

**IN VITRO SIĞIR BLASTOSİST ÜRETİMİ ÜZERİNE TANIMLANMIŞ
MEDYUMLARIN ETKİSİ VE BLASTOSİSTLERİN FARKLI
KRİYOPREZERVASYON TEKNİKLERİ İLE DONDURULMASI**

Tolga AKKOÇ

Doktora Tezi

Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M İhsan SOYSAL

2012

T.C.

NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

IN VITRO SIĞIR BLASTOSİST ÜRETİMİ ÜZERİNE TANIMLANMIŞ
MEDYUMLARIN ETKİSİ VE BLASTOSİSTLERİN FARKLI
KRİYOPREZERVASYON TEKNİKLERİ İLE DONDURULMASI

Tolga AKKOÇ

ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Danışman: Prof. Dr. M. İhsan SOYSAL

Eş Danışman: Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ

TEKİRDAĞ-2012

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

IN VITRO SIĞIR BLASTOSİST ÜRETİMİ ÜZERİNE
TANIMLANMIŞ MEDYUMLARIN ETKİSİ VE BLASTOSİSTLERİN
FARKLI KRİYOPREZERVASYON TEKNİKLERİ İLE DONDURULMASI

Tolga AKKOÇ

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. İhsan SOYSAL

II. Danışman: Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ

Blastosist safhasındaki sığır embriyolarının eldesi ve soğğun zararlı etkilerinden korunması, hayvansal üretimde, klonlamada, transgenik teknolojide, tıbbi biyoteknolojide ve gen bankacılığında oldukça önem taşımaktadır.

Bu çalışmanın amacı, farklı *in vitro* dölleme (IVF) yöntemlerinin ve solüsyonlarının *in vitro* sığır blastosist üretimi üzerine etkilerini ve blastosistlerin katı yüzey camsı yapı dondurma ve klasik camsı yapı dondurma yöntemleri kullanılarak dondurulup çözündürülmesi ve çözündürme sonrası canlılık oranları ve toplam çekirdek sayılarının yani blastosistlerin iç hücre sayılarının araştırılmasıdır.

Çalışmada, yumurtaların *in vitro* olgunlaştırma ve dölleme sürelerinin, farklı (QACM, QABM, KSOM ve SOF) kültür solüsyonlarının, solüsyona katılan betamerkaptoethanolün blastosist oluşumu üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmaları takiben elde edilen blastosistlerin katı yüzey camsı yapı dondurma ve klasik camsı yapı dondurma yöntemlerinin blastosist canlılık ve hücre sayılarına etkisi araştırılmıştır.

Elde edilen veriler doğrultusunda QACM, QABM, KSOM ve SOF kültür solüsyonlarının blastosist gelişimi üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmada, QACM (Quinn'in Avantaj Yarıklanma Solüsyonu) ve QABM'de (Quinn'in Avantaj Blastosist Solüsyonu) 72

saat ara ile yapılan kültür sonucunda %15.9 oranında blastosist eldesi gerçekleşirken, KSOM (Potasyumu optimize edilmiş Solsyonu)-SOF (Koyun Oviduk Solüsyonu) solüsyonlarında 48 saat ara ile yapılan kültür sonucunda %1.7 oranında blastosist elde edilmiştir ($P<0.05$). Katı yüzey camsı yapı dondurma ve klasik camsı yapı dondurma yöntemleri ile dondurulan blastosistlerin çözüldükten sonraki canlılık oranları sırasıyla %82.6 ve %34.8 olmakla birlikte dondurulup çözüldürülme işlemi uygulanmayan blastosistlerin bulunduğu kontrol grubunda %100 olmaktadır. Katı yüzey camsı yapı dondurma yönteminin uygulandığı blastosistlerin ortalama çekirdek sayısı (124) klasik camsı yapı dondurma yönteminin uygulandığı blastosistlerden (104) yüksek bulunmuştur. Kontrol grubu yani herhangi bir dondurma ve çözüldürme işlemine tabi tutulmamış blastosistlerin toplam iç hücre (çekirdek) sayıları ise 213 olarak tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Sonuç olarak, IVF yöntemi kullanılarak elde edilen embriyoların QACM ve QABM solüsyonlarında 72 saat ara ile yapılan kültür sonucunda elde edilen blastosist oranının, KSOM-SOF solüsyonlarında 48 saat ara ile yapılan kültür sonucuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca canlılığını sürdüren yani düzgün zona pelisudaya sahip, parlak görünümlü blastosist oranı ve ortalama iç hücre sayısı, katı yüzey camsı yapı dondurma yönteminin kullanıldığı grupta, klasik camsı yapı dondurma yönteminden yüksek olmuştur. İki dondurma grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaktadır. Çalışmanın sonuçları elde edilen IVF ve embriyo dondurma protokollerinin hayvan üreme biyoteknolojisinde ve transgenik hayvan üretimin de efektif olarak kullanılabilceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Blastosist, Klonlama, Transgenik Teknoloji.

ABSTRACT

PhD Thesis

THE EFFECT OF SOLUTIONS ON *IN VITRO* PRODUCED BOVINE BLASTOCYSTS AND FREEZING OF BLASTOCYSTS IN DIFFERET CRYOPRESERVATION METHODS

Tolga AKKOÇ

Namık Kemal University Natural and Applied Science Institute

Department of Animal Science

Supervisor: Prof. Dr. M. İhsan SOYSAL

2nd Supervisor: Prof. Dr. Haydar BAĞIŞ

In vitro production and cryopreservation of bovine blastocysts are important for animal breeding, cloning, transgenic technology, medical technology and gene banking.

The aim of this study is to investigate the effect of different *in vitro* fertilization (IVF) methods and solutions on producing bovine blastocysts, and vitrification and warming of blastocysts both solid surface vitrification (SSV) and classic vitrification techniques. And finally to research the viability rate and total nuclei number of warmed blastocysts.

In this study, the effect of maturation period and betamercaptoethanol on oocyte maturation and blastocysts development, the effect of QACM, QABM, KSOM and SOF embryo culture mediums and fertilization period and finally the effect of different culture mediums on blastocysts development were investigated. As a continuation of this study blastocysts were vitrified with SSV and classic vitrification techniques. The effect of these vitrification techniques on survivability and total nuclei number of blastocysts investigated.

In comparison of different culture mediums on blastocysts development, in *in vitro* culture with QACM (Quinn's Advantage Cleavage Medium) and QABM (Quinn's Advantage

Blastocyst Medium) at 72 hour produced higher blastocysts stage embryo rate (15.9 %), while KSOM-SOF solution showed 1.7% of blastosist stage after 48 hours ($p<0.05$). The viability rate of blastocysts that vitrified with SSV and Classic vitrification techniques were 82.6% and 34.8% respectively. Viability rate of Non-vitrified blastocyst as a control group were found 100%. Total nuclei number of vitrified-warmed, non vitrified group and control were 124,104 and 213 respectively ($p<0.05$).

As a result, the blastocysts rate of *in vitro* produced IVF embryos by culture with QACM and QABM for 72 hours found to be higher than cultured embryos with KSOM (Potassium Simolex Optimised Medim) and SOF (Sheep Oviduct Fluid) for 48 hours. However, in SSV group, both blastocysts viability rate and total nuclei or inner cell mass number was higher than Classic vitrification group blastocysts. In conclusion, used protocols showed both IVF and vitrification techniques can be used in animal reproduction biotechnology and transgenic animal production effectively.

Key Words: Blastocyst, Cryopreservation, Cloning, Transgenic Technology.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimine başlama imkanı sağlayan, akademiş hayatımda bana her tŸrlŸ desteğini hićbir zaman esirgemeyen doktora danışmam hocam Sayın Prof Dr. M. İhsan SOYSAL'a, doktora dersleri sŸresince sŸrekli yardım ve desteğini gŸrdŸđŸm hocam Sayın Prof. Dr. Muhittin ŐZDER'e,

Hićbir zaman bilimsel uslubŸnŸ kaybetmeyen, yapıcı ve yaratıcı eleştirileri ile beni yŸnlendiren, mŸtevazi kişiliği ile Ÿrnek bilim insanı olan ve kendisini her zaman Ÿrnek aldım hocam Sayın Prof. Dr. Haydar BAĐIŐ'a

Eđitimim boyunca, bilimsel yaklařımlarını ve desteklerini hić bir zaman eksik etmeyen hocam Sayın Prof. Dr. Sezen ARAT'a

Tezimin deneysel ćalıřmalarında bana yardımcı olan TŸBİTAK Gen MŸhendisliđi ve Biyoteknoloji EnstitŸsŸ Hayvan Genetiđi ve Ÿreme Biyolojisi Laboratuvarı ćalıřanlarına,

Ve tŸm eđitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen anneme, babama ve ćalıřmalarımda desteđini her zaman yanımda gŸrdŸđŸm ađabeyim Doć. Dr. Tunć AKKOć'a

TeőekkŸr etmeyi bŸyŸk borć bilirim.

Bu tez çalışması

TÜBİTAK KAMAG- 107G027 ve TÜBİTAK KAMAG- 106G005 No'lu projeler tarafından desteklenmiştir.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

μ l	: Mikrolitre
μ m	: Mikrometre
μ M	: Mikromolar
G	: Gauge
Gr	: Gram
IU	: International Unit (Uluslar arası Birim)
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
mmHg	: Milimetre Cıva
mosm	: Miliosmoz
nm	: Nanometre
$^{\circ}$ C	: Santigrad Derece
sn	: Saniye
IVF	: <i>In vitro</i> fertilizasyon (Yapay dölleme)
AFP	: Anti Friz Protein (Donmaya Karşı Direnç Gösteren Protein)
EGF	: Epidermal Gelişim Faktörü
İGF	: İnsülin Gelişim Faktörü
FCS	: Sığır Fetüs Serumu
GVBD	: Germinal vesicle break down (Germinal vezikülün yıkılmış hali)

LH	: Lüteinleştirici hormon
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
KOK	: Kumulus Hücreleri ile Kaplı Olan Yumurta Kompleksi
TCM	: Tissue Culture Medium (Doku Kültür Solüsyonu)
MEM	: Minimal Esansiyel Solüsyonu
CO ₂	: Karbondioksit
O ₂	: Oksijen
N	: Azot
TALP	: Tyrode'un Albumin Laktat Piruvat Solüsyonu
BSA	: Sığır Serum Albumini
mDM	: Modifiye Edilmiş Solüsyon
QACM	: Quinn'in Avantaj Yarıklanma Solüsyonu
QABM	: Quinn'in Avantaj Blastosist Solüsyonu
KSOM	: Potassium Simplex Optimised Medium (Optimize Edilmiş Potasyum Solüsyonu)
SOF	: Sheep Oviduct Fluid (Koyun Oviduk Sıvısı)
BO	: Brackett Oliphant Solüsyonu
BWW	: Biggers-Whitten-Whittingham Solüsyonu
KRB	: Krebs Ringer Bikarbonat Solüsyonu
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EG	: Etilen Glikol
PVP	: Polivinil Pirrolidon

PVA	: Polivilin Alkol
HTF	: Human Tubal Fluid (İnsan Tüp Sıvısı)
PHE	: Penisilin Hipotaurin Epinefrin
FAF	: Fatty Asit Free (Yağ Asidi İçermeyen)
PSA	: Penisilin Streptomisin Antimiyosin
SSV	: Solid Surface Vitrification (Katı Yüzey Camsı Yapı Dondurma)
VS	: Vitrifikasyon Solüsyonu (Soğuşun Zararlı Etkilerinden Koruyan Solüsyon)
OPS	: Open Pulled Straw (Açık Çekim Payeti)

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	7
2.1 YAPAY DÖLLENME (IVF).....	8
2.1.1 IVF Basamakları.....	9
2.1.1.1 Sığır Ovaryumlarının Temini ve Olgun Olmayan Yumurtaların Elde Edilmesi.....	9
2.1.1.2 Elde Edilen Olgun Olmayan Yumurtaların <i>in vitro</i> Ortamda Olgunlaştırılmaları.....	12
2.1.1.3 Olgun Yumurtaların Sperma ile IVF si.....	13
2.1.2 Canlı Spermatozom Elde Etme Yöntemleri.....	14
2.1.2.1 Swim Up (Yukarıya Yüzdürme) Yöntemi.....	15
2.1.2.2 Percoll Yoğunluk Dereceli Ayırıştırma Yöntemi.....	16
2.1.3 Spermatozomun Dölleme Kabiliyeti ve Yumurta ile IVF si.....	18
2.1.4 IVF Sonrası Dölleme Ölçütlerinin Belirlenmesi	19
2.1.5 IVF Sonrası Yumurtaların <i>in vitro</i> Kültürleri.....	20
2.2 Dondurma (Kriyoprezervasyon).....	22
2.2.1 Embriyoların Dondurulmasının Avantajları.....	23
2.2.2 Dondurmada Kullanılan Dondan Koruyucu Maddeler.....	24
2.2.3 Embriyolarda Uygulanan Dondurma Yöntemleri.....	25
2.2.3.1 Geleneksel Yavaş Dondurma Yöntemi(Slow Freezing).....	26
2.2.3.2 Hızlı Dondurma Yöntemi (Rapid freezing).....	28
2.2.3.3 Camsı Yapı Dondurma (Vitrifikasyon) ile Dondurma.....	29
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	31
3.1 Sığır Yumurtalarının <i>in vitro</i> Olgunlaştırılması, Dondurulmuş Boğa Spermalarının Çözündürülerek IVF Gerçekleştirilerek Blastosist Safhasındaki Embriyoların Eldesi.....	32
3.1.1 Ovaryumların Bölge Mezbahadan Teminleri ve Laboratuara Getirilişleri.....	33
3.1.2 Olgun Olmayan Yumurtaların Bulunduğu Folikül Sıvılarının Ovaryumlardan Aspirasyonları.....	33

3.1.3 Aspirasyonu Gerçekleştirilen Folikül Sıvılarından Olgun Olmayan Yumurtaların İzolasyonu.....	34
3.1.4 Olgun Olmayan Yumurtaların Seçimi ve <i>in vitro</i> Olgunlaştırılması.....	35
3.1.5 Spermanın Çözündürülmesi ve Canlı Spermanın Elde Edilmesi.....	36
3.1.6 Canlı Spermanın Sayımı ve Yapay Döllenme İçin Sperma Konsantrasyonunun Hazırlanması.....	38
3.1.7 Olgun Olduğu Öngörülen Yumurtaların Sperma ile IVF si	39
3.1.8 IVF Sonrasında Döllenmiş Yumurtaların <i>in vitro</i> Kültüre Alınmaları.....	40
3.2 IVF Çalışma Başlıkları.....	41
3.2.1 Yumurtaların Farklı Olgunlaştırma Sürelerinin Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi.....	41
3.2.2 Betamerkaptoethanolün Yumurta Olgunlaştırması ve IVF Sonrası Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi....	43
3.2.3 Farklı Kültür Solüsyonlarının ve Yumurtaların Sperma ile Döllenme Sürelerinin Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi.....	45
3.2.4 Farklı Kültür Solüsyonlarının Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi.....	48
3.3 Blastosistlerin Farklı Camı Yapı Dondurma Yöntemleri ile Dondurma ve Çözündürme Çalışmaları.....	51
3.3.1 Katı Yüzey Camı Yapı Dondurma (SSV) Yöntemi.....	53
3.3.2 Klasik Camı Yapı Dondurma Yöntemi	55
3.4 Çözündürülen Blastosistlerin Toplam Çekirdek Sayılarının Tespiti Amacıyla Floresan Boyama Boyama (Hoechst 33342) Yöntemi ile Boyanması.....	57
3.4.1 Floresan Boyanın Hazırlanması ve Uygulanması.....	57
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	58
4.1 IVF Çalışmaları.....	58
4.1.1 Yumurtaların Farklı Olgunlaştırma Sürelerinin Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi.....	58
4.1.2 Betamerkaptoethanolüs Yumurta Olgunlaştırma ve IVF Sonrası Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi....	60
4.1.3 Farklı Kültür Solüsyonlarının ve Yumurtaların Sperma ile Döllenme Sürelerinin Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi.....	61
4.1.4 Farklı Kültür Solüsyonlarının Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi.....	64
4.2 Blastosistlerin Farklı Camı Yapı Dondurma Yöntemleri ile Dondurma ve Çözündürme Çalışmaları.....	66
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	72
6.KAYNAKLAR	79
EKLER.....	87
EK 1.....	87
EK 2.....	88
EK 3.....	89
EK 4.....	90

EK 5.....	91
EK 6.....	92
EK 7.....	93
EK 8.....	94
EK 9.....	95
EK 10.....	96
EK 11.....	97
EK 12.....	98
EK 13.....	99
EK 14.....	100
EK 15.....	101
ÖZGEÇMİŞ.....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.2.1. Sığır IVF Uygulamasının Şematik Sunumu.....	8
Şekil 2.2. Ovaryumun Yapısı ve Folikül Gelişimleri.....	10
Şekil 2.3. Ovaryumda Yumurta ve Folikül Gelişimi.....	11
Şekil 2.4. Swim Up (Yukarıya Yüzdürme Yötemi).....	15
Şekil 2.5. Percoll Dereceli Ayırıştırma Yöntemi.....	17
Şekil 2.6 Percoll Dereceli Sperm Ayırıştırma Sonrası.....	18
Şekil 3.1. Primer Foliküllerin Ovaryumdan Aspirasyonu.....	34
Şekil 3.2. Sığır Ovaryumları.....	34
Şekil 3.3. a- Olgun Olmayan Yumurta, b- Olgunlaşmış Yumurta.....	35
Şekil 3.4. Percoll Sperm Ayırıştırma Tüpü.....	37
Şekil 3.5. Sperm Yüklü Payetin Çözündürülmesi ve Ayırıştırma Tüpüne Aktarılması.....	37
Şekil 3.6. Sperm Sayımında Kullanılan Thoma Lamı.....	38
Şekil 3.7. Thoma Lamında Sperm Sayım Sistemi.....	39
Şekil 3.8. Katı Yüzey Camsı Yapı Dondurma Düzeneği.....	54
Şekil 3.9.Embrioların Payetlenmesi.....	56
Şekil4.1. QACM – QABM Kültür Solüsyonlarında Kullanılarak Elde Edilen Blastosistler.....	65
Şekil 4.2. Dondurma Çalışması Kapsamında Kullanılan Blastosistler.....	69
Şekil 4.3. Katı Yüzey Camsı Yapı Dondurma Yöntemi ile Dondurulup Çözündürülen Blastosistler....	69
Şekil 4.4. Katı Yüzey Camsı Yapı Dondurma Yöntemi ile Dondurulup Çözündürülen Blastosistlerin Bis-Benzemide (Hoescht-33342) ile Boyaması Sonucu Çekirdek Görüntüleri.....	69
Şekil 4.5. Klasik Camsı Yapı Dondurma Yöntemi ile Dondurulup Çözündürülen Blastosistleri.....	70
Şekil 4.6. Klasik Camsı Yapı Dondurma Yöntemi ile Dondurulup Çözündürülen Blastosistlerin Bis-Benzemide (Hoescht-33342) ile Boyaması Sonucu Çekirdek Görüntüleri.....	70
Şekil 4.7. Kontrol Grubu Blastosister.....	70
Şekil 4.8. Kontrol Grubu Blastosistlerin Bis-Benzemide (Hoescht - 33342) ile Boyaması Sonucu Çekirdek Görüntüleri.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Memeli Embriyolarında IVF in Tarihçesi.....	4
Çizelge 1.2. İlk Başarılı IVF Çalışmaları.....	5
Çizelge 1.3. Dondurulup Çözündürülmüş Embriyolar, Çalışılan Hayvan Türleri ve Araştırmacılar.....	6
Çizelge 1.4. Memeli Türlerinde Embriyoların Camsı Yapı ile Dondurma Çalışmaları.....	7
Çizelge 4.1. Yumurtalarda Farklı Olgunlaştırma Sürelerinin Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi.....	59
Çizelge 4.2. Kullanılan BME'nin Yumurtaların Olgunlaştırılmasına ve Blastosist Safhasına Gelişimi Üzerine Etkisi.....	61
Çizelge 4.3. Farklı Döllenme Sürelerinin ve Kültür Solüsyonların Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi...	63
Çizelge 4.4. Farklı Kültür Solüsyonlarının <i>in vitro</i> Embriyo Gelişimi Üzerine Etkileri.....	65
Çizelge 4.5. Katı Yüzey Camsı Yapı Dondurma ve Klasik Camsı Yapı Dondurma Yöntemleri ile Dondurulup Çözündürülen Blastosistlerin Çözündürme Sonrasındaki Gelişim Oranları.....	67
Çizelge 4.6. Camsı Yapı Dondurma Grupları ve Çözme Sonrası Toplam Hücre Sayıları, Çözündürülen Blastosistlerin Çözündürme Sonrasındaki Gelişim	68

1. GİRİŞ

Ülkemizin mevcut gelirini tarım, endüstri, ticaret, ormancılık, madencilik, turizm ve ulaştırma gibi sektörlerden sağlanan kaynaklar oluşturmaktadır. Bu sektörlerin bir veya birkaçının diğerlerine göre daha ön sırada yer alması, ülkemizin doğal yapısına, ekonomik ve sosyal düzeyine göre değişim göstermektedir. Nüfusunun, %50'sinden fazlası kırsal kesimde yaşamakta olan ülkemiz son yıllarda endüstri, ticaret ve ulaşım alanında gerçekleştirdiği ilerlemelere rağmen, bir tarım ülkesi olma özelliğini günümüze dek korumuştur.

Tarımsal gelirin %70'lik bir kısmını bitkisel üretim, %30'luk bir kısmı ise hayvansal üretim oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerde hayvansal üretim payının %60 - 70'lere uzandığını gördüğümüzde ülkemizde gerçekten yeterli düzeyde hayvansal üretimin gerçekleşmediğini görebiliriz. Ülkemizdeki hayvansal üretimin başka ülkelerde gerçekleşen üretime göre daha az düzeyde olmasının nedenlerinden biri de mevcut gen kaynaklarımızın daha ilkel düzeyde olmasıdır. Bu nedenle hayvansal üretimde soy iyileştirme olarak tanımlanan hayvan ıslahı, gelecek jenerasyonlarda istenilen genotipik ve fenotipik değerlere sahip hayvanların üretilmesine, dolayısıyla döl verimi daha yüksek, olumsuz çevre koşullarına daha dayanıklı, tükettiği birim yemden daha fazla ürün elde edilmesine katkı sağlayacaktır (Soysal 2000).

Klasik ıslah yöntemlerinin yanı sıra, son yıllarda ülkemizde modern ıslah yöntemleri çatısı altında yoğun olarak kullanılan modern biyoteknolojik yöntemler, üreticinin isteği doğrultusunda gelecek jenerasyonların oluşturulması bu nedenle mevcut hayvansal üretimin açığının kapatılmasında olumlu etkileri olmaktadır.

Ülkemizde bilimsel alanda gerçekleşen önemli gelişmelerin biri biyoteknoloji alanındaki ilerlemeler olmaktadır. Gamet hücrelerinin gelişim ve fizyolojilerinin zamanla anlaşılma başlanması, canlılar üzerinde biyoteknolojik yöntemlerin uygulanmaya başlanmasının temelini oluşturmuştur. Fakat canlı bünyesindeki (*in vivo*) gamet fizyolojisi ve dölleme (fertilizasyon) olgusunun daha iyi anlaşılması, laboratuvar ortamlarında (*in vitro*) yapılan deneysel çalışmalarla sağlanmıştır. Bu nedenle ilk önce embriyoların *in vitro* koşullarda elde edilmesi ve manipülasyonlarının gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmalar özellikle farelerde ve çiftlik hayvanları olarak sığırlarda yoğun olarak uygulanmaya başlanmıştır.

Laboratuvar ortamında gerçekleşen *in vitro* çalışmaları, saha çalışmaları takip etmiş ve böylece biyoteknolojik çalışmalarda beşeri alanda önemli uygulamalar yapılmıştır.

Üreme biyolojisi alanındaki çalışmalar, ilk önce suni tohumlama metodunun uygulanmasıyla başlamış ve ardından yapay dölleme (*in vitro* fertilizasyon -IVF) ve elde edilen embriyolardan canlı birey elde etme amacıyla embriyo transferi çalışmaları, üretilen embriyoların dondurularak saklanması kapsayan soğukun zararlı etkilerinden koruma (kriyobioloji) çalışmaları ile modern biyoteknolojik yöntemlerin uygulanması alanındaki gelişmeler günümüze kadar hızla ivme kazanarak ilerleme kaydetmiştir.

Tarımda hayvansal üretim alanında faydalar sağlayan modern biyoteknolojik yöntemlerin hayvancılığa getireceği birtakım yararlar şöyle özetlenebilir;

- Çiftlik hayvanlarında ıslah çalışmalarının hızlandırılması,
- Besi hayvanlarının niteliklerini iyileştirmek,
- Yapay dölleme, yapay tohumlama ve embriyo transferi çalışmalarının etkin bir şekilde sağlanması ile dölleme problemlerinin (infertilite) çözümlenmesi,
- İkiz gebelikler için embriyo üretmek,
- Klon, transgenik, kimerik ve cinsiyeti belirli embriyoların üretilmesi,
- Soğukun zararlı etkilerinde koruma (kriyoprezervasyon) çalışmaları,
- Genetik kaynaklarının korunması.

Çiftlik hayvanlarında özellikle sığırlarda *in vitro* yöntemlerle embriyo eldesi ve embriyoların dondurma teknolojisi dünyada yaygın bir şekilde uygulanırken, ülkemizde istenilen düzeyde çalışmalar yapılamamıştır. Embriyoların *in vitro* yöntemlerle elde etme çalışmaları ile embriyoların dondurulması üzerinde gerçekleştirilen uygulamalar başta tıbbi biyoteknoloji alanında olmak üzere son yıllarda tarımsal biyoteknoloji adı altında ülkemiz hayvancılığının geliştirilmesinde ve hayvancılıkta daha fazla ürünün daha düşük maliyetle üretimi açısından oldukça önemli katkılar sağlayacaktır.

IVF yöntemi ile embriyoların elde edilmesinin birçok avantajı bulunmaktadır. Başlıca avantajları; bireyler arasında dölleme ile ilgili problemler olduğunda yumurtanın laboratuvar ortamında döllendirilmesi ile embriyo üretiminin gerçekleştirilebilmesi, başka ülkelerdeki döl verimi yüksek hayvanların sadece gametlerinin ülkeye transferi gerçekleştirilip yapay dölleme yöntemiyle yeni embriyonun elde edilmesi böylelikle canlı hayvan transferine gereksinim olmaması ayrıca kaliteli dişi ve erkeklerden daha fazla sayıda embriyo elde edilmesi ile ıslah çalışmalarına hız kazandırılması olmaktadır.

Memeli embriyoların dondurulmasının da büyük avantajları bulunmaktadır. Dondurma teknolojisi kullanılarak embriyo bankası ünitesi kurularak korunması istenen genetik kaynakların sorunsuzca uzun yıllar boyunca kontrollü bir şekilde saklanmasına olanak tanınır. Başka ülkelerden embriyo ve semen taşımacılığı gerçekleştirilerek canlı hayvan yerine, sadece embriyonun kullanılması ekonomik ve işgücü bakımından yarar sağlamaktadır. Embriyo dondurması ile hem ana hem de babadan gelen genlerin bir arada dondurulmuş olacağından yumurta ve spermanın ayrı ayrı dondurulmasına göre daha avantaj sağlamaktadır.

Olası salgın hastalıklar ve doğal afetler sonucu meydana gelebilecek kayıplar, kurulacak gen bankalarındaki dondurulmuş embriyoların canlandırılması ile telafi edilebilir. Bu nedenle embriyoların dondurularak saklanması, gen kaynaklarının korunmasında yaygın bir araç olarak kullanılmaktadır.

Sperma ve yumurtanın laboratuvar ortamında dölleme işleminin gerçekleştirilmesiyle embriyo elde etmek ve embriyonun uygun alıcı hayvanlara transferi sonrasında canlı ve sağlıklı yeni bireyler elde etmek son yıllarda yaygın olarak kullanılan bir teknoloji olmaktadır. Sunulan çalışmada, farklı yöntemler ve metotlar kullanılarak *in vitro* ortamda olgunlaştırılmış sığır yumurtaları dondurularak saklanmakta olan boğa spermeleri ile yapay döllemeye tabi tutulmuş, gelişen embriyoların farklı embriyo kültür solüsyonları ile *in vitro* kültürleri gerçekleştirilmiş, elde edilen blastosist safhasındaki embriyolar, katı yüzey camsı yapı dondurma (Solid Surface Vitrification-SSV) ve klasik camsı yapı dondurma yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak dondurulup çözündürülmüş ve çözündürme sonrasında canlılığını *in vitro* kültürde sürdüren blastosistler, floresan boyama tekniği ile boyanarak blastosistlerin toplam çekirdek sayıları araştırılmıştır.

IVF çalışmaları, 1878 yıllarına dayanmaktadır (Rock ve Menkin 1944). İlk başarılı IVF çalışması 1959 yılında tavşanlarda yapılmış ve bu çalışmanın sonunda canlı ve sağlıklı yavru eldesi gerçekleştirilmiştir (Chang 1959).

Sperm dölleme kabiliyet, prosedürünün geliştirilmesi IVF çalışmalarındaki ana engeli ortadan kaldırmıştır (Austin 1951, Chang 1951). Bu çalışmayı takiben olgun olmayan sığır yumurtalarının olgunlaştırılması sonrasında boğa sperması ile başarılı bir şekilde döllendirme çalışması 1977 yılında gerçekleştirilmiştir (Irritan ve Niva 1977).

Amerika Birleşik Devletleri'nde Brackett ve arkadaşlarının (1982) yapmış oldukları çalışmalarda yapay olarak döllendirilmiş sığır yumurtasının transferi sonucunda ilk canlı buzağı elde edilmiştir. Hanada ve arkadaşları (1986) *in vitro* yollarla olgunlaştırılmış sığır yumurtasının IVF sonrasında ilk buzağı eldesini gerçekleştirmişlerdir. Lu ve arkadaşları tarafından (1988) *in vitro* yollarla üretilmiş sığır embriolarından ilk kez ikiz gebelik ve gebeliğin sonucunda ikiz canlı doğum elde edilmiştir (Lu ve ark. 1988). Memeli embriolarında IVF nin tarihçesi **Çizelge 1.1**'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Memeli embriolarında IVF'in tarihçesi

Yıl	Araştırma Konusu	Araştırmacılar
1951	Sperm kapasitasyonunun tanımlanması	Austin; Chang
1959	Tavşanlarda IVF	Chang
1963	Kapasite edilmiş sperm ile IVF	Yanagimachi ve Chang
1969	İnsan yumurtasının IVF si	Bavister ve ark; Edwards ve ark
1977	Sığır yumurtasının IVF si	Iritani ve Niwa
1978	IVF sonucu ilk insanın doğumu	Steptoe ve Edwards
1982	IVF sonucu ilk buzağının doğumu	Brackett ve ark
1986	Nükleer transfer ile ilk koyunun klonlanması	Willadsen
1986	<i>In vitro</i> olgunlaştırılmış Sığır yumurtası IVF ve ilk buzağının doğumu	Hanada ve ark
1988	<i>In vitro</i> üretilmiş sığır embriolarından ikiz buzağının eldesi	Lu ve ark
1992	İnsan yumurtasına spermin enjeksiyonu sonrası ilk gebeliğin eldesi	Palermo ve ark
1993	İnsan yumurtasına spermin enjeksiyonu sonrası ikinci gebeliğin eldesi	Hamberger ve ark
1999	İnsan yumurtasının vitrifikasyonu sonrası yavru eldesinin gerçekleşmesi.	Kuleshova ve ark
2003	Üç çekirdekli insan zigotunu mikrocerrahi ile çekirdek izolasyonu sonrası normal doğumun gerçekleştirilmesi	Kattera ve ark
2004	Kanser hastalarında <i>in vitro</i> olgunlaştırma ve vitrifikasyon uygulanmış insan yumurtasında IVF uygulanması.	Rao ve ark
2012	İnsanlarda IVF sonucu 5.000.000 adet doğum gerçekleştirilmesi.	http://www.ivf1.com/ivf-history/

Hayvan türleri bakımından başarılı IVF çalışmalarını gerçekleştirdiği bilgilerini içeren özet **Çizelge 1.2**'de görüldüğü gibidir.

Çizelge 1.2. İlk başarılı IVF çalışmaları (Wolf ve Quigley, 1984)

Yıl	Canlı Türleri	Araştırmacılar
1898-1958	Onaylanmamış çalışmalar	Thiboult, tarafından özetlenmiştir.
1959	Tavşan	Chang
1964	Hamster	Yanagimachi ve Chang
1968	Fare	Wittingham
1969	İnsan	Edwards ve arkadaşları
1970	Kedi	Hommer ve arkadaşları
1972	Kobay	Yanagimachi
1973	Rat	Miyamoto ve Chang
1977	İnek	İritani ve Niwa
1978	Domuz	İritani ve arkadaşları
1983	Rhesus maymun	Bavister ve arkadaşları
1983	Şempaze	Gould

Donmaya karşı korumaya ilişkin (Kriyoprezervasyon) ilk çalışmalar, Gliserolün 1949 yılında sperm hücrelerin üzerinde dondurma çalışmalarının oluşturulmasıyla başlamıştır (Polge 1949). Elde edilen bu başarılı sonuçlar, memeli embriyolarının da dondurularak saklanması konusunda yapılması düşünülen araştırmalarının önünü açmıştır. İlk memeli embriyolarının dondurularak saklanması ve çözündürülerek transfer sonrası yeni bireylerin elde edilmesi fare embriyolarında gerçekleştirilmiştir (Whittingham ve ark. 1972).

Bu çalışmayı takip eden yılda sığır embriyoları dondurulup çözündürülmüş ve alıcı hayvanlara transfer edilerek canlı buzağı elde edilmiştir (Wilmot ve Rawson 1973). Sonraki yıllarda diğer memeli türlerine ait embriyolar üzerinde dondurma ve çözündürme çalışmaları gerçekleştirilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Dondurma ve çözündürme sonrası yapılan embriyo transferleri sonucunda canlı yavru elde edilmeleri ve bu konu üzerinde çalışmış araştırmacılar ve araştırmaların gerçekleştirildiği yıllar **Çizelge 1.3**'de görüldüğü gibidir.

Çizelge 1.3. Dondurulup çözündürülmüş embriyolar, çalışılan hayvan türleri ve araştırmacılar.

Yıl	Canlı Türleri	Araştırmacılar
1971	Fare	Whittingham ve arkadaşları
1973	İnek	Wilmot ve Rowson
1974	Tavşan	Bank ve Maurer
1974	Koyun	Willadsen
1975	Sıçan	Whittingham
1976	Keçi	Bilton ve Moore
1982	At	Yamamoto ve arkadaşları
1984	İnsan	Zeilmaker ve arkadaşları
1985	Hamster	Ridha ve Dukelow
1988	Kedi	Dresser ve arkadaşları
1989	Domuz	Hayashi ve arkadaşları
1989	Rhesus maymunu	Wolf ve arkadaşları

30-40 yıl öncesinden günümüze birçok sığır embriyosu dondurulmuş, çözündürülmüş ve transfer edilerek canlı buzağılar elde edilmiştir. Bu konu üzerinde birçok bilimsel makaleler yazılmıştır (Dobrinsky 1996 2002, Palasz ve Mapletoft 1996, Kaidi ve ark. 1997, 1999 a,b, Massip1999, 2001. Rall 2001, Liebo ve Songsasen 2002).

Embriyoların dondurulmalarında ilk başta kademeli yavaş dondurma yöntemi kullanılmıştır (Martez A.G. ve Matkovic M. 1998). Geleneksel yavaş dondurma yönteminin uygulanması için oldukça pahalı ve komplike cihazlara gereksinim olmaktadır. Bu yöntemle dondurulan embriyolar alıcı hayvanlara transfer edilmelerinden önce çözündürüldüklerinde hücre içerisindeki soğuktan koruyucu maddelerden tamamen uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu nedenle çözündürülen embriyolar kademeli olarak farklı yoğunluklardaki soğuktan koruyucu maddelere maruz bırakılmalıdırlar (Dinnyes ve ark. 1995).

Geleneksel yavaş dondurma yöntemi maliyetli ve zahmetli bir yöntem olarak kabul edildikten sonra araştırmalar, daha pratik, ekonomik olan ve daha etkin sonuçlar elde ettirebilecek yeni dondurma yöntemi olan camsı yapı ile dondurma (vitrifikasyon) yöntemini geliştirilmişlerdir (Rall ve Fahy 1985). Bu çalışmayı benzer yöntemin uygulandığı birçok çalışma izlemiştir. (Palasz ve Mapletoft 1996, Akkoc ve ark. 2006, Bagis ve ark. 2002, 2008, Akkoc ve ark. 2011)

Ayrıca Bagis ve arkadaşları (2002) tarafından gerçekleştirilen çalışmada Antifreeze proteini (AFP) geni taşıyan transgenik fare embriyoları camsı yapı ile dondurma yöntemi ile

dondurup çözündürmüş ve çözüdürme sonrası embriyolar alıcı farelere transfer edilerek yeni transgenik fareler elde edilmiştir AFP geni Ocean Pout cinsinde okyanus dibinde yaşayan balıktan izole edilmiştir ve bu gen fareye aktarılmıştır. Fare +4 °C'deki ortama maruz bırakıldığı anda bu AFP geni aktive olarak fareyi soğğun zararlı etkilerinden korumaktadır. (Bagis ve ark. 2002). Bagis ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen başka bir çalışmada, Antifiriz Protein (AFP) geni taşıyan transgenik fare ovaryumları kriyotüplerde vitrifiye edilerek 1-7 gün süre ile saklanmış ve çözüdürülen ovaryumlar transgenik olmayan hayvanlara transfer edilerek yeni AFP genine sahip transgenik fare yavruları elde edilmiştir (Bagis ve ark. 2008).

Bu tez çalışması kapsamında, IVF sonrası elde edilmiş inek blastosistlerinden oluşan materyali klasik camsı yapı dondurma yöntemi ile katı yüzey camsı yapı dondurma yönteminin karşılaştırmalı olarak dondurulmuş ve dondurulan bu embriyolar çözüdürülerek bu iki dondurma yöntemi birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

Diğer memeli türleri embriyolarında gerçekleştirilen camsı yapı dondurma çalışmalarının tarihçesi **Çizelge 1.4**'de özetlenmiştir.

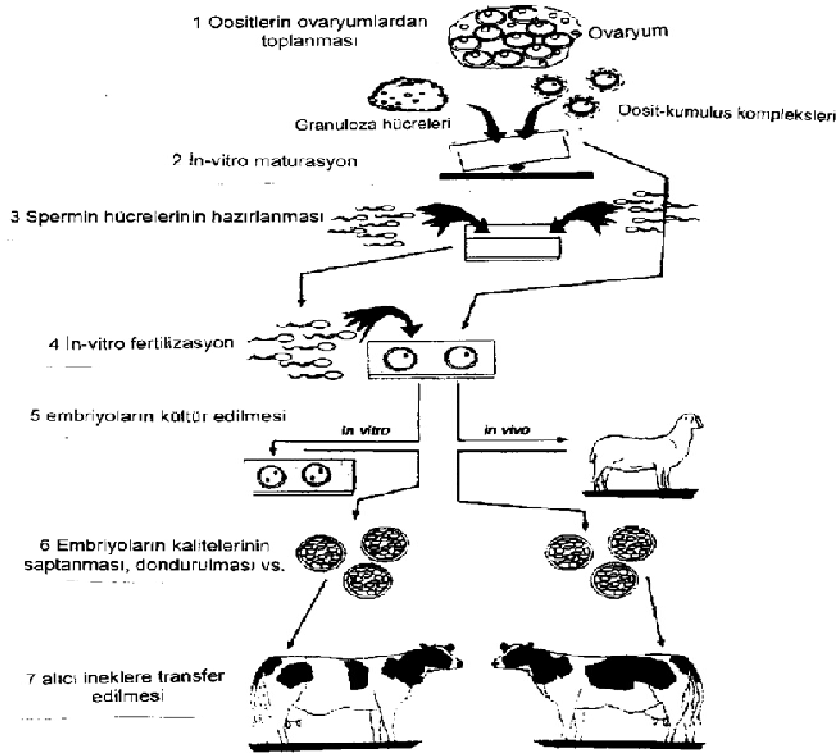
Çizelge 1.4. Memeli türlerinde embriyoların camsı yapı ile dondurma çalışmaları.

Yıl	Canlı Türleri	Araştırmacılar
1985	Fare	Rall ve Fahy
1986	İnek	Massip ve arkadaşları
1986	Hamster	Critser ve arkadaşları
1988	Sıçan	Kono ve arkadaşları
1989	Tavşan	Smorag ve arkadaşları
1990	Koyun ve Keçi	Scieve ve arkadaşları
1994	At	Hochi ve arkadaşları
1998	Domuz	Kobayashi ve arkadaşları

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. YAPAY DÖLLENME (IVF)

Yapay dölleme (IVF), dişi genital organ kanallarının dışında olgun yumurta hücresinin yunurtayı dölleme kabiliyetini kazanmış (kapasite olmuş) sperma ile döllemesini içeren bir tekniktir. Spermanın yumurtayı döllemesini takiben meydana gelen tek hücreli embriyolar (zigot) *in vitro* ortamda kültür edilirler ve *in vitro* gelişimini tamamlayan embriyolar uygun alıcı dişilere transfer sonrası yeni bireyler elde edilir. IVF çalışması ile başlayan doğum ve gebelikle sonuçlanan bu teknik, günümüzde oldukça yaygın bir biçimde deneysel çalışmalarda başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. IVF basamakları Şekil 2.1’de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Sığır IVF uygulamasının şematik sunumu (Gordon 1994).

2.1.1. IVF Basamakları

IVF çalışması, birbirini takip eden 4 ana basamakta gerçekleşmektedir. Bu basamaklar;

- 1- Sığır ovaryumlarının temini ve olgun olmayan yumurtaların elde edilmesi.
- 2- Elde edilen olgun olmayan yumurtaların *in vitro* ortamda olgunlaştırılması
- 3- Olgun yumurtaların sperma ile IVF si
- 4- IVF sonrası hücrelerin *in vitro* kültürleri

2.1.1.1. Sığır Ovaryumlarının Temini ve Olgun Olmayan Yumurtaların (Immature Oositlerin) Elde Edilmesi.

Olgun olmayan yumurtaların elde edildikleri kaynak ve elde edilme yöntemleri embriyo üretiminin başarısını olumlu ya da olumsuz yönde etkileyebilir. Embriyoların elde edilmesinde önceki yıllarda uterus yıkaması (flushing) yöntemi uygulanarak *in vivo* ortamda olgunlaşmış yumurtaların direk temini gerçekleştiriliyordu (Bavister ve ark 1992). Fakat bu yöntemde elde edilen yumurta sayısının sınırlı olması nedeniyle ileriki yıllarda olgunlaşmamış yumurtaların ultrasonografi rehberliğinde transvajinal ve laparotomi-endoskopi yöntemi yardımı ile canlı hayvanların ovaryumlarının yüzeylelerinden kfoliküllerin aspirasyonu ile elde edilmesi yoluna gidilmiştir (Hashimoto ve ark 1999).

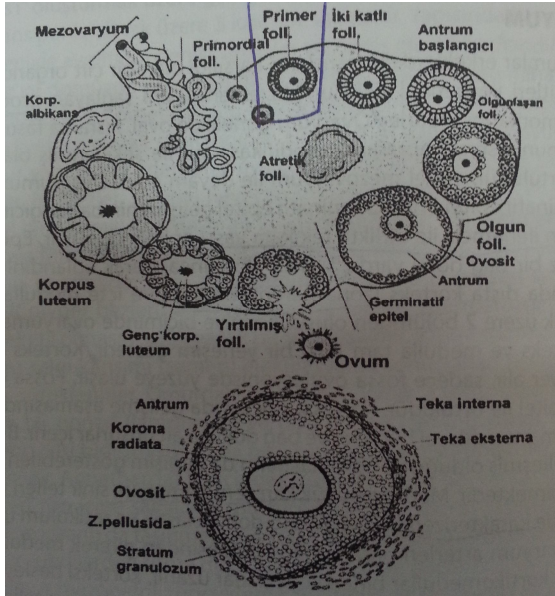
Her iki yöntemin uygulanması konusunda pahalı cihaz ve ekipmanlara ihtiyaç duyulması, teknik destek ve deneyim gereksiniminin bulunması nedeniyle yakın zamandan itibaren olgun olmayan yumurta kaynağı olarak mezbahada günlük kesimi gerçekleştirilen sığırların ovaryumları kullanılmaktadır (Truonson 1992).

Olgun olmayan yumurtaların eldesi, bölge mezbahalardan günlük kesimi yapılan ineklerin ovaryumlarının temini ile gerçekleştirilmektedir. Çok sayıda iyi kaliteye sahip yumurtaların temini birçok parametreye bağlı olarak değişmektedir. (Nagai 2001).

Normal embriyo gelişimi için yumurtanın elde edileceği verici sığırın en az 11 aylık yaşta olması gerekmektedir. Bununla beraber, 3 ya da 4 ay arası yaşta olan sığırlardan elde edilen yumurtaların gelişimi başarılı olmamaktadır. Fakat yumurtaların *in vitro* olgunlaştırma solüsyonlarına Epidermal Gelişim Faktörü (EGF) ilavesi yapılarak *in vitro* embriyo gelişim

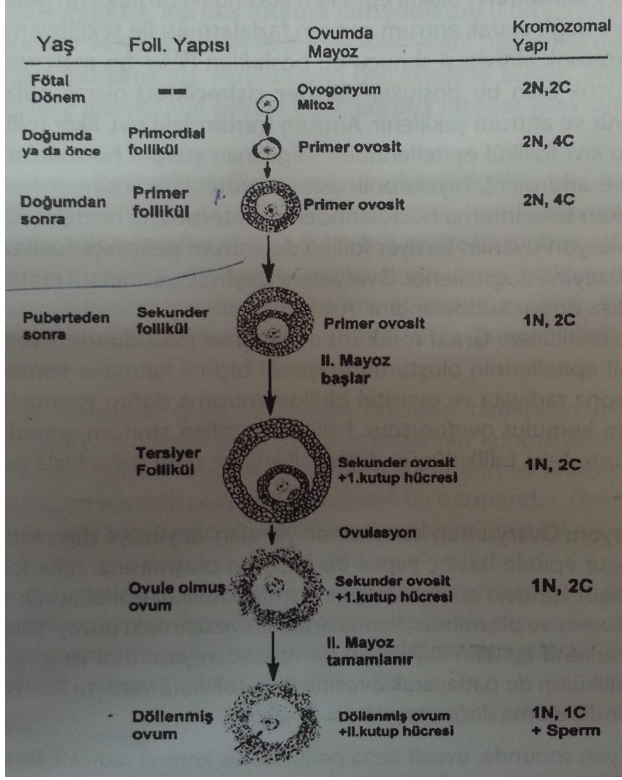
oranı arttırılabilinmektedir (Kahir ve ark. 1998). Genelde 1 yaşını doldurmuş sığırlardan ovaryumların temini yoğunlukla tercih edilmektedir.

Olgun olmayan yumurtaların eldesi, ovaryumların primer olarak adlandırılan olgunlaşmamış birincil foliküllerden aspirasyon yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. Folikül büyüklüğünün yumurta büyüklüğü ve gelişim durumu ile doğru orantılı olduğu Gordon tarafından belirtilmiştir (Gordon 1994). 2 mm'den küçük çapta olan foliküllerde bulunan yumurtalar mitoz bölünme karakterini kazanmadıklarından ve 6 mm'den büyük çapta olan foliküllerde bulunan yumurtalar da atrezi dalgası görünümünde ve olgunlaşma başarısının oldukça düşük olmasından dolayı çalışmalarda aspirasyon için 2-6 mm arası çapta olan primer foliküller tercih edilmektedir (Şekil-2.2, 2.3) (Sirard ve Blondin 1996).



Şekil 2.2 Ovaryumun yapısı ve folikül gelişimleri (Carlos 1996)

Ovaryum (Yumurtalık); dişinin yumurta ürettiği, östrojen ve progesteron hormonu oluşumunu ve yumurtanın gelişimini sağladığı organdır. Yumurta (Ovosit); ovaryumda üretilen, olgunlaşma devresinden önceki dişi cinsiyet hüresidir. (Şekil 2.2.) Sperma ile ovumun döllenmesinden sonra çekirden öncesi (pronükleus) safhafadaki hücre oluşur, çekirdekler kiyazma şeklinde birleşir ve tek hücreli embriyo hüresi yani zigot oluşur. Zigot oluşumunu takiben hücre içerisinde bölünme gerçekleşir. 2 iç hücreli safha oluşumu ile bölünme başlar ve blastosistin için hücre (aynı şekilde iç hücre çekirdeği) adedi bölünmeler ile 180-200'e ulaştığında normal gelişime sahip blastosist embriyo hüresi elde edilmiş olunmatadır.



Şekil 2.3 Ovaryumda yumurta ve folikül gelişimi (Carlos 1996)

Foliküllerden olgun olmayan yumurtaların aspirasyonu 18 - 22 G'luk iğne ile 3 - 20 ml'lik enjektör yardımıyla elle manuel olarak ya da 16 - 19 G'luk iğne ile 50 - 100 mmHg basınçta çalıştırılan ters vakum pompasıyla gerçekleştirilmektedir. Vakum basıncının yüksek olması yumurtaların etraflarında bulunan kümülüs hücrelerinin yıpranmasını ve kümülüs hücrelerinin yumurtadan ayrılmasına neden olacağı için hava basıncının 50 mmHg'den yüksek olmaması elde edilecek yumurtanın kalitesi açısından oldukça önemlidir (Ward ve ark 1999). Aspirasyon sonrası ovaryumların folikül bölgelerinden elde edilen folikül sıvıları 50 ml lik konik tüpe aktarılır ve tüpün dip kısmında yumurtaların bulunduğu kısım TL-HEPES dış ortam solüsyonuna transfer edilir. (EK-1)

2.1.1.2. Elde Edilen Olgun Olmayan Yumurtaların *in vitro* Ortamda Olgunlaştırılması

Yumurtaların olgunlaşması sırasında yumurta çekirdeği, $2n$ kromozom sayısını yarıya indirerek n sayıda kromozoma ulaştırması sırasında bir dizi bölünmeye girmektedir. Olgunlaşma süreci genetik materyali çevreleyen germinal vezikülün (GVBD) gözden kaybolması ve sonrasında kromozomların yoğunlaşması ile başlamaktadır.

Ovaryumların preantral ve antral foliküllerden elde edilen yumurta birinci mayoz bölünmenin profaz I aşamasında olup olgunlaşma için LH artışını beklemektedir. Yani bu durumda yumurtalar olgunlaşmamış durumdadır. LH dalgasından yaklaşık olarak 4 - 8 saat süre sonunda germinal vezikül yıkımlanır ve çekirdek zarı kaybolur, sonra çekirdek içerisinde bulunan kromozom şekillenir. Bu değişimin devamında yumurta sırasıyla metafaz-I, anafaz-I ve telofaz-I aşamalarını geçirir ve birinci kutup cisimciği zona pelisuda ile oositin arasındaki perivitellin boşluğuna atılır. Böylelikle yumurta olgunlaşmış olur (Thibault ve ark 1987).

Ovaryumların aspirasyonu sonrası elde edilen olgun olmayan yumurtaların seçimi morfolojik gözlemler dahilinde bir takım kalite değerlendirmeleri sonucunda gerçekleştirilmektedir. Bu değerlendirmelerden ilki, yumurtanın etrafını çevreleyen ve yumurta kumulus hücreleriyle oluşmuş kompleks olarak adlandırılan (KOK) kumulus hücrelerinin tabaka sayısı ve yoğunluğudur.

Kumulus hücrelerinin *in vitro* embriyo üretim başarısını %20 - 30 arasında etkilemekte olduğu bildirilmektedir (Wit ve ark. 2000). Dört ya da daha fazla kumulus hücre katmanına sahip yumurtaların olgunlaşma yeteneklerinin çok daha iyi olduğu bilinmektedir. (Younis ve ark. 1989). Ayrıca yumurtaların rengi, saydamlığı ve yumurta-plazmanın yapısı da yumurtanın kalite değerlendirmesinde kullanılan diğer kriterler arasında yer almaktadır (Goeseels ve Panich 2002).

Yumurtaların olgunlaştırılmasında sıklıkla Tissue Culture Medium 199 – Doku Kültür Solüsyonu (TCM-199), Tyrode, Ham'ın F10 ve F12, Minimum Esansiyel Medium-Minimum Esansiyel Solüsyonu (MEM) ve Menezo'nun B2'si gibi doku kültür solüsyonları kullanılmaktadır (Greve ve ark 1993). Yumurtaların olgunlaştırılmalarında kullanılan bu solüsyonlar kendi başlarına yeterli olmamaktadır ve bu solüsyonlara destek olarak dışarıdan kökenli olarak serumlar, proteinler, hormonlar ve peptitler, sentetik olarak da inhibitör,

oksitosin, insülin gelişim faktörleri (IGF), epidermal gelişim faktörleri (EGF), aktivin kaynakları ilave edilmektedir (Thompson 1996).

Elde edilen olgun olmayan yumurtaların olgunlaştırılmaları, yani metafaz-2 aşamasına ulaşmaları için hormon, enerji, çeşitli gelişim faktörleri gibi bir dizi kimyasallara maruz bırakılmak durumundadırlar. *In vitro* olgunlaştırma solüsyonu, yukarıda bahsedilen etkilil maddelerin belirli oranlarda ticari olarak temin edilen TCM-199 doku kültür solüsyonuna ilave edilmesiyle hazırlanmaktadır.

Olgunlaştırma solüsyonunun asit-baz değeri (pH değeri) yaklaşık olarak 7.3 - 7.4 arasındadır ve ozmotik basıncı ise 270 - 290 mosm/kg civarında olmaktadır. Hazırlanan olgunlaştırma solüsyonu bir petri kabı yüzeyinde yaklaşık olarak 50, 100 veya 400 µl.'lik damlalar oluşturup üzeri mineral yağ ile kaplatılıp, %5 CO₂ gaz içeren 38.5 - 39 °C'deki inkübatörde 22 - 24 saat süre ile inkübe edilerek olgunlaştırılmaktadırlar (Berg ve Brem 1989).

2.1.1.3. Olgun Yumurtaların Sperma ile IVF si

Döllenme, yani cinsiyet hücrelerinin (yumurta ve spermatozoon) bir araya gelmesi birçok faktörün sorunsuzca gerçekleşmesi sonucunda meydana gelmektedir. Bunlardan en önemlisi, bu hücrelerin birleşmeleri için gerekli olgunluğa sahip olmalarıdır. Yapılan araştırmalar sonucunda elde edilen bulguların büyük bir kısmı, sığır yumurtalarının IVF için olgunlaştırılma sürecinin 24 saat olduğunu göstermektedir. Fakat Semple ve arkadaşları (1993) yapmış oldukları çalışmanın sonucunda, yumurtaların olgunlaşma sürecinin 14. saatinde gelişme yeteneğini kazandıklarını ve erken dönemde döllenilen yumurtaların blastosist aşamasına ulaşma oranının daha yüksek olduğunu öne sürmüşlerdir (Semple ve ark 1993). Westerlaken ve arkadaşlarının (1992) gerçekleştirmiş olduğu bir çalışmada, yumurtaların 16 saat olgunlaştırma sonrasında 20 saat süre kadar spermatozoonlarla bir arada bırakılmaları sonucunda döllenme oranının yaklaşık olarak % 55,7 – 64,5 dolaylarında olduğu belirtilmiştir (Westerlaken ve ark. 1992).

Nakagava ve arkadaşları (1995) ise olgunlaşma sürecinin başlarında olan, germinal vezikül dönemindeki yumurtalarda gerçekleştirilen döllenme esnasında polispermin yaygın olarak görüldüğünü belirtmiştir. Olgunlaşma sürecinin artması ile yaşlanan yumurtaların döllenmeleri sonucunda asenkranöz pronükleus gelişimini yükselebileceği ve böylelikle

embriyoların ileri dönemlerinde abnormalitelere maruz kalacağı belirtilmiştir (Birler ve ark. 1998).

Yumurtanın olgunlaşma aşamasının tamamlanması, ayrıca spermanın da olgunlaşp kemotaksi olarak adlandırılan yumurtaya doğru hareket kabiliyetinin artması gerekmektedir. IVF çalışmalarında, çoğunlukla önceden dondurularak saklanmakta olunan spermalar kullanılmaktadır (Polge ve ark. 1949). Çözündürülen sperma çözündürüldüğü anda canlı olarak görülse dahi yumurtayı dölleyecek kabiliyette değildir. Bu nedenle spermaların bir dizi kimyasallara maruz bırakılarak gerekli dölleme kabiliyetinin kazandırılması gerekmektedir.

Spermaların dondurulmalarında kullanılan soğuktan koruyucu kimyasal maddelerin yarattığı olası zehir etkisi ve diğer koruyucu maddeler spermaya azda olsa zarar vermektedir (Polge ve ark. 1949). Dondurulan spermaların çözündürülmeleri esnasında spermalardaki canlılık kaybı ve düzgün hareket kabiliyetine (motilite) sahip olmayan sperma oranı %50 civarında olmaktadır (Polge ve ark. 1949). Çözündürülen spermanın bu koruyucu kimyasallardan olabildiğince uzaklaştırılmaları, çözündürülen spermanın hareket kabiliyetini doğrudan etkilemektedir.

Taze olarak elde edilen spermalar soğğun çeşitli zararlı etkilerinden koruyucu kimyasal maddelere maruz bırakıldıktan sonra 0.25 mm'lik payetlere transfer edilerek dondurulmaktadır. Payetler bu şekilde -196 °C'deki sıvı azotta uzun yıllar boyunca sorunsuzca saklanabilmektedirler (Parrish ve ark. 1995). IVF çalışmaları, bu dondurularak saklanmakta olan spermaların yüklü olduğu payetin 30 - 38 °C'deki su banyosuna daldırılarak çözündürülmesiyle gerçekleşmektedir. Çözündürülen payetlerin her iki ucu kesilerek payetin içeriği izole edilir ve çeşitli protokoller, kimyasal maddeler ve ayrıştırma yöntemleri kullanılarak canlı ve düzgün doğrusal harekete sahip canlı ve doğrusal harekete sahip spermalar elde edilir (Parrish ve ark. 1995).

2.1.2 Canlı Spermatazoom Elde Etme Yöntemleri

Canlı spermatazoonun eldesi ve aynı zamanda ölü spermatazoonların ve kimyasal maddelerin uzaklaştırılmasında genelde iki farklı ayrıştırma yöntemi kullanılmaktadır. Bunlarda birincisi Yukarıya Yüzdürme (Swim Up) yöntemi (Coscioni ve ark. 2001) ikincisi

ve daha sıklıkla kullan bir yöntem olan Percoll Yoğunluk Dereceli (Gradyent) ayırıştırma yöntemidir (Parrish ve ark. 1995).

2.1.2.1. Swim Up (Yukarıya Yüzdürme) Yötemi

Swim up yöntemi, diğer sperm ayırıştırma yöntemlerine göre bilinen en eski yöntemlerden biri olmakla beraber, normospermik olgularda standart olarak kabul edilmektedir. Orijinal adı “Sperm Rise” yani sperm yükselmesi olarak adlandırılan bu yöntem kendiliğinden aktif yönelme (migrasyon) esasına dayanmaktadır (Coscioni ve ark. 2001).

Swim up yönteminde esas amaç, hareketli spermatazoonların, hareketsiz olan spermatazoonlardan kendiliğinden ayrılmasını ve hareketli olan spermatozoonların yumurtayı dölleme kabiliyetlerinin kazandırılmalarının sağlanmasıdır. Bu yöntemde kullanılan solüsyon genellikle Tyroe'nin Albumin Laktat Pirüvat solüsyonu (TALP) olmaktadır. Ayrıca bu solüsyon hem sperm swim up prosedüründe hem de swip up sonrası tüpün dibinde kalan sperm peletini yıkama işleminde de kullanılmaktadır (Şekil 2.4).

Bu solüsyona ilave olarak 1.8, 2.6 ve 3.6 μM gibi farklı konsantrasyonlarda Kalsiyum ile 2.5, 5.0 ve 7.5 μM gibi farklı konsantrasyonlarda Kafein ilavesi gerçekleştirilir. Böylelikle spermatazoonlarda; daha yüksek oranlarda dölleme kabiliyetini sağlanmış olmaktadır. Yapılan araştırmalarda, TALP solüsyonuna 7.5 μM kadar kafein ilavesinin spermatozoonun dölleme kabiliyetini %53 oranında arttırdığı gösterilmiştir (Coscioni ve ark. 2001).



Şekil 2.4. Swim up (yukarıya yüzdürme) yöntemi

Çözündürülen payetin içeriği 15 ml'lik konik tüpün içerisine boşaltılır üzerine 1/1 (v/v) oranında TALP solüsyonu ilave edilerek tüp santrifuj edilir, santrifuj sonrasında tüpün üst kısmında bulunan süpernatant kısım otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırılır ve aynı işlem tekrarlanarak yıkama işlemi tamamlanır ve tüpün dip kısmında bulunan sperm peletinin üzerine yaklaşık olarak 2 ml kadar sperm-TALP (sp-TALP- Tirod'un Albumin Laktat Piruvat Solüsyonu) eklenerek tüp, 45 derecelik açı ile kapağı aralık bir şekilde 39 °C'deki ısıya sahip %5 CO₂ gazı içeren inkübatöre konup yaklaşık olarak 1 saat süre ile bekletilir.

Gerçekleştirilen kısa süreli inkübasyon sırasında, canlılığını sürdüren kaliteli spermatazoonlar tüpün üst kısmına doğru yüzerler. Tüp, inkübasyon süresi sonunda inkübatörden çıkarılarak canlı ve hareketli spermatazoonların bulunduğu tüpün üst kısmı, 1 ml'lik otomatik pipet yardımıyla yavaş ve dikkatli bir şekilde toplanır ve başka boş tüpe aktarılır. Tüpün dip kısmında ise geriye ölü spermatazoonlar ve dondurma esnasında kullanılan kimyasal maddeler bulunmaktadır. Tüpün izole edilen süpernatant kısmından alınan örnekler ile spermanın kalitesi ve motilite tayini gerçekleştirilir.

Bu yöntemde, motilite bakımından çok iyi ve kaliteli olan spermatazoonlar elde edilirken diğer sperma ayrıştırma yöntemlerine kıyasla elde edilen spermatazoon miktarı çok daha az miktarda olmaktadır (Coscioni ve ark. 2001). Ayrıca işlem yönteminin uzun olması ve yoğun ejakülatlarda iyi sonuç alınmaması bu yöntemin pratik bakımdan kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır.

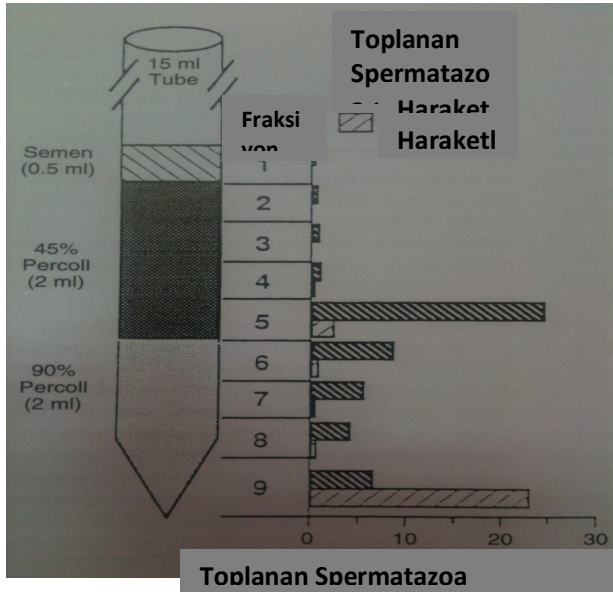
2.1.2.2. Percoll Yoğunluk Dereceli Ayrıştırma Yöntemi

Percoll yoğunluk dereceli ayrıştırma yöntemi, ilk olarak insanlarda 1980'li yıllardan itibaren uygulanmaya başlanmıştır (Parrish ve ark. 1995). Percoll solüsyonu Polivinilprillodine (PVP) ile kaplı kolloid yapıda yaklaşık olarak 15 - 30 nm büyüklüğünde silika partiküller içermektedir. Percoll hücreler bakımından toksik olmayan bir yapıya sahiptir. Seperasyon gerçekleştirildikten sonra ikinci yıkımayı takiben radyoaktif olarak nitelendirilen Percoll tamamen ayrıştırılmaktadır. Elektron mikroskobu ile yapılan gözlemler sonucunda bile hücre çeperlerinde hiçbir şekilde radyoaktif bir maddeye rastlanılmamaktadır (Anonymous Percoll 1985). Bu bakımdan Percoll, canlı spermatazoonların ayrıştırılmasında kullanılan oldukça güvenilir bir solüsyon olarak nitelendirilmektedir.

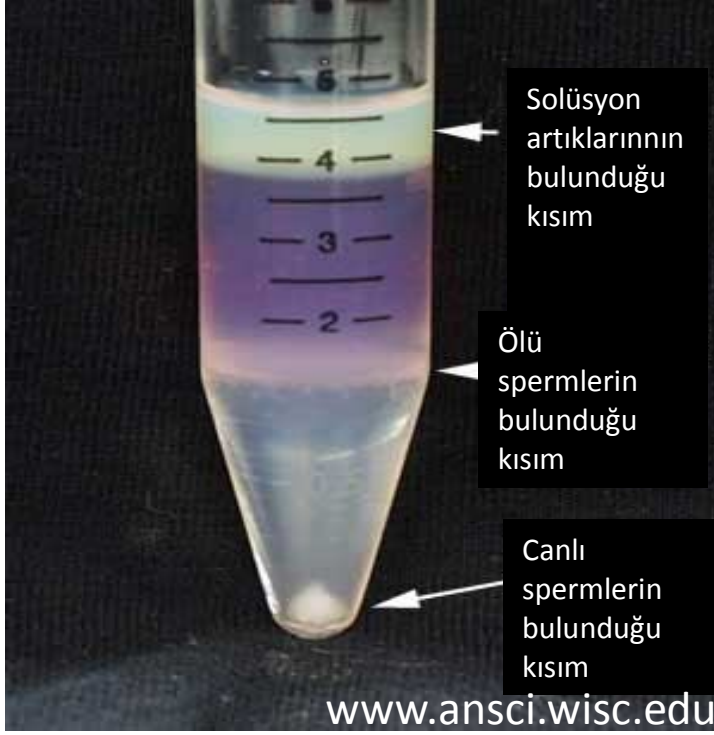
Percoll ayrıştırma yönteminin başlıca iki avantajı bulunmaktadır. Birincisi hareket kabiliyeti yüksek oranda spermin ayrıştırma olanağının olması, ikincisi ise motil spermaların

seminal plazma, somatik hücre artıkları, ölü ve morfolojik olarak kötü kalitede olan spermelerden çok daha hızlı bir şekilde ayrılmasının sağlanmasıdır (Parrish ve ark 1995).

Percoll ayrıştırma solüsyonu %45 ve %90 olmak üzere iki farklı yoğunlukta hazırlanmaktadır. Öncelikle %100'lük percoll solüsyonu, çeşitli tuz çözeltileri ile birlikte hazırlanmış 10 X stok solüsyonu ile 1:10 oranında karıştırılarak %90 yoğunluğunda percoll solüsyonu elde edilir. Bu ayrıştırma solüsyonu, sperm yıkama veya hepes içerikli dış ortam solüsyonu ile 1:1 oranında karıştırılarak %45 yoğunluğunda percoll solüsyonu elde edilir. Bu aşamadaki genel protokol tüm çalışmalarda aynı olmaktadır. 15 ml'lik konik tüp içerisine 1:1 oranında %90 ve %45 olmak üzere iki farklı yoğunluklardaki solüsyon önce %90 ve sonra %45 olmak üzere sırasıyla eklenir ve üzerine çözündürülen sperm peleti ilave edilir. Genel olarak 15 dakika süre ile 700 x g de santrifüj işlemi gerçekleştirilir. Sentrifuj sonunda tüpün dip kısmında (Sıra-9) 0.5 ml'lik çökeltide canlı ve kaliteli spermeler bulunmaktadır, Şekil 2.2'de görüldüğü üzere tüpün orta kısmında yani %45 ile %90 yoğunlukta percoll solüsyonunun kesiştiği bölgede (Sıra-5) ölü spermaların ve artık maddelerin bulunduğu kısım olmaktadır (Şekil 2.5 – Şekil 2.6) (Cevik ve ark. 2009).



Şekil 2.5. Percoll dereceli ayrıştırma yöntemi



Şekil 2.6. Percoll dereceli sperm ayırıştırma sonrası

2.1.3. Spermatozoonun Dölleme Kabiliyeti ve Yumurta ile IVF si (IVF)

Başarılı bir IVF nin en iyi ölçütü, spermatozoonun iyi bir şekilde yumurtayı dölleme kabiliyetine ulaşması olmaktadır. Sığırlar üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, spermatozoonlar hiperozmotik bir solüsyonla muamele edilmiştir ayrıca bu solüsyona ek olarak da glikozaminoglikanlar ile muamele ederek yumurta ile döllendirildiği ve bunun sonucunda dölleme oranının belirli bir ölçüde arttığı bildirilmiştir (Shamsuddin ve ark. 1996). Guerin ve Menezo (1995), dölleme solüsyonuna taurine ve hipotaurinin ilavesi ile spermatozoa canlılığını ve dölleme kabiliyetini olumlu ölçüde etkilediğini ve kimyasalların antioksidan olarak peroksidatif zarlara karşı koruyucu etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan diğer çalışmalarda ise başka araştırmacılar, hipotaurin, heparin ve epinefrini birlikte kullanmışlar ve bunun sonucunda spermatozoa hareketliliğinin ve dölleme kabiliyetinin önemli ölçüde uyardığını görmüşlerdir (Rosenkranz ve Holzman 1995). Hipotaurinin spermatozoa hareketliliği üzerinde etkili olduğu fakat bu kimyasalın epinefrin ve penisilamin ile beraber kullanılması gerektiği Boatman ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ortaya çıkarılmıştır (Boatman ve ark. 1990).

Boğa spermatozoasının dölleme kabiliyetini ve aynı zamanda yumurta ile yapay olarak döllemesi amacıyla bazı mineral tuzlar içerikli solüsyonlar kullanılmaya başlanmıştır. Bunların başında, BSA destekli olan Tyrode's Lactate (TALP-Tyrod'un Albumin Laktat Solüsyonu), Modify Defined Medium- Modifiye edilmiş solüsyonu (mDM), Brackett-Oliphant solüsyonu (BO), Biggers-Whitten-Whittingham solüsyonu (BWW), Krebs Ringer bikarbonat solüsyonu (KRB) olmaktadır. Ayrıca bu solüsyonlarda spermatozoonun dölleme kabiliyetinin uyarılması amacıyla belirli oranlarda heparin, hipotaurin, oviduktal sıvı, folikül sıvısı, kafein ve kalsiyum iyonları ilave edilmektedir (Bavister ve ark. 1992).

IVF de yumurtalara maruz bırakılacak spermanın miktarı döllemenin başarısını doğrudan etkileyen en önemli etkenlerden biri olmaktadır. Sığırların oviduktalarında benzer koşullarda sperm yumurta oranı 1:1 olmalıdır (Hunter 1996). Sığırlarda IVF çalışmalarında birçok laboratuvar sperma oranını rutin olarak 1×10^6 spermatozoa/ml şeklinde uygulamaktadır. Ayrıca sperm-yumurta oranı 5000:1 dolaylarında olmaktadır (Rizos ve ark. 2002). Yapılan başka bir çalışmada ise sperm-yumurta inkübasyon oranının 5000:1 ile 50000:1 civarında olmasının dölleme oranını arttırdığı belirtilmiştir (Tanghe ve ark. 2000).

Petri kabında IVF'nin gerçekleştirildiği inkübasyon damlalarının boyutları yumurta sayısının orantılı artışı ile 50 µl ile 500 µl arasında değişmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda IVF de sperm-yumurta oranının 5000:1 standardının üzerinde olmasının ve ayrıca dölleme solüsyon miktarının dölleme ve polispermi oluşumu açısından herhangi bir etkisi bulunmadığı ortaya konmuştur (Rizos ve ark. 2002).

2.1.4. IVF Sonrası Dölleme Ölçütlerinin Belirlenmesi

IVF sonrasında yumurtalar solüsyon, sperm ve kumulus hücre artıklarından izole edilmek amacıyla temizlenirler ve hızlı bir şekilde stereo mikroskop altında 40 X büyütme gözlemlerle yumurtaların spermalar ile döllemedikleri gözlemlenir. Amaç çalışmanın gidişatı hakkında genel gözlem yapmaktır. IVF sonrasında tüm canlı olduğu öngörülen hücreler *in vitro* kültüre alınırlar.

Dölleme ölçütlerin belirlenmesinde uygulanan gözlem protokolü Shioya tarafından belirtilen yöntem dahilinde gerçekleştirilmektedir (Shioya 1993).

Bu yönteme göre;

a- Hücrenin canlılığından emin olunması, yumurta - plazmasının (ooplazma) homojen parlak yapıda olması, belirli bir perivitellin boşluğunun bulunması, düzgün zona pellisudanin olması.

b- Yumurta – plazmasının içerisinde spermatozoon kuyruğunun saptanması.

c-Spermatazoonun baş bölgesinin yumurta–plazması içerisinde olduğunun görülmesi.

d- Perivitellin boşluğunun içerisinde 1. ve 2. Polar cisimciklerinin olması.

e- İkinci mayoz bölünmenin telofaz aşamasının tespit edilmesi.

2.1.5. IVF Sonrası Yumurtaların *in vitro* Kültürleri

IVF aşamasından sonra döllendiği öngörülen hücrelerin *in vitro* kültürler iki farklı şekilde gerçekleştirilmektedir.

Bu *in vitro* kültür yöntemlerinden ilki çok sık kullanılmayan fakat kullanıldığı zaman etkili bir yöntem olan Ko-Kültür yöntemidir. Bu yöntemde embriyolar, fibroblast, ovidukt epiteli ve granuloza gibi farklı yapılarıdaki hücreler ile birlikte kültürü edilir (Kelly ve ark. 2007, Xihe ve ark. 2001).

İkinci ve çok sıklıkla daha kolay bir şekilde uygulanan *in vitro* kültür yöntemi ise içeriği bilinen kültür solüsyonları ile gerçekleştirilen kültür yöntemidir. Bu yöntemde birinci yöntemde uygulandığı gibi herhangi bir hücre kültürüne gerek duyulmamaktadır. Kültür solüsyonları çeşitli konsantrasyonlar içeren mineral tuzlar, enerji, antibiyotik ve hormon katkıları ile hazırlanmakla birlikte ticari olarak temin edilen solüsyonlarda kullanılmaktadır.

Kullanılan *in vitro* kültür solüsyonları arasında bu tez çalışmasında da kullanılan QACM-QABM sıralı kültür solüsyonları ile birçok çalışma yapılmıştır (Cooke ve ark. 2002, Arat ve ark. 2011). Ayrıca sığırlarda somatik hücre transfer sonrası mSOF, G1 (Gardner 1) ve G2 (Gardner 2) *in vitro* kültür solüsyonları kullanılarak yapılan embriyo kültür çalışmalarında ise başarılı sonuçlar elde edilmiştir. mSOF kültür solüsyonu kullanılarak elde edilen blastosistlerin alıcılara transferi sonrasında % 6,7 oranında doğum gözlenmişken G1-G2 sıralı kültür solüsyonunda ise % 27.9 oranında doğum gözlenmiştir (Wang ve ark. 2011). Kültür solüsyonlarında kullanılan serumun erken safhadaki embriyoların 4 gün süre ile bölünmesi

üzerinde bibazik etki yapmakla birlikte embriyoların morula ve blastosist safhasına gelişimlerine arttırıcı bir etkisi olduğu kanıtlanmıştır (Lonergan ve ark. 1999, Thompson ve ark. 2007). Sığır yumurtaların olgunlaştırılmasında ve kültürlerinde kullanılan solüsoylarına insülin gelişim ve epidermal gelişim faktörlerinin ilavesinin, sığır embriyolarının *in vitro* gelişimine olumlu etkisi olduğu kanıtlanmıştır ayrıca bu faktörlerin kullanılmasıyla elde edilen embriyoların alıcılara transferi sonrasında gebelik ve doğum oranlarını ciddi bir şekilde arttırıldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Ravelich ve ark. 2004, J Block, 2007).

Yapılan çalışmalar sonucunda, Betamerkaptoethanolün sığır yumurta olgunlaştırma ve embriyo kültür solüsyonlarına ilavesinin embriyo gelişimi sırasında oluşan oksidatif stresini engellediği üstelik embriyoların blastosist gelişimine destek verdiği ortaya konmuştur. Bununla beraber, betamerkaptoethanol implantasyon öncesi embriyoların dondurulmasında da soğğun zararlı etkilerinden koruyucu etki göstermektedir. (Takahashi ve ark 1996, Caamano ve ark. 1998).

IVF'yi takiben sperm ile inkübasyona giren yumurtalar toplanarak artık spermelerden ve kumulus hücre kalıntılarından uzaklaştırılarak embriyonel gelişim için kültür solüsyonuna transferi ile *in vitro* kültür gerçekleştirilir. Sığır embriyolarının üretiminde yumurtaların *in vitro* kültürleri 35-39 °C arasında sorunsuz bir biçimde gerçekleşmesine rağmen IVF sonrası *in vitro* kültürün 38,5-39 °C arasında olması gerekmektedir (Goto ve ark. 1989). *In vitro* kültür ortamını 40 °C ve üzeri ısılarda olması IVF de önemli derecede zararlar ortaya çıkardığı bilinmektedir (Greve ve Madison 1991). Kültürün gerçekleştirileceği inkübatörde CO₂ oranının %5 dolaylarında olması düşük veya yüksek CO₂ oranlarına göre çok daha yüksek oranda embriyonel bölünme ve blastosist aşamasındaki embriyo eldesinin gerçekleştirildiği yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Shioya 1993).

Yumurta ve spermin bir arada tutulması (inkübasyon) yani IVF süresi birçok laboratuarda 18-20 saat arası olarak gerçekleştirilmiştir. Bu süre *in vivo* ortamda polisperminin oluşma riskini ortaya koyma açısından çok uzun olmaktadır. Fakat petri kaplarında yani *in vitro* ortamda bu süre aralığı uygun olarak belirtilmektedir. Rehman ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada dondurulup çözündürülmüş sperm ile yumurta ko-inkübasyonunun 24 saat süre olması döllenme oranının %76 gibi yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Sperm yumurta ko-inkübasyonun süresinin 4 - 12 saat gibi zaman periyoduna düşürülmesi ile elde edilen döllenme oranı %25 ile %54 gibi düşük bir oranda

olduğu yapılan bu çalışmada ortaya konmuştur. Bunun yanı IVF suresinin dollenme sonrasında embriyonun gelişimi üzerinde herhangi bir etkiye sahip olmadığı da belirtilmiştir (Rehman ve ark. 1994).

2.2. Dondurma (Kriyoprezervasyon)

İmplantasyon ncesi embriyoların dondurulması, embriyo dondurma teknolojinin ileriki gelişimleri bakımından oldukça büyük önem taşımaktadır (Akkoc ve ark. 2011).

Kriyoprezervasyon alışmaları, spermanın gliserol kullanılarak dondurulmasıyla başlanmıştır (Polge ve ark. 1949). Bu çalışmayı takiben yaklaşık bir yıl sonra sığır embriyoları dondurulup zndrlmş ve embriyoların alıcılara transferi sonrasında gebelik elde edilmiştir. Bu süreç sonrasında birçok araştırma yapılmış ve bu araştırmalar sonucunda günümüzde birçok yabani ve evcil hayvan türlerinin ve özellikle ürünlerinden yararlandığımız çiftlik hayvanlarının gerek embriyo, sperma, yumurta; gerekse dokuları başarılı bir şekilde dondurularak saklanmış ve zndrldkten sonra sorunsuz bir şekilde çalışmalarda kullanılmıştır.

Uygulanmakta olan dondurma yöntemlerinin tümünde temel prensip, dondurma esnasında hücre içerisinde oluşabilecek buz kristallerinin oluşumunun engellenmesidir. Ayrıca sıfırın altı sıcaklığın zararlı etkilerinden koruyucu maddelerin hücre içerisine giriş ıkışları ve oluşan ani ısı değişiklikleri, bu maddelerin zehir etkileri, hücreler arasında donmadan kaynaklanan hasarlar, ozmotik denge bozuklukları ve hücrelerin yoğun elektrik geçirgenliği gibi unsurlar dondurmanın başarısı etkileyen etkenler olmaktadır (Akkoc ve ark. 2011, Sağırkaya ve Bağış 2003, Bağış ve ark. 2002, Kasai 1996). Hücrelerin dondurulup zndrlmesinde hücrelerin canlılıklarını doğrudan etkileyen diğer etkenlerde bulunmaktadır. Bunlar, türler arasındaki farklılık, türlerin bakım beslenme ve yetiştirme unsurları, hücrelerin geçirgenlik özellikleri, embriyoların özellikle blastosist safhasındaki embriyoların büyüklükleri ve embriyoların buldukları gelişimsel safhalarıdır (Akkoc ve ark. 2011, Sağırkaya ve Bağış 2003).

2.2.1. Embriyoların Dondurulmasının Avantajları

Dondurulan tüm biyolojik materyaller, -196 °C’de bulunan sıvı azot içerisinde uzun süre canlılıklarını koruyarak saklanabilmektedirler.

Embriyo, hücre, doku ve gametlerin dondurulmasının birçok avantajı bulunmaktadır. Fakat embriyoların dondurularak saklanması diğer biyolojik materyallere göre daha üstün avantajı olmaktadır. Hem anadan hem de babadan gelen genomik materyali içeren gamet ve embriyolar ayrı ayrı dondurularak saklanmaktadır. Genetik çeşitliliğin ve tabii ki de gen kaynaklarının etkin bir şekilde saklanması, oluşturulacak gen bankaları ile biyo-çeşitliliğin korunması, dondurma teknolojilerinin uygulanmasını gerektiren diğer önemli bir alanlardır. Mevcut bölgelerden başka bölgelere canlıların transfer edilmesi yerine elde edilecek gamet ya da embriyoların dondurularak saklanması, olası doğal afetlerden dolayı deney hayvanı vb canlıların hatlarının bu risklere maruz kalmalarını önlemek amacıyla oluşturulacak gen bankası ile bu hatların güvence altına alınması ve soyu tükenmekte olan ırkların korunması amacıyla dondurma teknolojilerinin uygulanması avantajlı olmaktadır (Whittingham 1974, Dinnyes ve ark. 2003).

Üretim çiftliklerinde ve deney hayvanları laboratuvarında üretimi gerçekleştirilen hayvanlarda zaman içerisinde genetik mutasyonların meydana gelme riski bulunmaktadır. Bu mutasyon ve gen erozyonların önüne geçilmesi amacıyla bu dondurma teknolojilerin uygulanması tercih edilir. Transgenik çalışmalarda, mikroenjeksiyon ya da daha farklı yöntemler uygulanarak gen transferi gerçekleştirilen pronükleer safhadaki embriyoların deney günü uygun alıcı dişi bulunmadığı zaman dondurularak saklanması ve uygun alıcı bulunduğu zaman bu embriyoların çözündürülerek transfer edilmesi dondurma teknolojilerinin sağladığı bir avantajdır. Aynı şekilde cinsiyeti belirli embriyolarında bu şekilde dondurularak saklanıp uygun zamanda çözündürülerek alıcılara transferleri gerçekleştirilebilir. (Sağırkaya 2001, Sağırkaya ve Bağış 2003, Bağış ve ark. 2005, Akkoc ve ark. 2011).

Embriyo transferi uygulamaları kapsamında IVF çalışmalarında aynı anda boğadan taze sperma ile *in vitro* yöntemlerle olgun oosit eldesinin gerçekleşmesinin zor olmasından dolayı, daha önceden dondurularak saklanmakta olan boğa spermalarının kullanılması dondurma teknolojilerinin sağladığı avantajın diğer bir kanıtı olmaktadır.

Sağlık alanında döllenme problemi (infertilite) olan hastalardan yavru elde etmek amacıyla IVF uygulanan hastalardan elde edilen embriyoların sayısı beklenenden fazla olduğu

takdirde bu embriyolar dondurularak saklanmakta ve böylece transfer sonrası gebelik elde edilmediği durumlarda bu dondurularak saklanmakta olan embriyolar çözündürülerek sonraki embriyo transferlerde kullanılabilinmektedir (Check, 1996).

Dondurma teknolojilerinin biyoteknolojili alanında getirdiği bu avantajlar araştırma ve geliştirme (Ar-Ge) çalışmaları kapsamında yeni teknolojilerin üretilmesi amacıyla yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

2.2.2. Dondurmada Kullanılan Donmaya Karşı Koruyucu Maddeler

Embriyo, gamet, doku ve hücrelerin dondurulmasında kullanılan donmaya karşı koruyucu kimyasal maddeler, bu biyolojik materyallerin dondurulması ve çözündürülmesi sırasında oluşan ani ısı değişiklikleri sonucunda hücrelerde oluşması olası zararların önlenmesi amacıyla kullanılmaktadırlar (Palasz ve Mapletoft, 1996).

Uygulanan tüm dondurma yöntemlerindeki temel amaç, dondurma ve çözündürme uygulamaları sırasında hücrelerde meydana gelebilecek hücre içi ve dışı buz kristallerinin oluşumunun ve şok etkinin engellenmesidir. Bu nedenle hücre içerisindeki sıvının dondan koruyucu maddeler ile yer değiştirmesi, hücre içi kristali oluşumunun engellenmesi açısından başlıca unsurdur (Bagis ve ark. 2004, 2010).

Donmanın zararlı etkilerinden koruyan maddeler çeşitli özelliklere bağlı olarak hücre zarına nüfuz edebilen yani içerisine girebilen ve giremeyen maddeler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar.

Hücre zarına nüfuz edebilen dondan koruyucu maddeler düşük molekül ağırlığına ve yüksek oranda suda çözünme yeteneğine sahiptirler. Bu maddeler; etilen glikol (EG), methanol, 2.3 bütanediol, 1.2 propanediol, dimetilsulfoksit (DMSO), gliserol, propilen glikol ve bazı diğer alkoller olmaktadır. Bu grup içerisinde genellikle daha yoğun olarak kullanılan donmaya karşı koruyucu maddeler DMSO, etilen glikol ve gliserol olmaktadır. Bu maddelerden en az biri dondurma solüsyonu içerisinde mutlaka bulunmalıdır. Hücre içerisine girebilen dondan koruyucu maddelerin en büyük özelliği hücrelerde ozmotik basınç farklılığı yaratarak hücre içerisine giriş yapıp hücre içi sıvısı ile yer değiştirmesidir. Bunu sonucunda hücre hacmindeki değişiklikler azalır, hücre içindeki buz kristali oluşumu indirgenir ve hücrenin dondan gördüğü hasar minimum düzeye indirgenmiş olur (Pereira ve Marques 2008).

Hücre içine nüfuz edemeyen dondan koruyucu maddeler, kendi aralarında düşük ve yüksek molekül ağırlıklı maddeler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı olarak; trehaloz, glikoz, sükroz, galaktoz ve bazı diğer şekerler, yüksek molekül ağırlığa sahip olanlar ise, sodyum hyaluronat, hidroksietil nişasta, polivinil pirrolidon; PVP, polivinil alkol; PVA, antifiriz protein AFP, albumin, fikol ve bazı diğer polimerlerdir (Agca 1994, Akkoc 2006, Bagis ve ark. 2006, Sağırkaya 2001). Çeşitli serumlar da dondan koruyucu maddeler olarak kullanılabilir, fakat serumlardan kaynaklanan olası kontaminasyonlar nedeni ile serum yerine PVA veya PVP kullanılmaktadır (Shaw ve ark. 1997).

Dondurma sırasında bu dondan koruyucu maddelerin ancak belli oranlarda kullanılması ve fazla oranda kullanıldığı zaman bu maddelerin yaratacağı zehir etkisinin hücreye ölümcül zararlar verebileceği bilinmektedir. Gametlerdeki soğutma zararları, soğuk şoku stresi, hiperozmotik stres, ozmotik büzüşme gibi olumsuz dış etkenler dahilinde meydana gelmektedir (Gao ve ark. 1993). Bu zararların önlerine geçilmesi amacıyla, dondan koruyucu maddelerin hücreye kademeli olarak kısa süreler dahilinde maruz bırakılması hücre içi ve dışı ozmotik dengenin sağlanması ile hücrenin minimum düzeyde zarar görmesine neden olmaktadır.

Hücre içerisine giren düşük molekül ağırlıklı dondan koruyucu maddeler, dondurma çalışmalarında tek başlarına kullanılabilirken, hücre içerisine nüfuz edemeyen dondan koruyucu maddelerin ise en az bir tane hücre içerisine nüfuz edebilen dondan koruyucu madde ile birlikte kullanılması gerekmektedir (Agca 1994).

2.2.3. Embriyolarda Uygulanan Dondurma Yöntemleri

Embriyoların dondurulmasında birçok dondurma yöntemi uygulanmaktadır. Farklı yöntemlerin kullanılmasındaki amaç, embriyoların ait olduğu farklı türler ve ırklar, embriyoların buldukları safha (zigot, 2, 4, 8 ve 16 hücreli safha ya da morula veya blastosist safhaları), embriyoların elde edilme yöntemleri ve son olarak safha çalışmalarında kullanılacak uygulama yöntemleri olmaktadır.

Embriyoların dondurulmasında kullanılan yöntemler başıca 3 gruba ayrılmaktadır.

Bunlar;

a- Geleneksel yavaş dondurma,

b- Hızlı dondurma,

c- Camsı yapı yöntem (Vitrifikasyon) ile dondurma,

2.2.3.1. Geleneksel Yavaş Dondurma (Slow Freezing)

Yavaş dondurma sisteminde, diğer dondurma sistemlerine göre daha pahalı ve komplike cihazların kullanılmaktadır. Bu durum olumsuz olarak algılansa bile daha sistematik, hata ve yanılma paylarının daha düşük olması da ayrı bir avantaj olarak nitelendirilmektedir.

Yavaş dondurmada kullanılan dondan koruyucu maddelerin oranı yaklaşık olarak 1-2 molar civarında olmaktadır.

Hücrelerin yavaş dondurma yöntemi ile dondurulmaları belirli aşamalar kapsamaktadır.

Bu aşamalar:

1- Hücrelerin, DMSO, etilen glikol, gliserol ya da propilen glikol gibi hücre zarından nüfuz edebilen düşük molekül ağırlıklı dondan koruyucu maddelerden biri ile farklı konsantrasyonlarda olmak üzere genellikle oda ısısında ya da seyrek olarak düşük sıcaklıkta maruz bırakılmaları gerekmektedir. Bunun amacı hücredeki ozmotik dengelemenin (ekilibrasyon) sağlıklı bir şekilde sağlanmasıdır.

2- Seeding uygulaması yapılarak buz kristallerinin şekillenmesini sağlamak. Seeding, donma sıcaklığına ulaşmamış sıvılarda dış etkenler vasıtasıyla -5 °C ile -7 °C arasındaki sıcaklığa indirgenilmesi ile kristalizasyondaki latent ısı dalgasının ortaya çıkaracağı zararı en az düzeye indirmesini sağlamaktadır (Songsasen ve Leibo, 1997). Fizikokimyasal özellikleri bakımından su normal şartlarda 0°C'de donma noktasına ulaşır; ancak suyun kristaller halinde donması için su içerisinde safsızlık yaratan buzlanma merkezleri bulunması gerekir. Uygun

şartlarda seri halinde soğutma yapıldığında suyun bu kristalleri haline geçmesi için bu buzlanma merkezlerine ya da sarsıntı, sıkıştırma, dokunma gibi moleküler homojeniteyi bozacak fiziksel etmenlere ihtiyaç vardır. Yavaş dondurma işleminde bilindiği üzere su içeriği ile kriyoprotektan madde yer değiştirmektedir. Canlı materyal ve kriyoprotektan solüsyonu yavaş dondurma işleminde süper soğutmaya tabi tutulur. Süper soğutulmuş sıvılar katılaşma veya kristalleşme olmaksızın donma noktası altında bir noktaya kadar indirilmiştir. Dondurma işlemlerinde gerek genetik materyalin, gerekse de canlı bütünlüğünün korunabilmesi için kristalleşme şeklinde donma istenmeyen bir durumdur. Bu durumun önüne geçebilmek için sıvı haldeki canlı süspansiyonu (hücre/embriyo/sperma + donmaya karşı koruyucu madde) dakikada birkaç dereceyi geçmeyecek seeding sıcaklığına kadar soğutulur, ancak donma ya da diğer bir deyişle faz geçişi gerçekleşmez. Payet içindeki hücre zarı bir osmotik zar gibi davranarak içindeki görece olarak çok olan suyu dışarı atar. Bu aşamadan sonra keskin yapıli kristalleşme olmadan sıvının ve içindeki canlı materyalin donması için “seeding” denilen fiziksel etkiye ihtiyaç duyulur. Seeding sonucunda süper soğutulmuş süspansiyon düzgün ve lineer bir donma gerçekleştirir. Bu sayede canlı materyal zarar görmeksizin dondurulmuş olur. Seeding, yavaş dondurmadaki çözme/canlı kalma başarısında önemli bir parametredir, düzgün uygulanmaması durumunda canlı materyal zarar görece ve çözme sonrası canlılığını ya da çoğalma yeteneğini kaybedecektir.

3- Yavaş dondurma makinesini soğutma hızını ve oranını 0,2 - 2,0 °C / dk olacak şekilde ayarlayıp kontrollü bir şekilde -30 ile -70 °C’ler arasındaki sıcaklıklara kadar yavaş ve kademeli soğutmanın gerçekleştirilmesi.

4- Protokoller dahilinde istenilen sıcaklığa ulaşıldıktan sonra hücrelerin yüklü oldukları payetlerin direkt olarak sıvı azota (-196 °C) daldırılması ve çalışmalar dahilinde saklanması.

5- Çözündürme işleminde ise payetin sıvı azottan çıkarılarak 25 °C’deki su banyosuna daldırıp bekletilerek yani ısınma hızı 250 °C / dk olacak şekilde kontrollü olarak gerçekleştirilmesi.

6- Hücrelerin payetten izole edilip dondan koruyucu kimyasal maddelerden uzaklaştırılması olarak kısaca özetlenebilir.

Kademeli dondurma yöntemlerinde dondurma sırasında soğutma oranının 2 °C'den az olması ile hücrelerde sürekli dehidrasyon gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Yani hücrelerdeki ozmotik dengeleme durumu soğutma işlemi sırasında gerçekleşmektedir (Sağırkaya 2001).

2.2.3.2. Hızlı Dondurma (Rapid Freezing)

Hızlı dondurma yönteminde Hücrelerin dondurma hızı oldukça yüksek olup yaklaşık olarak 1200 ile 1250 °C / dk civarında olmaktadır. Bu yöntemde kullanılan dondan koruyucu kimyasal maddelerin oranı yaklaşık olarak 2 - 4.5 molar civarında olmaktadır. Hücre zarından nüfuz edebilen DMSO, gliserol, propanodiol ve etilen glikol gibi dondan koruyucu maddelerin en az birisinin 2 ile 4,5 M kadar, hücre zarından nüfuz edemeyen trehaloz, sükroz, galaktoz ve laktoz gibi dondan koruyucu maddelerden birisinin 0,25 ile 0,5 M kadar karışım oluşturularak kullanılması hızlı dondurma uygulamalarında başarılı sonuçlar vermektedir.

Hızlı dondurma yönteminde hücrelerin dondurma solüsyonuna transferinden önce dondurma solüsyonuna göre daha az oranda dondan koruyucu madde içeren ozmotik dengeleme solüsyonlarına kısa süreliğine maruz bırakılması gerekmektedir. Bu sistem hücrelerin yüksek molaritedeki dondan koruyucu maddelerden zehir etkisini ve ozmotik farklılığın meydana getirdiği şok etkisinin en az düzeye indirgenmesine neden olmaktadır. Kısa ozmotik dengeleme solüsyonuna maruz bırakılan hücreler kısmen dehidrasyona uğrarlar ve bu aşamadan sonra hücreler sıvı azot buharında çok kısa bir süre azot buharında tutulup direk olarak sıvı azota daldırılarak dondurulurlar.

Bu hızlı dondurma yönteminde, camsı yapı dondurma yöntemine göre farklı olarak hücre dışı sıvı donar ve dondurma solüsyonunun ozmolaritesinde kısmi artış meydana gelir. Hızlı dondurma yönteminde embriyolar çözme sırasında uygun molariteye sahip çözündürme solüsyonları kullanılmadığı takdirde hücrelerde ani ölüm ve enine dağılarak parçalanma durumu meydana gelebilmektedir (Palasz ve ark. 1996).

2.2.3.3. Camsı Yapı Yöntemi (Vitrifikasyon) ile Dondurma

Dondurma ve çözündürme sırasında hücre içerisinde buz kristallerinin oluşumu ve soğğun zararlı etkilerinden koruyucu kimyasalların zehirli etkileri, hücrelerde ciddi şekilde zararlar görmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, bahsedilen bu olumsuz etkilerin verebileceği zararları önlemek amacıyla, geleneksel dondurma tekniklerinin yerini alabilecek daha gelişmiş ve yeni tekniklerin ortaya konması söz konusu olmuştur.

Camsı yapı yöntemi ile dondurma, diğer adıyla vitrifikasyon tekniği, diğer dondurma tekniklerine göre daha az maliyetli, pratik olması ve komplike alet ve ekipmanlara gerek duyulmaması nedeniyle daha avantajlı olmaktadır. Fakat bu teknikte el manupilasyon güçlüğünün fazla olması ve hücre kaybetme riskinin yüksek olması nedeniyle, diğer tekniklere göre dezavantajı da bulunmaktadır (Akkoc 2006).

Camsı yapı dondurma, dokuların, hücrelerin, organların ve embriyoların çok düşük sıcaklıklarda, hücre içerisinde tamamen saydam ya da camsı bir hal yaratılarak dondurma yöntemi olarak tanımlanmaktadır. Bu yöntemde dondan koruyucu madde ozmotik basınç farkı yaratılarak hücre içerisine alınır, hücre içi sıvı hücre dışarısına çıkar. Böylelikle dondurma sırasında hücre içerisinde viskozitenin çok yoğun olması ile buz kristalleri şekillenmez. (Akkoc 2006, Akkoc ve ark., 2011, 2012, Aksu ve ark. 2012, Bağış ve ark. 2004, Bağış ve ark. 2005, Bagis ve ark. 2010, Dinnyes ve ark. 2003, Sağırkaya 2001, Sağırkaya ve Bağış 2003)

Camsı yapı ile dondurma tekniğinin uygulanmasındaki genel amaç, dondurma sırasında hücre içerisinde buz kristallerinin oluşumunun önlenmesi ve çözündürme sonrasında yeniden şekillenmesi olası kristallenmenin (devitrifikasyon) önlenmesi olmaktadır. Hücrelerin bu teknikle dondurulması sırasında hücre içerisine nüfuz eden dondan koruyucu kimyasalların, çözündürme işlemi esnasında dışarıya alınması ile birlikte hücre içerisinde buz kristallerinin yeniden ve çok daha hızlı bir şekilde şekillenmesi bu dondurma yöntemi açısından önemli bir risk oluşturmaktadır (Palasz ve ark. 1993).

Camsı yapı dondurma yönteminde kullanılan soğutma oranları dondan koruyucu maddelerin yaklaşık 5 - 7 molar gibi yüksek konsantrasyonlarda olması gerekmektedir. Bu oran, geleneksel yavaş dondurma tekniğinde kullanılan konsantrasyonların yaklaşık 2 - 3 katı kadar olmaktadır (Massip ve ark. 1999).

Uygun dondurmanın gerçekleşmesi açısından uygulanacak dondan koruyucu madde oranı yaklaşık %30'dan fazla olması gerekmektedir. Bu oran çok yüksek olduğundan kullanılacak dondan koruyucu maddelerin hücrelerde yaratacağı zehir etkileri çalışmanın başarısı açısından önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle yüksek konsantrasyonlarda kullanılan dondan koruyucu kimyasalların yaratacağı olumsuz etkileri en az düzeye indirmek amacıyla çeşitli önlemler alınmaktadır. Bu önlemlerin başında, ozmotik dengeleme (ekilibrasyon) zamanının kısaltılması, iki aşamalı ekilibrasyon, kimyasalların zehir etkilerini azaltan sükroz, trehaloz ve formamid gibi bazı kimyasal maddelerin kullanılması olmaktadır (Bagis ve ark. 2004, Palasz ve ark. 1993, Sagıraya 2001). Ayrıca özündürme sırasında uygulanan çözündürme hızı da tekrar kristallenme oluşumunun önüne geçilmesi bakımından önemli olmaktadır.

3 MATERYAL VE YÖNTEM

Materyal:

Çalışmanın temel materyalini mezbahadan temin edilen sığır ovaryumların aspirasyonu ile elde edilen yumurta hücreleri ve İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nden temin edilen dondurulmuş boğa sperması oluşturmaktadır.

1. Deney Grubu: Yumurtaların farklı olgunlaştırma sürelerinin blastosist gelişimi üzerine etkisi. Bu çalışmada 324 adet ovaryumdan 810 adet olgun olmayan yumurta elde edilmiştir. Toplam 10 adet sperm payeti kullanılmıştır.

2. Deney Grubu: Betamerkaptoethanolün yumurta olgunlaştırması ve suni dölleme sonrası blastosist gelişimi üzerine etkisi. Bu çalışmada, 196 adet ovaryumdan 650 adet olgun olmayan yumurta elde edilmiştir. Toplam 6 adet sperm payeti kullanılmıştır.

3. Deney Grubu: Farklı kültür solüsyonlarının ve yumurtaların sperma ile dölleme sürelerinin blastosist gelişimi üzerine etkisi. Bu çalışmada, 105 adet ovaryumdan 500 adet olgun olmayan yumurta elde edilmiştir. Toplam 4 adet sperm payeti kullanılmıştır.

4. Deney Grubu: Farklı kültür solüsyonlarının blastosist gelişimi üzerine etkisi. Bu çalışmada 30 adet ovaryumdan 150 adet olgun olmaya yumurta elde edilmiştir. Toplam 2 adet sperm payeti kullanılmıştır.

Çalışmanın Ana Basamakları;

Çalışma, birbirini izleyen 4 farklı ana basamaktan oluşmuştur.

- 1- Sığır yumurtalarının *in vitro* olgunlaştırılması, dondurulmuş boğa spermalarının çözündürülerek IVF gerçekleştirilerek blastosist safhasında embriyoların elde edilmesi.
- 2- Blastosistlerin farklı dondurma yöntemleri ile dondurulması, çözündürülmesi ve *in vitro* kültürleri.
- 3- Çözündürülen blastosistlerin toplam çekirdek sayılarının tespiti amacıyla Floresan Boyama yöntemi ile boyanması.

3.1. Sığır Yumurtalarının *in vitro* Olgunlaştırılması, Dondurulmuş Boğa Spermalarının Çözündürülerek IVF Gerçekleştirilerek Blastosist Safhasında Embriyoların Elde Edilmesi

Bu tez çalışmasında 4 farklı IVF çalışması gerçekleştirilmiştir. Farklı IVF protokolleri denenmiş ve en fazla oranda blastosist eldesini gerçekleştiren materyal ve yöntem oluşturulmuştur.

IVF çalışma başlıkları;

A- Yumurtaların farklı olgunlaştırma sürelerinin blastosist gelişimi üzerine etkisi.

B- Betamerkaptoethanolün yumurta olgunlaştırması ve suni dölleme sonrası blastosist gelişimi üzerine etkisi.

C- Farklı kültür solüsyonlarının ve yumurtaların sperma ile dölleme sürelerinin blastosist gelişimi üzerine etkisi.

D- Farklı kültür solüsyonlarının blastosist gelişimi üzerine etkisi.

Dört farklı IVF çalışmasında kullanılan bazı protokoller aynı olmaktadır.

Bu protokoller;

a- Ovaryumların bölge mezbahadan teminleri ve laboratuara getirilişleri.

b- Olgun olmayan yumurtaların bulunduğu folikül sıvılarının ovaryumlardan aspirasyonları.

c- Aspirasyonu gerçekleştirilen folikül sıvılarından olgun olmayan yumurtaların izolasyonu.

d- Olgun olmayan yumurtaların seçimi ve *in vitro* olgunlaştırılması.

e- Spermanın çözündürülmesi ve canlı spermanın elde edilmesi.

f- Canlı spermanın sayımı ve IVF için sperma konsantrasyonunun hazırlanması.

g- Olgun olduğu öngörülen yumurtaların sperma ile IVF si.

h- IVF sonrasında döllemiş yumurtaların *in vitro* kültüre alınmaları.

3.1.1. Ovaryumların Bölge Mezbahalardan Teminleri ve Laboratuara Getirilişleri

Bölge mezbahada günlük kesimi gerçekleştirilen sığırların ovaryumları deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Tür bakımından belirli bir tür üzerinde durulmamıştır. Kesim günü kesimi gerçekleştirilen sığırların hepsi deneysel çalışmalardaki kullanılmıştır. Ovaryum temininin gerçekleştirileceği günün sabahı, saf suya (dH₂O) %0,9 gr Sodyum Klorür (NaCl) ilavesi yapılarak serum fizyolojik hazırlanmıştır. Hazırlanan serum fizyolojinin içerisine 100 µl/lt Gentamisin ilave edildikten sonra solüsyon 38 - 39 °C'ye ısıtılarak mezbahaya götürülmüştür. Kesimi gerçekleştirilerek sakrifiye edilen sığırın sakrifikasyonun takriben 10. dakikasında karın bölgesi açılarak her iki ovaryumu alınıp termos içerisinde bulunan ısı yaklaşık 34±2 °C'deki serum fizyolojik içerisine konmuştur.

İlk ovaryumun teminini takiben en geç 4 saat içerisinde toplanan ovaryumlar laboratuara getirilmiştir.

3.1.2. Olgun Olmayan Yumurtaların Bulunduğu Folikül Sıvılarının Ovaryumlardan Aspirasyonları

Laboratuara termos içerisinde getirilen ovaryumların ısıları termometre ile kontrol edildikten sonra, 36 - 38 °C'deki serum fizyolojik ile en az 3 - 4 kez yıkanıp temiz bir süzgeç ile süzülerek steril kurulama kağıdı ile iyice kurulanıp aspire edilmek üzere steril kurulama kağıdı üzerinde aspirasyon süresince bekletilmişlerdir.

Aspirasyon sistemi; Ovaryumların üzerinde bulunan 2 - 8 mm çapındaki primer foliküller aspirasyon için tercih edilmiştir. Aspirasyon iğnesi olarak 18 G'luk enjektör iğnesi kullanılmıştır. Aspirasyon iğnesi içinde yaklaşık 5 ml TL-HEPES dış ortam solüsyonu bulunan 50 ml'lik konik tüpe mantar vasıtası ile takılmıştır. Konik tüp ise mantar vasıtası ile negatif hava basıncı oluşturan hava kompresör makinasına bağlanmıştır. Hava kompresör makinası 100 Hg: 28 ml/dak oranında çalıştırılmıştır. Kistik, kanlı ve dejenere olmayan, kaliteli görünen ovaryumlarda bulunan 2 - 8 mm'lik foliküllerin aspirasyonu, hazırlanmış bu düzenek kullanılarak 18 G'lik iğne ucunun folikülün içinde yatay ve dairesel hareketler yapılması ile gerçekleştirilmiştir. (Şekil 3.1, Şekil 3.2)



Şekil 3.1. Primer foliküllerin ovaryumdan aspirasyonu



Şekil 3.2. Sığır ovaryumları

3.1.3. Aspirasyonu Gerçekleştirilen Folikül Sıvılarından Olgun Olmayan Yumurtaların İzolasyonu

Mezbahadan temin edilen ovaryumlar laboratuara getirilip primer düzeydeki foliküller aspire edildikten sonra henüz olgunlaşmamış yumurtaların bulunduğu folikül sıvıları 100 mm'lik bakteriyolojik petride bulunan 3 mg/ml Sığır Serum Albumini (BSA) içeren TL-HEPES (TL-HEPES+BSA) dış ortam solüsyonu içerisine aktarılmıştır. Stereo mikroskobun objektifi 40X büyötmeye ayarlandıktan sonra petri içerisinde bulunan düzgün zona pelusidaya, homojen yumurta plazmasına ve en az 3 - 4 sıra kompakt kumulus hücrelerine sahip yumurtalar; 40 - 50 µm çapındaki pastör cam pipet yardımıyla toplanmıştır.

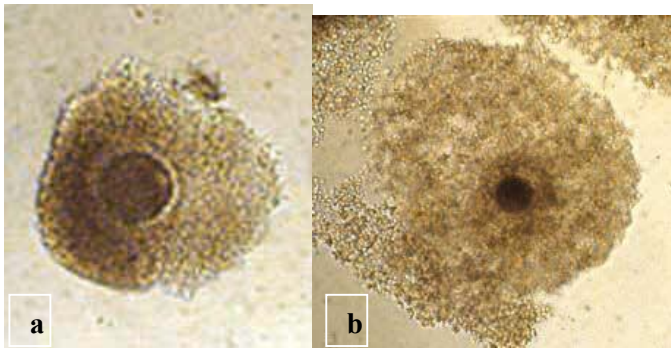
Toplanan yumurtalar TL-HEPES+BSA içeren 35 mm'lik petri kabına transfer edilmiştir. Bu yıkama işlemi en az 3 kez daha aynı yöntem ile tekrarlanmış ve böylece yumurtalar folikül sıvılarından tamamen arındırılmıştır. Olgun olmayan ve olgunlaştırılan yumurtalar **Şekil 3.3.a-b** de gösterilmiştir.

3.1.4. Olgun Olmayan Yumurtaların Seçimi ve *in vitro* Olgunlaştırılması

Aspirasyon sonucu elde edilen olgun olmayan yumurtaların *in vitro* yöntemle sitoplazmik olarak olgunlaştırılması gerekmektedir. Olgunlaştırma solüsyonu olarak sıklıkla kullanılan TCM-199 (Doku Kültür Solüsyonu) (EK-2) doku kültür solüsyonu kullanılmıştır, solüsyona destek maddeleri olarak hormon, serum, çeşitli büyüme faktörleri ve antibiyotik ilave edilerek *in vitro* olgunlaştırma solüsyonu final solüsyon olarak hazırlanıp yumurtaların olgunlaştırılmasında kullanılır hale getirilmiştir. (EK-3)

Yumurtaların aspirasyonundan 3 - 4 saat önce *in vitro* olgunlaştırma solüsyonu hazırlanıp 4 kuyulu petrinin her kuyusuna 500'er µl olacak şekilde konup, solüsyonun olası buharlaşma ve kontaminasyonun önüne geçilmesi amacıyla üzerleri 300 µl kadar mineral yağ ile kaplanmıştır. Petriler sonra 38,5 °C'deki ısıda, % 100'e yakın oranda nem ve %5 CO₂ ve hava içeren inkübatörde solüsyonun gaza doymasına ve ısısının 38,5 °C'ye ulaşmasına kadar bekletilmiştir.

Olgunlaştırma sürecinin sonunda, stereo mikroskop altında, en az homojen yumurta plazmaya, düzgün zona pellisudaya ve 2 kat kadar genişlemiş kümülüs katmanlarına sahip yumurtalar, olgunlaşmış yumurta, olarak öngörülüp IVF leri için ayrılmışlardır. (Şekil 3.3)



Şekil 3.3. a- Olgun olmayan yumurta, b- Olgunlaşmış yumurta

3.1.5. Spermmanın Çözündürülmesi ve Canlı Spermmanın Elde Edilmesi

IVF için daha önceden dondurulup 500 µl'lik payetler halinde sıvı azotta saklanmakta olan boğa spermaları deney günü çözündürülerek kullanılmıştır.

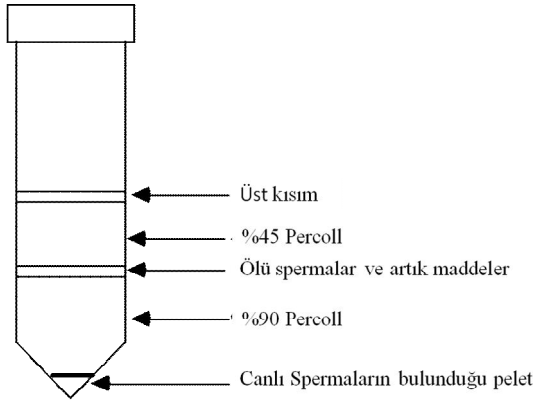
Spermin ayrıştırılmasında ticari olarak temin edilen percoll gradiyent sperm ayrıştırma solüsyonu kullanılmıştır. Percoll solüsyonu öncelikle %90 yoğunluğunda percoll içerecek final bir solüsyon olarak kullanılır hale getirilmiştir. Bu işlemde öncelikle 80 mM final konsantrasyonlu 10X Percoll stok solüsyonu hazırlanmıştır. Percoll solüsyonu %90'lık yoğunluğa percoll solüsyonuna %10 oranında 80 mM final konsantrasyonlu 10X Percoll stok solüsyonu ilave edilerek hazırlanmıştır.

Spermmanın ayrıştırılmasında kullanılan percoll gradiyent solüsyonu %45 ve %90 yoğunluğunda olmak üzere iki kademeli olarak hazırlandıktan sonra çözündürülen spermaların ayrıştırılmasında kullanılmıştır. %45 yoğunluktaki percoll solüsyonu, 1/1 oranda HTF (Human Tubal Fluid - İnsan Tüp Sıvısı) (Quinn'in Avantaj Sperm Yıkama Solüsyonu) ile %90 percoll solüsyonu ile karıştırılarak hazırlanmıştır. Boş bir 15 ml'lik konik tübe 2 ml %90 percoll solüsyonu konmuş, üzerine tüp 45 derecelik yatay eğilerek çok ağır biçimde 2 ml %45 percoll solüsyonu ilave edilmiştir. İki farklı yoğunluktaki percoll solüsyonları birbirine karışmadan tüpe aktarım yapılmıştır. Her iki yoğunluktaki percoll solüsyonların sıcaklığı 37 - 38 °C olmaktadır.

Daha önceden taze olarak elde edilip payetlere yüklenip dondurularak -196 °C'deki sıvı azotta saklanmakta olan sperm payetleri IVF işleminde kullanılmıştır. İki adet payet, önceden sıvı azota daldırılıp soğutulan çelik pens yardımıyla sıvı azottan çıkarılarak yaklaşık 10 saniye süre ile yatay olarak yavaşça havada sallandırılıp 45 derecelik açıyla yavaş bir şekilde 37 °C'deki su banyosuna daldırılıp 1 dakika süre ile bekletilip payetin içerisinde bulunan spermmanın erimesi sağlanmıştır. Payet, 1 dakika sonra sudan çıkartılıp steril kurulama kağıdı ile iyice kurulanıp, payetin her iki ucundan olmak üzere kesilerek spermmanın 15 ml'lik konik tüp içerisinde iki ayrı yoğunlukta bulunan percoll gradiyent solüsyonunun üzerine aktarımı gerçekleştirilmiştir.

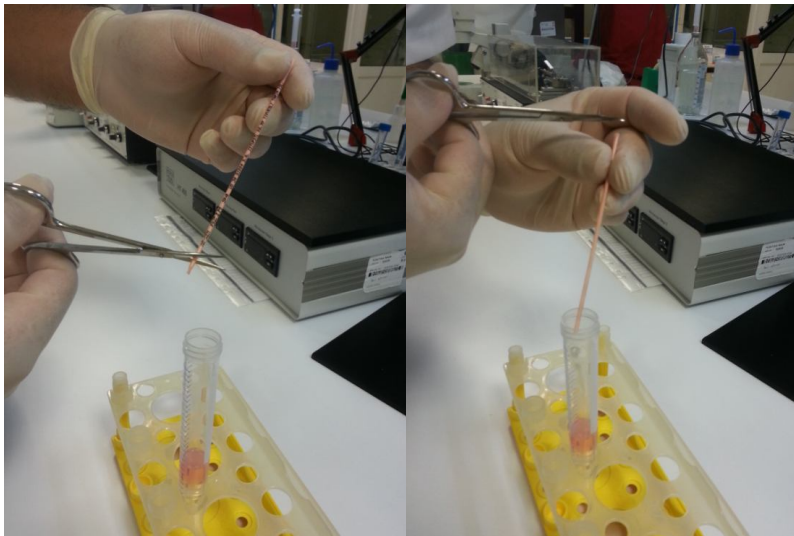
Spermaların bulunduğu tüp yavaşça santrifüje konulduktan sonra 700 x g'de 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sırasında canlı olan spermalar tüpün dip kısmına pelet halinde, ölü spermalar ve spermmanın dondurulmasında kullanılan kimyasal artıklar tüpün orta

kısımında yani %45'lik percoll ve %90'lık percoll solüsyonlarının arasında askıda kalacak şekilde yer edinmişlerdir. (Şekil 3.4)



Şekil 3.4. Percoll sperm ayrıştırma tüpü

Çözündürülen spermalar percoll seperasyon solüsyonu ile seperasyonu gerçekleştikten sonra tüpün dip kısmındaki canlı olduğu öngörülen sperma peletine ulaşmak için öncelikle zaman kaybetmeden tüpü 45 derecelik açı ile eğip 1 ml'lik otomatik pipet yardımıyla tüpün üst kısmından başlamak üzere solüsyon çekilmiştir. Her 1 ml solüsyon çekildikten sonra pipet değiştirilirmiş ve temiz pipetle bu işlem sperm peletine ulaşmaya kadar devam edilmiştir. Canlı spermin bulunduğu pelet gevşek yapıda olduğu için özellikle bu kısımda çok dikkatli şekilde pelet solüsyondan izole edilmiştir. Tüm solüsyon peletten uzaklaştırıldıktan sonra pelet 100 µl'lik otomatik pipet ucu yardımıyla pipetlenerek peletin homojen durumda olması sağlanmıştır. Bu işlemlerden sonra spermin canlılık kontrolü yapılmıştır. (Şekil 3.5)



Şekil 3.5. Sperm yüklü payetin çözündürülmesi ve ayrıştırma tüpüne aktarılması

Peletten otomatik pipet yardımıyla 10 µl kadar sperma çekilip daha önce ısıtılmış lamın üzerine bırakılmış ve üzeri lamel ile kaplanmıştır. Lam ışık mikroskopunun altına yerleştirilmiş ve 200X büyütme altında spermlerin canlılık tayinleri yapılmıştır. Doğrusal, seri ve ileri yönde hareket eden spermlerin varlığına dikkat edilmiştir.

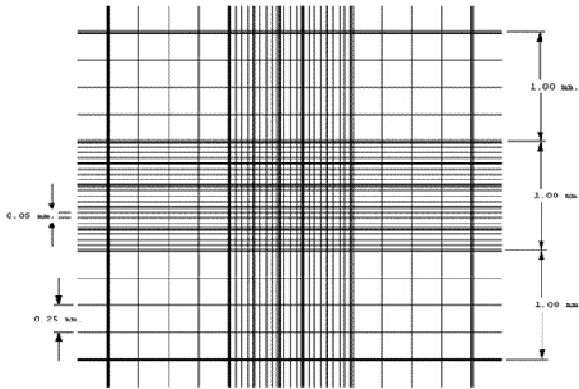
Kalite bakımından iyi derecede olan spermlerin varlığı doğrultusunda deneylere devam edilmiştir.

3.1.6. Canlı Spermanın Sayımı ve Sperma Konsantrasyonunun Hazırlanması

Spermanın canlılık tayini gerçekleştirildikten sonra spermin konsantrasyonunun hazırlanma işlemine geçilmiştir. Spermin konsantrasyonu, 1 ml'de $1-2 \times 10^6$ olacak şekilde düzenlenmiştir. Payette aynı kalite ve miktarda sperma bulunmama olasılığı sebebiyle öncelikle peletten elde edilen spermanın sayımı gerçekleştirilmiştir.

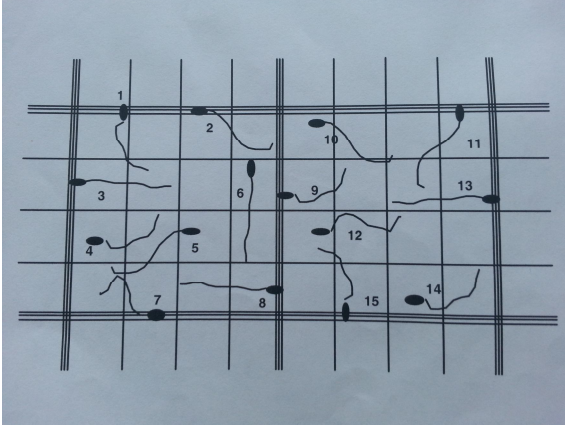
Sayım için Thoma Lamı kullanılmıştır. Sperm peletinden 10 µl alınıp 190 µl'lik çeşme suyunun içerisine konup iyice karıştırılıp spermlerin tamamen ölmesi sağlanmıştır. Spermlerin öldürülmesinde çeşme suyunun kullanımı en etkili ve kolay bir yöntem olmaktadır. Bu sulandırma oranı dondurulmuş spermlerin kullanılmasında daha iyi sonuç vermektedir.

Thoma lamının bölme kısmına 10 µl kadar ölü sperm peleti karışımı konmuştur ve spermlerin tamamını ölmesi için 5 dakika süre ile beklenmiştir. Bekleme sonrası thoma lamı ters mikroskop altına konarak faz kontrasta 400X büyütme ile spermlerin sayımı gerçekleştirilmiştir. Sayımda thoma lamında birbirine çok yakın olmayan herhangi 5 kare içerisinde bulunan spermler sayılmıştır.



Şekil 3.6. Sperma sayımında kullanılan thoma lamı

Sayılan sperma doğrultusunda IVF de kullanılacak spermin konsantrasyonu belirlenmiştir. Başarılı bir IVF çalışması için thoma lamında bulunan 5 karede yaklaşık olarak 110 - 200 adet spermanın varlığı gerekmektedir (Şekil 3.6). Sayım sonucunda genellikle çalışmaları olumlu yönde etkileyecek sperm adedi 200 - 250 arasında olmaktadır.



Şekil 3.7. Thoma lamında sperma sayım sistemi (Leibfried ve Bavister, 1982)

Sperm konsantrasyon hesaplama formülü:

SS x SO x 5000: Sperm/ml (SS= 5 karede içerisindeki sayılan sperm; SO= Spermi sulandırma oranı; 50000= 1000 µl / 5 x 0.004 µl. (Eldeki hacmi ml bazına çevirmede kullanmak amacıyla hesaplanmıştır).

Fakat daha pratik ve kolay olan diğer bir yöntem, sperm konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanılmıştır. Bu yöntemde, 2.5 sayısı 5 karede sayılan toplam sperm sayısına bölünmüştür. Elde edilen sonuç 1000 ile çarpılmıştır ve çıkan sonuçta virgöl sonrasındaki küsurat atılmıştır. Elde edilen sonuç kadar mikrolitre canlı sperm peletinden çekilip final konsantrasyon 100 µl olacak şekilde geri kalan kısım suni dölllenme solüsyonu ile tamamlanmıştır (Şekil 3.7).

3.1.7. Olgun Yumurtaların Sperma ile IVF si

Spermaların olgun yumurtalar ile IVF si için ticari olarak temin edilen HTF SAGE dölllenme solüsyonu kullanılmıştır. Fakat bu suni dölllenme solüsyonuna bir takım kimyasal maddeler ilave edilmiştir. Solüsyona 6 mg/ml yağ asidinden arındırılmış sığır serum albumini (BSA-FAF A-6003) solüsyonda protein kaynağı amaçlı eklenmiştir. HTF SAGE suni

döllenme solüsyonu 0.22 µm'lik enjektör filtresinden geçirildikten sonra 60 mm'lik petri kabına 44'er µl'lik boyutta damlalar halinde konmuştur. Damlaların herhangi kontaminasyona maruz kalmaması ve buharlaşmasının önlenmesi amacıyla üzerleri mineral yağ ile kaplanmıştır. Petriler %5 CO₂ ve hava ve yoğun nem içeren, 38.5 °C'deki inkübatöre konmuş ve en az 4 saat süre ile bekletilerek solüsyonun neme, ısıya ve gaza doyması sağlanmıştır.

Hazırlanan ve inkübatöre konarak en az 4 saat süre ile %5 CO₂ içeren 38,5 °C ısıdaki inkübatörde bekletilen yapay dölleme petrisi, inkübatörden çıkarılarak her damlaya uygunluğu tamamladığı öngörülen 10-12 adet yumurta transfer edilmiştir. Yumurtaların bulunduğu her damlanın içerisine 2 µl konsantrasyonu tamamlanmış sperma, sonra 2 µl Penisilin, Hipotavrin ve Epinefrin (PHE) (20 µM penisilamin, 10 µM hipotaurin, 1 µM epinefrin) ve son olarak 2 µl heparin (2 µg/ml) eklenmiştir.

Bu işlemler tamamlandıktan sonra IVF petrisi 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem ve %5 CO₂ ve hava içeren inkübatöre konmuştur. IVF petrisi deneylerin protokoller doğrultusunda değişen sürelerde inkübatörde bekletilmiştir.

3.1.8 IVF Sonrasında Döllenmiş Yumurtaların *in vitro* Kültüre Alınmaları

IVF sürecinin bitiminde döllenmiş yumurtalar IVF solüsyonundan alınarak TL-HEPES solüsyonuna transfer edilip burada en az 3 kez yıkanarak hem IVF solüyonundan hem de solüsyonu kaplayan yağdan arındırılmıştır. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra tüm döllenmiş yumurtalar, otomatik pipet yardımıyla 100 µl TL HEPES ile birlikte toplanarak 1.5 ml lik santrifüj tüpüne aktarılmıştır. Tüp dikkatli bir şekilde 2.5 - 3 dakika süre ile seri bir şekilde vortekslenmiştir. Bu işlemde döllenmiş yumurtalar etrafını çevreleyen genişlemiş kümülüs hücrelerinden arındırılmıştır.

Vorteks işlemi sonunda tüp TL-HEPES ile yıkanarak tüpte bulunan tüm içerik yıkama petrisine aktarılmış, ve düzgün zona pelisuda, homojen yumurta plazmaya sahip canlılığını sürdüren döllenmiş yumurtalar *in vitro* kültür için ayrılmışlardır.

In vitro kültür çalışmaları deneylerin protokoller doğrultusunda farklı metotlar uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

3.2. IVF Çalışma Başlıkları

A- Yumurtaların farklı olgunlaştırma sürelerinin blastosist gelişimi üzerine etkisi.

B- Betamerkaptoethanolün yumurta olgunlaştırması ve IVF sonrası blastosist gelişimi üzerine etkisi.

C- Farklı kültür solüsyonlarının ve yumurtaların sperma ile döllenme sürelerinin blastosist gelişimi üzerine etkisi.

D- Farklı kültür solüsyonlarının blastosist gelişimi üzerine etkisi.

3.2.1. Yumurtaların Farklı Olgunlaştırma Sürelerinin Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi.

Bu çalışmada olgunlaşmamış yumurtaların olgunlaştırma solüsyonuna maruz bırakılarak en uygun olgunlaştırma süreci incelenmiştir. Olgun olmayan yumurtalar iki farklı deney grubuna ayrıştırılmıştır.

Mezbahadan ovaryumların temini gerçekleştikten sonra laboratuarda ovaryumlardan aspirasyon yöntemiyle olgun olmayan yumurtalar elde edilip folikül sıvılarından arındırılıp olgunlaştırma solüsyonuna transfer edilmişlerdir. Bu çalışmada iki farklı deney grubu oluşturulmuştur. **Birinci deney grubunda** yumurtalar olgunlaştırma solüsyonunda 22 saat süre ile bekletilmiştir, **ikinci deney grubunda** ise yumurtalar 24 saat süre ile olgunlaştırma solüsyonunda bekletilmişlerdir.

Birinci deney grubundaki yumurtaların 22 saat süre ile olgunlaşmasının tamamlanmasının ve ikinci deney grubunun 24 saat süre ile olgunlaşmasının tamamlanmasının ardından yumurtalar olgunlaştırma solüsyonundan çıkarılmış ve 4 saat önceden hazırlanan ve inkübatörde bekletilen IVF petrilere her damlaya 10 - 12 adet olacak şekilde transfer edilmiştir.

Spermanın çözündürülmesi, spermaların bulunduğu payetin sıvı azottan çıkarılarak havada 10 sn süre ile yavaşça sallandırılarak 37 °C'deki su banyosunda daldırılıp 1dk kadar bir süre bekletilerek çözündürülmüştür. Çözündürülen payet su banyosundan çıkarılarak steril kurulama kağıdı ile silinmiş, payet her iki ucundan kesilerek hazırlanan Percoll %45 -

%90'lık ayrıştırma solüsyonunun bulunduğu tüpe içerik aktarılmış ve 700 x g'de 10 dakika süre ile santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası tüpün üstte kalan düşük yoğunluklu kısım yani süpernatant kısmı otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırılarak pelete ulaşılmış ve peletteki spermin motilite tayini ve sayımı gerçekleştirilmiştir. Spermin konsantrasyonu 1 ml'de 2×10^6 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Konsantrasyonu ayarlanan ve hazırlanan spermeler, 4 saat önce hazırlanarak inkübatörde bekletilen ticari olarak temin edilen HTF (Human Tubal Fluid-İnsan Tüp sıvısı) SAGE IVF solüsyon petrisine her damlanın içerisine 2 µl konsantrasyonu tamamlanmış sperma, sonra 2 µl Penisilin Hipotaurin Epinefrin (PHE) (20 µM penisilamin, 10 µM hipotaurin, 1 µM epinefrin) ve son olarak 2 µl heparin (2 µg / ml) eklenmiştir. Bu işlemler tamamlandıktan sonra IVF petrisi 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem ve %5 CO₂ ve hava içeren inkübatöre konmuştur. Bu çalışmada IVF süresi 18 saatdir.

IVF sonrası elde edilen canlı ve kaliteli döllenmiş yumurtaların kültürleri birbirini takip eden iki farklı kültür solüsyonunda gerçekleştirilmiştir. Kültürün ilk 72 saatinin gerçekleştirildiği 1. Kültür solüsyonu ticari olarak temin edilen SAGE-Yarıklanma (QACM-Quin'in Avantaj Yarıklanma Solüsyonu) olmaktadır. Bu solüsyona protein desteği amaçlı olarak 8 mg/ml yağ asidinden arındırılmış sığır serum albumini (BSA-FAF A-6003) solüsyona eklenmiştir. Sonra solüsyon 0,22 µm'lik enjektör filtresiyle filtre edilerek 30'ar µl olacak şekilde 60 mm'lik petri kabına damlalar oluşturulmuş ve üzerleri mineral yağ ile kaplanmıştır. Kültür damlalarının gaza neme ve ısıya doymaları amacıyla kültür öncesi en az 4 saat süre ile kültürün gerçekleştirileceği 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem ve %5 CO₂ ve hava içeren inkübatöre konmuştur. Kültür için hazır hale getirilmiş damlalar inkübatörden çıkartılarak, her damlaya 15'er adet döllenmiş yumurta aktarılmıştır. *In vitro* kültür süreci kültür petrilerinin inkübatöre konmasıyla başlamıştır.

Kültürün 72. saatinde döllenmiş yumurtaların transfer edileceği yine ticari olarak temin edilen SAGE-Blastosist (QABM-Quinn's Advantage Blastocyst Medium) adlı ikincil solüsyon olmaktadır. SAGE Blastosist solüsyonuna protein desteği amaçlı olarak 4 mg/ml yağ asidinden arındırılmış sığır serum albumini (BSA-FAF A-6003) ve %5 Sığır Buzağı Serumu (FCS) ilave edilmiştir ve aynı 1. kültür solüsyonunda gerçekleştirildiği gibi 60 mm'lik petri

kaplarına 30'ar µl'lik kültür damlaları oluşturulmuş ve petri aynı inkübatöre konarak en az 4 saat süre ile bekletilerek solüsyonun neme, gaza ve ısıya doyması sağlanmıştır.

Sage-Yarıklanma solüsyonunda 72 saatlik kültürünü tamamlayan döllenmiş yumurtalar mikroskop altında incelenerek 4, 8 ya da 16 hücreli safhaya ulaşan ve artık embriyo olarak nitelendirilen hücreler toplanarak SAGE-Blastosist solüsyonuna transfer edilmişlerdir. Ölü olan, bölünmeyen ve kalite bakımından iyi olmayan hücrelerin kültürüne devam edilmemiştir. Petriler bir sonraki kültür için aynı inkübatöre konmuşlardır ve 96 saat kadar kültüre devam edilmiştir. *In vitro* kültürün sonunda petriler inkübatörden çıkartılarak embriyoların gelişimleri gözlenmiştir.

3.2.2. Betamerkaptoethanolün Yumurta Olgunlaştırması ve IVF Sonrası Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, Betamerkaptoethanolün olgun olmayan yumurtaların olgunlaştırması ve olgun olduğu öngörülen yumurtaların IVF sonrası blastosist gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir.

Mezbahadan ovaryumların temini gerçekleştirilip ilk ovaryumun temininden itibaren en geç 4 saat içerisinde laboratuara getirilip tüm çalışmalarda uygulanan aynı yöntemlerle 2-8 mm çapındaki primer foliküllerin aspirasyonu gerçekleştirilmiştir. Aspirasyonu sonrasında olgun olmayan kaliteli yumurtalar, iki farklı deney grubuna ayrıştırılmıştır.

Birinci deney grubundaki yumurtaların olgunlaştırma solüsyonuna 100 µm Betamerkaptoethanol ilavesi gerçekleştirilmiştir. İkinci deney grubuna ise kontrol amaçlı olarak standart *in vitro* olgunlaştırma solüsyonu kullanılmıştır.

Olgun olmayan yumurtaların *in vitro* olgunlaştırılmaları, yumurtaların *in vitro* olgunlaştırma solüsyonuna transfer edilerek, 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem, %5 CO₂ ve hava içeren inkübatörde 22 saat süre bekletilerek gerçekleştirilmiştir.

Yumurtaların olgunlaştırma sürecinin ardından dondurulmuş spermanın çözündürülmesi, konsantrasyonunun ve IVF solüsyonunun hazırlanmasına geçilmiştir.

IVF solüsyonu olarak Brackett Oliphant (BO) stok solüsyonu kullanılmıştır (Brackett, 1981). Öncelikle çeşitli mineral tuzlardan oluşturulan Stok A (BO-A) solüsyonu hazırlanmıştır. Sonra pH dengesi amacıyla Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃) ve Fenol Kırmızısı

içeren Stok B (BO-B) solüsyonu hazırlanmıştır. Bu iki solüsyon protokol dahilinde kendi aralarında birleştirilerek enerji gereksinimi amacıyla pirüvik asit ve ayrıca antibiyotik gereksinimi karşılamak için gentamisin ilavesi ile IVF çalışmasında kullanılabilir BO-AB adında IVF solüsyonu hazırlanmıştır.

Fakat IVF çalışmasında kullanılan BO-AB Solüsyonunun protein gereksinimini karşılamak amacıyla solüsyona 8 mg/ml sığır serum albumini (BSA-Fraksiyon V- A-3311) ilavesi yapılmıştır. Final solüsyon 0,22 µm'lik enjektör filtresiyle filtre edilip 60 mm'lik petri kabına 44 µl'lik damlalar oluşturularak üzerleri mineral yağ ile kaplanmış ve 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem, %5 CO₂ ve hava içeren inkübatöre konarak en az 4 saat süre ile bekletilmiştir.

Bu işlemden sonra spermanın çözündürülmesi gerçekleştirilmiştir. Sıvı azottan çıkartılan iki adet payet havada yaklaşık 10 saniye süre ile yatay şekilde hafifçe sallandırılıp 37 °C'deki su banyosuna daldırılmış ve burada payetler 1 dakika kadar bir süre bekletilmiştir.

Çözündürülen payet, steril kurulama kağıdı ile silinerek payetin içeriği hazırlanan Percoll %45 - %90 ayırıştırma solüsyonun bulunduğu tüpe içerik aktarılmış ve tüp 700 x g'de 15 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda tüpteki ölü spermaların ve solüsyon artıklarının bulunduğu yoğunluğu az olan süpernatant kısım otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve tüpün dip kısmında canlı olduğu öngörülen sperm peletine ulaşılmıştır.

Tüpün dip kısmındaki sperm peletinden 10 µl alınarak önceden ısıtılmış lam üzerine yayılmış ve lamel ile lam kapatılıp, ışık mikroskobu altında 200X büyütme ile spermaların canlılık tayinleri gerçekleştirilmiştir. Birim alanda %70'in üzerinde düzgün doğrusal ve seri hareketli spermaların varlığının tespitinden sonra çözündürülen spermaların IVF çalışmasında kullanılacağına karar verilmiştir.

Spermanın sulandırılması, konsantrasyonun 1 ml'de 2×10^6 olacak şekilde ayarlanmıştır. Spermanın konsantrasyonu ayarlandıktan sonra 4 saat önce 44'er µl'lik damlalar halinde 60 mm'lik petriye hazırlanarak inkübatörde bekletilen BO-AB + 8 mg/ml sığır serum albumini (BSA-Fraksiyon V- A-3311) IVF solüsyonu hazırlanarak 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem, %5 CO₂ ve hava içeren inkübatörde bekletilen IVF damlaların her birine sulandırılmış spermadan 2'şer µl kadar eklendi ve sonra aynı damlara sırasıyla 2 µl PHE ve 2 µl heparin (2 µg / ml) eklenmiştir. Bu işlemler tamamlandıktan sonra IVF petrisi

38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem ve %5 CO₂ ve hava içeren inkübatöre konmuştur. IVF petrilerinin inkübasyon yani IVF süresi 18 saat olmaktadır.

İnkübasyonun 18. saatinin sonunda IVF süreci tamamlanmıştır. Petriler inkübatörden alınarak IVF damlalarının içerlerinde bulunan döllendiği öngörülen yumurtalar TL-HEPES solüsyonuna transfer edilmiştir. 100 µl TL-HEPES solüsyonu içerisine tüm döllendiği ön görülen yumurtalar 1.5 mm'lik tüpe konarak 3 dakika süre ile vorteks yapılmıştır ve yumurtalar, etraflarındaki kumulus hücrelerinden arındırılmıştır. Vorteks sonrasında yumurtalar sperm ve solüsyon artıklarından izole edilmek amacıyla birkaç kez TL-HEPES solüsyonunda yıkanarak canlı ve kaliteli görünen döllenmiş yumurtalar seçilerek kültür solüsyonuna aktarılmıştır.

Döllenmiş yumurtaların *in vitro* kültürleri birbirini takip eden ve ticari olarak elde edilen iki farklı kültür solüsyonunda gerçekleştirilmiştir. Kültürün ilk 72 saati 8 mg/ml BSA FAF içeren SAGE-Yarıklanma solüsyonu kullanılmıştır. Kültürün 72. saati sonunda canlılığını sürdüren ve 4, 8 ya da 16 hücreli safhaya ulaşan embriyolar, kültürün devamında kullanılacak ikincil solüsyon olan 4 mg/ml BSA FAF+ %5 FCS içeren SAGE-Blastosist solüsyonuna transfer edilmiştir. Her iki kültür solüsyonu döllenmiş yumurtaların transferinden en az 4 saat önce hazırlanıp 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem ve %5 CO₂ ve hava içeren inkübatöre konarak bekletilmiştir. Her iki kültür solüsyonunda kültür damlaları 30'ar µl olup 60 mm'lik IVF kültür petrisinde gerçekleştirilmiştir. Her kültür damlasında yaklaşık 12 - 15 adet döllenmiş yumurta transfer edilmiştir. SAGE-Blastosist solüsyonunda *in vitro* kültür çalışması 96 saat sürmüştür.

In vitro kültürün sonunda petriler inkübatörden çıkartılarak embriyoların gelişimleri gözlenmiştir.

3.2.3. Farklı Kültür Solüsyonlarının ve Yumurtaların Sperma ile Döllenme Sürelerinin Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, iki farklı kültür solüsyonunun ve yumurtaların sperma ile döllenme sürelerinin IVF sonrası blastosist gelişimleri üzerine etkileri incelenmiştir.

Ovaryumlar, deney sabahı bölge mezbahadan alınarak 38 - 39 °C'deki serum fizyolojik içerisinde muhafaza edilerek ilk ovaryumun temini itibaren en geç 4 saat içerisinde laboratuara getirilmiştir. Olgun olmayan yumurtalar, ovaryumların 2 - 8 mm çapındaki primer

folikülerinden aspirasyon yöntemi ile elde edilmiştir. Yumurtaların elde edilmesinde yukarıda uygulanan yöntemin aynısı kullanılmıştır.

Aspirasyon sonrası elde edilen olgun olmayan yumurtalar, *in vitro* olgunlaştırma solüsyonuna transfer edildikten sonra, 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem, %5 CO₂ ve hava içeren inkübatörde 22 saat süre bekletilerek *in vitro* olarak olgunlaştırılmışlardır.

Yumurtaların olgunlaştırma sürecinin ardından dondurulmuş spermanın çözündürülmesi, konsantrasyonunun ve IVF solüsyonunun hazırlanmasına geçilmiştir.

IVF solüsyonu, temel solüsyon olan TCM-199+HEPES'e NaHCO₃, Antibiyotik, Glükoz, Na Piruvat ve yağ asidinden arındırılmış BSA ilavesi gerçekleştirilerek hazırlanmıştır (Nedambale ve ark. 2006). IVF solüsyonu deney günü günlük hazırlanarak taze olarak kullanılmıştır. Hazırlanan solüsyon 44'er µl'lik damlalar halinde 60 mm'lik IVF petrisine hazırlanarak 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem ve %5 CO₂ ve hava içeren inkübatöre konmuştur. IVF petrisi, bu inkübatörde en az 4 saat süre ile bekletilerek solüsyonun neme gaza ve ısıya doymuş hale getirilmiştir.

% 45'lik Percoll Sperma ayırıştırma çözeltisi, %90 Percoll Sperma ayırıştırma çözeltisi ile sperm yıkama solüsyonu (TCM199+HEPES + 5 mg/ml BSA Fraksiyon V) ile bire bir oranında karıştırılarak hazırlanmıştır.

Spermanın çözündürülmesinde uygulanan yöntem diğer çalışmalarda uygulanan yöntemin aynısıdır. İki adet sperm payeti sıvı azottan çıkarılarak havada 10 sn kadar bir süre hafifçe sallandırılıp 38 °C'deki su banyosuna daldırılarak 1 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda payet su banyosundan çıkarılarak steril kurulama kağıdı ile kurularak Percoll %45-%90 ayırıştırma solüsyonun bulunduğu tüpe içerik aktarılmış ve tüp 700 x g'de 15 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırılarak tüpün dip kısmında kalan canlı spermaların bulunduğu pelete ulaşılmıştır. Bu peletten 10 µl kadar alınarak 39 °C'de ısıtılmış lam üzerine yayılarak üzeri lamelle kapatılmıştır.

Canlı olduğu öngörülen spermaların bulunduğu preparat ışık mikroskobu altına yerleştirilerek 200 x büyütme altında spermalar gözlemlenmiştir. Birim bölgede %70'in üzerinde doğrusal ve seri hareket eden spermaların tespitinden sonra IVF çalışmasına geçilmiştir.

Sperma, 1 ml'de 2×10^6 adet sperma olacak şekilde sulandırılmıştır. Spermanın konsantrasyonunda kullanılan sulandırma solüsyonu olarak IVF solüsyonu kullanılmıştır. Spermanın konsantrasyon hazırlığı tamamlandıktan sonra tüp IVF'nin gerçekleştirileceği inkübatöre, kapağı gevşek şekilde konarak solüsyonun ısınıp gazlanması sağlanmıştır.

IVF işleminin gerçekleştirilmesinden 4 saat önce IVF solüsyonu, 44'er μ l'lik damlalar halinde 60 mm'lik petriye konulmuş, petri kaplarının üzerleri mineral yağ ile kaplandıktan sonra petri IVF nin gerçekleştirileceği yani, 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem, %5 CO₂ ve hava içeren inkübatöre konarak solüsyonun ısıya, neme ve gaza doymaları sağlanmıştır. İki ayrı IVF petrisi hazırlanmıştır. 1. Petri; yapay dölleme süresi 6 saat olan deney grubunu, 2. Petri ise IVF süresi 18 saat olan deney gurubunu içermektedir.

IVF damlaların her birine sırasıyla, 2'şer μ l sulandırılmış sperma, PHE ve heparin (2 μ g/ml) eklenmiştir. Petri kutusu IVF için hazırlandıktan sonra, 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem ve %5 CO₂ ve hava içeren inkübatöre konmuştur. IVF süresi 6 ve 18 saat olmak üzere iki farklı zaman periyodunda denenmiştir. Her iki deney grubunda IVF sürecinin sonunda aynı manupilasyonlar gerçekleştirilerek kültür çalışması gerçekleştirilmiştir.

Her iki deney grubunun inkübasyonlarının 6 ve 18. saatlerinin sonlarında dölleme süreçleri tamamlanmıştır. Petri inkübatörden alınarak TL-HEPES solüsyonuna transfer edilerek en az 3 kez yıkanıp hücrelerin sperma artıklarından ve IVF solüsyonundan iyice arınmaları sağlanmıştır. Yıkama işleminden sonra, tüm hücreler 100 μ l TL-HEPES solüsyonu içerisine 1.5 mm'lik tüpe konarak 3 dakika süre ile vorteks yapılarak döllendiği ön görülen yumurtalar, etraflarında bulunan kumulus hücrelerinden arındırılmışlardır. Bu işlem tamamlandıktan sonra düzgün yumurta plazmaya, belirli bir zona pellisudaya sahip, kaliteli görünen hücrelerin *in vitro* kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. *In vitro* kültürün gerçekleştirildiği petri 60 mm'lik olmakla beraber kültür damlaları 30'ar μ l lik olup her damlaya yaklaşık olarak 10 - 12 adet hücre transfer edilmiştir.

In vitro kültür çalışması iki farklı deney grubu oluşturularak gerçekleştirilmiştir. **1. Kültür Grubu**; SAGE-Yarıklanma - SAGE-Blastosist Kültür grubu, **2. Kültür Grubu** ise KSOM-SOF Kültür grubu olmaktadır (Nedambale ve ark. 2006).

1. Kültür Grubunda; döllendiği öngörülen yumurtaların *in vitro* kültürlerinde, birbirini takip eden ve ticari olarak elde edilen iki farklı kültür solüsyonu kullanılmıştır. Yumurtaların ilk transfer edildiği kültür solüsyonu 8 mg/ml BSA FAF içeren SAGE-Yarıklanma solüsyonu

olmaktadır. SAGE-Yarıklanma solüsyonunda kültür süreci 72 saattir. Bu süreç sonunda canlılığını sürdüren ve 4, 8 veya 16 hücreli safhaya ulaşmış embriyolar kültürün devamında kullanılacak ikincil solüsyon olan 4 mg/ml BSA FAF + %5 FCS içeren SAGE-Blastosist solüsyonuna transfer edilmişlerdir. SAGE-Blastosist solüsyonunda *in vitro* kültür çalışması 96 saat sürmüştür.

2. Kültür Grubunda; spermalar ile döllendiği öngörülen yumurtaların *in vitro* kültürlerinde, birbirini takip eden taze olarak hazırlanmış iki farklı solüsyon kullanılmıştır. Bunlardan birincisi, KSOM (Potasyum Simpleks Optimize Edilmiş Solüsyon) ve İkincisi, ikincil solüsyon olarak kullanılan SOF (Sentetik Ovidukt Sıvısı) kullanılmıştır.

Tüm kültür solüsyonlarını döllenmiş yumurtaların transferinden en az 4 saat önce hazırlanıp 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem ve %5 CO₂ + %5 O₂ ve hava içeren inkübatöre konarak bekletilmiştir. Kültür damlaları 60 mm'lik IVF petri kaplarında 30 'ar µl olacak şekilde hazırlanarak üzerleri mineral yağ ile kaplanmıştır.

Bu grupta döllendiği öngörülen yumurtalar ilk önce 1 mg/ml BSA Fraksiyon V içeren KSOM solüsyonuna transfer edilmişlerdir. Bu kültür solüsyonunda hücreler 72 saat süre ile kültür edildikten sonra bölünme göstermiş, 4, 8, 16 hücreli safhaya ulaşmış kaliteli embriyolar deney günü sabahı en az 4 saat önceden hazırlanmış SOF kültür solüsyonuna transfer edilmişlerdir. Embriyoların SOF kültür solüsyonundaki kültürleri 96 saat daha devam etmiştir.

In vitro kültürün sonunda petri kablari inkübatörden çıkartılarak embriyoların gelişimleri gözlenmiştir.

3.2.4. Farklı Kültür Solüsyonlarının Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, *in vitro* olgunlaştırılan yumurtaların IVF sonrasında gerçekleştirilen kültür çalışmasında iki farklı kültür solüsyonunun blastosist gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır.

1. Kültür Grubu; Ticari olarak elde edilen ve SAGE- Yarıklanma ve kültürün devamında ikincil solüsyon olarak kullanılan SAGE Blastosist kültür solüsyonu olmaktadır.

2. Kültür Grubu; Laboratuarda protokoller dahilinde hazırlanan, KSOM solüsyonu ve kültürün devamında ikincil solüsyon olarak kullanılan SOF kültür solüsyonu olmaktadır.

Ovaryumların temini bölge mezbahasından gerçekleştirildikten sonra laboratuara getirilmiştir. Ovaryumlar tüm çalışmalarda olduğu gibi 38-39 °C'deki serum fizyolojik ile en az 3 kez yıkanarak ovaryumların kandan ve diğer artıklardan arındırılmaları ve eski ısalarına ulaşmaları sağlanmıştır.

2 - 8 mm çap aralığında olan foliküllerin aspirasyonları, 18 G'luk iğne ile negatif hava basıncı uygulanarak TL-HEPES solüsyonu içerisine aktararak gerçekleştirilmiştir. Aspirasyon sonrası elde folikül sıvıları ile birlikte elde edilen olgun olmayan yumurtalar, tüpten izole edilip TL-HEPES solüsyonu bulunan 100 mm'lik bakteriyolojik petri kaplarına transfer edilerek en az 2 - 4 kumulus katmanına sahip yumurtalar seçilerek *in vitro* olgunlaştırma solüsyonuna transfer edilmişlerdir.

Yumurtaların *in vitro* olgunlaştırıldığı ortam, diğer çalışma gruplarında uygulanan ortamın aynısı olup 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem ve %5 CO₂ ve hava içeren inkübatör ortamıdır. Yumurtaların olgunlaştırma süresi 24 saat olmaktadır.

Yumurtaların olgunlaştırma sürecinin ardından dondurulmuş spermanın çözündürülmesi, konsantrasyonunun ve IVF solüsyonunun hazırlanmasına geçilmiştir.

Fakat, IVF çalışmasında kullanılan sperm yıkama ve IVF solüsyonu ticari olarak elde edilmiştir. Sperm yıkama solüsyonu olarak SAGE HTF Sperm yıkama solüsyonu kullanılmıştır. IVF solüsyonu olarak SAGE HTF IVF Solüsyonu kullanılmıştır.

IVF solüsyonu olarak kullanılan SAGE HTF IVF solüsyonuna 6 mg/ml BSA FAF A-6003 ilave edilmiştir. Solüsyon diğer çalışma gruplarında olduğu gibi 60 mm'lik IVF petrisine 44'er µl'lik damlalar oluşturularak hazırlanmış damlaların üzerleri mineral yağ ile kaplanarak petriyer IVF den en az 4 saat öncesinden hazırlanarak 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem, %5 CO₂ ve hava içeren inkübatöre konmuştur (Arat ve ark. 2011).

Sperm yıkama solüsyonu, öncelikle %45 Percoll solüsyonu hazırlanırken %90 Percoll Solüsyonu ile bire bir oranında birleştirilerek hazırlanmıştır. Spermanın ayrıştırılması ve IVF IVF çalışmalarının solüsyonları hazırlandıktan sonra dondurularak saklanmakta olan spermanın çözündürülmesine geçilmiştir.

Spermanın çözündürülmesinde diğer çalışmalarda uygulanan yöntemin aynısı kullanılmıştır. Fakat bu çalışmada sperma çözüldükten sonra ikinci kez yıkanmıştır. İki adet sperm payeti sıvı azottan çıkarılarak havada yaklaşık 10 sn kadar hafifçe sallandırılıp 37

°C'deki su banyosuna daldırılarak 1 dakika süre ile bekletilmiştir. Süre sonunda payet su banyosundan çıkarılarak steril kurulama kağıdı ile kurularak Percoll %45-%90 ayırıştırma solüsyonun bulunduğu tüpe içerik aktarılarak tüp 700 x g'de 15 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süpernatant kısım otomatik pipet yardımıyla uzaklaştırılmış ve tüpün dibindeki sperm peletinin üzerine 4 ml kadar sperm yıkama solüsyonu eklenmiştir. Tüp ikinci kez 700 x g de bu sefer de 10 dakika süre kadar santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında, otomatik pipet yardımıyla tüpteki süpernatant kısım uzaklaştırıldı ve de tüpün dip kısmında kalan canlı spermaların bulunduğu pelete ulaşılmıştır.

Canlı spermaların bulunduğu peletten 10 µl. kadar alınarak daha önceden 39 °C'de ısıtılmış lam üzerine yayılarak üzeri lamelle kapatılmıştır. Canlı olduğu öngörülen spermaların bulunduğu preparat ışık mikroskobu altına yerleştirildi ve 200 x büyütme altında spermaların canlılık durumu gözlemlenmiştir. Birim bölgede %60 - 70'in üzerinde doğrusal ve seri hareket eden spermaların tespitinden sonra IVF çalışmasına geçilmiştir.

Sperma, 1 ml'de 2×10^6 olacak şekilde sulandırılmıştır. Spermanın konsantrasyonunda kullanılan sulandırma solüsyonu önceden inkübatörde bekletilerek gazlanmış SAGE IVF solüsyonu kullanılmıştır. Spermanın konsantrasyon hazırlığı tamamlandıktan sonra tüp IVF'nin gerçekleştirileceği inkübatöre kapağı gevşek şekilde konarak solüsyonun ısınıp gazlanması sağlanmıştır.

Yumurtalar, *in vitro* olgunlaştırma solüsyonunda 24 saat süre bekletildikten sonra, IVF solüsyonunun bulunduğu döllenme damlalarına, her bir damlaya 10 – 12 adet yumurta olacak şekilde transfer edildiler. Transfer sonrası yumurtaların bulunduğu her damlaya sırasıyla, 2'şer µl olmak üzere sulandırılmış sperma, PHE ve heparin (2 µg/ml) eklenmiştir. Heparin ilavesinin ardından IVF petrisi, 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem, %5 CO₂ ve hava içeren inkübatöre konarak 18 saat süre ile bekletilmiştir.

IVF, inkübasyonunun 18. saatinin sonunda, IVF petrisi inkübatörden çıkartılmıştır. Petride bulunan döllendiği öngörülen yumurtalar kumulus hücrelerinden ve sperm artıklarından arındırılmak amacıyla otomatik pipet yardımıyla TL-HEPES solüsyonuna transfer edilerek en az üç kere yıkanmışlardır. Yıkama işleminin ardından tüm hücreler 100 µl. TL-HEPES solüsyonu ile birlikte toplanarak 1,5 mm'lik santrifüj tüpüne aktarılmışlardır. Santrifüj tüpü 3 dakika süre ile seri bir hızda vortekslenmiştir. Vorteks sonrası mekanik titreşim yardımıyla kumuluslarından arındırılan yumurtalar TL-HEPES Solüsyonuna transfer

edilerek burada da en az 3 kez yıkanmışlardır. Kumulus ve sperm artıklarından arındırılan, düzgün yumurta plazmaya, belirgin zona pellisudaya sahip canlı görünen yumurtalar seçilerek kültür solüsyonlarına transfer edilmişlerdir.

Embriyoların *in vitro* kültürleri SAGE-Yarıklanma ve SAGE-Blastosist sıralı kültür solüsyonları ve diğer grup olarak KSOM-SOF sıralı kültür solüsyonları olmak üzere iki farklı deney grubu altında gerçekleştirilmiştir.

SAGE-Yarıklanma ve SAGE-Blastosist sıralı kültür grubunda, ticari olarak elde edilen ve SAGE-Yarıklanma ve kültürün devamında ikincil solüsyon olarak kullanılan SAGE-Blastosist kültür solüsyonu kullanılmıştır. SAGE-Yarıklanma kültür solüsyonuna 8mg/ml BSA FAF ilave edilmişlerdir. Bu solüsyonda embriyolar 72 saat süre ile kültür edilmişlerdir. SAGE-Blastosist kültür solüsyonuna ise 4 mg/ml BSA FAF + %5 FCS ilave edilmiştir. Bu solüsyonda ise embriyolar 96 saat süre ile kültür edilmişlerdir.

KSOM-SOF sıralı kültür grubunda ise her iki kültür solüsyonu da laboratuarda protokoller dahilinde hazırlanmıştır. KSOM kültür solüsyonuna 1 mg/ml BSA A-3311 ilave edilmiştir. Bu solüsyonda embriyolar 48 saat süre ile kültür edilmişlerdir. SOF kültür solüsyonuna ise 10 mg/ml BSA A-3311 ilave edilmiştir. Bu solüsyonda ise embriyolar 120 saat süre ile kültür edilmişlerdir.

Her iki deney grubundaki embriyoların *in vitro* kültürleri 60 mm'lik IVF petrisine hazırlanan 30'ar µl'lik kültür damllarına, her damlaya yaklaşık 10 - 12 adet embriyo transfer edilerek gerçekleştirilmiştir. Tüm deney gruplarının *in vitro* kültürleri, 38,5 °C'de % 100'e yakın oranda nem ve %5 CO₂ + %5 O₂ ve hava içeren inkübatörde gerçekleştirilmiştir.

In vitro kültürün sonunda petriyer inkübatörden çıkartılarak embriyoların gelişimleri gözlenmiştir.

3.3. Blastosistlerin Farklı Camsı Yapı Dondurma Yöntemleri ile Dondurma ve Çözündürme Çalışmaları

Bu çalışmada iki farklı camsı yapı dondurma yöntemi denenmiş, çözündürme sonrasında en fazla oranda blastosist canlılığını gerçekleştiren camsı yapı dondurma yöntemi tespit edilmiştir.

Dondurma çalışmasında, 3.2.4.'sıra nolu başlık altında açıklanan "Farklı Kültür Solüsyonlarının Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi" adlı çalışma sonucu elde edilen blastosistler kullanılmıştır.

Her iki çalışmada da blastosistler sırasıyla ozmotik dengeleme solüsyonuna transfer edilmişlerdir ve sonra blastosistler dondurma solüsyonuna transfer edilip mevcut yöntem dahilinde blastosistlerin dondurulmaları gerçekleştirilmiştir. Dondurulan ya da dondurularak saklanmakta olan hücreler ise çözündürme solüsyonuna maruz bırakılarak çözündürülmüşlerdir.

Ozmotik dengeleme solüsyonu; az yoğunlukta şeker türevi kimyasal kimyasallar içeren, hücrelerin dondurulmalarından önce ozmotik dengelerini sağlamak amacıyla kullanılan ekilibrasyon solüsyonu olarak tanımlanırlar. Bu solüsyon, hücre içi ortam ile hücre dışı ortam arasındaki ozmotik dengenin sağlanması amacıyla kullanılmaktadır.

Dondurma solüsyonu; hücrelerin soğğun olumsuz etkilerinden korumak amacıyla çok yoğun miktarda şeker türevi dondan koruyucu kimyasalların bulunduğu solüsyondur. Bu solüsyona maruz kalan hücrelerin hücre içi sıvıları yaratılan negatif basınç sebebiyle hücre dışısına geçer ve bu sırada dondan koruyucu maddeler hücre içerisine girer ve böylelikle hücre içerisindeki buz kristallerinin oluşumu engellenmiş olunur.

Çözündürme solüsyonu; dondurma sırasında hücre içerisine geçirilen dondan koruyucu kimyasal maddelerin hücre dışısına çıkarılması ve hücre içerisine suyun yeniden transferi amacıyla kullanılan solüsyondur.

Çalışmada kullanılan camsı yapı ile dondurma yöntemleri:

a- Katı Yüzey Camsı Yapı Dondurma (Solid Surface Vitrificaton-SSV)

b- Klasik Camsı Yapı Dondurma

3.3.1. Katı Yüzey Camsı Yapı Dondurma (SSV) Yöntemi

Kullanılan kimyasallar ve solüsyonlar:

Tüm camsı yapı dondurma yöntemlerinde olduğu gibi katı yüzey camsı dondurma yönteminde de blastosistler ozmotik dengeleme solüsyonu ve dondurma solüsyonu olmak üzere iki farklı yoğunlukta birbirini izleyen soğuktan koruyucu madde içeren solüsyonlara maruz bırakılarak dondurulup, çözündürme solüsyonu ile çözündürülmüşlerdir.

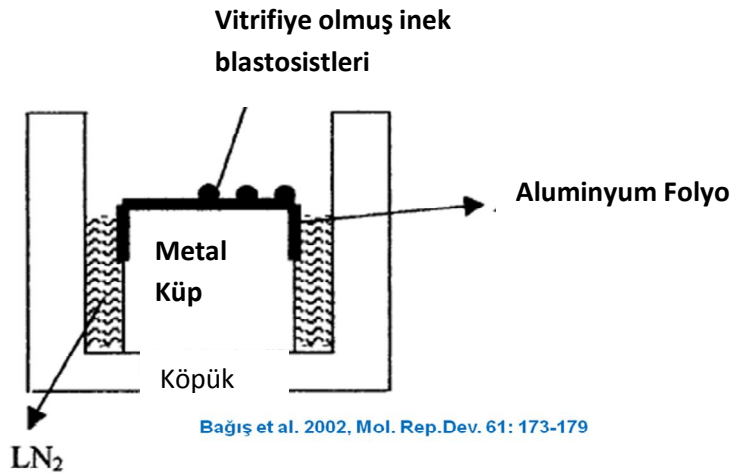
Çalışmada kullanılan tüm yıkama, ozmotik dengeleme ve dondurma solüsyonları deney günü taze olarak hazırlanmış ve solüsyonların hazırlanmasında kullanılan kimyasallar %20 FCS içeren TCM-199 solüsyonu içerisinde çözündürülmüştür.(EK-2)

Düzgün zona pelisudaya, belirgin iç hücre kitlesine sahip 8 günlük yaşta olan blastosist safhasındaki embriyolar, *in vitro* kültürün sonunda SAGE Blastosist solüsyonundan alınarak %20 FCS ilaveli TCM-199 yıkama solüsyonuna transfer edilmişlerdir ve bu solüsyonda en az 3 kez yıkanmışlardır. Kültür solüsyonundan iyice arındırılan blastosistler, 50 µl'lik ozmotik dengeleme damlasına transfer edilmişlerdir (EK-4). Blastosistler, osmotik dengeleme damlasında 12 dakika süre ile bekletilmişlerdir. Süre sonunda blastosistler ozmotik dengeleme damlasından alınarak 3 adet 20'şer µl'lik dondurma solüsyonunun bulunduğu damlalardan birincisine transfer edilmişlerdir (EK-5). Burada 5 saniye kadar bir süre bekledikten sonra blastosistler ikinci ve üçüncü damalara transfer edilerek yıkanmışlardır. Sonra her blastosist pipet yardımıyla alınarak, önceden hazırlanmış düzenek içerisinde bulunan sıvı azot yardımıyla -150 °C'ye kadar soğutulmuş metal yüzeye 2 - 3 µl'lik damlalar halinde bırakılmıştır (Dinnyes 2000, Bagis 2002, Akkoc 2006, Akkoc ve ark. 2011). Blastosistlerin dondurma solüsyonuna transferi ve solüsyondan alınarak metal yüzey üzerine bırakılmaları en fazla 30 saniye içerisinde gerçekleştirilmiştir.

Dondurma çalışmasının başarılı kanıtı, blastosistler dondurma solüsyonu içerisinde bekletildiği süre içerisinde hücre içi sıvılarını kaybettiklerinden dolayı yassı ve ince bir hal almaları gerekmektedir, başarının diğer bir ölçütü ise blastosistler dondurma damlaları halinde alüminyum yüzeye bırakıldıklarında, damlanın alüminyum yüzey üzerinde şeffaf bir görünümde olmaları gerekmektedir. Eğer damlalar şeffaf değil de mat renkte görünüyorsa bu başarılı bir dondurma olmamaktadır çünkü damlalarda buz kristallerinin şekillendiği unutulmamalıdır (Akkoc ve ark. 2011, 2012).

Damlalar halinde dondurulan blastosistler, 1 saat gibi kısa bir süre bekletildikten sonra çözündürülmüşlerdir. Çözündürme solüsyonu önceden ısıtıcı tabla üzerinde 38 - 39 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Alüminyum yüzey üzerinde dondurularak beklemekte olan blastosistlerin bulunduğu damlalar, önceden sıvı azota daldırılarak soğutulmuş pens yardımı ile alınarak 1 ml'lik çözündürme solüsyona bırakılmıştır. Blastosistler stereo mikroskop altında bulunarak pipet yardımı ile alınarak sırasıyla 1'er ml'lik 2. ve 3. çözündürme solüsyonlarına transfer edilmişlerdir (EK-6). Blastosistlerin çözündürme solüsyonuna maruz bırakılma süreleri en fazla 3 dakika olmaktadır.

Çözündürme sonrası canlılığını sürdüren zona pellisudası parçalanmamış blastosistler, çözündürme solüsyonundan alınarak 4 mg/ml BSA-FAF + %5 FCS içeren SAGE Blastosist solüsyonuna transfer edilerek %5 CO₂ ve %100'e yakın oranda nem içeren 38,5 °C'deki inkübatörde 1 gün boyunca kültür edilmişlerdir.



Şekil 3.8. Katı yüzey camsı yapı dondurma düzeneği

3.3.2. Klasik Camsı Yapı Dondurma Yöntemi

Tüm camsı yapı dondurma yöntemlerinde olduğu gibi klasik camsı dondurma yönteminde de blastosistler ozmotik dengeleme solüsyonu ve dondurma solüsyonu olmak üzere iki farklı yoğunlukta birbirini izleyen soğuktan koruyucu madde içeren solüsyonlara maruz bırakılarak dondurulup, çözündürme solüsyonu ile çözündürülmüşlerdir.

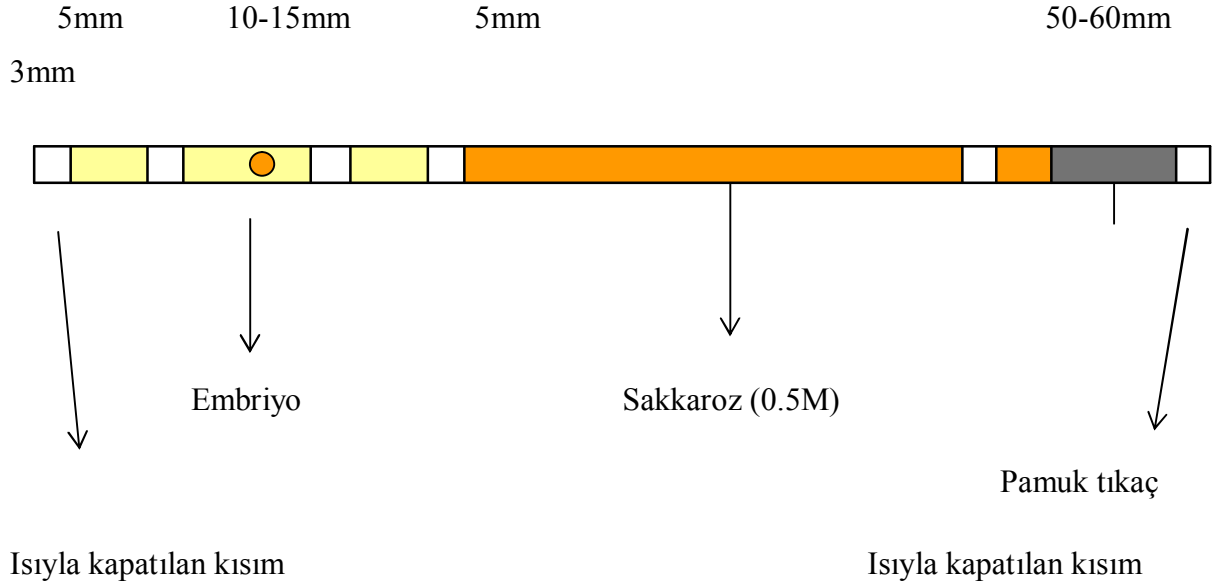
Çalışmada kullanılan tüm yıkama, ozmotik dengeleme ve dondurma solüsyonları deney günü taze olarak hazırlanmış ve solüsyonların hazırlanmasında kullanılan kimyasallar M-PBS temel solüsyonu içerisinde çözündürülmüştür (EK-8).

Klasik camsı dondurma çalışmasında ozmotik dengeleme solüsyonu yerine artan yoğunluklarda olan 3 adet dondurma solüsyonu kullanılmıştır.

90 ml. petri alınıp 100 µl.'lik dondurma solüsyonlarından oluşan damlacıklar hazırlanmıştır. Son damlacık 150 – 200 µl olacak şekilde hazırlandı. Önce embriyonun VS1 (Vitrifikasyon Solüsyonu) solüsyonuna (EK-9) taşınacağı pipete bir miktar VS1 çekildi ve embriyonun içerisinde bulunduğu solüsyondan mümkün olduğunca düşük miktar almak kaydıyla embriyo VS1 solüsyonuna taşındı ve kronometre çalıştırıldı ve 5 dakika süre ile bekletildi. Embriyo iki kez daha VS1 solüsyonunda yıkandı. Aynı işlem VS2 solüsyonu (EK-10) için yapılmıştır.

Embriyo VS3 solüsyonuna (EK-11) alınmadan önce payet hazırlandı ve etiketlendi. Embriyo VS3 solüsyonunun ilk damlacığına alındı seri bir şekilde diğerinde yıkayıp daha büyük damlaya transfer edilerek vakit kaybetmeden payete çekildi. Payetin her iki ucu ısıyla kapatıp önce embriyonun bulunduğu kısım 45 derecelik açı yapacak şekilde sıvı azota daldırıldı ve birkaç saniye sonra payet tamamen sıvı azot içine bırakıldı ve donduruldu.

VS1 (5 dk) → VS2 (5 dk) → VS3 (<1dk) → Sıvı azot



Şekil 3.9. Embriyoların payetlenmesi

Çözündürme ve Dondan Koruyucu Kimyasal Maddelerin Uzaklaştırılması:

Payeti sıvı azottan çıkartılıp 5 - 6 sn havada tutuldu ve direkt olarak 20°C'deki suyun içerisine daldırıldı ve sakkarozun tamamen erimesi sağlandı. Payet sudan çıkarıp kurulandıktan sonra her iki tarafından kesip bir petri kabının içerisine boşaltıldı. Stereo mikroskop altında embriyolar bulundu ve 0.5 M sakkaroz solüsyonuna (EK-13) alıp burada 5 dakika bekletildi sonra embriyolar 0.25 M sakkaroz solüsyonuna (EK-14) transfer edilerek 5 dakika bekletildi. Embriyolar, yıkama solüsyonu olan D-PBS+%20 FCS solüsyonuna transfer edilerek embriyoların kalite değerlendirmesi yapıldı. Kalite değerlendirilmesinde çözündürülen blastosistlerin zona pelisudalarının kırık olup olmamasına bakılmıştır. Çözündürülen blastosistler bir gece boyunca yaklaşık 18 saat süre kadar *in vitro* kültürleri devam ettiler ve kültür sonrasında perivitellin boşlukta dejenere hücre döküntüleri olmayan düzgün trofektoderme sahip, blastosol boşluğu oluşmuş embriyolar canlı olarak değerlendirilmiştir.

3.4. Çözündürülen Blastosistlerin Toplam Çekirdek Sayılarının Tespiti Amacıyla Floresan Boyama (Hoechst 33342) Yöntemi ile Boyanması

Çözündürülen blastosistlerin ve kontrol grubu olarak dondurulmayan *in vitro* kültürleri tamamlanan blastosistlerin çekirdek sayılarının belirlenmesi amacıyla blastosistler Hoechst 33342 yöntemi ile boyanmışlardır.

3.4.1. Floresan Boyanın Hazırlanması ve Uygulanması

2 mg bisbenzimidide (Hoechst 33342), 1 ml PBS ile sulandırılarak ana stok hazırlanmıştır. Hazırlanan ana stoklardan 1 ml alınarak 9 ml gliserol ile karıştırılarak boya final solüsyonu hazırlanmıştır.

Hazırlanan bu final boya solüsyonu direkt olarak genişlemiş blastosistlerin boyanarak toplam çekirdek sayılarının belirlenmesi için kullanılmıştır (Bagis ve ark. 2003, Rall 1987, Akkoc ve ark. 2011).

Her blastosist, oda ısısında 100 mm'lik bakteriyolojik petri kabında bulunan 10µl'lik boyama damlasına bırakılmıştır ve burada yağlarından arındırılan blastosist temiz ağız pipeti yardımıyla aynı petri kabında 5 µl'lik damla halinde bulunan aynı boyama damlasına transfer edilmiştir. Blastosist bu damlada 10 dakika süre ile petrinin üzeri kapalı karanlık bir ortam oluşturularak bekletilmiştir.

Süre sonunda blastosist boyama solüsyonundan alınarak lam üzerine yaklaşık 1 - 2 µl'lik damla boya ile bırakılmış ve üzeri lamel ile kaplanmıştır. Ters mikroskop (Zeiss axiovert 35 M) altında 40X büyütmede blastosistlerin boyanan çekirdekleri sayılmıştır.

Sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan istatistiksel değerlendirmeler SPSS (Release 5.0.1-SPSS INC.,1989 to 1992) paket programı kullanılarak yapıldı. Deneyler 5'er kez tekrarlanmıştır. Yapılan karşılaştırmalarda p değeri $\leq 0,05$ bulunduğunda, gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4 ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. IVF Çalışmaları

Bu çalışmada, 4 farklı IVF çalışması gerçekleştirilmiştir. Farklı kültür ve dölleme solüsyonları, yumurta olgunlaştırma ve sperm ayırıştırma teknikleri, kültür sistemleri denenmiş ve en uygun protokol ortaya konmuştur.

IVF ve *in vitro* embriyo kültürü sonunda elde edilen blastosist safhasındaki embriyolar iki farklı camsı yapı dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülmüş, çözündürme sonrasında gerçekleştirilen *in vitro* embriyo kültürü sonucunda blastosistlerin yeniden canlılıklarını ve gelişimlerinin devamlılığını sürdürmesi incelenmiş, floresan boyama gerçekleştirilerek toplam çekirdek sayıları araştırılmıştır.

4.1.1. Yumurtaların Farklı Olgunlaştırma Sürelerinin Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, olgun olmayan yumurtalar iki farklı gruba ayrılmıştır. Yumurtalar, aynı olgunlaştırma solüsyonuna ve kültür koşullarına maruz bırakılıp, aynı IVF yöntemi ile dölleme prosedürü ve *in vitro* kültürü uygulanmıştır.

Birinci deney grubundaki yumurtalar 22 saat, ikinci deney grubunda ise 24 saat süre ile olgunlaştırma solüsyonu içerisinde %5 CO₂ gaz içeren yüksek nem ve 38,5 °C'deki inkübatörde olgunlaştırılmıştır.

Olgunlaştırma süresinin 22 saat olarak uygulandığı 1. deney grubunda toplam 293 adet olgun olmayan yumurta kullanılmıştır. Olgunlaştırma süreci sonrasında yumurtalar IVF yapıldıktan sonra *in vitro* kültüre alınmışlardır. *In vitro* kültür sonrasında bu yumurtalardan 165 adedi (%56,3) 2, 4 ve 8 hücreli safhalara doğru bölünme göstermiştir. Bölünmeyi takiben gerçekleşen *in vitro* kültür sonucunda 293 adet yumurtadan 31 adet (%10.6) blastosist elde edilmiştir.

Olgunlaştırma süresinin 24 saat olarak uygulandığı 2. deney grubunda toplam 280 adet olgun olmayan yumurta kullanılmıştır. Olgunlaştırma süreci sonrasında yumurtalar aynı

yöntem ile yapay döllenenek *in vitro* kültüre alınmışlardır. *In vitro* kültür sonrasında bu yumurtalardan 158 adedi (%56,4) 2, 4 ve 8 hücreli safhalara doğru bölünme göstermiştir. Bölünmeyi takiben gerçekleşen *in vitro* kültür sonucunda 280 adet yumurtadan 46 adet (%16,4) blastosist elde edilmiştir (**Çizelge 4.1**).

Çizelge 4.1. Yumurtalarda farklı olgunlaştırma sürelerinin blastosist gelişimi üzerine etkisi

Olgunlaştırma süresi S (saat)	Döllenmeye alınan yumurta sayısı	Bölünen embriyo oranı (%)	Blastosist oranı (%)	Bölünen embriyodan elde edilen blastosist oranı (%)
22 S Olgunlaştırma	293	165/293 ^a (%56,3)	31/293 ^a (%10,6)	31/165 ^a (%18,8)
24 S Olgunlaştırma	280	158/280 ^a (%56,4)	46/280 ^b (%16,4)	46/158 ^b (%29,1)

a/b : p<0.05

Bu deneyin sonucunda, 24 saat süre ile olgunlaştırma uygulanan deney grubundaki blastosist oranı (%16,4) ve bölünen embriyolardan elde edilen blastosist oranı (%29,1), 22 saat süre ile olgunlaştırma uygulanan deney grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur (P<0.05, P<0.03). Bununla birlikte, olgun olmayan yumurtaların 24 saat süre ile olgunlaştırılmaları sonucunda elde edilen bölünme oranları 22 saat süre ile olgunlaştırma uygulanan deney grubuna göre daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı farka ulaşmamıştır (P>0.05).

4.1.2. Betamerkaptoethanolün Yumurta Olgunlaştırma ve IVF Sonrası Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, Betamerkaptoethanolün (BME) olgun olmayan yumurtaların olgunlaştırılması ve olgunlaştırmayı takiben gerçekleştirilen IVF sonrası blastosist gelişimi üzerine etkisi araştırılmıştır.

Deney grubunda, olgun olmayan yumurtaların olgunlaştırılacağı olgunlaştırma solüsyonuna 100 µm Betamerkaptoethanol/ml ilavesi gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubunda olgun olmayan yumurtaların olgunlaştırılacağı olgunlaştırmasında ise kontrol amaçlı olarak standart *in vitro* olgunlaştırma solüsyonu kullanılmıştır.

Yumurtaların olgunlaştırılmaları 38,5 °C ısıda, CO₂ gaz içeren yüksek nem içeren inkübatörde 22 süre bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Olgunlaştırma sürecini takiben olun olduğu öngörülen yumurtalar çözündürülen spermalar ile IVF yapılarak *in vitro* embriyo kültürleri gerçekleştirilmiştir.

100 µM Beta Merkaptethanol/ml. içeren olgunlaştırma solüsyonuna 176 adet olgun olmayan yumurta konmuştur. Embriyo kültürü sonucunda bu embriyolardan 45 adedinde (%25,6) bölünme göstermiş ve kültürün devamında 5 adet (%2,8) embriyo blastosist safhasına ulaşmıştır. Kontrol grubunda ise 341 adet olgun olmayan yumurta *in vitro* olgunlaştırma solüsyonuna transfer edilmiştir. Gerçekleşen *In vitro* embriyo kültürü sonucunda 130 adedinde (%25,6) bölünme gerçekleşmiş ve kültürün devamında 18 adet (%5) blastosist safhasında embriyo elde edilmiştir (**Çizelge 4.2**)

Olgunlaştırma solüsyonunda BME kullanılması BME kullanılmayan gruba göre daha az oranda blastosist gelişimine neden olmuştur. (Akkoc ve ark. 2010)

Çizelde 4.2. Kullanılan BME'nin yumurtaların olgunlaştırılmasına ve blastosist safhasına gelişimi üzerine etkisi.

Kültür Grubu	Döllenmeye alınan yumurta sayısı	Bölünen embriyo oranı (%)	Blastosist oranı (%)	Bölünen embriyodan elde edilen blastosist oranı (%)
Olgunlaştırma Solüsyonu (Kontrol)	341	130/341 ^a (%38)	18/341 ^a (%5)	18/130 ^a (%13,7)
100 µM Beta merkaptethanol/ml. içeren Olgunlaştırma Solüsyonu	176	45/176 ^b (%25,6)	5/176 ^a (%2,8)	5/45 ^a (%11)

a/b : p<0.05

Bu deneyin sonucunda, 100 µM Betamerkaptoethanol/ml içeren olgunlaştırma solüsyonu kullanılarak olgunlaştırılan yumurtaların IVF ve *in vitro* kültür sonrasında blastosiste ulaşma oranları, kontrol grubun kıyasla istatistiksel olarak düşük bulunmuştur. (P<0.008). Bununla birlikte kontrol grubunda blastosist oranı (%5) ve bölünen embriyodan elde edilen blastosist oranı (%13,7), 100 µM Betamerkaptoethanol/ml içeren olgunlaştırma solüsyonu kullanılan gruba göre daha yüksek çıkmasına karşın istatistiksel olarak anlam kazanmamıştır (p>0.05).

4.1.3. Farklı Kültür Solüsyonlarının ve Yumurtaların Sperma ile Döllenme Sürelerinin Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada iki farklı *in vitro* kültür solüsyonu ve yumurtaların sperma ile döllenme sürelerinin, IVF sonrasında hücrelerin blastosist gelişimine üzerine etkileri araştırılmıştır.

Olgun olmayan yumurtalar, ovaryumlardan aspire edilip olgunlaştırma solüsyonunda 22 saat süre ile 38,5 °C ısıda, CO₂ gaz içeren ve yüksek neme sahip inkübatörde olgunlaştırıldıktan sonra percoll gradiyent ayırıştırma çözeltisinde ayırıştırılan canlı spermatazoonlar ile birlikte IVF solüsyonuna transfer edilmişlerdir. IVF süreci, 6 ve 18 saat olmak üzere iki farklı zaman periyodunda denenmiştir. Her döllenme süreci ise kendi arasında

iki farklı deney grubuna ayrılıp SAGE HTF ve KSOM-SOF olmak üzere iki farklı kültür solüsyonunda *in vitro* kültürleri gerçekleştirilmiştir.

Çalışmanın sonucunda, 6 saat IVF sürecinin sonrasında hem SAGE-HTF solüsyonunda hem de KSOM-SOF solüsyonunda gerçekleşen *in vitro* kültür sonucunda elde edilen bölünme oranı sırasıyla %13,6 ve %12,1 blastosist oranı sırasıyla % 1,8 ve %0 olarak bulunmuştur. Altı saatlik fertilizasyon süreci sonrasında KSOM-SOF solüsyonunda gerçekleşen *in vitro* kültür sonrasında ise elde edilememiştir. Diğer deney grubu olan 18 saat IVF sürecinin sonrasında hem SAGE-HTF solüsyonunda hem de KSOM-SOF solüsyonunda gerçekleşen *in vitro* kültür sonucunda elde edilen bölünme oranı sırasıyla %52,8 ve %53,8 olmakla beraber elde edilen blastosist oranı sırasıyla %4,1 ve %1 olmaktadır (**Çizelge 4.3**).

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, 18 saatlik IVF süresinin 6 saatlik IVF süresine göre daha iyi olduğu gösterilmiştir. Özellikle, embriyoların 18 saat süre ile yapılan IVF ve IVF sonrasında KSOM-SOF solüsyonunda gerçekleşen *in vitro* kültür sonunda elde edilen bölünme oranı 6 saat süre ile yapılan IVF ve IVF sonrası aynı kültür solüsyonunda gerçekleşen *in vitro* kültürü sonrasındaki bölünme oranı bakımından anlamlı fark bulunmuştur ($p < 0,05$).

Çizelge 4.3. Farklı dölleme sürelerinin ve kültür solüsyonların blastosist gelişimi üzerine etkisi

Deney Grubu	IVF Süresi	Döllenmeye alınan yumurta sayısı	Bölünen embriyo oranı (%)	Blastosist oranı (%)	Bölünen embriyodan elde edilen blastosist oranı (%)
SAGE-Yarıklanma SAGE-Blastosist	6 Saat	110	15/110 ^a (%13,6)	2/110 ^a (%1,8)	2/15 ^a (%13,3)
KSOM - SOF	6 Saat	66	7/66 ^a (%12,1)	0/66 ^a (%0)	0/7 ^a (%0)
SAGE-Yarıklanma SAGE-Blastosist	18 Saat	123	65/123 ^b (%52,8)	5/123 ^a (%4,1)	5/65 ^a (%7,7)
KSOM - SOF	18 Saat	93	50/93 ^b (%53,8)	1/93 ^a (%1)	1/50 ^a (%2)

a/b : p<0.05

Bu deneyin sonucunda, 18 saat dölleme sonrası SAGE-Yarıklanma & SAGE-Blastosist grubunda bölünen embriyo oranı (%52,8), 6 saat dölleme sonrası SAGE-Yarıklanma & SAGE-Blastosist grubuna ve 6 saat dölleme sonrası KSOM – SOF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (P<0.05). Bununla birlikte gruplar arasında blastosist oranı ve bölünen embriyodan elde edilen blastosist oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (P>0.05).

18 saat dölleme sonrası KSOM - SOF grubunda bölünen embriyo oranı (%53,8), 6 saat dölleme sonrası SAGE-Yarıklanma & SAGE-Blastosist grubuna ve 6 saat dölleme sonrası KSOM – SOF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (P=0.001). Bununla birlikte gruplar arasında Blastosist oranı ve bölünen embriyodan elde edilen blastosist oranı (%) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (P>0.05) (Akkoc ve ark. 2009a).

4.1.4. Farklı Kùltür Solüsyonlarının Blastosist Gelişimi Üzerine Etkisi

Bu çalışmada, 24 süre ile *in vitro* olgunlaştırılan yumurtaların, çözüldürülen spermatazoonlar ile IVF leri sonrasında gerçekleştirilen *in vitro* kùltürde kullanılan iki farklı kùltür solüsyonunun blastosist gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Her iki deney grubunda IVF 18 saat süre ile yapılmıştır.

Birinci deney grubunda olgunlaştırma işlemi ve IVF sonrasında hücreler SAGE-Yarıklanma solüsyona transfer edilmiş ve 72 saat süre ile *in vitro* kùltürleri gerçekleştikten sonra embriyolar SAGE-Blastosist solüsyona transfer edilmiştir. İkinci deney grubunda ise olgunlaştırma işlemi ve IVF sonrasında hücreler KSOM solüsyonuna transfer edilmiştir. Bu solüsyonda *in vitro* kùltürleri 48 saat süre ile kùltür edildikten sonra SOF solüsyonuna transfer edilmişlerdir. Çalışmada, 88 adet zigot olduğu öngörülen hücre SAGE-Yarıklanma ve SAGE-Blastosist kùltür solüsyonlarına sırayla transfer edilerek *in vitro* kùltürleri gerçekleştirilmiş ve kùltür sırasında 56 adet hücrede bölünme gözlenmiş ve kùltürün devamında bu hücrelerden 14 adedi (%15,9) blastosist safhasına ulaşmıştır.

Diğer deney grubunda ise 60 adet zigot olduğu öngörülen hücre sırasıyla KSOM-SOF kùltür solüsyonlarına transfer edilmiş, kùltürün devamında bu hücrelerden 1 adedi (%1,7) blastosist safhasına ulaşmıştır (**Çizelge 4.4.**).

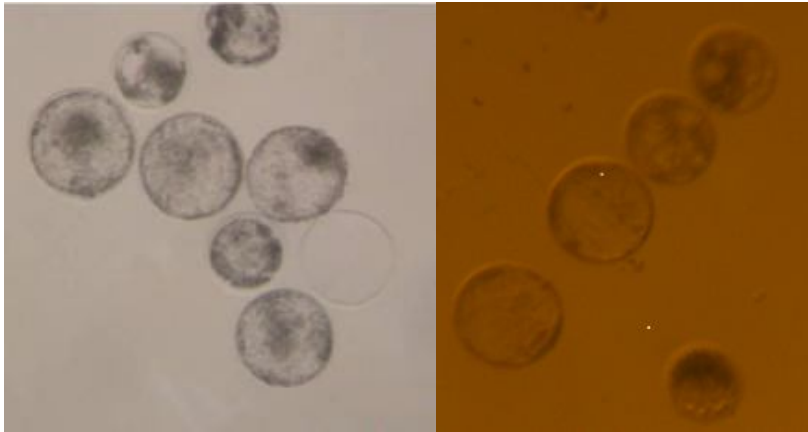
Çalışmanın sonucunda 1. Deney grubunda embriyo kùltürü çalışmasında kullanılan SAGE-Yarıklanma ve SAGE-Blastosist solüsyonu kullanımının KSOM ve SOF kùltür solüsyonu kullanımına göre daha yüksek oranda blastosist gelişimi gösterdiği istatistiksel olarak kanıtlanmıştır.($P<0.05$) (Akkoç ve ark. 2009b).

Çizelge 4.4. Farklı kültür solüsyonlarının *in vitro* embriyo gelişimi üzerine etkileri

Kültür Grubu	IVF alınan yumurta sayısı	Bölünen embriyo oranı (%)	Blastosist oranı (%)	Bölünen embriyodan elde edilen blastosist oranı (%)
SAGE-Yarıklanma SAGE-Blastosist	88	56/88 (%63,6)	14/88 ^a (%15,9)	14/56 ^a (%25)
KSOM - SOF	60	37/60 (%61,7)	1/60 ^b (%1,7)	1/37 ^b (%2,7)

a/b : $p < 0.05$

Bu deneyin sonucunda, 18 saat döllenme sonrası HTF IVF solüsyonu kullanılarak sperm yumurta inkübasyonu yapılan bu çalışmada, SAGE-Yarıklanma & SAGE-Blastosist grubunda blastosist oranı ve bölünen embriyodan elde edilen blastosist oranı, KSOM – SOF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. ($P=0.01$, $P=0.02$).



Şekil 4.1. SAGE Yarıklanma – SAGE Blastosist Kültür solüsyonları kullanılarak elde edilen blastosistler

4.2. Blastosistlerin Farklı Camsı Yapı Dondurma Yöntemleri ile Dondurma ve Çözündürme Çalışmaları

Bu çalışmada, IVF ve *in vitro* embriyo kültürü sonucunda blastosist safhasına ulaşmış 8 günlük blastosistler katı yüzey camsı dondurma (SSV) ve klasik camsı yapı dondurma (Payet Vitrifikasyonu) yöntemleri ile dondurulup çözündürülmüş ve çözündürme sonrası devam eden *in vitro* kültür sonrasında embriyonel gelişimin devamlılığı incelenmiştir. Embriyo kültürünün sonunda elde edilen blastosistlerin hücre sayıları floresan boyama yöntemi ile boyanarak tespit edilmiş ve embriyo gelişimleri değerlendirilmiştir.

Blastosist safhasına ulaşan 8 günlük blastosist safhasındaki embriyolar; katı yüzey camsı yapı dondurma ve klasik camsı yapı dondurma yöntemi ve kontrol grubu olmak üzere 3 farklı gruba ayrıştırılmıştır. Katı yüzey camsı yapı ve klasik camsı yapı dondurma deney gruplarında 23'er adet blastosist, kontrol grubunda ise 17 adet blastosist kullanılmıştır.

Dondurulan blastosistler en geç 1 saat içerisinde çözündürülerek 24 saat süre kadar *in vitro* embriyo kültürlerine devam edilmiştir, kontrol grubu blastosistlerde ise herhangi bir dondurma işlemi uygulanmamış olup diğer dondurup çözündürülen blastosistlerde uygulanan taze *in vitro* kültür solüsyonlarına transfer edilerek kültüre 24 saat süre kadar devam edilmiştir. Dondurulup çözündürülen ve kontrol amaçlı kültürlerine devam edilen tüm blastosistlerin embriyonel gelişimler gözlenmiş olup floresan boyama yapılarak toplam hücre sayılarına bakılmıştır.

Çalışmanın sonucunda, Katı yüzey camsı dondurma yöntemiyle dondurulup çözündürülen 23 adet blastosistten 19 adedi (%82,6) çözündürme sonrası canlılığını sürdürmüştür. Dondurulan 23 adet blastosistin çözündürülmesi sonrasında gerçekleşen *in vitro* embriyo kültürü sonucunda 12 adet (%52,2) blastosist ekspande olmuş, 4 adedinin ise (%17,4) zona pelisudası yırtılarak iç hücre kitlesi dışarıya doğru çıkmıştır. Klasik camsı yapı dondurma yöntemiyle dondurulup çözündürülen 23 adet blastosistten 8 adedi (%34,8) mevcut embriyonel gelişimini sürdürmüş, *in vitro* embriyo kültürünü takiben 2 adet (%8,7) blastosist ekspande olup, 1 adet (%4,3) blastosistin zona pelisudası yırtılarak iç hücre kitlesi dışarıya doğru çıkmıştır. Kontrol grubu olarak dondurulup çözündürülmeden mevcut *in vitro* embriyo kültürü yapılan 17 adet blastosistin 6 adedi (%35,3) ekspande olmuş, gerçekleşen *in vitro* embriyo kültürünü takiben 9. Günlük yaşa ulaşan blastosistlerin 11 adedinin (%64,7) zona pelisudaları yırtılarak iç hücre kitleleri dışarıya çıkmıştır (**Çizelge 4.5**).

Dondurulup çözündürülen blastositler ile kontrol grubu blastosistlerin embriyonel gelişimlerinin gözlemlenmesi amacıyla yapılan floresan boyama sonrası kontrol grubu blastosistlerin ortalama hücre sayısı 213 olmakla beraber, katı yüzey camsı yapı dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülen blastosistlerin ortalama hücre sayısı 124, klasik camsı yapı dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülen blastosistlerin ise 104 olmaktadır (**Çizelge 4.6**).

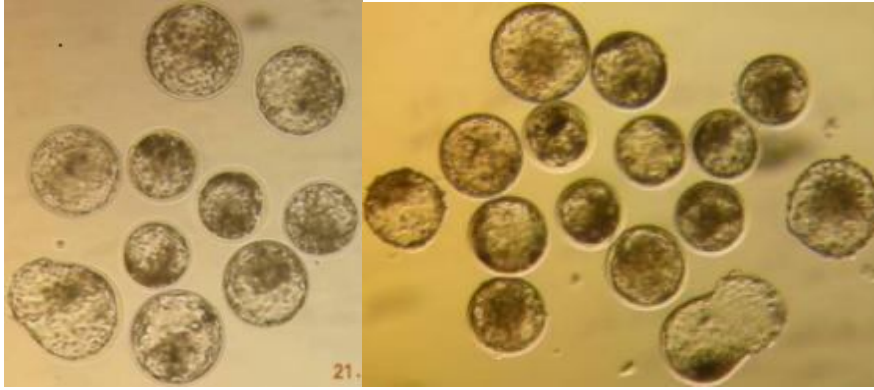
Sekiz günlük blastosistlerin dondurulmasında uygulanan katı yüzey camsı yapı dondurma yönteminin, klasik camsı yapı dondurma yöntemine göre, dondurulan blastosistlerin hem çözündürme sonrası gelişimlerinin devamlılığı açısından hem de toplam hücre sayıları bakımından daha avantajlı bir yöntem olduğu gözükmektedir (Akkoc ve ark. 2011, 2012).

Çizelge 4.5. Katı yüzey camsı yapı ve klasik camsı yapı yöntemleri ile dondurup çözündürülen blastosistlerin çözündürme sonrasındaki gelişim oranları

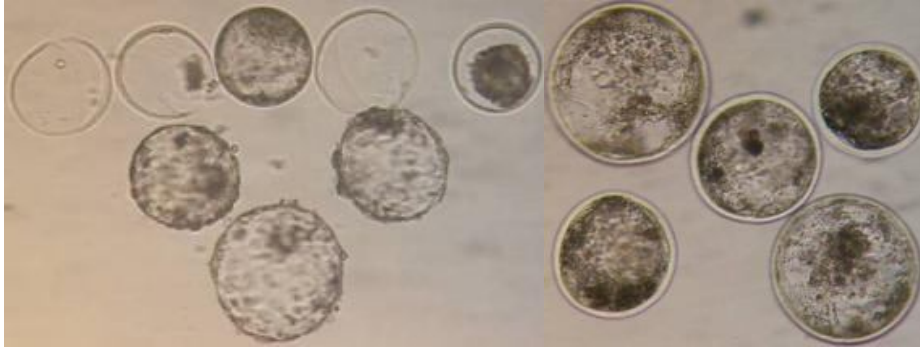
Deney grupları	Dondurulup çözündürülen blastosist adedi	Çözündürülen blastosistlerin canlılık oranları (%)	Expande olmuş çözündürülmüş blastosistlerin oranı (%)	Zonası çatlamış blastosist oranı (%)
Katı Yüzey Camsı Yapı Dondurma (SSV)	23	19/23 (%82,6) ^a	12/23 (%52,2) ^a	4/23 (%17,4) ^a
Klasik Camsı Yapı Dondurma (Payet Vitrifikasyonu)	23	8/23 (%34,8) ^b	2/23 (%8,7) ^b	1/23 (%4,3) ^b
Kontrol Grubu (Dondurulmamış Grup)	17	17/17 (%100) ^a	6/17 (35,3) ^a	11/17 (%64,7) ^a

Çizelge 4.6. Camsı yapı dondurma grupları ve çözme sonrası toplam hücre sayıları

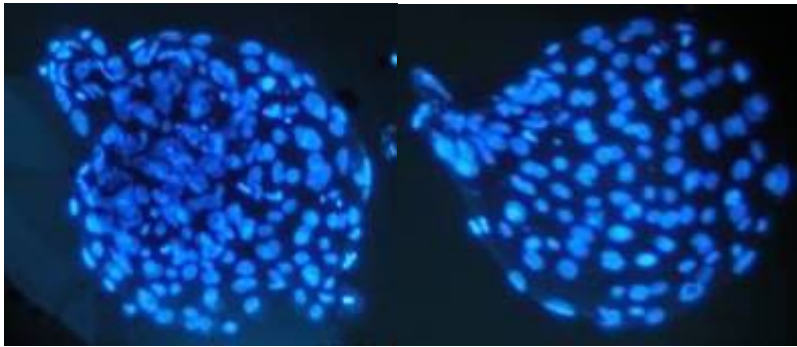
Deney Grubu	Blastosist No	Hücre Sayısı	Ortalama Hücre Sayısı
Katı Yüzey Camsı Yapı Dondurma (SSV)	1. Blast	87	124
	2. Blast	130	
	3. Blast	160	
	4. Blast	200	
	5. Blast	240	
	6. Blast	70	
	7. Blast	67	
	8. Blast	84	
	9. Blast	87	
	10. Blast	100	
	11. Blast	160	
	12. Blast	110	
	13. Blast	120	
Klasik Camsı Yapı Dondurma	1. Blast	125	104
	2. Blast	145	
	3. Blast	178	
	4. Blast	70	
	5. Blast	104	
	6. Blast	55	
	7. Blast	70	
	8. Blast	85	
Kontrol Grubu	1. Blast	140	213
	2. Blast	210	
	3. Blast	260	
	4. Blast	200	
	5. Blast	210	
	6. Blast	270	
	7. Blast	340	
	8. Blast	168	
	9. Blast	250	
	10. Blast	140	
	11. Blast	160	
	12. Blast	210	



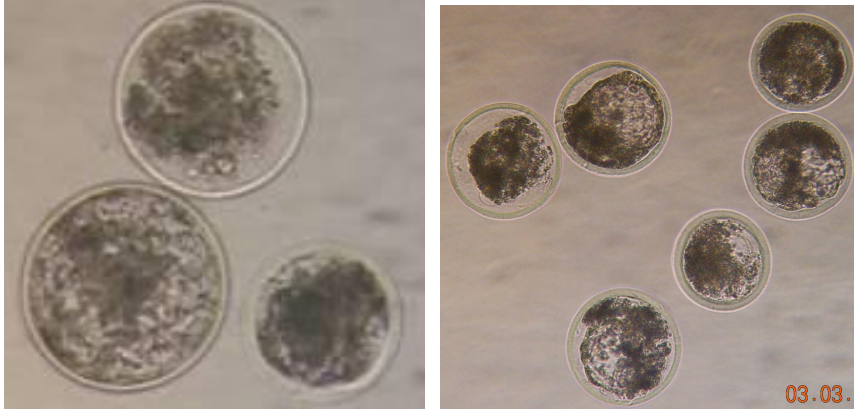
Şekil 4.2. Dondurma çalışması kapsamında kullanılan blastosistler



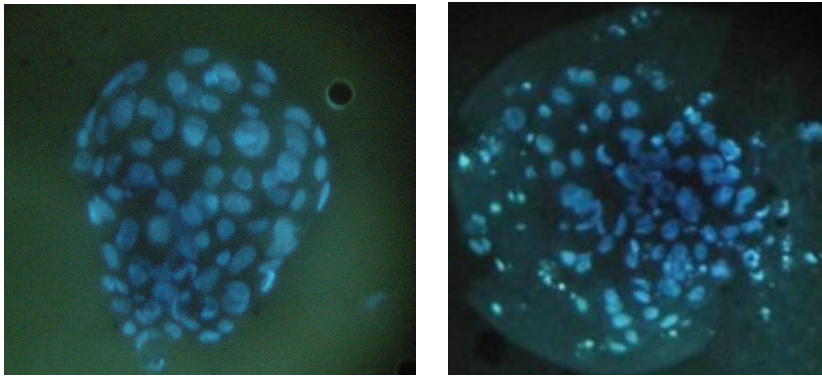
Şekil 4.3. Katı yüzey camsı yapı dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülen blastosistler



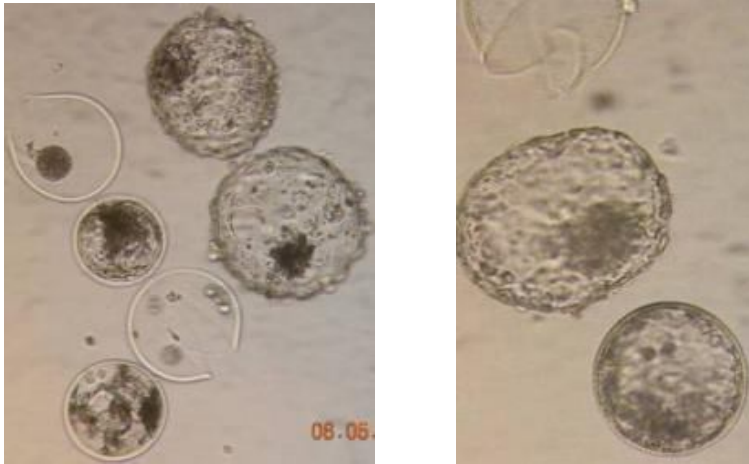
Şekil 4.4. Katı yüzey camsı yapı dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülen blastosistlerin Bis-Benzemide (Hoescht-33342) ile boyaması sonucu çekirdek görüntüleri.



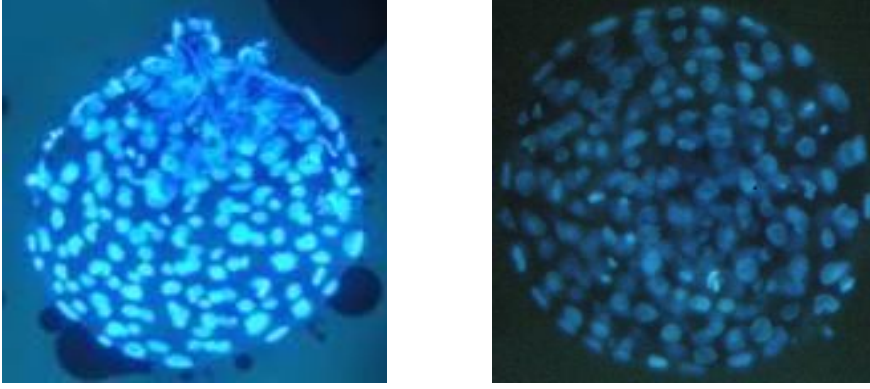
Şekil 4.5. Klasik camı yapı dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülen blastosistler



Şekil 4.6. Klasik camı yapı dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülen blastosistlerin Bis-Benzemide (Hoescht-33342) ile boyaması sonucu çekirdek görüntüleri



Şekil 4.7. Kontrol grubu blastosister



Şekil 4.8. Kontrol grubu blastosistlerin Bis-Benzemide (Hoescht-33342) ile boyaması sonucu çekirdek görüntüleri

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sunulan tez çalışmasında, 1) Farklı IVF yöntemleri uygulanmış ve embriyo kültür solüsyonların *in vitro* sığır blastosist üretimi üzerine etkileri incelenmiş, 2) IVF sonucu elde edilen blastosistler katı yüzey camsı yapı dondurma ve klasik camsı yapı dondurma (Payet Vitrifikasyonu) yöntemleri kullanılarak dondurulup çözündürülmüş ve çözündürme sonrası bu blastosistlerin canlılık oranları ve toplam hücre sayıları araştırılmıştır.

Bu çalışmada, olgun olmayan yumurtaların farklı zaman periyodunda olgunlaştırılmaları, dondurulup çözündürülen spermalar ile olgun yumurtaların farklı IVF yöntemleriyle döllenmesi ve elde edilen embriyoların farklı solüsyonlarda *in vitro* kültürleri 4 farklı çalışma kapsamında araştırılmıştır. Bu dört çalışmada sırasıyla, 1) yumurtaların farklı olgunlaştırma sürelerinin blastosist gelişimi üzerine etkisi, 2) betamerkaptoethanolün yumurta olgunlaştırma ve yapay döllenme sonrası blastosist gelişimi üzerine etkisi, 3) farklı embriyo kültür solüsyonlarının ve yumurtaların sperma ile döllenme sürelerinin blastosist gelişimi üzerine etkisi ve 4) farklı kültür solüsyonlarının blastosist gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. En fazla oranda blastosist eldesinin gerçekleştiği çalışma sonunda elde edilen blastosistler katı yüzey camsı yapı dondurma ve klasik camsı yapı dondurma yöntemleri kullanılarak dondurulup çözündürülmüş ve bu blastosistlerin canlılık oranlarına bakılmıştır.

Tez aşamasında gerçekleşen IVF çalışmaları kapsamında ilk olarak, ovaryumlardan izole edilen olgun olmayan yumurtaların en uygun *in vitro* olgunlaştırma süreleri araştırılmıştır. Yumurtaların *in vitro* olgunlaştırılmalarında 22 ve 24 saat olmak üzere iki farklı süre denenmiştir. Yumurtaların olgunlaştırılması sonrasında, IVF'yi takiben *in vitro* embriyo kültürü sonucunda 22 saatlik olgunlaştırma grubunda kullanılan 293 hücreden ise toplam 31 adet (%10,6) blastosist elde edilmiştir. 24 saatlik olgunlaştırma periyodu sonrası 280 adet olgun yumurtadan toplam 46 adet blastosist (%16,4) elde edilmiştir.

Agung ve arkadaşları, farklı olgunlaştırma süresinin yumurta gelişimi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, özellikle 16. saatlik olgunlaştırma süresinde, metafaz II'ye ulaşan yumurta oranını %63,6 olarak elde etmeleri ile birlikte blastosist eldesini %13,5 olarak bulmuşlardır. Olgunlaştırma süresi 22 saate arttırıldığında yumurtaların metafaz II'ye ulaşma oranını % 85,3 olarak rapor etmişler ve blastosist oranı %22,7 gibi yüksek orana çıktığını göstermişlerdir. Bununla birlikte, olgunlaştırma süreci 28. saate çıkarıldığında yumurtaların

metafaz II'ye ulaşma oranları ve blastosist oranı düştüğü gösterilmiştir (Agung ve ark. 2006). Birler ve arkadaşlarının (1997) yapmış olduğu bir çalışmanın sonucunda ise 22 saatlik olgunlaştırma süresinin sığır yumurtalarının *in vitro* olgunlaştırılmasında yetersiz kaldığı, 24 ve 26 saatlik olgunlaştırma sürelerinin uygulanması ile daha yüksek oranda blastosist safhasındaki embriyoların elde edilmesinin mümkün olacağı belirtilmiştir.

Bizim yapmış olduğumuz çalışmada 24 saatlik olgunlaştırma süresinin 22 saatlik olgunlaştırma periyodunu takiben gerçekleşen IVF ve sonrası *in vitro* embriyo kültürüne göre daha yüksek oranda blastosist safhasında embriyo elde edilmiştir. Bu sonuçlar, bahsedilen çalışmaları desteklemektedir.

Mizushima ve Fukui (2000) yaptıkları çalışmada, 5 µM betamerkaptoethanol ve % 0,1 polivilin alkol ilavesi yapılarak hazırlanan olgunlaştırma solüsyonunda, olgunlaştırma ve IVF sonrası yapılan *in vitro* embriyo kültürü sonucunda % 6,4 oranında blastosist safhasındaki sığır embriyosu elde edilmiştir. Buna karşılık betamerkaptoethanol eklenmeyen ve sadece %0,1 polivilin alkol ilave edilerek hazırlanmış olan yumurta olgunlaştırma solüsyonu kullanıldığı grupta ise, % 1,6 oranında blastosist elde edilmiştir. Yumurta olgunlaştırma solüsyonunda, polivilin alkolün kullanılmadığı fakat sadece %10 Fetal Calf Serumun kullanıldığı kontrol grubunda ise % 24,5 oranında blastosist safhasındaki sığır embriyosu elde edilmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada betamerkaptoethanolün sığır yumurtalarının olgunlaştırılması üzerine herhangi bir olumlu etkisinin olmadığı belirtilmiştir.

Bu konu üzerine yaptığımız araştırmada ise, betamerkaptoethanolün yumurta olgunlaştırması ve IVF sonrası blastosist gelişimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla, deney ve kontrol grubu oluşturulmuş, deney grubunda, *in vitro* olgunlaştırma solüsyonuna 100 µM Betamerkaptoethanol ilavesi yapılmış, kontrol grubunda ise betamerkaptoethanol kullanılmamıştır. Olgunlaştırma, IVF ve *in vitro* embriyo kültürü sonucunda deney grubunda 176 adet yumurtadan 5 adet (%2,8) blastosist elde edilirken, kontrol grubunda 341 adet yumurtadan toplam 18 adet (%5) blastosist elde edilmiştir. Araştırmamızın bu bölümünde, diğer çalışmalara benzer olarak olgunlaştırma solüsyonuna 100 µM betamerkaptoethanolün ilavesinin IVF ye ve blastosist gelişimine etkisi bulunmadığı ortaya konulmuştur.

Olgun olmayan sığır yumurtalarının olgunlaştırılmasının yanı sıra, olgun olduğu öngörülen yumurtaların spermalar ile inkübasyona bırakılarak yapay döllendirme süreçleri, döllenme sonrasında döllendiği öngörülen gametlerin *in vitro* embriyo kültürleri özellikle

blastosist safhasındaki embriyoların eldesinin başarısı bakımından oldukça önemlidir. Yumurta ve spermanın inkübasyon süreleri uzun yıllar araştırılmıştır.

Nedambale ve arkadaşlarının (2006) yapmış olduğu çalışmada, 23 - 24 saat süre ile TCM-199 destekli olgunlaştırma solüsyonunda %5 CO₂ gaz içeren yüksek neme sahip 39 °C'deki inkübatörde olgunlaştırılan yumurtalar, TCM-199 destekli IVF solüsyonunda çözündürülen spermanın 10 x 10⁶ / ml konsantrasyonla 6 saat inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrasında hücrelerKSOM solüsyonuna transfer edilmişlerdir. Yumurta hücrelerinin, %5 CO₂ gaz ve yüksek neme içeren 39 °C'deki inkübatörde 48 saat kültürün ardından SOF solüsyonuna transferi ile kültür 120 saat sonra tamamlanmıştır. Çalışmanın sonunda 264 adet yumurtanın 86 adedi (%32) bölünme göstermiş, 44 adedi (%16.6) ise blastosist aşamasına ulaşmıştır.

Sunulan tez çalışmasında, 6 saat ve 18 saat sperm yumurta inkübasyon süreci, KSOM-SOF ve SAGE Yarıklanma- SAGE Blastosist kültür solüsyonlarında ayrı ayrı araştırılmıştır. Çalışmamızda, Nedambale ve arkadaşlarının (2006) izlemiş oldukları protokol uygulanmış, ayrıca ilave olarak *in vitro* embriyo kültürü bakımından SAGE Yarıklanma- SAGE Blastosist kültür solüsyonları da denenmiştir.

Çalışmamızın sonucunda, 6 saatlik sperm yumurta inkübasyonunun uygulandığı ve kültür solüsyonu olarak 72 saat ara ile SAGE-Yarıklanma ve SAGE-Blastosist solüsyonlarının kullanıldığı deney grubunda, 110 adet hücreden 2 adet (%1,8) blastosist eldesi gerçekleşirken, 48 saat ara ile KSOM ve SOF solüsyonlarının kullanıldığı deney grubunda ise blastosist eldesi gerçekleşmemiştir. 18 saatlik sperm yumurta inkübasyonunun uygulandığı ve kültür solüsyonu olarak 72 saat ara ile SAGE-Yarıklanma ve SAGE-Blastosist solüsyonunun kullanıldığı deney grubunda 123 adet yumurta hücrelerinden 5 adet (%4,1) blastosist elde edilirken, 48 saat ara ile KSOM ve SOF solüsyonlarının kullanıldığı deney grubunda ise 93 adet hücreden 1 adet (%1) blastosist elde edilmiştir.

Bu çalışmada blastosist oranlarının düşük olmasının sperm yumurta inkübasyonunda kullanılan sperm konsantrasyonunun 1 - 2 x 10⁶ gibi düşük olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçlar doğrultusunda son olarak KSOM ve SOF ile SAGE-Yarıklanma ve SAGE-Blastosist kültür solüsyonları ile gerçekleştirilen embriyo kültürünün blastosist gelişimi üzerine etkileri incelenmiştir. Yumurtaların TCM-199

destekli olgunlaştırma solüsyonunda 24 saat süre ile %5 CO₂ ve yüksek oranda nem içeren 38,5 °C'deki inkübatörde olgunlaştırılmıştır ve SAGE-HTF-Döllenme solüsyonu kullanılarak sperm yumurta inkübasyonu 18 saat sürede gerçekleştirilmiştir. Döllenmeyi takiben KSOM-SOF solüsyonunda gerçekleşen kültür sonucunda 60 adet hücreden 37 adedi (%61,7) bölünme göstermiş ve 1 adet (%1,6) blastosist elde edilmiştir, SAGE-Yarıklanma ve SAGE-Blastosist solüsyonunda gerçekleşen kültür sonucunda 88 adet hücreden 56 adedi (%63,6) bölünme göstermiş ve 14 adet (%15,9) blastosist elde edilmiştir. Blastosist oranının yükselmesinin nedenlerinden en önemlisi sperm yumurta inkübasyonunda kullanılan ve ticari olarak elde edilen SAGE-HTF döllenme solüsyonu olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasının devamında, blastosist aşamasındaki sıgır embriyoları farklı dondurma yöntemleri kullanılarak dondurulup çözündürülmüş ve çözünme sonrası yapılan *in vitro* embriyo kültürü sonrasında embriyoların gelişim devamlılığı araştırılmıştır. Bu amaçla, blastosist safhasına ulaşan embriyolar, katı yüzey camsı yapı dondurma ve klasik camsı yapı dondurma yöntemleri ile dondurulup çözündürülmüş, çözündürme sonrasında blastosistlerin *in vitro* embriyo kültürü bir gün süre ile devam etmiş ve blastosistlerin dondurma ve çözündürme sonrasındaki canlılıkları ve gelişimlerinin devamlılığı incelenmiştir. Gelişim gösteren blastosistler, floresan boyama tekniği uygulanarak boyanmış, hücre çekirdekleri sayılmış ve gelişimleri bakımından veriler net bir şekilde elde edilerek bu iki farklı dondurma yöntemi birbirleri arasında karşılaştırılmıştır.

IVF ve *in vitro* kültürler sonucu elde edilen blastosist safhasındaki embriyolar katı yüzey camsı yapı dondurma ve klasik camsı yapı dondurma yöntemleri ile dondurulduktan sonra çözündürülmüş ve çözündürülen blastosistlerin 18 saat süre ile *in vitro* embriyo kültürleri yapılmıştır. Kültür sonrasında blastosistlerin hacim olarak genişleme (ekspande olma) ve zona pellisudalarının çatlama (hatching) düzeyleri incelenmiştir. İki farklı camsı yapı dondurma tekniği kendi aralarında karşılaştırılmıştır.

Dondurulup çözündürülen blastosistlerin canlılıkları ve kalite değerlendirmeleri, blastosistlerin çeperini kaplayan zona pelisudalarının düzgünlüğü belirli ve homojen yumurta-plazmanın olmasına, hücre genelinin parlak görünümlü olmasına ve hücrenin belirli bir perivitellin boşluklarının bulunmasına dikkat edilmiştir.

Yapılan dondurma çalışmasının sonucunda, katı yüzey camsı yapı dondurma ile dondurulup çözündürülen 23 adet blastosistin 19 adedi (%82,6) canlılığını sürdürmüştür. Katı

yüzey camısı yapı dondurma yöntemi kullanılarak dondurulup çözündürülen 23 adet blastosistten 8 adedi (%34.8) canlılığını sürdürmekle birlikte bu oran, katı yüzey camısı yapı dondurma yönteminden daha düşük başarı oranı getirmiştir. Bununla beraber dondurulup çözündürülmeden kültürleri devam eden kontrol grubu 17 adet blastosistten tamamı (%100) mevcut embriyonel gelişimlerini sorunsuzca sürdürmüşlerdir.

Dondurma ve çözündürme sonrasında, *in vitro* embriyo kültürünü takiben yaklaşık 24 saat sonra yapılan gözlemler sonucunda, katı yüzey camısı yapı dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülen ve kültürleri tamamlanan blastosistlerin 23 adetten 12 adedi (%52.2) ekspande olmuş ve 4 adedinin (%17.4) ise zona pelisudaları çatlayarak (hatch olarak) iç hücre kütleleri hücre dışarısına çıkmıştır. Klasik camısı yapı dondurma yöntemi ile dondurulup çözündürülen blastosistleri kültürleri tamamlandıktan sonra bu blastosistlerin 23 adetten 2 adedi (%8.7) ekspande olmuş ve 1 adedinin (%4.3) ise hatch olarak iç hücre kütleleri hücre dışarısına çıkmakla beraber bu deney grubunda katı yüzey camısı yapı dondurma yöntemine göre daha düşük oranda ekspande ve hatching oranı gözlemlenmiştir. Dondurulup çözündürülmeyen ve kontrol grubu olarak nitelendirilen 17 adet blastosistten 6 adedi (%35,3) ekspande olmuş fakat kültürün devamında 17 adet blastosistten toplam 11 adedinin (%64,7) hatch olmasıyla birlikte her iki deney grubuna göre daha yüksek oranda gelişim devamlılığı göstermiştir.

Çalışmanın sonucunda katı yüzey camısı yapı dondurma, klasik camısı yapı dondurma ve kontrol grupları arasında blastosistlerin gelişimlerin devamlılığı ekspande ve hatch olmaları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (Akkoc ve ark. 2011).

Tüm deney gruplarında dondurulan blastosistler çözündürüldükten sonra ve kontrol grubunda devam eden *in vitro* kültürü takiben gelişim devamlılığı göstermiş blastosistler 5.5 $\mu\text{M/L}$ konsantrasyonda Hoechst 33342 floresan çekirdek boyama kimyasalına 10 dakika süre ile maruz bırakılarak hücre çekirdekleri boyanmıştır. Oda ısında, floresan ışık kaynağı destekli ters mikroskop altında deney ve kontrol grubu blastosistlerin çekirdekleri sayılmıştır.

Katı yüzey camısı yapı dondurma yöntemi ile dondurup çözündürüldükten sonra kültürleri tamamlanan blastosistlerin ortalama çekirdek sayıları 124 olmakla beraber klasik camısı yapı dondurma yönteminin kullanıldığı deney grubundaki blastosistlerin ortalama çekirdek sayıları 104 olup katı yüzey camısı yapı dondurma yöntemine göre daha düşük

olmaktadır. Dondurulup çözündürülmeyen kontrol grubu blastosistlerin ortalama çekirdek sayıları ise 213 olup her iki deney grubuna göre çok daha yüksek orandabulunmuştur.

Sonuç olarak, toplam hücre çekirdek sayıları bakımından katı yüzey camısı yapı dondurma yöntemi ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir ($p<0.05$) (Akkoc ve ark. 2011, 2012).

Sunulan dondurma çalışması kapsamında, katı yüzey camısı dondurma tekniği, klasik camısı yapı dondurma tekniğine kıyasla daha yüksek oranda ekspansiyon oranı göstermiş olup, toplam hücre sayıları bakımından ise katı yüzey camısı dondurma yöntemi, klasik camısı yapı dondurma yöntemine göre daha fazla hücre sayısına sahip olmuştur.

Önceki çalışmalarda, memeli gametlerin, embriyoların ve dokuların camısı yapı ile dondurulması gen bankası çalışmalarında destekleyici teknik olmaktadır. Bu teknikte buz kristallerinin oluşumunun engellenmesi için yüksek oranda donmaya karşı koruyucu kimyasalların ve ajanların (DMSO, EG, PEG, trehalose, sükröz, xylose ve gliserol) kullanılması gerekmektedir. Dondurulan hücrede zehir etkisinin minimum düzeyde olması için hücrelerin daha az konsantrasyonlarda dondan koruyucu kimyasal maddelere ve ajanlara olabildiğince az sürede maruz bırakılması gerekmektedir. Dondan koruyucu kimyasalların miktarı ve konsantrasyonu azaltılması soğutma oranını artırır ve de hücre içi buz kristalleri oluşumunu en aza indirger (Arav ve ark. 2002, Rios ve ark. 2010).

Katı yüzey camısı yapı dondurma yönteminde, klasik camısı yapı yöntemine göre daha az miktarda ve az konsantrasyonlarda dondan koruyucu kimyasallar kullanılmakla beraber hücreleri bu maddelere maruz bırakma süresi de daha kısa olmaktadır. Hem katı yüzey camısı yapı dondurma hem de klasik camısı yapı dondurma teknikleri, diğer camısı yapı dondurma, hızlı ve yavaş dondurma tekniklerine göre daha ucuz, komplike bilgisayar sistemli cihazlara gereksinim duyulmayan, uygulaması kolay ve pratik tekniklerdir.

Bagis ve arkadaşlarının (2002) yapmış oldukları bir çalışmada, pronükleer safhasındaki fare embriyoları katı yüzey camısı yapı dondurma yöntemi uygulanarak dondurulup çözündürülmüş ve çözündürme sonrası Antifriz protein geni (AFP) transfer edilerek AFP genine sahip transgenik fareler elde edilmiştir. Bagis ve arkadaşlarının (2009) yapmış olduğu diğer bir çalışmada ise pronükleer safhasındaki fare embriyoları geleneksel yavaş dondurma, open pull straw (OPS) camısı yapı dondurma ve katı yüzey camısı yapı dondurma yöntemleri olmak üzere 3 farklı yöntem uygulanarak dondurulup çözündürülmüş

ve en çok blastosist gelişimini gösteren dondurma yöntemi katı yüzey camsı yapı dondurma yöntemi olmuştur.

Birçok memeli türlerinin yumurtaları özellikle bufalo, domuz, sığır yumurtaları katı yüzey camsı yapı dondurma yöntemi ile dondurulmuştur ve dondurma sonrasında gerçekleşen IVF çalışmaları sonucunda az da olsa blastosist safhasındaki embriyolar elde edilmiştir. Fakat şu ana kadar sadece sunulan tez çalışmasında blastosist safhasındaki sığır embriyoları katı yüzey camsı yapı dondurma yöntemi kullanılarak dondurulmuştur. Elde edilen bulgular sonucunda katı yüzey camsı yapı dondurma yönteminin blastosist safhasındaki sığır embriyolarında başarılı bir şekilde dondurulabildiğini ve çözündürme sonrasında blastosistlerin ekspande ve hatch olma oranlarının yüksek olduğu ayrıca hücre çekirdek sayılarının da kontrol gruplarının değerlerine yakın olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak, sunulan tez çalışmasında, *in vitro* inek blastosisti üretimi için değişik IVF protokolleri denenmiş ve elde edilen bu blastosistler farklı vitrifikasyon teknikleri kullanılarak dondurulup çözündürülmüş ve bu blastosistlerin *in vitro* kültürleri yapılarak embriyo gelişimleri incelenmiştir. Tez sonunda elde edilen IVF ve embriyo dondurma protokolleri hayvan üreme biyoteknolojisinde ve transgenik hayvan üretim tekniklerinde efektif olarak kullanılabilir.

6. KANAKLAR

- Agca Y (1994). Post-thawsurvival and pregnancy rates of intact and biopsied and sexed *in vitro* produced bovine embryos after vitrification, Master Thesis, University of Wisconsin-Madison, Madison WI.
- Akkoc T, Taskin AC, Caputcu TA, Arat S, Bagis H (2011). The effect of solid surface vitrification (SSV) versus classic vitrification technique on survive rate of *in vitro* produced bovine blastocysts. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(22): 2885-2891.
- Akkoc T, Taskin AC, Caputcu TA, Arat S, Bagis H (2012) The effect of solid surface vitrification (SSV) versus classic vitrification technique on survive rate of *in vitro* produced bovine blastocysts. *Molecular Immunology and Immunogenetics Congress*, 81, Antalya.
- Akkoç T (2006). Albino Irkı Sıçanlardan Süperovulasyon ile Pronükleer Aşamadaki Embriyoların Eldesi, vitrifikasyonu ve Vitrifikasyon Sonrası Embriyo Kültür Koşullarının Araştırılması. Y. Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Biyometri ve Genetik Anabilim Dalı.
- Akkoç T, Bağış H, Taşkın AC, Arat S (2009a). Fertilizasyon Sürelerinin ve Farklı Kültür Solüsyonlarının Sığır Blastosist Gelişimi Oranları Üzerine Etkileri. V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 118-119. Elazığ.
- Akkoç T, Bağış H, Taşkın AC, Arat S (2009b). Fertilizasyon Medyumlarının ve Sperma Yıkama Solüsyonlarının Sığır Blastosist Gelişim Oranları Üzerine Etkisi. V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 76-77. Elazığ.
- Akkoç T, Bağış H, Taşkın AC, Arat S (2010). Beta-merkaptioethanolün sığır yumurtası maturasyonuna ve blastosist gelişimi oranı üzerine etkisi. X. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 44, Çeşme İzmir.
- Aksu DA, Agca C, Aksu S, Bagis H, Akkoc T, Caputcu AT, Arat S, Taksin AC, Kizil SH, Karasahin T, Akyol N, Satılmış M, Sagirkaya H, Ustuner B, Nur Z, Agca Y (2012). Gene expressipn profiles of vitrified and *in vivo* derived bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, Publishes, DOI 10.1002/mrd.22068.
- Arat S, Caputcu AT, Akkoc T, Pabuccuoglu S, Sagirkaya S, Cirit U, Nak Y, Koban E, Bagis H, Demir K, Nak D, Senuver A, Kilicarslan R, Tuna B, Cetinkaya G, Denizci M, Aslan O (2011). Using cell banks as a tool in conversation programmes of native domestic breeds: the production of the first cloned Anatolian Grey cattle. *Reproduction Fertility and Development*, 23: 1012-1023.
- Arav S, Yavin S, Zeron Y, Natan D, Dekel I, Gacitua H (2002). Newtrends in gamets cryopreservation. *Mol. Cell. Endocrinol*, 187: 77-81.
- Auistin CR (1951). Observation of the penetration of sperm into the mammalian egg. *Aust J Rest*, B4: 581-596.

- Bagis H, Akkoc T, Tas A, Atoprakligil D (2008). Cryogenic effect of antifreeze protein on transgenic Mouse ovaries and the production of live offspring by orthotopic transplantation of cryopreserved mouse ovaries. *Molecular Reproduction and Development*. 75(4): 608-13.
- Bagis H, Akkoc T, Taskin C, Arat S (2010). Comparison of different cryopreservation techniques: higher survival and implantation rate of frozen-thawed –mouse pronuclear embryos in the presence of betamercaptoethanol in post-thaw culture. *Reprod Domes Anim*, 45 (6): 332-337.
- Bagis H, Aktoprakligil D, Odaman Mercan H, Turgut G, Yurtsev N, Sekman S, Cetin S, Arat S, Cirakoglu B (2006). Stable transmission and transcription of newfoundland ocean pout type III Fish Antifreeze Protein Gene (AFP) in transgenic mice and hypothermic storage of transgenic ovary and testis. *Mol Reprod Dev*, 73 (11): 1404-1411.
- Bagis H, Mercan HO, Cetin S, Sekmen S (2005). The effect of equilibration time on survival and development rates of Mouse pronuclear stage embryos vitrified in solid surface (SSV) and convectional straws: *in vivo* and *in vivo* evaluations. *Molecular Reproduction and Development*, 72: 494-501.
- Bagis H, Odaman H, Sagirkaya H, Dinnyes A (2002) Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. *Molecular Reproduction and Development*, 61:173-179.
- Bagis H, Odaman H, Sagirkaya H, Dinnyes A (2004). Vitrification of pronuclear stage embryos on solid surface (SSV) versus in cryotube: Comparison of the effect of equilibration time and different sugars in the vitrification solution. *Molecular Reproduction and Development*, 67: 186-192.
- Bavister BD, Edwards RG, Steptoe PC (1969). Identification of the midpiece and tail of the spermatozoon during fertilization of human eggs *in vitro*. *J Reprod Fertil*, 20 (1): 159-61. Berg U, Brem G (1989). *In vitro* production of bovine blastocysts by *in vitro* maturation and fertilization of oocytes and subsequent *in vitro* culture. *Zuchthgiene*, 24:3, 134-139.
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr I (1992). Development of *in vitro* matured/*in vivo* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*, 37: 127-147.
- Birler S, Pabuççuoğlu S, İleri K, Alkan S, Mithat E. (1998). Sığır oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılmasında farklı sürelerin etkisi. *Tr.J. of Veterinary and Animal Sciences*, 22: 551-557.
- Block J (2007). Use of insulin-like growth factor-1 to improve post-transfer survival of bovine embryos produced *in vitro*, *Theriogenology* 68S: 49-55.
- Boatman DE, Bavister BD, Cruz E (1990). Addition of hypotaurine can reactivate immotile golden hamster spermatozoa. *J Androl*, 11 (1): 66-72.

- Brackett B.G., Bousquet D, Boice M.L Donawick W.J, Evans J.F. ve Dressel M.A (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, 27: 127-158.
- Brackett BG (1981). Applications of *in vitro* fertilization. in: New technologies in animal breeding. Academic Press, New York, 141-161.
- Caamano JN, Ryoo ZY, Youngs CR (1998). Promotion of development of bovine embryos produced *in vitro* by addition of cysteine and beta-mercaptoethanol to a chemically defined culture system. *J. Dairy Sci*, 81: 369-374.
- Carlos BM (1996). Patten's foundations of embryology McGraw-Hill Inc.
- Cevik M, Tas A, Akkoc T, Bagis H, Arat S (2009). A comparative study of parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization of *in vitro* matured bovine oocytes. *Turk J. Vet. Anim. Sci TÜBİTAK*, 33 (5):393-399.
- Chang M,C (1959). Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature*, 184: 455.
- Chang MC (1951). Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature (Lond.)*, 168: 697-698.
- Coke S, Quinss P, Kime L, Ayres C, Tyler JP and Driscoll GL (2002). Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. *Fertil Steril*, 78(6):1254-1260.
- Coscioni AC, Reichenbach HD, Schwartz J, LaFalci VSN, Rodrigues JL, Brandelli A (2001). Sperm function and production of bovine embryos *in vitro* after swim-up with different calcium and caffeine concentration. *Animal Reproductive Science*, 67: 59-67.
- Dinnyes A, Bagis H, Ji W, Kikuchi K, Lee JW, Li X, Presicce GA, Somfai T, Si W, Yang X (2003). Gene banking in rare breeds and species whose gametes are difficult to cryopreserve. *Animal Husbandry and Nutrition*, 52: 82-90.
- Dinnyes A, Dai YP, Jiang S, Yang XZ (2000). High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Biology of Reproduction*, 63: 513-518.
- Dinnyes A, Wallace GA, Rall WF (1995). Effect of genotype on the efficiency of mouse embryo cryopreservation by vitrification or slow freezing methods. *Molecular Reproduction and Development*, 40: 429-435.
- Dobrinsky J.R (1999). Cryopreservation of swine embryos. Production possibilities for the future. *Embryo Transfer Newsletter*, 17(4):18-23.
- Dobrinsky J.R (2002). Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. *Theriogenology*, 57: 285-302.

- Goeseels SB, Panich P (2002). Effects of oocyte quality on development and transcriptional activity in early bovine embryos. *AnimReprod Sci*, 71: 143-155.
- Gordon I (2003). *Laboratory Production of Cattle Embryos 2nd Edition*. London UK, 548.
- Goto K, Koba M, Takuma Y, Nakanishi Y, Ogawa K (1989). Co-culture of bovine embryos with cumulus cells. *Ajas*, 2 (4): 595-598.
- Greve T, Madison V, Avery B, Callesen H, Hytell P (1993). *In vitro* production of bovine embryos. A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Anim Reprod Sci*, 33: 51-69.
- Guerin P, Menezo Y (1995). Hypotaurine and taurine in gamete and embryo environments: de novo synthesis via the cysteine sulfinic acid pathway in oviduct cells. *Zygote*, 3 (4): 333-343.
- Hanada A, Enya Y, Suzuki T (1986). Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 32: 208 (abs).
- Hashimoto S, Takakura R, Kishi M, Sudo T, Minami K, Amada M (1999). Ultrasound-guided follicle aspiration. The collection of bovine cumulus-oocyte complex from ovaries of slaughtered or live ovaries. *Theriogenology*, 51: 757-765.
- Hunter RHF (1996). Ovarian control of very low sperm/egg ratios at the commencement of mammalian fertilization to avoid polyspermy. *Molecular Reproduction and Development*, 44: 417-422.
- Irritani A, Niwa K (1977). Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, 50: 199-121.
- Kahir H, Longergan p, Touze JL, Mermillod P (1998). The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after nonsurgical embryo transfer. *Theriogenology*, 38: 35-47.
- Kaidi S, Donnay I, Van Langendonck A, Massip A (1997). Effect of cryoprotectants on survival and total cell number of *in vitro* produced bovine blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility, Abstract Series 19*: 53.
- Kaidi S, Donnay I, Van Langendonck A, Massip A, Dessy F (1998b). Double staining of bovine *in vitro* blastocysts with bisbenzimidazole and propidium iodide after treatment with cryoprotectants. In: *Proceedings 14th Meeting European Transfer Association, Venice*. 176.
- Kaidi S, Donnay I, Van Langendonck A, Dessy F, Massip A (1998a). Comparison of two co-culture systems to assess the survival of *in vitro* produced bovine blastocysts after vitrification. *Animal Reproduction Science*, 52: 39-50.

- Kattera S, Chen C (2003). Normal birth after microsurgical enucleation of tripronuclear of human zygotes: Case report. *Human Reproduction*, 18:1319-1322.
- Kelly JM, Kleemann DO, Rudiger SR and Walker SK (2007). Effects of grade of oocyte-cumulus complex and the interactions between grades on the production of blastocysts in the cow, ewe and lamb. *Reprod Dom Anim*, 42: 577-582.
- Kuleshova L, Gianaroli L, Malgi C, Ferraretti A, Trounson A (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. *Human Reproduction*, 14(12):3077-9.
- Leibfried ML and Bavister BD (1982). Effects of epinephrine and hypotaurine on *in vitro* fertilization in golden hamster. *J. Reprod. Fert*, 66: 87-93.
- Leibo SP, Songsasen N (2002). Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology*, 57: 303-326.
- Lonergan P, O'Kearney-Flynn M and Boland MP (1999). Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*, 51: 1565-1576.
- Lu KH, Gordon, Chen HB, Gallagher M, McGovern H (1988). Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by *in vitro* techniques. *Veterinary Record*, 122: 539-540.
- Madison V, Greve T, Avery B, Wamberg T (1991). The effect of endotoxin-contaminated medium on *in vitro* fertilization and development of bovine oocytes matured *in vitro*. *Reprod Nutr Dev*, 31 (2): 159-165.
- Martez AG, Matkovic M (1998). Cryopreservation of bovine embryos: slow freezing and vitrification. *Theriogenology*, 49: 1039-1049.
- Massip A (1999) Significant steps in cryopreservation of cattle embryos and oocytes. In: *Proceedings 15 th Meeting European Embryo Transfer Association*, Lyon, 16-23.
- Massip A (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction of Domestic Animals*, 36: 49-55.
- Mizushima S, Fukui Y (2001). Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined maturation medium. *Theriogenology*, 55: 1431- 1445.
- Nagai T (2001). The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55: 1291-1301.
- Nakagawa A, Martino A, Pollard JW, Leibo SP (1995). Stage of nuclear maturation of bovine oocytes at insemination influences sperm penetration and zygote development. *Theriogenology*, 43: 286.

- Nedambale TL, Du F, Xu J, Chaubal SA, Dinnyes A, Groen W, Faber D, Dobrinski JR, Yang X, Tian XC (2006). Prolonged bovine sperm-oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. *Theriogenology*, 66 (8): 1951-1960.
- Palasz AT, Mapletoft RJ (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 14:127-149.
- Palasz AT, Mapletoft RJ (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, 14: 127-149.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 4; 340 (8810): 17-8.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL (1995). Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 44: 859-869.
- Pereira RM, Marques CC (2008). Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Banking*, 9:267-277.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 164: 666-667.
- Rall W.F (2001). Cryopreservation of mammalian embryos, gametes and ovarian tissues: current issues and progress. In: Wolf, D.P, and Zelinski Wooten, M. (eds) *Assisted Fertilization and Nuclear Transfer in Mammals*. Human Press, Totowa, New Jersey, 173-187.
- Rall WF, Fahy GM (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos. *Nature*, 313: 573-574.
- Rao GD, Chian RC, Son WS, Gilbert L, Tan SL (2004). First report of fertility preservation of cancer patients using IVF and oocyte vitrification. *Lancet*, 363(9423):1829-30.
- Ravelich SR, Breier BH, Reddy S, Keelan JA, Wells DN, Peterson AJ and Lee RSF (2004). Insulin-like growth factor-I and binding proteins 1,2 and 3 in bovine nuclear transfer pregnancies. *Biology of Reproduction*, 70:430-438.
- Rehman N, Collins AR, Suh TK, Wright RW, Jr (1994). Effect of sperm exposure time on *in vitro* fertilization and embryo development of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology*, 41: 1447-1452.
- Rios GI, NC Mucci, GG Kaiser, RH Alberio (2010). Effect of container, vitrification volume and warming solution on cryosurvival of *in vitro* produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci*, 118 (1): 19-24.

- Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MF (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, 61:234-248.
- Rock J, Menkin MF (1944). In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. *Science*, 100 (2588): 105-107.
- Rosenkranz C, Holzmann A (1995). The influence of semen preparation and culture medium on the success of IVF in cattle. *Zentralbl Veterinarmed*, 42 (2): 139-143.
- Sağırkaya H (2001). Değişik gelişim dönemlerde bulunan hibrit fare embriyolarının vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması. Doktor tezi, Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı.
- Sağırkaya H, Bağış H (2003). Memeli Embriyoların Kriyoprezervasyonu. *Uludağ Üniv. J. Fac. Med*, 22:121-129.
- Semple E, Loskutoff N, Leibo SP, Betteridge KJ (1993). Effects of culture medium and maturation time on *in vitro* development of bovine oocytes into blastocysts. *Theriogenology*, 39: 307.
- Shamsuddin M, Niva K, Larsson G, Rodriguez MH (1993). *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes. *Reprod Dom Anim*, 31: 613:622.
- Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO (1997). Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology*, 35 (3): 219-229.
- Sirard MA, Blondin P, (1996). Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod Sci*, 42: 417-426.
- Songsasen N, Leibo SP (1997). Cryopreservation of mouse spermatozoa. I. effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa. *Cryobiology*, 35 (3): 240-254.
- Soysal İ (2000). Hayvan ıslahının genetik prensipleri. Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Ders Notu No 40.
- Takahashi H, Kuwayama M, Hamano S, Takahashi M, Okano A, KadokawaH, Kariya T, Nagai T. (1996). Effect of b-mercaptoethanol on the viability of IVM/IVF/IVC bovine embryos during long-distance transportation in plastic straws. *Theriogenology*, 46:1009-1015.
- Tanghe S, Van Soom A, Talebkhan Garoussi M, Mintiens K, Kruif A (2000). Sperm-egg ratios above 5000:1 do not improve *in vitro* fertilization rates in the bovine. *Journal of Reproduction and Fertility, Abstract series* 25:91.
- Thibault C, Szöllösi D, Gerard M (1987). Mammalian oocyte maturation. *Reprod Nutr Dev*, 27 (5): 865-896.

- Thompson JG, Mitchell M and Kind K (2007). Embryo culture and long-term consequences. *Reprod Fertil Dev.* 19: 43-52.
- Thompson JG (1996) Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology* 45: 27-40.
- Truonson A (1992). The production of ruminant embryos *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, 28: 125-137.
- Van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC, van der SACHANS A, Eyestone WH, de Boer H (1992). Relationship between kinetics of polar body extrusion and developmental potential of bovine oocytes. 12 th Int. Cong on Anim Repr, 1: 384-386.
- Wang YS, Tang S, An ZX, Li WZ, Liu J, Quan FS, Hua S and Zhang Y (2011). Effect of mSOF and G1.1/G2.2 Media on the developmental competence of SCNT-derived bovine embryos. *Reproduction of Domestic Animals*, 46: 404-409.
- Ward F.A, Enright BP, Lonergan P, Boland MP (1999). Ovum pick-up (OPU): Effect of aspiration vacuum on cumulus oocyte complex morphology and oocyte developmental capacity. In: Proceeding 15 th Meeting European Embryo Transfer Association, Lyon, 240.
- Whittingham DG (1974). Embryo banks in the future of developmental genetics, symposium on developmental genetics. XIII International Congress of Genetics, 78: 395-402.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P (1972). Survival of mouse embryos frozen to 196 and -269 °C. *Science*, 178: 411-414.
- Willadsen SM (1986). Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320 (6057): 63-5.
- Wilmot I, Rowson Lea (1973). The successful low temperature preservation of Mouse and cow embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 33: 352-353.
- Wit AAC, Wurth YA, Kruip AM (2000). Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *J Anim Sci*, 78: 1277-1283.
- Wolf PD, Quigley MM (1984). Histological backround and essentials for a program Chapter 1. In: Human *in vitro* fertilization and embryo transfer. Plenum Press, London.
- Xihe Li, Morris L H-A and Allen R (2001). Influence of co-culture during maturation on the developmental potential of equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reproduction*, 121: 925-932.
- Yanagimachi R, Chang MC (1963). Spermascent through the oviduct of the hamster and rabbit in relation to the time of ovulation. *J Reprod Rertil*, 6:413-20.
- Younis AI, Brackett BG, Fayerer-Hosken RA (1989). Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Gamete Res*, 23: 189-201.

EKLER

EK-1

TL HEPES Dış ortam solüsyonu

KİMYASAL MADDE	Final mM	mg/500 ml
NaCl	114 mM	3330 mg
KCl	3,2 mM	120 mg
CaCl₂.2H₂O	2,0 mM	150 mg
MgCl₂.6H₂O	0,5 mM	50 mg
NaHCO₃	2 mM	84 mg
NaH₂PO₄.H₂O	0,4 mM	28 mg
Na-Lactate (%60 Şurup)	10 mM	0930 ml
Penicilin	100 i.u./ml	32,5
Fenol Kırmızısı	-	5 mg
Hepes	10 mM	1200 mg

EK-2

TCM-199 Ana solüsyonu

KİMYASAL MADDE	MİKTAR /50 ml
TCM-199 toz	247,50 mg
NaHCO₃	62,25 mg
Deiyonize-bidistile H₂O	50 ml

EK-3

Yumurta olgunlaştırma solüsyonu

KİMYASAL MADDE	KULLANILAN MİKTAR (10 ml Final Konsantrasyon için)
TCM-199 (Ana Stok)	8720 ml
İnaktice FCS	1000 µl
Na Piruvat	50 µl (5,5 mg Na-Piruvat + 1 ml PBS)
Ticari PSA (Penisilin Streptomisin Antimiyosin)	50 µl
LH (Luteinize Hormon)	20 µl
FSH (Folikül Stimülan Hormon)	20 µl
EGF (Epidermal Gelişim Faktörü)	25 µl
IGF-1 (İnsülin Gelişim Hormon)	100 µl

EK-4

SSV Ozmotik Dengeleme Solüsyonu; %4 Etilen Glikol (EG).

KİMYASAL MADDELER	MİKTAR
Etilen glikol	0.4 ml
TCM-199 + %20 FCS	9.4 ml

EK-5

SSV Dondurma Solüsyonu; %35 EG, %5 Polivinil Prolidon (PVP) ve 0.4 M Trehalose.

KİMYASAL MADDELER	MİKTAR
Etilen glikol	3.5 ml
Polivinil Prolidon	0.5 gr
Trehalose	1,5132 gr
TCM-199 + %20 FCS	4,5 ml

EK-6

SSV Çözündürme Solüsyonu; 0,3 M Trehalose

KİMYASAL MADDELER	MİKTAR
Trehalose	1,1349 gr
TCM-199 + %20 FCS	10 ml finale tamamlandı

Ek-7

Klasik Camsı Yapı dondurma Solüsyonu - VS1, VS2, VS3:

	Gliserol	Etilen Glikol	Sakkaroz	Ksiloz	Polietilen (PEG) glikol
VS1	%10	-	0.1M	0.1M	%1
VS2	%10	%10	0.2M	0.2M	%2
VS3	%20	%20	0.3M	0.3M	%3

EK-8

M-PBS Temel Solüsyonu:

KİMYASAL MADDELER	MİKTAR (1Lt)
NaCl	8,000 gr
KCl	0,200 gr
KH₂PO₄	0,200 gr
Na₂HPO₄	1,150 gr
MgCl₂ 6H₂O	0,100 gr
CaCl₂	0,100 gr
Na Piruvat	0,036 gr
D+Glukoz	1,000 gr
Penisilin	100,000 IU
Streptomisin	0,100 gr

EK-9

Cams Yapı Dondurma Solüsyonu VS1

KİMYASAL MADDELER	MİKTAR
Gliserol	5 ml
Sakkaroz	1,7115 gr
Ksiloz	0,7507 gr
Polietilen Glikol	0,5 gr
M PBS	50 ml finale tamamlanmıştır

EK-10

Camsı Yapı Dondurma Solüsyonu VS2

KİMYASAL MADDELER	MİKTAR
Gliserol	5 ml
Etilen Glikol	5 ml
Sakkaroz	3,4230 gr
Ksiloz	1,5013 gr
Polietilen Glikol	1,0 gr
M PBS	50 ml finale tamamlandı

EK-11

Camsı Yapı Dondurma Solüsyonu VS3

KİMYASAL MADDELER	MİKTAR
Gliserol	10 ml
Etilen Glikol	10 ml
Sakkaroz	5,1345 gr
Ksiloz	2,2520 gr
Polietilen Glikol	1,5 gr
M PBS	50 ml finale tamamlandı

EK-12

Çözündürme için stok sakkaroz solüsyonu (0.625M)

KİMYASAL MADDELER	MİKTAR
Sakkaroz	10,697 gr
M PBS	50 ml finale tamamlandı

EK-13

0,5 M Sakkaroz Çözündürme Solüsyonu

KİMYASAL MADDELER	MİKTAR
Stok Solüsyon	4 ml
FCS	1 ml

EK-14

0,25 M Sakkaroz Çözündürme Solüsyonu

KİMYASAL MADDELER	MİKTAR
Stok Solüsyon	2 ml
M-PBS	2 ml
FCS	1 ml

EK-15

%20 FCS+M-PBS Yıkama Solüsyonu

KİMYASAL MADDELER	MİKTAR
M-PBS	4 ml
%20 FCS+M-PBS	1 ml

ÖZGEÇMİŞ

1979 Yılında İstanbul Şişli’de doğmuştur. Lise eğitimini Özel Yunus Emre Lisesinde 1997 yılında tamamladıktan sonra Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni bölümünü 2004 yılında bitirmiştir. Lisans stajını Boğaziçi Hayvanat Bahçesi kuş Cenneti ve Botanik Parkında 2002 yılında tamamlamıştır. TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsüne bağlı Transgen ve Deney Hayvanları Laboratuvarında 2004 yılında gönüllü araştırmacı olarak çalışmaya başlamış, bu dönem içerisinde Trakya Üniversitesi Tekirdağ Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümünde Yüksek Lisansını (2004-2006) tamamlamıştır. Aynı yıl TÜBİTAK MAM’da araştırmacı kadrosuna geçmiştir. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümünde Doktora programına 2006 yılında başlamıştır.

Halen TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü Hayvan Genetiği ve Üreme Biyolojisi Laboratuvarında araştırmacı olarak görev almaktadır.