

18188

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DOĞUM VE REPRODÜKSİYON HASTALIKLARI ANABİLİM DALI  
REPRODÜKSİYON VE SUN'İ TOHUMLAMA BİLİM DALI

**TAVŞAN EMBRYOLARININ KAZANILMASI VE  
KÜLTÜRE EDİLMELERİNDEN SONRA  
TRANSFERLERİ ÜZERİNDE ARAŞTIRMALAR**

DOKTORA TEZİ

SERHAT PABUÇÇUOĞLU

**T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi**

DANIŞMAN  
Doç. Dr. İ. KÂMURAN İLERİ



Bu alışma TUBİTAK tarafından VHAG-759 numaralı proje ile desteklenmiştir.

## TEŐEKKÜR

Bağta Doktora danıőmanım olan hocam Doç,Dr.f.Kamuran ileri olmak üzere, Anabilim Dalımız Baőkanı hocam Prof.Dr.Adnan Özkoca'ya değerli bilgi ve desteklerini esirgemediklerinden teőekkürlerimi arz ederim.

Ayrıca ęalıőmalarım sırasında bana yardımlarından dolayı Araş.Görev.Sema Usta ve Bilim Dalımızda görevli arkadaşlarıma teőekkürü borę bilirim.



## iÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	3
2. LİTERATÜR BİLGİSİ.....	6
2.1. Dişi tavşanlarda reproduksiyon.....	6
2.1.1. Reprodüktif organlar ve puberteye ulaşma yaşı.....	6
2.1.2. Seksüel aktivite ve östrus siklusları.....	6
2.1.3. Ovulasyon mekanizması ve luteal faz.....	7
2.1.4. Gebeliğin oluşması ve embryoların gelişim safhaları.....	8
2.2. Embryo transferi.....	8
2.2.1. Embryo transferinin tarihçesi.....	8
2.2.2. Embryo transfer tekniği.....	10
2.3. Tavşanlarda embryo transferi.....	13
2.3.1. Vericilerin hazırlanması (süperovulasyon).....	14
2.3.2. Embryo kazanılması.....	20
2.3.3. Kazanılan embryoların değerlendirilmesi.....	22
2.3.4. Alıcıların hazırlanması (senkronizasyon).....	23
2.3.5. Embryoların alıcılara transferi.....	26
2.4. Vericilerden kazanılan embryoların in vitro koşullarda saklanması.....	27
2.4.1. in vitro kültür sistemleri.....	29
2.4.2. in vitro kültür koşulları.....	32
2.4.3. in vitro kültür mediumu pH'sının etkisi.....	35
2.4.4. in vitro kültür mediumunun enerji kaynakları.....	38
2.4.5. in vitro kültür mediumunun protein kaynakları.....	42
3. MATERYAL VE METOD.....	48
3.1. Vericilerde süperovulasyon ve çiftleştirilmeleri.....	48
3.1.1. Toplam 225 IU PMSG'nin tek enjeksiyonla verilmesi.....	49

3.1.2. Toplam 225 IU PMSG'nin üç eşit doza bölünerek kas içi yolla verililişi.....	49
3.2. Alıcıların senkronizasyonu.....	49
3.3. Embryoların kazanılması ve değerlendirilmeleri.....	50
3.4. Embryoların in vitro kültürleri.....	52
3.4.1. in vitro kültür ortamı.....	52
3.4.2. Kültür mediuımları.....	52
3.4.3. Kültür kapları.....	55
3.4.4. Kültür periodları ve embryoların kontrolleri.....	56
3.5. Kültür sonrası sağlıklı embryoların transferi.....	57
4. BULGULAR.....	58
4.1. Süperovulasyon sonuçları.....	58
4.1.1. Toplam 225 IU PMSG'nin tek enjeksiyonla verililişi...	58
4.1.2. Toplam 225 IU PMSG'nin üç enjeksiyonla verililişi....	60
4.2. Ovidukt yıkaması sonucunda elde edilen bulgular.....	62
4.2.1. Tek enjeksiyonla 225 IU PMSG uygulanan vericilerden kazanılan embryolar.....	62
4.2.2. Üç enjeksiyon uygulanan vericilerden kazanılan embryolar.....	64
4.3. in vitro kültür sonuçları.....	66
4.4. Kültür sonrası transfer bulguları.....	85
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	87
6. ÖZET.....	98
7. SUMMARY.....	101
8. LİTERATÜR LİSTESİ.....	104

## 1. GİRİŞ

Dünya hayvan yetiştiriciliğinde bilimsel yöntemlerin uygulama alanına girmesinden sonra, yüksek verimli hayvanlardan yaşamları süresince daha fazla yararlanma yöntemleri araştırılmaya başlanmıştır. Bu gelişmeler ışığında da reproduksiyonla ilgili çalışmalar ciddi bir şekilde ele alınmıştır. Başlangıçta; iyi verim özelliklerine sahip annelerden elde edilen yavrular damızlık olarak kullanılırken, daha sonra yüksek verimli ana ve babaların erkek yavruları tohumlamada kullanılmış ve aynı özellikleri taşıyabilecek yavruların sayılarını artırma yollarına gidilmiştir. Erkek damızlıklardan daha fazla yararlanma amacıyla da sun'î tohumlama yöntemleri geliştirilmiştir. Dünyada ve ülkemizde hayvan popülasyonunun genotip ve fenotipini iyileştirmek için sun'î tohumlama yaygın olarak kullanılmaktadır.

Ülkemiz hayvan potansiyeli açısından büyük, buna karşın, hayvansal ürünler yönünden oldukça yetersiz bir durumdadır. 1920'li yıllardan bu yana uygulamaya konulan sun'î tohumlama çalışmaları, istenilen düzeye çıkmadığından hedeflenen noktaya ulaşamamıştır. Sun'î tohumlama çalışmaları ile hayvan popülasyonunu genotipik olarak iyileştirmek oldukça uzun zaman almaktadır. Zira, sun'î tohumlama uygulamaları ile en az iki generasyonda, ancak %75'lik bir saflık derecesine ulaşılabilir. Bunun yanı sıra, toplumumuzun sosyoekonomik yapısı ve yetiştirici eğitiminin de yetersiz oluşu, çalışmaları etkileyen negatif faktörlerdendir. Ülkemiz hayvancılığının konumu, güçlü bir seleksiyon ile genotipik ve fenotipik iyileştirme programlarını zorunlu kılmaktadır.

Araştırmacılar elit erkek damızlıklardan geniş çapta yararlanma yollarının yanı sıra, elit dişilerden de kısa süreler içerisinde daha fazla yavru elde etme yollarını geliştirmişler-

dir. Bu çalışmalar günümüzde embryo transferi olarak adlandırılmaktadır. Embryo transferi uygulamalarının sun'i tohumlamaya üstün yanı ise, saf bir dişinin(donor) süperovulasyon sonrasında, saf olan boğayla tohumlanması sonucu, ondan elde edilen embryoların gerek genotipik ve gerekse fenotipik yönden yetersiz dişilere(recipient) transferi ve sonuçta bunlardan elde edilen yavruların saf genotipik özellikleri taşımasıdır. Ancak bu sayede mevcut hayvan potansiyelinin genotipik özellikleri, yalnız bir uygulama ile %100 saflık derecesine ulaştırılabilmekte, sonuç olarak da verim yönünden üstün vasıflı hayvanların sayısı kısa sürede maksimal seviyede artırılabilir. Bu konudaki çalışmalar son 35-40 yıl içinde yaygınlık kazanmış ve reproduksiyon faaliyetleri konusunda detaylı bilgiler edinilmiştir.

Ülkemizde, üniversitelerimiz bünyesinde son 10 yılda tavşanlarda [Kılıçoğlu ve ark.(52); Özkoca ve ark.(64)], koyunlarda [Kılıçoğlu ve ark.(54)]; sığırlarda [İleri ve ark. (38,39); Sönmez(71)] ve Ankara Keçilerinde [Kılıçarslan (51)] başarılı embryo transfer uygulamaları yapılmıştır.

Embryo transfer uygulamalarında, genital organlarda gelişmiş olan embryoların dışarıya alınıp diğer alıcılara transferleri yapılınca kadar in vitro koşullarda bekletilmeleri gerekmektedir. Embryoların in vitro koşullarda canlılığını sürdürebilmesi için, ortamın sıcaklığının, besin kaynaklarının, osmolarite ve pH'sının optimal derecede in vivo şartlara yakın olması zorunludur. İşte bu zorunluluklar, fertilizasyon olayının, embryoloji ve bununla ilgili fizyolojik ve biokimyasal konuların araştırmaya açılmasını, embryo transferin in vitro kültür çalışmaları ile kombine olarak yürütülmesini de beraberinde gündeme getirmektedir.

Diğer hayvanlara uygulanacak yöntemlere temel oluşturabilmesi için, bakım, barındırma ve reproduktif faaliyetlerinin uygunluğu nedeniyle çalışmamızda deney hayvanı olarak tavşan kullanıldı. Bu çalışmada, embryo transfer programlarında kullanılan kimi süperovulator ajanlardan PMSG'nin uygulanış yönteminin,

tavşanlardan kazanılan embryoların kalite ve kantitesi üzerine etkisini belirlemek, embryoların aşama aşama tanınıp gelişim devrelerinin karşılaştırılabilmesi için 24 saatlik sürelerde in vitro koşullarda geliştirilmesi, 96 saat süre boyunca bu gelişim aşamalarını takip edebilmek için en uygun ortamın, mediumun ve mediuma katılacak olan ideal amino nitrojen kaynaklarının belirlenmesi, in vitro koşullarda 96 saat süre ile kültüre edilen embryoların alıcılara transferlerinden gebelik elde edilmesi ve laboratuvarımızın gelecekte yapılması düşünülen in vitro araştırmalara, bu çalışma ile hazırlanması amaç edinildi.



## 2.LiTERATÜR BiLGiSi

### 2.1. DiŞi TAVŞANLARDA REPRODÜKSİYON:

#### 2.1.1:Reprodüktif Organlar ve Puberteye Ulaşma Yaşı:

Puberteye ulaşmamış bir dişide ovaryumlar oldukça küçüktür, er-  
ginleşmiş bir hayvanda ise 1.5 x 0.5 cm boyutlarında ve yaklaşık  
olarak 0.25 - 0.85 g ağırlıktadırlar. Yaşlandıklarında ise  
ovaryumlar atrofiye uğrayarak 0.10 - 0.20 g ağırlılığa kadar düşer-  
ler(20,50). Ergenliğe ulaşmış bir hayvanda ovidukt yaklaşık 10 -  
12 cm'dir. Kornu uteriler dorso-lateral yönde hafifçe kıvrım gös-  
terirler. Uterus duvar kalınlığı yaklaşık olarak 4 mm kadardır.  
Her iki kornu uteri, iki ayrı serviks ile vaginaya açılır. Vagina  
ise dorsal ve ventraldan basılmış, yassı görünüşte, 3 - 6 cm  
uzunluğundadır(20,24,56).

Tavşanlarda puberteye, yani seksüel olgunluğa ulaşma  
yaşı ırklara göre değişkendir. Küçük ırklarda, Polish Tavşanı, 4  
ay; orta boy ırklarda, Beyaz Yeni Zellanda Tavşanı, 6 - 7 ay; bü-  
yük boy tavşanlarda ise, Flemish Tavşanı, 9 - 12 aydır. Tavşanlar  
yaklaşık olarak üçüncü yaşlarının sonuna kadar reprodüktif araş-  
tırmalarda ve damızlık olarak kullanılabilirler.

2.1.2. Seksüel Aktivite ve Östrus Siklusları: Yaban  
tavşanlarında seksüel aktivitenin genelde şubattan mayıs ayına  
uzanan dönemlerde ortaya çıktığı bildirilmektedir(50). Buna kar-  
şın, evcillerde hemen hemen tüm yıl boyunca kızgınlık gözlene-  
bilir. Temmuz, ağustos ve eylül aylarında kızgınlık düzensiz,  
aşım sonucunda elde edilen yavru sayısı az olmakta veya hiç yavru  
elde edilememektedir. Tavşanlar diğer laboratuvar hayvanlarının  
aksine spontan olarak ovulasyona sahip değildir. Tavşanlarda  
ovulasyonun oluşabilmesi için çiftleşmeleri gereklidir. Bu tip  
ovulasyon şekline proveke ovulasyon adı verilmektedir. Çiftleşme  
sinirsel uyarıları artırmakta, buna bağlı olarak LH salgılanmakta  
ve ovulasyon oluşmaktadır. Bu sayede de ovulasyonları kontrol  
altına alınabilmektedir(24,34,56,61). Lesbouyries(56), 19. YY

başlarında Cost'un tavşanlarda ilgi çekici araştırmalar yaptığını ve erkekle çiftleşmeyen bir dişide korpus luteumların bulunmadığını, graff folliküllerin patlamadığını izlediğini bildirmiştir. Olgunlaşan folliküller çiftleşme olmadığı sürece atresie olmakta ve bunların ardından yeni folliküller gelişmektedir. Folliküller gelişmelerin bu şekilde birbirini izlemesi nedeniyle, hayvanlar tüm sezon boyunca östrusta olup her an çiftleşmeye hazırdırlar(34,56).

2.1.3. Ovulasyon Mekanizması ve Luteal Faz: Tavşanlarda ovulasyon, kedi, sansar, deve gibi hayvanlarda gözleendiği şekilde, çiftleşme sonrasında, yani proveke olarak gerçekleşir(24,34,56,61). Tavşanlarda ovulasyonun çiftleşme gibi çok güçlü uyarılar ile oluşması dışında, ovulasyon oluşturacak olan LH veya benzer etkiye sahip ajanların iv. olarak verilmesiyle de gerçekleştirilebilmektedir(24,33,56,59,61). Diğer hayvanlarda ovulasyon mekanizması, kanda bulunan gl. pituitaria kökenli gonadotrop hormonların ve gonadal hormonların etkileşimi ile başlatılmaktadır. Kanda bulunan FSH ve buna bağlı olarak östrojen hormonu seviyesinin artması, hypothalamus ve dolayısıyla gl.pituitaria üzerine negatif feed back olarak etkilemekte, böylece FSH salınımı azalıp LH salınımı artmakta ve sonuçta da ovulasyon gerçekleşmektedir(24,61,65,66). Tavşanlarda ise ovulasyon mekanizmasının(LH salınımının) başlatılması, seksüel aktivite yani vaginal uyarımlarla gerçekleşmektedir. Vaginal uyarımlar hypothalamusu sinir yoluyla etkileyerek kontrol mekanizmasını harekete geçirmekte ve böylece hypothalamus kontrolündeki gl. pituitariadan LH salınmaktadır. Çiftleşmeden veya ovulatör ajanın iv. olarak verilışinden 10-12 saat sonra 4-12 adet ovum ovule olmaktadır. Ovulasyon sonrasında ise korpus luteumlar gelişirler(33,34,50,55,56). Luteal fazın başlamasıyla birlikte uterus endometriumu gebeliğe hazırlanır, östrus süresince düz olan epitel yüzeyi dantelalı bir şekil oluşturur. Fertilizasyon oluştuğu taktirde gebelik 28-32 gün sürer ve bu süre içinde korpus luteumlar aktivitesini sürdür-

rür. Çiftleşme veya dışarıdan verilen ajanlarla ovulasyon sağlanmış, ancak fertilizasyon oluşmamış ise, dişide yalancı gebelik oluşur. Yalancı gebelik sırasında da uterustaki gelişmelere memelerdeki gelişmeler eşlik ederler. Korpus luteumlar tavşanlarda, ovulasyondan sonra yaklaşık olarak 18 gün aktivitelerini sürdürür. Korpus luteumların regresyonu kabaca, 18.günün sonunda renginin sarıdan pembeye dönüşmesiyle belirlenir(33,50,53,56,62).

**2.1.4. Gebeliğin Oluşması ve Embryoların Gelişim Safhaları:** Tavşanlarda ırkların özelliklerine göre 4-12 adet arasında ovum ovulasyonla bırakılır. Fertilizasyonla beraber gebelik başlar. Hahn(34)'ın belirttiğine göre, fertilizasyondan sonra oluşan embryoların gelişim safhaları Tablo 1'de görüldüğü gibidir.

Tablo 1. Tavşanlarda çiftleşme veya tohumlama zamanına göre in vivo olarak embryoların gelişimi.

Çiftleşme veya tohumlamadan sonra(saatt)	Embryoların gelişim Devreleri	Lokalizasyon
24 - 30	2 - 4 hücreli	Ovidukt
31 - 36	4 - 8 "	"
37 - 42	8 - 16 "	"
43 - 48	Erken Morula	"
49 - 60	Morula	Ovidukt-Uterus
61 - 72	Geç Morula	" "
73 - 84	Erken Blastocyst	Uterus
85 - 96	Genişlemiş Blastocyst	"
97 - 108	" "	"

## **2.2. EMBRYO TRANSFERİ:**

**2.2.1. Embryo Transferinin Tarihçesi:** Embryo transfer çalışmalarının kökeni 1890'lı yıllara kadar dayanmaktadır. İlk defa başarılı olarak döllenmiş ovanın transferinin, tavşanlarda Heape tarafından yapıldığı çeşitli araştırmacılarca bildirilmektedir(23,33,34,52,59,64). Daha sonra embryo transfer

çalışmalarına Gine Domuzu(hamster), fare, rat, tavşan gibi laboratuvar hayvanlarında devam edilmiştir(23). Hafez(33)'in bildirdiğine göre, embryo transfer çalışmalarındaki gelişmelerin tarihçesi Tablo 2'de görüldüğü gibidir.

Tablo 2. Embryo transferinin tarihsel gelişiminin özeti.

Araştırmacı ve Yılı	Olay	Canlı Türü
Heape, 1890	ilk başarılı embryo transferi	Tavşan
Beidl & ark., 1922	Başarılı embryo transferi	Tavşan
Nicholas, 1933	" " "	Rat
Warwick & Berry, 1949	" " "	Koyun ve Keçi
Kvansickii, 1951	" " "	Domuz
Willet & ark., 1951	" " "	inek
Marden & Chang, 1952	ilk olarak 10°C'da saklanmış embryonun kıtalar arası deniz yoluyla nakli	Tavşan
Albert Livestock	ilk kez çiftlik hayvanlarında ticari embryo transfer şirketi kuruldu.	Sığır
Wittingham & ark. 1973	Uzun süreli dondurulmuş embryodan yavru elde edildi.	Fare
Wilmot & Rowson, 1973	" " "	Sığır
1974	Uluslararası embryo transfer derneği kuruldu.	
Stepto & Edwards, 1978	Embryo transferi sonrasında ilk kız çocuğu doğdu.	insan

Drost(23)'un bildirdiğine göre ilk olarak Amerika'da 1932 yılında Berry ve Horlmacher, evcil koyun ve keçide başarılı transfer yapmışlardır. 1970'li yılların başlarına kadar sığırlar da dahil olmak üzere embryo transfer çalışmaları cerrahi yöntem kullanılarak gerçekleştiriliyordu. 1970'li yılların başlarında sığırlarda gerçekleştirilen cerrahi olmayan yöntemle, embryo transferi çalışmalarına kolaylık ve uygulamada yaygınlık kazandırılmıştır. Cerrahi olmayan yöntem ile operasyon riski ekarte edilmiş ve bunun sonucu olarak da, verici ve alıcıların, embryo transfer programlarında birkaç kez kullanılabilmesi sağlanmıştır(23,59).

Embryo transfer çalışmalarında son 25 yılda, embryoloji ile reproduksiyon fizyolojisi hakkında uyanan ilgi ve merak saye-

sinde büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu çalışmalara gen mühendisliğinin de eşlik etmesi sonucunda BiOTEKNOLOJİ olarak adlandırılan bir bilim dalı şekillenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar gen mühendisliği, embryoların bölünmesi, in vitro kültür, in vitro fertilizasyon ve klonlama gibi konular üzerinde yoğunluk kazanmıştır(16,23,25,33,48,55).

Hayvanlarda yapılan çalışmaların ışığında, 1978 yılında insanlar üzerinde başlatılan in vitro fertilizasyon ve embryo transferi çalışmaları, halen başarılı şekilde sürdürülmekte ve gün geçtikçe ilerleme göstermektedir(33). Ülkemizde de embryo transfer çalışmaları, üniversitelerimiz bünyesinde başlatılmıştır. Kılıçoğlu ve ark.(52) ile Özkoca ve ark.(64) tavşanlarda; İleri ve ark.(38,39) ile Sönmez(71) sığırlarda; Kılıçoğlu ve ark.(54) koyunlarda; Kılıçarslan(51) keçilerde başarılı embryo transferi çalışmaları yapmışlardır.

2.2.2. Embryo Transfer Tekniği: Araştırmacılar embryo transfer çalışmalarını beş bölümde sınıflandırarak gerçekleştirmektedirler(17,23,33,46,53,55,57,66).

- 1- Verici(donor) hayvanlarda süperovulasyon.
- 2- Embryoların kazanılması.
- 3- Transfere kadar kazanılan embryoların invitro koşullarda saklanması.
- 4- Alıcı(recipient) hayvanların hazırlanması(Synchronization).
- 5- Embryoların alıcılara transferi.

Embryo transfer çalışmalarında kullanılan vericiler, elde edilecek olan embryoların sayılarını artırmak amacıyla süperovulasyona tabi tutulurlar. Süperovulasyonu sağlamak amacıyla çeşitli preparatlar kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalara göre çoğunlukla domuz gl. pituitariası kökenli FSH, gebe kısırak serumu kökenli PMSG ve menapausal kadından köken alan HMG'nin, eksojen

olarak yüksek dozda verilmesi ile tüm hayvan türlerinde süperovulasyon oluşturduğu ortaya konmuştur(4,23,24,33,34,55,59,61).

Süperovulasyon çalışmalarında gelişen folliküllerin ovulasyonlarını sağlamak için, yine eksojen olarak LH hormonu enjeksiyonları yapılması gerekmektedir. LH preparatı olarak pituitari gland kökenli LH kullanılabileceği gibi, insan plasentası kökenli hCG(humon chorionik gonadotropin)'den de yararlanılabilir.

Hafez(33)'in yapmış olduğu açıklamaya göre, hayvan türlerinde PMSG ve FSH hormonlarının süperovulasyonu, hCG ve LH hormonlarının ise ovulasyonu teşvik etmek amacıyla kullanımları ve dozları Tablo 3'de görüldüğü gibidir.

Tablo 3. Gonadotropinlerin süperovulasyon için dozları.

Hayvan türü	Östrus siklusunun günü	Folliküler büyüme için gonadotropin		Ovulasyon için gon.	
		PMSG(IU)b	FSH(mg)c	hCG(IU)d	LH(mg)
İnek	15 - 16a	1500-3000	20-50	1500-2000	75-100
Dana	-	1000-2000	20-50	1000-1500	50-75
Keçi	16 - 17a	1000-1500	12-20	1000-1500	50-75
Oğlak	-	1000-1200	10-15	1000-1500	50-75
Koyun	12 - 14a	1000-2000	10-15	1000-1500	50-75
Kuzu	-	1000-1200	10-15	1000-1500	50-75
Domuz	15 - 16	750-1500	10-20	500-1000	25-75
Tavşan	-	25-75	2-3	25-75	2-3

a- Alternatif olarak, PMSG uygulamasından, ineklerde 2-3 gün, koyun ve keçilerde 1 gün sonra lutolitik dozda PGF<sub>2</sub> verilecekse, PMSG uygulaması keçi ve ineklerde siklusun 6-15 günleri ve koyunlarda siklusun 6-13 günleri arasında yapılabilir.

b- PMSG kas içi veya deri altı yolla tek dozda uygulanır.

c- FSH günde bir veya günde iki kez, ineklerde 4-5 gün ve diğer hayvanlarda 3 gün bölünmüş dozlarda uygulanır.

d- LH veya hCG damar içi yolla, danalarda süperovulasyon tedavisi başladıktan 5 gün sonra, tavşanlarda 3 gün sonra, diğer türlerde ise östrus başladığında verilir. ineklerde, koyunlarda ve keçilerde folliküler gelişimi izleyerek endojen LH salınımı olduğundan, ovulasyon için gonadotropin enjeksiyon yapılmayabilir.

Gerek laboratuvar ve gerekse çiftlik hayvanlarında, embryolar arzu edilen gelişim safhalarına göre, özel sıvılarla ovidukt yada uterus lümeni yıkanarak kazanılmaktadır(4,8,10,14,

15,22,32,33,37,46,52,58,59,63,64,72,75). Embryoların kazanılmasında ovidukt yıkaması yöntemi kullanıldığında, yıkama fimbriadan uterus yönüne yapılabileceği gibi, uterustan fimbria yönüne de yapılabilmektedir. Ancak Hafez(33), domuz ve kısıraklar hariç, diğer türlerde bazan periovaryan yapışmalar gözlenirse de, çok az kayıpla yüksek oranda embryo elde edildiğinden fimbria yönüne yapılan yıkamaların tercih edildiğini belirlemektedir.

Cerrahi yöntemle uterus yıkamasında ise, utero-tubal bağlantı yerine yakın bir yerden küt bir kanülle lümen girilirken, kornu uteri de korpus yakınlarında alttan ve üstten bastırılarak tesbit edilmektedir. Utero-tubal bağlantı yerinden yıkama mediumu, kornu uteri gerginlik kazanıncaya kadar verilmekte ve korpus tarafından tesbit edilen bölgeye, ucuna polietilen boru takılmış olan kalın bir kanülle girilmektedir. Böylece embryolar polietilen boru aracılığı ile toplama kaplarına aktarılmaktadır. Diğer bir yöntemde ise, korpus tarafında yapılan küçük bir ensizyon deliğinden balonlu bir foley kateteri uterus kornusunun apikal bölgesine doğru yönlendirilip balonu şişirilerek lümen tesbit edilmekte ve kateter aracılığı ile verilen yıkama sıvısı tekrar aynı yoldan dışarıya alınmaktadır. Bu işlem mevcut embryoların tamamının toplanabilmesi için birkaç kez tekrarlanmaktadır (4,6,29,33,59,61,64). Cerrahi yöntemle embryo kazanılması laboratuvar hayvanlarının yanı sıra koyun, keçi, domuz, kısırak ve sığırlarda da uygulanmaktadır.

1970'li yıllara kadar cerrahi olarak uygulanan embryo transfer çalışmaları, bu yıllardan itibaren geliştirilen cerrahi olmayan yöntemle yapılmaya başlamıştır. Cerrahi olmayan embryo transfer tekniğinde, özellikle büyük baş hayvanlarda foley kateteri rektovaginal olarak serviksten geçirilerek kornu lümenine sokulmakta ve balonu şişirilerek buraya tesbit edilmektedir. Yıkama sıvısı kateter aracılığı ile dışarıdan verildikten sonra, rektumdaki el yardımıyla uterusu masaj uygulanarak uterus içindeki embryoların sıvı içinde yüzer duruma getirilmesi sağlanmaktadır. Böylece verilen sıvı, foley kateteri aracılığı ile dışarıya,

toplama kaplarına alınmaktadır. Bu uygulamada kazanılacak olan embryo sayısını artırmak amacıyla, uterus yıkaması birkaç kez tekrarlanmakta ve her kornu için yaklaşık 500 ml yıkama sıvısı kullanılmaktadır(4,23,33,55,59,61,71).

Embryo transfer çalışmalarında kullanılan yıkama sıvılarının embryolar için fizyolojik ortamı koruyacak yapıda olması gerekmektedir. Yapılan araştırmalar sonucunda, pH değeri açısından kanla eşit konumda,  $7.4 \pm 0.1$  pH'da, izotonik, osmolaritesinin de  $270 \pm 5$  mOsm'e eşit sıvıların en ideal olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca kullanılan mediumda enerji ve protein kaynağının da bulunması gerekmektedir. Protein kaynağı olarak kristalize Bovin Serum Albumini(BSA= Sığır serumu albumini) kullanılabileceği gibi, Föetal Buzağı Serumunun(FCS= Fetal Calf Serum) da kullanılabileceği ortaya konmuştur. Ayrıca yapılan çalışmalarda, aynı türden hayvanlardan alınan ve sıcakla işlem görüp inaktif hale getirilmiş homolog serumlar kullanılabileceği gibi, heterolog olarak aynı şekilde hazırlanmış serumların da aynı işlevi gördüğü anlaşılmıştır. Araştırmacılar çoğunlukla %1.5 BSA veya %1-2'lik FCS ve diğer serumları içeren Dubecco'nun Phosphat Buffered Salin(PBS) solusyonunu kullanmışlardır. Bunların yanı sıra kullanılan ekipmanın ve yıkama mediumlarının steril olması gerekmektedir. Mediumda oluşabilecek, olası bir kontaminasyona karşı her ml için 100 IU kristalize penicillin ve 0.5 streptomycin sulfat gibi antibiyotikler de katılmaktadır. Enerji kaynağı olarak glukoz ve pyruvattan yararlanılmaktadır(7,9,11,12,23,29,33,34,37,38,55,58,59,61,74). Embryoların ısı değişimlerine çok duyarlı oldukları yapılan araştırmalar sonucunda ortaya konulmuştur. Bu nedenle kullanılan tüm malzeme, yıkama ve saklama mediumları  $37^{\circ}\text{C}$ 'ta ayarlı olmalıdır.

Kazanılan embryolar, zonalarının durumu, hücresel homojenlik ve gelişim durumlarına göre değerlendirmeye alınırlar. Sığırlarda ve kısraklarda uterus yıkaması ile kazanılan embryolardan, değerlendirme sonucunda sağlıklı ve kazanıldığı anda bulunması gereken gelişme durumuna uygun olduğu belirlenen emb-



ryolar, payetlere çekilip transfer kateteri ile alıcının kornu uterusinin apeksine kadar girilerek bırakılırlar. Laboratuvar hayvanlarından kazanılan embryolar da yine, sağlıklı olarak değerlendirildikten sonra pastör pipeti aracılığı ile kazanıldıkları yere denk olarak transfer edilirler(6,23,33,34,55).

### 2.3. TAVŞANLARDA EMBRYO TRANSFERİ:

Embryo transfer çalışmaları ilk olarak tavşanlar üzerinde başlatılmıştır. Heape'nin 1890 yılında başlatmış olduğu çalışmalar 1920'li ve 1930'lu yıllarda daha bilinçli ve daha ayrıntılı olarak devam ettirilmiştir. Tavşanlarda embryo transfer çalışmaları aşağıda görülen program dahilinde yapılmaktadır.

- 1- Vericilerin hazırlanması(süperovulasyon).
- 2- Embryoların kazanılması.
- 3- Kazanılan embryoların değerlendirilmesi.
- 4- Alıcıların hazırlanması(senkronizasyon).
- 5- Embryoların transferi.

2.3.1. Vericilerin Hazırlanması(süperovulasyon): Tavşanlarda normal olarak 4-12 arasında ovulasyon oluşmaktadır. Embryo transfer çalışmalarında temel amaç, kazanılacak olan embryo sayısını artırmak olduğundan gonadotropinlerin dışarıdan verilmesi zorunludur. Eksojen olarak verilen gonadotropinler bazı hayvanların gl. pituitaria'larından(FSH-LH) izole edilebileceği gibi, gebe kısırakların serumundan(PMSG), menapoza girmiş kadınlardan da (HMG) izole edilmektedir. Hafez(32) tavşanlarda süperovulasyonu oluşturmak için PMSG'nin 25-75 IU'lık, FSH'in 2-3 mg'lık dozlarının süperovulasyonu oluşturacağını bildirmektedir.

Adams(3), tavşanlarda süperovulasyonu sağlamak için atın anterior pituitari ekstraktını kullandığını, verici olarak kullandığı 25 hayvanda, tavşan başına ortalama olarak  $39.8 \pm 2.3$  adet embryo kazandığını bildirmiştir.

Rottmann ve ark.(69) yaptıkları araştırmada, tavşanlarda süperovulasyonları oluşturmak için 60 IU PMSG ve bundan 72 saat sonra ovulasyonları oluşturmak için iv. olarak 60 IU hCG kullandıklarını açıklamıştır.

Kılıçoğlu ve ark.(52) tavşanlarda yaptıkları embryo transfer çalışmasında 150 IU PMSG enjeksiyonu ile ovaryumlarda süperovulasyonu oluşturduklarını ve PMSG enjeksiyonundan 66-72 saat sonra da 50-75 IU hCG'yi iv. olarak verdiklerini, donörlerin ovaryumlarında ortalama  $19 \pm 1$  ovulasyon olduğunu ve yıkamalar sonrasında 20 tavşandan 187 embryo kazandıklarını bildirmişlerdir.

Özkoca ve ark.(64)'nin yaptığı çalışmada, süperovulasyon için donörlere 150 IU PMSG ve bundan 72 saat sonra da 100 IU hCG enjeksiyonu yapmışlardır. PMSG'nin iki farklı preparatını kullanan araştırıcılar, ilk grupta ortalama  $8.66 \pm 4.93$  adet ovulasyon odağına karşın  $5.0 \pm 4.35$  adet embryo kazanıldığını, diğer preparatın kullanıldığı grupta ise ortalama  $11.0 \pm 3.82$  adet ovulasyon odağından ortalama  $5.5 \pm 5.80$  adet embryo kazandıklarını bildirmişlerdir.

Paria ve ark.(67), FSH'ı 0.1 mg'lık dozlarda günde iki kez olmak üzere, 3 gün üstüste enjekte etmişler ve son enjeksiyondan 12 saat sonra 25 IU'lık hCG'yi iv. olarak vermişlerdir. Fisher(27) ise yaptığı çalışmada, seksüel olgunluğa erişmiş tavşanlarda FSH-P preparatını günde iki kez olmak üzere, 0.3 mg'lık dozlarda 3 gün üstüste uygulamış ve ovulasyonu sağlamak için de 75 IU'lık dozda hCG preparatını iv. olarak enjekte etmiştir.

Maurer(59) embryo kazanımı için hazırlanacak olan tavşanların, küçük ırklarda 5 aylık, büyük ırklarda 6 aylık olmalarını, kullanımdan 18-21 gün öncesinde bireysel olarak kafeslere alınmalarının gerektiğini, küçük ırklarda günlük 200 g., büyük ırklarda 250 g. %17-18 oranında protein içeren tavşan rasyonu ile beslenmelerinin gerektiğini bildirmiştir. Ayrıca barınaklarda ışıklandırılmaların kontrollu olarak 12 saat aydınlık 12 saat karanlık veya 14 saat aydınlık, 10 saat karanlık periodlarında,

barınak sıcaklığının 18-20°C'da ve nemin %50-55 oranında olmasının gerektiğini bildirmiştir. Araştırmacı süperovulasyonu sağlamak için, methilcellulose ile %1 oranında sulandırılmış FSH.P'nin günlük 0.4 mg'lık dozda, 4 gün süre ile sc. olarak enjekte edilmesini ve 4. gün 0.5 mg/kg dozda LH.P hormonu veya 25 IU hCG'nin iv. olarak verilmesinin gerektiğini bildirmiştir.

Embryo transfer çalışmalarında, hayvanlara verilen süperovulatör ajanlara karşı antikorlar oluşabilmektedir. Tekrarlı olarak yapılan uygulamalarda bu olay göz önünde bulundurulmalıdır. Bu konuyla ilgili olarak Adams(2), 1953 yılında yapmış olduğu çalışmasında şu açıklamaları yapmıştır: Araştırmacı 12 haftalık albino tavşanlarda süperovulasyonu oluşturmak için, at pituitari ekstraktını 12 saat arayla 6 kez deri altı yolla enjekte etmiş, bu uygulamayı 28 gün arayla aynı hayvanda tekrar ettiğinde, hayvanların %95'inde ovaryum reaksiyonlarının zayıf ve ovulasyonların gerçekleşmediğini gözlemlemiştir. Aynı incelemeyi cinsel olgunluktaki hayvanlarda yaptıklarında ise, ovaryum reaksiyonlarının normal reproduktif faaliyetekine eş olduğunu ve ovulasyon sayısının ise fizyolojik sınırlar içinde kaldığını bildirmiştir. Bu olayı kanıtlamak amacıyla, pituitari ekstraktı uygulanmış hayvanlardan alınan plazma, hiç hormon uygulaması yapılmamış hayvanlara verilmiş ve daha sonra bu hayvanlara pituitari ekstraktı enjekte edildiğinde, ovaryumlarda süperovulasyon reaksiyonlarının inhibe olduğunu gözlemlemiştir.

Tavşanlardaki süperovulasyon yöntemlerini inceleyen Illera ve ark.(40) yaptıkları araştırmada, PMSG ile HMG'nin etkisini karşılaştırmışlardır. Yeni Zellanda ile Kalifornia melezi 8 ± 2 aylık tavşanlarda yaptıkları çalışmada PMSG ve HMG uygulamalarını, kontrol grupları ile karşılaştırmışlardır. Araştırmacılar 120 IU PMSG'yi im. olarak uygulamışlar, 60 saat sonra da 60 IU hCG'yi iv. olarak vererek hayvanları çiftleştirmişlerdir. HMG grubunda ise 12 saat arayla 10 IU'lık dozlarda 6 enjeksiyon yapmışlar, son enjeksiyondan 12 saat sonra da iv. olarak 60 IU hCG vererek tavşanları çiftleştirmişlerdir. Çiftleşmeden 62

saat sonra ovidukt ve uterus yıkaması ile embryoları kazanmışlardır. Yaptıkları karşılaştırmalar sonrasında PMSG uygulanan hayvanların ovaryumlarının, HMG ve kontrol gruplarına oranla daha geniş çapta olduğunu, fakat HMG uygulananlarda ovule olmayan follikül sayısının diğerlerine göre düşük olduğunu tesbit etmişlerdir. Yapılan uygulamalar sonrasında elde ettikleri ovaryum reaksiyonları ve elde edilen embryo sayıları Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4. Süperovulasyon uygulamaları ve sonuçları.

Preparat	Toplam fol. sayısı	CL sayısı	Embryo sayısı	Ovulasyon Oranı %	Embryo Oranı %
HMG	48.8 ± 4.0	32.2 ± 3.8	30.8 ± 4.3	65.9	95.65
PMSG	46.7 ± 4.58	26.6 ± 2.8	26.2 ± 4.7	59.9	98.50
Kontrol	15.5 ± 0.5	11.0 ± 1.0	10.5 ± 0.5	71.61	94.59.

Araştırmacı HMG uygulanan hayvanlarda, ovaryum ebatlarının küçük olmasına karşın en iyi sonucu HMG'nin verdiğini bildirmiştir.

PMSG uygulamalarında süperovulatör dozun, HMG ve FSH uygulamalarında olduğu gibi tek enjeksiyonla veya üçe bölünerek verilmesi de mümkündür. Bu konuyla ilgili Gabler(28) yapmış olduğu çalışmada PMSG, HMG ve FSH.P'nin farklı dozlarını, verilmiş yöntemlerini ve sonuçlarını karşılaştırmıştır. Hormon kombinasyonları ve dozları Tablo 5'de görülmektedir.

Tablo 5. Hormon kombinasyonları ve dozları.

Hormon Kombin.	Hayvan sayısı	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün
PMSG/hCG	6	30-50IU	30-50IU	30-50IU	-	50-100IUiv
PMSG/hCG	17	75IU im	75IU im	75IU im	100IU iv	-
PMSG/hCG	6	100IUim	100IUim	100IUim	-	100 IU iv
PMSG/hCG	11	50-100 IU im	50-100 IU im	50-100 IU im	-	50-100IUiv
HMG/hCG	3	25IU im	25IU im	25IU im	100IU iv	-
HMG/hCG	5	25IU im	25IU im	25IU im	-	100 IU iv
FSH./hCG	32	2x0.5 mg im	2x0.5 mg im	2x0.5 mg im	100IU iv	-
FSH.P/LH.P	63	2x0.5 mg im	2x0.5 mg im	2x0.5 mg im	2x0.5 mg im	2.5 mg iv
FSH.P/LH.P	37	2x0.5 mg im	2x0.5 mg im	2x0.5 mg im	2x0.5 mg im	3.1 mg iv

Yıkamalar sonrasında 3 enjeksiyonla toplam 120 IU PMSG verilen 6 hayvanda toplam 10 tane patlamış follükülden 4 tane tamamı döllenmiş zigot elde etmiştir. 3x75 IU PMSG verdiği ilk gruptaki hayvanlarda ortalama zigot sayısı 11.4 olmuştur. 3x100 IU PMSG verilen 6 hayvanda patlayan 87 follükülden, 39'u döllenmiş toplam 59 hücre elde etmiştir. ikinci 3x75 IU PMSG uygulama grubunda ise 11 hayvanda patlayan 58 follükülden tamamı döllenmiş 15 zigot kazanmıştır.

HMG uygulamasını ilk grupta 3x25 IU'lik dozlarda yapmış ve son enjeksiyondan 24 saat sonra hCG enjekte etmiş ve hayvanları çiftleştirmiştir. Bu gruptaki 3 hayvanda patlayan 53 follükülden, 39'u döllenmiş toplam 40 embryo kazanmıştır. hCG enjeksiyonu için son HMG enjeksiyonundan sonra 48 saat bekletilen 2. gruptaki 5 hayvanda ise, patlayan 150 follükülden tamamı döllenmiş 115 embryo kazanmıştır.

12 saat arayla 6 enjeksiyonda toplam 3 mg. FSH.P ve son enjeksiyondan 12 saat sonra 100 IU hCG verdiği 32 hayvandan 31'inde, patlayan 1173 follükülden, 820'si döllenmiş toplam 899 hücre kazanmıştır. FSH.P/LH.P hormon kombinasyonu uyguladığı 52 hayvanda patlayan 2623 follükülden 1412'si döllenmiş toplam 1500 hücre kazanmıştır.

Araştıracının verdiği bu sonuçlara göre, hayvan başına düşen ortalama döllenmiş embryo sayısı esas alındığında, 30.1 ile FSH.P/LH.P kombinasyonu en iyi sonucu vermiştir. Diğerleri ise sırasıyla 29.0'la FSH.P/hCG, 23.0'la 2.grup HMG/hCG, 13.3'le 1. grup HMG/hCG uygulaması, 12.7 ile 225 IU PMSG/ 100 IU hCG uygulaması, 9.8'le 300 IU PMSG/ 75 IU hCG uygulaması, 1.3'le 225 IU PMSG/ 75 IU hCG uygulaması ve sonuncu olarak da 0.6 ile 120 IU PMSG/ 75 IU hCG uygulaması sırayı almaktadır.

Illera ve ark.(41), yapmış oldukları çalışmada tavşanlarda süperovulasyon için kullanılan PMSG ve anti-PMSG uygulamasının ovulasyon sonrası embryonik gelişime olan etkisini araştırmışlardır. Bu amaçla süperovulasyon için tavşanlara 120 IU PMSG uygulayan ve 72 saat sonra onları çiftleştirip 60 IU hCG'yi iv. applike eden araştıracılar, çiftleşmeden 3 saat sonra hayvanlara yine iv. olarak 0.25 ml anti-PMSG vermişlerdir. Fizyolojik olarak çiftleşmeden 10-12 saat sonra gerçekleşen ovulasyonların, süperovulasyon tedavisi yapılmış hayvanlarda ne zaman oluştuğunu bilemediklerini belirten araştıracılar, tavşanları çiftleşmeden 16 ve 24 saat sonra öldürerek embryoları kazanma yoluna gitmişler ve 16. saatte öldürdükleri PMSG ve anti-PMSG uygulanan hayvanlardan döllenmiş hiçbir embryo kazanılamazken, bunların yerine kumulus hücreleri ile kaplanmış durumda ovumlar elde edebildiklerini bildirmişlerdir. PMSG ve anti-PMSG grubunda 24 saat sonra öldürdükleri hayvanlardan elde ettikleri sonuçları, kontrol grubu sonuçları ile karşılaştıran Illera ve ark.(41), süperovulasyon grubunda hayvan başına ortalama  $21.25 \pm 3.4$  adet zigot konumunda embryo kazanılırken, kontrol grubunda ise ortalama  $10.5 \pm 0.5$  adet 2 blastomerli embryolar elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Weber(73) yaptığı çalışmada 2.5 mg FSH.P uygulayarak süperovule ettiği tavşanlarda ve kontrol grubunda embryoların kazanılma oranlarını sırasıyla %91.6 ve %96.9, bunlardaki fertilizasyon oranının ise sırasıyla %86.3 ile %88.2 olarak bildirmiştir.

2.3.2. Embryo Kazanılması: Tavşanlarda embryo kazanılması, kazanılacak olan embryoların istenilen gelişme durumlarına göre, farklı yöntemlere dayanmaktadır.

Tavşanlarda temel olarak cerrahi yöntemlere dayanan embryo kazanılması, ovidukt veya uterus lümeninin yıkanması ile gerçekleştirilir. Genital kanal lümeninin yıkanması, operatif olarak(in vivo) gerçekleştirilebileceği gibi, hayvan uygun bir şekilde öldürüldükten sonra genital organları fizyolojik solusyonlar içine alınarak petri kutuları içinde(in vitro) de yapılabilmektedir.

Gelişimlerinin ilk 72 saatine kadar olan embryoların kazanılması için ovidukt yıkaması gerekmektedir. 60. saatten sonra embryoların bir kısmı uterus lümeninde, bir kısmının ise oviduktta bulunmasından bu dönemde hem uterus hem de ovidukt yıkaması yapmak gerekir. 72 saatten sonra ise embryoların tamamı uterus lümeninde bulunduğu için, uterus yıkaması yapılmalıdır(33,34).

Operatif olarak embryoların kazanılması için hayvanlara genel anestezi uygulanmalıdır. Tavşanlarda genel anesteziyi sağlamak için, Kılıçoğlu ve ark.(52) iv. olarak nembutal sodium kullanmışlardır. Aynı amaç için Maurer(59), pentobarbital sodium'u 50 mg/ml yoğunlukta 1 ml'si hızlı ve devamında genel anestezi oluşuncaya kadar, dakikada 0.2 ml olarak enjekte edilmesini önermiştir.

Operasyon için genel anestezi sağlandıktan sonra, median hatta, inguinal bölgeye yakın 2-3 cm'lik bir ensizyon yapılır ve ovaryumlar, ovidukt ve uterus ensizyon hattı dışına çıkarılırlar. Kazanılacak olan embryoların gelişim safhalarına göre, yıkamanın yapılacağı yere karar verilir ve kanal lümeni embryolar için izotonik, uygun pH ve osmolaritede, 37°C'da protein ve enerji kaynağı içeren solusyonlarla yıkanır(21,27,31,32,33,48,59,69).

a- Ovidukt Yıkaması: Araştırmacılar ovidukt yıkamasının fimbriadan uterus yönüne veya uterustan fimbria yönüne yapılabi-

leceğini bildirmektedirler. Ancak uterustan fimbria yönüne yıkamayı, gerek uygulamadaki kolaylığı ve gerekse kazanılan embryo sayısının daha yüksek oranda olması nedeniyle tercih eden araştırmacılar çoğunluktadır(10,14,15,32,37,38,52,58,61,75).

Maurer(59), oviduktan embryoların toplanması için, 30 cm uzunluğunda polietilen bir boru ucunun oviduktun fimbriaya açılan kısmına 2 cm kadar sokulmasını ve ucu kauçukla kaplanmış minyatür pens veya buldog klamp'ı ile tesbit edilmesini, diğer taraftan 20 numara, ucu kütleştirilmiş kanül ile uterus duvarından geçilip utero-tubal bağlantı yerinden ovidukt içine sokulmasını ve %0.1 BSA içeren kültür mediumu ile fimbria yönüne doğru 15x60 mm boyutlarındaki steril petri kutularına yıkanmasını önermektedir.

Oviduktun in vitro olarak yıkanması ise, petri kutusuna aktarılmış olan genital kanalın içinden az önce anlatılan yöntemde olduğu gibi, yıkama sıvısının geçirilmesi ile yapılabildiği gibi, organların kıyılması ile de embryoların kazanılması mümkündür. Petri içine alınan organların öncelikle etrafındaki yağ dokularından arındırılması gerekmektedir. Ovidukt tamamen parçalanarak mevcut embryoların, petri kutusu içerisindeki mediuma dağılmaları sağlanır. Bu sırada embryolarla birlikte, doku parçaları ve kan hücreleri de serbest hale gelirler. Embryoların, dö-küntülerden zarar görmesini önlemek amacıyla en kısa zamanda ortamdan uzaklaştırılmaları gerekmektedir(4,12,33,37,48,52,55,59).

b- Uterus Yıkaması: Tavşan embryolarını 72 saat sonrasındaki gelişim devrelerinde kazanmak için, uterus yıkaması yapılmaktadır. Uterus yıkaması yine ovidukt yıkamasında olduğu gibi, in vitro ve in vivo olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilmektedir.

Adams(3,4), embryoların in vitro olarak uterustan toplamak için şöyle bir yöntem izlemiştir: Öldürüldükten sonra tavşanların uterusları dışarıya alınmakta ve etrafındaki yağ dokularından temizlenmektedir. Uterus, mezovaryumların yapıştığı



kenarın karşı yüzünden, longitudinal olarak ensize edilmekte ve açılan uterus iki ucundan dişli bir pensle tutularak lümeni aşağıya gelecek şekilde, 6 ml %0.9'luk NaCl solusyonu içeren saat camlarından 20 kez geçirilmekte, böylece de lümende bulunan embryoların sıvı içine geçmesi sağlanmaktadır. Adams, bu işlemi yaparken kan hücrelerinin ortama karışmasının mümkün olduğunca engellenmesi gerektiğini bildirmektedir.

Uterustan embryoların kazanılması ile ilgili olarak ise Hafez(33), in vivo yapılacak olan yıkama yönteminin utero-tubal bağlantı yerinden, serviks yönüne doğru gerçekleştirilmesini önermektedir.

in vivo olarak uterusun yıkanması için Maurer(59), vaginanın kranial kısmına küçük bir ensizyon açılarak ucu 45°-90° açıda eğilmiş ince pastör pipetinin, ensizyon hattından içeriye yönlendirilmesi ile serviksin geçilebileceğini bildirmektedir. Araştırmacı serviks geçildikten ve pipet, serviksin üzerinden parmaklarla tesbit edildikten sonra, utero-tubal bağlantı yerine yakın bir yerden küt bir kanülle girilerek, kornunun 5 ml veya daha fazla mediumla yıkanmasını önermektedir.

**2.3.3. Kazanılan Embryoların Değerlendirilmesi:** Gerek ovidukt ve gerekse uterus yıkaması ile kazanılan embryoların klasifikasyonu ve kaliteleri hakkında bir karara varmak gerekir. Embryo transfer veya in vitro kültür çalışmalarından başarılı sonuçlar alabilmek için, erken dönemde, özellikle ilk 24 saatte kazanılan embryoların dölleniş döllenenmedikleri, sonraki gelişme safhalarında ise zonaların durumu, blastomerlerin sayıları, blastomer büyüklüklerinin homojen olup olmadığı ve blastomer sitoplazmalarının durumları, ileri safhalarda ise embryoların sağlıklı görünüp görünmediği hakkında karar vermek oldukça önemlidir.

Maurer(59), kazanılan embryoların fertilize olup olmadığını saptamak için, erkek ve dişi pronükleuslarının varlığını belirlediklerini, daha ileri safhalarda bölünmelerin başlayıp

başlamadığına dikkat ettiklerini bildirmiştir. Araştırmacı, bölünme gösteren embryoların sağlık durumlarını belirlemek için ise, gelişim düzeyi, morfolojik yani blastomerlerin üniform görünüşleri, blastomer doku yapısının homojenliği, zona pellusidalarının kalınlığı, müsin mantonun varlığı gibi noktaları göz önüne aldıklarını belirtmiştir.

Embryo transfer programlarında kullanılacak olan embryolarda ise Hafez(33), aşağıda sıralanan defektlerden herhangi biri görüldüğünde, embryonun elden çıkartılması gerektiğini bildirmiştir.

- a- Değişken, üniform olmayan büyüklükteki blastomerler,
- b- morula içinde hücre sel yıkıntılar,
- c- ovalleşmiş zona pellusida içinde dejenere blastocyst çöküntüsü bulunması,
- d- parçalara ayrılmış mitotik figür,
- e- köpük görünüşlü blastomerler,
- f- sitoplazmik ve nükleer materyalin parçalanması,
- g- morula veya blastocystün anormal şekli.

Embryoların mikroskopik değerlendirilmesinde Hafez(33), 40 büyütmeden 200 büyütmeye kadar olan mikroskobları kullanmıştır. Araştırmacı yine bu kontroller sırasında, embryoların taze mediumlar içerisinde ve mediumun buharlaşmasını, ayrıca mikrobiyel kontaminasyonu engellemek amacıyla parafin yağı ile örtülü olarak saklanması yararlı olacağını belirtmiştir.

**2.3.4. Alıcıların hazırlanması(senkronizasyon):** Embryo transfer çalışmalarında başarılı sonuçlar alınması istenildiğinde, verici(donor) ve alıcı(recipient) arasında yakın bir östrus senkronizasyonu gerekmektedir. Bu amaçla Chang(17), alıcılarda ovulasyonları ve sonrasında yalancı gebeliği oluşturmak için vericilerle denk olarak gonadotropin enjeksiyonu yapılmasını önerirken, Hafez(31) alıcıların ovulasyonlarının sağlanmasında

vasektomize erkeklerle çiftleştirmeyi tercih etmiştir.

Maurer ve ark. (57) transferlerden 23-63 saat önce, kg canlı ağırlığa 0.5 mg LH.P uygulayarak alıcılarda ovulasyonları uyarmışlardır. Bu çalışmada, LH enjeksiyonu ve hemen akabindeki çiftleştirmelerden 28-32 saat sonra kazandıkları embryoları, 0, 24, 36, 48, 62, 72, 88 ve 96 saat kültüre ettikten sonra transfer etmişlerdir. Kültür sürelerine göre alıcıların, transferden 23 ile 63 saat öncesinde LH enjeksiyonuna tabi tutulmalarının sebebi, embryoların in vitro gelişimlerinin yavaş olduğuna bağlayan araştırmacılar, embryoların transfer anındaki gelişim durumları ile alıcıların fizyolojik durumlarını denk getirmeyi amaç edindiklerini bildirmişlerdir.

Adams(4) alıcılarda ovulasyonları sağlama yöntemlerini, onları vasektomize erkeklerle çiftleştirme, veya hCG yada bunun yerine LHRH gibi hormonların iv. olarak enjekte edilmesi şeklinde sıralamıştır. Araştırmacı, 39 dişiye 0.2 ml(0.8 ug) LHRH iv. olarak verdiğinde, tavşanların tamamında ovulasyonun oluştuğunu, ortalama  $4150 \pm 112$  g. ağırlıktaki 2 yaşlı 33 tavşanda, bu uygulama sonrasında ortalama tavşan başına  $10.42 \pm 0.49$  adet ovulasyon oluştuğunu ve ovulasyon sayısının hayvanın ağırlığı ile doğru orantılı olarak arttığını veya azaldığını belirtmiştir. Ayrıca tekrarlanan hCG uygulamalarında, bu preparata karşı hayvanlarda bir resistansın oluştuğunu, bu nedenle uygulamaların 3 defalık aplikasyonlarla sınırlandırılması gerektiğini bildirmiştir. Yaptığı gözlemlerde bu resistansın LHRH preparatına karşı oluşmadığını söylemektedir.

Adams(3) tavşan embryolarının 1-4 günlük kültür periodları sonrasında onların gelişimlerini incelediği çalışmada, alıcıların senkronizasyonunun embryoların kronolojik yaşlarına, yani, ovulasyonlardan transfer edilinceye kadar geçen zamana göre değil de, bunlardan daha önemli olan gelişim durumlarına göre yaptıklarını bildirmişlerdir.

Seidel ve ark.(70), tavşanlarda in vitro fertilizasyon ve kültür çalışmaları ile ilgili olarak yaptıkları araştırmada,

kazandıkları ovumları in vitro koşullarda fertilize ettikten sonra, sırasıyla 26, 36, 48, 54, 72, ve 84 saat süre için kültüre etmişlerdir. Kültüre ettikleri bu embryoları, LH enjeksiyonu ile senkronize ettikleri alıcılara sırasıyla, 10, 11, 20, 36, 40, ve 46 saat sonra transfer etmişlerdir. Araştırmacılar, kültür periodları ve yalancı gebelik süreleri arasındaki bu farklılıkları, in vitro koşullardaki gelişimlerin gecikmesini göz önüne alarak yaptıklarını açıklamışlardır.

in vitro olarak kültüre edilmiş embryoların transferlerinde, alıcı senkronizasyonunun önemini vurgulayan Fischer(27), çalışmasında in vitro kültür koşullarında embryoların gelişimlerinin gecikmeye uğradığını, 3 günlük embryoları 48 saat süre için standart mediumda kültüre ettiğinde, bu gecikmenin 1 gün civarında olduğunu ve bu aksamanın 4-5 günlük blastocystlerde daha belirgin olarak ortaya çıktığını bildirmiştir. Araştırmacı bu aksamaların boyutunun, embryoların gelişim safhaları yanında, mediuma eklenen katkı maddelerine de bağlı olduğunu bildirirken, kültür ortamında ortaya çıkan bu gecikmelerin reversibl olduğunu, embryoların uterusu transferlerinden kısa bir süre sonra, bu farkın ortadan kalktığını belirtmiştir.

Başka bir çalışmada ise Hartung ve ark.(36), in vitro şartlarda kültüre edilen embryolardaki gelişmelerin geri kalma nedenlerini elektron mikroskop düzeyinde incelemişler ve yaptıkları araştırmada in vitro kültürde oluşan bu gecikmelerin belirgin morfolojik bozukluklarla beraber gözlendiğini bildirmişlerdir. Bu değişikliklerin transferden 24 saat sonra ortadan kalkabileceğini bildiren araştırmacılar, bu düzelmenin ancak embryoların gelişim devresine uygun alıcılara transfer edildiklerinde görülebileceğini, fakat embryoların kronolojik yaşları ile denk alıcılara transfer edildiklerinde ise böyle bir olayın oluşmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacıların bulguları 24 saatlik in vitro gelişimin, sadece bir kaç saatlik in vivo gelişime denk olabileceğini göstermektedir.

2.3.5. Embryoların Alıcılara Transferleri: Embryo transfer çalışmalarında embryolar, kazanıldıkları bölgeye ve gelişim durumlarına göre alıcı genital kanalının uygun bir bölgesine transfer edilirler.

Senkronizasyon bölümünde de değinildiği gibi, özellikle kültüre edilen embryoların kronolojik yaşlarına göre değil de, gelişim durumlarına göre transferlerinin gerçekleştirilmesi önemlidir. Taze embryoların direk transferleri gerçekleştirilecek ise, transferlerin yapılacağı bölgenin embryoların kazanıldıkları yere eş değer olması esastır. Buna göre embryolar, oviduktan kazanılmış ise ovidukta , uterustan kazanılmış ise uterus transfer edilirler.

Fischer(27) 24 saat süre için kültüre ettikleri 3-4 günlük tavşan embryolarını, cerrahi yolla uterus duvarına yapılan punksiyondan pastör pipeti ile girilerek, herbir kornuya 7-17 adet embryoyu 80 ul'den küçük hacımlardaki medium içinde transfer etmiştir. Transferden 24 saat sonra, embryoları tekrar dışarıya alan araştırmacı kültür aşamasındaki gelişimsel gecikmelerin reversibl olup olmadığını araştırmıştır. Araştırma sonucunda embryolarda gözlenen gelişimsel gecikmelerin uygun bir alıcıya transferleri yapıldığı taktirde reversible olduğunu ve bu gecikmelerin transferden kısa bir süre sonra ortadan kalktığını bildirmiştir.

Bu konuyla ilgili olarak Hafez(33), tavşanlarda ovidukta yapılacak olan transferlerde, çok az miktarda medium içinde uygun sayıdaki embryonun pastör pipeti ile fimbriadan ovidukt içine girilerek, infindibulumu kadar ilerleyip bu bölgeye verilebileceğini önermektedir.

Ülkemizde Kılıçoğlu ve ark.(52) tarafından tavşanlarda yapılan embryo transfer çalışmasında, iki blastomerli embryoların transferleri sonrasında %20 oranında gebelik elde edilmiştir.

Özkoca ve ark.(64) tarafından 1984 yılında yapılan çalışmada ise, çiftleşmeden 24 ve 48 saat sonra kazandıkları toplam 37 embryonun 25 tanesini 5 alıcıya transfer eden araştırmacılar,

alıcılardan sadece birinde gebelik oluştuğunu, bu gebelik sonunda da bir adet ölü yavru elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmanın bir bölümünde ise, kazandıkları embryoları ototransfer ile tekrar kendi annelerine verme yoluna giden ve bir hayvana 4 adet, diğerine ise 11 adet embryo transfer eden araştırmacılar, transferler sonrasında ilk hayvandan 2, ikinciden ise 4 adet yavru elde ettiklerini bildirmişlerdir.

**2.4. Vericilerden Kazanılan Embryoların in Vitro Koşullarda Saklanması:** Embryo transfer çalışmasında kazanılan embryolar genital kanaldan dışarıya alındıktan sonra, onların canlılıkları üzerine, barındırıldıkları ortamın oldukça fazla etkisi bulunmaktadır. Bu ortamın belirli şartlara sahip olması gerekmektedir. Eğer, uygun bir ortam hazırlanamaz ise, embryolar canlılıklarını yitirip ölmektedirler.

in vitro olarak embryoların saklanması denildiğinde, embryoların gelişimlerini devam ettirebilecekleri uygun ısılarda (37-38°C) ve ortamlarda (pH, nem, besin, osmolarite) barındırılması hem de düşük ısılarda gelişimlerinin yavaşlatılması veya dondurulması akla gelmektedir. Ancak bizim esas konumuz tavşan embryolarının in vitro koşullarda gelişimlerini sağlamak olduğundan, bu bölümde daha çok bu konuya değinilecektir.

Biggers(6), memeli embryolarının genital kanal dışında kültüre etme çalışmalarının, doku kültürünün bulunmasından hemen sonra başlatıldığını bildirmiştir. 1912'de California Üniversitesinde Mark ve Long'un rat ve fare embryolarının geliştirilmesi üzerinde çalışmalar yaptığını, bu çalışmayı yaparken her iki türün in vivo gelişimi ile in vitro şartlardaki gelişimlerini karşılaştırmalı olarak araştırdıklarını bildiren yazar, aynı dönemde 1912 ve 1913'lerde Brüksel Üniversitesi'nde Brachet'in tavşan blastocystlerini in vitro şartlarda kültüre ederek, daha başarılı sonuçlar elde ettiğini bildirmiştir.

Pek çok yazarın belirttiğine göre, memeli embryolarının kültüre edilmeleri 1930'lu yıllarda Pincus, Castle, Hammond, Fell

gibi araştışıcılar tarafından ele alınmış, çeşitli kültür teknikleri ve çeşitli mediuamlar geliştirilmiştir. Bu araştışıcıların edindikleri bilgiler doğrultusunda ileriki yıllarda daha başarılı araştışmalar yapılmıştır. ilk dönemlerde yapılan araştışmalarda sıklıkla plasma, serum gibi doğal kaynaklardan kültür mediuumu olarak yararlanılmış, daha sonraki ęalıřmalarda ise doğal katkı maddelerinin de bulunduğu sentetik mediuumlardan yararlanılmaya başlanmıştır(12,13,33,49,55,59,61,75).

Yapılan tüm araştışmalarda, in vitro şartların, in vivo ortama en yakın düzeyde olması prensip edinilmiştir. Son zamanlarda yapılan ęalıřmalarda, uterus endometriumu ve ovidukt epitellerinin yaptığı salgıdan yararlanma yollarına gidilmiş ve bu sisteme CO-CULTURE sistemleri adı verilmiştir. Embryoların kültürlerinin yapılacağı petrilerde öncelikle kapların yüzeyinin endometrium epitelleri ile kaplanması sağlanmakta, daha sonra bu epitel yüzey üzerinde embryolar kültüre edildiğinde, gelişimlerin desteklendiği ve daha iyi sonuçlar alındığı belirtilmektedir (12,68,72). Bu yönteme benzer olarak Eyeston ve ark.(26)'nın yaptığı ęalıřmada, sığır zigotlarını kültüre edecekleri TCM 199 mediuumuna %10 FCS ilavesi yapıldıktan sonra, mediuum ovidukt hücreleri ile süspansiyon haline getirilmesi ve hücrelerin salgıları tarafından mediuumun zenginleştirilmesini sağlanmıştır. Elde ettikleri bu mediuumla sığır zigotlarını 6-9 gün sürelerde kültüre etmişler ve bu süre içerisinde kullanılan mediuumu tazeleme yoluna gitmemişlerdir. ęalıřmada hücrelerle mediuumun süspansiyon halinde bekletilme sürelerinin, elde edilen desteklenmiş mediuumun dondurulmasının ve mediuumun çeşitli konsantrasyonlarda sulandırılmasının etkisini araştışmışlardır. ęalıřma sonucunda ovidukt hücreleri ile desteklenmiş mediuumun dondurulmasının, mediuumun embryotrofik etkisine zararlı olmadığını, düşük ısılarda uzun süre saklanabileceğini, ovidukt hücreleri ile 48 saat muamele edilmiş ve sulandırılmamış mediuumlarda en iyi sonucu elde ettiklerini bildirmişlerdir.

2.4.1. in Vitro Kültür Sistemleri: Embryolarla yapılan in vitro kültür çalışmalarının tarihsel süreci içerisindeki araştırmaların sonuçlarına göre, çeşitli kişiler tarafından ortaya atılmış kültür sistemleri ve kültür kapları mevcuttur.

Brister (12) tarafından ortaya konulmuş, çeşitli yapılarda kültür kapları bulunmaktadır. Bu kültür kapları sırasıyla ele alındığında;

a- 15x60 mm(Falkon) ölçülerinde, plastik, bir defalık petri kutuları kullanılabilir. Petri içine konulan 10 ml'lik parafin yağı tabanına, 50-100 ul'lik hacimlerde embrioları içeren kültür mediuamları yerleştirilmektedir. Parafin yağının buharlaşmayı önlediği gibi, mediumun kontaminasyonunu ve gaz difizyonunu kontrol altına almakta da yardımcı olduğu bilinmektedir.

b- Bu sistemde 15x60 mm ölçülerinde olan ve içine 10 ml parafin yağı konulan plastik petri kutuları ile kültür mediumunu içeren iç çapı 1-2 mm olan küçük kapillar tüpler kullanılmıştır. Embrioları içeren medium, kapillar tüpler içine, tüpün üst kısmında küçük bir hava boşluğu kalacak şekilde konulur. Daha sonra mediumla beraber embrioları içeren bu tüpler petri kutuları içindeki parafin yağının içine yatay olarak yerleştirilir.

c- Bu yöntemde kültür kabı olarak saat camlarından yararlanılmaktadır. 15x60 mm ölçülerinde olan petrilere ise saat camlarını kültür kabını içine yerleştirmede yararlanılmıştır. Petri kutuları içine saat camları konulmadan önce tabanına, suya doyurulmuş bir sünger veya cam elyafı konulur, daha sonra saat camları bu sünger veya cam elyafı üzerine yerleştirilir. Böylece sünger veya cam elyafı içinde bulunan su sayesinde petri kutusu içindeki hava su buharına doyurulmuş olur.

d- Bu yöntemde temel olarak "c"de belirtilene benzemektedir. 15x60 mm'lik petri kutusu içi çepeçevre olarak süngerle kaplanmıştır ve petrinin orta kısmında kültürün yapılacağı bölme bulunmaktadır. Bu tip bir defalık petri kutuları dizayn edilmiş, fabrikasyon olarak üretilmektedir.

e- 1-4 ml medium içeren saat camları da bu amaç için



kullanılabilmektedir. Kabın üzeri açık bırakılabileceği gibi, bir cam plaka veya parafin yağı ile örtülebilir. Medium üzeri parafin ile kapatıldığında iyi sonuçlar verdiği bildirilmektedir.

f- 1 ml kültür mediumu içeren yaklaşık 25-30 mm çaptaki bir defalık petri kutuları da bu doğrultuda kullanılabilmektedir. Medium yüzeyi steril parafin yağı ile örtülebileceği gibi atmosfere maruz bırakılabilmektedir.

g- Bölmeli bir defalık plastik doku kültürü kaplarından faydalanılmaktadır. Bu kaplar her bir bölümünde 10 ul medium yerleştirilen 60 bölmeden oluşmaktadır. Embryo içeren mediumlar bölmelere konulduktan sonra, üzeri parafin yağı ile örtülüp kutuların kapakları kapatılmaktadır.

h- Az sayıda embrioyu, az hacımdaki medium içinde kültüre etmek için standart olan asılı damla metodudur. Bir lamın üzerine embrioları içeren medium konulduktan sonra, damla alta gelecek şekilde lam ters çevrilmekte ve kültür kabini içine bu şekilde yerleştirilmektedir.

j- Bu yöntemde kültür kabı olarak serolojik tüp kullanılmaktadır. Tüpün ağzı, içine embrioları içeren medium konulup gazlandıktan sonra kapatılabileceği gibi, atmosferi kontrollü olan bir ortamda kapatılmadan da saklanabilmektedir.

k- Burada konu olan standart karrel şişesidir. Bu şişeler, 2 ml'den 10 ml'ye kadar kültür mediumu kapsar ve metod j'deki gibi şişe içi gazlandıktan sonra ağzı kapatılabileceği gibi, atmosferi kontrollü olan bir ortamda kapatılmadan açık olarak da bırakılabilmektedir. Bu sistemdeki avantaj embrioların düz bir yüzey üzerinde daha kolay görülebilmesidir.

l- Burada belirtilen kültür kabı, dibinde rutubeti sağlamak için bikarbonat tuzlarıyla tamponlanmış tuz solusyonu bulunan bir kavanozdur. Embriolar kavanoz dibine yerleştirilmiş bir platform üzerindeki küçük bir petri kutusu içinde kültüre edilirler. Kavanoz içindeki atmosfer uygun bir gaz karışımı ile kontrol altında tutulur. Bu yöntem daha çok fare embriolarını kültüre etmede kullanılmaktadır.

Brinster(12), bu sistemleri karşılaştırdığı araştırmaları sonunda, fare embryolarındaki en iyi gelişme oranının Metod A'da, ikinci olarak Metod J'de olduğunu bildirmiştir. Aynı zamanda embryoların izlenmesinde Metod J'nin ortaya koyduğu güçlükten de bahsedilmektedir. Araştırmacı diğer taraftan kültür mediumlarının atmosfere maruz bırakıldığı durumlarda daha düşük sonuçlar aldıklarını, parafinle örttüklerinde ise sonuçların belirgin olarak iyileştiğini açıklamıştır. Araştırmacıya göre, yağda eriyen maddelerin embryoların gelişimlerine etkisi araştırılmak istendiğinde, bu tür maddeleri içeren mediumların üzeri parafin yağı ile örtülmemeli, zira, bu maddeler parafin yağı içinde de eriyebileceğinden dolayı hatalı sonuçlar vereceği araştırmacı tarafından bildirilmektedir(12).

Maurer(59), pozitif atmosferik basınç, ultraviole ve floresanlarla donatılmış bir doku kültürü odasının, embryoları in vitro şartlarda kültüre etmede kullanılabileceğini bildirmiştir. Bunun yanı sıra, çoğu araştırma laboratuvarı için vertikal veya laminar hava akımlı davlumbaz, ultraviole ve floresan lambalarla donatılmış, şeffaf plastik davlumbazlarla, laboratuvarlarda steril çalışma alanlarının oluşturulabileceğini belirten araştırmacı, ultraviole lambanın yalnızca hava ve alan yüzeyinin sterilizasyonunda kullanılmasını, embryolarla mediumun bu ışıklara maruz bırakılmamasını önermiştir. Maurer(59) çalışmalarında, Brinster (12) tarafından ortaya konulan çeşitli kültür kaplarını karşılaştırmış, tavşan zigot ve embryolarını açık plastik petrilere kültüre ettiklerinde oldukça iyi sonuçlar aldıklarını bildirmiştir. Araştırmacıya göre, kullanılan plastik petrilere 7x temizleyicisi ile yıkandıktan sonra, 7 kez distile suda hafifçe çalkalanıp, %70'lik alkole saklanabilmektedir. Araştırmacı, kullanımdan 30-45 dakika önce alkolden çıkartılarak steril bir ortamda kurutulan bu kapları birkaç kez kullanabilme olanağının mümkün olabileceğini belirtmektedir.

Takahashi ve ark.(72), 7-8 günlük siğir embryoları ile yaptığı kültür çalışmasında, test tüpü ve Maurer(59) tarafından

bildirilen mikrodamla sistemini kullanmışlardır. Embryolar 1 ml kültür meidiumu içinde tüplerin içine yerleştirilmiş ve ağız silikon kapaklarla kapatılmıştır. Araştırmacı bikarbonat tamponlu medium kullanıldığında, ortamı kontrollu olarak %5 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> gaz karışımında tutmuş, fosfat tamponlu mediumlar kullanıldığında ise gazlama yapmamıştır. Gazlama içinden dakikada 100 ml gaz geçen enjektör iğnesi aracılığı ile yapılmış ve tüp içi basıncı 40 cm su basıncına ayarlanmıştır. Daha sonra test tüpleri 37°C'daki inkübatöre yerleştirilmiştir. Mikrodamla sisteminde ise, 10x65 mm'lik petriler kullanılmış, 0.2 ml hacımdaki mediumlar bu petriler içine konularak üzeri steril parafin yağı ile örtülmüş ve embryolar pipetle bu damlacıklar içine yerleştirilmiştir.

Cho(18), fare embryolarını kültüre etmek için 1 ml iç çaplı 50 mm uzunluğundaki cam tüplerden yararlanmıştır. Bu tüpleri 9 inçlik, tek kullanımlık pastör pipetlerinden elde etmiştir. Çalışma sırasında, bu tüplerin ortasına(yaklaşık 8 mm'lik bir bölümüne) 10 ul kültür mediumu mikropipet aracılığı ile koyulmuş ve tüpün bir ucu 5 ul hacımdaki parafin yağı ile kapatılmıştır. Embryolar medium içine konulmadan önce bu tüpler %5 CO<sub>2</sub>'li ve neme doyurulmuş 37°C'lık ortamda inkübe edilmiştir. Ekilibrasyon sonrasında 10-15 embryo diseksiyon mikroskobu altında, dikkatli bir şekilde, tüpün açık ağzından kapillar pipet yardımıyla medium içine yerleştirilmiş ve bu uç da hemen parafin yağı ile kapatılmıştır. Bu sistemde medium ile parafin yağı arasında bir hava boşluğu bırakılmıştır. Araştırmacı, bu boşluk sayesinde mediumlarda yağda eriyen komponentlerin incelenmesinin mümkün olabileceğini, ayrıca bu sistemin ekonomik, uygulanması kolay ve taşınabilir bir sistem oluşu gibi yararlarının bulunduğunu, aynı zamanda parafin yağı ile örtülü diğer sistemlerle de karşılaştırılabileceğini bildirmiştir.

**2.4.2. in Vitro Kültür Koşulları:** Embryolarda in vitro kültürün gerçekleştirilebilmesi için, ortamın belirli özellikler-

de olması gerekmektedir. Ancak bu ortam kontrollu olduğunda ve gerekli şartlar sağlandığında embryolarda istenilen gelişme gözlenebilmektedir. Kültür ortamının kontrol altına alınmasında gerekli önemli noktaları Brinster(12) aşağıdaki şekilde belirtmektedir:

- a- Kültür kabini sıcaklığı,
- b- Kültür kabini nem oranı,
- c- Kültür kabini gaz akışı,
- d- Kültür kabini gaz bileşimi.

Brinster(12) yaptığı araştırmalar ile embryoların in vitro şartlarda gelişebilmelerini sağlamak için, ortam sıcaklığının 37-37.5°C arasında olmasının en ideal olduğunu belirtmektedir. Araştırmacı, kültür mediumunun üzeri mineral yağla örtüldüğünde atmosferin nem oranının büyük önem taşımadığını, diğer taraftan atmosferle temas halindeki mediumlarda buharlaşmayı önlemek için atmosferin su buharı ile doyurulmasının gerekli olduğunu, mediumun mineral yağ ile örtülmeyp atmosfere maruz bırakıldığı durumlarda, eğer, maruz bırakıldığı atmosfer neme doyurulmamış ise buharlaşma ve buna bağlı olarak mediumun osmolaritesinde değişme oluşacağını, bunun sonucu olarak da osmotik basıncı kandan yüksek düzeye ulaşan mediumda embryoların gelişiminin yüksek oranda zayıf olacağını vurgulamıştır. Brinster, kültür kabini atmosferindeki gaz bileşimlerinin de mediumun pH'sını etkilemesi açısından kontrol altında tutulması gerektiğini belirtmiştir. Bu ortamı sağlamak için ise, kabinde belirli hızda gaz akımının dolaşması gerekmektedir. Araştırmacıya göre gaz akışında iki faktör etkili olmaktadır. Bunlardan birincisi kabinin hacmi, diğeri ise ekilibrasyon için beklemede geçirilecek zamandır. Bunlara bağlı olarak Brinster, kabin gaz bileşimini istenilen düzeyde tutmak ve gaz akışını ayarlamak için şu formülü ortaya koymuştur.

$$V \cdot dC/dt = FC_x - FC$$

C- Kabindeki gazın konsantrasyonu

$C_x$ - Giren gazın konsantrasyonu

V- Kültür kabinin hacmi

F- Dakikada litre olarak gazın akış hızı

dC/dt- Zamanla kabin gaz konsantrasyonundaki değişiklik.

Kabindeki gazın başlangıç konsantrasyonu 0 ve giren gazın konsantrasyonu %99 olduğunda, değerler  $F/V \cdot T = 4.60$  formülündeki yerlerine yerleştirilerek ortamın ne kadar süre için gazlanacağı hesaplanmaktadır(12).

Brinster'e(12) göre, inkübatöre konulan mediumdaki gaz kompozisyonunun ekilibrasyonu, kabindeki gaz kompozisyonu ekilibrasyonundan daha uzun süre almakta ve medium parafinle örtüldüğü durumlarda ise bu süre daha da uzamaktadır. Araştırmacı bu farklılığı, mediumla parafin ve parafinle atmosfer arasındaki gaz geçişlerine bağlamış ve in vitro kültür çalışmalarında kullanılan gaz bileşiminin daha çok  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $CO_2$ 'den oluştuğunu bildirmiştir. Yaptığı çalışmalarda; 2 hücreli embryoların %5'lik  $CO_2$ 'li ortamda gelişebildiklerini, bunun yanı sıra embryoların, kültür periodlarında kesin ve ölçülebilir düzeyde atmosferik  $O_2$ 'ye ihtiyaç duyduklarını ve saf  $N_2$  gazı bulunan ortamlarda yaptığı kültür çalışması sonucunda ise tüm embryoların bir bölünme bile geçirmeden dejenere olduklarını saptamıştır. Atmosferin  $CO_2$  oranının ise, mediumda bulunan bikarbonat oranına göre ayarlanması gerektiğini ve 25 mM'lük bikarbonat konsantrasyonuna sahip mediumun pH'sını %5  $CO_2$ 'li ortamda 7.4 olarak belirlemiştir.

Daniel(21), yaptığı çalışmada in vitro kültür ortamında bulunan  $O_2$  oranının, 5-7 günlük tavşan blastocystlerinin gelişimleri üzerine olan etkisini araştırmıştır. Medium olarak Ham's F10 kullanmış ve buna %15 oranında maternal serum katmıştır. Ortam atmosferini ise %5  $CO_2$  temel olmak üzere,  $O_2$  konsantrasyonunu %0'dan %95'e kadar değişik oranlarda denemiştir. 5 günlük blastocystleri kullandığı grupta uygulanan %0, %10, %20, %50, %75 ve %95'lik  $O_2$  konsantrasyonları arasındaki embryo gelişimlerinde istatistikî olarak önemli bir fark bulamamış, fakat en iyi geliş-

me oranının %10 O<sub>2</sub> konsantrasyonunda saptamıştır. Araştırmacı, aynı oranlardaki O<sub>2</sub>'i 7 günlük tavşan blastocystlerine uyguladığında ise bu değişik konsantrasyonlarda hemen hemen aynı gelişmeyi gözlemlemiş, O<sub>2</sub>'nin yokluğunda ise embryoların gelişimini çok zayıf bulmuştur. Daniel(21) 5 ve 7 günlük tavşan blastocystlerini kültüre ettiği çalışmasında, embryoların O<sub>2</sub> konsantrasyonlarını geniş aralıklarda tolere edebildiklerini fakat, en iyi gelişimin %10 O<sub>2</sub> konsantrasyonu dolayında olduğunu savunmuştur.

Harlow ve ark.(33), in vitro ortamdaki %5 ve %20 O<sub>2</sub> konsantrasyonlarının fare embryolarının gelişimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında, %20 O<sub>2</sub> içeren atmosferde geliştirilen embryoların %5 O<sub>2</sub>'li ortamda gelişenlere göre yaklaşık %20 oranında daha az sayıda blastomere sahip olduklarını, fakat gelişen embryoların yaşayabilme yeteneklerinin her iki grupta da aynı olduğunu belirlemişlerdir. Bu sonuca göre, %20 O<sub>2</sub> konsantrasyonlu atmosferde daha zayıf gelişen embryoların, transferden sonra 17 günlük oluncaya kadar bu zayıflığı, tolere edebildiklerini savunmuşlardır.

**2.4.3. in Vitro Kültür Mediumu pH'sının Etkisi:** Daha önceki bölümlerde de değinildiği gibi, embryoların in vitro ortamda barındırıldıkları süre içerisinde, etkilendikleri faktörlerden birisi de ortamın pH'sı olmuştur. Mediumdaki pH değişimlerinin, özellikle aşırı alkali veya aside doğru değişimlerin, embryolar üzerinde dejeneratif ve aynı zamanda öldürücü etkisi bulunmaktadır. Kullanılan mediumun yapısına bağlı olmakla beraber mediumun pH'sı, içerdiği bikarbonat veya fosfat tamponlarına ve buldukları ortam atmosferindeki CO<sub>2</sub> konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Kültür mediumunun pH'sını kontrol altında tutmak için, medium içine konulan bikarbonat ve fosfat tamponlardan yararlanılması, bikarbonat içeren mediumlar kullanıldığında ise atmosferin CO<sub>2</sub>'li gaz karışımları ile gazlanması gerekmektedir.

Kane(45) yapmış olduğu çalışmada, bikarbonat tamponlu mediumlarda pH'nın iki hücreli tavşan embryolarının blastocyst safhasına kadar olan gelişimleri üzerine etkisini araştırmıştır. Araştırma gruplarından birinde bikarbonat konsantrasyonu 1.875 ile 120 mM, pH ise 6.43 ile 8.2 arasında iken, diğer grupta bikarbonat miktarı 4.6 ile 80 mM, pH ise 6.64 ile 7.88 arasında değişik düzeylerde tutulmuştur. in vitro kültür gelişmesi ise %5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda gerçekleştirilmiştir. Araştırma sonunda elde edilen veriler, blastocyst safhasına kadar olan gelişmenin, 22 mM bikarbonat konsantrasyonunda ve buna bağlı olarak yaklaşık 7.3 pH'da en iyi şekilde gerçekleştiğini göstermektedir. Araştırmacıya göre mediumun pH değeri, 7.2 ile 7.7 arasında küçük değişiklikler göstermekte ve bu sapma da embryolar üzerine zararlı etki göstermemektedir. Diğer taraftan araştırmacı, blastocystlerin en iyi şekilde genişleyebilmesi için, embryoların 7.55 pH değerine ve 40 mM bikarbonat konsantrasyonuna ihtiyaç duyduğunu bildirmiştir. Bu sonuçlara göre Kane(45), embryoların blastocyst safhasına kadar gelişebilmesi ve diğer taraftan hacımsal olarak genişleyebilmesi için, farklı pH değerlerindeki mediumlara gereksinim olduğunu belirtmiştir.

Brinster(13), tris ve fosfatlı mediumların normal atmosferde, bikarbonatlı mediumların ise CO<sub>2</sub> kontrollu atmosferlerde saklanması gerektiğini bildirmiştir. Brinster'in ovum kültürü için önerdiği kültür mediumunun yapısı şu şekildedir(Tablo 6).

Tablo 6. BMOC-2 kültür mediumunun yapısı.

Madde	mM	gm/lt	m
NaCl	94.88	5.546	5.90
Na-laktat	25.00	2.253	2.10
Na-Pyruvat	0.25	0.028	2.10
KCl	4.78	0.356	0.40
CaCl <sub>2</sub>	1.71	0.189	0.20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19	0.162	0.10
MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O	1.19	0.294	0.10
NaHCO <sub>3</sub>	25.00	2.106	2.10
Pen-Strep.	100 IU/ml penicillin, 50 ug/ml streptomycin		
BSA	1 mg/ml ; 1 g/lt		

Bu mediuuma 25 mM bikarbonat katıldığında ve medium %5'lik CO<sub>2</sub>'li atmosferde tutulduğunda, mediumun pH'sının 7.4 olduğunu bildiren araştırmacı, atmosfer CO<sub>2</sub> oranının %5'den %50'ye çıkarılması ile pH'da 1 birimlik düşme olduğunu(7.4'den 6.4'e), CO<sub>2</sub> oranının %5'den %0.5'e indirilmesi ile de pH'da 1 birimlik artışın olduğunu(7.4'den 8.4'e) belirtmiştir.

Maurer(53), tavşan embryolarını kültüre etmede kullandığı mediuuma(Tablo 7), bikarbonat ta katarak medium, %5 CO<sub>2</sub>'li gaz karışımı ile gazlandığında pH'nın 7.4 ± 0.1 olduğunu bildirmiştir.

Tablo 7. Tavşan embryolarının kültürü için kullanılan sentetik mediuunun kompozisyonu.

İçerik		İçerik	
Tuzlar	g/lt	Amino asitler	mg/lt
NaCl	6.019	L-Alanine	8.90
KCl	0.356	L-Arginine-HCl	211.00
CaCl.2H <sub>2</sub> O	0.251	L-Aspartic acid	13.30
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.162	L-Asparagine.H <sub>2</sub> O	15.00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.294	L-Cystein-HCl	31.50
NaHCO <sub>3</sub>	2.106	L-Glutamine	146.20
Glukoze	1.800	L-Glutamic acid	14.70
BSA	15.000	Glycine	7.50
Vitaminler	mg/lt	L-Histidine-HCl	23.00
Biotin, cystalline	0.024	L-Isoleucine	2.60
DL-Calcium pantothenat	0.72	L-Leucine	13.10
Choline chloride	0.70	L-Lysine-HCl	29.30
Folic acid	1.30	L-Methionine	4.50
i-Inositol	0.54	L-Phenilalanine	5.00
Niacinamide	0.62	L-Proline	11.50
Pyridoxine-HCl	0.21	L-Serine	10.50
Riboflavin	0.38	L-Threonine	3.60
Thiamine-HCl	1.04	L-Tryptophan	0.60
DL-Thioctic acid		L-Tyrosine	1.80
(@-lipoic acid)	0.20	L-Valine	3.50
Vitamin B <sub>12</sub> crystallin	1.40	Metal elementler	ug/lt
		CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	2.50
		FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	834.00
		ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	28.80

Ovidukt salgılarının in vivo ve in vitro olarak embryo-



nik gelişimdeki rolünü araştıran Bavister(5), ovidukt salgısının oluşturduğu fiziko kimyasal ortamda bazı değişikliklerin söz konusu olduğunu, bunun yanı sıra ovidukt sıvılarının salgılanma yerlerinde, pH, gaz basıncı gibi bileşenleri açısından ölçümlerinin yapılmasının oldukça güç olduğunu belirtirken, buna bağlı olarak ta ovidukt salgısının yapısı hakkındaki bilgilerin sınırlı kaldığını bildirmiştir. Embryoların gelişimleri sırasında, umulmadık geniş aralıklardaki pH değişimlerini tolare edebildiklerini belirten araştırmacı, 8 hücreli hamster embryolarının 6.5-7.4 pH aralığının dışındaki düzeylerde de gelişebildiklerini bildirmiştir. Bavister(5), in vitro kültür çalışması sırasında ortam CO<sub>2</sub> oranı %5'den %10'a çıkarıldığında, 8 hücreli hamster embryolarından blastocyst safhasına kadar gelişenlerin sayısının iki kat arttığını ve aynı zamanda, %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda gelişen blastocystlerin, %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda gelişenlere oranla daha büyük ve daha normal yapıda olduğunu belirtmiştir. Araştırmacı, embryoların kendi doğal ortamlarından uzaklaştırıldıklarında intrasellüler pH'larının arttığını ve bunun sonucu olarak da gelişimlerinin yavaşladığını, aynı zamanda canlılıklarının tehlikeye girdiğini savunmuştur. Bu durumda mediumda laktik asit, asetik asit ve benzeri gibi zayıf asitlerin bulunmasının, gelişmeyi uyarıcı olarak etkileyebileceğini bildirmiştir.

**2.4.4. in Vitro Kültür Mediumunun Enerji Kaynakları:** in vitro kültür çalışmaları sırasında, embryoların gelişimlerini etkileyen faktörlerden birisi de medium içinde bulunan veya bulunması gereken enerji kaynaklarıdır. Yapılan çalışmalar, embryoların mediumlar içerisindeki kimi enerji kaynaklarına gereksinimleri olduğunu ortaya koymuştur.

Brinster(9) 1965 yılında yaptığı çalışmalarında, iki hücreli fare embryolarının, blastocyst aşamasına gelişimleri üzerine değişik enerji kaynaklarının etkisini inceleyen araştırmacı, embryoların blastocyst safhasına gelişebilmesi için gerekli enerjinin pyruvat, laktat, oxaloasetat veya phosphoenolpyruvat

tarafından karşılanabileceğini belirtmiştir. Araştırmacı glukoz, fruktoz, riboz, glukoz-6-phosphat, glukoz-1.6- phosphat, acetat, citrat, @-ketoglutamat, suksinat, fumarat ve malat gibi karbonhidratların ise fare embryolarının gelişimleri için gerekli enerjiyi sağlayamadığını bildirmiştir. Çalışması sonucunda ise 7.38 pH'da bu komponentlerin optimum konsantrasyonlarını, pyruvat için  $3.16 \times 10^{-2}M$ , oxaloacetat için  $3.16 \times 10^{-4}M$  ve phosphoenolpyruvat için ise  $1.00 \times 10^{-2}M$  olarak belirlemiştir. Çalışma sırasında enerji kaynağının yanı sıra osmolarite, pH ve enerji kaynakları arasında herhangi bir etkileşim olup olmadığını da inceleyen Brinster(9), sonuçta osmolarite ile pH arasında ve osmolarite ile enerji kaynağı arasında bir etkileşim bulunamamasına karşın, pH ile enerji kaynağının optimal konsantrasyonu arasında istatistiksel açıdan önem taşıyan bir etkileşim olduğunu, şöyle ki; medium pH'sının alkaliye kayması sonucu embryoların gelişebilmesi için, gerekli optimal enerji kaynağı konsantrasyonunun da arttığını açıklamıştır. Aynı zamanda araştırmacı 1969'da yapmış olduğu çalışmada(12), memeli embryolarının enerji ihtiyaçlarını pyruvat, laktat, glukoz ve phosphoenolpyruvattan karşılayabildiklerini, özellikle erken dönem bölünmelerinde pyruvat, phosphoenolpyruvat ve laktatın destekleyici etkisinin olduğunu bildirmiştir. Tavşan embryolarında morula öncesi glukoz harcaması hakkında pek fazla bilgi olmadığını belirten araştırmacı, blastocyst safhasında glukolizis olayının arttığını ve kreps ringer siklusunun aktivasyon kazandığını bildirmiştir. Brinster'in yaptığı araştırmalara göre fare embryoları, gelişimlerinin ilk dönemlerinde hem enerji kaynağına hem de amino nitrojen kaynağına ihtiyaç duyarlar, tavşan embryoları sadece amino nitrojen kaynağı içeren mediumlarda da gelişebilmektedir(12). Bunun yanı sıra araştırmacı, tavşan embryolarının gelişimlerine pyruvat ve laktatın da faydalı etkilerinin olduğunu bildirmiştir. Aynı araştırmacının 1970 yılında yaptığı başka bir çalışmada, kullandığı KRBF(modified Krebs Ringer Bicarbonat solution) mediumunda glukoz, laktat ve pyruvat gibi enerji kaynaklarının ve albuminin tek başına etkilerini in-

celemiştir. Çalışma sonucunda hiçbir katkı maddesi içermeyen ve ayrıca 1 mg/ml oranında glukoz içeren KRBF mediumunda 30'ar adet 2 blastomerli tavşan embryosunun 48 saatlik in vitro kültürleri sonunda embryoların tamamının dejenere olduğunu, 1 mg/ml oranında albumin içeren mediumda kültüre edilen 30 adet 2 blastomerli embryonun ise 20 tanesinin(%66.66) bu süre sonunda morula safhasına ulaştığını tesbit etmiştir. Tavşan embryosunun iki hücreli konumdan morulaya gelişebilmesi için, enerji kaynağına olan ihtiyaçlarının gösterilememesine karşın, pyruvatın önemli etkisini belirtmiş ve pyruvat için optimum konsantrasyonunun ise  $1-4 \times 10^{-2}M$  olduğunu bildirmiştir(14). Araştırmacı, tavşan embryolarının ihtiyaçlarının büyük bir kısmını endojen enerji kaynaklarından karşıladıklarını, gelişimin ilk iki gününde farelerde görüldüğü oranda pyruvat oksidasyonunun gerçekleştiğini, buna bağlı olarak da fare ve tavşan embryolarının ilk iki gününde enerji ihtiyaçlarını aynı yöntemle sağladıklarını savunmuştur.

Witten(74) 1970 yılında yaptığı araştırmada, fare embryolarını in vitro olarak pronükleer fazdan blastocyst safhasına kadar kültüre edip ardından yalancı gebelere transfer ederek, gebeliğin şekillenip şekillenmediğini incelemiştir. Embryoların kültürünü, basit bir kimyasal mediumda gerçekleştirmiştir(Tablo 8).

Tablo 8. 100 ml kültür mediumu içinde bulunan maddeler.

Madde		Madde	
NaCl	514 mg	Na pyruvat	3.5 mg
KCl	36 "	Ca laktat $5.H_2O$	53.0 "
$KH_2PO_4$	16 "	Glukoz	100.0 "
$MgSO_4 \cdot 7.H_2O$	29 "	K-Penicillin G	8.0 "
$NaHCO_3$	190 "	Streptomycin	5.0 "

Araştırmacı medium osmolaritesini 240-310 mOsm arasında ve pH değerini de yaklaşık 7.2 olarak belirlerken, mediumun ml'sine 3 mg BSA, ve tamamına da 0.37 ml %60'lık sodium laktat solusyonu ve 0.1 ml'lik fenolred solusyonu katmıştır. Çalışma sonucunda kalsi-

yum ve bikarbonat iyonlarının esansiyel olduğunu ve amino nitrojene ihtiyaç olmadığını belirlemiştir. Pyruvatı tek enerji kaynağı olarak belirleyen araştırmacı, pyruvatın yüksek konsantrasyonlarının gelişmeyi inhibe ettiğini bildirmiştir. Araştırmacı bu özellikleri taşıyan mediumda kültüre edilen pronükleer gelişme dönemindeki embrioların, blastocyst safhasına gelişebildiklerini ve yalancı gebelere transfer edildiklerinde ise, normal yavruların oluştuğunu bildirmiştir.

Cross ve Brinster(19) 1973 yılında yaptıkları çalışmada, iki hücreli fare embriolarının pyruvat ve laktata olan duyarlılıklarını araştırmışlardır. Kullandıkları bazik mediuma çeşitli konsantrasyonlarda pyruvat( mM olarak 0.05; 0.10; 0.50;1.00; 5.00; 10.00; 100.00) ve laktat( mM olarak 10.00; 30.00; 50.00; 70.00; 90.00) katan araştırmacılar, bunları karşılıklı kullanarak embriolar üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak, ilk bölünme sırasında 0.25 mM pyruvat içeren ve daha sonraki bölünmeler sırasında ise 30.00 mM laktat ve 0.25 mM pyruvat içeren medium kullandıklarında, maksimal seviyede blastocyst safhasına gelişme elde ettiklerini bildirmiştir.

Kane, yaptığı çalışmasında, glukoz ve pyruvatın ayrı ayrı ve birlikte tavşan zigotlarının blastocyst safhasına gelişebilmeleri üzerine olan etkilerini incelemiştir(44). Çalışmada bazal mediuma(BME) karbonhidrat kaynağı katarak veya katmayarak dört grup belirlenmiştir. Birinci gruba hiçbir enerji kaynağı katmazken, ikinci gruba  $5 \times 10^{-4}$ M pyruvat, üçüncü gruba  $1 \times 10^{-2}$ M glukoz ve dördüncü gruba ise glukoz ve pyruvatı beraberce katan ve her grup için 42 embrioyu kültüre eden araştırmacı, bütün gruplar arasında elde edilen değerlerin istatistiksel açıdan farklı olmadığını, ancak pyruvatın hacimsal gelişmeyi desteklemesiyle birlikte glukozla aralarında önemli bir etkileşim olduğunu, pyruvatın embriolar üzerindeki olumlu etkisini glukozun ters yönde etkilediğini bildirmiştir. Araştırmada elde edilen değerler Tablo 9'de görüldüğü gibidir.

Tablo 9. Glukozun ve pyruvatın hatched blastocyst oluşumuna etkisi.

Uygulama grupları	Denenen zigot Sayısı	Hatched blastocyst	
		%	Çapı (um)
Enerji kaynağı katılmadan	42	81.0	383 ± 25
5 x 10 <sup>-4</sup> M pyruvat'lı medium	42	71.0	483 ± 27
1 x 10 <sup>-2</sup> M glukoz'lu medium	42	64.3	376 ± 30
Glukoz - Pyruvat	42	81.0	373 ± 24

#### 2.4.5. in Vitro Kültür Mediumunun Protein Kaynakları:

Maurer(59), Brinster'in BMO-3, McCoy'un 5a, Medium 199, Ham'ın F10 ve F12 mediumlarına sıcakla muamele edilerek inhibe edilmiş serumlar katıldığında, tavşan embriolarının değişik zaman periodlarında in vitro olarak gelişebileceklerini bildirmiştir. Araştırmacı, kültür mediumundan amino asitlerin bazılarının(metionin) çıkartılması ile embrioların gelişemediklerini, kimilerinin(tyrosin, cystein, serin ve threonin) ortamda bulunmadığı hallerde zayıf gelişme gösterdiklerini bildirmiştir. Vitaminlerin kültür mediumunda bulunmadığı durumlarda, tavşan embriolarının erken dönem bölünmelerinde gelişme yüzdesinin düştüğünü saptayan araştırmacı, buna karşın tavşan zigotlarının gelişebilmesi için ortamda glukoz veya pyruvata ihtiyaç duyulmadığını bildirmiştir.

Tavşan embriolarının zigottan blastocyste kadar gelişimlerinde, temel ihtiyaç maddesi olan protein kaynakları pek çok araştırmada incelenmiş ve sonuçta BSA(sığır serumu albumini) veya homolog ve heterolog serumlar ihtiyacı karşılayabilir olarak nitelendirilmiştir(4,6,7,11,15,34,47,59).

Kane ve ark.(47), 1980'de yaptıkları çalışmada ticari BSA'nın in vitro olarak kültüre edilen embrioların üzerinde, iki kesin etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu etkilerden ilkinin BSA'nın taşıdığı yağ asitlerinden dolayı embriyonun enerji ihtiyacını karşılaması, diğerini ise in vitro kültürde genişlemeye uğrayan blastocytlerin zonalarının yırtılmasını sağladığı ve blastocystün zona dışına çıkmasına etkili olduğu şeklinde açıklamışlardır. Araştırmacılar tavşan zigotlarını Ham's

F10 mediumuna BSA'nın çeşitli tiplerini katarak elde ettikleri mediumda kültüre ettiklerinde, kültür süresi sonunda normal BSA içeren mediumda %59 oranında erken blastocyst ve %59 oranında genişlemiş blastocyst ve %51 oranında hatched blastocyste gelişim kaydetmişlerdir. Kloroform ile muamele edilerek uçucu yağ asitlerinden arındırılmış BSA katkılı mediumda %12 erken blastocyst, %5 genişlemiş blastocyst ve %0 hatched blastocyste gelişme elde ettiklerini, bu mediuma  $2 \times 10^{-4}$ M oranında pyruvat katılması ile gelişmelerinin sırasıyla %34, %17 ve %0 olarak belirlendiğini bildirmişlerdir. Bu sonuca göre pyruvatın embryonal gelişimi destekleyici etkisinin bulunduğunu belirtmişlerdir.

Maurer ve ark.(57), 1970 yılında yaptıkları çalışmada, 2 veya 4 blastomerli tavşan embryolarını glukoz içeren tavşan ve sığır serumu içinde 24, 36, 48, 62, 72, 88 ve 97 saat süreler için kültüre etmişlerdir. Çalışmada tavşan ve sığır serumlarını ayrı ayrı ve glukoz katkısı yapılmadan kontrol olarak, ikinci grupta ise bu serumlara 100 mg/100 ml oranında glukoz katarak ayrı ayrı deneme grubu olarak kullanmışlardır. 97 saatlik kültür süreci sonunda %75 morula safhasından önceki dönemlerde, %49.1 oranında morula ve %43.4 oranında blastocyst safhasında; sığır serumu içinde %9.1 oranında morula öncesi ve %90.9 oranında blastocyst safhasına gelişim kaydedilmiştir. Glukoz kattıkları deneme grubunda tavşan serumunda %1.4 morula öncesi dönem, %37.0 oranında morula ve %61.6 oranında blastocyst, sığır serumunda ise %11.0 morula öncesi gelişim safhalarına %4.9 morula ve %84.1 oranında blastocyst safhasına gelişme elde etmişlerdir. Araştırmanın sonucunda, embryoların sığır serumu içinde tavşan serumuna oranla daha iyi geliştiklerini belirtmişlerdir. Transfer sonrası embryoların canlı kalmasında ise in vitro kültürde harcanan sürenin gebelik açısından oldukça etkili olduğunu bildiren araştırmacılar, morfolojik olarak blastocystler normal görünseler bile, gebelik ile sonuçlanan transfer oranınının, 48 saati aşan kültür sürelerinde düştüğünü saptamışlardır. Bu düşüşün sebebini de, 48 saatin üzerindeki periodlarda fonksiyonel olarak iyi senkronize edilmiş

alıcıların hazırlanmasının güçlüğüne bağlamışlardır. Seidel ve ark.(70)'na göre de uzun süreli kültüre edilen embryoların transferlerinden elde edilecek başarılar, uygun bir şekilde senkronize edilmiş alıcıların varlığına bağlıdır. Ayrıca araştırmacılar, tavşanlarda bir iki embryo implante olsa bile, gebeliğin devam edemeyeceğini bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 26, 36, 48, 72 ve 84 saatlik kültür periodları için sırasıyla 4, 19, 18, 67, 38, 31 blastocyst transfer eden araştırmacılar, bu transferlerden sırasıyla 2, 5, 0, 4, 15 ve 0 tane yavru elde etmişlerdir.

in vitro kültür mediumlarına katılan fetal buzağı serumunun(FCS) depolanma yönteminin, in vitro şartlarda embryonik gelişimi destekleyici özelliğine olan etkisini 1990 yılında inceleyen Kameyama ve ark.(43), çalışmada fare embryolarını %5 CO<sub>2</sub>'li ve 39°C'lık ortamda M16 mediumuna FCS ve CS-lot(buzağı serumu)'nun iki tipini(CS-lotA ve CS-lotB) %10 oranında katarak elde ettikleri mediumda kültüre etmişlerdir. Kullanılan FCS'nun 1'den 10 defaya kadar çeşitli defalar dondurup erittikten sonra ve +4°C'da çeşitli sürelerde beklettikten sonra mediuma karıştırmışlar ve sonuçta fetal buzağı serumunun +4°C'da 40 günün üzerinde saklama sürelerinde ve 10 kez tekrarlanan dondurup eritme işlemlerinde bile embryonun in vitrodaki gelişimini destekleyici etkisinin zarar görmediğini savunmuşlardır.

Sığır amniotik ve allantoik sıvılarının kültür mediumu olarak kullanılıp kullanılamayacağı üzerinde Javed ve ark.(42) 1990 yılında bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada, gebeliğin çeşitli dönemlerinde kazandıkları amniotik ve allantoik sıvıları ayrı ayrı ve Witten'in mediumu(WM) ile %100'lük Fetal buzağı serumunu karşılaştırmalı kullanarak sığın embryolarını kültüre etmişlerdir. Çalışma sonucunda, gebeliğin 70. gününden önce alınan amniotik ve allantoik sıvıların in vitro kültür mediumu olarak kullanılabileceğini saptamışlardır. Bunların yanı sıra kazanılan bu sıvıların dondurulmasının embryoları destekleyici etkisi üzerinde ters etkisinin bulunduğunu belirtmişlerdir.

Illera ve ark(41) yaptıkları süperovulasyon çalışması

sonucunda, elde ettikleri tavşan zigotlarını %10 Fötal Buzağı Serumunu içeren bazal medium II(BM II) içinde, 37°C ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda, silikon yağı ile örtülü 20 ul'lik mikrodamlalar içerisinde kültüre etmişlerdir. Çalışma sonucunda elde ettikleri sonuçları karşılaştırdıklarında, süperovulasyon grubunda elde edilen toplam 170 zigotun %52'sinin(89 adet), ancak 120 saat sonra genişlemiş(expanded) blastocyst konumuna gelişebildiklerini, kontrol grubunda ise kazanılan 21 adet 2 blastomerli embryodan %62'sinin(13 adet), 96 saat sonra genişlemiş blastocyst safhasına erişebildiklerini saptamışlardır. Araştırmacılar, PMSG ve anti-PMSG uygulamasının embryonal gelişimde 24 saatlik bir gecikmeye neden olduğunu savunmuşlardır.

Gabler(28) tarafından yapılan 2 blastomerli tavşan embryolarının kültürlerinde kültür mediumu olarak TCM 199 + %20 tavşan serumu; TCM 199 + %20 siğir serumu; Ham's F10 + %20 tavşan serumu; TCM 199 + %1.5 BSA; Ringer solusyonu + %20 siğir serumu; Ringer + %20 tavşan serumu; Ringer + %1.5 BSA; Ringer + %20 siğir serumu + %0.25 glukoz; loges solusyonu + %1.5 BSA mediumları kullanılmıştır. Kültür sonrasında bu mediumlarda sırasıyla TCM 199 + tavşan serumu içinde %81.7 oranında morula ve %41.7 oranında genişlemiş blastocyst; TCM 199 + %20 SS mediumunda %30.1; Ham's F10 + %20 tavşan serumunda %22.7; TCM 199 + %1.5 BSA'da %21.2 oranında blastocyste gelişim elde etmiş, diğer fizyolojik solusyonlarda ise sadece morula safhasına kadar gelişim kaydedilebilmiştir. 2-4; 8-16 hücreli; morula ve blastocyst safhasındaki embryoların transferlerinden sırasıyla %1; %10 ve %3.8 oranında implantasyon belirlemiş fakat, yapmış olduğu blastocyst transferlerinden ise implantasyon elde edememiştir.

Weber(73) yaptığı kültür çalışmasında kazandığı 2-4; 8-16; erken morula; morula ve blastocyst safhasındaki embryoları +3-5°C'lık sıcaklıkta 24-48 saat beklettikten sonra, TCM mediumunda kültüre etmiştir. 24 saat soğukta bekletilen embryoların %39.30'u; 48 saat bekletilenlerin %12.31'i ve kontrol grubunda ise %63.31'i blastocyst safhasına gelişim göstermiştir.



Araştırmacı, morula safhasına kadar yapılan transferlerden oldukça düşük seviyede(%12.65) implantasyon gerçekleştiğini ve bunlardan çok az sayıda(%5) yavru doğduğunu belirtmiştir.

Abdel-Fattah(1) tarafından yapılan çalışmada çiftleşmeden 31-36 saat sonra kazandıkları 4-8 blastomerli tavşan embryolarını %95 nemli, %5 CO<sub>2</sub>'li ve 37°C'a ayarlı ortamda, mini pailletler içinde kültüre etmişlerdir. Kültür sırasında pailletlerin ağzı açık bırakıldığı gibi polivinilalkol veya misketlerle de kapatılmış, ayrıca çalışmada pailletlerin dikey veya yatay durmasının embryonal gelişime olan etkisini incelemiştir. Kültür için %20 FCS içeren ve ayrıca %20 tavşan serumu içeren BSM-II mediumunu kullanan araştırmacı, embryoları 96 saat süreyle bu mediumlarda kültüre etmiştir. Araştırmacı çalışma sonunda FCS'nun veya tavşan serumunun %1 oranında mediauma katılmasında 4-8 blastomerli embryoların ancak 16 blastomerli konuma kadar gelişmesini sağladığını, %20 FCS içeren mediumda açık pailletlerde %96; %20 tavşan serumu içeren mediumda ise %73 oranında blastocyst veya genişlemiş blastocyst konumuna gelişim sağladığını bildirmiştir. Çalışmanın başka bir bölümünde pailletlerin kapalı olmasının etkisini inceleyen araştırmacı kapalı pailletlerdeki gelişimi açıklarla karşılaştırmış, açık bıraktıklarında %81; polivinilalkol ile kapattıklarında %82 ve misketle kapattıklarında ise %64 blastocyst veya genişlemiş blastocyste gelişim kaydetmiştir. Çalışma sonucunda FCS'nun tavşan serumuna göre daha üstün olduğunu ve pailletlerin kültür için çok uygun olduğunu savunmuştur. Kültür aşamasından sonra kültürün embryoların yaşayabilme yeteneğine olan etkisini çeşitli gelişim dönemlerinde transferler yaparak inceleyen araştırmacı, %20 FCS içeren BSM-II mediumunu kullandıkları grupta kültüre etmeden transfer ettikleri embryolardan %74'ünde, 24 saat kültüre ettikleri embryolardan %59, 48-60 saat kültüre ettiklerinden ise %47 oranında fetus oluştuğunu belirlediklerini bildirmiştir. Tavşan serumu kullandıkları gruplarda ise her bir grupta %10 ile %20 oranında bu fotal oluşumlarda bir azalma gözlediklerini bildirmiştir.

Carney ve ark.(16) 2 blastomerli tavşan embryolarını BSM-II mediumu içinde tavşan ovidukt epitel hücreleri ile birlikte kültüre etmişlerdir. Çalışmada BSM-II mediumunu üç şekilde kullanmışlardır. İlk grupta hiçbir katkı maddesi eklenmemiş BSM-II'de kültür kontrolünü, ikinci grupta insülin, transferrin, selenyum ve epidermal growth faktör (ITS/EGF), collagen içeren BSM-II mediumunda co culture'ün kontrolünü ve üçüncü grupta ise ovidukt epitelleri ile beraber BSM-II + ITS/EGF + collagen mediumunda ise co culture'ü gerçekleştirmişlerdir. ITS/EGF ve collagen'in embryolar üzerinde bir etkisinin bulunmadığını belirten araştırmacılar, ovidukt hücrelerinin bu maddelere ihtiyaç duymasından dolayı kültür sistemine katıldığını belirtmişlerdir. Çalışma sonucunda kültür kontrolünde %79, co culture kontrolünde %0 ve co culture sisteminde ise %89 oranında blastocyste gelişim elde etmişlerdir.

### 3. MATERYAL VE METOD

Araştırmanın materyali 60'ı verici (donor) ve 30'u alıcı (recipient) olmak üzere toplam 90 dişi tavşandan oluştu. Bunlara ek olarak, vericilerin tohumlanmasında 4 adet de damızlık erkek tavşan kullanıldı.

Araştırmanın materyalini seçerken aşağıdaki esaslara özenle dikkat edildi.

- 1- Yaklaşık aynı yaşta olmaları,
- 2- Yaklaşık aynı ağırlıkta olmaları,
- 3- Aynı ırktan olmaları,
- 4- Aynı şartlarda bakım ve beslenmeleri.

Çalışma, aşağıdaki disiplin takip edilerek, 5 aşamada gerçekleştirildi.

- 1- Vericilerde süperovulasyon ve çiftleştirilmeleri.
- 2- Alıcıların senkronizasyonu.
- 3- Embryoların kazanılması ve değerlendirilmeleri.
- 4- Embryoların in vitro kültürleri.
- 5- Kültür sonrası sağlıklı embryoların transferi.

#### 3.1. Vericilerde Süperovulasyon ve Çiftleştirilmeleri:

Vericilerde süperovulasyonu sağlamak amacıyla, bir süperovulatör ajan olan PMSG (Pregnat Mare Serum Gonadotropin; Folligon; Intervet) hormon preparatından yararlanıldı.

Çalışma, her seferinde iki vericinin süperovulasyonu gerçekleştirilerek toplam 30 partide tamamlandı. Her uygulama grubunda PMSG'nin toplam aynı dozu, fakat iki farklı verilme yöntemi denendi (Tablo 10).

- 1- Toplam 225 IU PMSG'nin tek enjeksiyonla kas içi yolla verilmesi.

2- Toplam 225 IU PMSG'nin üç eşit doza bölünerek kas içi yolla uygulanışı.

Tablo 10. Süperovulasyon için PMSG'nin kullanım yöntemleri ve uygulanışı.

Prepara- rat	Toplam doz IU	Hayvan sayısı	PMSG' nin uygulanışı			
			1. gün	2. gün	3. gün	4. gün
PMSG	225 IU	30	225 IU	-	-	150IU hCG + Toh.
PMSG	225 IU	30	75 IU	75 IU	75 IU	150IU hCG + Toh.

**3.1.1. Toplam 225 IU PMSG'nin Tek Enjeksiyonla Verilişi:** Folliküler fazda olan 30 dişi tavşana tek enjeksiyonda 225 IU PMSG kas içi yolla verilerek süperovulasyon reaksiyonu oluşturuldu. PMSG enjeksiyonundan 72 saat sonra ise ovulasyonları sağlamak için iv. olarak 150 IU hCG(Human Chorionic Gonadotropin; Pregnyl; Organon) enjeksiyonu yapıldı.

**3.1.2. Toplam 225 IU PMSG'nin Üç Eşit Doza Bölünerek Kas İçi Yolla Uygulanışı:** 225 IU'lık doz üç eşit porsiyona bölünerek 75 IU'lık dozlarda, folliküler fazda bulunan tavşanlara 24 saatlik aralarla kas içi olarak verildi. Son PMSG enjeksiyonundan 24 saat sonra ovulasyonları sağlamak için, diğer grupta olduğu gibi 150 IU hCG damar içi yolla uygulandı. Vericiler, Maurer(59)'in de önerdiği gibi, ovule edilecek sekonder oocytlerin, doğal olarak sayılarını artırmak amacıyla, her iki grupta da hCG enjeksiyonundan hemen sonra iki ayrı erkekle üstüste çiftleştirildiler.

**3.2. Alıcıların Senkronizasyonu:** Embryoların 96 saat in vitro kültürlerinden sonra, normal gelişimlerini tamamlayanların alıcılara transferleri planlandı. Bu amaçla, gerek taze ve gerekse kültüre edilmiş embryoların transferlerinde, uygulamalar sırasında, embryoların gelişimlerinin yavaşladığı belirlendiğin-

den(27,36,44), alıcılar vericilere göre 24 saat daha geç ovulasyon(hCG enjeksiyonu) işlemine tabi tutuldular. Böylece vericilerle alıcılar arasında 24 saatlik bir siklus farkı oluşturuldu.

**3.3. Embryoların Kazanılması ve Değerlendirilmeleri:** in vitro kültür çalışmalarında kullanılacak olan embryoların 24 saatlik(2 blastomerli) gelişim safhasında olması istenildiğinden, embryoların kazanılması, vericilerin çiftleştirilmelerinden 24 saat sonra gerçekleştirildi. Embryolar, nembutal genel anestezisi altındaki tavşanlardan operatif olarak ve ovidukt yıkaması yöntemi ile kazanıldı.

Nembutal iv. yolla ilk 1 ml'si hızlı ve devamı da operatif genel anestezi sağlanıncaya kadar yavaş verilerek kullanıldı. Median hat ensizyonu ile üreme organları(uterus, ovidukt, ovaryumlar) ensizyon hattına çıkartılıp, ovaryumlardaki ovulasyon odakları ve patlamamış folliküller sayılarak reaksiyonlar saptandı.

Oviduktan embryoların kazanılmasında %1.5 BSA içeren Dulbecco'nun PBS'i(38) yıkama sıvısı olarak kullanıldı(Tablo 11).

Tablo 11. Dulbecco'nun PBS(Phosphat Buffered Salin) mediumunun yapısı.

Madde	mg/lt	Madde	mg/lt
NaCl	8000	KCl	200
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1150	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	100	CaCl	100

Hazırlanan mediuma %1.5 oranında BSA ve her ml'ye 100 IU kristal penicillin ve 0.5 mg streptomycin sülfat katıldı.

PBS mediumu hazırlanırken Tablo 13'de belirtilen kimyasal maddeler tartılıp steril, 1 lt'lik balon içine konuldu. Daha sonra üzerine bir miktar steril, bidistile su ilave edilip, magnetik karıştırıcıda maddelerin tamamen erimesi sağlandı. Kimyasal maddeler eritildikten sonra %1.5 oranında BSA(Bovine Serum Albu-

min) ilavesi yapıldı ve yine magnetik karıştırıcı üzerinde BSA'nın da erimesi sağlandı. BSA da eridikten sonra mediumun hacmi 1 lt'ye tamamlandı ve antibiotik ilavesi yapılarak sterilizasyon amacıyla filtrasyon işlemi gerçekleştirildi. Filtrasyon işlemi, otoklavda sterilize edilmiş, por genişliği 0.45 um olan milipor filtreden geçirilerek yapıldı. Sterilizasyon sonrası, herhangi bir kontaminasyonun kontrolü amacıyla, hazırlanan medium 24 saat süre ile 37°C'lik inkübatörde bekletildi.

Ovidukt yıkaması için 16-18 numara, ucu kütleştirilmiş bir kanül, uterusun utero-tubal bağlantı yerine yakın bir yerden lümeneye sokularak, 1-1.5 cm ovidukt içine yönlendirildi. Ovidukt içindeki kanül, başparmak ile işaret parmağı arasında hafifçe sıkılarak tesbit edildi. Daha sonra kanülün ajutajına 5 ml yıkama mediumu içeren bir enjektör adapte edildi. Diğer taraftan dış çapı 1-1.5 mm olan bir polietilen boru, fimbriadan ovidukt içine sokularak yine iki parmak arasında hafifçe sıkılarak tesbit edildi. Polietilen borunun diğer ucu altına ise, bir saat camı konuldu ve enjektör aracılığı ile verilen yıkama sıvısının oviduktten geçerek bu cam kaptan toplanması sağlandı (Resim 1).

Embryoları içeren yıkama sıvıları, değerlendirilme aşamasına kadar 37°C'ye ayarlı sıcak tabla üzerinde bekletildi. Bu bekletilme süresi, yıkama sıvısı içinde bulunabilecek ve üreme organlarından köken alan zararlı etkenlerden (kan hücreleri vb.) embryoları korumak amacıyla mümkün olduğunca kısa tutuldu. Yıkama sıvısı içinden mikropipet aracılığı ile dışarıya alınan embryolar, oviduktten gelen sıvı ve hücrelerden arındırılmak amacıyla, üç ayrı petri kutusu içinde bulunan taze PBS mediumundan ayrı ayrı geçirilerek üç kez yıkandılar. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra ise değerlendirmeye alındılar.

Embryoların kazanılmasından sonra kültür aşamasına kadar yapılan tüm işlemler, içi ultraviole lambası ile sterilize edilen bir cam kabin içinde gerçekleştirildi (Resim 2). Kabin iç yüzeyinin sterilizasyonu için, ultraviole lambası 12 saat öncesinden çalıştırıldı ve kabinin cam kapağı kapalı tutuldu.

Embryoların değerlendirilmesi ve diğer tüm manipulasyonlar, camlı dolap içinde bulunan zumlu, x10 - x40 büyütmeli stereo mikroskop(Olympus; VMZ 4F) altında gerçekleştirildi. Değerlendirme sırasında, zigot halinde olan embryoların, vitelluslarının görünümleri, homojen yapıda olup olmadığı, vitellusta dağılma, parçalanma ve vakuollenmelerin bulunup bulunmadığı, vitellus hacmi, vitellin boşlukta polar cisimciklerin varlığı ve zona pellusidaların kalınlığı, homojen yapısı, yuvarlaklığı ve berrak görüntüsü göz önünde bulunduruldu. İki hücreli embryoların ise yine zona pellusidalarının yapısına, blastomerlerin eşit büyüklükte ve zona iini doldurma durumlarına, blastomer sitoplazmalarının homojen yapısına, vakuollenme ve dejeneratif değişikliklerin varlığına bakılarak sağlık durumları hakkında karar verildi.

**3.4. Embryoların in Vitro Kültürleri:** Sağlıklı olduğuna karar verilen zigot ve embryolar, in vitro ortamda kültüre edildiler.

Kültür aşamasında kullanılan cam petriler ve diğer bütün cam malzemelerin temizliğinde 7x(Serva) temizleyicisi kullanıldı. 7x'li suda temizlenen malzemeler, durulamak amacıyla 7 defa, peşpeşe distile sudan geçirildiler. Kurutulduktan sonra aliminyum kağıtlara sarılarak, otoklavda sterilize edildiler.

**3.4.1. in Vitro Kültür Ortamı:** Embryoların kültüre edilmeleri için inkübatör olarak,  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 'a ayarlanabilen etüv kullanıldı. Kültür kabini olarak ise 2.5 lt hacimde, gaz giriş ve çıkışı için iki adet bağlantısı bulunan kültür kabininden yararlanıldı(Resim 3).

**3.4.2. Kültür Mediumları:** alışmada, embryoların kültürü için en ideal ve en ekonomik mediumu belirlemek amacıyla, aşağıda belirtilen üç medium denendi.

- 1- TCM 199 + %20 Sığır serumu(SS)
- 2- TCM 199 + %1.5 BSA
- 3- PBI + %20 SS

Bu üç mediumdan ikisinde esas olan TCM 199 hazır olarak alındı. Toz halinde temin edilen medium laboratuvarında, steril bidistile su ile eritilerek filtre edildi. Kullanım öncesinde gerekli katkı maddeleri eklenerek tekrar sterilizasyon amacıyla filtreden geçirildi. Diğer PBI mediumu(60) ise kendi laboratuvarımızda hazırlandı.

TCM 199 ve PBI mediumlarına katılan sığır serumu, sağlıklı sığırlardan elde edildi. Bu amaçla sığırlardan venöz kan steril tüplere alındı. Kanlar pıhtılaştıktan sonra çizilerek, serumların ayrılması için, oda ısısında 24 saat bekletildi. Elde edilen serumlar 3000 devirde 20 dakika santrifüje edildikten sonra, dipteki tortulardan ayrılıp ikinci kez, aynı devir ve sürede santrifüje edildiler. Santrifüj sonrasında serumlar, yapısında bulunan ovosid faktörlerin inhibe olması için 56°C'da 30 dakika bekletildi. Elde edilen bu serumlar daha sonra, küçük porsiyonlar halinde buzlukta dondurularak, kullanılıncaya kadar saklandı. Böylece, hazırlanan serumlar kullanılacağı zaman eritilip, belirtilen oranlarda mediumlara katıldı.

Araştırmada embryoların in vitro kültürü için kullanılan bazal mediumlardan TCM 199( GIBCO; Tablo 12) ve PBI mediumun bileşimleri(Tablo 13) aşağıda belirtildiği gibidir.



Tablo 12. TCM 199 mediumunun kimyasal yapısı.

inorganik komponentler	mg/lt	Amino asitler	mg/l
CaCl <sub>2</sub> (susuz)	140.00	DL-Alanin	50.00
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	0.72	L-Arginin.HCl	70.00
KCl	400.00	DL-Aspartik asit	60.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60.00	L-Sistein.HCl.H <sub>2</sub> O	0.11
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	200.00	L-Sistin.2HCl	26.00
NaCl	8000.00	DL-Glutamik asit.H <sub>2</sub> O	150.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (susuz)	47.00	L-Glutamin	100.00
Diğer Komponentler:	.	Glisin	50.00
Adenin Sulfat	10.00	L-Histidin.HCl.H <sub>2</sub> O	21.88
ATP(disodium tuzu)	1.00	L-Hidroksipropilin	10.00
Adenilik asit	0.20	DL-Isoleusin	40.00
Kolesterol	0.20	DL-Leusin	120.00
Deoksiriboz	0.50	L-Lisin	70.00
D-Glukoz	1000.00	DL-Metionin	30.00
Glutation(indirgenmiş)	0.05	DL-Fenilalanin	50.00
Guanin.HCl	0.30	L-Prolin	40.00
Hipoksantin(Na tuzu)	0.354	DL-Serin	50.00
Fenol red	20.00	DL-Treonin	60.00
Riboz	0.50	DL-Triptofan	20.00
Sodium asetat	50.00	L-Tirosin(disodium t.)	57.66
Timin	0.30	DL-Valin	50.00
Tween80	20.00	Vitaminler	mg/lt
Urasil	0.30	Askorbik asit	0.05
Ksantin(Na tuzu)	0.344	D-Biotin	0.01
Vitaminler	mg/lt	D-Ca Pantotenat	0.01
Kalsiferol	0.10	Folik asit	0.01
Kolin Klorid	0.50	Menadinon	0.01
i-inositol	0.05	Niasinamid	0.025
Niasin	0.025	Pridoksal HCl	0.025
Para-faminobenzoik asit	0.050	Ribofilavin	0.01
Pridoksin HCl	0.025	Vitamin A(asetat)	0.14
Tiamin HCl	0.01	.	.

- TCM 199 Gibco firmasından hazır olarak temin edildi ve bir gruba %20 oranında Sığır serumu, diğerine ise %1.5 BSA katıldı.  
- Olası bir kontaminasyona karşı her iki uygulamada da ml'ye 100 IU kristal penicillin ve 0.5 mg streptomisin sülfat katıldı.  
- Kültür Çalışması CO<sub>2</sub>'li ortamda yapılacağından bu mediuma filtrasyon öncesinde, firmanın önerdiği şekilde 0.35 g/lt oranında NaHCO<sub>3</sub> katılarak CO<sub>2</sub> gazı ile gazlandı.

Tablo 13. FBI Mediumunun kimyasal yapısı.

Madde	mg/lt	Madde	mg/lt
NaCl	8000.00	KCl	200.00
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	100.00	KH <sub>4</sub> PO <sub>4</sub>	200.00
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1150.00	Na-pyruvat	365.00
CaCl <sub>2</sub> (a)	1 ml	Phenol Ret(b)	1 ml
Glukoz	1000.00		

a- CaCl<sub>2</sub>; 13.246 g CaCl<sub>2</sub> 100 ml bidistile suda eritilip 1 ml'si mediuma katıldı.

b- Phenol Ret; 0.5 g phenol rot 100 ml bidistile suda eritilip 1 ml'si mediuma katıldı.

- Medium hazırlandıktan sonra %20 sığır serumu katıldı.

- Bu mediuma da diğer TCM 199 mediumunda olduğu gibi ml'ye 100 IU kristal penicillin ve 0.5 mg streptomysin sülfat katıldı.

- Kültür çalışması CO<sub>2</sub>'li ortamda yapıldığından, tampon tuzu olarak NaHCO<sub>3</sub>, 2.2 g/lt oranında katılarak CO<sub>2</sub> gazı ile gazlandı.

**3.4.3. Kültür Kapları:** Çalışmada, Brinster(12) tarafından önerilen, 1 ml kültür mediumu içeren, 30x15 mm ebatlarındaki tek kullanımlık, steril plastik kültür kapları(Nunk, Inter Med) kullanıldı. Petri kutularına 1 ml medium konulduktan sonra üzeri, yine steril ve toksik etkisi olmayan parafin yağı ile(Parafin Oil, Merk) örtüldü. Böylece, mediumda oluşabilecek buharlaşmanın ve medium ile atmosfer arasındaki hızlı gaz alışverişinin önüne geçildi.

Kültür mediumlarına aktarılincaya kadar 3. yıkama kabında tutulan embryolar, mikropipet aracılığı ile 10-15'erli gruplar halinde belirtilen kültür mediumlarının içine yerleştirildiler. Daha sonra, plastik petriler, 100 x 20 mm ölçülerindeki, tabanında steril bidistile su bulunan cam petriler içine üzer üzer konuldular.

Kültür petrileri cam petriler içine üzer üzer yerleştirilirken, bir büyük cam petri içine, TCM 199 + %20 SS, TCM 199 + %1.5 BSA ve FBI + %20 SS uygulama gruplarının bir arada konulmasına özen gösterildi. Buradaki amaç, eğer ortamda, kültür mediumunun haricinde embryoları etkileyen herhangi bir etken var ise, üç uygulama grubunun da bu faktörden eşit olarak etkilenme-

isini sağlamaktı.

Kültür gruplarını içeren büyük cam petrilere, kültür kabine konulduktan sonra, kabin içi, %5 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> gazı karışımından yararlanılarak, Brinster(12) tarafından ortaya konulan,

$$V \cdot dC/dt = FCx - FC$$

formülüne göre gazlandı.

Bu formüle göre, kültür kabininin hacmi(V) 2.5 lt, giren gazın akış hızı(F) 1 lt/dakika, gazlama öncesi kabin içi CO<sub>2</sub> gazı konsantrasyonu(C) 0, gazlama sonrası ulaşılmaması istenilen CO<sub>2</sub> konsantrasyonu(dC) %5 ve kabine giren gazın CO<sub>2</sub> oranı(Cx) ise %5 olarak belirlendi.

$$2.5 \times 0.05/dt = 1 \times 0.05 - 1 \times 0$$

eşitliğinden gazlama süresi= dt= 2.5 dakika olarak hesaplandı.

**3.4.4. Kültür Periyotları ve Embryoların Kontrolleri:** in vitro kültür ortamına konulan embryoların gelişimlerinin belirlenmesi ve buldukları medyumların tazelenmesi amacıyla, her 24 saatte bir embryolar inkübatör dışına alındılar. Dışarıya alınan embryolar gelişim durumları, bölünmelerin homojenliği, blastomerlerin büyüklüklerinin homojenliği, sitoplazmalarının sağlıklı görünüşleri ve dejeneratif değişiklikler dikkate alınarak sağlık kontrolleri yapıldı. Kontrolleri yapılan sağlıklı embryolar, taze kültür medyumları içeren yeni petrilere içine konuldular. Petrilere kültür kabini içine yerleştirilip her defasında, daha önce de belirtildiği gibi gazlama yapıldı. in vitro kültür süresi 96 saate ulaşınca kadar her 24 saatte bir bu işlemler tekrar edildi.

### 3.5. Kültür Sonrası Sağlıklı Embryoların Transferi: 96

saatlik in vitro kültür süresi sonunda, embryoların blastocyst safhasında olmaları esas alındı. Bununla beraber genel durumu iyi, berrak ve homojen görünümde olan, hücresel erimelerin ve parçalanmaların görülmediği, kompakt morula ile genişlemiş (expanded) blastocyst safhaları arasındaki gelişim safhalarına sahip embryolar da transfer edilebilir, sağlıklı embryolar olarak nitelendirildi.

Sağlıklı bulunan embryolar, genel anestezi altında operatif yolla, senkronize edilmiş alıcılara transfer edildiler. Embryoların kazanılmasında olduğu gibi, aynı yöntemle anesteziye edilen alıcılara median hat ensizyonu uygulandı. Ovaryumlardaki reaksiyonlar, her bir kornu uteriye verilecek embryo sayısını belirlemek amacıyla saptandı. Kornu uterilerin herbirine, servikse yakın olmak üzere, mikropipetin geçebileceği büyüklükte, kalın bir kanül aracılığı ile delik açıldı. Uygun sayıda embryo içeren mikropipet, açılan delikten uterus içine sokulup apekse kadar yönlendirildi. Embryoların mümkün olduğunca uç noktaya bırakılmaları sağlandı.

Transfer sonrası alıcılar, gebelik takipleri yapılmak üzere ayrı kafeslerde barındırıldılar.

#### 4. BULGULAR:

Bu bölümde araştırmanın sonuçları; süperovulasyon, embryoların kazanılması, toplam 96 saatlik in vitro kültür gelişmesi süresinde 24 saatlik periodlarda embryoların gelişim durumları ve onların transferleri olmak üzere dört aşamada sunuldu.

4.1. Süperovulasyon sonuçları: Süperovulasyon uygulaması materyal ve metod kısmında da belirtildiği gibi iki ayrı şekilde yapıldı.

1- Toplam 225 IU PMSG'nin tek enjeksiyonla verilmesi.

2- Toplam 225 IU PMSG'nin üç eşit doza (75 IU) bölünerek üç enjeksiyonda uygulanması.

4.1.1. Toplam 225 IU PMSG'nin tek enjeksiyonla verilmesi: Bu uygulamada toplam 30 hayvan kullanıldı. Yapılan çalışmada PMSG enjeksiyonundan 96 saat sonra operasyonlarda tesbit edilen ovaryum reaksiyonları Tablo 14'de belirtildiği gibidir.

Tablo 14'de süperovulasyon için yapılan PMSG enjeksiyonundan elde edilen değerler, bireylere ve bireyin kendi bünyesinde sağ ve sol ovaryumlarına ait bulguları göstermektedir.

Tablo 15'de ise, bu değerler genel toplam olarak verilmektedir.

Tablo 14. Toplam 225 IU PMSG'nin tek enjeksiyonla verildiği hayvanlarda gözlenen ovaryum reaksiyonları.

Hayvan sıra no	Sağ Ovaryum		Sol Ovaryum	
	Patlamamış Fol.	CL.H	Patlamamış Fol.	CL.H
1	8	2	7	5
2	3	10	4	5
3	3	3	3	3
4	-	35	-	35
5	6	5	6	12
6	7	7	12	9
7	6	7	7	9
8	5	18	6	23
9	3	8	3	15
10	4	15	3	10
11	-	10	-	2
12	2	12	-	12
13	9	1	4	10
14	2	3	3	5
15	9	1	4	3
16	5	3	3	2
17	12	3	14	-
18	-	-	-	-
19	2	6	1	5
20	3	7	2	5
21	6	9	3	7
22	4	10	5	8
23	2	5	3	7
24	3	7	4	9
25	2	8	3	10
26	10	6	11	8
27	8	12	6	15
28	-	-	-	-
29	3	15	3	13
30	6	14	2	8

CL.H= Hemorajik korpus luteum(Ovulasyon odağı).

Fol.= Follikül

Tablo 15. Toplam 225 IU PMSG'nin tek enjeksiyonla

Toplam hayvan Sayısı(n)	verilmesinden elde edilen ovaryum reaksiyonları.	
	Ovaryumlardaki Reaksiyonlar	
	Patlamamış Follikül	CL.H sayısı
30	253	524
Matematik ortalama	8.43 ± 2.29	17.53 ± 4.99

Tablo 15'den de anlaşılacağı üzere, 30 hayvanın ovaryumlarında 253 adet patlamamış(ovule olmamış) follikül ve 524 adet de korpus luteum hemorajikum(ovulasyon odağı) bulunduğu saptandı.

Ovaryumlarda hayvan başına ortalama olarak  $8.43 \pm 2.29$  adet patlamamış follikül, yine aynı grupta ortalama  $17.53 \pm 4.99$  adet de ovulasyon odağının bulunduğu tesbit edildi ( $t= 0.05$ ).

225 IU PMSG'nin tek enjeksiyonla verildiği bu grupta patlamış folliküller ve ovulasyon odakları toplanarak süperovulator ajanın etkisiyle oluşan gelişmenin saptanması istenildiğinde ise toplam 777 adet follikülün gelişmiş olduğunu belirledik. Ortalama ovaryum reaksiyonları  $t= 0.05$  güvenilirlik eşiğine göre hesaplandığında ise hayvan başına  $25.96 \pm 4.96$  adet olarak bulundu.

Ovaryumlarda gelişen 777 adet follikülden, 524 tanesinin ovule edildiği göz önünde bulundurulduğunda, ovulasyon oranının %66.43 olduğu hesaplandı.

#### 4.1.2. Toplam 225 IU PMSG'nin üç enjeksiyonla verililişi:

PMSG'nin üç eşit doza bölünerek, 24 saat arayla verildiği bu grupta da 30 hayvan kullanıldı. Uygulamalardan 96 sonra elde edilen ovaryum verilerinin bireysel olarak dağılımları Tablo 16'da görüldüğü gibidir.

Tablo 16. Toplam 225 IU PMSG'nin üç eşit doza (75 IU) bölünerek üç enjeksiyonla verildiği hayvanlarda gözlenen ovaryum reaksiyonları.

Hayvan sıra No	Sağ Ovaryum		Sol Ovaryum	
	Patlamamış Fol.	CL.H	Patlamamış Fol.	CL.H
1	20	5	25	6
2	6	10	10	7
3	10	10	12	12
4	11	2	5	3
5	6	18	6	12
6	6	11	11	10
7	10	4	9	6
8	15	4	17	13
9	5	10	8	12
10	-	-	2	3
11	-	-	-	-
12	10	17	6	19
13	7	5	8	3
14	7	6	3	3
15	2	2	4	4
16	-	-	-	-
17	2	4	3	2
18	2	1	2	4
19	1	9	1	8
20	3	10	4	11
21	6	13	2	9
22	8	15	3	10
23	11	17	8	11
24	8	9	6	13
25	2	13	7	15
26	10	18	8	9
27	4	7	7	9
28	7	9	7	5
29	4	2	5	4
30	7	5	8	6

Tablo 16'da verilen değerler bireylere göre ve aynı zamanda da sağ ve sol ovaryumlara göre dağılımları ifade etmektedir. Tablo 17'de ise, bu değerler genel toplam olarak verilmektedir.



Tablo 17. 3x75 IU PMSG enjeksiyonu sonrasında hayvanlarda gözlenen toplam ovaryum reaksiyonları.

Toplam Hayvan Sayısı(n)	Ovaryumlardaki Reaksiyonlar	
	Patlamamış Follikül say.	CL.H sayısı
30	387	465
Matematik ortalama	12.96 $\pm$ 3.43	15.5 $\pm$ 3.59

Tablo 17'den de izlendiği gibi, 30 hayvanın ovaryumlarında 387 adet ovule olmamış follikül ve 465 adet de korpus luteum(ovulasyon odağı) belirlendi.

Ovaryumlarda hayvan başına ortalama olarak 12.96  $\pm$  3.43 adet patlamamış follikül saptanırken, yine aynı grupta ortalama 15.5  $\pm$  3.59 adet ovulasyon odağının bulunduğu tesbit edildi(t= 0.05).

PMSG'nin 24 saat arayla 3x75 IU dozda verildiği bu hayvanlarda, verilen hormonun etkisiyle oluşan toplam folliküler gelişme ortaya konulduğunda ise toplam 852 adet follikülün geliştiği saptandı. Ovaryumlardaki gelişmeye göre hayvan başına düşen ortalama değer 28.46  $\pm$  5.64 olarak hesaplandı(t= 0.05).

Gelişen bu 852 adet follikülden, 465 tanesinin ovulasyona uğradığını, buna bağlı olarak da, ovulasyon oranının ise %54.57 olduğu saptandı.

#### 4.2. Ovidukt yıkaması sonucunda elde edilen bulgular:

Ovidukt yıkaması sonrası elde edilen bulgular, süperovulatör ajanın verilmiş yöntemine göre iki grupta toplandı.

4.2.1. Tek enjeksiyonla 225 IU PMSG uygulanan vericilerden kazanılan embryolar: Bu uygulama grubunda 30 hayvanda yapılan ovidukt yıkamasından elde edilen değerler Tablo 18'de izlendiği gibidir.

Tablo 18. Tek enjeksiyonla 225 IU PMSG verilen hayvanlardan elde edilen toplam hücre sayısı ve dağılımları.

Hay. sıra no	T.Hücre sayısı	Sağ Ovidukt				Sol Ovidukt			
		Ovum	Zigot	2B	4B	Ovum	Zigot	2B	4B
1	3	-	-	-	-	2	1	-	-
2	15	4	6	1	-	2	1	1	-
3	4	1	1	-	-	2	1	-	-
4	58	10	19	-	-	7	22	-	-
5	34	1	1	13	-	2	4	13	-
6	13	3	-	3	-	2	-	5	-
7	5	2	1	-	-	1	1	-	-
8	7	3	-	-	-	1	2	1	-
9	21	1	-	9	-	1	3	6	1
10	24	-	2	13	-	-	2	7	-
11	12	3	7	-	-	-	2	-	-
12	22	-	5	6	-	1	3	7	-
13	20	-	4	8	1	1	3	3	-
14	5	1	1	1	-	-	1	1	-
15	3	1	-	-	-	-	1	1	-
16	1	-	1	-	-	-	-	-	-
17	2	1	1	-	-	-	-	-	-
18	0	-	-	-	-	-	-	-	-
19	12	7	-	-	-	5	-	-	-
20	12	1	2	4	-	-	1	4	-
21	16	1	3	5	-	-	2	5	1
22	16	1	3	5	-	-	3	4	-
23	12	-	-	4	-	-	2	6	-
24	18	1	2	5	-	-	2	7	1
25	18	1	2	5	-	-	2	7	1
26	13	1	2	2	-	1	2	5	-
27	25	3	4	5	-	-	3	10	-
28	0	-	-	-	-	-	-	-	-
29	23	-	4	7	-	2	4	5	1
30	20	-	3	8	1	1	3	4	-

B= blastomer

Bu grupta 30 hayvandan toplam 434 hücre kazanıldı. Bu sayı ovaryumlarda tesbit edilen ovulasyon odakları ile karşılaştırıldığında, hücrelerin kazanılma oranı %82.8 olarak belirlendi.

Kazanılan toplam 434 hücrenin 78 tanesi(%17.97) ovum (Resim 4) 148 tanesi(%34.10) zigot(Resim 5), 202 tanesi(%46.54) 2 blastomerli(Resim 6) ve 6 tanesi(%1.38) de 4 blastomerli(Resim 7)

embryo olarak tesbit edildi(Tablo 19). Bu grupta kazanılan hücrelerin fertilizasyon oranı %82.02 olarak belirlendi.

Tablo 19. Tek enjeksiyonla 225 IU PMSG verilen hayvanlardan elde edilen embryoların gelişim dönemlerine göre dağılımları ve matematik ortalamaları(t= 0.05).

n	Toplam hücre say.	Ovum sayısı	Zigot sayısı	2 blastomerli E. sayısı	4 Blastomerli E. sayısı
30	434	78	148	202	6
x	14.46 $\pm$ 4.45	2.6 $\pm$ 1.33	4.9 $\pm$ 2.74	6.73 $\pm$ 2.61	0.2 $\pm$ 0.10

x = Matematik ortalama

Genel olarak kazanılan hücrelerin hayvan başına ortalama değerleri 14.46  $\pm$  4.45 olarak belirlendi(Tablo 19).

Kazanılan hücrelerin gelişim durumlarına göre hayvan başına düşen ortalama değerleri, t= 0.05 güvenilirlik eşiğine göre hesaplandığında 2.6  $\pm$  1.33 adet ovum, 4.9  $\pm$  2.74 adet zigot, 6.73  $\pm$  2.61 adet 2 blastomerli ve 0.2  $\pm$  0.10 adet de 4 blastomerli embryo olarak belirlendi(Tablo 19).

**4.2.2. Üç enjeksiyon uygulanan vericilerden kazanılan embryolar:** Bu grupta yapılan ovidukt yıkamaları sonucunda 30 hayvandan elde edilen hücrelerin dağılımı Tablo 20'de belirtildiği gibidir.

Bu grupta 30 hayvandan toplam 429 adet hücre kazanıldı. Ovaryumlarda tesbit edilen ovulasyon odakları sayısı(465) ile hücrelerin sayıları karşılaştırıldığında, hücrelerin kazanılma oranları %92.2 olarak belirlendi.

Tablo 20. 3x75 IU PMSG verilen hayvanlardan elde edilen embryolar.

Hay. sıra no	T.Hücre sayısı	Sağ Ovidukt				Sol Ovidukt			
		Ovum	Zigot	2 B	4 B	Ovum	Zigot	2 B	4 B
1	7	-	-	2	-	1	1	3	-
2	26	4	4	-	-	3	15	-	-
3	30	3	-	9	-	-	6	12	-
4	4	2	-	-	-	2	-	-	-
5	17	-	-	7	-	2	4	4	-
6	24	13	4	-	-	5	2	-	-
7	5	1	4	-	-	-	-	-	-
8	18	-	4	-	-	-	14	-	-
9	20	-	4	7	-	-	2	7	-
10	0	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0	-	-	-	-	-	-	-	-
12	36	-	-	19	1	1	-	11	4
13	7	-	1	2	-	4	-	-	-
14	5	-	2	1	-	1	-	1	-
15	8	-	4	-	-	1	3	-	-
16	0	-	-	-	-	-	-	-	-
17	1	-	-	1	-	-	-	-	-
18	3	1	-	-	-	2	-	-	-
19	19	-	-	8	-	-	-	10	1
20	19	1	3	6	-	2	1	6	-
21	19	2	2	7	-	-	3	4	1
22	23	3	4	7	-	-	-	9	-
23	25	2	-	13	-	-	-	10	-
24	21	1	1	7	-	1	3	8	-
25	24	-	3	9	-	2	1	9	-
26	24	-	5	11	-	-	3	5	-
27	16	-	3	4	-	-	-	9	-
28	14	3	1	5	-	-	1	4	-
29	4	-	-	1	-	-	-	3	-
30	10	1	-	3	-	1	3	2	-

Kazanılan 429 hücrenin 65 tanesi(%15.15) ovum, 111 tanesi(%25.87) zigot, 246 tanesi(%57.34) 2 blastomerli ve 7 tanesi(%1.63) de 4 blastomerli embryo olarak tesbit edildi(Tablo 21). Bu uygulama grubundaki fertilizasyon oranı ise %84.84 olarak saptandı.

Genel olarak kazanılan hücrelerin hayvan başına ortalama değeri  $14.3 \pm 3.76$  olarak saptandı(Tablo21).

Tablo 21. Üç enjeksiyonla 225 IU PMSG verilen hayvanlardan elde edilen embryoların gelişim dönemlerine dağılımları ve matematik ortalamaları (t= 0.05).

n	Toplam hücre	Ovum sayısı	Zigot sayısı	2 Blastomerli sayısı	4 Blastomerli sayısı
30	429	65	111	246	7
x	14.3±3.76	2.1±1.26	3.7±1.75	8.2±3.21	0.23±0.34

x= Matematik Ortalaması

Kazanılan hücrelerin gelişim durumlarına göre hayvan başına düşen ortalama değerleri 2.1 ± 1.26 adet ovum, 3.7 ± 1.75 adet zigot, 8.2 ± 3.21 adet 2 blastomerli ve 0.23 ± 0.34 adet de 4 blastomerli embryo olarak belirlendi (Tablo 21).

**4.3. in Vitro Kültür Sonuçları:** Ovidukt yıkaması ile kazanılan hücreler, materyal ve metod kısmında belirtilen değerlendirme yöntemleri ile değerlendirildikten sonra, sağlıklı bulunan embryolar, zigot ve iki blastomerli olmak üzere iki grup altında toplanırken, 4 blastomerli embryolar in vitro kültür çalışmasına dahil edilmediler.

Sınıflandırma sonrasında, embryolar üç ayrı medium içinde kültüre edildiler. ilk 24 saat için inkübatöre konulan zigot ve iki blastomerli embryoların dağılımları Tablo 22'de görüldüğü gibidir.

Tablo 22. 24 saatlik in vitro kültür periodu için inkübatöre konulan embryo sayıları ve mediuumlara dağılımları.

Medium	Zigot	2 Blastomerli	Toplam
TCM 199 + %20 SS	100	144	244
TCM 199 + %1.5 BSA	96	138	234
PBI + %20 SS	60	120	180
Toplam	256	402	658

ilk uygulama grubu olan TCM 199 + %20 sığır serumu mediumu içinde kültüre edilmek üzere 100 adet zigot ve 144 adet de iki blastomerli; %1.5 BSA içeren TCM 199 mediumunda yapılan kültür uygulamasında ise 96 tane zigot ve 138 tane de iki blastomerli embryo inkübatöre yerleştirildi. Üçüncü grupta ise PBI + %20 sığır serumu mediumu içinde kültüre edilmek üzere 60 tane zigot ve 120 tane de iki blastomerli embryo kullanıldı.

24 saatlik in vitro kültür perioduna konulan zigot ve 2 blastomerli embryoların gelişim durumları ayrı ayrı ele alındığında Tablo 23 ve Tablo 24'e gözlenen veriler saptandı.

Tablo 23. in vitro kültür için inkübatöre konulan zigotlarda 24 saat sonra gözlenen gelişmeler ve mediumlara göre dağılımları.

Medium	Toplam	2B	4B	8B	16B	32B	Gelişen(%)	Dejenere(%)
TCM199+%20 SS	100	1	19	16	33	1	72(%72)	28(%28)
TCM199+%1.5 BSA	96	-	17	19	31	2	69(%72.1)	27(%27.9)
PBI + %20 SS	60	-	6	13	19	1	39(%65)	21(%35)

Tablo 24. in vitro kültür için inkübatöre konulan 2 blastomerli embryolarda 24 saat sonunda gözlenen gelişmeler ve mediumlara göre dağılımları.

Medium	Toplam	2B	4B	8B	16B	32B	Gelişen(%)	Dejenere(%)
TCM199+%20 SS	144	-	-	18	86	9	109(75.69)	33(24.31)
TCM199+%1.5BSA	138	-	2	18	67	3	90(65.22)	48(34.78)
PBI + %20 SS	120	-	2	19	58	-	79(65.84)	41(34.16)

24 saatlik in vitro kültür periodu sonucunda %20 oranında sığır serumu içeren TCM 199 mediumuna konulan 100 zigotun 72 tanesi(%72) gelişme gösterdi. Bu gelişen embryolardan 1 tanesi(%1.30'u) 2 blastomerli, 19 tanesi(%26.30) 4 blastomerli, 16 tanesi(%22.22) 8 blastomerli, 33 tanesi(%45.83) 16 blastomerli

(Resim 8) ve 1 tanesi de(%1.30) 32 blastomerli konuma gelişti. TCM 199 + %20 sığır serumu mediumuna konulan 100 zigotun 28 tanesi(%28) ise dejenere olarak gelişememişlerdir (Resim 9).

Aynı süre sonunda %1.5 oranında BSA içeren TCM 199 mediumunda kültüre edilen 96 zigotun toplam 69 tanesi(%71.87) gelişme gösterirken, 27 tanesi(%28.13) de dejenerasyona uğramıştır. Gelişen 69 embryonun 17 tanesi(%24.63) 4 blastomerli, 19 tanesi(%27.53) 8 blastomerli, 31 tanesi(%44.92) 16 blastomerli ve 2 tanesi(%2.89) de 32 blastomerli(Resim 10) konuma ulaştı.

%20 sığır serumu içeren FBI içinde gerçekleştirilen kültür grubunda ise, kültüre alınan 60 zigotun 39 tanesi(%65) gelişme gösterirken, 21 tanesi(%35) ise dejenere oldu. Gelişen 39 embryonun 6 tanesi(%15.38) 4 blastomerli, 13 tanesi(%33.33) 8 blastomerli, 19 tanesi(%48.71) 16 blastomerli konuma ve 1 tanesi(%2.56) de 32 blastomerli konuma ulaşmış oldu.

ilk 24 saatlik period için TCM 199 + %20 sığır serumu içinde kültüre edilen toplam 144 adet 2 blastomerli embryonun 109 tanesi(%75.69) bu süre sonunda gelişim gösterirken 33 tanesi(%24.31) de dejenerasyona uğradı. Gelişen 109 embryonun 18 tanesi(%12.5) 8 blastomerli, 86 tanesi(%78.89) 16 blastomerli konuma ulaşırken, 9 tanesi(%8.25) de 32 blastomerli konuma ulaşmış oldu. Aynı süre içinde %1.5 BSA içeren TCM 199 mediumunda kültüre edilen 138 embryonun 90 tanesi(%65.22) gelişirken, 48 tanesi(%34.78) ise dejenere oldular. Gelişen 90 embryonun 2 tanesi(%2.22) 4 blastomerli, 18 tanesi(%20) 8 blastomerli, 67 tanesi(%74.44) 16 blastomerli ve 3 tanesi(%3.33) de 32 blastomerli konuma ulaştı(Tablo 24).

%20 oranında sığır serumu içeren FBI mediumunda kültüre edilen 120 adet 2 blastomerli embryodan 79 tanesi(%65.84), ilk 24 saatlik süre sonunda gelişim gösterirken, 41 tanesi(%34.16) dejenere oldu. Gelişen 79 embryonun 2 tanesi(%2.53) 4 blastomerli, 19 tanesi(%24.05) 8 blastomerli, 58 tanesi(%73.41) de 16 blastomerli konuma geliştirdi(Tablo 24).

Elde edilen bulguları zigot ve 2 blastomerli embryoların in vitro gelişimleri olarak toplu halde değerlendirmeye alındığında ise, ilk 24 saatlik kültür periodu sonrasında uygulama gruplarına göre embryolarda gözlenen gelişimler, Tablo 25'de belirtildiği şekilde oldu.

Tablo 25. 24 saatlik in vitro kültür periodu sonrasında uygulama gruplarında elde edilen bulgular.

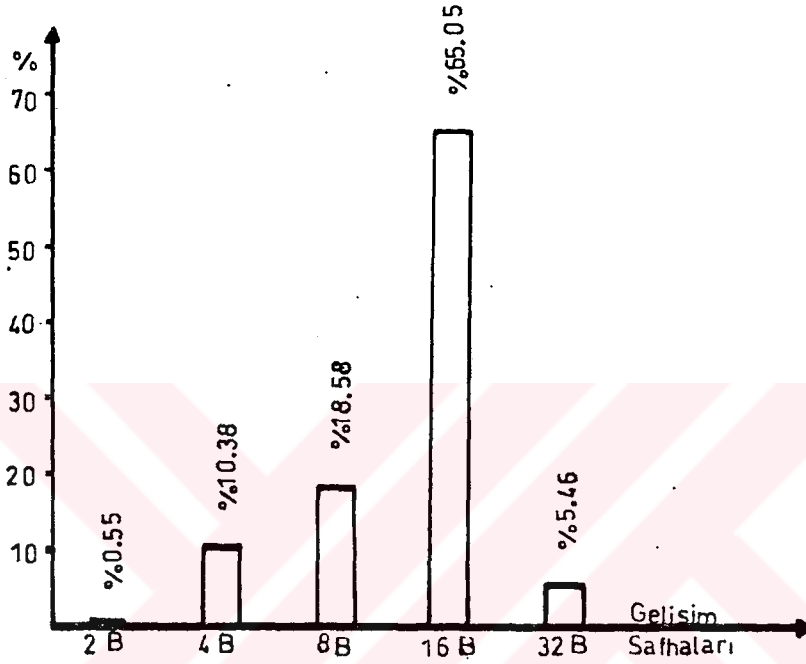
Medium	Toplam	2B	4B	8B	16B	32B	Gelişen(%)	Dejenere(%)
TCM199+%20 SS	244	1	19	34	119	10	183(%75)	61(%25)
TCM199+%1.5 BSA	234	-	19	37	98	5	159(67.95)	75(32.05)
PBI + %20 SS	180	-	8	32	77	1	118(65.56)	62(34.44)

B= Blastomerli;

Bu periodda %20 oranında sığır serumu içeren TCM 199 mediumuna yerleştirilen toplam 244 tane zigot ve embryonun, 1 tanesinin (%0.40) 2 blastomerli, 19 tanesinin(%7.78) 4 blastomerli, 34 tanesinin(%13.93) 8 blastomerli, 119 tanesinin(%48.77) 16 blastomerli ve 10 tanesinin(%4.09) de 32 blastomerli konuma geliştiği belirlendi. Geriye kalan 61 embryo da bu period sonrasında gelişme gösteremeyerek dejenere oldu. Gelişim gösteren embryoların(183 adet), inkübatöre konulan toplam embryo sayısına(244 adet) olan oranı, %75 olarak belirlenirken, dejenere olan embryoların(61 adet) oranı ise %25 olarak tesbit edildi. Gelişim gösteren embryoların dağılımları sırasıyla, %65.03 ile 16 blastomerli, %18.58 ile 8 blastomerli, %10.38 ile 4 blastomerli, %5.46 ile 32 blastomerli ve son olarak da %0.55 ile 2 blastomerli gelişim devrelerine oldu(Grafik 1).

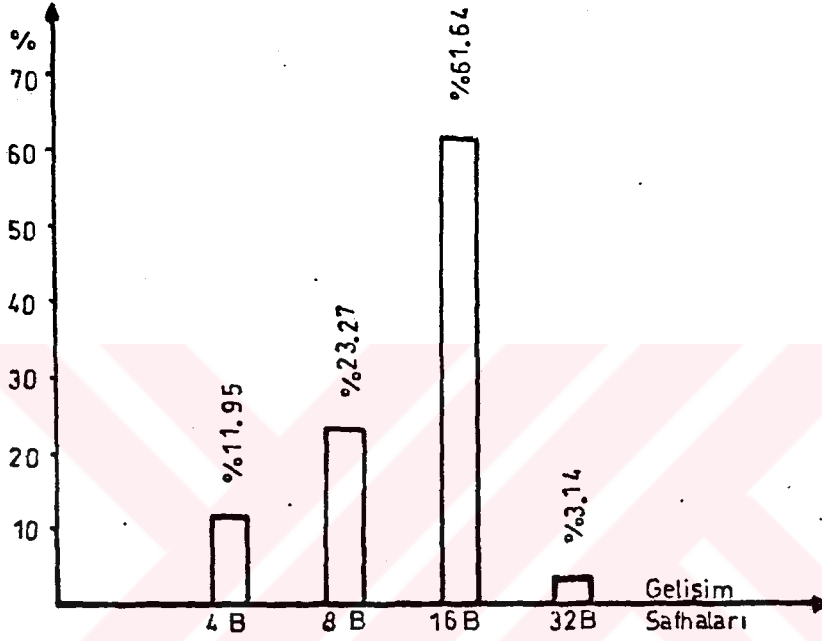


Grafik 1. 24 saatlik in vitro kültür periodundan sonra TCM 199 + %20 SS mediumunda gelişim gösteren embryoların dağılımları(%).



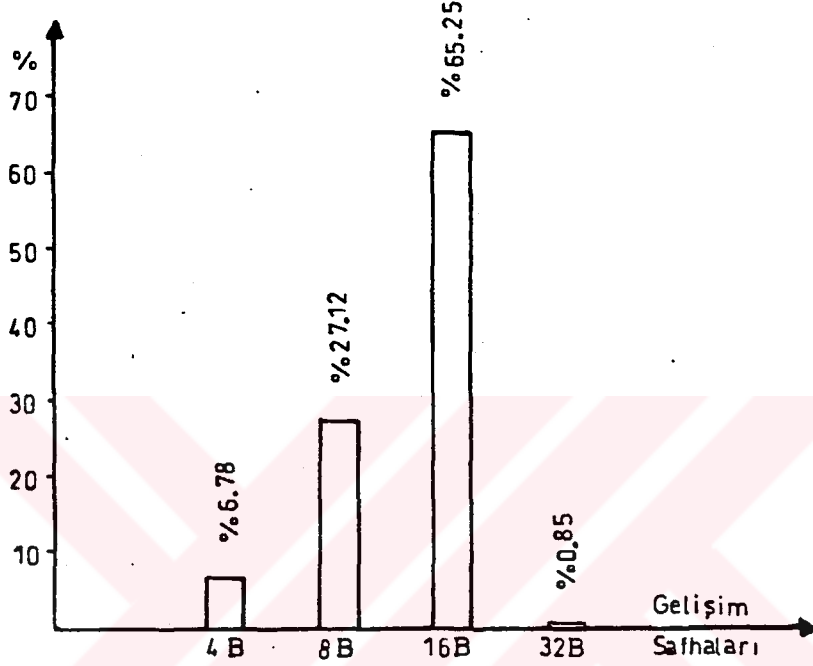
%1.5 oranında BSA içeren TCM 199 mediumunda kültüre edilen 234 zigot ve embryonun, 19 tanesinin(%8.11) 4 blastomerli, 37 tanesinin(%15.81) 8 blastomerli, 98 tanesinin(%41.88) 16 blastomerli ve 5 tanesinin(%2.13) de 32 blastomerli konuma ulaştıkları saptandı. Geriye kalan 75 adet(%32.05) embryonun da kültür sonrasında dejenere oldukları belirlendi. Gelişim gösteren embryoların(159 adet), inkübatöre konulan toplam embryolara(234 adet) olan oranı ise %67.95 oldu. Gelişim gösteren embryoların dağılımları sırasıyla %61.64 ile 16 blastomerli, %23.27 ile 8 blastomerli, %11.95 ile 4 blastomerli ve son olarak da %3.14 ile 32 blastomerli gelişim devrelerine oldu(Grafik 2).

Grafik 2. 24 saatlik in vitro kültür periodu için TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda gelişim gösteren embryoların dağılımları.



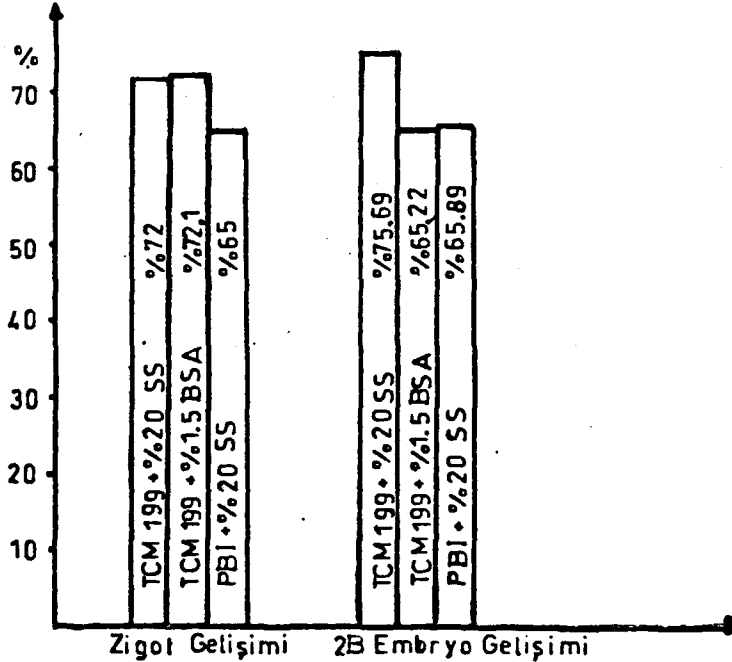
Diğer grupta ise PBI + %20 sığır serumu mediumunda ilk 24 saatlik in vitro kültür periodu sonucunda, toplam 180 zigot ve embryonun 8 tanesi(%4.4) 4 blastomerli, 32 tanesi(%17.77) 8 blastomerli, 77 tanesi(%44.44) 16 blastomerli ve 1 tanesi(%0.55) de 32 blastomerli konuma ulaşırken, geriye kalan 62 tanesinin (%34.44) de dejenere olduğu saptandı. Gelişim gösteren embryoların(118 adet), inkübatöre konulan toplam embryolara(180 adet) olan oranı ise %65.56 olarak belirlendi. Bu grupta gelişim gösteren embryoların dağılımları ise sırasıyla, %65.25 ile 16 blastomerli, %27.12 ile 8 blastomerli, %6.78 ile 4 blastomerli ve son olarak da %0.85 oranı ile 32 blastomerli safhada oldu(Grafik 3).

Grafik 3. 24 saatlik in vitro kültür periodu için PBI + %20 SS mediumunda gelişim gösteren embryoların dağılımları.



ilk 24 saat sonrasında zigot ve 2 blastomerli embryoların mediumlardaki gelişim oranları grafik olarak karşılaştırıldı (Grafik 4).

Grafik 4. ilk 24 saatlik in vitro kültür periodu sonunda zigot ve 2 blastomerli embryolarda mediumlara göre gözlenen gelişim oranları.



Yapılan karşılaştırmalar sonrasında farklı mediumlardaki zigot gelişimleri sırasıyla, TCM 199 + %20 SS mediumunda %72, TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda %72.1 ve PBI + %20 SS mediumunda ise %65 olarak saptandı. 2 blastomerli embryoların aynı mediumlarda gelişim oranları ise, sırasıyla %75.69, %65.22, %65.84 olarak belirlendi(Grafik 4).

24 saat in vitro olarak kültüre edilen ve gelişim gösterenlerden sağlıklı olduklarına karar verilen embryolar, tekrar ikinci bir 24 saatlik süre için kültür perioduna alındılar. Kültüre alınan embryoların mediumlara ve gelişim safhalarına göre dağılımları Tablo 26'da görüldüğü gibidir.

Tablo 26. 2nci saatlik in vitro kültür perioduna alınan embryoların mediumlara ve gelişim safhalarına göre dağılımları.

Medium	2B	4B	8B	16B	32B	Toplam
TCM 199 + %20 SS	1	19	34	114	10	178
TCM 199 + %1.5 BSA	-	16	37	98	4	155
PBI + %20 SS	-	8	32	77	1	118

2nci 24 saatlik kültür süresi sonunda embryolarda gözlenen gelişimler ise Tablo 27'de görüldüğü gibidir.

Tablo 27. 2nci saatlik in vitro kültür periodu sonucunda embryolarda izlenen gelişim safhaları.

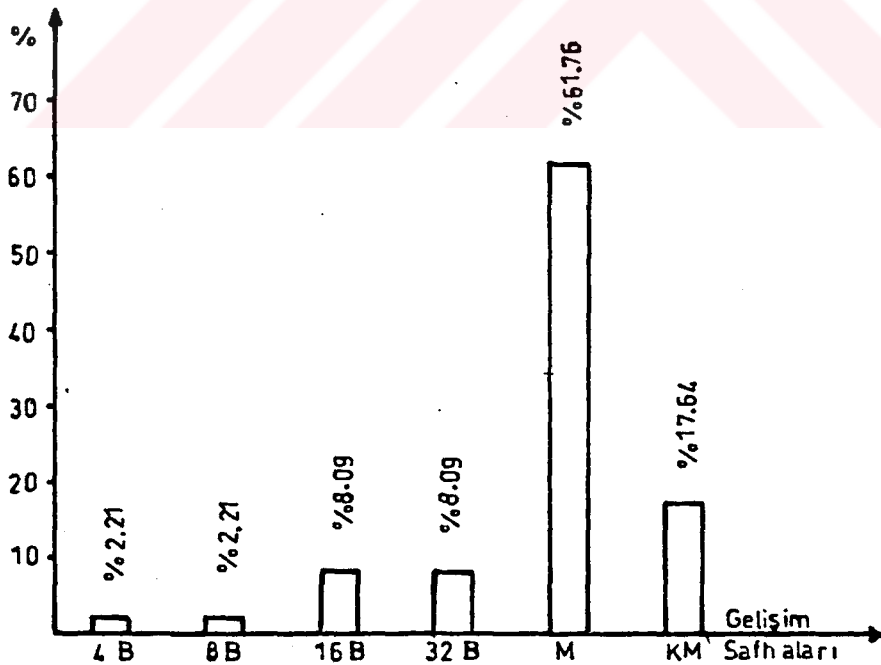
Medium	Baş. Emb.	4B	8B	16B	32B	M	KM	Geliş.(%)	Dej.(%)
TCM199+%20 SS	244	3	3	11	11	84	24	136(76.41)	42(23.59)
TCM199+%1.5 BSA	234	-	1	5	19	65	15	105(67.75)	50(32.25)
PBI + %20 SS	180	-	2	5	25	39	10	81(68.65)	37(31.35)

Baş.Emb.= inkübasyon başlangıcındaki embryo sayısı; M= Morula; KM= Kompakt morula.

%20 sığır serumu içeren TCM 199 mediumunda kültüre edilen toplam 178 embryonun 3 tanesi(%1.69) 4 blastomerli, 3 tanesi(%1.69) 8 blastomerli, 11 tanesi(%6,18) 16 blastomerli, 11

tanesi(%6.18) 32 blastomerli, 84 tanesi(%47.19) morula ve 24 tanesi(%13.48) de kompakt morula konumuna gelişirken, geriye kalan 42 tane(%23.59) embryonun ise bu dönemde dejenere olduğu gözlemlendi. Gelişim gösteren embryoların(136 adet), inkübatöre konulan toplam embryolara(178 adet) oranı %76.41 olarak belirlendi(Tablo 27). Bu uygulama grubunda in vitro kültüre konulan toplam 244 adet embryonun 48 saat sonunda 136 tanesi(%55.73) gelişme göstermiş oldu. Gelişim gösteren embryoların yüzde dağılımları sırasıyla, %61.76 ile morula, %17.64 ile kompakt morula, %8.09 ile 16 blastomerli ve 32 blastomerli konumlara ve son olarak da %2.21 ile 4 blastomerli ve 8 blastomerli gelişim safhalarında görüldü(Grafik 5).

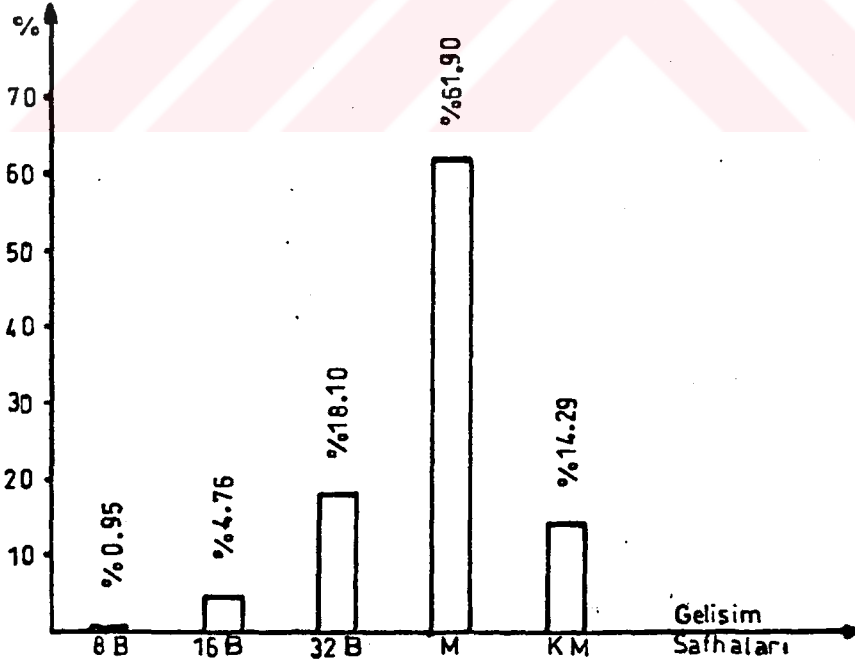
Grafik 5. 48 saat kültür sonrasında TCM 199 + %20 SS mediumunda, embryolarda gözlenen gelişimlerin dağılımları.



2nci 24 saatlik period için %1.5 BSA içeren TCM 199 mediumunda kültüre alınan toplam 155 embryodan, bu süre sonunda 1 tanesi(%0.64) 8 blastomerli, 5 tanesi(%4.24) 16 blastomerli, 19

tanesi(%12.25) 32 blastomerli konuma, 65 tanesi(%41.94) morula(Rasim 11) ve 15 tanesi(%9.67) de kompakt morula safhasına ulaştı. 50 adet(%32.25) embryonun ise bu period sırasında dejenere olduğu belirlendi. Gelişim gösteren embryoların(105 adet), inkübatöre konulan toplam embryo sayısına(155 adet) olan oranı ise %67.75 olarak belirlendi.48 saatin bitiminde %1.5 BSA içeren TCM 199 mediumunda kültüre alınan 234 embryonun 105 tanesi(%44.87) gelişme gösterdi. Gelişim gösteren embryoların gelişim safhalarına göre dağılımları ise sırasıyla; %61.90 ile morula, %18.10 ile 32 blastomerli, %14.29 ile kompakt morula, %4.76 ile 16 blastomerli safhaya ve son olarak da %0.95 ile 8 blastomerli safhalara oldu(Grafik 6).

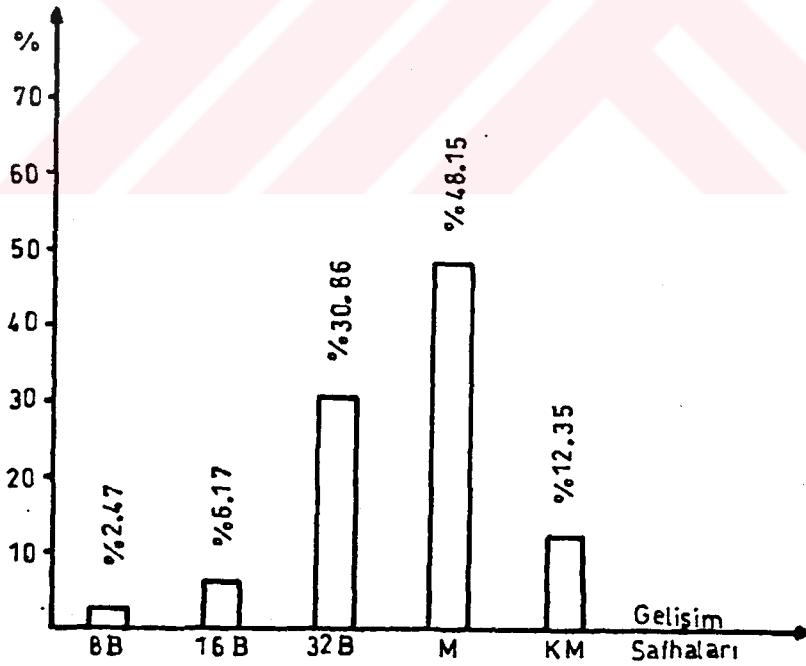
Grafik 6. 48 saat in vitro kültür sonrasında TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda, embryolarda gözlenen gelişimlerin dağılımları.



Aynı period sonunda PBI + %20 SS mediumunda kültüre edilen toplam 118 embryodan 2 tanesi(%1.70) 8 blastomerli, 5 tanesi(%4.24) 16 blastomerli, 25 tanesi(%21.19) 32 blastomerli,

39 tanesi(%33.05) morula ve 10 tanesi(%8.47) de kompakt morula safhasına geliştiler. Kültüre alınan toplam 118 embryonun 37 tanesinin(%31.35) ise bu period sonucunda dejenere olduğu gözlemlendi. Gelişme gösteren embryoların(81 adet), kültüre alınan embryolara(118 adet) olan oranı %68.65 iken, dejenerasyon oranı ise %31.35 olarak belirlendi. Bu uygulama grubunda ise in vitro kültürün başlangıcında kültüre alınan 180 embryonun 81 tanesi(%45) gelişti. Gelişme gösteren embryoların yüzde dağılımları ise sırasıyla; %48.15 ile morula, %30.86 ile 32 blastomerli, %12.35 ile kompakt morula, %6.17 ile 16 blastomerli ve son olarak da %2.47 ile de 8 blastomerli konumda oldu(Grafik 7).

Grafik 7. 48 saat in vitro kültür sonrasında PBI + %20 SS mediumunda, embryolarda gözlenen gelişmelerin dağılımları.



2nci 24 saatlik in vitro kültür periodundan sonra gelişen embryolar, 72 saatlik süre için kültüre alındılar. Kültüre

alınan embryoların toplam sayıları, mediuumlara ve gelişim durumlarına göre dağılımları Tablo 28'de belirtildiği gibidir.

Tablo 28. Üçüncü 24 saatlik kültür periodu için inkübatöre konulan embryoların mediuumlara ve gelişim durumlarına göre dağılımları.

Medium	4B	8B	16B	32B	M	KM	Toplam
TCM 199 + %20 SS	3	3	11	11	84	24	136
TCM 199 + %1.5 BSA	-	1	5	19	65	15	105
PBI + %20 SS	-	2	5	21	39	10	77

Bu period sonunda yapılan kontrollarda, embryolarda gözlenen gelişimler Tablo 29'da izlendiği şekildedir.

Tablo 29. Üçüncü 24 saatlik in vitro kültür periodu sonunda embryolarda izlenen gelişim safhaları.

Medium	Baş. Emb.	16B	32B	M	KM	EBL	BL	Geliş.(%)	Deje.(%)
TCM199+%20 SS	244	3	-	15	50	20	5	93(68.38)	43(31.62)
TCM199+%1.5 BSA	234	1	1	15	40	11	2	70(66.67)	35(33.33)
PBI + %20 SS	180	-	-	14	35	2	-	51(66.23)	26(33.77)

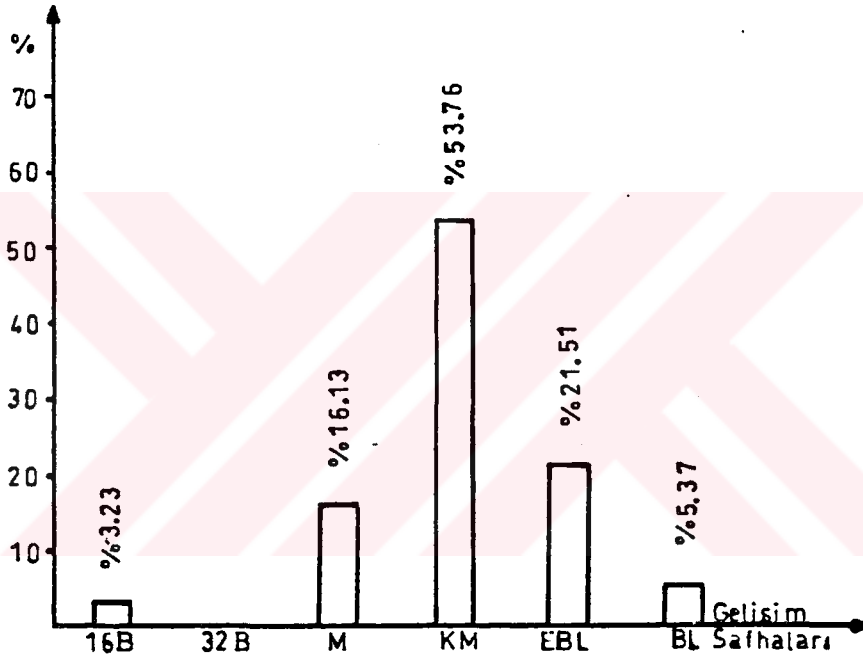
EBL= Erken Blastocyst; BL= Blastocyst.

%20 sığır serumu içeren TCM 199 mediumunda 3. period için kültüre edilen 136 embryodan; 3 tanesi(%2.2) 16 blastomerli, 15 tanesi(%11.03) morula, 50 tanesi(%36.76) kompakt morula(Resim 12), 20 tanesi(%14.71) erken blastocyst ve 5 tanesi(%3.68) de blastocyst konumuna ulaştı. Gelişen embryoların(93 adet) inkübatöre konulan embryolara(136 adet) olan oranı %68.38 iken, dejenere olan embryoların (43 adet) oranı ise %31.62 olarak belirlendi. in vitro kültürün başlangıcından 72 saatin bitimine kadar gelişme gösteren embryoların oranı %38.11 olarak belirlendi. Gelişen embryoların dağılımları sırasıyla, %53.76 ile



kompakt morula, %21.51 ile erken blastocyst, %16.13 ile morula, %5.37 ile blastocyst ve son olarak da %3.23 ile 16 blastomerli konumda oldu(Grafik 8).

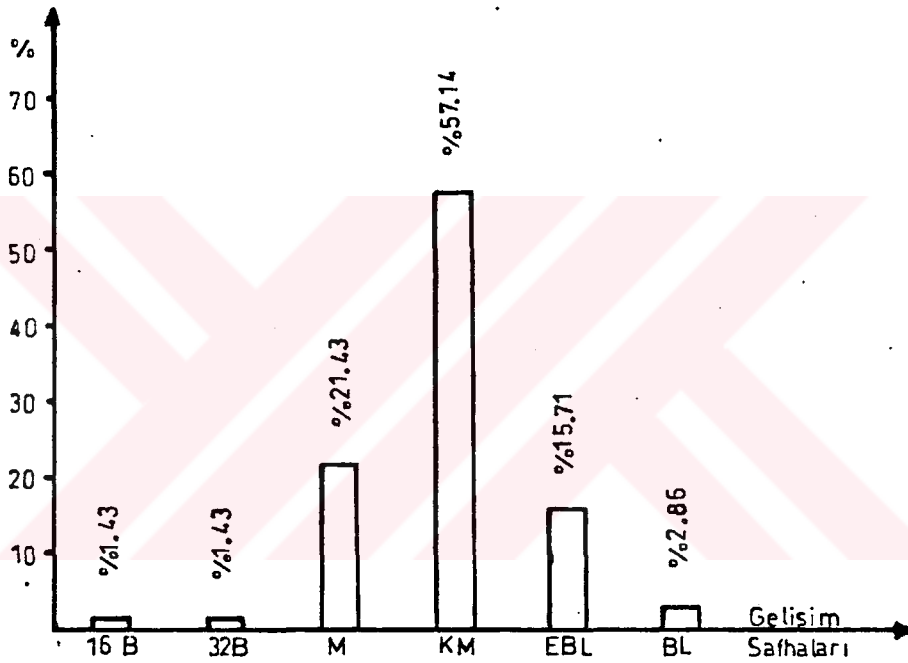
Grafik 8. in vitro kültürde 72 saat sonunda TCM 199 + %20 SS mediumunda gelişim gösteren embryoların dağılımları.



Aynı period sonunda %1.5 BSA içeren TCM 199 mediumunda kültüre edilen toplam 105 embryodan; 1 tanesi(%0.95) 16 blastomerli, 1 tanesi(%0.95) 32 blastomerli, 15 tanesi(%14.29) morula, 40 tanesi(%38.1) kompakt morula, 11 tanesi(%10.48) erken blastocyst ve 2 tanesi(%1.90) de blastocyst gelişim safhalarına ulaştılar. Gelişen embryoların(70 adet), inkübatöre konulan embryolara(105 adet) olan oranı %66.67, dejenere olan embryoların (35 adet) oranı ise %33.33 olarak belirlendi. Başlangıçta in vitro kültüre alınan 234 embryonun 70 tanesi(%29.91) bu period sonuna kadar gelişme gösterdi. Gelişim gösteren embryoların dağılımları sırasıyla; %57.14 ile kompakt morula, %21.43 ile

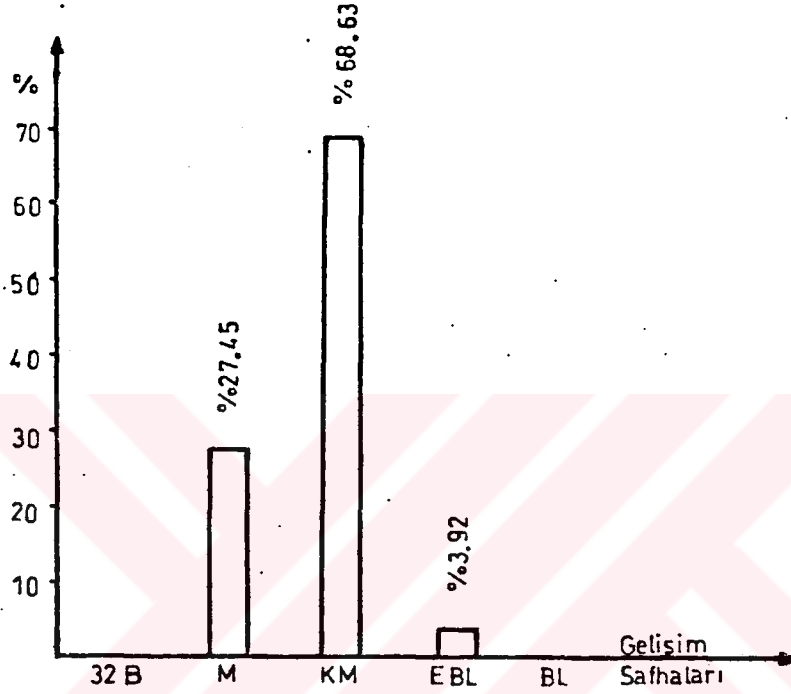
morula, %15.71 ile erken blastocyst, %2.86 ile blastocyst ve son olarak da %1.43 ile 16 blastomerli ve 32 blastomerli safhalarda oldu(Grafik 9).

Grafik 9. in vitro kültürde 72 saat sonunda TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda gelişim gösteren embryoların dağılımları.



%20 oranında sığır serumu içeren PBI mediumu ile yapılan 3üncü 24 saatlik kültür periodu sonunda ise, toplam 77 embryonun 14 tanesi(%18.18) morula, 35 tanesi(%45.45) kompakt morula ve 2 tanesi(%2.60) de erken blastocyst safhasına gelişti. Gelişen embryoların(51 adet), inkübatöre konulan embryolara(77 adet) olan oranı %66.23, dejenere olan embryoların(26 adet) oranı ise %33.77 olarak belirlendi. Bu grupta, başlangıçta 180 embryo kültüre konuldu ve 72 saatin bitimine kadar bu embryolardan 51 tanesi(%28.33) gelişebildi. Gelişme gösteren embryoların dağılımları sırasıyla %68.63 ile kompakt morula, %27.45 ile morula ve son olarak da %3.92 ile erken blastocyst safhasına oldu(Grafik 10).

Grafik 10. in vitro kültürde 72 saat sonunda PBI + %20 SS mediumunda gelişim gösteren embryoların dağılımları.



Üçüncü kültür periodu sonucunda, gelişme gösteren embryolar, son 24 saatlik süre için inkübatöre konuldular. inkübatöre konulan embryoların, mediumlara ve gelişim safhalarına göre dağılımları Tablo 30'da belirtildiği şekildedir.

Tablo 30. 4üncü 24 saatlik kültür periodu için inkübatöre konulan embryoların mediumlara ve gelişim durumlarına göre dağılımları.

Medium	16B	32B	M	KM	EBL	BL	Toplam
TCM 199 + %20 SS	3	-	15	47	19	5	89
TCM 199 + %1.5 BSA	1	1	14	40	11	2	69
PBI + %20 SS	-	-	14	35	2	-	51

Kültür periodu sonunda, %20 sığır serumu içeren TCM 199 mediumuna konulan 89 embryonun; 1 tanesi(%1.12) morula, 1

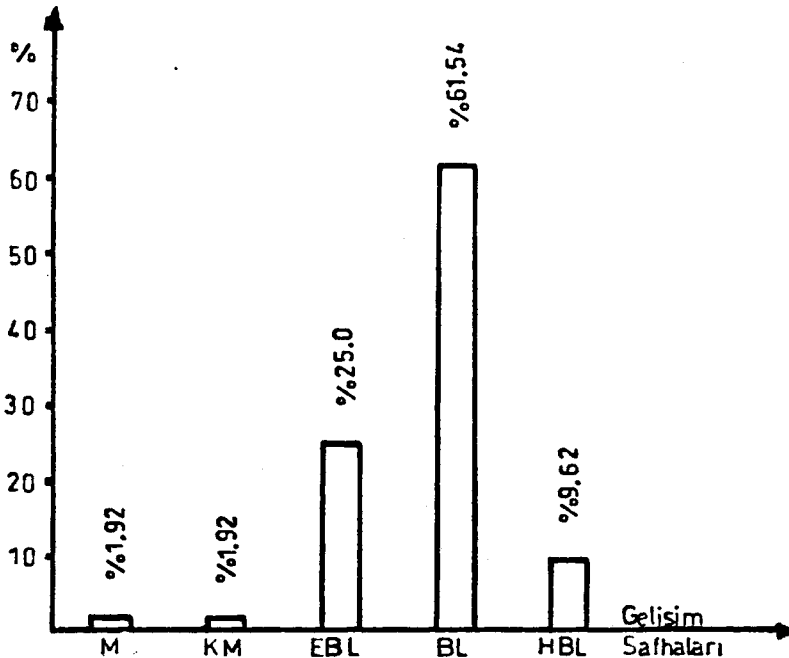
tanesi(%1.12) kompakt morula, 13 tanesi(%14.61) erken blastocyst, 32 tanesi(%35.96) blastocyst ve 5 tanesi de hatching blastocyst konumuna gelişti(Tablo 31). Gelişen embryoların(52 adet), inkübatöre konulan embryolara(89 adet) olan oranı %58.43, dejenere olan embryoların(37 adet) oranı ise %41.57 olarak belirlendi(Tablo 31). Gelişim gösteren embryoların dağılımları sırasısıyla; %61.54 ile blastocyst, %25.00 ile erken blastocyst, %9.62 ile hatching blastocyst ve son olarak da %1.92 ile morula ve kompakt morula safhasında oldu(Grafik 11).

Tablo 31. 4üncü 24 saatlik in vitro kùltür periodu sonunda embryolarda gözlenen gelişimlerin mediuumlara ve gelişim safhalarına göre dağılımları.

Medium	Baş. Emb.	M	KM	EBL	BL	HBL	Geliş.(%)	Deje.(%)
TCM199+%20 SS	244	1	1	13	32	5	52(58.43)	37(41.57)
TCM199+%1.5 BSA	234	-	3	8	16	1	28(40.58)	41(59.42)
PBI + %20 SS	180	-	2	9	7	-	18(35.29)	33(64.71)

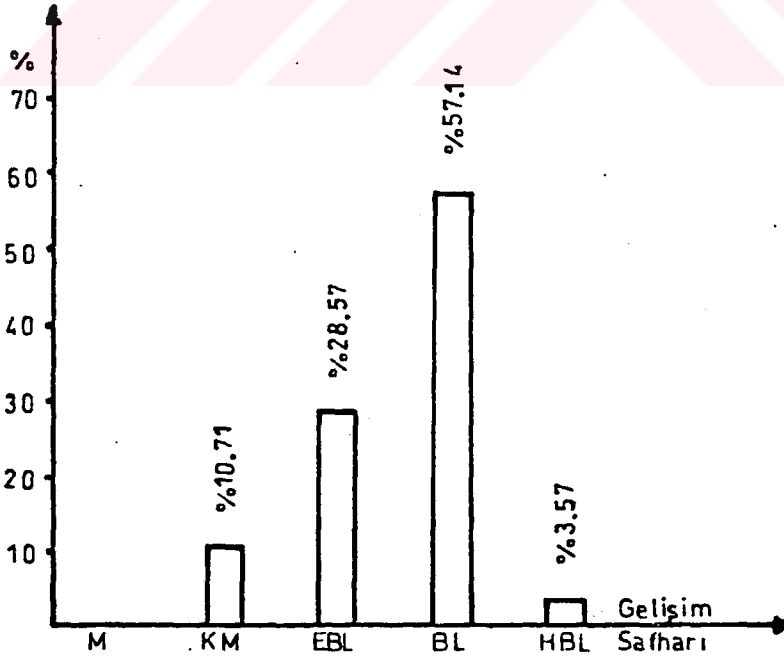
HBL= Hatching blastocyst.

Grafik 11. 96 saatlik in vitro kùltür periodu sonunda TCM 199 + %20 SS mediumunda gelişme gösteren embryoların gelişim safhalarına olan dağılımları.



4üncü periodun bitiminde, %1.5 BSA içeren TCM 199 mediumuna yerleştirilen toplam 69 embryodan; 2 tanesi(%3.92) kompakt morula, 8 tanesi(%11.59) erken blastocyst, 16 tanesi(%23.19) blastocyst(Resim 13) ve 1 tanesi(%1.45) de hatching blastocyst (Resim 14) safhasına geliştiler(Tablo 31). Gelişen embryoların(28 adet), inkübatöre konulan embryolara(69 adet) olan oranı %40.58 olarak belirlenirken, dejenere olan embryoların(41 adet) oranı ise %59.42 olarak saptandı. Gelişim gösteren embryoların dağılımları sırasıyla; %57.14 ile blastocyst, %28.57 ile erken blastocyst, %10.71 ile kompakt morula ve son olarak da %3.57 ile hatching blastocyst safhasında oldu(Grafik 12).

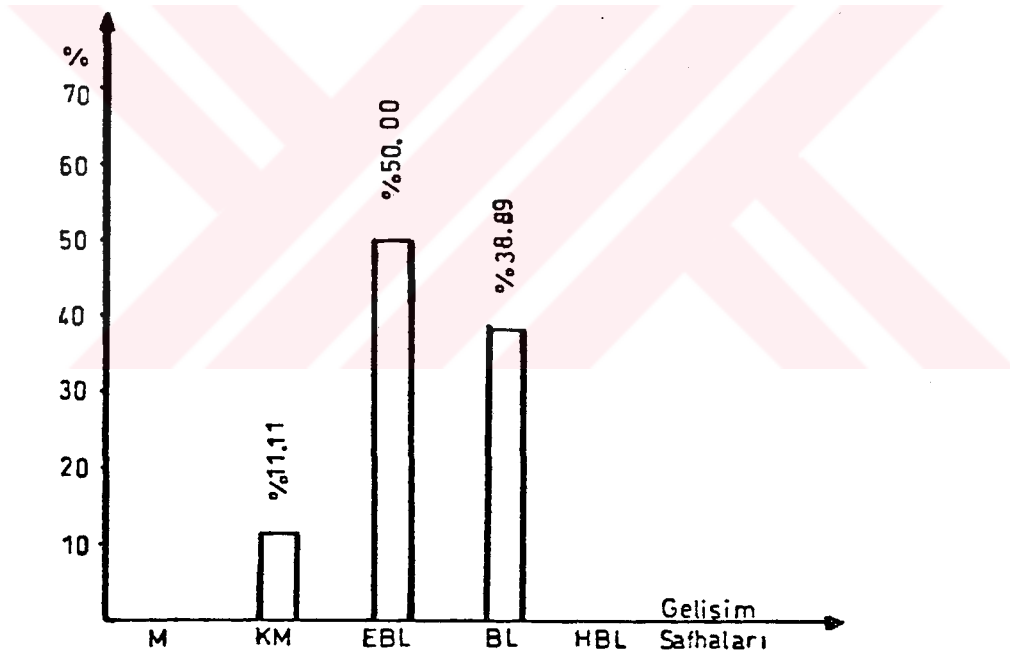
Grafik 12. 96 saatlik in vitro kültür periodu sonucunda TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda gelişme gösteren embryoların gelişim safhalarına olan dağılımları.



%20 sığır serumu katkılı FBI mediumunda, bu period için kültüre edilen toplam 51 embryodan; 2 tanesi(%3.92) kompakt morula, 9 tanesi (17.65) erken blastocyst ve 7 tane-

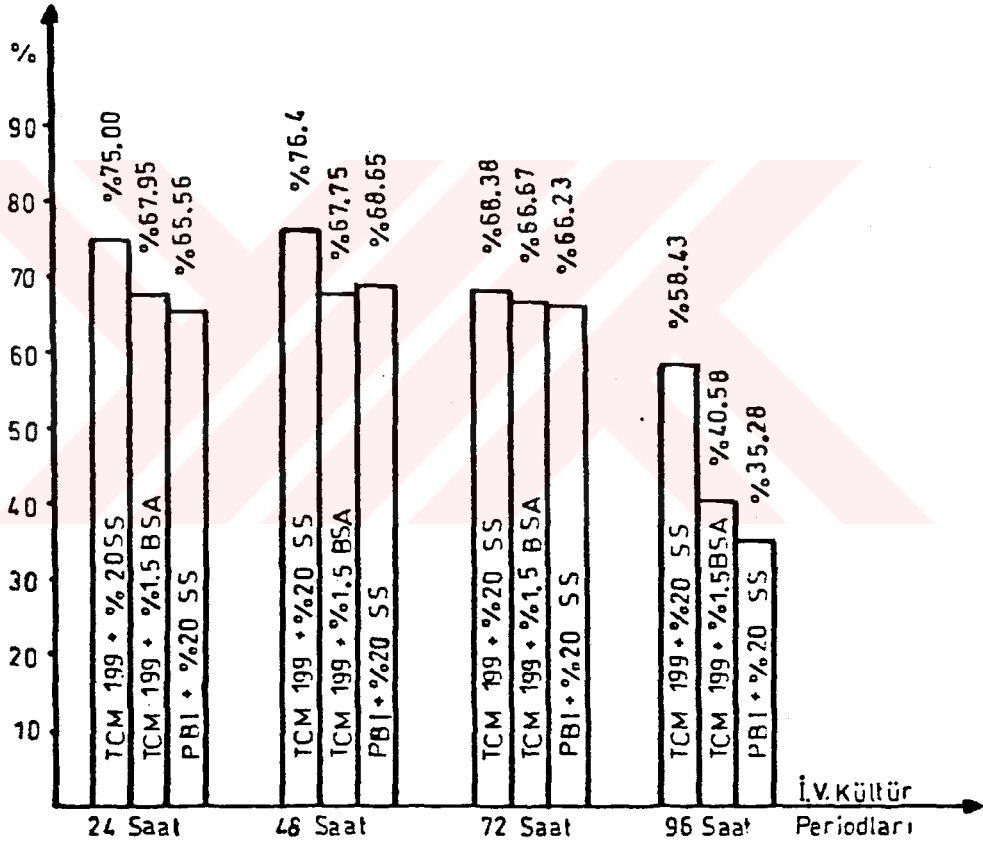
si(%13.72) de blastocyst safhasına gelişti(Tablo 31). Gelişim gösteren embryoların(18 adet), inkübatöre konulan embryolara(51 adet) oranı %35.29 olarak belirlenirken, dejenere olan embryoların(33 adet) oranı ise %64.71 olarak belirlendi(Tablo 31). Gelişim gösteren embryoların dağılımları sırasıyla; %50.00 ile erken blastocyst, %38.89 ile blastocyst ve son olarak da %11.11 ile kompakt morula safhasında oldu(Grafik 13).

Grafik 13. 96 saatlik in vitro kùltür perodu sonucunda PBI + %20 SS mediumunda gelişme gösteren embryoların gelişim safhalarına dağılımları.



Yapılan 96 saatlik in vitro kùltür çalışması süresince, her 24 saatte bir yapılan kontrollarda elde edilen embryoların gelişim durumları toplu olarak Grafik 14'de belirtilmiştir.

Grafik 14. 96 saatlik in vitro kültür süresince, 24 saatlik periyotlarda elde edilen embryonik gelişim oranlarının mediyumlara göre dağılımları.



in vitro kültür çalışmasının ilk 24 saatlik periyodu sonunda embryolarda, TCM 199 + %20 SS mediyumunda %75, TCM 199 + %1.5 BSA mediyumunda %67.95, PBI + %20 SS mediyumunda ise %65.56 oranında gelişimler elde edildi (Grafik 14).

2nci saatlik süre sonunda embryolarda, TCM 199 + %20 SS mediyumunda %76.4, TCM 199 + %1.5 BSA mediyumunda %67.75 ve %20 oranında sığır serumu içeren PBI mediyumunda ise %68.65 oranında gelişme elde edildi (Grafik 14).

Üçüncü 24 saatlik in vitro kültür sonunda %20 sığır serumu içeren TCM 199 mediyumunda %68.38, TCM 199 + %1.5 BSA mediyu-

munda %66.67 ve %20 sığır serumu içeren PBI mediumunda ise embryolarda %66.23 oranında gelişim elde edildi(Grafik 14).

in vitro kültürdeki üçüncü 24 saatlik süre bitiminde ise TCM 199 + %20 SS mediumunda embryolarda %58.43; %1.5 oranında BSA içeren TCM 199 mediumunda %40.58 ve % 20 sığır serumu içeren PBI mediumunda ise %35.28 oranında gelişim belirlendi(Grafik 14).

in vitro kültür çalışmasında, araştırmancının başlangıcından sonuna kadar embryolardaki gelişimler belirlendiğinde ise Tablo 32'de gözlenen durum ortaya çıkmıştır( Kültür çalışması sırasında her 24 saatlik period sonunda embryonal gelişimleri fotoğraflamak için, birkaç embryonun kültürüne son verilmiştir.).

Tablo 32. 96 saatlik in vitro kültür çalışması sonucunda 24 saatlik embryolarda elde edilen gelişim oranları ve mediuumlara göre dağılımları.

Medium	Kültür başlangıç embryo sayısı	96 saat sonunda gelişen embryo sayısı	Gelişim oranı (%)
TCM 199 + %20 SS	244	52	21.31
TCM 199 + %1.5 BSA	234	28	11.96
PBI + %20 SS	180	18	10.00

Çalışmada TCM 199 + %20 SS mediumunda kültürüne başlanan 244 embryodan, 96 saat sonunda 52 tanesi(%21.31) gelişme gösterirken, TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda kültüre alınan 234 embryodan ise 28 tanesi(%11.96) gelişebildi. %20 SS içeren PBI mediumunda ise kültüre alınan 180 embryodan ancak 18 tanesinde (%10) 96 saat sonunda gelişme gözlenebildi(Tablo 32). 96 saat devam eden in vitro kültür çalışmalarının tamamlanmasından sonra gelişme gösteren embryolar, transfer için değerlendirilmeye alındılar.

**4.4. Kültür Sonrası Transfer Bulguları:** in vitro kültür sonrasında, %20 sığır serumu içeren TCM 199 mediumunda gelişme gösteren, 1 tanesi kompakt morula, 8'i erken blastocyst ve 14'ü de blastocyst safhasında olan toplam 23 embryonun 13 tanesi bir



alıcıya, 10 tanesi de diğer bir alıcıya transfer edildi (Tablo 33).

Tablo 33. 96 saatlik in vitro kültür sonrasında transfer edilen embryoların mediuumlara dağılımları ve elde edilen gebelik sonuçları.

Medium	KM	EBL	BL	Toplam	Alıcı	Gebelik
TCM199 + %20 SS	1	8	14	23	2	-
TCM199 + %1.5 BSA	3	7	8	18	2	-
PBI + %20 SS	2	9	3	14	1	-

%1.5 oranında BSA içeren TCM 199 mediumunda gelişimini tamamlayan, 3 tanesi kompakt morula, 7'si erken blastocyst, 8'i de blastocyst konumunda olan toplam 18 embryonun 9 tanesi bir alıcıya diğer 9 tanesi ise başka bir alıcıya transfer edildi. (Tablo 33).

%20 sığır serumu içeren PBI mediumunda gelişim gösteren embryolardan, 2'si kompakt morula, 9'u erken blastocyst ve 3'ü de blastocyst safhasında olan toplam 14 embryo, bir alıcıya transfer edildi (Tablo 33).

Ancak yapılan gebelik muayeneleri ve normal gebelik süresi sonunda, hiçbir alıcıda pozitif sonuç alınamadı (Tablo 33).

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Tüm dünyada hayvan ıslahı ve genetik araştırmalarda yaygın bir uygulama alanı bulmuş olan embryo transferi ve in vitro çalışmalar, ülkemizde de üniversiteler bazında yaygınlık kazanmıştır. Veteriner hekimliğinin yanı sıra beşeri hekimlikte de in vitro fertilizasyon ve embryo transfer konuları rutin olarak uygulamaya konulmuştur.

Çalışmada öncelikle süperovulatör ajanlardan PMSG'nin uygun verilmiş yöntemini belirlemek, ikinci aşamada kazanılan embryoların in vitro olarak 96 saat süreyle yaşayabileceği uygun bir mediumu saptamak, üçüncü aşamada ise in vitro kültürü gerçekleştirilen embryoların transferi ile yavru elde etmek amaçlanmıştır.

Tavşanlarda süperovulasyonu oluşturmak için at pituitariyası ekstraktını kullanan Adams(32), hayvan başına ortalama  $39.8 \pm 2,3$  adet embryo elde ettiğini bildirirken, yine aynı amaç için değişik PMSG dozlarını kullanan bazı araştırmacılar, bu uygulamalarla yeterli süperovulasyon reaksiyonu elde edilebileceğini belirtmişlerdir. Bu araştırmacılarından Hahn(34) 75-150 IU, Hafez(33) 25-75 IU, Kılıçoğlu ve ark.(52) 150 IU, Rottman ve ark.(69) 120 IU PMSG verilmesinin bu amaç için yeterli olacağını savunmuşlardır.

Kılıçoğlu ve ark. (52), 150 IU PMSG enjeksiyonu ile 20 tavşandan toplam 187 embryo elde ettiklerini, operasyon sırasında hayvan başına ortalama  $19 \pm 1$  ovulasyon odağı saptadıklarını bildirmişlerdir. Yaptıkları çalışmada PMSG ve HMG'nin etkisini inceleyen Illera ve ark.(40), PMSG verilen hayvanlarda ovaryum boyutlarının, HMG ve kontrol grubundaki hayvanların ovaryumlarına kıyasla daha büyük, fakat HMG verilen hayvanlarda patlamamış follikül sayısının düşük olduğunu belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar 6 saat ara ile toplam 60 IU dozda HMG verdikleri hayvanlardan ortalama  $22.2 \pm 4.7$  adet embryo kazanırlarken,

kontrol grubunda bu değeri  $10.5 \pm 0.5$  olarak belirlemişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, aynı PMSG dozununun iki farklı verilmiş yönteminin birbirine olan üstünlüğü incelenmiştir. Tek enjeksiyonla 225 IU PMSG verilen araştırma grubunda, 30 hayvanın ovaryumlarında toplam 777 adet follikül + ovulasyon odağı belirlenirken, hayvan başına düşen ortalama reaksiyon değeri  $25.06 \pm 5.20$  ( $8.43 \pm 2.29$  patlamamış follikül;  $17.53 \pm 4.99$  ovulasyon odağı) olmuştur. 777 adet oluşumdan 253'ü follikül, 524 tanesi ovulasyon odağı olarak saptanırken, ovulasyon oranı %67.43 olarak hesaplanmıştır. Yapılan ovidukt yıkamaları sonrasında tavşanlardan toplam 434 tane yumurta hücresi kazanılırken, bu değer ovulasyon odakları sayısı ile karşılaştırıldığında, hücre kazanma oranı %82.82, hayvan başına ortalama değer ise  $14.46 \pm 4.46$  olarak belirlenmiştir. Kazanılan 434 hücreden 356 tanesinin fertil, fertilizasyon oranının ise %82.02 olduğu saptanmıştır. 225 IU PMSG'nin 75 IU'lık dozlarda üç enjeksiyonla verildiği grupta, 30 hayvanın ovaryumlarında toplam 852 adet follikül ve ovulasyon odağı belirlenirken, hayvan başına düşen ortalama reaksiyon  $28.43 \pm 5.67$  ( $12.96 \pm 3.43$  patlamamış follikül;  $15.5 \pm 3.59$  ovulasyon odağı) olmuştur. Toplam 852 adet oluşumun 389'u follikül, 465 tanesi ovulasyon odağı olarak saptanırken, ovulasyon oranının %54.57 olduğu hesaplanmıştır. Ovidukt yıkaması sonucunda 30 tavşandan toplam 429 tane yumurta hücresi kazanılırken, bu değer ovaryumlardaki ovulasyon odağı sayıları ile karşılaştırıldığında, hücre kazanma oranı %92.25, hayvan başına düşen ortalama hücre sayısı ise  $14.3 \pm 3.76$  olarak bulunmuştur. Kazanılan 429 hücrenin 364 tanesinin fertil, fertilizasyon oranının ise %84.84 olduğu hesaplanmıştır.

Tek enjeksiyon yöntemi uyguladığımız süperovulasyon grubunda elde ettiğimiz ovulasyon odağı verileri ( $17.53 \pm 4.99$ ), Kılıçoğlu ve ark.(52) tarafından bildirilen ortalama değere ( $19 \pm 1$ ) yakın olarak gerçekleşirken, üç enjeksiyon grubunda ise bu değer daha düşük olarak saptanmıştır ( $15.5 \pm 3.59$ ). Üç enjeksiyon grubunda elde ettiğimiz ortalama değer, aynı teknikle

süperovulasyon çalışması yapan Gabler(28)'in elde ettiği ortalama değere(14.7) çok benzer olarak gerçekleşirken, bu veriler, Illera ve ark.(40)'nın HMG(32.2  $\pm$  4.3) ve PMSG kullanarak(26.6  $\pm$  4.7) elde ettiği ortalama değerlerin altında kalmıştır.

iki uygulama grubunun verilerini karşılaştırdığımızda, hayvan başına düşen ortalama reaksiyon değerleri arasında bulunan ve 3x75 IU PMSG uygulaması lehine olan farkın, istatistikî yönden önem taşımadığı belirlenmiştir. Ovaryumlardaki reaksiyonları follikül ve ovulasyon odakları olarak ayrı ayrı ele aldığımızda, patlamayan follikül sayısı tek enjeksiyon grubundan ortalama 8.43  $\pm$  2.29; üç enjeksiyon grubunda ise ortalama 12.96  $\pm$  3.43 olarak tesbit edilmiştir. Ovaryumlarda bulunan patlamamış follikül sayısının, iyi bir süperovulasyon reaksiyonunda en az düzeyde olması gerektiğinden, 225 IU PMSG'nin tek enjeksiyonla verildiği grubun lehine olan fark istatistikî yönden önemli bulunmuştur (P< 0.05). Ovaryumlar üzerinde, tek enjeksiyon grubunda ortalama 17.5  $\pm$  4.99, üç enjeksiyon grubunda 15.5  $\pm$  3.59 adet ovulasyon odağı saptanırken, bu ortalama değerler arasında bulunan ve tek enjeksiyon yöntemi lehine olan farkın, istatistikî yönden herhangi bir önem taşımadığı hesaplanmıştır. Ovaryumlardaki ovulasyon oranı, yapılan incelemeler sonucunda tek enjeksiyon grubunda %67.4, üç enjeksiyon grubunda ise %54.5 olarak belirlenirken, iki grup arasında bulunan ve tek enjeksiyon yöntemi lehine olan %12.9'lük üstünlüğün, istatistikî yönden oldukça önemli olduğu saptanmıştır(P<0.001).

Ovaryumlarda belirlenen ovulasyon odakları sayısı ile kazanılan yumurta hücresi sayıları karşılaştırıldığında, ortaya konulan hücre kazanma oranları tek enjeksiyon grubunda %82.82, üç enjeksiyon grubunda ise %92.25 olmuştur. Bu oranlar arasındaki, üç enjeksiyon yöntemi lehine olan %9.43'lük fark, yine istatistikî olarak oldukça önemli bulunmuştur(P< 0.001). Tek enjeksiyon grubunda kazanılan toplam 434 hücreden 356'sının, üç enjeksiyon grubunda elde edilen 429 hücreden ise 364'ünün fertil olduğu; fertilizasyon oranının tek enjeksiyon grubunda %82.02, üç enjek-

siyon grubunda ise %84.84 olduğu belirlenirken, iki grup arasında bulunan ve üç enjeksiyon uygulaması lehine olan %2.82'lik fark istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur.

Weber(73) yapmış olduğu süperovulasyon çalışmasında, 2.5 mg FSH.P verdiği tavşanlardan %91.6 oranında, kontrol grubunda ise %96.9 oranında embryo kazandığını, kazanılan embryolardaki fertilizasyon oranlarının süperovulasyon grubunda %86.3, kontrollarda ise %88.2 olduğunu bildirmiştir. Araştırmamızda ise, hücrelerin kazanılma oranları açısından üç enjeksiyon grubunda elde edilen değer(%92.25), Weber'in(73) yaptığı süperovulasyon çalışması sonucuna(%91.6) hemen hemen denk iken, tek enjeksiyon grubunda ise(%82.82) daha düşük olarak gerçekleşmiştir. Çalışmamızda, üç enjeksiyon grubundaki hayvanlarda fertilizasyon oranı, Weber'in çalışmasının sonucuna yakın(%84.84), tek enjeksiyon grubundakilerde ise, daha düşük oranda(%82.02) olmuştur.

Kazanılan embryoların gelişim safhaları karşılaştırıldığında elde edilen ovum, zigot ve dört blastomerli embryoların oranları arasındaki fark, her iki uygulama grubu için önemsiz bulunurken, iki blastomerli embryoların uygulama gruplarına göre dağılımları(tek enjeksiyon:  $6.73 \pm 2.61$ , %45.54; üç enjeksiyon:  $8.2 \pm 3.21$ , %57.34), üç enjeksiyon grubu lehine istatistiksel olarak çok önemli bulunmuştur(  $P < 0.005$  ).

Çalışmamızdan elde edilen verilere göre, 225 IU'lık PMSG dozunun üç enjeksiyonla verilmiş yöntemi, hücre kazanma oranları ve kazanılan 24 saatlik embryoların bulunmaları gereken 2 blastomerli gelişim safhaları açısından, tek enjeksiyon yöntemine göre daha üstün olması nedeniyle tercih edilebilir. Ancak tek enjeksiyon yönteminin süperovulasyon sonrasında ovaryumlarda patlamamış follikül ve dolayısıyla ovulasyon oranları açısından, üç enjeksiyon yöntemine göre daha üstün sonuçlar verdiği de göz ardı edilmemeli, bunların yanı sıra tek enjeksiyon yönteminin üç enjeksiyon uygulamasına göre daha kolay uygulanabilir olduğu da unutulmamalıdır.

Çalışmamızda, tavşan embryolarını in vitro şartlarda kültüre etmek için TCM 199 ve PBI mediumlarından hangisinin daha uygun olacağı saptanmak istenirken, embryoların ihtiyacı olan nitrojen kaynağının da sığır serumu veya BSA'dan karşılanmasının birbirlerine üstünlüğü araştırılmıştır.

Materyal ve metod bölümünde de belirtildiği gibi, TCM 199 fabrikasyon olarak üretilen ve yapısında çeşitli temel amino asitleri, vitaminleri ve mineral maddeleri içeren kompleks yapıya sahip bir medium iken, PBI ise laboratuvarında hazırlanabilen temel tuzlardan oluşan basit bir bileşimdir.

Amino nitrojen kaynağı olarak kullanılan BSA yine fabrikasyon olarak üretilen ve standardize edilmiş bir madde olmasına karşın, sığır serumu kendi olanaklarımızla elde ettiğimiz bir materyaldir.

Brinster(12), tavşan embryolarının in vitro kültür mediumlarında enerji kaynağına ihtiyaç duymadıklarını, ancak pyruvat ve laktatın embryo gelişimine yararlı etkisi olduğunu, sadece amino nitrojen kaynağı içeren mediumlarda da embryoların gelişebileceğini belirtmiştir. Bu konuyla ilgili olarak aynı araştırmacı(14), 2 blastomerli tavşan embryolarını glukozun(1 mg/ml) dışında hiçbir katkı maddesi ilave etmediği KRBF mediumunda 48 saat kültüre ettiğinde tamamının dejenere olduğunu bildirirken, aynı mediuma yalnızca albumin (1 mg/ml) kattığında ise aynı süre sonunda %66.66 oranında morulaya gelişim kaydederek, glukozun tek başına tavşan embryolarının gelişimi için yeterli olmadığını, sadece amino nitrojen içeren mediumların yeterli olduğunu ortaya koymuştur. Başka bir çalışmada yine tavşan embryolarının in vitro gelişimlerinde glukozun ve pyruvatın etkisini inceleyen Kane(44), yaptığı çalışmada BME mediumuna pyruvatı ve glukozu ayrı ayrı, beraberce ve hiç katmadığı durumlarda, diğer araştırmacıların ifadeleri doğrultusunda hemen hemen tüm gruplarda aynı sonuçları elde etmiştir. Glukozun etkisini sığır ve tavşan serumlarına katarak inceleyen Maurer ve ark.(57), diğer araştırmacıların da belirt-

tiği gibi glukozun embryonal gelişime etkili olmadığını bildirmişlerdir. Bir başka yayınında Maurer(59), tavşan embryolarının gelişebilmeleri için, glukoz veya pyruvata ihtiyaçları olmadığını bildirmiş, bunun yanı sıra, mediumda bulunan amino asitlerin bazılarının çıkarılmasının, embryo gelişmesinin zayıflamasına neden olduğunu belirtirken, vitaminlerin mediumda bulunmamasının embryoların erken dönem bölünmeleri üzerine negatif yönde etkili olduğunu vurgulamıştır.

Yaptığımız çalışmada embryoları kültüre etmek için sırasıyla; %20 sığır serumu içeren TCM 199, %1.5 BSA katkılı TCM 199 ve %20 sığır serumu ilaveli PBI mediumları kullanılmıştır.

ilk 24 saatlik in vitro kültür sonunda zigotların ve 2 blastomerli embryoların gelişimleri ayrı ayrı incelendiğinde; zigotlarda TCM 199 + %20 SS mediumunda %72, TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda %72.1, PBI + %20 SS mediumunda %65 oranında gelişme kaydedilirken, 2 blastomerli embryoların gelişimleri ise TCM 199 + %20 SS mediumunda %75.69, TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda %65.22, PBI + %20 SS mediumunda %65.84 oranında olmuştur. İstatistiksel hesaplara göre zigot gelişimlerinde TCM 199 + %20 SS ve %1.5 BSA mediumlarında PBI + %20 SS mediumuna karşı oluşan %7 ve %7.1'lik üstünlüğün, ayrıca TCM 199 + %20 SS mediumundaki 2 blastomerli embryoların gelişimlerinin diğer mediumlara karşı olan %10.47 ve %9.85'lik pozitifliğin de istatistiksel bir önem taşımadığı anlaşılmıştır.

ilk 24 saatlik in vitro kültür periodu sonunda, zigot ve 2 blastomerli embryoların toplam gelişimlerinin mediumlar arasındaki farklılıkları incelendiğinde, embryonal gelişimler TCM 199 + %20 sığır serumu mediumunda %75, TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda %67.95, PBI + %20 SS mediumunda %65.56, olarak belirlenmiştir. Mediumlar arasındaki bu değerler hücrelerin in vitro gelişimleri açısından karşılaştırıldığında, TCM 199 + %20 sığır serumu ile, TCM 199 + %1.5 BSA mediumları arasında %7.05'lik bir gelişim farklılığı bulunmuştur. %1.5 BSA içeren TCM 199 ile PBI + %20 sığır serumu mediumları arasındaki fark ise

%2.4 olmuştur. Bu iki fark istatistiksel bir önem taşımazken, %20 sığır serumu içeren FBI mediumu ile TCM 199 + %20 sığır serumu mediumu arasında belirlenen %9.4'lük gelişim farkının istatistiksel olarak önemli olduğu hesaplanmıştır ( $P < 0.05$ ). Bu fark, Maurer(59)'in de belirttiği gibi FBI mediumunun vitaminlerden yoksun olmasına bağlanabilir.

ilk 24 saatlik kültür periodunda gelişerek 2inci 24 saatlik süre için kültüre alınan embryoların TCM 199 + %20 SS'da %76.41'i, TCM 199 + %1.5 BSA'da %67.75'i ve FBI + %20 SS'da %68.65'i gelişim göstermiştir. Bu süre sonunda 3üncü 24 saatlik periyot için kültüre alınan sağlıklı embryolardan ise, TCM 199 + %20 SS'da %68.38'i, TCM 199 + %1.5 BSA'da %66.67'si ve FBI + %20 SS'da %66.23'ü gelişmiştir. 2. ve 3. periodlarda elde edilen bu gelişim oranları arasında bulunan farklar, istatistiksel bir önem taşımazken, TCM 199 + %20 SS mediumuna konulan embryoların diğer mediumlardaki embryolara göre %9 ile %1 oranında daha iyi gelişme gösterdikleri belirlenmiştir.

in vitro kültürün başlangıcından 48. saatin bitimine kadar gelişen embryoların oranları mediumlara göre sırasıyla; TCM 199 + %20 SS'da %55.73, TCM 199 + %1.5 BSA'da %44.87, FBI + %20 SS'da %45; 72. saatin bitiminde ise TCM 199 + %20 SS'da %38.11, TCM 199 + %1.5 BSA'da %29.91 ve FBI + %20 SS'da %28.33 olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre 48. saatin sonunda TCM 199 + %20 SS'da diğer mediumlara göre oluşan %10.9 ( $P < 0.02$ ) ve %10.7'lik ( $P < 0.05$ ) üstünlüğün istatistiksel olarak önemli olduğu hesaplanmıştır. 72'inci saatin bitiminde ise TCM 199 + %20 SS'nda, TCM 199 + %1.5 BSA mediumuna karşı elde edilen %8.2'lik gelişim farkı istatistiksel olarak önem taşımazken, FBI + %20 SS'na karşı olan %9.8'lik üstünlüğün istatistiksel önemi olduğu belirlenmiştir ( $P < 0.05$ ).

in vitro kültürün başlangıcından 48. saatin bitimine kadar TCM 199 + %20 SS mediumunda elde edilen %55.73, TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda saptanan %44.87 ve FBI + %20 SS mediumunda oluşan %45'lik gelişim oranları, Brinster'in (14) KRBF mediumunda



aynı süre için elde ettiği %66.66 oranındaki gelişimin altında kalmıştır.

3'üncü 24 saatlik kültür perodu sonunda gelişim gösterip, son 24 saat için inkübatöre konulan embryoların TCM 199 + %20 SS'nda %58.43'ü, TCM 199 + %1.5 BSA'da %40.58'i ve PBI + %20 SS'nda %35.29'u gelişme göstermiştir. Bu süre sonunda, TCM 199 + %20 SS ile TCM 199 + %1.5 BSA arasında tesbit edilen %17.85'lik( $P<0.05$ ) ve TCM 199 + %20 SS ile PBI + %20 SS mediumu arasındaki %23.14'lük( $P<0.01$ ) gelişim oranları farkının istatistikî yönden önemli olduğu belirlenmiştir. %1.5 BSA içeren TCM 199 mediumu ile %20 oranında sığır serumu içeren PBI mediumları arasında oluşan %5.29'luk gelişim farkının ise istatistikî bir önem taşımadığı saptanmıştır.

96 saatlik in vitro kültürün başlangıcından sonuna kadar her üç medium, embryoların gelişimleri açısından kendi aralarında kıyaslandıklarında, gelişme oranları TCM 199 + %20 SS'nda %21.31, TCM 199 + %1.5 BSA'da %11.96 ve PBI + %20 SS'unda %10 olarak belirlenirken, TCM 199 + %20 SS'nun, TCM 199 + %1.5 BSA'ya ve PBI + %20 SS'na olan %9.85( $P<0.01$ ) ve %11.31'lik ( $P<0.005$ ) farkları istatistikî yönden önemli bulunmuştur.

in vitro kültürün başlangıcından 96 saatlik sürenin sonuna kadar, TCM 199 + %20 SS mediumunda elde ettiğimiz %21.31'lik gelişim oranı, Gabler(28)'in aynı mediumla yaptığı kültür çalışmasında elde ettiği %81.7 morula ve %41 genişlemiş blastocyst oranlarının altında şekillenirken, adı geçen araştırmacının aynı çalışmada yaptığı TCM 199 + %1.5 BSA kültür mediumundaki değer(%21.2) üzerinde kalmıştır. Yalnız her üç mediumda da(TCM 199 + %20 SS, TCM 199 + %1.5 BSA, PBI + %20 SS) 96 saatlik sürenin sonunda elde ettiğimiz embryonal gelişim oranları (sırası ile %21.31; %11.36; %10), yine Gabler(28)'in kimi fizyolojik solusyonlarla elde ettiği değerlerin oldukça üzerinde gerçekleşmiştir.

Yine elde ettiğimiz bu %21.31'lik en iyi gelişim oranı, kimi araştırmacıların(1.16.41.44.47.73) farklı medium ve yöntem-

lerle elde ettikleri gelişim oranlarının altında kalmıştır. Sonuçlarımızın bu araştırmacıların elde ettiği verilerin altında kalmasında, hiç şüphesiz yeni bir teknolojinin Bilim Dalımızda ele alınması, buna paralel olarak da deneyimimizin azlığı ve teknik olanaksızlıklarımız etkili olmuştur.

Çalışmamız sırasında uygun olan amino nitrojen kaynağını belirlemek için sığır serumu ve BSA, TCM 199 mediumuna ayrı ayrı katılarak incelenmiştir. Elde edilen bulgular kültür başlangıcından 24, 48, 72 ve 96. saatlerin bitimine kadar sırasıyla; sığır serumu için %75, %55.73, %38.11 ve %21.31; BSA için %67.95, %44.87, %29.91 ve %11.96 olarak gerçekleşmiştir. Buna göre, 24 saatlik kültür süresi sonunda embryoların gelişimleri açısından sığır serumu ve BSA arasında istatistiki açıdan önemli bir fark saptanamazken, sığır serumu içeren TCM 199 mediumunda daha iyi gelişim sağlandığı belirlenmiştir. Daha sonraki kültür periodları sonunda TCM 199 + %20 SS ile TCM 199 + %1.5 BSA mediumları arasında bulunan fark daha da artmıştır. Yapılan belirlemelere göre 48 saat sonunda belirlenen %10.9'luk fark istatistiki önem taşırken ( $P < 0.02$ ), 72 saat sonunda oluşan %8.2'lik farkın istatistiki açıdan önemli olmadığı saptanmıştır. in vitro kültürün başlangıcından 96 saatlik sürenin sonuna kadar gelişme gösteren embryoların oranlarına göre, sığır serumlu TCM'de %9.4'lük üstünlük belirlenmiş, bunun da istatistiksel olarak oldukça önemli olduğu bulunmuştur ( $P < 0.005$ ). Böylece, sığır serumunun BSA'ya oranla daha iyi gelişme sağladığı saptanmıştır. Maurer ve ark.(57) tavşan ve sığır serumlarının, tavşan embryolarının in vitro gelişimlerine etkisini araştırdıkları çalışmada, sadece sığır serumu kullanarak yaptıkları 96 saatlik in vitro kültürde %90.9, tavşan serumunda yaptıkları çalışmada %43.4 oranında gelişme elde etmişler ve sığır serumunun daha uygun olacağını savunmuşlar ve bu farkın da muhtemelen osmotik basınçların farklılığından kaynaklanabileceğini bildirmişlerdir. Tavşan embryolarının in vitro kültürdeki

amino nitrojen ihtiyacını, %10 FCS ile karşılayan Illera ve ark.(41) zigotlarda 120 saatlik in vitro kültür sonucunda %52 oranında, 2 blastomerlilerde 96 saat sonunda %62 oranında expanded blastocyste gelişim elde etmişlerdir. Tavşan embryolarının in vitro ihtiyaçlarını FCS ve tavşan serumları ile karşılama yoluna giden Abdel-Fattah(1) da, BSM II mediumuna %20 yoğunlukta FCS'u katarak, 96 saatlik kültür süresi sonunda %96 oranında gelişim kaydettiğini, aynı mediuma %20 FCS yerine %20 tavşan serumu kattığında ise blastocyste gelişim oranının %73'e düştüğünü, FCS'nun ve tavşan serumlarının yoğunluğunu %20'den %1'e düşürdüğünde, embryoların ancak 16 blastomerli konuma kadar gelişebildiğini bildirmiştir. Aynı konuyla ilgili olarak Kane ve ark.(47) BSA'nın, içerdiği uçucu yağ asitleri sayesinde embryonal gelişimi desteklediğini, kloroformla bu asitlerin uzaklaştırılması sonucunda gelişimin düştüğünü, pyruvatın ise bu düşmeyi biraz olsun iyileştirdiğini bildirmişlerdir.

Tüm gruplardan kültür periodu sonunda yaptığımız transferlerden herhangi bir gebelik elde edilememiştir. Seidel ve ark.(69) da, 84 saatlik kültür periodu sonucunda transferini yaptıkları 31 blastocystten hiç yavru elde edememişlerdir. Weber(73) kültüre ettiği embryoların transferlerinden ancak morula safhasına kadar olanlardan %12.65 oranında implantasyon ve bunlardan da %5 oranında yavru elde edebildiğini, Gabler(28) ise 2-4, 8-16 blastomerli, morula ve blastocyst safhasındaki embryoların transferlerinden sırasıyla %1; %10 ve %3.8 oranında implantasyon gerçekleştiğini, fakat her iki araştırmacı da(28.73), yaptıkları blastocyst transferlerinden hiç yavru elde edemediklerini bildirmişlerdir. Gabler(28) bunun sebebini, fonksiyonel olarak uygun alıcıların ayarlanamamasına ve ayrıca da tavşanlarda fizyolojik olarak az sayıdaki embryo(1-2) implantasyonunun, gebeliğin devam edebilmesi için yeterli olmadığına bağlamıştır.

Yaptığımız araştırmada, transfer edilen embryolardan yavru elde edilebilmesi üzerine, kullanılan mediuamların, kültür

sürelerine göre etkilerini araştırabilmemiz için, her 24 saatlik period sonunda transfer yapılması gerekli olabilirdi. Ancak elimizdeki mevcut olanaklar bu çalışma için yeterli olmadığından böyle bir değerlendirmeye gidilemedi.

Her 24 saatlik kültür periodunu ayrı ayrı ele aldığımızda, şunu söyleyebiliriz ki, kullandığımız her üç medium ilk 72 saatlik kültür sonuna kadar birbirine karşı bir üstünlük sağlamamaktadır. Buna bağlı olarak yapımının kolaylığı ve ucuzluğu nedeniyle, iki blastomerli tavşan embryolarını kompakt morula ve erken blastocyst konumuna geliştirmek için, PBI + %20 sığır serumu mediumu kullanılabilir. Ancak, blastocyst ve daha ileriki safhalara ulaşabilmek için, TCM 199 + %20 SS mediumu çok daha iyi sonuç verebilir.

Yaptığımız çalışmada kullandığımız TCM 199 hazır mediumuna katılan %20 sığır serumu, %1.5 BSA'ya oranla daha iyi sonuç verdiğinden, tavşan embryolarının in vitro kültürde amino nitrojen ihtiyaçlarını sığır serumundan daha iyi karşılayabilecekleri düşünülebilir. Bunun yanı sıra, kullandığımız PBI mediumu amino asit, vitamin ve mineral maddeler yönünden fakir olmasına karşın, içine katılan sığır serumunun embryonal gelişimi destekleyici etkisi sayesinde, daha kompleks bir yapıya sahip olan TCM 199 + %1.5 BSA mediumuna oldukça yakın gelişim oranlarını sağladığı için tercih edilebilir. in vitro kültür çalışmalarında kullanılan BSA ülkemizde üretilmeyip, temininde yurt dışına bağımlılık sözkonusu iken, mezbaha materyalinden kazanılan sığır serumu kolay ve ucuz elde edilen bir üründür. Bu nedenlerden dolayı BSA'nın yerine sığır serumunun kullanılabilceği, böylece yurt dışına olan bağımlılığın ortadan kalkacağı söylenebilir.

## 6. ÖZET

Araştırma, tavşanlarda süperovulasyon, embryoların kazanılması, kazanılan embryoların 96 saat süre ile kültürleri ve kültür aşamasından sonra gelişme gösteren embryoların transferleri olmak üzere 4 aşamada gerçekleştirildi.

Bu çalışma için 60'ı verici 30'u alıcı olmak üzere toplam 90 dişi, vericilerin tohumlanması için de 4 adet erkek damızlık tavşan kullanıldı.

Süperovulasyon için PMSG iki farklı yöntemde, toplam aynı dozda uygulandı. İlk uygulama grubunda 30 tavşana 225 IU PMSG tek enjeksiyonla verilirken, ikinci grupta aynı doz PMSG üç eşit kısma (75 IU) bölünerek 24 saat ara ile uygulandı. Vericiler tek enjeksiyon yönteminde PMSG uygulamasından 72 saat, üç enjeksiyon grubunda ise son PMSG verilişinden 24 saat sonra iv. olarak hCG enjeksiyonu ve tohumlama işlemine tabi tutuldular. Tohumlamadan 24 saat sonra her iki grupta bulunan vericiler, ovaryumlardaki oluşumların belirlenmesi ve embryo kazanılması amacıyla operasyona alındılar. Operasyonlarda, tek enjeksiyon grubundaki tavşanların ovaryumlarında ortalama  $25.96 \pm 4.96$  adet oluşum (follikül + ovulasyon odağı) saptandı. Bunlardan ortalama  $8.43 \pm 2.29$  tanesi patlamamış follikül,  $17.53 \pm 4.99$  tanesi ise ovulasyon odağı idi. Bu grupta ovulasyon oranı %67.43 olarak belirlendi. Üç enjeksiyon grubunda ise bu değerler  $28.46 \pm 5.64$  adet toplam oluşum,  $12.96 \pm 3.43$  adet patlamamış follikül,  $15.5 \pm 3.59$  adet ovulasyon odağı şeklinde idi. Ovulasyon oranı da %54.5 olarak saptandı.

Yapılan ovidukt yıkamaları sonucunda, tek enjeksiyon grubunda hayvan başına ortalama  $14.46 \pm 4.64$  adet yumurta hücresi kazanıldı. Kazanılan hücrelerden ortalama  $2.6 \pm 1.33$  tanesi ovum,  $4.9 \pm 2.74$  tanesi zigot,  $6.73 \pm 2.61$  tanesi 2 blastomerli,  $0.2 \pm 0.10$  tanesi 4 blastomerli embryo olarak belirlendi. Üç enjeksiyon grubunda ise ortalama  $14.3 \pm 3.76$  adet hücre kazanılırken, bu hücrelerden  $2.1 \pm 1.26$  tanesi ovum,  $3.7 \pm 1.75$  tanesi zigot,

8.2 ± 3.21 tanesi 2 blastomerli, 0.23 ± 0.34 tanesi de 4 blastomerli embryo olarak tesbit edildi. Hücrelerin ovulasyon odaklarına göre kazanılma oranları tek enjeksiyon yönteminde %82.8, üç enjeksiyon grubunda %92.2 olarak belirlenirken, kazanılan hücrelerin fertilizasyon oranları ise tek enjeksiyon grubunda %82.02, üç enjeksiyon grubunda %84.84 olarak saptandı.

Elde edilen veriler incelendiğinde, üç enjeksiyon yönteminin, hücre kazanma (P< 0.001) ve kazanılan hücrelerin bulunması gereken 2 blastomerli gelişim devresinde yoğunlaşma oranları açısından (P< 0.005) tek enjeksiyon yöntemine göre üstün olduğu belirlenirken, tek enjeksiyon yönteminin ise, ovaryumlarda bulunan patlamamış follikül sayıları (P<0.05) ve ovulasyon oranları (P<0.001) açısından üç enjeksiyon yöntemine karşı daha iyi sonuç verdiği saptandı.

Her iki grupta elde edilen sağlıklı embryolar 37°C'lık ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda, TCM 199 + % 20 SS, TCM 199 + %1.5 BSA ve PBI + %20 SS mediumlarında, 24 saatlik periodlarda toplam 96 saatlik bir süre için in vitro olarak kültüre edildiler. Çalışmanın başlangıcında ilk 24 saatlik süre için zigot ve 2 blastomerli embryolar ayrı ayrı kültüre edildiler. Buna göre zigotlar, TCM 199 + %20 SS mediumunda %72, TCM 199 + %1.5 BSA'da %72.1 ve PBI + %20 SS mediumunda %65 oranında gelişirken, 2 blastomerli embryolar aynı şartlarda %75.69; %65.22 ve %65.84 oranında gelişim gösterdiler. Bu sonuçlara göre TCM 199 + %20 SS mediumunda elde edilen gelişimin, diğer mediumlarda elde edilen gelişimlere karşı istatistikî yönden bir önem taşımasa da, daha üstün olarak gerçekleştiği belirlendi. Zigot ve 2 blastomerli konumda bulunan embryoların toplam gelişimleri TCM 199 + %20 SS mediumunda %75, TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda %67.95 ve PBI + %20 SS mediumunda ise %65.56 olarak belirlendi. TCM 199 + %20 SS mediumunun diğerlerine göre üstün bir gelişme sağlamasına karşın, bunlardan sadece PBI + %20 SS mediumuna olan üstünlüğün istatistikî yönden önem taşıdığı belirlendi (P< 0.05). 24 saatten sonraki aşamalarda embryoların gelişimleri TCM 199 + %20 SS medimu

içerisinde 48 saat sonunda %76.41, 72 saat sonunda %68.38 ve 96 saat sonunda %58.4; TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda aynı süreler için sırasıyla %67.75, %66.67 ve %40.58; PBI + %20 SS mediumunda ise %68.65, %66.23 ve %35.29 oranında elde edildi. Vericilerin tohumlanmasından 24 saat sonra kazanılan ve 96 saatlik kültür süresi sonunda gelişme gösteren embryoların oranları ise TCM 199 + %20 SS mediumunda %21.31, TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda %11.96 ve PBI + %20 SS mediumunda ise %10.00 olarak belirlendi.

Bu sonuçlara göre 24. saatten 72. saatin sonuna kadar TCM 199 + %20 SS mediumunda elde edilen embryoların gelişim oranları, diğerlerine göre üstün görünüp, istatistikî bir önem taşımazken, 72. saatin sonunda gelişim göstererek son 24 saatlik süre için tekrar kültüre edilen, TCM 199 + %20 SS mediumundaki embryoların gelişim oranları bu süre sonunda, TCM 199 + %1.5 BSA ( $P < 0.05$ ) ve PBI + %20 SS ( $P < 0.01$ ) mediumlarındaki gelişim oranlarına göre istatistikî yönden üstün bulundu. in vitro kültürün başlangıcından sonuna kadar TCM 199 + %20 SS medimunda embryolarda kaydedilen total gelişimin, TCM 199 + %1.5 BSA ( $P < 0.01$ ) ve PBI + %20 SS mediumlarında ( $P < 0.005$ ) elde edilen gelişimlere oranla oldukça üstün olduğu saptandı.

96 saat sonucunda TCM 199 + %20 SS mediumunda gelişme gösteren toplam 23 embryo 2 alıcıya, TCM 199 + %1.5 BSA mediumunda gelişen 18 embryo 2 alıcıya ve PBI + %20 SS mediumunda gelişen 14 embryo 1 alıcıya transfer edildi. Ancak yapılan kontrollarda transferlerin hiçbirinde gebelik oluşmadığı belirlendi.

## 7. SUMMARY

This study was carried out in 4 steps; superovulation of rabbits, recovery of embryos, culture of the recovered embryos for 96 h and transfer of the developed embryos to the recipients.

Total 90 female rabbits were used in the study, 60 were donors and 30 were recipients, also 4 males were used for mating.

Superovulation is provided by injecting equal doses of PMSG in two different methods. In the first group each of the 30 donors were superovulated by a single injection of 225 IU PMSG. In the second group same dose of PMSG was divided into 3 portions (75 IU) and injected to the other 30 donors with 24 h intervals. All of the donors were treated with 150 IU hCG and mated after 72 h from the PMSG injection in the first group, and 24 h after the last injection of PMSG in the second group. 24 h after mating donors of both groups were operated in order to detect the structural findings on the ovaries and to recover the embryos. At the end of operations, in the first and second group,  $25.96 \pm 4.96$  and  $28.46 \pm 5.64$  respectively, total structural findings (follicle + ovulation point) were observed. In the first group  $8.43 \pm 2.29$  unovulated follicles and  $17.53 \pm 4.99$  ovulation points were noted. However, the values for the second group were  $12.96 \pm 3.43$  and  $15.5 \pm 3.59$  respectively. The ovulation rate for both the group was 67.43% and 54.5% respectively.

From the oviduct flushings of first group, on an average  $14.46 \pm 4.64$  fertilized & unfertilized ova per animal were recovered. Out of the total recovered ova,  $2.6 \pm 1.33$  were unfertilized ova,  $4.9 \pm 2.74$  were zygotes,  $6.73 \pm 2.61$  were 2 cell stage and  $0.2 \pm 0.10$  were 4 cell stage embryos. In the second group,  $14.3 \pm 3.76$  ova were recovered. Out of the total in this group,  $2.1 \pm 1.26$  were ova,  $3.7 \pm 1.75$  were



zygotes,  $8.2 \pm 3.21$  were 2 cell stage and  $0.23 \pm 0.34$  were 4 cell stage embryos. The recovery rate of ova relating to their ovulation points were 82.8% in the first group and 92.2% in the second group. The fertilization rate of the recovered ova were 82.02% and 84.84% respectively.

From the flushing it was observed that the recovery rate ( $P < 0.001$ ) and number of two cell stage embryos were significantly higher ( $P < 0.005$ ) in the second group than the first group. However, the number of unovulated follicles ( $P < 0.05$ ) and ovulations rate ( $P < 0.001$ ) were higher in the first group.

Healthy embryos collected from each group were cultured at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  containing atmosphere in TCM 199 + 20% CS, TCM 199 + 1.5% BSA and PBI + 20% CS culture media for 96 h. For the first 24 h the zygotes and 2 cell stage embryos were cultured separately. The developmental rate for zygotes was 72% in TCM 199 + 20% CS, 72.11% in TCM 199 + 1.5% BSA and 65% in PBI + 20% CS medium. However, it was 75.69%, 65.22% and 65.84%, respectively, for 2 cell stage embryos in the these culture media. From the results it was obvious that although statistically there was no difference among three culture media, but, TCM 199 + 20% CS proved to be better than the other two media. The total development rate for embryos (zygot + 2 cell stage embryos) was 75% for TCM 199 + 20% CS, 67.95% for TCM 199 + 1.5 BSA and 65.56% for PBI + 20% CS culture media. TCM 199 + 20% CS differed significantly ( $P < 0.05$ ) than PBI + 20% CS culture medium, but, TCM 199 + 20% CS differed non significantly than TCM 199 + 1.5% BSA. The difference between TCM 199 + 1.5% BSA and PBI + 20% CS was also non significant. The rate development for embryos was 76.41%, 68.38% and 58.4% in TCM 199 + 20% CS at the end of 48, 72 and 96 hours of culture respectively. Whereas it was 67.75%, 66.67% and 40.58% in TCM 199 1.5% BSA ; and 68.65%, 66.23% and 35.29% in PBI + 20% CS respectively. Embryos collected 24 h after insemination of donors when cultured for 96 hours, they developed

21.31% in TCM 199 + 20% CS, 11.96% in TCM 199 + 1.5% BSA and 10.00% in PBI + 20% CS culture medium. Although upto 72 hours of culture there was no significant difference among the three culture media, but, from 72 hours to 96 hours of culture TCM 199 + 20% CS differed significantly than PBI + 20% CS ( $P < 0.01$ ). The total developmental rate of embryos (zygotes ; 2 cell stage embryos) from the beginning upto 96 hours of culture in the TCM 199 + 20% CS culture medium differed significantly than TCM 199 + 1.5% BSA ( $P < 0.01$ ) and PBI + 20% CS ( $P < 0.005$ ).

At the end of 96 hours of culture, 23 embryos from TCM 199 + 20% CS, 18 embryos from TCM 199 + 1.5% BSA and 14 embryos from PBI + 20% CS, were collected and were transferred into 2, 2 and 1 recipient respectively. The transfers were not resulted in pregnancy.

8. LITERATUR LISTESI

- 1- Abdel-Fattah, S.N.S.(1979): Untersuchungen über die Brauchbarkeit von Mini-Pailletten zur Kultivierung und Übertragung von Kanincheneizellen unter Berücksichtigung des Einflusses von fetalem Kälberserum und Kaninchenserum auf die Entwicklung. Hannover, Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Dissertation, s. 52.
- 2- Adams, C.E.(1953): Inhibition of Superovulation in The Rabbit. Nature.Vol.172: 82-
- 3- Adams, C.E.(1970): The Development of Rabbit Eggs After Cultur In Vitro For 1-4 Days. J.Embryol. Exp.Morph.Vol.23. 1: pp.21-34, Great Britain.
- 4- Adams, C.E.(1982): Egg Transfer in The Rabbit. In:C.E.Adams, "Mammalian Egg Transfer".Ch.3,p.30-46.CRS Press, Inc.Boca Raton, Florida.
- 5- Bavister B.D.(1988): Role of Oviductal Secration in Embryonic Growth In Vivo and In Vitro. Theriogenology, Vol.29 No.1: 143-154
- 6- Biggers, J.D.(1987): Poineering Mammalian Embryo Culture. In: B.D.Bavister, "The Mammalian Preimplantation Embryo". Ch. 1, p.1-15, Planum Press, New York & London.

7- Brinster, R.L.(1965): Studies on The Development of Mouse Embryos In Vitro. III. The Effect of Fixed-nitrogen Source. J.Exp.Zool. 158: 69-78.

8- Brinster, R.L.(1965): Studies on The Development of Mouse Embryos In Vitro. IV. Interaction of Energy Sources. J.Reprod.Fert. 10: 227-240.

9- Brinster, R.L.(1965): Studies on The Development of Mouse Embryos In Vitro. II. The Effect of Energy Source. J.Exp.Zool. 158: 59-68.

10- Brinster, R.L.; Thomson, J.L.(1966): Development of Eight-Cell Mouse Embryos In Vitro. Exp.Cell.Res. 42: 308-315.

11- Brinster, R.L.(1967): Protein Content of The Mouse Embryo During The First Five Days of Development. J.Reprod.Fert. 13: 413-420.

12- Brinster, R.L.(1969): In Vitro Cultivation of Mammalian Ova. Adv.Biosci. 4: 199-234.

13- Brinster, R.L.(1969): Mammalian Embryo Culture. In: E.S.E.Hafez; R.J. Bandau."The Mammalian Oviduct." Ch.18, p.419-446, The University of Chicago Press, Chicago.

14- Brinster, R.L.(1970): Culture of Two-cell Rabbit Embryos to morulae. J.Reprod.Fert. 21: 17-22.

15- Canfield, R.W.; Toole, R.J.; Gwazdauskas, F.C.; Vinson, W.E.; Whittier, W.D.(1986): In Vitro Development of Bovine Morulae in Bovin Serum Albumin, Normal Steer Serum and Uterine Flushings. Theriogenology, Vol.26, No.5: p. 561-568.

16- Carney, E.W.; Foote, R.H.(1988): Co Culture of Rabbit Two-cell Embryos With Rabbit Oviduct Epithelial Cells. 11th Inter.Cong. on Anim.Reprod. and Artif.Insem. Brief Communications, Vol.4: abst. 468, Dublin.

17- Chang, M.C.(1948): Transplantation of Fertilized Rabbit ova: The Effect on Viability of Age, In Vitro Storage Period and Storage Temperature. Nature, 161: 978.

18- Cho W.K.(1974): A Microtube Culture Method for Mouse Oocytes. J.Reprod.Fert. 37, 437-440.

19- Cross, P.C.; Brinster, R.L.(1973): The Sensivity of One-cell Mouse Embryos to Pyruvate and Lactate. Exp.Cell.Resear. 77: 57-62

20- Çalışlar, T.(1987): Laboratuvar Hayvanları Anatomisi. İstanbul Univ.Yayınları, İstanbul.

21- Daniel, J.C.(1968): Oxygen Concentrations for Culture of Rabbit Blastocysts. J.Reprod.Fert. 17: 187-190.

22- Daniel, J.C.(1970): Culture of Rabbit Embryo in Circulating Medium. Nature, 225: 193-194.

23- Drost, M.(1986): Embryo Transfer. In: S.J.Robert, Veterinary Obstetrics and Genital Diseases(Theriogenology), Edwards Brothers. Inc.Ann Arbor., Michigan.

24- Erk, H.; Doğaneli, M.; Akkayan, C.(1980): Veteriner Doğum Bilgisi (Obstetrik) ve Jinekoloji (ikinci Baskı). A.Ü.Veteriner Fakültesi Yayınları (363), Ankara.

25- Eyeston, W.H.; First, N.L.(1988): Co Culture of Bovine Embryos With Oviductal Tissue. 11<sup>th</sup> Inter.Cong. on Anim.Reprod. and Artif.Insem. Brief Communications Vol.4, Abst. 471, Dublin.

26- Eyeston, W.H.; Jones, J.M.; First, N.L.(1990): The Use of Oviduct-Conditioned Medium for Culture of Bovine Oocyte to The Blastocyst Stage. Theriogenology, Vol.33, No.1.

27- Fisher, B.(1987): Development Retardation in Cultured Preimplantation Rabbit Embryos. J.Reprod.Fert. 79: 115-123.

28- Gabler, G.(1970): Untersuchungen über die Gewinnung, Konservierung und Transplantation von Eizellen bei Kaninchen unter Berücksichtigung von in vitro-Befruchtungsversuchen. Hannover, Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Dissertation, s. 85.

29- Grobner, M.A.; Menino, A.R.Jr.(1988): Influence of Plasminojen on Development and Cell Numbers in Rabbit Embryos. Theriogenology, Vol.29, No. 1.

30- Hafez, E.S.E.(1961): Storage of Rabbit Ova in Gelled Media at 10<sup>0</sup>C. J.Reprod.Fert. 2: 163-178.

31- Hafez, E.S.E.(1962): Endocrin control of Reception, Transport, Development and Loss of Rabbit Ova. J.Reprod.Fertil. 3: 14-25.

32-Hafez, E.S.E.(1962): Effects of Antibiotics on Viability of Fertilized Rabbit Ova In Vitro. Fert.Steril. 13: 583-597

33- Hafez, E.S.E.(1987): Reproduction in Farm Animals. 5<sup>th</sup> ed. Iea & Febigen, Philadelphia.

34- Hahn, J.(1974): Gewinnung, Kultivierung, Konservierung und Transplantation von Eizellen der Spezies Maus, Kaninchen und Rind. In: S.K.Paufler und Mitautoren, "Künstliche Besamung und Eitransplantation bei Tier und Mensch. Band II. Verlag, M. & Schaper. Hannover.

35- Harlow, G.M.; Quinn, P.(1979): Foetal and Placental Growth in the Mouse after Pre-implantation Development In Vitro Under Oxygen Concentrations of 5 and 20%. Aust.J.Biol.Sci. 32: 363-9.

36- Hartung, H.C.; Fischer, B; Beier, H.M.(1988): Development of Preimplantation Rabbit Embryos After In Vitro Culture and Embryo Transfer: An Electron Microscopic Study. The Anatomical Record, 220: 31-42.

37- Hogan, B.; Constantini, F.; Lacy, E.(1986): Manipulating The Mouse Embryo a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.

38- İleri, İ.K.; Sayın, T.(1986): Sığırlarda Embryo Transfer Çalışmaları. İstanbul Univ.Vet.Fak.Derg. 12(1), 23-35.

39- İleri, İ.K.; Özkoca, A.; Ak, K.; Pabuççuoğlu, S.; Usta, S.; Soylu K.(1989): Hayvan İslahında Embryo Transfer Çalışmalarının Yeri ve Önemi. Bursa Veteriner Hekimler Odası II. Mesleki Eğitim Semineri(Tebliğ Özetleri) 17-18 Mayıs 1989, Bursa.

40- Illera, M.J.; Illera, J.C.; Munoz, I.; Silvan, G.(1988): Rabbit's Comparative Study Between PMSG and HMG in The Superovulation Treatments. 11<sup>th</sup> Inter.Congr.on Anim.Reprod. and Artif.Insem. Vol.2, Brief Communications, Abst. 168. University College Dublin, Belfield Dublin.

41- Illera, M.J.; Rodriguez de Sadia, C.; Munoz I; Illera, M.(1990): The Effect of PMSG anti-PMSG on the Performance of Rabbit Embryos. Theriogenology, Vol.33, No.1.

42- Javed, M.H.; Wright, R.W.Jr.(1990): Bovin Amniotic and Allantoic Fluid for The Culture of Mourine Embryos. Theriogenology, Vol.33, No. 1.

43- Kameyama, K,; Takeda, T.; and Onihara, T.(1990): Effect of Storage Methods of Fetal Calf Serum on The Development of Mouse Embryos, Theriogenology, Vol.33, No.1.

44- Kane, M.T.(1972): Energy Substrates and Culture of Single Cell Rabbit Ova to Blastocyst. Nature, Vol.238: 468-469.

45- Kane, M.T.(1974): The Effects of pH on Culture of one-cell Rabbit Ova to Blastocysts in Bicarbonate-Buffered Medium. J.Reprod.Fert. 38: 477-480.

46- Kane, M.T.(1977): Comparison of Pre-implantational Rabbit Ova Grawn In Vivo and In Vitro. J.Anat. 124: 506-507.

47- Kane, M.T.; Headon, D.R.(1980): The Role of Commercial Bovine Serum Albumin Preparations in the Culture of One-cell Rabbit Embryos to Blastocysts. J.Reprod.Fert. 60: 469-475.



48- Kane, M.T.(1987): In Vitro Growth of Preimplantation Rabbit Embryos. In: B.D.Bavister, "The Mammalian Preimplantation Embryo". Regulation of Growth and Differentiation In Vitro, Ch. 10, Plenum Press. New York & London.

49- Kane, M.T.(1987): Culture Media and Culture Of Early Embryos. Theriogenology, Vol. 27, No.1, 49-57.

50- Kaplan, H.M.; Timmons, E.H.(1979): The Rabbit, A Model for The Principles of Mammalian Physiology and surgery. Academic Press New York & San Fransisco & London. s.167.

51- Kılıçarslan, M.R.(1990): Ankara Keçilerinde Embryo Nakli Üzerinde Çalışma.(doktora Tezi). İ.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Bilim Dalı, İstanbul.

52- Kılıçoğlu, Ç.; Tekeli, T.(1982): Tavşanlarda Embryo Transferi. Ankara Üniv.Vet.Fak.Der. 28, (1-4) 1981'den ayrı basım(reprint) Ankara.

53- Kılıçoğlu, Ç.; Alaçam, E.(1983): Veteriner Doğum Bilgisi ve Üreme Organlarının Hastalıkları(Theriogenology). Türk Veteriner Hekimleri Birliği Merkez Konseyi Yayını. Ankara.

54- Kılıçoğlu, Ç.; Alaçam, E.; İzgür, H.; Tekeli, T.(1984): Koyunlarda Embrio Nakli Üzerinde Çalışmalar. Türkiye Bilimsel Araştırma Kurumu, Veterinerlik ve Hayvancılık Araştırma Grubu, Proje No: VHAG-548, Ankara.

55- Kreamer, D.C.; Bowen, M.J.(1987): Embryo Transfer in Laboratory Animals, In: D.A. Morrow, Current Therapy in Theriogenology, Sec.IV, p.75-76. W.B.Saunders Company, Philadelphia.

56- Lesbouyries, G.(1949): Reproduction des Mammiferes Domestique. Sexualite. Vigot Freres Editeurs. L'Ecole de Medicine. Paris.

57- Maurer, R.R.; Onuma, H.; Foote, R.H.(1970): Viability of Cultured and Transferred Rabbit Embryos. J.Reprod.Fert. 21:417-422

58- Maurer, R.R.; Beier, H.M.(1976): Uterine Proteins and Development In Vitro of Rabbit Preimplantation Embryos. J.Reprod.Fert. 48: 33-41.

59- Maurer, R.R.(1978): Advances in Rabbit Embryo Culture. In: J.C.Daniel, In Methods in Mammalian Reproduction. Ch.12, p.259-272, Academic Press, New York.

60- Meinecke, B.(1988): "Kisisel Görüşme". Ambulatorische und Geburtshilfliche Veterinärklinik der Tierärztliche Fakultät der JLU, Gissen.

61- Mc Donald, L.E.(1980): Veterinary Endocrinology and Reproduction. 3<sup>th</sup> Ed. Lea & Febiger, Philadelphia.

62- Netherway, M.Ep.SRN.(1974): A Manuel of Rabbit Farming. Fur & Feather. London.

63- Norris, M.L.; Adams, C.E.; Chang, M.C.(1983): Rate of Rabbit Eggs Transferred Asynchronously to The Oviducts or Uteri of Oestradiol-Treated Recipients After Ovulation. *Experientia*, 39, Birkhauser Verlag, CH-4010 Bazel/Switzerland.

64- Özkoca, A.; İleri, İ.K.; Sayın, T.(1984): Tavşanlarda ovidukt yıkaması yöntemiyle embryo kazanımı ve transplantasyon üzerinde araştırmalar. *İstanbul Üniv.Vet.Fak.Derg.* 10(1), 1-15.

65- Özkoca, A.(1984): Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'î Tohumlama. *İstanbul Üniv.Vet.Fak.Yayınları*(3209). İ.Ü.Fen. Fak.Dön.Ser.İşlt.Prof.Dr.Nazım Terzioğlu Basım Atölyesi. İstanbul

66- Özkoca, A.(1986): Sığırlarda Reprodüksiyon ve infertilite. *İ.Ü.Vet.Fak.Yayınları*(3433).Gür-Ay Matbaası, İstanbul.

67- Paria, B.C.; Sengupta, J.; Manchanda, S.K.(1984): Role of Embryonic Oestrogen in Rabbit Blastocyst Development and Metabolism. *J.Reprod.Fert.*70, 429-436.

68- Rajamahendran, R.; Canseco, R.S.; Denbow, C.J.; Gwazdauskas, F.C.; Vinson, W.E.(1986): Effect of Endothelial Cell Growth Supplement and Fibroblastic Growth Factor on Early Mouse Embryo Development In Vitro. *Theriogenology*, Vol.26 No.5, 631-638.

69- Rottmann, O.J.; Lampeter, W.W.(1981): Development of Early Mouse and Rabbit Embryos Without Zona Pellucida. *J.Reprod.Fert.* 61: 303-306.

70- Seidel, G.E.; Bowen, R.A.; Kane, M.T.(1976): In Vitro Fertilization, Culture and Transfer of Rabbit Ova. *Fert.Steril.* Vol.27, No.7: 861-870.

71- Sönmez, M.E.C.(1990): Sığırlarda Embryo Transfer Tekniğinin Ülkemiz Koşullarında Uygulanabilme Olanağının Araştırılması (Doktora Tezi). i.ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı, İstanbul.

72- Takahashi, Y.; Kanagawa, H.(1986): Development and Viability of Day-7 and -8 Bovine Embryos Cultured in a Simple Defined Synthetic Medium Using a Test Tube System. Jpn.J.Vet.Sci. 48(3): 561-567.

73- Weber, B.H.(1973): Versuche zur Kultivierung und Transplantation von gekühlten Kanincheneizellen verschiedener Entwicklungstadien. Hannover, Klinik für Geburtshilfe und Gynäkologie des Rindes der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Dissertation, s. 57.

74- Witten, W.K.(1970): Nutrient Requirements for the Culture of Preimplantation Embryos In Vitro. Advances in the Biosciences 6.

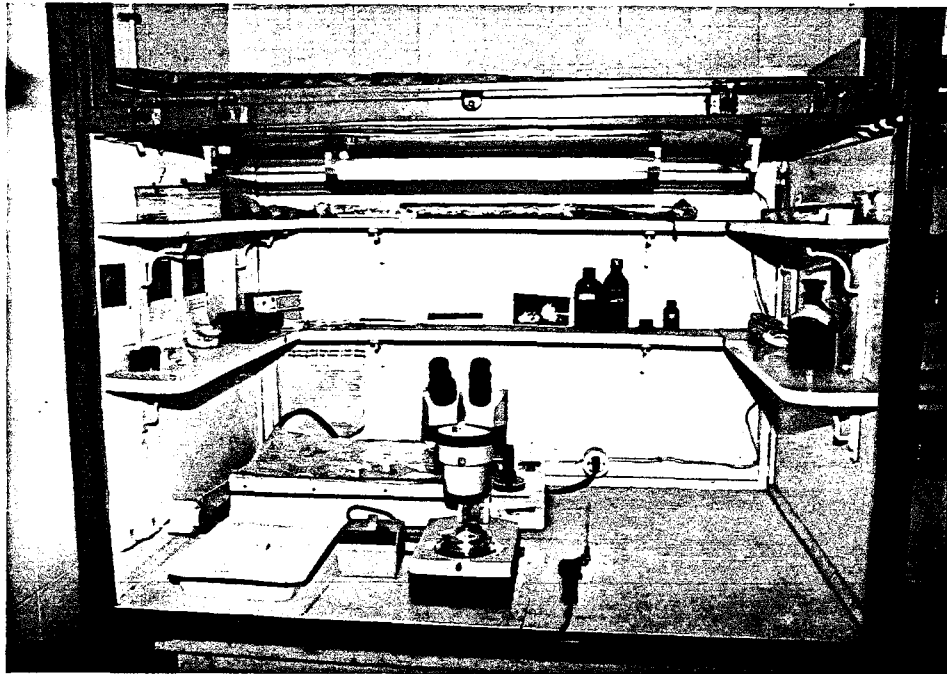
75- Wittingham, D.G.(1971): Culture of Mouse Ova. J.Reprod.Fert. Suppl. 14: 7-21.

## RESİMLER

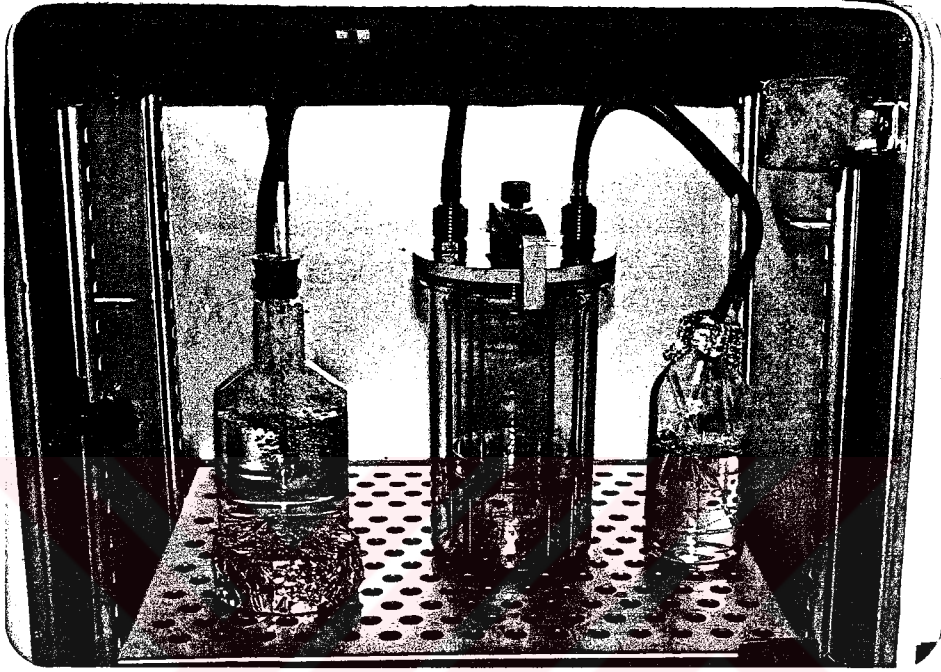
Resim 1. Tavşanlarda operatif olarak yapılan ovidukt yıkaması.



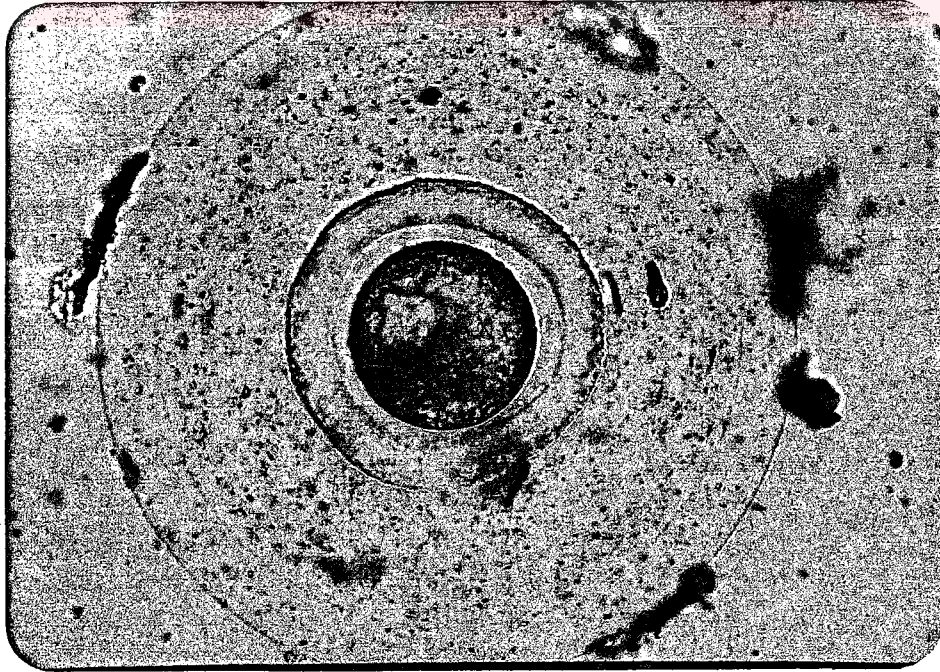
Resim 2. Ultravioleto lambası ve floresan lamba ile donatılmış özel camlı dolap.



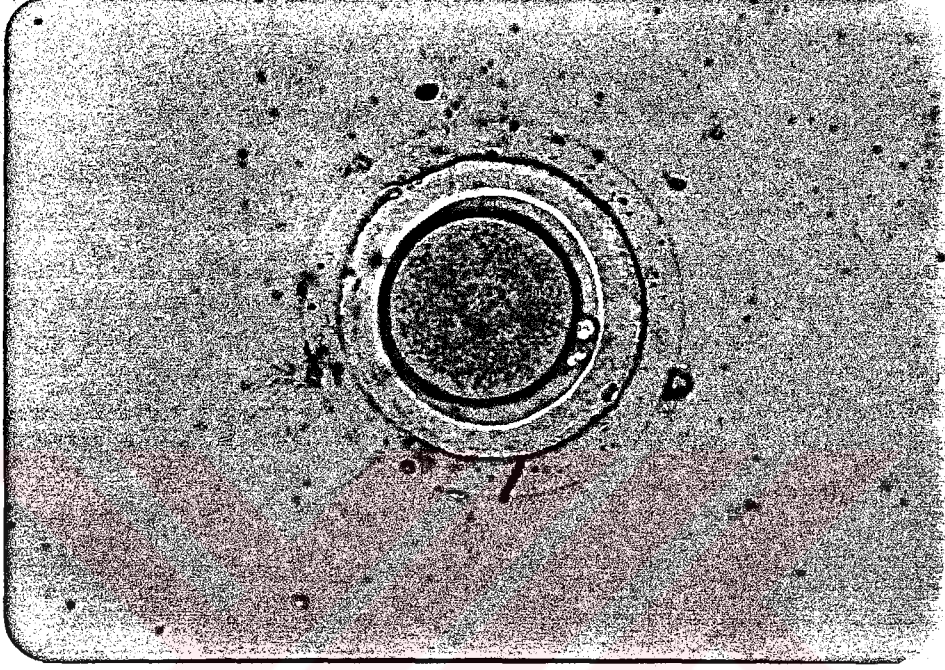
Resim 3. Tavşan embryolarının kültüründe kullanılan inkübatör ve kültür kabini.



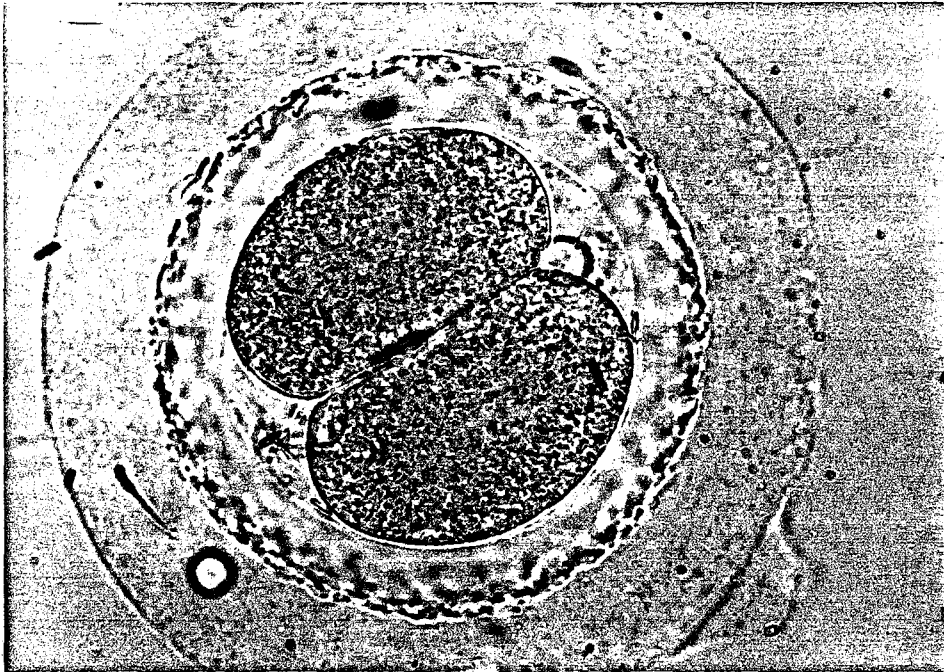
Resim 4. Çiftleşmeden 24 saat sonra oviduktan kazanılan bir ovum.



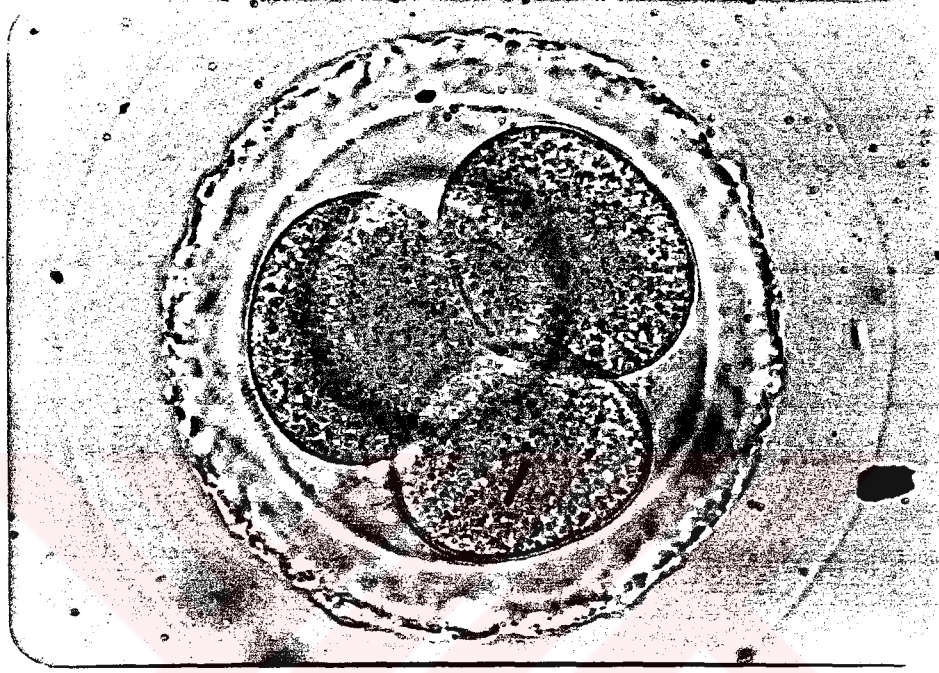
Resim 5. Çiftleşmeden 24 saat sonra kazanılan zigot konumundaki bir embryo.



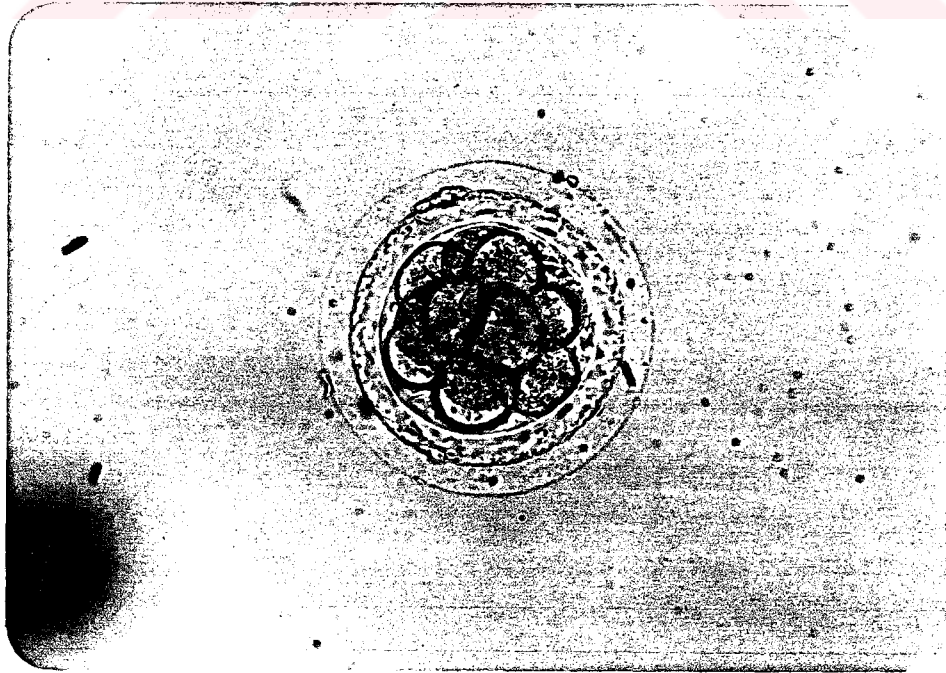
Resim 6. Çiftleşmeden 24 saat sonra kazanılan 2 blastomerli konumda bulunan bir embryo.



Resim 7. Çiftleşmeden 24 saat sonra oviduktan kazanılan 4 blastomerli konumda bir embryo.

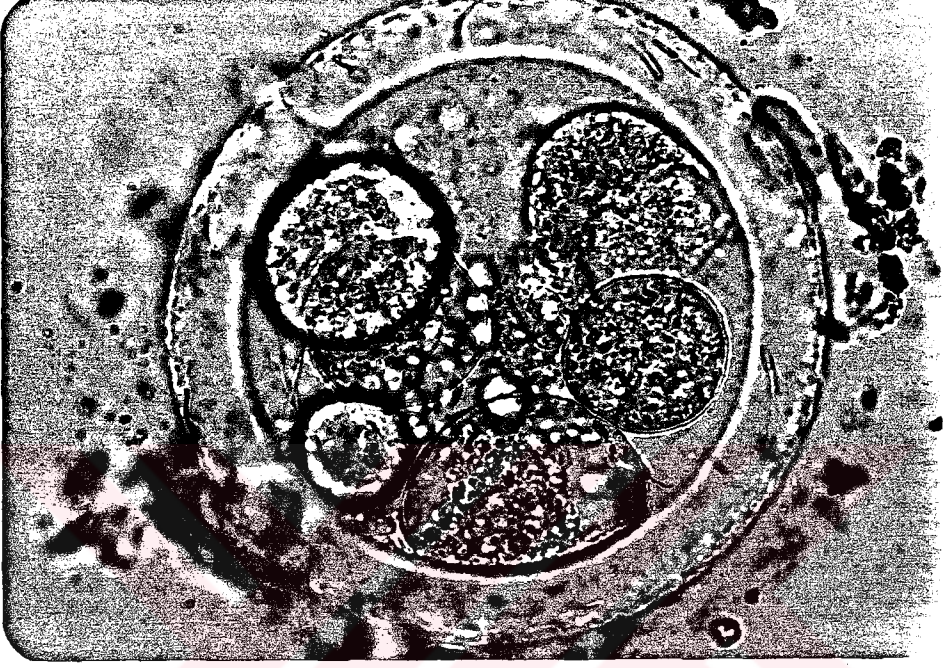


Resim 8. ilk 24 saatlik kültür süresi sonunda 16 blastomerli konuma gelişen bir embryo.

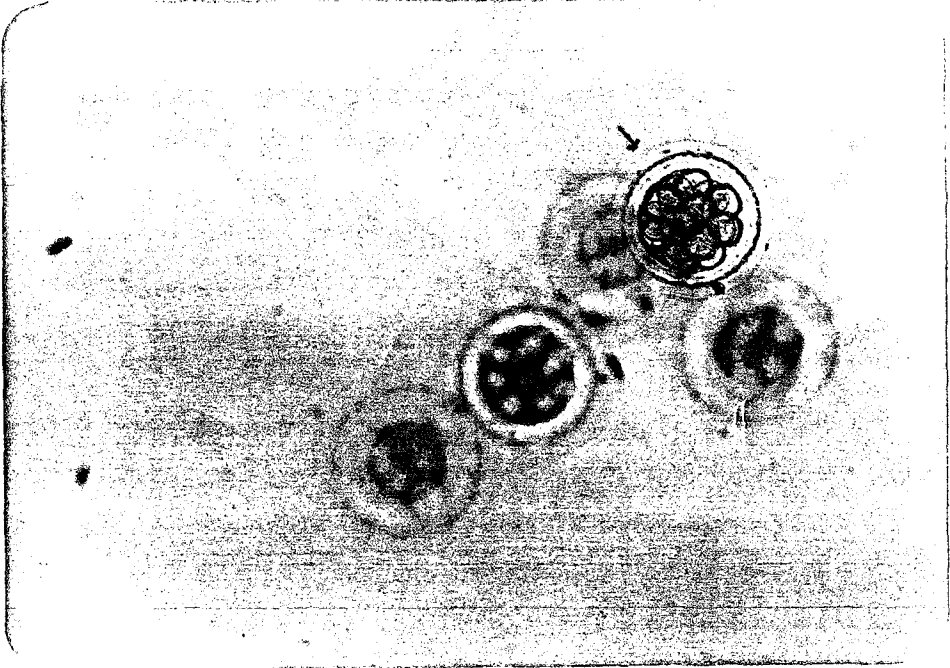




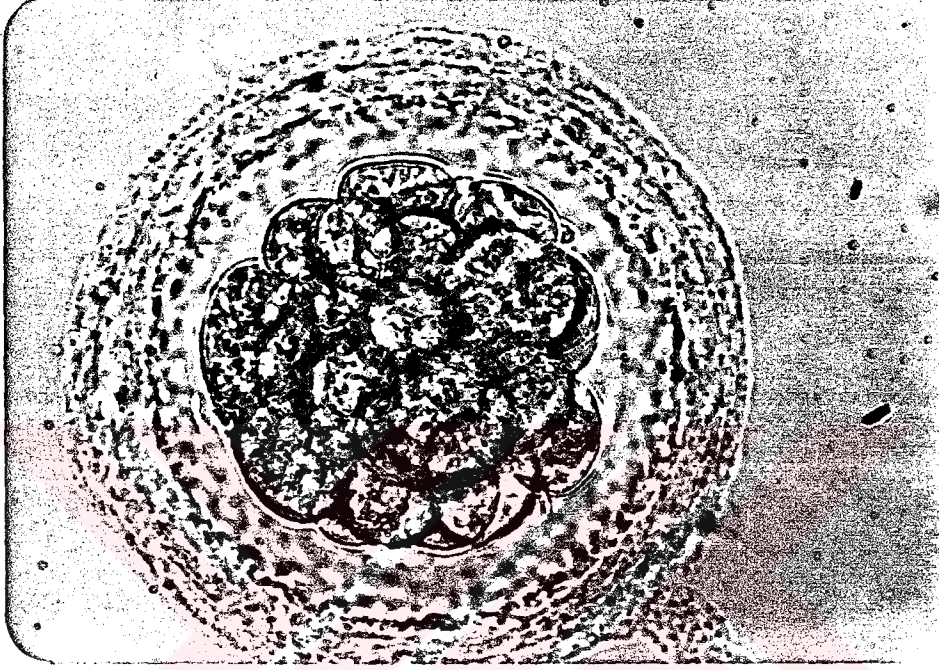
Resim 9. ilk 24 saatlik period sonunda dejenere olmuş bir embryo.



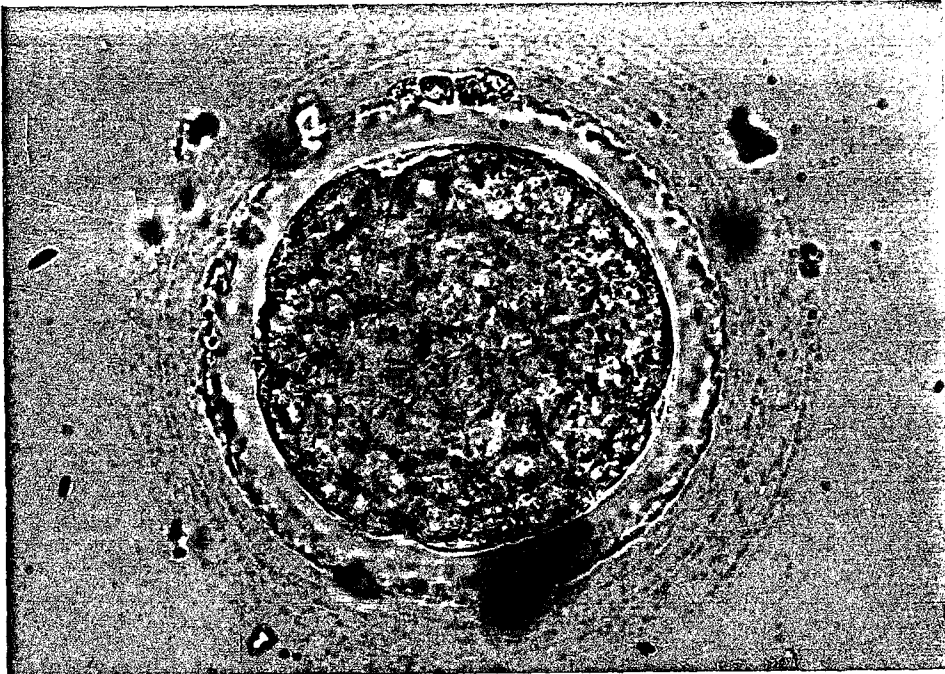
Resim 10. ilk 24 saatlik period sonunda 32 blastomerli konuma gelişmiş bir embryo.



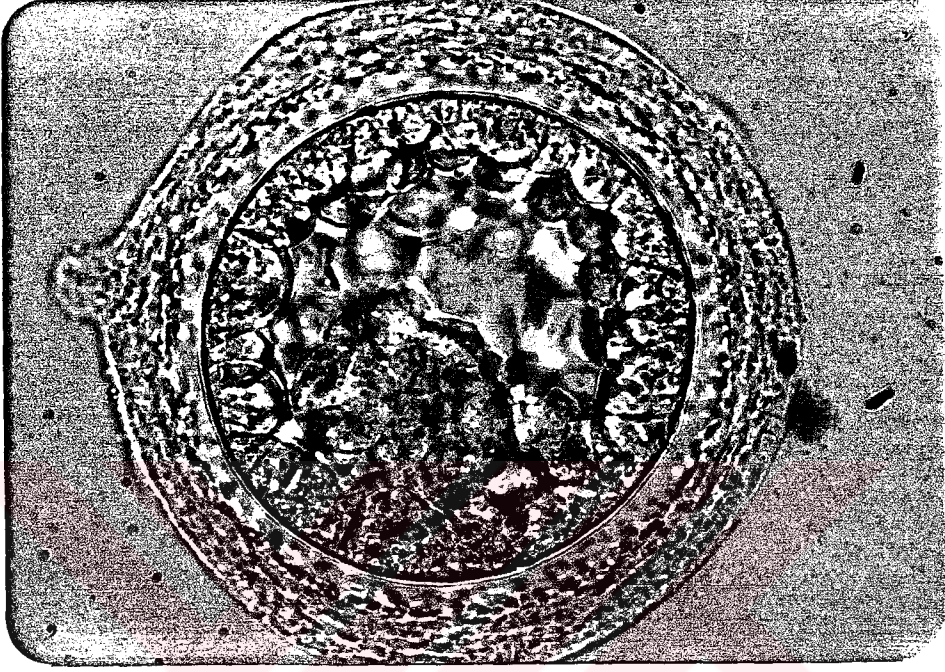
Resim 11. ikinci 24 saatlik kültür periyodu sonunda morula konumuna gelişmiş bir embryo.



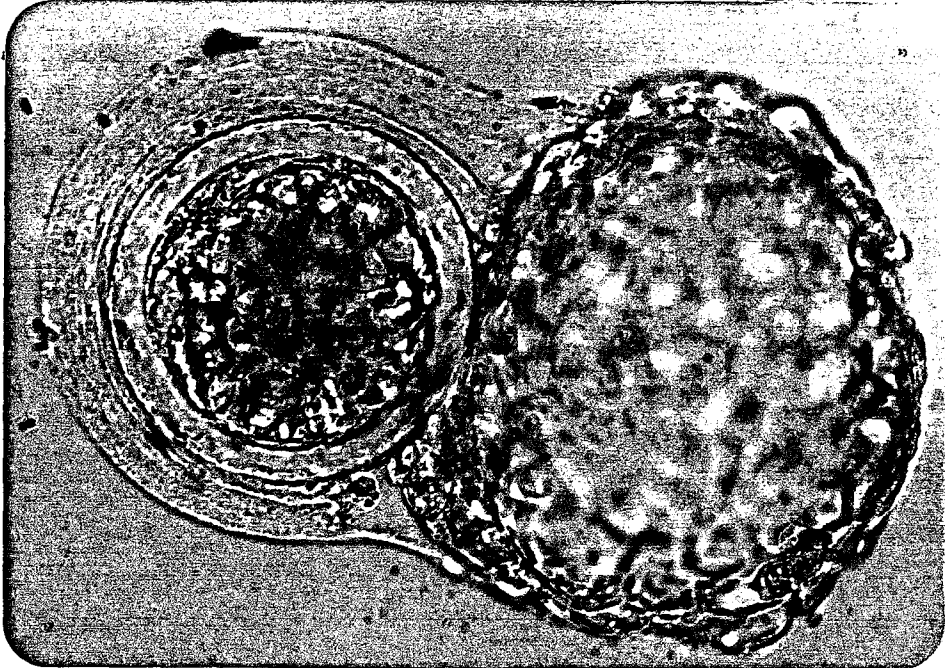
Resim 12. çnc 24 saatlik kültür periyodu sonunda kompakt morula konumuna gelişen bir embryo.



Resim 13. Dördüncü 24 saatlik period sonunda blastocyst safhasına gelişen bir embryo.



Resim 14. Dördüncü 24 saatlik period sonunda hatching blastocyst konumuna gelişen bir embryo.



## ÖZGEÇMİŞİM

1963 yılında Balıkesir ili Burhaniye ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Burhaniye'de tamamladım.

1986 yılında A.Ü.Veteriner Fakültesi'nden mezun oldum. Aynı yılın ekim ayında i.Ü.Veteriner Fakültesi Doğum ve Reprodüksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama Bilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladım. 1987 yılının eylül ayında i.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne doktora öğrencisi olarak kayıt oldum. Halen i.Ü.Veteriner Fakültesi'ndeki görevime devam etmekteyim.

**Y. G.**  
**Yükseköğretim Kurulu**  
**Dokümantasyon Merkez**