



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

KOYUN İN VİTRO EMBRİYO ÜRETİMİNDE AKTİVİN A ETKİSİ VE
MOLEKÜLER CEVABIN KARAKTERİZASYONU

GÖKHAN GÜN

DANIŞMAN
PROF. DR. ABİT AKTAŞ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

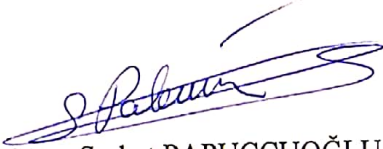
İSTANBUL-2019

Bu çalışma 09.12.2019 Tarihinde aşığıdaki jüri tarafından
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Doktora Programı Doktora
Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ



Prof. Dr. Abit AKTAŞ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi



Prof. Dr. Serhat PAPUCCUOĞLU
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi



Doç. Dr. M. Başak ULKAY
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Veteriner Fakültesi



Prof. Dr. H. Hakan BOZKURT
Gelişim Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Yüksekokulu



Prof. Dr. Rifat MUTUŞ
Gelişim Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Yüksekokulu

BEYAN

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

Gökhan GÜN

İTHAF

Aileme ve Eşim Duygu GÜN'e ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmamın tüm aşamalarını titizlikle takip eden, desteğini benden hiçbir zaman esirgemeyen danışman hocam Prof.Dr. Abit AKTAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim. Araştırmamda bilimsel önerilerini ve yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Serhat PAPUCCUOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamın her aşamasında destek olan, koordine eden ve bilimsel uyarılarıyla yönlendiren Doç. Dr. Kamber DEMİR'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmamda emeği geçen Ramazan ARICI, Selin YAĞCIOĞLU, Nur ERSOY ve Ahmet ESER'e teşekkür ederim.

Mesleki bilgi ve tecrübelerini ve manevi desteğini esirgemeyen tez izleme komitesi üyesi Doç. Dr. M. Başak ULKAY'a, düşünce çalışmalarından yararlandığım Prof. Dr. Sema BİRLER'e, çalışmalarım boyunca desteklerini sürdüren aileme ve eşim Duygu GÜN'e sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2016-22237.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	XİV
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Memeli Embriyonik Gelişimi	5
2.2. Koyunlarda <i>in vitro</i> embriyo üretimi	6
2.2.1. Oosit elde etme yöntemleri	6
2.2.1.1. Ovaryum dilimleme	7
2.2.1.2. Oosit aspirasyonu	7
2.2.1.3. Ovum pick-up (OPU) yöntemi ile oosit eldesi.....	8
2.2.2. Oosit kalitesini etkileyen faktörler.....	9
2.2.2.1. Donör yaşı	9
2.2.2.2. Ovaryum folikül boyutu	10
2.2.3. Oositlerin <i>in vitro</i> matürasyonu	12
2.2.3.1. Kullanılan albumin ve serum çeşitleri.....	15
2.2.4. <i>İn vitro</i> fertilizasyon.....	15
2.2.4.1. IVF’de kullanılan spermalar	17
2.2.4.2. IVF’de kullanılan serum ve albuminler	18
2.2.4.3. Sperma alma yöntemleri	19
2.2.4.4. Spermanın işlenmesi	20
2.2.5. <i>İn vitro</i> kültür	21
2.2.5.1. <i>İn vitro</i> kültürde kullanılan serumlar.....	21

2.2.5.2. Aktivin A.....	22
2.3. Embriyoların gelişim kontrolleri.....	25
2.4. Gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile incelenmesi	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Deney Dizaynı	29
3.1.1. Deney Planı A	29
3.1.2. Deney Planı B	29
3.2. Ovaryumların Temin Edilmesi ve Laboratuvara Taşınması	30
3.3. Oositlerin Elde Edilmesi	30
3.4. <i>İn Vitro</i> Maturasyon.....	31
3.5. Oosit Maturasyonunun Değerlendirilmesi.....	31
3.6. Spermanın Fertilizasyon İçin Hazırlanması.....	32
3.7. <i>İn Vitro</i> Fertilizasyon	32
3.8. <i>İn Vitro</i> Embriyo Kültürü.....	33
3.9. RNA İzolasyonu.....	33
3.10. Geri Transkripsiyon ile cDNA Sentezi	34
3.11. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Q-PCR)	34
3.12. İstatiksel Değerlendirme	35
3.13. Çalışmada Kullanılan Stok Solüsyonlar	36
3.14. Çalışmada Kullanılan Medyumlar	38
4. BULGULAR.....	43
4.1. Embriyoların <i>in vitro</i> üretimi	43
4.1.1. Deney Planı A Embriyo Üretim Sonuçları	44
4.1.2. Deney Planı B Embriyo Üretim Sonuçları.....	45
4.2. Aktivin A'nın Embriyonik Gelişim ile İlgili Genlere Etkisi	46
4.2.1. Deney Planı A Embriyonik Gelişim ile İlgili Genlere Etki	46
4.2.2. Deney Planı B Embriyonik Gelişim ile İlgili Genlere Etki	47
4.3. Aktivin A'nın Apoptoz ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	49
4.3.1. Deney planı A Apoptotik Gen Düzeyi Değişimleri	49
4.3.2. Deney planı B Apoptotik Gen Düzeyi Değişimleri	51
5. TARTIŞMA.....	54
KAYNAKLAR	61

ETİK KURUL KARARI	79
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	80
ÖZGEÇMİŞ	81



TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: IVM ortamına eklenecek aktivin A konsantrasyonları	29
Tablo 3-2: IVF sonrası medyumlara eklenecek aktivin A konsantrasyonları	29
Tablo 3-3: Embriyonik Gelişme Aşamalarının Değerlendirilme Zamanı	33
Tablo 3-4: Q-PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler.....	34
Tablo 3-5: Gerçek zamanlı PCR için kullanılan sıcaklık koşulları	35
Tablo 3-6: Q-PCR primerleri.....	35
Tablo 3-7: TCM-199 Stok (10x) solüsyonu formülasyonu	36
Tablo 3-8: Bikarbonat Stok Solüsyonu (B) formülasyonu	36
Tablo 3-9: Hepes stok solüsyonu (H) formülasyonu	36
Tablo 3-10: Tuz stok solüsyonu (S2) formülasyonu	37
Tablo 3-11: Laktat stok solüsyonu (L) formülasyonu	37
Tablo 3-12: Glikoz stok solüsyonu (G) formülasyonu	37
Tablo 3-13: Kalsiyum stok solüsyonu (Ca) formülasyonu.....	37
Tablo 3-14: Magnezyum stok solüsyonu (Mg) formülasyonu	38
Tablo 3-15: Antibiyotik stok solüsyonu (PS) formülasyonu.....	38
Tablo 3-16: Fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonu formülasyonu	38
Tablo 3-17: Antibiyotik karışımının hazırlanması.....	39
Tablo 3-18: Oosit Yıkama Solüsyonu formülasyonu	39
Tablo 3-19: Oosit olgunlaştırma medyumunu formülasyonu.....	39
Tablo 3-20: Hepes tamponlu SOF (HSOF) formülasyonu	40
Tablo 3-21: Percoll-SOF medyumunu formülasyonu	40
Tablo 3-22: BSOF medium formülasyonu	41
Tablo 3-23: SOFaa medium formülasyonu	41
Tablo 4-1: Deney planı A'ya ait IVM'de uygulanan Aktivin A (0, 10, 50 ve 100 ng/ml) ile elde edilen hücre sayıları	44
Tablo 4-2: Deney planı B'ya ait IVF sonrası uygulanan Aktivin A (0, 10, 50 ve 100 ng/ml) ile elde edilen hücre sayıları.....	44
Tablo 4-3: IVM'de aktivin A kullanılan deney planı A sonucu elde edilen hücre oranları	45

Tablo 4-4: IVF sonrası aktivin A kullanılan deney planı B sonucu elde edilen hücre oranları.....	46
Tablo 4-5: IVM’de aktivin A eklenmesi ile <i>Bax/Bcl-2</i> gen ekspresyon düzeyleri oranı.	51
Tablo 4-6: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile <i>Bax/Bcl-2</i> gen ekspresyon düzeyleri oranı.	53



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: GV, GVBD, MI ve MII evreleri -Hemin ve ark.(2015)'ten.....	13
Şekil 2-2: Aktivinlerin potansiyel intrafoliküler rollerini özetleyen şematik diyagram-Hammami (2014)'ten.....	23
Şekil 2-3: Aktivin A etkisi ile tetiklenen sinyal yolağı -Knight ve Glistler. (2003)'ten..	25
Şekil 3-1: 1. koyun ovaryumu, 2. folikül bölgeleri.....	30
Şekil 3-2: İn vitro matürasyon için seçilen kumuluslarla çevrili oositler.	31
Şekil 3-3: Embriyonik gelişim aşamaları – Birler ve ark. (2002)'den.....	33
Şekil 4-1: IVM'de aktivin A eklenmesi ile değişen <i>Bmp4</i> gen ekspresyon düzeyi.	47
Şekil 4-2: IVM'de aktivin A eklenmesi ile değişen <i>Smad4</i> gen ekspresyon düzeyi.	47
Şekil 4-3: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile değişen <i>Bmp4</i> gen ekspresyon düzeyi..	48
Şekil 4-4: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile değişen <i>Smad4</i> gen ekspresyon düzeyi.	48
Şekil 4-5: IVM'de aktivin A eklenmesi ile değişen <i>Bax</i> gen ekspresyon düzeyi.....	49
Şekil 4-6: IVM'de aktivin A eklenmesi ile değişen <i>Bcl-2</i> gen ekspresyon düzeyi.	50
Şekil 4-7: IVM'de aktivin A eklenmesi ile değişen <i>Caspase-3</i> gen ekspresyon düzeyi.	50
Şekil 4-8: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile değişen <i>Bax</i> gen ekspresyon düzeyi.....	51
Şekil 4-9: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile değişen <i>Bcl-2</i> gen ekspresyon düzeyi ..	52
Şekil 4-10: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile değişen <i>Caspase-3</i> gen ekspresyon düzeyi.....	52

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

IVF	İn Vitro Fertilizasyon
MI	Metafaz I
MII	Metafaz II
BMP4	Bone Morphogenetic Protein 4
BAX	BCL2-Associated X
BCL-2	B Cell Lymphoma-2
CASPASE-3	Cysteine-Aspartic Proteases-3
ICM	İç Hücre Kütlesi
IVM	İn Vitro Matürasyon
IVK	İn vitro Kültür
IVEP	İn Vitro Embriyo Kültür
OPU	Oosit toplanması
PBS	Fosfat Tamponlu Çözelti
COC	Kumulus Oosit Kompleksi
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
LH	Lüteinleştirici Hormon
E2	Estradiol
eCG	Equine Koryonik Gonadotropin
FCS	Fötal Sığır Serum
TCM 199	Tissue Culture Medium
BSA	Sığır Serum Albumin
GV	Germinal Vezikül
GVBD	Germinal Vezikül Yılkılması
PB	Polar Cisim
MEM	Minimal Esansiyel Medyum
hCG	İnsan Koryonik Hormon
FBS	Fötal Sığır Serum
ESS	Östrus Koyun Serumu

IU	Internrtional Unit
SOF	Sentetik Ovidukt Sıvısı
2PN	2 Pronükleuslu Zigot
LOPU	Laparoskopik oosit eldesi
EE	Elektro Ejakülasyon
AV	Yapay Vajina
VCV	Vajinal Toplama Tüpleri
EB	Genişlemiş (expanded) Blastosist
HB	Zonasından Çıkmış (hatched) Blastosist
SOF	Sentetik Ovidukt Sıvısı

ÖZET

Gün, G. (2019). Koyun İn Vitro Embriyo Üretiminde Aktivin A Etkisi ve Moleküler Cevabın Karakterizasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Çalışmada, koyunlarda *in vitro* ortamda şekillenen morula ve blastosist verimlerinin geliştirilmesi amacı ile farklı gelişim evrelerinde uygulanan farklı miktarlarda (10 ng/ml, 50 ng/ml ve 100 ng/ml) aktivin A proteini içeren medyumlarda oosit ve embriyoların gelişimleri değerlendirildi. Ayrıca blastosistlerde büyüme ve apoptoz faktörlerinin bağlı miktarları incelenerek *Bmp4*, *Smad4*, *Bax*, *Bcl-2* ve *Caspase-3* gen transkriptlerinin değişim oranları karşılaştırılmıştır.

Bu amaçla mezbahadan alınan koyun ovaryumlarından 1237 adet oosit kullanılarak metafaz I (MI), metafaz II (MII), bölünen, morula öncesi, morula sonrası, blastosist ve dejenere hücre sayıları değerlendirilmiştir. Farklı zaman aralıklarında aktivin A'nın etkilerinin incelenmesi amacıyla iki deney planı oluşturulmuştur. Deney planı A'da 10, 50 ve 100 ng/ml aktivin A konsantrasyonları maturasyon aşamasında (IVM) kullanılarak; deney planı B'de ise aynı konsantrasyonlar IVF sonrası medyumlara eklenerek aktivin A'nın etkileri incelenmiştir. Aktivin A'nın bölünme oranları üzerine olan en etkili sonucu IVF sonrası ortama 50 ng/ml konsantrasyonunda eklenmesi ile %92,7 verim elde edilmiştir. Maturasyon ortamına eklendiğinde morula gelişiminde sadece 100 ng/ml konsantrasyonda bir artışa neden olduğu (%81,1) ancak IVF sonrası bütün konsantrasyonlarda artışa neden olduğu ve maksimum düzeye (%89,3 morula) 50 ng/ml konsantrasyonu ile ulaştığı görülmüştür. Yine deney planı A'da blastosist yüzdelerinde önemli derecede ($p<0,05$) azalma meydana gelerek olumsuz bir etki gözlenmiş ancak bu etki IVF sonrası uygulanan deney planı B'de gözlenmemiştir.

Aktivin A'nın blastosistlerdeki çeşitli gen ekspresyonlarında her iki deney grubuna da olan etkisi incelendiğinde büyüme ve apoptoz faktörleri üzerinde artma ve azalma gözlenmesine rağmen bu etki %95 güven aralığında anlamlı bir değişimle sonuçlanmamıştır. Bu çalışmada aktivin A proteininin *in vitro* medyumlara eklenmesinde zamanlamanın önemi ortaya çıkmış ve kullanılan konsantrasyonların embriyonik gelişimde etkili rol oynadığı kanısına varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Koyun, blastosist, aktivin A, embriyo kültürü, gen ekspresyonu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:TDK-2016-22237



ABSTRACT

Gün, G. (2019). Effects Of Activin A On Sheep Embryo Production And Characterization Of Molecular Response. İstanbul University, Institute of Health Science, Histology and Embryology Department. Doktora Tezi. İstanbul.

In present thesis work, effects of activin A at different concentrations (10, 50 and 100 ng/ml) and different developmental stages were evaluated through developmental competence of sheep oocyte and blastocyst to increase rate of morula and blastocyst formation *in vitro*. Relative mRNA abundance of growth and apoptosis factors were also examined by comparing changes in *Bmp4*, *Smad4*, *Bax*, *Bcl-2* and *Caspase-3* transcripts.

1237 oocytes were collected from ovaries of slaughtered sheep females to evaluate metaphase I (MI), metaphase II (MII), cleavage, morula, blastocyst and degenerate cells. Two experimental strategy were conducted to investigate effects of activin A in different time periods. In experiment-A, activin A were used in medium during *in vitro* maturation (IVM) to examine its effects. Same concentrations were applied after IVF in experiment-B. The highest cleavage rate was obtained with 50 ng/ml as 92.7% in experiment-A. Increase in developmental rate (81.1%) of morula was only seen at 100 ng/ml concentration in experiment-A, but all the concentrations lead to increase in morula rate and reached maximum level (89.3%) at 50 ng/ml in experiment-B. Although blastocyst rates showed significant decrease at 95% interval in experiment-B, any adverse effect was not obtained from experiment-B.

Increases and decreases in relative abundance of gene expression levels were observed with addition of activin A. However, there were no significant alterations of growth and apoptosis specific transcripts in either experimental strategy. In conclusion, importance of timing of activin addition to *in vitro* medium was illustrated and it was suggested that applied concentrations of activin A had efficient role on embryonic development.

Key Words: Sheep, blastocyst, activin A, embryo culture, gene expression

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No:TDK-2016-22237





1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde insan nüfusu hızlı bir artış göstermekte ve buna paralel olarak bitkisel ve hayvansal ürünlere olan ihtiyaç da artmaktadır. Bu ürünlerden elde edilen gıda ve enerji miktarları artan nüfusu karşılayamamakta ve dünya nüfusunun yaklaşık olarak üçte biri açlık tehlikesi altındadır. Bu nedenle sığır, koyun, keçi ve domuz gibi çiftlik hayvanlarının verim yönünden geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

Evcilleştirilen ilk çiftlik hayvanı olduğu düşünülen koyunlar (Shelton, 1995), dünya üzerinde özellikle gıda ihtiyacı yönünden önemli bir yere sahiptir ancak sınırlı alanlar ve diğer doğal kaynaklara sahip az gelişmiş ülkeler için çok daha önem taşımaktadır. Et üretiminin yanı sıra süt, gübre, yapağı ve iş istihdamı açısından da oldukça değerlidir. Bilinen özelliklerinin yanı sıra koyunlar; yeni teknolojilerle birlikte önemli bir araştırma aracı haline gelmiştir. Boyutları ve fizyolojisinin uygunluğu üreme, embriyoloji ve fetal gelişim gibi birçok memeli biyolojik fonksiyonlarının çalışmasına olanak sağlamaktadır. Koyunların artan üretimi özellikle az gelişmiş ülkelerdeki insan popülasyonları için uygun bir kaynaktır. Koyunlara uygulanacak uygun reproduktif yöntemler ile koyun popülasyonlarının hızlı ve kolay artışı mümkün olabilir (Zhu ve ark., 2001; Mahammadpour, 2007). Türkiye, sahip olduğu koyun popülasyonu açısından dünyanın sayılı ülkeleri arasında yer almaktadır. Ancak koyun popülasyonun %93 kadarını yerli ırklar, geri kalanını ise kültür ve melez ırkların oluşturması ve yerli ırk veriminin düşük olması nedeniyle hayvansal üretim istenilen düzeyde değildir (Birler ve ark., 2002; TUİK, 2016). Ülkemizde koyun yetiştiriciliği yaygın olarak geleneksel yöntemlerle yapılmakta ve gelişen modern tekniklerin kullanımı az yer kaplamaktadır.

Hayvansal kaynakların yüksek verimlerde üretilmeleri amacıyla birçok bilimsel yöntemlere başvurulmuş ve hayvan üretimindeki düşük verimin giderilmesi hedeflenmiştir. İlk kullanılan yöntemlerden bir tanesi olan hayvan popülasyonlarının ıslah edilmesi ile genotip ve fenotip olarak üstün ırkların elde edilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu yöntemin başarılı olabilmesi amacıyla yapay seleksiyon yöntemleri uygulanmakta ve oldukça uzun yıllara ve çok fazla hayvana ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısı ile istenilen sonuca ulaşmak ve yüksek verim elde etmek oldukça zor olmaktadır. Bu nedenle daha kısa sürede ve daha az hayvana ihtiyaç

duyulan alternatif yöntemler, gelişen biyoteknolojik araştırmalar ile hız kazanmıştır. Suni tohumlama bu yönde yapılan ilk uygulama yöntemlerinden bir tanesi olmuştur. Koyunlarda ilk kez Rusya'da suni tohumlama çalışmaları başlamış ve 1926 yılında Türkiye'de Merinos ırkı koçlar kullanılarak ilk melezme çalışmaları yapılmıştır (İleri ve ark., 2000).

Reprodüktif biyoteknoloji alanında hızlı bir ilerleme sağlayabilecek embriyo transferi hayvan ıslahında kullanılan yöntemlerden bir diğeri olmuştur. Embriyo transferi ilk kez 1951 yılında mezbahadan elde edilen 5 günlük sığır embriyosunun cerrahi operasyonla transferi ile başarıyla sonuçlanmıştır (Willet ve ark., 1951). Bu yöntem ile damızlık değeri yüksek hayvanlardan reprodüktif yaşamı boyunca daha fazla yavru alınması sağlanmakta ve sürünün kısa sürede damızlık değeri yüksek hayvanlardan oluşması sağlanabilmektedir. Ancak embriyo transferinde kullanılan kimyasalların, hormonların ve laboratuvar sistemlerinin vs. yüksek maliyetli olması ve embriyo transferi ile elde edilen gebelik oranlarının düşük olması bu yöntemin dezavantajlarından biridir. Bu tür engellerin önüne geçebilmek amacıyla yeni yöntemler geliştirilerek daha ucuz bir alternatif olan *in vitro* fertilizasyon ile embriyo üretilerek bunların transferi geliştirilmiştir (Moore ve Hasler., 2017). Bu yöntemde mezbahadan alınan ovaryumların kullanımı mümkün olmakta ve elde edilen oositlerin *in vitro* ortamda olgunlaştırılıp, fertilizasyonları yapılarak embriyolar elde edilmekte ve transferleri gerçekleştirilmektedir.

Hayvanlarda uygulanan ve başarılı ile sonuçlanan embriyo eldesi ve transfer yöntemlerinin geliştirilmesi ile insanlarda karşılaşılan reprodüktif sorunların giderilmesine yönelik çalışmaların da önü açılmıştır. *In vitro* embriyo üretiminde kullanılan medyumların türe özel içerik ve konsantrasyonda olması standardizasyona engel olmaktadır. Günümüzde medyumların embriyo gelişim oranlarını en yüksek seviyeye çıkaracak bilimsel araştırmalara oldukça ihtiyaç duyulmaktadır.

In vitro koşullarda oositlerin olgunlaştırılması, fertilizasyonu ve embriyo kültürü laboratuvar ortamında *in vivo* ortam şartlarının belirli oranda karşılanması ile sağlanabilmektedir. Ancak günümüzde dişi genital kanalında yer alan faktörlerin bire bir sağlanması mümkün olmamaktadır. Her bir hayvan türünde embriyo gelişimini doğrudan etkileyen gen ekspresyon farklılıkları *in vivo* ortam içeriğini farklı

kılmaktadır. Türler arasındaki gen ekspresyon farklılıkları türlerin tümünde kullanılabilir ortak bir medyum elde edilmesini zorlaşmaktadır.

In vitro embriyo gelişim oranları değerlendirildiğinde elde edilen başarımın düşük kalmasının muhtemel nedeni çalışmada kullanılan embriyolardaki anormal gen ekspresyon düzeyleri olmaktadır. Embriyolarda karşılaşılan bu durumun sebebi; embriyo gelişiminde etkili transkripsiyon faktörlerinin anormal sentezi, DNA metilasyon aksaklıkları, somatik hücre çekirdeğinin yeniden programlanması ve kromatin düzenlenmesi gibi epigenetik faktörler olmaktadır (Wrenzycki ve ark., 2004). Günümüzde sağlıklı ve yüksek oranda embriyo üretimini amaçlayan çalışmaların bir çoğu embriyo kültür şartlarının geliştirilmesi üzerine olmaktadır. Ancak yeterli verimde çalışan optimal bir kültürün elde edilememesinin nedenleri embriyonik gelişim değerlendirmelerinin sadece bölünme oranları, blastosist yüzdesi ya da hücre sayımı gibi morfolojik değerlendirmelere bağlı kalınmasından kaynaklanmaktadır. Bu gibi değerlendirmeler kullanışlı olmasına rağmen transfer sonrası embriyonik gelişimin ve canlı yavru doğum oranlarının belirlenmesinde yeterli değildir. Bu nedenle gen ekspresyon profili ölçümleri embriyonun gelişimsel potansiyelinin daha detaylı değerlendirilebilmesi için kantitatif bir yöntemdir. Optimal düzeyin altında verim elde edilen kültür şartlarında belirlenen anormal gen ekspresyon düzeyleri ile ilgili birçok çalışma yer almaktadır (Wrenzycki ve ark., 2001, 2004; Eckert ve Niemann, 1998; Lazzari ve ark., 2002; Rizos ve ark., 2002, 2003; Lonergan ve ark., 2003). Bu yüzden uygun aday genlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi yöntemlerle analizi, embriyo transferi öncesi gelişimsel yeteneğin belirlenmesinde uygun bir yöntem olduğu ön görülmektedir.

Koyunlarda elde edilen *in vitro* blastosist oranlarının düşüklüğü bu alanda medyumların geliştirilmesini zorunlu hale getirmektedir (Cognie ve ark., 2003). *In vivo* ortamda rol oynayan faktörlerden bir tanesi olan aktivin A; oosit maturasyonu ve foliküler gelişimde rol alan faktörlerin sentezlenmesine neden olmaktadır. Embriyonik gelişimde BMP4 (bone morphogenetic factor) embriyonun erken dönem farklılaşmasında ve dorsal-ventral eksen oluşumu aşamasında rol alan kritik bir sinyal molekülüdür. En büyük rolünün embriyonik gelişim evresinde olduğu bilinmektedir (Chen, 2004). BMP4; SMAD1/5/8'in fosforilasyonuna neden olarak SMAD4'ün fosforillenmiş SMAD'larla kompleks oluşumuna neden olur ve SMAD4 gelişen

embriyolarda hücre nükleusuna gider. Aktivinler ise SMAD2/3'ü etkileyerek SMAD4 ile farklı ligand-spesifik SMAD'ların heteromerik kompleks oluşumuna neden olur (Heldin, 1997). Embriyo kültürlerinin geliştirilmesinde aydınlatılmış bu moleküler mekanizmaların sayesinde koyunlarda medyuma optimal düzeyde aktivin A eklenmesi ile embriyonal gelişimde gerekli olan genlerin ifade edilmesi araştırılarak bu çalışmada etkileri incelenmiştir.

Sunulan bu çalışmada mezbahada kesilen koyunlardan elde edilen oositlerin maturasyon medyumuna ve fertilizasyon sonrası *in vitro* kültür medyumlarına farklı konsantrasyonda katılan aktivin A'nın embriyoların blastosist aşamasına ulaşma üzerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca elde edilen blastosistlerin moleküler düzeyde karakterize edilmesi ile aktivin A'nın hedef genlerin ekspresyonlarına olan etkilerinin bulunması amaçlanmıştır. Son yıllarda tarım hayvanlarından *in vitro* embriyo üretimi; gelişimsel biyoloji, ticari uygulamalar ve klonlama teknolojileri için oldukça önemli bir kaynak haline gelmiştir. Ancak birçok başarılı çalışma sonuçlarına ve denemelere rağmen koyun oositlerinden *in vitro* embriyo üretim protokollerinin verimi tatmin edici bir düzeye ulaşamamıştır. Embriyoların blastosist aşamasına ulaşmalarında IVM/IVF/IVC kültür ortamlarının içerikleri belirleyici bir faktör durumundadır. Büyükbaş ve küçükbaş hayvan oositlerinde kullanılan geliştirme medyumlarında embriyonun *in vivo* ortamda bulunduğu koşullar ortama eklenerek verimliliğinin artırılması hedeflenmekte ancak zamanlama ve miktar kavramlarının optimizasyonu oldukça uzun zaman gerektirmektedir. Bu nedenle değişen ortam şartlarına göre embriyolardan elde edilen cevabın olumlu ya da olumsuz yönlerinin hem gelişimsel hem de gen ekspresyon düzeylerinde incelenmesi bu sürecin kısa sürede ve sistematik olarak ilerlemesi yönünden gereklidir. Çalışmamız bu sebeple üç ana amaç doğrultusunda tasarlanmıştır. İlk olarak aktivin A molekülünün farklı zaman dilimlerinde kültür ortamlarına eklenmesi ile embriyonik gelişim üzerine olan etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. İkinci olarak farklı gelişim evrelerinde ortama eklenen aktivin A'nın farklı konsantrasyonlarının etkileri incelenmiştir. Son olarak da farklı evrelerde ve konsantrasyonlarda aktivin A eklenmesi ile elde edilen blastosistlerde büyüme faktörleri ve apoptoz faktörleri gibi genlerin ifade düzeylerine olan etkileri incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Memeli Embriyonik Gelişimi

Fertilizasyondan implantasyona kadar geçen embriyogenez periyodu çeşitli genomik aktivitelere bağlı olarak morfolojik, hücrel ve biyokimyasal değişiklikler içerir. Embriyonik hücreler erken embriyogenez dönemi boyunca fetüs ve plasental dokuları oluşturmak için farklılaşma ve çoğalma olaylarını gerçekleştirir. Fertilizasyon sonrası embriyonik gelişim evresi; protein sentezi, çoğalma, farklılaşma ve fetal ve ekstraembriyonik dokuların oluşmasını içerir. Bu periyot sırasında genetik faktörlerin katkılarıyla fetusta bir takım farklılıklar meydana gelir. Bu değişiklikler embriyonik dokuların morfolojik olarak uzaması, anne ve fetüs arasında hücre-hücre etkileşimleri ve plasentasyon gibi oluşumlardır (Ushizawa ve ark., 2004). Genetik bilginin embriyoya geçişinin parental kaynaktan ve bir regülatör gen ağı ile olduğu öne sürülmüştür (Scholer ve ark., 1989). Ancak memeli embriyogenezinde bu transferin tam mekanizması bilinmemektedir. Türlerin çoğunda erken embriyonik evre maternal RNAlarla ve oogenez sırasında sentezlenen proteinlerle desteklenmektedir. Gelişim ilerledikçe maternal proteinler azalmaya başlar ve embriyogenez sadece embriyonik genlere bağlı olmaya başlar. Embriyonik genlerin transkripsiyonel aktivasyonu maternal RNA ve protein degradasyonu ile başlar ve hücre çekirdeğinin yeniden programlanması sonucu aktive olur (Memili ve First, 2000). Bu geçiş evresi embriyonik gelişimin ileriki evrelerini hazırlar ve genellikle 8-16 hücre evresinde başlatılır (Kopency ve ark., 1989). Ancak yeni bulgular bu geçişin daha erken evrelerde olabileceğini öne sürmektedir. *In vitro* embriyo gelişimi; oosit maturasyonu, fertilizasyon ve kültür içeriğine bağlı olarak şekillenir. Embriyonal iç bölünme; gelişimin bir indikatörü olmasına rağmen gelişimin en erken safhaları büyük çoğunlukla oosit sitoplazması tarafından desteklenmektedir. Embriyoların *in vitro* üretiminde post fertilizasyon sonrası 5-6 günlük periyodu embriyonun ileri gelişim aşamaları üzerine büyük etkisi olan ve ilk hücre iç bölünmesinin gerçekleştiği evredir (Lonergan ve ark., 1999). Bu periyotta aynı zamanda embriyonik genomun aktivasyonu (Memili ve First, 2000) ya da maternaldan zigota geçiş evresi, ilk hücre-hücre yüzey etkileşiminin kurulduğu morula kompaksiyonu, trofoektoderm ve iç hücre kütle (ICM) gibi iki farklı hücre tipinin belirlediği blastosist oluşumu gerçekleşir. Bu periyot genellikle pre-implantasyon periyodu olarak adlandırılır. Bu evre maternal ve embriyonik genlerin kompaksiyona, kavitasyona ve

blastosöl genişlemesine neden olan genlerin organize ekspresyonu ile meydana gelen farklı morfolojik adımlar ile karakterize edilir (Kidder, 1992). Ruminantlarda pre-implantasyon sonrası trofoektoderm eksponansiyel olarak genişleyerek 150 mm'den büyük bir yapıya ulaşarak uterus duvarına implante olur (Degrelle ve ark., 2005). *In vitro* kültür ortamının içeriği ve herhangi bir değişiklik oluşan embriyolarda kriyotolerans ve rölatif transkript miktarı bakımından oluşan embriyo kalitesine büyük ölçüde etki eder (Lonergan ve ark., 2003). Koyunlarda *in vitro* embriyo üretimi; süperovulasyon indüksiyon tekniklerine alternatif olarak güvenilir bir metot ve pre-implantasyon embriyo gelişim çalışmaları için uygun bir araç haline gelmiştir. Ancak bu gibi yardımcı teknolojilerin gen ekspresyonları üzerine olan etkilerinin incelenmesi üzerine yeterince çalışma bulunmamaktadır.

2.2. Koyunlarda *in vitro* embriyo üretimi

Araştırma projelerinde kullanılmak üzere kolay elde edilebilir ve daha ucuz olgunlaştırılmış oositler, zigotlar ve embriyolar büyük önem arz etmektedir. Bu sebeple *in vitro* üretime olan ilgi son 10 yılda hızla artmıştır. Küçük ruminantlarda *in vitro* embriyo üretimi embriyo gelişim çalışmalarında, moleküler biyoloji, fizyoloji ve ticari kullanımda düşük maliyetli embriyo kaynağı olarak kullanılmaktadır (Baldassare ve ark., 2002). Bunlara ek olarak, *in vitro* embriyo üretimi yok olma tehlikesi altındaki koyun türlerinin kurtarılmasında da kullanım alanı bulmuştur (Ptak ve ark., 2002). *In vitro* embriyo üretimi çok basamaklı bir metodolojidir: (i) antral foliküllerden alınan oositlerin *in vitro* maturasyonu (IVM), (ii) mature edilmiş oositlerin *in vitro* fertilizasyonu (IVF) ve (iii) zigotun blastosist evresine kadar 7-8 gün süren *in vitro* kültürüdür (IVK) (Paramio ve ark., 2010).

2.2.1. Oosit elde etme yöntemleri

Oosit elde etme yöntemleri *in vitro* embriyo üretim (IVEP) verimi üzerine önemli rol oynamaktadır (Katska-Ksiazkiewicz ve ark., 2007). Her bir ovaryumdan fazla sayıda ve üstün kalitede oosit toplamak bu yöntemin hedeflerindedir. Foliküllerin gelişimi ya da oositlerin gelişimsel süreci, oositlerin kalite ve gelişimsel kapasitesini belirler. Erken embriyonik gelişim, gebeliğin sürdürülmesi ve *in vitro* ortamdaki gelişim kabiliyeti gibi gelişimsel olaylar oosit kalitesi ile belirlenir (Krisher ve ark., 2004). Mezbahadan oosit eldesi amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir. Aynı zamanda canlı hayvanlardan da oosit alınması mümkün olmasına rağmen çoğunlukla mezbahadan

oosit toplama tercih edilmektedir (Wani ve ark., 2002). Mezbahadan alınan koyunlardan ovaryumun dilimlenmesi ya da aspirasyon yöntemi oosit elde etmek için sıklıkla kullanılan yöntemlerdendir (Wani ve ark., 2000). Diğer yandan canlı hayvanlardan oosit eldesi ise oosit toplanması (ovum pick-up, OPU) ya da laparoskopi ile mümkün olmaktadır. Mezbaha çalışmalarında yapılan işlemler; ovaryumların ayrılması, uygun sıcaklık ve solüsyonlarda laboratuvara getirilmesi, kullanılmayacak dokuların arındırılması ve yıkanması, dilimleme işlemi, oositlerin petri kabına aktarılması, seçilmesi ve yıkanması şeklinde sıralanabilir (Birler ve ark., 2002). Oositlerin kalitesi; hayvanın yaşı, türü, sağlık durumu, yetişkinlik durumu, kaç kez doğum yaptığı ve kesildiği mevsim gibi faktörlerden de etkilenmektedir (Lozano ve ark., 2003).

2.2.1.1. Ovaryum dilimleme

Ovaryumlar mezbahadan alındıktan sonra 30°C civarı bir sıcaklıkta ve %0.9 NaCl ya da fosfat tamponlu çözelti (PBS) içerisinde taşınır. Dilimleme (Slicing) metodu ovaryumların petri kabına aktarılması ve bütün ovaryum yüzeyinin bisturi ile kesilmesini takip eder. Taşınma ve oositlerin toplanması işlemleri 4 saatlik süre içerisinde gerçekleştirilmelidir (Wani ve ark., 2002). Oositler uygun medyum içeren petri kaplarına foliküllere uygulanan basınçlı medyum yıkaması ile aktarılır (Wang ve ark., 2007). Koyunlarda bu yöntem ile oldukça yüksek sayıda oosit elde edildiği bildirilmiştir; ancak elde edilen kalıntıların çokluğu nedeni ile oositlerin mikroskopik olarak bulunmasında zorluklara sebep olmaktadır. Bu nedenle elde edilen oositlerin sayısının azalmasına neden olabilmektedir (Wani ve ark., 2000).

2.2.1.2. Oosit aspirasyonu

Aspirasyon ile oosit elde edilmesi bütün görünen foliküllerin aspire edilmesini gerekli kılar. Tek kullanımlık şırıngaya bağlı bir hipodermik iğne kullanılarak yapılır. Foliküler oositlerin aspirasyonu koyun ve keçi gibi küçük ovaryumlara sahip hayvanlarda oldukça zor olmaktadır. Aspirasyon ile her bir koyun ya da keçi ovaryumundan genellikle kabul edilebilir kalitede ortalama iki kumulus oosit kompleksi (COC) elde edilebilmektedir (Cognie, 1999). Aspire edilmiş foliküler sıvı petri kabına aktarılarak oositlerin mikroskopik olarak aranması yapılır. Sığırlarda 50 mmHg üzeri basınç ile yapılan aspirasyon uygulamasının oosit oranını azalttığı ve iyi kalitede oositlerin elde edilmesini engellediği gözlenmiştir. Basıncın artırılması ise iyi kalitedeki oositlerin oranı düşürürken kumulus hücreleri uzaklaştırılmış oositlerin

oranını arttırmaktadır. (Pfeifer ve ark., 2008). Koyunlarda ve keçilerde karşılaşılan kumulus hücrelerinden uzaklaştırılmış oositlerin elde edilmesi problemi 18-G iğnesinin 1 mm iç çapa sahip silikon tüpe bağlanması ve 25 mmHg altında basınç ile vakum aspirasyonu sayesinde giderilebilmektedir. Ancak koyunlardan oosit elde edilme verimi bu yöntem ile %50-60 civarında olurken, 50 mmHg basınçta %85-90 civarında olmaktadır (Baldassare ve ark., 1996; Cownie ve ark., 2004).

2.2.1.3. Ovum pick-up (OPU) yöntemi ile oosit eldesi

Olgunlaşmamış oositler OPU ya da laparoskopik aspirasyon ile canlı hayvanlardan alınabilir. Bu yöntem ile alınan oositler genellikle kabul edilebilir derecede yüksek kaliteye sahiptir. Genellikle kalıtım takibi yapılabilen hayvanlar kullanılır ve üstün genetik kaliteye sahip örnekler elde edilir. Bu özelliklere sahip hayvanlardan gebe oldukları zamanlarda dahi fötusa ve hayvana herhangi bir zarar verilmeden aspirasyon yapılabilir (Cunningham, 1999). OPU; ultrason kullanılarak ya da kullanılmadan da yapılabilir. Ancak ultrason kullanılmadan yapılan OPU daha yaygın bir metottur. Enfeksiyon riskinin azaltılması ve yaralanmaların önüne geçebilmek amacıyla haftada iki kere her bir hayvandan yaklaşık 4-8 oosit elde etmek mümkündür. Bu nedenle OPU, süperovulasyon yöntemlerine gelecekte iyi bir alternatif olarak düşünülebilir. Yüksek sayıda embriyo oluşması için hormonlar ile süperovulasyonu sağlanan koyunlardan çok sayıda oosit elde edilmesine rağmen yetişkin ve prepubertal koyunlardan da OPU uygulamasının ardından oositlerin toplanması sağlanabilir. Genç hayvanlardan elde edilen embriyo üretimi ile jenerasyon süreleri oldukça kısaltılarak genetik kazanç artırılmış olmaktadır. Yardımcı manipülasyon teknikleri olmadan elde edilecek yavru sayısı ve elde etme süresi oldukça uzun olmaktadır. Bu yöntem ile koyun ve keçi üretimi üzerine önemli katkı sağlanabilmektedir (Morton ve ark., 2008). Koyun ve keçilere genellikle laparoskopik OPU (LOPU) yöntemi uygulanmakta ve küçük ruminantlarda bu yöntem diğer tekniklere göre oldukça verimli olmaktadır. Bu yöntem rektum yolu ile manipüle edilemeyen koyun, keçi gibi küçük ruminantlarda ve buzağılarda çoğunlukla tercih edilen bir metottur (Koeman ve ark., 2003). LOPU ile oosit elde etmek küçük ruminantlarda yaklaşık 20 dakika sürmekte ve hayvan üzerinde oluşabilecek stresi azaltmaktadır. Aynı zamanda ovaryuma hasar vermeden ya da donör hayvanın fertilizasyon verimini azaltmadan birkaç kez tekrarlanabilen bir yöntemdir (Stangl ve

ark., 1999). Keçiler ve koyunlar hormon uygulanmadığı takdirde normalde her bir kırgınlık dönemi sonrası 4-6 oosit üretebilmektedir. Ancak folikül uyarıcı hormon (FSH) uygulanmış koyunlarda oosit verimi 9-16 hücreye kadar çıkabilmektedir. Ovaryumun stimülasyonu sürekli olursa foliküler gelişim yaş ile birlikte azalır ancak bu azalma erken evrelerde OPU uygulanması ile tersine döndürülebilir (Valasi ve ark., 2007). Preovulasyon aşamasında büyük foliküllerden elde edilen oositler olgunlaşmış formda olabilir ancak OPU ile aspire edilen oositlerin büyük çoğunluğu genellikle daha küçük ovaryum foliküllerinden elde edilmektedir. Bu oositler *in vitro* ortamda 24 saatlik bir olgunlaşma periyoduna ihtiyaç duyarlar. Bu nedenle *in vitro* fertilizasyon öncesi oositlerin olgunlaştırılması büyük önem taşımaktadır (Elder & Dale, 2000). Bir diğer çalışmadan elde edilen sonuçlara göre ovaryum başına aspirasyon ile 8,1, dilimleme ile 6,3 adet oosit elde edildiği bildirilmiştir. Bunlardan dilimleme ile elde edilen oositlerin 1,7'sinin, aspirasyon ile alınanların 0,87'sinin olgunlaştırma için kabul edilebilir kalitede oldukları gözlenmiştir (Shirazi ve ark., 2005). Keçilerde ise dilimleme ile kıyaslandığında aspirasyon ile daha fazla sayıda oosit elde edilmekte ancak daha düşük kalitede olmaktadır (Pawshé ve ark., 1994). Bu nedenle koyunlardan oosit eldesinde dilimleme yöntemi aspirasyon ile kıyaslandığında daha uygun bir metot olarak görülmektedir.

2.2.2. Oosit kalitesini etkileyen faktörler

Oosit elde etme yöntemlerinin ortak amacı ovaryum başına elde edilebilecek iyi kalitedeki oosit sayısını maksimum düzeyde tutmaktır. Alınan oositler embriyo üretiminde kullanılacak kalitede ve gelişim yeteneğini azaltmayacak şekilde olmalıdır (Wani ve ark., 2000; Shirazi ve ark., 2005; Morton ve ark., 2008). Doğal oluşumlarında oosit kalitesi; oositlerin olgunlaşma yetenekleri, fertilizasyon kapasiteleri ve normal yavru verebilmeleri gibi kriterler ile belirlenmektedir (Duranthon & Renard, 2001; Hussein ve ark., 2006). Oositin kalitesi aynı zamanda oositin foliküler çevresi, hayvanın yaşı, foliküler gelişim evresi ve oosit olgunlaşması için kullanılan medyumun içeriği ile de alakalıdır (Camargo ve ark., 2006; Keskin-tepe ve ark., 1994).

2.2.2.1. Donör yaşı

Elde edilecek olan oositlerin gelişimsel yeteneklerinin belirlenmesinde donör koyunların yaşı büyük önem taşır. Prepubertal koyunlardan oosit alınması 4 hafta gibi bir sürede başlayabilir. Foliküler gelişimin başlaması 4-6 haftalık koyunlarda

gözlenmiştir (Armstrong ve ark., 1997). Keçilerde ise elde edilen oosit sayısı yetişkinler ile kıyaslandığında prepubertal hayvanlarda daha fazladır. Bunun olası sebebi genç hayvanlarda foliküler uyarımın yetişkinlerden daha fazla olması ile açıklanabilir. Koyunlarda foliküler gelişimde ovaryum folikül atrezisinin olmaması nedeni ile maksimum sayıdaki antral foliküle 4-8 haftalıkken erişilir. Bu sayı puberteye ulaşana kadar günden güne azalarak belirli miktara eriştiğinde sabitlenir. Koyunlarda süperovulasyonun en etkili olduğu zaman ovaryum yüzeyindeki folikül sayısının maksimuma ulaştığı dönemdir (Koeman ve ark., 2003; Chen ve ark., 2008). Ancak prepubertal hayvanlardan elde edilen oositler yetişkin koyunlar ile karşılaştırıldığında düşük gelişim kabiliyeti göstermektedir (Khatir ve ark., 1996). Bu yönde yapılan bir araştırmada *in vitro* koşullarda prepubertal koyunlardan elde edilen oositlerden %29 oranında, yetişkin koyunlardan ise %39,3 oranında blastosist yüzdesine ulaşılmıştır (Morton ve ark. 2005). Bu doğrultuda *in vivo* ortamda döllenmiş oositler prepubertal ve yetişkin koyunlardan alınarak uygun bir yetişkin koyuna transfer edilmiştir. Prepubertal koyunlardan transfer edilen zigotlardan %33, yetişkinlerden ise %73 oranında canlı yavru elde edilmiştir (Armstrong, 2001). Keçilerde ise prepubertal oositlerden %19, yetişkinlerden ise %65 oranında blastosist elde edildiği bildirilmiştir (Baldassarre ve ark., 2002). Ancak keçilerle yapılan başka bir çalışmada prepubertal ve yetişkin keçilerden elde edilen oositlerin gelişim kapasitelerinin benzer oranlarda oldukları gözlenmiştir (Koeman ve ark., 2003). Gelişimsel kapasitenin azalmasının yanında koyunlarda özellikle IVF sonrasında olgunlaşmamış oositlerde polispermi oluşumu meydana gelmektedir. Bunun sebebi olarak ise korteks etrafındaki kortikal granüllerin düzgün dağılmamasından kaynaklanabileceği öne sürülmektedir (Cognie ve ark., 2003). Polispermi oluşumu düşünülmendiğinde, prepubertal oositlerden blastosist oluşumu yetişkinlerle kıyaslandığında bir gün gecikme gösterme eğiliminde olmaktadır (O'Brien ve ark., 1997).

2.2.2.2. Ovaryum folikül boyutu

Folikül gelişim evreleri ve oosit büyümesi birbirini takip eden olaylardır. Ovulasyon sırasında elde edilen oosit kalitesinde ve embriyo kalitesinde folikül büyüklüğü önemli bir etkiye sahiptir (Sirard ve ark., 2006). Folikül içerisinde oosit gelişimi genellikle yavaş işleyen bir aşamadır ve oositler theca ve granuloza hücreleri ile etkileşime girerek mayotik olgunlaşma için hazır duruma ulaşmak zorundadır

(Camago ve ark., 2006). Gelişimsel aşamalarda meydana gelen ve ovulasyondan önce gerçekleşen bu olaya oosit kapasitasyonu adı verilir (Hyttel ve ark., 1997). Kapasitasyon sırasında oositler olgunlaşma evreleri geçirir (Elder & Dale, 2000). Bu sebeple folikül boyutu; oosit kalitesine mRNA ya da protein sağlayarak etki eder (Krisher, 2004). Bu sebeple ovaryumdan elde edilen olgunlaşmamış oositlerde gelişim kabiliyeti yönünden eksiklikler görülmektedir (Kane, 2003). Koyun ve keçilerde oosit gelişim yeteneği genellikle kumulüs ekspansiyonu ile ilişkili olup folikül boyutu ile artmakta ve artan granuloza atrezisi ile azalmaktadır. Koyunlarda genellikle 2-6 mm boyutları arasındaki foliküller, gelişimini tamamlamış oositler içermekte ve *in vitro* nükleer maturasyon için iyi bir yeteneğe sahiptir.

6 mm'den büyük boyutlardaki sığır foliküllerinden elde edilen oositlerden blastosist üretimi 2-6 mm boyutlarındakiler ile kıyaslandığında oldukça yüksek orandadır ve 2 mm'den küçük olan foliküller fertilize oldukları halde 8 hücre düzeyinin ötesine geçme yetenekleri yoktur (Pavlok ve ark., 1992). Keçilerde bu oran 2-6 mm folikül boyutundakilerde % 6 blastosist, 3-5 mm'de %12 ve 5 mm'den büyüklerde %26 blastosist düzeyine ulaşmaktadır (Crozet ve ark., 2000). Koyunlarda yapılan bir çalışmada ise prepubertal koyun oositlerinin %13 seviyesinde blastosist evresine ulaştıkları sonucuna ulaşılmıştır (Catala ve ark., 2011). Folikül boyutu ile *in vitro* maturasyon sonrası Metafaz II'ye ulaşan oositler arasında pozitif bir korelasyon bulunmaktadır (Wittmaack ve ark., 1994; Ectors ve ark., 2002). Bu sebeple *in vitro* embriyo üretiminde gelişme elde edebilmek için en ideal seçenek en yüksek kalitedeki oositlerin seçilmesi olmalıdır. Oosit boyutları ile blastosist eldesi arasında pozitif yönde bir orantı olması nedeniyle *in vitro* çalışmalarda oosit boyutları da önemli bir kriter oluşturmaktadır. Sığırlarda 100 µm boyutundaki oositler %30, 110 µm boyutundakiler ise %60 oranında blastosist oluşumu sağlamıştır (Hyttel ve ark., 1997). Benzer bir çalışmada ise mandalarda oosit boyutları 126 µm altındakilerde blastosist oluşumu gözlenmediği, 127-144 µm arası % 1, 145-162 µm arası %7.3 ve 163 µm'den büyük oositlerde %10.4 verimde blastosist elde edildiği gözlenmiştir (Raghu ve ark., 2002). Keçilerde ise bu oran 125 µm'den küçük oositlerde %10 iken, daha büyük boyutlardaki oositlerde %20 olarak bulunmuştur. Bu doğrultuda küçük foliküllerden (3 mm'den küçük) küçük oositlerin elde edildiği ve bunların da *in vitro* ortamda çok az gelişimsel kabiliyete sahip oldukları (Hammami ve ark., 2013) ve bunun da sebebinin foliküler büyüme fazının son evresinde meydana gelen maturasyon öncesi biyokimyasal ve bazı

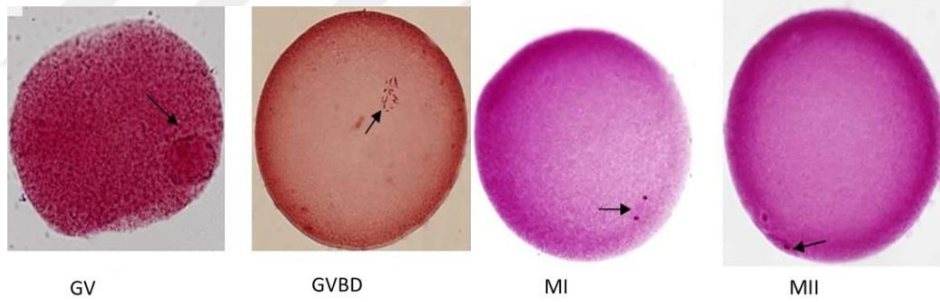
gen ekspresyon aktivitelerinden yoksun olabileceği öne sürülmüştür (Mahoete, 2010). Ayrıca folikül boyutunun yanı sıra embriyonik gelişimde ovaryum yüzeyinde yer alan folikül sayıları da büyük öneme sahiptir. Yapılan bir çalışmada koyunlarda ovaryum yüzeylerinde 8 ya da daha fazla folikül bulunanlarda %94 bölünme ve %52,4 blastosist oluşumu, 4 ya da daha az olanlarda ise %57 bölünme ve %30,2 blastosist oluşumu bildirilmiştir (Mossa ve ark., 2000).

2.2.3. Oositlerin *in vitro* matürasyonu

Prepubertal koyun oositlerinin *in vitro* matürasyonu yetişkin koyunlar ile kıyaslandığında oldukça düşük verimde olmaktadır (Paramio ve ark., 2010). Bu konu üzerinde yapılan bir çalışmada mezbahadan elde edilen 2 aylık keçi oositlerinin %10 blastosist düzeyine kadar ulaştığını ve bunun gelişim kabiliyetlerinin düşük olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Izquierdo ve ark., 2002). Bu da prepubertal ve yetişkin hayvanlarda çekirdek ve sitoplazma matürasyonunun moleküler basamaklarının başlatılması için belirli bir folikül büyüklüğüne ulaşmanın oosit gelişimi üzerine etkili olabileceğini göstermektedir (Cognie ve ark., 2004; Wen ve ark., 2006). Memeli oositleri kompakt yapıda kumulus hücreleri ile çevrelenmiş halde bulunur ve bu yapıya kumulus-oosit kompleksi (COC) adı verilir. Maturasyon medyumunda yer alan kumulus hücreleri gonadotropinlerin varlığında sitoplazmik maturasyona sebep olan çeşitli maddeler salgılamaktadır (Cha ve ark., 1998). Domuzlarda ve sığırlarda erkek pronükleus oluşumu, oosit maturasyonu sırasında kumulus hücrelerinin varlığına bağlıdır (Mattioli ve ark., 1998; Chian ve ark., 1994). Sitoplazmik maturasyonunu tamamlamamış bir oosit normal embriyonik gelişim evrelerini gösterememektedir (Krisher, 2004). Sitoplazmik tamamlanma büyük öneme sahip olduğu için herhangi bir eksiklikte sperm girişi ve dekondensasyonunda hatalar, pronükleus oluşumunun gerçekleşmemesi, zona pelusidanın polispermi engelini oluşturamaması, erken bölünmenin oluşmasında hatalar, maternal gen ekspresyonundan embriyonik gen ekspresyonuna geçişte hatalar ve sonuç olarak preimplantasyon ve post implantasyon aşamalarında embriyonik gelişimde hataların oluşması görülmektedir (Armstrong, 2001). Prepubertal koyunlarda *in vitro* maturasyon; FSH, lüteinleştirici hormon (LH), estradiol (E2), equine koryonik gonadotropin (eCG) gibi hormonların ve fetal sığır serum (FCS) eklenmesi ile geliştirilmiştir (Congnie ve ark., 2004). Oosit maturasyonu

için kullanılan rutin sistemlerden bir tanesi de TCM 199'dur ve FSH, LH ve E2 eklenmesi ile desteklenmiştir (Catala ve ark., 2012). Maturasyon medyumlarında serum kullanılmasının yanı sıra sığır serum albümin (BSA), büyüme hormonları (IGF-I) ve antioksidanlar (Pirüvik asit ve L-glutamin vb.) gibi eklemelerle medyumlar modifiye edilerek oositin sitoplazmik ve nükleus bölünmelerini tamamlaması desteklenmiştir.

Oositler ovaryumlardan primordial foliküllerin salınmasından önce mayotik bölünmenin erken evrelerinde gelişimleri durdurulmuş halde bulunurlar. Puberte ile birlikte her bir östrus döngüsünde hipofiz gonadotropin hormonu etkisi ile ovulasyon öncesi mayoz I'in tamamlanması stimüle edilir. Erken oositler immature germinal vezikül (GV) ve germinal vezikül yıkılması (GVBD) evreleri olarak sınıflandırılırlar (Şekil 2-1). GVBD, mayoz bölünmenin devam ettirilmesini ifade eder ve çekirdek maturasyonunun sağlanması ile telofaz I evresine ulaşılır. İlk polar cisim (PB) oluşması ise ilk mayotik döngünün tamamlandığını gösterir ve bu evre metafaz II olarak adlandırılır).



Şekil 2-1: GV, GVBD, MI ve MII evreleri -Hemin ve ark.(2015)'ten.

IVM ortamında kullanılan medyumlar

Birçok hayvan türü için IVM teknikleri geliştirilmiş ve günümüzde IVM işlemlerinde kullanılan yüksek maliyetli işlemlerin ya da malzemelerin çıkartılarak yerine daha ucuz ve kimyasal içeriği bilinen maddeler ve teknikler kullanılarak bu teknolojinin maliyetini azaltma yoluna gidilmektedir (Gupta ve ark., 2005). Genel olarak oosit IVM medyumları için kullanılan maddeler kompleks formülasyonlardan oluşmakta ve bunlar ilk olarak somatik hücreler ve doku kültürleri için dizayn edilmiştir. Bu nedenle oosit IVM medyumlarında doku kültür medyumuna (TCM 199) ve minimal esansiyel medyum (MEM) kullanılmaktadır. Medyum formülasyonları

normalde mature olan COC'ların kompleks ve dinamik ihtiyaçları için değil somatik hücrelerin metabolik ihtiyaçları özellikle de hücre hatlarının uzun süreli ihtiyaçları için dizayn edilmiştir. Bu nedenle özellikle oosit IVM için gerekli IVM spesifik medyum formülasyonlarına büyük ihtiyaç vardır. Geçtiğimiz son yirmi yılda embriyo kültür medyumlarının geliştirilmesinde majör anyon ve katyon oranlarının değiştirilmesi, üreme sistemi sıvılarındaki metabolik substratların eklenmesi ve pre-implante embriyoların metabolik substratlarının eklenmesi yoluna gidilmiştir. Bu tarz bir yaklaşım yeni IVM medyumlarının dizaynı için günümüzde tercih edilen bir yöntemdir. IVM'de kullanılan foliküler sıvı kompozisyonları değişmekle birlikte özellikle en büyük enerji kaynağı olan glikoz konsantrasyonları arasında farklar bulunmaktadır (Gilchrist ve Thompson, 2007). IVM'de oosit ve onu çevreleyen kumulus hücreleri fonksiyonel bir birim oluştururlar. Bu nedenle *in vitro* maturasyon kültür medyumunu geliştirilmesinde COC'ların besin ihtiyaçlarının düşünülmesi önem taşır (Sutton ve ark., 2003). Memeli IVM'lerinin çoğunda bazal medyum serum ve hormonlarla desteklenir. Protein katkılarının ve FSH, LH gibi hormonların IVM medyumunu için seçilmesi IVF ve embriyonik gelişim açısından da önemlidir (Pawsh ve ark., 1996; Wang ve ark., 1998). Fertilizasyonun arttırılması, erken embriyonik gelişim ve kumulus ekspansiyonu için *in vitro* maturasyon protokollerinde çoğunlukla FSH kullanılır. Doğal oosit maturasyonunda FSH ve LH'in gerekli olmadığı bilinmesine rağmen genellikle bu hormonların kumuluslar üzerine etki ederek oositin sitoplazmik maturasyonunu olumlu yönde etkilediğine inanılır. Ancak gonadotropinlerin yararlı etkilerinin kumulus hücrelerinin metabolik aktivitelerinde değişikliğe neden olup olmadıkları bilinmemektedir (Izadyar ve ark., 1998; Sutton ve ark., 2003; Cecconi ve ark., 2008).

Bununla ilgili yapılan bazı çalışmalarda FSH ve LH içeren medyum ile %70,1 maturasyon oranı elde edilirken insan koryonik hormon (hCG) içeren ortamda bu oranın % 50,3 olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca keçilerde FSH içeren medyum ile % 19,4-22,6 arası, FSH içermeyen ortamda ise % 12 oranında blastosist elde edilmiştir (Wang ve ark., 1998; Wang ve ark., 2007). FSH genellikle folikülogenezde ve *in vitro* oosit maturasyonlarında farklı gelişimsel etkilere sahiptir. Aynı zamanda foliküler büyümeyi sağlar ve foliküler gelişimin son evrelerinde LH reseptörlerinin aktivitesi için hayati önem taşır (Sirard ve ark., 2007).

2.2.3.1. Kullanılan albumin ve serum çeşitleri

In vitro kültür medyumlarında kullanılan diğer esansiyel bileşenler ise albumin ve serumlardır (Ocana Quero ve ark., 1994). Albumin memeli üreme kanalında bulunan en yaygın protein olması nedeniyle medyuma katılmalıdır. Serum ise oosite besin sağlamanın yanı sıra oositleri çevreleyen hücrelere de gerekli beslenme ortamını sunar. Serum ayrıca oositin foliküler çevreden ayrıldığı zona pelusida katmanının zayıflamasını engeller (Thompson, 2000; Wani, 2002). *In vitro* maturasyon medyumuna serum katılması maturasyonun indüklenmesinden de kısmen sorumludur. Bu nedenle örneğin koyunlarda at serumu ile desteklenen medyumda %69-72 oranında maturasyon oranı elde edilirken eklenmediği durumda %50 oranında sonuca ulaşılmıştır. Aynı zamanda bu sonuçlar keçilerle yapılan çalışmalarda da geçerlidir: Östrus keçi serumu ile %61-78, serumsuz ortamda %28 oranında maturasyon elde edilmiştir (Tajik ve Esfandabadi, 2003; Kharche ve ark., 2006; Motlagh ve ark., 2008).

Oosit maturasyonu amacıyla kullanılan farklı çeşitlerde serumlar mevcuttur. Bunlar; östrus sığır serumu, fetal sığır serumu (FBS), homolog ve heterolog östrus serumlarıdır. Koyun ve keçi oosit maturasyon medyumlarında yaygın olarak FBS kullanılır. FBS içeren ve içermeyen medyumlarla yapılan çalışmalarla elde edilen maturasyon oranlarında önemli derecede farklar ortaya çıkmıştır. FBS eklenmesi ile %79-84 oranında, eklenmediği durumda ise %4 oranında oositin metafaz II aşamasına ulaştığı görülmüştür. Östrus koyun serumunun (ESS) da koyun oosit IVM ortamlarında maturasyonu ve mature olmamış prepubertal koyun oositlerinde embriyonik gelişimi geliştirdiği belirtilmiştir. ESS ile FBS kıyaslandığında FBS'nin ESS'den çok az bir oranla daha az maturasyon oranı verdiği görülmüştür (%70'e %82 oranlarında) (Walker ve ark., 1996; Tibary ve ark., 2005). Maturasyon aşamalarında problemlerle karşılaşıldığında fertilizasyon oranı ve preimplantasyon embriyolarının verim kalitesini de etkilemektedir. Maturasyon medyumuna serum uygulama süresinin bölünme hızı üzerine çok az etkisi olmasına rağmen blastosist gelişimi üzerinde oldukça önemli etkiye sahiptir (Nedambale, 1999).

2.2.4. *In vitro* fertilizasyon

Prepubertal hayvanlardan elde edilen oositlerin *in vitro* fertilizasyonu jenerasyon sürelerinin kısaltılması ve sınırlı sayıdaki üstün genetik özelliklere sahip değerli hayvanların yaygınlaştırılmasını sağlayan önemli bir yöntemdir (Baldassarre ve ark.,

2003). IVF medyumunu genellikle spermatozoa kapasitasyonunu sağlamak ve uterus kanalının biyokimyasal bileşenlerinin benzer şekilde yapılması ile formüle edilir. Ancak yine de sürekli düzenlenen ovidukt ve uterus dinamik yapısının fizyolojik şartlarına ulaşmak oldukça zor olmaktadır (De La Torre - Sanchez ve ark., 2006). Oositlerin ve spermatozoonların füzyonu ile sonuçlanan fertilizasyon olayı birkaç evreden oluşmaktadır: (i) spermatozoonun ve oositin dış membranlarının füzyonu, (ii) spermatozoonun zona pelusidaya penetrasyonu, (iii) pronükleus füzyonu ve (iv) kromozomların dizilmesi gibi aşamalarıdır. Olgunlaştırılmış oositlerin *in vitro* fertilizasyonları genellikle 24 saatlik bir inkübasyon süresi ile IVF medyumunda yapılmaktadır. Oosite penetrasyon öncesi spermatozoon bir kapasitasyona maruz kalmak zorundadır. Spermatozoa dışı üreme kanalına ulaşmaya kadar fertilizasyon için gerekli olan tam kapasitasyonunu geçirmez. Zona pelusidaya penetre olmadan ve vitellusa girmeden önce önemli fizyolojik değişiklikler geçirir ve bu değişikliklere spermatozoa kapasitasyonu adı verilir. Penetrasyon sonrası zona pelusidada polispermiyi engelleyen mekanizma aktive olmaktadır (Wright ve ark., 1981). IVF medyumlarının çoğunda sperm kapasitasyonunu indükleyen ajan olarak heparin kullanılmaktadır. Heparin spermatozoona bağlanarak hücre içi ortamda bir dizi değişikliğe neden olarak Ca^{+2} alınımını sağlar ve hücre içi serbest Ca^{+2} miktarını ve pH'ı artırır. Bir diğer heparin indükleyici kapasitasyonun sonucu da spermatozoonda protein fosforilasyonlarının artmasıdır (Lane ve ark., 1999). Koyunlarda heparin kullanımı fertilizasyon oranını arttırmakta ancak artan konsantrasyonları bölünme (cleavage) oranlarını düşürerek oluşacak blastosist yüzdesini azaltmaktadır. Yapılan bir çalışmada heparin kullanılmayan ortamda % 86,7; 5 IU heparin ile %85,8 ve 10 IU heparin ile %75,5 oranlarında bölünme elde edilmiştir. Artan konsantrasyondaki heparinin olumsuz etkisi bu tür çalışmalarla da desteklenmiştir (Wani, 2002; Li ve ark., 2006; Cox ve Alfaro, 2007). Koç spermatozoa kapasitasyonu ve koyun oositlerinin fertilizasyonunda heparin kullanımı ile %80 fertilizasyon oranına ulaşıldığı ve %15 blastosist eldesi ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Slavik ve ark., 1992). Kafein ve penisilamin, hypotaurin ve epinefrin karışımları da uzun süreli spermatozoa hareketlerini sağlayan diğer maddelerdir. *In vitro* kapasitasyonu arttıran bir diğer madde olan BSA'nın heparin ile birlikte kullanıldığı çalışmalar oldukça az sayıdadır. Sığırlarda heparin ve kafein kullanımının kapasitasyonu arttırırken koyunlarda kafein kullanımı taze spermde kapasitasyonun azalmasına neden olur (Izquierdo et al., 1998; Wani, 2002). Ayrıca yine

koyunlarda spermatozoa kapasitasyonunda östrus koyun serumu (ESS) kullanımı ile fertilizasyon oranının % 85'e ve blastosist oranının % 56'ya çıktığı gözlenmiştir (Walker ve ark., 1994). Kapasitasyonda serum kullanımı sığırlarda (Marei ve ark., 2013), koyunlarda (Catala ve ark., 2012) ve keçilerde (Romaguera ve ark., 2011) yaygın olarak kullanılmaktadır. Canlı ve hareketli spermatozoa hücrelerinin seçilmesi için swim-up, percoll gradyanı, swim-down ya da glasswool filtrasyonu gibi yöntemler kullanılmasına karşın çoğunlukla swim-up (Shirazi ve ark., 2012) ya da percoll gradyanı (Rho ve ark., 2001) gibi yöntemler hem dondurulmuş hem de taze spermatozoa için kullanılmaktadır. Kısaca; %45 ve %90 percoll gradyanı içeren tüpe sperma koyulur ve 1500 g hızında oda sıcaklığında 10 dakika santrifüj edilerek canlı spermatozoalar %90'lık alt kısımdan alınarak ve mililitrede 1-2 milyon spermatozoa olacak şekilde seyreltilerek fertilizasyonda kullanılır (Rho ve ark., 2001). Swim-up yönteminde sperma, modifiye sentetik ovidukt sıvısı (SOF) ile 45-60 dakika arasında inkübe edilir ve süpernatant kısmındaki hareketli hücreler alınarak 5-10 dakika santrifüj edilir. Son olarak tüpün alt kısmındaki pelet istenilen oranda seyreltilerek IVF çalışmalarında kullanılır (Shirazi ve ark., 2010). Spermatozoa ve mature edilmiş oositler birlikte inkübe edilir ve 20 saat sonra zigot oluşumları kontrol edilerek IVF oranlarına bakılır. Bu zigotlar: normal fertilize oositler ya da 2 pronükleuslu zigotlar (2PN), polispermik, eşzamansız ve sperm başını da içeren çekirdek bölünmesinin MII aşamasındaki zigotlar olarak sınıflandırılır. Koyunlarda ESS kullanılarak elde edilen bölünme oranları normal olarak %50-70 arasında ve %30-40 blastosist eldesi ile sonuçlanmaktadır. Bu oranlar farklı deney koşulları ile değişebilmektedir (Walker ve ark., 1994). Catala ve arkadaşlarının prepubertal koyunlarda yapmış oldukları bir çalışmada ticari bir ürün olan Ovipure density gradient ile elde ettikleri hareketli spermatozoalar (1×10^6 spermatozoa/ml), 50 µl SOF medyum ve %10 ESS ile %79 fertilizasyon oranı ve %21 blastosist elde edilmiştir (2011).

2.2.4.1. IVF'de kullanılan spermalar

Kullanılan spermaya bağlı olarak fertilizasyon oranları değişmektedir. IVF amacıyla kullanılacak spermalar taze, dondurulmuş ya da cinsiyeti belirlenmiş olabilmektedir. Sperma kalitesi seyreltme ya da kriyoprezervasyon işlemleri ile kayba uğramaktadır. Taze olarak elde edilen spermadan elde edilen spermatozoa hareketliliğinin seyreltme işlemi ile azaldığı gözlenmiştir (Sugulle ve ark., 2006).

Dondurulmuş spermalarda dondur-çöz işlemi ve yaşayan spermatozoa popülasyonunda fonksiyon bozukluklarına neden olduğu için fertilizasyon yeteneklerinde kayıplar yaşanmaktadır. Taze spermanın dondurulup çözülmüş sperma ile kıyaslandığında da daha fazla oosit bağlama kapasitesine sahip olduğu görülmüştür (Watson, 2000; Niu ve ark., 2006). IVF çalışmalarında ve embriyo transferlerinde cinsiyeti belirlenmiş sperma kullanılarak sığır, domuz ve koyun gibi çiftlik hayvanlarından yavrular elde edilebilmektedir (Catt ve ark., 1996; Fry ve ark., 2004). Ancak birçok çalışmada cinsiyet ayrımı yapılan spermalardan elde edilen gebelik oranlarının cinsiyet ayrımı yapılmayanlarla kıyaslandığında daha düşük derecede olduğu gösterilmiştir (Hollinshead ve ark., 2002; Seidel & Garner, 2002; Wheeler ve ark., 2006). Gebelik elde edilmesine rağmen bu spermaların kullanımı ile domuzlarda düşük embriyonik gelişim düzeyi elde edilmektedir (Johnson ve ark., 2000). Ancak diğer yandan koyunlarda cinsiyeti belirlenmiş sperma ile uterusun oldukça düşük düzeyde tohumlanması ile cinsiyeti ayrılmamış sperma ile kıyaslandığında daha yüksek fertilizasyon oranı elde edilmektedir. Sperma uterusu laparoskopik tohumlama ile fertilizasyon bölgesine oldukça yakın bir biçimde yerleştirilebilmekte ve bu da cinsiyeti belirlenmiş sperma ile oldukça yüksek verim alınmasına neden olmaktadır (Salamon & Maxwell, 2000; Beilby ve ark., 2009). Bu çeşit spermada kullanılan DNA boyaları fertilitede ve embriyonik gelişimde sitotoksik etkiye sahiptir. Diğer spermalar ile kıyaslandığında sığırlardan elde edilen blastosist gelişim yüzdesi daha az olmaktadır (Cran & Johnson, 1996). Koyunlarda ise bölünme oranlarında (%66,7 ve %76,8) istatistiksel olarak önemli bir farkın olmadığı bildirilmiştir (Hollinshead ve ark., 2004).

2.2.4.2. IVF’de kullanılan serum ve albuminler

Oosit kültür medyumlarında çoğunlukla ısı ile inaktive edilmiş östrus serum kullanılmaktadır. Bu medyumlar koyunlarda ve keçilerde spermaların kapasitasyonunu da sağlarlar. Kullanılan sperma çeşidine göre serumların konsantrasyonları da değişmektedir. Örneğin; koyun ve keçilerde taze spermalara %20, dondurulmuş spermalara ise %2 oranında serum kullanılır (Cognie ve ark., 2003). IVF medyumuna serum ilavesi bölünme oranını arttırmakla birlikte yine serum konsantrasyonu burada da önem taşımaktadır. Fertilizasyon medyumuna serum eklenmediğinde bölünme gözlenmezken %20 serum ilavesinde %72,6-78 arası bölünmeye ulaşılmıştır. %10 ya da

%5 arasında kullanıldığında ise daha az oranda bölünme elde edilmektedir (Cognie ve ark., 2003; Li ve ark.,2006). Albumin eklenmesi ile *in vitro* üretilen embriyo protein içeriklerini erken bölünme safhalarında azalmaktadır. Kompaksiyon ve blastulasyon sırasında ise protein içeriği artmaktadır. Bu da erken bölünme evrelerinde gerçekleşen protein degradasyon hızının protein sentez hızından fazla olduğunu göstermektedir (Thompson, 2000). Sığır embriyolarında serum eklenmesi ilk hücre yarıklanmalarını inhibe ederken, blastosist gelişimini desteklemektedir (Van Langendonck ve ark., 1997) Koyunlar da ise *in vitro* kültüre serum eklenmesi daha büyük yavruların elde edilmesine neden olmuştur (Totey ve ark., 1993; Thompson ve ark., 1995).

2.2.4.3. Sperma alma yöntemleri

Sperma toplanması türler arasında farklılık gösteren yöntemlerle yapılmaktadır. Koyun ve keçilerde bu yöntem genellikle yapay vajina (AV) ve elektro-ejakülatör kullanarak elektro stimülasyon ile yapılmaktadır. Bunlara alternatif olarak Wulster-Radcliffe grubunun geliştirdiği vajinal toplama tüpleri (VCV) de kullanılmaktadır (2001). AV yönteminden farklı olarak VCV tekniğinde koyunların eğitilmesine ihtiyaç duyulmamakta ve her bir bireyde farklılık gösteren oldukça uzun olan süre kaybı da yaşanmamaktadır (Ortiz-de-Montellano ve ark., 2007). VCV yönteminde 9 cm uzunluğunda bir cam tüp 10° açı ile çiftleşmeden 10 dakika önce vajinaya yerleştirilir. Bir kemer yardımı ile de tüpün çiftleşme sırasında yer değiştirmesi önlenmiş olur. AV yöntemi ile elde edilen ejakülat doğal ve elektro-ejakülasyon (EE) yönteminden daha yüksek konsantrasyonda olur (Marco-Jimenez ve ark., 2008). Ancak AV yönteminde koçlarda yeterli derecede libido gerekli ve dışıye çıkabilmesi için alıştırılması gereklidir. EE'de bir güç kaynağı, aktarıcı ve rektal problar kullanılmaktadır. Probların boyutu hayvan türüne göre değişmektedir. EE yöntemi aynı zamanda fiziksel kabiliyeti olmayan erkek bireylerden sperma almaya da imkân sağlamaktadır. Bu nedenle AV'ye alternatif bir metot olarak kullanılmaktadır (Guiliano ve ark., 2008). Örneğin zor şartlarda yetiştirilmiş ve AV yöntemini reddeden keçilerden sperma alınmasında EE uygun bir alternatiftir (Ortiz-de-Montellano ve ark., 2007). Boğalarda ise EE; transrektal masajdan oldukça üstün bir yöntemdir. Transrektal masajın cevap vermediği durumlar da dahil bütün boğalarda sonuç vermektedir. EE ile elde edilen spermada oldukça yüksek spermatozoa konsantrasyonu (724×10^6 spermatozoa/ml), hareketlilik (%60) ve canlı spermatozoa (%78) elde edilirken bu oranlar transrektal masaj

yönteminde daha az olmaktadır (sırasıyla 320×10^6 spermatozoa/ml, %50 ve %67) (Palmer ve ark., 2005). Koyunlarda EE yöntemi ile hızlı ve yüksek hacimde sperma elde edilmesine rağmen spermatozoa konsantrasyonu düşük olmakta ve hayvana stres yaşatmaktadır (Marco-Jimenez ve ark., 2005).

2.2.4.4. Spermanın işlenmesi

Sperma toplanır toplanmaz öncelikle hacim ve renk gibi faktörler açısından makroskopik olarak değerlendirilir daha sonra mikroskopik değerlendirme ile spermatozoa motilitesi, sperma pH değeri ve konsantrasyonu hesaplanır. Laboratuarlarda kullanılan en yaygın kullanımlardan bir tanesi spermadaki hareketli spermatozoa yüzdesinin görsel olarak değerlendirilmesidir. Tek bir açıdan spermatozoa özelliğine bakılarak değerlendirilmesine rağmen oldukça kullanışlı ve değerlendirmede sübjektif bir taraf bulunmaktadır (Moce ve Graham, 2008).

Bütün hayvan türlerinde sperma vücut sıcaklığında elde edilir ve sıcak tutulması ve soğuk şokuna maruz bırakılmaması gerekmektedir. Dondurma işlemine tabi tutulsun ya da tutulmasın spermalar 5°C sıcaklıkta tutularak diğer işlemler gerçekleştirilir (Hafez, 1987). Spermanın soğutulması dikkatli bir şekilde yapılmalı ve $30^{\circ}\text{C} - 0^{\circ}\text{C}$ arası hızlı soğutma işlemleri spermatozoayı ölümcül strese sokmaktadır. Donma noktası altında gerçekleştirilen soğutma işlemlerinde ortamdaki su kristalize olmakta ve buz formuna geçmektedir. Geri kalan sıvı kısmı çözücü olarak işlevini sürdürmekte ve solüsyonun ozmotik kuvveti artmaktadır (Watson, 2000). Kalan çözeltideki ozmatik basınç ve buz formunda kristalize olan suyun oranı sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir. Sıcaklık düşük olduğunda donmamış fraksiyon oranı az, ortamın ozmotik basıncı yüksek olmaktadır. Bu nedenle dondurma hızı mümkün olduğunca hızlı yapılarak soğuğa maruz kalma süresi minimize edilir ve hücrelerin hayatta kalma oranları optimal seviyede tutulur (Watson, 2000). Dakikada $15-60^{\circ}\text{C}$ hızında bir dondurma işlemi uygulandığında kabul edilebilir düzeyde yaşama kabiliyeti olan hücre oranları elde edilebilmektedir. Ancak diğer yandan da hücre için ölümcül olan hücre içi kristalizasyonun önüne geçebilmek için soğutma hızının suyun ozmoz ile hücre dışına çıkmasına izin verecek derecede de az olması gerekmektedir (Mazur, 1984). Soğutma hızının yavaş olduğu durumlarda koyunlarda spermatozoonun orta ve kuyruk kısımlarında hasar meydana gelmektedir (Kumar ve ark., 2003).

2.2.5. *In vitro* kültür

Embriyo kültürlerinde yaygın olarak SOF medyumunu kullanılmakta ve bu kültürler; amino asitler, BSA ve ısıyla inaktive edilmiş serum ile desteklenmektedir (Holm ve ark., 1999). %5-10 oranında FCS ile desteklenen SOF medyumunu, 2-3 gün inseminasyon sonrası yüksek canlılık için kullanılmaktadır. IVF işleminin 20 saat sonrasında oluşan zigotlar üç defa *in vitro* kültür (IVC) medyumunu ile yıkanarak IVC medyumuna aktarılır ve blastosist, genişlemiş (expanded) blastosist (EB) ve zonasından çıkmış (hatched) blastosist (HB) gibi fertilizasyon sonrası embriyo gelişim aşamaları gözlemlenir. Sığırlarda sentetik ovidukt sıvısı (SOF) medyumuna eklenmiş serum ile %40, eklenmemiş durumda ise %20 oranında blastosist elde edildiği görülmüştür (Thompson ve ark., 1998). Prepubertal koyunlarda ise tüm aşamalarda (IVM, IVF ve IVC) serum kullanımı ile embriyo üretiminde %13 oranında blastosist elde edilmiştir (Catala ve ark., 2012). Bir başka çalışmada ise prepubertal koyunlardan %16, yetişkin koyunlardan ise %34 oranında blastosist elde edildiği bildirilmiştir (O'Brien ve ark., 1997). Literatürde bildirilmiş bu sonuçlar prepubertal koyunlarda *in vitro* embriyo üretim tekniklerinin oosit gelişiminin blastosist evresine gelmesini destekleyecek kadar yeterli olmadığını göstermektedir.

2.2.5.1. *In vitro* kültürde kullanılan serumlar

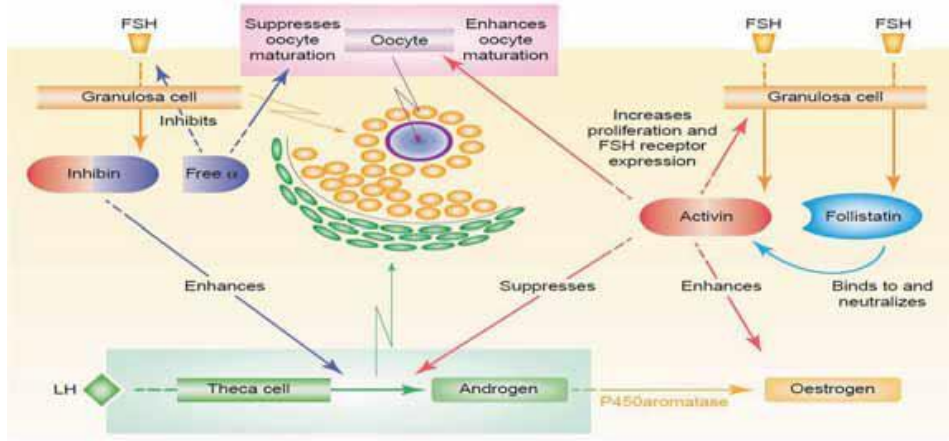
Serum *in vitro* hücre kültüründe sıklıkla kullanılan en önemli maddelerdendir (Gardner ve ark., 2000) ve içeriğinde birçok bilinmeyen faktörlerin bulunması nedeni ile kültür medyum içeriklerinin tam olarak tanımlanması zor olmaktadır. Ayrıca embriyo kültür ortamlarına eklenen serum sebebi ile yağ damlacıklarına da rastlanılmaktadır (Abe ve ark., 2002). Oosit kalitesinin ve IVF ortamının blastosist gelişim potansiyeli üzerine rol oynadıkları bilinmektedir. Serumun enerji kaynağı, amino asit, vitamin, büyüme faktörleri, ağır metal şelatları içerdiği ve farklı konsantrasyonlardaki serumların farklı etkilere sahip oldukları gözlenmiştir. Ayrıca kültür ortamlarına serum ilavesi embriyo kalitesinde değişikliklere, yağ damlacık sayısı ve boyutundaki değişikliklere neden olarak morfolojik ve fizyolojik fonksiyonlar üzerine etkiye sahiptir (Mucci ve ark., 2006). Fertilizasyon sonrası embriyonik gelişme üzerinde de bilinmeyen faktörler sebebiyle kromozomal bozukluklar gibi çeşitli ploid oluşumları şekillenmektedir (Lonergan ve ark., 2004). Serum genellikle 56°C'de 30 dakika ısıtılır ve istenmeyen faktörlerin inaktive olması sağlanır. Besleyici özelliğinin

yanı sıra serum, foliküler ortamdan ayrılmış olan oositi çevreleyen hücelere de besin sağlamaktadır. *In vitro* ortamlarda genellikle östrus koyun serumu, fetal sığır serumu ve insan serumu kullanılmaktadır (Wani, 2002). Bir çalışmada kullanılan insan serumunun tek hücre aşamasındaki koyun embriyo ortamına eklenmesinin östrus koyun serumundan daha etkili sonuç verdiği gözlenmiştir (Thompson ve ark., 1992).

2.2.5.2. Aktivin A

Memeli gelişimi sırasında hücre çoğalması, farklılaşması ve spatial ve temporal morfogenezde sitokinler fonksiyonel rol oynarlar (Rowzee, 2008). Dişi genital kanalı ve erken preimplantasyon embriyosunda üretilen sitokinler embriyonik hüceler üzerinde parakrin/otokrin faktörler olarak hareket ederler (Gandolfi, 1994). FSH ve LH hipofiz hormonlarının keşfi aktivin ve inhibin moleküllerinin FSH salınımını azaltması/arttırması ve LH salınımının değişmemesine neden olan gonadlarda üretilen maddeler olduğunu ortaya çıkarmıştır (McCullagh,1932).

Aktivinler TGF-beta (Transforming growth factor) protein ailesinde yer alan A ya da B alt birimlerinin birbirine disülfit bağı ile bağılı dimerik proteinlerdir. Bu alt birimlerin dimerizasyonu ile aktivinlerin 3 formu oluşur; aktivin A (A-A), aktivin AB (A-B) ve aktivin B (B-B) (Hata, 1988). Gonadal sıvılardan arındırılan aktivinler hipofizden FSH (folikül uyarıcı hormon) salınımını uyarır. Mezoderm indüksiyonu, nöral hücre farklılaşması, kemik gelişimi, hematopoez ve üreme fizyolojisi gibi geniş biyolojik aktiviteye sahiptir (Şekil 2-2). İzofomları ve TGF-beta proteinleri biyolojik etkilerini sinyal iletiminde temel olan tip I ve tip II serin-treonin kinaz reseptörünün heteromerik kompleksine bağlanarak gösterir (Donaldson ve ark., 1999).



Şekil 2-2: Aktivinlerin potansiyel intrafoliküler rollerini özetleyen şematik diyagram-Hammami (2014)'ten.

Ovaryumda üretilen aktivin alt birimleri ratlarda (Meunier, 1988), insanlarda (Roberts, 1993) ve koyunlarda (Braw-Tal, 1994; Tisdall, 1994); foliküler granuloza hücrelerinde; immünohistokimya ya da *in situ* hibridizasyon ile tespit edilmiştir. Omurgalılarda ovaryum fonksiyonlarının regülasyonunda parakrin/otokrin rollerinin olduğu çeşitli hayvanlarda gösterilmiştir (Yefei, 1999).

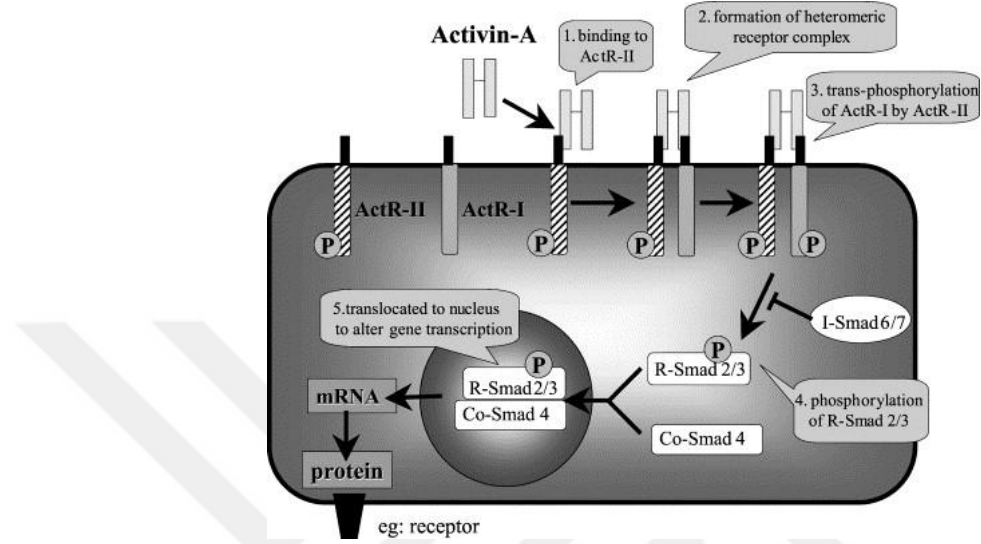
Ayrıca aktivin A'nın oosit maturasyonundaki potansiyel rolü birçok memeli hayvanda farklı sonuçlar elde edilerek çalışılmıştır. Sonuçlara göre aktivin A ratlarda (Itoh, 1990; Sadatsuki, 1993), sığırdaki (Stock, 1997), rhesus maymununda (Alak, 1996) ve insanda (Alak, 1998) *in vitro* matürasyon oranını arttırdığı görülmüştür. Fare ve sığırdaki zigotta morula safhasına kadar olan süreçte ve sığır ovidukt epitel, ovaryum ve granuloza hücrelerinde aktivinin alfa ve beta alt birimlerinin bulunduğu belirlenerek (Lu ve ark, 1993; Yoshioka ve ark. 1998) proteinin embriyogenezde rol oynayabileceği düşünülmüştür. Aktivin A'nın embriyo gelişimine olumlu etkisi olduğu sığır ve fare embriyo kültürüne embriyonik gelişimin ilk evrelerinde eklenerek elde edilmiştir (Lee, 2009; Lu, 1990).

Aktivin A'nın gelişimin 3. ve 5. gününde embriyonik kültüre eklenmesi ile sığır embriyolarında blastosist oluşum oranına olumlu yönde etki etmiştir. İlk 3 güne kadar olan süreçte ortama eklenen aktivin A'nın blastosist gelişimine etki etmediği gözlenirken sadece hatching oranını arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır (Trigal ve ark, 2011). Bazı çalışmalarda aktivinin 8-16 hücre aşamasından sonra eklenmesinin blastosiste ulaşan embriyo sayısına etki etmediği görülmüştür (Yoshioka ve ark, 1998 ve 2000). Oosit olgunlaşmasında ve foliküler gelişimde rol alan faktörler; oosit gelişim

potansiyelini belirlemek amacıyla moleküler markörler olarak kullanılabilir. Bunlardan birkaçının ekspresyon seviyeleri belirlenerek bu amaçla kullanılmaya çalışılmaktadır. Embriyonik gelişimde BMP4 (bone morphogenic factor) embriyonun erken dönem farklılaşmasında ve dorsal-ventral eksen oluşumu aşamasında rol alan kritik bir sinyal molekülüdür. BMP4 notokordun dorsal kısmından salgınır ve ventral kısımdan salgınan sonic hedgehog ile etkileşime girerek dorsal-ventral eksenini oluşturur ve diğer yapıların oluşumu için zemin hazırlanır. BMP'ler yetişkin hayvanlarda kemik oluşumunu uyarır. Osteoblastik bağlantı oluşumu ve mezenkimal kök hücrelerin farklılaşmasını indüklediği düşünülmektedir. BMP'lerin en büyük rolünün embriyonik gelişim evresinde olduğu bilinmektedir. Farelerde BMP4'ün inaktivasyonu ile mezoderm oluşumunun engellendiği görülmüştür (Chen, 2004).

TGF-Beta ailesi reseptörleri çoğunlukla SMAD sinyal yolağını kullanarak sinyal dönüşümünde rol almaktadır. Tip-II reseptörleri R-SMAD'ların (SMAD1, SMAD2, SMAD3, SMAD5 ve SMAD8/9) fosforilasyonuna katılan tip-I reseptörleri aktive etmede sorumludur. Fosforilasyonla birlikte R-SMAD kompleksi oluşumu co-SMAD (SMAD-4) ile (common partner smad) nükleusa gider ve transkripsiyon faktörü olarak hareket eder. TGF beta, aktivin ve GDF'ler (growth differentiation factor) SMAD2 ve SMAD3 tarafından yönlendirilirken, BMP'ler ve bazı GDF'ler SMAD1, SMAD5 ve SMAD9 tarafından yönlendirilir. BMP4 SMAD1/5/8'in fosforilasyonuna neden olarak SMAD4'ün fosforillenmiş bu smadlarla kompleks oluşumuna neden olur ve SMAD4 nükleusa gider. Aktivinler ise SMAD2/3'ü etkileyerek farklı ligand-spesifik SMAD'lar ile heteromerik kompleks oluşumuna neden olur (Şekil 2-3) (Heldin, 1997). Rat ve farelerde yapılan çalışmalarda blastosist, morula ve ICM (inner cell mass)'den elde edilen hücreler gen ekspresyon profili yönünden kıyaslanarak bu genlerin ekspresyon durumları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *Bmp4* geninin her iki türde de aynı ekspresyon profili gösterdiği ve blastosist aşamasında ve ICM'de ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Ayrıca *in vivo*'da pluripotent hücre popülasyonunda (ICM) rat ve farelerde benzer *Bmp4* ekspresyonunun olduğu belirtilmiştir. BMP sinyal yolağında yer alan R-SMADların (receptor regulated SMAD (SMAD -1, -2, -3) her üç hücre grubunda da iki türde benzer ekspresyon profiline sahip olduğu ve bu genlerin ürünü olan transkripsiyon faktörlerinin kompleks oluşturarak gen transkripsiyonunu düzenlediği bilinen SMAD4'ün ilgili geni *Smad4*'ün de farelerde blastosistin her kompartmanında arttığı sonucuna ulaşılmıştır. Ratlarda ise *Smad4*'ün ekspresyonu moruladan blastosiste

kadar sürdüğü fakat spesifik olarak ICM'de arttığı görülmüştür. Farelerde ICM ve blastosistte *Smad2* ve co-regülatör *Smad4*'ün ekspresyon seviyesi artarken *Smad7* ekspresyonu özellikle ICM'de azalmıştır (Casanova, 2012).



Şekil 2-3: Aktivin A etkisi ile tetiklenen sinyal yolağı -Knight ve Glistler. (2003)'ten.

Koyunda Aktivin A kullanımı ile yapılan bir çalışmada ise (Thomas, 2003) preantral folikül gelişimi ve oosit büyümesinin arttığı *in vitro* kültür ortamında gösterilmiştir. Yine buna benzer bir araştırmada çeşitli faktörlerin kumulus oosit kompleksi ve oosit gelişimi üzerine etkisi incelenerek GDF9'un bu yönde olumlu etkisi gözlenirken pentraxin 3, hyaluronan synthase 2 (HAS2), tumor necrosis factor alpha-induced protein 6, prostaglandin synthase 2, B-cell lymphoma 2 (BCL2), ve Bcl2-associated X (BAX)'nin ekspresyonlarında önemli bir katkısı olmadığı gösterilmiştir (Varnosfaderani, 2013). *In vitro* maturasyon ve *in vitro* embriyo kültürü, blastosist verimi ve kalitesi üzerine etkisi incelenen Aktivin A'nın keçilerde çeşitli oranlarda ve zamanlarda kullanımının embriyo gelişimini olumlu yönde etkilemiştir (Hammami, 2013).

2.3. Embriyoların gelişim kontrolleri

Koyun embriyolarının çapı çevrelerini saran zona pelusida ile birlikte yaklaşık olarak 125µm arasında olmaktadır (Imal, 2017). Embriyo çapı zigot oluşumundan blastosistin genişleme evresine kadar hemen hemen hiç değişmez. Embriyonik

gelişimin ilk aşamasında gözlemlenen ve büyüme gerçekleşmeksizin oluşan hücre bölünmesine “cleavage” denilmektedir. Bölünmeler sonucu meydana gelen iki yeni hücrede boyut farklılıkları olmakta ve ilk bölünmede oluşan ve onu takip eden hücreler blastomer olarak adlandırılmaktadır (Demir, 1995). Hücreler ikiye katlanarak bölünmeye devam ettiğinde 16-32 hücreli evrede kompakt bir şekilde zona pelusida içerisinde bulunur ve embriyo bu haliyle morula evresinde bulunur. Bu dönemde blastomerleri ayrı birer hücre olarak gözlemleyebilmek zordur. Embriyoların bölünen hücre toplulukları perivitellin boşluğunun büyük kısmını kaplar. Blastomerler birleşerek kompakt bir halde bütün bir yapı haline gelerek kompakt morulayı meydana getirirler ve perivitellin boşluğun yaklaşık %70’lik kısmını doldururlar. Bir sonraki aşama olan erken blastosist evresinde embriyo blastosöl denilen bir sıvı ile dolu boşluğa sahiptir. Bu evrede iç hücre yığını (ICM) ve trofoblast hücreleri ayırt edilebilir duruma gelmiştir. Bu iki katman daha da belirginleştiğinde perivitellin boşluğun büyük kısmını kaplayan embriyo ve blastosöl iyice belirginleşerek blastosist evresine girer. Bu evreyi takiben embriyo çapı yaklaşık 1.5 kat oranında artış gösterirken zona pelusida ise incelik ve genişlemiş blastosist (expanded blastosist) oluşur. Blastosöl bu evrede kaybolurken embriyonal hücre yığını kompakt halde bulunur. Hatched blastosist evresinde ise embriyolar zona pelusidayı terk etmeye başlarlar ve sonunda tamamıyla dışarı çıkarlar (Harris, 2012).

2.4. Gen ekspresyonlarının gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile incelenmesi

Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (Q-PCR) ya da gerçek zamanlı PCR tek hücre düzeyi dahil çok az miktardaki mRNA miktarlarını tayin edebilmek için kullanılan güvenilir bir tekniktir. Biyolojik çalışmalarda genellikle gen ekspresyon seviyelerinin ölçülmesi ve rölatif değerlendirilmeleri amacıyla tercih edilmektedir. Q-PCR yönteminin birçok çalışmada kullanılmasının nedenleri şu şekilde sıralanabilir: geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu sonrası işlemlere gerek duyulmaz, RNA miktarları arasındaki kıyaslamaya kantitatif bir ölçüde cevap verir, hem kalitatif hem de kantitatif bir tekniktir (Bustin ve ark., 2005). Kullanılan RNA miktarlarının tayini, kullanılan hücre sayısı, geri transkripsiyon verimi ve PCR aşamalarının veriminin ölçülebilmesi için bir endojen referans gen (housekeeping gen) kullanılır. Q-PCR hızlı, kolay uygulanabilen ve çok iş gücü gerektirmeyen bir yöntemdir. Öncelikle ilgilenilen genlerin transkriptini içeren örneklerden mRNA izolasyonu yapılır. Her bir mRNA

zinciri ters transkriptaz enzimi ile tamamlayıcı DNA denilen cDNA zinciri olarak sentezlenir. PCR işlemi sıcak toleransı yüksek bir DNA polimeraz kullanılarak küçük boyuttaki DNAların logaritmik olarak kopyalanmasına olanak sağlar. Q-PCR işleminde çok sayıda reaksiyon döngüsü gerçekleştiği için her bir döngüde enzim eklemenin önüne geçebilmek için sıcaklık toleransı önem taşımaktadır. Bir PCR karışımı; sıcaklığa dayanıklı polimeraz (örneğin Taq polimeraz), hedef genlere spesifik primer dizileri, deoksिनükleotitler ve uygun tampon solüsyonları içerir. Primerler çoğaltılacak DNA bölgesinin her iki ucuna yapışırlar. Primerlerin dizaynı ve seçimi deneysel koşullara uyum sağlayacak şekilde optimal düzeyde, primer dimer oluşumuna neden olmayacak, yanlış DNA bölgesine bağlanmayacak ya da çapraz reaksiyonlara girmeyecek şekilde olmalıdır. Bu gibi engellerin oluşmadığı primer seçimlerinde PCR amplifikasyon verimi yaklaşık %100 olmaktadır (Bustin ve ark., 2005). cDNA reaksiyon karışımının sıcaklığı artırılıp azaltıldığında DNA denatüre olur ve primerlerin uygun bölgelere yapışması sağlanarak polimerazın DNA ürününü sentezlemesi sağlanarak her bir döngüde amplifikasyon sağlanır. Her bir basamakta sıcaklığın tam bir şekilde kontrolü için bir termal döngü cihazı kullanılır. Klasik PCR uygulamasında çoğunlukla kullanılan DNA boyası Etidyum bromür olmasına rağmen, genler arasındaki küçük farklılıklara hassasiyeti az olması nedeniyle Q-PCR yöntemi için uygun değildir. Bu nedenle bu yöntemde çoğunlukla etidyum bromürden daha fazla emisyon veren ve küçük farklılıkları da saptayabilmeyi sağlayan SYBR Green boyası kullanılır (Gudnason ve ark., 2007).

Q-PCR yönteminin temelinde başlangıçta kullanılan hedef gen sayısının fazla olması o kadar az döngüde tespit edilebilmesi ve eşik değerine ulaşması yatmaktadır (Bustin ve ark., 2005). Ne kadar çok gen ürünü elde edilirse o kadar fazla florasan sinyali elde edilir. Her bir döngü bitiminde florasan seviyesi ölçülür ve eşik ya da bazal ışımaya seviyesini geçtiğinde önem derecesine sahip olur. Eşik döngüsü (C_t) ilgilenilen genin florasan seviyesinin bazal arka plan ışımaya seviyesini geçtiği seviye olarak tanımlanır. C_t değeri toplam çoğaltılan DNA ürünü sayısının yaklaşık yarısını elde edebilmek için gerekli döngü sayısı olarak tanımlanır. Reaksiyonun bu noktasında biriken ürün miktarı başlangıçtaki hedef örnek sayısı ile doğru orantılıdır. Ancak elde edilen C_t değeri program tarafından belirlenen bir bazal seviye ve değiştirilebilir bir eşik olması nedeniyle tamamen subjektiftir. Q-PCR kullanılan ajanlar ve protokolde benzerlik taşınmasına rağmen klasik PCR'dan farklı olarak kantitatif sonuçlar

vermektedir. Bu nedenle Q-PCR ile sadece bir genin var olup olmadığı değil transkripsiyon seviyesi de belirlenebilmektedir. Rölatif değerlendirmenin yanı sıra seri dilüsyonlar ile hazırlanan standart eğriden yararlanarak başlangıçtaki gen miktarı belirlenebilir. Ancak Q-PCR sadece küçük DNA boyutlarının çoğaltılmasında daha etkilidir (Debode ve ark., 2017).

Q-PCR bir referans gen kullanılarak verinin rakamsal hale getirilmesini sağlar. Referans gen RNA seviyesini normalize eder ve varyasyonların doğrulanmasında rol alır (Wrenzycki ve ark., 2004). Hedef genin miktarı referans genin miktarı ile yapılan orantısal hesap kullanılarak tayin edilir. Bu sebeple Q-PCR deneylerinin dizaynında doğru bir referans gen seçmek büyük önem taşır. Yapılan araştırmalara göre bütün kriterleri sağlayan tek bir evrensel referans gen yoktur. Her bir gen belirli bir seviyede regüle edilir ve hiçbirisi tüm hücre çeşitlerinde eşit seviyede değildir. Bu nedenle farklı her bir çalışma için spesifik bir referans gen tanımlanması gerekmektedir. Farklı doku ya da deneysel şartlarda sabit bir gen ekspresyonuna sahip referans genin varlığını kanıtlamak büyük önem taşımaktadır, aksi halde sonuçlar yanlış yorumlanabilir ve geçersiz olabilir (Bjarnadottir ve Jonsson, 2005). Birçok deneyde poli(A) polimeraz referans gen olarak kullanılmaktadır. Poli(A) kuyruğu hemen hemen bütün ökaryotik mRNAlarda ve 3' ucunda bulunur. Ayrıca mRNA'nın yıkılmasını engelleyerek stabilizasyon sağlar. Poli(A) sentezi de poli(A) polimeraz tarafından yapılır (Lodish ve ark., 1995). Bu kuyruğun her mRNA'da bulunması da poli(A) enzimi geninin her zaman transkribe olmasını zorunlu kılar. Bu nedenle referans gen olarak kullanılabilir iyi bir aday genidir. Her bir deney öncesi primerlerin validasyonu, gerekli optimal RNA konsantrasyonu, döngü sıcaklık değerleri ve uygulama süreleri optimize edilerek tekrarlanabilirlik düzeyi artırılmalıdır (Schmittgen ve ark., 2000).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Dizaynı

3.1.1. Deney Planı A

Oosit olgunlaştırılması aşamasında eklenen aktivin A'nın embriyonik gelişime etkisinin araştırılması amacıyla yapılan bu deney setinde tablo 3-1'de belirtilen gruplar ve aktivin A konsantrasyonları kullanılmıştır.

Tablo 3-1: IVM ortamına eklenecek aktivin A konsantrasyonları

Grup ismi	Aktivin A konsantrasyonu (ng/ml)
AI	0
AII	10
AIII	50
AIV	100

3.1.2. Deney Planı B

In vitro fertilizasyon sonrası medyumlara aktivin A eklenmesi ile meydana gelen embriyonik gelişimdeki değişikliklerin incelenmesi amacıyla yapılan deney planı B'de kullanılan aktivin A miktarları ve oluşturulan gruplar tablo 3-2'de verilmiştir. Bu deney setinde IVM ortamına aktivin A eklenmemiştir.

Tablo 3-2: IVF sonrası medyumlara eklenecek aktivin A konsantrasyonları

Grup ismi	Aktivin A konsantrasyonu (ng/ml)
BI	0
BII	10
BIII	50
BIV	100

Aktivin A ana stoğu -20° C'de muhafaza edilmiş olup, her çalışmada dondurulup çözülme ile oluşabilecek protein denatürasyonu gibi sorunlarla karşılaşmamak amacıyla PBS ile iki ayrı seyreltme yapılarak -80° C'de muhafaza edilmiştir.

Bu iki seyreltme oranı;

Grup II için 1 ng/ml konsantrasyonlu Aktivin A'dan 5 µl alınarak 500 µl'lik maturasyon medyumuna,

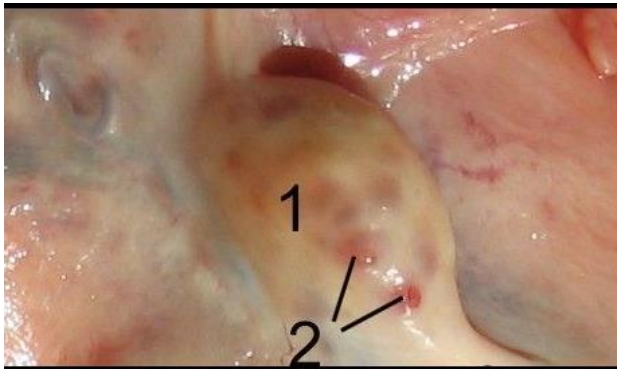
Grup III için 10 ng/ml konsantrasyonlu Aktivin A'dan 2.5 ul alınarak 500 µl'lik maturasyon medyumuna,

Grup IV için 10 ng/ml konsantrasyonlu Aktivin A'dan 5 µl alınarak 500 µl'lik maturasyon medyumuna eklenerek hazırlanmıştır.

Her bir bölüntü -80°C'de ayrı tüplerde 1 ng/ml için 7 ul, 10 ng/ml için 10 µl olarak hazırlanmıştır

3.2. Ovaryumların Temin Edilmesi ve Laboratuvara Taşınması

Mezbahada kesilen koyunlardan ovaryumlar (Şekil 3-1) ayrılarak hızlı bir şekilde 37°C'de %0,9'luk NaCl içeren serum fizyolojik içeren termoslara aktarıldı. Ovaryumlar toplanırken hayvanların yaşları, gebelik durumları dikkate alınmadan sadece gözle görülebilen sağlık problemleri olmayan hayvanlara ait dokuların kullanılması dikkate alınmıştır. Ovaryumlar iki saat süreyi aşmayacak biçimde laboratuvara taşındı ve işlemlere başlamadan önce yapılan ölçümlerde sıcaklığın 30°C'den aşağı düşmediği görüldü. İşlemlere başlayana kadar geçen sürenin 4 saatin üzerine çıkılmamasına dikkat edildi.

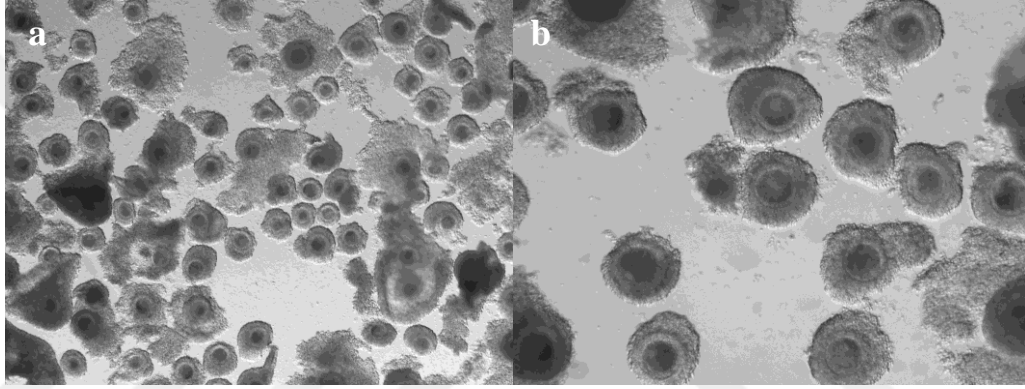


Şekil 3-1: 1. koyun ovaryumu, 2. folikül bölgeleri

3.3. Oositlerin Elde Edilmesi

Ovaryumların etrafında bulunan fazla doku ve yağlar kesilerek uzaklaştırıldı ve 37°C'deki PBS ile üç defa yıkanarak kan ve diğer kalıntılar temizlendi. Ovaryumlar

işleme alınincaya kadar 37°C’de su banyosunda bekletildi. Ovaryumların yüzeyinde bulunan foliküller bisturi ile belirli aralıklarla kesilerek öncelikle foliküler sıvının dışarı çıkması sağlandı. Geri kalan kısım ise 20 ml’lik enjektöre alınan oosit yıkama medyumu (Tablo 18) ile basınçlı bir şekilde ve her bir foliküle yaklaşık 5-6 ml kullanılarak petri kabına akıtıldı. Oositler stereo-mikroskop altında 10x-20x büyütme ile incelenerek ağız pipeti yardımıyla seçildi. Seçim işleminde: oosit etrafında üç dört sıra kumulus hücresi olması, kumulusların sıkı bir şekilde ve hasar görmemiş biçimde oositi çevrelemesi, oosit çaplarının uygun ve vitellus dağılımının homojen olması gibi kriterler göz önünde bulundurulmuştur (Şekil 3-2).



Şekil 3-2: İn vitro matürasyon için seçilen kumuluslarla çevrili oositler.

a: seçim öncesi oositler b: seçim sonrası oositler

3.4. İn Vitro Maturasyon

Maturasyon işleminde 4 kuyucuklu petri kapları kullanıldı. Her kuyucuğa üzeri mineral yağı ile kaplı 500 µl maturasyon medyumu eklenerek inkübatörde en az 6 saat ön inkübasyona bırakıldı. Toplanan oosit-kumulus kompleksleri (COCs) üç kere yıkama medyumu, bir kere de maturasyon medyumu ile yıkanarak damlacıklara aktarıldı. Her bir damlacıkta 40 COC bulunacak şekilde aktarım yapılarak 38,5°C’de 24 saat neme doyurulmuş ve %5 CO₂ bulunan ortamda inkübe edildi. Bu aşamada oositlerin GV aşamasından MII aşamasına gelerek maturasyonu sağlandı.

3.5. Oosit Maturasyonunun Değerlendirilmesi

Kumulus genişlemeleri 24 saat sonrasında; genişlememiş, kısmen genişlemiş ya da tamamen genişlemiş biçiminde ışık mikroskobu altında belirlendi. Oositlerin mayoz bölünmedeki çekirdek gelişimleri aseto-orsein boyama ile tespit edildi (Marei ve ark. 2009). Kısaca, oositler pipetaj ile kumulus hücrelerinden ayrılarak temiz bir lam

üzerine alındı ve dört damla vazelin paraffin karışımı (40:1) üzerine konulan lamel ile kapatıldı. Daha sonra asetik asit ve metanol içeren (1:3) solüsyon ile fikse edildi. Oositler 2 dakika süre ile %45 asetik asit, %1 orsein solüsyonu ile boyandı. Su, gliserol ve asetik asit (3:1:1) içeren yıkama solüsyonu ile yıkanarak nükleer maturasyon durumları faz kontrast mikroskopu ile belirlendi.

3.6. Spermanın Fertilizasyon İçin Hazırlanması

Fertilizasyon aşamasından en az 2 saat önce elektro-ejakülatör yardımı ile taze sperma elde edildi. Bu yöntem şu şekilde gerçekleştirildi: Kontrol altında tutulan koç yere yatırılarak güç kaynağına bağlı elektro-ejakülatör probu rektuma yerleştirildi. Prop yerleştirildikten sonra kısa ve düşük voltajdaki elektriksel akım pelvis sinirlerine uygulandı. Pelvis sinirleri elektriksel olarak uyarıldıktan sonra ejakulasyon gerçekleşti. İlk seferde ejakulasyon gerçekleşmediği takdirde hayvanın 10 dakika dinlenmesi sağlanıp işlem tekrarlandı. Ejakülatlar önceden ısıtılmış 15 ml'lik falkon tüplere alınarak geçici olarak 37°C sıcaklığa sahip termos içerisinde tutuldu. Bu işlem ile spermanın soğuk şoka maruz kalması engellendi. Sperma toplanmasından itibaren 1 saat içerisinde mikroskopik kalite değerlendirilmesi yapıldı.

5 µl sperma örneği lam üzerine alınıp lamel ile kapatılarak spermatozoa motilite değerlendirmesi ve canlılık oranı 40X büyütme ile 37°C sıcaklıktaki tabla üzerinde belirlendi. Değerlendirme sonrası 1 ml sperma 6 ml sperma yıkama solüsyonu ile karıştırılarak 1500 rpm'de 8 dakika ve 37° C'de santrifüj edildi. Yaklaşık 200×10^6 spermatozoa/mL olacak şekilde seyreltildi. Her bir fertilizasyon damlasına 5 µl sperma eklenerek mature oositlerle fertilizasyon aşamasına geçildi.

3.7. *In Vitro* Fertilizasyon

In vitro maturasyondan 24 saat sonra genişlemiş kumulus halinde olan COC'lar maturasyon medyumundan alındı. Kumulus hücreleri HSOF içeren ortamda pipetaj yapılarak oositlerden kısmen uzaklaştırıldı. Oositler %2 koyun serumu (SS) içeren bikarbonatlı yapay ovidukt sıvısı (BSOF) içeren medyumla bir kez yıkandı. Yıkamış oositler yüzeyi mineral yağ ile örtülü 500 µl BSOF ve SS içeren damlacıklara aktarıldı. Her bir damlada maksimum 40 oosit olacak şekilde aktarılan oositler ile spermalar fertilize edildi. Kullanılan spermalar son konsantrasyonları $0,8-1,0 \times 10^6$

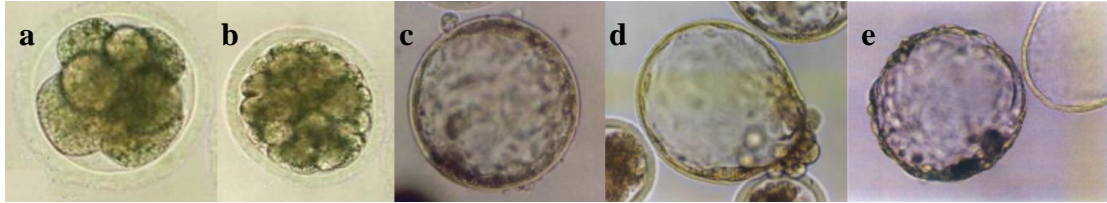
spermatozoa/mL olacak şekilde ortama eklendi. Fertilizasyon aşaması 22 saat boyunca 38,5°C’de neme doyurulmuş ortamda %5 CO₂ altında inkübe edildi.

3.8. *In Vitro* Embriyo Kültürü

IVF sonrası elde edilen zigotlar iki defa HSOF medyumunu ile 1 defa da SOF medyumuyla yıkandı. Üzeri mineral yağ ile örtülü 500 µl SOFaa medyumundan oluşan damlalar *in vitro* kültür öncesinde 6 saat inkübe edildi. Zigotlar hazırlanan medyumlara her birinde en fazla 40 adet olacak şekilde aktararak neme doyurulmuş %5 CO₂ ortamında ve 38,5°C’de inkübe edildi. Çalışmada fertilizasyonun yapıldığı zaman 0. Gün olarak baz alınarak embriyonik gelişim aşamaları (Şekil 3-3) tablo 3-3’deki zaman aralıklarına göre değerlendirildi.

Tablo 3-3: Embriyonik Gelişim Aşamalarının Değerlendirilme Zamanı

EMBRİYONİK AŞAMA	KAYIT ZAMANI (Fertilizasyon 0. Saat)
2-4 Hücre	48. Saat
8-16 Hücre	92. Saat
Morula	120. Saat
Blastosist	7-8. Gün



Şekil 3-3: Embriyonik gelişim aşamaları – Birler ve ark. (2002)’den.

a. 8 blastomer b. morula c. blastosist d. zonadan çıkan blastosist e. zonadan çıkmış blastosist

3.9. RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu her bir izolasyonda 1 adet blastosist olacak şekilde MN-nucleospin RNA XS kit kullanılarak yapılmıştır. Her bir blastosist 100 µl PBS içinde tutularak kit protokolü uygulanmıştır. Bu yöntemde silika membran teknolojisi kullanılarak RNA’ların tutunması ve yüksek saflıkta izolasyon gerçekleştirilmektedir. Hücreler yüksek konsantrasyondaki kaotropik iyonlar içeren liziz solüsyonu ile inkübe edildi. Ortamdaki RNAazlar bu solüsyon içeriği ile inaktif hale getirilirken RNA’ların silika membrana tutunması için uygun ortam sağlanmış oldu. Bu aşamada yapılan

filtrasyon işlemi ile homojenizasyon ve vizkozitenin azaltılması sağlandı. rDNAz enzimi ile genomik DNA yıkılarak filtreden uzaklaştırıldı. Saf halde kolonda tutulan RNA'lar distile su ile temiz bir tüpe aktarıldı. Tek bir blastosist ile elde edilecek RNA miktarlarının az olması nedeni ile son toplama hacminde 9 µl nukleaz içermeyen distile su kullanılmıştır. RNA ölçümleri 260 nm dalga boyunda 1 µl'lik örnekler kullanılarak Nanodrop 2000 cihazı ile ölçülmüştür. 260/280 oranları ve spektrum grafikleri değerlendirilerek saflık ve miktar tayinleri yapılmıştır. 260/280 oranlarının en az 1.7 olmasına dikkat edilmiştir.

3.10. Geri Transkripsiyon ile cDNA Sentezi

Elde edilen RNA'lar NEB protoscript M-MuLV First Strand cDNA synthesis kit kullanılarak cDNA'ya dönüştürülmüştür. Kit içeriğinde DNA endonükleaz aktivitesi olmayan ve çok az RNAaz H aktivitesine sahip Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase enzimi bulunmaktadır. Her bir izolasyon için 1 reaksiyonluk kit ürünü kullanılmıştır. Öncelikle 8 µl RNA ile 2 µl Oligo-dT primer PCR tüpü içerisinde karıştırılarak termal döngü cihazında 70°C'de 5 dakika inkübe edilerek ikincil yapı oluşumları önlenmiştir ve sonrasında buz içerisinde tutulmuştur. Karışıma 10 µl M-MuLV reaksiyon karışımı ve 2 µl enzim karışımı eklenerek toplamda 20 µl hacmindeki örnekler 42°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. Enzim inaktivasyonu 80°C'de 5 dakika inkübasyon ile yapıldı. Reaksiyon sonrası her bir örnek 30 µl RNAaz içermeyen distile su ile eklenerek toplamda 50 µl örnek elde edilmiştir.

3.11. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Q-PCR)

Geri transkripsiyon ile elde edilen cDNA örnekleri, İleri primer (stok solüsyon 10 µM, son konsantrasyon 0,25 µM), geri primer (stok solüsyon 10 µM, son konsantrasyon 0,25 µM), Luna Universal qPCR master mix ve su kullanılarak toplam 10 µl hacimde reaksiyon kurulmuştur (Tablo 3-4).

Tablo 3-4: Q-PCR reaksiyonunda kullanılan maddeler

İçerik	10 µl reaksiyon	Son konsantrasyon
Luna Universal qPCR Master Mix	5 µl	1X
İleri primer (10 µM)	0.5 µl	0.25 µM
Geri primer (10 µM)	0.5 µl	0.25 µM
cDNA	2 µl	<100 ng
Nukleazsız Su	2.5 µl	-

Reaksiyon kurulumunda her bir cDNA örneği 96 kuyuluk PCR kaplarına ayrı olarak eklenmiş ve geri kalan reaksiyon karışımı cDNA'lar üzerine eklenmiştir. Her bir primere ait reaksiyonlar en az 3 tekrarlı olacak şekilde hazırlanarak, ayrıca reaksiyonların negatif kontrolleri cDNA eklenmeden yapılmıştır. Hazırlanan örneklerin üzeri şeffaf yapıştırıcı ile kapatılarak su kaybı önlenmiş ve 1000 g hızda 1 dakika santrifüj edilerek tam bir karışım sağlanmıştır. Tablo 3-5'teki sıcaklık düzeni kullanılarak PCR gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3-5: Gerçek zamanlı PCR için kullanılan sıcaklık koşulları

Aşamalar	Sıcaklık (°C)	Süre (sn)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	95	60	45 döngü
Denatürasyon	95	15	
Uzama	60	30	
Erime eğrisi	60-95	Saniyede 1°C	1

Q-PCR deneyleri için dizayn edilen primerler tablo 3-6'da verilmiştir.

Tablo 3-6: Q-PCR primerleri

GEN	İLERİ PRİMER	GERİ PRİMER
<i>Bmp4</i>	AGGGCATCGGTCTGGAGTAT	ATACGATGAAAGCCCTGCTC
<i>Smad4</i>	CCAAGTAATCGTGCATCGAC	CAGTCCAGGTGGTAGTGCTGTT
<i>GAPDH</i>	GAGAAACCTGCCAAGTATGA	CGAAGGTAGAAGAGTGAGTG
<i>Beta Aktin</i>	GCATGGGCCAGAAGGACTCC	CGTAGATGGGCACCGTGTGG
<i>Caspase-3</i>	TAGCAAGTTTCTTCAGAGGG	GTCTCAATACCACAGTCCAG
<i>Bcl-2</i>	GCCGAGATGTCCAGTCAGC	GACGCTCTCCACACACATGAC
<i>Bax</i>	CATGGAGCTGCAGAGGATGA	GTTGAAGTTGCCGTCGAAA

3.12. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmada her bir grup için en az 4 tekrar kullanılarak deneyler gerçekleştirildi. Elde edilen blastosist sayılarının istatiksel değerlendirilmesinde ki-kare testi uygulandı

(SPSS 20 Software Program). İstatiksel fark açısından değerlendirme yapılırken $P < 0,05$ seviyesi kullanıldı. Genlerdeki ekspresyon düzeyleri değerlendirilmesinde gruplar arası ANOVA testi kullanılmıştır. Sonuçların anlamlı olabilmesi açısından her bir grup için 3-4 biyolojik tekrar gen ekspresyonlarında da her biri 3-4 kere olmak üzere biyolojik ve teknik tekrarlar kullanılmıştır.

3.13. Çalışmada Kullanılan Stok Solüsyonlar

Tablo 3-7: TCM-199 Stok (10x) solüsyonu formülasyonu

TCM-199 Stok (10x)	
M-199	9,5 gr
Distile Su	100 ml

Hazırlanan karışımın tamamen çözünmesi sağlanarak 0,22 μm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. 4°C’de 2 ay kadar muhafaza edildi.

Tablo 3-8: Bikarbonat Stok Solüsyonu (B) formülasyonu

Bikarbonat Stok Solüsyonu (B)	
NaHCO ₃	2.1 g
Distile Su	100 ml
Fenol Kırmızısı	%0,5 (W/V)

Hazırlanan karışımın tamamen çözünmesi sağlanarak 0,22 μm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. 4°C’de 2 haftaya kadar muhafaza edildi.

Tablo 3-9: Hepes stok solüsyonu (H) formülasyonu

Hepes stok solüsyonu (H)	
Sodyum Hepes	8,135 g
Hepes (Free acid)	7,5 g
Distile su	250 ml
Fenol kırmızısı	0,5 % (W/V)

Hazırlanan karışımın tamamen çözünmesi sağlanarak 0.22 μm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. 4°C’de 2 aya kadar muhafaza edildi.

Tablo 3-10: Tuz stok solüsyonu (S2) formülasyonu

Tuz stok solüsyonu (S2)	
NaCl	12,588
KCl	1,068
NaH ₂ PO ₄	0,108
Distile su	200 ml

Hazırlanan karışımın tamamen çözünmesi sağlanarak 0,22 µm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. 4°C’de 3 aya kadar muhafaza edildi.

Tablo 3-11: Laktat stok solüsyonu (L) formülasyonu

Laktat stok solüsyonu (L)	
Sodyum Laktat	4,70 ml
Distile su	100 ml

Hazırlanan karışımın tamamen çözünmesi sağlanarak 0,22 µm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. 4°C’de 2 aya kadar muhafaza edildi.

Tablo 3-12: Glikoz stok solüsyonu (G) formülasyonu

Glikoz stok solüsyonu (G)	
Glikoz	1080 mg
Distile su	100 ml

Hazırlanan karışımın tamamen çözünmesi sağlanarak 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. 4°C’de 2 aya kadar muhafaza edildi.

Tablo 3-13: Kalsiyum stok solüsyonu (Ca) formülasyonu

Kalsiyum stok solüsyonu (Ca)	
Kalsiyum klorür	1260 mg
Distile su	50 ml

Hazırlanan karışımın tamamen çözünmesi sağlanarak 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. 4 °C’de 2 aya kadar muhafaza edildi.

Tablo 3-14: Magnezyum stok solüsyonu (Mg) formülasyonu

Magnezyum stok solüsyonu (Mg)	
Magnezyum klorür	500 mg
Distile su	50 ml

Hazırlanan karışımın tamamen çözünmesi sağlanarak 0,22 µm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. 4 °C’de 3 aya kadar muhafaza edildi.

Tablo 3-15: Antibiyotik stok solüsyonu (PS) formülasyonu

Antibiyotik stok solüsyonu (PS)	
Penisilin	750 mg
Streptomisin	500 mg
PBS	100 ml

Hazırlanan karışımın tamamen çözünmesi sağlanarak 0,22 µm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. -20°C’de uzun süre muhafaza edildi.

3.14. Çalışmada Kullanılan Medyumlar

Tablo 3-16: Fosfat tamponlu tuz (PBS) solüsyonu formülasyonu

Fosfat tamponlu tuz (PBS)	
NaCl	20 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
KCl	0,5 g
Na ₂ HPO ₄	5,4 g
Distile su	2,5 l

Hazırlanan çözelti ovaryumların taşınması ve yıkanması için kullanıldı. Ozmotik basınç 280 mOsmol/kg ve pH değeri de yaklaşık 7,2’ye ayarlandı. Hazırlanan çözelti 121 °C’de 15 dakika otoklavlandı. Steril hale geldikten sonra tablo 3-17’teki antibiyotik karışımı ilave edildi.

Tablo 3-17: Antibiyotik karışımının hazırlanması

Antibiyotik	Miktarlar
Penisilin	0,75 g
Streptomisin	0,612 g
Neomisin	0,612 g
Steril distile su	25 ml

Hazırlanan solüsyonun tamamı 2,5 litre PBS içerisine katılarak 4°C’de 3 ay saklandı.

Tablo 3-18: Oosit Yıkama Solüsyonu formülasyonu

Oosit Yıkama Solüsyonu	
TCM-199 Stok (10x)	50 ml
H Stok Solüsyonu	42 ml
B Stok Solüsyonu	8 ml
Kanamisin	38 ml
Heparin	5 mg
Distile Su	500 ml

Hazırlanan karışımın tamamen çözünmesi sağlanarak 0,22 µm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. 4°C’de 3 aya kadar muhafaza edildi. Oosit toplama işleminden önce bu solüsyona %10 FBS (Heat inactivated) ve %1 oranında PS antibiyotik solüsyonu eklendi. Ozmotik basınç yaklaşık 280 mOsmol/kg değerine, pH ise 7,2-7,4 arasında bir değere ayarlandı. 0,22 µm filtreden geçirilerek 37°C’de bekletildi.

Tablo 3-19: Oosit olgunlaştırma medyumunu formülasyonu

Oosit olgunlaştırma medyumunu	
TCM 199	18 ml
Na prüvat	2 mg
FSH	10 µg/ml
LH	10 µg/ml
FBS (Sıcaklıkla inaktive edilmiş)	2 ml

Hazırlanan karışımın tamamen çözünmesi sağlanarak 0,22 µm filtreden geçirilerek sterilizasyonu sağlandı. Solüsyon her kullanım için taze olarak hazırlanır ve %5 CO₂ atmosferinde etüvde inkübe edildi.

Tablo 3-20: Hapes tamponlu SOF (HSOF) formülasyonu

Hapes tamponlu SOF (HSOF)	
S2	50 ml
H	42 ml
B	8 ml
D	5 ml
M	5 ml
L	5 ml
G	20 ml
PS	5 ml
Na prüvat	18 mg
Glutamin	73 mg
BSA (Fr. V)	1,5 g
Kanamisin	38 mg
Distile su	500 ml

Tablo 3-21: Percoll-SOF medyumu formülasyonu

Percoll-SOF medyumu	
S2	10 ml
Na Hapes	274 mg
HEPES	252 mg
D	1 ml
M	1 ml
Percoll	100 ml

pH değerleri yaklaşık 7,2'ye, ozmotik basınçlar 280 mOsmol/kg'a ayarlandı. Sadece HSOF 0,22 µm filtreden geçirildi Solüsyonlar hazırlandıktan sonra 4°C'de 1 ay saklandı.

Tablo 3-22: BSOF medium formülasyonu

BSOF	
S2	50 ml
B	50 ml
D	10 ml
M	5 ml
L	15 ml
PS	5 ml
Na prüvat	54 mg
Glutamin	73 mg
Phenol red	5 damla
Kanamisin	40 mg
Distile su	500 ml

Tablo 3-23: SOFaa medium formülasyonu

SOFaa	
S2	50 ml
B	50 ml
D	5 ml
M	5 ml
L	5 ml
PS	5 ml
BSA (yağ asitsiz)	2 g
Na prüvat	18 mg
Glutamin	23 mg
Phenol red	%0,2 (w/v)
Kanamisin	40 mg
MEM-aa	10 ml
MEM-non ess. aa	5 ml
Distile su	500 ml

Medyumların ozmotik basınçları kontrol edilerek 282 mOsmol/kg'a ayarlandı. SOF ve BSOF medyumlarının pH'ı 7.9'a ayarlandı. Medyumlar 0,22 µm filtreden geçirildi. Solüsyonlar hazırlandıktan sonra 4°C'de 1 hafta saklandı. Fertilizasyon medyumuna (BSOF) koyun serumu eklenerek (%2) kullanıldı. Gamet ve embriolar medyumlara eklenmeden önce %5 CO₂, %5 O₂ ve %90 N₂ gaz karışımı ortamda dengeye getirildi.



4. BULGULAR

4.1. Embriyoların *in vitro* üretimi

In vitro ortamda kullanılan oositler üzerine yapılan çalışmada kültür ortamına farklı zamanlarda ve konsantrasyonlarda eklenen aktivin A molekülünün *in vitro* fertilizasyon ve blastosist oluşumu üzerine olan etkisinin incelenmesi amacıyla 2 farklı deney planı oluşturulmuştur. İlk deney planında (A grubu) 0, 10, 50 ve 100 ng/ml aktivin A içeren *in vitro* matürasyon medyumları kullanılarak *in vitro* fertilizasyon ve blastosist üzerine etkileri incelenmiştir. *In vitro* fertilizasyon sonucu elde edilen embriyolar aktivin A içermeyen medyumlar ile geliştirilerek sadece matürasyon medyumuna eklenmiş aktivin A'nın blastosist gelişimi üzerine olan etkisi de incelenmiştir. Bir diğer deney planında (B grubu) ise sadece *in vitro* fertilizasyon sonrasında 0, 10, 50 ve 100 ng/ml aktivin A olacak şekilde 4 farklı grup oluşturularak eklenmiş ve bölünme ve blastosist gelişimi üzerine olan etkisi incelenmiştir. A ve B gruplarından elde edilen blastosistlerde aktivin A'nın *Bmp4* ve *Smad4* gen ekspresyonları incelenerek blastosist gelişim oranları ile bağlantısı incelenmiştir. Aynı zamanda elde edilen blastositlerde *Bax*, *Bcl-2* ve *Caspase-3* gibi apoptoz faktörlerinin ekspresyon düzeyleri de incelenerek aktivin A'nın bu faktörler üzerine etki edip etmediği araştırılmıştır. 7. günde alınan blastosistler A ve B gruplarındaki dörder gruptan 4 ya da 5 biyolojik tekrar yapılarak elde edilmiştir. RNA izolasyonları tek bir blastosistten elde edilerek gerçek zamanlı PCR işlemleri yapılmış ve her bir örneğe 3 PCR tekrarı yapılmıştır. Normalizasyonlar *GAPDH* ekspresyonuna göre düzenlenmiştir. Bağlı ekspresyonlar da kontrol grubuna (0 ng/ml aktivin A) göre normalize edilerek yorumlanmıştır. *In vitro* fertilizasyon deneylerinde deney planı A için toplamda 637 adet, deney planı B için ise 600 adet oosit kullanılmıştır. Deney planı A için kullanılan oosit sayıları ve elde edilen MI, MII, bölünen, bölünmeyen, morula öncesi, morula sonrası, blastosist ve dejenere hücre sayıları ile ilgili rakamsal sonuçlara ait veriler tablo 4-1'de verilmiştir.

Tablo 4-1: Deney planı A'ya ait IVM'de uygulanan Aktivin A (0, 10, 50 ve 100 ng/ml) ile elde edilen hücre sayıları

Grup	Oosit (n)	Bölünen	Bölünmeyen	DJ	M.Ö.		M.S.		Blastosist		DJ	
					7.gün	8.gün	7.gün	8.gün	7.gün	8.gün	7.gün	8.gün
AI	129(5)	84	29	0	10	4	51	16	15	5	7	1
AII	169(5)	95	42	0	16	4	57	28	10	10	13	3
AIII	170(5)	118	25	0	23	6	75	34	11	2	10	1
AIV	169(5)	106	44	0	12	3	86	8	3	2	11	1

n: her bir grubun tekrar sayısı, DJ: dejenere, M.Ö.: Morula öncesi, M.S.: Morula sonrası

Deney planı B'ye ait hücre tipleri ve elde edilen rakamsal sonuçlara ait veriler tablo 4-2'de verilmiştir.

Tablo 4-2: Deney planı B'ya ait IVF sonrası uygulanan Aktivin A (0, 10, 50 ve 100 ng/ml) ile elde edilen hücre sayıları

Grup	Oosit (n)	Bölünen	Bölünmeyen	DJ	M.Ö.		M.S.		Blastosist		DJ	
					7.gün	8.gün	7.gün	8.gün	7.gün	8.gün	7.gün	8.gün
BI	148(4)	106	28	0	2	1	92	72	10	6	1	1
BII	144(4)	128	18	0	4	1	113	78	9	8	2	0
BIII	151(4)	140	16	0	1	0	125	93	12	6	2	1
BIV	157(4)	145	25	0	3	2	123	95	17	3	1	1

n: her bir grubun tekrar sayısı, DJ: dejenere, M.Ö.: Morula öncesi, M.S.: Morula sonrası

Fertilizasyon, bölünme, morula ve blastosist oranları kullanılan oosit sayısına göre oranlanarak hesaplanmıştır. Fertilizasyon oranları A ve B gruplarında sırasıyla ortalama olarak %63 ve %86 olarak elde edilmiştir. Her iki deney setine ait *in vitro* kültür sonuçları tablo 4-3 ve 4-4'te özetlenmiştir. Oosit olgunlaştırılmasında ve *in vitro* embriyo kültür aşamasında ortama eklenen 10, 50 ve 100 ng/ml konsantrasyonlarındaki aktivin A'nın blastosist oluşum üzerine farklı etkileri gözlenmiştir. Her bir grup için toplamda 130-170 arası oosit kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre ilk deney setinden elde edilen bölünme oranları %56-69 arasında değişirken 2. deney setinde bu oran %71-92 arasında değişmektedir.

4.1.1. Deney Planı A Embriyo Üretim Sonuçları

Oositlerin IVM aşamasında aktivin A ile muamelesinin bölünme ve blastosist oranlarına olan etkileri incelenmiştir. Bu amaçla IVM ortamına 3 farklı

konstanrasyonda aktivin A eklenmiştir (0, 10, 50 ve 100 ng/ml (sırasıyla AI, AII, AIII ve AIV)). Bölünme oranları kıyaslandığında en yüksek oran %69,4 ile AIII grubunda ve en düşük değer AII grubunda (%56,2) elde edilmiştir. Bölünme oranları arasında aktivin A eklenen gruplar ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olmadığı gözlenirken, 50 ng/ml ve 100 ng/ml gruplar arasında bölünen embriyo oranları arasında anlamlı fark olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Morula oranlarında ise en yüksek değer %81,1 oranında AIV grubunda gözlenirken en düşük değer (%60,0) yine AII grubunda elde edilmiştir. Elde edilen blastosist oranları ise artan aktivin konsantrasyonu ile ters orantılı olmuştur. Buna göre aktivin konsantrasyonu arttıkça elde edilen blastosist sayısında anlamlı ölçüde azalma meydana gelmiştir. Kontrol grubunda (AI) %23,8 blastosist elde edilirken 100 ng/ml aktivin (AIV) ile bu oran %3,5'edüşmüştür (Tablo 4-3). En yüksek dejenere embriyo oranı AII grubunda olurken (%13,7) en düşük oran kontrol grubunda gözlenmiştir.

Tablo 4-3: IVM'de aktivin A kullanılan deney planı A sonucu elde edilen hücre oranları

Grup	Oosit (n)	Bölünen (%)	Morula*(%)	Blastosist* (%)	Dejenere* (%)
AI	129(5)	65,1 ^{ab}	60,7 ^{ab}	23,8 ^a	8,3
AII	169(5)	56,2 ^a	60,0 ^a	13,2 ^a	13,7
AIII	170(5)	69,4 ^b	63,5 ^{bc}	11,6 ^a	8,5
AIV	169(5)	62,7 ^{ab}	81,1 ^c	3,5 ^b	10,4

^{a,b,c,d} aynı dikey kolonda değişik harf taşıyan oranlar arasındaki farklar önemlidir ($p < 0,05$). *Oranlar bölünen embriyoların sayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde morulaya ulaşan hücre oranları arasında önemli fark sadece 100 ng/ml aktivin eklenen AIV grubunda (%81,1) meydana gelmiştir ($p < 0,05$). Ancak blastosist gelişimi AIV grubunda diğer gruplara göre daha düşük oranda (%3,5) elde edilmiştir ($p < 0,05$). Aktivin A eklenen gruplar arasında bir değerlendirme yapıldığında ise en düşük embriyonik gelişim yüzdesine (%56,2) sahip grupta (AII) en yüksek oranda (%13,2) blastosist gelişimi görülmüştür.

4.1.2. Deney Planı B Embriyo Üretim Sonuçları

Bu deney planında IVF sonrası aktivin A uygulanması ile bölünme, morula, blastosist ve dejenere embriyo oranları incelenmiştir. Deney planı A'da olduğu gibi aktivin A konsantrasyonları 0, 10, 50 ve 100 ng/ml uygulanarak sırasıyla BI, BII, BII ve

BIV grupları oluşturulmuştur. En yüksek bölünme oranlarına BIII ve BIV gruplarında (sırasıyla %92,7 ve %92,3) ulaşılmıştır. Aktivin A'nın her konsantrasyonunda kontrol grubuna göre artış gözlenirken bu fark istatistiksel olarak önemli olmuştur ($p<0,05$). Morula oranlarında ise en yüksek değer %89,3 oranında BIII grubunda gözlenirken en düşük değer (%84,8) yine BIV grubunda elde edilmiştir. Elde edilen blastosist oranları ise BII, BIII ve BIV grupları arasında değerlendirildiğinde artan aktivin A konsantrasyonu ile doğru orantılı artış göstermiştir. Bu fark istatistiksel değerlendirmede anlamsız olarak bulunmuştur ($p<0,05$). Ancak deney planı B'de deney planı A'nın aksine blastosist gelişimine olumsuz bir etki görülmemiştir (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: IVF sonrası aktivin A kullanılan deney planı B sonucu elde edilen hücre oranları

Grup	Oosit (n)	Bölünen (%)	Morula*(%)	Blastosist* (%)	Dejenere* (%)
BI	148(4)	71,6 ^a	86,8 ^a	9,4 ^a	0,9
BII	144(4)	88,9 ^b	88,3 ^{bc}	7,0 ^a	1,6
BIII	151(4)	92,7 ^b	89,3 ^c	8,6 ^a	1,4
BIV	157(4)	92,3 ^b	84,8 ^{bc}	11,7 ^a	0,7

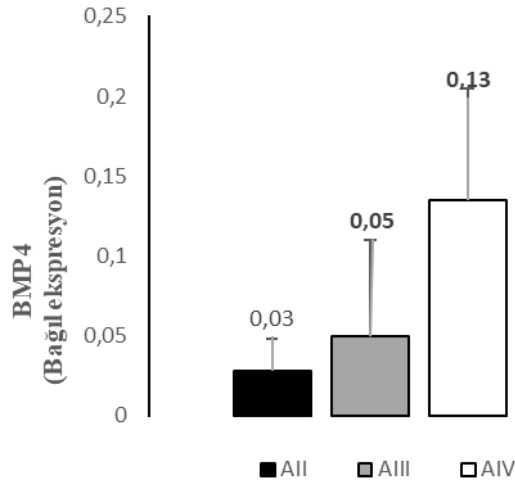
^{a,b}, aynı dikey kolonda değişik harf taşıyan oranlar arasındaki farklar önemlidir ($p<0,05$). *Oranlar bölünen embriyoların sayısı kullanılarak hesaplanmıştır.

4.2. Aktivin A'nın Embriyonik Gelişim ile İlgili Genlere Etkisi

Elde edilen her bir blastosiste RNA izolasyonu uygulayarak toplam mRNA'lardan cDNA sentezi yapılarak her bir blastosiste ait gen ifade değişimlerine gerçek zamanlı PCR ile bakılmıştır. Genler bağıl ekspresyon düzeyinde değerlendirilerek *GAPDH* ekspresyonuna göre normalize edilmiştir. Embriyonik gelişimde aktivin A etkisi ile ekspresyon seviyelerinin değişebileceği düşünülen aktivin A alt yollarında rol alan *Bmp4* ve *Smad4* gen düzeyleri her iki deney planında incelenmiştir.

4.2.1. Deney Planı A Embriyonik Gelişim ile İlgili Genlere Etki

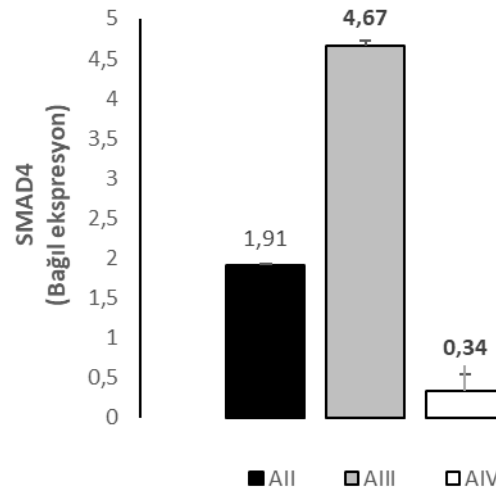
IVM'de aktivin A eklenmesi ile *Bmp4* mRNA düzeyindeki değişimler kontrol grubuna göre kıyaslanmış ve her grupta azalma görülmüştür (Şekil 4-1). En az azalma AIV grubunda görülürken AIII ve AII'de giderek daha da alt seviyeye inmiştir.



Şekil 4-1: IVM'de aktivin A eklenmesi ile değişen Bmp4 gen ekspresyon düzeyi.

Veriler ortalama değerler \pm Standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Smad4 gen düzeyi ise AII ve AIII'te artarken (sırasıyla 1,91 ve 4,67 kat) AIV grubunda azalma göstermiştir (Şekil 4-2). *Bmp4* ve *Smad4* gen düzeylerinde görülen değişime rağmen bu fark %95 güven aralığında önemli bir fark oluşturmamıştır.

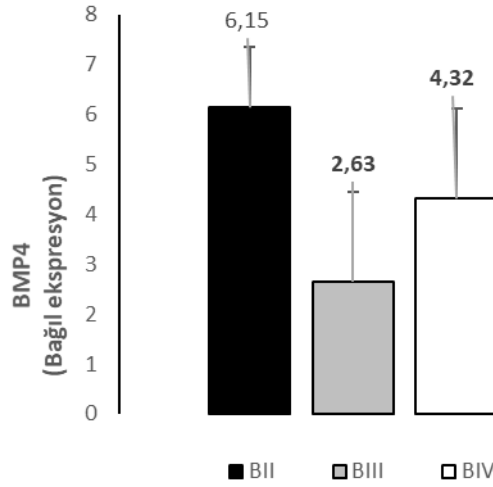


Şekil 4-2: IVM'de aktivin A eklenmesi ile değişen Smad4 gen ekspresyon düzeyi.

Veriler ortalama değerler \pm Standart sapma olarak ifade edilmiştir.

4.2.2. Deney Planı B Embriyonik Gelişim ile İlgili Genlere Etki

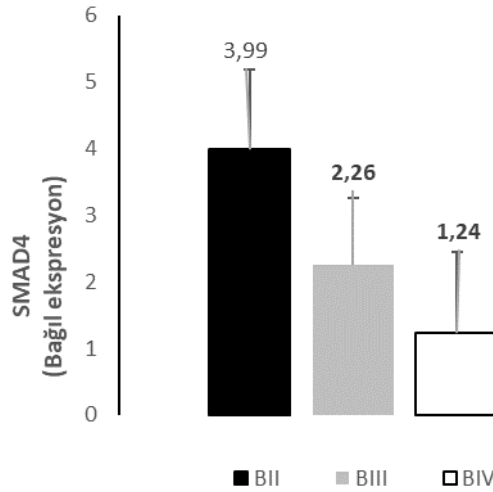
Aktivin A IVF sonrası medyumlara farklı konsantrasyonlarda eklendiğinde her bir grupta değerlendirilen *Bmp4* gen ifadesinde artışa neden olmuştur. En yüksek artış kontrol grubundan 6,15 kat fark ile BII grubunda meydana gelirken en az artış BIII grubunda gözlenmiştir (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile değişen *Bmp4* gen ekspresyon düzeyi.

Veriler ortalama değerler \pm Standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Smad4 gen ekspresyon düzeyleri ise artan aktivin A konsantrasyonu ile azalma göstermiştir. En fazla artış *Bmp4*'teki verilerden elde edilen sonuçla benzerlik göstererek BII grubunda meydana gelmiştir (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile değişen *Smad4* gen ekspresyon düzeyi.

Veriler ortalama değerler \pm Standart sapma olarak ifade edilmiştir.

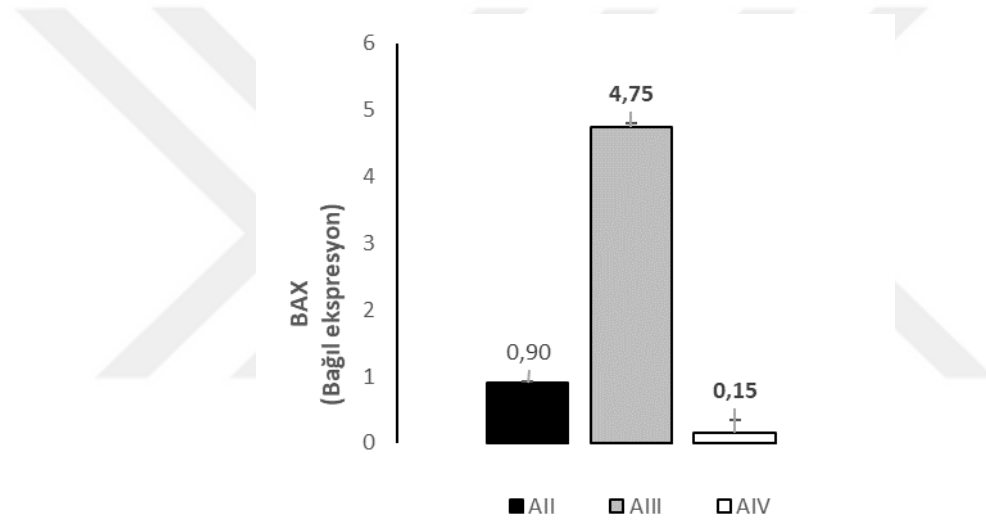
Bmp4 ve *Smad4* gen düzeylerinde görülen değişim ile elde edilen farklar %95 güven aralığında önemli bir fark oluşturmamıştır.

4.3. Aktivin A'nın Apoptoz ile İlişkili Genlerin Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

Her iki deney grubunda apoptoz ile ilişkili anti-apoptotik ve pro-apoptotik genlerin ekspresyon düzeylerindeki değişim ve aralarındaki ilişki incelenmiştir. *Bax*, *Bcl-2* ve *Caspase-3* gen ekspresyonlarına bakılarak *Bax/Bcl-2* oranının apoptoza etkisi incelenmiştir.

4.3.1. Deney planı A Apoptotik Gen Düzeyi Değişimleri

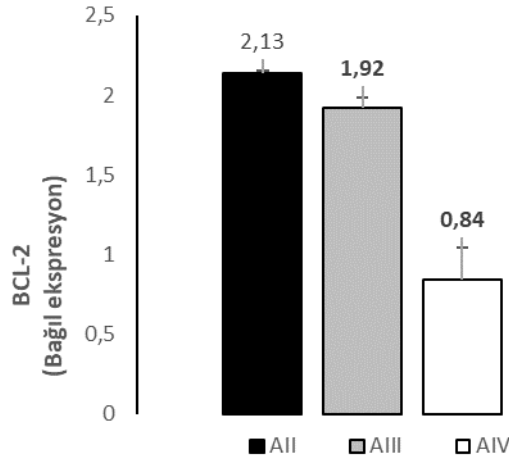
Aktivin A IVM'de meydana eklenerek *Bax* gen düzeyi incelenmiş ve AIII grubunda 4,75 kat artış gözlenmiştir. AII ve AIV gruplarına ait blastosistlerde ise *Bax* gen düzeyi kontrol grubuna göre azalma göstermiş ve AIV grubunda en düşük seviyede (0,15 kat) elde edilmiştir (Şekil 4-5).



Şekil 4-5: IVM'de aktivin A eklenmesi ile değişen *Bax* gen ekspresyon düzeyi.

Veriler ortalama değerler \pm Standart sapma olarak ifade edilmiştir.

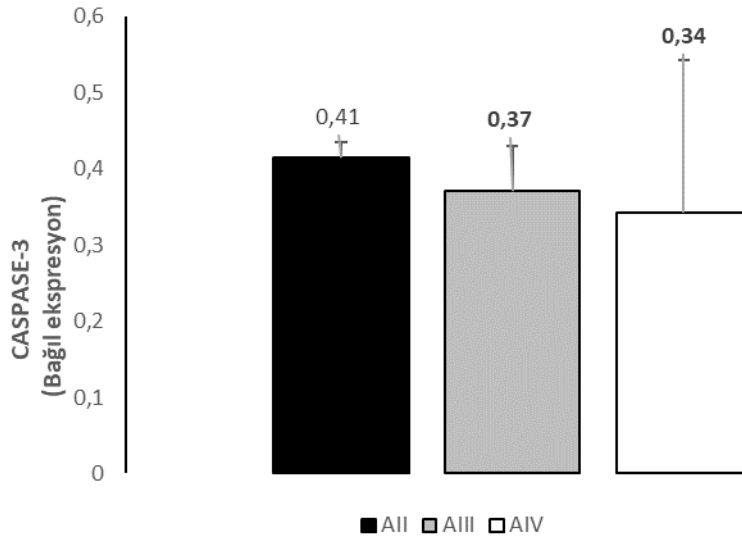
Bir diğer apoptoz belirleyici gen olan ve anti-apoptotik etkiye sahip *Bcl-2* genindeki değişim Şekil 4-6'da verilmiştir. AII ve AIII gruplarında *Bcl-2* gen düzeylerinde artış gözlenirken, AIV grubunda kontrol grubuna göre azalma görülmüştür.



Şekil 4-6: IVM'de aktivin A eklenmesi ile değişen *Bcl-2* gen ekspresyon düzeyi.

Veriler ortalama değerler \pm Standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Caspase-3 gen düzeyleri ise bütün gruplarda azalma gösterirken değerler birbirine yakın sonuçlanmıştır (Şekil 4-7). *Bax*, *Bcl-2* ve *Caspase-3* gen düzeylerinde görülen değişim ile elde edilen farklar %95 güven aralığında önemli bir fark oluşturmamıştır.



Şekil 4-7: IVM'de aktivin A eklenmesi ile değişen *Caspase-3* gen ekspresyon düzeyi.

Veriler ortalama değerler \pm Standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Apoptoza olan etkilerinin incelenmesi amacıyla *Bax/Bcl-2* gen ifade düzeyleri oranı hesaplanarak aralarındaki ilişki incelenmiş ve blastosist oranları ile kıyaslanmıştır. Buna

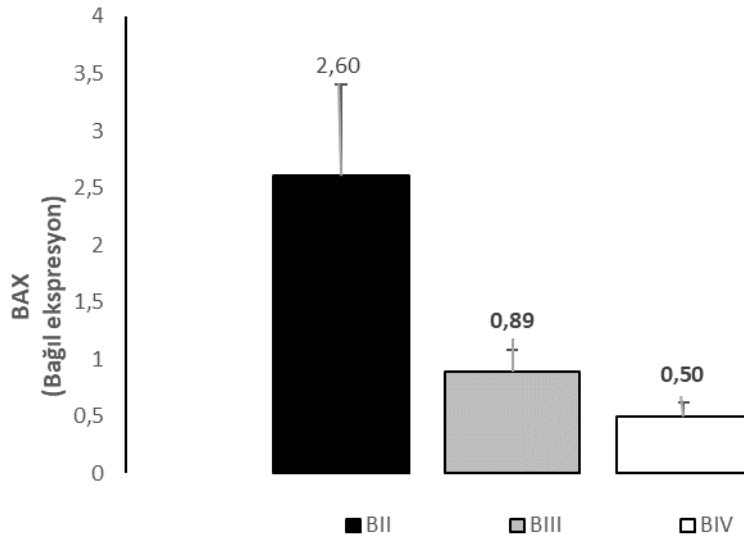
göre AII ve AIV gruplarından elde edilen *Bax/Bcl-2* oranları 1'den küçük, AIII'ten alınan sonuç ise 1'den büyük olmuştur (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: IVM'de aktivin A eklenmesi ile *Bax/Bcl-2* gen ekspresyon düzeyleri oranı.

Grup	<i>Bax/Bcl-2</i>
AII	0,42
AIII	2,47
AIV	0,18

4.3.2. Deney planı B Apoptotik Gen Düzeyi Değişimleri

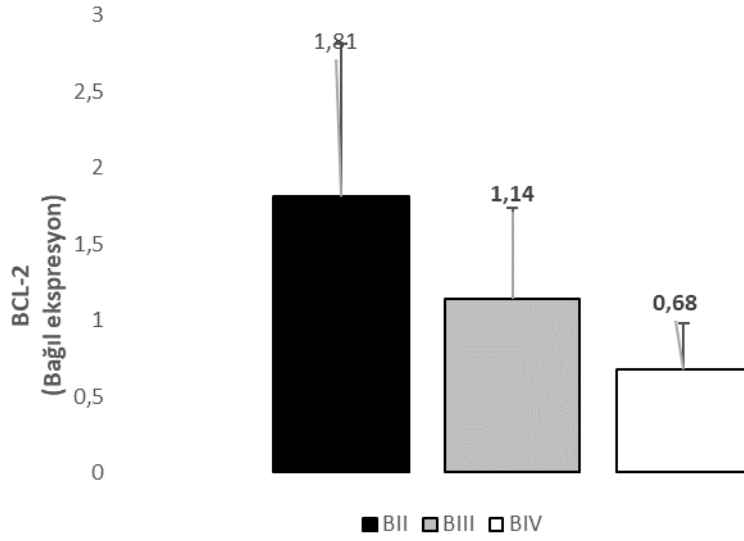
Aktivin A IVF sonrası meydumlara eklenerek BAX gen düzeyi incelenmiş ve sadece BII grubunda artış gözlenmiştir (2,60 kat). BIII ve BIV gruplarında ise BAX düzeyinde azalma meydana gelmiş ve en düşük gen düzeyi BIII grubunda 0,89 kat olarak elde edilmiştir (Şekil 4-8).



Şekil 4-8: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile değişen *Bax* gen ekspresyon düzeyi

Veriler ortalama değerler \pm Standart sapma olarak ifade edilmiştir.

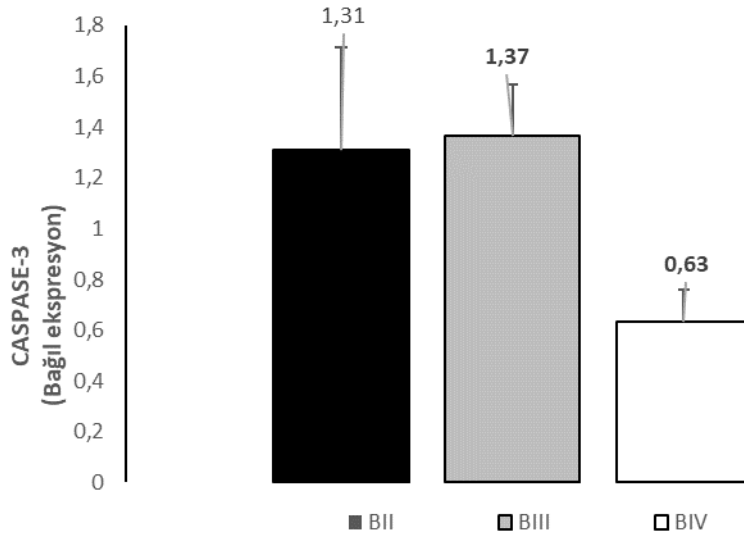
Apoptoz belirleyici genlerden diğeri olan ve anti-apoptotik etkiye sahip *Bcl-2* genindeki değişim şekil 4-9'de verilmiştir. BII ve BIII gruplarında *Bcl-2* gen düzeylerinde artış gözlenirken, BIV grubunda kontrol grubuna göre azalma görülmüştür.



Şekil 4-9: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile değişen *Bcl-2* gen ekspresyon düzeyi

Veriler ortalama değerler \pm Standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Caspase-3 gen düzeylerinde ise BII ve BIII gruplarında artış elde edilirken AIV grubunda azalma meydana gelmiştir (Şekil 4-10). *Bax*, *Bcl-2* ve *Caspase-3* gen düzeylerinde görülen değişim ile elde edilen farklar %95 güven aralığında önemli bir fark oluşturmamıştır.



Şekil 4-10: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile değişen *Caspase-3* gen ekspresyon düzeyi.

Veriler ortalama değerler \pm Standart sapma olarak ifade edilmiştir.

Apoptoza olan etkilerinin incelenmesi amacıyla *Bax/Bcl-2* gen ifade düzeyleri oranı hesaplanarak aralarındaki ilişki incelenmiş ve blastosist oranları ile kıyaslanmıştır.

Tablo 4-6: IVF sonrası aktivin A eklenmesi ile *Bax/Bcl-2* gen ekspresyon düzeyleri oranı.

Grup	<i>Bax/Bcl-2</i>
BII	1,44
BIII	0,78
BIV	0,74

Buna göre BIII ve AIV gruplarından elde edilen *Bax/Bcl-2* oranları 1'den küçük, BII'den alınan sonuç ise 1'den büyük olmuştur (Tablo 4-6).

5. TARTIŞMA

Çeşitli hayvan türleri üzerine yapılan çalışmalarda aktivin A molekülünün embriyonik gelişim üzerine olan etkisi incelenmiş ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Sığır oositlerinin FSH, LH ve 10 ng/ml aktivin A ile maturasyon medyumunda kullanılması sonucu elde edilen blastosist oranlarına etki etmediği görülmüştür. Aktivin A serum ve gonadotropik hormon eklenmemiş medyumda da blastosist oranına etki etmemiştir (Izadyar ve ark., 1996). Bir başka çalışmada ise 1-100 ng/ml aktivin A eklenmesi ile morula (%48-54) ve blastosist (%31-41) yüzdelerinde önemli derecede artışa neden olmuştur. Kontrol gruplarında ise %41 morula ve %25 blastosist oranlarına ulaşılmıştır (Yoshioka ve ark., 1998b). Sığır embriyonik gelişimi ile ilgili yapılan bir çalışmada ise 10 ng/ml aktivin A eklenmiş medyumlarda %57,7 blastosist oranı elde edilerek kontrol grubuna göre (%49,5) önemli derecede artış sağlanırken, 100 ng/ml aktivin A eklenmesi ile %42,8 oranında blastosist elde edilmiş ancak kontrol grubuna göre istatistiksel olarak bir fark yaratmamıştır (Stock ve ark., 1997). *In vitro* maturasyonun ilk üç gününde ortama eklenen 10 ng/ml aktivin A sığır embriyolarının gelişimini olumsuz etkilemiş ve %37 blastosist oranına neden olarak kontrol grubundan (%42,3) daha az blastosist verimi ile sonuçlanmıştır (Trigal ve ark., 2011).

Prepubertal keçi oositlerinin maturasyon medyumlarına 0, 10 ve 100 ng/ml aktivin A eklendiğinde maturasyon oranları (\leq %71,0) ve blastosist oluşma oranları (\leq %24,9) benzer olmuş ve önemli derecede fark görülmemiştir. Sadece *in vitro* kültür ortamına 10 ng/ml aktivin A uygulandığında ise blastosist oranı (%19,5) kontrol grubundan (%13,1) önemli derece farklı olmuştur (Hammami ve ark., 2014). Aynı grubun bir başka çalışmasında ise yine prepubertal keçilerde aktivin A reseptörlerinin oosit matürasyonu ve embryo gelişiminde sentezlendiği görülmüş. Aktivin A'nın tip II reseptörlere bağlanması ile tip I reseptörler aktive olurken fosforilasyonlar zinciri ile devam eden sinyal mekanizması hedef genlerin ifadesi ile sonuçlanmaktadır ve bu nedenle tip II reseptörlerinin sentezi ve lokalizasyonu incelenmiştir. Sonuçlara göre blastosistlerde ActR-IIA reseptörü hem ICM hem de trofoektoderimde bulunurken, ActR-IIB reseptörü sadece ICM'de tespit edilmiştir (Morató ve ark., 2019). Bu da aktivin A'nın *in vitro* gelişim ve blastosist evrelerinde gerekliliğini göstermektedir.

Görüldüğü üzere aktivin A'nın blastosist yüzdesi üzerine farklı etkileri olduğu görülmüştür. Bazı çalışmalarda bölünme ve morula evreleri üzerinde olumlu etkisi olduğu halde blastosist üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı; bazı çalışmalarda ise uygun zamanda eklenen aktivin A'nın blastosist verimini olumlu etkilediği bildirilmiştir. Bu nedenle aktivin A'dan elde edilen sonuçlar şuan için tutarlı ve kesin bir yargıya bağlanamamaktadır. Aktivinler maternal-embriyo etkileşiminde yer alan potansiyel faktörlerdir. Reprodüktif dokularda yüksek düzeydeki ekspresyonlarından dolayı çeşitli hayvan türlerinde embriyonik gelişim ve organogenezde rol oynadığı düşünülmektedir (Woodruff., 1998). Aktivin A ilk kez memeli folikül sıvısından izole edilmiş ve FSH salınmasını uyardığı bildirilmiştir (Ling ve ark., 1986). Aktivin A dimerini oluşturan beta alt birimleri ve aktivin reseptör mRNA'ları oositte ve zigotta morula aşamasına kadar bulunan embriyolarda sentezlenmektedir (Yoshioka ve ark., 1998a). Aynı zamanda östrus döngüsü ve preimplantasyon evrelerinde ovidukt ve endometrium epitel hücrelerinden baskın olarak sentezlenmektedir (Jones ve ark., 2006).

Bu bilgiler doğrultusunda öncelikle koyun oositlerine iki farklı zaman aralığında aktivin A uygulanarak zamanlamanın embriyo gelişimi üzerine olan etkisi incelenmiştir. IVM'de ve IVF sonrası olarak iki farklı periyotta aktivin A uygulanarak elde edilen bölünme, morula ve blastosist yüzdeleri değerlendirilmiştir. Bölünme oranları üzerine olan etki karşılaştırıldığında IVM'ye eklenen aktivin A 50 ng/ml düzeyinde verildiğinde kontrol grubuna göre az da olsa bir artışa neden olmuştur. IVF sonrası eklendiğinde ise oldukça fazla bir artışa sebep olarak en iyi bölünme oranı %92,7 ile 50 ng/ml aktivin A konsantrasyonu ile elde edilmiştir. Bu durumda aktivin A'nın bölünme üzerine etkisinin oldukça yüksek olduğu ancak kültür ortamına doğru zamanda eklenmesi gerektiği sonucuna ulaşılmıştır. Sığırlarda aktivin A'nın 3. hücre bölünme zamanına kadar etki edip embriyonik gelişim üzerine katkı sağladığı bildirilmiştir (Yoshioka ve ark., 1998a). Embriyonik transkripsiyonun aktivasyonu zigotik gen aktivasyonu (ZGA) olarak bilinen ve gelişimin maternal kontrolden embriyoya geçişi ile gerçekleşir. Koyun embriyolarında bu geçiş 8-16 hücre aşamasında gerçekleşmektedir. Ovulasyondan sonraki 3-4 gün içinde bu aşamaya gelen koyun embriyoları oviduktta bulunmaktadır (Crosby ve ark., 1988). Bu nedenle aktivin A'nın burada sentezlenerek embriyoların bölünmesine katkı sağladığı düşünülmektedir. Bu yüzden aktivin A'nın 8-16 hücre aşamasından önce dışarıdan medyuma verilmesi embriyonik gelişim açısından gerekli

görülmektedir. Sonuçlardan elde edilen verilere göre ise aktivin A'nın maturasyonda eklenmesinin olumsuz bir etki göstermemesi ancak IVF sonrası eklenen aktivin A'nın oldukça yüksek oranda bölünmeyi sağlaması zamanlamanın önemini ortaya koymuştur. Sığırlarda Aktivin A miktarı oosit maturasyonu sonrasında ooplazmada azalırken fertilizasyon sonrasında arttığı bildirilmiştir (Silvia ve ark., 2003). Bu veriler aktivin A'nın maturasyon ve fertilizasyonda farklı rollere sahip olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca sığır oviduktunda aktivin A'nın sentezlenmesi de memeli erken embriyonik gelişiminde aktivin A'nın aktif bir role sahip olabileceğini ve maternal kaynaklı aktivin A'nın preimplantasyonda yardımcı olabileceğini göstermektedir (Gandolfi ve ark., 1995).

Büyüme faktörlerinin *in vivo* ortamda potansiyel kaynakları ovidukt sıvısı ve embriyonun kendisi olmaktadır (Watson ve ark., 1992). Bu bulgu sığır ovidukt epiteli ile yapılan hücre kültürü ortamında aktivin A sentezlendiği bilgisi ile desteklenmiştir (Gandolfi ve ark., 1995). Fare embriyolarında ise aktivin A tek hücreli düzeyden kompakt morulaya kadarki bütün embriyonik hücrelerde (Albano ve ark., 1993) ve ovidukt epitel hücrelerinde (Lu ve ark., 1992) bulunmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen morula yüzdeleri karşılaştırıldığında IVM ortamına eklenen aktivin A'nın morula gelişiminde sadece 100ng/ml konsantrasyonda bir artışa neden olduğu (%81,1), IVF sonrası uygulanan aktivin A'nın her konsantrasyonda artışa neden olduğu ve maksimum düzeye (%89,3 morula) 50 ng/ml aktivin A konsantrasyonu ile ulaşıldığı görülmüştür. Koyun embriyolarında zigotik gen aktivasyonunun 8-16 hücre düzeyinde olduğu ve dolayısı ile bu geçişte gerçekleşen embriyonik genom aktivasyonunda aktivin A'nın fonksiyonel bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Bu evreden sonra genomik gen aktivasyonu ve farklılaşma evreleri devreye girmektedir. Morula evresine kadar IVM'ye eklenen aktivin A'nın proliferasyon üzerine olumlu ancak etkisinin az olduğu sonucu elde edilirken, IVF sonrası aktivin A'nın hücre bölünmesi üzerine oldukça fazla etkiye sahip olduğu sonucu aktivin A'nın proliferasyon üzerine olumlu etkisini göstermiştir.

Yalnızca IVM'ye eklenen aktivin A eklenmesi ile sürdürülen deney planı A'da blastosist yüzdelerinde önemli derecede azalma meydana gelerek olumsuz bir etki gözlenmiştir. Bu etki 100 ng/ml aktivin A konsantrasyonu ile maksimum düzeyde meydana gelmiş ve kontrol grubuna göre 5,8 kat daha az blastosist elde edilmiştir. 10 ve 50 ng/ml aktivin A konsantrasyonunda ise bu azalma sırası ile 0,8 ve 1,1 kat olmuştur. Sadece IVF sonrası medyumlara eklenen aktivin A'nın kullanıldığı deney planı B'de ise

artan aktivin konsantrasyonu ile blastosist yüzdeleri 50 ve 100 ng/ml aktivin A ile artmış 10 ng/ml ile hemen hemen hiç değişmemiştir. Maksimum blastosist yüzdesi ise 100 ng/ml aktivin A konsantrasyonu ile ve kontrol grubuna göre 0,25 kat artış ile sonuçlanmıştır. Deney planı B'den elde edilen bu veriler %95'lik güven aralığında anlamlı bir sonuç vermemiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise aktivin A'nın sadece IVM'ye eklenmesi blastosist gelişimi üzerine olumsuz etkiye neden olurken sadece IVF sonrası eklendiğinde bu olumsuz etki görülmemektedir. Sığır oositleri üzerine 500 ng/ml konsantrasyonunda aktivin A'nın kumulus-oosit kompleksi içeren maturasyon medyumuna eklenmesi blastosist yüzdesinde 0,38 kat artışa neden olmuş ancak kumuluslardan ayrılmış oositlerin bulunduğu ortama eklenen aktivin A ile 2,60 kat artış elde edilmiştir (Silva ve Knight, 1998). Rat blastosistlerine uygulanan 100 ng/ml aktivin A'nın kromatin degradasyonuna neden olduğu bildirilmiştir. Rodent türlerinde preantral folikül üzerine hem olumlu (Xiao ve ark., 1992) ve hem de gelişimi engelleyici etkileri olduğu gözlenmiştir (Mizunuma ve ark., 1999). Preantral koyunlarda aktivin A'nın folikül büyümesini arttırdığı gözlenmiş ancak embriyonik gelişime olan etkisi gözlenmemiştir (Thomas ve ark., 2003).

Reproduktif dokular ve embriyoda sentezlenen Aktivin A tip-I (ActRI ve ActRIB) ve tip-II (ActRII ve ActRIIB) reseptörlerine bağlanarak farklı sinyal yollarını aktive eder. Aktivin reseptörleri granuloza, kumulus ve oosit hücre yüzeylerinde bulunmuş ve karakterize edilmiştir (Silva ve ark., 2003). Sığır oositlerinde fonksiyonel aktivin reseptörleri ActRI ile ActRII ya da ActRIIB'nin birleşmesi ile meydana gelerek sinyal molekülerini aktive eder (Yoshioka ve ark., 1998a). Aktive olan bu sinyal molekülerinden bazıları reseptör-ilişkili SMAD'lar olarak bilinmektedir. SMAD molekülleri proliferasyon ve farklılaşmada rol alırlar (Jones ve ark., 2006). SMAD2/3 ve SMAD1/5/8 molekülleri SMAD4 ile heterodimerik bir kompleks oluşturarak aktive olur ve nükleusa taşınarak hedef genlerin ekspresyonlarını düzenler (Massague., 1996). Bu nedenle aktivin A'nın etkisinin değerlendirilmesinde SMAD2 veya SMAD3'ün etkileştiği SMAD4'ün gen ekspresyonunun değerlendirilmesi gerekmektedir. Sığır embriyolarında aktivin A eklenen embriyo kültüründe ActIIR ve ActRIIB gen ekspresyonlarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu ancak *Smad2* de herhangi anlamlı bir değişim olmadığı bildirilmiştir (Park ve ark., 2010). Çalışmamızda elde edilen blastosistlerde aktivin A eklenmesi ile değişen *Smad4* ekspresyon düzeyleri karşılaştırılmıştır. Her iki grupta da istatistiksel açıdan anlamlı bir

fark elde edilememiş ancak deney planı B’de artan aktivin konsantrasyonu ile *Smad4* ekspresyonu arasında ters orantılı bir ilişki ortaya çıkmış ve ekspresyon düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek olarak elde edilmiştir. Deney planı A’da ise sadece 100 ng/ml aktivin A eklendiği durumda gen ekspresyonunda 0,34 kat azalma meydana gelmiştir. Sığır embriyolarında ise *Smad4* ekspresyonu mayotik maturasyon sırasında oositlerde arttığı ve 2-hücre aşamasında maksimum düzeye ulaştığı ve 8-hücre aşamasına kadar yüksek düzeyde kalarak blastosist aşamasında düşük düzeyde kaldığı bildirilmiştir. Aynı zamanda SMAD4 miktarının zigota siRNA mikroenjeksiyonu ile azaltılması bölünme oranlarını, morula ve blastosist gelişimlerini azaltmıştır (Lee ve ark., 2014). Bu sonuçlar SMAD4’ün erken embriyonik gelişimden itibaren gerekli olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda elde edilen deney planı A’da bölünen hücre ve morula yüzdelerinin deney planı B’ye göre düşük olmuş ve blastosist yüzdelerinde de azalmaya neden olmuştur. Bu durumda IVM’ye eklenen aktivin A’nın (100 ng/ml) *Smad4* mRNA miktarı üzerine olumsuz etkiye neden olarak hem en düşük blastosist yüzdesi (%2,21) hem de en düşük *Smad4* gen ifade düzeyine (0,34 kat azalma) neden olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Deney planı B’de ise bu durum tam tersi olarak sonuçlanmıştır. Uygulanan 10, 50 ve 100 ng/ml aktivin A konsantrasyonları sonucu *Smad4* gen ekspresyonu sırası ile 3,99, 2,26 ve 1,24 kat gen ekspresyon artışına neden olmuştur; buna karşın elde edilen blastosist yüzdeleri sırası ile %6,25, %7,94 ve %10,82 oranlarında ters orantılı olarak artış göstermiştir. *Smad4* mRNA’sının belirli oranda düşmesinin elde edilen blastosist yüzdesini arttırdığı ancak kontrol grubuna göre düşük gen ifadesinin blastosist gelişimine olumsuz yönde etki ettiği görülmüştür.

BMP4 proteini; hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli role sahiptir ve TGF- β protein ailesinde yer almaktadır (Massagué ve ark., 2000). BMP4 de aktivin A ile benzer olarak SMAD1/5/8 fosforilasyonunu indüklemekte ve bu faktörlerin nükleusa taşınmalarını sağlayarak çeşitli genlerin regülasyonuna neden olmaktadır. *Bmp4*; polar tropoektoderm, ekstraembriyonik ektoderm ve ekstraembriyonik mezoderimde ifade edilmektedir (Gotoh ve ark., 2005). Ancak embriyonik gelişimdeki *Bmp4* ekspresyonunun moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılmamış durumdadır. *Bmp4* geninin susturulması farelerde mezodermal farklılaşmayı engelleyerek embriyonik gelişimin durmasına neden olmaktadır (Wang ve ark., 2014). Çalışmamızda *Bmp4* geni istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir farklılık göstermemiş, IVM’ye aktivin A

eklenmesi ile bütün aktivin A konsantrasyonlarında *Bmp4* ekspresyonunun blastosistlerde azalmasına neden olmuş ancak IVF sonrası eklenmesi ile *Bmp4* gen ifade düzeyi artmıştır.

Aktivin A'nın farklı zaman aralıklarında ve farklı konsantrasyonlarının embriyo kalitesi üzerine etkilerini incelemek amacıyla blastosistlerde bağıl gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldı. Erken embriyonik gelişim ve *in vitro* ortam şartlarının neden olduğu stres etkilerinin sonuçlarının gözlenebilmesi için apoptoz faktörlerinin incelenmesi oldukça uygun bir yöntem olmuştur (Melka ve ark., 2010; Bakri ve ark., 2016). Bu nedenle *Bcl-2* ilişkili X proteini (*Bax*) ve B-hücre CLL/lenfoma 2 (*Bcl-2*) ve *Caspase-3* gen ekspresyon değişimleri elde edilen blastosistlerde incelenmiştir. BAX proteini; farklı stress durumlarında mitokonriyal dış membranın geçirgenlik durumunu değiştirerek hücre ölümünü tetiklemekte, BCL-2 ise BAX aktivitesini inhibe ederek anti-apoptotik etki göstermektedir. Caspase-3 ise BAX/BCL-2 kontrolünde başlatılan apoptoz olayında apoptozun ilerlemesinde anahtar rol oynamaktadır (Rudel., 1999). Aynı zamanda Caspase-3, BCL-2 anti-apoptotik fonksiyonunu inaktive ederek hücre ölümünü hızlandırmaktadır. BCL-2 ve Caspase-3 arasında geri bildirimli bir döngü olmasına rağmen BCL-2 her zaman apoptozu inhibe edememektedir. Caspase-3'ün ise BCL-2'den bağımsız bir yolak ile de hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiştir (Cheng ve ark., 1997). Bunun yanı sıra pro-apoptotik genlerin anti-apoptotik genlere oranının hücrenin yaşayacağını ya da öleceğini belirlediği öne sürülmektedir (Oltval ve ark., 1993). Yapılan çalışmalarda *Bax/Bcl-2* oranını yüksek olması hücrenin apoptoza girme ihtimalinin yüksek olduğunu göstermiştir (Jarskog ve ark., 2004). Çalışmamızda Aktivin A'nın her iki deney grubunda da eklenmesi; *Bax*, *Bcl-2* ve *Caspase-3* bağıl gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı bir farka neden olmamıştır. *Bax* ekspresyonu deney planı B'de kontrol grubu ile kıyaslandığında en yüksek ekspresyonunu 10 ng/ml aktivin A ile göstermiş ve artan aktivin A ile ekspresyonu azalmıştır. Blastosist oranları ise bu azalma ile ters orantılı olarak artış göstermiştir. Deney planı A'da ise *Bax* ekspresyonu ile blastosist yüzdesi arasında bir ilişki gözlenmemiştir. *Bax/Bcl-2* oranlarının 1 değerinden büyük ya da küçük olmasına göre apoptoz ile blastosist yüzdeleri arasında bir ilişki olup olmadığı araştırılmıştır. Deney planı B'de artan aktivin A konsantrasyonu uygulanması ile *Bax/Bcl-2* oranlarında azalma görülmüştür. Dolayısı ile apoptoz oranında artan aktivin A konsantrasyonu ile birlikte azalma ve elde edilen blastosist oranlarında artış

beklenmektedir. Bu ilişki deney planı B’de elde edilirken deney planı A’da böyle bir ilişki görülmemiştir. Sığır embriyolarında yapılan bir çalışmada da aktivin A’nın apoptotik etkisi incelenmiş ve embriyonik gelişimin desteklendiği deney şartlarında apoptoz oranlarında önemli derecede artış gözlenmiştir. Bu artışın ise hızlı bölünmesi sağlanan hücrelerde bölünmenin programlanmasında hatalar olabileceği ve apoptozun kontrolünde problemlere neden olabileceği öne sürülmüştür (Trigal ve ark., 2011). Aktivin A’nın embriyonik gelişimde apoptotik etkisi üzerine olan etkisinin aydınlatılabilmesi için farklı hayvan türlerinde çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Sonuç Olarak;

Aktivin A proteininin *in vitro* maturasyon aşamasında medyuma eklenmesinin blastosist oranına olumsuz etkide bulunabileceği ancak bölünme oranlarında bu olumsuz etkiyi göstermediği görülmüştür. *In vitro* fertilizasyon sonrası aktivin A kullanımının ise embriyonik gelişime olumlu yönde katkı sağladığı anlaşılmıştır. *Bmp4* ve *Smad4* büyüme faktörlerinin gen ekspresyonları ise aktivin A eklenmesi ile önemli derecede değişime neden olmamış aynı zamanda *Bax*, *Bcl-2* ve *Caspase-3* apoptoz genlerinin ekspresyon düzeyleri de koyun blastosistlerinde aktivin A ile etkilenmemiştir. Aktivin A proteininin *in vitro* medyumlara eklenmesinde zamanlamanın önemi ortaya çıkmış ve kullanılan konsantrasyonların embriyonik gelişimde etkili rol oynadığı kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., & Hoshi, H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular reproduction and development*, 61(1), 57-66.
- Alak, B. M., Smith, G. D., Woodruff, T. K., Stouffer, R. L., & Wolf, D. P. (1996). Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization *in vitro* by inhibin A and activin A. *Fertility and sterility*, 66(4), 646-653.
- Alak, B. M., Coskun, S., Friedman, C. I., Kennard, E. A., Kim, M. H., & Seifer, D. B. (1998). Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. *Fertility and sterility*, 70(6), 1126-1130.
- Armstrong, D. T., Kotaras, P. J., & Earl, C. R. (1997). Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reproduction, Fertility and Development*, 9(3), 333-340.
- Armstrong, D. T. (2001). Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 55(6), 1303-1322.
- Bakri, N. M., Ibrahim, S. F., Osman, N. A., Hasan, N., Jaffar, F. H. F., Rahman, Z. A., & Osman, K. (2016). Embryo apoptosis identification: oocyte grade or cleavage stage?. *Saudi journal of biological sciences*, 23(1), S50-S55.
- Baldassarre, H., Furnus, C. C., De Matos, D. G., & Pessi, H. (1996). *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*, 45(3), 707-717.
- Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C., Lazaris, A., & Karatzas, C. N. (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology*, 57(1), 275-284.
- Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Gauthier, M., Neveu, N., Lapointe, J., ... & Lazaris, A. (2003). Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, 59(3-4), 831-839.

- Beilby, K. H., Grupen, C. G., Thomson, P. C., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2009). The effect of insemination time and sperm dose on pregnancy rate using sex-sorted ram sperm. *Theriogenology*, *71*(5), 829-835.
- Birler, S., Pabuccuoglu, S., Atalla, H., Alkan, S., Ozdaş, O. B., Bacinoğlu, S., ... & Zavar, I. (2002). *In vitro* uretilen koyun embriyolarının transferi. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, *26*, 1421-1426.
- Birler, S., Pabuccuoglu, S., Alkan, S., Özdaş, Ö. B., Atalla, H., & İleri, İ. K. (2002). Development of *in vitro* derived sheep embryos to the blastocyst stage. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, *26*(4), 891-894.
- Bjarnadottir, H., & Jonsson, J. J. (2005). A rapid real-time qRT-PCR assay for ovine β -actin mRNA. *Journal of biotechnology*, *117*(2), 173-182.
- Braw-Tal, R. (1994). Expression of mRNA for follistatin and inhibin/activin subunits during follicular growth and atresia. *Journal of molecular endocrinology*, *13*(3), 253-264.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T., & Pfaffl, M. W. (2005). Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *Journal of molecular endocrinology*, *34*(3), 597-601.
- Camargo, L. S. D. A., Viana, J. H. M., Sá, W. F. D., Ferreira, A. D. M., Ramos, A. D. A., & Vale Filho, V. R. (2006). Factors influencing *in vitro* embryo production. *Animal reproduction*, *3*(1), 19-28.
- Catalá, M. G., Izquierdo, D., Uzbekova, S., Morató, R., Roura, M., Romaguera, R., ... & Paramio, M. T. (2011). Brilliant Cresyl Blue stain selects largest oocytes with highest mitochondrial activity, maturation-promoting factor activity and embryo developmental competence in prepubertal sheep. *Reproduction*, *142*(4), 517-527.
- Catalá, M. G., Izquierdo, D., Rodríguez-Prado, M., Hammami, S., & Paramio, M. T. (2012). Effect of oocyte quality on blastocyst development after *in vitro* fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in a sheep model. *Fertility and sterility*, *97*(4), 1004-1008.
- Catt, S. L., Catt, J. W., Gomez, M. C., Maxwell, W. M., & Evans, G. (1996). Birth of a male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. *The Veterinary record*, *139*(20), 494-495.

- Casanova, E. A., Okoniewski, M. J., & Cinelli, P. (2012). Cross-species genome wide expression analysis during pluripotent cell determination in mouse and rat preimplantation embryos. *PloS one*, 7(10), e47107.
- Cecconi, S., Mauro, A., Capacchietti, G., Berardinelli, P., Bernabo, N., Di Vincenzo, A. R., ... & Barboni, B. (2007). Meiotic maturation of incompetent prepubertal sheep oocytes is induced by paracrine factor (s) released by gonadotropin-stimulated oocyte-cumulus cell complexes and involves mitogen-activated protein kinase activation. *Endocrinology*, 149(1), 100-107.
- Cha, K. Y., & Chian, R. C. (1998). Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction Update*, 4(2), 103-120.
- Chen, D. I., Zhao, M., & Mundy, G. R. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth factors*, 22(4), 233-241.
- Chen, A., Zhang, R., & Yu, S. (2008). Comparative results of survival of vitrified biopsied goat embryos and mouse morulae. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 32(2), 93-97.
- Cheng, E. H. Y., Kirsch, D. G., Clem, R. J., Ravi, R., Kastan, M. B., Bedi, A., ... & Hardwick, J. M. (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science*, 278(5345), 1966-1968.
- Chian, R. C., Niwa, K., & Sirard, M. A. (1994). Effects of cumulus cells on male pronuclear formation and subsequent early development of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 41(7), 1499-1508.
- Cognie, Y. (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51(1), 105-116.
- Cognie, Y., Baril, G., Poulin, N., & Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59(1), 171-188.
- Cognié, Y., Poulin, N., Locatelli, Y., & Mermillod, P. (2004). State-of-the-art production, conservation and transfer of in-vitro-produced embryos in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, 16(4), 437-445.
- Coskun, S., & Lin, Y. C. (1994). Effects of transforming growth factors and activin-A on *in vitro* porcine oocyte maturation. *Molecular Reproduction and Development*, 38(2), 153-159.
- Cox, J. F., & Alfaro, V. (2007). *In vitro* fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reproduction in domestic animals*, 42(1), 83-87.

- Cran, D. G., & Johnson, L. A. (1996). The predetermination of embryonic sex using flow cytometrically separated X and Y spermatozoa. *Human Reproduction Update*, 2(4), 355-363.
- Journal of reproduction and fertility. 2000;118:367-73.
- Crosby, I. M., Gandolfi, F., & Moor, R. M. (1988). Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *Journal of reproduction and fertility*, 82(2), 769-775.
- Cunningham, E. P. (1999). The application of biotechnologies to enhance animal production in different farming systems. *Livestock Production Science*, 58(1), 1-24.
- Debode, F., Marien, A., Janssen, É., Bragard, C., & Berben, G. (2017). Influence of the amplicon length on real-time PCR results. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 21(1), 3-11.
- Degrelle, S. A., Campion, E., Cabau, C., Piumi, F., Reinaud, P., Richard, C., ... & Hue, I. (2005). Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Developmental biology*, 288(2), 448-460.
- Demir, R. (1995). *İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi*. Palme Yayıncılık.
- De La Torre-Sanchez, J. F., Preis, K., & Seidel, G. E. (2006). Metabolic regulation of in-vitro-produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. *Reproduction, Fertility and Development*, 18(5), 585-596.
- Donaldson, C. J., Vaughan, J. M., Corrigan, A. Z., Fischer, W. H., & Vale, W. W. (1999). Activin and inhibin binding to the soluble extracellular domain of activin receptor II. *Endocrinology*, 140(4), 1760-1766.
- Duranthon, V., & Renard, J. P. (2001). The developmental competence of mammalian oocytes: a convenient but biologically fuzzy concept. *Theriogenology*, 55(6), 1277-1289.
- Eckert, J., & Niemann, H. (1998). mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor-beta in bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Molecular human reproduction*, 4(10), 957-965.
- Ectors, F. J., Vanderzwalmen, P., Van Hoeck, J., Nijs, M., Verhaegen, G., Delvigne, A., & Leroy, F. (1997). Relationship of human follicular diameter with oocyte fertilization and development after in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human reproduction (Oxford, England)*, 12(9), 2002-2005.

- Elder, K., & Dale, B. (2010). *In-vitro fertilization*. Cambridge University Press.
- Gandolfi, F. (1994). Autocrine, paracrine and environmental factors influencing embryonic development from zygote to blastocyst. *Theriogenology*, *41*(1), 95-100.
- Gandolfi, F., Modina, S., Brevini, T. A. L., Passoni, L., Petraglia, F., Lauria, A., & Artini, P. (1995). Activin β A subunit is expressed in bovine oviduct. *Molecular reproduction and development*, *40*(3), 286-291.
- Gilchrist, R. B., & Thompson, J. G. (2007). Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*, *67*(1), 6-15.
- Giuliano, S., Director, A., Gambarotta, M., Trasorras, V., & Miragaya, M. (2008). Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). *Animal reproduction science*, *104*(2-4), 359-369.
- Gotoh, N., Manova, K., Tanaka, S., Murohashi, M., Hadari, Y., Lee, A., ... & Nakazato, H. (2005). The docking protein FRS2 α is an essential component of multiple fibroblast growth factor responses during early mouse development. *Molecular and cellular biology*, *25*(10), 4105-4116.
- Gudnason, H., Dufva, M., Bang, D. D., & Wolff, A. (2007). Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic acids research*, *35*(19), e127.
- Gupta, P. S. P., Ravindra, J. P., Kumar, V. G., Raghu, H. M., & Nandi, S. (2005). Stimulation of *in vitro* ovine oocyte maturation with a novel peptide isolated from follicular fluid of the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Small Ruminant Research*, *59*(1), 33-40.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (Eds.). (2013). *Reproduction in farm animals*. John Wiley & Sons.
- Hammami, S., Morató, R., Romaguera, R., Roura, M., Catalá, M. G., Paramio, M. T., ... & Izquierdo, D. (2013). Developmental Competence and Embryo Quality of Small Oocytes from Pre-pubertal Goats Cultured in IVM Medium Supplemented with Low Level of Hormones, Insulin–Transferrin–Selenium and Ascorbic Acid. *Reproduction in Domestic Animals*, *48*(2), 339-344.
- Hammami, S. (2014). *Ín vitro* embryo production from prepubertal goat oocytes in different culture media. Universitat Autònoma De Barcelona. Doktora tezi

- Hammami, S., Izquierdo, D., Catala, M. G., Paramio, M. T., & Morato, R. (2014). *In vitro* developmental competence of prepubertal goat oocytes cultured with recombinant activin-A. *animal*, 8(1), 94-101.
- Harris, D. (2012). Inhibition of ERK and GSK3 signalling pathways promotes development and expression of pluripotent markers in bovine blastocysts (Doctoral dissertation, University of Waikato).
- Heldin, C. H., Miyazono, K., & Ten Dijke, P. (1997). TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390(6659), 465.
- IMAL, M. (2017). Effect of oocyte diameter on *in vitro* fertilization in iraqi local goats. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 5(6): 249-252.
- Ni, H., Sheng, X., Cui, X., Gu, M., Liu, Y., Qi, X., ... & Guo, Y. (2015). Epidermal growth factor-mediated mitogen-activated protein kinase3/1 pathway is conducive to *in vitro* maturation of sheep oocytes. *PloS one*, 10(3), e0120418.
- Hollinshead, F. K., O'Brien, J. K., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (2002). Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X-or Y-chromosome-bearing spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 14(8), 503-508.
- Hollinshead, F. K., Evans, G., Evans, K. M., Catt, S. L., Maxwell, W. M. C., & O'Brien, J. K. (2004). Birth of lambs of a pre-determined sex after *in vitro* production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*, 127(5), 557-568.
- Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T., & Callesen, H. (1999). High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*, 52(4), 683-700.
- Hussein, T. S., Thompson, J. G., & Gilchrist, R. B. (2006). Oocyte-secreted factors enhance oocyte developmental competence. *Developmental biology*, 296(2), 514-521.
- Itoh, M., Igarashi, M., Yamada, K., Hasegawa, Y., Seki, M., Eto, Y., & Shibai, H. (1990). Activin A stimulates meiotic maturation of the rat oocyte *in vitro*. *Biochemical and biophysical research communications*, 166(3), 1479-1484.

- Izadyar, F., Zeinstra, E., Colenbrander, B., Vanderstichele, H. M. J., & Bevers, M. M. (1996). *In vitro* maturation of bovine oocytes in the presence of bovine activin A does not affect the number of embryos. *Animal reproduction science*, 45(1-2), 37-45.
- Izadyar, F., Zeinstra, E., & Bevers, M. M. (1998). Follicle-stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of *in vitro* matured bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 51(3), 339-345.
- Izquierdo, D., Villamediana, P., Palomo, M. J., Mogas, T., & Paramio, M. T. (1998). Effect of sperm capacitation and fertilization media on IVF and early embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 49(8), 1501-1513.
- Izquierdo, D., Villamediana, P., Lopez-Bejar, M., & Paramio, M. T. (2002). Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*, 57(5), 1431-1441.
- İleri İk, Ak K, Pabuççuoğlu S, Birler S. (2000). Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama, Ders Notu, *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayını*, 59, 75-90.
- Jarskog, L. F., Selinger, E. S., Lieberman, J. A., & Gilmore, J. H. (2004). Apoptotic proteins in the temporal cortex in schizophrenia: high Bax/Bcl-2 ratio without caspase-3 activation. *American Journal of Psychiatry*, 161(1), 109-115.
- Jones, R. L., Tu'uhevaha, J., Nie, G., Sanchez-Partida, L. G., Findlay, J. K., & Salamonsen, L. A. (2006). Complex expression patterns support potential roles for maternally derived activins in the establishment of pregnancy in mouse. *Reproduction*, 132(5), 799-810.
- Kane, M. T. (2003). A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. *Animal reproduction science*, 79(3-4), 171-190.
- Kątska-Książkiewicz, L., Opiela, J., & Ryńska, B. (2007). Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology*, 68(5), 736-744.
- Keskintepe, L., Darwish, G. M., Kenimer, A. T. & Brackett, B. G., (1994). Termdevelopment of caprine embryos derived from immature oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, 42, 527-535.

- Khatir, H., Lonergan, P., Carolan, C. & Mermillod, P., (1996). Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte developmental competence. *Mol. Reprod. Dev.*, 45, 231-239.
- Kharche, S. D., Goel, A. K., Jindal, S. K. & Sinha, N. K., (2006). *In vitro* maturation of caprine oocytes in different concentrations of estrous goat serum. *Small Rumin. Res.* 64, 186-189
- Kidder, G. M. (1992). The genetic program for preimplantation development. *Dev. Genet.* 13:319-325.
- Knight, P. G., & Glistler, C. (2003). Local roles of TGF- β superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Animal reproduction science*, 78(3-4), 165-183.
- Koeman, J., Keefer, C. L., Baldassarre, H. & Downey, B. R. (2003). Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology*, 60, 879-889.
- Kopecny, V. (1989). High-resolution autoradiographic studies of comparative nucleogenesis and genome reactivation during early embryogenesis in pig, man and cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 29(5), 589-600.
- Krisher, R. L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of animal science*, 82(suppl_13), E14-E23.
- Kumar, S., Millar, J. D. Watson, P. F., (2003). The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiol.* 46, 246-253
- Lane, M.-E., Therien, I., Moreau, R. & Manjunath, P., (1999). Heparin and high density lipoprotein mediate bovine sperm capacitation by different mechanisms. *Biol. Reprod.* 60, 169-175.
- Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruip, T., Niemann, H., & Galli, C. (2002). Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction*, 67(3), 767-775.
- Lee, K. B., Bettegowda, A., Wee, G., Ireland, J. J., & Smith, G. W. (2009). Molecular determinants of oocyte competence: potential functional role for maternal (oocyte-derived) follistatin in promoting bovine early embryogenesis. *Endocrinology*, 150(5), 2463-2471.

- Li, F., Pi, W. H., Zhu, H. Z., Zhang, S. S., Liu, S. R., & Xue, J. L. (2006). The effect of estrous ewe serum and heparin on *in vitro* fertilization and subsequent embryonic development in sheep. *Small ruminant research*, 63(3), 226-232.
- Ling, N., Ying, S. Y., Ueno, N., Shimasaki, S., Esch, F., Hotta, M., & Guillemin, R. (1986). Pituitary FSH is released by a heterodimer of the β -subunits from the two forms of inhibin. *Nature*, 321(6072), 779.
- Lee, K. B., Zhang, K., Folger, J. K., Knott, J. G., & Smith, G. W. (2014). Evidence supporting a functional requirement of SMAD4 for bovine preimplantation embryonic development: a potential link to embryotrophic actions of follistatin. *Biology of reproduction*, 91(3).
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (1995). *Molecular cell biology* (Vol. 3). New York: WH Freeman.
- Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P., & Boland, M. P. (1999). Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Reproduction*, 117(1), 159-167.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Moreira, P. M., Pintado, B., De La Fuente, J., & Boland, M. P. (2003). Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. *Biology of Reproduction*, 69(4), 1424-1431.
- Lonergan, P., Pedersen, H. G., Rizos, D., Greve, T., Thomsen, P. D., Fair, T., ... & Boland, M. P. (2004). Effect of the post-fertilization culture environment on the incidence of chromosome aberrations in bovine blastocysts. *Biology of reproduction*, 71(4), 1096-1100.
- Lozano, J. M., Lonergan, P., Boland, M. P., & O'Callaghan, D. (2003). Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. *Reproduction*, 125(4), 543-553.
- Lu RZ, Shiota K. (1990). Activin A (EDF) releases the "two-cell block" of mouse embryo in culture. *Anim Reprod Sci*, 36:127-32.
- Lu, R. Z., Matsuyama, S., Nishihara, M., & Takahashi, M. (1993). Developmental expression of activin/inhibin β A, β B, and α subunits, and activin receptor-IIB genes in preimplantation mouse embryos. *Biology of reproduction*, 49(6), 1163-1169.

- Mahoete, N. E. (2010). *In vitro embryo production and semen cryopreservation in sheep* (Doctoral dissertation, University of the Free State).
- Marco-Jimenez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vincente, J. S. & Viudes-de-Castro, M. P., (2005). Effect of semen collection method on pre-and post-thaw Guirra ram spermatozoa. *Theriogenology*, 64, 1756-1765
- Marco-Jimenez, F., Vincente, J. S. & Viudes-de-Castro, M. P., (2008). Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electro-ejaculation in Guirra ram. *Reprod. Dom. Anim.*, 43, 403–408
- Marei, W. F., Salavati, M., & Fouladi-Nashta, A. A. (2013). Critical role of hyaluronidase-2 during preimplantation embryo development. *MHR: Basic science of reproductive medicine*, 19(9), 590-599.
- Massagué, J. (1996). TGF β signaling: receptors, transducers, and Mad proteins. *Cell*, 85(7), 947-950.
- Massagué, J., Blain, S. W., & Lo, R. S. (2000). TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell*, 103(2), 295-309.
- Mattioli, M., Galeati, G., & Seren, E. (1988). Effect of follicle somatic cells during pig oocyte maturation on egg penetrability and male pronucleus formation. *Gamete Research*, 20(2), 177-183.
- Mazur, P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American journal of physiology-cell physiology*, 247(3), C125-C142.
- McCullagh, D.R. (1932) Dual endocrine activity of the testes. *Science*, 76, 19–20.
- Melka, M. G., Rings, F., Hölker, M., Tholen, E., Havlicek, V., Besenfelder, U., ... & Tesfaye, D. (2010). Expression of apoptosis regulatory genes and incidence of apoptosis in different morphological quality groups of *in vitro*-produced bovine pre-implantation embryos. *Reproduction in domestic animals*, 45(5), 915-921.
- Memili, E., & First, N. L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*, 8(1), 87-96.
- Mizunuma, H., Liu, X., Andoh, K., Abe, Y., Kobayashi, J., Yamada, K., ... & Hasegawa, Y. (1999). Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. *Endocrinology*, 140(1), 37-42.

- Meunier H, Cajander SB, Roberts VJ, Rivier C, Sawchenko PE, Hsueh AJ, Vale W. (1988). Rapid changes in the expression of inhibin a-, bA-, and bB-subunits in ovarian cell types during the rat estrous cycle. *Mol Endocrinol*, 2:1352–1363.
- Moce, E. & Graham, J. K., (2008). *In vitro* evaluation of sperm quality. *Anim. Reprod. Sci.*, 105, 104-118
- Mohammadpour, A. A. (2007). Comparative histomorphological study of ovary and ovarian follicles in Iranian Lori-Bakhtiari sheep and native goat. *Pak. J. Biol. Sci*, 10(4), 673-5.
- Moore, S. G., & Hasler, J. F. (2017). A 100-year review: reproductive technologies in dairy science. *Journal of dairy science*, 100(12), 10314-10331.
- Morató, R., Hammami, S., Paramio, M. T., & Izquierdo, D. (2019). Activin-A receptor expression patterns in prepubertal goat oocytes and derived embryos. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*
- Morton, K. M., De Graaf, S. P., Campbell, A., Tomkins, L. M., Chis Maxwell, W. M., & Evans, G. (2005). Repeat ovum pick-up and *in vitro* embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reproduction in domestic animals*, 40(5), 422-428.
- Morton, K. M. (2008). Developmental capabilities of embryos produced *in vitro* from prepubertal lamb oocytes. *Reproduction in domestic animals*, 43, 137-143.
- Mossa, F., Berlinguer, F., Succu, S., Madeddu, M., Bebbere, D., Leoni, G. G., & Naitana, S. (2006). Follicle number affects *in vitro* developmental competence of sheep oocytes. In *Veinte años de buiatría: actas del XIV Congreso Internacional de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes, Lugo-Santiago de Compostela, 12-15 de julio de 2006* (pp. 545-549). Universidade de Santiago de Compostela.
- Mucci, N., Aller, J., Kaiser, G. G., Hozbor, F., Cabodevila, J., & Alberio, R. H. (2006). Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 65(8), 1551-1562.
- Nedambale, T. L. (1999). Evaluation of cryopreservation methods for *in vitro* produced bovine embryos.

- Niu, Y., Greube, A., Ji, W., & Jewgenow, K. (2006). The application of *in vitro* sperm competition test to evaluate the impact of ZP-derived peptides on fertilization capacity of cat sperm. *Theriogenology*, *66*(4), 989-995.
- Quero, J. O., Millán, M. M., Cordoba, M. V., & Franganillo, A. R. (1994). The influence of different types of media supplement on the meiotic maturation of bovine oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, *41*(2), 405-411.
- O'Brien, J. K., Catt, S. L., Ireland, K. A., Maxwell, W. M. C., & Evans, G. (1997). *In vitro* and *in vivo* developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. *Theriogenology*, *47*(7), 1433-1443.
- Oltval, Z. N., Milliman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *cell*, *74*(4), 609-619.
- Ortiz-de-Montellano, M., Galindo-Maldonado, F., Cavazos-Arizpe, E. O., Aguayo-Arceo, A. M., Torres-Acosta, J. F. J., & Orihuela, A. (2007). Effect of electroejaculation on the serum cortisol response of Criollo goats (*Capra hircus*). *Small ruminant research*, *69*(1-3), 228-231.
- Palmer, C. W., Brito, L. F. C., Arteaga, A. A., Söderquist, L., Persson, Y., & Barth, A. D. (2005). Comparison of electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling feedlot beef bulls. *Animal reproduction science*, *87*(1-2), 25-31.
- Pang, Y., & Ge, W. (1999). Activin stimulation of zebrafish oocyte maturation *in vitro* and its potential role in mediating gonadotropin-induced oocyte maturation. *Biology of reproduction*, *61*(4), 987-992.
- Paramio, M. T. (2010). *In vivo* and *in vitro* embryo production in goats. *Small Ruminant Research*, *89*(2-3), 144-148.
- Park, J. E., Oh, H. J., Hong, S. G., Jang, G., Kim, M. K., & Lee, B. C. (2010). Effects of Activin A on the *In vitro* Development and mRNA Expression of Bovine Embryos Cultured in Chemically-Defined Two-Step Culture Medium. *Reproduction in domestic animals*, *45*(4), 585-593.
- Pavlok, A., Lucas-Hahn, A., & Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular reproduction and development*, *31*(1), 63-67.

- Pawshe, C. H., Totey, S. M., & Jain, S. K. (1994). A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, *42*(1), 117-125.
- Pfeifer, M., Luiz, F., Schneider, A., & Corrêa, M. N. (2008). Factors that affect the *in vitro* production of bovine embryos: A review. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *21*(1), 109-120.
- Ptak, G., Clinton, M., Barboni, B., Muzzeddu, M., Cappai, P., Tischner, M., & Loi, P. (2002). Preservation of the wild European mouflon: the first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. *Biology of reproduction*, *66*(3), 796-801.
- Raghu, H. M., Nandi, S., & Reddy, S. M. (2002). Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes *in vitro*. *Reproduction, Fertility and Development*, *14*(1), 55-61.
- Rho, G. J., Hahnel, A. C., & Betteridge, K. J. (2001). Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos *in vitro*. *Theriogenology*, *56*(3), 503-516.
- Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M. P., Arroyo-Garcia, R., Pintado, B., Fuente, J. D. L., & Gutierrez-Adan, A. (2002). Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biology of reproduction*, *66*(3), 589-595.
- Rizos, D., A. Gutierrez-Adan, S. Perez-Garnelo, F. J. de la, M. P. Boland, and P. Lonergan. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.*, *68*:236-243.
- Roberts, V. J., Barth, S. A. R. A., el-Roeiy, A. L. B. E. R. T., & Yen, S. S. (1993). Expression of inhibin/activin subunits and follistatin messenger ribonucleic acids and proteins in ovarian follicles and the corpus luteum during the human menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *77*(5), 1402-1410.
- Romaguera, R., Moll, X., Morató, R., Roura, M., Palomo, M. J., Catalá, M. G., ... & Paramio, M. T. (2011). Prepubertal goat oocytes from large follicles result in similar blastocyst production and embryo ploidy than those from adult goats. *Theriogenology*, *76*(1), 1-11.

- Rowzee, A. M., Lazzarino, D. A., Rota, L., Sun, Z., & Wood, T. L. (2008). IGF ligand and receptor regulation of mammary development. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 13(4), 361-370.
- Rudel, T. (1999). Caspase inhibitors in prevention of apoptosis. *Herz*, 24(3), 236-241.
- Salamon, S. & Maxwell, W. M., (2000). Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, 62, 77-111.
- Schöler, H. R., Balling, R., Hatzopoulos, A. K., Suzuki, N., & Gruss, P. (1989). Octamer binding proteins confer transcriptional activity in early mouse embryogenesis. *The EMBO journal*, 8(9), 2551-2557.
- Schmittgen, T. D., & Zakrajsek, B. A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 46(1-2), 69-81.
- Seidel, G. E., & Garner, D. L. (2002). Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Reproduction*, 124(6), 733-743.
- Shelton, M., (1995). Harnessing the biological potential of sheep in providing protein for growing world population. *J. Anim. Sci.*, 73, 243 (Abstr.)
- Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., & Hosseini, S. M. (2005). A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for *in vitro* maturation. *Small Ruminant Research*, 58(3), 283-286.
- Shirazi, A., Ardali, M. A., Ahmadi, E., Nazari, H., Mamuee, M., & Heidari, B. (2012). The effect of macromolecule source and type of media during *in vitro* maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development. *Journal of reproduction & infertility*, 13(1), 13.
- Silva, C. C., & Knight, P. G. (1998). Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, 58(2), 558-565.
- Silva, C. C., Groome, N. P., & Knight, P. G. (2003). Immunohistochemical localization of inhibin/activin alpha, betaA and betaB subunits and follistatin in bovine oocytes during *in vitro* maturation and fertilization. *Reproduction*, 125(1), 33-42.
- Sirard, M. A., Richard, F., Blondin, P., & Robert, C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, 65(1), 126-136.
- Sirard, M. A., Desrosier, S., & Assidi, M. (2007). In vivo and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. *Theriogenology*, 68, S71-S76.



- Slavik, T., Fulka, J., & Goll, I. (1992). Pregnancy rate after the transfer of sheep embryos originated from randomly chosen oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Theriogenology*, 38(4), 749-756.
- Stangl, M., Kühholzer, B., Besenfelder, U., & Brem, G. (1999). Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology*, 52(4), 709-716.
- Stock, A. E., Woodruff, T. K., & Smith, L. C. (1997). Effects of inhibin A and activin A during *in vitro* maturation of bovine oocytes in hormone-and serum-free medium. *Biology of reproduction*, 56(6), 1559-1564.
- Sugulle, A. H., Bhuiyan, M. M. U., & Shamsuddin, M. (2006). Breeding soundness of bulls and the quality of their frozen semen used in cattle artificial insemination in Bangladesh. *Livestock Research for Rural Development*, 18(4), 1-10.
- Sutton, M. L., Gilchrist, R. B., & Thompson, J. G. (2003). Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. *Human reproduction update*, 9(1), 35-48.
- Tajik, P., & Esfandabadi, N. S. (2003). *In vitro* maturation of caprine oocytes in different culture media. *Small Ruminant Research*, 47(2), 155-158.
- Tibary, A., Anouassi, A., & Khatir, H. (2005). Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *Theriogenology*, 64(3), 618-638.
- Tisdall, D. J., Hudson, N., Smith, P., & McNatty, K. P. (1994). Localization of ovine follistatin and α and β A inhibin mRNA in the sheep ovary during the oestrous cycle. *Journal of molecular endocrinology*, 12(2), 181-193.
- Thomas, F. H., Armstrong, D. G., & Telfer, E. E. (2003). Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1(1), 76.
- Thompson, J. G., Simpson, A. C., Pugh, P. A., & Tervit, H. R. (1992). *In vitro* development of early sheep embryos is superior in medium supplemented with human serum compared with sheep serum or human serum albumin. *Animal Reproduction Science*, 29(1-2), 61-68.
- Thompson, J. G., Gardner, D. K., Anne Pugh, P., McMillan, W. H., & Robin Tervit, H. (1995). Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. *Biology of reproduction*, 53(6), 1385-1391.

- Thompson, J. G., Allen, N. W., McGowan, L. T., Bell, A. C. S., Lambert, M. G., & Tervit, H. R. (1998). Effect of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development *in vitro* and following transfer. *Theriogenology*, *49*(6), 1239-1249.
- Thompson, J. G. (2000). *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos—a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, *60*, 263-275.
- Totey, S. M., Pawshe, C. H., & Singh, G. P. (1993). *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes (*Bubalus bubalis*): Effects of media, hormones and sera. *Theriogenology*, *39*(5), 1153-1171.
- Trigal, B., Gómez, E., Díez, C., Caamaño, J. N., Martín, D., Carrocera, S., & Muñoz, M. (2011). *In vitro* development of bovine embryos cultured with activin A. *Theriogenology*, *75*(3), 584-588.
- Ushizawa, K., Herath, C. B., Kaneyama, K., Shiojima, S., Hirasawa, A., Takahashi, T., ... & Tsujimoto, G. (2004). cDNA microarray analysis of bovine embryo gene expression profiles during the pre-implantation period. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *2*(1), 77.
- Valasi, I., Leontides, L., Papanikolaou, T., & Amiridis, G. S. (2007). Age, FSH dose and follicular aspiration frequency affect oocyte yield from juvenile donor lambs. *Reproduction in domestic animals*, *42*(3), 230-237.
- Van Langendonck, A., Donnay, I., Schuurbiens, N., Auquier, P., Carolan, C., Massip, A., & Dessy, F. (1997). Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. *Journal of reproduction and fertility*, *109*(1), 87-93.
- Varnosfaderani, S. R., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hosseini, S. M., Khashouei, E. A., Abbasi, H., ... & Nasr-Esfahani, M. H. (2013). Importance of the GDF9 signaling pathway on cumulus cell expansion and oocyte competency in sheep. *Theriogenology*, *80*(5), 470-478.
- Walker, S. K., Hill, J. L., Bee, C. A., & Warnes, D. M. (1994). Improving the rate of production of sheep embryos using *in vitro* maturation and fertilization.
- Walker, S. K., Hill, J. L., Kleemann, D. O., & Nancarrow, C. D. (1996). Development of ovine embryos in synthetic oviductal fluid containing amino acids at oviductal fluid concentrations. *Biology of Reproduction*, *55*(3), 703-708.

- Wang, S., Liu, Y., Holyoak, G. R., Evans, R. C., & Bunch, T. D. (1998). A protocol for *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*, 29(1), 83-88.
- Wang, Z. G., Xu, Z. R., & Yu, S. D. (2007). Effects of oocyte collection techniques and maturation media on *in vitro* maturation and subsequent embryo development in Boer goat. *Czech Journal of Animal Science*, 52(1), 21.
- Wang, R. N., Green, J., Wang, Z., Deng, Y., Qiao, M., Peabody, M., ... & Idowu, O. (2014). Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes & diseases*, 1(1), 87-105.
- Wani, N. A., Wani, G. M., Khan, M. Z., & Salahudin, S. (2000). Effect of oocyte harvesting techniques on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. *Small Ruminant Research*, 36(1), 63-67.
- Wani, N. A. (2002). *In vitro* maturation and *in vitro* fertilization of sheep oocytes. *Small Ruminant Research*, 44(2), 89-95.
- Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science*, 60, 481-492.
- Wen, X., Tozer, A. J., Butler, S. A., Bell, C. M., Docherty, S. M., & Iles, R. K. (2006). Follicular fluid levels of inhibin A, inhibin B, and activin A levels reflect changes in follicle size but are not independent markers of the oocyte's ability to fertilize. *Fertility and sterility*, 85(6), 1723-1729.
- Wheeler, M. B., Rutledge, J. J., Fischer-Brown, A., Vanetten, T., Malusky, S., & Beebe, D. J. (2006). Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. *Theriogenology*, 65(1), 219-227.
- Willett, E. L., Black, W. G., Casida, L. E., Stone, W. H., & Buckner, P. J. (1951). Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. *Science*, 113(2931), 247-247.
- Wittmaack, F. M., Kreger, D. O., Blasco, L., Tureck, R. W., Mastroianni, L., & Lessey, B. A. (1994). Effect of follicular size on oocyte retrieval, fertilization, cleavage, and embryo quality in *in vitro* fertilization cycles: a 6-year data collection. *Fertility and Sterility*, 62(6), 1205-1210.
- Woodruff, T. K. (1998). Regulation of cellular and system function by activin. *Biochemical pharmacology*, 55(7), 953-963.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Keskinetepe, L., Martins Jr, A., Sirisathien, S., Brackett, B., & Niemann, H. (2001). Effects of culture system and protein supplementation on

- mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Human Reproduction*, 16(5), 893-901.
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Lucas-Hahn, A., Lemme, E., Korsawe, K., & Niemann, H. (2004). Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome?. *Animal reproduction science*, 82, 593-603.
- Wright, R. W., & Bondioli, K. R. (1981). Aspects of *in vitro* Fertilization and Embryo Culture in Domestic Animals 1, 2. *Journal of animal science*, 53(3), 702-729.
- Wulster-Radcliffe, M. C., Williams, M. A., Stellflug, J. N., & Lewis, G. S. (2001). Semen collection from rams: Artificial vagina versus a vaginal collection vial. In *PROCEEDINGS-AMERICAN SOCIETY OF ANIMAL SCIENCE WESTERN SECTION* (Vol. 52, pp. 219-222).
- Xiao, S., Robertson, D. M., & Findlay, J. K. (1992). Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 131(3), 1009-1016.
- Yoshioka, K., Takata, M., Taniguchi, T., Yamanaka, H., & Sekikawa, K. (1998a). Differential expression of activin subunits, activin receptors and follistatin genes in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, 10(3), 293-298.
- Yoshioka, K., Suzuki, C., & Iwamura, S. (1998b). Activin A and follistatin regulate developmental competence of *in vitro*-produced bovine embryos. *Biology of reproduction*, 59(5), 1017-1022.
- Yoshioka, K., Suzuki, C., & Iwamura, S. (2000). Effects of activin A and follistatin on developmental kinetics of bovine embryos: cinematographic analysis in a chemically defined medium. *Journal of reproduction and fertility*, 118(1), 119-125.
- Zhu, S. E., Zeng, S. M., Yu, W. L., Li, S. J., Zhang, Z. C., & Chen, Y. F. (2001). Vitrification of *in vivo* and *in vitro* produced ovine blastocysts. *Animal biotechnology*, 12(2), 193-203.

ETİK KURUL KARARI

 T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU 

Sayı: 2016/24 28/04/2016

Sayın Doç. Dr. Abit AKTAŞ
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Histoloji ve embriyoloji Anabilim Dalı

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, **MSc Gökhan GÜN'e** ait "In Vitro Koyun Embriyo Üretiminde Aktivin-A Etkisinin ve Moleküler Cevabın Belirlenmesi" başlıklı projeniz; incelenmiş olup, Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15.02.2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanarak yürürlüğe giren "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliği"nin 8.Maddesi (k-2) bendi hükümlerince, araştırmanızda kullanılacak materyal dikkate alındığında, çalışmanızın Etik Kurul Onayı almayı gerektirmediğine karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İÜ HADYEK Başkanı

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı I.Ü, Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu oda
Avcılar -İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : hadyek@istanbul.edu.tr

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KOYUN İN VİTRO EMBRİYO ÜRETİMİNDE AKTİVİN A ETKİSİ VE MOLEKÜLER CEVABIN KARAKTERİZASYONU

ORJİNALLİK RAPORU

%5	%3	%1	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	%1
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
3	www.turkhaygen.gov.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	zoofed.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
5	cdn.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	Submitted to University of Surrey Öğrenci Ödevi	<%1
7	www.science.gov İnternet Kaynağı	<%1
8	Submitted to Selçuk Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gökhan	Soyadı	Gün
Doğ.Yeri	Samsun	Doğ.Tar.	20.01.1987
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	54550501500
Email	gungokhan@hotmail.com	Tel	05445538692

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.	İTÜ-Moleküler Biyoloji – Genetik ve Biyoteknoloji	2013
Lisans	İTÜ-Moleküler Biyoloji ve Genetik	2010
Lise	Samsun 19 Mayıs Lisesi	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma görevlisi	İYYU TIP Fakültesi	2013-2016
2.	Araştırma görevlisi	Boğaziçi Ün. Mol. Biyo. Ve Genetik	2016-
3.			-

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Gun, G., Imamoglu, R., Tatli, O., Yurum, Y., Tarik Baykal, A., & Dinler-Doganay, G. (2019). Hyperthermophilic flavin reductase from *Sulfolobus solfataricus* P2: Production and biochemical characterization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.

Gün, G., Yürüm, Y., & Doğanay, G. D. (2015). Revisiting the biodesulfurization capability of hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P2 revealed DBT consumption by the organism in an oil/water two-phase liquid system at high temperatures. *Turkish Journal of Chemistry*, 39(2), 255-266.

Gün, G., & Kues, W. A. (2014). Current progress of genetically engineered pig models for biomedical research. *Bioresearch open access*, 3(6), 255-264.