

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA  
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Serhat PABUÇÇUOĞLU

İN VİTRO FERTİLİZASYON YÖNTEMİ İLE ELDE  
EDİLEN FARE EMBRİYOLARININ GELİŞİMİNE  
FARKLI POTASYUM KONSANTRASYONLARININ  
ETKİLERİ

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM BAKANLIĞI  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DOKTORA TEZİ

108128

Veteriner Hekim

ÖZEN BANU ÖZDAŞ

İSTANBUL - 2001


**108128**





**Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.**

**Proje No: 665/190299**

Tez Danışmanı:   
Doç. Dr. Serhat Pabuççuoğlu  
(İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi)

Üye:   
Prof. Dr. İ. Kamuran İleri  
(İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi)

Üye:   
Prof. Dr. Necmettin Tekin  
(Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi)

Üye:   
Prof. Dr. Kemal Ak  
(İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi)

Üye:   
Doç. Dr. Sema Birler  
(İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi)

Bu tez yukarıda isimleri yazılı jüri üyelerince Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiş olup, Enstitü Yönetim Kurulunun ~~11-07-2024~~ tarih ve 26 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Müdür

	<u>Sayfa No</u>
<b>1. İÇİNDEKİLER</b>	
<b>2. TEŞEKKÜR</b>	
<b>3. GİRİŞ VE AMAÇ</b> .....	1
<b>4. GENEL BİLGİLER</b> .....	4
4.1. İn Vitro Fertilizasyon.....	4
4.1.1. İn Vitro Fertilizasyon Nedir?.....	4
4.1.2. İn Vitro Fertilizasyon ve Embriyo Transferinin Tarihçesi.....	4
4.2. Embriyo Çalışmalarında Kullanılan Fareler, Bakım Besleme.....	6
4.3. Süperovulasyon.....	6
4.3.1. Süperovulasyon Amacıyla Kullanılan Gonadotropinler.....	7
4.3.2. Gonadotropinlerin Uygulama Zamanı.....	8
4.4. Erkek ve Dişi Gamet Hücrelerinin Elde Edilmesi.....	9
4.4.1. Manipulasyonlarda Kullanılan Medyumlar.....	9
4.4.2. Oviduktan Oosit Elde Edilmesi.....	10
4.4.3. Spermanın Elde Edilmesi ve Değerlendirilmesi.....	11
4.5. İn Vitro Fertilizasyon.....	12
4.6. İn Vitro Kültür.....	13
4.6.1. İn Vitro Kültür Medyumlarının Ozmotik Basıncı ve pH'sı.....	16
4.6.2. İn Vitro Kültür Ortamının Gaz Bileşenleri.....	17
4.6.3. İn Vitro Kültür Medyumlarının Enerji Kaynakları.....	18
4.6.4. İn Vitro Kültür Medyumlarının Protein Kaynakları.....	19
4.6.5. İn Vitro Kültür Medyumlarının Kimyasal Bileşimleri.....	20
4.7. Embriyoların İn Vitro Kültüründe Ovidukt Hücrelerinin Kullanımı (Ko-kültür).....	22
4.8. Embriyoların Gelişim Kontrolleri.....	23
<b>5. GEREÇ VE YÖNTEM</b> .....	25
5.1. Çalışmada Kullanılan Farelerin Üretilmesi ve Bakımı.....	25
5.2. Süperovulasyon İçin Gonadotropinlerin Hazırlanması.....	26
5.2.1. PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) Hormonunun Hazırlanışı ve Uygulanması.....	26

5.2.2.	hCG (Human Chorionic Gonadotropin) Hormonunun Hazırlanışı ve Uygulanması.....	26
5.3.	Uygulamalarda Kullanılan Medyumlar.....	27
5.3.1.	İnkübatör Dışı Manipulasyonlarda Kullanılan Medyumlar.....	27
5.3.2.	Kapasitasyon ve Fertilizasyon (TYH) Medyumunun Hazırlanması.....	29
5.3.3.	İn Vitro Kültür Medyumlarının Hazırlanması.....	31
5.3.3.1.	Whitten's Medyumunda Potasyum (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) Oranlarının Ayarlanması ve Medyumların Hazırlanışı.....	32
5.4.	Dropların Hazırlanması.....	34
5.4.1.	İn Vitro Kapasitasyon Droplarının Hazırlanması.....	34
5.4.2.	İn Vitro Fertilizasyon Droplarının Hazırlanması.....	34
5.4.3.	İn Vitro Kültür ve Ko-kültür Droplarının Hazırlanması.....	35
5.5.	Fertilizasyon ve İn Vitro Kültür İçin Hücre Elde Edilmesi.....	35
5.5.1.	Spermanın Elde Edilmesi.....	35
5.5.2.	Verici Farelerden Oosit Elde Edilmesi.....	36
5.5.3.	Ovidukt Hücrelerinin Kazanılması ve Ko-kültürün Hazırlanması.....	37
5.6.	İn Vitro Fertilizasyon.....	38
5.6.1.	Embriyoların İn Vitro Kültürü.....	39
5.7.	Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar.....	39
5.7.1.	Kullanılan Cihazlar.....	39
5.7.2.	Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	41
<b>6.</b>	<b>BULGULAR</b> .....	<b>42</b>
6.1.	Süperovulasyon Sonuçları.....	42
6.2.	İn Vitro Kültür Sonuçları.....	43
6.2.1.	Kültür Sürelerine Göre Embriyolarda Gözlenen Gelişimler.....	43
6.2.1.1.	Embriyoların 24. Saatteki Gelişim Oranları.....	43
6.2.1.2.	Embriyoların 48. Saatteki Gelişim Oranları.....	45
6.2.1.3.	Embriyoların 72. Saatteki Gelişim Oranları.....	47
6.2.1.4.	Embriyoların 96. Saatteki Gelişim Oranları.....	50

7.	TARTIŞMA.....	55
8.	ÖZET.....	63
9.	YABANCI DİLDE ÖZET.....	65
10.	KAYNAKLAR.....	67
11.	ÖZGEÇMİŞ.....	75



## 2. TEŞEKKÜR

Öğrenim hayatım boyunca ve bilimsel çalışmalarımda, büyük bir özveriyle, maddi ve manevi desteklerini sürdüren sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Doktora çalışmalarım süresince, bilgi ve becerilerinden yararlandığım, çalışmalarımda beni yönlendirerek yardımcı olan Anabilim Dalı öğretim üyelerinden doktora danışmanım Sayın Doç. Dr. Serhat PABUÇÇUOĞLU'na, mesleki bilgi ve tecrübeleriyle kendilerinden sonra yetişecek bilim adamlarının yetişmelerini sağlayan Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. İ. Kamuran İLERİ'ye, düşünce ve çalışmalarından yararlandığım Prof. Dr. Kemal AK, Doç. Dr. Sema BİRLER ve Yard . Doç. Dr. Serhat ALKAN'a şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen diğer Anabilim Dalı elemanlarına da teşekkür ederim.



### 3. GİRİŞ ve AMAÇ

Yirmibirinci yüzyılda dünya nüfusunun hızla artması ile birlikte enerji, su, bitkisel ve hayvansal gıda ihtiyacı buna paralel olarak artmaya başlamıştır. Günümüzde dünya nüfusunun üçte biri açlık tehlikesiyle karşı karşıyadır. Buda çok büyük bir orandır.

Bilim adamları bu problemi çözmek amacıyla değişik yöntemlere başvurmuşlar ve bu sorunun üstesinden gelmenin en iyi yolunun düşük verimli hayvan popülasyonunun ıslah edilerek, üstün genotipik ve fenotipik özelliklere sahip hayvan popülasyonlarının artırılması olduğuna karar vermişlerdir. Ancak doğal seleksiyon yöntemleri ile bunun başarılabilmesi için uzun yıllara gereksinim duyulmaktadır. Bu yüzden araştırmacılar daha kısa sürede sonuç alabilmek amacıyla, biyoteknolojik yöntemlerden biri olan Embriyo Transferi Teknolojisini geliştirmişlerdir. Bu teknoloji ile üstün fenotipik özelliklere sahip hayvandan yılda bir yerine on ile yirmi adet yavru alınabilmesine rağmen; embriyo transferinde kullanılan hormonların ve ilaçların pahalı olması, embriyo başına düşen maliyeti artırmaktadır. Bu yüzden araştırmacılar daha ucuz bir yöntem olan, in vitro fertilizasyon sonucu elde edilen embriyoların transferini gündeme getirmişlerdir. Bu yöntemle mezbahada kesilen hayvanların ovaryumlarından elde edilen oositlerin in vitro olgunlaştırılması ve fertilizasyonu sonucu embriyolar geliştirilmekte ve bu embriyolar transfer edilebilmektedir.

Diğer yandan, günümüz teknolojisinin gelişmesiyle birlikte; hava ve çevre kirliliği, stres gibi faktörler artmış ve insanlarda reproduktif problemler daha sık görülmeye başlanmıştır. Bilim adamlarının hayvanlar üzerinde yaptıkları in vitro fertilizasyon çalışmaları, günümüz insanının sorunlarının çözülmesine ışık tutmakta ve problemlili bireyler sağlıklı çocuk sahibi olabilmektedirler

Günümüzde uterus yıkaması veya in vitro fertilizasyon ile elde edilen embriyoların dondurulması ile uluslararası transport mümkün olabilmekte, bu da canlı hayvan transportu zorunluluğunu ortadan kaldırmaktadır. Bunun sonucu

olarak da genetik ıslahın uluslararası boyutta sağlanması yine in vitro fertilizasyon ve embriyo transferi yöntemi ile mümkün olabilmektedir.

In vitro fertilizasyon yöntemi bilindiği gibi tamamıyla laboratuvar koşullarında gerçekleşmektedir. Mezbaha materyalinden elde edilen oositlerin olgunlaştırılması ve fertilizasyonu sonucu elde edilen embriyoların transfer edilebilir aşamaya gelebilmeleri için, in vivo koşulların in vitro ortamda büyük oranda sağlanması gerekmektedir. Bu da dişi genital kanalında bulunan büyüme faktörlerinin, hormonların, enzimlerin, hücrelerin, mineral maddelerin, enerji ve protein kaynaklarının, gaz bileşenlerinin, pH ve osmotik basıncın, ortam sıcaklığının kısaca in vitro koşulların düzenlenmesi demektir.

Günümüzde in vitro fertilizasyon çalışmalarında, embriyoların sağlıklı gelişebilmeleri için gerekli olan in vivo ortam koşulları yüzde yüz oranında sağlanamamaktadır. Bunun en büyük sebeplerinden birisi de dişi genital kanalında özellikle de ovidukta bulunan; spermatozoonların kapasitasyonunu, fertilizasyon ve embriyonun gelişimini sağlayan, faktörlerin in vitro ortamda kullanılan kültür medyumlarında tam anlamıyla sağlanamamasıdır.

Araştırmacılar özellikle dişi genital kanalında bulunan  $Ca^{+}$ ,  $Mg^{+}$ ,  $NaCl$  ve  $K^{+}$  gibi kimyasal maddelerin fertilizasyonun gerçekleşmesi ve embriyoların gelişimleri üzerine olan etkilerini tam anlamıyla çözememişlerdir. Bilim adamları ovidukta yüksek oranda bulunan potasyumun ve ovidukt hücrelerinin embriyo gelişiminde önemli rolü olduğunu savunmaktadırlar. Ancak dişi genital kanalında bulunan potasyumun ve ovidukt hücrelerinin fertilizasyonun gerçekleşmesinde ve embriyoların gelişmesinde hangi oranlarda ve ne şekilde etkili olduğu tam anlamıyla bilinmemekle beraber halen araştırmacılar bu konudaki çalışmalarına devam etmektedirler.

Bir grup araştırmacı oviduktun yüksek oranda potasyum içerdiğini ve in vitro koşullarda fertilize edilmiş embriyoların yüksek oranda potasyum içeren medyumlarda kültüre edildiklerinde blastosist aşamasına daha iyi oranda

ulaştıklarını savunurken, bazı bilim adamları da düşük oranda potasyum içeren medyumlarda kültüre edilen embriyoların, saf fare ırklarında 2 blastomerli safhada görülen hücre bloğunu aşarak blastosist safhasına daha kolay ulaştıklarını savunmaktadırlar.

Yapılan alışmalar embriyoların morula aşamasına ulaşıncaya kadar gelişim safhalarının oviduktta gerçekleştiğini göstermektedir. Bu yüzden oviduktun içerisinde bulunan kimyasal kompozisyon büyük önem taşımakta ve in vitro fertilizasyon çalışmalarında ko-kültür sıklıkla kullanılmaktadır.

Sunulan bu çalışmada in vitro olarak elde edilen in bred BALB/C ırkı farelerin gamet hücrelerinin in vitro fertilizasyonu sonrası in vitro kültürlerinde 2 blastomerli safhada oluşan bloğun aşılarak blastosist aşamasına ulaşılabilinmesi için farklı potasyum oranların ve ko-kültürün etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

## **4. GENEL BİLGİLER**

### **4.1. İN VİTRO FERTİLİZASYON**

#### **4.1.1. İn Vitro Fertilizasyon Nedir?**

Kapasite olmamış spermatozoonların laboratuvar şartlarında kapasite edilmesi ve dişi gamet hücresi olan oositlerin, kapasitasyona uğramış bu spermatozoonlarla fertilize edilmesi olarak tanımlanan in vitro fertilizasyon 1980 yılından buyana büyük bir önem kazanmıştır (12, 33, 36).

Spermatozoonun kapasitasyonu ve primer oosit olgunlaşması dişi genital organlarının katkısı olmadan da in vitro şartlarda mümkün olabilmektedir (34, 48). Bazı türlerde fertilizasyonu ve embriyoların in vitro gelişim kapasitelerini artırmak için en mantıklı yaklaşım, kullanılan medyumların ayarlanarak uygun koşulları sağlamaktır (10, 68, 69).

In vitro kültür çalışmalarında, ortam koşullarının dış ortamda fertilize edilen embriyoların gelişimleri üzerine etkisi oldukça yüksektir (10, 15). Bu yüzden başarılı bir fertilizasyon ve embriyo gelişimi için in vivo şartlardaki tüm koşulların laboratuvar şartlarında sağlanması gerekmektedir (10, 12, 69).

#### **4.1.2. İn Vitro Fertilizasyon ve Embriyo Transferinin Tarihçesi**

Memeli genetiği Mendel kanunlarının 1900'lü yıllarda yeniden keşfi ile başlamasına rağmen, embriyoloji çalışmaları 1800'lü yılların sonlarına doğru başlamıştır (35). Embriyoloji çalışmalarında ilk olarak tavşan embriyosu kullanılmış ve 1890 yılında Heape tarafından embriyo transferi gerçekleştirilmiştir. Ancak, embriyo çalışmalarına tam anlamıyla 1940'lı yıllarda ilgi duyulmaya başlanmıştır (35).

Embriyo kültür tarihini klasik (ilk), ölü ve rönesans dönemi olmak üzere üç bölümde adlandıran araştırmacılar, 1949 yılında ilk embriyo transferinin gerçekleştiğini bildirmişlerdir (12). Bununla birlikte, spesifik olarak ilk kültür medyumunu 1956 yılında Whitten's tarafından ortaya konmuş ve iki yıl sonra da Biggers ve Mc Laren embriyoları in vitro şartlarda blastosist safhasına ulaştırmışlardır (12, 35).

Araştırmacılar 1960'dan 1970'e kadar olan ve klasik periyod olarak adlandırılan dönemde çoğunlukla fare embriyolarının metabolizması ve kültür koşulları üzerine yoğunlaşmışlardır. İki hücreli fare embriyoları 1965 yılında Biggers tarafından transfer edilmiş ve 1968 yılında da ilk olarak fare embriyoları in vitro olarak Biggers ve Whittens tarafından blastosist safhasına ulaştırılmıştır (12, 35).

Bu dönemi takiben, 1980'li yıllara kadar olan dönemde ise embriyo çalışmaları yavaşlamasına ve fazla araştırma yapılmamasına karşın, 1980'li yıllarda herpes simpleks virusunun timidin kinaz geninin fibroblast hücrelerinin nükleuslarına transfer edilmesiyle bilim adamları embriyolarda gen transferi çalışmalarına hız vermişlerdir. 1987 yılından günümüze kadar olan ve rönesans periyodu diye adlandırılan dönemde ise embriyoloji, in vitro fertilizasyon ve klonlama çalışmaları büyük bir hız kazanmıştır (12, 35).

Araştırmacılar bu dönemde, in vitro koşullarda oluşan hücre bloğunu aşmak için embriyonun metabolizması, embriyonun gelişimi için gerekli olan uygun besin kaynaklarını ve yeni kültür medyumlarının formüllerini bulmaya çalışmışlar ve özellikle ko-kültür sistemlerine önem vermişlerdir (12, 35).

1996 yılında İskoç bilim adamlarının, koyunlarda ilk olarak klonlanmış embriyodan bir kuzu elde etmeleri ile in vitro fertilizasyon, embriyoloji ve genetik çalışmalar için yeni bir çığır açılmıştır (20).

## 4.2. Embriyo Çalışmalarında Kullanılan Fareler, Bakım Besleme

In vitro fertilizasyon ve kültür çalışmalarında kullanılan fare ırklarının, uygulamalarda farklı sonuçlar vermesi nedeniyle dikkatle seçilmesi gerekmektedir (35). Çalışmalarda kullanılacak farelerin üretilmesinde, bakım ve beslemenin önemini vurgulayan araştırmacılar, farelerin 21-24 °C ısı ve %50-55 nem içeren ortamda, ad libitum yem ve su ile beslenmeleri gerektiğini belirtmişlerdir (4, 7, 35).

C57BLJ6 ve BALB/C ırkları ve bu iki ırkın F<sub>1</sub> melezlerinin yüksek ovulasyon yeteneğine sahip oldukları belirtilmiştir (35). Arat ve ark. (2) da C57BLJ6 x BALB/C F<sub>1</sub> hibritlerini gerek süperovulasyon uygulama sonuçları ve gerekse de embriyo transferi sonrası doğum oranları açısından diğer ırklardan üstün bulmuşlardır.

Birçok memeli türünde, embriyoların in vitro gelişimlerinin çeşitli dönemlerinde blok oluşmaktadır (8, 10, 21, 33, 35). Farelerde bu blok iki hücreli safhada gelişmektedir. Bloğun oluşması türlere bağlı olmakla beraber, blok yalnızca random bred ve inbred türlerde meydana gelmekte, bu türlerin F<sub>1</sub> hibritlerinde meydana gelmemektedir (21). Bu yüzden, birçok araştırmacı hücre bloğu ile ilgili çalışmalarında F<sub>1</sub> hibritleri yerine saf ırkları tercih etmişlerdir (37, 38, 49, 56, 59).

## 4.3. Süperovulasyon

Günümüzde embriyo transferi, in vitro fertilizasyon, gen transferi çalışmalarında dişi memelilerden, daha fazla sayıda gamet hücresi elde etmek amacıyla, follikül sayısını ve gelişimini arttıran, ovulasyonu sağlayan FSH ve LH karakterli çeşitli gonadotropinler eksojen yolla uygulanmaktadır (5, 33, 40).

### 4.3.1. Süperovulasyon Amacıyla Kullanılan Gonadotropinler

Süperovulatör hormonlar, embriyo transfer programlarında kullanılan hayvanlardan yeterli miktarda ve kalitede embriyo elde etmek amacıyla geniş ölçüde uygulanmaktadır (33).

Ovaryumlarda gelişecek folliküllerin sayılarını artırmak amacıyla, PMSG, FSH ve HMG hormonları kullanılmaktadır (5, 33, 35, 40). Glikoprotein yapısında olan ve hipofiz ön lobundan salgılanan FSH'nın yarılanma ömrünün kısa olması, süperovulasyon çalışmalarında bu hormonun 12 saatlik aralarla 7-8 kez enjeksiyonunu gerektirmektedir (33, 40, 48).

PMSG hormonu, kısırlarda gebeliğin 40. ve 150. günleri arasında fetal trofoblast hücreleri tarafından salgılanmaktadır (33, 35, 40). Daha çok FSH ve kısmende LH karakterli olan PMSG'nin yarılanma ömrünün uzun olması nedeniyle, memelilerde follikül gelişimini uyarmak ve süperovulasyonu sağlamak amacıyla tercih edildiği ve tek bir enjeksiyonun süperovulasyon için yeterli olacağı bildirilmektedir (33, 35, 40).

Diğer bir gonadotropin olan hCG, insan plasantasının sinsitial hücreleri tarafından gebelik süresince salgılanır ve ovulasyonun indüklenmesini sağlar (35, 40). hCG daha çok LH ve az derecede FSH karakterindedir.

Farelerde etkili bir süperovulasyon, dişi farelerin ağırlığı, yaşı, gonadotropinlerin uygulama zamanı ve farelerin ırkı gibi birçok değişik faktörlere bağlıdır (35). Dişi farelerde seksüel olgunluk süperovulasyon programlarında oosit sayısını etkileyen büyük bir faktördür. En iyi süperovulatör yanıtın türlere göre değişmekle beraber, genellikle 3-5 haftalık farelerde görüldüğü bildirilmiştir (35).

Dişi farelerin seksüel olgunluklarında yaş yine de daima güvenilir bir indikatör değildir. Beslenme programı ve sağlık durumu da folliküler olgunlaşmayı etkilemektedir (35).

PMSG ve hCG uygulamalarının zamanı birbiriyle ilişkilidir. Fare odasındaki ışık siklusu, süperovulasyona tabi tutulan farelerin gelişimsel bir örnekliliğini ve sayısını etkilemektedir (35). Süperovulasyon için kullanılacak olan farelerin birkaç gün aydınlık-karanlık döngüsüne tabi tutulması gerektiği ve bir çok fare ırkında, PMSG ve hCG enjeksiyonu aralığının, oosit üretimi için 42-48 saat olduğu bildirilmektedir (33, 35, 48).

Endojen LH salınımının türlere bağlı olmakla birlikte bir çok türde, PMSG enjeksiyonunu takiben, ikinci karanlık periyodunun orta noktasından sonraki 15-20. saatler arasında meydana geldiği tahmin edilmektedir (35).

Pekçok fare ırkında yeterli ovulasyonu sağlamak için 2.5 I.U hCG yeterli olmasına rağmen, genellikle enjeksiyonlar 5 I.U dozajında uygulanmaktadır. hCG enjeksiyonunun ovulasyonla sonuçlanabilmesi için, endojen LH salınımından önce kan dolaşımına hızlı bir şekilde girmesi gerektiği ve bu yüzden PMSG sc veya ip yolla verilirken, hCG'nin i.p yoluyla verilmesinin şart olduğu bildirilmektedir (4, 21, 34, 35, 41,51).

Birçok araştırmacı, süperovulasyon için puberteye ulaşmış fareleri kullanmaktadırlar (15, 51, 61). Bununla birlikte, puberteye ulaşmış 3-6 hafta yaştaki farelerin, herhangi bir yaşta ve doğal ovulasyonda olan farelerden çok daha fazla sayıda fertilize olabilecek yumurta ürettikleri bildirilmektedir (33, 35).

#### **4.3.2. Gonadotropinlerin Uygulama Zamanı**

PMSG ve hCG uygulama zamanları birbirleriyle ilişkili olmakla beraber, fare odasındaki ışık siklusu, süperovulasyon uygulanan farelerde oositlerin gelişimsel bir örnekliliğini ve yumurta sayısını etkilemektedir (35). İn vitro



fertilizasyon çalışmalarında bir çok araştırmacının kullandığı PMSG ve hCG dozları ile ışık programı benzerlik göstermektedir. Araştırmacıların çoğu ışık programını 10 saat karanlık 14 saat aydınlık periyoduna ayarlarken, bir kısmı da 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ışık döngüsünü kullanmışlardır (4, 52, 53, 54, 60).

Yine yapılan çalışmalarda araştırmacılar süperovulasyon için PMSG'yi 5-10 I.U uyguladıktan 42-48 saat sonra 5-10 I.U hCG'yi tercih etmişlerdir (15, 56, 60, 64, 65, 80). Çoğu fare ırkında, PMSG enjeksiyonu ile hCG enjeksiyonu arasındaki 42-48 saatlik zaman aralığı optimal olmakla beraber, ovulasyon genellikle hCG enjeksiyonundan sonraki 10-14 saatlik bir süre içerisinde gerçekleşmektedir (15, 18, 35, 41, 59). Fakat, ovulasyon zamanını kontrol etmek için hCG'nin endojen LH salınımından önce uygulanması gerektiği bildirilmektedir (35, 48).

#### **4.4. Erkek ve Dişi Gamet Hücrelerinin Elde Edilmesi**

##### **4.4.1. Manipulasyonlarda Kullanılan Medyumlar**

In vitro kültür çalışmalarında kullanılan bikarbonat tuzlu medyumların pH'sı inkübatör dışındaki ortamlardan etkilenerek hızla alkaliye doğru kaymaktadır. Bazı araştırmacılar çalışmalarında farklı yıkama medyumunu kullansalar da, uzun süreli inkübatör dışı ortamlarda pH stabilitesini sağlamadaki güvenilirliğinden dolayı, M2 yıkama medyumunu tercih etmişlerdir (2, 3, 4, 67). Uzun süre CO<sub>2</sub> inkübatörünün dışında tutulan M16 medyumunun pH'sının alkaliye kayması nedeniyle, Krebs Ringer solusyonundaki bikarbonat tamponu azaltılarak Hepes tampon tuzunun eklenmesiyle M2 medyumunu modifiye edilmiştir (35). Bu medyum organların diseksiyonu ve embriyoların toplanması gibi inkübatör dışındaki manipulasyonlarda kullanılmaktadır (35). M2 medyumunun pH'sının 7,2- 7,4 olduğunu bildiren araştırmacılar medyumun CO<sub>2</sub> inkübatörüne ihtiyaç duymadan uzun süre dışarıda kalabilmesi nedeniyle, fare

embriyolarının toplanmasında ve inkübatör dışındaki manipülasyonlarda kullanılabileceğini belirtmektedirler (35).

Bunun yanı sıra birçok araştırmacı, in vitro çalışmalarında yıkama medyumunu olarak Dulbecco'nun fosfat buffer tuz solüsyonunu (PBS), Heps-MTF medyumunu, PB-1 medyumunu, %1 FCS içeren %0.9'luk NaCl ve Krebs Ringer solüsyonunu kullanmıştır (13, 51, 70, 71, 79, 84).

#### **4.4.2. Oviduktan Oosit Elde Edilmesi**

Farelerde ovulasyonun genellikle hCG enjeksiyonundan sonraki 10 ile 15. saatler arasında meydana geldiği ve fertilize olabilecek kalitede oosit elde edebilmek için bu zaman aralığına dikkat edilmesi gerektiği bildirilmektedir (15, 35, 48).

Oositlerin ovulasyonlardan sonra birkaç dakika içinde oviduktun ampulla bölgesine geldiğini bildiren araştırmacılar, iyi kalitede oosit elde edebilmek için, süperovule edilmiş dişilerin hCG enjeksiyonundan 10-14 saat sonra servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmeleri gerektiğini bildirmişlerdir (15, 35, 58).

Sakrifiye edildikten sonra abdominal bölgeleri alkollenerek karın duvarı bir makas yardımıyla kesilip açılan farelerin uterus, ovidukt ve ovaryumları bulunduktan sonra, ovidukt etrafındaki yağ dokusu ve damarlardan arındırılarak diseke edilmektedir. Oositler mikroskopta, M2 medyumuna içine alınmış ve şişkin olarak görülen ampullanın punksiyonu sonucunda elde edilmektedir (35). Fare oositlerinin 8-10 saat süreyle yaşadığını belirten araştırmacılar, in vitro fertilizasyonda başarılı olabilmek için oosit toplama işleminin en kısa sürede bitirilmesi gerektiğini belirtmektedirler (33, 35, 54).

Oositlerin yaşam sürelerinin türlere göre değişmekle beraber 8-10 saat arasında olduğunu belirten araştırmacılar, oosit yaşlandıkça fertilizasyon sonucu blastosiste ulaşma oranlarının azalmakta olduğunu vurgulamaktadırlar (33, 48).

Aynı zamanda oosit ve embriyoların elde edilmesi sırasında kullanılan ısıların 32-37°C arasında olması gerektiği bildirilmektedir (4, 7, 35).

#### 4.4.3. Spermanın Elde Edilmesi ve Değerlendirilmesi

Spermatozoonlar sertoli hücrelerinden atıldıktan sonra hızla epididimisin kauda bölgesine iletilmekte ve orada hareketsiz olarak kalmaktadırlar. In vivo şartlarda spermatozoon, motilitesini ejakulasyon sırasında eklenti üreme bezlerinden salgılanan sekresyonlarla karıştığına kazanmaktadır (35, 39, 40).

Birçok araştırmacı çalışmasında, epididimiste depolanması nedeniyle spermayı epididimisin diseksiyonu yöntemiyle kazanmaktadır (21, 22, 35, 46, 49). Erkek fareler, dişi farelerin hCG enjeksiyonu uygulamasından 12 saat sonra servikal dislokasyon yöntemiyle sakrifiye edilmektedir. Çalışmada kullanılacak farelerin operasyon gününden önceki bir kaç gün içinde çiftleşmeleri engellenmektedir (35).

Abdominal bölgeleri açılan farelerin testis ve epididimisleri abdominal boşluğun dışına alınarak etrafındaki yağ dokulardan temizlenmektedir. Kauda epididimisler vas deferens ile birlikte testisten dikkatle ayrıldıktan sonra 37°C'deki yıkama medyumu içerisine aktarılmaktadır. Daha sonra kauda epididimis kapasitasyon medyumu içerisinde yavaşça sıkılarak (kauda epididimis parçalanmadan) sağılmaktadır (35). Sağılan sperma temel bir basamak olan kapasitasyon için 37°C'lik %5 CO<sub>2</sub> %5 O<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> içeren inkübatörde 1,5-2 saat süreyle kültüre edilmektedir (21, 35, 36, 49, 78, 80).

Farelerde her bir ejakulatta yaklaşık olarak  $58 \times 10^6$  adet spermatozoon dişi genital kanalına bırakılmaktadır (35). Ancak, ejakulasyon sonrası spermatozoon fertilizasyonu sağlayabilecek yapıda olmadığından, dişi genital kanalında özellikle de oviduktun istmik bölgesinde olgunlaşmaları gerekmektedir. Bu olay kapasitasyon olarak isimlendirilmektedir (33, 35, 40, 48)

Bununla beraber kapasitasyon, dişi genital kanal katkısı olmadan da in vitro şartlarda mümkün olabilmektedir (48, 62). Kauda epididimisten veya ejakulasyon sonrası elde edilen spermanın, in vitro şartlarda fertilizasyon yeteneğini inceleyen araştırmacılar, epididimal spermanın ejakule olan spermaya oranla daha fazla sayıda oositi fertilize ettiğini bildirmektedirler (48). Araştırmacılar, ejakule edilen spermada seminal plazmanın dekapasitasyon faktörlerinin bulunduğunu, bunun da spermatozoonların kapasitasyonunu olumsuz etkilediğini bildirmektedirler (40).

Fare, kedi ve insan gibi bazı türlerde in vitro kapasitasyon süresinin 1 saatten az olabildiği, bazı türlerde ise birkaç saat olduğu bildirilirken çoğu araştırmacı fare spermasını 1,5-2 saat süreyle kapasite etmektedirler (46, 48, 49, 77, 78). Günümüzde birçok araştırmacı fare spermatozoonlarının kapasitasyonunda TYH medyumunu kullanmaktadırlar (21, 22, 40, 78). Ayrıca, Whitten's medyumunu da kapasitasyon amacıyla kullanılmıştır (35).

#### 4.5. İn Vitro Fertilizasyon

Dişi gamet hücresi oosit ve erkek gamet hücresi spermatozoonun laboratuvar şartlarında biraraya getirilerek fertilizasyonun ve zigotun oluşturulması diye bilinen in vitro fertilizasyon, son yıllarda büyük önem kazanmıştır (12, 35, 48). İn vivo ve in vitro şartlarda spermatozoonun oositi dölleyebilmesi için dişi genital kanalında olgunlaşması, diğer bir anlamda kapasitasyona uğraması gerekmektedir (33, 35, 40, 48).

İN vivo şartlarda, dişi farelerin genital kanalına her bir ejakulasyonda yaklaşık  $58 \times 10^6$  adet spermatozoon bırakılmakta ve bu spermatozoonlar 1 saatte olgunlaşabilmektedir (35). Araştırmacılar in vitro şartlarda başarılı bir fertilizasyon için  $2-2.5 \times 10^6$  mL adet spermatozoonun yeterli olduğunu ve sperma kapasitasyonunun 1-3 saatte gerçekleştiğini bildirmektedirler (22, 26, 35, 39, 46, 48, 49). Ayrıca kapasitasyona uğramış fare spermatozoonlarının in

vivo şartlarda, zona pellusidayı birkaç dakikada, in vitro şartlarda ise ortalama 20 dakikada geçebildiği bildirilmektedir (48). Gerçek fertilizasyon ise spermatozoonun oosite penetrasyonundan 3-4 saat sonra meydana gelmektedir (48).

Oositlerin fertilizasyon kabiliyetlerinin ovulasyondan sonraki 1-2 saatlik sürede daha yüksek olduğu ve zamanla bu kabiliyetlerinin azaldığı bildirilmektedir (49). Bu nedenle in vitro fertilizasyon çalışmalarında, fertilizasyonun hCG enjeksiyonundan sonraki 12-14 saatler arasında gerçekleşmesi gerekmektedir (22, 35).

In vitro şartlarda başarılı bir fertilizasyon için spermatozoonların kapasitasyonu ve fertilizasyonunda kullanılacak medyumlarda  $Na^+$ ,  $Ca^{++}$ ,  $K^+$ ,  $PO_4^-$ ,  $Cl^-$ ,  $Mg^{++}$  gibi mineral maddelerin bulunması gerektiği bildirilmektedir (14, 30, 48). Günümüzde birçok araştırmacı kapasitasyon ve fertilizasyon medyumunu olarak TYH medyumunu kullanmışlar ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir (22, 46). Bunun yanısıra araştırmacılar, Whitten's medyumunu in vitro fertilizasyon amaçlı kullanmışlardır.

#### **4.6. İn Vitro Kültür**

Memeli embriyoları ve in vitro fertilizasyon çalışmaları yaklaşık bir yüzyıldır sürmesine rağmen, yalnızca son otuz yıldır alet ve ekipmanların iyileştirilmesi bu konuda yoğun çalışmalara izin vermiştir (88).

Yapılan in vitro fertilizasyon çalışmalarında, hayvan türlerine göre değişmekle beraber, özellikle saf ırklarda, örneğin farelerde 2 blastomerli, ratlarda 2-4, tavşanda morula, maymun, siğir ve koyunda 8-16, domuzda ise 4 blastomerli safhada hücre bloğu olduğu bildirilmiştir (10, 33, 39, 53, 83).

Birçok hayvan türünde meydana gelen bu hücre bloğunun, embriyonun genomik aktivasyonunun başlaması, DNA sentezinin artması, embriyonun

gelişimi için gerekli olan besin maddelerine duyarlılığı ve embriyoların in vivo şartlardaki ovidukt ve uterus çevresinden alınarak in vitro ortama alınmaları nedeniyle meydana geldiği belirtilmektedir (10, 48, 83).

In vitro kültüre tabi tutulan memeli embriyolarının gelişim hızları, in vivo koşullarla karşılaştırıldığında, medyumlardaki değişik elementler, organik kompozisyonlar ve hormonal yetersizlikler nedeniyle daha yavaştır (6, 48, 71).

Bahsi geçen hücre bloğunu aşabilmek ve blastosist safhasına ulaşabilmek için in vitro kültür laboratuvarları dikkatle kontrol edilmeli ve özellikle çalışmalarda kullanılacak olan alet ve materyaller olası sitotoksik etkileri yönünden kullanılmadan önce test edilmelidir (88).

In vitro kültür çalışmalarında plastik ve cam petripler ile tüpler yaygın olarak kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar, in vitro fertilizasyon çalışmalarında petri kalitesinin sonuçları etkileyen önemli faktörlerin başında geldiğini, düşük kaliteli petriplerin embriyo toksik etki gösterebileceklerini bildirmekle beraber özellikle cam eşyaların fabrika üretimi sırasında değil de, kullanım sonrası dezenfeksiyonu ve sterilizasyonu sırasında toksik etkilerini kazandıklarını belirtmektedirler (12, 47, 82, 88).

Whittingham (82), bütün cam malzemelerin yüksek kalitede, ısıya dirençli olması ve stok medyumların saklanması sırasında medyuma geçebilmelerinden dolayı yapısındaki sodyum, potasyum ve diğer metabolik iyonların düşük miktarda olması gerektiğini bildirmektedir. Yine aynı araştırmacı cam malzemelerin 150 °C'de 90 dk. da kuru ısıda sterilize edilebileceğini belirtmektedir.

Whittingham tarafından 1957 yılında modifiye edilen Whitten's kültür medyumunun pH'sının 7.2- 7.4, osmotik basıncının ise 275-290 mOsmol olması gerektiği bildirilmektedir (35, 82). Fare embriyo kültüründe kullanılan diğer bir medyum olan M 16 medyum, Krebs Ringer bikarbonat solusyonundan modifiye edilmiştir. M 16 medyum Whitten's kültür medyumunun formülüyle

hemen hemen benzer özellik göstermektedir (35). Bu yüzden fare embriolarının in vitro kültüründe her iki medyum da yaygın olarak kullanılmaktadır (82).

Günümüzde birçok araştırmacı, çalışmalarında 35 x 15 mm. ve 60 x 10 mm. çapındaki plastik petripleri kullanmaktadırlar (9, 17). Bazı araştırmacılar embriyo toplama işlemine başlamadan önce kültür droplarının üzerlerini mineral yağı ile örterek 4-12 saat süre ile %5 CO<sub>2</sub> ortamda inkübasyona tabi tutmuşlardır (4, 9, 21, 53, 54). Diğer taraftan, Willey ve ark. (85), kültür öncesi medyumların uzun süreli inkübasyonunun sakıncalı olduğunu ve sodyum pirüvatın etkisinin bu nedenle zayıflatıldığını belirtmektedir.

Yine Chatot ve ark (21), fare embrioları için hazırlanan üzerleri mineral yağ ile örtülü olan kültür droplarını, kültür işlemine geçmeden önce %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C' lik etüvde 4-5 saat süreyle inkübe ettiklerini belirtmişlerdir .

Fare embriolarının in vitro kültüründe, damla başına düşen embriyo sayısının embriyo gelişimine önemli ve büyük etkisi vardır (45, 51, 74, 85). Birçok araştırmacı, fare embriolarının in vitro kültüründe 2-60 adet arasında değişen embriyoyu 10 ile 100 µL'lik kültür dropları içerisinde inkübe etmişlerdir (3, 4, 21, 44, 47, 52, 74, 85).

Salahuddin ve ark. (74), in vitro fertilizasyonda drop başına düşen fare embriyosu sayısının artırılmasının embriyo gelişimini desteklediğini bildirirlerken, embrioların fertilize olmamış oositlerle aynı ortamda inkübe edilmelerinin zararlı olduğunu belirtmişlerdir. Yine aynı araştırmacılar, grup halinde kültüre edilen embrioların gelişim hızlarının, bireysel kültüre edilen embriolara oranla çok daha fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Kato ve Tsunoda (45), kültür ortamındaki embriyo sayısı çoğaldıkça gelişimi de artırdığını savunmalarına rağmen, embriyo sayısı ve kültür hacmi

oranlarında her bir embriyo için yeterli, eşit alanın ve gerekli maddelerin olması gerektiğini bildirmektedirler.

Willey ve ark. (85), fare embriyolarının blastosiste ulaşmalarında en iyi sonucun 10-12  $\mu$ L'lik medyum damlasına 20 embriyonun yerleştirildiği gruplardan alındığını belirtmektedirler.

İn vitro kültür sistemlerinde, gelişimlerinin erken dönemlerindeki embriyolar ısıнын belirtilen optimal düzeyin üzerine çıkmasından aşırı derecede, bu optimal ısıнын düşmesinden ise nadiren etkilenmektedirler (88). Isı zararları embriyoların inkübatörde kültüre edilmeleri sırasında, mikroskopta incelenmeleri sırasında ve hücrelerin yerleştirildiği medyumların farklı ısıda olması nedeniyle meydana gelebilmektedir (88).

#### **4.6.1. İn Vitro Kültür Medyumlarının Ozmotik Basıncı ve pH'sı**

Kültür medyumlarındaki pH değişiklikleri memeli embriyoları için önemli olabildiği gibi, değişik kültür medyumları formüllerinde bulunan kimyasal maddeler medyumun pH'sını etkileyebilmekte, bu da embriyo gelişim oranlarını azaltabilmektedir (12). Bu yüzden kültür medyumlarının pH'sı embriyolar üzerinde son derece etkili bir faktördür (12, 40, 74, 88).

Kültür medyumlarına katılan bikarbonat iyonlarının medyum pH'sının kontrolünü sağladığı ve medyum pH'sının kabin içindeki CO<sub>2</sub> ile ayarlanabildiği bildirilmektedir (35, 50). Araştırmacıların çoğu embriyo kültüründe kullandıkları medyumun pH'sını 7.2 – 7.6 arasında ayarlayarak kullanmaktadırlar (2, 3, 12, 35, 42).

Bavister (12) ovidukt içeriğinin erken dönemdeki embriyoların pH'sının düzenlenmesine yardımcı olduğunu bildirirken, ovidukt pH'sının 7.2 – 7.4 olduğunu belirtmektedir.



Fare embriyoları ile yapılan çalışmalar göstermektedir ki, kültür medyumlarının ozmotik basıncı çok kritik ve önemli bir düzenleyici değildir (12). Genellikle preimplantasyon dönemindeki embriyoların geniş orandaki ozmotik basınç değişimlerine çok iyi adapte oldukları görülmektedir. Bu yüzden kültür medyumlarında bir değişiklik yapıldığında ozmotik basıncı ayarlamak gerekli olmayabilir (12).

Bununla birlikte, kültür medyumlarındaki sodyum klorür oranının azaltılmasının embriyo gelişimi için daha iyi olabileceği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (12, 14).

#### **4.6.2. İn Vitro Kültür Ortamının Gaz Bileşenleri**

Kültür ortamlarında bikarbonat tamponlar %5 CO<sub>2</sub> içeren atmosferde kullanılırlar. Bu sistemin seçilmesinin en büyük nedeni kandaki fizyolojik sistemle benzeşmesidir (14).

Whittingham (82) izotonik bikarbonat medyumlarının kullanılmadan önce %5 CO<sub>2</sub> ile gazlandığında medyumun pH'sının 7.2-7.4'e ayarlanabildiğini, Bavister (12) de medyumların pH'sının stabilize edilmesinde CO<sub>2</sub>'in rolünün önemli olduğunu bildirmektedir.

Bunun yanı sıra embriyoların in vivo ve in vitro ortamda oksijen solunumu yaptıkları bildirilirken gaz karışımındaki N<sub>2</sub> gazının etkisiz olduğu belirtilmektedir (12, 14, 42, 50, 87).

Çeşitli hayvan türlerinde embriyoların in vitro fertilizasyonunda %20 O<sub>2</sub> oranının %5 düzeyine indirilmesinin embriyolar için olumlu olduğu bildirilmektedir (14). Bu yüzden birçok araştırmacı tarafından in vitro kültür çalışmalarında %5 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> gaz karışımı kullanılmaktadır (3, 4, 12, 25, 35, 36, 88). Watson ark. (81), ise ovidukt epitel hücreleri ile ko-kültüre edilen embriyoların gelişimlerinde %5 CO<sub>2</sub> oranının yeterli olduğunu

bildirirlerken, %5 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> gaz karışımının faydalı olmadığını ve olasılıkla azalan O<sub>2</sub> konsantrasyonunun ovidukt hücrelerinin ihtiyaçlarını karşılayamadığını belirtmektedirler.

#### **4.6.3. İn Vitro Kültür Medyumlarının Enerji Kaynakları**

Türlerin çoğunda, in vitro kültür medyumlarının besin kompozisyonlarında bulunan enerji maddelerinin akıllıca ayarlanmasıyla blok oluşumunun üstesinden gelinebilmekte ve blastosist safhasına ulaşılabilir (12, 14). Yapılan araştırmalarla oosit ve embriyo gelişimi için enerji kaynağı olan glikoz, piruvat ve laktatın çok önemli olduğu bildirilmektedir (12, 14, 43, 56, 76).

Biggers ve ark. (13), embriyo için uygun olan enerji kaynaklarından biri olan piruvatın, fare oviduktunun yukarı bölümünden salgılandığını bildirirlerken, Houghton ve ark. (37), embriyonun erken dönemlerinde oviduktta daha çok piruvat salgılandığını, laktatın ise blastosist aşamasında arttığını vurgulamaktadırlar. Buna ek olarak Pomp ve ark. (68), Whitten's medyumundaki laktat seviyesinin düşürülmesiyle fare zigotlarının 1. bölünme aşaması için daha uygun bir ortam oluşturulacağını ve embriyoların daha iyi gelişeceğini vurgulamaktadırlar. Bununla birlikte, gebe hayvanlarda embriyoların preimplantasyon döneminde (ilk 48 saat) laktat seviyesinin artmasının, embriyoların gelişimine oviduktun bir cevabı olduğu bildirilmektedir (63).

Chatot ve ark. (21), embriyoların in vitro kültürünün ilk 48 saatinde glikozun zararlı olduğunu ve yalnızca 3-4 hücreli safhadaki dönemden sonra gerekli olduğunu bildirirken, Schini ve Bavister (75), glikozun embriyoların bölünme aşamasını inhibe etmediğini ve inbred fare embriyolarında rutin olarak kullanılan piruvat, laktat ve glikozun, embriyoların 2 hücreli safhadan blastosist safhasına gelişimlerini desteklediğini belirtmektedir.

Bazı araştışıcılar fare embriyolarının erken dönem in vitro kùltüründe glikozun gerekli olduğunu ve yine 2 hücreli safhadan itibaren glikoz yokluğunda embriyoların blastosist safhasına çok düşük oranda ulaştıklarını bildirmektedirler (8). Buna karşın Brinster (15), glikozun 2 hücreli fare embriyolarının blastosist safhasına ulaşmalarını desteklemediğini bildirmektedir. Yine aynı araştırıcı glikozun düşük oranda piruvat ile birlikte kullanıldığında embriyo gelişiminin arttığını bildirmiştir.

#### **4.6.4. In Vitro Kùltür Medyumlarının Protein Kaynakları**

Serbest aminoasitler çeşitli hayvan türlerinde ovidukt sıvısında bulunmaktadır. Aminoasitlerden biri olan glutaminin embriyoların gelişimleri üzerine pozitif etkisi olduğu bildirilmektedir. Ancak, aminoasitlerin hepsinin 37°C için uygun olmadığını, uzun süreli kùltürde, parçalanmaları nedeniyle amonyumun şekillenebileceğini belirten araştışıcılar, fare embriyolarının in vitro gelişiminde medyumların yenilenmediği sürece aminoasitlerin etkisi olmadığını belirtmektedirler (14, 52).

Kramer ve Bowen (50), embriyoların in vitro gelişimi için protein ilavesine ihtiyaç duyduklarını bunun için, kùltür ortamlarına hayvansal kaynaklı serumların katılabileceğini, katılacak olan serum oranının %10'u aşmaması gerektiğini aşılması durumunda düşük sonuçlara yol açabileceğini bildirmişlerdir. Menino ve ark. (58), in vitro embriyo gelişiminin ortamdaki protein miktarına bağlı olduğunu, sığır uterus sıvısı ile sığır serum albuminin embriyo gelişimini benzer olarak etkilediklerini ve ısıya tabi tutulan sığır serumunun (Heat Treated Bovine Serum) BSA'ya göre daha fazla desteklediğini bildirmektedirler.

Evecen (28) ise iki hücreli fare embriyolarının in vitro kùltüründe protein kaynağı olarak BSA'nın olumlu katkılar yapabildiğini ve kùltürde Whitten's medyumunu kullanılacaksa 3 mg/mL BSA yoğunluğunun tercih edilmesi gerektiğini bildirmektedir.

Leese (55) ise embriyoların in vitro gelişiminde aminoasitlerin gerekli olmadığını, bunun yerine BSA gibi makromoleküllerin gerekli olduğunu belirtmektedir.

#### 4.6.5. İn Vitro Kültür Medyumlarının Kimyasal Bileşimleri

Fare embriyolarının in vitro kültüründe kullanılan kültür medyumları, yapısal olarak birbirlerine benzerlik göstermekle beraber, kültür çalışmalarında M 16, Tyrodes, HTF gibi medyumlar araştırmacılar tarafından kullanılmakta ve Whitten's medyumunu birçok araştırmacı tarafından tercih edilmektedir (12, 35, 68, 69). Bunun yanısıra, bazı araştırmacılar kültür medyumunu olarak MEM (Minimum Essential Medium), Ham's F 10, M-199, Whitten's T6, CZB (Chatot-Ziomek-Bavister), KSOM, MTF medyumlarını kullandıklarını bildirmektedirler (11, 21, 23, 25, 27, 51, 72, 73, 79).

Fare ve tavşan embriyolarında yapılan deneysel çalışmalarda, embriyoların in vitro gelişimleri için medyum formülasyonunun önemli olduğu bildirilirken (10), medyum hazırlanmasında kullanılan suyun yüksek saflıkta olması ve medyumun filtre edilmesi gerektiği belirtilmektedir (82, 86).

In vitro kültür medyumlarında bulunması gereken başlıca iyonların,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{PO}_4^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Mg}^{++}$  ve  $\text{HCO}_3^-$  olduğu bildirilmektedir (14, 18, 48, 50). Araştırmacılar NaCl'in medyumun osmotik basıncını ayarladığını,  $\text{Ca}^{++}$ 'un ise embriyonun membran permeabilitesi ile stabilitesini desteklediğini ve morulanın kompakt hale geçmesinde önemli rol oynadığını belirtmektedirler (35, 50).

Lawits ve Biggers (54), NaCl, piruvat, glikoz ve  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ın yüksek konsantrasyonlarının medyumdaki diğer maddelerle karşılaştırıldığında, embriyo gelişimine zararlı olduğunu bildirmektedir. Araştırmacı basit örnekleme optimizasyon yöntemiyle 8 ortamı karşılaştırdığını,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içermeyen

medyumda bulunan embriyoların gelişmelerinde büyük artış olduğunu belirtmektedir.

Erbach ve ark. (27), yaptıkları bir çalışmada fertilizasyon medyumlarından biri olan SOM medyumundaki  $K^+$  oranını on kat artırdıklarını ve KSOM medyumunu olarak dizayn ettiklerini belirtmektedirler. Araştırmacılar, CF1 fare embriyolarının SOM'dakine göre KSOM'da 2 hücreli bloğu aşarak daha yüksek oranda blastosist safhasına ulaştığını bildirmektedirler.

Willey ve ark. (85), fare embriyolarının in vitro kültüründe değişik oranlarda (0,6 mM, 1,4 mM ve 6 mM)  $K^+$  içeren medyumların embriyo gelişimine etkisini araştırdıkları çalışmada, 0,6 mM  $K^+$  içeren ortamdaki embriyoların, 6 mM  $K^+$  içeren medyumdakilere göre iki katı oranda blastosist safhasına geliştiklerini bildirmektedirler.

Dumoulin ve ark. (26) ise yaptıkları bir çalışmada ovidukt sıvısında yüksek oranda  $K^+$  bulunmasına rağmen, fare embriyolarının in vitro gelişiminde artan  $K^+$  konsantrasyonunun negatif etkili olduğunu ve embriyoların yüksek potasyuma çok duyarlı olduğunu bildirmektedirler.

Ovidukt sıvısında  $K^+$  ve  $Cl^-$  iyonlarının çok yüksek konsantrasyonda,  $Ca^{++}$  iyonunun düşük,  $Na^+$  ve  $Mg^+$  iyonunun ise serum düzeyiyle benzer olduğu belirtilmekle birlikte (1, 10, 18, 19, 55), ampulla ile isthmus sıvısında yüksek oranda  $K^+$  (23-25 mM) düşük oranda  $Ca^{++}$  (1,7-2,0 mM) bulunduğu; oviduktteki yüksek potasyumun kumulus hücrelerinin dejenerasyonu sonucu değil, olasılıkla ovidukt epitelinden kaynaklandığı belirtilmektedir (18).

Fraser (30), memeli genital kanalında bulunan yüksek orandaki (20-30 mM)  $K^+$ 'un spermatozoonların kapasitasyonunda, akrozom reaksiyonunda ve fertilizasyonda önemli rol oynadığını bildirirken, Borland ve ark. (18), in vivo şartlarda fertilizasyonun ve 1. bölünme aşamasının oviduktun yüksek potasyum içeren bölgesinde meydana geldiğini belirtmektedirler.

Roblero ve Riffo (71), fare embriyolarının in vitro gelişiminin düşük potasyuma göre yüksek potasyumda daha hızlı olduğunu,  $K^+$  konsantrasyonunun embriyonun farklı gelişim safhalarını eşit oranda etkilemediğini bildirmektedirler. Erken embriyo safhasının yüksek potasyuma daha duyarlı olduğunu belirten araştırmacı daha sonraki gelişim safhaları için yüksek potasyumun gerekliliğini de belirtmektedir. Araştırmacılar, yüksek potasyumun fare embriyolarının ilk bölünme safhasında esansiyel olmadığını, hem in vitro hem de in vivo koşullardaki hücre bölünmelerinin medyumun diğer iyonik kompozisyonlarıyla bağlantılı olduğunu bildirmektedirler.

#### **4.7. Embriyoların İn Vitro Kültüründe Ovidukt Hücrelerinin Kullanımı (Ko-kültür)**

Fertilizasyonun oviduktta meydana geldiği ve oviduktun embriyoları uterusa ilettiği bilinen bir gerçektir. Fertilizasyonu takiben çoğu türde, 8-16 hücreli safhaya uterusa ulaşmadan önce ovidukt içinde gelişmektedirler (35). Embriyo kültüründe problemlerin çoğunun, gelişimin ovidukt safhasına denk gelen dönemde meydana geldiği gözlemlenmekte ve bu sebeple oviduktun daha çok incelenmesi gerekmektedir (10, 73, 86).

Embriyolojik çalışmalar, oviduktun in vivo ve in vitro şartlarda, embriyo gelişimine olan katkısının türe özgü olmadığını göstermektedir (10, 44, 86). Örneğin Wiemer ve ark. (86), insan embriyolarının ko-kültüründe sığır uterus fibroblast ve sığır ovidukt hücrelerini kullandıklarını ve ovidukt epitel hücrelerinin embriyo gelişimini artırdığını bildirmektedirler.

Günümüzde birçok araştırmacı, ovidukt epitel hücreleriyle birlikte ko-kültürün embriyo gelişimini olumlu yönde etkilediğini bildirmektedir (14, 16, 31, 32, 57, 70, 89). Yeung ve ark. (89) ovidukt hücrelerinin kryoprotektan maddelerle dondurulabileceğini ve gerekli olduğunda tekrar kullanılabilirliğini belirtmektedirler.

Avery ve ark. (6) sığır embriyolarının B2 medyumunda ovidukt epitel hücreleri ile birlikte kültüre edildiğinde, ovidukt hücrelerinin medyumda bulunan glikoz oranını azaltarak, embriyolar için uygun bir ortam oluşturduğunu ve bloğun aşılmasını sağladığını belirtmektedirler.

Günümüzde birçok araştırmacı, ko-kültür çalışmalarında medyum seçiminin kritik olduğunu, medyumun embriyoların ve hücrelerin besin ihtiyaçlarını karşılaması gerektiğini bildirmektedir (11, 57).

#### **4.8. Embriyoların Gelişim Kontrolları**

Araştırmacılar büyüme olmaksızın oluşan hücre bölünmesine "Cleavage" adını verdiklerini, bölünme sonucu oluşan iki yeni hücreden birinin diğerinden büyük olduğunu, ilk bölünme ve onu takip eden hücrelere "Blastomer" adı verildiğini bildirmektedirler (24, 66).

Demir (24), hücre bölünmelerinin aynı düzen ve ahenk içinde 2, 4, 8, 16, 32 ve 64 hücre şeklinde devam ettiğini bildirirken, Özkoca (66), 3, 5, 6, 7 hücreli dönemlerin bulunabileceğini, 16-32 hücreli dönemde hücrelerin sıkışık halde zona pellusida içerisinde bulunduğunu ve embriyonun bu haline "Morula" adı verildiğini belirtmektedir.

Araştırmacılar 32 hücreli dönemden sonra hücreler arasındaki boşluklara sıvı toplandığını, böylece embriyoda "Blastosel" adı verilen bir boşluk olduğunu ve bu dönemdeki embriyoya "Blastosist" adı verildiğini bildirmektedirler (24, 48, 66). Bu aşamadan sonra blastosist şişer "Expanded Blastosist" adını alır. Fare embriyosunun fertilizasyondan sonraki 2-2.5 günde 8-16 blastomerli safhada yoğunlaşmaya başladığı, 2.5'uncu günde morulaya, 3,5 günde blastosiste geliştiğini ve daha sonra 3.5-4 gün arasında hücrelerin zona pellusidayı yırtarak dışarı çıktığı ve bu olaya "Hatching" denildiği belirtilmektedir (33, 48).

In vitro ortamda fare embriyosunun DNA polimeraz aktivitesinin düştüğü, bu sebeple embriyonun cleavage döneminde in vivo ortama göre en az iki saatlik bir gecikmeyle bölündüğü, blastosist aşamasında bu gecikmenin yaklaşık bir güne ulaştığı bildirilmektedir (48).

Araştırıcılar, embriyoların sağlık durumlarının, zona pellusidanın yapısına, blastomer sitoplazmasının homojen yapısına, vakuolleşme ve dejeneratif değişikliklere, blastomerlerin eşit büyüklükte olmasına ve zona içini doldurma durumlarına bakılarak anlaşılabilceğini belirtmektedirler (33, 67).





## 5. GEREÇ ve YÖNTEM

### 5.1. Çalışmada Kullanılan Farelerin Üretilmesi ve Bakımı

Çalışmada, fare embriyolarının in vitro gelişmesinde oluşan 2 blastomerli hücre bloğunun sadece saf ırklarda görülmesi nedeniyle (21), hayvan materyali olarak saf ırk olan BALB/C ırkı 74 adet dişi ve 16 adet erkek fare kullanıldı. Fare barınağında ışık programı özel bir zaman ayarlayıcı ile 10 saat karanlık, 14 saat aydınlık olacak şekilde düzenlendi. Aydınlık periyodu sabah 07:00'de başlayıp akşam 21:00'de sona erecek şekilde ayarlandı. Barınağın ısı 21-22 °C'ye ayarlandı.

Farelerin beslenmesi, 24 saat boyunca önlerinde yeterli miktarda su ve yem bulunacak şekilde ad libitum olarak uygulandı, ayrıca haftada bir olmak üzere sulukların ağızlıkları ve 15 günde bir olmak üzere su şişeleri sterilize edildi. Barınağın havalandırması ise dış ortam sıcaklığına bağlı olarak 15 dk ve 30 dk'da bir zaman ayarlayıcı ile programlanarak gerçekleştirildi. Farelerin altlıkları haftada iki kez olmak üzere değiştirildi ve altlık olarak otoklavlama ile sterilizasyonu sağlanmış iri rende talaşı kullanıldı.

Damızlık erkekler her kafeste birer adet olmak üzere ayrı ayrı tutulmasına karşın, dişi damızlıklar her bir kafeste beşer adet olacak şekilde barındırıldılar. Damızlık seçimi yapılırken, farelerin 6-8 haftalık yaş grubundan olmasına dikkat edildi. Dişiler damızlık erkeklerin bulunduğu kafeslere 1-1, 1-2 oranında konularak çiftleştirildi ve 18 ile 24. saatler arasında dişi farelerde vaginal plağın oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Vajinal plak görülen fareler doğum kafeslerine alındılar. Doğum sonrası yavru fareler 3 hafta süreyle doğum kafeslerinde beslendiler, 3. hafta sonunda ise yavrularda cinsiyet ayırımı yapılarak, ayrı kafeslere konuldular.

Üretilen bu farelerden dişi olanlar 5-8 haftalık yaşa; erkek fareler ise 8 haftalık yaşa eriştikten sonra in vitro fertilizasyon çalışmalarında kullanıldılar.

## **5.2. Süperovulasyon için Gonadotropinlerin Hazırlanması**

Çalışmada, dişi farelerden oosit sayısını artırmak ve senkronizasyonu sağlamak amacıyla, PMSG hormonu uygulandı. Ovulasyonları uyarmak için de, daha çok LH karakterli olan ve ovaryumdaki interstisyel hücreleri stimüle ederek ovulasyonun oluşmasını sağlayan hCG hormonu kullanıldı.

### **5.2.1. PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotropin) Hormonunun Hazırlanışı ve Uygulanması**

Süperovulasyon amacıyla, ticari olarak Synchroject (Vetimex) adıyla satılan, 600 ve 18000 I.U'lık liyofilize PMSG hormonu kullanıldı. Flakon içindeki liyofilize edilmiş kuru madde tartılarak herbirinde 50 I.U olacak şekilde porsiyonlanarak eppendorf tüpleri içerisine kondu. Eppendorf tüpleri 4-8 °C'deki buzdolabında saklandı

Eppendorf tüplerine porsiyonlanan PMSG kullanılacağı zaman 1 mL %0,9'luk NaCl ile sulandırılarak 1 mL'de 50 I.U PMSG hormonu gelecek şekilde hazırlandı. Her bir dişi fareye, follikül gelişimlerini uyarmak amacıyla, içinde 5 I.U PMSG bulunan 0.1 mL hormon solusyonu, intraperitoneal olarak enjekte edildi.

### **5.2.2. hCG (Human Chorionic Gonadotropin) Hormonunun Hazırlanışı ve Uygulanması**

Çalışmada, mililitresinde 500 I.U, 1500 I.U ve 5000 I.U hCG hormonu olmak üzere 3 ayrı formu bulunan Pregnyl (Organon) hormon preparatı kullanıldı. Bunlardan hazırlanış kolaylığı açısından 500 I.U hCG preparatı tercih edildi. İçerisinde 500 I.U hCG hormonu bulunan preparat önce 1 mL %0,9 NaCl içeren solusyon ile sulandırıldı. Daha sonra, hazırlanan bu solusyondan, 100'er µL alınarak eppendorf tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 900 µL %0,9'luk NaCl

eklenerek karıştırıldı. Böylece hazırlanan solusyonun mililitresinde 50 I.U hCG hormonu bulunması sağlandı. Hazırlanan bu hormon solusyonları, -20 °C'deki derin dondurucuda, 3 ay boyunca kullanılmak üzere saklanabilmesine rağmen, bu çalışmada, oosit elde edilmesinde daha iyi sonuç vermesinden dolayı, hormonun taze olarak kullanılması tercih edildi.

Dişi farelere PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra 5 I.U hCG içeren 0,1 mL hacimdeki hormon solusyonu intraperitoneal yolla uygulandı.

### **5.3. Uygulamalarda Kullanılan Medyumlar**

Hücre kazanılması ve organ diseksiyonu gibi dış ortamda gerçekleştirilen maniplasyonlarda pH stabilitesini sağlamadaki güvenilirliğinden dolayı M2 yıkama medyumu tercih edildi. Kapasitasyon ve fertilizasyon medyumu olarak, başarılı sonuçlar elde edilen TYH (Toyoda Yokojama and Hoshi) medyumu kullanıldı. Ayrıca kültür medyumu olarak da fare embriyolarının gelişimi için uygun mineral kompozisyonunu içeren Whitten's kültür medyumu kullanıldı.

#### **5.3.1. İnkübatör Dışı Maniplasyonlarda Kullanılan Medyumlar**

Organların diseksiyonu, oositlerin kazanılması ve yıkanması gibi inkübatör dışında uzun süreli maniplasyonlarda, pH stabilitesini sağlamadaki güvenilirliğinden dolayı M2 yıkama medyumu tercih edildi (35).

M2 medyumunun hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddelerin bileşimi ve hazırlanışı aşağıda belirtildiği gibidir (28, 35).

**M2 Yıkama Medyumu**

<b><u>İçerik</u></b>	<b><u>g/100 mL</u></b>
NaCl	0.5533
KCl	0.0356
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.0252
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0162
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.0293
NaHCO <sub>3</sub>	0.0349
HEPES	0.4969
Na Lactate	0.2610
Na pyruvate	0.0036
Glucose	0.1000
Bovine Serum Albumin (BSA)	0.4000
Penicillin G.Potassium Salt	0.0060
Streptomycin Sulfate	0.0050
Phenol Red	0.0010
Milli Q Water	qsp 100 mL

- I- 0.0252 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 20 mL suda eritildi
- II- 0.0293 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub> 20 mL suda eritildi.
- III- Na Lactate ve BSA dışındaki tüm kimyasal maddeler formülde belirtildiği gibi sırayla ayrı ayrı tartılarak (NaCl: 0.5533 g; KCl: 0.0356 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.0162 g; NaHCO<sub>3</sub>: 0,0349 g, HEPES: 0.4969 g, Na pyruvate: 0.0036 g, Glucose: 0.100 g, Phenol Red: 0.001 g) 45 mL suda eritildi.

- IV- 0.006 g Penisilin ve 0.005 g Streptomisin ayrı ayrı tartılarak 10 mL suda eritildi.
- V- I., II. ve III. Maddedeki kimyasallar sırasıyla üstüste eklendi ve magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı.
- VI- 332 µL %60'lık Na Lactate bu karışıma eklendi ve karışım 100 mL ye tamamlandı.
- VII- Son aşamada 0.400 g BSA tartılarak karışıma eklendi ve hazırlanan medyum BSA'nın erimesi amacıyla 37°C'deki inkübatöre kondu.
- VIII- Karışımın pH'sı ölçüldü. Gerektiğinde pH'sının 7.2-7.4 sınırlarına getirilmesi için 0.1 N HCl veya 0.1 N NaOH kullanıldı.
- IX- pH'sı ayarlanan medyumun ozmotik basıncı ölçüldü. Medyumun ozmotik basıncının 285-287 mOsmol aralığında olup olmadığı kontrol edildi.
- X- Medyum 0.22 µ millipor filtreden geçirilerek steril cam şişelere filtre edildi.
- XI- Medyum + 4 °C'lik buzdolabında bir hafta boyunca muhafaza edilerek kullanıldı.

### **5.3.2. Kapasitasyon ve Fertilizasyon (TYH) Medyumunun Hazırlanması**

Kapasitasyon ve fertilizasyon aşamasında Toyoda'nun ortaya koyduğu TYH medyumunu kullanıldı. TYH medyumunun formülü ve hazırlanış şekli aşağıdaki gibidir (22, 50, 78).

## TYH Kapasitasyon Medyumu

<u>İçerik</u>	<u>g/100 mL</u>
<i>NaCl</i>	0.6976
<i>KCl</i>	0.0356
<i>CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub> O</i>	0.0251
<i>KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub></i>	0.0162
<i>MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub> O</i>	0.0293
<i>NaHCO<sub>3</sub></i>	0.2106
<i>Na pyruvate</i>	0.1100
<i>Glucose</i>	0.1000
<i>Bovine Serum Albumin (BSA)</i>	0.4000
<i>Penicillin G.Potassium Salt</i>	0.0075
<i>Streptomycin Sulfate</i>	0.0050
<i>Phenol Red</i>	0.0010
<i>Milli Q Water</i>	qsp 100 mL

Normal ve distile su içinde bulunan bazı maddelerin embriyolar üzerinde toksik etki göstermesi nedeniyle çalışmada Milli Q arıtma sisteminden geçirilmiş steril su kullanıldı.

- I- 0.0251 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 20 mL suda eritildi
- II- 0.0293 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 20 mL suda eritildi.
- III- BSA dışındaki tüm kimyasal maddeler formülde belirtildiği gibi sırayla ayrı ayrı tartılarak (NaCl: 0.6976 g; KCl: 0.0356 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0.0162 g; NaHCO<sub>3</sub>: 0,2106 g, Na pyruvate: 0.011 g, Glucose: 0.100 g, Phenol Red: 0.001 g) 45 mL suda eritildi.

- IV- 0.0075 g Penisilin ve 0.005 g Streptomisin ayrı ayrı tartılarak 10 mL suda eritildi.
- V- I., II. ve III. Maddedeki kimyasallar sırasıyla üstüste eklendi ve magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı.
- VI- Son aşamada 0.400 g BSA tartılarak karışıma eklendi ve hazırlanan medyum BSA'nın erimesi amacıyla 37°C'deki inkübatöre kondu.
- VII- Karışımın pH'sı ölçüldü. Gerekliğinde pH'sının 7.2-7.4 sınırlarına getirilmesi için 0.1 N HCl veya 0.1 N NaOH kullanıldı.
- VIII- pH'sı ayarlanan medyumun ozmotik basıncı ölçüldü. Medyumun ozmotik basıncının 280-300 mOsmol aralığında olup olmadığı kontrol edildi.
- IX- Medyum 0.22 µ millipor filtreden geçirilerek steril cam şişelere filtre edildi.
- X- Medyum + 4 °C'lik buzdolabında bir hafta boyunca muhafaza edilerek kullanıldı.

### **5.3.3. İn Vitro Kültür Medyumlarının Hazırlanması**

İn vitro fertilize edilmiş fare embriyolarının kültüründe, farklı potasyum oranlarının etkisini belirlemek amacıyla, Whitten's kültür medyumunun yapısındaki  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  miktarları değiştirilerek 3 farklı kültür medyumunu oluşturuldu (35).

### 5.3.3.1. Whitten's Medyumunda Potasyum (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) Oranlarının Ayarlanması ve Medyumların Hazırlanışı

Çalışmada esas olarak, potasyum iyonunun fare embriyolarının gelişimine etkisi araştırıldığından, farklı oranlarda (düşük, normal, yüksek) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren 3 adet Whitten's kültür medyumları hazırlandı.

Potasyum fosfatın dozlanması, formülde belirtilen ve kontrol grubunda (normal) kullanılan KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oranının değiştirilmesi ile yapıldı. Kontrol grubunda yer alan (0.162 g/L) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oranı yarıya indirilerek (0.081 g/L) düşük potasyum grubu ve yine kontrol grubunda bulunan (0.162 g/L) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> oranı iki katına (0.324 g/L) çıkartılarak yüksek potasyum grubu oluşturuldu.

#### Whitten's Kültür Medyumları

<u>İçerik</u>	<u>Kontrol</u> <u>g/100 mL</u>	<u>Düşük K<sup>+</sup></u> <u>g/100 mL</u>	<u>Yüksek K<sup>+</sup></u> <u>g/100 mL</u>
NaCl	0.5140	0.5140	0.5140
KCl	0.0356	0.0356	0.0356
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0162	0.0081	0.0324
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.0294	0.0294	0.0294
NaHCO <sub>3</sub>	0.1900	0.1900	0.1900
Glucose	0.1000	0.1000	0.1000
Ca-Lactate	0.0527	0.0527	0.0527
Na-Lactate	0.4444	0.4444	0.4444
Na-pyruvate	0.0025	0.0025	0.0025
Gentamycin	0.100 mL	0.100 mL	0.100 mL
Phenol Red	0.0010	0.0010	0.0010
Bovine Serum Albumin	0.3000	0.3000	0.3000
Milli Q Water	qsp 100 mL	100 mL	100 mL



- I- 0.0294 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  20 mL suda eritildi
- II- 0.0527 g Ca-Lactate 20 mL suda eritildi
- III- Gentamisin, BSA ve Na-Laktat dışındaki tüm maddeler (NaCl: 0.514 g, KCl: 0.0356 g, düşük  $KH_2PO_4$ : (0.0081 g), normal  $KH_2PO_4$  (0.0162 g), yüksek  $KH_2PO_4$  (0.0324 g),  $NaHCO_3$ : 0.190 g, Glucose: 0.100 g, Na-pyruvate: 0.0025 g, Phenol Red: 0.001 g) sırasıyla tartılarak 50 mL suda eritildi.
- IV- Sırasıyla I., III. ve II. maddelerdeki kimyasallar üstüste eklendi ve magnetik karıştırıcı ile karıştırıldı.
- V- %60'lık Sodyum-Laktat şurubundan 332  $\mu$ l alınarak bu karışıma eklendi.
- VI- 0.1 mL Gentamisin (50 mg/mL) bu karışıma eklendi ve karışım 100 mL ye tamamlandı.
- VII- Son aşamada 0.300 g BSA tartılarak karışıma eklendi ve hazırlanan medyum BSA'nın erimesi amacıyla 37°C deki inkübatöre kondu.
- VIII- Karışımın pH'sı ile ölçüldü. Gerektiğinde pH'sının 7.2-7.4 sınırlarına getirilmesi için 0.1 N HCl veya 0.1 N NaOH kullanıldı.
- IX- pH'sı ayarlanan medyumun ozmotik basıncı ölçüldü. Medyumun ozmotik basıncının 275-285 mOsmol aralığında olup olmadığı kontrol edildi.
- X- Medyum 0.22  $\mu$ m por çaplı filtreden geçirilerek steril cam şişelere filtre edildi.

XI- Medyum + 4 °C'lik buzdolabında bir hafta boyunca muhafaza edilerek kullanıldı.

## **5.4. Dropların Hazırlanması**

### **5.4.1. İn Vitro Kapasitasyon Droplarının Hazırlanması**

Çalışmada erkek farelerden elde edilen spermatozoonların in vitro kapasitasyonu için 15 x 35 mm çapındaki (Grainer) tek kullanımlık steril, plastik hücre kültür petripleri kullanıldı.

Kapasitasyon ve pasajlama için, iki adet petri kutusunun ortasına, 600 µl TYH medyumunu konuldu. Medyumun üzeri, kontaminasyonları engellemek ve buharlaşmayı önlemek amacıyla, embriyo kültüründe test edilmiş steril mineral yağ (Sigma) ile örtüldü. Hazırlanan bu petri, operasyon gününde spermanın elde edilmesinden yaklaşık 1-1.5 saat önce %5 CO<sub>2</sub> %5 O<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> gazı içeren jara yerleştirildi. Petriplerden birisi in vitro kapasitasyon için kullanılırken diğeri kauda epididimislerin son kez pasajlanmasında kullanıldı.

### **5.4.2. İn Vitro Fertilizasyon Droplarının Hazırlanması**

Oositlerin fertilizasyonu için yine 15 x 35 mm ebatlarındaki doku kültür petripleri tercih edildi. Petri kutusunun içerisine, 5 adet 25 µl'lik TYH medyumunu damlası konuldu ve damlaların üzerleri mineral yağ ile örtülerek fertilizasyondan 2-3 saat önce %5 CO<sub>2</sub> %5 O<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> gazı içeren jara yerleştirildiler.

Oositlerin, fertilizasyon medyumuna konulmadan önce pasajlanmaları amacıyla, bir başka petride 50 µL TYH medyumunu içeren 5 adet drop oluşturularak üzeri mineral yağ ile kapatıldı ve aynı jara yerleştirildi.

XI- Medyum + 4 °C'lik buzdolabında bir hafta boyunca muhafaza edilerek kullanıldı.

## **5.4. Dropların Hazırlanması**

### **5 4.1. İn Vitro Kapasitasyon Droplarının Hazırlanması**

Çalışmada erkek farelerden elde edilen spermanın in vitro kapasitasyonu için 15 x 35 mm çapındaki (Grainer) tek kullanımlık steril, plastik hücre kültür petripleri kullanıldı.

Kapasitasyon ve pasajlama için, iki adet petri kutusunun ortasına, 600 µl TYH medyumunu konuldu. Medyumun üzeri, kontaminasyonları engellemek ve buharlaşmayı önlemek amacıyla, embriyo kültüründe test edilmiş steril mineral yağ (Sigma) ile örtüldü. Hazırlanan bu petri, operasyon gününde spermanın elde edilmesinden yaklaşık 1-1.5 saat önce %5 CO<sub>2</sub> %5 O<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> gazı içeren jara yerleştirildi. Petrilerden birisi in vitro kapasitasyon için kullanılırken diğeri kauda epididimislerin son kez pasajlanmasında kullanıldı.

### **5.4.2. İn Vitro Fertilizasyon Droplarının Hazırlanması**

Oositlerin fertilizasyonu için yine 15 x 35 mm ebatlarındaki doku kültür petripleri tercih edildi. Petri kutusunun içerisine, 5 adet 25 µl'lik TYH medyumunu damlası konuldu ve damlaların üzerleri mineral yağ ile örtülerek fertilizasyondan 2-3 saat önce %5 CO<sub>2</sub> %5 O<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> gazı içeren jara yerleştirildiler.

Oositlerin, fertilizasyon medyumuna konulmadan önce pasajlanmaları amacıyla, bir başka petride 50 µL TYH medyumunu içeren 5 adet drop oluşturularak üzeri mineral yağ ile kapatıldı ve aynı jara yerleştirildi.

### **5.4.3. İn Vitro Kültür ve Ko-kültür Droplarının Hazırlanması**

Embriyoların kültürlerinde, tek kullanımlık steril 15 x 35 mm ebatlarındaki (Grainer) doku kültür petripleri tercih edildi. Çevre şartlarının etkisini gruplar üzerinde eşitlemek amacıyla, 3 farklı potasyum oranı içeren ko-kültür grupları bir petriye, normal kültür grupları diğer bir petriye gelecek şekilde yerleştirildi. Bunun için, 2 adet 15 x 35 mm ebatlarındaki petri kutusu, 3 eşit bölüme ayrıldı ve her bir bölüme, farklı oranlarda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren Whitten's kültür medyumundan 25  $\mu\text{l}$ 'lik damlalar ikişer adet olmak üzere yerleştirildi. Dropların üzerleri mineral yağ ile kaplandı.

Fertilize olan oositlerin ve ovidukt epitel hücrelerinin, kültür medyumlarına aktarılmadan önce pasajlanmaları amacıyla, 2 adet petri kutusu 3'er eşit parçaya bölündü ve her bir bölüme farklı oranlarda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren 50  $\mu\text{l}$ 'lik damlalar konuldu. Damlaların üzerleri mineral yağ ile örtüldü.

Kültür ve pasajlama petripleri gaz alışverişlerinin sağlanması amacıyla oositlerin ve ovidukt hücrelerinin kültüre konulmalarından 6 saat önce 37°C'deki %5  $\text{O}_2$  %5  $\text{CO}_2$  %90  $\text{N}_2$  gaz karışımı jar içine yerleştirildiler.

## **5.5. Fertilizasyon ve İn Vitro Kültür için Hücre Elde Edilmesi**

### **5.5.1. Spermanın Elde Edilmesi**

Memeli spermatozoonları, ejakulasyon sonrasında oositi dölleyebilecek kabiliyette değildir ve dişi genital kanalında kapasite olmaları, olgunlaşmaları gerekmektedir. Kapasitasyon, in vivo koşullarda olduğu kadar, in vitro koşullarda da gereklidir (40, 48). Bu yüzden çalışmada, farelerden oosit elde edilmeden önce erkek farelerin kauda epididimislerinden elde edilen sperma kapasitasyona tabi tutuldu. Bu işlem yapılırken aşağıdaki prosedür izlendi.

Oositlerin elde edilifinden 2 saat 6nce 2 adet erkek fare servikal dislokasyon y6ntemi ile sakrifiye edildikten sonra, temiz bir kurutma kağıdı 6zerine alındı ve abdominal b6lgeleri %70 lik alkol ile dezenfekte edildi. Abdominal b6lgeleri kurulananan fareler, tek tek batın b6lgelerinden d6z bir makas yardımıyla açıldı ve karın boşluğuna girildi.

Farelerin testisleri g6z pensi ile tutulup, kaput epididimisten kauda epididimise kadar olan b6lge, evre yağ dokularından arındırılarak diseke edildi. Daha sonra kauda epididimisler zarar verilmeden korpus epididimis ve testis dokusundan ayrıldılar. Elde edilen her bir kauda epididimis, evre dokulardan temizlemek amacıyla, 37°C ısıdaki M2 medyumuna aktarıldı. Bu aşamadan sonra epididimisler, kan ve doku artıklarından arındırmak amacıyla M2 medyumunda 3'er kez yıkandılar. Daha sonra epididimisler, M2 medyumundan arındırmak amacıyla da 6nceden hazırlanmış olan TYH drobu içinde yıkandılar. Yıkanan epididimisler, diğer petrideki 600 µl'lik TYH medyumunu içerisine, iki adet g6z pensi yardımıyla sağıldı. Sağılan bu sperma, kapasitasyon için 1.5-2 saat s6reyle 37°C de %5 O<sub>2</sub> %5 CO<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> içeren anaerobik jara yerleştirildiler.

### **5.5.2. Verici Farelerden Oosit Elde Edilmesi**

Oositler, hCG enjeksiyonundan sonra 12. saatte toplanılmaya başlandı. Fareler, servikal dislokasyon y6ntemi ile sakrifiye edildikten sonra, temiz bir kurutma kağıdı 6zerine alındı ve abdominal b6lgeleri %70'lik alkol ile dezenfekte edildi. Abdominal b6lgeleri kurulananan fareler, tek tek, batın b6lgelerinden d6z bir makas yardımıyla açıldı ve karın boşluklarına girildi.

Bağırsaklar, bir makas yardımı ile karın boşluğunun 6st tarafına sıyrıldıktan sonra, uterusun bifurkasyon b6lgesinden başlayarak, kornu uterilere bağlı ovidukt, ovaryum ve etrafındaki yağ tabakaları diseke edildi. Ovidukt g6z pensi ile tutularak, uterotubal bağlantı noktasından ve ovidukt ile ovaryum arasından kesilerek ayrıldı.

Elde edilen oviduktlar, içinde 37°C'deki 2-3 mL M2 medyumunu bulunan petrilere aktarıldılar. Oositler ampullanın punksiyonu ile elde edileceği için, oviduktun diseksiyonu sırasında, ampullaya herhangi bir hasar verilmemesine özen gösterildi.

Her bir ovidukt, içinde 0.5 mL M2 medyumunu bulunan steril bir saat camı içine konuldu. Stereo mikroskop altında, oviduktun ampullası bulundu ve oositlerin yoğun olarak görüldüğü bölgeden insülin iğnesi yardımı ile yırtılarak, oositlerin dışarı çıkması sağlandı. Oositler steril bir pastör pipeti ile yine içinde 2 mL M2 medyumunu bulunan petriye aktarıldılar. Toplanan oositler, yeni çekilmiş steril pastör pipeti ile, önceden hazırlanmış ve üzeri mineral yağ ile örtülmüş 50 µL'lik M2 medyum damlalarına aktarıldılar. Oositler M2'de 2 kez pasajlandıktan sonra, fertilizasyon için uygun görülenler seçilerek 50 µL'lik TYH medyumunu içeren petrilere tekrar 2'şer kez pasajlandılar. Böylelikle oositler M2 medyumundan arındırılmış oldu.

Daha sonra, fertilizasyon için, oositler, herbir damlaya 10-30 adet gelecek şekilde 25 µL'lik TYH medyumunu damlalarına yerleştirilerek 37°C'deki %5 O<sub>2</sub> %5 CO<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> içeren anaerobik jara kaldırıldılar.

### **5.5.3. Ovidukt Hücrelerinin Kazanılması ve Ko-kültürün Hazırlanması**

Ovidukt hücreleri, hCG enjeksiyonundan sonraki 12. saatte M2 medyumunu ile oviduktun ve ampullanın yıkanmasıyla elde edildi. Oositler elde edildikten hemen sonra, oviduktlar (hücre elde etmek amacıyla) içinde 2-3 mL M2 medyumunu bulunan başka bir petriye aktarıldılar. Her bir ovidukt içinde 0.5 mL M2 medyumunu bulunan steril saat camına alındı. Göz pensi ile infundibulum bölgesinden yakalanan ovidukt, infundibulumundan insülin iğnesi ile girilerek, 0.5 mL M2 medyumunu ile yıkandı. Böylece, oviduktun dışına çıkan hücreler, yeni çekilmiş bir pastör pipeti ile önceden hazırlanmış 50 µL'lik M2 droplarına

aktarılarak 2-3 defa pasajlandılar. Pasajlanan hücreler, değerlendirilmek üzere inverted mikroskopta incelemeye alındılar.

Inverted mikroskopta sağlıklı görülen, silyumları hareketli olan ovidukt hücreleri, üç farklı  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren daha önceden hazırlanarak, %5  $\text{O}_2$  %5  $\text{CO}_2$  ve %90  $\text{N}_2$  ortamda inkubasyona bırakılan, 50  $\mu\text{L}$ 'lik Whitten's kültür medyumunda, ikişer kez pasajlandılar.

Pasajlanan ovidukt hücreleri, düşük, normal ve yüksek oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren 25  $\mu\text{L}$ 'lik Whitten's medyum droplarına, her bir dropta 7-10 adet ovidukt hücre kitlesi olacak şekilde yerleştirildiler. Bu işlemden sonra hücreler, 6-8 saat süreyle  $37^\circ\text{C}$ 'lik etüve konularak gelişmeye bırakıldılar.

## 5.6. In Vitro Fertilizasyon

Fertilizasyon aşamasında, kapasite olan ve motilitesi kontrol edilerek final konsantrasyonu mililitrede  $2 \times 10^6$  spermatozoon gelecek şekilde hesaplanan sperma, 25  $\mu\text{L}$ 'lik TYH medyumunu içeren ve içinde 10-30 adet oosit bulunan droplara eklendi.

Sperma konsantrasyonunun hesaplanmasında Thoma Lamı yöntemi kullanıldı. Kapasitasyon damlasından 5  $\mu\text{L}$  sperma alınarak üzerine 95  $\mu\text{L}$  su ilave edildi. Böylelikle sperma 1:20 oranında sulandırılmış oldu. Sperma eppendorf tüpünde karıştırıldıktan sonra Thoma lamında sayıldı.

Oositlerin üzerine sperma eklendikten sonra 4-6 saat süreyle %5  $\text{O}_2$  %5  $\text{CO}_2$  ve %90  $\text{N}_2$  içeren jarda  $37^\circ\text{C}$ 'lik etüvde fertilizasyona bırakıldı.

Petriler etüve yerleştirilmeden önce invert mikroskopta spermanın hareketleri ve oositler kontrol edildi.

### 5.6.1. Embriyoların İn Vitro Kültürü

Dört-altı saat süreyle fertilizasyona bırakılan oositlerin, kumulus hücrelerinin dağılımı ve spermatozoonların motilitesi, inverted mikroskopta kontrol edildikten sonra, oositler, yeni çekilmiş steril pastör pipeti ile toplanarak pasajlanmak amacıyla 3 eşit gruba bölündüler ve içerisinde, düşük, normal, yüksek oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren, önceden hazırlanmış, üzerleri mineral yağ ile örtülü 50  $\mu\text{L}$ 'lik Whitten's medyum droplarına eşit olarak paylaştırıldılar. Burada 2 kez pasajlanan oositler/embriyolar TYH medyumundan gelen  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  katkılarından elimine edildiler.

Daha sonra düşük, normal, yüksek oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren her bir gruptaki oosit sayısı iki eşit gruba ayrılarak, ko-kültürlü 3 gruba ve ko-kültürsüz 3 gruba paylaştırıldılar. Böylelikle fertilize edilen oositlerin kültür droplarına yerleştirilmesiyle altı grup oluşturuldu. Bu aşamadan sonra oositler / embriyolar 96 saat süreyle kültüre edildi. Embriyoların gelişimleri 24, 48, 72 ve 96. saatlerde kontrol edilerek kaydedildi. Çalışmanın istatistiksel hesaplamalarında  $\chi^2$  testi ve t- testi kullanıldı (29).

## 5.7. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Cihazlar

### 5.7.1. Kullanılan Cihazlar

<u>Cihaz</u>	<u>Marka</u>	<u>Model</u>
CO <sub>2</sub> İnkübatörü	Dedeoğlu	MCO-17AI
CO <sub>2</sub> Tüpü	Habaş	VHAC-1196
Stereo-Mikroskop	Olympus	TL 2
Faz-Kontrast Mikroskop	Nikon	-
Inverted Mikroskop	Olympus	CK 2
Buzdolabı	Arçelik	4042T
Deep-Freeze	Philco	-
Distile su cihazı	Nüve	NS212
pH'metre	Schott-Mainz	CG710



Mikropipetler	Biohit-Proline	-
Sıcak Tabla	Elektromag	M22
Jar	Merck	Anearobik
Ozmometre Cihazı	Knauer	D-141-63
Magnetik Karıştırıcı	Cole Parmer	4803-02
Air Condition	Beko	LG
Hassas Terazi	Sartorius	BP211D
Sterilizator	Haraeus	-
Otoklav	Nüve	DT4080
Etüv	Nüve	EN-500
Sıcak Tabla	Mini Tüb	HT-200

### **Malzemeler**

### **Katalog No**

### **Firma**

Saat Camları	0.50 mm	Isolab
Lam	-	Marin
Lamel	-	Marin
Pasteur Pipetleri	PA.1.230	Isolab
Cam Şişeler	GL45	Schot
Cam petriler	-	Teknik Cam
Steril Cam Tüpler	-	Assistent
Steril Plastik Tüpler	188-2611	Grainer/Labortechnik
Eppendorf Tüpleri	617-301	Grainer/Labortechnik
Plastik Petriler (15x60mm)	628-102	Grainer/Labortechnik
Plastik petriler (15x35mm)	627-102	Grainer/Labortechnik
Mikropipet Ucu	739-265/686-290	Grainer/Labortechnik
Millipore Filtreler (0.22 µ)	GSWP 04700	Bedford-Millipor
Saatçi Pensi	-	Herbert
Göz Makası	-	Herbert
Enjektör	-	Hayat
İnsülin Enjektörü	-	Hayat

## 5.7.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada farelerin süperovulasyonunda, embriyoların elde edilmesinde, elde edilen embriyoların in vitro kültüründe aşağıda belirtilen kimyasal maddeler kullanıldı.

<u>Kimyasal Maddeler</u>	<u>Katalog No</u>	<u>Firma Adı</u>
Na-Lactate	L-4388	Sigma
Na-pyruvate	P-5280	Sigma
Ca-lactate	L.4388	Sigma
Bovine Serum Albumin	11930	Serva
NaCl	S-5886	Sigma
KCl	P-5405	Sigma
HCl	H-9892	Sigma
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	C-7902	Sigma
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	P-5655	Sigma
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	K-25119682	Sigma
NaOH	S-2770	Sigma
NaHCO <sub>3</sub>	S-7277	Sigma
Hepes	H-9136	Sigma
Glucose	G-7021	Sigma
Phenol Red	P-5530	Sigma
Gentamycin	Gentasol	Eczacıbaşı
Streptomycin Sulfate	05844	-
Penicillin-G Potassium Salt	P-4687	Sigma
Serum Fizyolojik	10 mL	Eczacıbaşı
Enjeksiyonluk Distile Su	10 mL	Eczacıbaşı
pH meter Buffer Solution	486451	Carlo Erba
HCG	Pregnyl	Organon
PMSG		Vetimex
Mineral oil	M-8410	Sigma

## 6. BULGULAR

Çalışmada farklı oranlarda, (düşük, yüksek, normal)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren Whitten's kültür medyumunda kültüre edilen fare embriyolarının gelişim safhaları ve her üç grubun, fare ovidukt hücreleri ile ko kültürü sonucundaki embriyo gelişim safhaları ve oranları 96 saat süreyle gözlemlendi.

### 6.1. Süperovulasyon Sonuçları

Süperovulasyon amacıyla, 8 kez tekrarlanan uygulamalarda toplam 74 adet BALB/C ırkı dişi fare kullanıldı. Süperovulasyon sonucunda, servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilen farelerin ampullarından, fertilize olabilecek kalitede olan oositler toplandı. Süperovulasyon sonucu 1191 adet oosit elde edilirken, bunlardan 1071 tanesi in vitro fertilizasyona tabi tutuldu (Tablo 1). Fertilizasyon amacıyla, sperma elde etmek için 16 adet BALB/C erişkin erkek fare kullanıldı.

*Tablo 1: Çalışmada kullanılan dişi ve erkek fareler ile elde edilen hücre sayısı*

Uygulama No	Kullanılan Dişi Sayısı	Kullanılan Erkek Sayısı	Elde Edilen Oosit Sayısı	In vitro Fert.Kul Oosit Sayısı
1	8	2	96	71
2	8	2	91	74
3	11	2	169	158
4	9	2	138	122
5	8	2	101	83
6	12	2	231	226
7	11	2	223	214
8	7	2	142	123
Toplam	74	16	1191	1071

## 6.2. İn Vitro Kültür Sonuçları

Materyal metot bölümünde bahsedildiği şekilde fertilize edilmiş oositler, in vitro kültür amacıyla seçilerek ayrıldılar. Fertilizasyon sonrası 1071 adet oosit/embriyo düşük  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.0081 g/ 100 mL), düşük  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve ko-kültür (0.0081 g/ 100 mL), normal  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.0162 g/ 100 mL), normal  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve ko-kültür (0.0162 g/ 100 mL), yüksek  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.0324 g/ 100 mL), yüksek  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve ko-kültür (0.0324 g/ 100 mL) içeren Whitten's kültür medyumundan oluşan 6 çalışma grubuna paylaştırılarak kültüre alındı.

Kültüre alınan embriyoların gelişim kontrolleri 24, 48, 72 ve 96. saatlerde olmak üzere inverted mikroskopta x 100- x 200 büyütmede yapıldı.

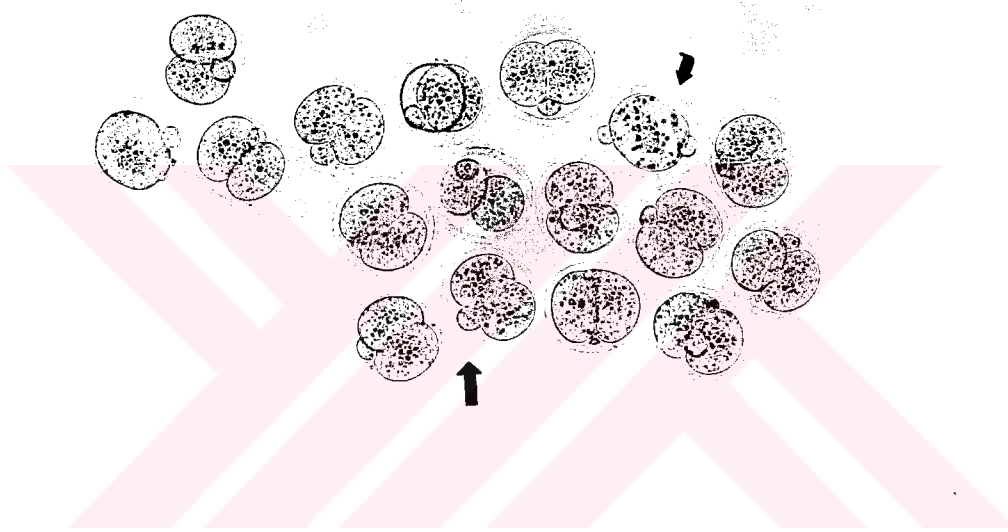
### 6.2.1. Kültür Sürelerine Göre Embriyolarda Gözlenen Gelişimler

#### 6.2.1.1 Embriyoların 24. Saatteki Gelişim Oranları

İlk 24 saatin bitiminde ko-kültür uygulanmayan düşük oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren gruptaki 175 adet oositin %48.00'i (84 adet) yarıklanma (cleavage) gösterdi, oositlerin %8.57'si ise (15 adet) dejenere oldu. Geriye kalan 76 adet (%43.42) hücrenin ise henüz bölünme göstermediği belirlendi (Şekil 1). Yarıklanma gösterenlerin tamamının 2 blastomerli aşamada olduğu belirlendi (Şekil 1). Ko-kültür kullanılan, düşük  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren medyumda kültüre edilen 179 oositin, %57.44'ü (103 adet) yarıklanma gösterdi. Geriye kalan 55 (%30.72) adet hücrenin ise henüz bölünme göstermediği saptandı. Oositlerin %11.73'ü (21 adet) ise dejenere oldu. Yarıklanma gösterenlerden %98.05'i (101 adet) 2 blastomerli aşamaya ulaşırken, %1.94'ü (2 adet) 4 blastomerli aşamaya gelişti (Tablo 2).

Normal oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren gruptaki 182 adet oositin %55.49'u (101 adet) yarıklanma gösterirken, %3.84'ü (7 adet) dejenere oldu. Diğer 74 adet (%40.65) hücrenin ise henüz bölünme göstermediği saptandı. Yarıklanma gösterenlerden ise %98.01'i (99 adet) 2 blastomerli aşamaya gelişirken,

%1.98'i (2 adet) 4 blastomerli safhaya ulaştı. Ko-kültür kullanılan normal oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren grupta ise 181 adet oositin %56.90'ı (103 adet) yarıklanma gösterirken, %4.97'si (9 adet) dejenere oldu. Geriye kalan 69 adet (%38.12) hücrenin ise henüz bölünme göstermediği belirlendi. Yarıklanma gösterenlerden ise %99.02'si (102 adet) 2 blastomerli aşamaya gelişirken %0.97 'si (1 adet) ise 4 blastomerli safhaya ulaştı (Tablo 2).



şekil 1 : In vitro kültürün 24. saatinde 2 blastomerli aşamaya gelişen embriyolar.

- ➔ Döllenmiş fakat henüz bölünmemiş, 2 kutup hücreli zigot
- ➔ iki blastomerli embriyo

Ko-kültürün kullanılmadığı yüksek oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren gruptaki 177 adet oositin %50.84' (90 adet) yarıklanma gösterirken, %12.42'si (22 adet) dejenere oldu. Diğer 65 adet (%36.72) hücrenin henüz bölünme göstermediği saptandı. Yarıklanma gösterenlerden ise %96.66'sı (87 adet) 2 blastomerli aşamaya gelişirken %3.33' (3 adet) 4 blastomerli safhaya ulaştı. Ko-kültürün kullanılan ve yüksek oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren gruptaki 178 adet oositin %53.37'si

(95 adet) yarıklanma gösterirken, %7.30'u (13 adet) dejenere oldu. Geriye kalan 70 adet (%39.32) hücrenin ise henüz bölünme göstermediği saptandı. Yarıklanma gösterenlerin tamamı 2 blastomerli aşamaya gelişti (Tablo 2)

**Tablo 2:** In vitro fertilizasyon sonrası kültüre edilen embriyoların 24. saat sonundaki gelişimleri ve gelişim aşamalarına göre dağılımları.

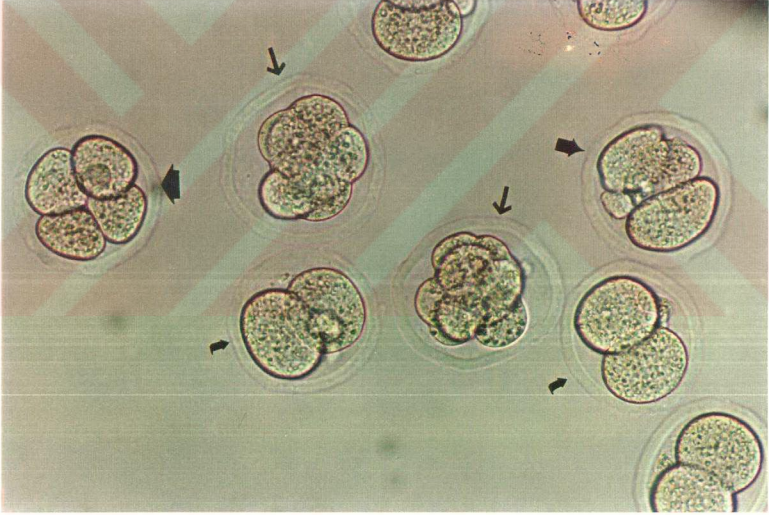
24. Saat	Top. Oosit	Bölün. Oosit	Toplam Cleav. (%)	Dejenere Oosit	Gelişen Embryolar (%)*			
					2 Bls	4 Bls	4-6 Bls	8 Bls
Düşük K <sup>+</sup>	175	76 (43.42)	84 (48.00)	15 (8.57)	84 (100.00)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Düşük K <sup>+</sup> ve Ko-kül	179	55 (30.72)	103 (57.44)	21 (11.73)	101 (98.05)	2 (1.94)	0 (0.0)	0 (0.0)
Normal K <sup>+</sup>	182	74 (40.65)	101 (55.49)	7 (3.84)	99 (98.01)	2 (1.98)	0 (0.0)	0 (0.0)
Normal K <sup>+</sup> ve Ko-kül	181	69 (38.12)	103 (56.90)	9 (4.97)	102 (99.02)	1 (0.97)	0 (0.0)	0 (0.0)
Yüksek K <sup>+</sup>	177	65 (36.72)	90 (50.84)	22 (12.42)	87 (96.66)	3 (3.33)	0 (0.0)	0 (0.0)
Yüksek K <sup>+</sup> ve Ko-kül	178	70 (39.32)	95 (53.37)	13 (7.30)	95 (100.00)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)

\*Yüzde oranlar bölünme gösteren embriyoların sayıları üzerinden hesaplandı  
Top.: Toplam; Bölün.: Bölünmeyen; Cleav.: Cleavage, Bls: Blastomer

### 6.2.1.2. Embriyoların 48. Saatteki Gelişim Oranları

Kırk sekizinci saatin sonunda, ko-kültür kullanılmayan düşük oranda KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren gruptaki 175 adet oositin %60.00'ü (105 adet) yarıklanma gösterdi. Oositlerin %12.00'si (21 adet) ise dejenere oldu. Geriye kalan 49 adet (%28.00) hücrenin ise henüz bölünme göstermediği belirlendi. Yarıklanma gösterenlerden %68.57'si (72 adet) 2-4 blastomerli aşamaya kadar gelişirken, %31.43'ü (33 adet) 4-6 blastomerli aşamaya ulaştı. Düşük oranda KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren ve ko-kültür kullanılan grupta 179 adet oositin %68.71'i (123 adet) yarıklanma gösterdi. Oositlerden %14.52'si (26 adet) dejenere oldu. Geriye kalan 30 adet (%16.76) hücrenin ise henüz bölünme göstermediği belirlendi. Yarıklanma gösterenlerden %60.97'si (75 adet) 2-4 blastomerli aşamaya gelişirken %30.08'i (37) 4-6 blastomerli aşamaya, %8.94'ü (11 adet) 8 blastomerli safhaya ulaştı (Tablo 3).

Bu periyodun sonunda, normal oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren ve ko-kültür kullanılmayan gruptaki 182 adet oositin %65.93'ü (120 adet) yarıklanma gösterirken, %5.49'u (10 adet) dejenere oldu. Diğer 52 adet (%28.58) hücrenin ise henüz bölünme göstermediği belirlendi. Yarıklanma gösteren embriyoların ise %50.83'ü (61 adet) 2-4 blastomerli aşamaya, %45.83'ü (55 adet) 4-6 blastomerli safhaya ve %3.33'ü (4 adet) 8 blastomerli aşamaya ulaştı. Normal oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve ko-kültür içeren gruptaki 181 adet oositin %67.95'i (123 adet) yarıklanma gösterirken, %9.94'ü (18 adet) dejenere oldu. Geriye kalan 40 adet (%22.09) hücrenin ise yine bölünme göstermediği belirlendi. Yarıklanma gösterenlerden %68.29'u (84 adet) ise 2-4 blastomerli aşamaya gelişirken %21.95'i (27 adet) ise 4-6 blastomerli, %8.94'ü (11 adet) 8 blastomerli, %0.81'i (1 adet) 16 blastomerli aşamaya ulaştı (Tablo 3).



Şekil 2: İn vitro kültürün 48. saatinde gelişmiş embriyolar.

➡ 2 blastomerli;      ➡ 3 blastomerli embriyo;      ◆ 4 blastomerli embriyo;  
➡ 8 blastomerli aşamadaki kompaktlaşmış embriyolar

Yüksek oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren gruptaki 177 adet oositin %61.58'i (109 adet) yarıklanma gösterirken, %14.12'si (25 adet) dejenere oldu. Geriye kalan 43 adet (%24.30) hücrenin ise bölünme göstermediği belirlendi.

Yarıklanma gösterenlerin %68.80'i (75 adet) 2-4 blastomerli aşamaya gelişirken (Şekil 2), %28.44'ü (31 adet) 4-6 blastomerli, %2.75'i (3 adet) ise 8 blastomerli (Şekil 2) aşamaya ulaştı. Yüksek oranda  $KH_2PO_4$  ve ko-kültür içeren gruptaki 178 adet oositin %62.35'i (111 adet) yarıklanma gösterirken, %12.35'i (22 adet) dejenere oldu. Diğer 45 adet (%25.28) hücrenin ise bölünme göstermediği saptandı. Yarıklanma gösterenlerin %63.96'sı (71 adet) 2-4 blastomerli, %31.53'ü (35 adet) 4-6 blastomerli, %4.50'si (5 adet) ise 8 blastomerli safhaya gelişti (Tablo 3).

**Tablo 3:** İn vitro fertilizasyon sonrası, kültüre edilen embriyoların 48. saat sonundaki gelişimleri ve gelişim aşamalarına göre dağılımları.

48. Saat	Top. Oosit	Bölün. Oosit	Toplam Cleav (%)	Dejenere Oosit	Gelişen Embriyolar (%)*			
					2-4 Bls	4-6 Bls	8 Bls	16 Bls
Düşük K <sup>+</sup>	175	49 (28.00) <sup>a</sup>	105 (60.00) <sup>a</sup>	21 (12.00) <sup>a</sup>	72 (68.57) <sup>a</sup>	33 (31.43) <sup>b</sup>	0 (0.0) <sup>b</sup>	0 (0.0) <sup>a</sup>
Düşük K <sup>+</sup> ve Ko-kül	179	30 (16.76) <sup>a</sup>	123 (68.71) <sup>a</sup>	26 (14.52) <sup>a</sup>	75 (60.97) <sup>a</sup>	37 (30.08) <sup>b</sup>	11 (8.94) <sup>a</sup>	0 (0.0) <sup>a</sup>
Normal K <sup>+</sup>	182	52 (28.58) <sup>a</sup>	120 (65.93) <sup>a</sup>	10 (5.49) <sup>a</sup>	61 (50.83) <sup>a</sup>	55 (45.83) <sup>a</sup>	4 (3.33) <sup>a</sup>	0 (0.0) <sup>a</sup>
Normal K <sup>+</sup> ve Ko-kül	181	40 (22.09) <sup>a</sup>	123 (67.95) <sup>a</sup>	18 (9.94) <sup>a</sup>	84 (68.29) <sup>a</sup>	27 (21.95) <sup>b</sup>	11 (8.94) <sup>a</sup>	1 (0.81) <sup>a</sup>
Yüksek K <sup>+</sup>	177	43 (24.29) <sup>a</sup>	109 (61.58) <sup>a</sup>	25 (14.12) <sup>a</sup>	75 (68.80) <sup>a</sup>	31 (28.44) <sup>b</sup>	3 (2.75) <sup>a</sup>	0 (0.0) <sup>a</sup>
Yüksek K <sup>+</sup> ve Ko-kül	178	45 (25.28) <sup>a</sup>	111 (62.35) <sup>a</sup>	22 (12.35) <sup>a</sup>	71 (63.96) <sup>a</sup>	35 (31.53) <sup>b</sup>	5 (4.50) <sup>a</sup>	0 (0.0) <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> aynı dikey kolonlarda değişik harf taşıyan oranlar arasındaki farklar önemlidir. ( $P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 13.4406$ )

Top: Toplam; Bölün: Bölünmeyen; Cleav: Cleavage; Bls: Blastomer

\* Yüzde oranlar bölünme gösteren embriyoların sayıları üzerinden hesaplandı

### 6.2.1.3 Embriyoların 72. Saatteki Gelişim Oranları

İn vitro kültürün 72. saati sonunda, düşük oranda  $KH_2PO_4$  içeren ve ko-kültür kullanılmayan grupta kültüre edilen 105 adet embriyonun %50.47'si (53 adet) dejenere oldu. Embriyoların %34.61'i (18 adet) 8 blastomerli aşamaya kadar gelişirken, %32.69'u (17 adet) 8-16 blastomerli, %11.53'ü (6 adet) morula ve %21.15'i (11 adet) kompakt morula aşamasına ulaştı. Düşük



oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve ko-kültür içeren grupta kültüre edilen 123 adet embriyodan, %38.21'i (47 adet) dejenere oldu. Embriyolardan %26.31'i (20 adet) 8 blastomerli aşamaya gelişirken, %26.31'i (20 adet) 8-16 blastomerli, %31.57'si (24 adet) morula, %15.78'i (12 adet) kompakt morula safhasına ulaştı (Tablo 4).

Normal oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren ve ko-kültür kullanılmayan gruptaki yarıklanma gösteren 120 adet embriyodan %36.66'sı (44 adet) dejenere oldu. Embriyoların %18.42'si (14 adet) 8 blastomerli aşamaya kadar gelişirken, %13.15'i (10) 8-16 blastomerli , %55.26'sı (42 adet) morula ve %13.15'i (10 adet) kompakt morula aşamasına ulaştı. Normal oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve ko-kültür içeren gruptaki yarıklanma gösteren 123 adet embriyodan %45.52'si (56 adet) dejenere oldu. Embriyoların %16.41'i (11 adet) 8 blastomerli aşamaya kadar gelişirken, %31.34'ü (21 adet) 8-16 blastomerli, %44.77'si (30 adet) morula ve %7.46'sı (5 adet) kompakt morula aşamasına ulaştı (Tablo 4).

Yüksek oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren ve ko-kültür kullanılmayan gruptaki yarıklanma gösteren 109 adet embriyodan %34.86'sı (38 adet) 72 saat sonunda dejenere oldu. Embriyoların %30.98'i (22 adet) 8 blastomerli aşamaya kadar gelişirken, %38.02'si (27 adet) 8-16 blastomerli, %16.90'ı (12 adet) morula ve %14.08'i (10 adet) kompakt morula aşamasına ulaştı. Yüksek oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ve ko-kültür içeren gruptaki 111 adet embriyodan %49.54'ü (55 adet) dejenere oldu. Kültürün 72. saati sonunda bu grupta gelişen embriyoların %28.57'si (16 adet) 8 blastomerli aşamaya kadar gelişirken, %21.42'si (12 adet) 8-16 blastomerli aşamasına , %28.57'si (16 adet) morula ve %21.42'si (12 adet) kompakt morula aşamasına ulaştı (Tablo 4).

**Tablo 4:** İn vitro fertilizasyon sonrası, kültüre edilen embriyoların 72. saat sonundaki gelişimleri ve gelişim aşamalarına göre dağılımları.

72. Saat	Top Emb.*	Gelişen Emb.	Dejenere Emb. (%)***	Gelişen Embriyolar (%)**			
				8 Bls	8-16 Bls	Morula	Kom. Mor
Düşük K	105	52 (49.53) <sup>a</sup>	53 (50.47) <sup>a</sup>	18 (34.61) <sup>a</sup>	17 (32.69) <sup>b</sup>	6 (11.53) <sup>a</sup>	11 (21.15) <sup>a</sup>
Düşük K <sup>+</sup> ve Ko-kül	123	76 (61.79) <sup>a</sup>	47 (38.21) <sup>a</sup>	20 (26.31) <sup>a</sup>	20 (26.31) <sup>b</sup>	24 (31.57) <sup>c</sup>	12 (15.78) <sup>a</sup>
Normal K <sup>+</sup>	120	76 (63.34) <sup>a</sup>	44 (36.66) <sup>a</sup>	14 (18.42) <sup>a</sup>	10 (13.15) <sup>a</sup>	42 (55.26) <sup>a</sup>	10 (13.15) <sup>a</sup>
Normal K <sup>+</sup> ve Ko-kül	123	67 (54.48) <sup>a</sup>	56 (45.52) <sup>a</sup>	11 (16.41) <sup>a</sup>	21 (31.34) <sup>b</sup>	30 (44.77) <sup>b</sup>	5 (7.46) <sup>a</sup>
Yüksek K <sup>+</sup>	109	71 (65.14) <sup>a</sup>	38 (34.86) <sup>a</sup>	22 (30.98) <sup>a</sup>	27 (38.02) <sup>b</sup>	12 (16.90) <sup>d</sup>	10 (14.08) <sup>a</sup>
Yüksek K <sup>+</sup> ve Ko-kül	111	56 (50.46) <sup>a</sup>	55 (49.54) <sup>a</sup>	16 (28.57) <sup>a</sup>	12 (21.42) <sup>b</sup>	16 (28.57) <sup>d</sup>	12 (21.42) <sup>a</sup>

<sup>abcde</sup> aynı dikey kolonda değişik harf taşıyan oranlar arasındaki farklar önemlidir. (P< 0.05;  $\chi^2=12.2073$ )

\* 48. saatte cleavage göstermiş embriyo sayıları esas alınmıştır.

\*\*Oranlar gelişen embriyoların sayısı kullanılarak hesaplanmıştır

\*\*\*8 Blastomeren küçük embriyolar dejenere kabul edilmiştir

Top Emb:Toplam Embriyo, Emb:Embriyo, Bls:Blastomer, Kom. Mor: Kompakt Morula

Kültürün 72'inci saati sonunda embriyo gelişimlerini her grup için total olarak 8-16 blastomer ile morula ve kompakt morula aşamaları şeklinde iki grup altında incelediğimizde şu değerler bulundu.

Düşük oranda KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren grupta yarıklanma gösteren 105 adet embriyodan %67.30'u (35 adet) 8-16 blastomerli, %32.69'u (17 adet) ise morula ve kompakt morula aşamasına gelişti. Ko-kültür içeren grupta ise yarıklanma gösteren 123 adet embriyodan %52.63'ü (40 adet) 8-16 blastomerli, %47.36'si (36 adet) ise morula ve kompakt morula safhasına ulaştı (Tablo 5).

Normal oranda KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren ve ko-kültür kullanılmayan grupta yarıklanma gösteren 120 adet embriyodan %31.57'si (24 adet) 8-16 blastomerli aşamaya gelişirken %68.42'si (52 adet) morula ve kompakt morulaya ulaştı. Ko-kültür içeren grupta ise yarıklanma gösteren 123 adet embriyodan %47.76'si (32 adet) 8-16 blastomerli aşamaya gelişirken, %52.23'ü (35 adet) de morula ve kompakt morula safhasına ulaştı (Tablo 5).

Ko-kültür kullanılmayan yüksek oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren grupta kültüre edilen 109 adet embriyodan %69.01'i (49 adet) 8-16 blastomerli aşamaya gelişirken %30.98'i (22 adet) ise morula ve kompakt morula safhasına ulaştı. Ko-kültür kullanılarak geliştirilen kültür grubunda ise 111 adet embriyodan %50.00'si (28 adet) 8-16 blastomerli safhaya gelişirken %50.00' si de morula ve kompakt morula aşamasına ulaştı (Tablo 5).

**Tablo 5:** İn vitro kültürün 72. saati sonunda embriyoların gelişimleri ve gelişim aşamalarına göre dağılımları.

72. Saat	Toplam Embryo	Gelişen Embriyolar	Dejenere Emb (%)***	Gelişen Embriyolar (%)**	
				8-16 Blast	Morula-Komp. Mor
Düşük K <sup>+</sup>	105	52 (49.53) <sup>a</sup>	53 (50.47) <sup>a</sup>	35 (67.30) <sup>a</sup>	17 (32.69) <sup>b</sup>
Düşük K <sup>+</sup> ve Ko-kül	123	76 (61.79) <sup>a</sup>	47 (38.21) <sup>a</sup>	40 (52.63) <sup>a</sup>	36 (47.36) <sup>b</sup>
Normal K <sup>+</sup>	120	76 (63.34) <sup>a</sup>	44 (36.66) <sup>a</sup>	24 (31.57) <sup>b</sup>	52 (68.42) <sup>a</sup>
Normal K <sup>+</sup> ve Ko-kül	123	67 (54.48) <sup>a</sup>	56 (45.52) <sup>a</sup>	32 (47.76) <sup>a</sup>	35 (52.23) <sup>b</sup>
Yüksek K <sup>+</sup>	109	71 (65.14) <sup>a</sup>	38 (34.86) <sup>a</sup>	49 (69.01) <sup>a</sup>	22 (30.98) <sup>b</sup>
Yüksek K <sup>+</sup> ve Ko-kül	111	56 (50.46) <sup>a</sup>	55 (49.54) <sup>a</sup>	28 (50.00) <sup>a</sup>	28 (50.00) <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> aynı dikey kolonda değişik harf taşıyan oranlar arasındaki farklar önemlidir. ( $P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 19.3070$ )

<sup>a</sup>48. saatte cleavage göstermiş embriyolar total ele alınmıştır.

<sup>\*\*</sup>Yüzde oranlar gelişen embriyoların sayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

<sup>\*\*\*</sup>8 blastomerden küçük embriyolar dejenere kabul edilmiştir.

Emb: Embriyo. Bls: Blastomer. Komp-Mor: Kompakt Morula

#### 6.2.1.4. Embriyoların 96. Saatteki Gelişim Oranları

İn vitro kültürün 96. saati sonunda düşük oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren ve ko-kültür kullanılmayan gruptaki 105 adet embriyodan 43 adedi (%40.96) gelişirken, %59.04'ü (62 adet) de dejenere oldu. Embriyoların %32.55'i (14 adet) morula aşamasına kadar gelişebilirken, %37.20'si (16) kompakt morula, %4.65'i (2 adet) erken blastosist ve %25.58'i (11 adet) blastosist (Şekil 3) aşamasına ulaştı. Ko-kültür kullanılan gruptaki 123 adet embriyodan ise 51 tanesi (%41.47) gelişirken, %58.53'ü (72 adet) dejenere oldu. Gelişen embriyoların %25.49'u (13 adet) morulaya kadar gelişebilirken, %35.29'u

(18 adet) kompakt morula %7.84'ü (4 adet) erken blastosist ve %31.37'si (16 adet) blastosist aşamasına ulaştı (Tablo 6).

Normal oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren ve ko-kültür kullanılmayan grupta, 120 adet embriyonun 67 adedi (%55.84) gelişirken, %44.16'sı (53 adet) dejenere oldu. Gelişen embriyoların ise %13.43'ü (9 adet) morula, %32.83'ü (22 adet) kompakt morula, %5.97'si (4 adet) erken blastosist ve %47.76'sı (32 adet) blastosist aşamasına ulaştı. Aynı  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  oranı içeren ve ko-kültür kullanılarak kültüre edilen gruptaki 123 adet embriyonun %51.22'si (63 adet) gelişirken, %48.78'i (60 adet) dejenere oldu. Gelişen embriyoların %23.80'i (15 adet) morula %25.39'u (16 adet) kompakt morula, %3.17'si (2 adet) erken blastosist ve %47.61'i (30 adet) blastosist aşamasına ulaştı (Tablo 6).



Şekil 3: İn vitro kültürün 96. saati sonunda blastosist ve hatching blastosist aşamasına gelişen embriyolar.

➡ Blastosist; ➡ Hatching Blastosist

Ko-kültürün kullanılmadığı yüksek oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren grupta 109 adet embriyodan %27.53'ü (30 adet) gelişirken %72.47'si (79 adet) dejenere oldu. Gelişen embriyoların %36.66'sı (11 adet) morula aşamasına kadar ulaşabilirken, %23.33'ü (7 adet) kompakt morula, %6.66'sı (2 adet) erken blastosist ve %33.33'ü (10 adet) de blastosiste gelişti (Şekil 4). Ko-kültür içeren grupta 111 adet embriyodan, %27.03'ü (30 adet) gelişirken %72.97'si (81 adet) dejenere oldu. Gelişebilen embriyoların %36.66'sı (11 adet) morula aşamasına, %36.66'sı (11 adet) kompakt morula, %3.33'ü (1 adet) erken blastosist ve %23.33'ü (7 adet) blastosist aşamasına ulaştı (Tablo 6)

**Tablo 6:** İn vitro fertilizasyon sonrası, kültüre edilen embriyoların 96.saat sonundaki gelişimleri ve gelişim aşamalarına göre dağılımları.

96.Saat	Top. Emb*.	Gelişen Emb.(%)	Dejenere Emb.***	Gelişen Embriyolar (%)**			
				Morula	Komp Mor	Erk Blast	Blast.
Düşük K*	105	43 (40.96) <sup>b</sup>	62 (59.04) <sup>b</sup>	14 (32.55) <sup>a</sup>	16 (37.20) <sup>a</sup>	2 (4.65) <sup>a</sup>	11 (25.58) <sup>b</sup>
Düşük K* ve Ko-kül	123	51 (41.47) <sup>b</sup>	72 (58.53) <sup>b</sup>	13 (25.49) <sup>a</sup>	18 (35.29) <sup>a</sup>	4 (7.84) <sup>a</sup>	16 (31.37) <sup>b</sup>
Normal K*	120	67 (55.84) <sup>a</sup>	53 (44.16) <sup>a</sup>	9 (13.43) <sup>b</sup>	22 (32.83) <sup>a</sup>	4 (5.97) <sup>a</sup>	32 (47.76) <sup>a</sup>
Normal K* ve Ko-kül	123	63 (51.22) <sup>b</sup>	60 (48.78) <sup>b</sup>	15 (23.80) <sup>a</sup>	16 (25.39) <sup>a</sup>	2 (3.17) <sup>a</sup>	30 (47.61) <sup>b</sup>
Yüksek K*	109	30 (27.53) <sup>b</sup>	79 (72.47) <sup>b</sup>	11 (36.66) <sup>a</sup>	7 (23.33) <sup>a</sup>	2 (6.66) <sup>a</sup>	10 (33.33) <sup>b</sup>
Yüksek K* ve Ko-kül	111	30 (27.03) <sup>b</sup>	81 (72.97) <sup>b</sup>	11 (36.66) <sup>a</sup>	11 (36.66) <sup>a</sup>	1 (3.33) <sup>a</sup>	7 (23.33) <sup>b</sup>

<sup>ab</sup> aynı dikey kolonda değişik harf taşıyan oranlar arasındaki farklar önemlidir. ( $P < 0.05$ ;  $\chi^2 = 11.2246$ )

\* Toplam embriyo 48. saat sonunda bölünen, hücre sayıları ele alındı.

\*\* Yüzde oranı gelişen embriyoların sayılarına göre hesaplanmıştır.

\*\*\*Morula aşamasından küçük embriyolar dejenere kabul edilmiştir

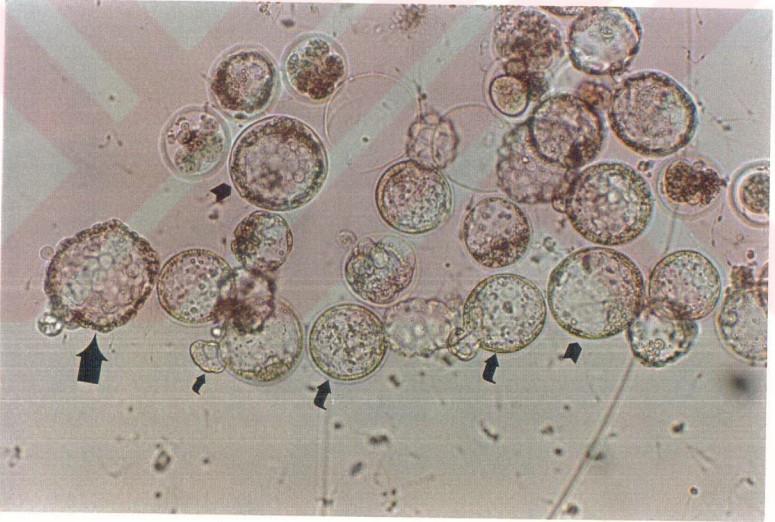
Emb: Embriyo. Komp Mor: Kompakt Morula. Erk. Blast:Erken Blastosist. Blast: Blastosist

İn vitro kültürün 96'ıncı saati sonunda embriyo gelişimlerini her grup için total olarak morula ve kompakt morula ile erken blastosist, blastosist aşamaları olarak iki grup altında toplandığında, şu değerler bulundu (Tablo 7).

Düşük oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren grupta, ko-kültür kullanılmadan gerçekleştirilen kültürdeki 105 adet embriyodan %28.57'si (30 adet) morula ve

kompakt morulaya gelişebilirken, %12.38'i (13 adet) erken blastosist ve blastosist aşamasına ulaştı. Ko-kültür içeren grupta kültüre edilen 123 adet embriyonun ise %25.20'si (31 adet) morula ve kompakt morulaya gelişebilirken, %16.26'sı (20 adet) erken blastosist ve blastosist safhasına ulaştı (Tablo 7).

Normal oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren ve ko-kültür kullanılmayan grupta yarıklanma gösteren 120 adet embriyodan %25.83'ü (31 adet) morula ve kompakt-morulaya gelişebilirken, %30.00'u (36 adet) erken blastosist-blastosist safhasına ulaştı. Ko-kültür içeren grupta ise 123 adet embriyodan %25.20 'si (31 adet) morula ve kompakt morula aşamasına gelişebilirken %26.01'i (32 adet) erken blastosist ve blastosist safhasına ulaştı (Tablo 7).



Şekil 4: İn vitro kültürün 96. saatinin sonunda blastosist, hatching blastosist ve hatched blastosist aşamasına gelişmiş embriyolar.

► blastosist; ➡ hatching blastosist; ➤ hatched blastosist

Ko-kültür kullanılmadan ve yüksek oranda  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  içeren grupta kültüre edilen 109 adet embriyodan %16.51'i (18 adet) morula ve kompakt morulaya,

%11.00'i (12 adet) erken blastosist ve blastosist safhasına gelişti. Ko-kültür içeren grupta ise 111 adet embriyodan %19.81'i (22 adet) morula ve kompakt morulaya gelişebilirken %7.20'si (8 adet) de erken blastosist ve blastosist aşamasına ulaştı (Tablo 7).

**Tablo 7:** In vitro fertilizasyon sonrası, kültüre edilen embriyoların 96. saat sonundaki gelişimleri ve gelişim aşamalarına göre dağılımları.

96. Saat	Toplam Embriyo*	Gelişen Emb (%)	Dejenere Oosit (%)***	Gelişen Embriyolar (%)**	
				Mor-Komp Mor	Erk. Bls- Bls
Düşük K <sup>+</sup>	105	43 (40.96) <sup>b</sup>	62 (59.04) <sup>b</sup>	30 (28.57) <sup>a</sup>	13 (12.38) <sup>c</sup>
Düşük K <sup>+</sup> ve Ko-kül	123	51 (41.47) <sup>b</sup>	72 (58.53) <sup>b</sup>	31 (25.20) <sup>ab</sup>	20 (16.26) <sup>bc</sup>
Normal K <sup>+</sup>	120	67 (55.84) <sup>a</sup>	53 (44.16) <sup>a</sup>	31 (25.83) <sup>ab</sup>	36 (30.00) <sup>a</sup>
Normal K <sup>+</sup> ve Ko-kül	123	63 (51.22) <sup>b</sup>	60 (48.78) <sup>b</sup>	31 (25.20) <sup>ab</sup>	32 (26.01) <sup>ab</sup>
Yüksek K <sup>+</sup>	109	30 (27.53) <sup>c</sup>	79 (72.47) <sup>c</sup>	18 (16.51) <sup>b</sup>	12 (11.00) <sup>cd</sup>
Yüksek K <sup>+</sup> ve Ko-kül	111	30 (27.03) <sup>c</sup>	81 (72.97) <sup>c</sup>	22 (19.81) <sup>ab</sup>	8 (7.20) <sup>d</sup>

<sup>abcd</sup> aynı dikey kolonda değişik harf taşıyan oranlar arasındaki farklar önemlidir (P < 0.05; t- testi).

\*48. saatte cleavage göstermiş embriyoların sayısı ele alınmıştır.

\*\* Yüzde oranları bölünen embriyo sayıları üzerinden hesaplanmıştır.

\*\*\* Morula aşamasından küçük embriyolar dejene kabul edilmiştir

Emb: Embriyo. Mor: Morula. Komp Mor: Kompakt Morula. Erk Bls: Erken Blastosist. Bls: Blastosist

## 7. TARTIŞMA

Yirmibirinci yüzyılda büyük bir gelişme gösteren embriyo transferi ve in vitro fertilizasyon çalışmaları, insan hekimliğinde genetik çalışmalar, tüp bebek, çeşitli hastalık ve kısırlık tedavisi amaçlı kullanılırken; veteriner hekimliği alanında ise, hayvan ıslahını sağlamakla birlikte, gen transferi ve klonlama gibi biyoteknolojik çalışmalarda kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, temel olarak, in vitro fertilizasyon yöntemiyle elde edilen embriyoların, 96 saat süreyle kültüre edilecekleri medyumun farklı potasyum miktarlarının, 2 hücreli safhada şekillenen bloğun aşılmasına ve embriyonik gelişime etkileri belirlenmeye çalışıldı.

Bu amaçla, in vitro fertilize edilen embriyoların, farklı potasyum oranlarını bulunduran Whitten's medyumunu, ko-kültürlü ve ko-kültürsüz olarak kullanıldı. Medyumun yapısında bulunan  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  oranı sırasıyla, düşük (0.0081 g/100 mL), normal (kontrol) (0.0162 g/100 mL), yüksek (0.0324 g/100 mL) olacak şekilde ayarlanarak, 3 grup oluşturuldu. Her bir grup, ovidukt epitel hücreleri ile ko-kültürlü ve ko-kültürsüz olarak kullanıldı. Böylece 6 deneme grubu oluşturuldu.

İlk 24 saatlik süreçte, Whitten's medyumunun düşük  $\text{K}^+$  içeren grubunda kültüre edilen oositlerden %48.00'i yarıklanma (cleavage) gösterirken, aynı medyumun ko-kültür grubunda ise yarıklanma oranı %57.44 olarak bulundu. Bununla birlikte normal potasyum grubunda yarıklanma oranı sırasıyla %55.49 ve %56.90, yüksek potasyum grubunda ise yarıklanma oranı %50.84 ve %53.37 olarak bulundu (Tablo 2).

Kültürün 24'üncü saatinde gruplar arasında embriyoların yarıklanma oranları bakımından, gruplar arasındaki gelişim oranları farkları istatistiksel açıdan önemli olmamakla birlikte, en düşük cleavage oranı %48.00 ile ko-



kültürsüz düşük potasyum grubunda kaydedilirken, en yüksek yarıklanma oranı ise bu medyumun ko-kültür ile beraber kullanıldığı grupta %57.44 olarak saptandı. Bu oran ko-kültür kullanılmayan normal potasyum değerindeki grupta %55.49 olarak belirlenirken, potasyum oranı iki katına çıkarıldığında %50.84'e geriledi. Ko-kültür kullanılan gruplarda ise, bu oranlar normal düzeyde potasyum içeren grupta %56.90, yüksek potasyum grubunda %53.37 olarak saptandı (Tablo 2).

Elde edilen bulgular, Roblero ve Riffo (71) ile Chatot ve ark. (21)'nin yüksek potasyum oranlarının embriyoların yarıklanmalarında esas olmadığı fikrini destekler niteliktedir. Diğer taraftan her bir grupta ko-kültür kullanılmasıyla embriyoların yarıklanma oranlarının artmasının, istatistiksel açıdan önemli olmasa da Boorland ve ark. (18)'nin 1. bölünme aşamasının in vivo şartlarda yüksek potasyum içeren ovidukt bölgesinde meydana geldiği, ovidukt hücrelerinin ve bu hücrelerden köken alan potasyumun, yarıklanma oranını artırdığı görüşlerini destekler niteliktedir.

Düşük potasyum içeren grupta en düşük oranda yarıklanma gözlenirken, bu ortama ko-kültür hücreleri ilave edildiğinde, istatistiksel açıdan önemli olmasa da, normal ve yüksek potasyum içeren, ko-kültürlü ve ko-kültürsüz gruplardaki yarıklanma oranlarına sayısal üstünlük sağlaması, ovidukt epitel hücrelerinin ortamdaki eksikliği giderebileceği fikrini uyandırmıştır. Ancak, bu olumlu etkiye ters olarak; dejenerasyon oranları ele alındığında; istatistiksel önem taşımasa da, ko-kültür kullanımı düşük potasyumlu grupta yarıklanma oranını azalttığını göstermiştir.

Yine 24 saatlik kültür sonunda hemen hemen tüm gruplarda embriyolar 2 blastomerli safhada yoğunlaşırken, çok az bir kısmı 4 blastomerli aşamaya ulaştı.

In vitro fertilizasyonun başlangıcından 48 saat sonra, yapılan incelemelerde, yarıklanma oranlarının tüm gruplarda arttığı belirlenmiştir. Bu da

kaynaklarda belirtilen, in vivo embriyonal gelişimin ilk 32 saatinde yarıklanmanın tamamlandığı fikrini desteklerken (35); in vitro şartlarda fare embriyolarında DNA polimeraz aktivitesinin düşmesi (48) nedeniyle embriyoların daha geç bölündükleri fikrini güçlendirmiştir. Gözlenen bu yarıklanma oranları gruplara göre, ko-kültür uygulanmayan düşük potasyum grubunda %60.00, normal potasyumda %65.00, yüksekte ise %61.58 olarak gözlenmiştir.

Ko-kültür kullanıldığında ise bu değerler, gruplara göre sırasıyla %68.71, %67.95, %62.35 olarak saptanmıştır. Bu veriler ışığında tüm gruplarda istatistiksel açıdan önemli olmamakla birlikte; ko-kültürün cleavage oranlarını arttırdığı belirlenmiştir. Bu da ovidukt epitel hücrelerinin farklı potasyum oranları içeren ortamlarda destek görevi yapabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır (Tablo 3). Bu kanı bazı araştırmacıların embriyoların ovidukt hücreleriyle ko-kültüre edilmelerinin yararlı olduğu fikrini destekler niteliktedir (16, 31, 32, 57, 70, 89).

Kırksekiz saatlik süreçte tüm gruplarda yer alan embriyoların dejenerasyonunda artış görülmesine ve en yüksek dejenerasyonun %14.52 ile düşük potasyum ve ko-kültür grubunda bulunmasına rağmen gruplardaki dejenerasyon oranları istatistiksel açıdan önemli bulunmamıştır (Tablo 3).

İn vitro kültürün 48 saatlik süresi sonunda tüm gruplarda bölünen embriyoların gelişim aşamaları incelendiğinde, embriyoların çoğunlukla 2-4 blastomerli dönemde yoğunlaşma gösterdikleri ve aralarında istatistiksel açıdan bir fark olmadığı ( $P>0.05$ ) saptandı. Gruplardaki embriyolardan 4-6 blastomerli aşamaya en hızlı olarak %45.83 ile normal potasyum grubu ulaştı. Normal potasyum grubu ile diğer gruplar arasındaki gelişim oranı farklarının istatistiksel açıdan önemli olmadığı gözlenmiştir. Diğer taraftan, 8 blastomerli embriyoya, ko-kültür hücrelerinin kullanıldığı düşük potasyum medyumlarında en yoğun olarak rastlanırken, ko-kültürün bulunmadığı düşük potasyumlu ortamda bu aşamaya gelişim gözlenmemiştir ( $P<0.05$ ).

Avery ve ark. (6), in vitro ortamda şekillenen bloğun aşılmasında, ovidukt hücrelerin kültür ortamlarına ilave edilmesi ile medyumdaki glikozun bu hücreler tarafından kullanılarak azaltılması sonucu embriyolar için daha iyi bir ortam sağlandığı ve embriyolarda gözlenen bloğun aşılmasında faydalı olabileceğini bildirmiştir.

In vitro kültür periyodunun 48. saatinde bölünen embriyolar total olarak ele alınmış ve 8 blastomerdan küçük embriyolar dejenere kabul edilmiştir. 72. saatte gruplar arasında şekillenen dejenerasyon oranları istatistiksel açıdan önemli olmasa da, tüm gruplarda dejenerasyon oranı büyük ölçüde artmış; en fazla dejenerasyon %50.47 ile düşük potasyum grubunda ve %49.54 ile yüksek potasyumlu ko-kültür grubunda bulunmuştur (Tablo 4).

Embriyoların in vitro kültürünün 72. saatinde, hemen hemen tüm gruplarda gelişim oranları arasındaki fark istatistiksel açıdan önemli olmasa da; 8-16 blastomerli ve morula safhalarına dağılımlarında önemli farklar olmuştur ( $P<0.05$ ), (Tablo 4). Kültür sürecinde gruplar arasında morulaya ulaşma oranının en fazla gözleendiği grup olarak %55.26 ile normal potasyum ve daha sonra %44.77 ile normal potasyum ve ko-kültür grubunda bulunurken; her iki grubun birbirleriyle ve diğer gruplar ile olan gelişim hızı değerleri arasındaki fark önemli bulundu ( $P<0.05$ ). Ayrıca morulaya ulaşma hızının en yavaş olduğu grubun %5.71 ile düşük potasyum grubu olduğu saptandı. In vitro kültürün 72 saatlik sürecinde kompakt morulaya ulaşma hızlarında istatistiksel anlamda ( $P>0.05$ ) bir fark bulunmadı (Tablo 4).

Bu kriterler doğrultusunda en iyi gelişimin normal potasyum içeren grupta %68.42 ve bunu da sırasıyla normal potasyum ve ko-kültür %52.23, yüksek potasyum ve ko-kültür %50.00, düşük potasyum ve ko-kültür %47.36, yüksek potasyum %30.98 ve en sonunda %32.69 ile düşük potasyumun takip ettiği gözlenmiştir ( $P<0.05$ )(Tablo 5). Normal potasyum haricindeki gruplar arasındaki gelişim oranları farkı istatistiksel açıdan önem taşımamaktadır.

Bu sonuçlara göre, normal potasyum grubuna ovidukt hücrelerinin ilave edilmesinin embriyoların gelişimini negatif yönde etkilediği düşünülmekle beraber; bu hücrelerin düşük ve yüksek potasyum gruplarında şekillenen farklılıkların oluşturduğu negatif etkileri pozitif yönde desteklediği fikri ortaya çıkmıştır. Normal potasyum grubunda ovidukt epitellerinin katılmasıyla morula ve kompakt morula aşamasına gelişim oranlarında şekillenen düşüşün sebebi bilinmemekle beraber, ovidukt hücrelerinin embriyoların gelişimi için gerekli olan besin maddelerini daha hızlı oranda tüketmelerinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Bu fikir Bavister (12) ile Menezo ve ark. (57)'nin ko-kültür kullanıldığında medyumun içerdiği besin maddelerinin embriyolarla birlikte hücrelerin de ihtiyaçlarını karşılayacak yapıda olması gerektiği görüşleri tarafından desteklenmektedir.

İn vitro kültürün son aşamasında, gelişen ve dejenere olan toplam embriyo sayıları göz önüne alındığında, en iyi gelişim oranı normal potasyum içeren grupta (%55.84) şekillenmiştir ( $P<0.05$ ) (Tablo 6). Gelişim safhalarına dağılım oranlarına bakıldığında ise, yine aynı grupta blastosiste gelişim en yüksek değere ulaşmış, bunu ko-kültür kullanılan normal potasyum grubu takip etmiştir ( $P<0.05$ ) (Tablo 6).

Doksan altı saatlik in vitro kültürün bitiminde, embriyoların erken blastosist ve blastosist aşamasına gelmesi beklendiğinden; bu değerler topluca alındığında; cleavage gösteren embriyolardan erken blastosist ve blastosist aşamasına en iyi gelişimin normal potasyum içeren medyumda şekillendiği, bunu da, ko-kültür kullanılan aynı grup ve düşük potasyum oranlarının takip ettiği saptanmıştır ( $P<0.05$ ) (Tablo 7). Ayrıca 96 saatlik kültürün sonunda, gruplarda hatching ve hatched blastosist safhası görülmüştür (Şekil 3,4).

Ko-kültür kullanılmayan düşük ve yüksek potasyumlu ortamlarda daha az gelişim gözlenirken ko-kültür ilave edilmiş yüksek potasyumlu ortamlarda gelişim oldukça zayıf kalmıştır ( $P<0.05$ ) (Tablo 7).

İn vitro kültürün 72. ve 96. saatlerinde ortaya çıkan değerler ışığında; yüksek potasyumun morula gelişimini desteklediği, ancak bu olumlu etkinin, kompaktlaşma ile blastosist şekillenmesine geçildiğinde negatife döndüğü ve blastosiste gelişen toplam embriyo sayısını azalttığı saptanmıştır.

Bu gözlem, Roblero ve ark.'nın (71) yüksek potasyumun morula gelişimine kadar olumlu etki yaptığı, bunu takiben, blastosist gelişimi için ortamın potasyum değerinin düşürülmesi gerektiği görüşü tarafından desteklenmektedir.

Yüksek potasyum ve ko-kültür gruplarında kültüre edilen embriyoların dejenerasyonlarının diğer gruplardan yüksek bulunması Lawitts ve Biggers'in (53)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ün yüksek konsantrasyonlarının embriyo gelişimine zararlı olduğu fikrini desteklemektedir.

Bu sonuçlar Willey ve ark.'nın (85) düşük oranda potasyum içeren medyumdaki embriyoların blastosist safhasına, yüksek potasyum içeren medyumda gelişen embriyolara göre daha hızlı oranda geliştikleri fikrine paralel olmasına karşın, Erbach ve ark.'nın (27) yüksek oranda potasyum içeren medyumda gelişen embriyoların daha yüksek oranda, 2 hücreli bloğu aşmış blastosist safhasına ulaştığı fikrine ters düşmektedir.

Dumoulin ve ark.'nın (26) ovidukt sıvısında yüksek oranda potasyum bulunmasına rağmen, in vitro şartlarda, artan potasyum konsantrasyonunun, embriyoların gelişimine negatif etkili olduğu ve embriyoların yüksek potasyuma çok duyarlı olduğu şeklindeki görüşü, Roblero ve Riffo'nun (71) fare embriyolarının in vitro kültürlerinde blastosist öncesi kompaktlaşma aşamasına kadar olan gelişimlerde pozitif etkisi olduğu düşüncesine ters düşmektedir.

Yapılan çalışmada ise gelişim oranları bakımından potasyum oranlarındaki farklılığın etkili olmadığı, ancak, kültür sonucundaki blastosiste

ulaşım oranları bakımından, yüksek potasyumun, düşük potasyuma oranla daha zararlı etki oluşturduğu saptanmıştır.

Ayrıca ko-kültür gruplarında yer alan ovidukt hücreleri ile ilk 48 saatlik dönemde embriyoların, (Tablo 3) ko-kültürsüz gruptaki embriyolara göre biraz daha iyi gelişim gösterdiği saptanırken ( $P>0.05$ ), 96 saatlik süre sonunda ko-kültür grupları ile ko-kültürsüz gruplar arasındaki bu fark düşük potasyum grubu hariç tersine dönmüştür. Bu sonuç birçok araştırıcının (12, 57) belirttiği gibi ko-kültür çalışmalarında kullanılan medyumun, embriyoların ve hücrelerin besin ihtiyaçlarını karşılaması gerektiği fikrine paraleldir.

Yine 96 saatlik in vitro kültür sonucunda ko-kültür gruplarında meydana gelen gelişim oranlarındaki azalmanın, embriyoların yer aldığı medyum droplarının kültür süresince tazelenmemesi nedeniyle, özellikle de ovidukt hücrelerinin bulunduğu droplarda embriyoların gelişimi için gerekli olan besin maddelerinin yetersiz kalması nedeniyle oluştuğu düşünölmektedir.

Kültür sonunda normal ve yüksek potasyum içeren ko-kültür gruplarında ovidukt hücrelerinin embriyoların gelişimlerini artırmaması, Watson ve ark.'nın (81), özellikle ovidukt epitel hücreleriyle ko-kültüre edilen embriyoların gelişmelerinde %5 O<sub>2</sub> %5 CO<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> gaz karışımının yeterli olmadığı ve azalan O<sub>2</sub> konsantrasyonunun ovidukt hücrelerinin ihtiyaçlarını karşılayamayacağı fikrini akla getirmiştir.

In vivo şartlarda gelişen fare embriyolarının 96 saat sonunda hatching ve hatched blastosiste ulaştıkları bildirilirken (33, 35, 48), sunulan çalışmada in vitro olarak kültüre edilen fare embriyolarının kompakt morula, erken blastosist, blastosist ve kısmen de hatching blastosist aşamasına geliştikleri saptandı. Bu sonuç, Knobil ve Neil'in (48), fare embriyolarının in vitro kültüründe in vivo ortama göre en az iki saatlik bir gecikmeyle bölünmeye başladığı ve blastosist aşamasında bu gecikmenin bir tam güne ulaştığı düşöncelerine paralel bulunmuştur.

Sonuç olarak çalışmada;

- Fare embriyolarının in vitro fertilizasyonunda TYH medyumunun, in vitro kültürlerinde Whitten's medyumunun kullanılabilmesi; ovidukt epitel hücreleriyle yapılan ko-kültürün embriyoların gelişmelerinde faydalı olduğu; ancak, 48 saatten sonraki dönemde, medyumda bulunan mineral madde ve besin kaynaklarının, embriyoların ve ovidukt epitel hücrelerinin ihtiyaçlarını tam olarak karşılayamaması nedeni ile medyum droplarının tazelenmesi gerektiği,

- Farklı oranlarda uygulanan potasyumun, in vitro gelişimlerde şekillenen iki hücreli bloğun aşılmasında ve şekillenecek cleavage oranlarında etkili olmadığı,

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ın yoğun olarak bulunduğu grup ile ko-kültür kullanılan yüksek potasyum grubunda embriyoların gelişiminin yavaşladığı ve olumsuz yönde etkilendiği,

-Fare embriyolarının in vitro gelişmelerinde, yüksek  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'a göre, ko-kültürün kullanıldığı düşük potasyum ile normal, normal ve ko-kültürün daha faydalı olacağı,

-Optimal sonuca ulaşmak için  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 'ın normal miktarlarında kullanılmasının uygun olacağı ve

-Bu konuda daha fazla çalışma yapılması ve ortamdaki diğer maddelerin de incelenmesi gerektiği kanısına varıldı.

## 8. ÖZET

Çalışmada, saf fare ırklarında in vitro fertilizasyon ve kültür ortamlarında şekillenen 2 blastomerli hücre bloğunun aşılması amacı ile, farklı  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0.0081 g/100 mL, 0.00162 g/100 mL, 0.0324 g/100 mL) oranları içeren, Whitten's medyumlarında kültüre ve ko-kültüre edilen embriyoların gelişimleri değerlendirildi.

Bu amaçla BALB/C ırkı 74 adet dişi ve 16 adet erkek fare kullanıldı. Süperovulasyon amacıyla, 5 I.U PMSG enjeksiyonu ve bunu takiben 48 saat sonra 5 I.U hCG enjeksiyonu uygulandı. Süperovule edilen farelerden elde edilen 1191 adet oositten 1071 tanesi, epididimisten kazanılan ve 1,5-2 saat süreyle TYH medyumunda kapasite edilen sperma ile 4-6 saat süreyle fertilize edildiler.

Fertilize olan oositler düşük, normal (kontrol), yüksek oranda potasyum içeren ovidukt epitel hücreleri ile birlikte veya bu hücreler olmaksızın 96 saat süreyle kültüre edildiler. Kültüre edilen embriyoların gelişimleri her 24 saatte bir kontrol edilerek kaydedildi.

Kültürün 24. saatinde, yarıklanma oranları bakımından gruplar arasında şekillenen farklar istatistiki açıdan önemli bulunmadı. Yine bu sürenin sonunda tüm gruplarda embriyolar 2-6 blastomerli safhada yoğunlaştı.

Kültürün 48. saati sonunda tüm gruplarda cleavage oranlarının arttığı ve artışın ko-kültüre edilen gruplarda, kültüre edilen gruplara göre daha fazla olduğu saptandı. İlk 48 saatin sonunda gruplarda yarıklanma oranları sırasıyla, düşük  $\text{K}^+$  % 60.00, düşük  $\text{K}^+$ +ko-kültür % 68.71, normal  $\text{K}^+$  % 65.93, normal  $\text{K}^+$ +ko-kültür % 67.95, yüksek  $\text{K}^+$  % 61.58, yüksek  $\text{K}^+$ +ko-kültür % 62.35 olarak saptandı. Ayrıca 4-6 ve 8 blastomerli aşamaya en çok normal potasyum ve normal potasyum+ko-kültür gruplarında ulaşıldığı belirlenirken ( $P<0.05$ ), diğer gruplar arasında fark görülmedi.



Yetmişikinci saatin sonunda, 8-16 blastomerli aşamaya en iyi gelişim normal potasyum grubunda belirlenirken, morula aşamasına en iyi gelişimin normal potasyum ve normal potasyum+ko-kültür gruplarında olduğu saptandı ( $P<0.05$ ). Düşük ve yüksek potasyum gruplarında morulaya gelişim oranları arasındaki fark anlamlı bulundu ( $P<0.05$ ).

Doksan altı saatlik kültürün bitiminde, embriyoların erken blastosist ve blastosist aşamasına gelmesi beklenirken, erken blastosist ve blastosist safhasına en iyi gelişimin normal potasyum içeren medyumda şekillendiği, bunu da normal potasyum+ko-kültür ve düşük potasyum gruplarının takip ettiği saptanmıştır ( $P<0.05$ ). Kültürün sonunda grupların erken blastosist ve blastosiste ulaşma oranları, düşük  $K^+$  % 12.38, düşük  $K^+$ +ko-kültür % 16.26, normal  $K^+$  % 30.00, normal  $K^+$ +ko-kültür % 26.01, yüksek  $K^+$  % 11.00, yüksek  $K^+$ +ko-kültür % 7.20 olarak saptandı.

Sonuç olarak, farklı oranlarda potasyumun, 2 hücre bloğunun aşılmasında ve cleavage oranlarında etkili olmadığı, ovidukt epitel hücreleri ile yapılan ko-kültürün embriyo gelişimini olumlu etkilediği, ancak, ko-kültürlü ortamlarda kullanılan medyumların hücrelerin ve embriyoların ihtiyaçlarını karşılaması gerektiği düşünüldü. Ayrıca blastosist aşamasına ulaşmada düşük potasyumun yüksek potasyuma göre daha faydalı olacağı, en iyi sonuçların kontrol gruplarında elde edildiği ve bu konuda ortamdaki diğer maddeleri de inceleyerek daha fazla çalışma yapılması gerektiği kanısına varıldı.

## 9. SUMMARY

### **Effects of Various Potassium Levels on the Development of In Vitro Fertilized Mouse Embryos**

The goal of this study was to evaluate the development of embryos cultured and co-cultured in Whitten's media containing various  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  levels (0.0081g/100 mL, 0.0162 g/100 mL, 0.0324 g/100 mL), in order to cover the 2 blastomere cell block in in vitro fertilization and culture environment in pure mouse breeds.

Seventy four female and 16 male BALB/C mice were used. To achieve superovulation 5 I.U PMSG and after 48 hours 5 I.U hCG were injected. Out of 1191 oocytes recovered from superovulated mice, 1071 were fertilized for 4-6 hours with semen collected from the epididymis and capacitated in TYH media for 1.5-2 hours.

Fertilized oocytes were cultured for 96 hours with or without oviduct epithelial cells in low, normal (control) and high level potassium containing media. Development of cultured embryos were controlled and reported every 24 hours.

During the 24<sup>th</sup> hour of culture, the differences in cleavage rates among the groups were not important statistically. At the end of this period, embryos from all groups were at 2-6 blastomere stage. At the end of the 48<sup>th</sup> hour cleavage rates were determined to be low  $\text{K}^+$  % 60.00, low  $\text{K}^+$ +co-culture % 68.71, normal  $\text{K}^+$  % 65.93, normal  $\text{K}^+$ +co-culture % 67.95, high  $\text{K}^+$ +co-culture % 62.35 respectively. Meantime 4-6 and 8 blastomere stage was mainly reached by normal potassium and normal potassium+co-culture groups ( $P < 0.05$ ) and no difference was observed among other groups.

At the end of 72<sup>nd</sup> hour, 8-16 blastomere was mostly observed in normal potassium group and morula stage was seen most in the normal potassium and normal potassium+co-culture group ( $P<0.05$ ). The difference between low and high potassium groups was important ( $P<0.05$ ).

At the end of 96 hours culture, when the embryos were expected to reach early blastocyst and blastocyst stages, highest rates were observed in normal potassium containing medium which was followed by normal potassium+co-culture and low potassium groups ( $P<0.05$ ). At the end of the culture, early blastocyst and blastocyst reaching rates of the groups were determined as low  $K^+$  % 12.38, low  $K^+$ +co-culture % 16.26, normal  $K^+$  % 30.00, normal  $K^+$ +co-culture % 26.01, high  $K^+$  % 11.00, high  $K^+$ +co-culture % 7.20.

In conclusion, it was suggested that different potassium levels were ineffective on cleavage rates to cover 2 cell stage block, oviduct epithelial cell co-culture had beneficial effects on embryo development and co-culture media should provide the necessities of embryos. Moreover, low potassium levels were superior to higher levels and best results were obtained from the control group revealing the need to more research on the other substrates in the environment.

## 10. KAYNAKLAR

1. Amnon D, Serr DM, Czernobilsky B. Chemical composition of human oviduct fluid. *Fertility and Sterility* 1973; 24 (6): 435-439.
2. Arat S, Bağış H, Çırakoğlu B. Fare ırklarında tek hücreli embriyoların ovidukta transfer çalışmaları. *Journal of Vet and Animal Science* 1994; 18: 169-173.
3. Arat S. Culture and transfer of eight and sixteen cell zona free mouse embryos into uterus. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences* 1995; (19): 321-323.
4. Arat S. Suitable recipients for successful development of cultured eight-sixteen cell zona free mouse embryos. *Journal of Vet. Animal. Science* 1997; 21: 307-311.
5. Armstorg DT. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 1993; 39: 7-24.
6. Avery BM, Brandenhoff HR, Greve T. Development of in vitro matured and fertilized bovine embryos, cultured from days 1-5 post insemination either Menozo-B2 medium or in Hecm-6 medium. *Theriogenology* 1995; 44: 935-945.
7. Bağış H. Transgenik fare eldesine yönelik çalışmalar. İ. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 1994.
8. Barak Y, Goldman S, Gonen Y, Nevo Z, Bartoov B, Kogowoski A. Does glucose affect fertilization development and pregnancy rates of human in vitro fertilized oocytes. *Human Reprod.* 1998; 13: 203-211.
9. Bavister BD, Leibfried ML, Lieberman G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. *Biology of Reproduction* 1983; 28: 235-247.
10. Bavister BD. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. *Theriogenology* 1988; 29 (1): 143-154.
11. Bavister BD. Co-culture for embryo development: is it really necessary?. *Human Reprod.* 1992; 7(10): 1339-1341.

12. Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: Facts and Artifacts. *Journal Reprod. Fertil.* 1993; Abstract Series (12): 5.
13. Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote. *Proc.N.A.S.* 1967; 58: 560-567.
14. Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijinders PM, Verveld M, Zeilmeker GH. *Laboratuary Aspects of In Vitro Fertilization.* 1996; Organon.
15. Brinster RL. Studies on the development of mouse embryos in vitro. *Journal Reprod. Fert.* 1965; 10: 227-240.
16. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S. The search for improved in vitro systems should not be ignored embryo co-culture may be one of them. *Human Reprod.* 1993; 8: 1155-1162.
17. Boone RW, Shapiro SS. Quality control in the in vitro fertilization laboratuary. *Theriogenology.* 1990; 33 (1): 23-50.
18. Borland RM, Hazra S, Biggers JD, Lechene P. The elemental composition of the enverionments of the gametes and preimplantion embryo durig the initiation of pregnancy. *Biology of Reprod.* 1977; 16: 147-157.
19. Borland RM, Biggers JD, Lechene CP, Taymor ML. Elemental composition of fluid in the human fallopian tube. *Journ. Reprod. Fert.* 1980; 58: 479-482.
20. Campbell KHS, Mcwhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380: 64-66
21. Chatot CL, Ziomek CA, Bavister BD, Lewis JL, Torres I. An improved culture medium supports development of random bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J .Reprod. Fert.* 1989; 86: 679-688.
22. Choi YH, Sang S, Toyoda Y. In vitro fertilization and embryonic development in BALB/C mice. *Theriogenology .* 1998; 49 (1): 281.
23. Dandekar VP, Glass HR. Development of mouse embryos in vitro is affected by strain and culture medium. *Gamete Research* 1987; 17: 279-285.
24. Demir R. İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi. Akdeniz Ü. Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı. Palme Yayıncılık 1995.

25. Downs MS, Wastropolo AM. Culture conditions affect meiotic regulation in cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Molecular Reprod. And Fert.* 1997; 46: 551-556.
26. Dumoulin JCM, Evers JLH, Michiels AHJC, Pieters MHEC, Bras M, Land JA, Geradets JPM. Modulation of embryonic Na<sup>+</sup> ATPase activity and mouse preimplantation development in vitro in media containing high concentration of potassium. *Molecular Reprod. And Develop.* 1993; 36: 329-327.
27. Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biology of Reprod.* 1994; 50: 1027-1033.
28. Evecen M. Fare Embriyolarının In vitro Kültüründe Farklı BSA Oranlarının Gelişime Etkisi. I. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Sun' i Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İstanbul, 1999.
29. Evrim M, Güneş H. Biyometri Ders Notları. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını Ders Notu No:81, 1998.
30. Fraser LR. Potassium ions modulate of mouse sperm fertilizing ability, acrosome reaction and hyperactivated motility in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1983; 69: 539-553
31. Gandolfi F, Moor RM. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *Journal. Reprod. Fert.* 1987; 81: 23-28 .
32. Goto K, Iwai N, Ide K, Takuma Y, Nakanishi. Viability of one-cell bovine embryos cultured in vitro: comparison of cell-free culture with co-culture. *Journal of Reproduction and Fertility.* 1997; 100: 239-243.
33. Hafez ESE. *Reproduction in Farm Animals.* 5<sup>th</sup> Ed. Lea and Febiger Philadelphia. 1987.
34. Hartmann JF. *Mechanism and Control of Animal Fertilization.* 2<sup>nd</sup> ed. Department of Reproductive Biology Merck Institute for Therapeutic Research Rahway, New Jersey 1983.
35. Hogan B, Constantini F, Lacy E. *Manipulating The Mouse Embryo A Laboratory Manual.* 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbour Laboratory, Newyork 1986.

36. Hoppe PC, Whitten WK. An albumin requirement for fertilization of mouse eggs in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1974; 39: 433-436
37. Houghton DF, Thompson GJ, Kennedy CJ. Oxygen consumption and energy metabolism of the early mouse embryo. *Molecular Reproduction And Development* 1996; 44: 476-485.
38. Hsu YC. Embryo Growth and Differentiation Factors in Embryonic Sera of Mammals. *Developmental Biology* 1980; 76, 465-474.
39. Ivanova M, Mollova MG Ivanova-Kicheva M, Djarkava P, Somlev B. Effect of cryopreservation on zona binding capacitating of canine spermatozoa in vitro. *Theriogenology* 1992; 52:163-170
40. İleri İK, Ak K, Pabuççuoğlu S, Birlir S. Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun' i Tohumlama. *İ. Ü. Veteriner Fakültesi Ders Notu*, No: 84.1998.
41. Jin-Hoi K, Jung-ha HS, Hoon-Taek L, Kill-Saeng C. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Mol. Reprod. and Develop.* 1997; 46: 515-526.
42. Kane MT. The effects of pH on culture of one-cell rabbit ova to blastocysts in bicarbonate buffered medium. *J. Reprod. Fert.* 1973; 38: 477-480
43. Kane MT, Buckley NJ. The effects of inhibitors of energy metabolism on the growth of one-cell rabbit ova to blastocysts in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1977; 49: 261-266
44. Kato H, Minami N, Yamada M, Utsumi K. Effects of mouse oviducts on the development of bovine ivm/ivf embryos in a serum free medium. *Theriogenology* 1994; 41(1): 224.
45. Kato Y, Tsunoda Y. Effects of the culture density of mouse zygotes on the development in vitro and in vivo. *Theriogenology.* 1994; 41: 1315-1322
46. Kılıçoğlu Ç. The in vitro cultivation of mouse ova from one cell to blastocyst. *A. Ü. Vet. Fak. Derg.* 1985; 32 (2): 301-310.
47. Kite S, Irritani A, Bavister BD. Effects of volume culture media and type of culture dish on in vitro development of hamster 1-cell embryos. *Theriogenology* 1997; 47: 541-548.
48. Knobil E, Neil JD. *The Physiology of Reproduction.* 2<sup>th</sup> Ed. Vol. 1. Lea and Febiger. New York 1994

49. Kono T, Kwon OY, Nakahara T. Development of vitrified mouse oocytes after in vitro fertilization. *Cryobiology* 1991; 28: 50-54.
50. Kraemer DC, Bowen MJ. Embryo Transfer in Laboratory Animals. In W. P. Saunders. Co. Current Therapy in Theriogenology. Philadelphia, 1986; 73-76.
51. Lane M, Gardner DK. Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro. *Human Reprod.* 1992; 7 (4): 558-562.
52. Lane M, Gardner DK. Amino acids increase mouse embryo viability. *Theriogenology* 1994; 41(1): 233.
53. Lawitts JA, Biggers JD. Overcoming the 2-cell block by modifying standard components in a mouse culture medium. *Biology of Reprod.* 1991; 45: 245-251.
54. Lawitts JA, Biggers JD. Optimization of mouse embryo culture media using simplex methods. *J. Reprod. Fert.* 1991; 91: 543-556.
55. Leese HJ. The formation and function of oviduct fluid. *J. Reprod. Fert* 1988; 82: 843-856.
56. Martin KL, Leese HJ. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. *Molecular Reprod. And Fert.* 1995; 40: 436-443.
57. Menezo Y, Veiga A, Benkhalifa M. Improved methods for blastocyst formation and culture. *Human Reproduction.* 1998; 13: 256-265.
58. Menino AR, Cheek HK, O'clary JL. The effects of bovine serum albumin bovine uterine fluid and heat-treated bovine serum on in vitro mouse embryo development *Theriogenology.* 1985; 23 (3): 461-472.
59. Minami N, Kato H, Inoue Y, Yamada M. Utsumi K, Iritani A. Nonspecies-specific effects of mouse oviducts on development of bovine ivm/ivf embryos by a serum free co-culture. *Theriogenology.* 1994; 41:1435-1445.
60. Miyamoto H, Chang MC. Development of mouse eggs fertilized in vitro by epididimal spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1972; 30: 135-137.
61. Mognetti B, Leppens G, Sakkas D. The development of preimplantation mouse parthenogenones in vitro in absence of glucose influence of the



- maternally inherited componenets. *Molecular Reproduction And Development* 1996; 43: 421-427.
62. Moore HDM, Bedford JM. An in vivo analysis of factors influencing the fertilization of hamster eggs. *Biology of Reproduction* 1975; 19: 879-885.
63. Nieder GL, Corder CL. Pyruvate and lactate levels in oviducts of cycling, pregnant and pseudopregnant mice. *Biology of Reproduction* 1993; 28: 566-574.
64. Niemierko A, Komar A. Cytochalasin b induced triploid in mouse oocytes fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* 1976; 48: 279-284.
65. Noda Y, Matsumoto H, Umaoka Y, Tatsumi K, Kishi J, Mori T. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Molecular Reproduction and Development* 1991; 28 35: 356-360.
66. Özkoca A. Sığırlarda Reproduksiyon ve Infertilite. I. Ü. Veteriner Fakültesi Yayınları (3433). Gür-Ay Matbaası, İstanbul 1986.
67. Pabuççuoğlu S. Tavşan embriyolarının kazanılması ve kültüre edilmelerinden sonra transferleri üzerinde araştırmalar. I.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi. İstanbul 1991.
68. Pomp D, Critser ES, Rutlege JJ. Lower sodium lactate in whittens medium improves in vitro developmental capacity of one-cell mouse embryos. *Theriogenology* 1988; 29 (5): 1019-1025.
69. Quinn P, Kerin FJ, Warnes MG. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertility and Fert.* 1985; 44 (4): 493-498.
70. Richardson LL, Hamner CE, Oliphant G. Some characteristics of an inhibitor of embryonic development from rabbit oviductal fluid. *Biology of Reproduction* 1980; 22: 553-559.
71. Roblero SL, Riffo DM. High potassium concentration improves preimplantion development of mouse embryos in vitro. *Fertility and Sterility.* 1986; 45: 412-416.
72. Sağırkaya H. Değişik Gelişim Dönemlerinde Bulunan Hibrit Fare Embriyolarının Vitrifikasyon Yöntemiyle Dondurulması. Uludağ Üniversitesi,

- Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı  
Doktora Tezi, 2001.
73. Sakkas D, Trounson AO. Formulation of a complex serum free reproduction tract. *J. Reprod. Fert.* 1991; 3: 99-108.
  74. Salahuddin S, Ookutsu S, Goto K, Nakanishi Y, Bagata Y. Effects of embryo density and co-culture of unfertilized oocytes on embryonic development of in vitro fertilized mouse embryos. *Human Reprod.* 1995; 10: 2382-2385.
  75. Schini AS, Bavister BD. Two-cell block to development of cultured hamster embryos is caused by phosphate and glucose. *Biology of Reprod.* 1988; 39: 1183-1192.
  76. Seshagiri B P, Bavister BD. Glucose inhibits development of hamster 8-cell embryos in vitro. *Biology of Reprod.* 1989; 40: 599-606.
  77. Smith TT, Yanagimachi R. Capacitation status of hamster spermatozoa in the oviduct at various times after mating. *J. Reprod. Fert.* 1989; 86: 255-261.
  78. Tekeli T, Güler M, Aksoy M. Fare ovumlarının in vitro fertilizasyonu üzerine çalışmalar. *S. Ü. Vet. Fak. Derg.* 1991; 6(1): 13-15.
  79. Usta S. Sığır ovumlarının in vitro fertilizasyonu. *Hayvancılık araştırma dergisi.* 1994; 4 (2): 82-84.
  80. Vergara GJ, Irwin MH, Moffatt RJ, Pinkert CA. In vitro fertilization in mice strain differences in response to superovulation protocols and effect of cumulus cell removal. *Theriogenology* 1996; 47: 1245-1252.
  81. Watson JA, Watson PH, Warners D, Walker KS, Armstrong TD, Seamark FR. Preimplantation development of in vitro-matured and in vitro-fertilized ovine zygotes: comparison between coculture on oviduct epithelial cell monolayers and culture under low oxygen atmosphere. *Biology of Reproduction* 1994; 50: 715-724.
  82. Whittingham DG. Culture of mouse ova. *Journal Reprod.Fert.* 1971; 14: 7-21.
  83. White KL, Hehnke LF, Rickords LL, Southern DL, Thompson JR, Wood TC. Early embryonic development in vitro by coculture with oviductal epithelial cells in pigs. *Biology of Reproduction.* 1989; 41: 425-430.

84. Whitten WK, Biggers JD. Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *Journal Reprod. Fert.* 1968; 17: 399-401.
85. Willey LM, Yamami S, Muyden DV. Effect of potassium concentration type of protein supplement and density on mouse preimplantation development in vitro. *Fertility and Sterility.* 1986; 45 (1): 111-119.
86. Wiemer EK, Cohen J, Tucker JM, Godke AR. The application of co-culture in assisted reproduction 10 years of experience with human embryos. *Human Reprod.* 1988; 13: 226-238.
87. Wiemer EK, Anderson A, Stewart B. The importance of water quality for media preparation. *Human Reprod.* 1998; 13: 166-172.
88. William RB, Shapiro SS. Quality control in the in vitro laboratory. *Theriogenology.* 1990; 33 (1): 23-51.
89. Yeung WSB, Ho CP, Lau EYL Chan STH. Improved development of human embryos in vitro by a human oviductal cell co-culture system. *Human Reprod.* 1992; 7 (8): 1144-1149.

## 11. ÖZGEÇMİŞ:

1973 yılında Çanakkale'nin Ezine ilçesinde doğdum. İlk eğitimimi Muallim Naci İlkokulu'nda, Orta eğitimimi Ahmet Rasim Ortaokulu'nda ve Lise eğitimimi Şişli Terakki Lisesi'nde tamamladım.

1990 yılında eğitim hayatıma başladığım, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 1995 yılında mezun oldum. 1995 yılının Ağustos ayında İ. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne doktora öğrencisi olarak kayıt oldum. 1997 yılının Eylül ayında İ. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya başladım.

1 Eylül 2000 tarihinde, Danimarka Hükümetinden kazanmış olduğum bursla, "Copenhagen The Royal Agricultural and Veterinary Faculty"de 4 ay süreyle, sığırlarda in vitro fertilizasyon, androloji, in vitro olarak elde edilmiş embriyoların laporoskopik yöntemle transfer edilmesi ve klonlama çalışmalarına katıldım.

