

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(DOKTORA TEZİ)

**MODİFİYE TCM-199 MEDYUMUNDA
OLGUNLAŞTIRILARAK İN VİTRO ÜRETİLEN SIĞIR
EMBRİYOLARININ DONDURULMASI**

ASİYE İZEM SANDAL

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. ÖZEN BANU ÖZDAŞ**

**DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI/
DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA PROGRAMI**

İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı Dölerme ve Sun'i Tohumlama Programında Araş. Gör. Asiye İzem SANDAL tarafından hazırlanan “Modifiye TCM-199 Medyumunda Olgunlaştırılarak İn Vitro Üretilen Sığır Embriyolarının Dondurulması” başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

06 / Aralık / 2012

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)


İmzası

- 1.Prof. Dr. Kemal AK (İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı)
- 2.Prof. Dr. Sema BİRLER (Tez İzleme Komitesi Üyesi) (İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı)
- 3.Prof. Dr. Güven KAŞIKÇI (Tez İzleme Komitesi Üyesi) (İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı)
- 4.Prof. Dr. Hakan SAĞIRKAYA (Uludağ Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı)
- 5.Doç. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ (Tez Danışmanı) (İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.



Asiye İzem SANDAL

İTHAF

Anneme, babama ve eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sırasında karşılaştığım tüm zorluklarda gerek bilimsel bilgileri gerekse kişisel yardımlarıyla yanımda olan danışmanım sayın Doç. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ'a, deneysel çalışmalarım ve tez yazım aşamamda değerli desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Alper BARAN'a, engin tecrübesi ve manevi desteğinden yararlandığım saygı değer emekli hocam sayın Prof. Dr. İ. Kamuran İLERİ'ye, başta Anabilim Dalı başkanım sayın Prof. Dr. Kemal AK olmak üzere tez komitesi hocalarım sayın Prof. Dr. Sema BİRLER ve sayın Prof. Dr. Güven KAŞIKÇI'ya teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Araştırmamın büyük bölümünü oluşturan materyal kısmında mezbaha imkânlarını kullanmamı sağlayan tüm Tuzla mezbahası çalışanlarına teşekkür ederim.

Verilerimin istatistiksel değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı sayın Prof. Dr. Bülent EKİZ'e teşekkür ederim.

Eğitim-Öğretim hayatım boyunca eşsiz maddi ve manevi destekleriyle her koşulda yanımda olan biricik aileme; annem Kadriye HAMZAOĞLU ve babam MUSTAFA HAMZAOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu zorlu süreçte daima yanımda olduğunu hissettiren, desteğini benden esirgemeyen ve tezimi bitirmemde büyük payı olan sevgili eşim Barış SANDAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 9564

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	2
BEYAN	3
İTHAF	4
TEŞEKKÜR.....	5
İÇİNDEKİLER	6
TABLolar LİSTESİ	9
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	11
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	12
ÖZET	15
ABSTRACT.....	16
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	17
2. GENEL BİLGİLER	20
2.1. İn Vitro Fertilizasyonun Tarihçesi.....	20
2.2. İn Vivo Şartlarda Oositlerin Olgunlaşması, Döllenmesi ve Embriyo Oluşumu ...	20
2.3. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Nedir ?.....	21
2.3.1. İn Vitro Olgunlaşma (IVM).....	22
2.3.2. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)	23
2.3.3. İn Vitro Kültür (IVC)	23
2.4. İn Vitro Olgunlaşma ve Kültür Medyumlarının İçerikleri.....	24
2.4.1. Enerji Kaynakları	24
2.4.2. Protein Kaynakları	25
2.4.3. Hormonlar ve Büyüme Faktörleri.....	27
2.4.4. Antioksidanlar ve Oksijen Basıncı.....	27
2.4.5. Dondurma Yöntemleri ve Kriyoprotektanlar	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Oosit Eldesi ve Seçimi	32
3.2. Oositlerin Olgunlaştırılması	34
3.3. Olgunlaştırılan Oositlerinin Döllenmesi	34

3.3.1.Spermanın Eritilmesi, Motilitenin Değerlendirilmesi ve Konsantrasyonunun Hesaplanması	35
3.4.Döllen Oositlerin Kültür Medyumlarına Aktarılması	36
3.4.1.Kültür Medyum Droplarının Hazırlanması	36
3.4.2. Döllenmiş Oositlerin Spermatozoonlardan ve Kumulus Hücrelerinden Arındırılması ve Kültüre Aktarılması	36
3.5. Kültüre Konan Embriyoların Bölünme Kontrollerinin Yapılması	37
3.6. Gelişen Embriyoların Dondurulması	37
3.7. Dondurulan Embriyoların Eritilmesi	39
3.8. Eritilen Embriyoların Kültüre Edilmesi	40
3.9.Çalışmada Kullanılan Medyumların Hazırlanması	41
3.9.1.Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonunun Hazırlanması (FTTS)	41
3.9.2.Sığır Oosit Yıkama Medyumunun Hazırlanması	42
3.9.3.Sığır Olgunlaşma Medyumunun Hazırlanması	43
3.9.4.Sperma Yıkama (Sperm-TALP) ve Döllenme Medyumunun (IVF-TALP) Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	44
3.9.4.1.Sperm-TALP Stok Solüsyonunun Hazırlanması	44
3.9.4.2.IVF-TALP Stok Solüsyonunun Hazırlanması	45
3.9.5.Sperma Yıkama (Sperm-TALP) ve Döllenme (IVF-TALP) Medyumlarının Hazırlanması	46
3.9.5.1.Sperm-TALP Medyumunun Hazırlanması	46
3.9.5.2.IVF-TALP Medyumunun Hazırlanması	46
3.9.6.SOF ve CR1aa Kültür Medyumlarının Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	48
3.9.6.1.SOF Kültür Medyumunun Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	48
3.9.6.2.CR1aa Kültür Medyumunun Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	50
3.9.7. SOF ve CR1aa Kültür Medyumlarının Hazırlanması	51
3.9.7.1.SOF Kültür Medyumunun Hazırlanması	51
3.9.7.2.CR1aa Kültür Medyumunun Hazırlanması	51
3.9.8.Dondurmada Kullanılan Medyumların Hazırlanması	52
3.9.8.1.Vitrifikasyon Medyumunun Temel Solüsyonunun Hazırlanması	52
3.9.8.2.Ekilibasyon ve Vitrifikasyon Medyumlarının Hazırlanması	53

3.9.8.3.Dondurma Payetlerinin Hazırlanmasında ve Eritilmesinde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	53
3.10.Verilerin Değerlendirilmesi.....	54
3.11.Alet ve Malzeme Listesi.....	54
3. BULGULAR	58
4. TARTIŞMA.....	71
KAYNAKLAR	83
ETİK KURUL KARARI	99
TELİF HAKKI İZNİ	100
ÖZGEÇMİŞ	101

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (FTTS).....	42
Tablo 3-2: Sığır Oosit Yıkama Medyumu.....	42
Tablo 3-3: Olgunlaşma Medyumu.....	43
Tablo 3-4: Sperm-TALP Stok Solüsyonu.....	44
Tablo 3-5: IVF-TALP Stok Solüsyonu.....	45
Tablo 3-6: Sperm-TALP Medyumu.....	46
Tablo 3-7: IVF-TALP Medyumu.....	47
Tablo 3-8: 100x PHE stok.....	48
Tablo 3-9: SOF-Stok A Solüsyonunun Hazırlanması.....	48
Tablo 3-10: SOF-Stok B Solüsyonunun Hazırlanması.....	49
Tablo 3-11: SOF-Stok C Solüsyonunun Hazırlanması.....	49
Tablo 3-12: SOF-Stok D Solüsyonunun Hazırlanması.....	49
Tablo 3-13: CR1aa-Stok A Solüsyonunun Hazırlanması.....	50
Tablo 3-14: CR1aa-Stok B Solüsyonunun Hazırlanması.....	50
Tablo 3-15: SOF Kültür Medyumu.....	51
Tablo 3-16: CR1aa Kültür Medyumu.....	52
Tablo 3-17: Vitrifikasyon Medyumunun Temel Solüsyonu (PBS).....	52
Tablo 3-18: Ekilibrasyon ve Vitrifikasyon Medyumları.....	53
Tablo 3-19: Dondurma Payetlerinin Hazırlanmasında ve Eritilmesinde Kullanılan Solüsyonlar.....	53
Tablo 4-1: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-I).....	59
Tablo 4-2: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-II).....	60
Tablo 4-3: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-III).....	61
Tablo 4-4: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-IV).....	62

Tablo 4-5: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-V).....	63
Tablo 4-6: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-VI).....	64
Tablo 4-7: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-VII).....	65
Tablo 4-8: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-VIII).....	66
Tablo 4-9: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-IX).....	67
Tablo 4-10: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-X).....	68
Tablo 4-11: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-XI).....	69
Tablo 4-12: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Tüm Deneyler).....	70
Tablo 4-13: Dondurulan Sığır Embriyolarının Eritme Sonrası Gelişimleri.....	79

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3-1: Holstein ırkı inek.....	32
Şekil 3-2: Ovaryumlardan kesme metoduyla elde edilen olgunlaşmamış sığır oositleri.....	33
Şekil 3-3: Olgunlaşma sonrası kumulus hücrelerinin genişlemesi.....	34
Şekil 3-4: 48. saat sonunda bölünmüş iki blastomerli sığır embriyoları.....	37
Şekil 3-5: Payetlere yerleştirilen embriyoların görüntüsü.....	38
Şekil 3-6: Embriyoların vitrifikasyon medyumundaki görünümü.....	38
Şekil 3-7: Sisteaminsiz ortamda olgunlaştırılıp SOF medyumunda geliştirilen blastosist aşamasındaki embriyolar. VS1 (solda) ve VS2 (sağda).....	39
Şekil 3-8: Dondurulan embriyoların eritilmesi.....	40
Şekil 3-9: Sisteaminli ortamda olgunlaştırılıp CR1 medyumunda geliştirilen blastosist ve genişlemiş blastosist aşamasındaki embriyolar.....	41
Şekil 4-1: 8. gün, SOF (+) blastosist, genişlemiş blastosist, hatching ve hatched blastosist.....	73
Şekil 4-2: 8. gün, SOF (-) blastosist, genişlemiş blastosist ve hatched blastosist.....	74
Şekil 4-3: 8. gün, SOF (+) blastosist ve genişlemiş blastosist.....	75
Şekil 4-4: 8. gün, SOF (-) blastosist ve genişlemiş blastosist.....	76
Şekil 4-5: CR1 (+) eritme sonrası 48. saat gelişimi.....	81

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BO	Brackett ve Oliphant medyumu
BSA	Sığır serum albümini
cAMP	Siklik adenzin mono fosfat
COC's	Kumulus ooforus hücreleri
CPS	Kapalı çekilmiş payet
CR1aa	Charles ve Rosencrans medyum
CZB	Chatot, Ziomek ve Bavister medyum
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
D-PBS/FTTS	Dulbecco fosfat tamponlu solüsyon/Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
EG	Etilen glikol
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EM grid	Elektron mikroskop grid
FBS	Fötal sığır serumu
FCS	Fötal buzağı serumu
FSH	Folikül stimüle edici hormon
FTTS	Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
gr	Gram
GSH	Glutatyon
GV	Germinal vezikül
GVBD	Yıkılmış germinal vezikül
Ham's F10	Ham'ın F10 medyum
IGF-1	İnsülin benzeri büyüme faktörü-1

IVC	İn vitro kültür
IVF	İn vitro fertilizasyon
IVF-TALP	İn vitro fertilizasyon medyum-Tyrode'un albümin laktat pirüvat
IVM	İn vitro maturasyon
kg	Kilogram
KSOM	Potasyumla optimize edilmiş basit medyum
LH	Lüteinleştirici hormon
LN ₂	Likit nitrojen
M	Molar
MDS	Minimum damla hacmi
Menezo-B2	Menezo'nun B2 medyum
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mOsm	Miliosmol
MPF	Maturasyon ilerletici faktör
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
NAC	N-asetil-L-sistein
OPS	Açık çekilmiş payet
OPU	Oosit toplama yöntemi
P	Ki kare testi P değeri
p34 ^{cdc2}	Maturasyon ilerletici faktör alt proteini
PBS	Fosfat tamponlu tuz solüsyonu
pH	Asitlik derecesi
PHE	Penisilin, epinefrin, hipotaurin
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil prolidon

ROS	Reaktif oksijen türevleri
SOD	Süperoksitdismutaz
SOF	Sentetik ovidukt sıvısı
Sperm-TALP	Sperm medyum - Tyrode'un albümin laktat pirüvat
SSV	Katı yüzey vitrifikasyonu
TCM-199	Doku kültür medyum-199
VS1	Vitrifikasyon medyum 1
VS2	Vitrifikasyon medyum 2
β ME	Betamerkaptoetanol
χ^2	Ki kare testi
$^{\circ}\text{C}$	Derece santigrat
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
17 β -östradiol	17 Beta östradiol

ÖZET

Sandal, A.İ. (2012). Modifiye TCM-199 Medyumunda Olgunlaştırılarak İn Vitro Üretilen Sığır Embriyolarının Dondurulması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı. Doktora Tezi. İstanbul.

İn vitro sığır embriyosu üretiminde antioksidan maddeler, gamet hücrelerini reaktif oksijen türevlerine (ROS) karşı koruma amacıyla tercih edilmektedirler. Çalışmada modifiye TCM-199 medyumunda olgunlaştırılarak in vitro üretilen sığır embriyoları 7. ve 8. günde dondurulmuş, eritme sonrası 48. saatteki gelişimleri kaydedilmiştir. Mezbahadan getirilen ovaryumlardan kesme metoduyla kazanılan oositler seçilerek iki gruba ayrılmıştır. Birinci gruptaki oositler antioksidan bir madde olan sisteamin ilave edilen TCM-199 medyumunda (Grup A), ikinci gruptaki oositler ise sisteamin içermeyen TCM-199 medyumunda (Grup B) 38,8 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat süreyle olgunlaşmaya bırakılmışlardır. Olgunlaşan oositler IVF-TALP medyumuna aktarılmışlar ve Sperm-TALP medyumuyla yıkanan donmuş boğa sperması ile $1-2 \times 10^6$ /mL olacak şekilde 18-22 saat süreyle 38,8 °C'de, %5 CO₂ içeren inkübatörde döllenmeye bırakılmışlardır. Bu süre sonunda Grup A ve B'ye ait embriyolar karıştırma metoduyla denude edilmişlerdir. Her bir gruba ait embriyolar farklı 2 kültür medyumunda, Sentetik Ovidukt Sıvısında (SOF) ve CR1aa-Charles Rosencrans (CR1aa) geliştirilmek üzere 2 alt gruba bölünmüştür. Bu amaçla Grup AI-SOF, Grup AII-CR1aa, Grup BI-SOF ve Grup BII-CR1aa olmak üzere 4 grup oluşturulmuştur. 38,8 °C'de, %5 CO₂, %5 N₂ ve %90 nem içeren inkübatörde kültüre edilen embriyolar camlaştırma (vitrikasyon) metoduyla dondurulmuşlardır. Eritilen embriyolar kendi gruplarına ait CR1 ve SOF kültür medyumlarında 48 saat kültüre edilmişlerdir. Blastosiste ve genişlemiş blastosiste ulaşma oranları sırasıyla %20, %18,1, %24,6 ve %22,5 olarak bulunmuştur. Eritme sonrası gelişimleri sırasıyla %5,5, %23,6, %0 ve %5,2 olarak bulunmuş ve Grup AII-CR1aa lehine olmak üzere P<0,05 düzeyinde istatistiksel önem saptanmıştır. Sonuçta sisteamin, eritme sonrası CR1aa medyumunda gelişimi pozitif yönde etkilemiştir.

Anahtar Kelimeler: Sığır, Embriyo, Sisteamin, Olgunlaşma, Vitrikasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir Proje No: 9564.

ABSTRACT

Sandal, A. İ. (2012). Vitriification of İn Vitro Produced Bovine Embryos Matured in Modified TCM-199. İstanbul University, İnstitute of Health Science, Department of Reproduction and Artificial İnsemination. PhD thesis. İstanbul.

Antioxidant substances for in vitro embryo production are preferred to protect the gamete cells against reactive oxygen species. In this study, in vitro produced cattle embryos matured in modified TCM-199 media were frozen at the 7th and 8th days, and their development in the 48th hour after thawing were saved. The selected oocytes, obtained from the ovaries brought from slaughterhouse with slicing method, divided into two groups. Cysteamine was added to the first group oocytes in TCM-199 media (Group A), in second group it did not contain cysteamine in its TCM-199 media (Group B), and they were incubated at 38.8 °C under 5% CO₂ for 24 hours. Matured oocytes were transferred into the IVF-TALP media for fertilization with 1-2x10⁶/mL frozen bull semen washed with Sperm-TALP media were incubated at 38.8 °C under 5% CO₂ for 18-22 hours. At the end of this period embryos belonging to Group A and Group B were denuded by vortex method. Embryos of each group in two different culture media, Synthetic Oviduct Fluid (SOF) and CR1aa-Charles Rosencrans (CR1aa) were divided into two sub-groups in order to be developed. For this purpose; four groups, Group AI-SOF, Group AII-CR1aa, Group BI-SOF and Group BII-CR1aa were established. Cultured embryos at 38.8 °C under 5% CO₂, 5% N₂ and 90% humidity were frozen with vitrification method. Thawed embryos were incubated in CR1aa and SOF culture medias of their groups for 48 hours. The rate of reaching to the blastocyst and expanded blastocyst stages were detected as 20%, 18.1%, 24.6% and 22.5%, respectively. The development after thawing was detected as 5.5%, 23.6%, 0% and 5.2%, respectively and in favor of Group AII-CR1aa statistical significance was detected at the level of P<0.05. In conclusion, cysteamine had a positive effect on development after thawing in CR1aa media.

Key Words: Cattle, Embryo, Cysteamine, Maturation, Vitrification

This study was supported by the Research Fund of İstanbul University with the project number: 9564.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İçinde bulunduğumuz 21. yüzyılda gerek teknolojik gerekse biyolojik bilimlerdeki ilerlemeler büyük ölçüde hız kazanmıştır. Özellikle reproduktif biyoteknoloji alanında çiftlik hayvanlarının ıslahı ve böylece hayvansal üretimin geliştirilmesi konusunda önemli gelişmeler meydana gelmiştir. Bu amaçla in vitro sığır embriyosu üretimi, üretilen embriyoların dondurulması ve transferi konularında çalışmalar sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Embriyo transferi sayesinde yüksek oranda genetik ilerleme sağlamak mümkündür. Embriyo transfer programı çerçevesinde bir yılda verici bir inekten ortalama 20 yavru elde edilebilir. İneğin doğal yaşamı söz konusu olduğunda ise bu sayı yalnızca 7-8 yavruya düşmektedir (İleri ve ark. 1998).

Ülkemizde yıllık kırmızı et tüketimi kişi başına ortalama 12 kg iken Avrupa'da ortalama 70-100 kg'dır (<http://www.tarimsalhaberler.com/konu/652/kirmizi-et-tuketimindede-sinifta-kaldik.html>). Türkiye'de yıllık süt tüketimi kişi başına yalnızca 24 L, Avrupa'da ise ortalama 100 L'dir (<http://bebekvecocuk.milliyet.com.tr/turkiye-de-sut-tuketimiyle-ilgili-uzucu-istatistikler/-haberpanosu/haberdetay/18.07.2012/1568654/default.htm>). Bu nedenle ülkemiz için çiftlik hayvanlarının ıslah edilmesi, yüksek verimli hayvanların popülasyonun arttırılması ve hayvansal üretimin teşvik edilmesi son derece önemli bir konudur.

Sonuç olarak; in vitro embriyo üretimi, transferi, gerektiğinde dondurulması yöntemleri ile hem ülke ekonomisi açısından önemli derecede gelir kaynağı olan büyük baş hayvancılığı geliştirmek ve sağlıklı nesiller yetiştirmek, hem de soyu tükenme tehlikesiyle karşı karşıya kalan yerli hayvan ırklarını korumak mümkün olabilmektedir (Hafez 1993 ss. 461-499; İleri ve ark. 1998; Gordon 2003 ss. 303-321).

In vitro sığır embriyosu üretimi; kesimhanelerden alınan ovaryumlardan olgunlaşmamış oositlerin kazanılması, in vitro olgunlaştırılması (IVM), olgunlaşan oositlerin laboratuvar ortamında döllenmesi (In Vitro Fertilizasyon-IVF) ve in vitro olarak kültüre edilmesi (IVC) aşamalarından oluşmaktadır (Gordon 2003 ss.112-275).

1959 yılında Chang tarafından tavşanlarda ilk in vitro fertilizasyon denemesi sonucunda başarılı bir döl elde edilmiş ve günümüze kadar yapılan araştırmalarda in vitro olgunlaşma (maturasyon), dölleme (fertilizasyon) ve in vitro kültür sonucu embriyoların blastosiste ulaşma oranlarını arttırmak için bilim insanları sayısız çalışmalarda bulunmuşlardır (Wolf ve Quigley 1984; Birler ve ark. 1997; Atalla 2002; Sağırkaya ve ark. 2007).

Özellikle in vitro olgunlaşma aşamasında kullanılan Sentetik Ovidukt Sıvısı (SOF) ve Doku Kültür Medyumu (TCM-199) gibi medyumlara ilave edilen epidermal büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörleri ile oosit olgunlaşma oranı arttırılmaya çalışılmıştır (Birler ve ark. 1997; Sağırkaya ve ark. 2007). Geçmiş yıllarda kültür medyumlarını geliştirmek ve blastosist oranlarını arttırmak amacıyla protein, şeker, antioksidan türevleri, hormon ve büyüme faktörleri ile ilgili olarak birçok çalışma yapılmış aynı zamanda embriyoların gelişimlerinde ihtiyaçları olan O₂ ve CO₂ gaz sistemleri standardize edilmeye çalışılmıştır. Hücrelerin gelişiminde temel besin maddesi olan proteinlerden Fötal Buzağı Serum (FCS), Sığır Serum Albümini (BSA), L-Glutamin, enerji maddelerinden glukoz, sukroz, hormonlardan Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH), Lüteinleştirici Hormon (LH), Östrojen gibi maddeler çiftlik hayvanları için yapılan in vitro fertilizasyon çalışmalarında standart hale getirilmeye çalışılmıştır (Sağırkaya ve ark. 2004; Sağırkaya ve ark. 2007; Özdaş ve ark. 2012a). Son 10 yıllık süreçte ise elde edilen embriyoların blastosist oranlarının ve dondurma-eritme sonrası canlı kalma kapasitelerinin arttırılması amacıyla in vitro olgunlaşma ve kültür medyumlarına belli oranlarda ilave edilen β -Merkaptoetanol (β -ME), sisteamin, sistein, sistin gibi antioksidan maddeler sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (Van Soom ve ark. 2002; Ali ve ark. 2003; Kobayashi ve ark. 2006).

Embriyo ve oosit dondurulmasında yavaş dondurma ve vitrifikasyon olmak üzere iki temel teknik bulunmaktadır. Bu tekniklerden ilki olan yavaş dondurma metodu fare embriyoları üzerinde uygulanmıştır (Whittingham 1971). Daha sonraki yıllarda vitrifikasyon yöntemlerinden olan elektron mikroskop grid, minimum damla hacmi, kriyotop, kriyolop, katı yüzey, naylon ağ, kriyolif, açık-kapalı payet yöntemleri gibi birçok teknik geliştirilmiştir. Embriyo dondurulmasında her tekniğin avantaj ve

dezavantajları bulunmakla beraber son 10 yıldaki çalışmalarda araştırmacılar payet yöntemi ile vitrifikasyonu tercih etmektedirler (Atalla 2002; Mucci ve ark. 2006; Gomez ve ark. 2008; Gupta ve ark. 2010; Zhao ve ark. 2012).

Son yıllarda araştırmacılar sığır embriyolarının dondurulmasında temel dondurma tekniği olan yavaş dondurma metodu yerine daha hızlı dondurma tekniği olan aniden camlaştırma denilen vitrifikasyon yöntemini tercih etmeye başlamışlardır (Nedambale ve ark. 2004; Abdalla ve ark. 2010; Saragusty ve Arav 2011). Yapılan çalışmalar vitrifikasyon metodu ile dondurulan embriyoların eritme sonrası yaşama oranlarının daha yüksek olduğunu göstermektedir (Sommerfeld ve Niemann 1999). Vitrifikasyon metodunda yüksek oranda kullanılan kriyoprotektanların toksik etkileri olduğu bilinse de embriyolar çok kısa süreyle bu küçük hacimdeki maddelere maruz kaldıkları için diğer yavaş dondurma metoduna göre daha avantajlı olduğu bilinmektedir (Kuwayama 2007; Galeati ve ark. 2011).

Ülkemizde sığır embriyo üretimi ve dondurma teknikleri tam olarak çözümlenmemiştir. Bu durumun sebepleri arasında sığır in vitro üretimi ve dondurulması konusunda çalışan araştırmacı sayısının az olması, büyük baş hayvan popülasyonunun azalması dolayısıyla mezbahalardaki kesim sayısının düşmesi gibi faktörler yer almaktadır. Bu doktora tez projesi ile üstün verim özelliklerine sahip hayvanların sayılarının arttırılması ve genetik ilerlemenin sağlanması amacıyla in vitro sığır embriyo üretimi ve dondurma tekniklerinin geliştirilerek sağlıklı embriyoların üretilmesi, dondurulması ve ilerideki projelerle embriyo transferlerinin rutin olarak yapılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İn Vitro Fertilizasyonun Tarihçesi

İn vitro fertilizasyonla ilgili ilk çalışma Shenk'in kobay ve tavşan oositlerinin döllemesi sonucu ilk polar cismin atılması ve kültüre bağlı bölünmelerin gözlemlendiği 1878 tarihine dayanmaktadır. Ancak bu çalışma o tarihlerde onaylanmamış, 1969 yılında Thiboult tarafından özetlenmiştir. 1959 yılında Chang isimli araştırmacı ilk defa in vitro döllemiş tavşan oositlerini alıcı tavşana naklederek sağlıklı bir döl elde etmiştir. Bu tarihten sonra in vitro fertilizasyon çalışmaları hız kazanmış ve birçok araştırmacı tarafından farklı hayvan türlerinde denemeler yapılmıştır. Bunlar sırasıyla 1964 yılında Yanagimachi ve Chang tarafından hamsterlarda, 1968 yılında Whittingham tarafından farelerde, 1969'da Edwards ve arkadaşları tarafından insanlarda, 1970 yılında Homner ve arkadaşlarınca kedilerde, 1972'de Yanagimachi tarafından kobaylarda, 1973'te Miyamoto ve Chang tarafından ratlarda, ilk defa 1977 yılında İritani ve Niwa tarafından çiftlik hayvalarından ineklerde, 1978'de yine İritani ve arkadaşlarınca domuzlarda, 1983'te Bavister ve arkadaşları tarafından Rhesus maymununda ve aynı yıl içinde Gould tarafından şempanzelerde gerçekleştirilmiştir. Sayısız denemelerin ardından insanlarda ilk defa 1978'te in vitro fertilizasyon yöntemiyle sağlıklı bir bebek dünyaya gelmiştir. 1984 yılında bu konudaki çalışmalar hız kazanmıştır (Wolf ve Quigley 1984).

2.2. İn Vivo Şartlarda Oositlerin Olgunlaşması, Döllemesi ve Embriyo Oluşumu

İn vivo (vücut içi) şartlarda memeli türlerinin çoğunda gametlerin farklılaşması döneminde dişi üreme hücreleri (oogonia) önce mitoz bölünme ile proliferasyonlarını tamamlar ve primer oosit aşamasına ulaşacakları 1. mayoz bölünmenin profaz safhasına fetal yaşamda ulaşırlar. Fetal dönemde başlayan mayoz bölünme doğumu takiben diktiati adı verilen faza girer ve durur. Bu aşamada üreme hücresinin genetik materyali zarla çevrili haldedir ve germinal vezikül (GV) olarak adlandırılır. Puberteyle birlikte oosit kaldığı yerden 1. mayoz bölünmesine devam eder. 1. mayoz bölünmenin devam etmesiyle GV olarak adlandırılan yapı yıkılır (GVBD). Yıkılmayı

sağlayan etkenler arasında olgunlaşma iletici faktörün (MPF) alt komponentlerinden olan $p34^{cdc2}$ proteini ve siklin-B yer almaktadır. (Akyol 2006; Delilbaşı 2008 ss. 86-88; Conti ve ark. 2012). Ovulasyonla birlikte ilk polar cismin atılmasıyla 1. mayoz bölünme sona erer. Çoğu memeli türünde ilk polar cismin atılmasından sonra hızla 2. mayoz bölünmeye başlayan oosit döllenmeye kadar metafaz II safhasında bekler.

İn vivo ortamda döllenme sırasında spermatozoonların oositin sitoplazmasına girmesinin hemen arkasından oositin sitoplazmasının periferinde bulunan kortikal granüller hücrenin yüzeyine doğru hareket ederek ekzositoz yoluyla başka bir spermatozoonun girişini engellemek amacıyla blok oluştururlar. Buna kortikal reaksiyon adı verilir. Kortikal granüllerin ekzositozuna neden olan en büyük etken hücre içinde Ca^{++} iyonlarının artışıdır.

Ekzositoz yoluyla hücrenin yüzeyine salgılanan kortikal granüllerin yapısında meydana gelen proteolizis gibi kimyasal değişimler zona pellüsidanın yapısını değiştirerek zona reaksiyonunun meydana gelmesini sağlar. Böylelikle polispermi oosit tarafından engellenerek döllenme gerçekleştirilmiş olur (Delilbaşı 2008 ss. 107-108).

Döllenmeden 16-18 saat sonra dişi ve erkek pronükleuslar oosit sitoplazmasının ortasında görülürler. İki pronükleusun birleşmesinin ardından singami meydana gelir. Spermatozoon tarafından ooplazmaya taşınan sentriyoller kromatidleri çeker ve döllenmeden ortalama 35 saat sonra iki hücreli bir embriyo meydana gelir. Bu iki blastomerli embriyo bölünerek genital kanalda gelişimine devam eder. 2-4 blastomer, 8-16 blastomer, morula, kompakt morula gibi gelişim aşamalarının ardından blastosist aşamasına ulaşan embriyo uterusu yerleşir (Delilbaşı 2008 s. 117).

2.3. İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Nedir ?

Dişi üreme hücrelerinin yani oositlerin vücudun dışında uygun laboratuvar koşullarında olgunlaştırılarak taze veya donmuş spermatozoonlarla döllenmesi sonucu oluşan embriyoların in vivo koşulların sağlandığı ortamda belirli bir süre kültüre edilmesi ve geliştirilmesine “İn Vitro Fertilizasyon” adı verilmektedir. Bu süreç oositlerin in vitro olgunlaştırılması, in vitro döllenmesi ve son olarak da in vitro kültüre edilmesi aşamalarından oluşmaktadır.

2.3.1. İn Vitro Olgunlaşma (IVM)

Memeli türlerinde elde edilen olgunlaşmamış oositlerin laboratuvar koşullarında in vivo şartları sağlayarak döllenebilecek olan metafaz II aşamasına getirilmesine “İn Vitro Maturasyon” adı verilir.

İn vitro olgunlaşmada kullanılacak oositlerin eldesi amacıyla cerrahi, ultrason yöntemi (OPU: Oosit Toplama) ve mezbahadan temin edilen ovaryumlardan folikül aspirasyonu veya kesme yöntemi gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalarda ucuz olması nedeniyle genellikle mezbahada kesilen hayvanlardan elde edilen ovaryumlar kullanılmaktadır.

Sığır ovaryumları 30-35 °C arasında %0,9'luk NaCl veya antibiyotik ilaveli fosfat tamponlu tuz solüsyonu (PBS) bulunan termoslarda 2-3 saat içerisinde laboratuvara getirilirler (Mtango ve ark. 2003; Özdaş ve ark. 2012a). Olgunlaşmamış oositler ovaryum yüzeyindeki genellikle 2-8 mm çaplı foliküllerden aspirasyon, punksiyon veya kesme metotlarıyla elde edilirler (Fry ve ark. 1997; Hashimoto ve ark. 1999). Bunun sebebi de 2-8 mm çaplı foliküllerden elde edilen oositlerin metafaz I safhasından metafaz II safhasına ulaşma kapasitlerinin yüksek oluşudur (Raghu ve ark. 2002; Woudenbergh ve ark. 2006; Khatir ve ark. 2007). Olgunlaştırılacak oositlerin etrafında en az 3-4 sıralı kumulus ooforus (COC's) hücrelerinin olması, sitoplazmalarının homojen görünümde olması ve hücre çeperlerinin düzgün olması gerektiği bildirilmektedir (Mayes ve Sirard 2001; Davachi ve ark. 2012). Seçilen sığır oositlerinin olgunlaştırılmasında kullanılan olgunlaşma medyumlarında; mineral maddeler, Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH), Lüteinleştirici Hormon (LH), büyüme faktörleri (Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)), enerji maddeleri, proteinler, antibiyotikler ve antioksidan gibi kimyasalların bulunması gerektiği bildirilmiştir (Gasparrini ve ark. 2000; Sağırkaya ve ark. 2007). Ayrıca araştırmacılar olgunlaşmada medyum türlerine göre %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ ve %90 nem içeren gaz karışımını, hayvan türlerine göre de 37-39 °C sıcaklık ve 22-24 saat inkübasyon süresinin kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir (Khurana ve Niemann 2000; Park ve ark. 2005).

2.3.2. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

Olgunlaşma süresinin sonunda etraflarındaki kumulus ooforus hücrelerinin genişlemesiyle olgun oldukları düşünülen oositler, donmuş veya taze spermatozoonlarla in vitro olarak döllenirler (Keskintepe ve ark. 1995; Dhali ve ark. 2009; Naib ve ark. 2011). İn vitro fertilizasyonda kullanılabilir donmuş spermatozoonların eritme sonrası en az %45-60 oranında motil olmaları gerekmektedir. Taze ve donmuş spermatozoonların döllenme için hazırlanmasında Percoll-Gradient, Swim-Up, Pellet gibi yıkama yöntemleri kullanılırken, döllenme medyumları olarak da IVF-TALP, Tryode, Brackett ve Oliphant (BO) gibi medyumlar tercih edilmektedir (Kim ve ark. 2002; Nedambale ve ark. 2006a).

Döllenmede kullanılacak spermatozoon konsantrasyonu türlere göre değişmekle beraber genellikle sığır dahil olmak üzere $0,4-2 \times 10^6/\text{mL}$ olacak şekilde ayarlanmakta ve çoğunlukla medyum türlerine göre %5 CO_2 , %5 O_2 , %90 N_2 ve %90 nem içeren gaz karışımı ve hayvan türlerine göre de 37-39 °C sıcaklık altında 18-24 saat inkübasyona bırakılmasına rağmen yapılan son çalışmalarda 6 saatlik döllenme süresinin yeterli olabileceği belirtilmektedir (Nedambale ve ark. 2006a; Gupta ve ark. 2010).

2.3.3. İn Vitro Kültür (IVC)

Döllenme süresinin sonunda döllenmiş oositler etraflarındaki spermatozoon ve kumulus ooforus karışımından arındırılarak uygun kültür medyumlarına aktarılırlar. Kültür medyumları olarak Sentetik Ovidukt Sıvısı (SOF), CR1aa-Charles Rosencrans, KSOM, TCM-199, Menezo-B2, Whittens Medyumları, Ham's F10 ve CZB gibi medyumlar araştırmacılar tarafından kullanılmakta (Whitten 1971; Tervit ve ark. 1972; Chatot ve ark. 1989; Rosenkrans ve ark. 1993) ancak çoğunlukla SOF ve CR1aa medyumları tercih edilmektedir. Nedeni ise, bu medyumlarda kültüre edilen embriyoların gelişim dönemlerinde daha sağlıklı olmaları ve donma işlemlerine karşı kriyotoleranslarının daha yüksek olmasıdır (Nedambale ve ark. 2004; Mucci ve ark. 2006). Embriyoların gelişiminde kullanılacak kültür medyumlarında en önemli nokta, ovidukt kanalındaki kimyasal kompozisyona benzerlik göstermesi gerektiğidir. Bu amaçla kullanılan medyumlara ovidukt ko kültürünün eklenmesinin daha yüksek oranda

blastosist eldesine neden olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Özdaş ve ark. 2006; Goovaerts ve ark. 2009; Özdaş ve ark. 2012b).

Kullanılan medyum türlerine göre %5 CO₂, %5 O₂, %90 N₂ ve %90 nem içeren gaz karışımı ve hayvan türlerine göre de 37-39 °C sıcaklık altında 5-9 gün boyunca kültüre edilirler (Perin ve ark. 2008; Trigal ve ark. 2012; Rubessa ve ark. 2011). Yapılan çalışmalarda araştırmacılar in vitro üretilen embriyoların in vivo olanlara göre daha geç gelişmekte olduklarını bu durumun da toplam kültür süresini 1 gün daha uzattığını belirtmişlerdir (Enright ve ark. 2000; Holm ve ark. 2002). Kültür medyum dropları genelde 50-500 µL arasında değişmekle beraber genellikle embriyo başına 1-10 µL medyum olması gerektiği vurgulanmaktadır (Fujita ve ark. 2006; Hoelker ve ark. 2009). Aynı araştırmacılar (Fujita ve ark. 2006) embriyo:medyum hacimi oranının 1:1 olduğu zamanlarda blastosiste ulaşma oranlarını %18 bulurken, 1:10 iken blastosiste ulaşma oranını %2,5 olarak bildirmişlerdir. Ayrıca embriyoların blastosist aşamasına ulaşma yüzdeleri kültür medyumlarının kimyasal içerikleri, inkübasyon süresince mevcut oksijen konsantrasyonu ve kültüre edilen embriyo sayısı gibi etkenlere bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Nagao ve ark. 2008; Hoelker ve ark. 2009).

2.4. İn Vitro Olgunlaşma ve Kültür Medyumlarının İçerikleri

İn vitro embriyo üretiminde in vivo koşulların sağlanması amacıyla erkek ve dişi gamet hücrelerinin ihtiyaç duyduğu maddelerin medyumlarda bulunması başarılı bir in vitro fertilizasyon süreci için oldukça gereklidir.

2.4.1. Enerji Kaynakları

Oositler için enerji kaynakları olan glukoz, pirüvat ve laktat farklı oranlarda kültür medyumlarına katılarak kullanılmaktadır (Guyader-Joly ve ark. 1996; Kimura ve ark. 2005). Hücrenin enerji gereksinimini büyük ölçüde karşılayacak olan pirüvat, kumulus ooforus hücreleri tarafından glukozun kimyasal reaksiyonlar sonucu dönüştürülmesiyle oluşmaktadır (Bilodeau-Goeseels 2006).

Sığır oositlerinin nükleer gelişimi için enerji gereksinimi konusu farelerde olduğu kadar net açıklanmamıştır. Özellikle enerji maddelerinin eksikliği durumunda

kumulus hücrelerinin oositin metafaz II aşamasına ulaşmasını engellediğini bildirmiştir (Bilodeau-Goesseels 2006).

Hayvan türlerine göre farklılık göstermekle birlikte sığırlarda in vitro fertilizasyon çalışmalarında döllenmiş bir dişi gamet hücresinde 8-16 blastomerli aşamada gelişimsel blok meydana gelir yani hücre bölünmesine devam edemez. Birçok araştırmacı bunun nedeninin genellikle kültür medyumlarına erken dönemde ilave edilen glukozdan kaynaklandığını belirtilmektedir (Thompson 2000; Rubessa ve ark. 2011). Ancak hamsterlarda yapılan bir araştırmada 2 blastomerli aşamadaki hücre için inorganik fosfatın glukozdan daha fazla inhibitör etki gösterdiği bildirilmiştir (Seshagiri ve Bavister 1991).

Sığır embriyoları morula döneminden önceki bölünme aşamalarında enerji ihtiyaçlarını özellikle pirüvat ve laktattan sağlarken, morula döneminden sonra glukoza gereksinim duymaktadırlar. Buna ek olarak sitratın in vitro kültür aşamasında miyo inositol ile birlikte kullanıldığı durumlarda sığır embriyo gelişimine yüksek oranda destek olduğu bildirilmektedir (Holm ve ark. 1999).

2.4.2. Protein Kaynakları

Proteinlerin, özellikle de vücut tarafından sentezlenemeyen esansiyel aminoasitlerin embriyo gelişiminde önemli payı vardır (Li ve ark. 2006; Hong ve Lee 2007). Ancak in vitro embriyo üretiminde kullanılan başta L-glutamin, fetal buzağı serumu, fetal sığır serumu ve sığır serum albümini gibi protein kaynaklarının embriyonun implantasyon aşamasında faydalı olduğu bildirilse de (Carolan ve ark. 1995; Kuran ve ark. 2001), bazı araştırmacılar özellikle blastosiste ulaşma aşamasında proteinlerin pozitif bir etkisinin olmadığını savunmaktadırlar (Gomez ve Diez 2000). Ayrıca bazı bilim insanları da, in vitro kültür medyumlarına eklenen serumların embriyonun metabolizmasında bazı değişiklikler yaparak yağ asitlerinin birikimini (Reis ve ark. 2003) ve sitoplazmik yağ damlacıklarının sayısını arttırdıklarını (Abe ve ark. 1999) bunun sonucu olarak da Moore ve ark. (2007) hücrelerin kriyotoleranslarını azalttığını belirtmişlerdir.

Özellikle glutaminin metabolize edilmesi sonucu açığa çıkan amonyak embriyo üzerine olumsuz etki etmektedir (Rooke ve ark. 2004; Hammon ve ark. 2000). Amonyanın en önemli etkisi “iri buzağı sendromu”nu oluşturan temel faktörlerden birisi olmasıdır (Lane ve Gardner 1994; 2003). Bu nedenle bazı araştırmacılar glutamin kullanılan kültür medyumlarının kültür süresi boyunca her iki günde bir değiştirilerek tazelenmesinin embriyo gelişim oranını optimize ettiğini bildirmişlerdir (Lane ve Gardner 1994). Fakat medyum tazelemenin metabolik artıkları elimine ettiği gibi ortam pH’sını ve gaz basıncını değiştirdiği böylelikle gelişimi destekleyici faktörleri de ortadan kaldırdığı belirtilmektedir (Fukui ve ark. 1996).

Yapılan araştırmalarda sığır embriyolarının in vitro üretimleri sırasında kullanılan medyumlara ilave edilen serumların, hücrelerin ultrastrüktürel yapısında değişiklikler, anormal blastulasyon oluşumu ve beklenmedik mRNA ekspresyonları ile iri buzağı sendromu ve doğumdan hemen sonra yavru kayıplarına neden olabileceği belirtilmiştir (Abe ve ark. 2002; Wrenzycki ve ark. 2004).

Ayrıca Mucci ve ark.’ın (2006) yılında yayınladığı makalesinde serumun yararlı etkilerinin ticari preparatların arasında çeşitlilik gösterdiğinden bahsedilmiştir.

Araştırmacılar in vitro kültür medyumlarından protein kaynağı olan serumun çıkartılması durumunda onun yerine destekleyici maddelerle dengelenmesi gerektiğini düşünerek Polivinilalkol (PVA) veya Polivinilprolidon (PVP) gibi inert maddeleri kullanmışlardır. Böylelikle sentetik ağır bir polimer olan PVA ya da PVP kullanımıyla proteinsiz bir ortamda embriyoların kolaylıkla manipüle edilmesi sağlanmıştır (Gardner 2010 s. 145). Bunun yanısıra sığırlarda BSA yerine PVA kullanılmasının embriyoların bölünme oranlarını, blastosiste ulaşan hücre sayısını ve donmaya karşı canlılıklarını olumsuz yönde etkilediği de bilim insanları tarafından bildirilmiştir (Vajta ve ark. 1999; Sommerfeld ve Niemann 1999).

2.4.3. Hormonlar ve Büyüme Faktörleri

İn vitro olgunlaşma medyumlarına FSH, LH ve 17 β -östradiol gibi hormonlar ilave edilmektedir.

Sığırlarda 2-8 mm çapındaki folliküllerde granuloza hücreleri üzerinde yalnızca FSH reseptörleri mevcuttur. LH reseptörleri ise teka hücrelerinde bulunur.

FSH, hem kumulus hücrelerinde genişlemeye neden olarak hem de kumulus-oosit birleşik yapısında siklik adenosin mono fosfat (cAMP) miktarında geçici artışa neden olarak olgunlaşmayı uyarıcı etki gösterir (Izadyar ve ark. 1997; 1998). İn vitro olgunlaşma medyumlarına ilave edilen FSH'nın in vitro fertilizasyonu desteklediği ve embriyo gelişimi üzerinde olumlu etkileri olduğu bildirilirken; LH'nın, embriyonun 4-8 blastomerli aşamasına dek gelişimini destekleyici etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Brackett ve ark. 1989).

Gasparrini (2002) in vitro embriyo üretiminde sıklıkla kullanılan epidermal büyüme faktörü (EGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) gibi büyüme faktörlerinin embriyo gelişimini arttırdığını bildirmiştir. Özellikle insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1), FSH ile birlikte sinerjik etki yaparak oosit olgunlaşmasını dolayısıyla da mitogenezisi, steroid hormonların üretimini ve protein sentezini destekler.

Ayrıca, birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda epidermal büyüme faktörünün, DNA sentezini, protein ve proteoglikan sentezlerini uyarıcı etkisi olduğu kanıtlanmıştır (Lonergan ve ark. 1996; Khamsi ve Armstrong 1997).

2.4.4. Antioksidanlar ve Oksijen Basıncı

Bugüne kadar dişi genital sistemindeki oksijen basıncıyla ilgili birçok çalışma kaydedilmiştir (Rodina ve ark. 2009; Waldenström ve ark. 2009). Ovidukt ve uterustaki oksijen basıncının atmosferik oksijen basıncından düşük olduğu net bir şekilde bilinmektedir (Fischer ve Bavister 1993). Memeli türlerinin in vitro embriyo üretiminde rutin olarak atmosferik oksijen basıncı kullanılmıştır ancak in vitro embriyo kültürü süresince bu yüksek basınç reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olur (Van Soom ve ark. 2002; Ali ve ark. 2003; Kitagawa ve ark. 2004). ROS'un bilinen

zararlı etkilerinin arasında DNA hasarı, lipid peroksidasyonu ve proteinlerin oksidatif modifikasyonları ve spermatozoon ile oositin füzyon inhibisyonu yer almaktadır (Aitken ve ark. 1993). Bilinen bu olumsuz etkileri yanında ROS, bazı koşullarda programlı hücre ölümünün (apoptoz) önemli bir faktörü gibi fizyolojik olarak da nitelendirilebilmektedir (Van Soom ve ark. 2002; Yuan ve ark. 2003).

ROS, direkt olarak erkek ve dişi gametlerden veya çeşitli embriyonal gelişim aşamasındaki embriyodan köken alabildiği gibi tamamen çevresel koşullardan da kaynaklanabilir (Guérin ve ark. 2001). ROS'un endojen kaynakları arasında en önemlisi oksidatif fosforilizasyondur. Oksidatif fosforilizasyonun inhibe edilmesi ROS üretimini düşürür ve in vitro embriyo gelişimi üzerine pozitif etki eder (Thompson ve ark. 2000). ROS üretimini arttıran eksojen kaynaklı en önemli faktör ise oksijen basıncıdır. Oviduktteki oksijen basıncı atmosferik oksijen basıncının ancak ¼'ü kadardır. Düşük oksijen basıncı altında (%5-7) in vitro üretilen sığır embriyolarında protein yapıda olmayan sülfidril bileşiklerinden olan glutatyon (GSH) sentezinin ve donmaya karşı dayanıklılığın arttığı bildirilmiştir (Oyamada ve Fukui 2004; Rätty ve ark. 2011).

İn vitro sığır embriyosu üretiminde β -merkaptotanol, sisteamin, sistin, sistein, N-asetil-L-sistein (NAC) ve süperoksitdismutaz (SOD) gibi antioksidanlar embriyoyu oksidatif strese karşı koruyabilmek amaçlı sıklıkla kullanılmıştır (Ali ve ark. 2003; Kobayashi ve ark. 2006; Balasubramanian ve Rho 2007). Antioksidanların embriyo gelişimi üzerine olumlu etkisi bilinmekle birlikte bazı bilim insanları bu pozitif etkilerin belirli koşullarda geçerli olduğunu savunmuşlardır. Yapılan çalışmalarda antioksidanların olumlu etkileri %20 O₂ basıncı varlığında ortaya çıkmaktadır (Olson ve Seidel 2000). Aynı şekilde kullanılan medyum türünün ve antioksidan miktarının da önemli olduğu vurgulanmaktadır (Van Soom ve ark. 2002). Sistein, sistin ve β -merkaptotanol %20 O₂ basıncı varlığında olgunlaşma için kullanılan TCM-199 medyumunda pozitif etki ederken; 50 μ M sisteamin %20 O₂ basıncı altında TCM-199 medyumunda pozitif, aynı miktar sisteamin %5 O₂ basıncında ve SOF medyumunda embriyo gelişimine pozitif etki etmektedir (Takahashi ve ark. 1993). İn vitro embriyo üretiminde araştırmacılar tarafından çeşitli oksijen basınçları farklı koşullarda denenmektedir. Örneğin; ovidukt hücreleri veya granuloza hücrelerinin kullanıldığı ko

kültür ortamlarında %20 O₂ basıncı, somatik hücrelerinin kullanılmadığı ko kültürsüz ortamlarda ise %5 O₂ basıncı daha uygun bulunmuştur (Yuan ve ark. 2003; Özdaş ve ark. 2012b). Ayrıca %5 O₂ basıncı altında in vitro üretilen sığır embriyolarında apoptotik hücre oranının %20 O₂ basıncı altında üretilenlerden belirgin bir şekilde düşük olduğu bildirilmektedir (Van Soom ve ark. 2002).

Düşük molekül ağırlıklı tiyol bileşiklerinden olan β -merkaptetanöl ve sisteamin, sistinin sistine indirgenmesini sağlayarak hücre içi glutatyon sentezinin (GSH) artışına sebep olmaktadır (Ali ve ark. 2003; Nedambale ve ark. 2006b; Balasubramanian ve Rho 2007). Hücre içi GSH yükselişi, embriyoyu endojen veya eksojen kaynaklı ROS ürünlerinin yaratacağı oksidatif strese karşı koruyarak hücre kalitesini ve blastosiste ulaşan embriyo sayısını artırarak etki göstermektedir (Singhal ve ark. 2009). Balasubramanian ve Rho'nun 2007 yılındaki makalesinde in vitro olgunlaşma medyumlarına ilave edilen β -merkaptetanöl, sistein ve sistin gibi antioksidanların sığır oositlerinde hücre içi glutatyon sentezini, embriyo kalitesini ve in vitro kültürün 6. gününde blastosiste ulaşan embriyo sayısını arttırdığı bildirilmektedir (De Matos 1996; 1997).

İn vitro olgunlaşma veya kültür süresince kullanılan antioksidanlar, vitrifikasyon sonrası eritilen sığır embriyolarının kültüre edilmeleri için kullanılan SOF, CR1 ve KSOM gibi medyumlara da ilave edilmiş ve gelişimleri kontrol edilmiştir. Yapılan çalışmada eritme sonrası 6 saatlik kültür süresi sonunda en iyi gelişimin β -merkaptetanöl eklenen SOF medyumunda olduğu bildirilmiştir (Nedamble ve ark. 2006).

2.4.5. Dondurma Yöntemleri ve Kriyoprotektanlar

Günümüzde birçok memeli türünün dişi genital hücrelerinin kriyoprezervasyonu genetik materyalin korunması açısından oldukça etkili bir yöntemdir (Vajta ve Kuwayama 2006; Özdaş ve ark. 2012c).

Dişi genital hücreler in vitro fertilizasyon işlemlerinde kullanılmak veya dondurulmak üzere çeşitli yöntemlerle ve seksüel sikluslarının farklı aşamalarında elde edilebilmektedirler. Bu yöntemler arasında kısırlaştırma sonrası ve kesim sonrası elde

edilen ovaryumlardan folikül aspirasyonu ya da kesme yöntemi ile doğal ya da kimyasal yolla senkronize edilmiş hayvanlardan ovulasyonu takiben ovum toplama yöntemi (OPU) sayılabilmektedir (Ward ve ark. 2000; Galli ve ark. 2003; Van Wagtendonk-de Leeuw 2006).

Toplanan dişi genital hücreler temel olarak iki metotla dondurulmaktadırlar. Birincisi geleneksel yavaş dondurma ikincisi ise hızlı ve ani dondurma (vitritfikasyon) metodudur. Her iki yöntemde hücre içi ve dışında bulunan suyun biyolojik olarak donması söz konusudur. Ancak yavaş dondurma metodunda hücre dışındaki su kristalleştiğinde hücre içindeki su henüz donmamıştır. Kristalleşmenin etkisiyle ortamda bulunan kriyoprotektan maddelerin yoğunluklarında artış meydana gelir ki, osmotik dengeyi sağlamak amacıyla hücre içinde bulunan su dehidre olarak hücre dışına çıkmaya başladığında artık hücre içi yoğunluk da artmış olmaktadır sonuç olarak burada da kristalleşme başlar ve ardından donma işlemi gerçekleşmiş olur (Bucak ve Tekin 2007). Oluşan buz kristalleri büyük oldukları için hücre zarına olumsuz yönde etki etmektedirler. Vitritfikasyon metodunda ise hücre içi ve hücre dışında bulunan su aniden hızlı bir şekilde camsılaşıarak donar. Bu metodun en önemli avantajı, su kristallerinin ani ve hızlı donmaya bağlı, geleneksel yavaş dondurma yönteminden farklı olarak daha küçük boyutlarda oluşmalarıdır (Saragusty ve Arav 2011).

Yavaş dondurma metodunda hücreler kademeli olarak düşük konsantrasyonda ve hücre zarından geçebilen kriyoprotektanlar arasından genellikle gliserol ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi kriyoprotektanlarla dondurulmuşlardır (Whittingham 1975; Saragusty ve Arav 2011). Vitritfikasyon metodunu kullanarak oosit ya da embriyo dondurma sırasında dikkat edilmesi gereken bazı kritik noktalar bulunmaktadır. Bunlardan ilki dondurma sıcaklık derecesidir. Temel olarak likit nitrojen (LN₂) kullanılarak ulaşılan dondurma derecesi -196 °C'dir. Vitritfikasyonda dikkat edilmesi gereken ikinci ve en önemli nokta ise kullanılan dondurma medyumlarının miktarlarıdır. Medyum hacmi ne kadar az olursa dondurma başarısı o kadar artmaktadır (Kuwayama 2007; Rios ve ark. 2010). Son yüzyılda vitritfikasyonda kullanılan solüsyonların kullanılan hacimlerini en aza indirmek için araştırmacılar tarafından Elektron Mikroskop Izgara Sistemi (EM grid) (Park ve ark. 1999; Kim ve ark. 2012), Minimum Damla

Hacmi (MDS) (Abdalla ve ark. 2010), Kriyotop (Kuwayama 2007; Lin ve ark. 2010; Galeati ve ark. 2011), Katı Yüzey Vitrifikasyonu (SSV) (Somfai ve ark. 2006; Zhang ve ark. 2009), Açık Çekilmiş Payet (OPS) (Al Yacoub ve ark. 2010; Zhao ve ark. 2012), Kapalı Çekilmiş Payet (CPS) (Yu ve ark. 2010) gibi birçok yöntem kullanılmıştır.

Gerek geleneksel yavaş dondurma gerekse vitrifikasyon metoduyla dışı genital hücrelerin kriyoprezervasyonunda dondurma sırasında oluşabilen soğuk şokuna, hücre içi kristal oluşumuna, aynı şekilde eritme esnasında mevcut kristallerin çözünmesinde meydana gelebilecek zararlı etkilere karşı koruyucu etkileri için kullanılan kimyasal maddelere kriyoprotektan adı verilir. Kriyoprotektanlar hücre içine geçebilenler ve geçemeyenler olmak üzere iki gruba ayrılırlar.

Hücre zarından geçerek etki gösteren kriyoprotektanlar arasında gliserol, etilen glikol, propilen glikol ve DMSO gibi kimyasallar yer almaktadır. Bu maddeler etkilerini hücre içinde mevcut madde ve elektrolit yoğunluğunu azaltmak koşulu ile dehidrasyonu düzenleyerek gösterirler (Bucak ve Tekin 2007; Manjunatha ve ark. 2009). Oositlerin kriyoprezervasyonunda genellikle gliserol ve DMSO gibi kriyoprotektanlar 1-1,5 M oranında kullanılırken; embriyoların dondurulmasında 1,35-1,5 M oranında kullanılmaktadırlar (Saragusty ve Arav 2011).

Hücre dışı kriyoprotektanlar olarak bilinen glukoz, sukroz, fruktoz, trehaloz gibi kriyoprotektanlar da etkilerini donma ve çözünme sırasında oluşabilecek membran hasarına karşı fosfolipitlerle etkileşime girip yüzey artışı sağlayarak gösterirler. Memeli embriyolarının dondurulmasında vitrifikasyon solüsyonlarına sıklıkla ilave edilen sukroz 0,25-0,5 M oranında kullanılmaktadır (Bucak ve Tekin 2007; Tian ve ark. 2007; Manjunatha ve ark. 2008; Özdaş ve ark. 2012c). Yapılan çalışmalarla araştırmacılar vitrifikasyon metoduyla dondurulup eritilen embriyoların yaşama oranlarının ve transferi sonucu gebelik oranlarının daha yüksek olduğunu savunmaktadırlar (Pugh ve ark. 2000; Isachenko ve ark. 2003). Buna bağlı olarak tez çalışmasında vitrifikasyon metoduyla sığır embriyolarının dondurulması tercih edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Oosit Eldesi ve Seçimi

Çalışmada, 2011-2012 yılları arasında Tuzla Mezbahasından (Elif Et) alınan Holstein ırkı (kültür ırkı) sığır ovaryumları kullanılmıştır (Şekil 3-1).

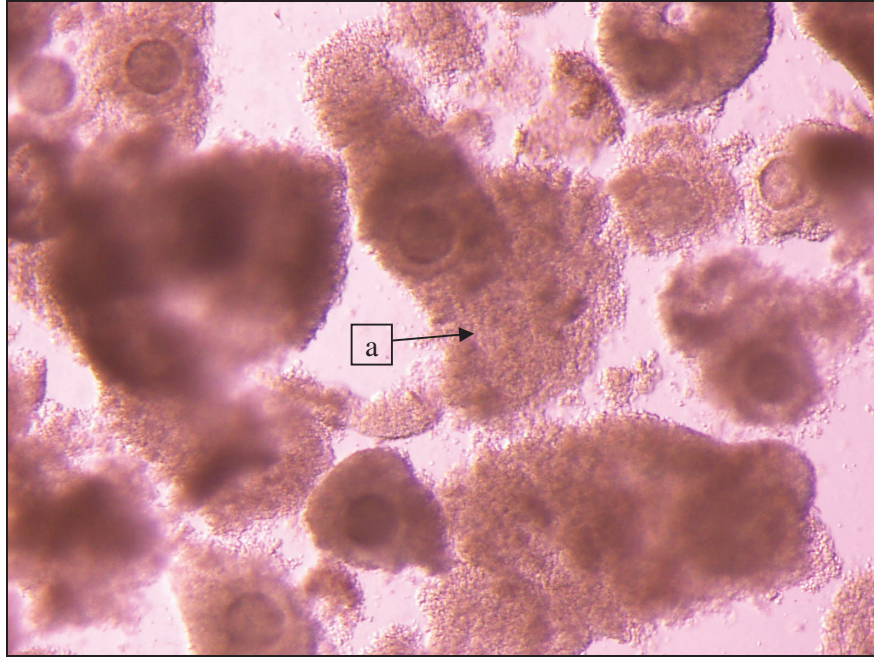


Şekil 3-1: Holstein ırkı inek.

(<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/269677/Holstein-Friesian>)

Ovaryumlar antibiyotik ilaveli (Penisilin 250 IU/mL, Streptomisin 125 µg/mL ve Neomisin 125 µg/mL) 30-35 °C'lik Dulbeco'nun fosfat tamponlu tuz solusyonu (D-PBS/FTTS) içerisinde 2-3 saat içinde laboratuvara getirilmiştir (Khamsi ve

Armstrong 1997). Oositler, ovaryumlar üzerinde bulunan 2-8 mm çaplı foliküllerden kesme yöntemi ile elde edilmişlerdir (Khatir ve ark. 2007). Bu yöntemde bistüri ucu ile ovaryumların üzerinde bulunan foliküllere yüzeysel (1-2 mm derinlikte) ve sık aralıklarla kesitler atılmış ve açılan kesitlerin içleri 22 gauge steril iğne ve 20 mL'lik sığır ovaryum yıkama medyumu çekilmiş enjektör yardımıyla steril petrilere yıkanmıştır (Şekil 3-2). Petrilere yıkanan oositler mikroskop altında kumulus ooforus hücreleri ve morfolojik değerlendirmeye göre olgunlaşmaya konmak üzere seçilmişlerdir. Döllenecek oositlerde hücre çerperinin düzgün olması, homojen bir sitoplazmaya sahip olmaları, zona pellusidalarının düzgün ve hasarsız olması, etraflarında en az 3-4 sıra kumulus ooforus hücreleri kompakt bir şekilde kaplı olmaları gibi özellikler aranmış ve bu kriterlere göre olgunlaşmaya konmuşlardır (Abe ve ark. 1999).



Şekil 3-2: Ovaryumlardan kesme metoduyla elde edilen olgunlaşmamış sığır oositleri.

a) Kumulus hücreleri

3.2. Oositlerin Olgunlaştırılması

Mikroskop altında seçilen oositler hepesli TCM-199 (Lonergan ve ark. 1996) medyumunda 3 kez yıkandıktan sonra her bir grup için ayrı hazırlanan ve önceden gazlanmış olan olgunlaşma medyumlarında yıkandıktan sonra 700 µL IVM medyumunu içeren dört kuyucuklu petri kaplarına her bir kuyucuğa 30-50 adet oosit olacak şekilde aktarılmıştır. Olgunlaşma için seçilen oositler, iki gruba ayrılarak [GrupA (Sisteaminli) ve GrupB (Sisteaminsiz)] antioksidan bir madde olan sisteamin ile modifiye edilen TCM-199 medyumunda ve sisteaminsiz TCM-199 medyumunda 38,8 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat olgunlaşmaya bırakılmıştır (Şekil 3-3).



Şekil 3-3: Olgunlaşma sonrası kumulus hücrelerinin genişlemesi.

a) Açılmış kumulus hücreleri

3.3. Olgunlaştırılan Oositlerinin Döllenmesi

Olgunlaşma sonrası etraflarındaki kumulus ooforus hücreleri açılan oositler olgun kabul edilerek GrupA (Sisteaminli) ve GrupB (Sisteaminsiz) için ayrı ayrı

hazırlanan önceden gazlanmış IVF-TALP medyumuna (Fair ve ark. 2001; Özdaş ve ark. 2012b) aktarılmışlardır. Aktarma işlemi, olgunlaşma medyumundan çıkarılan oositlerin önce 2 mL döllenme medyumunu içeren 35 mm'lik petrisinde üç defa yıkanması hemen ardından da döllenmenin gerçekleştirileceği ve içerisinde 400 µL döllenme medyumunu bulunan dört kuyucuklu petrilere her kuyucuğa 25-35 adet oosit olacak şekilde yerleştirilmesiyle yapılmıştır.

3.3.1.Spermanın Eritilmesi, Motilitenin Değerlendirilmesi ve Konsantrasyonunun Hesaplanması

Döllenme için 2 adet holstein ırkı (kültür ırkı) boğaya ait donmuş 0,25'lik sperma payetleri 37 °C'de 30 sn süre ile eritilmişlerdir. Eritme sonrası motilite muayenesinde en az %45-60 motil olanlar tespit edildikten sonra sperma konsantrasyonunun hesaplanması aşamasına geçilmiştir. Hesaplama için Thoma lamı kullanılmıştır. Thoma lamında sayım yapabilmek için hazırlanan karışım (95 µL Hancock solüsyonu üzerine 5 µL sperma) spermanın 1:20 oranında sulandırılmasını sağlamıştır. Eppendorf tüpünde sulandırılan spermatozoonlar Thoma lamında sayılarak döllenme için $1-2 \times 10^6$ /mL olacak şekilde hesaplanmıştır (Goovaerts ve ark. 2009). Payet içeriği yıkanmak üzere 4 mL Sperm-TALP medyumunu (Özdaş ve ark. 2012b) içeren 14 mL'lik konik tüplere aktararak 1500 g'de 5 dk santrifüj edilmişlerdir. Birinci santrifüj işlemi sonunda süpernatant atılarak dipte kalan spermanın üzerine 4 mL'ye tamamlayacak şekilde Sperm-TALP eklenmiş ve tekrar 1500 g'de 5 dk daha santrifüj edilmişlerdir. Son santrifüj sonrasında süpernatant dipteki tortuyu karıştırmadan atılarak tekrar taze Sperm-TALP medyumunu ile 0,5 mL'ye tamamlanmıştır. Yıkanan spermatozoonlar, döllenme medyumunda hazır bulunan olgun oositlerin üzerine otomatik pipet yardımıyla eklenmiş ve toplam hacimin her bir kuyucuk için 500 µL olması sağlanarak 38,8 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 18-22 saat süre ile döllenmeye bırakılmışlardır.

3.4.Döllen Oositlerin Kültür Medyumlarına Aktarılması

3.4.1.Kültür Medyum Droplarının Hazırlanması

Sisteaminli (Grup A) ve Sisteaminsiz (Grup B) olgunlaşma medyumlarında olgunlaştırılan sığır oositlerinin kültürlerinde farklı iki medyum SOF ve CR1aa (Tervit ve ark. 1972; Rosenkrans ve ark. 1993) test edilmek amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla her bir grup iki alt gruba bölünerek toplamda dört kültür grubu oluşturulmuştur:

Grup A-I SOF, Grup A-II CR1aa, Grup B-I SOF, Grup B-II CR1aa

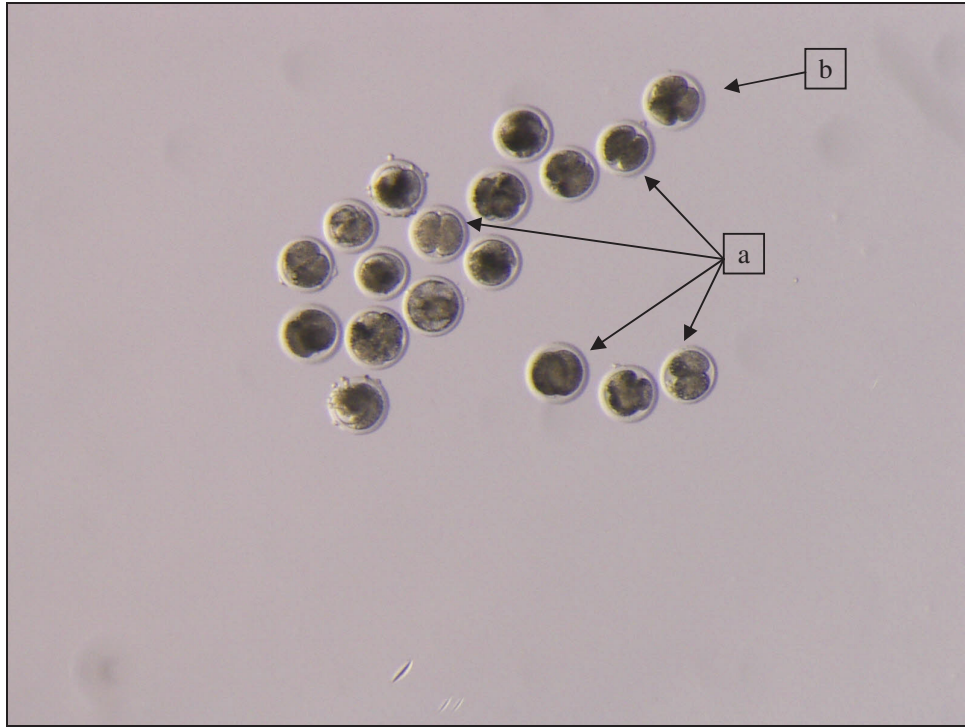
Her iki grup için bir gece önceden ayrı ayrı hazırlanıp gaz karışımı içeren inkübatöre gazlanması için bırakılan dört kuyucuklu kültür petrilerinin her kuyucuğuna önce 5 µL kültür medyumuna üzerine 910 µL mineral yağ son olarak da 95 µL kültür medyumuna olacak şekilde droplar yapılmıştır.

3.4.2. Döllenmiş Oositlerin Spermatozoonlardan ve Kumulus Hücrelerinden Arındırılması ve Kültüre Aktarılması

Önceden hazırlanan ve 38,5 °C'de bulunan 14 mL'lik konik santrifüj tüplerinin içinde 1 mL sığır yıkama medyumuna alınan etrafları spermatozoonlarla kaplı ve döllenmiş olduğu düşünülen oositler Grup A ve B için ayrı ayrı 1 dk süre ile karıştırılmışlardır. Karışım içeriği 35 mm'lik boş petriye dökülerek stereo mikroskop altında embriyo seçimi gerçekleştirilmiştir. Seçilen embriyolar üç kez sığır yıkama medyumunda (Hepesli TCM-199) ve bir kez de %5 FCS katkılı SOF ve CR1aa medyumlarında yıkanmışlardır. Kumulus hücreleri ve spermatozoonlardan arındırılan döllenmiş zigot olarak düşünülen Grup A (Sisteaminli) ve Grup B (Sisteaminsiz)' ye ait embriyolar kendi gruplarında hemen hemen eşit sayıda iki alt gruba bölünerek önceden hazırlanarak inkübatörde gazlanması sağlanmış embriyo kültür medyumlarında her dropta 20-30 adet embriyo olacak şekilde 38,8 °C'de %5 CO₂, %5 N₂ ve %90 nem içeren inkübatörlerde 7-9 gün süre ile kültüre edilmişlerdir.

3.5. Kültüre Konan Embriyoların Bölünme Kontrollerinin Yapılması

İn vitro kültür aşaması sırasında embriyoların bölünme kontrolleri yapılmıştır. Kültür süresinin başlangıcından itibaren 48. saat sonunda bölünmüş olan embriyolar kendi gruplarına ait taze medyum droplarını içeren, önceden gazlanmış 60 mm'lik kültür petrilere alınarak bölünmemiş olan diğer embriyolardan ayrılmışlardır. Böylelikle bölünmemiş olan embriyoların metabolik artıklarının oluşturabileceği olumsuz etki ortadan kaldırılmış olmaktadır (Şekil 3-4).



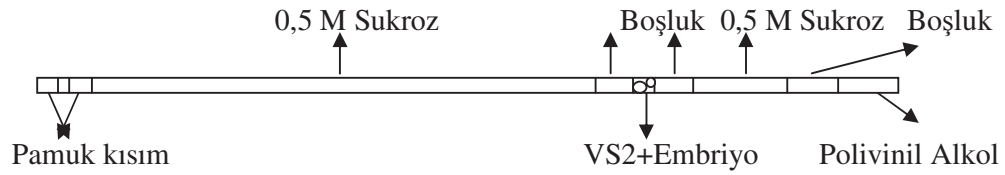
Şekil 3-4: 48. saat sonunda bölünmüş iki blastomerli sığır embriyoları.

a) İki blastomer aşamasındaki embriyolar, b) 3-4 blastomer aşamasındaki embriyo

3.6. Gelişen Embriyoların Dondurulması

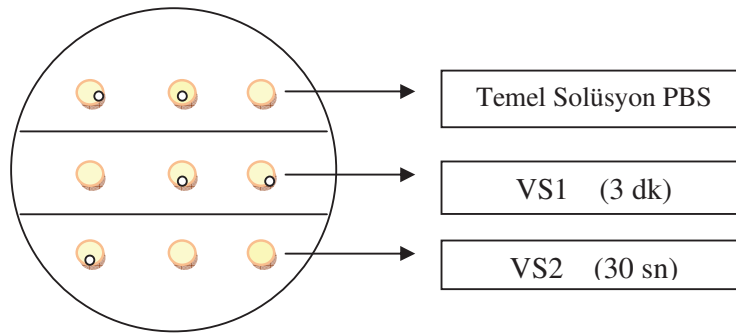
Kültür sonunda blastosist ve genişlemiş blastosist aşamasına ulaşmış ayrı ayrı SOF ve CR1aa medyumlarında geliştirilen Grup A ve Grup B'ye ait sağlıklı embriyolar dondurma işlemine tabi tutulmak üzere seçilmişlerdir. Seçilen embriyolar hızlı bir

şekilde camlaştırma (vitrikasyon) metoduna göre payet yöntemi ile (Kasai 1997; Vajta 2000) dondurulmuşlardır (Şekil 3-5).



Şekil 3-5: Payetlere yerleştirilen embriyoların görüntüsü.

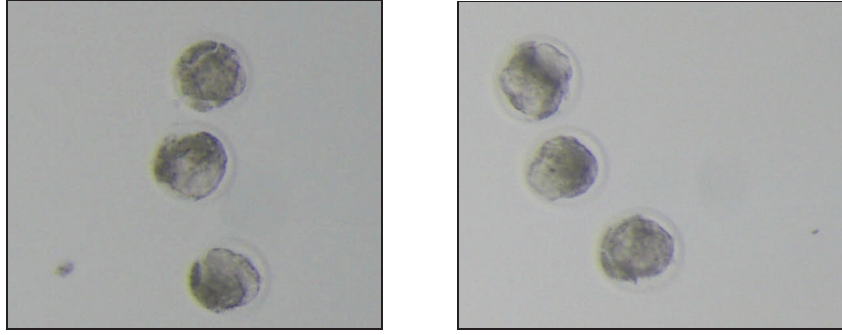
Vitrikasyon metodunda kullanılan solüsyonlar; ekilibrasyon (VS1) ve vitrikasyon (VS2) solüsyonları şeklinde adlandırılmış olup, temel olarak %20 fetal buzağı serumu içeren antibiyotik ilaveli fosfat tamponlu tuz solüsyonundan hazırlanmıştır. Ekilibrasyon solüsyonu olarak 1,5 M etilen glikol (EG) ve 1 M dimetilsülfoksit (DMSO) kombinasyonu; vitrikasyon solüsyonu olarak da 2,5 M EG, 2 M DMSO ve 0,5 M sukroz kombinasyonu kullanılmıştır (Şekil 3-6).



Şekil 3-6: Embriyoların vitrikasyon medyumundaki görünümü.

Seçilen embriyolar önceden hazırlanmış ve oda ısısında bulunan %20 FCS katkılı PBS droplarına alınmışlardır. 70 µL'lık 3 ayrı drop halinde hazırlanan temel solüsyonda adaptasyon amaçlı kısa bir süre bekletilen embriyolar, iki aşamalı

vitrikasyon metodunun birinci aşaması olan ekilibasyon solüsyonuna aktarılmıştır. 3 dk boyunca 70 µL'lik 3 ayrı drop halinde hazırlanan VS1 solüsyonunda pasajlanarak bekletilen embriyolar hemen ardından yine 70 µL'lik 3 ayrı drop halinde hazırlanan VS2 solüsyonuna (Şekil 3-7) alınarak 30 sn içinde önceden hazırlanmış embriyo dondurma payetlerine 3-5 adet embriyo olacak şekilde yerleştirilip payetin açık olan ucu önce polivinilalkole (PVA) daha sonra suya daldırılarak kapatılması sağlanmış ve direkt olarak -196 °C'lik sıvı azota 45°'lik açıyla daldırılarak dondurulmuşlardır (Özdaş ve ark. 2012c).

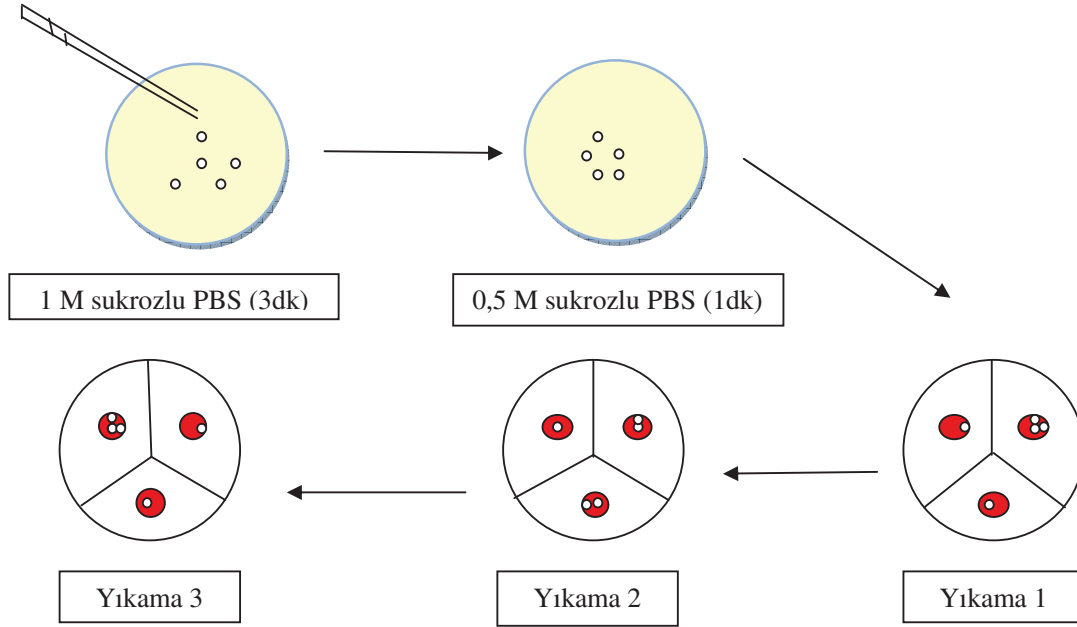


Şekil 3-7: Sisteaminsiz ortamda olgunlaştırılıp SOF medyumunda geliştirilen blastosist aşamasındaki embriyolar. VS1 (solda) ve VS2 (sağda).

3.7. Dondurulan Embriyoların Eritilmesi

Dondurulmuş embriyo payetleri en az 1 hafta bekletildikten sonra eritilmişlerdir. Payetler sıvı azottan çıkarıldıktan sonra yaklaşık 10 sn ortam sıcaklığında havada tutulduktan sonra direk olarak 37 °C'lik su banyosunda 30 sn süre ile eritilmişlerdir. Su banyosundan çıkarılan payetler peçete yardımıyla iyice kurutulmuş ve polivinilalkol ile kapatılmış olan ucu kesildikten sonra dik bir şekilde içinde önceden hazırlanmış ve oda ısısında bulunan %20 serum katkılı PBS kullanılarak yapılan 1 M Sukroz solüsyonu bulunan 35 mm'lik petriye payetin pamuk kısmı kesilerek içeriğin akması sağlanmıştır. Embriyolar 3 dk boyunca 1 M sukroz solüsyonunda, sitoplazmalarının homojen hale gelmesi, farklı osmotik basınçlar nedeniyle büzüşen embriyoların tekrar genişlemesi için bekletilmiştir. Ardından 0,5 M sukroz solüsyonuna alınmış ve burada 1 dk

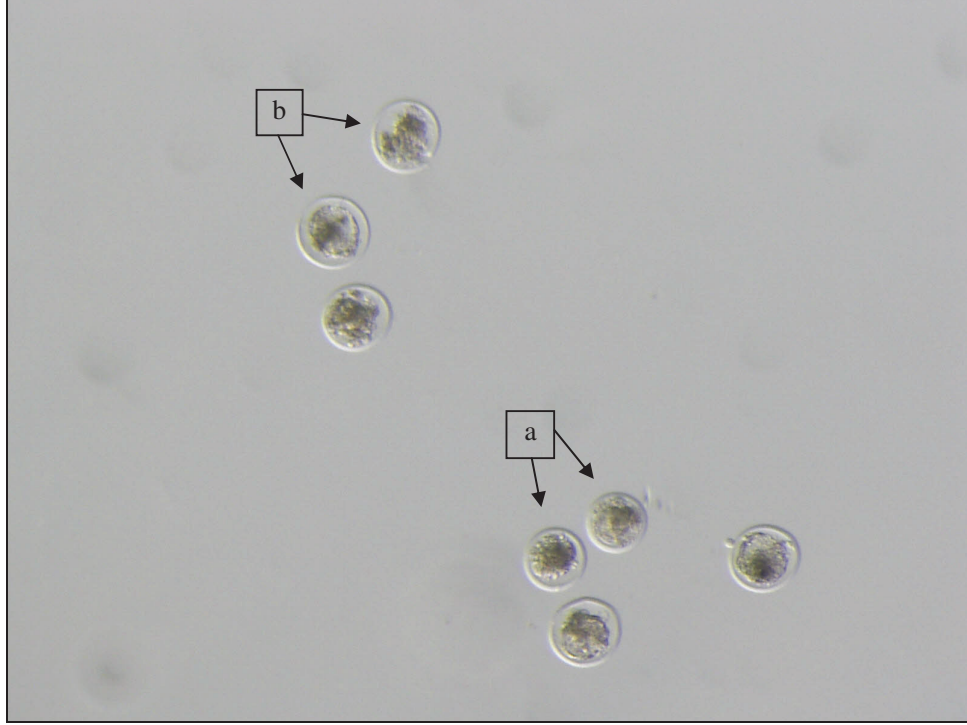
bekletildikten sonra hepesli TCM-199 medyumuna aktarılmışlar ve 3 kez aynı medyum içerisinde yıkanmışlardır (Şekil 3-8).



Şekil 3-8: Dondurulan embriyoların eritilmesi.

3.8. Eritilen Embriyoların Kültüre Edilmesi

Eritilen embriyolar hepesli TCM-199 medyumunda 3 kez yıkandıktan sonra gelişimlerinin ve dondurma işleminin embriyo üzerindeki etkisinin tespit edilmesi için her embriyo kendi grubuna ait önceden hazırlanmış olan %5 FCS katkılı SOF ve CR1aa kültür medyumlarında 1 kez yıkandıktan sonra 35 mm'lik kültür medyumlarında 48 saat süre ile kültüre edilmiştir (Şekil 3-9). Kültür medyumlarının dropları eritilen embriyo sayısına bağlı olarak hücre başına 10 μ L medyum olacak şekilde hazırlanmıştır. 48 saatlik süre sonunda embriyoların eritme sonrası gelişimlerine devam edip etmedikleri kontrol edilmiştir (Özdaş ve ark. 2012c).



Şekil 3-9: Sisteaminli ortamda olgunlaştırılıp CR1 medyumunda geliştirilen blastosist ve genişlemiş blastosist aşamasındaki embriyolar.

a) Blastosist, b) Genişlemiş blastosist

3.9.Çalışmada Kullanılan Medyumların Hazırlanması

3.9.1.Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonunun Hazırlanması (FTTS)

Mezbahada kesilen embriyoların laboratuvara taşınması amacıyla kullanılan fosfat tamponlu tuz solüsyonu aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır.

Tablo 3-1: Fosfat Tamponlu Tuz Solüsyonu (FTTS):

Kimyasal Madde	Sigma	Miktar (gr)	Final Konsantrasyon
NaCl	S 5886	8 gr	137 mM
KCl	P 5405	0,2 gr	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	P 5655	0,3 gr	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	S 5136	2,16 gr	8,1 mM
Penisilin	P 7794	0,3 gr	250 IU/mL
Streptomisin	S 1277	0,25 gr	125 µg/mL
Neomisin	N 6386	0,25 gr	125 µg/mL

Kimyasal maddeler 700 mL ultra saf su içinde çözündürüldükten sonra solüsyon üzerine saf su eklenerek medyum 1.000 mL'ye tamamlanmıştır.

Solüsyonun osmotik basıncı 280 mOsm/kg ve pH'sı da 7,2-7,4 olarak ayarlanmış ve por çapı 22 µm'lik filtre yardımı ile steril edilerek şişe içinde 4 °C'de buzdolabında en fazla 1 hafta süre ile saklanmıştır.

3.9.2.Sığır Oosit Yıkama Medyumunun Hazırlanması

Mezbahadan alınan ovaryumlar antibiyotik ilaveli (Penisilin 250 IU/mL, Streptomisin 125 µg/mL ve Neomisin 125 µg/mL) 30-35 °C'lik Dulbeco'nun fosfat tamponlu tuz solusyonu (D-PBS/FTTS) içerisinde en geç 2-3 saat içinde laboratuvara getirildikten sonra oosit eldesi amacıyla kullanılan sığır yıkama medyumunu aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır.

Tablo 3-2: Sığır Oosit Yıkama Medyumu:

Kimyasal Madde	Sigma	Heparinsiz Yıkama	Heparinli Yıkama	Final Konsantrasyon
Hepes TCM-199	M 2520	660 mg	660 mg	45 mL'ye tamamla
Sodyum Bikarbonat	S 5761	99 mg	99 mg	45 mL'ye tamamla
Gentamisin sülfat 10 mg/mL (200x)	G 1264	0,23 mL	0,23 mL	50 µg/mL
Heparin 1000 U/mL (50x)	H 3149	-	0,9 mL	20 U/mL
L-glutamin 200 mM (200x)	G 5763	0,23 mL	0,23 mL	1 mM

Hazırlanan heparinsiz yıkama medyumunun içine %2,5 oranında heparinli yıkama medyumundan eklenerek sığır yıkama medyumunu elde edilmiştir.

Medyumun osmotik basıncı 280-285 mOsm/kg ve pH'sı da 7,2-7,4 olarak ayarlandıktan sonra por çapı 22 µm'lik filtre yardımı ile steril edilerek şişe içinde 4 °C'de buzdolabında en fazla 1 hafta süre ile saklanmıştır.

3.9.3.Sıgır Olgunlaşma Medyumunun Hazırlanması

Mikroskop altında toplanan oositler bazı kriterlere göre seçilerek olgunlaşma medyumuna aktarılırlar. Seçilecek oositlerin etrafındaki kumulus ooforus hücrelerinin en az 3-4 sıra olmasına, sitoplazmalarının homojen dağılım göstermesine ve hücre çeperlerinin düzgün olmasına dikkat edilir.

Tablo 3-3: Olgunlaşma Medyumu:

Kimyasal Madde	20 mL	Sigma
TCM-199	190 mg	M 5017
Sodyum Bikarbonat	44 mg	S 5761
L-Glutamin 200 mM	0,03 mL	G 5763
Na-pirüvat 20 mM (100x)	0,2 mL	P 3662
EGF 10 µg/mL (200x)	0,05 mL	E 4127
LH 10 µg/mL	0,1 mL	L 5269
FSH 10 µg/mL	0,005 mL	F 8174
Gentamisin sülfat 10 mg/mL (200x)	0,1 mL	G 1264
Sisteamin (80x)	*0,125 mL	M 9768

*Kullanım sabahı yukarıdaki formüle göre hazırlanan olgunlaşma medyumunu iki eşit hacime bölünerek, 10 mL'lik hacimlerden birinin içinden 125 µL çıkartılarak yerine çıkartılan miktar kadar sisteamin eklenmiştir. Bu işlemin sonunda her iki medyumun pH'sı 7,2-7,4 olarak, osmotik basıncı 280±10 mOsm/kg olarak ayarlanmış ve 22 µm'lik düşük protein tutan filtre yardımıyla steril edilerek kullanılmıştır.

3.9.4.Sperma Yıkama (Sperm-TALP) ve Döllenme Medyumunun (IVF-TALP) Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

3.9.4.1.Sperm-TALP Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Olgunlaşmış oositlerin döllenmesi için kullanılacak eritilmiş sperma payetlerinin dondurma medyumlarından arındırılması amaçlı yıkama işleminde kullanılacak Sperm-TALP medyumunun stok solüsyonu aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır.

Tablo 3-4: Sperm-TALP Stok Solüsyonu:

Kimyasal Madde	Moleküler Ağırlık (gr)	Final Konsantrasyon (mM)	200 mL	Sigma
NaCl	58,44	100,0	1,168 gr	S 5886
KCl	74,55	3,10	0,0462 gr	P5405
NaHCO ₃	84,01	25,00	0,4200 gr	S 4019
Laktik asit	%60 w/w 112,1	21,60	0,807 mL	L 4263
NaH ₂ PO ₄	120,0	0,29	0,0070 gr	S 5011
CaCl ₂ , 2H ₂ O	147,02	2,10	0,0617 gr	C 7902
MgCl ₂ , 6H ₂ O *	203,30	1,50	3 mL 100 mM stok	M 2393
Hepes (asit)	238,30	10,00	0,4766 gr	H 9136
Fenol Red	354,38	5 µg/mL	0,0010 gr	P 5530
Embriyo test edilmiş su	-	-	200 mL'ye tamamla	W1503

*Magnezyum Klorit stok (MgCl₂ 6H₂O): 100 mM stok solüsyonu hazırlamak için 10 mL embriyo test edilmiş su içinde 203 mg MgCl₂ 6H₂O çözdürülmüş ve 1 mL'lik porsiyonlar eppendorf tüplerinin içinde -20 °C'de en fazla 1 ay süre ile saklanmıştır.

3.9.4.2.IVF-TALP Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Olgunlaşmış oositlerin döllenmesi için kullanılacak IVF-Talp medyumunun stok solüsyonu aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır.

Tablo 3-5: IVF-TALP Stok Solüsyonu:

Kimyasal Madde	Moleküler Ağırlık (gr)	Final Konsantrasyon (mM)	200 mL	Sigma
NaCl	58,44	114,00	1,3324 gr	S 5886
KCl	74,55	3,20	0,0477 gr	P 5405
NaHCO ₃	84,01	25,00	0,4201 gr	S 4019
Laktik asit	%60 w/w 112,1	10,00	0,374 mL	L 4263
NaH ₂ PO ₄	120,0	0,40	0,0096 gr	S 5011
CaCl ₂ , 2H ₂ O	147,02	2,00	0,0588 gr	C 7902
MgCl ₂ , 6H ₂ O *	203,30	0,50	1 mL 100 mM stok	M 2393
Fenol Red	354,38	5 µg/mL	0,0010 gr	P 5530
Embriyo test edilmiş su	-	-	200 mL'ye tamamala	W1503

*Magnezyum Klorit stok (MgCl₂ 6H₂O): 100 mM stok solüsyonu hazırlamak için 10 mL embriyo test edilmiş su içinde 203 mg MgCl₂ 6H₂O çözdürülmüş ve 1 mL'lik porsiyonlar eppendorf tüplerinin içinde -20 °C'de en fazla 1 ay süre ile saklanmıştır.

3.9.5.Sperma Yıkama (Sperm-TALP) ve Döllenme (IVF-TALP) Medyumlarının Hazırlanması

3.9.5.1.Sperm-TALP Medyumunun Hazırlanması

Kullanım gününden 1 gün önce aşağıdaki formüle göre hazırlanan medyumun pH'sı 7,2-7,4 olarak, osmotik basıncı 305±7 mOsm/kg olarak ayarlanmış ve 22 µm'lik düşük protein tutan filtre yardımıyla steril edilerek 4 °C'de saklanmıştır.

Tablo 3-6: Sperm-TALP Medyumu:

Kimyasal Madde	Sigma	20 mL	Final konsantrasyon
Sperm-TALP Stok	-	20 mL'ye tamamla	-
Gentamisin sülfat 10 mg/mL (200x stok) *	G 1264	0,1 mL	50 µg/mL
Na-pirüvat 20 mM (20x stok) **	P 3662	1 mL	1 mM
BSA, fraksiyon V	A 4919	0,120 gr	6 mg/mL (%0,6)

*10 mg/mL gentamisin sülfat stok solüsyonu: 0,300 gr gentamisin sülfat, 30 mL embriyo test edilmiş su içerisinde çözündürülmüş ve 1 mL'lik porsiyonlar halinde eppendorf tüpünde 4 °C'de en fazla 1 ay süre ile saklanmıştır.

**20 mM Na-pirüvat stok solüsyonu: 0,022 gr Na-pirüvat, 10 mL embriyo test edilmiş su içerisinde çözündürülmüş ve 14 mL'lik tüp içinde 4 °C'de en fazla 1 hafta süre ile saklanmıştır.

3.9.5.2.IVF-TALP Medyumunun Hazırlanması

Kullanım gününden 1 gün önce aşağıdaki formüle göre hazırlanan medyumun pH'sı 7,2-7,4 olarak, osmotik basıncı 295±5 mOsm/kg olarak ayarlanmış ve 22 µm'lik düşük protein tutan filtre yardımıyla steril edilerek 4 °C'de saklanmıştır.

Tablo 3-7: IVF-TALP Medyumu:

Kimyasal Madde	Sigma	20 mL	Final concentration
IVF-TALP Stok		20 mL'ye tamamla	
PHE 100x Stok *	P 4875 H 1384 E 4250	0,2 mL	20 µM 10 µM 1 µM
Gentamisin sülfat 200x Stok (10 mg/mL) **	G 1264	0,1 mL	50 µg/mL
Heparin Stok 1mg/mL (170 USP/mg) ***	H 3149	0,6 mL	30 µg/mL
Na-pirüvat 20mM (80x stok) ****	P 3662	0,25 mL	0,25 mM
BSA, fraksiyon V	A 4919	0,1200 gr	6 mg/mL (%0,6)

**10 mg/mL gentamisin sülfat stok solüsyonu: 0,300 gr Gentamisin sülfat, 30 mL embriyo test edilmiş su içerisinde çözündürülmüş ve 1 mL'lik porsiyonlar halinde eppendorf tüpünde 4 °C'de en fazla 1 ay süre ile saklanmıştır.

****20 mM Na-pirüvat stok solüsyonu: 0,022 gr Na-pirüvat, 10 mL embriyo test edilmiş su içerisinde çözündürülmüş ve 14 mL'lik tüp içinde 4 °C'de en fazla 1 hafta süre ile saklanmıştır.

***1 mg/mL Heparin stok solüsyonu: 0,030 gr heparin, 30 mL Sperm-TALP medyumunun içerisinde çözündürülmüş 1,5 mL'lik porsiyonlar halinde eppendorf tüpünde -20 °C'de en fazla 1 ay süre ile saklanmıştır.

*100x PHE stok solüsyonu:

NaCl 157 mM (Sigma S 5886) solüsyonu: 0,918 gr NaCl 100 mL embriyo test edilmiş su içerisinde çözündürülür.

Laktat bisülfid stok: 126 µL sodyum laktat (Sigma L 4263) + 50 mg sodyum metabisülfid (Sigma S 1516) 50 mL embriyo test edilmiş su içerisinde çözündürülür ve 1 M HCl (hidrojen klorik asit) ile pH'sı 4,0'e ayarlanır.

Penisilamin 10 mM (Sigma P 4875): 15 mg penisilamin 10 mL NaCl solüsyonu içerisinde çözündürülür.

Hipotaurin 10 mM (Sigma H 1384): 11 mg hipotaurin 10 mL NaCl solüsyonu içerisinde çözündürülür.

Epinefrin 1 mM (Sigma E 4250): 1,8 mg epinefrin 10 mL laktat bisülfid stok solüsyonu içerisinde çözündürülür. Epinefrin solüsyonu PHE stok solüsyonunun hazır olmasına yakın zamanda hazırlanıp bekletmeden ana karışımın içine katılır.

Tablo 3-8: 100x PHE stok:

Kimyasal Madde	30 mL 100x PHE stok	100X PHE stok içindeki konsantrasyonu	IVF-TALP içindeki konsantrasyonu
10 mM Penisilamin	6 mL	2 mM	20 µM
10 mM Hipotaurin	3 mL	1 mM	10 µM
1 mM Epinefrin	3 mL	0,1 mM	1 µM
157 mM NaCl	18 mL	-	-

100x PHE stok hazırlandıktan sonra epinefrin kolayca okside olduğu için hızlıca 0,5 mL’lik porsiyonlar halinde eppendorf tüpünde ışık görmemesini sağlamak amacıyla etrafı alüminyum folyo ile kaplı olarak -20 °C’de 1 ay süre ile saklanmıştır.

3.9.6.SOF ve CR1aa Kültür Medyumlarının Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

3.9.6.1.SOF Kültür Medyumunun Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Tablo 3-9: SOF-Stok A Solüsyonunun Hazırlanması:

Kimyasal Madde	Sigma	50 mL
NaCl	S 5886	3,145 (gr)
KCl	P 5405	0,267 (gr)
KH ₂ PO ₄	P 5655	0,081 (gr)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	M 2643	0,091 (gr)
Na-laktat	L 4263	0,30 (mL)
H ₂ O	W1503	49,20 (mL)

Hazırlanan solüsyon 22 µm’lik filtre yardımıyla steril edilerek 50 mL’lik tüp içerisinde 4 °C’de 1 ay süre ile saklanmıştır.

Tablo 3-10: SOF-Stok B Solüsyonunun Hazırlanması:

Kimyasal Madde	Sigma	50 mL
NaHCO ₃	S 4019	1,050 (gr)
Fenol Red	P 5530	0,0050 (gr)
H ₂ O	W 1503	50 (mL)

Hazırlanan solüsyon 22 µm'lik filtre yardımıyla steril edilerek 50 mL'lik tüp içerisinde 4 °C'de 1 ay süre ile saklanmıştır.

Tablo 3-11: SOF-Stok C Solüsyonunun Hazırlanması:

Kimyasal Madde	Sigma	10 mL
Na-pirüvat	P 3662	0,0800 (gr)
H ₂ O	W 1503	10 (mL)

Hazırlanan solüsyon 22 µm'lik filtre yardımıyla steril edilerek 14 mL'lik tüp içerisinde 4 °C'de 1 hafta süre ile saklanmıştır.

Tablo 3-12: SOF-Stok D Solüsyonunun Hazırlanması:

Kimyasal Madde	Sigma	10 mL
CaCl ₂ , 2H ₂ O	C 7902	0,2620 (gr)
H ₂ O	W 1503	10 (mL)

Hazırlanan solüsyon 22 µm'lik filtre yardımıyla steril edilerek 50 mL'lik tüp içerisinde 4 °C'de 1 ay süre ile saklanmıştır.

3.9.6.2.CR1aa Kültür Medyumunun Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Tablo 3-13: CR1aa-Stok A Solüsyonunun Hazırlanması:

Kimyasal Madde	Sigma	50 mL
NaCl	S 5886	0,440 (gr)
KCl	P 5405	0,015 (gr)
Na-pirüvat	P 3662	0,003 (gr)
NaHCO ₃	S 4019	0,144 (gr)
Fenol Red (% 0,5)	P 5530	0,032 (µL)
H ₂ O	W 1503	50 mL'ye tamamla

Hazırlanan solüsyon 22 µm'lik filtre yardımıyla steril edilerek 50 mL'lik tüp içerisinde 4 °C'de 1 ay süre ile saklanmıştır.

Tablo 3-14: CR1aa-Stok B Solüsyonunun Hazırlanması:

Kimyasal Madde	Sigma	50 mL
LaktikAsit HemikalsiyumTuzu	L 2000	0,150 (gr)
H ₂ O	W 1503	50 mL'ye tamamla

Hazırlanan solüsyon 22 µm'lik filtre yardımıyla steril edilerek 50 mL'lik tüp içerisinde 4 °C'de 1 ay süre ile saklanmıştır.

3.9.7. SOF ve CR1aa Kùltür Medyumlarının Hazırlanması

3.9.7.1.SOF Kùltür Medyumunun Hazırlanması

Kullanım gününden 2 gün önce aşğıdaki formüle göre hazırlanan medyumun pH'sı 7,4 olarak, osmotik basıncı 275-285 mOsm/kg olarak ayarlanmış ve 22 µm'lik düşük protein tutan filtre yardımıyla steril edilerek 4 °C'de saklanmıştır. Döllenmiş oositlerin kùltüre konacağı günden önceki akşam %5 oranında Fötal Buzağı Serumı eklenerek tekrar 22 µm'lik düşük protein tutan filtre yardımıyla steril edilerek kùltür petrilere hazırlanmıştır.

Tablo 3-15: SOF Kùltür Medyumı:

Kimyasal Madde	Sigma	50 mL
H ₂ O (mL)	W 1503	39 mL
Tri-Na-sitrat-dihidrat	S 1804	0,0050 gr
Miyo-inositol	I 7508	0,0250 gr
SOF-Stok A	-	5 mL
SOF-Stok B	-	5 mL
SOF-Stok C	-	0,5 mL
SOF-Stok D	-	0,5 mL
BME 50X	B 6766	1,5 mL
MEM 100X	M 7145	500 µL
L-Glutamin 200 mM	G 5763	50 µL
Gentamisin Sülfat 10 mg/mL	G 1264	250 µL

3.9.7.2.CR1aa Kùltür Medyumunun Hazırlanması

Kullanım gününden 2 gün önce aşğıdaki formüle göre hazırlanan medyumun pH'sı 7,2-7,4 olarak, osmotik basıncı 280-285 mOsm/kg olarak ayarlanmış ve 22 µm'lik düşük protein tutan filtre yardımıyla steril edilerek 4 °C'de saklanmıştır. Döllenmiş oositlerin kùltüre konacağı günden önceki akşam %5 oranında Fötal Buzağı Serumı eklenerek tekrar 22 µm'lik düşük protein tutan filtre yardımıyla steril edilerek kùltür petrilere hazırlanmıştır.

Tablo 3-16: CR1aa Kùltür Medyumú:

Kimyasal Madde	Sigma	50 mL
H ₂ O	W 1503	50 mL'ye tamamla
CR1aa Stok A	-	38 mL
CR1aa Stok B	-	10 mL
BME 50X	B 6766	1,0 mL
MEM 100X	M 7145	0,5 mL
L-Glutamin 200mM	G 5763	50 µL
Sığır Serum Albümini (Yağ asiti serbest BSA-FAF)	A 8806	0,1500 gr
Penisilin 100 U/mL	P 7794	0,0035 gr
Streptomisin 100 µg/mL	S 1277	0,0050 gr

3.9.8.Dondurmada Kullanılan Medyumların Hazırlanması

3.9.8.1.Vitrifikasyon Medyumunun Temel Solüsyonunun Hazırlanması

Tablo 3-17: Vitrifikasyon Medyumunun Temel Solüsyonu (PBS):

Kimyasal Madde	Sigma	Miktar (gr/L)	Final Konsantrasyon
NaCl	S 5886	8 gr	137 mM
KCl	P 5405	0,2 gr	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	P 5655	0,3 gr	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄ anhidroz	S 5136	1,15 gr	8,1 mM
CaCl ₂ 2H ₂ O*	C 7902	0,133 gr	1,2 mM
MgCl ₂ 6H ₂ O*	M 2393	0,100 gr	0,49 mM
D-Glukoz	G 6152	0,100 gr	5,5 mM
Na-Pirüvat	P 4562	0,036 gr	0,32 mM
Penisilin	P 7794	0,066 gr	100 IU/mL
Streptomisin	S 1277	0,050 gr	50 µg/mL

* CaCl₂2H₂O ve MgCl₂6H₂O ayrı kaplarda embriyo test edilmiş su içerisinde eritilip solüsyonun hacmi 1 L'ye tamamlanmadan önce son aşamada yavaşça medyuma ilave edilmiştir.

Solüsyon hazırlandıktan sonra pH'sı 7,2-7,4 osmotik basıncı 280-285 mOsm/kg olarak ayarlanmıştır. 22 µm'lik filtre yardımıyla steril edilerek 4 °C'de en fazla 1 ay süre ile saklanmıştır.

Kullanım günü vitrifikasyon temel solüsyonunun içine %20 oranında fetal buzağı serumu katılarak tekrar 22 µm'lik düşük protein tutan filtre yardımıyla steril edilmiştir.

3.9.8.2.Ekilibrasyon ve Vitrifikasyon Medyumlarının Hazırlanması

Tablo 3-18: Ekilibrasyon ve Vitrifikasyon Medyumları:

Kimyasal Madde	Ekilibrasyon Medyumu (VS1)	Vitrifikasyon Medyumu (VS2)	Sigma
Etilen Glikol (EG)	0,931 mL (1,5 M)	1,550 mL (2,5 M)	E 9129
Dimetilsülfoksit (DMSO)	0,781 mL (1 M)	1,560 mL (2 M)	D 2650
Sukroz	-	1,71 gr (0,5 M)	S 1888
Temel Solüsyon (%20 FCS'li PBS)	8,288 mL	10 mL'ye tamamla	-

Ekilibrasyon ve vitrifikasyon solüsyonları kullanım gününde %20 FCS katkılı temel solüsyondan taze olarak hazırlanmıştır.

3.9.8.3.Dondurma Payetlerinin Hazırlanmasında ve Eritilmesinde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

Tablo 3-19: Dondurma Payetlerinin Hazırlanmasında ve Eritilmesinde Kullanılan Solüsyonlar:

Kimyasal Madde	0,5 M Sukroz	1 M Sukroz
Sukroz	1,71 gr	3,42 gr
Temel Solüsyon %20 FCS'li PBS	10 mL'ye tamamla	10 mL'ye tamamla

Blastosist aşamasına ulaşmış embriyoların dondurulmasında 0,5 M sukroz solüsyonu kullanılırken embriyoların eritilmesi için önce 1 M sukroz solüsyonu ardından 0,5 M sukroz solüsyonu kullanılmıştır.

3.10.Verilerin Değerlendirilmesi

Tez çalışmasında elde edilen verilerin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde SPSS-13.0 paket programı dahilinde χ^2 (Ki-kare) testi kullanılmıştır.

3.11.Alet ve Malzeme Listesi

Alet Listesi:

O₂ ve CO₂ inkübatörleri

CO₂ inkübatörü

Etüv

Stereomikroskop

Steril kabin

Görüntüleme sistemi

Isıtma tablası

Buzdolabı

Derin dondurucu (-80°C)

Osmometre

pH metre

Hassas terazi

Karıştırıcı

Santrifüj cihazı

Malzeme Listesi:

Desikatör

Azot tankı

Parafilm

Cerrahi set

Enjektörler

4 gözlü kültür petrileri

35 ve 60 mm'lik kültür petrileri

14 ve 50 mL'lik santrifüj tüpleri

Otomatik pipetler

Otomatik pipet uçları

Şırınga ucu filtreler

Kimyasal Malzeme Listesi:

BME amino asit solüsyonu

BSA (sığır serum albümini)

CaCl₂, 2H₂O

DMSO (dimetilsülfoksit)

Embriyo test edilmiş su

Etilen glikol

Epinefrin

Epidermal büyüme faktörü

Fötal sığır serumu

Fötal buzağı serumu

Gentamisin Sülfat

Glukoz

Glutamin (L-glutamin)

Fenol red

FSH (Folikül stimüle edici hormon)

LH (Lüteinleştirici hormon)

Gliserol

Heparin

Hepes acid free

Hepes Na tuzu

Hipotaurin

KCl

KH_2PO_4

Laktat hemi kalsiyum

Laktat sodyum tuzu

MEM amino asit solüsyonu

$\text{MgCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$

$\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$

Mineral yağ

Miyoinositol

NaCl

NaH_2PO_4

NaHCO_3

Na metabisülfid

Neomisin

Penisilin

Penisilamin

Piruvat sodyum tuzu

Sisteamin

Streptomisin

Sukroz

TCM-199 (Earle's Salts)

Tri sodyum sitrat dihidrat

3. BULGULAR

Tez çalışmasında ilk üç tanesi sistemi yerleştirmek ve kriyoprotektanların embriyo üzerindeki toksisitesini saptamak amacıyla olmak üzere toplamda 18 deney yapılmıştır. Geriye kalan 15 deneyin 4 tanesinde elde edilen 690 oosit inkübatörlerde oluşan kontaminasyon sonucunda bölünememiştir ve istatistiki değerlendirmeye alınmamıştır.

11 tekrarlı çalışma sonunda büyükbaş hayvan kesimhanesinden 329 adet ovaryum toplanmış ve 2710 adet sığır oositi elde edilmiş, bu oositlerden 2357 tanesi olgunlaştırılmak üzere kullanılmıştır (%86,97). Bu veriler ışığında bir ovaryumdan elde edilen oosit sayısı ortalama 12,13 bulunmuştur.

Sisteaminli (Grup A) ve Sisteaminsiz (Grup B) olgunlaşma medyumlarında olgunlaştırılan sığır oositlerinin kültürlerinde farklı iki medyum SOF ve CR1aa test edilmek amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla her bir grup iki alt gruba bölünerek toplamda dört kültür grubu oluşturulmuştur:

Grup A-I SOF, Grup A-II CR1aa, Grup B-I SOF, Grup B-II CR1aa.

Deneyler sonucunda her bir deney grubuna ait elde edilen veriler ve tüm deney gruplarına ait veriler Tablo 4-1 ve Tablo 4-12 arasında sunulmuştur.

Tablo 4-1: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-I):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	120/140	Grup AI (SOF)	60	27 (45)	2 (7,4)	0 (0)
		Grup AII (CR1aa)	60	29 (48,3)	0 (0)	0 (0)
Sisteamin (-)	113/120	Grup BI (SOF)	63	25 (39,6)	0 (0)	0 (0)
		Grup BII (CR1aa)	50	15 (30)	1 (6,6)	0 (0)

Tablo 4-2: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-II):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	98/125	Grup AI (SOF)	50	21 ^b (42)	0 ^b (0)	0 (0)
		Grup AII (CR1aa)	48	25 ^a (52)	0 ^b (0)	0 (0)
Sisteamin (-)	97/125	Grup BI (SOF)	48	34 ^{a*} (70,8)	12 ^{a*} (35,2)	2 (5,8)
		Grup BII (CR1aa)	49	34 ^a (69,3)	8 ^a (23,5)	2 (5,9)

^{a,b} Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

*: P<0,05

Tablo 4-3: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-III):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	107/125	Grup AI (SOF)	54	36 ^a (66,6)	10 (27,7)	6 (16,6)
		Grup AII (CR1aa)	53	34 ^a (64,1)	12 (35,2)	5 (14,7)
Sisteamin (-)	116/125	Grup BI (SOF)	58	44 ^{a*} (75,8)	16 (36,3)	4 (9)
		Grup BII (CR1aa)	58	29 ^b (50)	12 (41,3)	3 (10,3)

^{a,b} Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

*: P<0,05

Tablo 4-4: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-IV):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	65/120	Grup AI (SOF)	33	28 (84,8)	10 (35,7)	2 (7,1)
		Grup AII (CR1aa)	32	22 (68,7)	4 (18,1)	0 (0)
Sisteamin (-)	94/120	Grup BI (SOF)	53	35 (66)	8 (22,8)	3 (8,5)
		Grup BII (CR1aa)	41	24 (58,5)	4 (16,6)	2 (8,3)

Tablo 4-5: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-V):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	168/200	Grup AI (SOF)	93	36 (38,7)	10 (27,7)	8 ^a (22,2)
		Grup AII (CR1aa)	75	31 (41,3)	11 (35,4)	10 ^a (32,2)
Sisteamin (-)	172/200	Grup BI (SOF)	75	26 (34,6)	12 (46,1)	7 ^a (26,9)
		Grup BII (CR1aa)	97	44 (45,3)	5 (11,3)	1 ^{b*} (2,2)

^{a,b} Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

*: P<0,05

Tablo 4-6: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-VI):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	134/140	Grup AI (SOF)	66	35 ^{a*} (53)	0 ^b (0)	0 (0)
		Grup AII (CR1aa)	68	32 ^{ab} (47)	1 ^b (3,1)	0 (0)
Sisteamin (-)	139/140	Grup BI (SOF)	71	24 ^b (33,8)	0 ^b (0)	0 (0)
		Grup BII (CR1aa)	68	23 ^b (33,8)	5 ^a (21,7)	1 (4,3)

^{a,b} Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

*: P<0,05

Tablo 4-7: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-VII):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	100/110	Grup AI (SOF)	46	18 (39,1)	4 (22,2)	3 (16,6)
		Grup AII (CR1aa)	54	22 (40,7)	4 (18,1)	1 (4,5)
Sisteamin (-)	112/130	Grup BI (SOF)	52	24 (46,1)	3 (12,5)	2 (8,3)
		Grup BII (CR1aa)	60	26 (43,3)	3 (11,5)	1 (3,8)

Tablo 4-8: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-VIII):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	60/70	Grup AI (SOF)	30	16 (53,3)	5 (31,2)	2 (12,5)
		Grup AII (CR1aa)	30	9 (30)	3 (33,3)	1 (11,1)
Sisteamin (-)	40/50	Grup BI (SOF)	20	8 (40)	2 (25)	0 (0)
		Grup BII (CR1aa)	20	7 (35)	4 (57,1)	2 (28,5)

Tablo 4-9: Sisteaminin Sığır Embriolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-IX):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı 1	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	95/100	Grup AI (SOF)	46	14 (30,4)	1 (7,1)	0 (0)
		Grup AII (CR1aa)	49	16 (32,6)	3 (18,7)	0 (0)
Sisteamin (-)	67/70	Grup BI (SOF)	35	20 (57,1)	3 (15)	0 (0)
		Grup BII (CR1aa)	32	15 (46,8)	2 (13,3)	0 (0)

Tablo 4-10: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-X):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	85/90	Grup AI (SOF)	43	31 (72)	15 (48,3)	5 (16,1)
		Grup AII (CR1aa)	42	29 (69)	11 (37,9)	4 (13,7)
Sisteamin (-)	107/110	Grup BI (SOF)	54	35 (64,8)	18 (51,4)	6 (17,1)
		Grup BII (CR1aa)	53	34 (64,1)	17 (50)	5 (14,7)

Tablo 4-11: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Deney-XI):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	144/150	Grup AI (SOF)	73	23 ^b (31,5)	0 (0)	0 (0)
		Grup AII (CR1aa)	71	43 ^a (60,5)	4 (9,3)	2 (4,6)
Sisteamin (-)	124/150	Grup BI (SOF)	60	33 ^a (55)	2 (6)	0 (0)
		Grup BII (CR1aa)	64	42 ^{a*} (65,6)	5 (11,9)	2 (4,7)

^{a,b} Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

*: P<0,05

Tablo 4-12: Sisteaminin Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişimlerine Etkisi (Tüm Deneyler):

Olgunlaşma Medyumu	Olgunlaşmaya Bırakılan/Toplam Oosit Sayısı	Kültür Grupları	Kültüre Konan Oosit Sayısı	Bölünen Oosit Sayısı (%)	Blastosist Sayısı (%)	Genişlemiş Blastosist Sayısı (%)
Sisteamin (+)	1176/1370	Grup AI (SOF)	594	285 (47,9)	57 (20)	26 (9,1)
		Grup AII (CR1aa)	582	292 (50,1)	53 (18,1)	26 (8,9)
Sisteamin (-)	1181/1340	Grup BI (SOF)	589	308 (52,2)	76 (24,6)	27 (8,8)
		Grup BII (CR1aa)	592	293 (49,4)	66 (22,5)	19 (6,4)

4. TARTIŞMA

Günümüzde sığır, domuz, koyun, keçi gibi türlerin in vitro embriyo üretimlerinde olgunlaşma ve kültür medyumlarına ilave edilen (TCM-199, SOF, CR1aa) sisteamin, sistin, sistein, β -merkaptotanol olarak bilinen antioksidan maddeler embriyo gelişimi üzerine pozitif etkilerinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır (de Matos ve ark. 2002; Kobayashi ve ark. 2006; De ve ark. 2011; Wani ve ark. 2012). Tez çalışmasında sisteaminin sığır oositlerinin olgunlaşma aşamasında olumlu etkisi hipotezine dayanarak TCM-199 medyumuna eklenerek kullanılmış ve daha sonra CR1aa ve SOF gibi farklı kültür medyumlarında embriyo gelişimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda mevcut bilgilere göre sığır oositlerinin olgunlaşmasında kullanılan sisteaminin SOF medyumunda kültürü yaygın bir şekilde araştırılmasına rağmen, CR1aa medyumunda embriyo gelişimine olan etkisi ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.

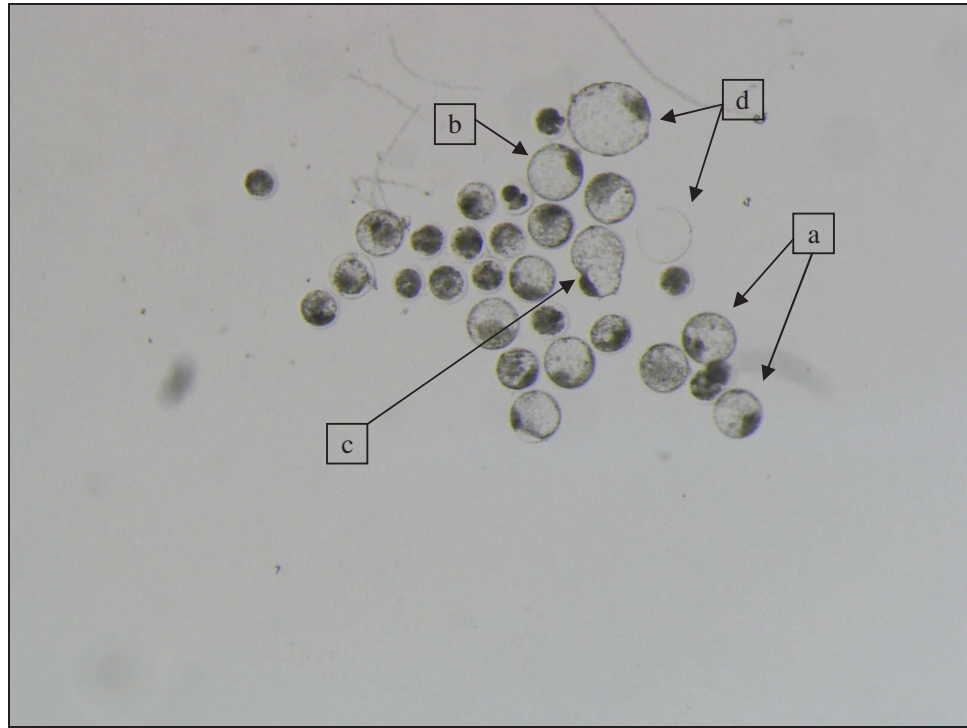
Tablo 4-12’de görüldüğü üzere Sisteamin ilave edilen TCM-199 medyumunda 1176 adet oosit olgunlaştırılırken, Sisteamin eklenmeyen TCM-199 medyumunda ise 1181 adet oosit kullanılmıştır. Her iki gruba ait oositler döllenmeyi takiben SOF ve CR1aa kültür medyumlarında hemen hemen eşit sayıda olmak üzere 2’şer alt gruba bölünmüş ve bölünme oranları sırasıyla %47,9 (Grup A-I SOF), %50,1 (Grup A-II CR1aa), %52,2 (Grup B-I SOF), %49,4 (Grup B-II CR1aa) olarak bulunmuştur. Bu oranlara göre olgunlaşma açısından aralarında istatistiki bir fark saptanmamıştır. Gasparini ve ark. (2000) TCM-199 medyumunda 100 μ M sisteamin ilave ederek olgunlaştırdıkları ve SOF medyumunda kültüre ettikleri sığır oositlerinin bölünme oranını %56,92 olarak saptarlarken, Singhal ve ark. (2009) bufalo oositlerinde 50 μ M sisteaminle yaptıkları çalışmada bölünme oranını %60,7 olarak bulmuşlardır. Oyamada ve Fukui (2004) ise epidermal büyüme faktörü ve sisteaminin sığır oositlerinin olgunlaşması üzerine etkilerini araştırmışlar; 100 μ M sisteamin ilave ettikleri grupta bölünme oranını %62,4 epidermal büyüme faktörü ve sisteaminli grupta %63,2 bularak aralarında istatistiki bir fark saptamamışlardır.

Tez çalışmasında bulunan sonuçlar ile Oyamada ve Fukui'nin (2004) bulduğu değerler birbirine paralel gözükmektedir. Birçok araştırmacı antioksidan maddelerin oositlerin olgunlaşmasında ve embriyoların gelişmesi üzerinde pozitif etkileri olduğunu savunsalar da antioksidanların etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. İn vivo şartlarda EGF (Dekel ve Sherizly 1985), EGF benzeri büyüme faktörleri (Park ve ark. 2004), LH (Tsafriri ve Kraicer 1972), GnRH (Hillensjo ve Lemaire 1980) ve gonadotropinler (Eppig 2001); hipoksantin (Downs ve ark. 1985; Byskov ve ark. 1997), fosfodiesteraz (Dekel ve Beers 1978) ve cAMP analogları (Cho ve ark. 1974) gibi olgunlaşma inhibitörlerinin etkilerini ortadan kaldırdığı bilinmekle birlikte in vitro şartlarda gonadotropinlerin ve büyüme faktörlerinin eksojen olarak medyumlara katılmasının antioksidansız bir ortamda dahi adı geçen inhibitörleri etkisiz kılabilceği ayrıca olgunlaşma için yeterli olabileceği tez çalışmasıyla da desteklenmektedir.

Aynı zamanda Balasubramanian ve Rho (2007) yine sisteamin katkılı TCM-199 medyumunda olgunlaştırdıkları oositlerin aynı medyumda kültür sonrası bölünme oranlarını %77,3 sisteaminsiz grupta ise %72,4 olarak kaydetmişler ve aralarında istatistiki önem bulamamışlardır. Bu sonuçlar tez çalışmasında bulunan olgunlaşma sonuçlarıyla aynı doğrultuda gözükmektedir. Domuzlarda ise sisteaminin oosit olgunlaşmasındaki pozitif etkisi %96,2 ile yüksek oranda, bölünmedeki etkisi ise %72,8 olarak saptanmıştır. Bu durum da antioksidan maddelerin farklı türler ve medyumlar arasında değişik etki gösterdiklerini kanıtlamaktadır (Kobayashi ve ark. 2006).

Dünyada yapılan çalışmalarda sisteamin kullanılmayan olgunlaşma medyumlarıyla elde edilen sonuçları incelediğimizde Gasparrini ve ark. (2000) sığır oositlerinin bölünme oranlarını SOF medyumunda %52,9 , Balasubramanian ve Rho (2007) TCM-199 medyumunda %72,4 , Oyamada ve Fukui (2004) %54,2 , Singhal ve ark. (2009) bufaloda %90,4; sunulan tez çalışmasında SOF medyumunda bölünme oranları %52,2 CR1aa medyumunda %49,4 olarak bulunmuş ve aralarında istatistiksel açıdan fark saptanmamıştır. SOF medyumunu için Gasparini ve ark. (2000) ile hemen hemen aynı yüzdesel sonuç bulunurken, mevcut literatürlere göre CR1aa medyumunda sisteamin ile karşılaştırma yapabileceğimiz bir çalışma bulunmamaktadır.

Tez çalışmasında kültür süresi sonunda Grup-AI'de (Tablo 4-12 ve Şekil 4-1) blastosiste ulaşma oranı %20 ve genişlemiş blastosist %9,1 iken, Oyamada ve Fukui (2004) aynı şartlar altında sadece blastosist oranını %10,6 olarak bulmuşlardır. Benzer araştırmalarda olgunlaşmada 50 μ M sisteamin destekli in vitro üretilen bufalo embriyolarının blastosiste ulaşma oranı %13,5 iken (Singhal ve ark. 2009), 100 μ M sisteamin destekli TCM-199 medyumunda mature ve kültüre edilen sığır embriyoların blastosist oranı %13,7 olarak belirtilmiştir (Balasubramanian ve Rho 2007).

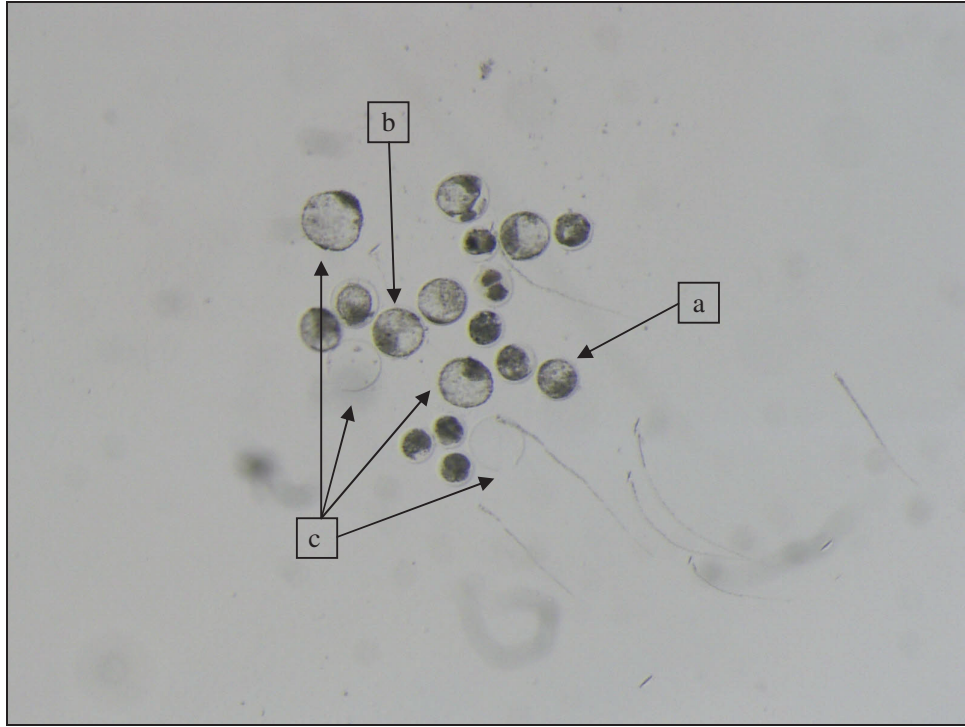


Şekil 4-1: 8. gün, SOF (+) blastosist, genişlemiş blastosist, hatching ve hatched blastosist.

a)Blastosist, b) Genişlemiş blastosist, c) Hatching blastosist, d) Hatched blastosist ve boş zonası

Yapılan çalışmalarda antioksidan madde eklenmeden olgunlaştırılan ve kültüre edilen embriyoların farklı hayvan türlerinde ve medyumlarda blastosiste ulaşma oranları sığırlarda TCM-199'da %7,2 yine sığırlarda SOF'da %6, domuzlarda SOF medyumunda ise %23,3 olarak saptanmıştır (Oyamada ve Fukui 2004;

Balasubramanian ve Rho 2007; Singhal ve ark. 2009). Oyamada ve Fukui (2004), SOF medyumunda kültürün 8. gününde blastosiste ulaşma oranlarını göz önüne alındıklarında kontrol (%6) grubu ile sisteaminli (%10,6) grup arasında istatistiksel bir fark bulmuşlardır ($P<0,05$). Tez çalışmasında ise Grup-BI'de (Tablo 4-12 ve Şekil 4-2) blastosist oranı %24,6 ve genişlemiş blastosist oranı ise %8,8 olarak bulunmuştur. Grup-BI ve BII arasında blastosiste ulaşma oranlarında yüzdesel bir fark olsa da istatistiki bir önem saptanmamıştır.

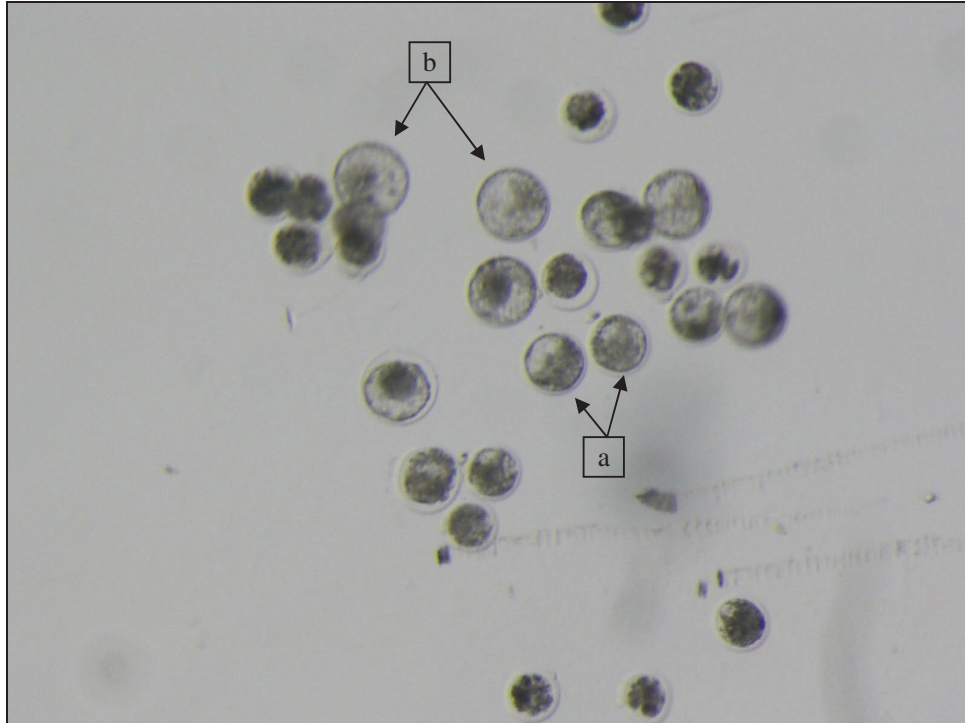


Şekil 4-2: 8. gün, SOF (-) blastosist, genişlemiş blastosist ve hatched blastosist.

a)Blastosist, b) Genişlemiş blastosist, c) Hatched blastosistler ve boş zonaları

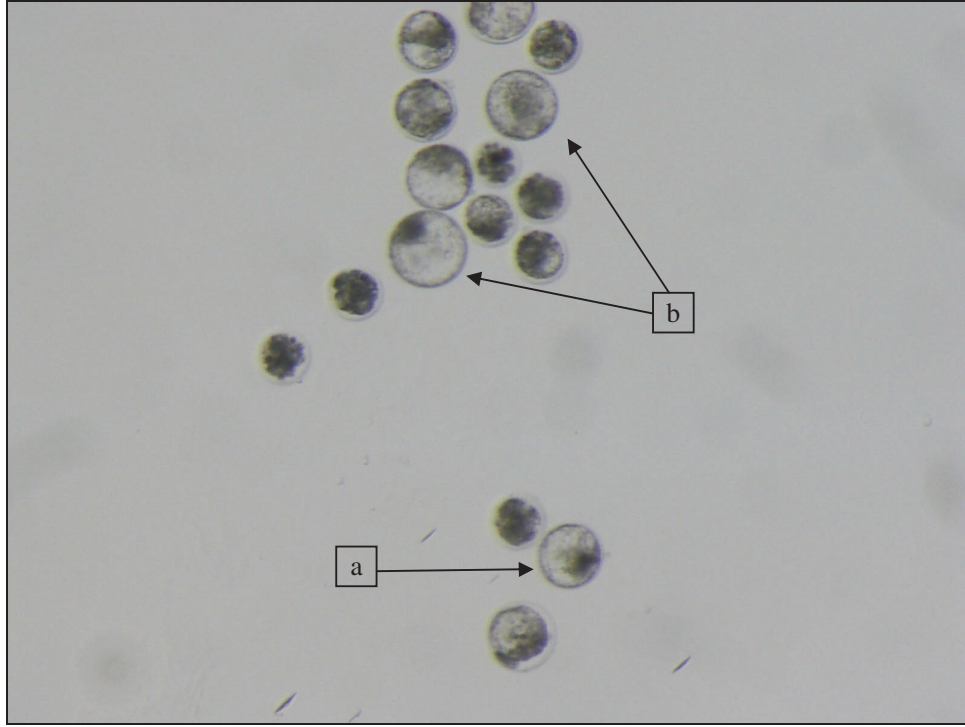
Benzer durum farklı medyumlarda kültüre edilen Grup AI-SOF ve Grup AII-CR1aa arasında da gözlenmektedir. Grup AI-SOF'ta blastosist oranı %20 iken Grup AII-CR1aa'da %18,1'dir (Şekil 4-3) ve aralarında istatistiksel bir fark yoktur. Dikkat çekici nokta ise antioksidan katılmamış olan olgunlaşma medyumunda olgunlaşan

embriyoların kültür süresince blastosiste ulaşma oranları (SOF medyumunda %24,6 ve CR1aa medyumunda %22,5) (Şekil 4-4) yüksek iken; antioksidanlı olgunlaşma medyumunda olgunlaştırılan embriyoların SOF medyumuna (%20) oranla CR1aa medyumunda blastosist oranlarının (%18,1) düşük bulunmasıyla birlikte aralarında istatistiksel bir fark olmamasıdır. Bu sonuç bazı bilim insanlarının antioksidanların embriyo gelişimi üzerindeki pozitif etkilerinin belirli koşullarda ve farklı medyum içeriklerinde geçerli olduğu tezini desteklemektedir (Van Soom ve ark. 2002; Ali ve ark. 2003).



Şekil 4-3: 8. gün, SOF (+) blastosist ve genişlemiş blastosist.

a)Blastosist, b) Genişlemiş blastosist



Şekil 4-4: 8. gün, SOF (-) blastosist ve genişlemiş blastosist.

a) Blastosist, b) Genişlemiş blastosist

Olson ve Seidel (2000) yaptıkları bir çalışmada kültür medyumlarında kullanılan antioksidan miktarının önemli olduğunu vurgularken, aynı araştırmacılar antioksidanların olumlu etkilerinin çoğunlukla yüksek oksijen basıncında (%20) ortaya çıktığını belirtmektedirler. Fakat, Yuan'ın (2003) yüksek oksijen basıncı altında yüksek oranda reaktif oksijen türevleri (ROS) açığa çıktığını bildirdiği için tez çalışmasında embriyoların kültüründe düşük oksijen basıncı (%5) tercih edilmiştir. Antioksidan maddeler %20 oksijenli ortamda embriyoların blastosiste ulaşma oranları üzerine pozitif etki ettiklerinden dolayı tez çalışmasında SOF ve CR1aa medyumunda %5 O₂ basıncı kullanılması, antioksidanların yeteri düzeyde olumlu etkilerini açığa çıkaramadıklarını düşündürmektedir. Bunu destekleyici olarak Rodina ve ark. (2009) yaptıkları bir çalışmada %5 ve %20 oksijen basıncının KSOM ve TCM-199 gibi farklı kültür medyumlarında farklı etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu çalışmayla tez ile doğru

orantılı olarak düşük oksijen basıncı altında (%5) blastosist gelişiminin daha yüksek olduğunu vurgulamışlardır.

Diğer yandan da araştırmacılar embriyo kültüründe kullanılan medyum türünün ve antioksidan miktarlarının blastosiste ulaşma kriteri olarak önemli olduğunu vurgulamaktadırlar (Van Soom ve ark. 2002; Nedamble ve ark. 2006). Farklı medyumlar, farklı enerji maddeleri ve geniş varyasyonlarda mineral madde içermektedirler ve embriyolar gerekli olan bu besin maddelerini embriyonik gelişim sürecinin değişik dönemlerinde kendilerine uygun gaz atmosferi altında kullanarak blastosist aşamasına ulaşırlar (Lane ve Gardner 2007; Goovaerts ve ark. 2009; Özdaş ve ark. 2012b). Takahashi ve ark. (1993) ile de Matos ve ark.'ın (1996) belirttikleri üzere TCM-199 medyumunda 50-100 μ M oranında kullanılan sisteamin kültür boyunca embriyo gelişimine pozitif etki ederken; SOF medyumunda sadece 25-50 μ M sisteaminin gerekli olduğunu bildirmiştir (Van Soom ve ark. 2002).

Tezde sisteaminsiz ortamda olgunlaşan embriyoların kültürlerinde Grup AI ve Grup AII'de blastosist oranlarının düşük olması antioksidanların %20 O₂ basıncı altında bilinen genel etkilerini %5 O₂ basıncı altında gösteremediklerini düşündürmektedir. Tez çalışmasında 8. günde genişlemiş blastosiste ulaşma oranları sırasıyla Grup AI-SOF %9,1, Grup AII-CR1aa %8,9, Grup BI-SOF %8,8, Grup BII-CR1aa %6,4 olarak saptanmış ve gruplar arasında istatistiki bir önem bulunamamıştır. Oyamada ve Fukui (2004) ise SOF medyumunda kültürün 8. gününde yalnızca blastosist oranlarını kontrol grubunda %6, Sisteaminli grupta ise %10,6 olarak saptamışlar ve aralarında istatistiksel önem bulmuşlardır ve blastosist aşamasından sonraki gelişim oranlarından bahsetmemişlerdir. Antioksidan maddeler sistinin sisteine indirgenmesini sağlayarak glutatyon sentezini arttırırlar. Bu da hücre içi GSH sentezini yükselterek embriyonun oksidatif strese karşı korunmasını sağlar ve böylelikle in vitro kültürün 6. gününde blastosiste ulaşan embriyo sayısını arttırır (Balasubramanian ve Rho 2007, Singhal ve ark. 2009). Tez çalışmasında kültürün 7. gününde blastosist sayıları kaydedilmiştir ancak 7. günde kompakt morula halinde görülen embriyolar ertesi gün hızlı bir şekilde genişlemiş olarak saptanmışlar ve kaydedilmişlerdir (Tablo 4-12). Bu etkinin antioksidanların pozitif etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Dünyada son 40 yılda memeli embriyoları yavaş dondurma ve vitrifikasyon metotları ile dondurulmaktadır (Keskintepe ve ark. 1995; Mucci ve ark. 2006). Ancak yapılan son çalışmalarda vitrifikasyon metodu ile dondurulan embriyoların eritme sonrası canlılık oranlarının daha yüksek olduğu saptanmıştır (Imai ve ark. 2002). Keskintepe ve Brackett (2000) dondurulma çalışmalarında sığır embriyolarının donmaya karşı duyarlılığı, kriyoprotektanların hücre membranlarından geçmeleri, difüzyon hızları ve molekül ağırlıklarının eritme sonrasında embriyo kalitesini etkileyen faktörler arasında olduğunu bildirmişlerdir. Bu amaçla vitrifikasyon medyumunda kriyoprotektan olarak DMSO, etilen glikol, gliserol ve makromolekül yapısına sahip olan şeker türevlerinden sukroz kriyoprotektanlara ek olarak osmolariteyi arttırmak ve hücre içindeki sıvının dışarı alınması amacıyla tercih edilmektedir (Pugh ve ark. 2000). Tez çalışmasında sonuncu dondurma solüsyonunda yüksek oranda kriyoprotektif maddeler (2,5 M etilen glikol, 2 M DMSO ve 0,5 M sukroz) kullanılmıştır. Vitrifikasyon metodunun dezavantajı yüksek oranda kriyoprotektan madde gereksinimi ve bunların embriyo üzerinde toksik etki göstermeleridir (Pugh ve ark. 2000). Ancak farklı kriyoprotektanların ikili veya üçlü kombinasyonlar şeklinde kullanılması bu kimyasalların bireysel ve spesifik toksik etkilerini azaltmak için tercih edilmektedir. (Vajta ve Kuwayama 2006). Ayrıca kriyoprotektif maddelerin kullanım miktarları embriyonun sağlıklı bir şekilde donup erimesini sağlaması açısından önemlidir. Minimum hacimlerde kullanılan kriyoprotektanlar zona pellusida ve embriyonun yapısının bozulmasını engeller (Kuwayama 2007; Rios ve ark. 2010). Çalışmada payet yöntemine göre dondurma metodu kullanılmış ve embriyoların payete yüklenmesi sırasında vitrifikasyon solüsyonunun hacimi 3-5 µL civarında olmuştur.

Oositlerin ve embriyoların in vitro kültürlerinde sistein, N-asetilsistein, sisteamin, SOD ve β merkaptetanol gibi antioksidan maddelerin kullanımı ve vitrifikasyon metodu ile dondurma ve eritme sonrası gelişimleri ile ilgili yapılan çalışmalar fazla sayıda değildir. Bu bilgilere bağlı olarak tez çalışmasında belirtildiği üzere sisteaminin antioksidan etkisinin eritme sonrası embriyo gelişimleri üzerine etkileri ile ilgili sonuçlar Tablo 4-13'te verildiği gibidir.

Tablo 4-13: Dondurulan Sığır Embriyolarının Eritme Sonrası Gelişimleri:

Gruplar	Dondurulan Embriyo Sayısı		Eritme Sonrası Kültüre Konan Embriyo Sayısı		Embriyoların 48. Saat Gelişimi			48. Saat Sonunda Gelişen Toplam Embriyo Sayısı (%)
	Blastosist	Genişlemiş Blastosist	Blastosist	Genişlemiş Blastosist	Genişlemiş Blastosist	Hatching Blastosist	Hatched Blastosist	
Grup AI (SOF)	21	26	18	18	0 ^b	1	1	2 ^b (%5,5)
Grup AII (CR1aa)	23	26	17	21	5 ^a	1	3	9 ^a (%23,6)
Grup BI (SOF)	37	27	26	22	0 ^b	0	0	0 ^b (%0)
Grup BII (CR1aa)	33	18	25	13	1 ^b	1	0	2 ^b (%5,2)

^{a,b} Aynı sütunda ortak harf taşımayan değerler arasındaki fark önemlidir (P<0,05).

*: P<0,05

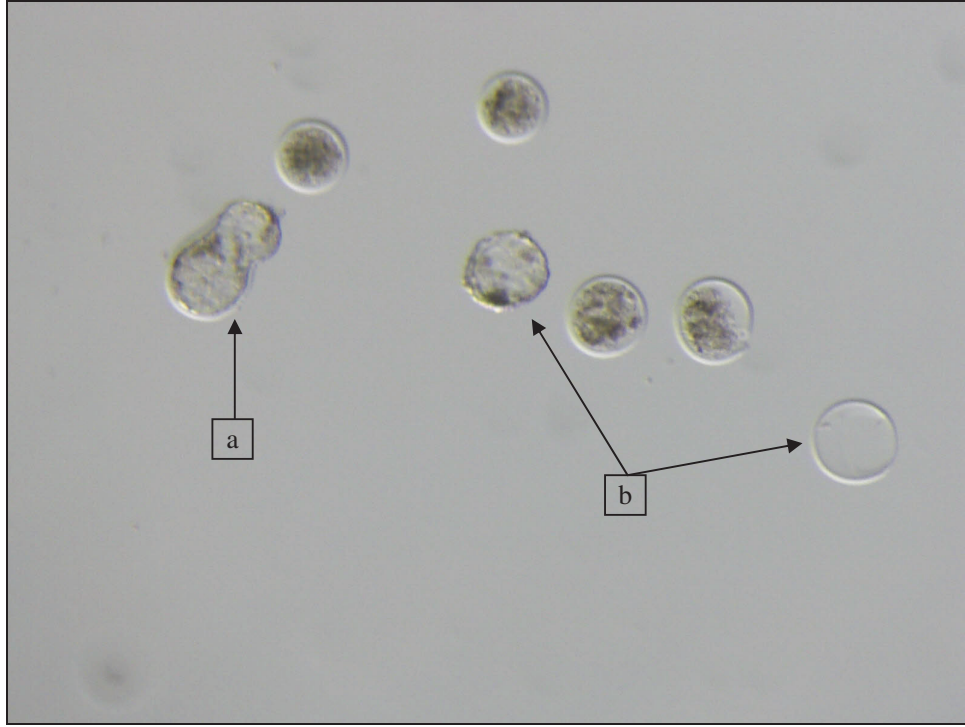
Sisteaminli ve sisteaminsiz TCM-119 medyumunda olgunlaştırılan embriyolar CR1aa ve SOF medyumlarında kültürleri sonucunda 154 tanesi blastosist ve 98 tanesi genişlemiş blastosist olmak üzere toplamda 252 adet embriyo elde edilmiştir. Elde edilen bu embriyolardan morfolojik olarak dondurmaya uygun olanları arasından 114 adet blastosist ve 97 adet genişlemiş blastosist vitrifikasyon metodu ile dondurulmuştur. Blastosist aşamasına ulaşan sığır embriyolarından %74'ü (114/154) dondurulurken, bu oran genişlemiş olan embriyolarda %98,9 (97/98) olarak bulunmuştur. Verilen değerler incelendiğinde in vitro ortamda genişlemiş blastosist aşamasındaki embriyoların çevresel koşullardan blastosistlere oranla daha iyi yararlandığı ve bu embriyoların donma kabiliyetlerinin daha yüksek olduğu anlaşılabılır.

Dondurulan embriyolardan Tablo 4-13'te görüldüğü gibi Grup AI'de eritme sonrası 21 adet blastosistten 18 tanesi (%85,7), 26 adet genişlemiş blastosistten yine 18

tanesi (%69,2); sırasıyla Grup AII'de %73,9 (17/23), %80,7 (21/26); Grup BI'de %70,2 (26/37), %81,4 (22/27); Grup BII'de %75,7 (25/33), %72,2 (13/18) gelişimlerini kaydetmek üzere kendi gruplarına ait kültür medyumlarında 48 saatlik inkübasyona alınmışlardır. Bu sonuçlara göre dondurulan ve eritme sonrası kültüre konan hücre sayıları arasındaki azalma embriyoların dondurma sırasında önemli ölçüde morfolojik olarak fonksiyonel bozukluğa uğradıklarının göstergeleridir (Vajta ve Kuwayama 2006). İn vitro üretilen embriyolarda in vivo üretilenlere oranla zona pellusidanın çok daha kırılğan ve hassas olduğu ayrıca bu embriyoların dondurulması sırasında kriyoprotektan maddelere maruz kalmaları neticesinde yapısal bütünlüklerini koruyamadıkları bilinmektedir (Fair ve ark. 2001). Çalışmada eritme sonrasında tüm gruplarda çoğunlukla zona çatlağı ve yırtılması gözlemlenmiş bu nedenle hasarlı embriyolar kültüre konmamışlardır.

48 saatlik kültür süresi sonunda Grup AI'de toplamda 2 adet embriyo gelişimine devam etmiş (%5,5) ve aralarından 1 tanesi zonasından çıkmaya başlamış (hatching), 1 tanesinin de hücre içeriği zonadan tamamen ayrılmış (hatched) olarak kaydedilmiştir. Grup AII'de eritme sonrası gelişen 9 adet (%23,6) embriyodan 5 tanesi expanded, 1 tanesi hatching 1 tanesi de hatched olarak kayda alınmıştır. Grup BI'de eritme sonrası kültüre konan toplam 48 adet embriyodan gelişmesine devam eden olmamıştır (%0). Son olarak Grup BII'de ise gelişim süresi sonunda 1 adet expanded blastosist, ve 1 adet hatching blastosist bulunmuştur (%5,2).

Eritme sonrası en yüksek oranda embriyo gelişimi %23,6 ile Grup AII'de elde edilmiştir (Şekil 4-5). Elde edilen bu sonuçla diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan önemlilik saptanmıştır ($P<0,05$). Burada dikkat çeken en önemli nokta Tablo 4-13'te görüldüğü üzere Grup BI'de eritme sonrası 48 saatlik inkübasyon süresi bitiminde herhangi bir gelişmenin olmamasıdır. Grup AII'de bulunan %23,6'lık oran Mucci ve ark.'nın (2006) CR1aa medyumunda geliştirdiği embriyoların eritme sonrası 48. saatteki canlılık oranına (%26,7) oldukça yakındır. Grup BI'de canlılık oranına bakıldığında (%0) bulunurken; Gomez ve arkadaşları eritme sonrası SOF medyumunda 48 saat sonra canlılık oranını %35,2 olarak bulurken, Shirazi ve arkadaşları ise bu oranı %28,1 olarak kaydetmişlerdir (Gomez ve ark. 2008; Shirazi ve ark. 2009).



Şekil 4-5: CR1 (+) eritme sonrası 48. saat gelişimi.

a)Hatching blastosist, b) Hatched blastosist ve boş zonası

Fair ve ark. (2001) in vitro olarak üretilen embriyoların daha koyu renkli sitoplazmaya sahip ve donmaya karşı daha duyarlı olduklarını bildirmişlerdir. Donma sırasında hücrenin yaranması, hücrenin büyüklüğüne, biçimine, hücre membranlarının geçirgenliğine ve oositin ve embriyonun kalitesine bağlıdır. Her ne kadar hücreler donma sırasında zarar görseler de bazen kısmen veya tamamen kendilerini onarır ve uygun koşullarda gelişmesine devam ederler (Vajta ve Kuwayama 2006). Çalışmada eritme sonrası gruplarda hücrelerin ilk 2-3 saat içerisinde canlı oldukları gözlemlenmiştir. Ancak kültürün ilerleyen saatlerinde kendilerini toparlayamayıp çoğunlukla gelişimlerine devam edememişlerdir. Sadece Grup AII'de eritme sonrası gelişme oranı yüksek bulunmuştur (%23,6). Bu da bize antioksidanların belirli koşullar altında ve farklı medyumlarda pozitif etkilerini gösterebildiklerini kanıtlamaktadır (Van Soom ve ark. 2002; Nedambale ve ark. 2006b; Balasubramanian ve Rho 2007; Gupta ve ark. 2010). Sonuç olarak elde edilen verilerde antioksidan maddelerden sisteaminin

olgunlaşma medyumuna eklenmesinin SOF medyumunda kültüre edilen embriyoların gelişimleri üzerine bir fark oluşturmadağı ancak CR1aa medyumunda gelişimlerini daha iyi oranda arttırdığı ve embriyoları donmaya karşı daha dayanıklı hale getirdiğı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdalla, H., Shimoda, M., Hara, H., Morita, H., Kuwayama, M., Hirabayashi, M., Hochi, S. (2010). Vitrification of ICSI and IVF-derived bovine blastocysts by minimum volume cooling procedure: Effect of developmental stage and age. *Theriogenology*, 74, 1028-1035.
- Abe, H., Yamashita, S., İtoh, T., Satoh, T., Hoshi, H. (1999). Ultrastructure of bovine embryos developed from in vitro matured and fertilized oocytes: Comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum free medium or serum supplemented medium. *Molecular Reproduction and Development*, 53, 325–335.
- 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. *Molecular Reproduction and Development*, 61, 57-66.
- Aitken, R.J., Harkiss, D., Buckingham, D. (1993). Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *Journal of Reproduction and Fertility*, 98, 257-265.
- Akyol, N. (2006). Sığırlarda in vivo oosit maturasyonu (derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 46 (2), 47-51.
- Ali, A.A., Bilodeau, J.F., Sirard, M.A. (2003). Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59, 939-949.
- Al Yacoub, A.N., Gauly, M., Holtz, W. (2010). Open pulled straw vitrification of goat embryos at various stages of development. *Theriogenology*, 73, 1018–1023.
- Atalla, H. (2002). İn vitro fertilizasyon yöntemi ile elde edilen koyun embriyolarının dondurulması. Doktora tezi.
- Balasubramanian, S. ve Rho, G.J. (2007). Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. *Animal Reproduction Science*, 98, 282-292.

- Bilodeau-Goeseels, S. (2006). Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. *Theriogenology*, 66, 297-306.
- Birler, S., Pabuççuoğlu, S., Alkan, S., Evecen, M., İleri, İ.K. (1997). Sığır oositlerinin in-vitro fertilizasyonu üzerine farklı medyumların ve bu medyumlara yapılan hormon ilavelerinin etkileri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23 (2), 511-516.
- Brackett, B.G., Younis, A.L., Fayrer-Hosken, R.A. (1989). Enhanced viability after in vitro fertilization of bovine oocytes matured in vitro with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertility and Sterility*, 52, 319-324.
- Bucak, M.N. ve Tekin, N. (2007). Kriyoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kriyoprotektif etki (derleme). *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 54, 67-72.
- Byskov, A.G., Andersen, C.Y., Hossaini, A., Guoliang, X. (1997). Cumulus cells of oocyte-cumulus complexes secrete a meiosis-activating substance when stimulated with FSH. *Molecular Reproduction and Development*, 46, 296–305.
- Carolan, C., Lonergan, P., Van-Langendonck, A., Mermillod, P. (1995). Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 43, 1115-1128.
- Chatot, C.L., Ziomek, C.A., Bavister, B.D., Lewis, J.L., Torres, I. (1989). An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 86, 679-688.
- Cho, W.K., Stern, S., Biggers, J.D. (1974). Inhibitory effect of dibutyryl cAMP on mouse oocyte maturation in vitro. *Journal of Experimental Zoology*, 187 (3), 383-386.
- Conti, M., Hsieh, M., Zamah, A.M., Oh, J.S. (2012). Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 356 (1-2), 65-73.
- Davachi, N.D., Kohrama, H., Zainoaldinia, S. (2012). Cumulus cell layers as a critical factor in meiotic competence and cumulus expansion of ovine oocytes. *Small Ruminant Research*, 102, 37-42.

- De, A.K., Malakar, D., Akshey, Y.S., Jena, M.K., Garg, S., Dutta, R., Sahu, S. (2011). In vitro development of goat (*Capra hircus*) embryos following cysteamine supplementation of the in vitro maturation and in vitro culture media. *Small Ruminant Research*, 96, 185–190.
- De Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F., Martinez, A.G., Matkovic, M. (1996). Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. *Molecular Reproduction and Development*, 45, 451-457.
- De Matos, D.G., Furnus, C.C., Moses, D.F. (1997). Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: Role of cumulus cells. *Biology of Reproduction*, 57, 1420-1425.
- De Matos, D.G., Herrera, C., Cortvrindt, R., Smitz, J., Van Soom, A., Nogueira, D., Pasqualini, R.S. (2002). Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: A useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. *Molecular Reproduction and Development*, 62, 203-209.
- Dhali, A., Anchamparuthy, V.M., Butler, S.P., Pearson, R.E., Gwazdauskas, F.C. (2009). In vitro development of bovine embryos cultured with *Stem Cell Factor* or *Insulin-Like Growth Factor-I* following IVF with semen of two bulls having different field fertility. *Animal Reproduction Science*, 116, 188-195.
- Dekel, L. ve Sherizly, I. (1985). Epidermal growth factor induces maturation of rat follicle enclosed oocytes. *Endocrinology*, 116, 406–409.
- Dekel, N. ve Beers, W.H. (1978). Rat oocyte maturation in vitro: Relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. *Cell Biology*, 75, 4369-4373.
- Delilbaşı, L. (2008). *İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*. İstanbul: Güneş Tıp Kitabevi.
- Downs, S.M., Coleman, D.L., Ward-Bailey, P.F., Eppig, J.J. (1985). Hypoxanthine is the principal inhibitor of murine oocyte maturation in a low molecular weight fraction of porcine follicular fluid. *Developmental Biology*, 82, 454-458.
- Enright, B.P., Lonergan, P., Dinnyes, A., Fair, T., Ward, F.A., Yang, X., Boland, M.P. (2000). Culture in vitro produced bovine zygotes in vitro vs in vivo: Implications for early embryo development and quality. *Theriogenology*, 54, 659-673.

- Eppig, J.J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122, 829–838.
- Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, D.C., Hyttel, P., Ward F.A., Boland, M.P. (2001). Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: Effect of method of blastocyst production. *Molecular Reproduction and Development*, 58, 186-195.
- Fischer, B., Bavister, B.D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99, 673-679.
- Fry, R.C., Niall, E.M., Simpson, T.L., Squires, T.J., Reynolds, J. (1997). The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, 47, 977-987.
- Fujita, T., Umeki, H., Shimura, H., Kugumiya, K., Shiga, K. (2006). Effect of group culture and embryo culture conditioned medium on development of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, 52, 137-142.
- Fukui, Y., Lee, E.S., Araki, N. (1996). Effect of medium renewal during culture in two different culture systems on development to blastocysts from in vitro produced early bovine embryos. *Journal of Animal Science*, 74, 2752-2758.
- Galeati, G., Spinaci, M., Vallorani, C., Bucci, D., Porcu, E., Tamanini, C. (2011). Pig oocyte vitrification by cryotop method: Effects on viability, spindle and chromosome configuration and in vitro fertilization. *Animal Reproduction Science*, 127, 43-49.
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59, 599-616.
- Gardner, D.K. ve Lane, M. (1993). Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biology of Reproduction*, 48, 377-385.
- Gardner, D.K. (2010). Editör. *Yardımla üreme teknikleri temel kitabı*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Gasparrini, B.F., Neglia, G., Di Palo, R., Campanile, G., Zicarelli, L. (2000). Effect of Cysteamine during in vitro maturation on buffalo embryo development. *Theriogenology*, 54, 1537-1542.
- Gasparrini, B. (2002). In vitro embryo production in buffalo species: State of the art. *Theriogenology*, 57, 237-256.

- Gomez, E. ve Diez, C. (2000). Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science*, 58, 23–37.
- Gomez, E., Rodriguez, A., Munoz, M., Caamano, J.N., Hidalgo, C.O., Moran, E., Facal, N., Diez, C. (2008). Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*, 69, 1013-1021.
- Goovaerts, I.G.F., Leroy, J.L.M.R., Van Soom, A., De Clercq, J.B.P., Andries, S., Bols, P.E.J. (2009). Effect of cumulus cell coculture and oxygen tension on the in vitro developmental competence of bovine zygotes cultured singly. *Theriogenology*, 71, 729–738.
- Gordon, I. (2003). *Laboratory production of cattle embryos*, 2nd edition. Cambridge: Cromwell press.
- Guerin, P., El Mouatassim, S., Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, 7 (2), 175-189.
- Gupta, M.K., Uhm, S.J., Lee, H.T. (2010). Effect of vitrification and β -Mercaptoethanol on reactive oxygen species activity and in vitro development of oocytes vitrified before or after in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 93 (8), 2602-2607.
- Guyader-Joly, C., Khatchadourian, C., Menezo, Y. (1996). Comparative glucose and fructose incorporation and conversion by in vitro produced bovine embryos. *Zygote*, 4, 85-91.
- Hafez, E.S.E. (1993). Editör. *Reproduction in farm animals*. Philadelphia: Lea&Febiger.
- Hammon, D.S., Wang, S., Holyoak, G.R. (2000). Effects of ammonia during different stages of culture on development of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 59, 23-30.
- Hashimoto, S., Takakura, R., Kishi, M., Sudo, T., Minami, N., Yamada, M. (1999). Ultrasound-Guided follicle aspiration: The collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. *Theriogenology*, 51, 757-765.
- Hillensjö, T. ve Lemaire, J. (1980). Gonadotropin releasing hormone agonists stimulate meiotic maturation of follicle-enclosed rat oocytes in vitro. *Nature*, 287, 145-146.

- Hoelker, M., Rings, F., Lund, Q., Ghanem, N., Phatsara, C., Griese, J., Schellander, K., Tesfayetsara, D. (2009). Effect of the microenvironment and embryo density on developmental characteristics and gene expression profile of bovine preimplantative embryos cultured in vitro. *Reproduction*, 137, 415-425.
- Holm, P., Booth, P.J., Schmidt, M.H., Greve, T., Callessen, H. (1999) High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using Sofaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum proteins. *Theriogenology*, 52, 683-700.
- Holm, P., Booth, P.J., 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.
- Hong, J. ve Lee, E. (2007). Intrafollicular amino acid concentration and the effect of amino acids in a defined maturation medium on porcine oocyte maturation, fertilization, and preimplantation development. *Theriogenology*, 68, 728-735.
- [Http://bebekvecocuk.milliyet.com.tr/turkiye-de-sut-tuketimiyle-ilgili-uzucu-istatistikler-/haberpanosu/haberdetay/18.07.2012/1568654/default.htm](http://bebekvecocuk.milliyet.com.tr/turkiye-de-sut-tuketimiyle-ilgili-uzucu-istatistikler-/haberpanosu/haberdetay/18.07.2012/1568654/default.htm)
- [Http://www.britannica.com/EBchecked/topic/269677/Holstein-Friesian](http://www.britannica.com/EBchecked/topic/269677/Holstein-Friesian).
Erişim 14.11.2012.
- [Http://www.tarimsalhaberler.com/konu/652/kirmizi-et-tuketimindede-siniftakaldik.html](http://www.tarimsalhaberler.com/konu/652/kirmizi-et-tuketimindede-siniftakaldik.html)
Erişim 09.12.2012.
- Imai, K., Matoba, S., Dochi, O., Shimohira, I. (2002). Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryos. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 64 (10), 887-891.
- Isachenko, V., Alabart, J.L., Dattena, M., Nawroth, F., Cappai, P., Isachenko, E., Cocero, M.J., Olivera, J., Roche, A., Accardo, C., Krikokharchenko, A., Folch, J. (2003). New technology for vitrification and field (microscope-free) warming and transfer of small ruminant embryos. *Theriogenology*, 59, 1209-1218.

- Izadyar, F., Colenbrander, B., Bevers, M.M. (1997). Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through the Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate signaling pathway. *Biology of Reproduction*, 57, 1484-1489.
- Izadyar, F., Zeinstra, E., Bevers, M.M. (1998). Follicle-Stimulating Hormone and Growth Hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 51, 339-345.
- İleri, İ.K., Ak, K., Pabuccuoğlu, S., Birler, S. (1998). Reprodüksiyon ve sun'i tohumlama. Ders Notu No: 84. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Masa üstü Yayıncılık.
- Kasai, M. (1997). Cryopreservation of mammalian embryos. *Molecular Biotechnology*, 7 (2), 173-179.
- Keskintepe, L., Burnley, C.A., Brackett, B.G. (1995). Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biology of Reproduction*, 52, 1410-1417.
- Keskintepe, L. ve Brackett, B.G. (2000). Cryopreservation of bovine blastocysts obtained by intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 53, 1041-1052.
- Khamsi, F. ve Armstrong, D.T. (1997). Interactions between Follicle-Stimulating Hormone and Growth Factors in regulation of Deoxyribonucleic Acid synthesis in bovine granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 57, 684-688.
- Khatir, H., Anouassi, A., Tibary, A. (2007). Effect of follicular size on in vitro developmental competence of oocytes and viability of embryos after transfer in the dromedary (*Camelus dromedarius*). *Animal Reproduction Science*, 99, 413-420.
- Khurana, N.K. ve Niemann, H. (2000). Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54, 741-756.
- Kim, B.K., Lee, S.C., Lee, K.S., Lee, B.K., Han, C.H., Kim, J.H., Lee, C.S. (2002). Effect of medium milieu on sperm penetration and pronuclear formation of bovine oocytes matured in vitro. *Theriogenology*, 57, 2093-2104.

- Kim, Y.M., Uhm, S.J., Gupta, M.K., Yang, J.S., Lim, J.G., Das, Z.C., Heo, Y.T., Chung, H.J., Kong, I.K., Kim, N.H., Lee, H.T., Ko, D.H. (2012). Successful vitrification of bovine blastocysts on paper container. *Theriogenology*, 78, 1085–1093.
- Kimura, K., Spate, L.D., Green, M.P., Roberts, R.M. (2005). Effects of *D-Glucose* concentration, *D-Fructose* and inhibitors of enzymes of the *Pentose Phosphate Pathway* on the developmental sex ratio of bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, 72, 201–207.
- Kitagawa, Y., Suzuki, K., Yoneda, A., Watanabe, T. (2004). Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, 62, 1186–1197.
- Kobayashi, M., Lee, E.S., Fukui, Y. (2006). Cysteamine or β -mercaptoethanol added to defined maturation medium improves blastocyst formation of porcine oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Theriogenology*, 65, 1191–1199.
- Kuran, M., Robinson, J.J., Staines, M.E., McEvoy, T.G. (2001). Development and de novo protein synthetic activity of bovine embryos produced in vitro in different culture systems. *Theriogenology*, 55, 593–606.
- Kuwayama, M. (2007). Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The cryotop method. *Theriogenology*, 67, 73–80.
- Lane, M. ve Gardner, D. K. (1994). Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *Journal of Reproduction and Fertility*, 102, 305–312.
- Lane, M. ve Gardner, D.K. (2003). Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biology of Reproduction*, 69, 1109–1117.
- Lane, M. ve Gardner, D.K. (2007). Embryo culture medium: Which is the best? *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology*, 21 (1), 83–100.

- Li, R., Wen, L., Wang, S., Bou, S. (2006). Development, freezability and amino acid consumption of bovine embryos cultured in synthetic oviductal fluid (SOF) medium containing amino acids at oviductal or uterine-fluid concentrations. *Theriogenology*, 66, 404-414.
- Lin, T.K., Su, J.T., Lee, F.K., Lin, Y.R., Lo, H.C. (2010). Cryotop vitrification as compared to conventional slow freezing for human embryos at the cleavage stage: Survival and outcomes. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 49 (3), 272-278.
- Lonergan, P., Carolan, C., Langendonckx, A.V., Donnay, I., Khatir, H., Mermillod, P. (1996). Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and pre implantation embryo development in vitro. *Biology of Reproduction*, 54, 1420-1429.
- Manjunatha, B.M., Gupta, P.S.P., Ravindra, J.P., Devaraj, M., Nandi, S. (2008). In vitro embryo development and blastocyst hatching rates following vitrification of river buffalo embryos produced from oocytes recovered from slaughterhouse ovaries or live animals by ovum pick-up. *Animal Reproduction Science*, 104, 419-426.
- Manjunatha, B.M., Gupta, P.S.P., Ravindra, J.P., Devaraj, M., Nandi, S. (2009). Effect of vitrification medium composition and exposure time on post-thaw development of buffalo embryos produced in vitro. *The Veterinary Journal*, 179, 287-291.
- Mayes, M.A. ve Sirard, M.A. (2001). The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. *Theriogenology*, 51, 911-922.
- Moore, K., Rodriguez-Sallaberry, C.J., Kramer, J.M., Johnson, S., Wroclawska, E., Goicoa, S., Naslaji-Niasari, A. (2007). In vitro production of bovine embryos in medium supplemented with a serum replacer: Effects on blastocyst development, cryotolerance and survival to term. *Theriogenology*, 68, 1316-1325.
- Mtango, N.R., Varisanga, M.D., Dong, Y.J., Rajamahendran, R., Suzuki, T. (2003). Growth factors and growth hormone enhance in vitro embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. *Theriogenology*, 59, 1393-1402.

- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G.G., Hozbor, F., Cabodevila, J., Alberio, R.H. (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 65, 1551-1562.
- Nagao, Y., Iijima, R., Saeki, K. (2008). Interaction between embryos and culture conditions during in vitro development of bovine early embryos. *Zygote*, 16, 127-133.
- Naib, A.A., Ward, F., Kelly, A.K., Wade, M., Marti, J.I., Lonergan, P. (2011). Effect of duration of storage at ambient temperature on fertilizing ability and mucus penetration ability of fresh bovine sperm. *Theriogenology*, 76, 1070-1075.
- Nedambale, T.L., Dinnyes, A., Groen, W., Dobrinsky, J.R., Tian, X.C., Yang, X. (2004). Comprasion on in vitro fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 62, 437-449.
- Nebambale, T.L., Du, F., Xu, J., Chaubal, S.A., Dinnyes, A., Groen, W., Faber, D., Dobrinsky, J.R., Yang, X., Tian, X.C. (2006a). Prolonging bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. *Theriogenology*, 66, 1951-1960.
- Nedambale, T.L., Du, F., Yang, X., Tian, X.C. (2006b). Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with β -mercaptoethanol. *Animal Reproduction Science*, 93, 61-75.
- Olson, S.E. ve Seidel, G.E. (2000). Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. *Biology of Reproduction*, 62, 248-252.
- Oyamada, T. ve Fukui, Y. (2004). Oxygen tension and medium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. *Journal of Reproduction and Development*, 50, 107-117.
- Özdaş, Ö.B., Pabuccuoğlu, S., İleri, İ.K. (2006). Effects of monopotassium phosphate and oviduct cells on the in vitro fertilized mice embryos development. *Medycyne Weterynaryjna*, 62 (3), 281-284.

- Özdaş, Ö.B., Baran, A., Taş, M., Cirit, Ü., Demir, K., Bacınoğlu, S., Pabuccuoğlu, S., Ak, K. (2012a). Effect of different transport temperatures on in vitro maturation of oocytes collected from frozen-thawed sheep ovaries. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36 (1): doi: 10.3906/vet-1104-24.
- Özdaş, Ö.B., Cirit, Ü., Baran, A., Kaşıkçı, G. (2012b). The effects of oviductal cell co-culture and different gas mixtures on the development of bovine embryos in vitro. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 36 (4), 362-366.
- Özdaş, Ö.B., Cirit, Ü., Demir, K., Bacınoğlu, S., Baran, A., Pabuccuoğlu, S., İrez, T., Alkan, S., Ak, K. (2012c). İn Vitro Elde Edilen Sığır Embriyolarının Dondurulmasında Vitrifikasyon Medyumuna Maruz Kalma Sürelerinin Çözünme Sonrası Gelişim Üzerine Etkisi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 38 (1), 29-35.
- Park, S.P., Kim, E.Y., Kim, D.I., Park, N.H., Won, Y.S., Yoon, S.H., Chung, K.S., Lim, J.H. (1999). Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grids. *Human Reproduction*, 14 (11), 2838-2843.
- Park, J.Y., Su, Y.Q., Ariga, M., Law, E., Catherine Jin, S.L., Conti, M. (2004). Egf-like growth factors as mediators of LH action in the ovulatory follicle. *Science*, 303.
- Park, Y.S., Kim, S.S., Kim, J.M., Park, H.D., Byun, M.D. (2005). The effects of duration of in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent development, quality and transfer of embryos. *Theriogenology*, 64, 123-134.
- Perin, P.M., Maluf, M., Januarion, F.D.A.N., Saldiva, P.H.N. (2008). Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization mouse model. *Fertility and Sterility*, 90, 1503-1510.
- Pugh, P.A., Tervit, H.R., Niemann, H. (2000). Effects of vitrification medium composition on the survival of bovine in vitro produced embryos, following in straw-dilution, in vitro and in vivo following transfer. *Animal Reproduction Science*, 58, 9-22.
- Raghu, H.M., Nandi, S., Reddy, S.M. (2002). Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 14 (1), 55-61.

- Raty, M., Ketoja, E., Pitkanen, T., Ahola, V., Kananen, K., Peippo, J. (2011). In vitro maturation supplements affect developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes and embryo quality after vitrification. *Cryobiology*, 63, 245-255.
- Reis, A., Rooke, J.A., McCallum, G.J., Staines, M.E., Ewen, M., Lomax, M.A., McEvoy, T.G. (2003). Consequences of exposure to serum, with or without vitamin E supplementation, in terms of the fatty acid content and viability of bovine blastocysts produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 15 (5), 275–284.
- Rios, G.L., Mucci, N.C., Kaiser, G.G., Alberio, R.H. (2010). Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of in vitro-produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, 118, 19-24.
- Rodina, T.M., Cooke, F.N.T., Hansen, P.J., Ealy, A.D. (2009). Oxygen tension and medium type actions on blastocyst development and interferon-tau secretion in cattle. *Animal Reproduction Science*, 111, 173–188.
- Rooke, J.A., Ewen, M., Mackie, K., Staines, M.E., McEvoy, T.G., Sinclair, K.D. (2004). Effect of ammonium chloride on the growth and metabolism of bovine ovarian granulosa cells and the development of ovine oocytes matured in the presence of bovine granulosa cells previously exposed to ammonium chloride. *Animal Reproduction Science*, 84, 53–71.
- Rosenkrans, C.F.JR., Zeng, G.Q., Mcnamara, G.T., Schoff, P.K., First, N.L. (1993). Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*, 49, 459-462.
- Rubessa, M., Boccia, L., Campanile, G., Longobardi, V., Albarella, S., Tateo, A., Zicarelli, L., Gasparrini, B. (2011). Effect of energy source during culture on in vitro embryo development, resistance to cryopreservation and sex ratio. *Theriogenology*, 76, 1347–1355.
- Sağırkaya, H., Yağmur, M., Nur, Z., Soylu, M.K. (2004). Replacement of Fetal Calf Serum with Synthetic Serum Substitute in the in vitro maturation medium: Effects on maturation, fertilization and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28. 779-784.

- Sağırkaya, H., Mısırlıoğlu, M., Kayaç, A., First, N.L., Parrish, J.J., Memili, E. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Animal Reproduction Science*, 101, 225-240.
- Saragusty, J. ve Arav, A. (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, 141, 1-19.
- Seshagiri, P.B. ve Bavister, B.D. (1991). Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: Evidence for the "crabtree effect". *Molecular Reproduction and Development*, 30 (2), 105-111.
- Shirazi, A., Nazari, H., Ahmadi, E., Heidari, B., Shams-Esfandabadi, N. (2009). Effect of culture system on survival rate of vitrified bovine embryos produced in vitro. *Cryobiology*, 59, 285-290.
- Singhal, S., Prasad, S., Singh, B., Prasad, J.K., Gupta, H.P. (2009). Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for in vitro culture of buffalo oocytes recovered in vivo. *Animal Reproduction Science*, 113, 44-50.
- Somfai, T., Dinnyes, A., Sage, D., Marosan, M., Carnwath, J.W., Ozawa, M., Kikuchi, K., Niemann, H. (2006). Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated in vitro matured porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). *Theriogenology*, 66, 415-422.
- Sommerfeld, V. ve Niemann, H. (1999). Cryopreservation of bovine in vitro produced embryos using ethylene glycol in controlled freezing or vitrification. *Cryobiology*, 38, 95-105.
- Takahashi, M., Nagai, T., Hamano, S., Kuwayama, M., Okamura, N., Okano, A. (1993). Effect of thiol compounds on in vitro development and intracellular glutathione content of bovine embryos. *Biology of Reproduction*, 49, 228-232.
- Tervit, H.R., Whittingham, D.G., Rowson, L.E.A. (1972). Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. *Journal of Reproduction and Fertility*, 30, 493-497.
- Thompson, J.G. (2000). In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos: A decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, (60-61), 263-275.

- Thompson, J.G., McNaughton, C., Gasparrini, B., McGowan, L.T., Tervit, H.R. (2000). Effects of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118, 47-55.
- Tian, S.J., Yan, C.L., Yang, H.X., Zhou, G.B., Yang, Z.Q., Zhu, S.E. (2007). Vitricification solution containing DMSO and EG can induce parthenogenetic activation of in vitro matured ovine oocytes and decrease sperm penetration. *Animal Reproduction Science*, 101, 365–371.
- Trigal, B., Gómez, E., Caamaño, J.N., Muñoz, M., Moreno, J., Carrocera, S., Martín, D., Diez, C. (2012). In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. *Theriogenology*, 78, 1465-1475.
- Tsafriri, A. ve Kraicer, P.F. (1972). The time sequence of ovum maturation in the rat. *Journal of Reproduction and Fertility*, 29, 387-393.
- Waldenström, U., Engström, A.B., Hellberg, D., Nilsson, S. (2009). Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertility and Sterility*, 91 (6), 2461-2465.
- Wani, A.R., Khan, M.Z., Sofi, K.A., Lone, F.A., Malik, A.A., Bhat, F.A. (2012). Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on in vitro maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. *Small Ruminant Research*, 106, 160–164.
- Ward, F.A., Lonergan, P., Enright, B.P., Boland, M.P. (2000). Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. *Theriogenology*, 54, 433–446.
- Whitten, W.K. (1971). Nutrient requirements for the culture of preimplantation mouse embryo in vitro. *Advanced in Bioscience and Biotechnology*, 6, 129-139.
- Whittingham, D.G. (1971). Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 233, 125-126.
- Whittingham, D.G. (1975). Survival of rat embryos after freezing and thawing. *Journal of Reproduction and Fertility*, 43, 575-578.

- Wolf, P.D., Quigley, M.M. (1984): Histological Background and Essentials for a Program Chapter 1. In: *Human In Vitro Fertilization and Embryo Transfer*. Plenum Press, London.
- Woudenberg, A.R.B.V., Zeinstra, E.C., Roelen, B.A.J., Colenbrander, B., Bevers, M.M. (2006). Developmental competence of bovine oocytes after specific inhibition of MPF kinase activity: Effect of estradiol supplementation and follicle size. *Animal Reproduction Science*, 92, 231-240.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Korsawe, K., Niemann, H. (2004). Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: Relationship to the large offspring syndrome? *Animal Reproduction Science*, (82–83), 593–603.
- Vajta, G., Rindom, N., Peura, T.T., Helm, P., Greve, T., Callesen, H. (1999). The effect of media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, 52, 939-948.
- Vajta, G. (2000). Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, 60-61 (2), 357-364.
- Vajta, G., Kuwayama, M. (2006). Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, 65, 236-244.
- Van Soom, A., Yuan, Y.Q., Peelman, L.J., De Matos, D.G., Dewulf, J., Laevens, H., De Kruif, A. (2002). Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology*, 57, 1453-1465.
- Van Wagtenonck-de Leeuw, A.M. (2006). Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. *Theriogenology*, 65, 914-925.
- Yuan, Y.Q., Van Soom, A., Coopman, F.O.J., Mintiens, K., Boerjan, M.L., Van Zeveren, A., De Kruif, A., Peelman, L.J. (2003). Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured in vitro. *Theriogenology*, 59, 1585-1596.
- Yu, X.L., Deng, W., Liu, F.J., Li, Y.H., Li, X.X., Zhang, Y.L., Zan, L.S. (2010). Closed pulled straw vitrification of in vitro-produced and in vivo produced bovine embryos. *Theriogenology*, 73, 474–479.

- Zhang, J., Nedambale, T.L., Yang, M., Li, J. (2009). Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): Effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. *Animal Reproduction Science*, 110, 46–55.
- Zhao, X.M., Du, W.H., Wang, D., Hao, H.S., Qin, T., Liu, Y., Zhu, H.B. (2012). Controlled freezing and Open-Pulled Straw (OPS) vitrification of in vitro produced bovine blastocysts following analysis of ATP content and Reactive Oxygen Species (ROS) level. *Journal of Integrative Agriculture*, 11 (3), 446-455.



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



ETİK KURUL KARARI

Sayı: 145

30/09/2010

Sn. Doç. Dr. Özen Banu ÖZDAŞ
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Karar No: 145
Başvuru Tarihi: 01/09/2010

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, Arş. Gör. A. İzem HAMZAOĞLU'na ait "Modifiye TCM-199 Medyumunda Olgunlaştırılarak İn Vitro Üretilen Sığır Embriyolarının Dondurulması" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul İlkelerine uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Alev A. KAYMAZ
İ. Ü. HADYЕК Başkanı

Prof. Dr. Müjdat UYSAL
Üye

Prof. Dr. Gülderen ŞAHİN
Üye

Prof. Dr. Nuriye AKEV
Üye

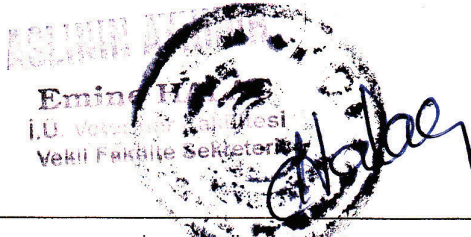
Prof. Dr. Alper YILMAZ
Üye

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
Üye

Uzm. Vet. Hek. Fatma TEKELİ
Üye

Avukat Safiye ALTUN
Üye

Mak. Müh. Seyfettin AVCI
Üye



TELİF HAKKI İZİNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Asiye İzem	Soyadı	SANDAL
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	10.12.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	56191513720
Email	izem@istanbul.edu.tr	Tel	0530 435 98 76

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2012
Yük.Lis.	-	-
Lisans	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2007
Lise	Fatih Davutpaşa Süper Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2010-Halen
2.	-	-	-
3.	-	-	-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Orta	İyi	70 (ÜDS)	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	81.113	80.982	79.511

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Word	Çok iyi
Microsoft Powerpoint	Çok iyi
Microsoft Excell	İyi

Yayınları/Tebliğleri/Sertifikalari/Ödülleri

SCI-Expanded, SSCI, AHCI kapsamındaki dergilerde yayınlanmış özgün araştırma, makale, derleme

- 1- Özdaş, Ö.B., Baran, A., **Sandal, A.İ.**, Bakırer, G., Tek, Ç., Enginler, S.Ö., Gündüz, M.C., Kaşıkçı, G., Ak, K. (2012). Effects of Different Transport Temperatures On In Vitro Development Of Queen Oocytes. Journal of Animal and Veterinary Advances, 11 (7), 995-999.
- 2- Baran, A., Özdaş, Ö.B., **Sandal, A.İ.**, Ak, K. (2012). Effect of Skim Milk And Tris Extender On Frozen-Thawed Canine Sperm Morphology. Journal of Animal and Veterinary Advances, Basımda.
- 3- Ekici, A., Baran, A., Yamaner, G., Özdaş, Ö.B., **Sandal, A.İ.**, Güven, E., Baltacı, M.A. (2012). Effects of Adding Different Doses of Taurine on Freezing to Glucose-Based Extender Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Semen. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 26 (4), 3113-3115.
- 4- Evecen, M., Cirit, Ü., Demir, K., **Hamzaoglu, A.İ.**, Bakırer, G., Pabuccuoğlu, S., Birler, S. (2011). Adding Hormones Sequentially Could Be An Effective Approach For IVM of Dog Oocytes. Theriogenology, 75, 1647-1651.
- 5- Evecen, M., Cirit, Ü., Demir, K., Karaman, E., Bakırer, G., **Hamzaoglu, A.İ.**, Birler, S., Pabuccuoğlu, S. (2010). Effect of Dog Oocyte Diameter on In Vitro Embryo Production. Journal of The Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, 16 (6), 947-950.
- 6- Evecen, M., Cirit, Ü., Demir, K., Karaman, E., Bakırer, G., **Hamzaoglu, A.İ.**, Birler, S., Pabuccuoğlu, S. (2010). Comparison of Two Different Media For In Vitro Production Of Dog Embryos. Journal of The Faculty of Veterinary Medicine, Kafkas University, 16 (6), 897-902.

7- Birler, S., Pabuccuoğlu, S., Demir, K., Cirit, Ü., Karaman, E., Bacınoğlu, S., Özdaş, Ö.B., Evecen, M., Alkan, S., Baran, A., Bakırer, G., **Hamzaoglu, A.İ.**, Özcan, C., Koçak, Ö., Kılıçarslan, R., Kaşıkçı, G., Toydemir, S., Dinç, H., Koban, E., Togan, İ., İleri, İ.K., Ak, K. (2010). Production of Cloned Lambs: Transfer of Early Cleavage Stage Embryos to Final Recipients. *Journal of The Faculty Veterinary Medicine, Istanbul University*, 36 (1), 1-8.

8- Evecen, M., Cirit, Ü., Demir, K., Karaman, E., **Hamzaoglu, A. İ.**, Bakırer, G. (2009). Developmental Competence of Domestic Cat Oocytes From Ovaries Stored at Various Durations at 4 °C Temperature. *Animal Reproduction Science*, 116, 169–172.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve tam metni veya özeti yayınlanan poster

1- Özdaş, Ö.B., Baran, A., **Sandal, A.İ.**, Bakırer, G., Tek, Ç., Enginler, S.Ö., Gündüz, M.C., Kaşıkçı, G., Ak, K. (2012). Effects of Different Transport Temperatures On İn Vitro Development Of Queen Oocytes. 3th International Scientific Meeting, Days of Veterinary Medicine, 2-4 September 2012, Ohrid, Macedonia. The 16th Annual Conference of The European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), 29 August-1 September 2012, Dublin, Ireland.

2- Evecen, M., Cirit, Ü., Demir, K., **Hamzaoglu, A.İ.**, Bakırer, G., Pabuccuoğlu, S., Birler, S. (2011). Adding Hormones Sequentially Could Be An Effective Approach For IVM Of Dog Oocytes. The 15th Annual Conference of The European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR), 15-17 September 2011, Antalya, Turkey.

3- Baran, A., Özdaş, Ö.B., **Sandal, A.İ.**, Bakırer, G., Demir, K., Alkan, S., Ak, K. (2011). Spermatological Traits of Cat Semen Frozen in Pellets with Taurine Containing Tris Extender. South European Veterinary Congress (SEVC), September 29-October 2 2011, Barcelona, Spain.

- 4- Baran, A., Ozdas, O.B., Gulcubuk, A., **Hamzaoglu, İ.**, Tonguc, M. (2010): Pilot Study: Intratesticular Injection Induces Sterility in Male Cats. 4th International Symposium on Non-surgical Contraceptive Methods of Pet Population Control April 8-10, Dallas/Texas, U.S.
- 5- Baran, A., Özdaş, Ö.B., **Sandal, A.İ.**, Ak, K. (2010). Post-Thaw Sperm Traits of Canine Semen Frozen In Straws With Skim Milk and TRIS Extender. 7th Joint Scientific Symposium of Veterinary Faculties of the Ludwig-Maximilians Universitat München and T.C. Istanbul University, 7-8 October 2010, Istanbul, Turkey.
- 6- Evecen, M., Cirit, Ü., Demir, K., Karaman, E., Bakırer, G., **Hamzaoglu, A.İ.**, Birler, S., Pabuccuoğlu, S. (2010). Comparison of Two Different Media For In Vitro Production of Dog Embryos. 7th Joint Scientific Symposium of Veterinary Faculties of the Ludwig Maximilians Universitat München and T. C. Istanbul University, 7-8 October 2010, Istanbul, Turkey.

Yurt içi hakemli dergilerdeki yayınlar

- 1- Evecen, M., Öztürk, E., Demir, K., Bakırer, G., **Sandal, A.İ.**, Birler, S., Pabuccuoğlu, S., Ak, K. (2012). Investigation of the Vitrification Ability of Mouse Embryos with Quartz Capillary (QC) Straws. Journal of The Faculty Veterinary Medicine, Istanbul University, 38 (1), 9-13.

Tebliğleri

- 1- Bakırer G., Demir K., Cirit Ü., Bozkurt H., Aktaş A., **Sandal, A.İ.**, Özdaş, Ö.B., Ak, K., Ağca, Y., Birler, S., Pabuççuoğlu, S. (2011). Ozmotik Stresin Koç Sperması Üzerindeki Etkilerinin CASA ve Elektron Mikroskop Düzeyinde İncelenmesi. 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi (Uluslararası katılımlı), 18-22 Mayıs 2011, Antalya, Türkiye.
- 2- Baran, A., Özdaş, Ö.B., **Sandal, A.İ.**, Ak, K. (2011): Tris ve Yağsız Süt Sulandırıcısı İle Payetlerde Dondurulmuş Köpek Spermasının Eritme Sonrası Spermatolojik Özellikleri. 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi (Uluslararası katılımlı), 18-22 Mayıs 2011, Antalya, Türkiye.
- 3- Evecen, M., Cirit, Ü., Demir, K., **Hamzaoglu, A.İ.**, Bakırer ,G., Pabuccuoğlu,

S., Birler, S. (2011). Adding Hormone Sequentially Could be an Effective Approach for IVM of Dog Oocytes. 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 18-22 Mayıs 2011, Antalya, Türkiye.

4- Evecen, M., Cirit, Ü., Demir, K, **Hamzaoglu, A.İ.**, Bakırer, G., Birler, S., Pabuccuoğlu, S. (2011). Comparision of Two Different Media For İn Vitro Production of Dog Embryos. 6. Ulusal Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 18-22 Mayıs 2011, Antalya, Türkiye.

5- Baran, A., **Hamzaoglu, A.İ.**, Özdaş, Ö.B., Bakırer, G., Alkan, S., Birler, S., Ak, K. (2009). Köpek Spermasının Farklı Miktarlarda Taurin İçeren Tris Sulandırıcısında Pellet ve Payet Yöntemine Göre Dondurulması, 5. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Elazığ, Türkiye, Sözlü Sunum.

6- **Hamzaoglu, A.İ.**, (2009). Sülünlerde Suni Tohumlama, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Avcılar, Türkiye. Sözlü Sunum.

7- **Hamzaoglu, A.İ.**, (2008). Sığırlarda Embriyo Transfer Çalışmaları, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Avcılar, Türkiye. Sözlü Sunum.

Sertifikalari

1- Uluslararası Veteriner Hekimliği Öğrencileri Araştırma Kongresi Organizasyon Görevlisi, 2004-2007, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

2- 4. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 25-28 Ekim 2007, Uludağ Üniversitesi, Antalya, Türkiye.

3- Mikroskobi Teknikleri ve Uygulamaları Kursu, 7 Mayıs 2008, İstanbul Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

4- 3. Klinik Pratikte Kök Hücre ve Gen Tedavisi Kongresi, 29 Mayıs-1 Haziran 2008, İstanbul, Türkiye.

- 5- Koyunlarda Embriyo Toplama ve Manipölasyonu Workshop, 13-16 Ekim 2008, Selçuk Üniversitesi, Konya, Türkiye.
- 6- 5. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 1-4 Ekim 2009, Fırat Üniversitesi, Elazığ, Türkiye.
- 7- Sığırlarda Rekto-Vaginal Metotla Suni Tohumlama Kursu, 19-23 Eylül 2011, İstanbul, Türkiye.

Ödülleri

- 1- İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi 2007 Dönem İkincisi.
- 2- 5. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 1-4 Ekim 2009, Fırat Üniversitesi, Elazığ, Türkiye, (Sözlü Sunum 2.'lik Ödülü).
- 3- Sığırlarda İn Vitro Fertilizasyon Çalışmaları, 15 Mart-15 Haziran 2011, Origio Medicult Media Ar-Ge Laboratuvarı, Danimarka, (Tinçel Kültür Vakfı Destekli).

Özel İlgi Alanları (Hobileri)

- 1- Spor yapmak
- 2- Kitap okumak
- 3- Film izlemek
- 4- Müzik dinlemek
- 5- Çiçek yetiştirmek