



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİTRO EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE PROGESTERONUN ETKİSİ

ORHAN ÖRNEK

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
ŞUBAT-2019



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİTRO EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE PROGESTERONUN ETKİSİ

ORHAN ÖRNEK

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
ŞUBAT-2019**

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİTRO EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE PROGESTERONUN ETKİSİ

Orhan ÖRNEK

ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Ziya GÜZEY danışmanlığında hazırlanan bu tez **01/02/2019** tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **OYBİRLİĞİ** ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Ziya GÜZEY

Başkan

Doç. Dr. Sabri GÜL

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet NAZ

Üye

Kod No:

Prof. Dr. Erdal SERTKAYA

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

İN VİTRO EMBRİYO GELİŞİMİ ÜZERİNE PROGESTERONUN ETKİSİ

Bu çalışmada, in vitro fertilizasyon (IVF) sonrası, farklı düzeylerde progesteron konsantrasyonlarının (25, 50, 100 ng/mL) in vitro kültüre (IVC) alınan sığır embriyolarının gelişimi üzerine etkileri araştırılmıştır. Klevaj aşamasında deneme grupları arasında gözlenen farklılıklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($P<0.05$). Kültür medyalarına 25 ve 50 ng/mL P₄ eklenen gruplarında hücre bölünmelerini teşvik edecek yönde etki yapmıştır. Morula aşamasında ise P₄ katkısının herhangi bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiştir. Blastosist aşamasına ulaşan embriyolar incelendiğinde P₄ katkısının embriyo gelişimi üzerine istatistiksel olarak olumlu etkisi olduğu tespit edilmiştir ($P<0,01$). 100 ng/mL P₄ katkılı kültür medyasında blastosist verimliliğini düşük seviyelerdeyken, 25 ve 50 ng/mL P₄ katkılı kültür medyalarında embriyonik gelişim yüksek seviyelerde gerçekleşmiştir. Sonuç olarak, 25 ng/mL P₄ katkılı kültür medyalarının embriyonik gelişimi desteklediği tespit edilmiştir.

2019, 32 sayfa

Anahtar Kelimeler : IVC, progesteron, klevaj, morula, blastosist

ABSTRACT

EFFECT OF PROGESTERONE ON IN VITRO EMBRYO DEVELOPMENT

We aimed to investigate the effects of progesterone (25, 50, 100 ng/mL) on development of bovine embryos in vitro. The rate of cleaved embryos was significantly different between groups ($P < 0.05$). Progesterone supplementation enhanced cellular division at levels of 25 and 50 ng/mL. No significant effect was detected for embryos reached to morula but enhanced number of embryos reached to blastocyst ($P < 0.01$). Progesterone impaired blastocyst yield at high concentration (100 ng/mL) but enhanced at 25 and 50 ng/mL. As a consequence, we can claim that progesterone supplementation to the media in vitro may support embryos development at low levels (25 ng/mL).

2019, 32 pages

Keywords : in vitro culture, progesterone, cleavage, morula, blastocyst

TEŐEKKÜR

Tez alıŐmamn hazırlanmasında bilgi, deneyim ve yardımlarıyla beni yönlendiren, sabır ve desteğini esirgemeyen değerli danıŐman hocam, Dr. Öğr. Üyesi Yusuf Ziya GÜZEY'e sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Her türlü yardımını esirgemeyen sayın Doç. Dr. Sabri GÜL, Prof. Dr. Mahmut KESKİN, Prof. Dr. İbrahim TAPKI ve Yrd. Doç. Dr. Emre İLHAN'a teŐekkürlerimi sunarım.

ÇalıŐmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen çok değerli eŐim Hüner ÖRNEK ve aileme çok teŐekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

1.	GİRİŞ	1
2.	ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	7
3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1.	Materyal	15
3.2.	Yöntem.....	17
3.2.1.	Ovaryumların Toplanması ve <i>İn Vitro</i> Matürasyonu (IVM)	17
3.2.2.	<i>İn vitro</i> Fertilizasyon.....	18
3.2.3.	<i>İn vitro</i> Embriyo Kültürü (IVC).....	20
3.2.4.	Deneme Deseni ve Örneklerin Toplanması	21
3.2.5.	İstatistik Analizler.....	21
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	22
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	27
	KAYNAKLAR	28
	ÖZGEÇMİŞ	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. 1. Östrus siklusu sırasında inek kanındaki hormon konsantrasyonları (Anonim, 2019).....	2
Şekil 3. 1. Ovaryumlar üzerine yer alan foliküllerin aspirasyonu.....	17
Şekil 3. 2. En az 3 veya 4 katmanlı kümülüs-oosit kompleksleri	18
Şekil 3. 3. Yüzdürme (swim up) tekniği	19
Şekil 3. 4. Thoma lamı	20
Şekil 4. 1. Deneme gruplarına göre klevaj ve embriyonik gelişim aşamaları.....	25



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. 1. Dünya genelinde, <i>in vitro</i> üretilen ve transfer edilen embriyo sayıları (Perry, 2016).....	5
Çizelge 1. 2. Dünya genelinde, <i>in vivo</i> üretilen ve transfer edilen embriyo sayıları (Perry, 2016).....	5
Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan kimyasallar.....	15
Çizelge 4. 1. İn vitro kültüre alınan embriyoların bölünme oranları.....	22
Çizelge 4. 2. Gelişim aşamalarına göre embriyo verimleri.....	24



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

- AA: Amino asit
CL: Corpus luteum
CO₂: Karbondioksit
CPR: Klinik gebelik oranı
dk: Dakika
ET: Embriyo transferi
FAF: Fatty Acid Free (Yağ asidi içermeyen)
FET: Dondurulmuş çözündürülmüş embriyo transferi
FSH: Folikül stimüle edici hormon
FSS: Fötal sığır serumu
G: Gauge
GnRH: Gonadotropin relasing hormon
Gr: Gram
hCG: İnsan koryonik gonadotropin
hMG: İnsan menopozal gonadotropin
ICSI: İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IM: İntra müküler
IU: Uluslararası birim (Biyolojik ünite)
IVC: *İn vitro* embriyo kültürü
IVF: *İn vitro* fertilizasyon
KOH: Kontrollü overyan hiperstimülasyon
KOK: Kümüls-oozit kompleksi
KSOM: Potasyum simpleks optimizasyon medyası
LH: Luteinleştirici hormon
LPS: Luteal faz desteği
mg: Miligram
mm: Milimetre
mRNA: Mesajcı ribo nükleik asit
ng: Nanogram
O₂: Oksijen

OAM: Oosit arama medyası
OOM: Oosit olgunlaştırma medyası
OPU: Ovum pick-up
OTM: Ovaryum transfer medyası
P: Penisilin
P₄: Progesteron
PBS: Fosfat tamponlu solüsyon
PE: Progesteron yükselmesi
PGR: Progesteron reseptörü
PL: Prematür lüteinizasyon
PR: Gebelik oranı
rFSH: Rekombinant folikül stimüle edici hormon
S: Streptomisin
sn: Saniye
SP: Sperm penetrasyon
SSA: Sığır serum albümin
TALP: Tyrode albumin laktat piruvat solüsyonu
v: Volume (Hacim)
µg: Mikrogram
µl: Mikrolitre
µmol: Mikromol
°C: Santigrad derece

1. GİRİŞ

Türkiye'nin ekonomik gelirini tarım, endüstri, ticaret, ormancılık, madencilik, turizm ve ulaştırma gibi sektörler sağlamaktadır. Nüfusunun % 50 'sinden fazlası kırsal kesimde yaşamakta olan Türkiye'de, tarım ülkesi olma özelliği devam etmektedir. Türkiye'de tarımsal gelirin % 70'lik kısmını bitkisel üretim, % 30'luk kısmını ise hayvansal üretim oluşturmaktadır. Gelişmiş ülkelerde ise hayvansal üretimin payı % 60-70'lardedir. Bu durum, Türkiye'de yeterli oranda hayvansal üretimin gerçekleşmediğini göstermektedir. Türkiye'de de hayvansal üretimin payını arttırmakta üreme alanındaki teknolojik gelişmelerin uygulanmasının artırılması ve geliştirilmesi büyük katkı sağlayacaktır (Akkoç, 2012).

Sığırlar, Türkiye'nin et ve süt ihtiyacının karşılanmasında çok önemli bir paya sahiptir. Çünkü Türkiye'de toplam süt üretiminin % 90,7'si (18 654 682 yıl/ton), toplam kırmızı et üretiminin ise % 88,3'ü (1 149 262 yıl/ton) sığırlardan karşılanmaktadır. Sığırlarda süt verimi, ilk gebeliğinin ardından doğumla beraber başlamaktadır. Fertilizasyonun ardından embriyonik gelişimin problemsiz bir şekilde devam etmesi ve embriyo implantasyonunun gerçekleşmesinin üremede rol oynayan hormonlarla direkt olarak bağlantılı olduğu bilinmektedir. Progesteron hormonu da üreme endokrinolojisinde önemli bir yere sahiptir. Ayrıca gebelik sırasında meme dokusunda östrojen ve progesteron olmak üzere iki hormona ait reseptör vardır. Bu hormonlar gebelikte meme bezinin büyümesini sağlamaktadır. Besi amaçlı sığır yetiştirme alanında da sığırların doğurganlıkları, hormonal değişimlere bağlıdır (Anonim, 2016a, Anonim, 2016b).

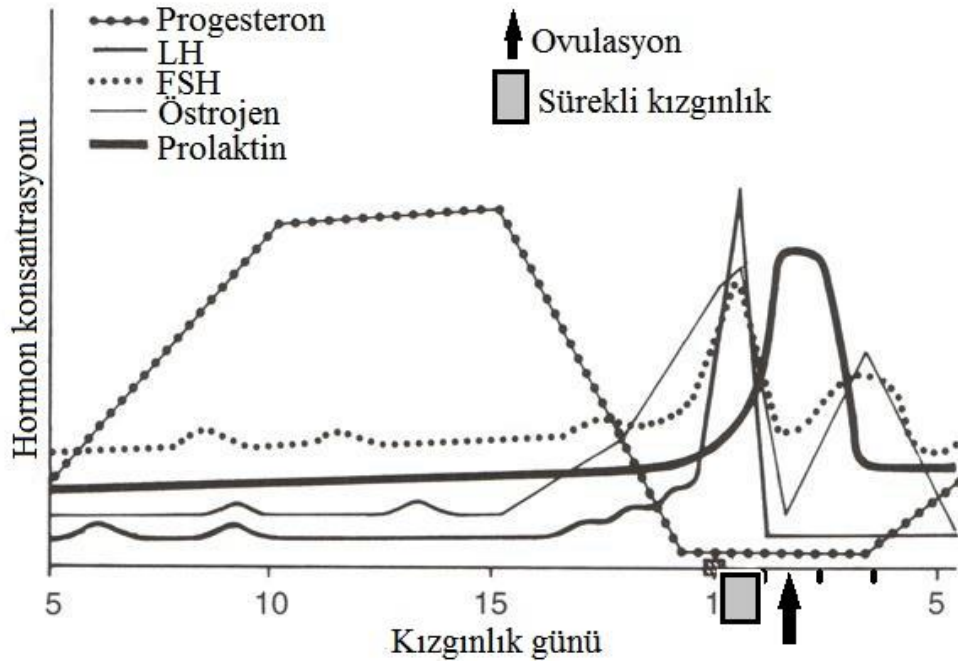
Türkiye'de, beslenme açısından çok önemli bir yere sahip olan sığırlardan yüksek verimlerin alınabilmesi, sağlıklı embriyo oluşumuyla başlar.

Progesteron hormonunun insan üremesinde gösterdiği etkiler, sığırlar için de geçerli sayılabilecek kadar benzerdir. İneklerde progesteron hormonunun spesifik etkileri aşağıda sıralanmıştır (Gietema, 2005):

- Uterus mukozasının artmasını ve uterusun korunmasını (bakımını) uyarır ve uterusu kan tedarikini artırır; döllenmiş oositin kabulü için uterusu hazırlar.
- Uterus bezleri tarafından 'uterus sütünü' salgılar. Uterus sütü, embriyo için besin maddelerini, plasenta bu işlevi üstlenene kadar sağlar (yaklaşık 45 gün sonra).

- Uterus kasının kasılmalarını engeller ve bu da embriyonun implantasyonunu kolaylaştırır.
- Embriyoyu enfeksiyonlardan koruyan servikal kanaldaki kalın bir mukus 'dolgu, tıkaç' olan servikal mührün üretilmesini sağlar.
- Gebeliği korur ve inekte kızgınlık ile ovulasyonu önler.
İneklerde östrus siklusu 21 gün sürmektedir.

Östrus siklusu boyunca ineklerin kan değerleri incelendiğinde, hormonların değerlerinde dalgalanmalar olmaktadır. Bu değer değişimleri Şekil 1.1 Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.'de gösterilmiştir.



Şekil 1. 1. Östrus siklusu sırasında inek kanındaki hormon konsantrasyonları (Anonim, 2019)

Ergin, fonksiyonel bir ovaryumda stroma (konnektif doku), foliküller ve corpus luteum (CL) olmak üzere üç ayrı işlevsel ünite yer alır. Bu yapısal üniteler birbirini destekler ve birisi regresyona uğrarken diğer ünitenin formasyonuna yardımcı olur. Folikülün corpus luteum'a, onun da konnektif dokuya dönüşmesi bu kavramı açıklamaktadır. Ovulasyonun ardından granulosa hücreleri hipertrofi ile CL'ü oluştururlar. CL formasyonunda theca interna hücreleri de rol oynamaktadır. Ovaryumda geçici olarak yer alan ve dinamik bir yapı olan CL progesteron (P₄) ve

oksitosin hormonlarının sekresyonundan sorumludur. Progesteron, reproduktif sistemde ve özellikle uterusu yapısal değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler fertilize ovumun uterus duvarı ile ilişki kurmasına ve gelişmesine yardım eder. İnekte CL gebelik boyunca etkisini sürdürür. Fertilizasyon veya implantasyon şekillenmez ise CL dejenere olur ya da luteolizis gösterir. CL, progesteron salgılayan bir endokrin organ olup, gebeliği de kontrol altında tutar. Son çalışmalarda CL'da yer alan 0,2 mm çapında koyu renkli boyanabilen granüllerin progesteron salgıladıkları ortaya konulmuştur. Progesteron bütün büyüme sürecindeki foliküllerin ara ürünü ve periovulator ve postovulator dönemlerin ise sekretorik son ürünüdür (Alaçam, 1996).

Progesteron hormonunun düzeyleri, siklus süresince sütün de belirlenebilir. Süt progesteron konsantrasyonu, östrüstan iki gün önce ve iki gün sonraki dönemlerde en düşük değerdedir. CL formasyonuna bağlı olarak 5-7. günlerde ani bir yükselme gösterir. Sonraki 8-10 günde hafif bir yükselme veya standart seyir ile 4-5 ng/mL olarak devam eder ve östrüstan 2-4 gün önce tekrar azalmaya başlar. Sirkülasyondaki progesteronun bazal değerlere (≤ 1 ng/mL) düşmesi sonucunda bu hormonun adenohipofiz üzerindeki baskılayıcı etkisi ortadan kalkar ve gonadotropinler hızlı ve yoğun bir şekilde kana salınırlar. Foliküler ve luteal fazlar sırasında periferik plazmadaki progesteron düzeylerini sırasıyla, ortalama 0,4 ve 6,6 ng/mL olarak belirlemiştirler. Luteal doku, progesteronun primer kaynağı olduğundan fonksiyonel CL varlığında kan ve sütte progesteron yoğunluğu artar (Alaçam, 1996).

Canlıların, üreme organları tüm fonksiyonlarıyla taklit edilerek oluşturulan, uygun medyalar ve çevresel faktörler (ısı, gazlar vb.) içerisinde embriyo üretimine *in vitro* embriyo üretimi (IVP) denir.

IVP, ovaryumların toplanması, toplanan ovaryumlardan oositlerin aspirasyonu, aspire edilen oositlerin *in vitro* maturasyonu (IVM), mature oositlerin *in vitro* fertilizasyonu (IVF) ve embriyo kültürü (IVC) aşamalarından oluşan bir işlemdir. IVP basamaklarının her biri sırasıyla bir sonrakinin başarısını etkilemektedir (Topuzoğlu, 2011).

IVF, genel anlamda dışıdan alınan oositin erkek gamet ile, laboratuvarında oluşturulmuş uygun ortamda döllenmesine denir.

Embriyo üretimindeki en büyük düşüş *in vitro* aşamaların embriyo üretim aşamalarının son kısmında; fertilizasyon sonrası kültürde, 2 hücreli aşamadan blastosist

oluşumuna kadar geçen sürede meydana gelmektedir. Elde edilen blastosist sayısına bakıldığında fertilizasyon sonrası embriyo kültürünün en kritik dönem olduğu görülmektedir (Topuzoğlu, 2011).

Fertilizasyon sonrası 6 günlük periyotta, blastosistin kalitesini etkileyecek çeşitli gelişimsel olaylar meydana gelmektedir. Bu gelişimsel olaylar; bölünmenin başlaması, 8 hücreliden 16 hücreli aşamaya kadar olan zamanda embriyonik genomun aktivasyonu, 5. günde embriyonun hücreler arası iletişimini sağlayan morulanın kompaksiyonu ve 6-7. günlerde blastosist oluşumu olarak belirtilmiştir (Topuzoğlu, 2011).

In vitro fertilizasyona etki eden faktörler;

- Spermatozoa kaynağı,
 - Sperm hazırlama metotları,
 - Fertilizasyon mediumu ve kapasitör ajanlar,
 - Fertilizasyon süresi,
 - Sperm doze edilmesi ve kültür süresi,
 - Çevresel gaz ve sıcaklık,
- şeklinde sıralanabilir.

IVP sığırlarda genetik ıslahı hızlandırabilecek büyük bir potansiyele sahip üreme biyoteknolojisidir, yani hayvan embriyolojisi için de önemli bir araştırma aracıdır. Bununla birlikte, *in vitro* embriyo üretiminin verimliliği, oositlerin sadece % 30-40'ı blastosiste dönüşürken hala düşüktür, muhtemelen *in vitro* ortamında *in vivo* ortamı taklit edilemez ve değişmiş morfoloji ve gen ifadesine sahip embriyolar ortaya çıkabilir. Geçtiğimiz 20 yıl boyunca embriyo transferi (ET) aktivitesinin gittikçe artan popülaritesi görülmektedir. Son 14 yılda her yıl bir milyondan fazla sığır embriyosu toplanmakta ve son 4 yılda 900 000'den fazla embriyo transfer edilmektedir. Tüm ülkeler ET aktivite verilerini desteklemiş olsaydı, bir milyondan fazla sığır embriyosunun yıllık olarak aktarılabilmesi öngörülmektedir. Ticari embriyo şirketleri tarafından, IVP kullanımı artmış ve günümüzde *in vitro* embriyo üretiminde sığır embriyoları, tüm dünyada üretilen sığır embriyolarının önemli bir yüzdesini temsil etmektedir (% 86). Örneğin, Brezilya'da 2016 yılında transfer edilen sığır embriyolarının % 89,69 'u IVP'larından oluşmaktadır. Dünya genelinde *in vitro* üretilen ve transfer edilen embriyo sayıları Çizelge 1. 1'de, *in vivo* üretilen ve transfer edilen embriyo sayıları ise Çizelge 1. 2'de gösterilmiştir. Bununla birlikte, IVP verimliliğini

bozan morfolojik ve moleküler yönleri içeren, *in vivo* ve *in vitro* üretilen embriyolar arasındaki farkların var olduğu bilinmektedir. IVP verimliliğini etkileyebilecek, *in vivo* ve *in vitro* üretilen embriyolar arasındaki mevcut farklılıklara katkıda bulunan çeşitli faktörler olabilir. Bu farklılıklar muhtemelen ırk, oosit kalitesi, folikül ortamı, fertilizasyon ve embriyo kültürü ortamı gibi çeşitli faktörlerden kaynaklanmaktadır. Genellikle *in vitro* türevli embriyoların koyu renkleri, hücresel kütlelerin sıkışıklığı, blastokoelin erken oluşumu, iç hücre külesinin trofoblast hücrelerine oranındaki değişiklik, daha fazla mikroploidite ve gen ekspresyonunda ve hücre metabolizmasındaki değişikliğe sahip olması bulunmaktadır. Bu değişiklikler, *in vitro* üretilen embriyolardan elde edilmiş yavrular ve fetüslerde gözlenen düşük embriyo durumları cryosurvival (dondurulmuş spermin çözme sonrası motilitesi/taze spermin dondurma öncesi motilitesi) ve fenotipik bozukluk oranlarına karışabilmektedir (Camargo ve ark., 2006).

Çizelge 1. 1. Dünya genelinde, *in vitro* üretilen ve transfer edilen embriyo sayıları (Perry, 2016)

	Kullanılan			Transfer edilen		Toplam
	Donör	Oosit	Embriyo	Taze embriyo	Dondurulmuş embriyo	
Dünya geneli	109 168	2 078 430	666 215	326 623	121 490	448 113

Çizelge 1. 2. Dünya genelinde, *in vivo* üretilen ve transfer edilen embriyo sayıları (Perry, 2016)

	Kullanılan		Transfer edilen		Toplam
	Transfer edilebilir embriyo	Taze embriyo	Dondurulmuş embriyo		
Dünya geneli	632 638	195 563	321 022		516 585

Embriyo üretiminde, kültür medyalarına çeşitli katkıları eklenerek embriyonik gelişim arttırılmaya çalışılmıştır. P₄ katkısının *in vitro* embriyo gelişiminde doğrudan

embriyoların bireysel gelişimleri üzerine etki edebileceğine dair iddialar (Goovaerts, 2012) bu çalışmanın temelini oluşturmuştur. Yapılan bu çalışma ile IVP yöntemiyle sağlıklı embriyo üretimi için, fertilizasyon sonrası embriyonik aşamaların her birinde progesteron kullanımı ve dozunun etkisi ortaya konulmaya çalışılmıştır.



2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Zheng ve ark., (2003), tarafından yapılan çalışmada oositler P₄ katkılı ve katkısız olan medyalarda kültüre alınmış, araştırma sonucunda; mayotik olgunlaşma, fertilizasyon, ilk klevaj ve 8 hücreli aşamaya kadar embriyo gelişiminde benzer yüzdelere göstermişlerdir. Blastosist oluşumu için, zaman aralıkları da tohumlamadan 153-178 saat sonra tüm muamele gruplarında benzerlik olduğunu tespit etmişlerdir. Östradiolü içeren muamelede olgunlaşan oositlerin, ≥ 8 hücreli ve morula evresine kadar, kontrol medyasındaki oositlerden daha iyi gelişme gösterdiğini gözlemlemişlerdir (steroid hormon yok). Progesteronu içeren muameledeki oositlerin ise kontrol grubuna kıyasla morulalarda üstün gelişim gösterdiğini belirtmişlerdir. Benzer sonuçlara ulaşan Larson ve ark. (2011) da, *in vitro* embriyo üretiminde kültür medyalarına ekledikleri P₄ katkısının oositlerde bölünme oranlarına etki etmediğini belirtmişlerdir.

Bölünme evresinde (2. gün) dondurulan embriyoların transferinden üç gün önce P₄ takviyesiyle, dört günlük takviyesi karşılaştırıldığında, gebelik ve implantasyon oranlarının çok daha yüksek olduğu sonucu elde edilmiştir (Sharma ve ark., 2016).

IVF prosedürleri uygulanırken oosit aspirasyonu sırasında foliküler sıvıda bulunan P₄ ve E₂ seviyeleri ve oranları tespit edilip karşılaştırılmıştır. P₄/E₂ oranının daha yüksek olmasının, gebeliği teşvik ettiği tespit edilmiştir (Basuray ark., 1988).

Sığırlarda, embriyo kaybının çoğu çok erken gebelik (yaklaşık ilk 16 gün) döneminde veya gebelik öncesinde ana tarafından tanınması sırasında oluşur. LH pulsatilitesinin kontrolü ve yumurtalık follikül gelişiminde P₄ eylemleri oosit kalitesi üzerine olumsuz etki yapabilir. Ancak, progesteronun memelilerde oosit olgunlaşması ve kalitesi üzerindeki potansiyel etkisi iyi tanımlanmış değildir. Embriyo kaybı, önemli bir oranda yetersiz dolaşan P₄ konsantrasyonları, uterus lümenine endometriyal gen ifadesi ve histotroph salgılanmasından sonra şu sonuçlara bağlı olabilir: Embriyonun büyüme ve gelişmesi, embriyo-ana etkileşimleri, gebelik tanıma ve implantasyon için uterus alıcılığı dahil endometrial fonksiyonu düzenleyen uterus üzerinde progesteron eylemi gerektirir. Progesteronun dolaşımdaki konsantrasyonu, gelişen embriyoları etkilediği açıktır. Bu etki, gelişmekte olan embriyonun maruz kaldığı histroph bileşimi içindeki değişiklikler ile sonuçlanır. P₄ düzeyinin değişmesinden kaynaklanan etkiyle uterus dokusunda gen ekspresyonunun düşmesi olasıdır (Lonergan ve ark., 2011).

Ferguson ve ark. (2012), 'nın yaptığı bir çalışmada, *in vitro* embriyo gelişim oranı, P₄ ile muamele edilerek arttırıldığını belirlemişlerdir. 6. günde, P₄ muamele grubundaki embriyoları, kontrol grupları ile karşılaştırdıklarında erken blastosistin daha çok görüldüğünü belirtmişlerdir. 7. günde, embriyoların çapları ölçüldüğünde P₄ muamelesi yapılan embriyoların çaplarının daha büyük olduğunu tespit etmişlerdir. Progesteronun *in vitro* kültürde sığır embriyolarının gelişmeleri üzerine doğrudan olumlu bir etkisinin olduğunu savunmuşlardır.

Vaisbuch ve ark. (2012), insan IVF siklusunda progesteronun kullanılıp kullanılmadığıyla ve kullanılıyorsa da hangi yolla (vajinal veya ağız yolu) kullanıldığıyla ilgili bir anket çalışması yapmışlardır. Dünya çapında web tabanlı, geçerli kanıta dayalı literatür araştırmasında, IVF döngüsü içinde luteal faz desteği (LPS) için klinik uygulamalarını karşılaştırmışlardır. Bu araştırmalarında, döngülerin neredeyse üçte ikisinde, LPS için P₄, vajinal uygulamayla tercih edilmiştir. Hamileliğin 10-12. haftasına kadar LPS devamını destekleyecek herhangi somut bir kanıt olmamasına rağmen, bu uygulamanın dünya çapında IVF sikluslarının çoğunda kullanılmış olduğunu belirtmişlerdir.

Ballester ve ark. (2014), oviduct sıvısı içeren *in vitro* fertilizasyon protokollerinde, optimal koşulları belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada, domuzlardan alınan oosit, sperm ve oviduct sıvısını kullanmışlardır. Kontrol grubu olarak kullandıkları fertilizasyon medyalarına steroid eklememiş ve diğer gruba ise steroidler eklemişlerdir. Steroid eklenen grubun sonuçları, steroidlerin olmadığı kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında; penetrasyon yüzdeleri gruplar arasında farklılık göstermezken, steroidlerin varlığında daha yüksek bir monospermi ve verimlilik için bir eğilim kaydettiğini belirtmişlerdir. Bu eğilim ile uyumlu olarak, oosit başına ortalama sperm sayısının ve zona pellucidaya bağlı ortalama sperm sayısının, IVF medyasında steroid içeren grupta kontrol grubuna göre daha düşük olduğunu görmüşlerdir. Bu verileri doğrulamak için yapılan ek deneyde ana etkinin, E₂ yokluğunda P₄ 'ün etkisinden kaynaklandığını gözlemlemişlerdir.

Sofuoğlu ve ark. (2008), 'na göre, implantasyon ve gebelik oranlarını arttırması nedeniyle *in vitro* fertilizasyon uygulamalarında luteal destek olarak progesteron, rutin olarak kullanılmaktadır. Progesteron kullanımının iki farklı yolu olan vajinal ve intra müküler (IM) progesteron kullanımının gebelik oranları üzerine etkisini gösteren bir

çalışma yapmışlardır. Yardımcı üreme tekniklerinde luteal destek olarak iki farklı şekilde progesteron kullanımının gebelik oranları üzerinde benzer etkilere neden olduğu kanaatine varmışlardır. Dolayısıyla yaptıkları bu çalışmada progesteron kullanımı iki farklı yöntemde de fertilizasyon, implantasyon ve embriyo gelişimine olumlu etkide bulunmuştur.

Koycheva ve ark. (2015), progesteronun implantasyon sonrası embriyo gelişimine ve özellikle de farelerde bazı büyümeye bağlı imprinting genlerin ekspresyonuna etkilerini araştırmışlardır. Çoğu imprinting genlerin, embriyo büyümesi sırasında ifade edildiğini ve fetal veya plasental gelişim için önemli olduğunu açıklamışlardır. Progesteronun gebeliğin kurulması ve sürdürülmesinde rol oynayan doğal bir steroid hormon olduğunu ve insan gebelik süresince düşüklere karşı koruyucu bir madde olarak kullanılmasına rağmen gelişmekte olan embriyo üzerindeki etkileri hakkında çok az şey bilindiğini belirtmişlerdir.

Pfeifer ve ark. (2009), sistemik progesteron konsantrasyonunun oosit kalitesi ve *in vitro* embriyo üretimi üzerindeki etkilerini değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Oositleri, melezlenmiş 15 inekten (*Bos taurus* x *Bos indicus*) almışlardır. Ovum pick-up (OPU) prosedürü, 4. günden 24. güne kadar her 4 günde bir gerçekleştirmişlerdir. OPU prosedürüne eşzamanlı olarak, progesteronu ölçmek için plazma toplamış ve 18. Gün LH salım desenini değerlendirmek için seri kan numuneleri toplamışlardır. Sonuç olarak, ineklerdeki dolaşımda yüksek LH ile sonuçlanan, plazmada orta P₄ konsantrasyonu *in vitro* embriyo üretimini arttırdığını belirtmişlerdir.

Nayak ve ark. (2014), 'na göre; oosit alımında progesteron seviyesi, kısa-antagonist protokolde *in vitro* fertilizasyon başarısını öngörür. P₄ seviyelerinin, oosit alınma günündeki dağılımının, antagonist protokolde gebelik sonuçlarıyla ilişkisini değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Değerlendirmede ana ölçüt olarak implantasyon, gebelik ve spontan düşük oranını kullanmışlardır. Oosit toplama günündeki P₄ düzeylerinin gebelik oranları ile ters orantılı olduğunu tespit etmişlerdir.

Roque-Velázquez ve ark. (2016), döllemeden 5 gün sonra tek enjeksiyon progesteronun süt ineklerinde gebelik oranını (CR) arttırıp arttırmadığını test etmişlerdir. Döllenme sonrası 40-50. günler arasında transrektal palpasyon ile gebelik teşhisi konulmuştur. Östrojen döngüsünün 5. ve 7. günlerinde progesteron konsantrasyonları ile embriyo sağkalımı arasında pozitif bir ilişki bulmuşlardır. Döllenme sonrası 5. ve 9.

günlerde progesteron ilavesi, embriyo gelişimine katkıda bulunmuştur ve aynı tedavinin 12-16. günleri arasında uygulanması durumunda ise herhangi bir etkisinin olmadığını belirtmişlerdir.

Rizos ve ark. (2012), östrus sonrası 5. günde insan korionik gonadotropin (hCG) uygulaması ile korpus luteum aksesuarının (CL) indüksiyonundan kaynaklanan yüksek progesteron konsantrasyonlarının (P_4) gelişmiş konseptus uzamasına neden olacağı hipotezini test etmek için bir çalışma yapmışlardır. *In vitro* üretilen sıgır blastosistlerini, östrus sonrası 7. günde eşzamanlı olarak alıcılara transfer etmişlerdir. Düveleri, östrus sonrası 14. günde öldürmüş ve embriyoları kurtarmak için uterus yıkama işlemi yapmışlardır. 5. günde hCG'nin enjekte edilmesinin, muamele edilen bütün düvelerde dominant folikülün ovülasyonunu indüklediğini, yumurtalıktaki luteal dokunun toplam alanını arttırdığını ve bu durumun 7. günden 14. güne kadar P_4 serum konsantrasyonlarında anlamlı bir artışla ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. CL alanı ve toplam luteal doku alanı ile dolaşımdaki P_4 arasında pozitif ilişkiler saptamışlardır. Yaptıkları çalışmada sonuç olarak; östrus sonrası 5. günde hCG uygulaması, asıl CL'nin, CL aksesuarının ve hipertrofinin oluşmasına neden olmuş ve bunun sonucunda 7. günden itibaren P_4 konsantrasyonlarında bir artış meydana gelmiştir. Bu yükselmiş P_4 konsantrasyonlarının, konseptus alanının artması ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Stronge ve ark. (2005), döllenme sonrası süt progesteron konsantrasyonu ile embriyo sağkalım arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Süt progesteron konsantrasyonlarını enzim-immünoassay ile ölçmüş ve gebelik tanısını yaklaşık 30. gününde transrektal ultrason ile gerçekleştirmişlerdir. 4. günde süt progesteron konsantrasyonu ile embriyo sağkalımı arasında negatif bir ilişki olduğunu, ancak 5., 6. ve 7. günlerde süt progesteron konsantrasyonu ile progesteron konsantrasyonları ve ayrıca 4-7. günler arasında embriyo sağkalımı arasındaki değişimde pozitif bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak, 5-7. günlerde (döllenme sonrası) düşük progesteron düzeylerini, süt ineklerinde düşük doğurganlık ile ilişkilendirmişlerdir.

Xu ve ark. (2012), IVF uygulamalarına farklı cevaplar veren insanlarda hCG uygulaması gününde serum P_4 düzeyleri ile gebelik sonuçları arasındaki ilişkiyi araştırmak için bir çalışma yapmışlardır. Hastalara uzun GnRH agonist protokolü ile

IVF-ET (*in vitro* fertilizasyon-embriyo transferi) uygulamışlardır. Ana sonuç ölçütü olarak devam eden gebelik oranlarını (PR) baz almışlardır. Farklı yumurtalık yanıtlarına göre farklı P₄ eşik konsantrasyonlarını belirleyip: Düşük cevap verenler için eşik olarak 1.5 ng/mL, orta cevap verenler için 1.75 ng/mL ve yüksek cevap veren kişiler için 2.25 ng/mL'lik bir serum P₄ düzeyini önermişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre, hCG uygulamasının yapıldığı gün alınmış oosit sayısı, toplam FSH dozu ve plazma E₂ değerleri ile artmış P₄ seviyeleri arasında pozitif bir ilişki olduğunu belirlemişlerdir.

Huang ve ark. (2015), farklı gelişim evrelerinde (bölünme ve blastosist) transfer edilen embriyoların IVF/ICSI sikluslarında hCG uygulaması günü progesteron yükselmesi (PE) ile klinik gebelik oranları (CPR) arasındaki ilişkiyi değerlendirmek ve PE'nin CPR'ler üzerinde zararlı etkisi olan eşikleri belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Serum PE hem bölünme hem de blastosist evresinde ET sikluslarında CPR'lerle ters ilişki içinde olduğunu belirlemişlerdir. 3. ET sikluslarında, progesteron konsantrasyonu 1.0 ng/ml'ye ulaştığında ve 1.5 ng/ml'ye yükseldiğinde CPR'lerin önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir. 5. gün blastosist evresinde ET siklusunda serum progesteron düzeyleri ≥ 1.75 ng/ml olan hastalarda, serum progesteron düzeyleri < 1.75 ng/ml olan hastalara kıyasla anlamlı şekilde daha düşük CPR'ler gözlemlenmiştir. Sonuç olarak; PE'nin, hCG verilme gününde, aktarılan embriyoların gelişim aşamasına bakılmaksızın (bölünmeye-blastosist evresi) GnRH agonisti IVF/ICSI döngülerinde azalmış CPR'ler ile ilişkili olduğunu bulmuşlardır.

Bosch ve ark. (2010), *in vitro* fertilizasyon/intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (IVF/ICSI) döngüleri sırasında serum progesteron düzeylerinin gebelik oranları üzerindeki etkisini araştırmak için bir çalışma yapmışlardır. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) uygulaması günü serum progesteron seviyeleri ile gonadotropin relasing hormonu (GnRH) analogları kullanan 4032 hastada devam eden gebelik oranı arasındaki ilişkiyi değerlendirmişlerdir. Devam eden gebelik oranlarının, hCG gününde serum progesteron seviyeleri ile ters orantılı olduğunu belirlemişlerdir. hCG uygulamasının yapıldığı gün günlük folikül stimüle edici hormon (FSH) dozu, oosit sayısı ve östradiol değerlerinin progesteron seviyeleri ile pozitif olarak ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak; hCG uygulaması gününde yüksek serum progesteron seviyelerinin, devam eden gebelik oranlarının azalması ile ilişkili olduğunu ve özellikle, 0.1 ng/ml serum progesteron düzeylerini, hipofiz alt regülasyonu için kullanılan GnRH

analoğundan bağımsız olarak IVF/ICSI sikluslarını takiben düşük devam eden gebelik oranları ile ilişkilendirmişlerdir.

Miller ve ark. (1996), hCG uygulaması gününde progesteron konsantrasyonunun IVF hastalarında gebelik oluşumu ile ilişkili olup olmadığını saptamak için bir çalışma yapmışlardır. hMG (insan menopozal gonadotropin) ve/veya FSH ile GnRH agonisti tarafından indüklenen over hiperstimülasyonu olan hastalarda hCG gününde progesteron konsantrasyonlarını geriye dönük olarak incelemişlerdir. Toplanan oositleri, dölleme oranı ve gebelik oranı grupları arasında karşılaştırılmıştır. Daha yüksek progesteron konsantrasyonuna sahip hastalarda artmış östradiol konsantrasyonları ve daha fazla oosit bulmuşlardır. Dölleme oranı için, poliploid dölleme veya gebelik oranı açısından fark bulamamışlardır. Luteal destek tipi ile yüksek preovulatuvar progesteronun gebelik oranı üzerindeki etkisi arasında bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Yüksek progesteron konsantrasyonlarının düşük gebelik oranı ile ilişkisinin, luteal destek türüne göre değiştiği sonucuna varmışlardır.

Kolibianakis ve ark. (2004), GnRH antagonistleri kullanılarak IVF ile muamele edilen hastalardaki serum progesteron seviyelerinin siklusun 2. günündeki yüksekliğinin gebelik oranları üzerindeki etkisini değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Progesteron düzeyleri normal olanlarda siklusun 2. gününde yumurtalık stimülasyonunu başlatmışlardır. Uyarılma, rekombinant FSH (rFSH) ile yapılmış ve GnRH antagonistini her zaman stimülasyonun 6. gününde başlatmışlardır. Yüksek progesteron grubunda, normal progesteron grubuna göre hem başlangıç siklusuna hem de embriyo transferi başına anlamlı olarak daha düşük devam eden gebelik oranının mevcut olduğunu tespit etmişlerdir. Döngünün 2. gününde yüksek serum progesteron varlığı, rFSH ve GnRH antagonistleri ile muamele edilen hastalarda gebelik şansının azalması ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Polotsky ve ark. (2009), dondurulmuş çözündürülmüş embriyo transferi (FET) döngüsünün başarısını etkileyen hasta özelliklerini ve taze *in vitro* fertilizasyon döngüsü parametrelerini değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Progesteronun insan koryonik gonadotropin verildiği gün serumdaki yüksek seviyeleri, FET'ten sonra klinik hamileliğin prediktif olduğunu istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde ortaya çıktığını belirtmişlerdir. hCG günündeki progesteron seviyesini, FET başarısının en iyi hormonal öngörücüsü olarak tanımlamışlardır. Ayrıca, insan koryonik gonadotropin uygulama

gündeki serum progesteron ile sonraki FET'in sonucu arasındaki ilişkinin dikkat çekici ve ileri incelemeyi hak ettiğini açıklamışlardır.

Urman ve ark. (1999), hCG uygulama gününde serum P₄ düzeyleri ile intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu ve ET sonrası elde edilen oranlar arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için bir çalışma yapmışlardır. Serum progesteronunu, hCG uygulamasının yapıldığı gün elde edilen dondurulmuş serumlardan ölçmüşlerdir. Serum P₄ düzeyleri yüksek olan siklularda, daha fazla oosit alındığını ve transfer için daha fazla embriyo elde edildiğini belirtmişlerdir. Embriyo başına implantasyon oranının iki grupta da benzer olduğunu belirtmişlerdir. Elde ettikleri verilerin, hCG uygulamasının yapıldığı gün yüksek serum P₄ düzeylerinin ICSI ve ET sonrası implantasyon oranları üzerinde olumsuz bir etkisi olmadığını gösterdiği sonucuna ulaştıklarını bildirmişler.

Özkan ve ark. (2015), GnRH agonist/antagonisti ile hipofizer down-regülasyon yapılan kontrollü overyan hiperstimülasyon (KOH) sikluslarında, hCG uygulandığı gün plazma progesteron düzeyinin tedavi sonuçlarına etkisini araştırmışlardır. hCH günü progesteron seviyesinin 1 ng/mL ve 1.5 ng/mL üzerine çıkmasının elde edilen oosit, matür oosit ve fertilize oosit sayıları ile gebelik oranlarına etkisini kontrol etmişlerdir. Progesteron eşiği 1 ng/mL alındığında prematür lüteinizasyon (PL) insidansı % 34, progesteron eşiği 1.5 ng/mL alındığında ise prematür lüteinizasyon insidansı % 8 olduğunu bildirmişlerdir. Fertilizasyon ve implantasyon oranları 1 ng/mL eşiğinde bir fark göstermezken; 1.5 ng/mL eşiğinin üstünde gebelik ve implantasyonun olmadığını belirtmişlerdir.

Check ve ark. (1994), yaptıkları bir oosit programında hCG zamanında serum progesteron düzeyine göre alıcılarla vericilerdeki gebelik oranlarını karşılaştırmışlardır. hCG zamanında serum progesteron düzeylerine göre iki gruba ayırmışlardır; P₄ ≤1 ng/mL, P₄ >1 ng/mL. Progesteron düzeyi ≤1 ng/mL olan gruptaki verici ve alıcı arasında farklılık göstermediğini, ancak progesteron düzeyinin >1 ng/mL olduğu grupta verici ve alıcı arasında farklılıklar olduğunu ve düşük yapma oranının bu grupta daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Sonigo ve ark. (2014), ovaryum uyarımı sırasında prematüre progesteron yükselmesinin sebepleri ve sonuçları hakkında araştırma yapmışlardır. *In vitro* fertilizasyon için ovaryum stimilasyonundaki progesteron yükselmesinin gebelik oranı üzerinde olumsuz bir etkisinin olabileceğini belirtmişlerdir. Progesteron yükselmesini,

implantasyon penceresini erken açacağını, endometrium reseptivitesini değiştireceğini ve bu nedenle de kusurlu implantasyon ile ilişkilendirdiklerini bildirmişlerdir. Progesteron yükselmesinin oosit kalitesi üzerine herhangi bir etkisinin olmadığını, bu nedenle, hCG tetiklemesi sırasında serum progesteronunu ölçerek ovaryum stimölasyon döngülerinin yakından izlenmesi gerektiğine ve progesteron değerlerinin arttırılmasıyla ilgili stratejilerin daha fazla değerlendirilmesi gerektiği sonucuna vardıklarını belirtmişlerdir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

Çalışmanın oosit materyali, yerel bir özel kesimhanede kesilen sığırların ovaryumlarından elde edilmiştir. Irk bakımından belirli bir ırk üzerinde durulmamış olmasına karşın, Siyah Alaca melezi hayvanlar ağırlıklı olarak kullanılmıştır. Fertilizasyon için kullanılacak olan sperm materyali ticari olarak satın alınan dondurulmuş payetlerden (TR451012043, ATAFEN, İzmir / Türkiye) elde edilmiştir.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan kimyasallar

Malzeme Adı	Firma	Stok kodu
Fosfat Tamponlu Solüsyon	Sigma - Aldrich	P4417
Penisilin / Streptomisin, 100×	Merck	516106
Doku Kültür Medyası 199, Heps	ThermoFisher Sci	22340020
Doku Kültür Medyası 199, GlutaMAX™	ThermoFisher Sci	41150020
Fötal Sığır Serum	Sigma - Aldrich	F4135
Pirüvik Asit Sodyum	Sigma - Aldrich	P4562
β-Estradiol	Sigma - Aldrich	E2758
Luteinleştirici Hormon	Sigma - Aldrich	L5269
Folikül Uyarıcı Hormon	Sigma - Aldrich	F8174
Sığır Serum Albümini, FAF	Sigma - Aldrich	A8806
Sığır Serum Albümini	Sigma - Aldrich	A3311
Heps-TL	Caisson Labs	IVL01
IVF-TL	Caisson Labs	IVL02
SP-TL	Caisson Labs	IVL03
KSOM+AA	Caisson Labs	IVL04
D(-)-Penisilamin hidroklorit	Sigma - Aldrich	P5000
Hipotaurin	Sigma - Aldrich	H1384
(-)-Epinefrin	Sigma - Aldrich	E4250
Progesteron	Sigma - Aldrich	P8783

Fosfat tamponlu solüsyon (PBS) tabletlerinden (Çizelge 3.1) bir tanesi 200 mL deiyonize su içerisinde çözdürülerek 25°C'de 7,4 pH değerine sahip, 0,01 M fosfat, 0,0027 M potasyum klorit ve 0,137 M sodyum klorit çözeltisi hazırlanmıştır. Kullanım öncesi bu solüsyona % 1 v/v 100× Penisilin Streptomisin (P/S) eklemek suretiyle Ovaryum Transfer Medyası (OTM) elde edilmiştir.

Ovaryumlardan temin edilen oositlerin seçimi amacıyla kullanılan Oosit Arama Medyası (OAM) ise hepes katkılı doku kültür medyası (M199) içerisine % 5 v/v fetal sığır serumu (FSS) ve % 1 v/v P/S eklemek suretiyle hazırlanmıştır.

Elde edilen oositlerin *in vitro* matürasyonu amacıyla kullanılan Oosit Olgunlaştırma Medyası (OOM); GlutaMax™ katkılı M199 içerisine % 10 v/v FSS, 100 IU/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, 0,22 mg/mL sodyum piruvat, β-estradiol, luteinleştirici hormon (LH), folikül uyarıcı hormon (FSH) eklenerek elde edilmiştir.

İnkübatör dışındaki embriyo/oosit manipülasyonları için kullanılan Hebes-Tyode Albumin Laktat Piruvat (Hebes-TALP) medyası, ticari olarak satın alınan Hebes-TL içerisine 3 mg/mL sığır serum albümin (SSA), 22 µg/mL sodyum piruvat, 100 IU/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin eklenerek hazırlanmıştır.

Sperm yüzdürme tekniği ve diğer sperm hazırlıklarında kullanılan Sperm Penetrasyon-TALP (SP-TALP) medyası için; ticari olarak satın alınan Sp-TL içerisine 6 mg/mL SSA, 22 µg/mL sodyum piruvat, 100 IU/mL penisilin ve 100 µg/mL streptomisin kullanılmıştır.

İn vitro fertilizasyon-TALP (IVF-TALP) medyası; ticari olarak satın alınan IVF-TL içerisine 6 mg/mL SSA-FAF (yağ asitleri bulunmayan), 22 µg/mL sodyum piruvat, 100 IU/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin, heparin, 20 µmol/L penisilamin, 10 µmol/L hipotaurin, 1 µmol/L epinefrin kullanılarak hazırlanmıştır.

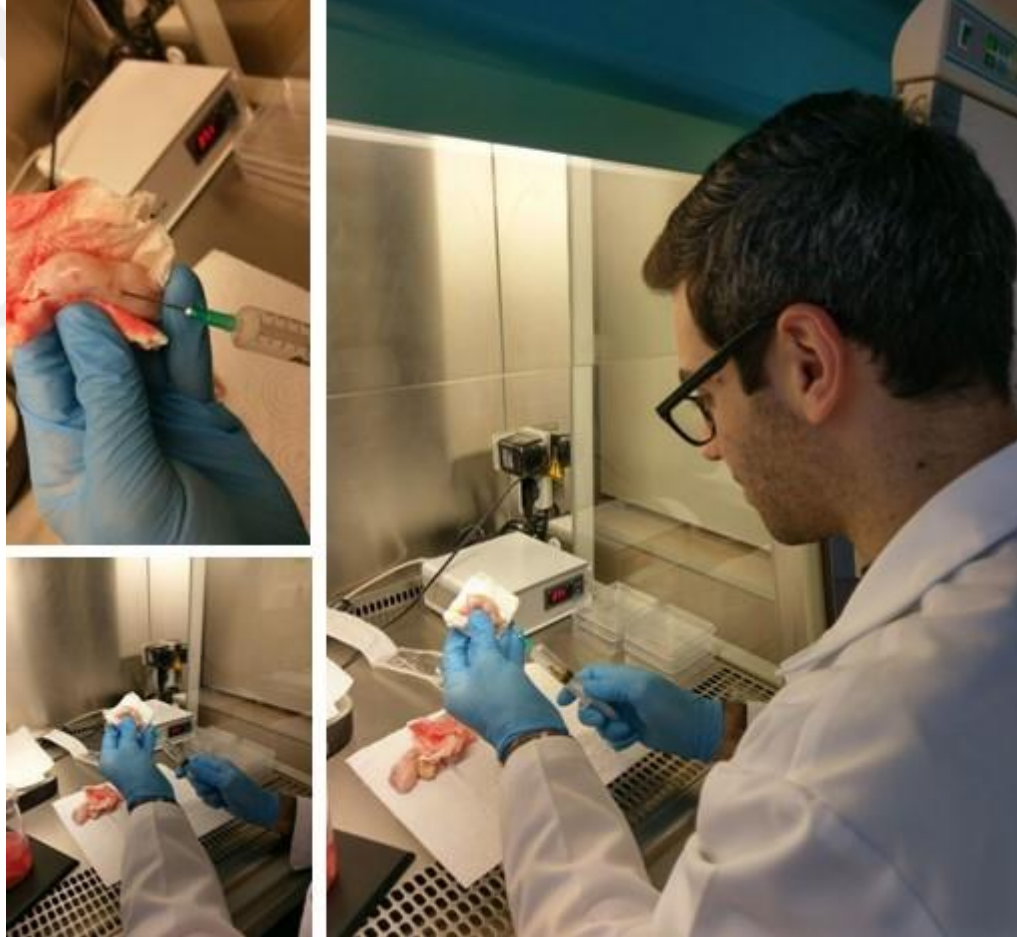
Embriyo gelişiminde kullanılan KSOM-BE medyası, Potasyum Simpleks Optimizasyon Medya + Amino Asit (KSOM+AA) içerisine, 3 mg/mL SSA-FAF, 100 IU/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin eklenerek elde edilmiştir.

Çalışmada kullanılan tüm solüsyonlar haftalık olarak hazırlanmış ve tüm işlemler, laminar flow kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Ovaryumların Toplanması ve *İn Vitro* Matürasyonu (IVM)

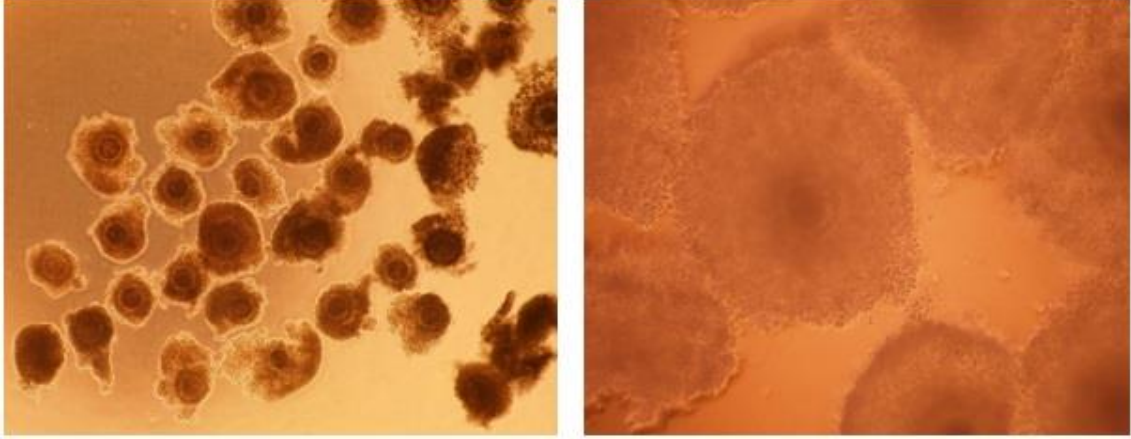
Kesilen sığırlardan elde edilen ovaryumlar yaklaşık 35°C sıcaklığındaki OTM içerisinde muhafaza edilmiş ve ilk hayvanın kesimini izleyen 1-2 saat içerisinde laboratuvara taşınmıştır. Doku kalıntıları cerrahi makas ile ayrıldıktan ve çeşitli kalıntılar PBS solüsyon ile yıkanarak temizlendikten sonra 21G iğne takılı 10 mL tek kullanımlık enjektör yardımı ile ovaryumlar üzerinde bulunan 2-8 mm çapındaki foliküllerden folikül içi sıvı ile birlikte kümülüs-oozit kompleksleri (KOK) aspire edilmiştir (Şekil 3.1). Aspire edilen folikül içi sıvı, ısıtıcı blok üzerinde yer alan konik tabanlı santrifüj tüpleri içerisinde biriktirilerek KOK'nin tabana çökmesi sağlanmıştır.



Şekil 3. 1. Ovaryumlar üzerine yer alan foliküllerin aspirasyonu

Konik tabanlı tüpün dibindeki çöküntü otomatik pipet yardımı ile kılavuz çizgili kare petri içerisinde aktarılmış ve yeteri kadar OAM eklendikten sonra 10-40× optik büyütmeye sahip ışık mikroskobu altında oosit seçme işlemi yapılmıştır. Morfolojik

olarak uygun yapıya sahip immatür KOK'nin seçimi işlemi Yang ve ark. (2003) ve Boni ve ark. (2002) tarafından yapılan çalışmalar sonucunda belirledikleri ölçütler doğrultusunda yapılmıştır. Bu amaçla antral foliküllerden toplanan en az 3 veya 4 katmanlı kümülüs hücrelerine sahip, sitoplazması homojen görünümdeki KOK *in vitro* olgunlaştırmaya alınmıştır (Şekil 3.2).

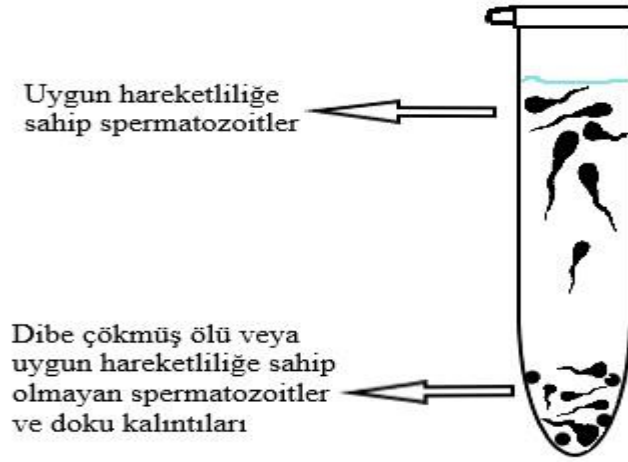


Şekil 3. 2. En az 3 veya 4 katmanlı kümülüs-oosit kompleksleri

3.2.2. *IN VITRO* FERTİLİZASYON

Olgunlaştırma işlemi havada % 5 CO₂, maksimum nem ve +38°C sıcaklık koşullarındaki inkübatör içerisinde, her bir kuyucukta 500 µL OOM bulunan 4 kuyucuklu petri kullanılarak ve kuyucuk başına 30-40 KOK bırakılmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık olarak 18-20 saat süresince olgunlaşmaya bırakılan KOK bu süre sonunda nükleer matürasyonu bakımından kontrol edilmiş ve uygun yapıda olmayanlar ayıklanmıştır. Uygun yapıya sahip olan KOK her bir kuyucukta yaklaşık 20 adet olacak biçimde 4 kuyucuklu petriye, IVF-TALP medya içerisine alınmıştır. Bu esnada dondurulmuş spermelerin hazırlık işlemleri tamamlanmıştır.

Dondurulmuş boğa sperması +38°C su içerisinde 30-45 sn süresince çözdürülmüş ve motil spermelerin seçilmesi ve kapasitasyonu için yüzdürme (swim up) tekniği (Parrish ve ark. 1986) kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. Yüzdürme (swim up) tekniği

Bu amaçla içerisinde SP-TALP medya bulunan tüpün tabanına çözdürülen sperma dikkatlice bırakılmış ve inkübatör içerisinde maksimum nem, +37°C sıcaklık ve havada % 5 CO₂ atmosfer koşullarında 40 dakika süresince inkübe edilmiştir. Motil spermanın kapasitasyonunu müteakiben dipte yer alan çöküntüyü bozmamaya azami özen gösterilerek üstte kalan medya bir santrifüj tüpü içerisine alınarak 10 dk 400G 'de santrifüj edilmiş ve bu işlem sonucunda hipermotil spermatozoa'nın dibe çökmesi sağlanmıştır. Santrifüj işleminin ardından hemositometre (Şekil 3.4) yardımı ile yaklaşık konsantrasyon belirlenmiş (Eşitlik 1) ve IVF-TALP medya yardımı ile 1×10^6 spermatozoa/mL final konsantrasyon elde edilecek biçimde seyreltme işlemi yapılmıştır.

$$\text{Konsantrasyon} = n \times SK \times 50000 \dots\dots\dots \text{Eşitlik 1}$$

Verilen eşitlikte hemositometrede sayılan spermatozoa n , sulandırma katsayısı ise SK ile temsil edilmiştir.



Şekil 3. 4. Thoma lamı

Konsantrasyonu belirlenen spermanın matür oositlerin bulunduğu kuyucuklara bırakılmasının ardından *in vitro* fertilizasyonun sağlanması amacıyla 8-12 saat süresince hücreler +38°C, maksimum nem ve havada % 5 CO₂ koşullarında birlikte inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.3. İN VİTRO EMBRİYO KÜLTÜRÜ (IVC)

Fertilizasyon işleminin ardından kümülüs hücreleri ve spermatozoa kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla embriyolar 2-3 dakika süresince HEPES-TALP medya içerisine alınarak vorteks uygulanmıştır. KSOM-BE medya içerisine taşınan embriyoları çevreleyen hücrelerin uzaklaştırılmasının ardından *in vitro* embriyo kültürü +38°C sıcaklık, maksimum nem ve azot ile dengelenmiş % 5 CO₂ ve % 5 O₂ atmosfer koşulları sağlanmıştır. Fertilizasyonun gerçekleştiği zaman “Gün 0” olarak kabul edilmek şartıyla 7’nci güne kadar kültüre devam edilmiş ve embriyonik gelişim aşamaları kaydedilmiştir.

3.2.4. DENEME DESENİ VE ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Çalışma *in vitro* fertilizasyonun ardından (1. gün) KSOM-BE içerisine eklenen (1) 0 ng/mL progesteron (K), (2) 25 ng/mL progesteron (P25), (3) 50 ng/mL progesteron (P50) ve (4) 100 ng/mL progesteron (P100) olacak biçimde 4 grup üzerinden ve 8 tekerrürlü olarak tesis edilmiştir.

3.2.5. İSTATİSTİK ANALİZLER

Çalışma sonucunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde. Frekans tablolarından yararlanılmıştır. Her bir gelişim aşamasındaki embriyoların oranı, veriler normal dağılış göstermediği için öncelikle arksin transforme edilmiş ve ardından SPSS paket programı (v23.0, Illinois, ABD) kullanılarak ANOVA ile analiz edilmiştir. Uygulamalar arasındaki farklılıkların karşılaştırılmasında ise Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

In vivo fertilizasyonu takip eden günlerde gebelik kayıplarının önlenmesinde progesteron önemli bir rol oynamaktadır. P₄ epitelyal veya stromal hücreler yoluyla embriyo gelişimi üzerindeki etkilerinden kaynaklanmaktadır (Ghaemi, 2008). Mevcut araştırmada kesimhanede kesilen Siyah Alaca ineklere ait 2-8 mm çapındaki foliküllerden, iyi ve orta kalitede toplam 816 adet KOK kullanılmış ve ilk bölünme oranları **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**'de gösterilmiştir.

Çizelge 4. 1. *In vitro* kültüre alınan embriyoların bölünme oranları

Progesteron	0 ng/mL (n=193)	25 ng/mL (n=210)	50 ng/mL (n=212)	100 ng/mL (n=201)	P değeri
<i>Klevaj</i>	78,8±1,23 ^{a,b}	88,6±0,35 ^b	82,1±0,45 ^b	53,7±2,68 ^a	0,027
<i>Bölünmeyen</i>	21,2±1,23 ^{a,b}	11,4±0,35 ^a	17,9±0,45 ^a	46,3±2,68 ^b	

Değerler Ortalama±OSH şeklinde verilmiştir. Aynı satırdaki farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre (P<0,05) farklı grupları ifade etmektedir.

Progesteronun embriyo gelişimi üzerine doğrudan etkilerinin tespit edilmesi için, progesteron ilavesinin uygun zamanda yapılması büyük önem arz etmektedir ve bu amaçla da progesteron ilavesi *in vitro* kültür (IVC) (IVF sonrası 1. gün) aşamasında yapılmıştır. Yapılan bu çalışmada gözlemlenen ilk aşama fertilizasyonu takip eden 48 saatlik süre içerisindeki klevaj oranları olmuştur. Fertilizasyonu takiben membran içerisinde hücrenin 2'ye bölünmesiyle başlayan gelişime ilk klevaj denir. Klevaj oranları ilk klevajı gözlenen hücre sayısının deneme grubundaki toplam KOK sayısına oranı ile elde edilmiştir. **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**'den görüleceği üzere embriyoların ortalama yaklaşık olarak % 76'sında ilk klevaj gözlenmiştir. İlk klevaj ortalamasının düşük gerçekleşmesinin nedeni özellikle 100 ng/mL progesteron eklenen gruptaki embriyoların bölünme oranlarının düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Buna bağlı olarak da deneme grupları arasında gözlenen farklılıklar önemli bulunmuştur (P<0,05). Yapılan çoklu karşılaştırma testi sonuçlarına göre sığır embriyolarının *in vitro* kültürü esnasında, kültür medyasına ilave edilen 25 ve 50 ng/mL dozlarındaki progesteron hücre bölünmelerini teşvik edecek yönde etki yapmıştır.

Foliküler gelişim aşamalarındaki hormonlar arasında progesteronun da yer alıp hormonal mekanizmadaki direkt etkisi ve geri bildirimleriyle diğer hormonlara olan

etkisi *in vivo* çalışmalarda kan plazmalarındaki varlığıyla kanıtlanmıştır. Ovaryum stimülasyonu sonrası gebelik oranlarının artırılmasında progesteron enjeksiyonu yaygın olarak tercih edilen bir uygulama olsa da progesteronun gebelik üzerindeki bu etkisinin doğrudan embriyoyu etkilemek suretiyle mi gerçekleştiği ya da anne üreme kanalı üzerindeki dolaylı etkisinden mi kaynaklandığı konusundaki bulgular çelişkilidir (Ghaemi ve ark., 2008). Bu konuda bazı araştırmacılar doğrudan bir etkiye işaret etmekte iken (Ferguson ve ark., 2005; Merlo ve ark., 2007), bazı araştırmacılar ise etkinin yalnızca dolaylı yollarla olduğu tezini savunmuşlardır (Goff ve Smith, 1998; Reggio ve ark., 1997). Söz konusu görüşler arasındaki farklılıklar kullanılan kültür sistemlerine, mineral yağ ile yapılan kültürde steroidlerin lipofilik karakteristiği nedeniyle hormon yararlanılmasının azalması gibi sebeplerden kaynaklanabilmektedir. Embriyonik gelişimin tüm aşamalarında mevcut olan progesteron reseptörü mRNA bu doğrudan etkilerden sorumlu en önemli faktörlerdendir (Lonergan, 2011).

Yapılan bu çalışmada, kültür medyasına 25 ng/mL (% 88,6) ve 50 ng/mL (% 82,1) konsantrasyonunda eklenen progesteron klevaj oranlarını önemli derecede artırmıştır ($p < 0,05$). Mevcut bulgular *in vitro* kültürün ilk 72 saatinde embriyoların bölünme oranlarının arttığını tespit eden Ghaemi ve ark (2008) ile paralellik sergilemektedir.

Sığır embriyolarının *in vitro* kültüründe önemli hücre bloklarından bir tanesi 8-16 hücre bloğu olarak bilinmektedir. Bu amaçla yapılan bu çalışmada morula ve blastosist aşamasına erişen embriyo verimleri kaydedilmiştir. **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**2’de ortalama yüzde değerler, standart hata ile birlikte gösterilmiş bununla birlikte embriyo sayıları da parantez içerisinde gösterilmiştir.

Morula gelişimi, fertilizasyon sonrası erken ve geç dönemde gerçekleşir. İlk 72 saat sonunda zigotun 12 - 16 hücreli dönemi erken morula dönemi, ilk 96 saate kadar olan 16 - 32 hücreli dönemi ise geç morula dönemidir. Blastosist, *in vitro* kültürde inseminasyondan 5 gün sonra ortaya çıkan bir embriyo gelişim evresi olarak kabul edilir (Ozgur, 2018). Geç dönemdeki morulanın içerisine uterin sıvının girmesiyle morulanın merkezinde bir boşluk oluşur, ortaya çıkan bu yapıya blastosist, oluşan boşluğa ise blastoel boşluğu denir.

Çizelge 4. 2. Gelişim aşamalarına göre embriyo verimleri

Deneme grupları	Kontrol (n=152)	P25 (n=186)	P50 (n=173)	P100 (n=108)	P değeri
Morula	45,4±0,03	59,7±0,01	55,2±0,01	43,5±1,45	0,358
Blastosist	30,3±0,00 ^{a,b}	37,1±0,01 ^b	35,6±0,01 ^b	27,8±0,36 ^a	0,009

Veriler % Ortalama±SH şeklinde gösterilmiştir (n). Aynı satırdaki farklı harfler Duncan çoklu karşılaştırma testine göre farklı grupları ifade etmektedir.

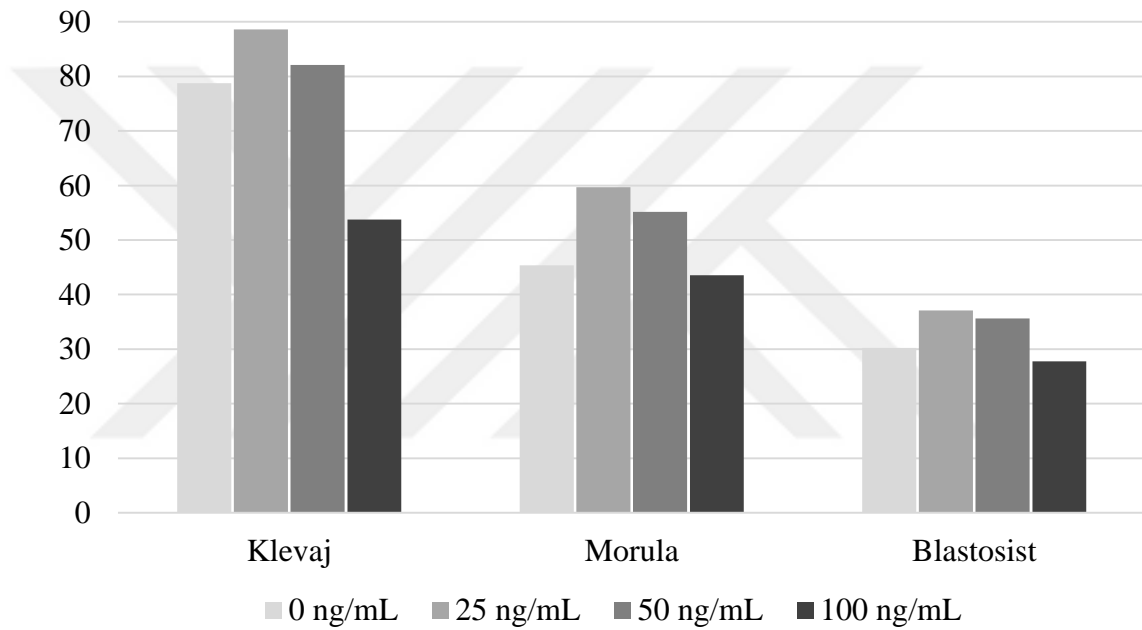
Embriyonik gelişim aşamaları hesaplanırken klevaj sayıları temel alınarak oranlar hesaplanmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, sığır embriyolarının *in vitro* kültürü için kültür medyasına değişen oranlarda ilave edilen progesteronun morula aşamasına erişen embriyo sayısı üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.2**). Progesteronun en önemli etki mekanizması progesteron reseptörleridir (PGR). Clemente ve ark. (2009) sığır embriyolarının, morula hariç tüm gelişim aşamalarında PGR tespit edildiğini bildirmişlerdir. Morula evresinde, PGR'nin bulunmamasından dolayı bu safhada P₄ embriyonik gelişime herhangi bir etki yapmamıştır. Morula aşamasında azalan PGR, blastosist aşamasına erişildiğinde tekrar yükselmektedir.

Elde etmiş olduğumuz bulgular, progesteron katkılı medyada embriyoların daha büyük çapta, önemli ölçüde 1. kalitede blastosiste ulaştıklarını ve daha iyi gelişim oranı sergilediklerini bildiren Ferguson ve ark (2012) ile de benzerlik göstermektedir.

Progesteron reseptörleri endometriyal doku tarafından eksprese edilmektedir. Bu durum, embriyonik gelişim sırasında progesteronun birincil etki şekli olabileceğini düşündürmektedir. Progesteron, konseptus uzamasına katkıda bulunan taşıyıcıları ve salgılanan proteinleri kodlayan uterustaki genlerin ekspresyonunu değiştirmektedir. Ayrıca gelişmekte olan embriyoya enerji sağlayan trigliserit sentezinin ve glikozun taşınmasına da katkıda bulunmaktadır (Larson ve ark. (2011)).

Sığır embriyolarının *in vitro* kültürü aşamasında, kültür medyasına değişen oranlarda ilave edilen progesteronun, blastosist verimi üzerine pozitif etkisi olduğu (P<0,01) yapılan bu çalışma ile belirlenmiştir (**Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.1**, **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.2**). Kültür medyasına 100 ng/ml konsantrasyonda eklenen progesteron blastosist verimlerini önemli oranda düşürmüş, 25 ve 50 ng/mL konsantrasyondaki progesteron ilavesi embriyo gelişimini olumlu yönde teşvik etmiştir

(Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.1). Ayrıca bu çalışmanın sonuçları, progesteronun *in vitro* sığır embriyosu kalitesini değiştiremediğini göstermiştir. Bu sonuçlar, progesteronun embriyo gelişimi üzerindeki diğer epitelyal veya stromal hücreler aracılığıyla dolaylı etkilerine bağlı olabilir. 100 ng/mL P₄ eklenmiş olan kültür medyasındaki embriyo gelişim oranları diğer tüm gruplardan daha düşük olmuştur. Bu durumun nedeni, P₄ miktarının kültür medyasındaki diğer hormon miktarlarına ve diğer medya katkılarına olan oranının çok fazla artmış olmasıyla birlikte, embriyodaki P₄ reseptörlerinin gereğinden fazla P₄'e maruz kalmasıyla embriyoda dejenerasyona sebep olabileceği düşünülmektedir.



Şekil 4. 1. Deneme gruplarına göre klevaj ve embriyonik gelişim aşamaları

Fukui ve ark. (1982), Wiemer ve ark. (1987), Goff ve Smith (1998) ve Reggio (1997) yaptıkları çalışmalarda ko-kültür aşamasında sığır embriyolarını progesteron ile desteklemişlerdir. Kültür ortamına fertilizasyondan önce eklenen progesteron, klevaj öncesi embriyolarının fazla miktarda progesterona maruz bırakılmaları nedeniyle gelişimi baskı altına alabilmektedir.

Ferguson ve ark (2012) embriyoların kültür medyasına tohumlamadan 3 gün sonrasında eklenen fizyolojik konsantrasyonlardaki 15 ng/mL progesteron ilavesinin embriyo gelişimi üzerine çeşitli şekillerde katkı yapabileceğini belirtmiştir. Bu etki

mekanizmalarını ise embriyo kalitesinin ve oranının yükselmesi şeklinde bildirmişlerdir.

Araştırma sonucunda elde ettiğimiz bulgular, 25 ng/mL ve 50 ng/mL progesteronun embriyo gelişimi üzerine doğrudan etki gösterebileceğini veya gelişmeye yardımcı olan sitokinlerin ekspresyonunu dolaylı olarak teşvik edebileceğini göstermektedir. Martal ve ark. (1997), progesteron gibi yumurtalık hormonlarının sitokin üretiminin düzenlenmesinde rol oynadığını göstermişlerdir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan tez projesi, *in vitro* embriyo kültürü işlemleri sırasında progesteron hormonunun farklı dozlarının embriyo gelişim aşamalarına herhangi bir etkisinin olup olmadığını araştırmaya yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizler, kontrol ve deneme gruplarına ait embriyolarda P₄'ün olumlu etkileri olduğunu göstermiştir.

Kültür medyalarına eklenen farklı miktarlardaki P₄ katkısı, elde edilen veriler ışığında, embriyo gelişim aşamalarında tespit edilen sonuçlar şu şekildedir:

- (1) Klevaj aşamasına ulaşan embriyo grupları arasında en iyi sonuç 25 ng/mL P₄ katkılı medyadan elde edilmiştir.
- (2) Morula evresine geçebilen embriyolara, P₄ katkılı medyaların herhangi bir etki etmediği elde edilmiştir.
- (3) Embriyo gelişimlerinin blastosist aşamalarına ulaşmalarına en iyi etki 25 ng/mL P₄ katkılı medya tarafından sağlandığı tespit edilmiştir.

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda, P₄ katkısının embriyo gelişiminin birçok aşamasında embriyonik gelişimi desteklediği görülmektedir. Embriyo gelişimlerinin en iyi seviyelere ulaşmalarını teşvik edebilecek medyanın, 25 ng/mL P₄ katkılı medya olduğu tespit edilmiştir. P₄ seviyesi arttıkça sonuçlar olumsuz etkilenmiştir. *In vitro* embriyo üretiminde, en iyi sonuçları elde etmeyi sağlayabilecek protokolü belirlemek ve böylece maksimum embriyo üretimini sağlamak amacıyla 6,25 ng/mL ve 12,5 ng/mL P₄ katkılı medyaların da denenmesi önerilmektedir. Hatta elde edilen bu embriyoların transferi sonrasındaki gebelik oranının, ileriki embriyonik gelişimin ve fetal gelişimin incelenmesi, *in vitro* embriyo kültüründe uygulanan farklı P₄ katkısının embriyo üzerindeki etkilerini daha net ortaya koymaya yardımcı olabilir.

KAYNAKLAR

- Akkoç, T., 2012. In vitro sığır blastosist üretimi üzerine tanımlanmış medyumların etkisi ve blastosistlerin farklı kriyoprezervasyon teknikleri ile dondurulması. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi
- Alaçam, E., Salmanoğlu, R., Çelebi, M., Kutluca, A. ve Baş, A., 1996. **Sütçü inek yetiştirmelerinde fonksiyonel infertilite kontrol programı uygulaması.** Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Ankara
- Anonim, 2016a. Tür ve ırklarına göre büyükbaş ve küçükbaş kesilen hayvan sayısı ve et üretim miktarları. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002. Erişim tarihi: 27.06.2016
- Anonim, 2016b. Tür ve ırklarına göre sağılan hayvan sayısı ve süt üretim miktarı. http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1002. Erişim tarihi: 27.06.2016
- Anonim, 2019. Östrus siklusu sırasında inek kanındaki hormon konsantrasyonları. [http://oer2go.org/mods/en-infonet/export/default\\$ct\\$791\\$livestockSpecies.html](http://oer2go.org/mods/en-infonet/export/defaultct791$livestockSpecies.html). Erişim Tarihi: 04.02.2019
- Ballester, L., Romero-Aguirregomezcorta, J., Soriano-Ubeda, C., Matas C., Romar, R., Coy, P., 2014. Timing of oviductal fluid collection, steroid concentrations, and sperm preservation method affect porcine in vitro fertilization efficiency. **Fertility and Sterility**, 102 (6): 1762-1768.
- Basuray, R., Rawlins, R.G., Radwanska, E., Henig, I., Sachdeva, S., Tummon, I., Binor, Z., Dmowski, W.P., 1988. High progesterone/estradiol ratio in follicular fluid at oocyte aspiration for in vitro fertilization as a predictor of possible pregnancy. **Fertility and Sterility**, 49 (6): 1007-1011.
- Boni, R., Cuomo, A., Tosti, E., 2002. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. **Biology of Reproduction**, 66 (33): 836-842.
- Bosch, E., Labarta, E., Crespo, J., Simon, C., Remohi, J., Jenkins, J., Pellicer, A., 2010. Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles. **Human Reproduction**, 25 (8): 2092-2100.
- Camargo, L.S.A., Viana, J.H.M., Sa, W.F., Ferreira, A.M., Ramos, A.A., Filho, V.R.V., 2006. Factors influencing in vitro embryo production. **Animal Reproduction**, 3 (1): 19-28.
- Check, J.H., Hourani, C., Choe, J.K., Callan, C., Adelson, H.G., 1994. Pregnancy rates in donors versus recipients according to the serum progesterone level at the time of human chorionic gonadotropin in a shared oocyte program. **Fertility and Sterility**, 61 (2): 262-264.
- Clemente, M., Fuente, J.D.L., Fair, T., Naib, A.A., Gutierrez-Adan, A., Roche, J.F., Rizos, D., Lonergan, P., 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium?. **Reproduction and Fertility**, 138 (3): 507-517.
- Ferguson, C.E., Davidson, T.R., Mello, M.R., Lima, A., Kesler, D., Wheeler, M.B., Godke, R.A., 2005. Evidence for a direct effect of P4 on IVF-derived bovine 8-cell embryos. **Reproduction and Fertility**, 17 (2): 219.
- Ferguson, C.E., Kesler, D.J. and Godke, R.A., 2012. Progesterone enhances in vitro development of bovine embryos. **Theriogenology Journal**, 77 (1): 108-114.

- Fukui, Y., Fukushima, M., Terawaki, Y., Ono, H., 1982. Effect of gonadotropins, steroids and culture media on bovine oocyte maturation in vitro. **Theriogenology**, 18 (2): 161-175.
- Ghaemi, S.R., Salehnia, M., Valojerdi, M.R., 2008. The effect of progesterone and exogenous gonadotropin on preimplantation mouse embryo development and implantation. **Experimental Animals**, 57 (1): 27-34.
- Gietema, B., 2005. **Reproduction in Dairy Cattle 1**. Agromisa Foundation, 9052850127, 54, Wageningen.
- Goff, A.K., Smith, L.C., 1998. Effect of steroid treatment of endometrial cells on blastocyst development during co-culture. **Theriogenology**, 49 (5): 1021-1030.
- Goovaerts, I.G.F., Leroy, J.L.M., Langbeen, A., Jorssen, E.P.A., Bosmans, E., Bols, P.E.J., 2012. Unravelling the needs of singly in vitro-produced bovine embryos: from cumulus cell co-culture to semi-defined, oil-free culture conditions. **Reproduction, Fertility and Development**, 24 (8): 1084-1092.
- Huang, Y., Wang, E., Du, Q., Xiong, Y., Guo, X., Yu, Y., Sun, Y., 2015. Progesterone elevation on the day of human chorionic gonadotropin administration adversely affects the outcome of IVF with transferred embryos at different developmental stages. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 13: 82.
- Kolibianakis, E.M., Zikopoulos, K., Schiettecatte, J., Smits, J., Toumaye, H., Camus, M., Steirteghem, A.C.V., Devroey, P., 2004. Profound LH suppression after GnRH antagonist administration is associated with a significantly higher ongoing pregnancy rate in IVF. **Human Reproduction**, 19 (11): 2490-2496.
- Koycheva, Y.M., Taseva, T.K., Popova, S.G., Stoimenova, D.B., Penkov, L.I., 2015. Effects of progesterone on the expression of growth-related imprinted genes *igf2*, *h19* and *grb10* in the mouse placenta. **Genetics and Plant Physiology**, 5 (1): 86-93.
- Larson, J.E., Krisher, R.L., Lamb, G.C., 2011. Effects of supplemental progesterone on the development, metabolism and blastocyst cell number of bovine embryos produced in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, 23 (2): 311-318.
- Lonergan, P., 2011. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, 76 (2011): 1594.
- Martal, J., Chene, N., Camous, S., Huynh, L., Lantier, F., Hermier, P., L'Haridon, R., Charpigny, G., Charlier, M., Chaouat, G., 1997. Recent developments and potentialities for reducing embryo mortality in ruminants: the role of IFN-tau and other cytokines in early pregnancy. **Reproduction, Fertility and Development**, 9 (3): 355-380.
- Merlo, B., Iacono, E., Mari, G., 2007. Effect of progesterone and epidermal growth factor on in vitro-produced eight-cell bovine embryos in a serum-free culture medium. **Reproduction, Fertility and Development**, 19 (1): 211.
- Miller, K.F., Behnke, E.J., Arciaga, R.L., Goldberg, J.M., Chin, N.W., Awadalla, S.G., 1996. The significance of elevated progesterone at the time of administration of human chorionic gonadotropin may be related to luteal support. **Assisted Reproduction and Genetics**, 13 (9): 698-701.
- Nayak, S., Ochalski, M.E., Fu, B., Wakim, K-M., Chu, T.J., Dong, X., Wakim, A.N., 2014. Progesterone level at oocyte retrieval predicts in vitro fertilization success in a short-antagonist protocol: a prospective cohort study. **Fertility and Sterility**, 101 (3): 676-682.

- Ozgun, K., Bulut, H., Berkkanoglu, M., Humaidan, P., Coetzee, K., 2018. Artificial cryopreserved embryo transfer cycle success depends on blastocyst developmental rate and progesterone timing. **Reproductive BioMedicine Online**, 36 (3): 269-276.
- Özkan, Z.S., Sapmaz, E., Ekinci, M., Timurkan, H., 2015. **IVF sikluslarında HCG günü progesteron seviyesinin tedavi sonuçlarına etkisi**. Fırat Üniversitesi Hastahanesi Tüp Bebek Merkezi, Elazığ
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Crister, E.S., Eyestone, W.H., First, N.L., 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, 25 (4): 591-600.
- Perry, G., 2016. 2016 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals.
https://www.iets.org/pdf/comm_data/IETS_Data_Retrieval_Report_2016_v2.pdf
f. Erişim tarihi: 22.11.2018
- Pfeifer, L.F.M., Sartori, R., Pivato, I., Rumpf, R., Nogueria, G.P., Xavier, E.G., Dionello, N.J.L., Correa, M.N., 2009. Effect of circulating progesterone on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Animal Reproduction**, 6 (3): 473-480.
- Polotsky, A.J., Daif, J.L., Jindal, S., Lieman, H.J., Santoro, N., Pal, L., Serum progesterone on the day of human chorionic gonadotropin administration predicts clinical pregnancy of sibling frozen embryos. **Fertility and Sterility**, 92 (6): 1880-1885.
- Reggio, B.C., Lynn, J.W., Godke, R.A., 1997. The effect of progesterone on the development of IVF-derived bovine embryos cultured in a semi-defined culture medium. **Theriogenology**, 47 (1): 284.
- Rizos, D., Scully, S., Kelly, A.K.Ealy, A.D., Moros, R., Duffy, P., 2012. Effects of human chorionic gonadotrophin administration on Day 5 after oestrus on corpus luteum characteristics, circulating progesterone and conceptus elongation in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, 24 (3): 472-781.
- Roque-Velazquez, C.I., Montaldo-Valdenegro, H.H., Gutierrez-Aguilar, C.G., Hernandez-Ceron, J., 2016. Efecto de una inyección única de progesterona, cinco días después de la inseminación, en la fertilidad de vacas lecheras. **Agrociencia**, 50 (3): 287-296.
- Sharma, S., Majumdar, A., 2016. Determining the optimal duration of progesterone supplementation prior to transfer of cryopreserved embryos and its impact on implantation and pregnancy rates: a pilot study. **Reproductive Medicine**, 2016 (7128485): 1-7.
- Sofuoğlu, K., Yılmaz, S., Delikara, N., Çetinkaya, T., Yılmaz, E., 2008. Yardımcı üreme tekniklerinde iki farklı luteal faz progesteron kullanımını karşılaştırılması. **Zeynep Kamil Tıp Bülteni**, 39 (3): 117-120.
- Sonigo, C., Dray, G., Roche, C., Cédric-Durnerin, I., Hugues, J-N., 2014. Impact of high serum progesterone during the late follicular phase on IVF outcome. **Reproductive BioMedicine Online**, 29 (2014): 177-186.
- Stronge, A.J.H., Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Mee, J.F., Kenny, D.A., Morris, D.G., 2005. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, 64 (5): 1212-1224.
- Topuzoğlu, D.B., 2011. Farklı büyüklükteki sığır oositlerinin maturasyon ve fertilizasyonu üzerine insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve epidermal

büyüme faktörünün (EGF) etkilerinin araştırılması. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi

- Urman, B., Alatas, C., Aksoy, S., Mercan, R., Isiklar A., Balaban, B., 1999. Elevated serum progesterone level on the day of human chorionic gonadotropin administration does not adversely affect implantation rates after intracytoplasmic sperm injection and embryo transfer. **Fertility and Sterility**, 72 (6): 975-979.
- Vaisbuch, E., Leong, M. and Shoham, Z., 2012. Progesterone support in IVF: is evidence-based medicine translated to clinical practice? A worldwide web-based survey. **Elsevier Inc.**, 25 (2): 139.
- Wiemer, K., Amborski, G., Denniston, R., White, K., Godke, R., 1987. Use of a hormone-treated fetal uterine fibroblast monolayer system for in vitro culture of bovine embryos. **Theriogenology**, 27 (1): 294-299.
- Xu, B., Li, Z., Zhang, H., Jin, L., Li, Y., Ai, J., Zhu, G., 2012. Serum progesterone level effects on the outcome of in vitro fertilization in patients with different ovarian response: an analysis of more than 10,000 cycles. **Fertility and Sterility**, 97 (6): 1321-1327.
- Yang, B-C., Im, G-S., Chang, W-K., Lee, Y.K., Oh, S-J., Jin, D-I., Im, K-S., Lee, C-K., 2003. Survival and in vitro development of immature bovine oocytes cryopreserved by vitrification. **Asian-Aust. J. Anim. Sci.**, 16 (1): 23-28.
- Zheng, P., Si, W., Bavister, B.D., Yang, J., Ding, C. and Ji, W., 2003. 17 β -Estradiol and progesterone improve in-vitro cytoplasmic maturation of oocytes from unstimulated prepubertal and adult rhesus monkeys. **Human Reproduction**, 18 (10): 2144.

ÖZGEÇMİŞ

Yazar, 1990 yılında Adana'nın Yüreğir ilçesinde doğdu. İlköğretim ve Liseyi Yüreğir'de tamamladı. Adnan Menderes Üniversitesi Bozdoğan Meslek Yüksekokulu Hayvan Yetiştiriciliği ve Sağlığı Bölümü'nü 2008 yılında kazandı. Üniversiteden 2010 yılında mezun oldu. Bir yıl sonra Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü'nü kazandı. Üniversiteden 2015 yılında mezun oldu. 2012 yılında Anadolu Üniversitesi İşletme Fakültesi Konaklama İşletmeciliği Bölümü'nü kazandı. Üniversiteden 2015 yılında mezun oldu. 2014 yılında Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden Sığırlarda Recto-Vaginal Yolla Suni Tohumlama kurs sertifikasını aldı. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı'nda Eylül 2015 tarihinde Yüksek Lisans öğrenimine devam etti. 2017 yılında Bingöl Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ni kazandı.