Maturasyon

Maturasyon medyumunu ortası kuyucuklu petri içerine 500 µl olacak şekilde hazırlandı. Buharlaşıma ve kontaminasyonu önlemek için üzeri mineral yağ ile kaplandı. Ayrıca immatür oositlerin maturasyon medyumuna konulmadan önce yıkanması için 1ml'lik ependorf içerisine IVM medyumunu hazırlandı. Medyumlar oosit toplama işleminden önce hazırlanarak inkübatöre konuldu. Etüvde en az 2 saat ekilibire edildi. Maturasyon medyum miktarı toplanan ovaryum sayısına göre hazırlandı.

Oositler ilk önce %1 FBS içeren TCM-199 medyumuyla oluşturulan damlacıklarda en az 10 defa yıkandı. Daha sonra ortası kuyucuklu petrinin etrafında dengelenen maturasyon medyumuyla damlacıklar oluşturuldu (en az 3 damlacık). Oositler bu damlacıklar içerisinde pipet yardımıyla yıkanarak maturasyon medyumuna konuldu (Şekil 3.4). Hazırlanan 500 µl'lik IVM medyumuna en fazla 40-45 oosit yüklendi. Maturasyon 39 °C, %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ ve yüksek nemin sağlandığı inkübatör ortamında 20-22 saat bekletilerek gerçekleştirildi.



Şekil 3.4. İmmatür oositlerin maturasyon medyumuna konulması. A: İmmatür oositlerin maturasyon medyumuna konulmadan önce yıkanması, B: İmmatür oositlerin maturasyon medyumuna konulması.

3.5.1. Maturasyon değ erlendirilmesi

Maturasyon kriteri olarak kumulus ekspansiyonuna bakıldı ( ekil 3.5). Değ erlendirme 3 derecede yapıldı. 0. Derece; immatür oosit aşamasında kalıp, morfolojik değişiklik göstermeyen oositler, 1. Derece; kumulus hücrelerindeki genişleme sınırlı, bağlar ise kısmen sıkı durumda, 2. Derece; kumulus hücreleri tamamen geni lemi , görüntü homojen ve hücreler arası bağlar gev emi  olarak kabul edildi (Kobayashi ve ark., 1994).



Şekil 3.5. IVM sonrasında kumulus hücre genişlemesinin görüntülenmesi. A:0. derece, B:1. derece, C:2. derece maturasyon görüntüsü

3.6. Spermanın Hazırlanması

Fertilizasyon işleminde spermadan kaynaklı varyasyonları önlemek için daha önce fertilizasyon özellikleri bilinen tek boğaya ait, dondurulmuş sperma kullanıldı. Sperma hazırlanmasında swim up tekniği tercih edildi. Spermanın hazırlanmasında BO-Semenprep solüsyonu kullanıldı. BO-Semenprep solüsyonundan 15 ml'lik steril konik uçlu santrifüj tüplerine 2 ml olacak şekilde, 2 adet hazırlandı. Kullanım prosedürlere uyularak tüplerin kapağı sıkı bir şekilde kapatılarak, ısınması için en az 1 saat inkübatörde bekletildi.

BO-Semenprep solüsyonu ısıtma işlemi tamamlandıktan sonra sperma    d rme işlemine geçildi. Azot tankından alınan sperma payeti 37  C su içerisinde 30 saniyede    d r ld .    d r len payet steril gazlı bezle kurutulduktan sonra içerisinde BO-Semenprep solüsyonu bulunan 15ml'lik konik tüplere aktarıldı. Konik t p 328 x g'ye ayarlı santrifüj cihazında (NÜVE- NF800) 7 dk santrifüj edildi. Üst kısmındaki süpernatant kısmı otomatik pipet yardımıyla atıldı. Alt kısmında bulunan pellet üzerine diğer tüpte bulunan BO-Semenprep solüsyonu, dikkatli bir şekilde

üzerine boşaltıldı. Konik tüp 45 derecelik açı olacak şekilde etüve konuldu (Şekil 3.6). Spermalar 60 dakika yüzdürmeye bırakıldı. Böylece hareketli spermatozoonların yüzeye doğru yüzmeleri gerçekleştirilmiş oldu. Daha sonra konik tüpün üst kısmından steril pipet yardımıyla 1 ml solüsyon alınarak yeni steril konik tüpe konuldu. Tüp 328 x g'de 7 dk olacak şekilde tekrar santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra alt kısımda yaklaşık 200 µl sıvı bırakıldı.



Şekil 3.6. Swim up aşamalarına ait görüntü. A: Çözdürülen sperma payetinin BO-Semenprep solüsyonuna konulması, B: Spermanın bir saat yüzdürmeye bırakılması, C: Santrifüj sonrası motil spermatozoonların dip kısımda toplanması.

3.6.1. Sperma yoğunluğunun hesaplanması

Sperma yoğunluğu hesaplanırken BO-Semenprep solüsyonunu ait prosedür uygulandı. Bu kapsamda ependorf içerisine 25 µl solüsyon, 25 µl soğuk su konularak karıştırıldı. Thoma lamında stereo mikroskop yardımıyla sayım yapıldı. Thoma lamında 6 büyük 4 küçük olmak üzere toplam 100 küçük kare içerisindeki spermatozoa sayıldı. Sperm süspansiyonunda ml başına 1 milyon ($\times 10^6$ / ml) spermatozoaya karşılık gelmekteydi. Toplam 100 küçük karede sayılan spermatozoa 10'a bölündü. Sperm 1:1 oranında sulandırıldığı için konsantrasyon 1×10^6 /ml verecek şekilde 2 ile çarpıldı. Konsantrasyon olarak IVF medyumunda ml başına 2 milyon spermatozoa olması istenilmektedir. Kullanılacak sperma hacmi formül olarak aşağıda gösterilmektedir.

$$\text{Sperma Hacmi}(\mu\text{l}) = \frac{2.0 \times 10^6 \times A}{B \times 10^6}$$

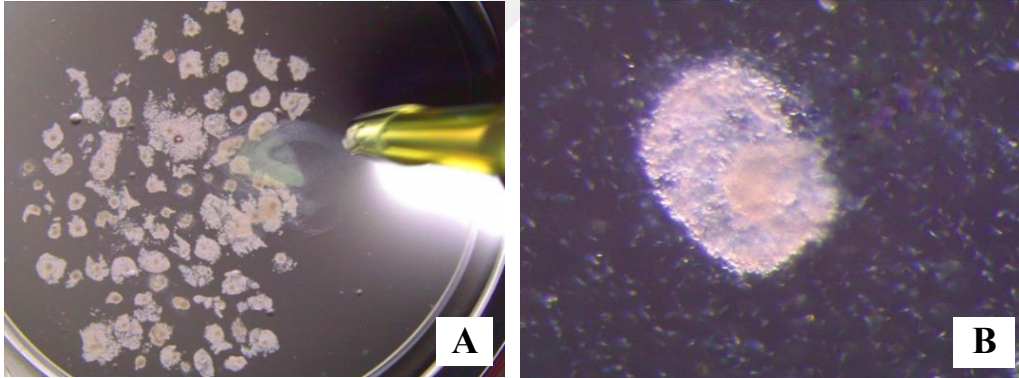
A: IVF damlacığının hacmi (µl)

B: 100 küçük kareden sayılan spermatozoa sayısının 10'a bölünüp 2 ile çarpılmasıyla elde edilmektedir.

3.7. İn Vitro Fertilizasyon

Fertilizasyon medyumunu ortası kuyucuklu petri içerine 500 µl'ye 40-45 oosit konulacak şekilde hazırlandı. Medyum üzeri buharlaşma ve kontaminasyonu önlemek için mineral yağ ile kaplandı. Ayrıca oositlerin fertilizasyon medyumuna konulmadan önce yıkanması için 1ml'lik ependorfa yıkama medyumunu olarak kullanılacak IVF medyumunu hazırlandı. Medyumlar çalışmadan önce hazırlanarak, en az 2 saat inkübatörde gazlandı.

Maturasyon sonrasında oositler IVF medyumuyla 3 farklı damlada yıkanarak, IVF damlacığına yüklendi. Ardından yoğunluğu hesaplanan sperma gerekli miktarda IVF damlacığına eklendi (Şekil 3.7). Fertilizasyon 39 °C, %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ ve yüksek nemin sağlandığı inkübatör ortamında 24 saat bekletilerek gerçekleştirildi.



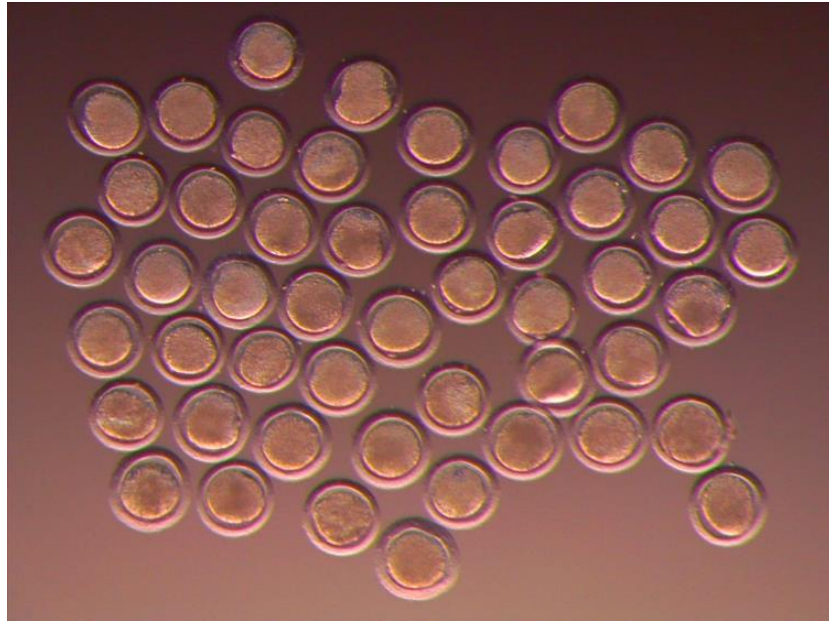
Şekil 3.7. Spermanın fertilizasyon medyumuna eklenmesi. A: Spermanın eklenmesi sırasında alınan görüntü, B: Sperma ve oosit.

3.8. İn Vitro Kültür

Embriyoların kültür işleminde L-karnitin içeren ve içermeyen olmak üzere 2 farklı medyum kullanıldı. Medyum ortası kuyucuklu petri içerine 500 µl'ye 40-45 embriyo konulacak şekilde hazırlandı. Medyum üzeri buharlaşma ve kontaminasyonu önlemek için mineral yağ ile kaplandı. Ayrıca oositlerin fertilizasyon medyumuna

konulmadan önce yıkanması için 1 ml'lik ependorf içerisine yıkama medyumunu olarak hazırlandı. Medyumlar kültür işleminden bir gün önce hazırlanarak, inkübatörde gazlandı. Kültür günü % 10 FBS içeren TCM-199 medyumunu yıkama solüsyonu olarak hazırlandı. Yıkama medyumunu en az 2 saat inkübatörde gazlandı.

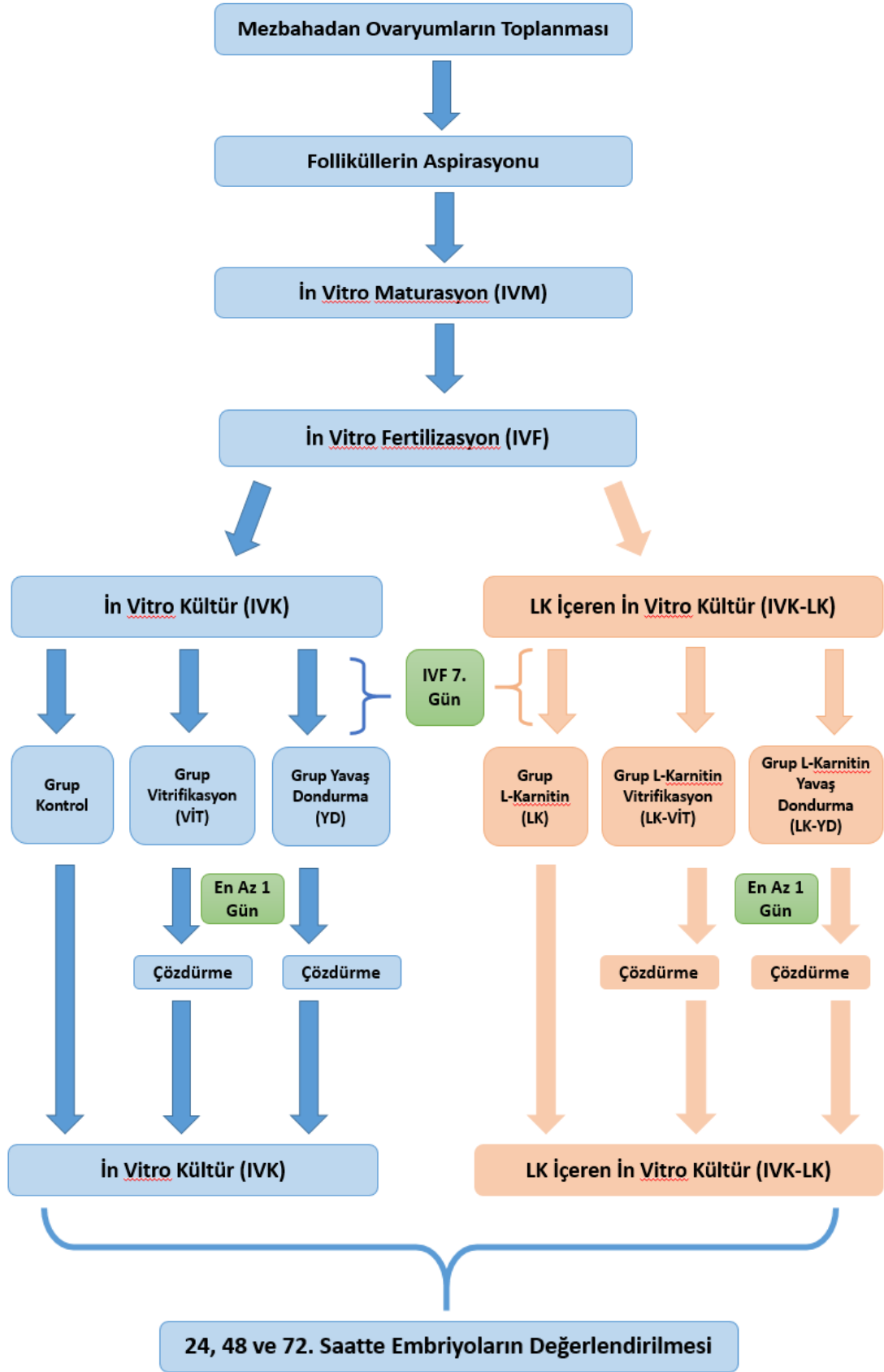
Fertilizasyon işleminden 24 saat sonra muhtemel zigotlar 2,5 ml'lik ependorf içerisine alındı. Ependorf içerisine ilk önce 70 µl hacminde % 10 FBS içeren TCM-199 medyumunu konuldu. Muhtemel zigotlar maksimum 30 µl'lik hacimle alındı. İçerisinde muhtemel zigotlar bulunan ependorf 7 dakika vortekslendi (Daihan-*MaXshake* VM-30). Böylece oosit soyma işlemi (denudasyon) tamamlandı. Dört bölmeli petriler içerisine % 10 FBS içeren TCM-199 medyumunu konuldu. Ependorf içerisindeki muhtemel zigotlar otomatik pipet yardımıyla yıkama medyumuna konuldu. Muhtemel zigotlar stereo mikroskop altında yıkanarak (Şekil 3.8), iki eşit gruba ayrıldı. Kültüre yüklenmeden önce muhtemel zigotlar en az 3 defa 100 µl'lik % 10 FBS içeren TCM-199 damlalarda, daha sonra kültür medyumuyla (IVK veya IVK-LK) yıkandı. Her grup kendi kültür medyumuna yüklendi. Etüv ortamı 39 °C, %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ ve yüksek nem olacak şekilde ayarlandı. Kültürün 3. günü klivaj oranları, 6. günü de embriyolar değerlendirildi.



Şekil 3.8. Fertilizasyon sonrasında muhtemel zigotların görüntüleri.

3.9. Deney Düzeneginin Oluşturulması

Çalışma 5 deneme ve 1 kontrol olmak üzere toplam 6 gruptan oluşturuldu. Kültür medyumı iki farklı şekilde hazırlandı. İlk grupta L-karnitin içermeyen kültür medyumı (IVK), ikinci grupta ise LK içeren kültür medyumı (IVK-LK) kullanıldı. Kültür grubunda bulunan embriyolara, kültürün 6. gününde herhangi bir işlem yapılmadan kültür işlemine devam edildi. Dondurma gruplarında bulunan embriyolara ise kültürün 6. gününde vitrifikasyon veya yavaş dondurma işlemi yapıldı. Vitrifiye edilen veya yavaş dondurulan embriyolar en az 1 gün sıvı azotta bekletildikten sonra çözdüme işlemi uygulandı. Çözdürülen ve kültüre devam eden embriyolar 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirilerek embriyoların gelişimleri incelendi. Çalışmaya ait şema aşağıda verilmiştir (Şekil 3.9). Her çalışma tekrarında LK içeren ve içermeyen gruplar birlikte çalışıldı. Çalışmalar kültür, vitrifikasyon ve yavaş dondurma şeklinde sırayla yapıldı.



Şekil 3.9. Çalışmanın şematik gösterimi

3.10. Dondurma ve Çözdürme Medyumlarının Hazırlanması

Vitrifikasyon, yavaş dondurma ve tüm çözdürme medyumları her çalışma için taze olacak şekilde, çalışmadan 1 gün önce hazırlandı. Medyumlar 0,20 µm'lik enjektör filtresinden geçirilerek steril edildi. Hazırlanan medyumlar çalışmada kullanılmadan ortalama 2 saat önce bekletilerek oda ısısına gelmesi sağlandı.

3.10.1. Vitrifikasyon medyumu

Vitrifikasyon medyumu olarak vitrifikasyon solüsyonu 1 (VS1) ve vitrifikasyon solüsyonu 2 (VS2) kullanıldı. VS1 (Ek 1) için 3,5M EG, %20 FBS içeren TCM-199, VS2 (Ek 2) için, 7M EG, 0,5M süktroz, %18 ficoll 70 (w/v), %20 FBS içeren TCM-199 kullanıldı.

3.10.2. Vitrikiye edilen embriyoların çözdürme medyumu

Çözdürme medyumu 2 adımda olacak şekilde vitrifikasyon çözdürme 1 (VÇ1) ve vitrifikasyon çözdürme 2 (VÇ2) olarak hazırlandı. VÇ1 (Ek 3) için, 0,5M süktroz, %20 FBS içeren TCM-199 kullanıldı. VÇ2 (Ek 4) için, 0,25M süktroz, %20 FBS içeren TCM-199 kullanıldı. Çözdürülen embriyolar daha sonra % 20 FBS içeren TCM-199 (Ek 5) ile yıkandı.

3.10.3. Yavaş dondurma medyumu

Yavaş dondurma medyumu olarak yavaş dondurma solüsyonu 1 (YDS1) ve yavaş dondurma solüsyonu 2 (YDS2) hazırlandı. YDS1 (Ek 6) için, %20 FBS içeren TCM-199, YDS2 (Ek 7) için 1,5M EG, 0,1M süktroz ve %20 FBS içeren TCM-199 kullanıldı.

3.10.4. Yavaş dondurulan embriyoların çözdürme medyumu

Çözdürme medyumu 2 adımda olacak şekilde yavaş dondurma çözdürme 1 (YDÇ1) ve yavaş dondurma çözdürme 2 (YDÇ2) olarak hazırlandı. YDÇ1 (Ek 8) için

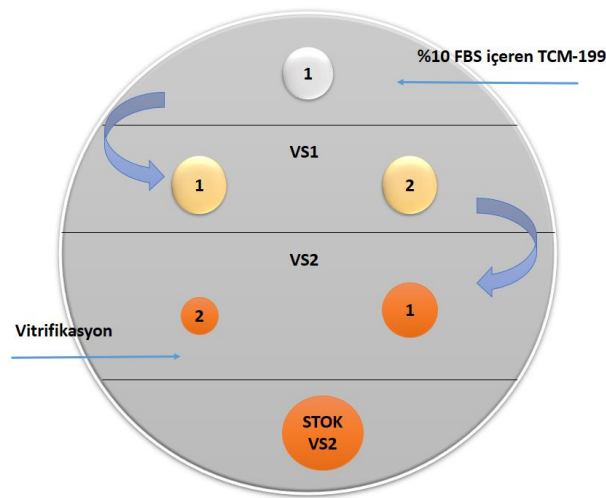
0,3M sükröz, %10 FBS içeren TCM-199 kullanıldı. YDÇ2 (Ek 9) için %10 FBS içeren TCM-199 kullanıldı.

3.10.5. L-Karnitin stok medyumunu

L-Karnitin stok solüsyonu için TCM-199 kullanılarak hazırlandı (Ek 10). Sterilizasyon işlemi 0,20'lik enjektör filtresinden geçirilerek yapıldı. Solüsyon steril ependorflara konuldu. Raf ömrü 1 ay olacak şekilde kullanıldı. Hazırlanan stok solüsyonu buzdolabında saklandı. L-Karnitin içeren kültür medyumuna 0,75 mM yoğunlukta L- karnitin takviye edildi.

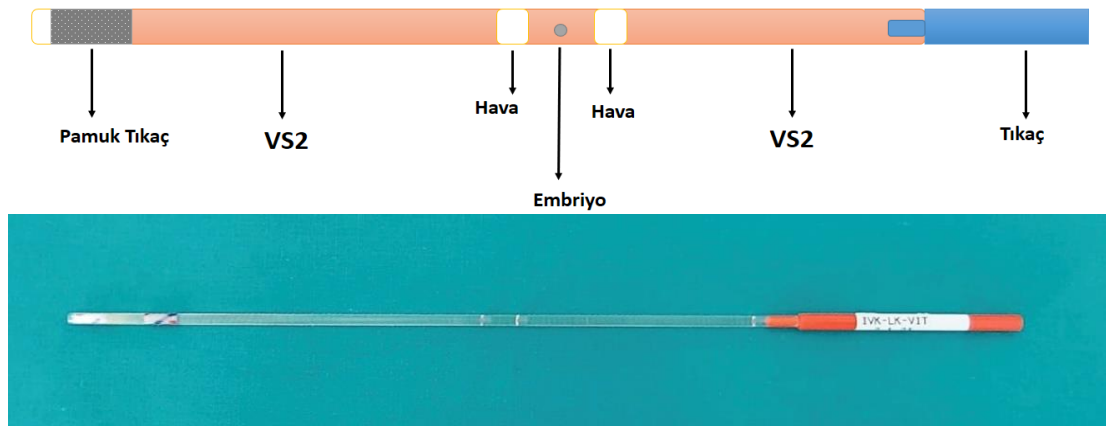
3.11. Embrioların Vitrifikasyonu

Vitrifikasyon işlemine başlamadan önce ilk olarak payet tıkaçlar üzerine yapıştırılan etiketlere ve gobletlere embriyoya ait bilgiler, dondurma şekli ve vitrifikasyon tarihi yazıldı. Daha sonra strafor köpük kutu içerisine sıvı azot dolduruldu. Oda ısına gelen VS1, VS2 ve %10 FBS içeren TCM-199 medyumlarından 35'lik petri içerisine damlacıklar oluşturuldu. Petrinin üst kısmına 100 µl hacminde %10 FBS içeren TCM-199 medyumundan, hemen alt kısmına 100 µl'lik 2 tane VS1, 1 tane VS2 ve 10 µl'lik VS2 olacak şekilde hazırlandı. Son damla ise 200 µl hacminde VS2 stok olarak hazırlandı (Şekil 3.10).

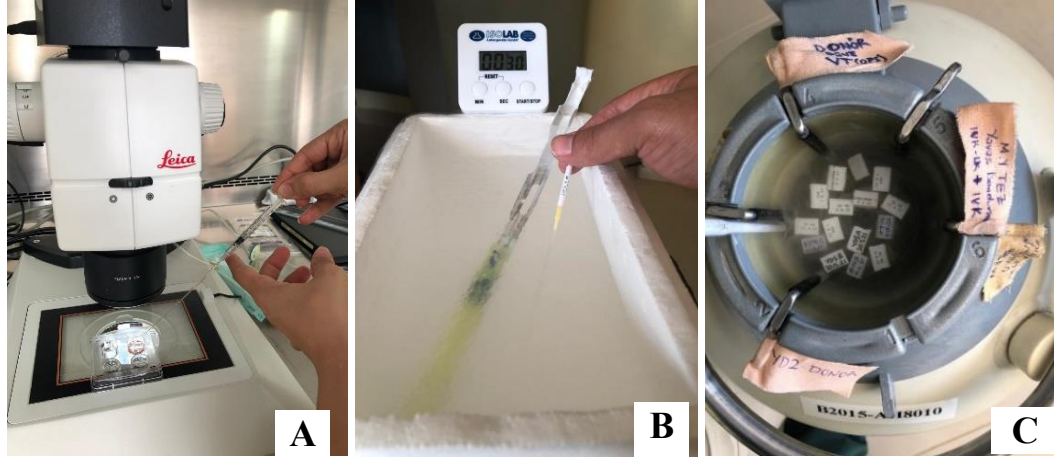


Şekil 3.10. Embriyonun vitrifikasyonu şematik gösterimi. VS1: Vitrifikasyon solüsyonu 1, VS2: Vitrifikasyon solüsyonu 2.

Embriyonun payete yerleştirilme işlemi insülin enjektörü yardımıyla gerçekleştirildi. Embriyo 0,25 ml payetlere 10 μ l'lık VS2 ile yüklendi (Şekil 3.11). Daha sonra payetin açık kısmına tıkaç takıldı. Payet 45 derecelik açı ile sıvı azot içerisine daldırıldı. Payetler gobletlere konulup sıvı azot tankına alındı. Burada en az 1 gün süreyle bekletildi (Şekil 3.12).



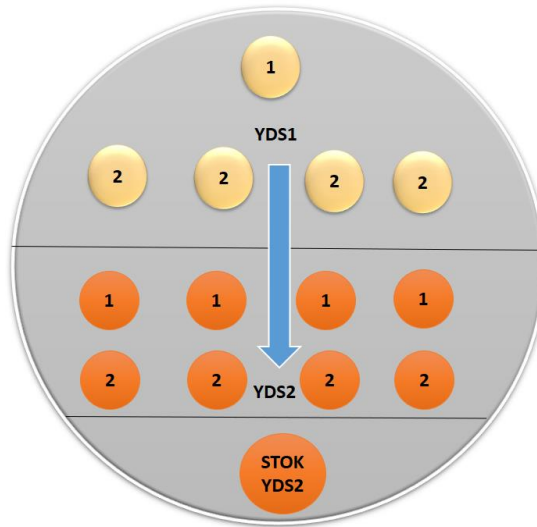
53



Şekil 3.12. Embriyonun vitrifikasyonu A: Embriyonun payete yüklenmesi, B: Embriyo yüklü payetin sıvı azot içine daldırılması, C: Embriyoların sıvı azot içerisinde depolanması

3.12. Embriyoların Klasik Yavaş Dondurulması

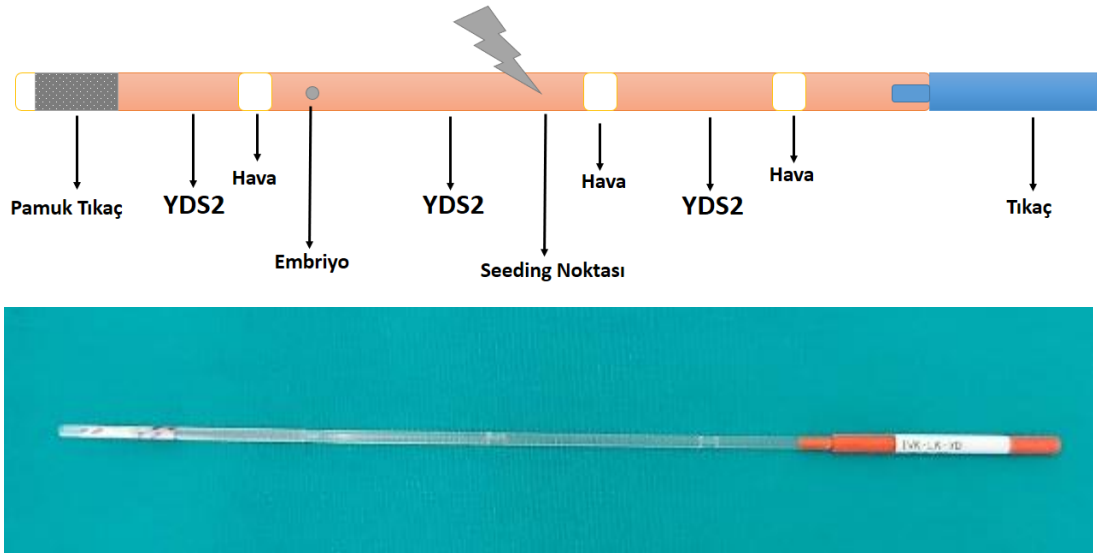
Klasik yavaş dondurma işlemine başlamadan önce ilk olarak payet tıkaçlar üzerine yapıştırılan etiketlere ve gobletlere embriyoya ait bilgiler, dondurma şekli ve yavaş dondurma tarihi yazıldı. Oda ısısında olan YDS1, YDS2 medyumlarından 100'lük petri içerisinde damlacıklar oluşturuldu (Şekil 3.13). İlk damla 100 µl hacminde YDS1, 2. damlalar 50 µl'lik YDS1, sonraki iki sırada 50 µl'lik YDS2 olacak şekilde hazırlandı. Son damla ise 200 µl hacminde YDS2 stok olarak hazırlandı (Şekil 3.13).



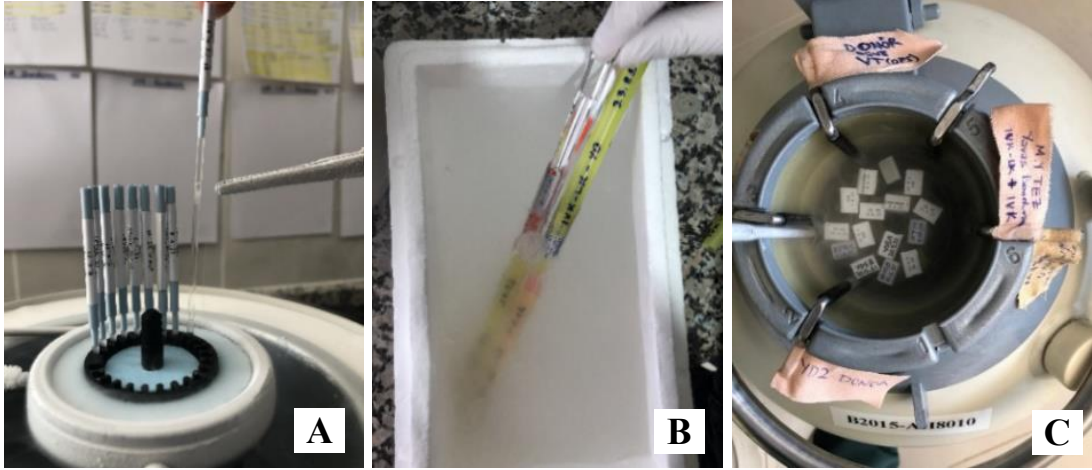
Şekil 3.13. Embriyonun yavaş dondurma işlemi şematik gösterimi. YDS1: Yavaş dondurma solüsyonu 1, YDS2: Yavaş dondurma solüsyonu 2.

İn vitro kültürün 6. gününde erken blastosist ve blastosist aşamasına ulaşan embriyolara klasik yavaş dondurma işlemi oda ısısında ve ısıtılmalı faz tabla kapalıyken yapıldı. Embriyolar ilk olarak 100 µl'lik YDS1 damlacığında yıkandı. Ardından 50 µl'lik YDS1 solüsyonunda yıkanıp 50 µl'lik YDS2 damlasına konuldu. Buradan farklı bir YDS2 damlacığına alınıp yıkandıktan sonra payete yüklendi. Embriyo yıkama işleminde otomatik pipete embriyonun yükleneceği damlacıktan az miktarda solüsyon alınıp, embriyoyu içinde bulunduğu damlacıktan mümkün olduğunca az miktarda solüsyonla alınmasına dikkat edildi.

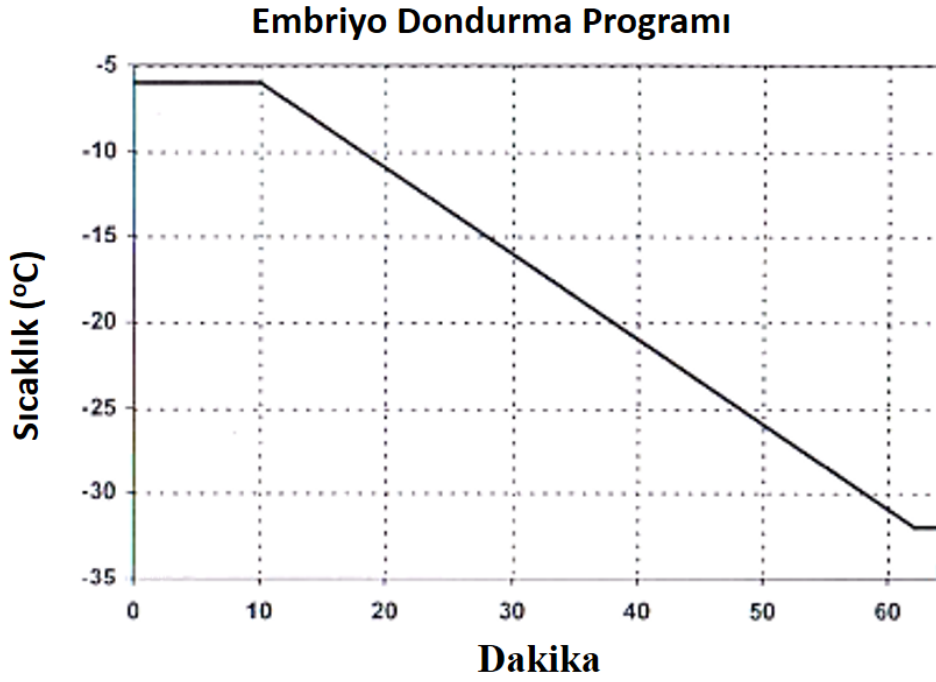
Embriyonun payete yerleştirilme işlemi insülin enjektörü yardımıyla gerçekleştirildi. Embriyo 0,25 ml payetlere YDS2 ile yüklendi (Şekil 3.14). Daha sonra payetin açık kısmına tıkaç takıldı. Embriyo payeti 10 dakika oda ısısında dengelendikten sonra yavaş dondurma cihazına (freze Control^(R) CL-5500) konuldu (Şekil 3. 15). Cihaz hız zaman grafiğine göre çalışmaktaydı (Şekil 3.16). Embriyoların içinde bulunduğu payet cihaza konulduktan 2 dakika sonra seeding işlemi uygulandı. Dondurma işlemi tamamlandıktan sonra payetler gobletlere konulup sıvı azot tankına alındı. Burada en az 1 gün süreyle bekletildi.



Şekil 3.14. Embriyonun yavaş dondurma payetine yüklenmesinin şematik ve gerçek görüntüsü. YDS2: Yavaş dondurma solüsyonu 2.



Şekil 3.15. Embriyoların yavaş dondurulması. A: Seeding işlemi, B: Payetlerin gobletlere konulması, C: Gobletlerin sıvı azot tankına konulması.



Şekil 3.16. Yavaş dondurma programı.

3.13. Vitrifiye Payetlerin Çözdürülmesi

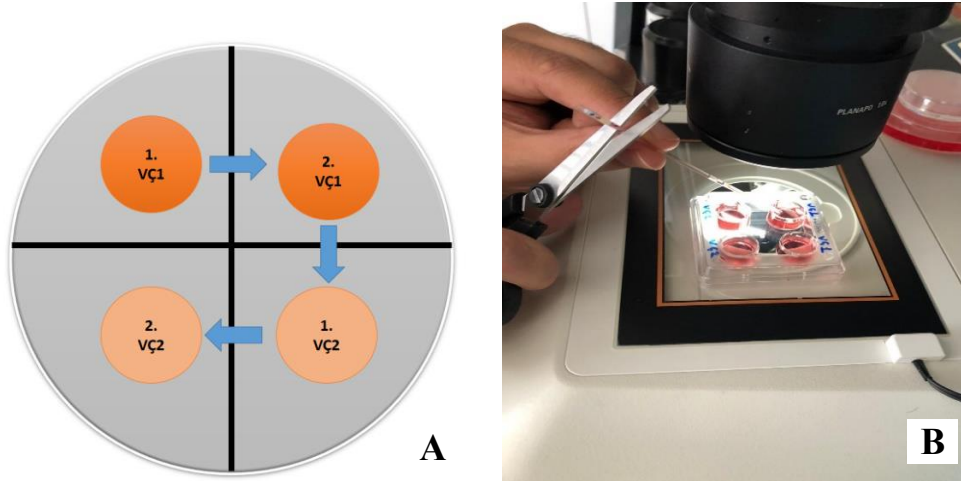
Çözdürme işlemine başlamadan önce 30 °C'ye ayarlanmış su banyosu hazırlandı (Şekil 3.17). Daha sonra strafor köpük kutu içerisine sıvı azot dolduruldu. Azot tankından alınan embriyolar gobletlerle birlikte içerisinde sıvı azot bulunan strafor kutuya aktarıldı. Oda ısısına gelen VÇ1, VÇ2 medyumlarından 4 kuyucuklu

petrilerin 2 tanesine 1'er ml VÇ1, diğer 2 tanesine 1'er ml VÇ2 konuldu (Şekil 3.18). Petri kabı içerisine ise %20 FBS içeren TCM-199 medyumunu konularak ısıtılmalı tabla üzerinde bekletildi. Çözdürme işlemi oda ısısında yapıldı.

Sıvı azot içerisinden alınan payet havada 5 saniye bekletildi. Bu sırada payetin ucunda bulunan tıkaç çıkartıldı. Daha sonra sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 10 saniyede çözdürüldü. Su banyosundan çıkartılan payet steril gazlı bezle kurutulup açık olan kısmı VÇ1 medyumuna daldırıldı. Pamuk kısmı makas yardımıyla kesildi. Payet içeriği VÇ1 medyumuna aktarıldıktan sonra embriyo hızlı bir şekilde tarandı. Bulunan embriyo farklı VÇ1 damlasına alındı. Toplamda 5 dk olacak şekilde VÇ1'de bekletildi. Embriyo daha sonra VÇ2 damlacığında yıkanıp, farklı VÇ2 damlacığına alındı ve burada da toplam 5 dk bekletildi. Çözünen embriyo sıcaklığı 37°C'ye ayarlı tabla üzerinde bulunan %20 FBS içeren TCM-199 medyumunu konuldu ve en az 3 defa farklı damlacıkta yıkandı. Çözdürme işlemi bittikten sonra embriyolar kendi kültür medyumuyla en az 3 defa yıkandıktan sonra kültür damlacığına konuldu. Embriyolar 3 gün boyunca gözlemlendi. Embriyolara ait gelişim 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirildi.



Şekil 3.17. Vitriye edilen embriyoların çözdürülmesi, A: Su banyosunun ısısının ayarlanması, B: Havada 5 saniye çözdürme, C: Su banyosunda çözdürme.



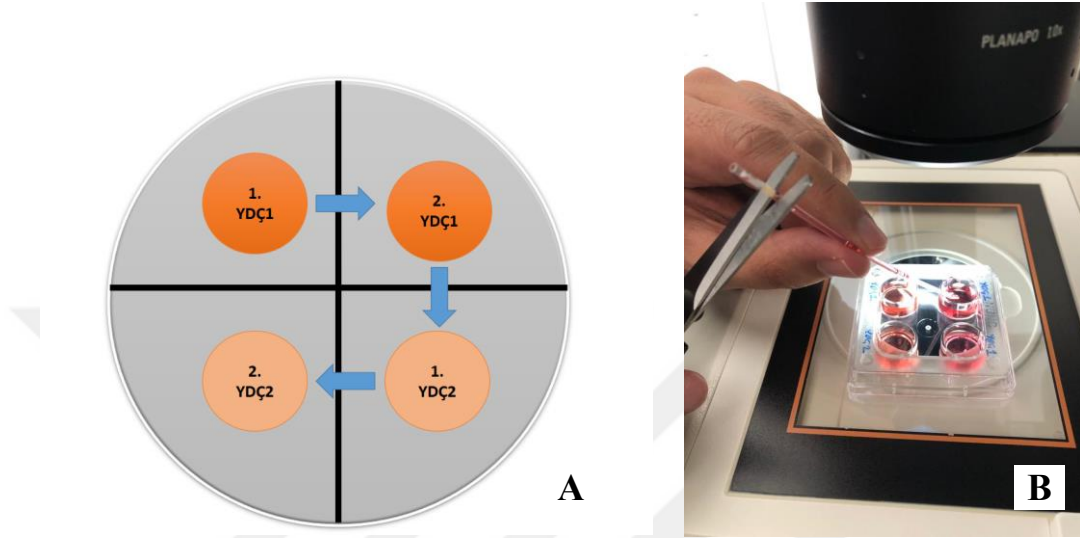
Şekil 3.18. Vitrifiye edilen embriyoların çözündürülmesinin şematik ve gerçek görüntüsü. A: Vitrifiye edilen embriyoların çözündürülmesinin şematik gösterimi, B: Vitrifiye edilen embriyonun çözündürme medyumuna konulması. VÇ1: Vitrifikasyon çözündürme 1, VÇ2: Vitrifikasyon çözündürme 2.

3.14. Yavaş Dondurulan Embriyoların Çözündürülmesi

Çözdürme işlemine başlamadan önce 30 °C'ye ayarlanmış su banyosu hazırlandı. Daha sonra strafor köpük kutu içerisine sıvı azot dolduruldu. Azot tankından alınan embriyolar gobletlerle birlikte içerisinde sıvı azot bulunan strafor kutuya aktarıldı. Oda ısısına gelen YDÇ1, YDÇ2 medyumlarından 4 kuyucuklu petrilerin 2 tanesine 1'er ml YDÇ1, diğer 2 tanesine 1'er ml YDÇ2 konuldu (Şekil 3.19). 35'lik petri içerisine ise %10 FBS içeren TCM-199 medyumunu konularak ısıtmalı tabla üzerinde bekletildi. Çözdürme işlemi oda ısısında yapıldı.

Sıvı azot içerisinden alınan payet havada 5 saniye bekletildi. Daha sonra sıcaklığı 30 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 20 saniyede çözündürüldü. Su banyosundan çıkartılan payet steril gazlı bezle kurutulup açık olan kısmı YDÇ1 medyumuna daldırıldı. Pamuk kısmı makas yardımıyla kesildi. Payet içeriği YDÇ1 medyumuna aktarıldıktan sonra embriyo hızlı bir şekilde tarandı. Bulunan embriyo farklı bir YDÇ1 damlasına alındı. Toplamda 3 dk olacak şekilde YDÇ1'de bekletildi. Embriyo daha sonra YDÇ2 (%20 FBS içeren TCM-199 medyum) damlacığında yıkanıp farklı YDÇ2 damlacığına alındı ve burada da toplam 3 dk bekletildi (Şekil 3.21). Çözünen embriyo sıcaklığı 37°C'ye ayarlı tabla üzerinde bulunan %10 FBS içeren TCM-199 medyumunu

konuldu ve en az 3 defa farklı damlacıklarda yıkandı. Çözdürme işlemi bittikten sonra embriyolar kendi kültür medyumuyla en az 3 defa yıkandıktan sonra kültür damlacığına konuldu. Embriyolar 3 gün boyunca gözlemlendi. Embriyolara ait gelişim 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirildi.



Şekil 3. 19. Yavaş dondurulan embriyoların çözündürülmesinin şematik ve gerçek görüntüsü. A: Yavaş dondurulan embriyoların çözündürülmesinin şematik gösterimi, B: Yavaş dondurulan embriyonun çözündürme medyumuna konulması. YDÇ1: Yavaş dondurma çözündürme 1, YDÇ2: Yavaş dondurma çözündürme 2.

3.15. İstatistik Analiz

Nümerik değişkenlerin normal dağılıma uygunluğunun kontrolü “Shapiro-Wilk Testi” ile yapıldı. Nümerik değişkenlerin tanımlayıcı istatistikleri normal dağılım gösterenler için ortalama ($\pm$) standart sapma değerleri, normal dağılım göstermeyenler için medyan (min-max) değerleri verildi. Kültürün 3. gününde embriyolarda bölünme oranlarının karşılaştırılmasında, “Bağımsız Örneklem T Testi” kullanıldı. Sekiz ve üzeri hücreli embriyolarda normallik sağlanamadığı için “Mann-Whitney U Testi” kullanıldı. Kültürün 6. gününde embriyoların gelişim oranlarına ait bulguların istatistiği yapılırken “Bağımsız Örneklem T Testi”, normalitenin sağlanmadığı gruplarda “Mann-Whitney U Testi” kullanıldı. Direkt kültüre edilen embriyoların gelişim oranlarının karşılaştırılması “Mann-Whitney U Testi” ile incelendi. Yavaş dondurulan embriyoların çözündürüldükten sonra gelişim oranlarının karşılaştırılması “Bağımsız Örneklem Testi” ve “Mann-Whitney U Testi” kullanıldı. Vitrifiye

embriyoların çözdürüldükten sonra gelişim oranlarının karşılaştırılması “Mann-Whitney U Testi” ile incelendi. Tüm gruplara ait verilerin karşılaştırılmasında; veriler parametrik varsayımlarını sağlamıyorsa “Kruskal-Wallis H Testi” kullanıldı. Ayrıca tüm hesaplamalarda ve yorumlamalarda istatistik anlamlılık düzeyi “ $p<0,05$ ” olarak dikkate alınarak, hipotezler çift yönlü olarak kuruldu. Verinin istatistiksel analizi SPSS v26 (IBM Inc., Chicago, IL, USA) istatistik paket programında yapıldı.



4. BULGULAR

Mezbahada kesilen hayvanlardan, uygun şartlar altında toplanan 583 adet ovaryum laboratuvara getirildi. Ovaryumların 75 tanesi patolojik durumlardan ve inaktif yapılardan dolayı çalışmaya dâhil edilmedi. Kullanılan 508 ovaryumdan A kalitede 795 ve B kalitede 463 tane olmak üzere toplam 1258 oosit elde edildi. Oositler ovaryum üzerinde bulunan ve çapları yaklaşık 2-8 mm olan foliküllerden aspirasyon tekniğiyle toplandı. Elde edilen oositlere ait kalite bilgileri ve sayısal veriler tablo 4.1’de sunuldu.

Tablo 4.1. Elde edilen toplam oosit, ovaryum başına düşen kaliteli oosit sayıları.

Toplam Sayı	Elde Edilen Toplam Oosit Sayısı	Ovaryum Başına Kaliteli (A-B) Oosit Sayısı (%)
Ovaryum	508	2,48
A Kalite Oosit	795	1,56
B Kalite Oosit	463	0,92

4.1. İn Vitro Maturasyon Bulguları

Ovaryumlardan aspire edilen A (n=795) ve B (n=463) kaliteden toplam 1258 oosit maturasyon medyumuna konuldu. Maturasyon değerlendirmesi 3 derecede yapıldı. Maturasyon başarı oranı 2. ve 1.dereceden toplam %94,91 (n=1194) olarak saptandı. Oositlerin %5,09’unun (n=64) dejenere olduğu tespit edildi. Çalışmada 1 kontrol ve 5 çalışma grubu olmak üzere toplam 6 grup bulunmaktadır. Gruplar kültür aşamasında ayrıldığı için çalışmaya ait maturasyon bilgisi toplam olarak verildi. Her grup ise kültür aşamasına geldiğinde L-karnitin içeren ve içermeyen olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Oositlere ait maturasyon bilgileri Tablo 4.2’de özetlendi.

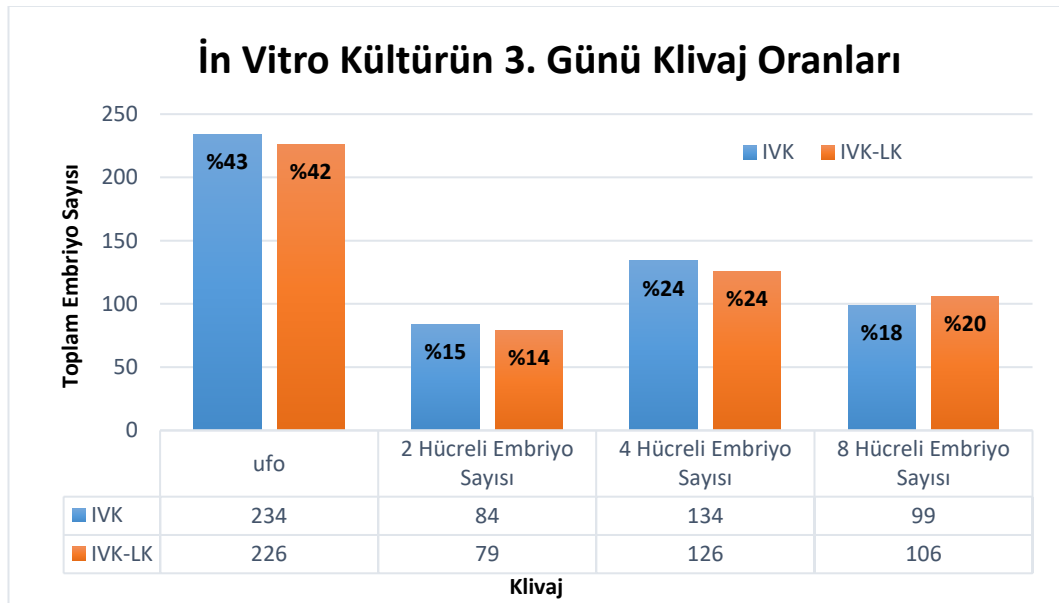
Tablo 4.2. Oosit maturasyon bilgileri.

GRUP	A ve B Kaliteli Oosit Sayısı	0. Derece Matur Oosit Sayısı (%)	1. Derecede Matur Oosit Sayısı (%)	2. Derece Matur Oosit Sayısı (%)
Toplam	1258	64 (5,09)	376 (29,89)	818 (65,02)

4.2. İn Vitro Kültür Bulguları

4.2.1. Kültürün 3. günü klivaj bulguları

Fertilizasyon işleminde toplam 1194 matur oosit kullanıldı. Fertilizasyon sonrası 24. saatte hücreler vortekslendi. Vortekslenme işlemi sonrasında kayıp ve dejenerasyona bağlı olarak 106 (%8,88) hücre çalışma dışında bırakıldı. Çalışma 22 defa tekrarlandı. Elde edilen 1088 hücre ile kültür işlemine devam edildi. Hücrelerin 551 tanesi L-karnitin içermeyen kültür ortamında, 537 hücre L-karnitin içeren kültür ortamında kültüre edildi. Kültür işleminin 3. gününde klivaj (bölünme) oranları değerlendirildi. L-karnitin içermeyen kültür ortamında hücrelerin 234 (%42,47) tanesinin unfertil oosit (UFO), 84 (%15,25) tanesinin 2 hücreli embriyo, 134 (%24,32) tanesinin 4 hücreli embriyo, 99 (%17,97) tanesinin ise 8 ve üzerine hücreli embriyo olduğu tespit edildi. L-karnitin içeren kültür ortamında hücrelerin 226 (%42,09) tanesinin UFO, 79 (%14,71) tanesinin hücreli embriyo, 126 (%23,46) tanesinin 4 hücreli embriyo ve 106 (%19,73) tanesinin ise 8 ve üzerine hücreli embriyo olduğu tespit edildi (Şekil 4.1). Çalışmaya 4, 8 ve üzeri hücreli embriyolarla devam edildi. Hücrelere ait klivaj oranları (Tablo 4.2), ve klivaj görüntüleri (Şekil 4.2) aşağıda verildi.



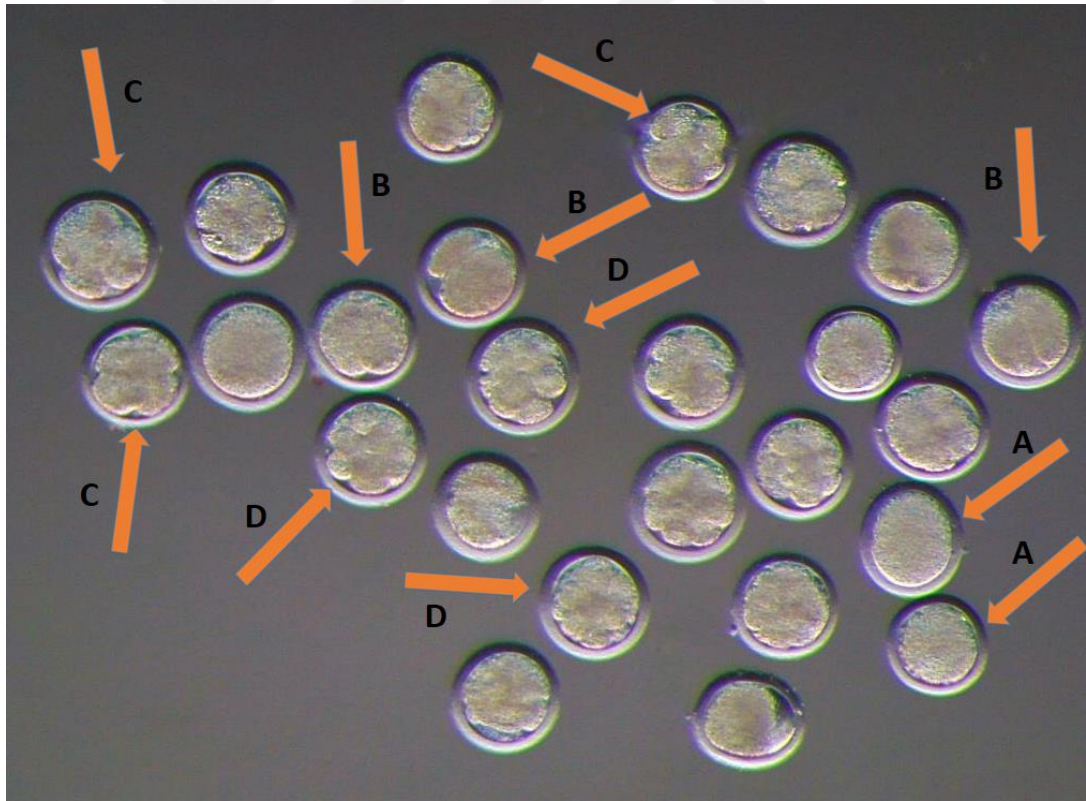
Şekil 4.1. Kültürün 3. gününde embriyoların klivaj oranları. Ufo: Unfertil oosit, IVK: in vitro kültür, IVK-LK: L-karnitin içeren in vitro kültür.

Tablo 4.3. Kùltürün 3. gününde embriyolarda bölünme oranlarının karşılaştırılması

Grup	Toplam Matur Oosit Sayısı	UFO (Ort±SE)	2 Hücreli Embriyo (Ort±SE)	4 Hücreli Embriyo (Ort±SE)	8 ve Üzeri Hücreli Embriyo (Ort±SE)	Toplam Embriyo (Ort±SE)
IVK	551	234 (38,4±13,3)	84 (15,9±7,0)	134 (25,8±11,9)	99 (19,9±13,9)	317 (60,6±12,8)
IVK-LK	537	226 (39,3±13,6)	79 (14,6±10,4)	126 (25,2±13,4)	106 (20,9±11,4)	311 (60,7±13,6)
p		0,814	0,641	0,864	0,581	0,990

Bağımsız Örneklem T Testi, *Mann-Whitney U Testi*.

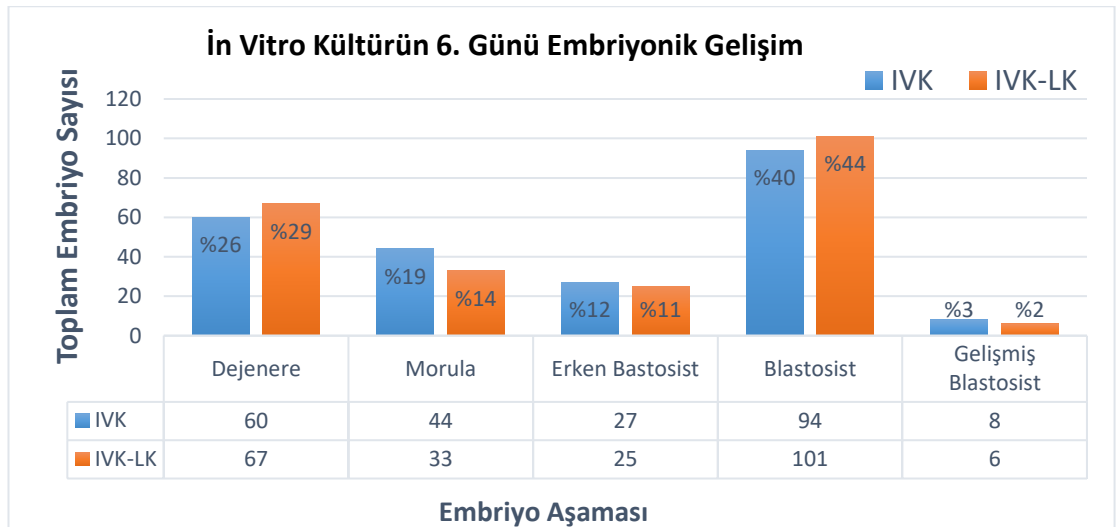
Yapılan analiz sonuçları incelendiğinde, “UFO” ($p>0,05$), “2 Hücreli Embriyo” ($p>0,05$), “4 Hücreli Embriyo” ($p>0,05$), “8 ve Üzeri Hücreli Embriyo” ($p>0,05$) ve “Toplam Embriyo” oranlarında ($p>0,05$) L-karnitin varlığının anlamlı bir fark oluşturmadağı belirlendi.



Şekil 4.2. Kùltürün 3. günü embriyoların klivaj görüntüleri; A: UFO, B: 2 Hücreli Embriyo, C: 4 Hücreli Embriyo, D: 8 Hücreli Embriyo.

4.2.2. Kültürün 6. gün bulguları

Kültür işlemine 1088 oosit ile başlandı. Bu oositlerden 460 tanesi ufo, 163 tanesi ise 2 hücreli embriyo olduğu için kültürün 3. gününde çalışma dışında bırakıldı. Çalışmaya 4 (n:260), 8 ve üzeri (n:205) hücreye sahip toplam 465 embriyo ile devam edildi. Kültür işleminin 6. gününde L-karnitin içermeyen kültür ortamında 233, L-karnitin içeren kültür ortamında 232 embriyo bulunmaktaydı. Kültür işleminin 6. gününde embriyoların gelişim oranları değerlendirildi. L-karnitin içermeyen kültür ortamında embriyoların 60 (%25,75) tanesinin dejenere, 44 (%18,88) tanesinin morula, 27 (%11,58) tanesinin erken blastosist, 94 (%40,34) tanesinin blastosist ve 8 (%3,43) tanesinin gelişmiş blastosist (expanded blastosist, hatching veya hatched blastosist) olduğu tespit edildi. L-karnitin içeren kültür ortamında embriyoların 67 (%28,88) tanesinin dejenere, 33 (%14,22) tanesinin morula, 25 (%10,78) tanesinin erken blastosist, 101 (%43,53) tanesinin blastosist ve 6 (%2,58) tanesinin gelişmiş blastosist olduğu tespit edildi (Şekil 4.3). Kültür işleminin 6. gününde 4-8 hücre veya 8-16 hücre arasında bloklanan embriyolar, morulalar ve gelişmiş blastosistler çalışmadan çıkartıldı. Geriye kalan embriyoların gelişimleri takip edildi. Vitrifikasyon ve yavaş dondurma gruplarında erken blastosist ve blastosist aşamasına ulaşan embriyolar donduruldu. Dondurulan embriyolar çözündürülüp gelişimleri kontrol edildi. Kültürün 6. gününe ait bilgiler Tablo 4.4’de, embriyolara ait görüntü ise Şekil4.4’de verildi.



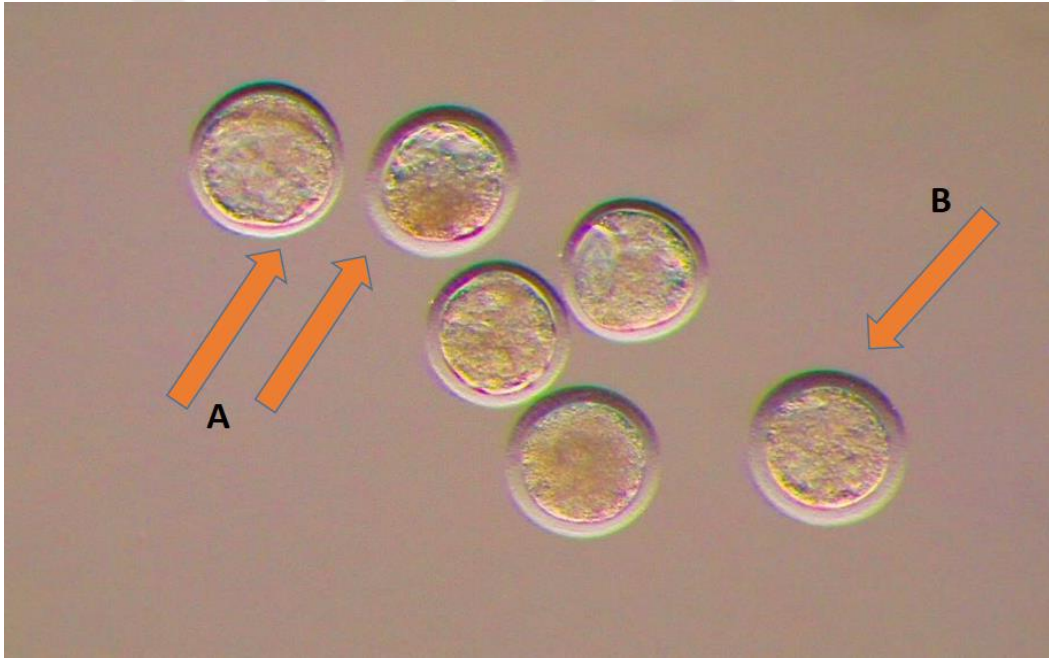
Şekil 4.3. Kültürün 6. gününde gruplarındaki embriyo gelişim oranları. IVK: in vitro kültür, IVK-LK: L-karnitin içeren in vitro kültür.

Tablo 4.4. Kùltürün 6. gününe ait bulgular

	Toplam Embriyo Sayısı	Dejenere (Ort±SS)	Morula (Ort±SS)	Erken Blastosist (Ort±SS)	Blastosist (Ort±SS)	Gelişmiş Blastosist (Ort±SS)	Toplam Embriyo (Ort±SS)
IVK	233	60 28,6±17,7	44 16,6±15,9	27 13,3±15,3	94 36,9±17,3	8 4,2±8,0	173 71,0±17,7
IVK LK	232	67 32,3±19,5	33 13,0±15,3	25 9,9±14,4	101 43,1±19,2	6 1,8±4,7	165 67,7±19,5
p		0,518	0,420	0,322	0,268	0,244	0,558

Bağımsız Örneklem T Testi, Mann-Whitney U Testi

“Dejenere” ($p>0,05$), “Morula” ($p>0,05$), “Erken Blastosist” ($p>0,05$), “Blastosist” ($p>0,05$), “Gelişmiş Blastosist” ($p>0,05$) ve “Toplam Embriyo” oranlarında ($p>0,05$) L-karnitin anlamlı fark oluşturmadığı tespit edildi.



Şekil 4.4. Fertilizasyonun 7. günü embriyolara ait görüntüler; A:Blastosist, B: Erken Blastosist.

4.3. Kültür Grubu Embriyoların Gelişimlerinin İncelenmesi

Kültürün 6. günü Grup Kontrol ve Grup LK'ye herhangi bir işlem yapılmadan direkt kültür işlemine devam edildi. Grup Kontrol'de 29 tane dejenere, 6 morula, 22 erken blastosist, 39 blastosist ve 2 hatching aşamasında olmak üzere toplam 98 embriyo bulunmaktaydı. Grup LK'de 26 tane dejenere, 9 morula, 16 erken blastosist, 40 blastosist olmak üzere toplam 91 embriyo bulunmaktaydı. Çalışma 12 tekrar yapılarak embriyolar toplandı. Erken blastosist ve blastosist aşamasında bulunan embriyoların gelişimleri 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirildi. Embriyoların gelişim aşamaları Şekil 4.5'te verildi. Embriyolarının expanded blastosist veya hatching/hatched blastosist aşamasına ulaşması, 24 saat aralıklarla incelendi. Günlük değerlendirmelerde gelişim oranları toplam sayı olarak verildi. Gruplara ait embriyoların gelişim oranları Tablo 4.5'te özetlendi.

Tablo 4.5. Direkt kültüre edilen embriyoların gelişim durumları

	Toplam Embriyo	Expanded Blastosist (Ort±SS)			Hatching (Ort±SS)		
		24. Saat	48. Saat	72. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Grup Kontrol	61	35,5±32,8	43,1±31,7	55,9±36,5	16,7±31,7	30,2±34,1	31,7±33,0
Grup LK	56	24,2±41,5	34,6±40,3	55,2±46,8	0,5±1,8	4,2±12,0	10,9±19,4
P		0,227	0,506	0,946	0,098	0,020*	0,058

*p<0,05

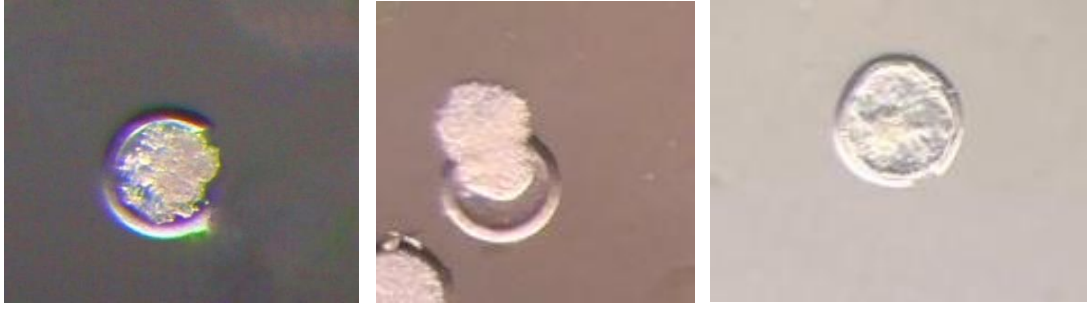
“Expanded Blastosist (%)” oranı 24. saat (p>0,05), 48. saat (p>0,05) ve 72. saat sonunda (p>0,05) istatistiksel olarak anlamlı değildi. “Hatching/Hatched blastosist” oranlarında 24. saat sonunda (p>0,05) istatistik farkın olmadığı, 48. saat sonunda (p<0,05) ise anlamlı farkın varlığı tespit edildi. Ancak 72. saatin sonunda (p>0,05) istatistik farkın ortadan kalktığı belirlendi. Sonuç olarak L-karnitin varlığının dondurma işlemi yapılmadan kültüre edilen embriyolarda gelişim oranının değiştirmedığı tespit edildi.



Şekil 4.5. Embriyoların gelişim aşamaları; A: Expanded blastosist, B: Hatching blastosist, C: Hatched blastosist

4.4. Embriyoların Yavaş Dondurulması ve Çözdürme Sonrası Bulguları

Kültürün 6. gününde Grup YD’de 13 dejenere, 21 morula, 6 erken blastosist, 30 blastosist ve 1 tane hatching aşamasında olmak üzere toplam 71 embriyo bulunmaktaydı. Grup LK-YD’de 18 dejenere, 14 morula, 6 erken blastosist, 33 blastosist olmak üzere toplam 71 embriyo bulunmaktaydı. Çalışma 6 tekrar yapılarak embriyolar toplandı. Erken blastosist ve blastosist aşamasında bulunan embriyolar dondurulurken, diğer embriyolar çalışma dışında bırakıldı. Dondurulan embriyolar sıvı azot içerisinde depolandı. Embriyolar çözündürüldükten sonra tekrar kendi kültür medyumlarına (L-karnitin içeren veya L-karnitin içermeyen kültür ortamı) konularak 24 saat aralıklarla 3 gün boyunca gelişimleri değerlendirildi. Grup YD’de 6 erken blastosist ve 30 blastosist olmak üzere toplam 36, Grup LK-YD’de 6 erken blastosist ve 33 blastosist olmak üzere toplam 39 embriyo donduruldu. Çözdürme işlemi sonucunda grup YD’de 1 embriyonun parçalandığı, 2 (%5,56) embriyoda ise zona pellusida kırığı görüldü (Şekil 4.6). Çalışmaya 35 embriyo ile devam edildi. Grup LK-YD’de ise kayıp görülmeyi, ancak 5 (%12,82) embriyoda zona pellusida kırığı tespit edildi. Çalışmaya 39 embriyo ile devam edildi. Her iki grup içinde zona pelluside kırıkları dikkate alınmadan çalışma sürdürüldü. Çözdürme sonrası kültüre alınan embriyoların, expanded blastosist ve hatching/hatched blastosist aşamasına ulaşması 24, 48 ve 72. saatlerde takip edildi. Yavaş dondurulan embriyoların çözündürüldükten sonra gelişim oranlarının karşılaştırmaları Tablo 4.6’da verildi.



Şekil 4.6. Yavaş dondurma sonrası çözündürülen embriyolarda görülen zona pellusida kırıkları.

Tablo 4.6. Yavaş dondurulan embriyoların çözündürüldükten sonra gelişim oranlarının karşılaştırılması

	Toplam Embriyo Sayısı	Expanded Blastosist (Ort±SS)			Hatching/Hatched Blastosist (Ort±SS)		
		24. Saat	48. Saat	72. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Grup YD	35	9,3±14,8	13,0±20,4	19,0±23,1	0,0±0,0	5,6±13,6	5,6±13,6
Grup LK-YD	39	22,2±19,5	49,3±41,4	49,3±41,4	0,0±0,0	12,5±20,9	20,8±24,6
p		0,198	0,113	0,148	-	0,528	0,214

Bağımsız Örneklem T Testi, Mann-Whitney U Testi

Yapılan analiz sonuçlarına göre, 24. saat ($p>0,05$), 48. saat ($p>0,05$) ve 72. saat ($p>0,05$) sonunda “Expanded Blastosist” oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi. “Hatching/Hatched Blastosist” oranlarının 48 ($p>0,05$) ve 72. saat sonunda ($p>0,05$) anlamlı fark olmadığı belirlendi.

4.5. Embriyoların Vitrifikasyonu ve Çözdürme Sonrası Bulguları

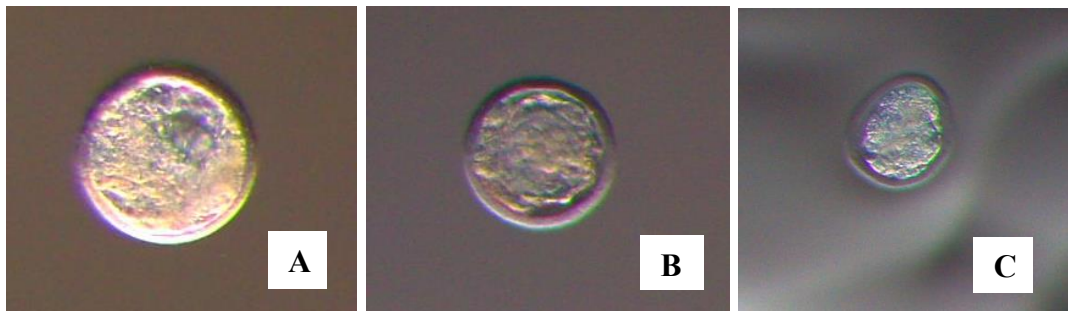
Kültürün 6. gününde L-karnitin içermeyen grupta (Grup VİT) 19 dejenere, 13 morula, 1 tane erken blastosist, 26 tane blastosist ve 5 tane expanded blastosist aşamasında olmak üzere toplam 64 embriyo bulunmaktaydı. L-karnitin içeren grupta (Grup LK-VİT) 19 dejenere, 13 morula, 4 erken blastosist, 28 blastosist ve 6 tane expanded blastosist aşamasında olmak üzere toplam 70 embriyo bulunmaktaydı. Çalışma 5 tekrar yapılarak embriyolar toplandı. Erken blastosist ve blastosist aşamasında embriyolar vitrifiye edilirken (Şekil 4.7), diğer embriyolar vitrifiye işleminde kullanılmadı. Vitrifiye edilen embriyolar sıvı azot içerisinde depolandı. Çözdürülen embriyolar tekrar kendi kültür medyumlarına (L-karnitin içeren veya L-

karnitin içermeyen kültür ortamı) konularak 24 saat aralıklarla 3 gün boyunca gelişimleri değerlendirildi (Şekil 4.8). Grup VİT’de 1 erken blastosist ve 26 blastosist olmak üzere toplam 27 embriyo vitrifiye edildi. Grup LK-VİT’de 4 erken blastosist ve 28 blastosist olmak üzere toplam 32 embriyo donduruldu. Grup VİT’ de çözündürülen embriyoların 1 tanesi çözündürme aşamasında parçalandı ve çalışmaya 26 embriyo ile devam edildi. Grup LK-VİT’de ise çözündürme sırasında 3 embriyo parçalandı ve 29 embriyo ile çalışmaya devam edildi. Vitrifiye embriyoların çözündürüldükten sonra gelişim oranlarının karşılaştırmaları Tablo 4.7’de verildi.

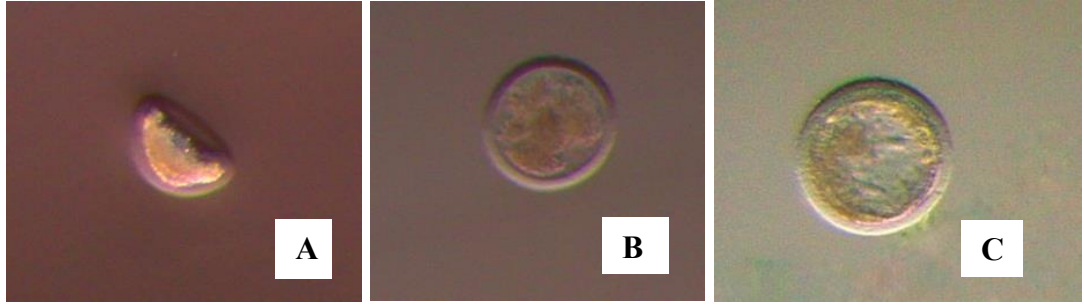
Tablo 4.7 Vitrifiye embriyoların çözündürüldükten sonra gelişim oranlarının karşılaştırılması.

	Toplam Embriyo Sayısı	Expanded Blastosist (Ort±SS)			Hatching/Hatched Blastosist (Ort±SS)		
		24. Saat	48. Saat	72. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Grup VİT	26	10,5±17,4	10,5±17,4	14,5±26,0	6,5±9,3	10,5±17,4	10,5±17,4
Grup LK-VİT	29	34,2±20,1	34,2±20,1	36,7±17,3	10,9±17,4	9,6±15,3	23,6±10,9
p		0,056	0,056	0,090	0,814	0,278	0,110

Yapılan analiz sonuçlarına göre, 24. saat ($p>0,05$), 48. saat ($p>0,05$) ve 72. saat ($p>0,05$) sonunda “Expanded Blastosist” ve “Hatching/Hatched Blastosist” oranları arasında istatistiksel anlamda farklılık olmadığı tespit edildi.



Şekil 4.7. Embriyoların vitrifikasyonu sırasında alınan görüntüler. A:Kültür medyumundaki blastosist görüntüsü, B: VD1 görüntü, C:VD2 görüntü.



Şekil 4.8. Vitrifiye edilen embriyoların çözündürülme aşamasında alınan görüntüler. A: Çözdürme aşamasında VÇ1 görüntü, B: VÇ2 görüntü, C: Çözdürme sonrası kültür medyumundaki görüntü.

Tüm gruplarda bulunan embriyoların gelişim oranlarının karşılaştırılması Tablo 4.8’de verildi.

Tablo 4.8. Tüm gruplarda bulunan embriyoların gelişim oranlarının karşılaştırılması

	Toplam Embriyo Sayısı	Expanded Blastosist (Ort±SS)			Hatching/Hatched Blastosist (Ort±SS)		
		24. Saat	48. Saat	72. Saat	24. Saat	48. Saat	72. Saat
Grup Kontrol	61	35,5±32,8	43,0±31,7	55,9±36,5	16,7±31,7	30,2±34,1	31,7±33,0
Grup LK	56	24,2±41,5	34,6±40,3	55,2±46,8	0,5±1,8	4,2±12,0	10,9±19,4
Grup YD	35	9,3±14,8	13,0±20,4	19,0±23,1	0,0±0,0	5,6±13,6	5,6±13,6
Grup LK-YD	39	22,2±19,5	49,3±41,4	49,3±41,4	0,0±0,0	12,5±20,9	20,8±24,6
Grup VİT	26	10,5±17,4	10,5±17,4	14,5±26,0	6,5±9,3	10,5±17,4	10,5±17,3
Grup LK-VİT	29	34,2±20,1	34,2±20,1	36,7±17,3	10,9±17,4	19,6±15,3	23,6±10,9
p		0,225	0,147	0,150	0,315	0,100	0,112

Kruskal Wallis H Testi

Yapılan analiz sonuçlarına göre, 24, 48 ve 72. saat sonunda “Expanded Blastosist” ve “Hatching/Hatched Blastosist” oranlarının karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Sığır embriyolarının in vitro üretimi dünya genelinde giderek artmaktadır. Hatta son yıllarda üretilen IVP embriyo sayılarının, IVD embriyo sayılarını geçtiği görülmektedir. Elde edilen embriyolar taze transfer edilebildiği gibi dondurularak uzun süre saklanabilmektedir. Başarılı şekilde dondurulan embriyoların çözündürüldükten sonra transfer edilmesiyle canlı yavrular alınabilmektedir. İn vitro embriyoların yavaş dondurmaya karşı duyarlı olduğu bilinmektedir. IVP embriyoların IVD embriyolara göre daha hassas olması özel dondurma yöntemlerine gereksinim oluşturmaktadır. Her ne kadar IVP embriyo kriyoprezervasyonunun geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmış olsa da standart bir protokol belirlenememiştir.

Gelişen biyoteknoloji ile birlikte çiftliklerde yetiştirilen, soyu tükenmekte olan veya zorunlu olarak kesime giden genetik olarak üstün özelliklere sahip hayvanlardan embriyolar üretilmektedir. Embriyo üretimi sırasında kültür ortamı, embriyoların metabolizması, gelişim hızları, kriyoprezervasyona duyarlılıkları, oksidatif stres yanıtı ve lipid metabolizması üzerinde kalıcı etkilere sahiptir. Yağ asitlerinin kültür ortamından uzaklaştırılması erken embriyonik dönemde gelişimi olumlu etkilemektedir (Yotsushima ve ark., 2004). Sığır IVP embriyolarının kriyoduyarlılığını azaltmak için, oosit veya embriyoların lipid birikimini azaltabilen moleküller kullanılabilmektedir. L-karnitin, oosit olgunlaşmasını ve domuzlarda embriyonik gelişimi artırabilecek ATP üretimi için yağ asidini mitokondriye taşıyarak β -oksidasyonunda önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (Somfai ve ark., 2011; Wu ve ark., 2011a). Sunulan bu çalışmada IVP embriyoların kültür ortamına L-karnitin eklenmesinin dondurma üzerine etkisi araştırıldı.

Oosit aspirasyonu; Mezbahada toplanan sığır ovaryumlarından oosit elde etmek için genellikle aspirasyon tekniği kullanılmaktadır. Aspirasyon yöntemi yaygın bir şekilde kullanılmasına rağmen ovaryum üzerinde bulunan foliküllerin %30 ile 60 kadarından oosit toplanabilmektedir (Ahmed ve ark., 2015; Gordon, 2003; Zarcula ve ark. 2012). Ahmed ve ark. (2015) oosit başına 1,37 A ve 0,96 B kalite olmak üzere toplam 2,33 kaliteli oosit topladıklarını bildirmektedir. Khandoker ve ark. (2016), üzerinde CL bulunan ovaryumlardan 4,8 adet, CL bulunmayan ovaryumlardan ise 2,8 olmak üzere ortalama 3,8 kaliteli oosit aspire etmişlerdir. Satılmış (2019) aspirasyon

ile oosit başına toplanan A ve B kalitede 4,19 oosit elde etmiştir. Sunulan bu çalışmada ovaryum başına 1,56 A kalitede ve 0,92 B kalitede olmak üzere ortalama 2,48 kaliteli (A ve B kalite) oosit elde edildi. Elde edilen sonuçlar, Ahmed ve ark. (2015) ile paralel bulunurken, Khandoker ve ark. (2016) ve Satılmış (2019)'a göre düşük bulunmuştur. Toplanan oosit sayılarındaki farklılıklar, hayvanın bireysel özellikleri, çevre şartları, kesim öncesi döl verimleri, ovaryum üzerinde CL varlığı ve aspirasyonu yapan pratisyen farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Oositlerin maturasyonu; Oositin kalitesi maturasyon başarısını, fertilizasyonu ve embriyo gelişimini etkilemektedir (Sirard ve ark., 2006). Kaliteli oositlerin kullanıldığı IVP çalışmalarında, maturasyon oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Protokollerde genellikle A kalite immatür oositler tercih edilmektedir. Maturasyon çalışmalarında A kalite oositlerin kullanılmasında metafaz II'ye (%MII) ulaşan oosit oranının %81,8 olduğu bildirilmektedir. B ve C kalitede oositlerin tercih edilmesinde ise başarının sırasıyla %57,1 ve %38,5 olduğu tespit edilmiştir (Kakkassery ve ark., 2010). Akyol ve ark. (2007) A-B kalitede sığır oositlerinin kullanıldığı araştırmada maturasyon başarısı %92 olduğunu bildirmektedir. Satılmış (2019), A ve B kalitede immatür oositlerin kullanıldığı çalışmasında maturasyon oranını %87,42 bulmuştur. Zhang ve ark. (1995) oosit kalitelerinin embriyo gelişimi üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada maturasyon oranlarını %93-96 olduğunu bildirmektedir. Güler (2018) sığır oositlerinde IVM başarısının %96 olarak bulmuştur. Sunulan çalışmada A ve B kaliteli immatür oositler kullanılarak, IVM başarı oranını yukarıda bahsedilen literatürlere paralel olarak %94,91 olduğu belirlendi. Çalışmalar arasındaki farklılıklar oositlerin toplandığı hayvanın genel durumu, siklusun dönemi, maturasyon süresi, pH, sıcaklık gibi birçok faktörden kaynaklanabilmektedir. Yapılan araştırmalarda IVM başarısına birçok faktörün etki ettiği bildirilmektedir. Oositlerin toplandığı hayvanın fizyolojik durumu, östrus siklusu, siklusun dönemi, foliküler dalgalanmalar, folikül çapı, kumulus oosit kompleksi, oositin kalitesi ve maturasyon için geçen süre gibi faktörler örnek olarak verilmektedir(Gordon, 2003). Ayrıca medyumların pH'sı osmotik basıncı ortam sıcaklığı, nem ve çevresel gaz bileşimi de maturasyon başarısını etkilemektedir (Matsuo ve ark., 2017). Tüm bunların yanısıra morfolojik derecelendirme subjektif

olup, IVM başarısında önemli bir varyasyon kaynağı olabilmektedir (Rocha ve ark., 2016; Viswanath ve ark., 2016).

Klivaj oranları; Carrillo-González ve ark. (2021) 38,5°C, %5 CO₂, %90 bağıl nem içeren ortamda gerçekleştirildiği çalışmada, sığır embriyolarının IVK medyumuna 1,5 mM L-karnitin eklenmesinin klivaj oranlarını etkilemediğini bildirmektedirler. Araştırma sonuçlarında kontrol grubunda %68,3, L-karnitin grubunda ise %67,1 klivaj oran tespit edildiği bildirilmektedir. Zolini ve ark. (2019) OPU yöntemiyle topladıkları oositlerin kültür medyumuna 0,75 mM L-karnitin eklenmesinin klivaj oranlarını arttırmadığını tespit etmişlerdir. L-karnitin eklenen grupta %76,4, L-karnitin eklenmeyen grupta ise %78,8 klivaj oranı bildirilmektedir (Zolini ve ark., 2019). Takahashi ve ark. (2013) 1,518 mM L-karnitin eklenen grupta %75,6, L-karnitin yoğunluğun 3,03mM olduğu grupta %76,5 ve kontrol grubunda ise %76,5 klivaj oranı tespit etmişlerdir. Araştırmacılar kültür medyumuna 1,518 mM ve 3,03mM yoğunluklarında L-karnitin eklenmesinin klivaj oranlarını arttırmadığını bildirilmektedir. Phongnimitr ve ark. (2013) 38,5°C ve %5 CO₂ ortamında IVK medyumlarına L-karnitin eklenmesi durumunda klivaj oranlarının %67,8 olduğunu ve L-karnitin klivaj oranlarını iyileştirmede etkili olmadığını tespit etmişlerdir. Nikoloff ve ark. (2019) L-karnitine benzer antioksidan olan sisteaminin IVP embriyolarda eikosapentaenoik asit (EPA) ve vitamin E'nin tek başına veya birlikte kombinasyonlarının embriyo gelişimi üzerine etkisini araştırmışlardır. Araştırmacılar kültür ortamının 39°C, %7 O₂, %5 CO₂, %88 N₂ olduğunu ve medyumların her 48 saatte bir değiştirildiği çalışmada IVF sonrası 3. günde kontrol grubunda toplam klivaj oranlarını %73,6 olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda da, yukarıda sunulan çalışmalara benzer şekilde kültür ortamına L-karnitin eklenmesinin, klivaj oranlarını etkilemediği tespit edildi. Yukarıda sunulan çalışmalara benzer olarak, 39°C, %5 O₂, %5 CO₂, %90 N₂ ortamda gerçekleştirildiğimiz çalışmamızda kültür ortamına L-karnitin eklenen grupta klivaj oranı %60,7, eklenmeyen grupta %60,6 olduğu tespit edildi. Çalışmalar arasındaki klivaj oran farklılıklarının ise kullanılan L-karnitin yoğunluğu, kültür medyumları, hayvan materyali, oositlerin elde edilme yöntemleri, seçilen oosit kaliteleri, laboratuvar ortamı, kişisel tecrübeler ve kültür ortam koşullarından kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Embriyo gelişim oranları; Zolini ve ark. (2019) kültür medyumuna 7. güne kadar 0,75 mM L-karnitin eklenmesi blastosist gelişim oranlarını (kontrol grubu %22,2, L- karnitin grup %20,6) etkilemediğini bildirirken, L-karnitin yoğunluğunun 3,03 mM olmasının ise blastosist gelişim oranlarının azalmasına neden olduğunu belirtmektedirler. Takahashi ve ark. (2013) IVK medyumuna 1,518 mM ve 3,03mM yoğunluklarında L-karnitin eklenmesinin IVF'in 7. gününde blastosist gelişim oranını %40,2 ve %44,6 olacak şekilde arttırdığını bildirmektedir. Aynı çalışmada kontrol grubu için blastosist gelişim oranlarının %32,2 olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda IVK-LK'da blastosist gelişimi %43,1 IVK grubunda ise %36,9 olduğu tespit edildi. L-karnitin eklenen grupta blastosist gelişim oranı sayısal olarak daha yüksek olmasına rağmen istatistiksel anlamda bir fark tespit edilmedi. Farklı çalışmalarda (Dunning ve ark., 2010; Uhde ve ark., 2018), kültür ortamına L-karnitin eklenmesinin β -oksidasyonunu ve embriyo gelişimini olumlu etkilediği bildirilmektedir. Ayrıca enerji kaynağı olan karbonhidratların yokluğunda zigotların bölünmesi önemli ölçüde artmaktadır (Dunning ve ark., 2010). Çalışmamızda elde edilen blastosist gelişim oranları Zolini ve ark. (2019)'dan yüksek, Takahashi ve ark. (2013) ile benzer bulunmuştur. Çalışmamızda elde edilen bulguların Zolini ve ark. (2019)'dan yüksek bulunmasının nedeni, çalışmamızda kültürün 3. günü bölünmeyen ve 2 hücreli embriyoların çalışmadan çıkartılarak, en az 4 ve üzeri hücreye sahip embriyolarla çalışmaya devam edilmesinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Kültüre devam eden embriyoların gelişim oranları; Atmosferik oksijen seviyesinde (%20 O₂) kültürlenmiş oositler yüksek konsantrasyonda ROT üretebilmektedir (Ali ve ark., 2003). Ayrıca β -oksidasyonun yetersizliği de, ROT oluşumunu teşvik etmekte ve DNA hasarına neden olmaktadır. Aşırı ROT üretiminin, β -oksidasyonu bozarak mitokondriyal fonksiyonu modüle ettiği ve artan lipid birikimine yol açtığı bildirilmektedir (Van Hoeck ve ark., 2015). Hücrel makromoleküllere bağlanan ROT lipid peroksidasyonunu arttırmakta ve hücre hasarına neden olmaktadır (Tarín ve Trounson, 1993; Quinn, 1985). Kültür sırasında ROT oluşumunun azaltılmasının, in vitro embriyo gelişimi üzerinde faydalı bir etki göstermesi beklenmektedir. Oksijen radikallerinin in vitro olarak nasıl üretildiği belirsiz olduğu için, kültür koşulları altında gerçekte kaç oksijen radikalının bulunduğunu tahmin etmek çok zordur. Sığır embriyo kültüründe β -merkaptotanol

(Lim ve ark., 1999), sisteamin (de Matos ve ark., 1996), vitamin E (Olson ve Seidel, 2000), allopurinol (Iwata ve ark., 1998), hipotaurin (Fujitani ve ark., 1997) ve süperoksit dismutaz (Iwata ve ark., 1998), sisteamin (Balasubramanian ve Rho, 2007; de Matos ve ark., 2002), sistein, N-asetil-L-sistein, katalaz, süperoksit dismutaz (Ali ve ark., 2003), glutatyon (Deleuze ve Goudet, 2010), melatonin (Remião ve ark., 2016) ve L-karnitin (Somfai ve ark., 2011) gibi antioksidanlar kullanılmaktadır. Glutatyon seviyesinin, L-karnitin takviyesinden sonra arttığı tespit edilmiştir (Mishra ve ark., 2016). Kültür ortamına L-karnitin eklenmesinin β -oksidasyonu ve embriyo gelişimini olumlu etkilediği bildirilmektedir. Ayrıca enerji kaynağı olan karbonhidratların yokluğunda zigotların bölünmesini önemli ölçüde artırmaktadır (Dunning ve ark., 2010; Uhde ve ark., 2018). Domuz oositlerinin maturasyonunda L-karnitin, ROT seviyelerini azaltan güçlü antioksidan özelliği bulunmaktadır (Somfai ve ark., 2011; Wu ve ark., 2011a). Bu özelliğinden dolayı, L-karnitin hücreleri apoptozdan korumakta (Qi ve ark., 2006; Ye ve ark., 2010), mitokondriyal disfonksiyonu önleyebilmekte ve mitokondriyal membranları stabilize edebilmektedir (Pillich ve ark., 2005). Teorik olarak, antioksidanlar sığır embriyo gelişimi üzerinde olumlu etkiler gösterir. Ancak bazı araştırmacılar (Fujitani ve ark., 1997; Iwata ve ark., 1998), oksijen seviyesi veya kültür koşullarına bağlı olarak, embriyo gelişiminde olumsuz etkiler tespit etmişlerdir. Olson ve Seidel (2000) ve de Matos ve ark. (2000)'nın çalışmaları dışında, antioksidanların olumlu etkileri esas olarak %20 oksijen koşullarında elde edilmektedir. Pozitif sonuçlar için kültür ortamının da oldukça önemli olduğu bildirilmektedir. Örneğin TCM199 ile pozitif etkiler elde etmek için 50–100 μ M sisteamin gerekliken (Takahashi ve ark., 1993; de Matos ve ark., 1996) SOF ile yapılan kültür işleminde 25–50 μ M sisteamin gerekmektedir (de Matos ve ark., 2000). Bu durum SOF ortamının zaten embriyoları serbest radikal hasarından koruyabilecek faktörleri içerdiği gerçeğiyle açıklanabilmektedir (Morales ve ark., 1999). Sunulan çalışmada kültürün 7. gününde erken blastosist ve blastosist aşamasına gelen embriyoların 3 gün boyunca kültürde gelişimleri gözlemlendi. Karnitin eklenen grup ile kontrol grubu kıyaslandığında expanded blastosist oranlarının 24, 48 ve 72. saat sonunda değişmediği görüldü. Karnitin eklenen grubun 48. saat değerlendirilmesinde hatching blastosist oranları kontrol grubuna göre istatistiksel olarak düşük bulundu. Ancak 72. saat sonunda ise istatistiksel fark bulunmadı.

Sunulan çalışmada kullanılan kültür medyumunun BSA, vitaminler, amino asitler ve antioksidanlar ile zenginleştirildiği bildirilmektedir. Ancak kullanılan maddelerin yoğunlukları hakkında bilgi bilinmemekteydi. Dolayısıyla antioksidan bulunan bir kültür medyumuna ayrıca antioksidan eklenmesinin, antioksidan yoğunluğunun artmasına ve embriyonik gelişimin olumsuz etkilenmesine neden olabileceği düşünülmektedir. Kültürün 48. saatinde hatching oranlarının düşük olması çalışmanın % 5 O₂ ortamından veya kullanılan L-karnitin yoğunluğundan kaynaklanabileceğini düşündürdü. Yapılacak çalışmalarda ticari bir medyumla değil de tanımlı medyumlarla, farklı L-karnitin yoğunlukları ve O₂ seviyeleriyle çalışmanın tekrarlanması gerekmektedir. Ayrıca çalışmamızda ROT seviyelerine bakılmadı. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında L-karnitin grubunda farkın olmaması ROT değerlerinin birbirine yakın olabileceğini düşündürdü. Yapılacak çalışmalarda ROT değerlendirilmesi ve apoptoz hücre oranlarına bakılması ile L-karnitin etkinliğinin anlaşılmasına katkı sağlanabilir.

Yavaş dondurulan embriyoların gelişim oranları; İn vitro üretilen embriyoların IVD embriyolara göre daha hassas ve kriyoprezervasyona karşı daha duyarlı oldukları bilinmektedir. Bu durum IVP embriyoların sahada kullanımını sınırlamaktadır (Fair ve ark., 2001). Sığır IVP embriyolarında sitoplazmik lipit birikimi, düşük kriyotolerans ile ilişkilendirilmektedir. Üretilen IVP ve IVD embriyolar moleküler düzeyde olduğu kadar morfolojik ve metabolik düzeyde de farklılıklar göstermektedir (Abe ve ark., 2002; Leese ve ark., 2008; Rizos ve ark., 2002). Zolini ve ark. (2019) IVP embriyoların kültür medyumuna 7. güne kadar 0,75 mM L-karnitin eklenmesinin, yavaş dondurulan embriyolarda hayatta kalma oranını artırdığını bildirmektedir. Aynı çalışmada 0,75 mM L-karnitin re-ekspansiyon oranlarını artırırken, hatching blastosist oranları üzerine etkisi olmadığı görülmüştür. Ayrıca yavaş dondurulan embriyoların transferi sonrasında gebelik oranlarında herhangi bir artış tespit edilmediği bildirilmektedir (Zolini ve ark., 2019). Takahashi ve ark. (2013)'nın, bulgularına göre IVK medyumuna 1,5 mM veya 3,03 mM L-karnitin eklenmesi yavaş dondurulan embriyoların hayatta kalma oranlarını iyileştirmektedir. Çalışmamızda kültür medyumuna L-karnitin eklenmesinin yavaş dondurulan embriyolarda çözdürme sonrası expanded blastosist ve hatching blastosist oranlarını istatistik anlamda iyileştirmede tespit edildi. Ancak L-karnitin eklenen

grupta yavaş dondurulan embriyoların gelişimlerinde 24, 48 ve 72. saatlerde oransal bir artış olduğu gözlemlendi. Gruplar arası bu oransal artış çalışma gruplarının daha fazla materyal ile tekrarlanması durumunda istatistik farkın oluşabileceğini düşündürdü. Lipid metabolizması üzerindeki etkisinden dolayı, kültür medyumlarına L-karnitin eklenilmesi embriyoların kriyotoleransını geliştirmektedir (Held-Hoelker ve ark., 2017; Ruiz ve ark., 2015; Takahashi ve ark., 2013). Yağ asidi içermeyen BSA (EFAF-BSA) ile takviye edilmiş embriyo kültür ortamının L-karnitin ile desteklenmesinin, çözülme sonrası hayatta kalmayı iyileştirdiği, ancak embriyo lipid içeriğini etkilemediği bildirilmektedir (Held-Hoelker ve ark., 2017). Çalışmamızda da yavaş dondurulan embriyoların çözündürme sonrasında expanded ve hatching blastosist oranlarında farklılık olmaması Held-Hoelker ve ark. (2017)'ni destekler niteliktedir. Takahashi ve ark. (2013) ise sığırlardan elde edilen IVP embriyoların kültür medyumuna L-karnitin eklenmesinin lipid içeriğini azalttığını bildirmektedir (Takahashi ve ark., 2013). Bu durum IVP embriyoların kriyotoleransı ile ilişkilendirilmektedir. Çalışma grupları arasında farklılık bulunmaması ise çalışmada kullanılan embriyolara ait lipid içeriğinde istatistiksel anlamda farkın olmamasından kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Lipid metabolizması üzerindeki etkilerinin yanı sıra L-karnitin ROT düzeylerini azaltıcı olumlu etkileri bulunmaktadır (Gülçin, 2006). Dondurma-çözündürme sırasında ROT seviyeleri artmaktadır (Ahn ve ark., 2002). Artan ROT miktarı embriyolarda hasara veya ölüme yol açabilmektedir (Valencia ve Moran 2004). Çalışmamızda L-karnitin eklenen grupta embriyonik gelişimin sayısal olarak artış göstermesi, Ahn ve ark. (2002)'ni destekler nitelikte kültür ortamına eklenen L-karnitin, ROT seviyelerini düşürücü etkisinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla ilerleyen araştırmalarda çalışmaların daha çok sayıyla tekrarlanması ve embriyolarda ROT seviyelerinin ölçülmesi daha anlamlı sonuçların ortaya çıkabileceğini düşündürdü. Dondurularak saklanan embriyoların alıcıya transfer edildikten sonra gebelik oluşturmalarının, kültürde ölçülen hayatta kalma ölçümlerinden daha karmaşık olduğunu göstermektedir (Zolini ve ark., 2019). Böylece embriyo kriyotoleransını iyileştirmeye yönelik yeni yaklaşımlar, yalnızca in vitro ölçümlere dayandırılmamalı, aynı zamanda transferler yapılarak gebelik oranları değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Vitrifiye edilen embriyoların gelişim oranları; Kriyoprezervasyonun, mitokondriyal aktivite veya hücre iskeleti bütünlüğünde değişikliklere neden olduğu (Luciana ve ark., 2013), insan oositlerindeki ATP içeriğini azalttığı ve iğ hasarını indüklediği bildirilmektedir (Manipalviratn ve ark., 2011). Vitrifiye oositlerde gelişim ve fertilizasyon oranlarının düşük olması değiştirilmiş mayotik iğ düzeniği, mikrotübüller, kortikal granül dağılımı, zona pellucida özellikleri ve oositlerin vitrifikasyona bağlı partenogenetik aktivasyonundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Gupta ve ark., 2007; Rojas ve ark., 2004; Shi ve ark., 2007; Somfai ve ark., 2007; Wu ve ark., 2006). Kriyoprezervasyon sonrası hayatta kalan oosit ve embriyolarda ROT birikimi görülmektedir. Artan ROT seviyelerine bağlı olarak mitokondriyal hasar, ATP tükenmesi, döllenme sırasında değişen kalsiyum salınımı (Takahashi ve ark., 2003), apoptoz ve gelişimsel blok (Favetta ve ark., 2007) gibi zararlı etkiler ortaya çıkmaktadır (Ahn ve ark., 2002; Somfai ve ark., 2007). Gupta ve ark. (2010) vitrifikasyonun ROT seviyelerini artırdığını bildirmektedir. Artan ROT domuz oosit veya embriyolarının hayatta kalma ve gelişim yeterliliğini düşürmektedir. Manda oositlerinin IVM ve vitrifikasyon medyumuna asetil-L-karnitin eklenmesi mitokondriyal membran potansiyelini arttırmakta, zarın lipid profilini değiştirmektedir. Dolayısıyla embriyolarda kalite ve kriyotoleransı iyileştirmektedir (Xu ve ark., 2019). Özellikle sığır oositlerinin IVM medyumunda L-karnitin varlığı lipid içeriğini merkezden perifer doğru dağıtmaktadır (Chankitisakul ve ark., 2013). Domuzların IVM medyuma L-karnitin eklenmesinin lipid damlacıklarının transkolasyonuna neden olduğu bildirilmektedir (Xu ve ark., 2020). Kriyoprezervasyon başarısı embriyolarda bulunan lipid miktarı ile ilişkilendirilmektedir (Abe ve ark., 2002; Nagashima ve ark., 1995). Oositlerdeki sitoplazmik lipid damlacıklarının miktarının artışı, oositleri kriyoprezervasyon sırasında soğuk hasarına karşı daha hassas hale getirmektedir. Lipid damlacıklarının mekanik uzaklaştırma veya kimyasal ajanlarla azaltılması ile oositlerin ve embriyoların kriyotoleransını iyileştirilebileceği bildirilmektedir (Ushijima ve ark., 1996). Carrillo-González ve ark. (2021) vitrifiye embriyoların çözündürüldükten sonra expanded ve hatching blastosist oranlarını etkilemediğini tespit etmişlerdir. Araştırmacılar farklılık oluşmama nedeninin embriyoların lipid oranlarının benzerliğinden kaynaklanabileceğini bildirmektedirler. Zolini ve ark. (2019) kültür

ortamına 0,75 mM'de L-karnitin eklenmesinin çözölme sonrası kriyotoleransı iyileştirdiğini, ancak dondurularak saklanan sığır embriyolarının transferinden sonra gebelik ve implantasyon oranı üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. İn vitro embriyolarının kriyo-duyarlılığını azaltmak için, oositlerin veya embriyoların lipid birikimini azaltabilen L-karnitin gibi moleküller kullanılabilir. Domuzlarda yapılan çalışmalarda L-karnitin, oosit maturasyonunu ve embriyonik gelişimi iyileştirebildiği bildirilmektedir. L-karnitin ATP üretimi için yağ asidini mitokondriye taşıyarak β -oksidasyonda önemli bir rol oynamaktadır. Dolayısıyla L-karnitin mitokondriyal aktiviteyi artırdığı, sığır ve fare oositlerinde β -oksidasyonu uyardığı bildirilmektedir (Somfai ve ark., 2011; Wu ve ark., 2011a). Çalışmamızda kültür medyumuna L-karnitin eklenmesinin vitrifiye edilen embriyolarda çözölme sonrası expanded blastosist ve hatching blastosist oranlarını istatistik anlamda iyileştirmediği tespit edildi. Ancak L-karnitin eklenen grupta vitrifiye embriyoların gelişimlerinde 24, 48 ve 72. saatlerde oransal bir artış dikkat çekiciydi. Çalışmamızda kullanılan embriyoların lipid miktarına bakılmadı. Dolayısıyla farklılığın oluşmaması Carrillo-González ve ark. (2021) destekler nitelikte kullanılan embriyolarda lipid içeriklerinin istatistiki olarak farklı olmamasından kaynaklanabileceğini düşündürdü. Gupta ve ark. (2010) vitrifikasyonun ROT seviyelerini artırdığını bildirmektedir. Artan ROT miktarı oosit ve embriyolarda hasara veya ölüme yol açabilmektedir (Valencia ve Moran 2004). Çalışmamızda L-karnitin eklenen grupta embriyonik gelişimin sayısal olarak artış göstermesi, L-karnitin ROT seviyelerini düşürücü etkisinden kaynaklanmış olabilir. Dolayısıyla yapılacak farklı çalışmalarda materyal sayısı artırılarak ve embriyolarda ROT seviyeleri ölçülerek daha anlamlı sonuçların ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- ✓ Çalışma gruplarında bulunan embriyo sayılarının mümkün olduğunca fazla olması, istatistiksel açıdan sağlıklı sonuçların çıkmasına katkı sağlayabilir.
- ✓ Eğer çalışmalarda ticari medyum kullanılacaksa, kullanılan medyumun antioksidan içeriğinin ve yoğunluğunun bilinmesi gereklidir. Ticari medyumda antioksidan varlığı, L-karnitin ilavesinin etkilerini maskeleyebilir.
- ✓ Yapılacak çalışmalarda embriyolara ait lipid içerikleri ve ROT seviyelerinin ölçülerek değerlendirilmesi önerilmektedir.
- ✓ Yapılacak araştırmalarda vitrifikasyon, yavaş dondurma ve çözündürme medyumlarına L-karnitin eklenerek üretilen embriyoların, transfer edilip gebelik oranlarının değerlendirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdoon ASS (2022).** Factors affecting in vitro production of bovine embryos. <https://esarf2.tripod.com/abdoon.htm> (Erişim tarihi:13.06.2022).
- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H (2002).** Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.*, **61**, 57-66.
- Ahmed JA, Dutta D, Nashiruddullah N (2015).** Recovery of different cumulus oocyte complex (COC) grades from bovine ovaries by aspiration method. *J. Anim. Res.*, **5(3)**, 631.
- Ahn HJ, Sohn IP, Kwon HC, Jo DH, Park YD, Min CK (2002).** Characteristics of the cell membrane fluidity, actin fibers, and mitochondrial dysfunctions of frozenthawed two-cell mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, **61**, 466e76.
- Akyol N, Kızıl SH, Karaşahin T (2007).** İn vitro sığır embriyosu üretim ve transferi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, **47(1)**, 1-8.
- Ali J (1992).** *Factors affecting ultra rapid vitrification and cryopreservation of embryos.* The Australian National University. PhD Thesis. Canberra, Australia.
- Ali J, Shelton J (1993).** Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. *Reproduction*, **99**, 471-477.
- Ali AA, Bilodeau JF, Sirard MA (2003).** Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*. **59**, 939-949.
- Al-Katanani Y, Paula-Lopes F, Hansen P (2002).** Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in holstein cows. *J. Dairy Sci.*, **85**, 390-396.
- Alvarenga MA, Alvarenga FC, Moreira RM, Cesarino MM (2000).** Acrozoal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packing systems. *EVJ.*, **32**, 541-545.
- Amorim CA, Curaba M, Van Langendonck A, Dolmans MM, Donnez J (2011).** Vitrification as an alternative means of cryopreserving ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online.*, **23**, 160-186.
- An Q, Peng W, Cheng Y, Lu Z, Zhou C, Zhang Y, Su J (2019).** Melatonin supplementation during in vitro maturation of oocyte enhances subsequent development of bovine cloned embryos. *J. Cell. Physiol.*, **234(10)**, 17370-17381.
- Arav A (2014).** Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, **81**, 96-102.

Arav A, Shehu D, Mattioli M (1993). Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. *J. Reprod. Fert.*, **99**, 353-358.

Arav A, Yavin S, Zeron Y, Natan Y, Dekel I, Gacitua H (2002). New trend in gamete's cryopreservation. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **187**, 77-81.

Arav A, Zeron Y (1997). Vitrification of bovine oocytes using modified minimum drop size technique (MDS) is affected by the composition and the concentration of the vitrification solution and by the cooling conditions. *Theriogenology*, **47**, 341.

Aydiner F (2008). *Sperm kriyoprezervasyonu sonrasında apoptozun değerlendirilmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

Báez F, Camargo Á, Reyes AL, Márquez A, Paula-Lopes F, Viñoles C (2019). Time-dependent effects of heat shock on the zona pellucida ultrastructure and in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Reprod. Biol.*, **19(2)**, 195-203.

Balasubramanian S, Rho GJ (2007). Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, **98(3-4)**, 282-292.

Baldoceda L, Gilbert I, Gagné D, Vigneault C, Blondin P, Ferreira CR, Robert C (2016). Breed-specific factors influence embryonic lipid composition: Comparison between Jersey and Holstein. *Reprod. Fertil. Dev.*, **28**, 1185-1196.

Bank H, Maurer RR (1974). Survival of frozen rabbit embryos. *Exp. Cell. Res.*, **89(1)**, 188-196.

Barcelo-Fimbres M, Seidel GE (2007). Effects of fetal calf serum, phenazine ethosulfate and either glucose or fructose during in vitro culture of bovine embryos on embryonic development after cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.*, **74**, 1395-1405.

Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr I (1992). Development of in vitro matured/in vivo fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, **37**, 127-147.

Beebe D, Wheeler M, Zeringue H, Walters E, Raty S (2002). Microfluidic Technology For Assisted Reproduction. *Theriogenology*, **57**, 125-135.

Bhattacharya S (2018). Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. *Cryopreserv.* <https://cdn.intechopen.com/pdfs/64165.pdf> (Erişim Tarihi:16.4.2022).

Bilton RJ, Moore NW (1977). Frozen storage of embryos of farm animals: progress and implications. *Ciba Found Symp Jan* **18-20 (52)**, 203-219 Cited In: Ali J. Factors affecting ultra rapid vitrification and cryopreservation of embryos. The Australian National University, 1992.

Block J, Bonilla L, Hansen PJ (2010). Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. *J. Dairy. Sci.*, **93**, 5234-5242.

Blondin P (2017). Logistics of large scale commercial IVP embryo production. *Reprod. Fert. Dev.*, **29**, 32-36.

Boediono A, Saha S, Sumantri C, Suzuki T, Rajamahendran R (1995). Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production in vitro in cattle. *Theriogenology*, **1**, 169.

Bó GA, Mapletoft RJ (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Anim. Reprod.*, **10(3)**, 344-348.

Braga JV, Komninou ER, Vieira AD, Mondadori RG (2019). Approaches to reduce lipids: A review of its impacts on in vitro embryo production. *Rev. Bras. de Zootec.*, **43**, 3-7.

Brito DC, Domingues SF, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Santos RR, Pieczarka JC (2018). Vitrification of domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue: effects of three different sugars. *Cryobiology*, **83**, 97-99.

Bruyere P, Baudot A, Guyader-Joly C, Guerin P, Louis G, Buff S (2012). Improved cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos using a chemically defined freezing medium. *Theriogenology*, **78**, 1294-1302.

Bucak MN, Satılmış M, Kızıl SH, Karaşahin T, Akyol N (2010). Sığır embriyolarının in vitro gelişiminde kültür medyumlarına katılan antioksidanların etkisi. *Kafkas Üniv. Vet. Fak. Derg.*, **16 (1)**, 69-74.

Camargo LSA, Viana JHM, Sá WF, Ferreira AM, Ramos AA, Vale Filho VR (2006). Factors influencing in vitro embryo production. *Anim. Reprod. Sci.*, **3**, 19-28.

Carolan C, Kuran M, Robinson JJ, Broadbent PJ, Sinclair KD (1999). Ovine embryo development in culture systems causing fetal oversize. *Theriogenology*, **51**, 233-233.

Carrillo-González DF, Hernández-Herrera DY, Maldonado-Estrada JG (2021). The role of L-carnitine in bovine embryo metabolism. A review of the effect of supplementation with a metabolic modulator on in vitro embryo production. *Anim. Biotechnol.*, **21**, 1-11.

Chankitisakul V, Somfai T, Inaba Y, Techakumphu M, Nagai T (2013). Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology*, **79(4)**, 590-598.

Chupin D, De Reviers MM (1986). Quick freezing of rat embryos. *Theriogenology*, **26(2)**, 157-166.

Clemens RA, Jones JM, Kern M, Lee SY, Mayhew EJ, Slavin JL, Zivanovic S (2016). Functionality of sugars in foods and health. *Compr. Rev. Food Sci. Food. Saf.*, **15**, 433-470.

Cooke S, Quinn P, Kime L, Ayres C, Tyler JP, Driscoll GL (2002). Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. *Fertil. Steril.*, **78(6)**, 1254-1260.

Crowe J, Crowe L, Mouradian R (1983). Stabilization of biological membranes at low water activities. *Cryobiology*, **20 (3)**, 346-356.

Czlonkowska M, Eysymont U, Guskiewicz A, Kossakowski M, Dziak J (1991). Birth of lambs after in vitro maturation, fertilization, and coculture with oviductal cells. *Mol. Reprod. Dev.*, **30**, 34-38.

Çevik M, Koçyiğit A, Şen U, Kuran M (2014). Can Sequential Human Embryo Culture Media be Used in Bovine in vitro Embryo Culture? *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, **20(1)**, 145-149.

De Castro MV, Cortell C, Vicente J (2010). Dextran vitrification media prevents mucin coat and zona pellucida damage in rabbit embryo. *Theriogenology*, **74**, 1623-1628.

De Matos DG, Furnus CC, Moses DF, Martinez AG, Matkovic M (1996). Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Mol. Reprod. Dev.*, **45(4)**, 451-457.

De Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG (2002). Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology*, **57**, 1443-1451.

De Matos DG, Herrera C, Nogueira D, Donaldson M, Pasqualini RS (2000). Stimulation of glutathione synthesis during in vitro maturation and in vitro culture of bovine oocytes. *J. Reprod. Fertil.*, **25**, 75.

De Wit AA, Wurth Y, Kruip TA (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J. Anim. Sci.*, **78(5)**, 1277-1283.

Del Collado M, Saraiva NZ, Lopes FL, Gaspar RC, Padilha LC, Costa RR, Rossi GF, Vantini R, Garcia JM (2016). Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.*, **28**, 1721-1732.

Deleuze S, Goudet G (2010). Cysteamine supplementation of in vitro maturation media: a review. *Reprod. Domest. Anim.*, **6**, e476-e482.

Dhali A, Kolte AP, Mishra A, Roy SC, Bhatta R (2018). *Cryopreservation of oocytes and embryos: current status and opportunities.* <https://www.intechopen.com/books/7163> (Erişim Tarihi: 2.01.2022).

Dinnyes A, Dai Y, Jiang S, Yang X (2000). High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, **63**, 513-518.

Dochi O (2019). Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos and its application in cattle reproduction management. *J. Reprod. Dev.*, **65(5)**, 389-396.

Donnay I, Partridge RJ, Leese HJ (1999). Can embryo metabolism be used for selecting bovine embryos before transfer? *Reprod. Nutr. Dev.*, **39**, 523-533.

Dos Santos EC, Varchetta R, de Lima CB, Ispada J, Martinho HS, Fontes PK, Nogueira MFG, Gasparrini B, Milazzotto MP (2018). The effects of crocetin supplementation on the blastocyst outcome, transcriptomic and metabolic profile of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, **123**, 30-36.

Dos Santos Neto P, Vilariño M, Barrera N, Cuadro F, Crispo M, Menchaca A (2015). Cryotolerance of Day 2 or Day 6 in vitro produced ovine embryos after vitrification by Cryotop or Spatula methods. *Cryobiology*, **70 (1)**, 17-22.

Dresser BL, Gelwicks EJ, Wachs KB, Keller GL (1988). First successful transfer of cryopreserved feline (*Felis catus*) embryos resulting in live offspring. *J. Exp. Zool.*, **246 (2)**, 180-186.

Dumollard R, Duchen M, Carroll J (2007). The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **77**, 21-49.

Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL (2010). Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol. Reprod.*, **83(6)**, 909-918.

El Mouatassim S, Guerin P, Menezo Y (2000). Mammalian oviduct and protection against free oxygen radicals: expression of genes encoding antioxidant enzymes in human and mouse. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **89**, 1-6.

Elbarbary T (2004). Cryopreservation par vitrification puis transplantation intrauterine de tissu ovarien. Doktora Tezi, Geneve Üniversitesi, Mısır.

Elder K, Dale B (2003). *In-vitro fertilization*. 2nd Edition, Cambridge, Cambridge University Press, 152-224.

Fahy GM, MacFarlane D, Angell CA, Meryman HT (1984). Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, **21**, 407-426.

Fair T, Lonergan P, Dinnyes A, Cottell DC, Hyttel P, Ward FA, Boland MP (2001). Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. *Mol. Reprod.*, **58**, 186-195.

Favetta LA, St John EJ, King WA, Betts DH (2007). High levels of p66shc and intracellular ROS in permanently arrested early embryos. *Free. Radic. Biol. Med.*, **42**, 1201-1210.

Ferraz PA, Burnley C, Karanja J, Viera-Neto A, Santos JE, Chebel RC, Galvão KN (2016). Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenolog.*, **86**, 1834-1841.

Ferré LB, Kjelland ME, Strøbech LB, Hyttel P, Mermillod P, Ross PJ (2020). Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal*, **14(5)**, 991-1004.

Feugang JM, Camargo-Rodríguez O, Memili E (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livestock Sci.*, **121(2-3)**, 141-9.

Flood LP, Shirley B (1991). Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. *Mol. Reprod. Dev.*, **30**, 226-231.

Fujihara M, Kaneko T, Inoue-Murayama M (2019). Vitrification of canine ovarian tissues with polyvinylpyrrolidone preserves the survival and developmental capacity of primordial follicles. *Sci. Rep.* **9**, 1-11.

Fujitani Y, Kasai K, Ohtani S, Nishimura K, Yamada M, Utsumi K (1997). Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro produced bovine embryos. *J. Anim. Sci.*, **75**, 483-489.

Fuller BJ (2004). Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo-Letters*, **25**, 375-388.

Gandolfi F, Brevini TAL, Moor RM (1986). Role of somatic cells in the long-term culture of ovine embryos. In: *Proceedings Society for the Study of Fertility*, Bristol abs. 111.

Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR (2015). Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum. Reprod. Update.*, **21(6)**, 727-747.

Gardner DK, Schoolcraft WB (1999). Culture and transfer of human blastocysts. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, **11**, 307-311.

Ghanem N, Salilew-Wondim D, Gad A, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K, Hoelker M (2011). Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. *Reproduction*, **142(4)**, 551-564.

Gómez E, Carrocera S, Martín D, Pérez-Jánez JJ, Prendes J, Prendes JM, Vázquez A, Murillo A, Gimeno I, Muñoz M (2020). Efficient one-step direct transfer to recipients of thawed bovine embryos cultured in vitro and frozen in chemically defined medium. *Theriogenology*, **1:(146)**, 39-47.

Gordon I (2003). Laboratory production of cattle embryos. Vol. 27, 2nd Edition, CABI Publishing, p: 112-302.

Goto K, Kajihara Y, Koba M, Kosaka S, Nakanishi Y, Ogawa K (1989). In vitro fertilization and development of in vitro matured bovine follicular oocytes. *J. Anim. Sci.*, **67**, 2181-2185.

Greve T, Madison V, Avery B, Callesen H, Hytelt P (1993). In vitro production of bovine embryos. A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Anim. Reprod. Sci.*, **33**, 51-69.

Guerin P, Mouatassim SEI, Menezo Y (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum. Reprod. Update.*, **7**, 175-189.

Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT (2007). Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology*, **67**, 238-248.

Gupta MK, Uhm SJ, Lee HT (2010). Effect of vitrification and beta-mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertil. steril.*, **93(8)**, 2602-2607.

Gülçin I (2006). Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci.*, **78**, 803e11.

Güler Ş (2018). Farklı vitrifikasyon yöntemleri ile dondurulan sığır oositlerinin çözündürme sonrası in vitro maturasyon başarıları. Yüksek Lisan Tezi. Burdur Makü Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur/Türkiye.

Hafez B, Hafez Ese (2000). *Reproduction in farm animals*. 7rd edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p: 431-443.

Hasler JF (2014). Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, **81**, 152-169.

Hayashi S, Kobayashi K, Mizuno J, Saitoh K, Hirano S (1989). Birth of piglets from frozen embryos. *Vet. Rec.*, **8;125(2)**, 43-44.

Held-Hoelker E, Klein SL, Rings F, Salilew-Wondim D, Saeed-Zidane M, Neuhooff C, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M (2017). Cryosurvival of in vitro produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology*, **96**, 145-152.

Holm P, Booth PJ, Callesen H (2002). Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo- and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media. *Reproduction*, **123**, 553-565.

Hubel A, Spindler R, Skubitz AP (2014). Storage of human biospecimens: selection of the optimal storage temperature Biopreserv. *Biobanking*, **12**, 165-175.

Huebinger J, Han HM, Hofnagel O, Vetter IR, Bastiaens PI, Grabenbauer M (2016). Direct measurement of water states in cryopreserved cells reveals tolerance toward ice crystallization, *Biophys. J.*, **110**, 840-849.

Hunt CJ (2017). Cryopreservation: vitrification and controlled rate cooling. *Stem. Cell. Banking.*, **1590**, 41-77.

Hwang IS, Hochi S (2014). Recent progress in cryopreservation of bovine oocytes. *BioMed. Res. Int.*, **2014**, 1-11.

Ishimori H, Saeki K, Inai M, Nagao Y, Itasaka J, Miki Y, Seike N, Kainuma H (1993). Vitrification of bovine embryos in a mixture of ethylene glycol and dimethyl sulfoxide. *Theriogenology*, **40**, 427-433.

Iwata H, Akamatsu S, Minami N, Yamada M (1998). Effects of antioxidants on the development of bovine IVM/IVF embryos in various concentrations of glucose. *Theriogenology*, **50**, 365-375.

Jang TH, Park SC, Yang JH, Kim JY, Seok JH, Park US, Choi CW, Lee SR, Han J (2017). Cryopreservation and its clinical applications. *Integr. Med. Res.*, **6**, 12-18.

Kakkassery MP, Vijayakumaran V, Sreekumaran T (2015). Effect of cumulus oocyte complex morphology on in vitro maturation of bovine oocytes. *J. Vet. Anim. Sci.*, **41**, 12-17.

Kara U (2018). Östrus senkronizasyonu ve süperovulasyon öncesi gonadotropin uygulamasını takiben kısa süreli ekzojen progesteron verilen ve süperovulasyon uygulanan donörler ile klasik süperovulasyon metodu uygulanan donörlerin elde edilen embriyo sayısı ve kalitesi yönünden karşılaştırılması. Doktora Tezi, Erciyes Üniv Sağlık Bil Ens, Kayseri, s.1-124.

Karlsson JOM (2002). Cryopreservation: freezing and vitrification. *Science*, **296**, 655-656.

Karlsson JOM, Toner M (1996). Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. *Biomaterials*, **17**, 243-256.

Kasai M (1996). Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, **42**, 67-75.

Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T, Machida T (1990). A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J. Reprod. Fertil.*, **89(1)**, 91-97.

Kasai M, Niwa K, Iritani A (1980). Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. Reprod. Fertil.*, **59(1)**, 51-56.

Kelly JM, Kleemann DO, Rudiger SR, Walker SK (2007). Effects of grade of oocyte-cumulus complex and the interactions between grades on the production of blastocysts in the cow, ewe and lamb. *Reprod. Dom. Anim.*, **42(6)**, 577-582.

Khandoker MAMY, Atiqah NF, Ariani N (2016). Effect of ovarian types and collection techniques on the number of follicles and the quality of cumulus-oocyte-complexes in cow. *Bang. J. Anim. Sci.*, **45(3)**, 10-16.

Kobayashi K, Yamashita S, Hoshi H (1994). Influence of epidermal growth factor and transforming growth factor- α on in vitro maturation of cumulus cell-enclosed bovine oocytes in a defined medium. *Reproduction*, **100**, 439-446.

Koçyiğit A (2014). *Sığır embriyosunun in vitro üretimi ve vitrifikasyonunda sitokin (LIF) ve büyüme faktörünün (IGF-1) etkileri.* Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Samsun/Türkiye.

Kumar P (2014). *Development of a novel device and improved techniques for bovine oocytes and embryos vitrification.* PhD. Thesis, Suranaree University of Technology, Thailand.

Kumar S (2007). *Cryopreservation of buffalo oocytes by slow freezing and vitrification.* PhD. Thesis, Deemed University, India.

Kuran M (1999). Effect of macroscopic classification of bovine ovarian follicles on steroidogenic activities of granulosa cells in vitro. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, **23**, 197-203.

Kuran M, Robinson JJ, Ranilla MJ, Staines ME, Broadbent PJ (1999). Incidence of fetal oversize in relation to developmental stage of in vitro cultured ovine embryos at transfer. *Theriogenology*, **55**, 240.

Kuwayama M, Kato O (2000). All-round vitrification method for human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **17**, 477.

Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK (1999). Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.*, **72**, 1073-1078.

Leese HJ, Baumann CG, Brison DR, McEvoy TG, Sturmey RG (2008). Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. *Mol. Hum. Reprod.*, **14(12)**, 667-672.

Leibfried-Rutledge ML (1999). Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology*, **51(2)**, 473-485.

Leibo SP, Songsasen N (2002). Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic animals. *Theriogenology*, **57**, 303-326.

Li F, Cui L, Yu D, Hao H, Liu Y, Zhao X, Pang Y, Zhu H, Du W (2019). Exogenous glutathione improves intracellular glutathione synthesis via the γ -glutamyl cycle in bovine zygotes and cleavage embryos. *J. Cell. Physiol.*, **234(5)**, 7384-7394.

Liebermann J, Tucker MJ (2002). Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction*, 124:483-489.

Lim JM, Reggio BC, Godke RA, Hansel W (1999). Development of in vitro derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. *Hum. Reprod.*, 14, 458-464.

Lindner GM, Wright RW Jr (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20(4), 407-416.

Luciana D, Silva RC, Fernanda P, Silva BDM, Neves JP, Lucci CM (2013). Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. *Cryobiology*, 67(2), 137-145.

Lunardi FO, de Aguiar FLN, Duarte ABG, Araújo VR, de Lima LF, de Sá NAR, Correia HHV, Domingues SFS, Campello CC, Smitz J (2016). Ovine secondary follicles vitrified out the ovarian tissue grow and develop in vitro better than those vitrified into the ovarian fragments. *Theriogenology*, 85, 1203-1210.

Magata F, Ideta A, Okubo H, Matsuda F, Urakawa M, Oono Y (2019). Growth potential of bovine embryos presenting abnormal cleavage observed through time lapse cinematography. *Theriogenology*, 133, 119-124.

Mahapatra SK, Chakraborty SP, Majumdar S, Bag BG, Roy S (2009). Eugenol protects nicotine-induced superoxide mediated oxidative damage in murine peritoneal macrophages in vitro. *Eur. J. Pharmacol.*, 623, 132-140.

Mandawala AA, Harvey SC, Roy TK, Fowler KE (2016). Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. *Theriogenology*, 86, 1637-1644.

Manipalviratn S, Tong ZB, Stegmann B, Widra E, Carter J, Decherney A (2011). Effect of vitrification and thawing on human oocyte ATP concentration. *Fertil. Steril.*, 95(5), 1839-1841.

Martino A, Songsasen N, Leibo SP (1996). Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54, 1059-1069.

Massip A (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod. Dom. Anim.*, 36(2), 49-55.

Massip A, Van der Zwalmen P, Ectors F (1987). Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27, 69-79.

Matsumoto H, Jiang JY, Tanaka T, Sasada H, Sato E (2001). Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*, 42, 139-144.

Matsuo M, Sumitomo K, Ogino C, Gunji Y, Nishimura R, Hishinuma M (2017). Three-step in vitro maturation culture of bovine oocytes imitating temporal changes of

estradiol-17 β and progesterone concentrations in preovulatory follicular fluid. *Arch. Anim. Breed.*, **60**(4), 385-390.

Maturana D, Jorge Gómez O, Giovanni Restrepo B (2019). Efecto de la quercetina sobre la tasa de desarrollo y la viabilidad de embriones bovinos producidos in vitro. *Rev. Inv. Vet. Perú.*, **30**(2), 775-786.

Mazur P (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*, **247**(3 Pt 1), C125–C142 Review.

Mazur P, Miller RH, Leibo SP (1974). Survival of frozen-thawed bovine red cells as a function of the permeation of glycerol and sucrose. *J. Membr. Biol.*, **15**(2), 137-158.

McEvoy TG, Sinclair KD, Young LE, Wilmut I, Robinson JJ (2000). Large offspring syndrome and other consequences of ruminant embryo culture in vitro: Relevance to blastocyst culture in human ART. *Hum. Fertil.*, **3**, 238-246.

Menezo Y (2004). Cryopreservation of IVF embryos: which stage? *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, **113**, 28-32.

Mishra A, Reddy IJ, Gupta PSP, Mondal S (2016). L-carnitine Mediated Reduction in Oxidative Stress and Alteration in Transcript Level of Antioxidant Enzymes in Sheep Embryos Produced In Vitro. *Reprod. Domest. Anim.*, **51**, 311-321.

Morales H, Tilquin P, Rees JF, Massip A, Dessy F, Van Langendonck A (1999). Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, **52**(2), 149-57.

Mukaida T, Takahashi K, Kasai M (2003). Blastocyst cryopreservation: ultrarapid vitrification using cryoloop technique. *Reprod. Biomed.*, **6**(2), 221-225.

Murillo A, Muñoz M, Martín-González D, Carrocera S, MartínezNistal A, Gómez E (2017). Low serum concentration in bovine embryo culture enhances early blastocyst rates on Day-6 with quality traits in the expanded blastocyst stage similar to BSA-cultured embryos. *Reprod. Biol.*, **17**, 162-171.

Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Nottle MB (1995). Cryopreservation of porcine embryos. *Nature*, **374**(6521), 416.

Nakashima A, Ino N, Kusumi M, Ohgi S, Ito M, Horikawa T, Nakagawa K, Saito T, Kamura T, Saito H (2010). Optimization of a novel nylon mesh container for human embryo ultrarapid vitrification. *Fertil. Steril.*, **93**, 2405-2410.

Nematollahi–Mahani SN, Nematollahi–Mahani A, Moshkdanian G, Shahidzadehyazdi Z, Labibi F (2009). The role of co–culture systems on developmental competence of preimplantation mouse embryos against pH fluctuations. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **26**, 597-604.

Nikoloff N, Campagna A, Luchetti C, Carranza-Martín AC, Pascua AM, Anchordoquy JM, Anchordoquy JP, Lombardo DM, Seoane A, Furnus CC

(2019). Effects of EPA on bovine oocytes matured in vitro with antioxidants: Impact on the lipid content of oocytes and early embryo development. *Theriogenology*, **1**;146, 152-161.

Olson SE, Seidel GE (2000). Culture of in vitro produced bovine embryos with Vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biol. Reprod.*, **62**, 248-252.

Ordóñez-León EA, Merchant H, Medrano A, Kjelland M, Romo S (2014). Lipid droplet analysis using in vitro bovine oocytes and embryos. *Reprod. Domest. Anim.*, **49**, 306-314.

Palasz AT, Maplettoft RJ (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: Recent advances. *Biotechnol. Adv.*, **14**, 127-149.

Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL, (1995). Effect of bovine sperm separation by swim up or percoll on success of in vitro fertilization and embryo development. *Theriogenology*, **44**, 859-869.

Paschoal DM, Sudano MJ, Guastali MD, Dias MR, Crocomo LF, Ona Magalhaes LC, da Cruz Landim-Alvarenga F (2014). Forskolin effect on the cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos in the presence or absence of fetal calf serum. *Zygote*, **22**, 146-157.

Pereira RM, Marques C (2008). Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell. Tissue. Bank.*, **9**, 267-277.

Petersen BM, Boel M, Montag M, Gardner DK (2016). Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3. *Hum. Reprod.*, **31**, 2231-2244.

Phongnimitr T, Liang Y, Srirattana K, Panyawai K, Sripunya N, Treetampinich C, Parnpai R (2013). Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. *Anim. Sci. J.*, **84**, 719-725.

Pillich RT, Scarsell G, Risuleo G (2005). Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture. *Exp. Cell Res.*, **306**, 1-8.

Pinyopummintr T, Bavister BD (1994). Effect of gaseous atmosphere on in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, **41**(1), 276.

Pryor JH, Hasler JF, Strøbech L, Avery B, Hashem N, Menges S, Long CR, Shewfelt G, Looney CR (2016). 86 improved bovine embryo production using novel in vitro culture systems. *Reprod. Fertil. Dev.*, **28**(2), 172-172.

Pope CE, Pope VZ, Beck LR (1984). Live birth following cryopreservation and transfer of a baboon embryo. *Fertil. Steril.*, **42**(1), 143-145.

Precht RM, Janßen D, Behr J, Ludwig C, Küster B, Vogel RF, Jakob F (2018). Sucrose-induced proteomic response and carbohydrate utilization of *Lactobacillus sakei* TMW 1.411 during dextran formation. *Front. Microbiol.*, **9**, 2796.

Prentice JR, Anzar M (2011). Cryopreservation of mammalian oocyte for conservation of animal genetics. *Vet. Med. Int.*, **2011**, 146405.

Purohit GN, Brady MS, Sharma SS (2005). Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development in vitro. *Anim. Reprod. Sci.*, **87**, 229-239.

Puts C, Berendsen T, Bruinsma B, Ozer S, Luitje M, Usta OB, Yarmush M, Uygun K (2015). Polyethylene glycol protects primary hepatocytes during supercooling preservation. *Cryobiology*, **71**, 125-129.

Qi SN, Zhang ZF, Wang ZY, Yoshida A, Ueda T (2006). L-Carnitine inhibits apoptotic DNA fragmentation induced by a new spin-labeled derivative of podophyllotoxin via caspase-3 in Raji cells. *Oncol. Rep.*, **15**, 119-222.

Quan GB, Hong QH, Lan ZG, Yang HY, Wu SS (2012). Comparison of the effect of various disaccharides on frozen goat spermatozoa Biopreserv. *Biobanking*, **10**, 439-445.

Quinn PJ (1985). A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, **22**, 128-146.

Rall WF, Fahy GM (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, **313**, 573-575.

Rall WF, Wood MJ, Kirby C, Whittingham DG (1987). Development of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *J. Reprod. Fertil.*, **80(2)**, 499-504.

Rama Raju GA, Murali Krishna K, Prakash GJ, Madan K (2006). Vitrification: an emerging technique for cryopreservation in assisted reproduction programmes. *Embryo. Talk.*, **1(4)**, 210-227.

Ravelich SR, Breier BH, Reddy S, Keelan JA, Wells DN, Peterson AJ, Lee RSF (2004). Insulin-like growth factor-I and binding proteins 1,2 and 3 in bovine nuclear transfer pregnancies. *Biol. Reprod.*, **70**, 430-438.

Remião MH, Lucas CG, Domingues WB, Silveira T, Barther NN, Komninou ER, Basso AC, Jornada DS, Beck RC, Pohlmann AR, Junior AS, Seixas FK, Campos VF, Guterres SS, Collares T (2016). Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reprod. Toxicol.*, **63**, 70-81.

Ridha MT, Dukelow WR (1985). The developmental potential of frozen-thawed hamster preimplantation embryos following embryo transfer: viability of slowly frozen embryos following slow and rapid thawing. *Anim. Reprod. Sci.*, **9(3)**, 253-259.

Rienzi L, Gracia C, Maggiulli R, LaBarbera AR, Kaser DJ, Ubaldi FM, Vanderpoel S, Racowsky C (2017). Oocyte, embryo and blastocyst cryopreservation in ART: Systematic review and meta-analysis comparing slow-freezing versus vitrification to produce evidence for the development of global guidance. *Hum. Reprod. Update.*, **23**(2), 139-155.

Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, De La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán A (2008). Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod. Domest. Anim.*, **43**, 44-50.

Rizos D, Fair T, Papadopoulos S, Boland MP, Lonergan P (2002). Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, **62**, 320-327.

Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.*, **68**, 236-243.

Rocha JC, Passalia F, Matos FD, Maserati MP Jr, Alves MF, Almeida TG, Cardoso BL, Basso AC, Nogueira MF (2016). Methods for assessing the quality of mammalian embryos: How far we are from the gold standard? *JBRA. Assist. Reprod.*, **1**;20(3), 150-158.

Rojas C, Palomo MJ, Albarracin JL, Mogas T (2004). Vitrification of immature and in vitro matured pig oocytes: study of distribution of chromosomes, microtubules, and actin microfilaments. *Cryobiology*, **49**, 211-220.

Romek M, Gajda B, Krzysztofowicz E, Kepczynski M, Smorag Z (2011). New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. *Theriogenology*, **75**, 42-54.

Ruiz A, Hansen PJ, Block J (2015). 53 Effect of addition of L-carnitine and conjugated linoleic acid during bovine embryo culture on cryosurvival, lipid content, and gene expression. *Reprod. Fertil. Dev*, **27**, 119.

Saad M, Sarwar Z, Saleem M, Arshad U, Shahzad M, Hassan Mushtaq M, Husnain A, Riaz A, Ahmad N (2019). Effect of plasma progesterone on oocyte recovery, oocyte quality, and early in-vitro developmental competence of embryos in Bos indicus dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, **202**, 80-86.

Sağırkaya H (2001). *Değişik gelişim dönemlerinde bulunan hibrit fare embriyolarının vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması.* Doktora tezi, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa.

Sağırkaya H, Bağış H (2003). Memeli embriyonlarının kriyoprezervasyonu. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **22**, 127-135.

Santos MVO, Nascimento LE, Praxedes ÉA, Borges AA, Silva AR, Bertini LM, Pereira AF (2019). Syzygium aromaticum essential oil supplementation during in vitro bovine oocyte maturation improves parthenogenetic embryonic development. *Theriogenology*, **1(128)**, 74-80.

Saragusty J, Arav A (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, **141**, 1-19.

Sata R, Tsujii H, Abe H, Yamashita S, Hoshi H (1999). Fatty acid composition of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing medium during early embryonic development. *J. Reprod. Dev.*, **45(1)**, 97-103.

Satılmış F (2019). *Farklı Antioksidanların (Pentoksifilin ve Borik Asit) İn Vitro Sığır Embriyo Kültür Medyumlarına İlavesinin Embriyo Gelişimi ve Kalitesi Üzerine Etkileri*. Doktora Tezi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Konya/Türkiye.

Seidel G E (2006). Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*, **65**, 228-235.

Seidel GE, Seidel SM (2019). *Training manual for embryo transfer in cattle*. FAO Animal. Evaluation of embryos. Chapter 7.
<http://www.fao.org/3/T0117E/T0117E00.htm>. (Erişim Tarihi: 15.09.2019).

Shaw J, Jones G (2003). Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos, *Hum. Reprod. Update.*, **9**, 583-605.

Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO (2000). Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, **53(1)**, 59-72.

Shaw JM, Trounson AO (1989). Effect of dimethyl sulfoxide and protein concentration on the viability of two-cell mouse embryos frozen with a rapid freezing technique. *Cryobiology*, **26(5)**, 413-421.

Shi LY, Jin HF, Kim JG, Mohana Kumar B, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ (2007). Ultra-structural changes and developmental potential of porcine oocytes following vitrification. *Anim. Reprod. Sci.*, **100**, 128-140.

Shioya Y (1993). Calf production by in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. *JARQ.*, **26**, 287-293.

Silva E, Greene AF, Strauss K, Herrick JR, Schoolcraft WB, Krisher RL (2015). Antioxidant supplementation during in vitro culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice. *Reprod. Fertil. Dev.*, **27**, 975-983.

Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, **65(1)**, 126-136.

Smith AK (2009). Embryo transfer opportunities for vets and scientists. *Cattle Pract.*, **17**, 16-25.

Smith AU (1952). Behaviour of fertilized rabbit eggs exposed to glycerol and to low temperatures. *Nature*, **170**, 374-375.

Snijders SE, Dillon P, O'Callaghan D, Boland M (2000). Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology*, **53**, 981-989.

Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Kuriani Karja NW, Farhudin M, Dinnyés A, Nagai T, Kikuchi K (2007). Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. *Cryobiology*, **55**, 115-126.

Somfai T, Kaneda M, Akagi S, Watanabe S, Haraguchi S, Mizutani E, Dang-Nguyen TQ, Geshi M, Kikuchi K, Nagai T (2011). Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.*, **23**, 912-920.

Sousa de RV, da Silva Cardoso CR, Butzke G, Dode MAN, Rumpf R, Franco MM (2017). Biopsy of bovine embryos produced in vivo and in vitro does not affect pregnancy rates. *Theriogenology*, **90**, 25-31.

Stringfellow DA, Givens MD (2013). International Embryo Transfer Manual. A procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. 4th Edition 2013 with supplemental corrections, IETS Publish., Savoy, USA.

Sturmey RG, Reis A, Leese HJ, McEvoy TG (2009). Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development. *Reprod. Domest. Anim.*, **44**(Suppl 3), 50-58.

Sudano MJ, Paschoal DM, da Silva Rascado T, Magalhães LCO, Crocomo LF, de Lima-Neto JF, da Cruz Landim-Alvarenga F (2011). Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. *Theriogenology*, **75**, 1211-1220.

Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi E, Konishi K, Imai K (2012). Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PLoS. One.*, **7**(5), e36627.

Sugimura S, Akai T, Imai K (2017). Selection of viable in vitro-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *J. Reprod. Dev.*, **63**(4), 353-357.

Summers PM, Shephard AM, Taylor CT, Hearn JP (1987). The effects of cryopreservation and transfer on embryonic development in the common marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. *J. Reprod. Fertil.*, **79(1)**, 241-250.

Suthar VS, Shah RG (2009). Bovine in vitro embryo production: an overview. *Vet. World.*, **2(12)**, 478-479.

Sutton-McDowall ML, Feil D, Robker RL, Thompson JG, Dunning KR (2012). Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. *Theriogenology*, **77**, 1632-1641.

Szell A, Shelton JN (1987). Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, **80 (1)**, 309-316.

Şaylan A (2011). *Kadın gamet hücrelerinde optimal vitrifikasyon araştırması*. Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya.

Şen U (2014). *Sığırlarda İn Vitro Embriyo Üretiminde Olgunlaştırma Sıcaklığı ve Antioksidan Kullanımı*. Doktora Tezi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Samsun/Türkiye.

Takahashi M, Nagai T, Hmanao S, Kuwayama M, Okamura N, Okano A (1993). Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biol. Reprod.*, **49**, 228-232.

Takahashi T, Inaba Y, Somfai T, Kaneda M, Geshi M, Nagai T, Manabe N (2013). Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.*, **25(4)**, 589-599.

Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, Kurachi H (2003). Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Mol. Reprod. Dev.*, **66**, 143-152.

Tarín JJ, Trounson AO (1993). Effects of stimulation or inhibition of lipid peroxidation on freezing-thawing of mouse embryos. *Biol. Reprod.*, **49**, 1362-1368.

Tominaga K, Hamada Y (2001). Gel-loading tip as container for vitrification of in vitro-produced bovine embryos. *J. Reprod. Dev.*, **47**, 259-265.

Uhde K, van Tol HTA, Stout TAE, Roelen BAJ (2018). Metabolomic profiles of bovine cumulus cells and cumulus-oocyte-complex-conditioned medium during maturation in vitro. *Sci. Rep.*, **8(1)**, 9477.

Ushijima H, Yamakawa H, Nagashima H (1996). Cryopreservation of bovine IVM/IVF embryos at early cleavage stage following removal of cytoplasmic lipid droplets. *Theriogenology*, **45(1)**, 159-159.

Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1998). Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, **51**, 53-58.

Vajta G, Korösi T, Du Y, Nakata K, Ieda S, Kuwayama M, Nagy ZP (2008). The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reprod. Biomed. On.*, **17**(1), 73-81.

Vajta G, Kuwayama M (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, **65**, 236-244.

Vajta G (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.*, **60**, 357-364.

Valencia A, Moran J (2004). Reactive oxygen species induce different cell death mechanisms in cultured neurins. *Free. Radic. Biol. Med.*, **36**, 1112e25.

Van Hoeck V, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Pintelon I, Jorssen E, Dufort I, Sirard MA, Verlaet A, Hermans N, Bols PE, Leroy JL (2015). Interaction between differential gene expression profile and phenotype in bovine blastocysts originating from oocytes exposed to elevated non-esterified fatty acid concentrations. *Reprod. Fertil. Dev.*, **27**(2), 372-384.

Viana J (2020). 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, **36**(4), 17.

Viswanath PS, Weiser T, Chintala P, Mandal S, Dutta R (2016). Grading of mammalian cumulus oocyte complexes using machine learning for in vitro embryo culture. *BHI.*, 172-175,

Wang YS, Tang S, An ZX, Li WZ, Liu J, Quan FS, Hua S and Zhang Y (2011). Effect of mSOF and G1.1/G2.2 Media on the developmental competence of SCNT-derived bovine embryos. *Reprod. Domest. Anim.*, **46**, 404-409.

Whittingham DG (1971). Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, **233**(5315), 125-126.

Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 C. *Science.*, **178**, 411-414.

Whittingham DG, Whitten WK (1974). Longterm storage and aerial transport of frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, **36**(2), 433-435.

Whittingham, DG (1975). Survival of rat embryos after freezing and thawing. *J. Reprod. Fert.*, **43**, 575-578.

Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, Moor RM (1974). Preservation of sheep embryos in liquid nitrogen. *Cryobiology*, **11**, 560.

Willadsen SM, Polge C, Rowson LEA, Moor RM (1976). Deep freezing of sheep embryos. *Reproduction*, **46(1)**, 151-154.

Wilmot I (1972). The effect of cooling rate, warming rate, cryoprotective agent and stage of development of survival of mouse embryos during freezing and thawing. *Life. Sci.*, **11**, 1071-1079.

Wilmot I, Rowson LE (1973). Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.*, **92(26)**, 686-690.

Wright JrRW, Ellington J (1995). Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. *Theriogenology*, **44**, 1167-1189.

Wu C, Rui R, Dai J, Zhang C, Ju S, Xie B, Lu X, Zheng X (2006). Effects of cryopreservation on the developmental competence, ultrastructure and cytoskeletal structure of porcine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, **73**, 1454-1462.

Wu GQ, Jia BY, Li JJ, Fu XW Zhou GB, Hou YP, Zhu SE (2011a). L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. *Theriogenology*, **76**, 785-793.

Wu LL, Norman RJ, Robker RL (2011b). The impact of obesity on oocytes: evidence for lipotoxicity mechanisms. *Reprod. Fertil. Dev.*, **24(1)**, 29-34.

Wusteman M, Robinson M, Pegg D (2004). Vitrification of large tissues with dielectric warming: biological problems and some approaches to their solution. *Cryobiology*, **48**, 179-189.

Xu H, Jia C, Cheng W, Zhang T, Tao R, Ma Y, Si L, Xu Y, Li J (2020). The effect of L-carnitine additive during in vitro maturation on the vitrification of pig oocytes. *Cell. Reprogramming.*, **22(4)**, 198-207.

Xu HY, Geng SS, Li TT, Fu Q, Lu SS, Liang XW, Lu YQ, Zhang M, Yang XG, Lu KH (2019). Maturation of buffalo oocytes in vitro with acetyl-L-carnitine improves cryotolerance due to changes in mitochondrial function and the membrane lipid profile. *Reprod. Fertil. Dev.*, **31(2)**, 386-394.

Yacoub AI, Matthias Gauly AN, Holtz W (2013). Is sucrose required in open pulled straw (OPS) vitrification of mouse embryos?. *CryoLetters*, **34(5)**, 466-470.

Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, Hachinohe Y (1982). Experiments in the freezing and storage of equine embryos. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, **32**, 399-403.

Yang RF, Xiong XR, Zi XD (2019). Effect of cysteine, insulin-like growth factor-1 and epidermis growth factor during in vitro oocyte maturation and in vitro culture of yak-cattle crossbred embryos. *J. Appl. Anim. Res.*, **47(1)**, 463-466.

Yao X, Jiang H, Liang S, Shen X, Gao Q, Xu YN, Kim NH (2018). Laminarin enhances the quality of aged pig oocytes by reducing oxidative stress. *J. Reprod. Dev.*, **64**, 489-494.

Yavin S, Arav A (2007). Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, **67**, 81-89.

Yavin S, Aroyo A, Roth Z, Arav A (2009). Embryo cryopreservation in the presence of low concentration of vitrification solution with sealed pulled straws in liquid nitrogen slush. *Hum. Reprod.*, **24 (4)**, 797-804.

Ye J, Li J, Yu Y, Wei Q, Deng W, Yu L (2010). L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. *Regul. Pept.*, **161**, 58-66.

Yong KW, Choi JR, Safwani WKZW (2016). Biobanking of human mesenchymal stem cells: future strategy to facilitate clinical applications F. Karimi-Busheri, M. Weinfeld (Eds.), *Biobanking and Cryopreservation of Stem Cells*, Springer Nature, Switzerland AG, 99-110.

Yotsushima K, Sakaguchi M, Shimizu M, Okimura T, Izaike Y (2004). Effects of fatty acid-free bovine serum albumin and fetal calf serum supplementing repair cultures on pre- and post-warm viability of biopsied bovine embryos produced in vitro. *J. Reprod. Dev.*, **50(4)**, 471e6.

Yuan Y, Wheeler MB, Krisher RL (2012). Disrupted redox homeostasis and aberrant redox gene expression in porcine oocytes contribute to decreased developmental competence. *Biol. Reprod.*, **87**, 78.

Zarcula SM, Cernescu H, Godja G, Igna V (2012). Effects of recovering bovine oocyte methods on quantity and quality of cumulus-oocyte complexes. *Adv. Res. Scientific Area-Virtual Conf.*, **1**, 2171-2174.

Zeilmaker GH, Alberda AT, Van Gent I, Rijkmans CM, Drogendijk AC (1984). Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos. *Fertil. Steril.*, **42 (2)**, 293-296.

Zhang LI, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, Godke RA (1995). Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. *Mol. Reprod. Dev.*, **40(3)**, 338-44.

Zolini AM, Carrascal-Triana E, de King AR, Hansen PJ, Torres CAA, Block J (2019). Effect of addition of l-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*, **133**, 135-143.

EKLER

Ek 1: Vitrifikasyon Solüsyon 1 (VS1): 3.5M etilen glikol (EG), %20 FBS içeren TCM-199

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 Medyumu	Sigma Aldrich	M2520-10x 1lt	6 ml+ 75 µl
Etilen Glikol	Sigma Aldrich	293237	1 ml +925 µl
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich	F9665-500 ml	2 ml

Ek 2: Vitrifikasyon Solüsyon 2 (VS2): 7M etilen glikol, 0.5M sükröz, %18 ficoll 70 (w/v), %20 FBS içeren TCM-199

Kimyasal Madd	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 medyumu	Sigma Aldrich	M2520-10x 1lt	4 ml +150 µl
Etilen Glikol	Sigma Aldrich	293237	3 ml +850 µl
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich	F9665-500 ml	2 ml
Ficoll	Sigma Aldrich	F2878, 100 gr	1,8 gr
Sukroz	Sigma Aldrich	S7903-250 gr	1, 7115 gr

Ek 3: Vitrifikasyon Çözdürme Solüsyonu 1 (VCS1): 0,5M sükröz, %20 FBS içeren TCM-199.

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 Medyumu	Sigma Aldrich	M2520-10x 1lt	8 ml
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich	F9665-500 ml	2 ml
Sukroz	Sigma Aldrich	S7903-250 gr	1, 7115gr

Ek 4: Vitrifikasyon Çözdürme Solüsyonu 2 (VCS2): 0,25M sükröz, %20 FBS içeren TCM-199.

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 Medyumu	Sigma Aldrich	M2520-10x 1lt	8 ml
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich	F9665-500 ml	2 ml
Sukroz	Sigma Aldrich	S7903-250 g	0, 85575 gr

Ek 5: % 20 FBS içeren TCM-199.

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 Medyumu	Sigma Aldrich	M2520-10x 1 lt	8 ml
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich	F9665-500 ml	2 ml

Ek 6: Yavaş Dondurma Solüsyonu 1 (YDS1): %20 FBS içeren TCM-199.

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 Medyumu	Sigma Aldrich	M2520-10x1 lt	8 ml
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich	F9665-500 ml	2 ml

Ek 7: Yavaş Dondurma Solüsyonu 2 (YDS2): 1.5M EG, 0.1M süktroz ve %20 FBS içeren TCM-199.

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 Medyumu	Sigma Aldrich	M2520-10x1lt	7 Ml +175 µl
Etilen Glikol	Sigma Aldrich	293237	825 µl
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich	F9665-500 ml	2 ml
Sukroz	Sigma Aldrich	S7903-250 gr	0,3423 Gr

Ek 8: Yavaş Dondurma Çözdürme Solüsyonu 1 (YDCS1): 0.3M süktroz, %10 FBS içeren TCM-199 olacak şekilde hazırlanacaktır.

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 Medyumu	Sigma Aldrich	M2520-10x 1lt	9 ml
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich	F9665-500 ml	1 ml
Sukroz	Sigma Aldrich	S7903-250 gr	1,0269 gr

Ek 9: Yavaş Dondurma Çözdürme Solüsyonu 2 (YDCS2): %10 FBS içeren TCM-199.

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 Medyumu	Sigma Aldrich	M2520-10x 1lt	9 ml
Fetal Bovine Serum	Sigma Aldrich	F9665-500 ml	1 ml

Ek 10: L-Karnitin stok solüsyonu

Kimyasal Madde	Marka	Ürün Kodu (Katalog No)	Miktar
TCM199 Medyumu	Sigma Aldrich	M2520-10x 1lt	10 ml
L-Karnitin	Sigma Aldrich	C0158-5 gr	0,1209 gr

