

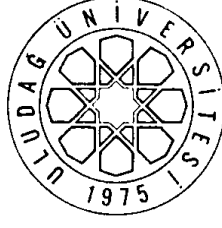
T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUN'I TOHUMLAMA ANABİLİM DALI

**SIĞIRLARDA EMBRİYO KÜLTÜR MEDYUMUNA İLAVE EDİLEN
PROTEİN KAYNAKLARININ EMBRİYONİK GELİŞİM ÜZERİNE ETKİLERİ**

Mehmet YAĞMUR

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2005



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUN'İ TOHUMLAMA ANABİLİM DALI**

**SIĞIRLARDA EMBRİYO KÜLTÜR MEDYUMUNA İLAVE EDİLEN
PROTEİN KAYNAKLARININ EMBRİYONİK GELİŞİM ÜZERİNE ETKİLERİ**

Mehmet YAĞMUR

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof.Dr.M.Kemal SOYLU

Bursa-2005

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET	II
İNGİLİZCE ÖZET	III
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
In vitro embriyo üretiminin tarihçesi	3
In vitro embriyo üretimi	5
Ülkemiz açısından sığır IVF teknolojisinin önemi	6
Oositlerin elde edilmesi ve maturasyon	8
Aspirasyon yöntemi	10
Mincing (Dilimleme) yöntemi	11
Foliküllerin diseksiyonu ve patlatılması yöntemi	11
Sperm kapasitasyonu ve in vitro fertilizasyon	13
Swim-up	14
Perkol separasyonu	14
Embriyo kültürü	15
Ko-kültür	15
Kimyasal olarak tanımlanmış medyumlar içerisinde kültür	15
Sığır embriyolarının morfolojik değerlendirilmesi	16
Sığır embriyolarının morfolojisi	17
Sığır embriyolarının değerlendirilmesi	20
GEREÇ ve YÖNTEM	24
Çalışmada kullanılan kimyasallar ve medyumlar	24
Ovaryumların elde edilmesi ve laboratuara taşınması	29
Oositlerin elde edilmesi ve in vitro maturasyon	30
In vitro fertilizasyon	31
In vitro kültür	31
Gelişen embriyoların değerlendirilmesi	32
İstatistiksel değerlendirme	32
BULGULAR	33
TARTIŞMA ve SONUÇ	37
KAYNAKLAR	42
TEŞEKKÜR	48
ÖZGEÇMİŞ	49

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, birçok araştırmacı tarafından kullanılmakta olan CR1aa kültür medyumunda protein kaynağı olarak kullanılan sığır serum albumininin (BSA) yerine sentetik bir madde olan polivinilpirolidon (PVP) maddesinin kullanılıp kullanılmayacağıın belirlenmesi ve normal şartlarda 4. günde kültür ortamına katılan fetal buzağı serumunun (FCS) embriyonik gelişim üzerindeki etkisinin incelenmesidir.

Bu amaçla lokal bir mezbahadan elde edilen ovaryumlardan toplanan oositler in vitro şartlarda mature ve fertilize edildi. Fertilizasyondan 24 saat sonra, embriyolar rasgele iki gruba bölündükten sonra grubun birinde embriyolar içerisinde 3 mg/ml oranında BSA bulunan CR1aa medyumunda kültür edilirken, diğesinde embriyolar içerisinde 3 mg/ml oranında PVP bulunan CR1aa medyumunda kültür edildi. Kültürün 4. gününde (fertilizasyon 0. gün) de ayrıca her iki grupta yer alan embriyoların bir kısmına %10 oranında FCS ilave edilirken, geriye kalan embriyoların bulunduğu ortama FCS ilavesi yapılmadı. Embriyoların gelişimleri takip edildi ve özellikle embriyoların 2 hücre aşamasına ulaştıkları dönemde (kültürün 2. günü) ve blastosit aşamasına ulaştıkları 7. günde embriyolar sayılarak gelişim oranları belirlendi.

İki hücreye bölünme ve morulaya gelişim oranları FCS ilavesi yapılan grup için sırasıyla BSA'lı grupta %61,60 ve %32,32 iken, PVP'li grupta %55,56 ve %25,40 bulundu; FCS ilavesi yapılmayan grup içinse BSA'lı grupta %60,95 ve %27,89 iken, PVP'li grupta %55,73 ve %21,34 bulundu. İkiye bölünme oranları bakımından gruplar arasında istatistiksel fark bulunmamış olsa da ($P>0,05$), BSA'lı grupların PVP'li gruplardan daha yüksek oranda bölünme gözleendiği tespit edildi. Morula gelişim oranları bakımından da gruplar içinde sadece FCS katılan BSA'lı ve FCS katılmayan PVP'li gruplar arasında istatistiksel fark bulundu ($P<0,01$).

Sonuç olarak, CR1aa embriyo kültür ortamında BSA kullanılmasının gelişim oranlarını olumlu yönde etkilediği sonucuna varıldı. Ayrıca, kültürün 4. gününde kültür ortamına FCS ilavesinin yapılmasının embriyonik gelişimi pozitif yönde etkilediği gözleendi.

Anahtar Kelimeler: Sığır, embriyo kültürü, CR1aa, BSA, PVP, FCS

SUMMARY

Effects of the protein sources added to the bovine embryo culture medium on embryonic development

The purpose of this study was to investigate the effect of fetal calf serum (FCS) added to the culture milieu under normal conditions and the possibility of using a synthetic chemical, polyvinylpyrrolidone (PVP), instead of bovine serum albumin used as protein source in CR1aa culture medium used by many researchers.

For this purpose oocytes collected from ovaries obtained from a local slaughterhouse were matured and fertilized. Twenty-four hours after fertilization, fertilized oocytes were randomly divided into two groups. Embryos in one group were cultured in CR1aa medium containing 3 mg/ml BSA and embryos in the other group were cultured in CR1aa medium containing 3 mg/ml PVP. On fourth day of culture (fertilization day = 0) some embryos from both groups were supplemented with 10% FCS, and remaining embryos from both groups were not supplemented with FCS. Embryonic development was observed and their developmental ratios were determined on days which embryos reach two-cell stage (second day of culture) and blastocyst stage (seventh day of culture).

Cleavage rates and development rates to morula stage for group supplemented with FCS were found 61.60% and 32.32% in BSA group and 55.56% and 25.40% in PVP group, respectively; for group not supplemented with FCS they were 60.95% and 27.89% in BSA group and 55.73% and 21.34% in PVP group. Even there was no statistical difference among groups in terms of cleavage rate ($P>0.05$), the cleavage rates of BSA groups were higher than the cleavage rates of PVP groups. In terms of development rates to morula there was a significant difference only between the BSA group supplemented with FCS and the PVP group not supplemented with FCS ($P<0.01$).

As a result, it was concluded that using BSA in CR1aa embryo culture milieu affects the development rate in a positive way. Moreover, FCS supplementation to the culture medium also affects the development rate in a positive way.

Key Words: Cattle, embryo culture, CR1aa, BSA, PVP, FCS

GİRİŞ

Biyolojik bilimler alanındaki gelişmeler 20. yüzyıl içerisinde hızla ilerlemiştir. Bu alanlar içerisinde biyoteknolojinin yeri ise ayrı bir öneme sahiptir. Özellikle reproduktif biyoteknoloji alanındaki gelişmelerle hayvansal üretimin iyileştirilmesi konusunda büyük yol alınmıştır. Dünyada bu alanda uygulanan ilk yöntem olan suni tohumlama uygulamasına ikinci başlayan ülke olmamıza karşın, bu yöntemin tam anlamıyla uygulamasında ortaya çıkan bazı nedenlerden dolayı, alınan yol arzu edilenin çok gerisinde kalmıştır (1). Bunu hayvan sayımızla hayvansal üretimimizi karşılaştırarak en iyi biçimde gösterebiliriz. Reproduktif biyoteknoloji alanındaki gelişmeler özellikle sığırlarda in vitro maturasyon (IVM), in vitro fertilizasyon (IVF) ve in vitro kültür (IVC) yöntemlerinin başarılı şekilde gerçekleştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu gelişmelere paralel olarak, embriyoların cinsiyetlerinin önceden belirlenmesi, transgenik hayvan üretimi, ikiz yavru elde edilmesi ve klonlama gibi konularda da büyük gelişmeler sağlanmıştır (2-4).

Sığırlarda in vitro embriyo üretimindeki aşamalar özetlenecek olursa; ilk olarak mezbahalardan elde edilen ovaryumlar üzerindeki mature olmamış oositler toplanır ve bunlar in vitro şartlarda mature edilir. Mature olmuş oositler yaklaşık 22 saat sonra dondurulmuş sperma ile in vitro fertilize edilir. Fertilizasyon sonucu elde edilen embriyolar in vitro şartlarda kültür edilerek blastosit aşamasına kadar in vitro şartlarda geliştirilirler (2).

Sığır embriyolarının in vitro kültürü için değişik yöntem ve medyumlar kullanılmıştır. İn vitro embriyo üretiminin başladığı ilk yıllarda embriyolar in vivo şartlarda kültür edilmiştir. Bu amaçla aynı türden ya da başka türden bir hayvanın uterusuna transfer edilen embriyolar blastosit dönemine kadar geliştikten sonra toplanmıştır. Günümüzde bu yöntem hem çok pahalı olması hem de in vitro şartlardaki iyileşmeler sonucunda yaklaşık tümüyle terk edilmiştir (2).

İN vitro kültür işleminde ise, embriyolar özel şartların sağlandığı inkübatörlerde kültür edilmektedir. İn vitro kültür işleminde başlıca iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Ko-kültür yönteminde, embriyolar ovidukt epitel, fibroblast ve granuloza gibi farklı hücre kültürlerinin yapıldığı kültür ortamına aktarılırlar ve hücreler ile birlikte kültür edilirler. Buradaki temel ilke, kültür edilen hücrelerin salgıladığı büyüme faktörlerinden embriyoların da yararlanmasını sağlamaktır. Diğer yöntemde ise, içeriği tümüyle bilinen maddelerden hazırlanmış medyumlar kültür işlemi için kullanılmaktadır. Bu yöntemde diğer yöntemden farklı olarak, ayrıca bir hücre kültürüne gereksinim yoktur. Bundan dolayı da daha kolay bir uygulamadır (2, 5). Sığır embriyolarının in vitro kültüründe, en yaygın olarak kullanılan medyumlardan birisi de CR1aa diye adlandırılan kültür medyumudur. Ancak, embriyolar kültür edilirken 4. günde yapılacak

fötal buzağı serumu, ilavesi embriyoların gelişimi üzerine olumlu etkide bulunmaktadır (6). Son yıllarda gelişmekte olan embriyo gereksinimlerinin tam olarak anlaşılmasına yönelik olarak yapılan çalışmalarda, kültürde kullanılan medyumunu oluşturan unsurların tümünün bilinmesi ve kontrol edilebilir olmasına dikkat edilmektedir. Medyumların protein kaynakları ile desteklenmesinin embriyo kültürü üzerindeki olumlu etkileri bir çok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (5-8). Sığır serum albumini ve FCS in vitro kültür işleminde kullanılan başlıca protein kaynaklarıdır. Bunlar aynı firma tarafından olsa bile, değişik dönemlerde üretildiklerinde aynı nitelikleri göstermeyebilmekte ve bunun sonucunda da kullanıldıklarında elde edilen sonuçların farklı çıkmasına neden olmaktadır. Bu nedenle de, embriyo gereksinimlerinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda protein kaynağı olarak kullanılan bu maddelerin kullanılmamasının daha uygun olacağı öngörülmektedir (2).

İn vitro embriyo üretimi ülkemizde son yıllarda çalışılmaya başlanmış yeni bir konudur. Bu alandaki eksikliklerin hızla tamamlanması ve hayvan popülasyonu bakımından hedeflerin çok gerisinde bulunan ülkemizde hayvan popülasyonunun genetik açıdan iyileştirilmesinde etkili olacak in vitro embriyo üretimi ve buna bağlı diğer yöntemlerin kullanılması sağlanarak yeterli bir ivmenin kazandırılması gerekmektedir. Çalışmada IVF yolu ile elde edilmiş embriyoların in vitro kültüründe önceden Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi IVF laboratuvarında da başarılı sonuç alınmış olan CR1aa medyumunu kullanılmıştır. Ancak bu çalışmada protein takviyesinin embriyo gelişim oranı üzerindeki etkisinin incelenmesi amacıyla, normalde CR1aa (Charles Rosenkrans 1 amino acids) medyumunda bulunan bovine serum albumin (BSA)'nın yerine sentetik bir madde olan polivinilpirrolidon (PVP) kullanılmıştır. Sonrasında ise, embriyo kültürünün 4. gününde yapılan %10 FCS takviyesi de yapılmayarak, bu değişikliklerin embriyo gelişimi üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan bir çok çalışmada BSA'nın ve FCS'un embriyoların gelişim oranlarını arttırdığı bildirilmiştir (5-9). Ancak, herhangi bir protein takviyesi yapılmadan da embriyoların elde edilebileceği bazı araştırmacılar tarafından gösterilmiştir (7, 10). Sonuç olarak, çalışmanın yapıldığı IVF laboratuvarında başlatılmış olan in vitro embriyo üretim çalışmalarının geliştirilmesi ve bilimsel arenada hala önemli bir konu olan protein takviyesinin araştırılmasına olanak sağlanmıştır. Bu çalışmada elde edilecek veriler yöntemin geliştirilmesi ve sonraki çalışmalara ışık tutması bakımından da büyük yararlar sağlayacaktır.

GENEL BİLGİLER

İn vitro embriyo üretiminde özellikle 20. yüzyılın son çeyreğinde oldukça önemli gelişmeler kaydedilmiş olmasına karşın ülkemizde bu konu ile ilgili çalışmalar henüz başlangıç aşamasındadır. Özellikle çiftlik hayvanlarında in vitro embriyo üretimiyle ilgili çalışmalar İstanbul Üniversitesi, Uludağ Üniversitesi ve Ankara Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dallarındaki mevcut laboratuarlardan bildirilen çalışmalarla kısıtlı kalmıştır. Ayrıca, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında koyunların ve TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nde sığırların klonlanmasına ilişkin çalışmalar başlamıştır. Ülkemizde konu ile ilgili yetişmiş uzman sayısında da önemli yetersizlik olduğu gözlenmektedir. Dolayısıyla, konu ile ilgili çalışmaların artabilmesi için uzman araştırmacı sayısının da artmasının önemi büyüktür. Çalışmanın yapıldığı IVF laboratuvarı bünyesinde daha önceden yapılan embriyo kültür çalışmasında dört farklı kültür medyumu içerisinde CR1aa medyumu ile en yüksek oranda blastosist gelişimi elde edilmiştir. Dolayısıyla, çalışmada CR1aa medyumunun kullanılmasına karar verilmiştir.

Fertilizasyondan sonra embriyoların gelişimlerinin sürdürülebilmesi için uygun şartlarda kültür edilmeleri gerekmektedir. Embriyoların değişik gelişim dönemlerinde gereksinim duydukları besin maddelerinin değiştiği bilinmektedir. Ancak içeriği tümüyle tanımlanmış olan maddelerden oluşan bir medyumun tam anlamıyla geliştirilmemiş olması embriyoların besinsel gereksinimlerinin belirlenmesini güçleştirmektedir. Bilindiği üzere, en yaygın olarak kullanılan protein kaynakları BSA ve FCS'dur. Bunlardan BSA CR1aa medyumu içerisine hazırlanırken 3 mg/ml dozda katılmaktadır. FCS ise fertilizasyon 0. gün kabul edildiğinde 4. günde %10 oranında ilave edilmektedir. Bu iki maddenin gelişim üzerindeki etkilerinin incelenmesiyle konu ile ilgili yürütülecek sonraki çalışmalar için bilgi birikimi sağlanacaktır.

İn Vitro Embriyo Üretiminin Tarihçesi

Fertilizasyona ilişkin bilgilerin çoğu, Gregory Pincus ve arkadaşlarınca memelilerde 1930'lu yıllarda araştırılmış olmasına karşın, özellikle 1940'lı yıllarda deniz kestanelerinde yapılmış çalışmalara dayanmaktadır. Memelilerde fertilizasyon olayının daha iyi anlaşılması, 1950'li yıllarda sperma kapasitesinin bulunmasıyla olmuştur. Tavşanlarda, yavruyla sonuçlanan ilk başarılı IVF çalışması 1959 yılında

gerçekleştirilmiştir. Tavşanlardaki bu ilk çalışmalarda, çiftleşmeden 12 saat sonra, uterustan elde edilen sperma kullanılmıştır. Yine 1968'de, farelerde uterustan elde edilen sperma ile yapılan başarılı in vitro fertilizasyon çalışması bildirilmiştir. Chang ve arkadaşları 1986'da ilk kez hamsterlerde ve onu takiben de farelerde epididimal spermanın IVF için kullanılabileceğini göstermişlerdir. Farelerde ve ratlarda, epididimden elde edilen spermanın in vitro kapasitasyonu 1970'li yılların başında gerçekleştirilmiştir (2).

Sığırlardaki çalışmalar da bu süre içerisinde yoğun biçimde süregelmiştir. In vitro mature edilmiş sığır yumurtasının ilk başarılı fertilizasyonu, 1977'de Iritani ve Niwa (11) tarafından bildirilmiştir. İlk kez ovule olmuş yumurtanın in vitro fertilizasyonu sonucu canlı bir buzağı elde edilmesi de 1981'de gerçekleştirilmiştir (12). Yine Kanada'da Lambert ve arkadaşlarınca (13) laparoskopik yöntemle elde edilen sekonder oositlerden, 6 adet buzağı in vitro fertilizasyon yapılarak elde edilmiştir. Bu işlemde laparoskopi ile ovulasyona yakın zamanda toplanan yumurtalar in vitro fertilize edilip tavşan oviduktunda in vivo kültür edilmiştir. In vitro mature edilmiş yumurtalardan ilk buzağı, 1986 yılında Japonya'dan Hanada ve arkadaşları tarafından (14) bildirilmiştir. Bu çalışmada, embriyolar blastosit aşamasına dek tavşan oviduktunda in vivo kültür edilmiş ve transferden önce dondurulup çözündürülmüşlerdir. Transfere kadar tümüyle in vitro şartlarda üretilmiş embriyolardan ikiz yavrunun elde edildiği çalışma da Dublin'den Lu ve arkadaşları tarafından 1987'de (15) bildirilmiştir.

Diğer türlerde de başarılı IVF çalışmaları yapılmıştır. Özellikle dünyada bazı ülkelerde koyun ve keçi yetiştiriciliği büyük öneme sahiptir. Çiftlik hayvanları arasında ilk olarak IVF çalışmalarında kullanılan hayvan koyun iken, in vitro maturasyon ve fertilizasyon sonucu elde edilen kuzuların doğumunu bildiren çalışmalar çok sonraları gerçekleştirilebilmiştir (2). Söz konusu çalışmada in vitro mature edilen koyun oositlerinin in vitro fertilizasyonundan sonra in vitro kültür edilmiş ve kültür sonrasında gelişen embriyolar taşıyıcı anne koyunlara transfer edilmiştir. Transferden sonra gelişen gebeliklerden canlı kuzular elde edilmiştir.

Domuzlarda ise, ilk in vitro fertilizasyon çalışması in vivo mature olmuş oositlerin kullanılması yoluyla 1986 yılında Cheng ve arkadaşları tarafından (16) bildirilmiş olmasına karşın, tümüyle in vitro şartlarda üretilmiş embriyoların blastosit aşamasına dek geliştirilmeleri ve canlı yavruların elde edilmesi, İtalya'da 1989 yılında Mattioli ve arkadaşları tarafından (17) gerçekleştirilmiştir.

Atlarda ise, ilk canlı yavru, in vivo mature olmuş yumurtaların in vitro fertilizasyonu sonucu Palmer ve arkadaşları (18) tarafından 1991 yılında gerçekleştirilmiştir.

İn Vitro Embriyo Üretimi

İçinde bulunduğumuz yüzyılın en önemli bilimsel gelişmelerinin olduğu biyoteknoloji alanındaki ilerlemeler özellikle son çeyrek yüzyılda gerçekleşmiştir. Reprodüktif alanda kaydedilen gelişmeler dikkate alındığında, elde edilen başarılar baş döndürücüdür ve her geçen gün de bu gelişmelere yenileri eklenmektedir. Gamet hücrelerinin gelişim ve fizyolojilerinin daha iyi anlaşılmasına başlanmasıyla bu süreç daha da hızlanmıştır. Gamet fizyolojisinin ve fertilizasyon olgusunun daha iyi anlaşılması, ancak bu işlemlerin in vitro şartlarda uygulanabilmesiyle olası hale gelmiştir. Bunun için; bu alanda ilk olarak, embriyoların in vitro şartlarda geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu çalışmalar genellikle farelerle ve çiftlik hayvanlarından da özellikle sığırlarda yoğun biçimde uygulanmışlardır. Ayrıca, elde edilen sonuçlar beşeri alanda da önemli uygulama olanakları bulmuştur.

Suni tohumlama metoduyla başlayan reprodüktif biyoteknoloji daha sonra, embriyo transferi ile yeni bir boyut kazanmıştır. Bununla da yetinmeyen biyoteknoloji, in vitro fertilizasyon tekniğiyle ayrı bir ivme kazanmıştır (19). İn vitro fertilizasyon tekniğinde, anneden elde edilen yumurta, babadan elde edilen spermatozoonlar ile laboratuvar şartlarında birleştirilir (20). Bunun sağlayacağı yararlar bilindiği üzere çok çeşitlidir. İn vitro embriyo üretimi insanlarda reprodüktif sorunların çözümü ile hayvanlarda özellikle genetik ilerlemenin sağlanması bakımından önemli bir biyoteknolojik yöntemdir. Ayrıca maturasyon, fertilizasyon ve erken embriyonik gelişim gibi bazı olguların anlaşılmasına yardımcı olması bakımından da bilimsel çalışmalar açısından ayrı bir öneme sahiptir (21, 22). Belirtmeden geçilemeyecek hususlardan birisi de, gen transferi ve klonlama gibi ileri düzeydeki uygulamaların in vitro embriyo üretiminde yapılan gelişmeler sayesinde gerçekleştirilebilmiş olmasıdır (23). Bu tekniğin hayvancılığa sağladığı bazı yararlar; besi sığırlarının niteliklerini iyileştirmek, ikiz gebelikler için embriyo sağlamak, üstün niteliklere sahip ineklerin infertilite sorunlarını çözmek, transgenik ve klon hayvanlar üretmek ve cinsiyetleri bilinen embriyolar sağlamak olarak özetlenebilir.

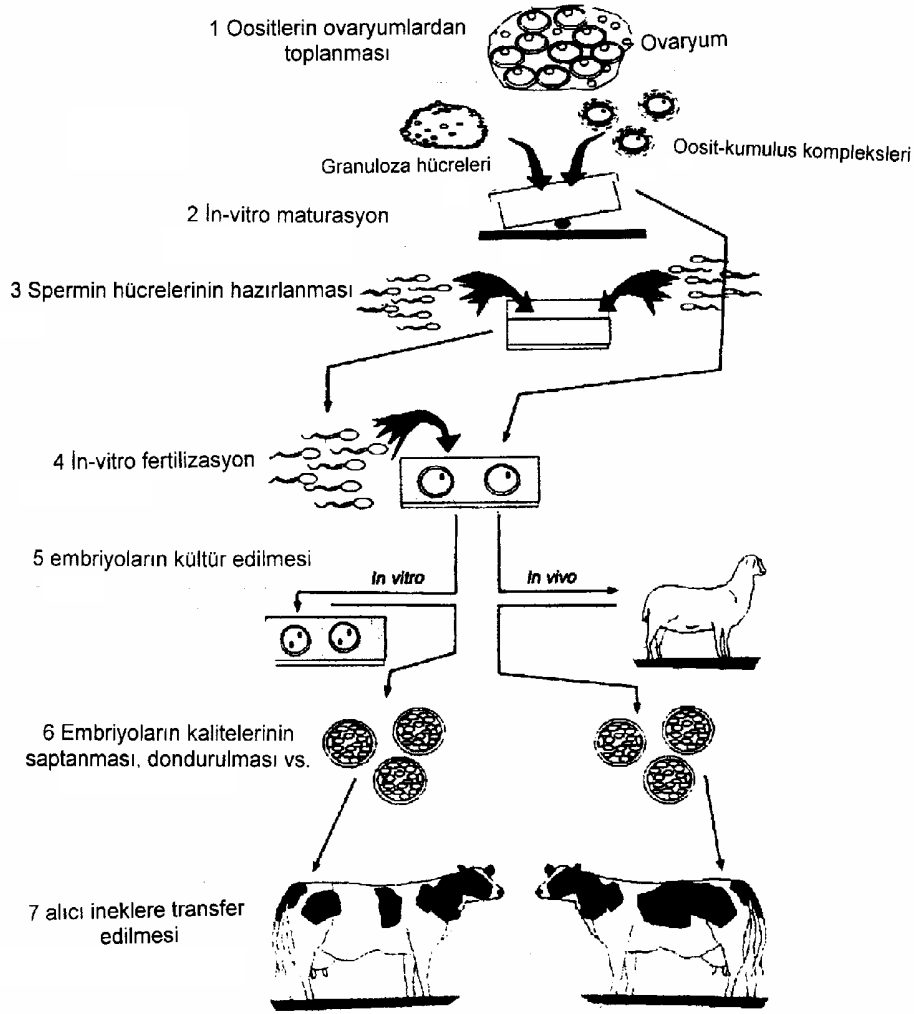
Bu genel yararlardan başka, üstün özellik taşıyan hayvanların ölümlerinden sonra dahi elde edilecek yumurtalar, in vitro fertilizasyon uygulanarak kullanılabilirler ve bu yöntemle üstün genetik yapıdan sonuna kadar yararlanma fırsatı elde edilebilir.

İn vitro embriyo üretimindeki başlıca aşamalar; oositlerin elde edilmesi ve maturasyonu, in vitro fertilizasyon ve embriyo kültürü olarak 3 aşamaya ayrılabilir. Bu aşamalara geçilmeden önce ülkemiz açısından in vitro embriyo üretim teknolojisinin önemine değinmek yararlı olacaktır. Sığır embriyolarının üretimi şematik olarak Şekil 1'de özetlenmiştir.

Ülkemiz Açısından Sığır IVF Teknolojisinin Önemi

Özellikle OPU/IVF (Ovum Pick Up/In Vitro Fertilizasyon) sonucu elde edilecek embriyoların sığır ıslahında kullanılması ülkemiz açısından oldukça önemlidir. Sığır ıslah çalışmaları, gelişmiş ülkelerde uygulanan düzenli kayıt sistemi ve erkek hayvanların projeni teste tabi tutulmaları sonucu son 50 yıl içerisinde oldukça büyük ilerleme sağlamıştır. Ülkemiz dünyada suni tohumlama uygulamasına başlayan ikinci ülke olmasına karşın, ıslah çalışmalarında istenilen düzeyin oldukça gerisinde kalmıştır. Bunun bir çok nedeni bulunmaktadır. Bu kaybı kısa zaman içerisinde kapatmak ancak ileri biyoteknolojik yöntemlerin kullanılması ile olasıdır (24, 25).

Bilindiği üzere, reproduktif biyoteknoloji son yıllarda dünya çapında büyük ilerlemeler sergilemiştir (klonlama, transgenik hayvan üretimi vs). Gelişen bu teknolojiler özellikle ıslah çalışmalarında geri kalmış gelişmekte olan ülkelere, açıklarını kapamak için büyük fırsatlar sunmaktadır. Ayrıca, ülkemizde son yıllarda hayvansal ürün üretiminde (özellikle et ve süt) büyük yatırımlar yapılmıştır. Yapılan bu yatırımların etkin şekilde değerlendirilebilmesi, ancak ham madde ihtiyacının istenilen kalite ve miktarda sağlanması ile olasıdır. Bunun doğal sonucu olarak yatırımcı firmaların ham madde miktar ve kalitelerini artıracak her türlü projeye destek sağlamaları zorunlu bir durum arz edecektir.



Şekil – 1 Sığır embriyolarının in vitro üretimi (Gordon, 1994 (2)'den alınmıştır).

Yukarıda sözü edilen OPU/IVF tekniklerinin kullanılması sonucu, Türkiye'de var olan az sayıdaki elit ineklerden en üst düzeyde yararlanma ve ülkemiz şartlarına adapte olmuş bu ineklerden elde edilecek yavruların çekirdek damızlık sürülerin oluşturulmasında kullanılması sağlanarak, ıslah çalışmalarının hızlandırılması olasıdır. Ancak, tüm bu işlemleri rutin uygulayabilecek bir kurum ya da laboratuvar ülkemizde tam anlamı ile bulunmamaktadır. Uygulanacak bu yöntemlerle dış alım için harcanan milyonlarca dolarlık öz kaynağın ülkemizde kalması sağlanacaktır. Bunun için öncelikle yapılması gereken, mezbahadan sağlanacak ovaryumlardan elde edilecek oositlerle deneysel çalışmalara başlanması ve in vitro embriyo üretimini laboratuvar için standartlaştırdıktan sonra, hazırlanacak bir proje ile OPU/IVF sonucu elde edilecek embriyoların ıslah amacıyla kullanılmasının sağlanmasıdır. Son yıllarda ülkemizde in vitro embriyo üretimi

ile ilgili çalışmalara başlanmış olmasına karşın istenilen düzeyde gelişmeler elde edilememiştir (22, 26-28).

Bunun dışında, sığır in vitro embriyo üretiminin laboratuarda standardize edilmesi sonucu klonlama ve transgenik sığır üretim çalışmalarına geçilerek, biyofarming için temel adımların atılması da sağlanmalıdır.

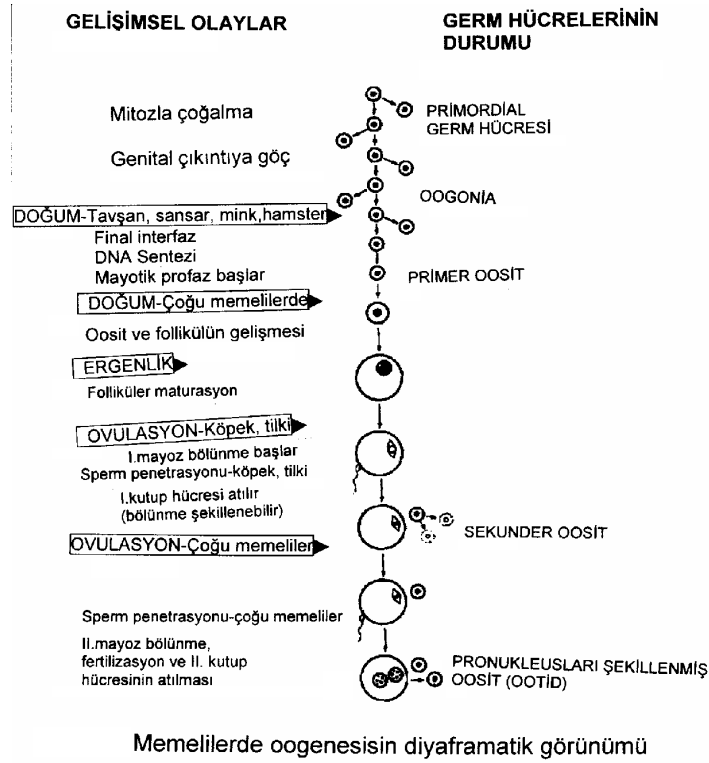
Oositlerin Elde Edilmesi ve Maturasyonu

Gametlerin farklılaşmasında primer oosit aşamasına, çoğu dişi memeli türlerde primordial germ hücrelerinin ve oogoninin mitozla proliferasyonunu takiben bunların mayoz girişleri ile fetal yaşamda ulaşılır (2, 29, 30). Birinci mayozun profaz aşamasında gelişimi durdurulmuş oosit tek katlı yassı epitel follikül hücreleri ile kuşatılmıştır. Bu aşamadaki folliküller primordial folliküller olarak adlandırılmaktadır. Primer oositler hayvanın reproduktif üretkenliği boyunca kullanılacak gametojenik materyaldir ve bu aşamadan sonra herhangi bir mitoz çoğalmaya uğramazlar. Dişi hayvanın hayatının değişik zamanlarında, uygun hormonların in vivo varlığında primordial folliküllerden bir kısmı gelişmeye ve farklılaşmaya başlar ki; bunun sonucunda da genellikle tek bir mature ve ovulasyona hazır Graaf follikülü şekillenir. Primordial folliküllerin gelişme aşamasına girmeleri fetuslarda, ergenliğe ulaşmamış hayvanlarda, menstrual ve östrus siklusları boyunca ve hatta gebelik süresince dahi gözlemlenebilir. Ancak, fertilizasyona hazır yumurtayı içeren mature follikül, uygun şartlar altında sadece reproduktif açıdan olgun hayvanlarda reproduktif siklusun spesifik dönemlerinde ve mevsime bağlı östrus gösteren hayvanlarda da çiftleşme mevsimi boyunca bulunabilir. Gelişmekte olan folliküllerden dominant özellik kazananların; başka bir deyişle, ovulasyon için seçilenlerin dışındaki folliküller dejenerasyon sonucu ortadan kaybolurlar (29). İşte bu sebepten dolayı, çalışmalar özellikle gelişmekte olan tersiyer folliküllerden elde edilen oositlerin dominant follikülün etkisi olmaksızın in vitro şartlarda mature edilmesinde yoğunlaşmıştır. Böylece in vivo şartlarda dejenere birçok yumurtadan yararlanmanın yolu açılmıştır. Ayrıca, bu işlem için oositlerin toplanma zamanı da çok büyük önem taşımamaktadır.

Follikül ünitesindeki büyüme ve farklılaşma başladığında, primordial fazdan ayrılan folliküllerin içerisindeki primer oosit hacimce büyümeye başlar ve bunu kuşatan somatik hücreler çoğalarak tek katlı kübik ya da prizmatik yapıya dönüşürler. Morfolojik olarak bu yapı primer follikül olarak adlandırılır. Gelişmeye başlayan follikülle birlikte oositin cansız hücre dışı katmanını oluşturan zona pellusida şekillenmeye başlar. Follikül

hücrelerinin proliferasyonu çok katlı epitel yapı şekilleninceye kadar devam eder ve follikül hücrelerinin etrafı tek katlı yassı hücreler ile kuşatılır. Bu şekilde sekonder follikül gelişmiş olur. Aynı zamanda sekonder folliküldeki primer oosit de gelişmesine devam eder. Follikül hücrelerinin büyümesi ve teka eksterna ve interna olarak iki ayrı yapıya farklılaşmasından sonra follikülün içerisi sıvı ile dolmaya başlar. Bu dönemde oosit follikül duvarının bir tarafında hücrelere tutunmuş durumdadır ve follikül hücreleri bu aşamadan itibaren granuloza hücreleri olarak adlandırılır. Çok az memeli türünde (Madagaskar kirpisi, Moon faresi gibi) antrum hiçbir zaman şekillenmez. Çoğu memelinin tersiyer ya da antral follikülünde oosit, kumulus ooforus diye adlandırılan tepecik şeklindeki yapı ile kuşatılmış durumdadır. Kumulus ooforus, granuloza ve kendi kumulus hücreleriyle birlikte aynı zamanda oositle de temas halindedir. Kumulus hücrelerinden oositi çepeçevre kuşatan ve oositin plazmalemmasıyla ilişkide olan parmak şeklindeki villuslara sahip hücreler korona radiata olarak adlandırılırlar. Bazı memelilerde oosit maksimum çapına ulaşmıştır ve gelişimini de tamamlamıştır. Bu duruma daha çok kısa siklusa sahip rodent gibi türlerde rastlanır. Evcil hayvanlar ve primatlar gibi uzun siklusa sahip türlerde ise oositin gelişimi devam eder. Tersiyer follikül içerisinde, oldukça geniş bir follikülle sonuçlanan, granuloza hücrelerinin proliferasyonu ve lumendeki sıvı sekresyonu ovulasyon anına kadar devam eder (2, 29, 30). Dişi gamet hücrelerinin yaşam aşamaları Şekil 2'de özetlenmiştir.

Yukarıda da söz edildiği gibi, folliküler gelişim süresince gelişmekte olan birçok oositin dejenerasyona uğraması ve ayrıca süperovulasyon prosedüründe de oosit vericilerine yapılan hormon uygulamalarında, oositlerin toplanmasında ve fertilizasyon yeteneklerindeki değişkenlikler IVF uygulamasında çeşitli aksaklıkların doğmasına ve özellikle deneysel çalışmalar için oosit sayısının yetersiz olmasına neden olmaktadır. Bundan dolayı ve özellikle oosit sayısındaki artışı sağlamak için, araştırmacılar mezbahalardan kolayca toplanabilen ovaryumlar üzerindeki 7-8 mm'den daha küçük folliküllerin aspire edilmesiyle elde edilen olgunlaşmamış oositlerin olgunlaştırılabilmeleri için yeni prosedürler geliştirmişlerdir (22, 31, 32). Bunun yanında, OPU adı verilen ve vajinadan ultrason yardımıyla folliküllerin aspire edilmesini kapsayan yöntem de özellikle beşeri sahada ve sığır IVF uygulamasında başarıyla kullanılmakta olan bir yöntemdir (33-35).



Şekil – 2 Dişi gamet hücrelerinin yaşam döngüsü (Austin ve Short, 1976 (36)'dan alınmıştır)

Mezbahadan ovaryumlar çoğunlukla yaklaşık 30°C'lik fizyolojik tuzlu su bulunan termoslar içerisinde getirilir. Bazı laboratuvarlar fizyolojik tuzlu su yerine doku kültür medyumu-199 (tissue culture medium-199, TCM-199) veya fosfat tamponlu tuz çözeltisi (phosphate buffered saline, PBS) gibi değişik medyumları da kullanmaktadır. Oositlerin maturasyona bırakılmalarına kadar olan sürenin 6 saati geçmemesi önerilmektedir. Bazı durumlarda, kontaminasyonu önlemek amacıyla antibiyotik eklemenin yararlı olacağı söylenebilir, IVF için bunun yapılması zorunlu değildir. Laboratuvara getirilen ovaryumlar, oositlerin elde edilmesinden önce, mutlaka ılık çeşme suyu (30-35°C) ile yıkanmalıdır. Böylece mantar kontaminasyonu büyük ölçüde önlenmektedir. Mezbahadan getirilen ovaryumlardan oositlerin elde edilmesinde değişik yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; aspirasyon yöntemi, mincing (dilimleme) yöntemi ile folliküllerin diseksiyonu ve patlatılması yöntemidir (2, 37, 38).

Aspirasyon Yöntemi: Bu yöntemde, genellikle 2-8 mm çapındaki tersiyer folliküller, bir enjektöre ya da vakum sistemine bağlı 18 ga'luk bir enjektör iğnesi ile aspire edilirler. Böylece follikül sıvısı ile birlikte oositler de aspire edilmiş olur. Elde edilen folliküler içerik 50 ml'lik konik santrifüj içerisinde biriktirilir. Toplanan follikül sıvısı

sedimentasyon için bir süre bekletildikten sonra, dipteki sediment bir pastör pipeti yardımıyla oositlerin ve embriyoların yıkanması için hazırlanan vasat içerisine aktarılarak stereo mikroskop altında incelenerek oositler toplanır. Yıkama vasatı olarak PBS veya TL-HEPES [tyrode lactate-2-(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethanesulfonic acid] gibi pH'sı 7.2-7.4 arasında sabitlenmiş değişik solüsyonlar kullanılabilir. Günümüzde en yaygın kullanılan oosit toplama yöntemidir (2, 22).

Mincing (Dilimleme) Yöntemi: Bu yöntemde, ovaryumlara üzerlerindeki folliküllerden geçecek şekilde çeşitli kesitler yapılır. Daha sonra ovaryum yıkama vasatı içerisinde iyice yıkanarak, oositlerin yıkama vasatına geçmesi sağlanır. Yıkama sonunda, petri içerisinde toplanan içerik ya direkt olarak stereo mikroskop altında oositler için araştırılır ya da yıkanan ovaryum çok fazla ise yıkamadan sonra, yıkamada kullanılan solüsyon 50 ml'lik konik santrifüj tüp içerisine aktarılır. Daha sonra, dipteki sedimentte oositler yukarıda tanımlandığı gibi araştırılır (2).

Folliküllerin Diseksiyonu ve Patlatılması Yöntemi: Bu yöntem için öncelikle folliküller ovaryumlardan diseksiyon yoluyla ayrılırlar. Ayrılan bu folliküller yıkama vasatı içerisinde patlatılarak, oositlerin dışarı çıkması sağlanır. Sonrasında oositler stereo mikroskop altında araştırılır (2).

Bunun yanında, başarılı bir in vitro fertilizasyon için, vajinadan ultrason yardımıyla folliküllerin aspire edilmesi de özellikle beşeri sahada başarıyla uygulanmakta olan bir yöntem iken, günümüzde hayvancılıkta, özellikle elit ineklerden yaşam süreleri boyunca en üst düzeyde yararlanabilmek amacıyla yaygın şekilde çalışılan ve kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. OPU yöntemiyle, primer oositler aspire edilebilir ve göreceli olarak kısa aralıklarla işlem tekrarlanabilir (haftada bir ya da iki kez gibi). Yöntem, sığır embriyolarının laboratuvar şartlarında üretilmesindeki gelişmelerle birleştirilince, konvansiyonel süperovulasyon ve cerrahi olmayan embriyo toplamayla embriyo elde edilmesine alternatif ve uygulanabilir bir durum göstermektedir. Bu durum özellikle embriyo toplama yönteminin uygulanamadığı üstün nitelikli vericiler ve göreceli olarak kısa zamanda çok sayıda embriyonun elde edilmesinin amaçlandığı durumlarda özel bir önem taşımaktadır. Konvansiyonel yöntemle genç hayvanlardan embriyoların toplanması ya çok güç olmakta ya da çoğu zaman olanaksız bir hal almaktadır. Yöntem verici hayvanlarda ultrason aracılığı ile tersiyer folliküllerin transvaginal aspirasyonu ile gerçekleştirilir (20, 23, 33-35). Bu yöntemle elde edilen oositler in vitro maturasyona tabi

tutulur ve in vitro embriyo üretimi için kullanılırlar. Uygulama follikül stimüle edici hormon (FSH) ile sitümüle edilen veya edilmeyen verici ineklerde haftada bir ya da iki kez yinelenabilir. Sirard ve arkadaşları (20) 1989'de yaptıkları bir çalışma ile embriyo üretiminin üç günlük FSH uygulamasından sonra FSH'dan yoksun bırakmakla iyileştirilebileceğini ifade etmişlerdir. Bousquet ve arkadaşları (23) ise, kısa bir zaman aralığında çok sayıda dişi embriyo üretmek istenildiğinde in vitro embriyo üretiminin konvansiyonel süperovulasyon prosedürüyle karşılaştırıldığında daha etkili bir yol olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, konvansiyonel süperovulasyonda, uygulamaya verilen yanıtlar bireyler arasında değişkenlik göstermektedir. Genellikle süperovulasyon sonucu toplanan embriyo sayısı 2-20 arasında değişebilmektedir. Uygulanan hormonlar peptid yapılı olduğundan hayvanlarda immun reaksiyon gelişmesine neden olabilmekte ve yinelenen uygulamalardan elde edilen başarı oranı azalmaktadır. İlaç fiyatlarının da pahalı olması ayrı bir maliyete neden olmaktadır.

Başarılı bir biçimde gerçekleştirilecek in vitro embriyo üretimi için, laboratuarda, kaliteli oositlerin seçiminin iyi yapılabilmesi büyük önem taşımaktadır. Oositi kuşatan, bütünlüğü bozulmamış kumulus hücrelerinin varlığı ile birlikte, oositin homojen görünümlü ooplazmaya sahip olması, mature olmamış oositlerin mature olabilecekleri ve embriyonik gelişimi sürdürebileceklerini gösteren en dikkate değer konudur (2, 22).

Sığır oositlerinin in vitro maturasyonu için en yaygın biçimde kullanılan maturasyon medyumunu kompleks doku kültür (TCM 199) medyumudur. Bunun dışında Ham's F10, MEM (minimum essential medium) gibi diğer medyumlar da bu amaçla kullanılmaktadır. Maturasyon medyumları %10 FCS, gonadotropik hormonlar [FSH ve luteinleştirici hormon (LH)], büyüme faktörleri [epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF) veya insülin benzeri büyüme hormonu-I (insulin like growth factor-I, IGF-I)] ve östradiol-17 β gibi bir steroid hormonla desteklenmektedir. Bunların tümü yerine değişik kombinasyonları kullanılmaktadır. Memeli oositlerinin IVM'u sırasındaki kültür şartlarına bağımlı olarak, IVF ve sonraki embriyonik gelişim oranlarının önemli derecede etkilendiği yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (22, 39, 40).

IVM'da, primer oosit I. mayozu tamamlayarak mature olur ve II. mayozun metafaz aşamasında gelişimi tekrar duraklamış olan ve canlı yavru verebilecek yetenekte sekonder oositler gelişir. Bu sırada oosit I. kutup hücresini de atmıştır. Ayrıca, oositi kuşatan kumulus hücre topluluğunda hacimce bir genişleme oluşur ve yapışkan bir durumda birbirlerine daha gevşek biçimde tutunur bir hal alırlar. Bu işlem için oositlerin 20-24 saat

süreyile belirli ısı derecesinde (sığırlarda 38,5-39°C) %5 CO₂ ve %100'e yakın oranda nem içeren etüv şartlarında kültür edilmesi gereklidir.

Sperm Kapasitasyonu ve İn Vitro Fertilizasyon

Maturasyona bırakılan oositler yaklaşık 22 saat sonra yıkama medyumlarında yıkanarak fertilizasyon medyumu içerisine aktarılır ve aktarma işleminden sonra, fertilizasyon medyumu içerisine sperm hücreleri eklenir. Sperma kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu, fertilizasyon işleminin başlatılabilmesi için, sperm hücresinin oositin zona pellusidasından penetre olmasını sağlayan fizyolojik olaylardır. Kapasitasyon sperm hücresinin dış membranında morfolojik olarak gözlemlenebilen akrozom reaksiyonunun şekillenmesine olanak sağlayan biyokimyasal değişiklikleri içerir. İneğin genital kanalı içerisinde bulunan glukozaminoglikanlar sperm membranının destabilizasyonuna neden olarak kapasitasyonu da etkilerler. Bir tür glukozaminoglikan olan heparin günümüzde IVF'de kullanılan boğa sperm hücrelerinin kapasitasyonu için yaygın biçimde kullanılmaktadır. Kalsiyuma karşı sperm membran geçirgenliğinde şekillenen değişikliğin kapasitasyondan sonra gelişen akrozom reaksiyonunun başlaması için primer uyarım olduğu görülmektedir. Bu değişikliğe sebep olan fizyolojik uyarımı doğuran bileşenin, zona pellusidanın peptid bir bileşeni olduğu düşünülmektedir. Akrozom reaksiyonuna sperm plazmalemması ve akrozomun dış membranının vezikülasyonu ve füzyonu neden olur. Böylece akrozom içeriği serbest hale geçmiş olur. Akrozom içeriğinde zona pellusidayı sindirebilen litik enzimler mevcuttur. Akrozom reaksiyonu ile birlikte sperm hücresinde zona pellusida yakınlarında hiperaktif bir motilite de şekillenir (41-44).

Yukarıda sözü edilen heparinden başka, sığırlarda, kafeinle birlikte veya kafein olmaksızın kalsiyum iyonofor da kapasitasyon için başarılı biçimde kullanılmaktadır. Ca iyonoforla yapılan 1 dakikalık bir muamele sonucunda Ca düzeyinde artış şekillenmektedir (45-47).

IVF'de sığırlar baz alındığında, kullanım kolaylığı bakımından genellikle dondurulmuş sperm hücrelerinin kullanıldığı görülmektedir. Çözündürme işlemi 35°C'da bir dakika bekletilerek yapılabilir. Kullanılacak sperm hücrelerinin canlı ve iyi nitelikte sperm hücreleri olması gereklidir. Bu işlem için genellikle iki farklı sistem kullanılır. Bunlar swim-up ve Perkol separasyon yöntemleridir (2, 22, 44).

Swim-up:

Bu yöntemde esas amaç, hareketli sperm hücrelerinin hareketsiz olanlardan ayrılmasını sağlamaktır. Swim-up prosedüründe genellikle çözündürülmüş payet içeriğinin üzeri uygun miktarda bu iş için hazırlanmış medyum ile kaplanır. Motil durumdaki sperm hücreleri hareket ederek vasat içerisine geçerler. Daha sonra üstteki solüsyon dipteki sedimenti bozmadan alınarak santrifüj edilir. Santrifüj işleminden sonra, motil spermatozoitler pelet halinde dipte kalır. Üstteki kısım atıldıktan sonra, dipteki pelet üzerinde kalan medyumuyla karıştırılır ve spermatozoit yoğunluğu belirlendikten sonra sperm hücreleri IVF işleminde kullanılır. Bu yolla motilitesi çok iyi olan sperm hücrelerinin elde edilmesi olası ise de, elde edilen sperm hücre miktarının az olacağı gerçeği özellikle pahalı spermanın kullanıldığı durumlarda göz ardı edilmemelidir (2, 44).

Perkol Separasyonu:

Bu yöntemde ise, canlı sperm hücrelerinin, ölü olanlardan ayrılması temel amaçtır. Ölü sperm hücrelerinin ağırlıklarının canlı olanlardan az olması nedeniyle, yoğunlukları farklı tabaka oluşturmuş iki farklı ortamda bunları ayırmak olasıdır. Bu amaçla, konik bir santrifüj tüpüne katman oluşturacak biçimde, %90 Perkol tabana ve bunun üzerine de %45 Perkol eşit miktarlarda konur. En üst kısma da yine katman oluşturacak biçimde sperma eklenir ve dakikada 700 x g.de 10-15 dakika süreyle santrifüj edilir. Ölü sperm hücreleri iki Perkol katmanı arasında ve canlılarda tabanda şekillenen pelet içerisinde toplanırlar. Santrifüj tüpünde olabildiğince pelete zarar vermeden diğer kısımlar tümüyle uzaklaştırılır. Elde edilen pelet uygun biçimde dozlanıp sulandırıldıktan sonra IVF için kullanılır. Bu yöntemle elde edilen sperm hücrelerinin tümünün motilitesinin iyi olmasını beklemek yanlış olur, ancak elde edilecek sperm hücre sayısı swim-up yöntemine göre daha yüksektir. Fertilizasyon için de maturasyonda kullanılan etüv şartlarının aynısı kullanılır (2, 22, 44).

IVF'da genel olarak oosit başına 10.000-20.000 sperm hücresi kullanılmaktadır. Diğer bir deyişle IVF'da kullanılan sperm hücre yoğunluğu $1-2 \times 10^6$ spermatozoon/ml'dir. Yukarıda da değinildiği gibi sperm kapasitasyonu amacıyla heparin yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, sperm hücrelerinin motilitesini artırmak amacıyla penisilamin, hipotaurin ve epinefrin karışımı da IVF işleminde oldukça sık kullanılmaktadır (22, 48, 49).

Fertilizasyonla birlikte, oositte duraklamış olan metafaz II'den başlanarak, mayozun II. bölünmesi tamamlanır ve bu sırada II. kutup hücreleri de perivitellin boşluğa atılır. Fertilize olan bir oositte erkek ve dişi pronukleuslar şekillenir. Daha sonra bu pronukleuslar birleşerek zigot olarak adlandırılan tek hücreli embriyonun nükleusunu oluştururlar. Pronukleusların birleşmesi olgusuna singami adı verilir. Sonraki aşamalarda ise, embriyoda bölünmeler şekillenir. Sperm hücrelerinin katılmasından yaklaşık 48 saat sonra 2, 60 saat sonrada 8 hücre aşamasındaki embriyolar görülebilir. Fertilizasyon vasatı içerisindeki embriyolar duruma göre 24 ya da 48 saat sonra, yıkama vasatında yıkayıp kültür ortamına aktarılırlar (2, 29, 30).

Embriyo Kültürü

Fertilizasyondan sonra, embriyoların gelişebilmeleri için daha uygun ortamlara aktarılmaları gerekmektedir. Genellikle, embriyolar in vivo ya da in vitro olarak iki ayrı yöntemle kültür edilirler.

İn vivo kültür sisteminde embriyolar senkronize edilmiş aynı türden ya da farklı türden hayvanların oviduktlarına aktarılırlar. Belirli bir süre için gelişimlerini tamamlayan embriyolar tekrar toplanırlar. Genellikle 7 ya da 8 gün embriyolar bu şekilde kültür edilirler. Bu yöntem günümüzde terk edilmiş bir yöntemdir. Çünkü, hayvanların bakımı, senkronizasyonu ve kültür amacıyla alıkonulmaları gibi ekstra maliyetleri gerektirmektedir (2, 50, 51).

İn vitro kültür sisteminde ise, iki farklı sistem kullanılmaktadır. Bunlar; ko-kültür ve içeriği bilinen medyumlar içerisinde embriyoların kültür edilmesidir.

Ko-kültür:

Bu yöntemde, embriyolar ovidukt epitel, fibroblast ve granuloza gibi farklı hücre kültürlerinin yapıldığı kültür ortamına aktarılırlar ve hücreler ile birlikte kültür edilirler. Bunun dışında yukarıda belirtilen hücrelerin kültür edildiği medyum hücrelerden arındırıldıktan sonra da kültür amacıyla kullanılmaktadır. Her iki durumda da temel ilke, kültür edilen hücrelerin salgıladığı büyüme faktörlerinden embriyoların da yararlanmasını sağlamaktır (52-56).

Kimyasal Olarak Tanımlanmış Medyumlar İçerisinde Kültür:

Bu yöntemde ise, ayrıca bir hücre kültürüne gereksinim yoktur. Bundan dolayı da daha kolay bir uygulamadır. Sığır embriyolarının in vitro kültüründe, en yaygın olarak kullanılan bu gruptaki vasatlardan birisi de CR1aa denilen vasattır. Ancak embriyolar kültür edilirken 4. günde yapılacak FCS katkısı embriyoların gelişimi üzerine olumlu etkide bulunmaktadır. Bu yöntemle kültür edilen, IVM'la mature edilip fertilize edilmiş oositlerden yaklaşık %25-50 arasında blastosist aşamasında embriyo elde edilebilmektedir (7, 22, 55, 57-59).

Embriyoların kültür edilmesi amacıyla kullanılan kimyasal olarak tanımlanmış medyumların hemen hepsi genellikle BSA gibi bir protein kaynağını içermektedir. Günümüzde erken embriyonik gelişim döneminde proteinlerin veya amino asitlerin ne rol oynadıkları tam olarak bilinmemektedir. Flood ve Shirley (60) in vitro kültür ortamında bulunan BSA gibi bir protein kaynağının başlıca fonksiyonunun embriyolar üzerinde toksik etkisi olan maddelerin olumsuz etkilerinin ortadan kaldırılması olma olasılığını araştırmıştır. Yaptıkları çalışmada sadece medyumların en düşük kalitedeki saf suyla hazırlanması durumunda BSA katılmış medyumlardaki embriyonik gelişimin herhangi bir protein kaynağının katılmadığı medyumlardaki embriyonik gelişimden daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. Elde edilen böylesi bir sonuç proteinlerin kültür süresince embriyoları toksik etkilerden koruduğu görüşünü desteklemektedir.

FCS'un embriyo gelişimi üzerinde bifazik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Bildirilen çalışmada in vitro sığır embriyo gelişimi üzerinde serum katkılı medyumların embriyoların birinci bölünme aşamasında inhibitör bir etkiye sahipken, morula/blastosist aşamasında gelişimi stimüle edici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (61).

IVF sonucu elde edilen embriyolar 7. ya da 8. günde senkronize edilmiş inek veya düvelere transfer edilmelidirler. Çünkü, hazırlanacak alıcı hayvanların maliyetleri oldukça yüksektir ve elde edilecek en yüksek gebelik şansı blastosist aşamasındaki embriyoların transferinden elde edilmektedir. Ayrıca, bu embriyoların daha sonraki kullanımlar için dondurularak saklanmaları da olanaklar dahilindedir (2, 62).

Sığır Embriyolarının Morfolojik Değerlendirilmesi

Embriyoların değerlendirilmesi, embriyo transfer uygulamalarının başarısında önemli bir aşamadır. Embriyoların morfolojik değerlendirilmesi embriyoların transfer edilmesinden sonra elde edilecek gebelik oranının tahmin edilmesi bakımından faydalı olsa da, bireysel olarak her bir embriyonun gelişimine devam edip etmeyeceğinin

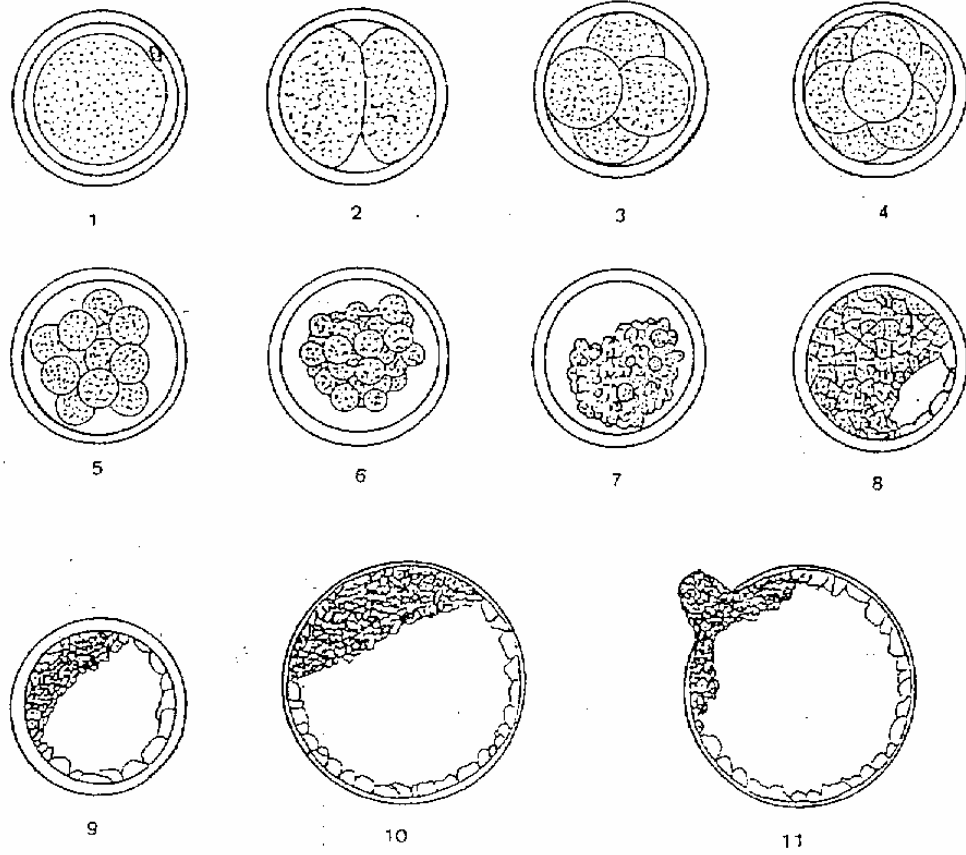
belirlenmesinde sınırlı bir öneme sahiptir. Boyama testi (boya kabul etmeme testi), enzim aktivitelerinin ölçülmesi, glukoz alımı ve kullanımının belirlenmesi ile ölü-canlı boyama tekniklerinin morfoloji ve transfer sonu embriyoların gelişimlerini sürdürebilmelerinin belirlenmesinde yakından ilişkili oldukları bilinmektedir. Bu metotlardan bazıları, ya kompleks veya uzun süreli in vitro kültür periyotlarını, ya da her ikisini birlikte uygulamayı gerektirmektedir. Bundan dolayı da, bu testler çiftlik şartlarındaki embriyo transfer uygulamaları açısından önemli dezavantajlara sahiptir (7, 56, 63-67).

Morfolojik değerlendirme, embriyoların kalitelerini tayin etmek için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Embriyoların kalitelerinin değerlendirilmesi için, bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin tümü, gerçek gebelik oranları baz alındığında, eşit derecede güvenilir yöntemlerdir. Embriyo kalitesinin değerlendirilmesinde yaygın biçimde kullanılan parametreler; şekil, renk, hücrelerin sayısı ve kompaktlığı, perivitellin boşluğun genişliği, ihraç edilmiş ve dejenere hücrelerin sayısı ile veziküllerin sayı ve hacmi olarak sıralanabilir (63). En ideal embriyodan, en zayıf kalitedeki embriyoya kadarki sınıflandırma, işlemi uygulayan uzmanlar arasında değişkenlik gösterir. Bazıları embriyoları iyi ve zayıf diye sınıflandırırken, diğerleri daha kompleks sınıflandırma sistemleri kullanmaktadırlar. Embriyoları iyi, orta ve zayıf diye sınıflara ayıran sistemler en basit ve güvenilir sistemler olarak dikkat çekmektedir. Sığır embriyolarının kalite değerlendirmesinde en yaygın biçimde kullanılan kriter, embriyoların uygun gelişme aşamalarına ulaşıp ulaşmadığının kontrol edilmesidir (2). Günümüze değin, embriyoların değerlendirilmesi, embriyo transfer uygulamasındaki önemini kaybetmemiştir.

Sığır Embriyolarının Morfolojisi

Sığır embriyolarının çapı yaklaşık olarak 12-15 µm kalınlıktaki zona pellusida ile birlikte 150-190 µm arasında değişmektedir. Çapın büyüklüğü, zigot döneminden, blastosistin genişleme dönemine kadar yaklaşık hiç değişmez. Erken bölünme dönemindeki embriyolar, zigot, iki hücreli (blastomerli) ve dört hücreli örneklerinde olduğu gibi 16 hücre aşamasına dek genellikle mevcut sayılabilen hücrelerin sayılarıyla tanımlanırlar. On altı hücreden fazla sayıda hücreye (blastomere) sahip canlı embriyoların yapılan mikroskopik muayeneleri ile ancak mevcut hücrelerin tahmini sayısı ortaya konabilir (Şekil 3). Bunun sonucu olarak da, diğer morfolojik kriterlerin kullanılması zorunludur. Yaygın biçimde, cerrahi olmayan yolla süperovulasyona tabi tutulan verici

ineklerden elde edilen farklı gelişme dönemindeki embriyoların gelişim dönemlerine göre listesi aşağıda sıralanmış ve kısaca açıklanmıştır (2, 68).



Numara:

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11

Tanımlama:

1 Hücreli
2 Blastomerli
4 Blastomerli
8 Blastomerli
16 Blastomerli
Morula
Kompakt Morula
Erken Blastosist
Blastosist
Genişlemiş (Expanded) Blastosist
Hatching Blastosist

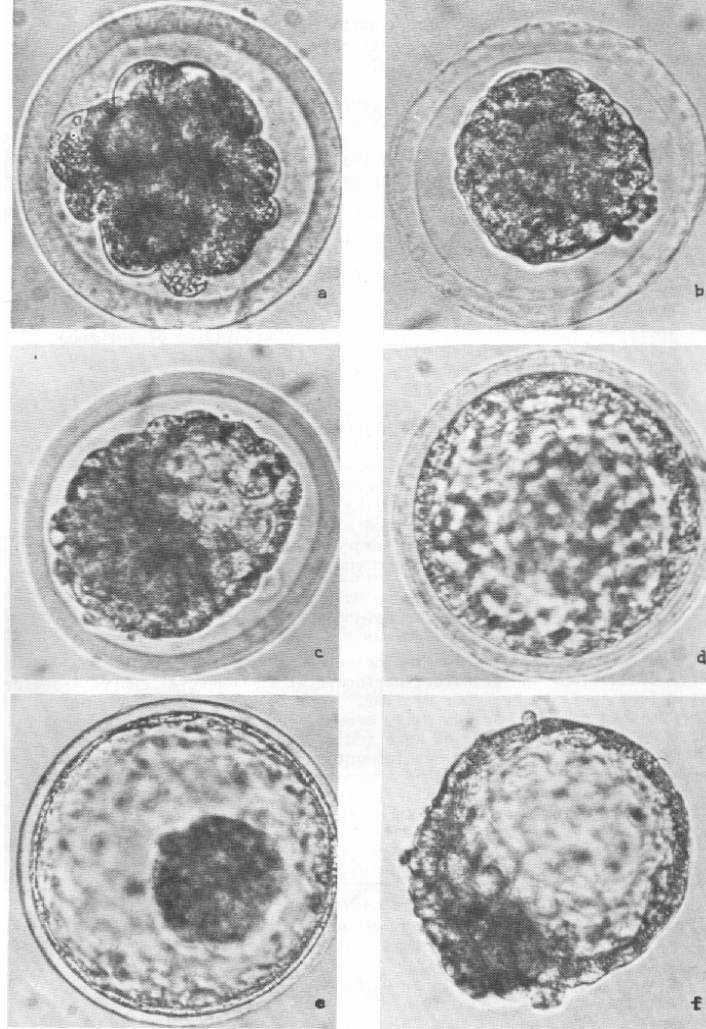
Normal olarak östrüstan sonra
bulunduğu günler:

0 - 2
1 - 3
2 - 3
3 - 5
4 - 5
5 - 7
5 - 7
7 - 8
7 - 9
8 - 10
9 - 11

Şekil – 3 Normal görünümdeki embriyoların şematik görünümleri, isimlendirilmesi ve östrüstan sonra hangi günlerde bulunduğu bilgileri (İleri ve arkadaşları 1998 (68)'den alınmıştır).

Morula: Hücreler yumağı olarak tanımlanan bu dönemde, bireysel blastomerleri, diğerlerinden ayırt etmek güçtür. Embriyoların hücresel yığını perivitellin boşluğun büyük çoğunluğunu kaplamaktadır (Şekil 4a).

Kompakt Morula: Bireysel blastomerler birleşerek, tek vücut olmuştur ve kompakt bir yığın şekillendirmiştir. Embriyo yığını perivitellin boşluğun yaklaşık %60-70'ini kaplamaktadır (Şekil 4b).



Şekil – 4 Farklı gelişme dönemlerindeki sığır embriyoları: **a)** morula, **b)** kompakt morula, **c)** erken blastosit, **d)** blastosit, **e)** genişlemiş blastosit ve **f)** yarıklanmış blastosit (Lindner ve arkadaşları 1983 (63)'ten alınmıştır).

Erken Blastosit: Bu dönemdeki embriyo, blastosöl olarak adlandırılan sıvı ile dolu bir boşluğa sahiptir ve mühür yüzüğü şeklinde genel bir görünüm gösterir. Embriyo perivitellin boşluğun yaklaşık %70-80'ini kaplar (Şekil 4c). Trofoblast hücreleri ile iç hücre yığını (inner cell mass) arasındaki görülebilir fark, bu dönemde gözlemlenebilir hal almaya başlar.

Blastosit: Dıştaki trofoblast kat ile daha koyu ve kompakt olan iç hücre yığınının belirgin farkı tam anlamıyla gözlenebilir hale gelir. Perivitellin boşluğun büyük çoğunluğunu dolduran embriyo ile blastosöl oldukça göze çarpar bir şekil alır (Şekil 4d).

Genişlemiş (Expanded) Blastosit: Embriyonun çapı çarpıcı biçimde artarken (1,2-1,5 kat), zona pellusida orijinal kalınlığının yaklaşık 1/3 oranına kadar inceler (Şekil 4e). Genişlemiş blastosit döneminde iken elde edilen embriyolar sıklıkla kollapse olmuş biçimde görünürler. Bu durum ya tümüyle ya da kısmen blastosölün kaybından kaynaklanmaktadır. Buna karşın, zona pellusida nadiren orijinal kalınlığına tekrar dönebilir.

Yarıklanan /Yarıklanmış (Hatching /Hatched) Blastosit: Gelişimin bu döneminde iken elde edilen embriyolar, ya yarıklanma işlemini sürdürüyor, ya da zona pellusidayı tümüyle terk etmiş durumdadırlar. Yarıklanmış blastositler, ya blastosölle iyi biçimde sınırlanmış şekilde küresel (Şekil 4f), ya da kollapse olmuş görünümündedirler. Bu dönemdeki embriyoların identifikasyonu deneyimsiz uzmanlar için güçtür.

Sığır Embriyolarının Değerlendirilmesi

Bireysel embriyolarda kalite sınıflaması aşağıda belirtilen kriterlere göre yapılmaktadır (63).

Çok iyi: İdeal embriyo kalitesidir. Küresel biçimli, aynı hacim, renk ve yapıya sahip hücreler ve bu hücrelerin simetrik dağılımı ile karakterizedir (Şekil 5a).

İyi: Birkaç tane ihraç edilmiş blastomer, düzensiz şekil ve çok az oranda vezikülleşme gibi önemsiz kusurlarla karakterizedir (Şekil 5b).

Orta: Sınırlı, fakat önemli sorunlar göze çarpar. İhraç edilmiş blastomerlerin varlığı, vezikülasyon ve çok az dejenere hücrelerle karakterizedir (Şekil 5c).

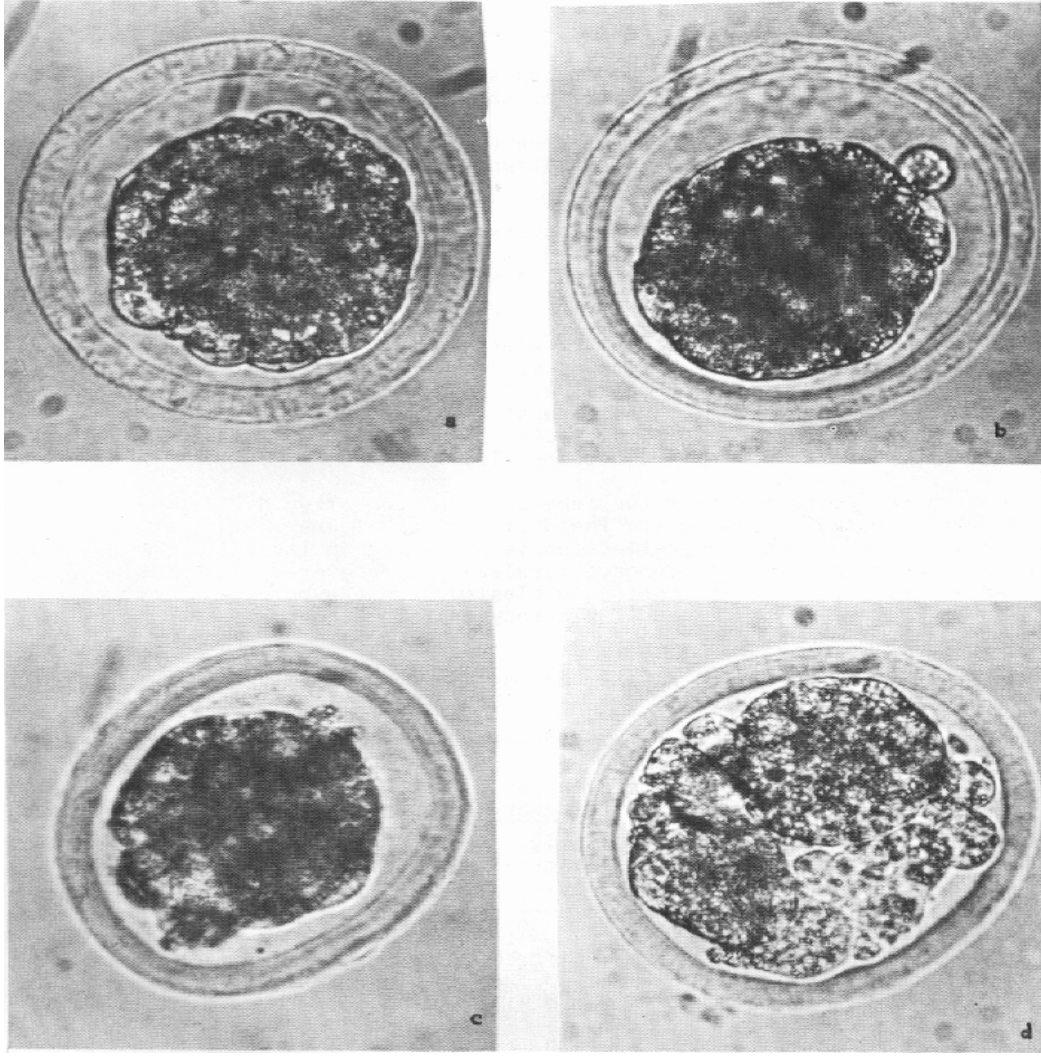
Zayıf: Ciddi sorunlar, çok sayıda ihraç edilmiş blastomer, dejenere hücreler, çok sayıda geniş veziküllere karşın, canlı görünümüyle karakterizedir (Şekil 5d).

Gelişim aşamalarına göre sığır embriyolarının tahmini yaşları Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo – 1 Gelişim aşamalarına göre sığır embriyolarının tahmini yaşları

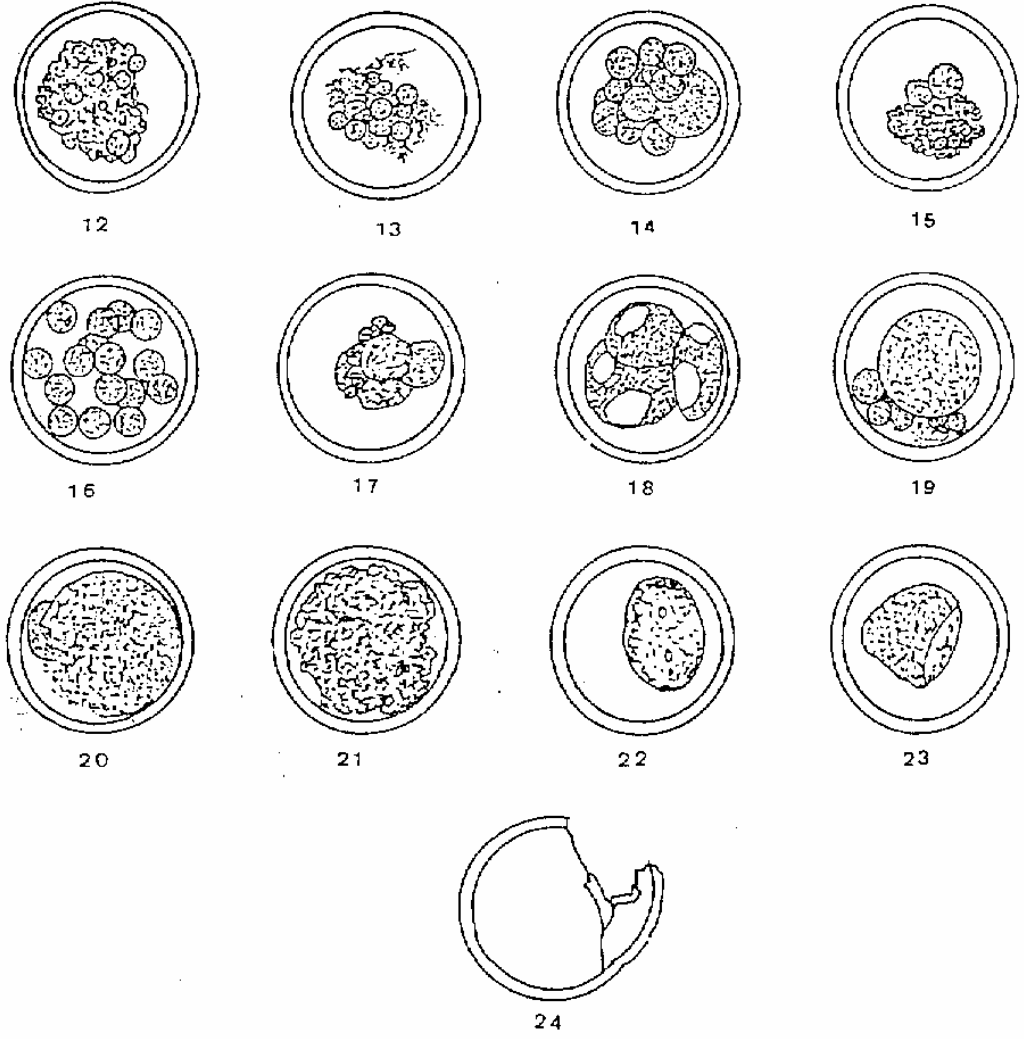
GELİŞİM AŞAMALARI	TAHMİNİ YAŞ
Morula	5 gün
Kompakt Morula	6 gün
Erken Blastosit	7 gün
Blastosist	7 gün
Genişlemiş Blastosit	8 gün
Yarıklanmış Blastosit	9 gün

Yapılan çalışmalarda, çok iyi ve iyi kalite grubundaki embriyoların transferleri sonucu gebelik oranları arasında fark gözlenmemiştir. Dolayısıyla, değerlendirme yapılırken iyi, orta ve zayıf olmak üzere yapılacak bir sınıflandırma daha yararlı olacaktır.



Şekil – 5 Morula döneminde değişik kalite sınıflaması **a)** çok iyi, **b)** iyi (ihraç edilmiş blastomer ve hafif biçimdeki düzensiz şekil dikkat çekici), **c)** orta ihraç edilmiş blastomerler ve dejenere bazı hücreler dikkat çekici, **d)** zayıf (çok sayıdaki ihraç edilmiş blastomerler ve hüresel dejenerasyona karşın yaşıyor görünen embriyo yığını dikkat çekici) kalitedeki kompakt morulalar (Lindner ve arkadaşları 1983 (63)’ten alınmıştır).

Şekil 6’da ise değişik gelişme dönemindeki dejenere embriyolara çeşitli örnekler sunulmuştur.



Numara:

12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

Tanımlarına:

Oval şekilde zonası bulunan kompakt morula
Parçalanmış blastomerli bir morula
Düzensiz blastomerler
Hasar görmüş bir morula
Dağınık blastomerler
Düzensiz hücre yığını
Valcuoller
Dejenere olmuş bir hücre (zigot)
Dejenere olmuş bir hücre (zigot)
Dejenere olmuş bir hücre (zigot)
Dejenere olmuş bir hücre (zigot)
Dejenere olmuş bir hücre (zigot)
Çatlak boş zona

Şekil – 6 Değişik gelişme dönemindeki dejenere embriyoları (İleri ve arkadaşları 1998 (68)'den alınmıştır).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Medyumlar

Çalışmada ovaryumların mezbahadan laboratuara taşınması için kullanılan serum fizyolojik piyasada satılan iyotsuz mutfak tuzuyla hazırlanmıştır. Bu amaçla 4,5 gr tuz 500 ml çeşme suyuna karıştırıldı. Ayrıca, stok solüsyonlardan hazırlanan medyumlar içerisine katılan piruvat stok solüsyonu da günlük olarak taze hazırlandı. Piruvat stok solüsyonu 1 ml stok TL-HEPES solüsyonu içerisine 2,2 mg piruvat (Sigma P-5280) eklenerek hazırlandı. Bunun dışında yine medyumlar hazırlanırken kontaminasyonu önlemek amacıyla gentamisin stok solüsyonu hazırlandı. Bu amaçla 50 mg gentamisin (Sigma G-3632) 1 ml steril serum fizyolojik içerisine katıldı ve çalışma boyunca +4°C'da saklandı.

Çalışmanın her aşamasında oosit ve embriyoların yıkanması amacıyla TL-HEPES yıkama medyumu kullanıldı (69). TL-HEPES yıkama medyumunu hazırlamak için öncelikle stok TL-HEPES hazırlandı. Stok solüsyonun hazırlanmasında kullanılan formülasyon Tablo 2'de verilmiştir.

Tablo – 2 Stok TL-HEPES'in hazırlanması

Kimyasal Madde	Sigma Katalog No	Final mM	Miktar
NaCl	S-5886	114	3330 mg
KCl	P-5405	3,2	120 mg
*CaCl ₂ .2H ₂ O	C-7902	2	150 mg
*MgCl ₂ .6H ₂ O	M-2393	0,5	50 mg
NaHCO ₃	S-5761	2	84 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	S-9638	0,4	28 mg
Na-laktat (% 60 şurup)	L-4263	10	0,930 ml
Penisilin	P-3032	100 IU/ml	32,5 mg
Fenol Kırmızısı	P-4663	-	5 mg
Hepes	H-4034	10	1200 mg
Deiyonize-bidistile H ₂ O	-	-	500 ml

* Bu ikisi solüsyona en son eklendi.

Hazırlanan TL-HEPES stok solüsyonunun pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra, osmolaritesi ölçüldü. Osmolaritesi 255-270 mOSM arasında olan stok TL-HEPES'ler çalışma amacıyla kullanıldılar.

Maturasyon amacıyla TCM-199 (Sigma M-5017) diye adlandırılan doku kültür medyumu kullanıldı. TCM-199 içeriği oldukça kompleks olan bir medyumdur. Stok TCM-199 medyumu 100 ml olarak hazırlandı. Stok TCM-199'un hazırlanışı Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo – 3 Stok TCM-199 solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal Madde	Sigma Katalog No	Miktar
TCM-199	M-5017	990 mg
NaHCO ₃	S-5761	220 mg
Deiyonize-bidistile H ₂ O	-	100 ml

Çalışmada in vitro fertilizasyon amacıyla kısaca TL (Tirod-Laktat) stok solüsyonu hazırlandı (43). Stok solüsyonun hazırlanışı Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo – 4 TL Stok solüsyonunun hazırlanışı

Kimyasal Madde	Sigma Katalog No	Final mM	Miktar
NaCl	S-5886	114	666 mg
KCl	P-5405	3,2	23,5 mg
*CaCl ₂ .2H ₂ O	C-7902	2	30 mg
*MgCl ₂ .6H ₂ O	M-2393	0,5	10 mg
NaHCO ₃	S-5761	25	210,4 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	S-9638	0,4	5,5 mg
Na-laktat (% 60 şurup)	L-4263	10	0,186 ml
Penisilin	P-3032	100 IU/ml	6,5 mg
Fenol kırmızısı	P-4663	-	1 mg
Deiyonize-bidistile H ₂ O	-	-	100 ml

* Bu ikisi solüsyona en son eklendi.

Hazırlanan TL stok solüsyonunun osmolaritesi ölçüldü. Osmolaritesi 280-300 mOSM arasında olan TL stok solüsyonları çalışma amacıyla kullanıldı.

Yukarıda tanımlanan TL-HEPES, TCM-199 ve TL stok solüsyonları hazırlandıkları miktarlar da göz önünde bulundurularak steril 100 veya 500 ml'lik steril cam şişeler içerisine filtre edildi. Stok solüsyonlarının sterilizasyonu sağlamak amacıyla 0,22 µm çapındaki filtreler (Corning) kullanıldı. Hazırlanan stok solüsyonlar +4°C'ta 2-3 hafta boyunca saklandı.

Hazırlanan stok solüsyonlardan gerekli olan medyumlar kullanım günlerinde hazırlanarak kullanıldılar. TL-HEPES yıkama medyumu, TCM-199 maturasyon medyumu ve TL fertilizasyon medyumunun hazırlanış biçimleri sırasıyla Tablo 5, 6 ve 7'de verilmiştir.

Tablo – 5 TL-HEPES yıkama medyumunun hazırlanışı

Bileşen	Sigma Katalog No	Miktar
PVP	P-0930	150 mg
Piruvat stok solüsyonu	-	500 µl
Gentamisin stok solüsyonu	-	25 µl
Stok TL-HEPES solüsyonu	-	50 ml

Tablo – 6 TCM-199 maturasyon medyumunun hazırlanışı

Bileşen	Sigma Katalog No	Miktar
FCS	P-9665	0,5 ml
Piruvat stok solüsyonu	-	50 µl
LH	L-5269	25 µg
FSH	F-8174	2,5 µg
Gentamisin stok solüsyonu	-	2,5 µl
Stok TCM-199 solüsyonu	-	5 ml

Tablo – 7 TL fertilizasyon medyumunun hazırlanışı

Bileşen	Sigma Katalog No	Miktar
BSA	A-6003	30 mg
Piruvat stok solüsyonu	-	50 µl
Gentamisin stok solüsyonu	-	2,5 µl
Stok TL fertilizasyon solüsyonu	-	5 ml

İn vitro fertilizasyonda kullanılmak üzere ayrıca hazırlanan heparin ile Penisilamin (Sigma P-4875), Hipotaurin (Sigma H-1384) ve Epinefrin (Sigma E-4250) maddelerinin karışımından hazırlanan ve kısaca PHE adı verilen iki farklı solüsyon kullanım gününe dek -20°C’ta saklandı.

Heparin solüsyonunu hazırlamak için 1 mg heparin (Sigma H-3149) 2 ml TL HEPES içerisinde eritildi. İki µg/ml yoğunluk için hazırlanan bu solüsyondan alınan 100 µl solüsyon TL HEPES ile 1 ml’ye tamamlandı. Günlük kullanım miktarları hesap edilerek küçük hacimlerde tüplere aktararak donduruldu. Bu solüsyondan fertilizasyon damlasına (44 µl olarak hazırlanmış) 2 µl eklendiğinde istenilen yoğunluk (2 µg/ml) elde edilmiş oldu.

PHE ise üç ayrı maddenin ayrı ayrı hazırlanmasından sonra belirli oranlarda bu solüsyonların karıştırılmasıyla hazırlandı. İlk olarak, hipotaurinin 1 mM’lık solüsyonu hazırlandı. Bu amaçla 1.09 mg hipotaurin 10 ml %0,9 NaCl içerisinde çözündürüldü. Penisilamin solüsyonu 2 mM olacak biçimde hazırlandı. Bu amaçla 3 mg penisilamin 10 ml %0,9 NaCl içerisinde çözündürüldü. Epinefrinin ise 250 µM’lık solüsyonu hazırlandı. Bu amaçla öncelikle 165 mg Na laktat şurubu (Sigma L-4263) ve 50 mg Na metabisulfit (Sigma S-1516) 50 ml bidistile su içerisinde eklendi. Hazırlanan karışımın pH’sı HCl solüsyonu ile 4’e kadar asitleştirildi. Daha sonra, asitleştirilen bu karışımın 40 ml’sinde 1,83 mg epinefrin çözündürüldü. Hazırlanan bu solüsyonlardan 10 ml hazırlamak için; 2,5 ml penisilamin, 2,5 ml hipotaurin ve 1,0 ml epinefrin solüsyonları ile 4,0 ml %0,9 NaCl karıştırıldı. Günlük gereksinim yaklaşık olarak hesaplandıktan sonra, küçük tüpler içerisine aktarılan günlük kullanım dozları derin dondurucuda saklandı. Epinefrinin kolayca okside olmasından dolayı PHE tüpleri Alüminyum folyoya sarılmış şekilde korundu. Dondurulmuş solüsyon direkt ışık almayacak şekilde çözündürülerek

fertilizasyon damlasına (44 µl olarak hazırlanmış) 2 µl eklendiğinde hedeflenen final konsantrasyonlar (20 µM penisilamin, 10 µM hipotaurin ve 1 µM epinefrin) sağlandı.

Bunun dışında IVF amacıyla kullanılan spermanın hazırlanması için kullanılan Perkol (Sigma P-1644) solüsyonu da çalışmaya başlamadan önce hazırlanıp +4°C'da saklanmıştır. Perkol solüsyonunun hazırlanış şekli aşağıda kısaca özetlenmiştir.

<u>80 mM final konsantrasyonlu 10X</u>	<u>%90'lık Perkol Solüsyonu:</u>																				
<u>Perkol stok solüsyonu:</u> Aşağıda verilen miktarlarda hazırlanan tuzlar konsantre stok olarak +4°C'ta saklandılar. CaCl ₂ , MgCl ₂ ve NaHCO ₃ eklenmemelidir. Aksi takdirde çökerler.	45 ml Perkol + 5 ml 10X Perkol stok solüsyonu üzerine aşağıdaki kimyasallar eklenerek hazırlandı.																				
<table><thead><tr><th><u>Kimyasal madde</u></th><th><u>/100ml</u></th></tr></thead><tbody><tr><td>KCl</td><td>0,230 gr</td></tr><tr><td>NaH₂PO₄</td><td>0,035 gr</td></tr><tr><td>NaCl</td><td>4,675 gr</td></tr><tr><td>HEPES</td><td>2,380 gr</td></tr></tbody></table> pH 7,3e ayarlandı.	<u>Kimyasal madde</u>	<u>/100ml</u>	KCl	0,230 gr	NaH ₂ PO ₄	0,035 gr	NaCl	4,675 gr	HEPES	2,380 gr	<table><thead><tr><th><u>Kimyasal madde</u></th><th><u>/50 ml</u></th></tr></thead><tbody><tr><td>CaCl₂</td><td>14,5 mg</td></tr><tr><td>MgCl₂(6H₂O)</td><td>4,0 mg</td></tr><tr><td>Lactic asit (%60 şurup)</td><td>0,184 ml</td></tr><tr><td>NaHCO₃</td><td>104,5 mg</td></tr></tbody></table> Osmolarite spermin canlılığı ve fonksiyonu için yaşamsal öneme sahiptir, ve 280-300 mOsm olmalıdır.	<u>Kimyasal madde</u>	<u>/50 ml</u>	CaCl ₂	14,5 mg	MgCl ₂ (6H ₂ O)	4,0 mg	Lactic asit (%60 şurup)	0,184 ml	NaHCO ₃	104,5 mg
<u>Kimyasal madde</u>	<u>/100ml</u>																				
KCl	0,230 gr																				
NaH ₂ PO ₄	0,035 gr																				
NaCl	4,675 gr																				
HEPES	2,380 gr																				
<u>Kimyasal madde</u>	<u>/50 ml</u>																				
CaCl ₂	14,5 mg																				
MgCl ₂ (6H ₂ O)	4,0 mg																				
Lactic asit (%60 şurup)	0,184 ml																				
NaHCO ₃	104,5 mg																				

Fertilize edilen oositlerden gelişecek embriyoların kültür edilmesi amacıyla CR1aa kültür medyumunu (4, 70) kullanıldı. Bu medyum fertilizasyondan sonraki günün sabahı taze olarak hazırlanarak kullanılmıştır ve normalde protein kaynağı olarak BSA bulunan medyumdur. Ancak çalışma süresince hem BSA içeren rutin hem de BSA yerine PVP içeren modifiye CR1aa kültür medyumları hazırlandı. Böylece BSA'ya alternatif olarak PVP'nin bu medyum içerisinde kullanılmasının etkileri araştırıldı. CR1aa medyumunun hazırlanışı Tablo 8'de verilmiştir.

Çalışmada in vitro maturasyon, fertilizasyon ve kültür amacıyla kullanılan medyumlardan sırasıyla 50, 44 ve 50 µl'lik damlalar petri kutuları içerisinde hazırlandı ve üzerleri mineral yağ (Sigma M-8410) ile kaplandı. Böylece damlalar buharlaşma ve kontaminasyon riskinden korunmuş oldular. Hazırlanan tüm solüsyonlar içerisinde oosit veya embriyo aktarılmadan en az 4 saat öncesinde inkübatör içerisinde gazlanması amacıyla konuldular. Çalışmanın her aşamasında kültür ortamı olarak %5 CO₂, 39°C sıcaklık ve yüksek nemli inkübatör ortamı kullanıldı.

Tablo – 8 CR1aa kültür medyumunun hazırlanışı

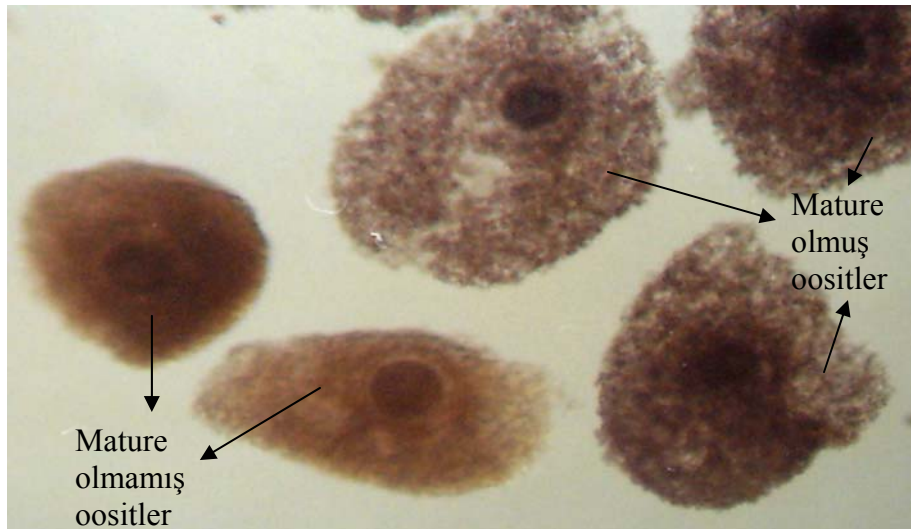
Kimyasal Madde	Sigma Katalog No	Miktar	
		BSA'lı	PVP'li
NaCl	S-5886	67 mg	67 mg
KCl	P-5405	2,3 mg	2,3 mg
NaHCO ₃	S-5761	22 mg	22 mg
BSA	A-6003	30 mg	-
PVP	P-0930	-	30 mg
L-glutamin	G-3126	1,5 mg	1,5 mg
Na-piruvat	P-5280	0,4 mg	0,4 mg
L-laktat	L-4388	5,5 mg	5,5 mg
Gentamisin	G-3632	5 µl	5 µl
MEM amino asit*	M-7145	100 µl	100 µl
BME amino asit*	B-6766	200 µl	200 µl
Deiyonize-bidistile H ₂ O	-	10 ml	10 ml

Ovaryumların Elde Edilmesi ve Laboratuara Taşınması

Çalışmada kullanılan oositler Bursa Et-Ba mezbahasında kesilen inek ve düvelerin ovaryumlarından elde edilmiştir. Ovaryumlar toplanırken kesilen hayvanların yaşları, ırkları ve gebe olup olmadıklarına dikkat etmeden, sadece gözle görünür sağlık problemi olmayan tüm inek ve düvelerin ovaryumları toplanmıştır. Ovaryumlar toplandıktan hemen sonra içerisinde yaklaşık 35°C'daki fizyolojik serum (%0,9 NaCl) bulunan termos içerisinde biriktirildi. Ovaryumlar laboratuara termos içerisinde getirildi ve aspirasyona başlanana kadar termos içerisinde bekletildiler. İşleme başlarken yapılan ölçümlerde termos sıcaklığının 30°C'ın altına inmediği gözlemlendi. Kesimden işleme başlayana kadar geçen sürenin 6 saati geçmemesine dikkat edildi.

Oositlerin Elde Edilmesi ve İn Vitro Maturasyon

Laboratuara getirilen ovaryumlar 35°C çeşme suyunda 3 kez yıkandı. Böylece çeşitli kan ve diğer kalıntılar temizlenmiş oldu. Daha sonra 10 ml'lik enjektör ucuna takılı 18 ga'lık enjeksiyon iğnesi ile ovaryumlar üzerindeki 2-6 mm çapında gözle görünür tüm folliküller enjektör içerisine aspire edildi. Enjektör içerisinde biriken folliküler içerik zaman zaman 50 ml'lik konik santrifüj tüp içerisine aktarıldı. Aspirasyon işlemi tamamlandıktan sonra 50 ml'lik konik santrifüj tüp içerisinde toplanan folliküler içerik 5-10 dakika bekletildikten sonra dipte toplanan sediment pastör pipeti yardımıyla 10 cm'lik petri kabı içerisine aktarıldı. Daha sonra sedimentin üzerine TL-HEPES yıkama medyumu (69) eklenip karıştırıldı ve oositler stereo mikroskop altında araştırıldılar. Çalışma için en az 3-5 sıra kumulus hücresiyle çepeçevre kuşatılmış, homojen bir sitoplazmaya sahip ve morfolojik olarak herhangi bir bozukluğu bulunmayan oositler ucunda 20 µl'lik unopet takılı olan 100 µl'lik Hamilton marka enjektörle içerisine TL-HEPES yıkama medyumu bulunan 30 mm'lik petri kutusuna aktarıldılar. Arama işlemi tamamlandıktan sonra oositler yine içlerinde TL-HEPES yıkama medyumu bulunan 2 ayrı 30 mm'lik petri kutusuna aktararak toplam 3 kez yıkanmış oldu. Yıkama işleminden sonra maturasyona alınacak oositler 60 mm'lik petri kutusundaki 50 µl'lik TCM-199 maturasyon damlaları içerisine her bir damlaya ortalama 10 oosit düşecek şekilde transfer edildiler ve %5 CO₂, 39°C ve yüksek oranda nemli inkübatörde yaklaşık 24 saat süreyle kültür edildiler. Sonraki tüm aşamalarda da aynı inkübatör şartları kullanılmıştır. Şekil 7'de mature olmamış ve mature olmuş sığır oositleri görülmektedir.



Şekil 7 Mature olmamış ve mature olmuş sığır oositleri

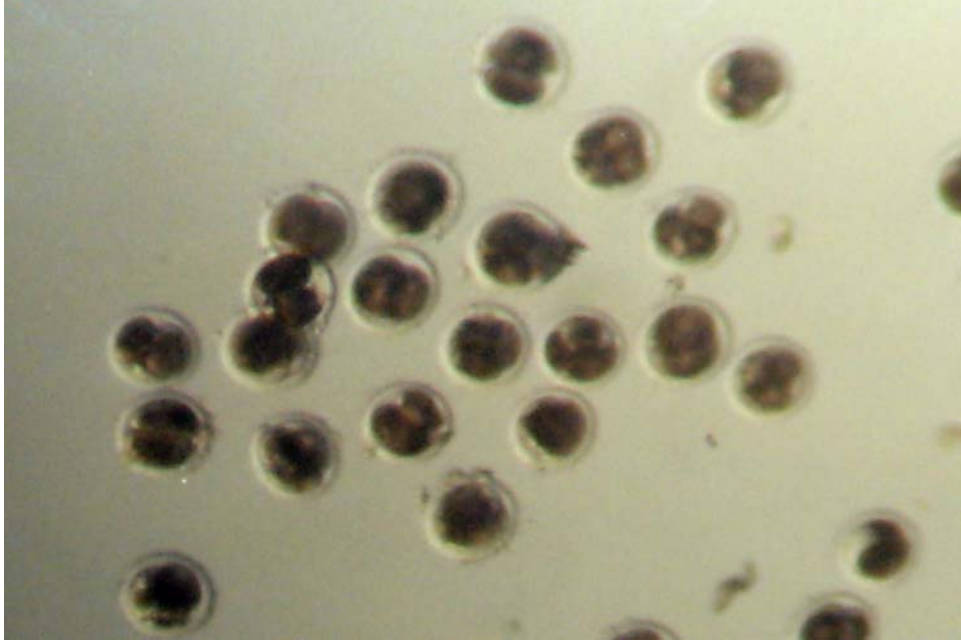
İn Vitro Fertilizasyon

Maturasyondan 24 saat sonra, kumulus hücreleri genişlemiş olan oositler TL-HEPES yıkama medyumu içerisinde iki kez yıkandıktan sonra 44 µl'lik fertilizasyon damlalarına damla başına 10 adet olacak biçimde aktarıldı. Oositler, spermanın eklenmesine kadar geçen süre boyunca inkübatörde bekletildi. Fertilizasyon amacıyla İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı tarafından sağlanan dondurulmuş sperma kullanıldı. Canlı spermatozoitler, 35°C'da 1 dakika süre ile çözündürülen donmuş spermadan Parrish ve arkadaşlarınca (41-44) geliştirilen Perkol separasyon yöntemi kullanılarak elde edildi. Bu amaçla 0,5'er ml'lik %90 ve %45 Perkol solüsyonları, %45'lik Perkol üstte olacak biçimde, birbirlerine karıştırılmadan 1,5 ml'lik Eppendorf santrifüj tüp içerisine katman oluşturacak biçimde aktarıldı. En üste de çözündürülmüş payet içerisindeki sperma aktarıldı ve 700 x g'de 10 dakika süre ile santrifüj edildi. Süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra, motil spermatozoonları içeren pelet, peletin üzerinde kalan az miktardaki solüsyon ile süspense edildi. Spermatozoit yoğunluğu Thoma lamı kullanılarak saptandıktan sonra, TL-HEPES ile µl'inde yaklaşık 50.000 spermatozoit bulunacak şekilde sulandırıldı. Hazırlanan sperm solüsyonundan 2 µl fertilizasyon damlaları içerisine eklendi. Böylece oosit başına ortalama 10.000 spermatozoit kullanılmış oldu. Spermatozoonların eklenmesinden sonra, daha önceden hazırlanıp dondurulmuş olan heparin ve PHE solüsyonlarından damla başına 2'şer µl eklendi. İşlem tamamlandıktan sonra spermatozoitler ve oositler fertilizasyonun gerçekleşmesi amacıyla inkübatör içerisinde 24 saat beraberce kültür edildiler.

İn Vitro Kültür

Fertilizasyondan sonra, oositleri kuşatan kumulus hücreleri, 1,5 ml'lik Eppendorf santrifüj tüpleri içerisinde 3 dakika süre ile karıştırıcı yardımıyla hızlıca çalkalanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra, kumulus hücreleri uzaklaştırılmış fertilize oositler TL-HEPES yıkama medyumu içerisinde 3 kez yıkandı. Yıkanan fertilize oositler iki gruba ayrıldı. Birinci gruptaki fertilize oositler BSA katkılı CR1aa, ikinci gruptaki oositlerse PVP katkılı CR1aa kültür medyumları içerisine aktarıldı. Kültür amacıyla kullanılan damlaların hacmi 50 µl idi ve bir damla içerisinde yaklaşık 20-25 embriyo kültür edildi. Çalışmada fertilizasyonun yapıldığı gün 0. gün kabul edilerek 4. günde kültür edilen her iki gruptaki

embriyoların yaklaşık yarısına %10 oranında FCS katılırken, diğer yarısına hiçbir katkı yapılmadan kültür devam edildi. Şekil 8’de 2-4 hücreli sığır embriyoları gösterilmiştir.



Şekil 8 2-4 hücreli sığır embriyoları

Gelişen Embriyoların Değerlendirilmesi

Embriyoların gelişimleri günlük olarak kontrol edildi. Embriyolar stereo mikroskop altında incelendiler. Ancak embriyoların zarar görmemesi için ayrıntılı kontrol bölünmeden sonraki 2-4 hücre döneminde ve blastosist gelişiminin gözlenebildiği 7. günde gerçekleştirildi. Ancak çalışmada embriyoların gelişimi morula dönemini geçmedi. Bu nedenle morula dönemindeki embriyoların kaydı yapıldı. Bölünen embriyoların doğru olarak sayılması için embriyoların pozisyonları değiştirildi. Böylece iki hücreli embriyolarda üst üste gelmiş olan blastomerlerin gözlenmesi sağlanmış oldu.

İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada her bir grup için toplam 4 tekrar yapıldı. Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ki-kare testi uygulandı (SSPS Software Program). İstatistiksel değerlendirmenin anlamlı olabilmesi amacıyla, çalışmada grup başına 250’nin üzerinde fertilize oosit kültür edildi.

BULGULAR

Çalışmada mezbahadan getirilen toplam 437 adet ovaryum kullanıldı. Bunlardan 198 adedi 4. günde FCS katılacak BSA'lı (grup I) ve PVP'li (grup II) CR1aa grupları için; 239 adedi ise FCS katılmayacak BSA'lı (grup III) ve PVP'li (grup IV) CR1aa grupları için kullanıldı. Toplam 437 ovaryum üzerindeki folliküllerin aspirasyonundan sonra sadece kalite bakımından elverişli olan (en az 3-5 sıra kumulus hücresiyle çepeçevre kuşatılmış, homojen bir sitoplazmaya sahip ve morfolojik olarak herhangi bir bozukluğu bulunmayan) toplam 1171 oosit (2,68 oosit/ovaryum) çalışmada kullanıldı. Gruplar bakımından değerlendirildiğinde, grup I ve II için kullanılan 198 ovaryumdan toplam 588 oosit (2,97 oosit/ovaryum) elde edilirken, grup III ve IV için kullanılan 239 ovaryumdan 583 oosit (2,44 oosit/ovaryum) elde edildi (Tablo 9).

Tablo – 9 Çalışmada kullanılan ovaryum ve oosit sayıları

Deney No	Gruplar	Ovaryum Sayısı	Oosit Sayısı	Oosit Sayısı/Ovaryum
Deney I	+ FCS	62	180	2,90
Deney II	+ FCS	52	148	2,85
Deney III	+ FCS	44	145	3,30
Deney IV	+ FCS	40	115	2,88
Toplam	+ FCS	198	588	2,97
Deney V	- FCS	62	102	1,65
Deney VI	- FCS	45	102	2,27
Deney VII	- FCS	83	243	2,93
Deney VIII	- FCS	49	136	2,78
Toplam	- FCS	239	583	2,44
Genel Toplam		437	1171	2,68

Fertilizasyondan sonra, kumulus hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla uygulanan çalkalama işlemini takiben embriyoların küçük bir bölümü kaybedilmiştir. Bu kayıplar, ya zona pellusidası zayıf olanların parçalanmasından ya da tüpe veya pipete yapışmalardan kaynaklanmıştır. FCS katılacak grup I ve grup II için kullanılan toplam 588 oositten fertilizasyon sonrası elde edilen olası tek hücreli embriyoların sayısı 515 (%87,59) olarak

saptandı. FCS katılmayan grup III ve grup IV için kullanılan 583 oositten vorteks (çalkalama işlemi) uygulaması sonrası elde edilen olası tek hücreli embriyoların sayısı 504 (%86,45) olarak bulundu (Tablo 10).

Tablo – 10 Fertilizasyonda kullanılan oosit sayısı ve vorteks işlemi uygulamasından sonra elde edilen olası tek hücreli embriyoların sayısı

Deney No	Gruplar*	Fertilize Edilen Oosit Sayısı	Vorteksten Sonra Elde Edilen Olası Tek Hücreli Embriyo Sayısı (%)
Deney I	+ FCS	180	155 (86,11)
Deney II	+ FCS	148	132 (89,19)
Deney III	+ FCS	145	126 (86,90)
Deney IV	+ FCS	115	102 (88,70)
Toplam	+ FCS	588	515 (87,59)
Deney V	- FCS	102	93 (91,18)
Deney VI	- FCS	102	80 (78,43)
Deney VII	- FCS	243	213 (87,65)
Deney VIII	- FCS	136	118 (86,76)
Toplam	- FCS	583	504 (86,45)
Genel Toplam		1171	1019 (87,02)

* + FCS'ler grup I ve grup II'deki oositleri kapsamaktadır. – FCS'ler grup III ve grup IV'deki oositleri kapsamaktadır.

Kumulus hücrelerinin uzaklaştırılmasından sonra elde edilen olası tek hücreli embriyolar kültür için BSA veya PVP içeren CR1aa kültür medyumuna içerisinde transfer edildiler. Dördüncü günde FCS katılan grupta vorteksle kumulus hücreleri uzaklaştırılmış toplam 515 olası tek hücreli embriyodan 263 adedi BSA'lı CR1aa kültür medyumunda, 252 adedi ise PVP'li CR1aa kültür medyumunda kültür edildi. BSA'lı CR1aa'daki olası tek hücreli embriyolardan 162 (%61,60) adedi bölünerek 2 hücreli aşamaya geçerken, PVP'li CR1aa'daki olası zigotlardan 140 (%55,56) adedi 2 hücreli aşamaya geçti. Daha sonra yapılan kontrollerde ise morula aşamasına gelişen embriyoların sayısı BSA'lı ve PVP'li CR1aa medyumları için sırasıyla 85 (%32,32) ve 64 (%25,40) olarak bulundu (Tablo 11).

Dördüncü günde FCS katılmayan grupta vorteks uygulamasından sonra elde edilen toplam 504 olası tek hücreli embriyodan 251 adedi BSA'lı CR1aa kültür medyumunda, 253 adedi ise PVP'li CR1aa kültür medyumunda kültür edildi. BSA'lı CR1aa kültür medyumundaki olası tek hücreli embriyolardan 153 (%60,10) adedi bölünerek 2 hücreli aşamaya geçerken, PVP'li CR1aa kültür medyumundaki olası zigotlardan 141 (%55,73) adedi 2 hücreli aşamaya geçti. Morula aşamasına gelişen embriyoların sayısı ise BSA'lı ve PVP'li CR1aa medyumları için sırasıyla 70 (%27,89) ve 54 (%21,34) olarak saptandı (Tablo 11).

Yapılan istatistiksel değerlendirmede bölünme oranları bakımından dört grup arasında istatistiksel bir fark bulunmadı. Ancak, en yüksek bölünme oranından en düşük bölünme oranına göre yapılan sıralamada en yüksek gelişme oranı FCS katılan BSA'lı CR1aa grubunda gözlemlendi. Bunu sırasıyla, FCS katılmayan BSA'lı CR1aa, FCS katılan PVP'li CR1aa ve FCS katılmayan PVP'li CR1aa grubu izledi. Morulaya gelişim oranları bakımından ise FCS katılan BSA'lı CR1aa grubu ile FCS katılmayan PVP'li CR1aa grubu arasında istatistiksel fark bulunurken ($P < 0,01$), diğer gruplar arasında istatistiksel fark bulunmadı (Tablo 11).

Tablo - 11 Dördüncü günde FCS katılan ve katılmayan BSA'lı ve PVP'li kültür medyumlarında embriyoların gelişimleri

Deney No	Gruplar	Kültür Edilen Olası Tek Hücreler	Alt Gruplar	Olası Tek Hücre Sayısı	2 Hücreli Embriyo Sayısı (%)	Morula Sayısı (%)
Deney I	+ FCS	155	BSA'lı	80	43 (53,75)	32 (40,00)
			PVP'li	75	33 (41,25)	21 (28,00)
Deney II	+ FCS	132	BSA'lı	70	54 (77,14)	23 (32,86)
			PVP'li	62	39 (62,90)	16 (25,81)
Deney III	+ FCS	126	BSA'lı	66	45 (68,18)	19 (28,79)
			PVP'li	60	34 (56,67)	14 (23,33)
Deney IV	+ FCS	102	BSA'lı	47	20 (42,55)	11 (23,40)
			PVP'li	55	34 (61,81)	13 (23,64)
Toplam	+ FCS	515	BSA'lı	263	162 (61,60)^a	85 (32,32)^a
			PVP'li	252	140 (55,56)^a	64 (25,40)^{ab}
Deney V	- FCS	93	BSA'lı	50	38 (76,00)	15 (30,00)
			PVP'li	43	27 (62,79)	12 (27,91)
Deney VI	- FCS	80	BSA'lı	40	27 (67,50)	14 (35,00)
			PVP'li	40	21 (52,50)	10 (25,00)
Deney VII	- FCS	213	BSA'lı	95	53 (55,79)	18 (18,94)
			PVP'li	118	70 (59,32)	19 (16,10)
Deney VIII	- FCS	118	BSA'lı	66	35 (53,03)	23 (34,85)
			PVP'li	52	23 (44,23)	13 (25,00)
Toplam	- FCS	504	BSA'lı	251	153 (60,95)^a	70 (27,89)^{ab}
			PVP'li	253	141 (55,73)^a	54 (21,34)^b

^{ab} Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak farklıdır.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Embriyo kültüründe kullanılan medyumların FCS ve BSA gibi çeşitli protein kaynakları ile desteklenmesi in vitro embriyo gelişimini olumlu yönde etkilemektedir (71). Bilindiği üzere serum, kanın pıhtılaşmasından sonra elde edilen patolojik bir sıvıdır. FCS'nin kültür ortamına eklenmesinin yararlı etkisinin nasıl ortaya çıktığı henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak, etkisini embriyoların gelişim için gereksinim duyduğu fakat kültür ortamında eksik kalabilen çeşitli enerji kaynakları, steroidler, amino asitler, yağ asitleri, vitaminler ve büyüme faktörleri gibi esansiyel elementleri sağlayarak gösterdiğine inanılmaktadır. Ayrıca, kültür ortamında bulunan bazı zararlı iyonlardan ve gelişen embriyolardan salınan küçük moleküllerin zararlarına karşı koruyucu etki gösterdiği düşünülmektedir (72). Ancak, FCS'nin medyum içerisine katılmasından sonra içerik bakımından her zaman stabil bir durumun sağlanamaması, elde edilen sonuçların da tutarsız olabilmesine neden olmaktadır. Bu nedenle, medyumların içerisine FCS yerine BSA'nın katılması önerilmiş ve bunun daha tutarlı sonuç elde edilmesine katkıda bulunacağı bildirilmiştir (7, 8, 73). Ayrıca, yapılan çalışmalar sonucunda BSA'nın da tümüyle saf şekilde olmadığı ve içeriğinde steroidler, vitaminler, yağ asitleri ve kolesterol gibi embriyolar için faydalı bileşenleri taşıyan bir kaynak olduğu bildirilmiş ve yine çeşitli iyon ve küçük yapıli moleküllerden gelecek zararlara karşı embriyoları koruduğu ifade edilmiştir (2, 6, 70). Bu sebeple, içeriğinde protein kaynağı olarak serum veya BSA kullanılan medyumlar tamamıyla tanımlanmış, yani içerdiği bileşenlerin tümünün neler ve ne miktarda olduğu bilinen medyumlar değildir. Bu durumda özellikle embriyoların gelişim için gereksinim duydukları maddelerin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmaları güçleştirmektedir (7). Tüm bunların dışında, hayvanlardan elde edilen FCS ve BSA'nın çeşitli hastalıkların ve özellikle sığırlarda görülen ve insanlara da bulaşabilen BSE (bovine spongiform encephalopathy)'nin uygulamalar sırasında hayvan ve insanlara bulaşmasında yaratacağı riskten dolayı son zamanlarda medyumlarda kullanılmaması tercih edilmektedir. Ayrıca ko-kültür veya FCS'nin kültür ortamına eklenmesi yüksek oranda fetal kayıplar, gebelik komplikasyonları, yüksek oranda ölü doğumlar ve normalden daha iri doğan yavrularla karakterize anomalilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır (74-76). Serumun kültür ortamına eklenmesinin, embriyolar üzerinde; embriyoların metabolizmalarının bozulması, mitokondrilerin ultra yapısında bozulmalar ve normal ultra yapının biçimini değiştiren geniş yağ veziküllerinin gelişimiyle sonuçlanan direkt zararlı bir etkiye sahip

olduğu bildirilmiştir (75, 77-81). Sıralanan bu sebeplerden dolayı son yıllarda serum ve BSA'nın yerine çeşitli sentetik serumlar (22, 82), PVP (83), polivinil alkol (PVA) (84-86) ve hyaluronik asit (2, 87) gibi bazı sentetik makro moleküller kullanılmaktadır.

Özellikle kültür ortamında BSA'nın yerine en çok tercih edilen madde PVA olmuştur. Çünkü PVA'nın BSA'ya benzer sürfektan aktivitesi bulunmaktadır (8). Ancak albumin memeli reproduktif kanalında en yoğun miktarda bulunan proteindir ve farelerde yapılan çalışmalar albuminin düşünülen hücre dışı destek fonksiyonunun yanında hücre içi çeşitli görevlerinin de bulunduğunu göstermiştir (88). Ancak, Keskin-tepe ve arkadaşları (10) albuminin embriyolar için mutlak gereksinim olmadığını bildirmiştir. Yaptıkları çalışmada BSA'nın yerine PVA kullanılmıştır. Bununla birlikte diğer bir çok çalışmada BSA'nın yerine PVA'nın kullanılması durumunda embriyoların gelişim oranlarının düştüğü bildirilmiştir (7, 89, 90). Yapılan çalışmada da CR1aa olarak bilinen ve yaygın olarak kullanılan embriyo kültür medyumuna katılan BSA'nın yerine PVP'nin kullanılması araştırılmıştır. Çalışma sonuçları da BSA yerine PVP kullanılması durumunda gelişimin düştüğünü göstermiştir.

Çalışmada fertilizasyondan sonra bölünen embriyo oranları üzerinde FCS katılıp katılmama durumunun bir etkisi bulunmamaktadır. Çünkü 2 hücreli embriyo aşamasına yaklaşık 48. saatte ulaşılmaktadır ve kültür ortamına FCS 4. günde katılmıştır. Dolayısıyla, bölünme oranları değerlendirilirken CR1aa medyumunda BSA'nın veya PVP'un kullanılması sonucu ortaya çıkacak etkiler değerlendirilmiştir. Başka bir deyişle FCS katılsın veya katılmasın embriyoların kültür edildikleri şartlar FCS'nin eklendiği 4. güne kadar aynı kalmıştır. Elde edilen sonuçları karşılaştırdığımızda, gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunmamıştır. Buna karşın, bölünme oranları sırasıyla BSA'lı CR1aa kültür medyumunda FCS katılan ve katılmayan gruplar için %61,60 ve %60,95 iken, PVP'li CR1aa kültür medyumunda FCS katılan ve katılmayan gruplar için %55,56 ve %55,73 olarak tespit edilmiştir (Tablo 11). İstatistiksel bir fark bulunmasa da kültür medyumunda BSA'nın kullanılması durumunda PVP kullanılan gruptakine göre embriyonik gelişim oranının daha yüksek olduğu görülmüştür.

Çalışmada blastosist gelişimi sağlanamadığı için tam anlamıyla karşılaştırma yapılamamıştır. Ancak yine de çalışmada sırasıyla BSA'lı ve PVP'li CR1aa kültür medyumundaki gelişmelerin FCS katılmayan BSA'lı ve PVP'li CR1aa kültür medyumlarındaki gelişim oranlarından daha yüksek oranlarda olması yukarıdaki sonucu desteklemektedir. Çalışmada FCS 4. günde katıldığından sonraki dönemde morula gelişim oranları değerlendirilirken dikkate alındı. Çalışmada en yüksek morula gelişim oranı FCS

katılan BSA'lı CR1aa grubunda (%32,32) elde edildi. Bunu sırasıyla FCS katılmayan BSA'lı CR1aa (%27,89), FCS katılan PVP'li CR1aa (%25,40) grupları izledi. En düşük morula gelişim oranı ise FCS katılmayan PVP'li CR1aa grubunda (%21,34) elde edildi. En yüksek ve en düşük morula gelişimlerinin elde edildiği FCS katılan BSA'lı CR1aa ve FCS katılmayan PVP'li CR1aa grupları arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ($P<0,01$) bulunmuşken, diğer grupların arasındaki farklar önemli bulunmamıştır. Preimplantasyon dönemdeki embriyoların ilk 3 gün boyunca gereksinim duydukları proteinin çok az olduğu, ancak bundan sonraki dönemde protein takviyesinin gelişimi stimüle ettiği bildirilmiştir (7). Çalışmadan elde edilen sonuçlar da bu durumu desteklemektedir. Yoshioka ve arkadaşları (58) yaptıkları çalışmada morula döneminde kültür medyumuna FCS veya BSA eklemiş ve sonrasındaki gelişimi takip etmişlerdir. Sonuçta morula aşamasında kültür ortamına FCS'nin katılmasının morula aşamasındaki embriyoların blastosit aşamasına geçişlerini BSA'den daha yüksek oranda stimüle ettiğini ve kültür ortamındaki FCS'nin BSA'dan daha üstün bir şekilde, erken blastulasyonu başlattığını ifade etmişlerdir. Blastosit gelişiminin sağlanamamasından dolayı, söz konusu çalışma ile sunulan çalışma sonuçları arasında tam anlamıyla bir karşılaştırma yapma olanağı bulunamamıştır. Ancak yine de sunulan çalışmada sırasıyla FCS katılan BSA'lı ve PVP'li CR1aa kültür medyumlarındaki gelişimlerin FCS katılmayan BSA'lı ve PVP'li CR1aa kültür medyumlarındaki gelişim oranlarından daha yüksek oranlarda olması yukarıdaki sonucu destekler niteliktedir.

Biggers ve arkadaşları (85, 86) farelerde yaptıkları çalışmalarda KSOM (potassium simplex optimized medium) medyumunu içerisinde kullanılan BSA yerine PVA denemiştir. Elde edilen gelişim oranı BSA katılan grupta PVA katılan grubunkinden daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuç sunulan çalışmadan elde edilen sonuçla benzerlik göstermektedir.

Furnus ve arkadaşları (87) ise yaptıkları çalışmada 4 mg/ml dozda BSA ile birlikte 1 mg/ml dozda hyaluronik asit içeren modifiye SOF (synthetic oviduct fluid) medyumunda elde ettikleri blastosist gelişim oranı %21 iken, kontrol grubu olarak kullanılan ve 4 mg/ml dozda BSA içeren modifiye SOF medyumunda ise blastosist gelişim oranının %33 olduğunu ve aralarındaki farkın istatistiksel açıdan önemli olduğunu bildirmişlerdir. Aynı şekilde BSA yerine 1 mg/ml dozda PVA'nın kullanıldığı modifiye SOF medyumunun kontrol olarak kullanılması durumunda blastosite gelişim oranı %9,93 olarak saptanırken, aynı medyuma hyaluronik asidin katılması durumunda blastosit gelişim oranının %16,97 olduğu ve aralarındaki farkın istatistik açısından önemli bulunduğu bildirilmiştir. Buradaki sonuçlarla sunulan çalışmadaki sonuçlar birbirlerine benzer bulunmuştur. Yalnız, burada

dikkat edilecek önemli bir nokta BSA ile birlikte kullanılan hyaluronik asidin blastosit gelişim oranını artırması ve BSA'nın tümüyle çıkarılıp yerine PVA'nın kullanılmasıyla blastosite gelişim oranının düşmesine karşın, PVA'nın hyaluronik asitle birlikte kullanılmasının blastosiste gelişim oranını yükseltmesidir. Bu durumun tamamıyla tanımlanmış medyumların geliştirilmesine ilişkin çalışmalarda göz önünde bulundurulması, gelecekte yapılacak çalışmalar açısından önemli olabilir.

Krisher ve arkadaşları (7) sığırlarda yaptıkları bir çalışmada SOF kültür medyumunu kullanmış ve BSA yerine PVA kullandıklarında daha düşük embriyo gelişim oranı elde ettiklerini bildirmiştir. Yaptıkları çalışmada morula ve blastosit aşamasına gelişim oranı 8 mg/ml BSA içeren SOF medyumunda %56,8, 2 mg/ml BSA içeren SOF medyumunda %34,8 ve 0,1 mg/ml PVA içeren SOF medyumunda %21,0 olarak bildirilmiştir. Sunulan çalışmada BSA'nın kültür medyumundan uzaklaştırılması ve yerine PVP'nin eklenmesi de benzer biçimde gelişim oranlarının düşmesine neden olmuştur.

Evecen ve arkadaşları (91) farelerde yaptıkları çalışmada 2 hücreli fare embriyolarının kültür edilmesi amacıyla kullandıkları M16 ve Whitten's medyumlarında değişen düzeylerde BSA kullanmıştır. Elde ettikleri sonuçlar medyumlara BSA'nın katılmasının gelişimi stimüle ettiğini göstermiştir. Söz konusu çalışmada BSA'nın 0, 0,3, 1, 3, 9, 18 ve 36 mg/ml'lik dozları test edilmiştir. En yüksek gelişim oranlarının her iki medyumda da 3 mg/ml dozda BSA'nın kullanıldığı gruplardan elde edildiği bildirilmiştir (M16 için %84,74; Whitten's için %94,57). BSA'nın kullanılmadığı gruplardan elde edilen oranlar ele alındığında ise, gelişim oranlarının her iki grupta da düştüğü gözlenmiştir. Bu durum BSA'nın kültür medyumuna katılmasının faydalı etkisinin teyit edilmesi bakımından önem taşımakta ve sunulan çalışmanın sonuçlarını da dolaylı olarak desteklemektedir (M16 için %33,43; Whitten's için %63,88). Ayrıca Evecen ve arkadaşları (91) medyum içerisinde yüksek dozda (18 ve 36 mg/ml) BSA kullandıklarında gelişimin inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Bu duruma neden olarak yüksek dozda, uzun süre kullanılan BSA'nın medyum pH'sını etkileyerek embriyonik gelişimi bozması gösterilmiştir.

Son zamanlarda embriyoların kültür edilmesi amacıyla iki farklı medyumla iki aşamada embriyo kültürü uygulaması yaygınlaşmıştır (92, 93). Bu tür uygulamaların asıl nedeni medyumlarda kullanılan serumun kullanılmaması veya ko-kültür uygulamasının yapılmaması isteğidir. Bu durumda embriyoların erken dönemdeki gelişimleri boyunca gösterdikleri normal embriyonik gelişim için önemli olan temel değişikliklerin daha iyi tolere edilmesi gerekmektedir. Bu değişiklikler anne ve babadan gelen genlerin

kombinasyonu, embriyonun kendi genlerinin aktive olması, embriyonun enerji metabolizmasındaki değişiklikler ve en azından bazı embriyolardaki hücre içi homeostatik mekanizmalarla sitoplazma ve organellerin yeniden düzenlenmesi olarak sıralanabilir (94, 95). Bu tür değişiklikleri serumun tanımlanmamış olan içeriği bir dereceye kadar, ancak değişen oranlarda tolere edebilmektedir. Ancak, yukarıdaki istenmeyen etkilerinin yanında BSE ve diğer bazı hastalıkların transfer edilmesinde yarattığı riskler de düşünüldüğünde kültür ortamlarında kullanılmamasının daha yararlı olacağı açıktır. İki aşamalı embriyo kültür uygulamasında özellikle embriyoların gelişimleri boyunca gereksinim duyduğu ve değişim gösteren besinsel öğeler (özellikle karbonhidratlar ve amino asitler) dikkate alınmaktadır. Bu amaçla en yaygın biçimde kullanılan medyum çifti, G1.2/G2.2 olarak tanınan medyumlardır. Son yıllarda ise yenilenmiş olan G1.3/G2.3 medyum çifti yaygın olarak kullanılmaktadır (96). Sunulan türden çalışmaların sonuçları özellikle bu şekilde içeriği tamamıyla tanımlanmış medyumların geliştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

Medyumun kendi kimyasal bileşeninden daha çok, medyumda kullanılan protein kaynağının embriyo gelişimi üzerinde daha etkili olduğu bildirilmiştir (6). Dolayısıyla protein kaynağının doğru seçilmesinin önemi büyüktür.

Sunulan çalışmada en iyi gelişim oranı içerisinde BSA bulunan ve kültürün 4. gününde FCS katkısı yapılan CR1aa kültür medyumundan elde edilmiştir. Buna karşın, diğer gruplardan elde edilen sonuçlar da çok düşük bulunmamıştır. Sonuç olarak, bildirilen birçok çalışmaya benzer şekilde FCS'nin ve BSA'nın in vitro embriyo üretimini pozitif yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. Laboratuarda bundan sonra yapılacak çalışmalarda farklı medyumların denemesinin de gelişim oranlarının iyileştirilmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak, çalışmalarda kontrol olarak en iyi sonuç elde edilen BSA katkılı ve 4. günde FCS ile desteklenen CR1aa medyumunun kullanılmasının doğru olacağı da çalışma sonuçlarına göre önerilebilir. PVP'nin de çalışmalarda BSA'nın yerine kullanılabilmesi için büyüme faktörleri gibi bazı unsurların PVP ile beraber kullanıldığı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. SEVİNÇ A. Dölerme ve Sun'i Tohumlama. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayınları:397. Üçüncü Baskı. Ankara Üniversitesi Basımevi, 160-163, 1983.
2. GORDON I. Laboratory Production of Cattle Embryos. CAB International, Wallingford, 242-261, 1994.
3. WILMUT I, YOUNG L, DESOUSA P, KING T. New opportunities in animal breeding and production - an introductory remark. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 5-14, 2000
4. SAĞIRKAYA H. Effects of CR1aa and TCM-199 media on in vitro embryonic development until blastocyst stage in cattle. *The Journal of The Faculty of Veterinary Medicine University of Uludag* 17: 55-63, 1998
5. HASLER JF. In vitro culture of bovine embryos in Menezos's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Animal Reproduction Science*, 60-61:81-91, 2000.
6. WANG S, LIU Y, HOLYOAK GR, BUNCH TD. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and postcleavage-stage bovine embryos cultured in modified CR2 and M199 media. *Animal Reproduction Science*, 48: 37-45, 1997.
7. KRISHER RL, LANE M, BAVISTER BD. Developmental competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. *Biology of Reproduction*, 60: 1345-1352, 1999.
8. THOMPSON JG. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos: a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 263-275, 2000.
9. THOMPSON JG, ALLEN NW, MCGOWAN LT, BELL ACS, LAMBERT MG, TERVIT HR. Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and following transfer. *Theriogenology*, 49: 1239-1249, 1998.
10. KESKİNTEPE L, BURNLEY CA, BRACKETT BG. Production of viable bovine blastocysts in defined in vitro conditions. *Biology of Reproduction*, 52: 1410-1417, 1995.
11. IRITANI A, NIWA K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, 50: 119-121, 1977.
12. BRACKETT RG, BOUSQUET D, BOICE ML, DONAWICK WJ, EVANS JF, DRESSEL MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, 27: 147-158, 1982.
13. LAMBERT RD, BERNARD C, RIOUX JE, EELAND R, D'AMOURS D, MONTREUIL A. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology*, 20: 149-161, 1983.
14. HANADA A, ENYA Y, SUZUKI T. 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, 1986.
15. LU KH, GORDON I, GALLAGHER M, MCGOVERN H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. *Veterinary Record*, 121: 159-160, 1987.

16. CHENG WTK, MOOR RM, POLGE C. In vitro fertilization of pig and sheep oocytes matured in vivo and in vitro. *Theriogenology*, 25: 146, 1986.
17. MATTIOLI M, BACCI ML, GALEATI G, SEREN E. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*, 31: 1201-1207, 1989.
18. PALMER E, BEZARD J, MAGISTRINI M, DUCHAMP G. In vitro fertilization in the horse: a retrospective study. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement*, 44: 375-384, 1991.
19. BETTERIDGE KJ, SMITH C, STUBBINGS RB, XU KP, KING WA. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 38: 87-98, 1989.
20. SIRARD MA. Practical aspects of in vitro fertilization in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, 38: 127-134, 1989.
21. FIRST NL. New animal breeding techniques and their application. *Journal of Reproduction and Fertility*, 41: 3-14, 1990.
22. SAĞIRKAYA H, YAĞMUR M, NUR Z, SOYLU MK. Replacement of fetal calf serum with synthetic serum substitute in the in vitro maturation medium: Effects on maturation, fertilization and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28: 779-784, 2004.
23. BOUSQUET D, TWAGIRAMUNGU H, MORIN N, BRISSON C, CARBONEAU G, DUROCHER J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, 51: 59-70, 1999.
24. BAĞIŞ H, SAĞIRKAYA H. Klonlama. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 20: 187-198, 2001.
25. HANSEN PJ, BLOCK J. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. *Reproduction, Fertility and Development*, 16: 1-14, 2004.
26. BİRLER S, PABUÇÇUOĞLU S, İLERİ İK, ALKAN S, EVECEN M. Sığır oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında farklı sürelerin etkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 22: 551-557, 1998.
27. TEKİN N, DAŞKIN A, AKÇAY E. Boğa spermatozoonlarında in vitro kapasitasyon ve fertilizasyon. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 25: 349-358, 2001.
28. DOĞAN I, SAĞIRKAYA H, SOYLU MK, NUR Z, YERLİKAYA H. Development of in vitro produced bovine embryos in four different culture media. *Indian Journal of Animal Science*, 72: 227-229, 2002.
29. LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, DOMINKO T, CRITSER ES, CRITSER JK. Tissue maturation in vivo and in vitro: Gamete and early embryo ontogeny. In *Reproductive Tissue Banking* (Ed.) Karow A. Academic Press, New York, pages: 23-138, 1997.
30. TELFER EE. In vitro models for oocyte development. *Theriogenology*, 49: 451-460, 1998.
31. SIRARD MA, PARRISH JJ, WARE CB, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, FIRST NL. The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. *Biology of Reproduction*, 39: 546-552, 1988.
32. KOCOSKI LJ, POPOVSKI K, DOVENSKI T, PETKOV V, TROJACANEC P, GEORGIEVSKI B, MICKOVSKI G. In vitro production of bovine embryos. *Macedonian Journal of Reproduction*, 1: 29-34, 1995.
33. SANTI B, WENIGERKIND H, SCHERNTHANER W, MODL J, STOJKOVIC M, PRELLE K, HOLTZ W, BREM G, WOLF E. Comparison of ultrasound-guided vs

- laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. *Theriogenology*, 50: 89-100, 1998.
34. D'OCCHIO MJ, JILLELLA D, LINDSEY BR. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. *Theriogenology*, 51: 9-35, 1999.
 35. MAJERUS V, DE ROOVER R, ETIENNE D, KAIDI S, MASSIP A, DESSY F, DONNAY I. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology*, 52: 1169-1179, 1999.
 36. AUSTIN CR, SHORT VR. Fortpflanzungsbiologie der Säugetiere. Band 1 Keimzellen und Befruchtung. Verlag Parey, Berlin und Hamburg, 1976.
 37. BİRLER S, PABUÇÇUOĞLU S, ALKAN S, EVECEN M, İLERİ İK. In vitro fertilize edilen sığır oositlerindeki pronükleer gelişim üzerine olgunlaştırma ve fertilizasyon sürelerinin etkisi. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Science*, 22: 1-15, 1998.
 38. WANI NA, WANI GM, KHAN MZ, SALAHUDIN S. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Ruminant Research*, 36: 63-67, 2000.
 39. CHAUHAN MS, PALTA P, DAS SK, KATIYAR PK, MADAN ML. Replacement of serum and hormone additives with follicular fluid in the IVM medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of buffalo oocytes in vitro. *Theriogenology*, 48: 461-469, 1997.
 40. SAKAGUCHI M, DOMINKO T, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, NAGAI T, FIRST NL. A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. *Theriogenology*, 54: 1327-1342, 2000.
 41. PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, FIRST NL. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. *Theriogenology*, 24: 537-549, 1985.
 42. PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, CRITSER ES, EYESTONE WH, FIRST NL. Bovine in-vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 25: 591-600, 1986.
 43. PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, WINER MA, FIRST NL. Capacitation of bovine spermatozoa by heparin. *Biology of Reproduction*, 38: 1171-1180, 1988.
 44. PARRISH JJ, KROGENAES A, SUSKO-PARRISH JL. Effect of bovine sperm separation by swim up or percoll on success of in vitro fertilization and embryo development. *Theriogenology*, 44: 859-870, 1995.
 45. CRITSER ES, LEIBFRIED ML, FIRST NL. The effect of semen extention, cAMP and caffeine on in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*, 21: 625-631, 1984.
 46. NAKADA K, MIZUNO J. Intracellular calcium responses in bovine oocytes induced by spermatozoa and by reagents. *Theriogenology*, 50: 269-282, 1998.
 47. ALM H, TORNER H, BLOTTNER S, NURNBERG G, KANITZ W. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. *Theriogenology*, 56: 817-829, 2001.
 48. SUSKO-PARRISH JL, WHEELER MB, AX RL, FIRST NL, PARRISH JJ. The effect of penicillamine, hypotaurine, epinephrine and sodium metabisulfite on bovine in vitro fertilization. *Theriogenology*, 33: 333, 1990.

49. CHOI YH, CARNEVALE EM, SEIDEL GE, SQUIRES EL. Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199. *Theriogenology*, 56: 661-670, 2001.
50. HOLM P, WALKER SK, SEAMARK RF. Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in vitro fertilized zygotes cultured in vitro or in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility*, 107: 175-181, 1996.
51. EPPIG JJ, O'BRIEN MJ. Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth and development in vitro and in vivo. *Theriogenology*, 49: 415-422, 1998.
52. EYESTONE WH, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, NORTHEY DL, GILLIGAN BG, FIRST NL. Culture of one- and two-cell bovine embryos to the blastocyst stage in the ovine oviduct. *Theriogenology*, 28: 1-7, 1987.
53. CZLONKOWSKA M, EYSYMONT U, GUSZKIEWICZ A, KOSSAKOWSKI M, DZIAK J. Birth of lambs after in vitro maturation, fertilization, and coculture with oviductal cells. *Molecular Reproduction and Development*, 30: 34-38, 1991.
54. HAWK HW, WALL RJ. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. II. Media and co-culture cells. *Theriogenology*, 41: 1585-1594, 1994.
55. VALOJERDI MR, MOVAHEDIN M, HOSSEINI A. Improvement of development of vitrified two-cell mouse embryos by vero cell coculture. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 19: 31-38, 2002.
56. RIZOS D, WARD F, DUFFY P, BOLAND MP, LONERGAN P. 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, 2002.
57. LI J, FOOTE RH, LIU Z, GILES JR. Development of rabbit zygotes into blastocysts in defined protein-free medium and offspring born following culture and embryo transfer. *Theriogenology*, 47: 1103-1113, 1997.
58. YOSHIOKA K, OTHMAN AM, TANIGUCHI T, YAMANAKA H, SEKIKAWA K. Differential patterns of blastulation in bovine morulae cultured in synthetic oviduct fluid medium containing FCS or BSA. *Theriogenology*, 48: 997-1006, 1997.
59. CHANSON A, NOCERA D, SENN A, DE GRANDI P, GERMOND M. Development of well-defined medium for the in vitro maturation of immature bovine cumulus-oocytes complexes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18: 97-105, 2001.
60. FLOOD LP, SHIRLEY B. Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. *Molecular Reproduction and Development*, 30: 226-231, 1991.
61. PINYOPUMMINTR T, BAVISTER BD. In vitro-matured/in vitro-fertilized bovine oocytes can develop into morulae/blastocysts in chemically defined, protein-free culture media. *Biology of Reproduction*, 45: 736-742, 1991.
62. CURTIS JL. *Cattle Embryo Transfer Procedure*. Academic Pres, Inc. San Diego, California, 1991.
63. LINDNER GM, WRIGHT RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, 20: 407-416, 1983.
64. ABE H, OTOI T, TACHIKAWA S, YAMASHITA S. Fine structure of bovine morulae and blastocyst in vivo and in vitro. *Anatomy and Embryology*, 199: 519-527, 1999.

65. STEEVES TE, GARDNER DK. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. *Biology of REproduction*, 61: 731-740, 1999.
66. MORI M, OTOI T, SUZUKI T. Correlation between the cell number and diameter in bovine embryos produced in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, 37: 181-184, 2002.
67. ABE H, MATSUZAKI S, HOSHI H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. *Theriogenology*, 57: 1273-1283, 2002.
68. İLERİ İK, AK K, PABUÇÇUOĞLU S, BİRLER S. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını. Ders notu no: 84, 1998.
69. BAVISTER BD, LEIBFRIED-RUTLUDGE ML, LIEBERMAN G. Development of preimplantation embryos of golden hamster in a defined culture medium. *Biology of Reproduction*, 28: 235-247, 1983.
70. ROSENKRANS CF, ZENG GQ, MCNAMARA GT, SCHOFF PK, FIRST NL. Development of bovine embryos in-vitro is affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*, 49: 459-462, 1993.
71. CAROLAN C, LONERGAN P, VAN-LANGENDONCKT A, MERMILLOD P. Factors affecting bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. *Theriogenology*, 43: 1115-1128, 1995.
72. BEN-YOSEF B, YOVEL I, SCHWARTZ T, AZEM F, LESSING JB, AMIT A. Increasing synthetic serum substitute (SSS) concentrations in P1 glucose/phosphate-free medium improves implantation rate: a comparative study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 18: 588-592, 2001.
73. TAKAHASHI Y, FIRST NL. In vitro development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, 37: 963-978, 1992.
74. HASLER JF, HENDERSON WB, HURTTGEN PJ, JIN ZQ, MCCAULEY AD, MOWER SA, NEELY B, SHUEY LS, STOKES JE, TRIMMER SA. Production, freezing, and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, 43: 141-152, 1995.
75. FARIN PW, CROISER AE, FARIN CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, 55: 151-170, 2001.
76. GALI C, DUCHI R, CROTTI G, TURINI P, PONDERATO N, COLLEONI S, LAGUTINA I, LAZZARI G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59: 599-616, 2003.
77. WALKER SK, HEARD TM, SEAMARK RF. In vitro culture of sheep embryos without co-culture: successes and perspectives. *Theriogenology*, 37: 111-126, 1992.
78. DORLAND M, GARDNER DK, TROUNSON A. Serum in synthetic oviduct fluid causes mitochondrial degeneration in ovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, 13:70, 1994.
79. GARDNER DK, LANE M, SPITZER A, BATT PA. Enhanced rates of cleavage and development for sheep zygotes cultured to the blastocyst stage in the absence of serum and somatic cells: amino acids, vitamins, and culturing embryos in groups stimulate development. *Biology of Reproduction*, 50: 390-400, 1994.
80. CROSIER AE, FARIN PW, DYKSTRA MJ, ALEXANDER JE, FARIN CE. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. *Biology of Reproduction*, 62: 1459-1465, 2000.

81. HASLER JF. In vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction*, 15:47-58, 2000.
82. DUGAN KJ, SHALIKA S, SMITH RD, PADILLA SL. Comparison of synthetic serum substitute and fetal cord serum as media supplements for in vitro fertilization: a prospective, randomized study. *Fertility and Sterility*, 67: 166-168, 1997.
83. SAEKI K, HOSHI M, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, FIRST NL. In vitro fertilization and development of bovine oocytes matured in serum-free medium. *Biology of Reproduction*, 44: 256-260, 1991.
84. SEIDEL GE, ELSDEN RP, BRINK Z. Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. *Theriogenology*, 33: 322, 1990.
85. BIGGERS JD, SUMMERS MC, MCGINNIS LK. Polyvinyl alcohol and amino acids as substitutes for bovine serum albumin in mouse preimplantation embryo culture media. *Human Reproduction Update*, 3: 125-135, 1997.
86. BIGGERS JD, MCGINNIS LK, RAFFIN M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free potassium simplex optimized medium. *Biology of Reproduction*, 63: 281-293, 2000.
87. FURNUS CC, DE MATOS DG, MARTINEZ AG. Effect of hyaluronic acid on development of in vitro produced bovine embryos.
88. DUNGLISON GF, JANE SD, MCCAUL TF, CHAD JE, FLEMING TP, KAYE PL. Stimulation of endocytosis in mouse blastocysts by insulin: a quantitative morphological analysis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 105: 115-123.
89. ECKERT J, PUGH SD, THOMPSON JG, NEIMANN H, TERVIT HR. Exogenous protein affects developmental competence and metabolic activity of bovine preimplantation embryos in vitro. *Reproduction Fertility and Development*, 10: 327-332, 1999.
90. LONERGAN P, O'KEARNEY-FLYNN M, BOLAND MP. Effect of protein supplementation and the presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen concentration. *Theriogenology*, 51: 1565-1576, 1999.
91. EVECEN M, PABUCÇUOĞLU S, ALKAN S, İLERİ İK. The effects of various BSA levels in different media on development in in vitro culture of mouse embryos. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 28: 337-342, 2004.
92. VAN LANGENDONCKT A, DEMYLLE D, WYNS C, NISOLLE M, DONNEZ J. Comparison of G1.2/G2.2 and Sydney IVF cleavage/blastocyst sequential media for the culture of human embryos: a prospective, randomized, comparative study. *Fertility and Sterility*, 76: 1023-1031, 2001.
93. BUNGUM M, POVLSSEN B, MADSEN K, POULSEN AL, ELLIMAN P, HUMAIDAN P. Comparison of G1.2/G2.2 and the GIII series, sequential media for culture of human embryos. A prospective, randomized study. *Fertility and Sterility*, 80: 198-199, 2003.
94. BARNETT DK, BAVISTER BD. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their development in vitro? *Molecular Reproduction and Development*, 43: 105-133, 1996.
95. SQUIRRELL JM, WOKOSIN DL, BAVISTER BD, WHITE JG. Long-term multiphoton fluorescence imaging of mammalian embryos does not compromise viability. *Nature Biotechnology*, 17: 763-767, 1999.
96. SAĞIRKAYA H, ERGIN F, BAGIS H, ARAT S. Vitrification of pronuclear-stage mouse embryos on aluminum foil floating on liquid nitrogen. *Reproduction, Fertility and Development*, 16: 181, 2004.

TEŞEKKÜR

Doktoraya baŐladığım andan itibaren değerli bilgi görgü, öneri yardım ve desteklerini hiçbir Şekilde esirgemeyen danıŐmanım Anabilim Dalı BaŐkanı Sayın Prof.Dr.M.Kemal SOYLU'ya teŐekkürlerimi sunarım.

Özellikle tez çalıŐmam esnasında değerli zamanımı ayırıp çalıŐmama yön verdiğinden dolayı Sayın Yar.Doç.Dr.Hakan SAĞIRKAYA'ya yürekten teşekkür ederim.

Ayrıca tezimin yazım aşamasındaki çok değerli öneri ve katkılarından dolayı Anabilim Dalı üyelerimizden Sayın Doç.Dr.İbrahim DOĞAN'na, Sayın Doç.Dr. Ülgen Günay'a, Sayın Yar.Doç.Dr. Zekarriya Nur'a ve yardımlarından dolayı Sayın Mehmet Gürses'e teŐekkürlerimi sunarım. Çalışma materyali elde etmemde bana kolaylık sağlayan ETBA veteriner hekimlerine ve emeği geçen tüm çalıŐanlarına teşekkür ederim.

Son olarak tüm eğitim hayatı boyunca her zaman yanımda olan ve her türlü imkanı iyi bir eğitim almam için seferber eden anneme, babama ve kardeŐlerime içtenliğimle teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Mehmet YAĞMUR
Ünvanı : Doktora Öğrencisi
Doğum Yeri ve Yılı : Malatya, 14.04.1967
Medeni Hali : Bekar
Uyruğu : Türkiye Cumhuriyeti
Yabancı Dil : Almanca, İngilizce
Ev adresi : Hüdavendigâr Mah. 14. Sok. 40/5 Dikkaldırım
Osmangazi BURSA
Telefon : 0 536 928 9 888
e-mail : vetmehmet@gmail.com

Eğitim Durumu

1988 – 1993 : Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekim
1998 – Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama
Anabilim Dalı, Doktora Öğrencisi

Çalıştığı Kurum ve Kuruluşlar

1997 – 1999 : Bayer Türk Kimya Sanayi

Bilimsel Yayınlar

1. SAĞIRKAYA H, YAĞMUR M, NUR Z, SOYLU MK. Replacement of fetal calf serum with synthetic serum substitute in the in vitro maturation medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of cattle oocytes in vitro. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 28: 779-784, 2004.

2. SAĞIRKAYA H, YAĞMUR M, NUR Z, SOYLU MK. İn vitro maturasyon medyumunda ftal buzağı serumu yerine sentetik serumun kullanılması ve sığır oositlerinin in vitro maturasyon, fertilizasyon ve sonraki gelişimleri üzerindeki etkileri. I. Türk Veteriner Jinekoloji Kongresi, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 4-5-6 Eylül 2003, Konya (Sözlü Bildiri).