

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI ANTIOKSİDANLARIN (PENTOKSİFİLİN VE BORİK
ASİT) İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO KÜLTÜR MEDYUMLARINA
İLAVESİNİN EMBRİYO GELİŞİMİ VE KALİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

FATMA SATILMIŞ

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK DOĞUM ve JİNEKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mehmet GÜLER

KONYA-2019

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI ANTIOKSİDANLARIN (PENTOKSİFİLİN VE BORİK
ASİT) İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO KÜLTÜR MEDYUMLARINA
İLAVESİNİN EMBRİYO GELİŞİMİ VE KALİTESİ ÜZERİNE
ETKİLERİ**

FATMA SATILMIŞ

DOKTORA TEZİ

VETERİNERLİK DOĞUM ve JİNEKOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Mehmet GÜLER

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 17102051 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2019

ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Arş. Gör. Fatma SATILMIŞ tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Tefvik TEKELİ

Selçuk Üniversitesi

Danışman:

Prof. Dr. Mehmet GÜLER

Selçuk Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Mehmet Bozkurt ATAMAN

Selçuk Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Gökhan DOĞRUER

Mustafa Kemal Üniversitesi

Üye:

Prof. Dr. Mustafa Kemal SARIBAY

Mustafa Kemal Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir

Prof.Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Hayvansal kaynaklı gıdaların artırılmasına yönelik çalışmalar yüzyıllardır devam etmektedir. Hatta bu amaçla ıslah çalışmaları yapılmakta ve bu çalışmalarda; suni tohumlama, in vivo/in vitro embriyo transferi çalışmaları ve klonlama uygulamalarından yararlanılmaktadır. Yapılan çalışmalar arasında, in vitro embriyo üretiminin zor ve başarı oranının düşük olması sebebi ile başarısını artırmaya yönelik birçok deneme yapılmaktadır. Bu denemelerin başlıcaları; maturasyon solüsyonları ve embriyo kültür vasatlarına hormon, vitamin, antioksidan, mineral yağlar ve benzeri ilavelerin yapılmasıdır. Embriyo kültür vasatlarına eklenen maddelerin yetersizliği başta olmak üzere, embriyo kalitesi üzerinde birçok stres faktörünün rolü bulunmaktadır. Kültür ortamında normal metabolik enzimatik reaksiyonlar sonucu sürekli olarak hücrelerde serbest radikaller oluşmaktadır. Bu radikaller de antioksidan savunma sistemleri ile ortadan kaldırılabilir. Antioksidan maddelerin embriyo kültür vasatına ilavesi ile oksidatif stres azaltılarak embriyo gelişim ve kalitesini arttırmaya yönelik yapılan çalışmalar mevcuttur. Sunulan çalışmada; antioksidan oldukları bilinen pentoksifilin ve borik asitin farklı dozlarının sığır embriyo kültür vasatına ilavesi yapılarak kültür sistemindeki oksidatif stresi azaltmak, embriyo kalitesi ve sayısını artırmak ve embriyo gelişim aşamalarına etkilerini değerlendirmek hedeflenmiştir.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince beni her daim destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet GÜLER'e, doktora eğitimim süresinde bilgi ve tecrübeleri ile gelişimimde büyük katkıları olan Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Tevfik TEKELİ'ye, Prof. Dr. Dursun Ali DİNÇ'e, Prof. Dr. Hüseyin ERDEM'e, Prof. Dr. İbrahim AYDIN'a, Dr. Öğrt. Üyesi S. Ülküm ÇİZMECİ'ye teşekkür ederim. Sunulan tez çalışmasının uygulamalarında beni yalnız bırakmayan Arş. Gör. Dr. Hasan ALKAN'a, Dr. Öğrt. Üyesi M. Buğra KIVRAK'a, Arş. Gör. M. Furkan ÇİFTÇİ'ye, Arş. Gör. Ö. Faruk YEŞİLKAYA'ya, tez çalışmamın istatistiklerinin değerlendirilmesindeki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Agah TEKİNDAL'a, projemin materyalini temin etmemde yardımcı olan AKŞEKER TARIM GIDA ET ENTEGRE TES. GIDA İTH. İHR. A.Ş.'ye ve bünyesinde çalışan Veteriner Hekimler Mehmet YAMAN ve Samet AYGUN'a sonsuz teşekkür ederim.

Beni asla yalnız bırakmayan, zor zamanlarda her daim yanımda olduklarını bildiğim, beni bugünlere getiren ve bana inancını asla kaybetmeyen kıymetli aileme ve her zaman her koşulda yanımda olan arkadaşım Arş. Gör. Merve İDER'e şükranlarımı sunarım.

Yapılan tez çalışması 17102051 proje numarası ile desteklenmiştir. Tez projemi destekleyen Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP)'ne yaptıkları katkılardan dolayı teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
1. GİRİŞ	1
1.1. İn Vitro Fertilizasyonun Tanımı.....	1
1.2. İn Vitro Fertilizasyonun Avantajları	1
1.3. İn Vitro Fertilizasyonun Tarihçesi.....	1
1.3.1. Türkiye’de Yapılan İn Vitro Fertilizasyon Çalışmaları.....	3
1.3.2. Günümüzde İn Vitro Fertilizasyonun Durumu.....	3
1.4. Oogenezis.....	4
1.5. Sığırlarda İn Vitro Embriyo Üretimi.....	5
1.5.1. Ovaryumlardan Oosit Elde Edilmesi.....	6
1.5.2. Oositlerin Kalite Değerlendirmesi.....	9
1.5.3. Oositlerin İn Vitro Maturasyonu (IVM).....	12
1.5.4. İn Vitro Maturasyonu Etkileyen Faktörler ve Maturasyon Ortamı....	15
1.5.5. İn Vitro Fertilizasyon (IVF).....	16
1.5.6. Embriyo Kültürü.....	18
1.5.7. Embriyo Kalitelerinin Değerlendirmesi.....	20
1.5.8. Embriyo Kültür Vasatında Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar.....	23
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.5. Gereç.....	30
2.6. Yöntem.....	30
2.6.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	30
2.6.2. Ovaryumların Toplanması ve Laboratuvara Taşınması.....	30
2.6.3. Ovaryum Üzerindeki Folliküllerin Aspirasyonu ve Oositlerin Toplanması.....	31
2.6.4. Oositlerin Taranması ve Kalitelerinin Değerlendirilmesi.....	33
2.6.5. Oositlerin İn Vitro Maturasyonu (IVM).....	33
2.6.6. Spermanın Hazırlanması ve İn Vitro Fertilizasyon (IVF).....	34
2.6.7. İn Vitro Kültür (IVC).....	35
2.6.8. İstatistiksel Analizler.....	36
3. BULGULAR	38
3.5. İn Vitro Maturasyon Bulguları.....	38
3.6. İn Vitro Fertilizasyon Bulguları.....	39

3.3. İn Vitro Kültür Bulguları.....	41
3.3.1. 48. saatteki Bölünme Bulguları.....	41
3.3.2. Yedinci Günde Bölünme ve Kalite Bulguları.....	44
4. TARTIŞMA.....	51
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	59
6. KAYNAKLAR.....	60
7. EKLER.....	70
EK-A: Etik Kurul Belgesi.....	70
EK-B: İzin Belgesi.....	71
EK-C: Laboratuvar Takip Formu.....	72
8. ÖZGEÇMİŞ.....	73



SİMGELER VE KISALTMALAR

-	Eksi
%	Yüzde
°	Derece
+	Artı
±	Artı Eksi
<	Küçüktür
=	Eşittir
>	Büyüktür
/	Bölme
X	Çarpma
≤	Küçük Eşittir
≥	Büyük Eşittir
°C	Santigrat Derece
cc	Cubic Cantimeter (Santimetre Küp)
AR	Akrozomal Reaksiyon
ATP	Adenozin Trifosfat
BO	Brackett and Oliphant Medium
BOEC	Bovine Oviduct Epithelial Cell (Sığır Ovidukt Epitel Hücresi)
BSA	Bovine Serum Albumine (Sığır Serum Albumini)
Ca	Kalsiyum
cAMP	Siklik Adenosin Monophosphatedan
CDM	Complete Defined Medium
Cl	Klor
CO₂	Karbondioksit
COCs	Kumulus-oosit kompleksleri
CR1aa	Charles Rosenkrans
CZB	Chatot Ziomek Bavister Medium
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EPF	Early Pregnancy Faktor (Erken Gebelik Faktörü)
GPx	Glutasyon Peroksidaz
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
GV	Germinal Vezikül

H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
HCO₃⁻	Bikarbonat
HECM- 6	Hamster Embriyo Kültür Vasatı-6
IETS	International Embryo Technology Society (Uluslararası Embriyo Teknoloji Topluluğu)
IVC	İn Vitro Kültür
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
IVM	İn Vitro Maturasyon
K	Potasyum
SOM	Mouse Embryo Medium (Fare Embriyo Medyumu)
KSOM	Potassium Simplex Optimization Medium
L	Litre
Mg	Magnezyum
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mmHg	Milimetre Civa
mmol	Milimol
Mn-SOD	Mangan Süperoksit Dismutaz
MOET	Multiple Ovulation and Embryo Transfer (Çoklu Ovulasyon ve Embriyo Transfer)
mOsm / kg	Miliosmol Kilogram
Na	Sodyum
NCSU- 37	North Carolina State University-37
O₂	Oksijen
OH⁻	Hidroksil Radikal
OH⁻	Süperoksit Anyon
OPU	Ovum Pick Up (Ovum Toplanması)
pH	Power of Hydrogen (Hidrojenin Gücü)
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksidaz Dismutas
SOF	Synthetic Oviduct Fluid (Sentetik Ovidukt Sıvısı)
TALP	Tirode'nin Albümin Laktat Piruvat Solüsyonu
TCM- 199	Tissue Culture Medium (Doku Kültür Medyumu)

UFO	Unfertilized Oocytes (Fertilize Olmayan Oosit)
UI	International Unit (Uluslararası Ünite)
µm	Mikrometre
Zn-SOD	Çinko Süperoksit Dismutaz
ZP	Zona Pellusida



ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Farklı Antioksidanların (Pentoksifilin ve Borik Asit) İn Vitro Sığır Embriyo Kültür Medyumlarına İlavesinin Embriyo Gelişimi ve Kalitesi Üzerine Etkileri

Fatma SATILMIŞ
Veterinerlik Doğum ve Jinekolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2019

Sunulan çalışmanın amacı, sığırlarda in vitro fertilizasyon uygulamalarında farklı antioksidanların (borik asit ve pentoksifilin) embriyo kültür vasatına ilavesi yapılarak, kültür ortamındaki oksidatif stresin azaltılıp elde edilen embriyo sayısının ve kalitesinin artırılmasıdır.

Çalışmanın materyalini, mezbahada kesilen hayvanlardan elde edilen 330 ovaryum oluşturdu. Bu ovaryumlar üzerinden 2-8 mm çapındaki folliküller aspire edilerek 1894 adet oosit elde edildi. Elde edilen oositler arasından A ve B kalitede olan 1384 adeti maturasyon için kullanıldı. Oositler, 38,8°C'de ve %5,5 CO₂'li ortamda yeterli nem varlığında CO₂ inkübatöründe 21-24 saat süre IVM (Bioscience) ile mature edildi. Maturasyonunu tamamlayan 1210 adet oosit, fertilizasyon için IVF (Bioscience) ile aynı atmosferik koşullarda 12 saat süre ile fertilize edildi. Fertilizasyonunu tamamlayan 979 oosit; kültür amacıyla 2 farklı antioksidanın farklı dozları ilave edilen gruplara ayrıldı. Elde edilen bu zigotlar pentoksifilin (3 mmol, 3,6 mmol, 4 mmol, kontrol) ve borik asit (2 ug, 1 ug, 0,04 ug, kontrol) grupları arasında dağıtıldı. Kültüre alınan zigotların 48. saatte bölünme durumları kontrol edildi. Toplamda 744 adet zigotta bölünme gözlemlendi. Bölünen zigotların gruplar arasındaki farklılıklar değerlendirildi. Pentoksifilin grubunda kültüre alınan 505 zigottan 343 tanesinde (%67,92) bölünme gözlenirken, borik asit grubunda 474 adetten 401 tanesinin (%84,59) bölündüğü gözlemlendi. Genel olarak pentoksifilin ve borik asit grubu arasında %16,62 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi (p<0,05). Kültüre alınan zigotlar 7. günde incelendiğinde; bölünmeden sonra pentoksifilin grubunda kompakt morula oranı %31,19 ve blastosist oranı 0, borik asit grubunda ise %34,16 kompakt morula ve %10,97 oranında blastosist elde edildi. Çalışma grupları arasında morula-blastosist elde etme oranları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlendi ve borik asit grubunda daha fazla sayıda embriyo elde edildi (p<0,05). Çalışma gruplarında elde edilen embriyolarda, doza bağlı olarak istatistiksel bir farklılık gözlenmez iken sayısal olarak farklılık gözlemlendi. Ancak her iki çalışma grubunda da kontrol grubuna göre daha yüksek oranda embriyo elde edildi.

Sonuç olarak, in vitro embriyo kültür vasatına antioksidan ilave edilmesi ile elde edilen embriyo sayılarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi. Çalışma grupları ile kontrol grupları arasında istatistiksel bir farklılık gözlenmez iken, çalışma gruplarında sayısal olarak daha fazla embriyo elde edildi. Dolayısıyla farklı antioksidanların doza bağlı olarak in vitro kültür ortamına ilavesinin embriyo gelişimine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Antioksidan; borik asit; in vitro embriyo kültür; pentoksifilin; sığır.

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELCUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effects of Different Antioxidants (Pentoxifylline and Boric Acid) on Embryo Development and Quality Supplement In Vitro Bovine Embryo Culture Mediums

Fatma SATILMIS
Department of Obstetrics and Gynecology

PhD THESIS / KONYA-2019

The aim of the present study was to increase the number and quality of embryos obtained by reducing the oxidative stress in the culture medium by supplementing boric acid and pentoxifylline, a good antioxidant, to the embryo culture in an in vitro fertilization study.

The study material was consisted of 330 ovariums achieved from animals slaughtered in the abattoir. 1894 oocytes were obtained by aspirating follicles of 2-8 mm diameter from ovaries. A and B quality 1384 oocytes were placed into maturation. Maturation was achieved at 38,8° C with 5.5% CO₂ and atmospheric O₂ in CO₂ incubator with IVM (Bioscience) in for 21-24 hours. Mature 1210 oocytes were fertilized for 12 hours under the same atmospheric conditions as IVF (bioscience) for fertilization. 979 oocytes fertilized; distributed between pentoxifylline (3 mmol, 3.6 mmol, 4 mmol, control) and boric acid (2 ug, 1 ug, 0.04 ug, control) groups. Cultured zygotes were controlled situation of division at 48th hour later. A total of 744 zygote division was observed. Divided zygotes were evaluated differences between the groups. In the pentoxifylline group, 343 (67.92%) of the 505 zygotes cultured was observed divided, whereas 401 (84.59%) of the 474 were divided in the boric acid group. Overall, a statistically significant difference was observed between the pentoxifylline and boric acid groups at a rate of 16.62% (p <0.05). Cultured zygotes were examined on the 7th day; After cleavage, the rate of compact morula in the pentoxifylline group was 31.19% and blastocyst rate was 0, in the boric acid group was 34.16% compact morula and 10.97% blastocyst. Morula-blastocyst achieve rates were significantly different between the study groups and more embryos were obtained in the boric acid group (p <0.05). In these study groups, no statistically significant difference was observed in dose-dependent embryos, but numerically difference was observed. However, more embryos were obtained in both study groups than the control group.

In conclusion, a statistically significant difference was observed between the groups in the number of embryos obtained by supplementing antioxidant to the in vitro embryo culture medium. While there was no statistical difference between the study and control groups, more embryos were obtained in the study groups. Therefore, dose-dependent supplementing different antioxidants in vitro culture is thought to contribute to embryo development.

Key words: Antioxidant; boric acid; bovine; in vitro embryo culture; pentoxifylline.

1. GİRİŞ

1.1. İn Vitro Fertilizasyonun Tanımı

İn vitro fertilizasyon, mature olmuş sığır oositlerinin ve kapasite olmuş spermatozoonların laboratuvar ortamında fertilize edilmesi olarak tanımlanmaktadır. İn vitro fertilizasyonun başarısını spermatozoonun kapasitasyonu ve oositin maturasyonu etkilemektedir. Bunun için in vitro fertilizasyon öncesinde; mezbahadan elde edilen ovaryumlardan ya da ovum pick up (OPU) yardımı ile dişi hayvanların ovaryumlarından toplanan immature oositler laboratuvar ortamında mature edilmekte, seçilen boğa spermaları ise laboratuvar ortamında kapasite edilerek fertilizasyon işlemine hazır hale getirilmektedir (Hafez 1993, Kanagawa ve ark 1995).

1.2. İn Vitro Fertilizasyonun Avantajları

Çiftlik hayvanlarında yapılan hücresel ve moleküler düzeydeki embriyo çalışmaları, uygulanabilirliğinin sınırlı ve zor olması nedeni ile saha şartlarında yaygınlaştırılamamıştır. Ancak in vitro fertilizasyon yöntemi ile gerekli deneysel materyalin düşük bir maliyet ile elde edilebileceği ortaya konulmuştur. Ayrıca embriyo transferi teknolojisinde donör hayvanların süperovulasyonunun pahalı olması ve hayvan üzerinde çok fazla uygulama yapılıyor olması hem maddi yönden hem de etik yönünden in vitro fertilizasyon için bir ortam oluşturmuştur. Son 10-15 yıllık süreçte yüksek verimli hayvanların mecburi kesime sevk edilmesi ve bu hayvanların genetik varlığının sürdürülmek istenmesi in vitro fertilizasyon çalışmalarının artışına katkıda bulunmuştur (Galli ve ark 2003, Gordon 2004).

1.3. İn Vitro Fertilizasyonun Tarihçesi

İn vitro fertilizasyon (IVF), in vitro koşullarda embriyo elde edilmesinin genel tanımı olarak kullanılmaktadır. IVF; in vitro maturasyon (IVM), in vitro fertilizasyon (IVF) ve in vitro kültür (IVC) adımlarından oluşmaktadır. Chang ve Austin tarafından 1951'de tavşanlarda ve sığırlarda yapılan bir çalışma ile fertilizasyon için spermının kapasitasyonunun gerekliliği bildirilmiştir. Ayrıca IVF tekniği ile ilk yavru alınan memelinin de tavşan olduğu bilinmektedir (Austin 1957, Chang 1958). Ancak sığırlar ve diğer memeli hayvanlarda, laboratuvar hayvanlarında uygulanan IVF tekniği ile uzun süre başarı sağlanamamıştır. Sığırlar için ilk başarılı IVF uygulaması 1977

yılında rapor edilmiştir. İritani ve Niwa (1977) spermayı farklı hayvanların uterusunda kapasite etmeyi denemiş ve on yıl süren çalışmaları sonunda oositlerin mature edilerek ineklerin oviduktunda döllenebileceği ve buzağı üretilebileceği gösterilmiştir. IVF yöntemi ile ilk canlı buzağı Brackett ve ark (1982) tarafından elde edilmiştir. Daha sonralarda Hanada ve ark (1986) tarafından sperm kapasitasyonu kalsiyum iyonofor ile yapılarak fare oviduktunda kültüre edilen zigottan ilk ikiz buzağı elde edilmiştir. İrlanda'daki University College Dublin'de Lu ve arkadaşları tarafından 1987'de in vitro maturasyon, in vitro fertilizasyon ve in vitro kültürün tamamı laboratuvar ortamında gerçekleştirilerek ilk buzağı elde edilmiştir. 1980'lerde IVF embriyo transferi teknolojileri arasında sadece bir araştırma teknolojisi olarak yer bulmuştur (Hasler 2014, Moore ve Hasler 2017). Sığırlarda yapılan in vitro fertilizasyon çalışmaları giderek artmıştır. İn vitro fertilizasyon çalışmaları 2000'li yıllarda OPU ile desteklenmiştir ve son on yılda ise in vitro fertilizasyon çalışmaları genetik düzeye taşınmıştır (Hasler 2014). Memelilerin in vitro fertilizasyon çalışmaları çizelge 1.1'de özetlenmiştir (Gordon 2004).

Çizelge 1.1. Memelilerde in vitro fertilizasyon çalışmalarının tarihi geçmişi (Gordon 2004).

Olay	Araştırmacı
Tavşanlarda embriyo transferi	Heape (1890)
Embriyo transferiyle kuzu ve oğlak doğumu	Warwick ve Berry (1949)
Embriyo transferinden domuz elde edilişi	Kvansnickii (1951)
Embriyo transferinden buzağı doğumu	Willett ve ark. (1951)
Tavşanlarda <i>in vitro</i> fertilizasyon	Chang (1959)
Sperma kapasitasyonu ile <i>in vitro</i> fertilizasyon	Yanagimachi ve Chang (1963)
İnsan oositi <i>in vitro</i> fertilizasyonu	Bavister ve ark., Edwards ve ark. (1969)
Embriyo dondurma sonrası ilk buzağı	Wilmot ve Rawson (1973)
Embriyo transferi sonrası ilk tay eldesi	Oguri ve Tsutsumi (1974)
Sığır oositi <i>in vitro</i> fertilizasyonu	Iritani ve Niwa (1977)
IVF embriyodan ilk insan doğdu	Stepeteo ve Edwards (1978)
IVF embriyodan ilk buzağı doğdu	Brackett ve ark. (1982)
Nükleer transfer yoluyla ilk koyun doğdu	Willadsen (1986)
IVF, IVM yapılan oositten buzağı	Hanada (1986)
IVP embriyodan ilk ikizler doğdu	Lu ve ark. (1988)
Klonlama yoluyla ilk canlı (Dolly)	Wilmot ve ark. (1997)

1.3.1. Türkiye’de Yapılan İn Vitro Fertilizasyon Çalışmaları

Ülkemizde Veteriner Hekimlikte gerçekleştirilen in vitro fertilizasyon çalışmaları ilk olarak 80’li yılların başlarında yapılmıştır. Bu alanda Tekeli (1984) “Tavşan Ovumlarının İn Vitro Fertilizasyonu Üzerine Çalışmalar” adlı doktora tezi ile ilk çalışmayı gerçekleştirmiştir. İlerleyen zamanlarda in vitro fertilizasyon çalışmaları fareler üzerinde de uygulanmıştır (Kılıçoğlu 1985, Tekeli ve ark 1990, Tekeli 1992). Sığırlar üzerindeki ilk çalışmalar 90’lı yıllarda yapılırken (Birler 1997, Birler ve ark 1998) koyunlar üzerinde ise 2000’li yıllarda gerçekleştirilmiştir (Birler ve ark 2002). Sığırlarda in vitro fertilizasyon teknolojisi kullanılarak elde edilen ilk buzağı Akyol ve ark (2007) tarafından yapılan bir çalışma sonucu doğmuştur.

1.3.2. Günümüzde İn Vitro Fertilizasyonun Durumu

IETS verilerine göre son 15 yılda in vitro fertilizasyon çalışmalarının giderek arttığı özellikle son 4 yılda daha da fazla olduğu bildirilmiştir. IETS’nin 2016 yılı in vitro elde edilen embriyo sayıları çizelge 1.2.’de ve taze transfer edilen embriyo yüzdeleri ise çizelge 1.3.’te verilmiştir.

Çizelge 1.2. IETS 2016 in vitro embriyo transfer verileri (Perry 2017).

BÖLGELER	OPU ile elde edilen oositlerden in vitro üretilen embriyo transfer sayısı	Mezbaha materyalinden elde edilen oositlerden in vitro üretilen embriyo transfer sayısı
AFRİKA	625	0
ASYA	0	0
AVRUPA	14.059	173
K. AMERİKA	131.497	12
AVUSTRALYA	6.434	12
AVUSTRALYA	295.498	0
GENEL TOPLAM	448.113	197

Çizelge 1.3. IETS 2016 in vitro embriyo taze transfer verileri (Perry 2017).

BÖLGELER	IVF TAZE TRANSFER EDİLEN EMBRİYO (%)			
	2013	2014	2015	2016
AFRİKA	66,5%	87,6%	60.6%	88.5%
ASYA	57.2%	-	-	50.1
AVRUPA	76.6%	78.8%	73.5%	65.1%
G. AMERİKA	81.0%	76.7%	61.5%	67.1%
AVUSTRALYA	44.4%	39.2%	73.5%	42.3%
K. AMERİKA	95.1%	84.0%	77.9%	79.2%
GENEL TOPLAM	89.8%	81.3%	72.9%	74.0%

1.4. Oogenezis

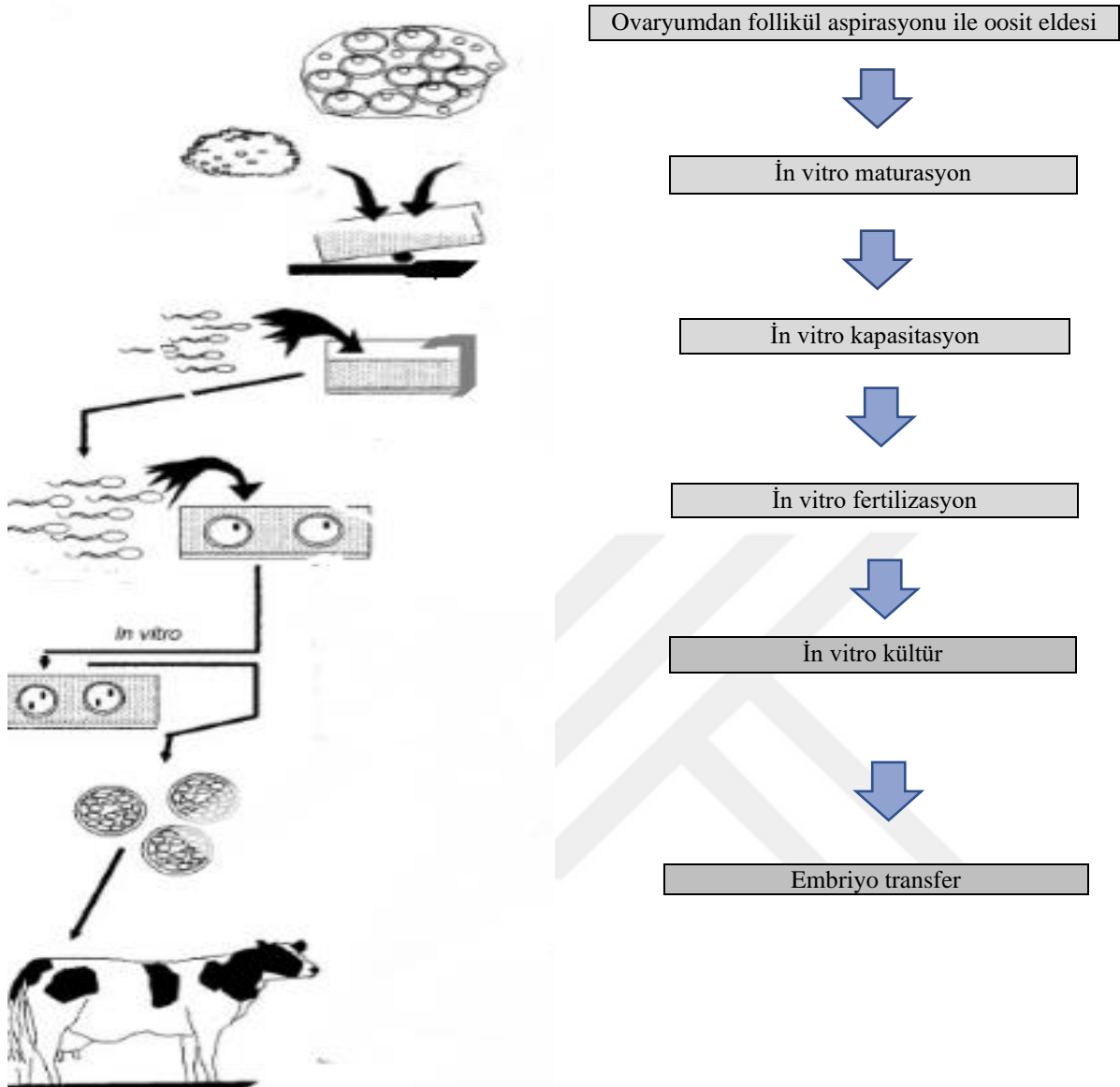
Tüm memelilerde oogenezis erken fetal dönemde başlamakta ve pubertasta son bulmaktadır. Oogenezis, dişi eşey hücresi olan oositin gelişip olgunlaşma evresine verilen isimdir. Oogenezis; çoğalma, büyüme ve olgunlaşma evrelerinden oluşmaktadır (Assey ve ark 1994). Bazı kaynaklar oogenezisi prenatal ve postnatal maturasyon olmak üzere iki evrede incelemektedir (Leeson ve ark 1998). Fetal dönemde; cinsiyet farklılaşmasını takiben dişi primordial germ hücreleri, mitoz bölünme ile çoğalarak oogoniumları oluştururlar ve oogoniumlarda mitoz bölünme ile sayılarını artırabilmektedirler. Çoğalma evresinde, oogoniumlar I. mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler ve bu dönemdeki oogoniumlar artık primer oosit olarak adlandırılırlar. Primer oositlerin ise tek katlı yassı epitel ile sarılmasıyla primer folliküller şekillenmektedir. Primordial folliküllerin içerisinde bulunan primer oositler pubertasa kadar I. mayoz bölünmenin profaz aşamasında beklemektedirler. I. mayoz bölünme preovulator follikül olgunluğu gerçekleşene kadar oosit nükleusu dinlenme safhasında kalır ve bu safhaya diklate nükleus adı verilmektedir. Folliküller pubertaya ulaşıldığında preovulator gelişimlerini gonodotropinlerin etkisi ile tamamlayarak mayoz bölünmeye kaldıkları yerden devam edebilmektedir. Olgunlaşma evresi, birbirini takip eden çift mayoz bölünmeden oluşmaktadır. Mayoz I'in profaz evresinde bekleyen oosit, metafaz II'ye kadar bölünerek gelişim gösterir. Oositin nükleusu plazma membranına doğru hareket eder ve membran kaybolur. Bunun sonucunda sitoplazmanın çoğu ile kromatinin yarısını içeren sekonder oosit oluşur. Diğer kromatini içeren sitoplazmalı kısım ise polar cisimcik olarak atılır (Bearden ve Fuquay 1992).

İnek, koyun ve domuzda ovulasyon öncesi sekonder oosit oluşumu ovulasyondan birkaç saat öncesinde tamamlanır iken, köpek ve kısrakta bu olay ovulasyon sonrasında tamamlanmaktadır (Leeson ve ark 1998). Türlerde ovulasyon öncesi II. mayoz bölünme başlar ve ovulasyon zamanında metafaz II safhasına ulaşırlar. Ulaşılan bu safhaya olgunlaşma aşaması denilmektedir ve oviduktta fertilizasyonun şekillenmesi ile sonlanmaktadır. Böylelikle II. olgunlaşma evresi tamamlanmaktadır. II. olgunlaşma evresi sonucunda diploid sekonder oositten ($2n$), haploid oosit (n) meydana gelmektedir. Sonuç olarak primer oositten, ovum meydana gelmektedir (Otlu 2015).

1.5. Sığırlarda İn Vitro Embriyo Üretimi

İn vitro fertilizasyon ile embriyo üretimi, tüm aşamaları laboratuvar ortamında gerçekleştirilen bir yardımcı üreme tekniğidir. İn vitro fertilizasyon tekniği bazı aşamalardan oluşmaktadır (Şekil 1.1.). Bu aşamalar;

1. Ovaryumlardan oosit elde edilmesi
 - a. Mezbaha materyalinden
 - Aspirasyon tekniği
 - Dilimleme tekniği
 - Diseksiyon tekniği
 - b. Canlı hayvandan ovum pick up (OPU) yöntemiyle
2. Oositlerin maturasyonu,
3. Fertilizasyon,
4. Embriyo kültüründen oluşmaktadır (Saleh 2017).



Şekil 1.1. İn vitro embriyo üretim aşamaları (Gordon 2003).

1.5.1. Ovaryumlardan Oosit Elde Edilmesi

Ovaryumlardan immatür oosit elde edebilmek için çoğunlukla iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi mezbahada kesilen dişi hayvanların ovaryumlarından, ikincisi ise canlı hayvanlardan ovum pick up (OPU) yöntemi ile gerçekleştirilmektedir (Kaymaz 2012).

A. Mezbaha materyalinden oosit elde edilmesi

Mezbaha materyalinden oosit elde edilmesi için; follikül aspirasyon tekniği, dilimleme tekniği ve diseksiyon tekniği kullanılmaktadır. Bu amaçla en çok kullanılan yöntem follikül aspirasyon tekniğidir (Gordon 2003).

Folikül aspirasyon tekniği

İneklerde en yaygın kullanılan tekniklerden bir tanesidir. Ovaryum üzerindeki antral folliküller pipet, vakumlu aspirasyon iğnesi veya enjektör yardımı ile aspire edilmektedir. Bu tekniğin diğer yöntemlere göre avantajı daha hızlı uygulanabilir olmasıdır. Hızlı oosit elde etmek de embriyo üretim üniteleri için oldukça tercih edilebilir bir kriterdir. Bu yöntem ile 2-8 mm büyüklüğündeki antral folliküller aspire edilmektedir. Aspirasyon için 18-22-g, contasız, 10-20 mL'lik enjektörler tavsiye edilmektedir (Gordon 2003). Ancak Fry ve ark (1998) mevcut olan primer oositlerin sayısını ve kalitesini optimize etmek amacıyla, aspirasyon basıncı ve yıkama yönteminin oosit toplama üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında en iyi oositin, 17-g iğne ve 55/mmHg basınç ile elde edildiği sonucuna ulaşımlardır. Yapılan bu çalışma, vakumda artış olması kumulussuz ve kalitesiz oosit sayısında artışa neden olduğunu göstermektedir.

Hashimoto ve ark (2000) ise yaptıkları çalışmalarda en fazla kaliteli oositi 40 mmHg basınç ve 18-g iğne ile elde etmişlerdir. Aspirasyon yöntemi ile ovaryum başına ortalama 13.9 ± 2.3 oosit elde edildiği ve bunlarında ortalama %45-50'sinin kullanılabilir kalitede olduğu bildirilmektedir.

Dilimleme tekniği

Mezbaha materyalinden immatür oositleri elde etmenin diğer yöntemi ise ovaryumların dilimlenmesidir. Bu işlem sırasında ovaryum bir forseps yardımı ile tutulmakta ve üzerindeki folliküller bistüri yardımı ile kesilmektedir. Bu işlem önceden hazırlanmış, içerisinde yıkama solüsyonu bulunan 90 mm'lik petri içerisinde gerçekleştirilmektedir. Folliküllerden elde edilen oositler yıkama solüsyonuna boşaltılmakta ve mikroskop altında incelenmektedir (Saleh 2017). Wang ve ark (2007), dilimleme tekniği ile aspirasyon tekniğine kıyasla daha fazla sayıda oosit elde ettiklerini bildirmişlerdir. Ayrıca Hoque ve ark (2011) dilimleme tekniği ile ovaryum

başına düşen oosit sayısının da daha fazla olduğunu belirtmektedirler. Ancak (Wang ve ark 2007) aspirasyon yöntemi ile elde edilen oositlerin daha kaliteli olduğunu ve dilimleme tekniği ile karşılaştırıldığında işlemin daha kısa sürdüğünü ifade etmektedirler. Dilimleme yöntemi ile ovaryum başına ortalama 10.7 oosit elde edildiği ve bunların ise 9.7'sinin kullanılabilir kalitede olduğu bildirilmektedir (Carolan ve ark 1994, Vincenti ve ark 1998).

Bazı kaynaklarda, dilimleme yönteminin aspirasyon tekniği ile kombine kullanıldığı da bildirilmektedir. Bunun için önce ovaryum üzerindeki folliküller aspire edilmekte, sonrasında ise dilimlenmektedir. Bu yöntem ile elde edilen oosit sayısının arttığı ifade edilmektedir (Gordon 2003, Hoque ve ark 2011).

Vincenti ve ark (1998), Piedmont sığırlarının ovaryumlarının dilimlenmesiyle ovaryum başına 10.7 oosit elde ettiklerini ve elde edilen oositlerin çoğunun (ovaryum başına 9.7) çalışmalarında kullanılabilir kalitede olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada aspirasyon, dilimleme, diseksiyon teknikleri kıyaslanmış ve aspirasyon tekniği ile elde edilen kumuluslu ve kaliteli oosit sayısının diğer iki tekniğe göre dört kat daha az olduğu bulunmuştur. Fazla sayıda kullanılabilir kalitede oosit elde etmek için dilimleme tekniğinin diğer yöntemlere kıyasla en iyi yöntem olduğu bildirmektedir (Gordon 2003).

Diseksiyon tekniği

Diseksiyon yönteminde, ovaryum üzerindeki folliküller diseke edilerek ayrılmaktadır. Diseke edilen folliküller önceden hazırlanmış toplama sıvısı bulunan petrilere boşaltılmaktadır. Bu sayede elde edilen oositlerin kumulus hücreleri minimum düzeyde zarar görmektedir. Diseksiyon yöntemi ile elde edilen oosit sayısının oldukça yüksek olduğu ve bu yöntemle elde edilen oosit kalitelerinin de daha iyi olduğu bildirilmektedir. Bu yöntem ile ovaryum başına ortalama 32-44 arası oosit elde edildiği ifade edilmektedir. Diseksiyon yöntemi ile atretik ve atretik olmayan folliküllerin daha kolay identifiye edilebilmesi yöntemin avantajı olarak görülmektedir. Ancak bu yöntem oldukça tecrübe gerektirmektedir (Carolan ve ark 1994, Gordon 2004).

B. Canlı hayvanda ovum pick up (OPU) yöntemi

Ovum pick up (OPU) yönteminde, oositler canlı hayvanların ovaryumları üzerindeki folliküllerin aspire edilmesi ile elde edilmektedir. OPU, ultrason probu, aspirasyon pompası ve aspirasyon iğne sisteminin varlığında gerçekleştirilebilen sistematik non-invaziv bir tekniktir. OPU'nun insanlar üzerindeki kullanımı, sığırlarda da kullanılabilceği düşüncesini ortaya koymuştur. Callesen ve ark (1987), OPU ile sığır folliküler oositlerinin aspirasyonu ilk olarak Danimarka'da gerçekleştirmiştir. Pieterse ve ark (1988) ise insanda kullanılan bir OPU sistemini veteriner sahaya modifiye etmiştir. OPU'nun sığır uygulamaları sonrasında canlı donörlerden embriyo elde etmek için esnek ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Pieterse ve ark 1991). OPU, Multiple Ovulasyon ve Embriyo Transfer (MOET)'in aksine donörlerin daha sık kullanılabilirliğini sağlaması yönünden avantaj olarak görülmektedir (Faber ve ark 2003, Pontes ve ark 2010). OPU yönteminin; postpartum 2-3. haftada, gebelikte ve 6 aylık yaştan itibaren buzağılarda kullanılabilir olması konvansiyonel ve pratik bir alternatif olduğunu göstermektedir (Galli ve ark 2001, Besenfelder ve ark 2012, Qi ve ark 2013).

OPU tekniği, oositin sadece mezbaha materyalinden elde edilmediğini de ortaya koymuştur. Bu yöntemin kullanılması ile üstün genetik özelliklere sahip donörlerden kısa sürede daha fazla embriyo elde edilebilmiştir. Ayrıca OPU tekniği in vitro fertilizasyon çalışmalarının da başarısını artırmıştır (Galli ve ark 2004).

Yapılan çalışmalar da OPU tekniği ile hem in vitro hem de in vivo yöntem ile buzağı elde edildiği bildirilmektedir (Maclellan ve ark 1998, Santi ve ark 1998, Majerus ve ark 1999).

1.5.2. Oositlerin Kalite Değerlendirmesi

Sığır oositlerinin in vitro maturasyon işlemi için seçimi, bazı temel görsel morfolojik değerlendirmeler sonucunda olmaktadır. Mikroskop eşliğinde, oositlerin sınıflandırma şemaları oluşturulmuştur. Bu şemada; oositin sitoplazma yoğunluğu, oosit çevresindeki kumulus hücrelerinin yoğunluğu ve görülebilir bazı morfolojik özellikler yer almaktadır.

Çizelge 1.4. Sığır oositlerini değerlendirmede kullanılan kriterler (Gordon 2003).

Kategori	Kumulus oosit kompleks durumu
Kriter	
1	Kompakt ve çok katmanlı kumulus, ooplazması homojen, kumulus oosit kompleksi (COC) açık ve şeffaf.
2	Kumulus yapısı çok katmanlı, ooplazması homojen, kalın görünüm ve zonada koyulaşma, COC daha koyu ve daha az transparan.
3	Kumulus yapısı oldukça az katmanlı, ooplazma düzensiz ve koyu kümelenmelere sahip, COC 1 ve 2.'ye göre oldukça koyu.
4	Kumulus hücreleri genişlemiş ve dağınık, ooplazma düzensiz, COC koyu ve düzensiz.

Çizelge 1.5. Sığır oositlerinin seçiminde Beltsville kriterleri (Gordon 2004).

Oosit tipi	Kumulus karakteri	Sitoplazma karakteri
İyi kalite	Çok katlı kumulus ve sitoplazma net görülebilir	Yoğun, ince granüllü
Orta ve vasat kalite	Birkaç katlı ya da yarısından daha azı kompakt kumulus ile kaplı ve net görülmeyen sitoplazma	Değişebilen yoğunlukta, küçük ve orta büyüklükte granüllü
Kalitesiz	Kısmen ya da tamamen genişlemiş kumulus, hücresiz ve kumulussuz iskelet, aşırı büyük veya küçük oosit.	Kalın granüller çok açık ve çok koyu alanlarda dağılmış, sitoplazma açık kahve ya da siyah, düzensiz oosit

Ayrıca oositlerin; kumulus genişlemesi, maturasyon ve fertilizasyon oranlarında çizelge 1.4'e göre değişmektedir. İmmatür oositler, kumulus hücrelerinin dağılımına göre A, B, C ve D olarak sınıflandırılmaktadır (Cetica ve ark 1999).

A Kalite; Zonanın çevresinde kumulus hücreleri 5 veya daha fazla kat olarak görülmektedir.

B Kalite; Zona çevresinin 1/3'ünden fazlasını kumulus hücreleri 2 veya daha az kat olarak kaplamaktadır. Ya da az bir kısmında kumulus olmayabilir.

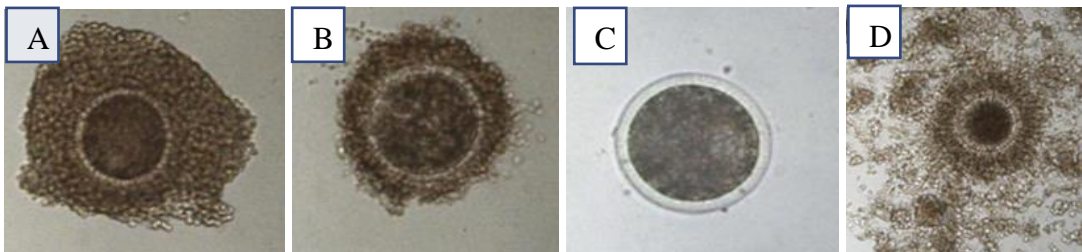
C Kalite; Oositler genellikle tamamen çıplak ya da B kalite oositten çok daha az kumulus hücrelerine sahiptir.

D Kalite; Kumulus hücreleri örümcek ağı gibi ya da şişmiş gözükmetedir (Kaymaz 2012).

Bazı kaynaklarda A sınıfı oositlerin büyük bir kısmının (%87,7) germinal vezikül (GV) aşamasında olduğu bildirilmektedir. Ayrıca A sınıfı oositlerin diğer sınıflara oranla mayotik olgunlaşmasının daha yüksek (%76,5) olduğu belirlenmiştir (Cetica ve ark 1999). Bu nedenle in vitro fertilizasyon çalışmalarında A ve B kalite oositler maturasyona alınmaktadır ve C-D kalite oositlerin ise değerlendirmeye alınmadığı bildirilmektedir (Gordon 2003).

Oositlerin maturasyon kalitesini; oosit büyüklüğü, kumulus hücrelerinin varlığı ve ovaryumların alındıkları hayvanların özellikleri gibi faktörler etkilemektedir (Gordon 2003).

Oositlerin maturasyon kalitesini etkileyen bir diğer faktör de aspire edilen follükülün büyüklüğüdür. Bunun için ovaryum üzerindeki 2-8 mm büyüklüğünde olan follüküllerin aspirasyonu önerilmektedir. 2 mm'den küçük veya 8 mm'den büyük follüküllerin aspirasyonu sonucu kültüre edilen oositlerden düşük kalitede embriyoların elde edildiği bildirilmektedir (Katska ve Simorak 1984, Carolan 1994).



Şekil 1.2. A, B, C ve D kalite oositler (Hasler 2017).

1.5.3. Oositlerin İn Vitro Maturasyonu (IVM)

Oositler, iki organizmanın genetik bilgilerinin toplandığı bir havuz olmasından dolayı üreme sisteminin özel hücreleridir. Oositler gelişimi için bir dizi moleküler ve şekilsel değişikliklere uğramaktadır. Oositler, embriyonik süreçte ovaryum korteksinde bulunan embriyonik germ hücrelerinin mitozu sonucu ortaya çıkmaktadır. Mitotik proliferasyon, fetal hayatın 7,5 ayına kadar tamamlanmaktadır. Bu olay germ hücreleri mitozunun, doğum öncesinde tamamlandığını göstermektedir. Sonrasında ise mitotik aktivite durmaktadır. Bu aşamadan sonra germ hücreleri mayoz bölünmenin profaz safhasına girmekte ve oogonyuma dönüşmektedir. Daha sonraki büyüme ve maturasyon sürecinde oogonia gelişir ve mature olmuş oositlere dönüşür (Alexander 2012).

Oositlerin olgunlaşması hem sitoplazmik hem de hücrenel şekilde olmaktadır. Germ hücresi oluşumu için diploit somatik hücre bir haploit hücreye dönüşür. Fertilizasyon sırasında da spermin oosite füzyonu sonucu, haploit iki hücre birleşerek her iki ana hücreden elde edilen karışık genomlu diploit bir hücre (zigot) oluşumu gerçekleşmektedir. Somatik hücrelerin germ hücrelerine dönüşümünde mayotik bölünme sırasında, kromozom sayılarında azalma görülmektedir. Bu süreçte sitoplazmada da maddelerin birikimine bağlı olarak değişiklikler meydana gelmektedir. Dişi bireylerde görülen eşit olmayan bölünmeler nedeni ile erkek bireylere oranla daha fazla sitoplazmaya sahiptirler (Alexander 2012).

İn vitro ortamda oosit maturasyon oranının, in vivo ortama göre daha düşük olduğu bildirilmektedir. Oositin in vitro koşullardaki maturasyon oranının düşük olmasının nedeni, folliküler sıvı içeriğinin tam olarak bilinmemesinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca maturasyon başarısını, kullanılan oositin kalitesi de büyük ölçüde etkilemektedir. Bu amaçla in vitro ortamda oosit maturasyonunu daha iyi bir şekilde gerçekleştirebilmek için, folliküler sıvının metabolik analizinin yapılması ve oosit kalitesinin karakterize edilmesinin fayda sağlayabileceği bildirilmektedir (Wrenzycki 2018).

Oositin nükleer maturasyonu

Nükleer maturasyon, oositin mayoz bölünmesi sırasında gerçekleşmekte ve germinal vezikül aşamasından metafaz-II'ye kadar olan süreci kapsamaktadır.

Bu faz somatik hücrelerin mitoz bölünmesine benzer şekilde gerçekleşmektedir ve bazı fazlardan oluşmaktadır. Bunlar;

Sentez fazı (S): Bu fazda DNA replikasyonu olmaktadır. Moleküllerin sentezi için annenin hücreleri gereklidir ve iki dişi hücre arasında genetik dağılım gerçekleşmektedir.

Mitotik veya mayotik faz (M): Bu fazda kromozomlar ve sitoplazma ikiye bölünür ve dişi hücrelere dağılırlar.

Gelişim ya da GAP fazı (G): M ve S fazı arasında şekillenmektedir. Bu işlemin mitozdan farkı birbirini takip eden iki S fazını içermesi ve sonucunda diploit hücrelerin oluşmasıdır. Miyotik hücre döngüsü sonucu nükleer materyalin kopyalandığı premyotik bir fazdan önce gelir ve böylelikle tüm hücreler diploit olur. Sonrasında mayoz bölünme şekillenir. Mayoz bölünme mayoz-I ve mayoz-II olmak üzere iki kısımdan oluşmakta ve bu bölümler birbirinden interkinezis adı verilen bir aralık ile ayrılmaktadır. Mayoz bölünme aşamaları mitoz bölünme ile aşamaları aynı isimlere sahiptir. Bu aşamalar profaz, metafaz, anafaz ve telofazdır. *Diploten*; mayozun ilk bölünme fazıdır, kromatinler dağınıktır ve despiralize olmuştur. Germinal vezikül mevcuttur. *Diakinezis*; mayoz-I'in profaz aşamasının sonudur. Kromozomlar 4 kopya olmuş ve germinal vezikülde parçalanma (GVBD) meydana gelmiştir. GVBD olayı, diakinezis sırasında nükleer membranın katlanmaya başlaması, nükleer gözeneklerin kaybolması ve daha sonra nükleer membran parçalarının çift duvarlı küçük keselerden ayrılarak hızla kaybolması şeklinde gerçekleşmektedir. Sığırlarda, GVBD follikül ya da ovulator LH salınımı gerçekleştikten sonra meydana gelmektedir. *Metafaz-I*; ekvator da maksimum yoğunlukta kromozom lokalize olmaktadır. GVBD sonucu olarak da oosit etrafındaki kumulus hücreleri ve bağlantıları parçalanır. *Anafaz-I*; yoğunlaşmış kromozomlar kutuplara çekilir. *Telofaz-I*; bir grup kromozom dejenere olur oosit ile perivitellin boşluk arasında polar body-I'i oluşturular. *Metafaz-II*; ikinci mayoz bölünme başlar ve kromozomlar oositin ekvatorundadır. *Anafaz-II/Telofaz-II*; spermatozoa oosit sitoplazması içine girer. İlk mayoz bölünmede kromozomlar rekombinasyonla eşleşir ve değiş tokuş yaparlar. Hücre sayısı 2 katına çıkarılır ancak kromozom sayısı hücre başına düşen kromozom sayısının yarısına neden olmaz. Mayoz-II'de ise hücre

sayısının azalması için mitoz benzeri bölünme gerçekleşir (Monniaux ve ark 2009, Tripathi ve ark 2010, Brunet ve Verlhac 2011, Alexander 2012).

Spermatozoonun mayoz bölünmesi sonucu başlangıçta diploit hücreden dört adet haploit hücre üretimi gerçekleşirken, oositin mayoz bölünmesinde ise bir diploit hücreden sadece bir adet oosit elde edilmektedir. Her bir mayoz bölünmede, hücre çiftlerinden biri primer kutup cisimciği şeklinde diğer hücrenin gövdesinde gelişimini tamamladığı bildirilmektedir. Dişi eşey hücreleri arasında sitoplazmanın mayotik dağılımı eşit değildir. Maturasyonunu tamamlayan hücre, kutup gövdesini oluşturacak küçük bir miktar ile sitoplazmanın çoğunluğunu alır. Oluşan primer polar body'nin dejenere olan kromozomlarının fonksiyonsuz olduğu ve görülmediği bir şekilde yüzeyden atıldığı bildirilmektedir. Tüm bu olaylar sırasında ve sonrasında kromozomların pronükleus içerisinde despiralize olduğu ifade edilmektedir. Fertilizasyon sırasında oluşan haploit dişi eşey hücresi diploit hücre oluşturmak için erkek haploit eşey hücresi ile birleşmekte ve diploit bir organizma olan zigotu oluşturmaktadır (van den Hurk ve Zhao 2005, Kimura ve ark 2007, Grøndahl 2008).

Oositin sitoplazmik maturasyonu

Sitoplazmik maturasyon, oosit büyümesini, oosit organellerinin yapısındaki ve dağılımındaki değişiklikleri ve daha fazla gelişebilmek için gerekli olan biyolojik aktif maddelerin birikimini ifade eder. Başta mitokondri olmak üzere organellerin pozisyonu ve yapısında metafaz-II aşamasına kadar kompleks değişiklikler meydana gelmektedir. Sitoskeletal mikroflamentler ve mikrotubulleri içeren sitoplazma, kromozomların ayrımı sırasında nükleer maturasyona büyük ölçüde yardımcı olmaktadır. Sitoplazma içerisinde bulunan ribozomlar, oosit maturasyonu ve sonrası için gerekli olan peptitleri üretmektedir. Dolayısıyla sitoplazmik maturasyon, ATP, mRNA'lar, proteinler ve transkripsiyon faktörlerinin depolanmasını içermektedir (Brevini ve ark 2007, Miyano ve Manabe 2007, Ferreira ve ark 2009). Nükleer maturasyonun yeniden başlatılması sonrasında protein sentezi hızla aktive edilmekte ve mRNA'nın önemli bir kısmı bozularak ölmektedir (Aerts ve Bols 2008).

Sitoplazmada metabolik maddelerin depolanması oosit büyümesini indükler. Memelilerin oositleri iki farklı karakteristik yapıda büyümektedir. İlk olarak büyüme, geliştiği follükül ile geçici olarak bağlantılıdır, ikincisinde ise follükül ovulasyona

kadar büyümeye devam etmesine rağmen oosit mevcut büyüklüğünü korumaktadır. Birinci büyüme fazı sırasında oositlerde depolanan makromoleküller ve organeller mayozun ilerlemesinden sorumludur. Ayrıca bu makromoleküller; penetre olan spermatozoonun yoğunlaştırılması, bir erkek pronükleusunun oluşması, fertilizasyonun şekillenmesi, zigot oluşumu ve 6-8 hücreli aşamaya ulaşılmasından da sorumludur (van den Hurk ve Zhao 2005).

Folikül içerisindeki oositin büyümesi ve gelişmesi kumulus ve granuloza tabakası çevresindeki somatik hücrelere de bağlıdır. Bu hücreler ile oosit arasında gap birleşimleri ile bağlantı kurulmaktadır. Oosit gelişimi için gerekli olan enerji ve substratlar (nükleosit, amino asit, fosfolipit ve iyonlar) bu bağlantı vasıtası ile taşınmaktadır (Feng ve ark 2007, Mermillod ve ark 2008, Sirard 2016). Somatik hücrelerdeki defektler veya gap birleşimleri arasındaki bağlantı hataları, oositin optimal büyüklüğe ulaşmasını, maturasyonunu ve fertilizasyonunu önleyebilir (Hutt ve Albertini 2007).

Sitoplazmik ve nükleer maturasyonun senkronizasyonu oositlerin daha fazla gelişimi için gerekli olan ön koşuldur ve in vitro embriyo üretiminde göz önünde bulundurulması gereken bir unsurdur (Eppig ve ark 2004).

1.5.4. İn Vitro Maturasyonu Etkileyen Faktörler ve Maturasyon Ortamı

İn vitro ortamda başarılı bir maturasyon sonucunda, oositin fertilize olabilmesi ve embriyonun gelişimini sağlayabilmesi gerekmektedir. Ancak oositin maturasyon başarısını; follikülün ve oositin çapı, östrüs siklusu, oositin maturasyonu için kullanılan vasatlar ve içeriği, oositi elde etme tekniği ve elde edilen hayvanın özellikleri etkilemektedir (Kaymaz 2012).

Sığır oositleri genellikle in vitro maturasyon için genellikle %5 CO₂ içeren bir ortamda 38,5 °C sıcaklıkta 20-24 saat süre ile inkübe edilmektedir. İnkübasyon sonrasında kumulus ekspansiyonu veya primer polar body oluşumlarından herhangi birinin görülmesi maturasyon olarak değerlendirilmektedir (Alexander 2012).

İn vitro maturasyon için; Tissue Culture Medium (TCM-199), Sentetik Ovidukt Sıvısı (SOF), North Carolina State University (NCSU-37) ve Ham's F10a gibi birçok vasat tercih edilmektedir. Bu vasatlara; hormonlar, sığır serum albümini,

follikül sıvısı, büyüme faktörleri, vitaminler, serumlar ve farklı antioksidan madde ilaveleri yapılabilmektedir. Yapılan her ilave, maturasyon vasatını daha da iyileştirmeye yöneliktir (Strejček ve Petrovičová 2012).

1.5.5. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

İn vitro fertilizasyon oosit maturasyonu, spermanın seperasyonu ve kapasitesini içeren kompleks bir mekanizmadan oluşmaktadır. IVF kapasite olmuş sperma ile mature olmuş oositi laboratuvar ortamında bir araya getirilmesi ve bu iki hücrenin nükleuslarının kaynaşması işlemidir. IVF yöntemi ile ilk canlı buzağı 1986'da Japonya'da elde edilmiştir (Gordon 2003).

IVF çalışmalarında en önemli adımlardan biri, kullanılacak spermanın seçimidir. Seçilen spermanın oositi fertilize edebilmesi için bir maturasyon süreci geçirmesi gerekmektedir. Spermatozoonlar bu süreçte kapasitasyon, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonu gibi değişikliklere uğramaktadır. İn vivo ortamda spermatozoonların hiperaktivasyon ve kapasitasyon değişimleri oosit ile karşılaşmadan önce dişi genital kanalda gerçekleşmektedir. Akrozom reaksiyonu ise, oositin kumulus hücreleri ve zona pellusidasına penetrasyonu sırasında başlar. Dişi genital kanalda spermatozoonun geçirdiği bazı biyokimyasal değişikliklere kapasitasyon denilmektedir. İn vitro fertilizasyon çalışmalarında, dişi genital kanal ortamını taklit eden içeriklerle kapasitasyon sağlanmaktadır. Sığırlarda spermatozoonun in vitro kapasitasyonu için kullanılan vasatlar çizelge 1.6'da gösterilmiştir. Bunun için yaygın olarak glikozaminglikan (GAG) heparin kullanılmaktadır (Gordon 2003, Mendes ve ark 2003). Hiperaktivasyon ise spermatozoonun zona pellusida (ZP) ve kumulus hücrelerine girebilmesi için gerekli bir aşamadır. Bu aşamada Ca^{+} , ATP ve cAMP kullanılmaktadır. Akrozomal Reaksiyon (AR) hidrolitik yapıdaki akrozomal enzimlerin açığa çıkabilmesi için, akrozom membranı ve onu saran plazma membranı arasındaki dağılımı içerir (Gordon 2003).

İn vitro fertilizasyonda kullanılan vasatlar

Fertilizasyon için optimal koşulun 38,5-39°C'de, %5 CO₂ ve maksimum nem içeren ortamlar olduğu bildirilmektedir (Hammam ve ark 2010). IVF için en çok kullanılan vasatlar Tirode'nin Albümin Laktat Piruvat Solüsyonu (TALP), Sentetik Ovidukt Sıvısı (SOF), Brackett and Oliphant Medyum (BO) ve Potasium Simpleks

Optimizasyon Medyum (KSOM)'dur (Nedambale ve ark 2006). Ayrıca TALP vasatının yerine SOF (sentetik ovidukt sıvısı) kullanılmaktadır. Ayrıca fertilizasyon medyumlarına yardımcı olmak için heparin, kafein, epinefrin, penisilamin, taurin, hipotaurin, BSA, glisin ve hiyaluronik asit gibi maddeler ilave edilebilmektedir (Gordon 2003).

Çizelge 1.6. Sığırlarda spermatozoonun in vitro kapasitasyonu için kullanılan vasatlar (Gordon 2003).

Yıl	Metot	Araştırmacılar
1982	High-ionic-strength (HIS) medium	Brackett ve ark.
1983	Bovine follicular fluid	Fukui ve ark.
1984	Standard-ionic-strength medium	Iritani ve ark..
1984	Heparin	Parrish et al.
1985	Elevated pH	Cheng
1985	Ionophore A23187	Hanada
1986	Liposomes	Graham ve ark.
1988	Percoll gradient/hypotaurine	Utsumi ve ark.
1988	Caffeine	Niwa ve ark.
1989	TEST yolak	Ijaz and Hunter
1989	Oviductal cell monolayer	Guyader ve ark.

İn vitro fertilizasyonda spermanın hazırlanması

IVF'de fertilizasyon yeteneğinin artırılması amaçlanarak spermaya "Seperasyon" işlemi uygulanmaktadır. Bu işlem ile mevcut spermatozoonlar arasından en yüksek motiliteye sahip olanlar seçilmektedir (Ohnami ve ark 2012, Wrenzycki 2018). Payetlenmiş spermalardan IVF başarısını olumsuz etkileyen içeriklerin (bakteri, enzim, anormal spermatozoa, dondurma sırasında kullanılan kimyasallar) uzaklaştırılması için bazı teknikler geliştirilmiştir. Bunlar; migrasyon-sedimentasyon, density gradient santrifüj tekniği ve filtrasyon tekniğidir (Kaymaz 2012). Spermanın seperasyonu için en çok swim-up ve percoll gradient tekniği kullanılmaktadır. Swim-up migrasyon teknikleri arasında yer alırken, percoll gradient ise density gradient santrifüj tekniği arasında yer almaktadır. Hungary percoll gradient tekniği ile ayırma yöntemiyle elde edilen spermatozoonların akrozom bütünlüğünün swim-up tekniğine göre daha fazla olduğunu bildirmiştir (Somfai ve ark 2002).

Seperasyon tekniği uygulamaları sırasında aranan ideal kriterler vardır. Bu kriterler; hızlı ve kolay olmalı, çok sayıda motil spermatozoa elde etmeli, ekonomik

olmalı, toksik maddeleri, lökositleri ve bakterileri ayırabilmeli, yüksek volümde spermada çalışmaya izin vermeli ve en önemlisi spermatozoada hasara neden olmamalıdır (Kaymaz 2012).

1.5.6. Embriyo Kültürü

İn vitro maturasyon ve fertilizasyon sonrası zigotun bir kültür medyumuna ile yıkanarak gelişim dönemini tamamlayana kadar 6-9 gün süreyle kültüre edilmesi aşamasıdır. Oositin kültür vasatına konulmadan önce denatüre hücrelerden, spermatozoa kalıntılarında ve kültür vasatını kirletebilecek hücrelerden arındırılması embriyo gelişimi için oldukça önemlidir. Embriyo kültürü için, ilk zamanlarda basit vasatlar kullanılmıştır. İlerleyen zamanlarda ise kültür vasatlarının başarısını artırmaya yönelik çalışmalar yapılmış ve bununla ilgili bazı kriterler belirlenmiştir. Bunlar;

1. Vasatın embriyonun gelişim aşamasındaki gereksinimleri göz önünde bulundurularak hazırlanması,
2. Kültür vasatına ilavelerin mümkün olduğunca embriyonun erken gelişim döneminde yapılması,
3. Yüksek oranda blastosist elde edebilmek için kültüre büyüme faktörleri gibi tanınmış bileşenlerin ilave edilmesi,
4. Kültür vasatına BSA ilave edilecek ise beraberinde asit içermeyen yağ preparatlarından destek alınması,
5. Embriyo için çok adımlı kültür sistemlerinin incelenmesi,
6. Embriyo kültür vasatının standartının kontrol edebilmesi için sık olarak kullanılmasıdır (Gordon 2003).

Embriyo kültür vasatı olarak ilk zamanlarda Sığır Ovidukt Epitel Hücreleri (BOEC) kullanılmış sonrasında ise; TCM-199, SOF, Hamster Embriyo Kültür Vasatı-6 (HECM-6), Chatot Ziomek Bavister Medium (CZB), CR1aa (Charles Rosenkrans), KSOM ve Complete Defined Medium (CDM) gibi vasatlar da kullanılmıştır. TCM-199 gibi kompleks embriyo kültür vasatları, memelilerin erken embriyonal dönem gelişiminden ziyade somatik hücrelerin in vitro gelişimi için tasarlanmıştır. Sığır embriyoları ve somatik hücreler serumda çok sayıda embriyotrofin geliştirmektedir ve bunlar da embriyo gelişiminde farklı görevler üstlenmektedir (Gordon 2003, Feugang ve ark 2009). Günümüzde embriyo kültür

vasatı olarak SOF'lar en çok kullanılan medyum haline gelmiştir. SOF'lar ovidukt sıvısının biyokimyasal analizi sonucu oluşturulmuştur (Gordon 2003).

Son yıllarda embriyo gelişimi için sıralı kültür vasat sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistem embriyoların ovidukta inmesi sırasında, in vivo ortamda gelişim sırasında meydana gelen fizyolojik değişiklikleri taklit etmeye yöneliktir. Bu kültür vasatı sistemlerinin uygulaması daha komplike ancak elde edilen sonuçların ise daha başarılı olduğu bildirilmektedir (Wrenzycki 2018). Donay ve ark (2002) erken embriyonal dönemde fazla glikozun toksik etki yapabildiğini, ancak morula aşamasından sonra ise daha fazla glikoza ihtiyaç duyulduğunu bildirmiştir. Bu durum da sıralı kültür vasatı sistemi kullanmanın avantajlı olabileceğini göstermektedir. Ancak Garcia ve ark (2006) sıralı embriyo kültür vasat sisteminin kullanımında, embriyoların dondurma-çözdürme işlemi sonucunda gelişimlerinin azaldığını bildirmiştir.

Başarılı bir embriyo kültür vasatı hazırlayabilmek için, in vivo ovidukt biyokimyasının iyi analiz edilerek taklit edilmesi ve bazı parametreler için optimum şartların sağlanması gerekmektedir. İn vivo ortamda ovidukt sıvısı yaklaşık 245-290 mOsm / kg arasında osmolariteye sahip ve pH'sı 7,2-7,6 arasında olduğu bildirilmektedir. Aynı zamanda ovidukt sıvısında Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ve Cl^- konsantrasyonları düşükken, potasyum (K) ve bikarbonat (HCO_3^-) seviyeleri yüksektir. İn vitro ortamda enerji kaynağı olarak erken embriyonal gelişim döneminde laktat, piruvat ve glutamin tercih edilirken morula aşamasından sonra ise glikoz tercih edilmektedir. Kültür sistemlerinde protein kaynağı olarak ise aminoasit ve makromoleküller kullanılmaktadır (Kaymaz 2012, Gilchrist ve ark 2015).

Embriyo kültür vasatı sistemlerinde, başarıyı artırmak için somatik hücrelerden yararlanılmıştır. Bu durum da ko-kültür sistemlerinin temelini oluşturmaktadır. Ko-kültür sistemleri için çoğunlukla granuloza hücreleri, ovidukt epitel hücreleri, rat karaciğer hücreleri ve uterus hücreleri kullanılmaktadır. Ko-kültür sistemleri ortamda bulunan belirli toksik bileşenleri ortadan kaldırarak ve O_2 konsantrasyonunu azaltarak embriyo gelişimi üzerine olumlu etki etmektedir (Lonergan ve ark 2001, Lonergan ve Fair 2016).

Embriyo kültür sistemi ortamı

İn vitro kültür ortamında oksijenin %10'un altında olması istenmektedir. Kültür sistemlerinde genellikle %5'lik O₂, %5 CO₂ ve %90 N₂ gazlarının kullanımı tercih edilmektedir. Kültür sistemlerinde CO₂ stabilizasyonu sağlamaktadır. Ortam pH'nın 7,2-7,6 arasında olması istenmektedir. Kültür ortamında en ideal ısının 38-39°C arası, en ideal ışığın ise filtreden geçirilmiş sarı ışık olduğu bildirilmektedir (Garcia ve ark 2016).

1.5.7. Embriyo Kalitelerinin Değerlendirmesi

Son zamanlarda embriyonun morfolojisi, ultrastruktürü, kriyoresistansı ve gen yapısı üzerine yapılan çalışmalar artmıştır. Embriyo kalitesini etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Blastosistin rengi, kompaktlığı ve hatch olma aşamasındaki büyüklüğü kalitesi üzerine etkilidir. Sığır embriyolarındaki anormal kromozom dağılımı veya kromozomal bozuklukları mevcut kullanılan morfolojik yöntemlerle tespit etmek mümkün değildir. Ancak zigot aşamasında iken ultrasantrifüjleme veya multifoton lazer mikroskobu ile genetik analiz yapılabilmektedir. Bir diğer seçenek olarak biyopsi yönteminden yararlanılabilmektedir. Preimplantasyon dönemde embriyonun yaşama kabiliyetini en çok normal bir morfoloji, hızlı bölünme oranı ve embriyodan salınan erken gebelik faktörleri (EPF, sitokinler ve luteotrofik faktörler) etkilemektedir. Bu faktörler ovumun taşınması ve aktivitesi üzerine doğrudan etkilidir (Makarevich 2012).

Sığırlarda embriyoların kalitesinin değerlendirilmesi için 50X veya 100X'lik büyütme ile mikroskopta farklı perspektiflerden inceleme yapılmaktadır. Sığır embriyosunun büyüklüğü 150 ile 190 µm arasında değişmektedir. Embriyonun genel olarak çapı 1 hücreli aşama ile blastosist aşaması arasında hemen hemen aynıdır. En iyi kalite değerlendirme ovulasyondan hemen sonraki günlerde olmaktadır. İdeal embriyonun; kompakt ve küresel, perivitellin boşluğu net ayırt edilebilen, sitoplazmasında granül ve vezikül içermeyen, renk dağılımı eşit olan ve zona pellusidasının uniform olması istenmektedir (Bo ve Mapletoft 2013).

Embriyoların morfolojileri değerlendirilirken bazı kriterlere önem verilmektedir. Bu kriterler;

1. *Hücresel fragmentlerin varlığı ya da yokluğu*; erken embriyonal gelişim döneminde değerlendirilmesi kolaydır. İlerleyen aşamalarda değerlendirme daha zor olmaktadır. Hücreler zona pellusidaya dayanmakta ve perivitellin aralık görülememektedir. Bu nedenlerden dolayı değerlendirme oldukça zor olmaktadır.
2. *Kompaklaşma derecesi*; genellikle morulanın dış çevresinin yuvarlaklığı ve keskinliği değerlendirilmektedir.
3. *Blastomerin renk ve dokusu*; açıktan koyuya kadar değişir. Bu değişime birçok faktör etkilidir. İn vitro fertilizasyondan elde edilen embriyoların rengi in vivo yoldan elde edilen embriyolara göre daha koyu olmaktadır.
4. *Düzensiz bölünme*; zamanla senkronize olmayan bölünmeler nedeniyle oluşmaktadır (Makarevich 2012).

Embriyonik aşamaların sınıflandırılması

Embriyo değerlendirme, embriyo transfer prosedürünün en kritik aşamalarından birisidir. Embriyoların kaliteleri ve gelişim aşamaları IETS'nin belirlemiş olduğu bir standart skala ile değerlendirilmektedir. Embriyolar gelişim derecelerine göre 1 ile 9, kalitelerine göre ise 1 ile 4 arasında değerlendirilmektedir.

Embriyo kalitelerinin sınıflandırması

Kalite-I; Mükemmel veya iyi, %85'ten fazlası canlı hücrelerden oluşur. Embriyoların gelişim dereceleri gelişim süreleri ile uyumludur. Hücre dağılımları diffuz ve zona pellusida vardır. Hücre içerisinde düzensizlikler minimumdur. Mükemmel ve iyi kaliteli embriyolardan yüksek oranda gebelik elde edilmektedir. Bu aşamadaki embriyolar dondurma için uygundur.

Kalite-II; Orta, %50'si canlı hücrelerden oluşur. Renk biraz açıktır ve kısmen düzensiz hücre kütleleri mevcuttur. Dondurma çözündürme sırasında yaşama kabiliyetlerini kayb ettikleri için dondurma işlemine uygun değildirler. Bu nedenle 2. kalite embriyolar uygun bir taşıyıcı bulunduğu takdirde taze transfer için kullanılmaktadır.

Kalite-III; Zayıf/vasat, %25 canlı hücrelerden oluşur ve daha düzensiz bir yapıya sahiptir. Dondurmaya uygun değildir taze transferlerde de yaşama şansları oldukça düşüktür.

Kalite-IV: Dejenere oosit veya 1 hücreli zigot olarak bilinmektedir (Bo ve Mapletoft 2013). Embriyo gelişim aşamalarının tanımlanması çizelge 1.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 1.7. Embriyonun gelişim aşamalarının tanımlanması (Makarevich 2012).

			Embriyo Kaliteleri	
Kod	Aşama	Morfolojik Tanımlama	Kod	Kalite Tanımlama
1	1	Fertilize olmayan tek hücre (UFO)	1	Mükemmel veya iyi
2	2-12	2-12 hücre içermektedir	2	Orta
3	Erken morula	16-32 adet hücre içerirler, kompakt olmayan büyük blastomer kümesi.	3	Zayıf/vasat
4	Morula	32-64 hücre içerirler, kompakt küçük blastomer kümesi.	4	Dejenere veya ölü
5	Erken blastosist	Blastoseller < %50		
6	Blastosist	Blastoseller > %50		
7	Expanded Blastosist	Embriyonun büyüklüğü artar ve zona pellusida duvarı incelik.		
8	Hatched blastosist	Zona pellusida rupturu sonucu embriyo kısmen atılır.		
9	Expanded hatched blastosist	Embriyo tamamen atılır ve büyüklüğü artar, zona pellusida boştur.		

1.5.8. Embriyo Kültür Vasatında Serbest Oksijen Radikalleri ve Antioksidanlar

İn vitro fertilizasyonun aşamalarından biri de embriyo kültürüdür. Embriyo kültürlerine erken embriyonik gelişim aşamalarında katılan büyüme faktörleri, aminoasitler, vitaminler ve antioksidanların embriyo gelişimine büyük oranda katkıda bulunduğu bilinmektedir. Embriyo kültürlerine ilave edilen supplementlerin yetersizliği başta olmak üzere, embriyo kalitesi üzerinde birçok stres faktörünün rolü bulunmaktadır (Kaymaz 2012). Son yıllarda in vitro fertilizasyon kültür vasat sistem içerikleri ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Kültür sistemlerinde embriyo gelişimi üzerinde en önemli stres faktörünün oksijen olduğu belirlenmiştir (Kupka ve ark 2014, Tola 2014, Sunderam ve ark 2015). Bundan dolayı fare, koyun, inek ve insanlarda in vitro kültür ortamında normal atmosfer konsantrasyonundan (%20) daha düşük (%5) konsantrasyonlar ile çalışılmıştır. İn vitro fertilizasyon kültür sistemlerinde tüm canlılarda embriyoların gelişimi yaklaşık %2-8 gibi düşük bir oksijen ortamında gerçekleşmektedir. Memelilerde ve laboratuvar hayvanlarında embriyo kültürlerinde %5'lik O₂'nin belirlenmiş zararlı bir etkisi bildirilmemektedir. Hamster ve tavşan üzerinde yapılan çalışmalarda; uterus O₂ kapasitesinin yaklaşık olarak %8,7, maymunlarda ise %1,5'den daha fazla O₂ içerdiği bildirilmektedir. Yani çoğu canlıdaki in vitro çalışmalar için gerekli O₂ ortamının, normal atmosferik O₂'den daha düşük olduğu belirlenmiştir. Atmosferik O₂'nin hem farelerde hem de sığırlarda DNA hasarına neden olduğu gözlenmiştir. Hatta kısa bir süre bile atmosferik O₂'ye maruz kalan fare ve sığır embriyolarında bölünmelerde bloklanma veya gecikmiş bölünmelerin meydana geldiği görülmüştür (Meintjes ve ark 2009, Wale ve Gardner 2012). Yüksek O₂ seviyesinin etkisi serbest eksojen reaktif oksijen ürünleri (ROS'lar) vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca ROS'ların insan embriyolarında apoptozise neden olduğu ve embriyo kalitesini düşürdüğü bilinmektedir (Johnson ve Nasr Esfahani 1994, Guerin ve ark 2001, Van Soom ve ark 2002, Truong ve ark 2016).

Oksidatif stres, organizmada hücrel savunma mekanizmalarının tolere edebileceğinden daha fazla reaktif oksijen türünün meydana gelmesidir (Karaşahin ve Arıkan 2015). İn vitro fertilizayonda oositen blastosist elde etme oranı %25 ile %30 arasında değişmektedir. İn vivo fertilizasyona göre bu oran düşük bulunmakta ve sebebinin embriyonun in vivo ortamdaki normal fizyolojik koşullarını sağlayamaması olarak düşünülmektedir (Johnson ve Nasr Esfahani 1994, Guerin ve ark 2001).

Reproduktif sistem, fizyolojik olarak meydana gelen ROS'ları tolere edebilecek seviyede antioksidan içermektedir (Christianson ve ark 2014). Bundan dolayı in vivo çalışmalarda ROS'a bağlı embriyo bloklanması ve hasarı ile ilgili problemler ile daha az karşılaşmaktadır. İn vitro çalışmalarda ise; ROS üretimi antioksidan kapasiteyi aştığı zaman embriyo oksidatif strese maruz kalır. Bu problemlerin önüne geçebilmek için kültür sistemlerine antioksidan ilaveleri yapılmaktadır. Bu yüzden ROS ve antioksidanların varlığı arasındaki denge embriyonik gelişim sırasında kilit bir faktördür (Ali ve ark 2003, Meintjes ve ark 2009, Agarwal ve ark 2012, Bontekoe ve ark 2012, de Souza Rocha-Frigoni ve ark 2015, Sunderam ve ark 2016).

İN vitro kültür sistemlerindeki ortam, in vivo ortama göre yüksek O₂ seviyesi ile ROS'ların seviyesini yükselterek hücrel membranlarda lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır (Dalvit ve ark 2005). Kültür sistemlerinde üretilen ROS türleri; süperoksit anyon (O₂⁻), hidroksil radikal (OH[·]), hidrojen peroksit (H₂O₂) ve lipit peroksidazdır. Bunlar normal mitokondri solunumu veya diğer hücre içi elektron transferleri sırasında elektron transferi vasıtası ile ortaya çıkmaktadır (Guille ve Joenje 1991, Ho ve ark 1996). Birçok eksojen faktör; fertilizasyon sonrası ölmüş sperm hücreleri kalıntısı, proteinlerin oksidasyonu ve metalik iyonların kalması gibi in vitro kültürlerinde ROS miktarını artırmaktadır. ROS'a bağlı bileşenlerin hücrel oksidasyonda en büyük zararlı etken olduğu bilinmektedir. Bunlar zararlı etkileri ile protein inaktivasyonu, lipit membran peroksidasyonu ve DNA değişimine neden olurlar. Ancak fizyolojik süreçte ROS'ların normal hücrel işleyişlere katıldığı bilinmektedir (Luvoni ve ark 1996, Hancock ve ark 2001).

Aerobik respirasyon sırasında, hücrede reaktif oksijen türlerinden olan O₂⁻, OH[·] ve H₂O₂ üretilmektedir. Bu ROS'lar elektronları diğer moleküllere taşımada oldukça aktiftir. OH[·] grubu ROS oluşumunda tek bir elektronu O₂ molekülüne bağlayan ve eşleşmemiş elektron pozisyonunu oluşturan ilk adımdır. O₂ radikallerinden oluşan H₂O₂ üretimi oluşumu için bir zincir reaksiyonu başlar ve aracı hale gelir. Ardından su (H₂O) ve O₂ üretmek için yola koyulur. H₂O₂ kararlıdır ve hücre zarını geçebilir. Ancak hücre içerisindeki kalıcı iyonlar varlığı nedeni ile bunlarla etkileşme girerek daha da zararlı oksidatif zarara neden olabilmektedir. ROS'un üretimi enzimatik ve enzimatik olmayan yol ile kontrol edilir. O₂'e karşı

enzimatik savunmaları O_2 ve H_2O_2 'leri dağıtan süperoksit dismutaz (SOD) yapmaktadır. O_2 'nin değişmesi esas olarak sitoplazmada bulunan Cu, Zn-SOD ve mitokondride yer alan Mn-SOD ile sağlanır. O_2 glutasyon peroksidaz (GPx) ve katalaz ile H_2O_2 oluşumu öncesi reaksiyona girer. Mitokondriyel solunum zinciri ara toksik ROS'ları üreten ve O_2 tüketen bir sistemdir. Oosit içerisindeki mitokondri sayısı, şiddetli bir hücre büyümesi ve enerji üretimi için gereken somatik hücrelere oranla 100 kat daha fazladır. Bu nedenle ROS'un büyük bir çoğunluğu fizyolojik koşullarda bile bu sistem ile üretilmektedir (Takahashi 2012).

Memeli hücrelerinin enzimatik antioksidan sistemlerini katalaz, glutasyon peroksidaz ve süperoksit dismutaz oluşturmaktadır. Bunlar ROS'lardan meydana gelen zararlı etkileri ortadan kaldırmak için çalışmaktadır. Sığırların kumulus-oosit komplekslerinde (COCs) kalıcı enzimatik antioksidan sistemlerin varlığı tespit edilmiştir. Ancak yine de ROS'ların yüksek seviyeleri oositlerin mayotik bölünmelerinde durgunluğa neden olmaktadır. Ayrıca yüksek seviyede ROS bulunan kültür vasat sistemlerinde glikoz oranında da artış olduğu gözlenmiş ve bu durumun blastosist aşamasına ulaşmada negatif rol aldığı bildirilmiştir. Bunun için oositlerin normal bir fizyolojide *in vitro* ortamda sitoplazmik maturasyonu ve embriyonik gelişimini tamamlaması aşamasında antioksidan ilavelerine ihtiyaç duyulmaktadır (Hashimoto ve ark 2000, Tatemoto ve ark 2001, Truong ve Gardner 2017). İlave edilen antioksidanlar ortamdaki ROS'ların zararlı etkisini azaltarak embriyo gelişimine fayda sağlamaktadır (Sovernigo ve ark 2017).

In vitro embriyo üretimini birçok faktör etkilemektedir. Bunlar; atmosferdeki gaz, sıcaklık, büyüme faktörleri, protein ilaveleri ve oosit manipülasyonudur (Adona ve ark 2008, Mingoti ve ark 2009, Arat ve ark 2016). Normal bütün hücrelerin aerobik metabolizmaları sırasında ROS'lar doğal olarak üretilir ve fizyolojik olarak hücre içerisinde nötralize edilir. Dengeli ROS'lar fizyolojik süreçte fayda sağlamaktadır. Doku yenilenmesi, hormon sinyalleri, steroidogenezis, hücre içi redoks regülasyonu ve embriyogeneziste aktif rol almaktadır. Diğer yandan fazla miktarda ROS, hücre üzerinde zararlı etkiye sahip olmakta ve hücre ölümlerine neden olabilmektedir. Oosit ve embriyoların maruz kaldıkları çevresel etkiler (ısı, ışık, manipülasyon, ortam bileşenleri, sperm ve O_2 konsantrasyonu) ROS miktarında artışa ve dolayısıyla savunma mekanizmasının çökmesine neden olabilir. Normal reproduktif sistem

antioksidanlar açısından oldukça zengin olmakla birlikte, ama hangi tür antioksidandan ne ölçüde mevcut olduğu bilinmemektedir. Ancak in vitro ortamda bu antioksidanların eksikliği sebebi ile antioksidan ilaveleri denenmektedir (Corrêa ve ark 2008, Rocha-Frigoni ve ark 2016). İlave edilen antioksidan maddeler, kültür vasatındaki fazla ROS'ların ve ortaya çıkan oksidatif ürünlerin etkisini azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Sığırlarda, kültür ortamına katılan antioksidanlar vasıtasıyla elde edilen kaliteli embriyo sayısı ve oositlerin maturasyon oranının arttığı bilinmektedir (Gasparrini ve ark 2006, Lott ve ark 2010).

Bazı literatürlerde, sığır in vitro embriyo kültür vasatlarında antioksidan olarak çeşitli maddelerin ilave edildiği bildirilmektedir (Rocha-Frigoni ve ark 2016). Sunulan tez çalışmasında ise daha önce sığır embriyo kültür vasatına ilavesi denenmemiş olan ve antioksidan özellikleri ile tanınan borik asit ve pentoksifilin ilavesinin, embriyo gelişimi üzerine etkisinin değerlendirilmesi planlanmıştır.

Bor

Ülkemiz, dünyadaki bor rezervlerinin yaklaşık %73'üne sahiptir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Bor madeninin, farklı teknolojik ve imalat sektöründe kullanım alanı bulmasının yanı sıra özellikle insan ve hayvan sağlığı üzerinde de yararlı etkileri olduğu tespit edilmiştir. Bor madeninin atom numarası 5 (B₅), atom ağırlığı 10,81g, yoğunluğu 2.84 g/cm³, erime noktası 2300 °C'dir. Bor, bitkiler ve hayvanlar için önemli mikro besin kaynağı olan bir elementtir. Bazı insan ve hayvan dokularında düşük konsantrasyonlarda bor madeni tespit edilmiştir (Yılmaz 2002, Lipscomb ve ark 2004). Bu element, doğada serbest halde bulunmayan bir mineraldir ve çoğunlukla diğer elementlerin oksitleri ile birlikte B₂O₃ şeklinde bulunmaktadır (Kemp 1956). Metallerle borun yaptığı bileşikler borat olarak adlandırılmaktadır. Bor mineralleri genellikle Na, Ca ve Mg gibi metallerle bileşik yaparlar ve Kolemanit, Uleksit, Tinkal bileşik olan boratların öncüleridir (Boncukoğlu ve ark 2003). Bor mineralleri özellikle borik asit ve boraks; dezenfektan ve ilaçların hazırlanması amacıyla endüstriyel sektörde kullanılmaktadır. Bor mineralinin çok az miktarı bile canlı metabolizmasında optimum etki gösterebilmektedir. Bu mineralin eksikliği ya da fazlalığı, metabolizma üzerinde istenmeyen etkilerinin olduğu gözlenmiştir. (Yılmaz 2002, Korkmaz 2007).

Bor elementi, insan ve hayvan diyetlerine eklenerek çeşitli fizyolojik ve metabolik sistemlerde önemli etkiler yapmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar sonucu bor elementinin metabolizmada (Ca/P), enzimlere (Aldehitdehidrogenaz, ksantin, oksidaz, sitokrome B5 redükdaz), endokrin fonksiyonlara (kalsitonin, insülin, östrojen, testesteron, T3, T4), enerji substratlarına (trigliseridler, glikoz), reaktif oksijenlere etki ettiği ve immun fonksiyonlarda rol aldığı gözlenmiştir. Ayrıca gen ekspresyonun planlı düzenlenmesinde, canlılarda büyüme ve proliferasyonunda da bor elementinin rol aldığı bilinmektedir (Nielsen ve ark 1987, Hunt 1988, Meacham ve ark 1994, Hunt 1996, Armstrong ve ark 2001, Devirian ve Volpe 2003, Eren ve ark 2006, Türkez ve ark 2007). Yine de bor madeninin insan ve hayvan dokularındaki biyokimyasal mekanizmasına etkisi tam olarak ortaya konulamamıştır. Yapılan araştırmalarda bor elementinin oksijenle bağ yapmaya yatkın olduğu ve hidroksil grubu içeren biyomoleküller ile (polisakkaritler, adenozin-5-fosfat, piridoksin, riboflavin, dehidroaskorbik asit, piridin) reaksiyona girebileceği ve çeşitli bor-oksijen radikallerini oluşturabileceği bilinmektedir. Hücrelerde oksidatif stres, süperoksit radikali (O_2^-), hidroksil radikali ($HO\cdot$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen radikallerinin, hücrelerden atılamayacak kadar fazla miktarda oluştuklarında meydana gelmektedir. Oluşan bu reaktif oksijen molekülleri; DNA, protein ve lipitler ile etkileşime girerek geri dönüşümü olmayan hasarlara neden olabilmektedir. Hücreler, oluşan reaktif oksijen radikallerini detoksifiye eden antioksidanlar içermektedir. Yapılan çalışmalar, bor bileşiklerinin antioksidan enzim aktivitelerini artırdığı ve lipit peroksidasyonunu (LPO) önlediği ve antioksidan özellikte etki ettiğini göstermiştir. Glutasyon da (GSH) bu antioksidanlardan bir tanesidir. Oksijen radikallerinin miktarı arttığı zaman, GSH hızlı bir şekilde oksitlenerek miktarı azalır. Oksitlenmiş glutasyonun (GSSG) yeniden indirgenmesi için ortamda nikotinamid adein dinükleotidte (NADPH) ihtiyaç duyulmaktadır. Bor minerali antioksidan özelliğini burada göstererek NADPH seviyelerini düzenlemektedir. NADPH, hücrelerdeki GSH miktarını artırarak oksidatif stresi ve doku hasarını ortadan kaldırmaktadır (Uçkun 2013, Çoban ve ark 2015). Ayrıca bor bileşikleri, GSSG'nun vücut depolarını güçlendirir ve reaktif oksijenleri inhibe eder. Yapılan çalışmalarda düşük dozlarda bor bileşiklerinin insan kanındaki eritrosit SOD ve katalaz (CAT) aktivitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca bor mineralinin membrandaki ROS'ları süpürücü etkisi vardır. Bunu hidroksil gruplarına olan affinitesi sayesinde yapmaktadır (Coban ve ark 2015, Demirtaş ve ark 2015).

Bor mineralinin önemli birçok metabolik olayda etkin olması; embriyogenezis, kemik gelişimi ve immun fonksiyon gibi yaşamsal faaliyetlerdeki önemli rolünün olduğunu göstermiştir. Yapılan çalışmalar bor mineralinin erken embriyonik gelişim aşamalarında gerekli olduğunu desteklemiştir (Nielsen 2000). Bor noksanlığın embriyo gelişiminin ilk dönemlerindeki etkisi, farelerde ve zebra balıklarında preimplantasyon aşamasında yapılan çalışmalarda ortaya konulmuştur. İlk olarak 1995 yılında embriyonik büyümesi yavaş olan balıklarında bor konsantrasyonunun düşük olduğu, 1998 yılında yapılan çalışmalarda ise bordan fakir diyet alan zebra balıklarının embriyonik ölümlerle karşılaştığı gözlenmiştir (Eckhert 1998).

Curtis D. Eckhert 1995 ve 1997'de gökkuşağı alabalıklarının in vitro gelişiminde bor minerali kullanmıştır. Çalışmalarda doza bağlı olarak büyümede artış gözlenmiş ve herhangi bir teratojenik etki gözlenmemiştir. Bu da omurgalıların gelişiminde bor mineralinin gerekliliği bilgisini doğrulamıştır (Eckhert 1998).

1999'da yapılan bir çalışmada, bor ilave edilen ve bordan sınırlı diyetlerle beslenen farelerin embriyo gelişimleri incelenmiştir. Çalışma sonunda bordan kısıtlı diyetle beslenen farelerde embriyonik kayıplar ve dejenere embriyo sayısında artış gözlenmiştir. Güney Afrika kurbağası *Xenopus Laevisde* borun embriyonik gelişim üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Diyetlerinde bor mineralinin noksanlığı görülen kurbağalarda; anormal organogenezis, anormal gastrulasyon ve embriyonik kayıplar ile karşılaşılmıştır. Sonuç olarak *Xenopus Laevisde* bor mineralinin embriyogenezis üzerinde olumlu etkisinin olduğu gözlenmiştir (Fort ve ark 1999).

Kandi ve ark (2009) farelerde embriyo kültürlerine bor ilave ederek borun embriyo gelişimi üzerine etkilerini inceledikleri bir çalışmada, morula aşamasına kadar olan embriyo gelişim oranının kontrol grubunda deneme gruplarına göre %22,41 oranında daha düşük olduğu sonucuna ulaşmışlardır.

Pentoksifilin

Pentoksifilin (PTX) metilksantin türevi fosfodiesteraz inhibitörü bir ilaçtır. PTX özellikle mikrosirkülasyonda etkili olmakla birlikte antiinflamatuvar, antiproliferatif, antifibrotik, antiapoptotik, immunmodülatör ve antioksidan etkileri bulunmaktadır (Çakmak ve ark 2012, Amber 2014). Ayrıca PTX fosfodiesteraz enzimi, adenilaz siklaz ve guanilaz siklaz enzimi sonucu oluşan hücre içi ikincil

habercilerden cAMP ile cGMP oluşmasını önler. PTX etki mekanizması tam bilinmemekle birlikte akut yangıda, yangının düzenleyicisi olarak kabul edilen TNF α sentezini azalttığı bildirilmiştir. Yangısal süreçte rol oynayan interferon gamma, interlökin (IL)- 1, IL-2, IL-6 ve IL-12'yi inhibe ederken, antienflamatuar özelliği olan IL-10 sentezini artırdığı belirtilmiştir (Başkurt ve Küçüköğlü 2010).

PTX'in antioksidan özelliğini, hasarlı dokularda süperoksit radikali başta olmak üzere nötrofillerden salınan serbest oksijen radikallerinin ve lizozomal enzimlerin salınımını ve ksantin oksidazı inhibe ederek süperoksit (SO) ve hidroksil (HO-) radikallerinin oluşumunu engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir. PTX serbest oksijen radikallerini nötralize etmektedir. Fosfolipaz A2'yi inhibe ederek prostosiklin salınımını artırır. Nötrofillerin infiltrasyon ve aktivasyonunu azaltır. Ayrıca PTX'in sitozoldeki Ca miktarını azaltarak serbest oksijen radikallerinin hücrede yaptıkları hasarı önlediği ve hücre içi Ca miktarının artmasının da ksantin oksidazı aktive ettiği bilinmektedir. Pentoksifilin tarafından inhibe edilen fosfolipaz A2 hücre içindeki depolardan Ca salınımını da artırmaktadır (Pasquier ve ark 1990, Hammermann ve ark 1999).

Khalili ve ark (2017) PTX'i farelerde in vitro fertilizasyon öncesi spermaya ilave ederek embriyo gelişimi ve fertilizasyon oranlarını inceledikleri çalışmada, kontrol grubu ile deneme grubu arasında negatif veya pozitif bir fark bulunamamıştır.

PTX'nin mikrovaskülarizasyonu önleme, immun cevabın artırılması, kemoterapötiklerin yan etkisinden korunma ve rejenerasyon amacıyla kullanıldığı belirtilmektedir (Hammermann ve ark 1999).

Sunulan bu tez çalışmasında; PTX ve borik asitin hidroksil radikaline affinitesi olan birer antioksidan olmalarından faydalanarak sığır in vitro embriyo üretiminde oksidatif stresi azaltarak, embriyo gelişim ve kalitesine fayda sağlayabileceği düşünülmektedir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Sunulan doktora tez çalışması izinleri, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu'ndan alınmıştır (2017/147).

Çalışmanın materyalini Konya ilinde bulunan Akşeker Tarım Et Entegre Tesisleri'nde kesilen dişi sığırlardan elde edilen ovaryumlar oluşturdu. Çalışma Ekim 2018-Mayıs 2019 tarihleri arasında gerçekleştirildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. BO-OPU (Bioscience-61007/500 mL)
2. BO-WASH (Bioscience-61008/50 mL)
3. BO-IVM (Bioscience-61002/10 mL)
4. BO-HEPES-IVM (Bioscience-61009/10 mL)
5. BO-SEMENPREP (Bioscience-61004/10 mL)
6. BO-IVF (Bioscience-61003/10 mL)
7. BO-IVC (Bioscience-61001/10 mL)
8. BO-OİL (Bioscience-62000/50 mL)
9. Sperma (DEMSA-Gravity 205219 C 1410161)
10. Borik Asit (Eti Maden)
11. Pentoxifylline (SIGMA-P1784)
12. HIPRACILIN RETARD (HIPRA-28000485/100 mL)
13. Laktat Ringer (Polifarma/1000 mL)
14. %0,9 İzotonik Sodyum Klorür (Polifleks/1000 mL)
15. Mineral Oil (SIGMA-M8410/1 L)

2.2.2. Ovaryumların Toplanması ve Laboratuvara Taşınması

Çalışmada kullanılacak ovaryumların kesim sonrası yıkanması, mezbahadan laboratuvara taşınması ve kandan arındırılması için taşıma solüsyonu hazırlandı. Solüsyon hazırlanırken %0,9 izotonik sodyum klorür (Polifleks/1000 mL) benmari içerisinde 25-30°C'ye gelene kadar ısıtıldı ve içerisine 100.000 IU penicilin-streptomisin

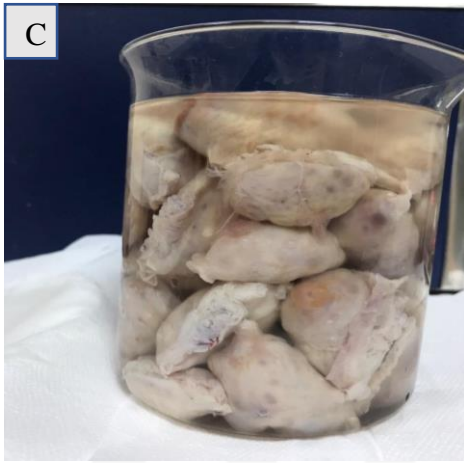
(HIPRACILIN RETARD/ HIPRA) ilave edildi. Sonrasında hazırlanan solüsyon 2 litrelik termos içerisine aktarıldı. Taşıma solüsyonlarının mezbahaya gitmeden en az 4 saat öncesinde hazırlanmasına dikkat edildi.

Mezbahada kesilen hayvanların ovaryumları, taşıma solüsyonu ile yıkanarak temizlendi ve termosu konuldu. Ovaryumlar 2-4 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı.

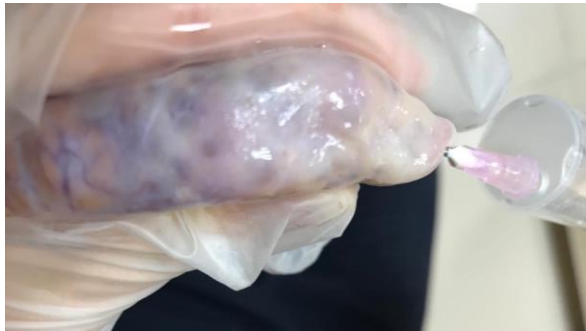
2.2.3. Ovaryum Üzerindeki Folliküllerin Aspirasyonu ve Oositlerin Toplanması

Mezbahadan getirilen ovaryumlar, hazırlanmış olan taşıma solüsyonu ile tamamen kandan arındırılana kadar yıkandı. En son yıkama işleminden sonra ovaryumlar 15-20 saniye alkolde bekletildi ve ardından tekrar taşıma solüsyonu ile yıkandı. Sonrasında 500 mL'lik beherglasa taşıma solüsyonu ile birlikte boşaltılarak 30-35°C'lik benmariye bırakıldı (Şekil 2.1 A, B, C).

Oositlerin toplanması için 50 mL'lik konik uçlu tüpler (Falkon) hazırlandı. Tüpler içerisine aspirasyon öncesinde, aspire edilen oositlerin tüpe yapışmasını önlemek amacı ile BO-OPU (Bioscience oosit toplama sıvısı) solüsyonundan yaklaşık 1'er cc ilave edilerek benmariye bırakıldı (Şekil 2.1 B). Ovaryumların üzerinde bulunan 2-8 mm büyüklüğündeki folliküller, 10 mL'lik veya 20 mL'lik 18-G contasız, steril ve içerisine az miktar BO-OPU çekilmiş enjektörler ile aspire edildi (Şekil 2.2). Aspirasyon sırasında enjektörün kesik ucunun yukarı gelmesine, ovaryumun korteksinden girilmesine ve çıkmadan mümkün olduğu kadar çok follikül aspirasyonu yapılmasına dikkat edildi. Ayrıca ovaryumların aspirasyonu sonrası enjektörde toplanan aspirasyon sıvısı her ovaryumdan hemen sonra 50 mL'lik falkon tüplere boşaltıldı. Tüm ovaryumların aspirasyon işlemi bittikten sonra, konik uçlu falkon tüplerde toplanan sıvılar süpernatant oluşana kadar bekletildi. Oluşan süpernatant enjektör yardımı ile uzaklaştırıldı ve tüp üzerine BO-OPU ilave edildi. Bu işlem süpernatant tamamen mikroskopta taranabilir parlaklığa gelene kadar (çoğunlukla 3 defa) tekrarlandı. Bu süreç içerisinde 90 mm'lik petrinin altı çizilerek ve içerisine oositlerin yapışmasını önlemek için az miktar BO-WASH (Bioscience oosit ve embriyo yıkama solüsyonu) ilave edilerek ısıtma tablası üzerine konuldu. Hazır olan süpernatant ve sediment tarama yapılmak üzere petriye aktarıldı. Falkon tüp içerisinde, oosit kalmış olabileceğinden tekrar BO-OPU ilave edilerek yıkandı ve sonrasında ikinci bir 90 mm'lik petriye aktarıldı. Bu işlem her tüp için uygulandı.



Şekil 2.1. Mezbahadan getirilen ovaryumların aspirasyon için hazırlanması (A), benmariye falkon tüplerin yerleştirilmesi (B), aspirasyon sonrası ovaryumlar (C) ve aspirasyon için bekletilen ovaryumlar (D) (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D. IVF Laboratuvarı 2019).



Şekil 2.2. Ovaryumlardan oosit aspirasyonu (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D. IVF Laboratuvarı 2019).

2.2.4. Oositlerin Taranması ve Kalitelerinin Değerlendirilmesi

Petrilere aktarılan sıvı mikroskop altında (OLYMPUS, SZX16) sol baştan başlayarak ve ‘‘S’’ harfi çizerek tarandı. Bulunan oositler, önceden hazırlanmış, içerisine BO-WASH ilave edilmiş 35 mm’lik petrilere pipet yardımı ile aktarıldı. Her petri en az iki defa tarandı. Petrilere toplanan oositlerin kalite değerlendirilmesi yapıldı (Cetica ve ark 1999). Oositler kalitelerine göre A, B, C ve D olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

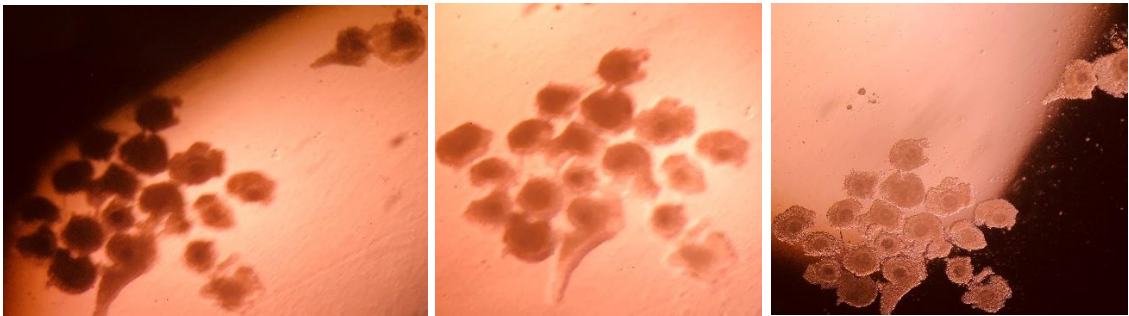
A Kalite; Zonanın çevresinde kumulus hücreleri 4 veya daha fazla kat olarak görülmektedir.

B Kalite; Zona çevresinin 1/3’ünden fazlasını kumulus hücreleri 5 veya daha az kat olarak kaplamaktadır.

C Kalite; Oositler genellikle tamamen çıplak ya da B kalite oositten çok daha az kumulus hücrelerine sahiptir. Ya da az bir kısmında kumulus olmayabilir.

D Kalite; Kumulus hücreleri örümcek ağı gibi ya da dağılmış gözükmektedir.

Elde edilen oositlerden sadece A ve B kalitede olan oositler maturasyon için kullanıldı. C ve D kalite oositler ise yalnızca sayı olarak kaydedildi.



Şekil 2.3. Elde edilen oositlerin mikroskopta ilk görünümü (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D. IVF Laboratuvarı 2019).

2.2.5. Oositlerin İn Vitro Maturasyonu (IVM)

Maturasyon için öncelikle, oosit toplama işleminden 2 saat önce BO-IVM (Bioscience, oositlerin in vitro maturasyon solüsyonu) ile 35 mm’lik petrilere 100 µL’lik 4 tane drop hazırlandı ve üzeri mineral oil ile kaplandı.

Tri-gas CO₂ inkübatöre (Sanyo MCO-175M) 38,8°C'de %5,5 CO₂'li ortamda atmosferik O₂ ile ekilibrasyona bırakıldı. Ayrıca CO₂ inkübatörüne oosit yıkamak için BO-IVM bir adet petri ekilibrasyona bırakıldı. Hazırlanacak petri sayısı, mezbahadan verilen kesilecek hayvan sayısı bilgisine göre belirlendi.

Kalite değerlendirilmesi yapılan oositler, BO-WASH'dan arındırmak için maturasyona alınmadan önce yıkama işlemi yapıldı. Arındırma ve yeni kültür ortamına adaptasyon için, 20'li grup yapılan oositler ekilibre edilmiş BO-IVM ile en az 3 defa yıkandı. Her bir droba (100 µL), 20 oosit gelecek şekilde oositler maturasyon petrilere yerleştirildi. Petriler maturasyon için, 38,8°C'de %5,5 CO₂'li ortamda atmosferik O₂ ile 21-24 saat CO₂ inkübatörüne konuldu.

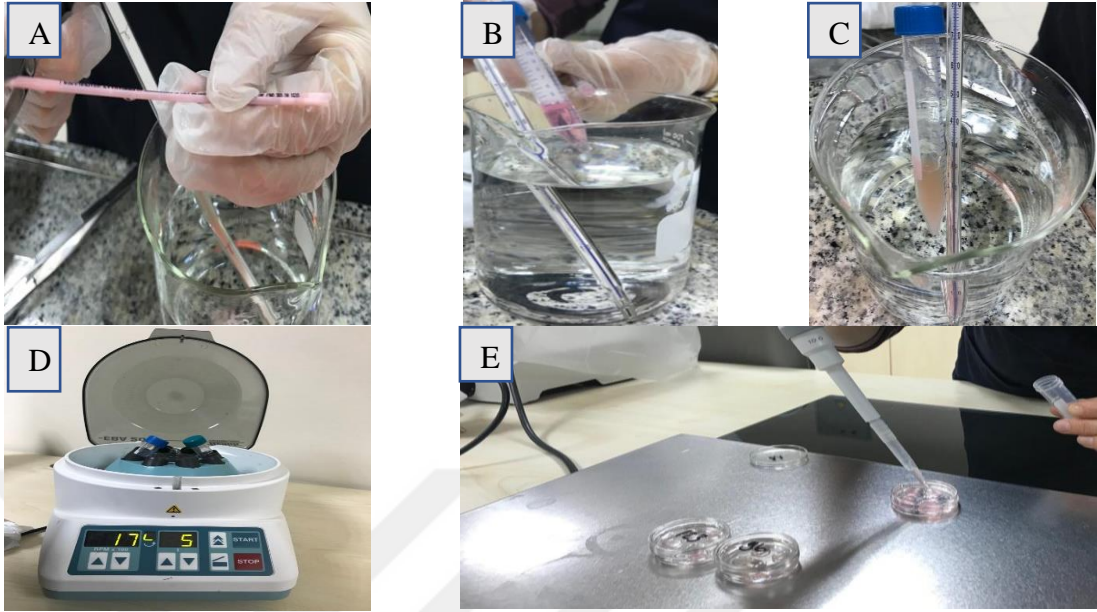
2.2.6. Spermının Hazırlanması ve İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

İn vitro fertilizasyon için gerekli olan BO-IVF solüsyonundan, 100 uL'lik droplar hazırlanarak mineral oil ile kaplandı ve 38,8°C'de %5,5 CO₂ ve atmosferik O₂ ile CO₂ inkübatörüne ekilibrasyon için 12 saat bırakıldı.

Spermının hazırlanması için gerekli olan BO-SEMENPREP (Bioscience, sperma hazırlama solüsyonu) kullanmadan önce 37°C'ye ısıtıldı. Konik uçlu 15 mL'lik santrifüj tüpüne 2 mL BO-SEMENPREP ilave edildi (Şekil 2.4 B). Azot tankından çıkarılan sperma (DEMSA-Gravity) 37°C sıcak su içerisinde 30 saniye bekletilerek çözdürüldü (Şekil 2.4 A). Çözdürülen sperma, hazırlanan santrifüj tüpüne boşaltıldı. Sperma 328 x g devirde 5 dakika santrifüj edildi (Şekil 2.4 D). Santrifüj sonrası tüpün üzerindeki süpernatanttan 2 mL atılarak üzerine tekrar 2-4 mL BO-SEMENPREP ilave edildi ve tekrar santrifüj edildi. Sonrasında tekrar süpernatanttan 2 mL atılarak 2 mL BO-SEMENPREP ilave edildi. Hazır olan spermının, santrifüj öncesi ve sonrası motilite kontrolü yapıldı. Her droba ortalama 150.000 adet spermatozoon gelecek (40 µL) şekilde sperma ilavesi yapıldı (Şekil 2.4 E).

Oositlerin inkübasyonundan sonra maturasyonları değerlendirildi. Primer polar body ve kumulus ekspansiyonundan herhangi birisinin görülmesi mature olmuş oosit olarak kabul edildi. Genellikle kumulus ekspansiyonu kriter olarak yeterli sayıldı. Maturasyonunu tamamlayan oositler ekilibre olan BO-IVF ile en az 3 kere yıkandı ve 20'li gruplar halinde fertilizasyon droplarına aktarıldı. Her bir droba

hazırlanmış olan spermadan 40 µL ilave edildi. Hazırlanan petriyeler, 38,8°C’de %5,5 CO₂ ve atmosferik O₂ ile CO₂ inkübatörüne 12 saat süre ile fertilizasyon için bırakıldı.



Şekil 2.4. Spermının payetten falkon tüpe aktarımı (A, B, C), spermının santrifüjü (D) ve fertilizasyona hazır spermının oositlerin bulunduğu droplara ilavesi (E) (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D. IVF Laboratuvarı 2019).

2.2.7. İn Vitro Kültür (IVC)

Fertilizasyon sonrası petriyeler inverted (Olympus lx72) mikroskop altında incelendi. Sekonder polar bodynin görülmesi ile fertilizasyonun gerçekleştiği kabul edildi. Fertilize olmuş oositlerin etrafındaki kumulus hücrelerini uzaklaştırmak için, oositler droplardan toplanarak 2,5 mL ependorf tüpüne boşaltıldı. Önce 30 saniye vorteks yapıldı ve sonra oositler tekrar 35 mL’lik yıkama petrisine aktarılarak pipet yardımı ile kumulus hücreleri uzaklaştırıldı.

Kültür için 35 mm’lik petriyelerin altı 4 grup olacak şekilde çizildi ve numaralandırıldı. Her bölüme 100 µL’lik drop hazırlandı (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Kültür droplarının gruplandırılmasının şematik gösterimi.

Pentoksifilin çalışma grubu için 100 µL'lik droplara farklı dozlarda pentoksifilin ilave edildi;

1. gruba 3 mmol; 2. gruba 3,6 mmol; 3. gruba 4 mmol pentoksifilin ilave edildilerken 4. gruba herhangi bir ilave yapılmadı ve kontrol grubu olarak değerlendirildi.

Borik Asit çalışma grubu için 100 µL'lik droplara farklı dozlarda borik asit ilave edildi;

1. gruba 2 µg; 2. gruba 1 µg; 3. gruba 0,04 µg borik asit ilave edilirken 4. gruba herhangi bir ilave yapılmadı ve kontrol grubu olarak değerlendirildi.

İn vitro kültür için, içerisine pentoksifilin (PTX) veya borik asit ilave edilmiş BO-IVC (Bioscience embriyo kültür solüsyonu), oositler fertilizasyona alınırken 38,8°C'de %5,5 CO₂'li ortamda inkübatörde 12 saat süre ile ekilibrasyona bırakıldı.

Kumulusları uzaklaştırılan oositler, hazırlanan droplara eşit sayıda dağıtıldı ve 38,8°C'de %5,5 CO₂ ile inkübatörde 7 gün süre ile kültüre edildi.

2.2.8. İstatistiksel Analizler

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS 25 (IBM Corp. Released 2017. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 25.0. Armonk, NY: IBM Corp.) istatistik paket programı kullanılmıştır. Değişkenler için ortalama±standart sapma, medyan (Maksimum-Minimum) yüzde ve frekans değerleri kullanılmıştır. Verilerin tekrarlanan ölçümleri varyans analizine uygunluğu Mauchy's Küresellik Testi ve Box-M Varyansların Homojenliği Testi ile değerlendirilmiştir. Ortalamaların karşılaştırmaları için faktöriyel düzende faktörlerden biri tekrarlanan ölçümler varyans analizi kullanılmıştır. Eğer parametrik testlerin (faktöriyel düzende tekrarlanan ölçümler varyans analizi) ön şartlarını sağlamıyor ise serbestlik derecesi düzeltmeli Greenhouse-Geisser (1959), ya da Huynh-Feldt (1976) testlerinden biri kullanılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar ise Düzeltilmiş Bonferroni Testi ile gerçekleştirilmiştir. Değişkenler normallik, varyansların homojenliği ön şartlarının kontrolü yapıldıktan sonra (Shapiro Wilk ve Levene Testi) değerlendirilmiştir. Veri analizi yapılırken, iki grup karşılaştırması için Bağımsız 2 Grup *t* testi (Student's *t* test), ön şartlar sağlamadığında ise Mann Whitney-U testi, üç ve daha fazla grup karşılaştırması için

Tek Yönlü Varyans Analizi ve çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey HSD testi ile sağlanmadığında ise Kruskal Wallis ve çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni-Dunn testi kullanılmıştır. Kategorik veriler Fisher's Exact Test ve Ki Kare testi ile analiz edilmiştir. Beklenen frekansların %20'den küçük olduğu durumlarda bu frekansların analize dahil edilmesi için "Monte Carlo Simulasyon Yöntemi" ile değerlendirme yapılmıştır. Testlerin anlamlılık düzeyi için $p < 0,05$ ve $p < 0,01$ değeri kabul edilmiştir.



3. BULGULAR

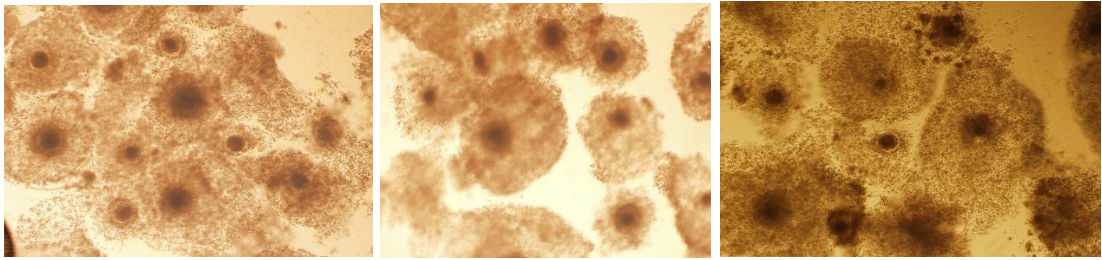
Sunulan tez çalışmasında uygun koşullarda mezbahadan getirilen 370 adet ovaryum kullanıldı. Getirilen ovaryumlardan 40 adedi kistik, inaktif veya adezyonlu olması nedeni ile çalışmaya dahil edilmedi. Kalan 330 ovaryum üzerinden 2-8 mm çapındaki folliküller aspire edildi. Aspire edilen oositlerden sadece A ve B kalitede olanlar tercih edildi, toplam 1384 adeti çalışmaya dahil edildi. Elde edilen oositlerin kalite ve sayı bilgileri çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Elde edilen oosit, kaliteleri ve ovaryum başına düşen oosit sayıları.

	Elde edilen toplam sayı	Ovaryum başına oosit sayısı
Kullanılan ovaryum sayısı	330	-
Aspire edilen oosit	1894	5,73
A-B kalite oosit	1384(800A+584B)	4,19
C-D kalite oosit	201	0,6
Dejenere	60	0,18

3.1. İn Vitro Maturasyon Bulguları

Maturasyon için toplam 1384 oosit kullanıldı. Toplam 1210 oositin mature olduğu gözlemlendi. Oositlerin 174 adetinde dejenerasyon şekillendiği veya maturasyonun gerçekleşmediği görüldü. Oositlerin gruplar arası dağılımı, kalitesi ve maturasyon yüzdeleri çizelge 3.2’de verilmiştir.



Şekil 3.1. İn vitro maturasyonun mikroskop görüntüleri (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D. IVF Laboratuvarı 2019)

Çizelge 3.2. Maturasyona alınan oosit sayıları, kaliteleri, maturasyon yüzdeleri ve dejenere olan oosit oranları.

	Maturasyona alınan oosit sayısı	Oosit kalitesi A-B kalite oosit	Mature olan oosit sayısı	Maturasyon oranları	Mature olmayan ve dejenere olan oosit oranı
Toplam	1384	800A 584B	1210	%87,4	%12,6 (174/1384)



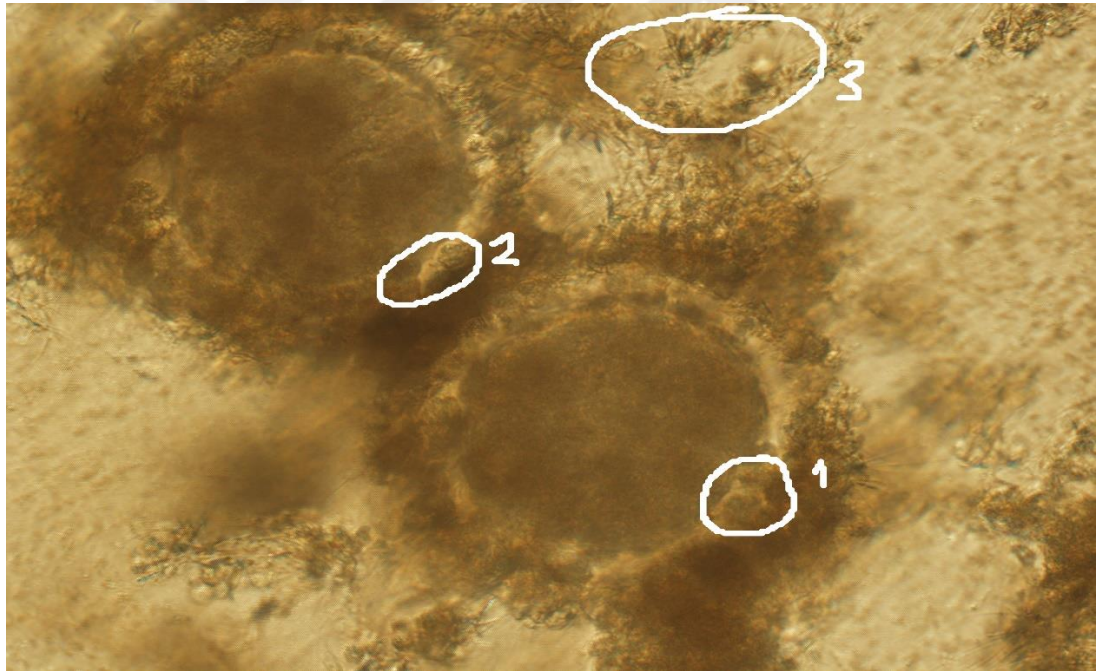
Şekil 3.2. İn vitro maturasyon mikroskop görüntüleri, primer polar body (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D. IVF Laboratuvarı 2019).

3.2. İn Vitro Fertilizasyon Bulguları

İN vitro fertilizasyon için, kullanılan 1210 adet mature oositin 979 (%80,9)'unda fertilizasyonun gerçekleştiği belirlendi. Yaklaşık 12 saatlik bir fertilizasyon süreci sonrasında oosit etrafında sperma hücrelerinin varlığı veya sekonder polar cisimciğin görülmesi fertilize olmuş olarak değerlendirildi. Zigotun embriyo kültür vasatına alınmasından 48 saat sonra yapılan bölünme incelemelerinde, bölünen hücreler fertilizasyonu doğruladı. Fertilizasyon için oositlerin gruplar arasındaki dağılımı ve fertilizasyon oranları çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Fertilizasyona alınan oosit sayıları, fertilizasyon yüzdeleri, dejenere olan oosit oranları ve 48. saatte bölünen hücre sayıları.

	Fertilizasyona alınan oosit sayısı	Fertilize olan zigot sayısı	Fertilizasyon oranları	Fertilize olmayan ve dejenere olan oosit oranı	48. saatte bölünmüş hücre sayısı
Toplam	1210	979	%80,9	%19 (231/1210)	744



Şekil 3.3. İn vitro fertilizasyon mikroskop görüntüleri, sekonder polar body (1,2) ve spermatozoon kalıntıları (3) (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D. IVF Laboratuvarı 2019).

3.3. İn Vitro Kültür Bulguları

Elde edilen 979 zigot; pentoksifilin çalışma grubu (3 mmol; 3,6 mmol; 4 mmol ve kontrol) ve borik asit çalışma grubu (2 ug; 1 ug; 0,04 ug ve kontrol) arasında dağıtıldı. Her grup için kullanılan zigot sayısı çizelge 3.4'te verilmiştir.

Çizelge 3.4. Kültüre alınan zigot sayıları ve gruplar arası dağılımı.

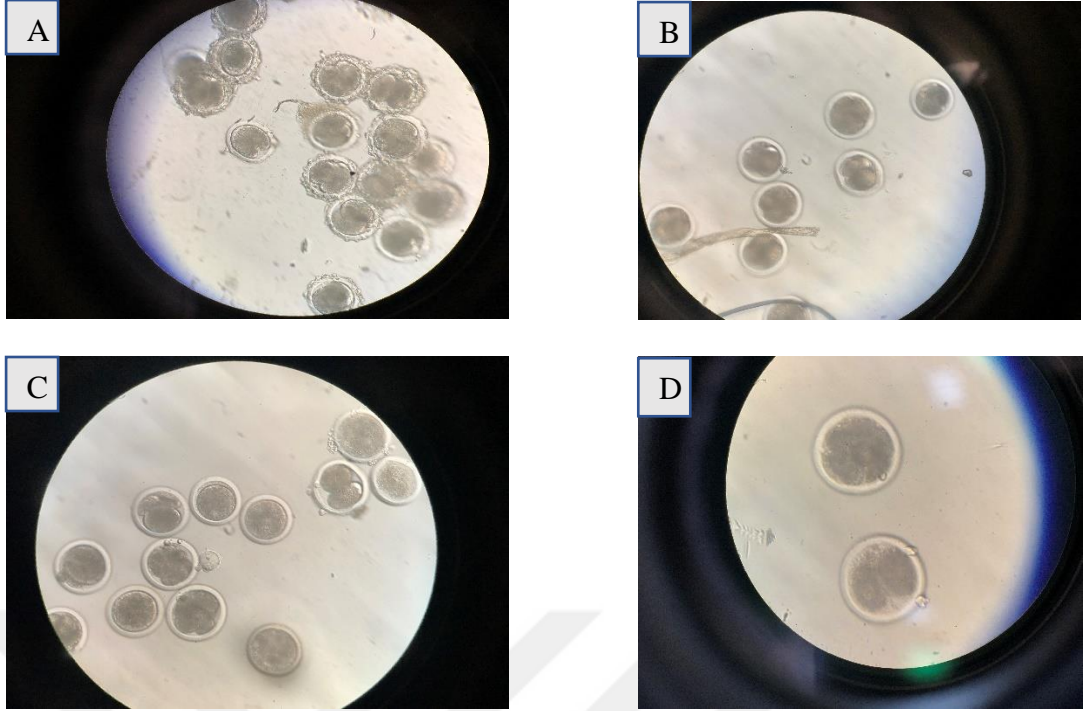
PTX	n	BORİK ASİT	n
1. 3 mmol	123	1. 2 ug	116
2. 3,6 mmol	121	2. 1 ug	112
3. 4 mmol	126	3. 0.04 ug	126
4. Kontrol	135	4. Kontrol	120
Toplam	505	Toplam	474

3.3.1 48. saatteki Bölünme Bulguları

Kültüre alınan zigotların 48. saatte bölünme durumları kontrol edildi. Toplam 744 adet zigotta bölünme gözlemlendi. Bölünen zigotların gruplar arasındaki farklılıkları değerlendirildi. Pentoksifilin grubunda kültüre alınan 505 zigottan 343 tanesinde (%67,92) bölünme gözlenirken, borik asit grubunda 474 adetten 401 tanesinin (%84,59) bölünmüş olduğu gözlemlendi. Toplamda pentoksifilin ve borik asit grubu arasında 48. Saatteki bölünme bulgularında %16,62 oranında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p<0,05$), (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Kültüre alınan zigotların 48. saatte pentoksifilin ve borik asit grubundaki bölünme sayısı ve yüzdelerinin karşılaştırılması.

	Kültüre alınan zigot sayısı (n)	Bölünen zigot sayısı (n)	Bölünme oranı (%)	P-Value
PTX	370	255	%67,92	
BORİK ASİT	354	304	%85,87	
KONTROL	255	185	%72,5	
TOPLAM	979	744	%75,99	
				$p<0,05$



Şekil 3.4. Pentoksifilin grubu (A, B) ve Borik asit grubu (C, D) için 48. saat bölünmelerinin mikroskop görüntüleri (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D. IVF Laboratuvarı 2019).

Pentoksifilin 3 mmol ve 3,6 mmol dozları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Pentoksifilin 3 mmol ve 4 mmol dozları arasında ise istatistiksel olarak %17,69 oranında bir farklılık görüldü ve düşük olan dozda daha fazla bölünme gözlendi. Kontrol grubu ile 3 mmol karşılaştırıldığında ise %11,24'lük bir farkla pentoksifilin ilave edilen grupta daha fazla bölünme olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$). Kontrol grubu ile 4 mmol doz arasında anlamlı farklılık gözlenmedi, 3,6 mmol ile 4 mmol dozları arasında %13,17'lik bir farkla düşük olan pentoksifilin grubunda istatistiksel açıdan daha fazla bölünme belirlendi ($p<0,05$), (Çizelge 3.6).

Borik asitin farklı dozları kendi arasında karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.6. Pentoksifilin grupları arasında 48. saat bölünmelerinin sayısal ve yüzde olarak karşılaştırılması.

	1		2		3		4		5		6	
	3 mmol PTX	3,6 mmol PTX	3 mmol PTX	4 mmol PTX	3 mmol PTX	Kontrol	4 mmol PTX	Kontrol	3,6 mmol PTX	4 mmol PTX	3,6 mmol PTX	Kontrol
Kültüre alınan zigot sayısı (n)	123	121	123	126	123	135	126	135	121	126	121	135
Bölünen zigot sayısı (n)	94	87	94	74	94	88	74	88	87	74	87	88
Bölünme oranı (%)	76,42	71,9	76,42	58,73	76,42	65,18	58,73	65,18	71,9	58,73	71,9	65,18
P-Value	0,416		0,002		0,045		0,282		0,028		0,246	
	4,52		17,69		11,24		6,45		13,17		6,72	

Çizelge 3.7. Borik asitin grupları arasında 48. saat bölünmelerinin sayısal ve yüzde olarak karşılaştırılması

	1		2		3		4		5		6	
	2 ug BOR	1 ug BOR	2 ug BOR	0.04 ug BOR	2 ug BOR	Kontrol	1 ug BOR	0.04 ug BOR	1 ug BOR	Kontrol	0.04 ug BOR	Kontrol
Kültüre alınan zigot sayısı (n)	116	112	116	126	116	120	112	126	112	120	126	120
Bölünen zigot sayısı (n)	99	97	99	108	99	97	97	108	97	97	108	97
Bölünme oranı (%)	85,34	86,6	85,34	85,71	85,34	80,83	86,6	85,71	86,6	80,83	85,71	80,83
P-Value	0,784		0,935		0,354		0,842		0,231		0,305	
	1,26		0,37		4,51		0,89		5,77		4,88	

Çizelge 3.8. Pentoksifilin ve borik asitin grupları arasında 48. saat bölünme farklılıkları

Gruplar	2 ug BOR	1 ug BOR	0.04 ug BOR	3 mmol PTX	3,6 mmol PTX	4 mmol PTX	Kontrol PTX
Kültüre alınan zigot sayısı	116	112	126	123	121	126	255
Bölünen sayı	99	97	108	94	87	74	185
Bölünme oranı	%85,34 ^{ae}	%86,6 ^a	%85,71 ^{ae}	%76,42 ^{be}	%71,9 ^{bd}	%58,73 ^c	%72,54 ^{cd}

^{a-c}: aynı satırda bulunan farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir (p<0,05).

Borik asitin 2 µg uygulama dozu ile pentoksifilin farklı doz grupları karşılaştırıldığında, pentoksifilin 3 mmol'ü ile arasında bir farklılık gözlenmezken 3,6 mmol, 4 mmol ve kontrol grubu arasında farklılık gözlemlendi ($p<0,05$). Borik asitin 1 µg uygulama dozu ile pentoksifilin tüm grupları arasında anlamlı farklılık belirlendi ($p<0,05$). Borik asitin 0,04 µg grubu ile kıyaslandığında pentoksifilin 3 mmol grubu arasında fark gözlenmez iken 3,6 mmol, 4 mmol ve kontrol grubu arasında fark gözlemlendi ($p<0,05$). Borik asitin kontrol grubu ise pentoksifilin 4 mmol ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterirken pentoksifilin 3 mmol ve 3,6 mmol grubu arasında farklılık belirlenmemiştir (Çizelge 3.8).

3.3.2. Yedinci Günde Bölünme ve Kalite Bulguları

Kültüre alınan zigotlar 7. günde incelendiğinde öncelikle embriyo gelişim aşamaları ve sonra embriyoların kaliteleri değerlendirildi. Pentoksifilin grubunda embriyoların gelişimi çoğunlukla 4-8 hücre veya 8-16 hücreler arasında bloklandığı gözlemlendi. Bloklanmayan ve kompakt morula aşamasına geçen embriyolar bu aşamadan sonra gelişimini devam ettiremedi. Kompakt moruluların kalite değerlendirmeleri yapıldığında tüm embriyoların dejenerasyona uğradığı gözlemlendi. Bu embriyolar dejenere embriyo kısmına kayıt edildi. Borik asit grubunda pentoksifilin grubuna göre bloklanmanın daha az olduğu belirlendi. Ancak kompakt morula aşamasına ulaşan embriyoların kalitesi değerlendirildiğinde, embriyoların vasat veya dejenere olduğu gözlemlendi. Elde edilen 137 adet kompakt morulanın sadece 4 adedinin iyi kalitede olduğu gözlemlendi ve iyi kalitede olan bu embriyolar donduruldu. Borik asit grubunda toplam 44 adet blastosist ve 15 adet hatched olmuş embriyo elde edildi. Elde edilen blastosistlerin tümü mükemmel kalitedeydi ve donduruldu. Hatched embriyolar için herhangi bir işlem yapılmadı. Pentoksifilin ve borik asit grubu için embriyoların gelişim aşamaları ve sayıları çizelge 3.9'da verilmiştir.

Pentoksifilin ve borik asit gruplarının 16-32 hücre, kompakt morula ve blastosist oranları arasında karşılaştırılma yapıldı. Borik asit grubu ile pentoksifilin grubu arasında 16-32 hücreli embriyo ve kompakt morula oranlarında bölünme öncesi ve sonrasında önemli bir fark tespit edilemedi. Ancak borik asit grubunun bölünme öncesi ve sonrasında blastosist oranının pentoksifilin grubuna göre oldukça yüksek olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.9. Deneme gruplarında embriyoların gelişim aşamalarının sayısı.

PTX	N	UFO	2-4 hücreli embriyo	4-8 hücreli embriyo	16-32 hücreli embriyo	Kompakt morula	Erken Blastosist	Blastosist	Expanded Blastosist	Dejenere	Hatched
3 mmol PTX	123	29	25	21	19	0	0	0	0	29 (CM)	0
3,6 mmol PTX	126	52	13	22	17	0	0	0	0	22(CM)	0
4 mmol PTX	121	34	20	24	21	0	0	0	0	22(CM)	0
Kontrol	135	47	19	19	16	0	0	0	0	34(CM)	0
Toplam	505	162	77	86	73	0	0	0	0		0
BOR	N	UFO	2-4 hücreli embriyo	4-8 hücreli embriyo	16-32 hücreli embriyo	Kompakt morula	Erken Blastosist	Blastosist	Expanded Blastosist	Dejenere	Hatched
2 ug BOR	116	17	15	16	14	32	4	3	4	7	4
1 ug BOR	112	15	16	15	9	31	1	10	2	9	4
0.04 ug BOR	126	18	11	12	21	41	3	7	1	5	7
Kontrol	120	23	19	16	14	33	3	5	1	6	0
Toplam	474	73	61	59	58	137	11	25	8	27	15

Çizelge 3.10. Deneme gruplarında bulunan 16-32 hücre, kompakt morula ve blastosist oranları ve sayıları.

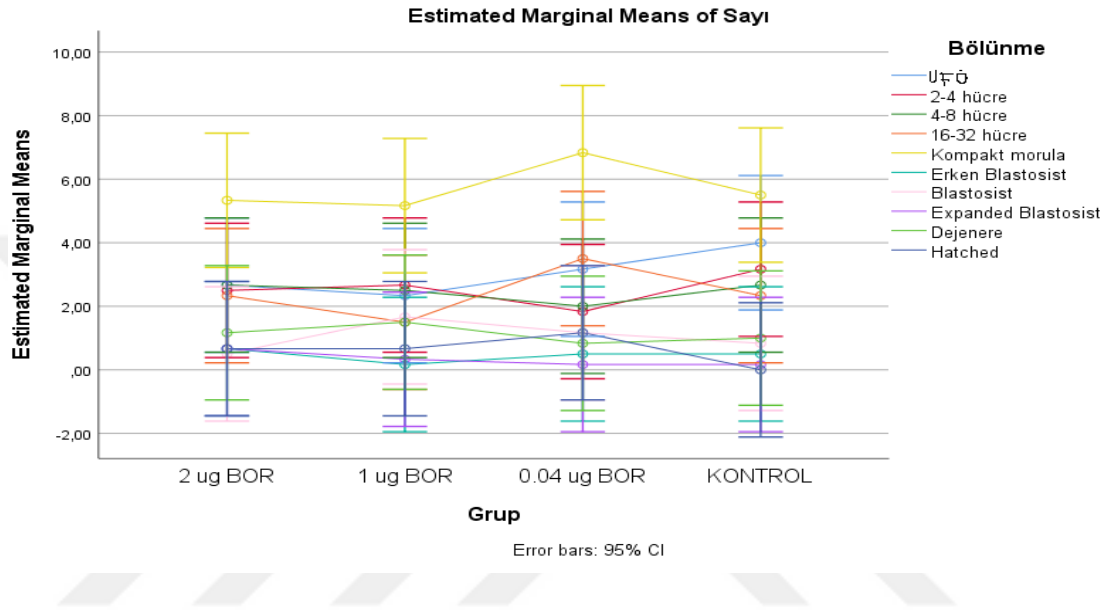
Grup	PTX	Borik asit	Toplam
Kültüre alınan hücre sayısı	505	474	979
Kültüre alınan hücrelerden 16-32 hücreli oranı	%14,45 (73/505)	%12,23 (58/474)	%13,38 (131/979)
Kültüre alınan hücrelerden kompakt morula oranı	%21,18 (107/505)	%28,9 (137/474)	%24,92 244/979
Kültüre alınan hücrelerden blastosist oranı	-	%9,28 (44/401)	%9,28 (44/401)
Bölünmeden sonra 16-32 hücreli oranı	%21,28 (73/343)	%14,46 (58/401)	%17,6 131/744
Bölünmeden sonra kompakt morula oranı	%31,19 (107/343)	%34,16 (137/401)	%32,79 (244/744)
Bölünmeden sonra blastosist oranı	-	%10,97 (44/401)	%10,97 (44/401)

Çizelge 3.11. Pentoksifilin ve borik asit gruplarında doza bağlı olarak morula ve blastosist oranları.

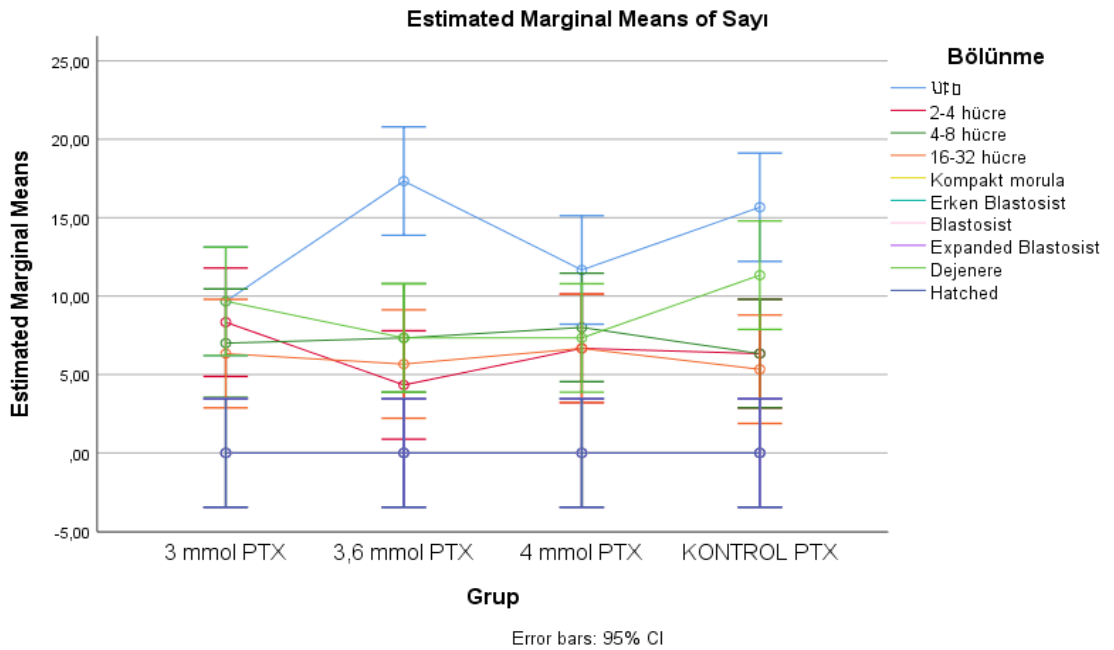
Kültür medyumuna katılan deneme grupları	Oosit sayısı(n)	Morula-blastosist sayısı(n)	Kültüre alınan oositten morula-blastosist oranı (%)	Bölünme aşamasından morula-blastosist oranı (%)
Borik Asit 2 ug	116	47	%40,51 (47/116)	47,47(47/99)
Borik Asit 1 ug	112	48	%42,85 (48/112)	%49,48(48/97)
Borik Asit 0.04 ug	126	59	%46,82 (59/126)	%54,62(59/108)
Borik Asit Kontrol	120	42	%35 (42/120)	%43,29(42/97)
Pentoksifilin 3 mmol	123	29	%23,57 (29/123)	%30,85(29/94)
Pentoksifilin 3,6 mmol	126	22	%17,46 (22/126)	%29,72(22/74)
Pentoksifilin 4 mmol	121	22	%18,18 (22/121)	%25,28(22/87)
Pentoksifilin Kontrol	135	24	%17,77 (24/135)	%27,27(24/88)

Pentoksifilin ve borik asit deneme gruplarında doza bağlı olarak morula ve blastosist oranları arasında farklılık gözlemlendi. Her iki grupta da en düşük uygulama dozunda en yüksek oranda morula ve blastosist elde edildi (Çizelge 3.11). Şekil 3.4’de elde edilen ebriyoların görüntüsü verilmiştir.

Çizelge 3.12. Borik asit deneme grubunda embriyo gelişim aşamalarının doza bağlı minimum ve maksimum sayı değerleri grafiği.



Çizelge 3.13. Pentoksifilin deneme grubunda embriyo gelişim aşamalarının doza bağlı minimum ve maksimum sayı değerleri grafiği.

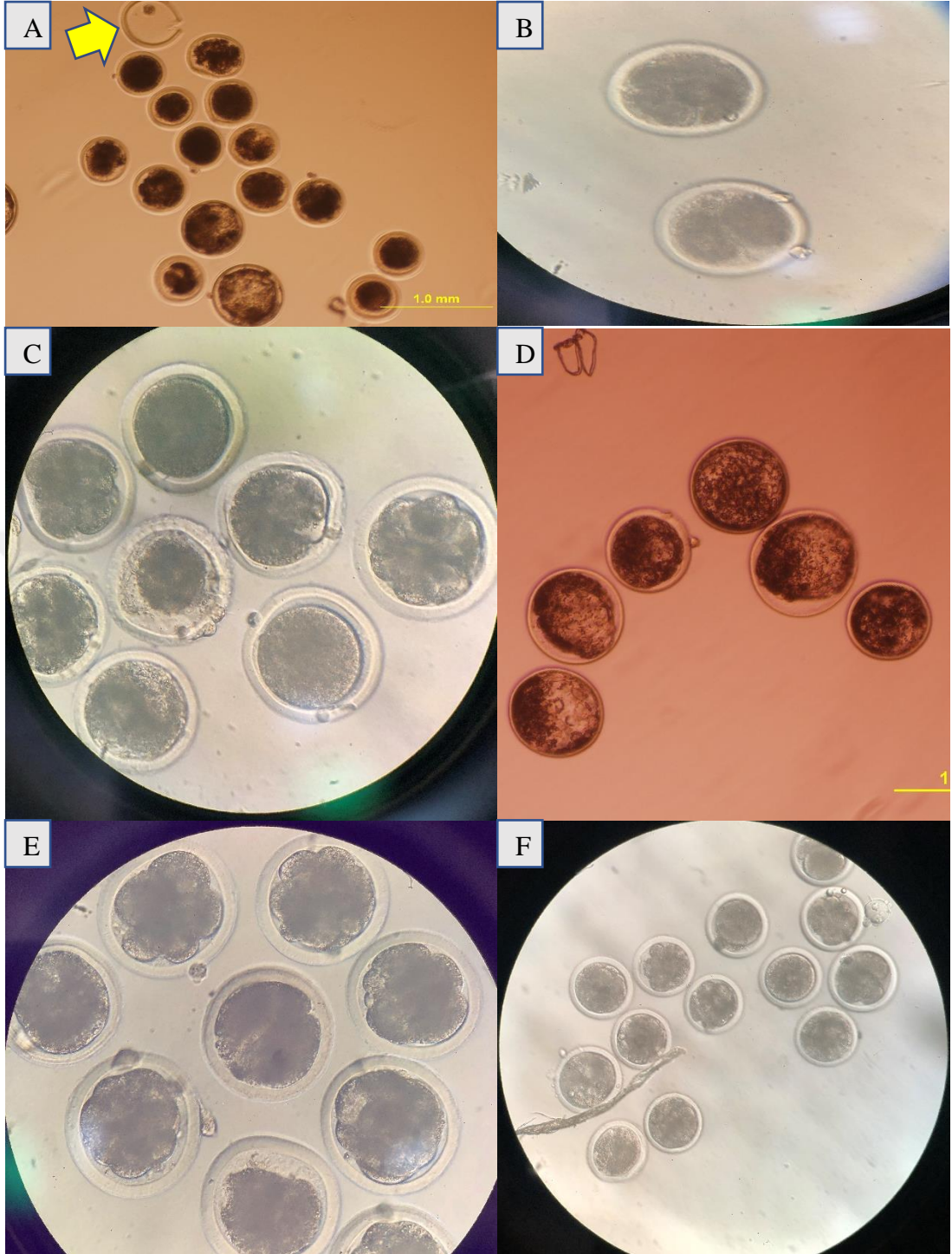


Çizelge 3.14. Borik asit deneme grubunda embriyo gelişim aşamalarının doza bağlı minimum ve maksimum sayı değerleri.

	2 ug BOR		1 ug BOR		0,04 ug BOR		KONTROL		TOTAL	
	Ort±SEM	Median(Min-Mak)	Ort±SEM	Median(Min-Mak)	Ort±SEM	Median(Min-Mak)	Ort±SEM	Median(Min-Mak)	Ort±SEM	Median(Min-Mak)
UFO	2,66±0,92	2(1-7)	2,33±0,84	2,5(0-5)	3,16±1,25	2(1-9)	4,00±1,00	3,0(2-8)	3,04±0,49	2,5(0-9)
2-4 Hücre	2,5±0,71	2,5(0-5)	2,66±0,42	2,7(2-4)	1,83±0,40	1,8(1-3)	3,16±0,98	2,4(2-8)	2,54±0,32	2,4(2-8)
4-8 Hücre	2,66±0,66	2,8(0-4)	2,5±0,88	2,00(0-6)	2,00±0,57	2,00(0-4)	2,66±0,84	2,5(0-5)	2,45±0,35	2,3(0-6)
16-32 Hücre	2,33±0,91	2,3(0-6)	1,50±0,61	1,33(0-4)	3,50±1,23	3,00(0-8)	2,33±0,71	2,3(0-5)	2,41±0,44	2,2(0-8)
Kompakt Morula	5,33±2,33	4,5(0-15)	5,16±2,22	4,0(0-15)	6,83±2,84	4,5(0-16)	5,50±2,29	3,5(0-13)	5,70±1,14	4,0(0-16)
Erken Blastosist	0,66±0,66	0,7(0-4)	0,16±0,16	1,7(0-1)	0,50±0,50	0,5(0-3)	0,50±0,50	0,5(0-3)	0,45±0,23	2(0-4)
Blastosist	0,50±0,34	4(0-2)	1,66±1,66	1,7(0-10)	1,16±0,83	0,8(0-5)	0,83±0,83	0,83(0-5)	1,04±0,49	0,3(0-10)
Expanded Blastosist	0,66±0,66	0,7(0-4)	0,33±0,33	0,3(0-2)	0,16±0,16	0,16(0-1)	0,16±0,16	0,16(0-1)	0,33±0,18	0,18(0-4)
Hatched	0,66±0,66	0,7(0-4)	0,66±0,66	0,7(0-4)	0,16±0,16	0,16(0-7)	0	0	0,62±0,36	0,5(0-7)

Çizelge 3.15. Pentoksifilin deneme grubunda embriyo gelişim aşamalarının doza bağlı minimum ve maksimum sayı değerleri.

	3 mmol Pentoksifilin		3,6 mmol Pentoksifilin		4 mmol Pentoksifilin		KONTROL		TOTAL	
	Ort±SEM	Median(Min-Mak)	Ort±SEM	Median(Min-Mak)	Ort±SEM	Median(Min-Mak)	Ort±SEM	Median(Min-Mak)	Ort±SEM	Median(Min-Mak)
UFO	9,66±0,33	9,7(9-10)	17,33±2,02	17(14-21)	11,66±1,33	11,7(9-13)	15,66±0,33	15,7(15-16)	13,58±1,06	13,7(9-21)
2-4 Hücre	8,33±1,45	8,0(6-11)	4,33±2,02	4,0(1-8)	6,66±1,33	6,66(4-8)	6,33±1,45	6,0(4-9)	6,41±0,80	6,66(1-11)
4-8 Hücre	7,00±3,05	5,0(3-13)	7,33±2,84	5,0(4-13)	8,00±3,78	7,00(2-15)	6,33±3,38	4,0(2-13)	7,16±1,41	5,00(2-15)
16-32 Hücre	6,33±4,84	2,00(1-16)	5,66±4,25	3,0(0-14)	6,66±2,72	5,0(3-12)	5,33±1,45	5,0(3-8)	6,00±1,53	4,2(0-16)
Kompakt Morula	9,66±1,20	9,0(8-12)	7,33±0,88	7,0(6-9)	7,33±1,45	7,0(5-10)	11,33±2,40	10,0(8-16)	8,91±0,84	8,5(5-16)
Erken Blastosist	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Blastosist	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Expanded Blastosist	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hatched	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



Şekil 3.4. Borik asit grubu hatched embriyo (A), borik asit grubu morula-blastosist (D, E), Pentoksifilin grubu embriyoları (B, C, F) (Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji A.D. IVF Laboratuvarı 2019).

4. TARTIŞMA

Ülkemizde sığırlarda yapılan mevcut birçok in vitro fertilizasyon çalışması bulunmaktadır. Yapılan çalışmaların çoğu, in vitro embriyo üretimini ve kalitesini arttırmaya yöneliktir. Çünkü in vitro fertilizasyon çalışmalarında, in vivo çalışmalara göre embriyo zor elde edildiği için başarı oranı daha düşüktür. Embriyo üretimi başarısını arttırmaya yönelik kültür ortamına bazı katkı maddelerinin ilavesi denenmektedir. Bunların başında da en çok embriyo kültür vasatına antioksidan ilaveleri yer almaktadır. Çünkü embriyo gelişimi sırasında kültür ortamında bazı metabolik ve enzimatik reaksiyonlar gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonlar sırasında sürekli olarak serbest oksijen radikalleri oluşmaktadır. Normal fizyolojik ortamların tam taklit edilememesi nedeniyle açığa çıkan serbest oksijen radikallerinin fazlası tolere edilememektedir. Bu aşamada embriyo kültür sistemlerine antioksidan ilavesi yapılarak mevcut serbest oksijen radikallerinin etkisini azaltmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Sunulan doktora tez çalışmasında da embriyo kültür sistemine birer antioksidan olan ve insan hekimliğinde sıkça kullanılan borik asit ve pentoksifilin farklı dozlarının ilavesi denenmiştir. Bu uygulama ile in vitro embriyo kültür sistemlerinde meydana gelen oksidatif stres problemlerine yönelik çözüm bulunması amaçlanmıştır.

İn vitro embriyo kültür sistemlerinin ilk adımını ovaryumlardan oosit elde edilmesi oluşturmaktadır. Bunun için de en çok tercih edilen ve en klasik yöntemin aspirasyon tekniği olduğu bilinmektedir. Aspirasyon tekniği diğer yöntemlere kıyasla daha hızlı uygulanabilir olması nedeniyle daha çok tercih edilmektedir. Aspirasyon tekniği ile folliküllerden oositlerin yalnızca %30-60'ı elde edilebilmektedir (Gordon 2004, Pandey ve ark 2009, Zarcu ve ark 2012, Ahmed ve ark 2015).

Yapılan bu tez çalışmasında ovaryum üzerindeki 2-8 mm büyüklüğündeki folliküller aspire edildi ve toplamda ovaryum başına 5,73 oranında oosit elde edildi. Elde edilen oositlerin 4,19 adetinin kaliteli kullanılabilir oosit (A-B kalite) olduğu belirlendi. Toplamda %73,07 oranında kaliteli oosit elde edildi. Hashimoto ve ark (2000) yaptıkları bir çalışmada ovaryum başına $13,9 \pm 2,3$ adet oosit elde ettiklerini ve bunların $6,8 \pm 1,5$ adedinin kullanılabilir kalitede oosit olduğunu bildirmişlerdir. Ahmed ve ark (2015) ovaryum başına 3,54 adet oosit elde etmişler ve bunların 2,33 (%65,79) oranında kullanılabilir kalitede oosit olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca

Korkmaz ve ark (2013) ise aspire edilen oositlerin kalitelerine göre maturasyon başarılarını değerlendirmişlerdir. Çalışma sırasında aspirasyon yöntemi ile %66,39 oranında kaliteli oosit elde etmişlerdir. Gordon (1994) ovaryum başına ortalama 5-8 arasında kullanılabilir oosit elde edildiğini bildirmektedir. Sunulan tez çalışmasında elde edilen kullanılabilir oosit sayısının verilen literatür bilgileri ile benzerlik gösterdiği görülmektedir. Yapılan çalışmalar arasında ovaryum başına elde edilen oosit sayısı ve kullanılabilir oosit oranları farklılık göstermektedir. Uygulamalar arasında farklılık olmasının nedenleri arasında; mezbaha materyali kullanılıyor olması, kesilen hayvanların kondisyon ve verim özelliklerinin uygulamalar arasında farklılık göstermesi ve aspirasyonu yapan kişilerin farklı olması yer almaktadır.

Sunulan tez çalışmasında %87,42 (1210/1384) oranında maturasyon elde edilmiştir. Ortalama maturasyon yüzdesi %87,42 olarak belirlendi. Akyol ve ark (2007) yaptıkları bir sığır in vitro fertilizasyon çalışmasında A-B kalite oosit kullanarak %92 oranında maturasyon elde etmişlerdir. Zhang ve ark (1995) oosit kalitelerinin blastosist gelişim aşamalarına etkisini araştırdıkları bir çalışmada %93-96 oranında maturasyon elde etmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlar daha önce yapılan bu çalışmalar ile uyumluluk göstermiştir. Güler (2018) oositlere uygulanan farklı dondurma çözündürme işlemlerinin maturasyon oranına etkisini araştırdıkları bir tez çalışmasında kontrol grubunda %96 oranında maturasyon elde ettiklerini bildirmiştir. Yapılan benzer bir çalışmada %94,1 ± 1,1 oranında maturasyon başarıları sağlamıştır (Faheem ve ark 2011). Daha önce yapılan bu çalışmalarda, sunulan tez çalışmasından daha yüksek oranda maturasyon başarıları sağlanmıştır. Zhao ve ark (2017) ise lipopolisakkaritlerin maturasyon oranına etkisini araştırdıkları bir çalışmada kontrol grubunda %85,67 ± 2,73 oranında, deneme gruplarında ise bundan daha da düşük oranda başarı elde etmiştir. Küplülü ve Ün (2001) follikül büyüklüklerinin maturasyon oranına etkisini araştırmış ve %61-%74 arasında maturasyon elde etmiştir. Topuzoğlu (2011) sığır oositlerinin maturasyon oranına büyüme faktörlerinin etkisini araştırdığı bir çalışmasında %63,33-%73,33 oranında başarı sağlamıştır. Yapılan bu çalışmalarda sunulan tez çalışmasına göre maturasyon başarılarının daha düşük olduğu görülmektedir. Maturasyon oranlarındaki bu farklı sonuçlar birçok faktörden kaynaklanabilmektedir. Bunlar arasında; oosit kalitesi, maturasyon ortamı, aspire edilen folliküllerin büyüklüğü, maturasyon solüsyonunun içeriği, oosit elde etme tekniği, maturasyon vasatına eklenen katkı maddeleri ve oosit vericisinin özellikleri

gibi faktörler yer almaktadır (Kaymaz 2012). Yaptığımız tez çalışmasında diğer çalışmalardan farklı sonuçlar elde edilmesinin sebebi olarak, kullanılan maturasyon vasatının ve oosit vericilerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Araştırmamızda toplam fertilizasyon oranı ortalama %80,9 (979/1210) olarak belirlendi (Çizelge 3.3). Literatürlerde optimum şartların sağlanması durumunda %60-90 arasında fertilizasyon sağlanabileceği belirtilmektedir (Gordon 2003). Sağırkaya ve ark (2003) fetal calf serum (FCS) ve syntehtic serum substitute (SSS) kullanımının fertilizasyon oranları üzerine etkisini araştırmış ve %73,7 oranında fertilizasyon elde etmiştir. Zi ve ark (2008) farklı ırk boğaların spermalarını kullanarak fertilizasyon oranlarını karşılaştırmış ve yaptıkları çalışma gruplarında %77,8 ve %65,9 oranında fertilizasyon elde ettiklerini ifade etmektedirler. Al Naib ve ark (2011) yüksek ve düşük fertiliteli boğa spermalarının in vitro koşullarda fertilizasyon oranına etkisini araştırdıkları çalışmada %76,7 ve %55,3 oranında fertilizasyon sağlamışlardır. Sanjaya ve Hasbi (2019) ise Bali ineklerinde yaptıkları in vitro fertilizasyon çalışmasında %55,54-%70,03 oranında fertilizasyon elde etmişlerdir. Bu tez çalışmasında elde edilen fertilizasyon oranlarının daha önce yapılan çalışmalara göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Elde edilen yüksek fertilizasyon oranları; farklı fertilizasyon vasatlarının kullanılmasından kullanılan spermanın kalitesi, sperm hazırlama tekniklerinin farklı olması, sperma motilitelerinin farklı olması ve fertilizasyon ortamındaki farklılıklardan dolayı olabileceği düşünüldü. Çalışmamızda fertilizasyon oranlarına bakıldığında fertilizasyon açısından kullanılan teknik ve materyaller ile optimal başarı sağlanabileceğini göstermektedir.

Borik asit grubunun, farklı doz kullanılan alt gruplarının kontrol grubu ile kıyaslanmasında gruplar arasında istatistiki bir farklılık gözlenmedi (Çizelge 3.7). Bulgular kültür vasatlarına bor ilavesinin ilk 48 saat bölünmelerine katkı sağlamadığını ancak daha ileri bölünme aşamalarında etki ettiğini göstermektedir. Ancak pentoksifilin grubunda, alt gruplar arasında grup içi farklılıklar belirlendi. Pentoksifilin daha önce hiçbir sığır in vitro embriyo çalışmasında kullanılmamıştır. Bundan dolayı kullanılan pentoksifilin dozları daha önce yapılan spermatazoon çalışmalarına göre uyarlanmıştır (Khalili ve ark 2017). Pentoksifilin 1.grubu (3 mmol) diğer gruplarla karşılaştırıldığında 2. grup (3,6 mmol) ile arasında farklılık gözlenmez iken, 3. grup (4 mmol) ve 4. grup (Kontrol) ile arasında istatistiksel olarak

anlamli bir farklılık gözlemlendi ($p < 0,05$). Farklı doz kullanılan grupların birbirleri ile karşılaştırılmasında ise 2 ve 3. gruplar arasında istatistiksel anlamda bir farklılık gözlemlendi ($p < 0,05$), fakat diğer grupların kontrol grubu ile arasında bir farklılık gözlemlenmedi (Çizelge 3.6). Elde edilen sonuçlar embriyo kültür vasatına 3 ve 3,6 mmol pentoksifilin ilavesinin fayda sağladığını, ancak 4 mmol pentoksifilin ilavesinin kontrol grubuna göre bir farklılık oluşturmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar da pentoksifilin ilavesinin doza bağlı olarak bölünmeye katkı sağlandığını ortaya koymaktadır. Ayrıca embriyo kültür vasatlarına 3,6 mmol'den fazla PTX ilavesinin bölünmelere katkı sağlamadığını söylemek mümkündür. PTX özellikle mikrosirkülasyonda etkili olmakla birlikte antiinflamatuvar, antiproliferatif, antifibrotik, antiapoptotik, immunmodülatör ve antioksidan etkileri bulunmaktadır (Lanoue ve ark 1998, Çakmak ve ark 2012, Amber 2014, İnce ve ark 2016). Bu durum PTX'in antiproliferatif etkisinin bu dozlarda ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmada 48. saat bölünme bulguları, pentoksifilin ve borik asitin farklı dozlar kullanılarak oluşturulan alt grupları arasında da karşılaştırılmasında (Çizelge 3.8) borik asit alt gruplarının pentoksifilin alt gruplarına göre daha fazla bölündüğü gözlemlendi. Bu durum borik asitin embriyo kültürüne ilavesinin pentoksifiline göre daha başarılı olduğunu gösterdi.

Yapılan çalışmada borik asit ve pentoksifilin gruplarında kültüre bırakılan zigotların bölünme öncesi ve sonrası gelişim durumları incelendiğinde sırasıyla; 16-32 hücreli oranları %26,68- %35,74, kompakt morula oranları %50,08-%65,35 ve blastosist oranları %9,28-%10,97 olarak belirlendi. Pentoksifilin ve borik asit grubu birbiri ile karşılaştırıldığında embriyo gelişim aşamalarının çoğu birbirleri ile benzerlik gösterirken, blastosist oranlarında anlamlı bir farklılık gözlemlendi ($p < 0,05$). Borik asit grubunda %10,97 oranında blastosist elde edilirken, pentoksifilin grubunda hiç elde edilemedi (Çizelge 3.10). Ayrıca yapılan çalışmada embriyo gelişim aşamaları doza bağlı olarak farklılık gösterdi. Borik asit grubuna en düşük konsantrasyon (0.04 ug) ilavesi ile en yüksek oranda %54,62 morula ve blastosist elde edilmiş olup, doz arttıkça morula ve blastosist oranında azalma görüldü. Pentoksifilin grubunda da aynı şekilde en düşük konsantrasyonda %30,85 oranında morula ve blastosist oranı elde edilirken, doz artımına bağlı olarak bu oranda da azalma gözlemlendi (Çizelge 3.11). Bu durum antioksidanların embriyo kültür vasatlarına ilavesinin doza bağlı olarak etki ettiğini göstermektedir. Thiyagarajan ve Valivittan (2009), antioksidan ilavesinde

beklenen etkinin doza ilişkili olduğu hipotezini destekler niteliktedir. Ayrıca borik asit grubunda tüm uygulama dozlarında kontrol grubuna göre daha yüksek oranda bölünme elde edilmiş olması borik asitin embriyo kültür vasatına ilavesinin başarılı olduğunu gösterir niteliktedir. Pentoksifilin grubunda ise, en yüksek uygulama dozunda (4 mmol) kontrol grubuna göre daha düşük bölünme elde edilmesi doz artışına bağlı olarak pentoksifilin zararlı etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda sığır in vitro kültür vasatına borik asit ve pentoksifilin ilavesi denenmemiştir. Bundan dolayı çalışma dozları genellikle daha önce yapılan farklı hayvan uygulamalarına göre belirlenmiştir. Pentoksifilin ve borik asit grupları bölünme oranları arasındaki farklılığın sebebi olarak da oositlerin farklı hayvanlardan elde edilmiş olması düşünülmekte ve elde edilen sonuçlar yapılan benzer çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir (Karaşahin 2015). Yapılan bazı çalışmalar embriyo kültür vasatlarına dışarıdan farklı bir antioksidanın ilavesi yapılarak embriyo gelişimine katkıda bulunabileceğini söylerken, bazı çalışmalar ise herhangi bir değişiklik gözlenmediğini bildirmektedir (Feugang ve ark 2003, Feugang ve ark 2004, Hosseini ve ark 2009, Loren ve ark 2017). Jeong ve ark (2006) yaptıkları bir çalışmada, embriyo kültür vasatına α -tokoferol ilavesi yaparak daha çok blastosist elde ettiklerini bildirmişlerdir. Thiyagarajan ve Valivittan (2009) yaptıkları bir çalışmada ise embriyo kültür vasatına vitamin-E'nin farklı dozlarını ilave etmişlerdir. Çalışma sonucunda doza bağlı olarak embriyo kültür vasatında oksidatif stresin azaldığı ve blastosist elde etme oranının arttığı bildirilmiştir. Benzer bir şekilde Natarajan (2010) α -tokoferol ile yaptığı bir koyun embriyo çalışmasında doza bağlı olarak blastosist elde etme oranlarının değiştiğini ve antioksidan ilavesinin bu oranları arttırdığını bildirmiştir.

Borik asitin embriyonik gelişim için gerekli olduğu ve borik asit ile yetersiz beslenen canlılarda embriyonik kayıpların meydana geldiği daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir (Eckhart 1998, Nielsen 2000). Borik asitin iyi bir antioksidan olduğunun bilinmesi ve yapılan bu çalışmalar sonucunda, borik asitin embriyo kültür vasatına ilavesinin katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

Kandi ve ark (2009) yaptıkları bir çalışmada farelerde in vitro kültür vasatına borik asitin farklı dozlarının ilavesini denedikleri çalışma sonucunda doza bağlı olarak

blastosist oranlarında farklılık ve artış gözlenmiştir. 7. günde elde edilen morula ve blastosist gelişim oranları yapılan tez çalışması ile uyumluluk göstermektedir.

Pentoksifilin ile yapılan birçok sperma çalışması mevcuttur. Çalışmaların çoğu pentoksifilin antioksidan özelliğinden faydalanmaya yönelik yapılmıştır. Numabe ve ark (2001) yaptıkları bir çalışmada, fertilizasyon öncesi pentoksifilin ile muamele görmüş spermanın fertilizasyon oranının (%81) kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğunu bildirmiştir. Ayrıca fertilizasyon sonrası oositlerden blastosist elde etme oranının arttığını da bildirmiştir. Tournaye ve ark (1995) insanlarda yaptıkları benzer bir çalışmada yine pentoksifilin ile muamele edilen spermatoozonlardan yüksek oranda fertilizasyon elde ettiklerini ve gebelik oranlarının arttığını bildirmişlerdir. Natadisastra ve ark (2015) insanlarda tüp bebek öncesi endometriyuma pentoksifilin ve tokoferol uygulaması yapmıştır. Uygulama sonucunda elde edilen gebelik oranlarının arttığını bildirmişlerdir.

Yapılan tez çalışmasında embriyoların çoğunlukla 8-16 hücreli aşamada bloklandığı ve dejenere olduğu gözlemlendi. Verilen literatür bilgilerine göre de sığır embriyolarının en çok 8-16 hücreli aşamada bloklandığı bildirilmektedir (Gordon 2003, Meirelles ve ark 2004). Meydana gelen bloklanmaların birçok sebebinin olabileceği düşünülmekle birlikte en büyük faktörün maternal mRNA yetersizliği, oositin sitoplazmik maturasyonu sırasında meydana gelen organel kayıpları ve sitoplazma kalitesine bağlı olduğu bildirilmektedir. Bu nedenle, in vitro ortamda sığır zigotu tüm mRNA'yı ve proteinleri barındırmasına rağmen bir anda hücre döngüsü içinde gelişmesini sonlandırdığı bildirilmektedir. Bu durumda, oosit gelişiminde farklı proteinlerin rol aldığını ve bunların eksiklikleri durumunda gelişimde de yetersizlik olduğu bilinmektedir. Ayrıca gen aktarımı sırasında yetersiz sitoplazmanın eksik proteinlerden dolayı apoptozis mekanizmasına karşı bir savunma geliştiremediği söylenmektedir. (Memili ve First 2000, Lequarre ve ark 2003). İlk hücre döngüsünün uzunluğu; oosit kalitesi, sperm kalitesi, IVF kurallarına ve kültür ortamına göre değişiklik göstermektedir (Meirelles ve ark 2004). Yapılan bu tez çalışmasında embriyonal gelişim sırasında blok ile karşılaşılmasının sebebi olarak, elde edilen oositlerin maternal kaynaklarının yetersizliğinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmada mezbaha materyali kullanılıyor olması, kesilen hayvanların bilgisine ulaşılamaması ve reforme hayvanların kesim için kullanılmış

olması elde edilen oositlerin genomik olarak yeterli kaliteye sahip olmadığını düşündürmektedir.

Uygulanan çalışmada pentoksifilin grubunda borik asit grubuna göre daha çok bloklanma ile karşılaşıldı. Bunun sebebi olarak pentoksifilin antiproliferatif etkisinden kaynaklanabileceği düşünüldü. Bloklanmayarak embriyonal gelişimini tamamlayan, morula ve blastosist aşamasına ulaşan embriyoların kalite değerlendirmeleri yapıldı. Blastosist aşamasında olan bütün embriyolar mükemmel kalite olmasına rağmen morula aşamasındaki embriyoların büyük bir çoğunluğunun dejenerasyona uğradığı gözlemlendi. Başar ve Soysal (2019) erken dönemde oositin pentoksifilin ile muamelesinin dejenerasyona neden olduğunu ancak fertilizasyon aşamasında pentoksifilin muamelesinin blastosist oranında ve gebeliklerde artış sağladığını bildirmektedir. Bu durum ve elde edilen sonuçlar embriyo kültür vasatına erken dönemde pentoksifilin ilavesinin dejenerasyona neden olabileceğini ve pentoksifilin kültür aşamasından daha önce kullanılması gerektiğini göstermektedir. Ancak borik asitin embriyo kültür aşaması sırasında ilave edilmesinin, doza bağlı olarak katkı sağladığı görüldü. Ayrıca yapılan bazı çalışmalar embriyo kültür vasatına ilk 72 saat herhangi bir ilave yapılmaması gerektiğini, 16-32 hücreli embriyo aşamasından sonra supplement ilavesi yapılmasını tavsiye etmektedir. Erken embriyonik gelişim aşamasında enerji kaynağı olarak piruvat, laktat ve glutamin kullanılmaktadır. Erken dönemde glikoz, fosfofruktokinaz enzim aktivesinin olmamasından dolayı kullanılmamaktadır ve bu dönemde glikoz ilavesi embriyonik gelişimde hasara neden olmaktadır (Kobayashi 2007). Bu durum antioksidan ilavelerinin erken dönemde dikkatli yapılması gerektiğini düşündürmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Son dönemlerde sığırlarda yapılan biyoteknoloji çalışmaları oldukça artmıştır. Yapılan biyoteknoloji çalışmalarının tümünün ortak hedefi daha fazla ve yüksek verimli hayvanlar elde edebilmektir. Bu alanda yapılan çalışmaların bir adımını da in vitro embriyo çalışmaları oluşturmaktadır. In vitro embriyo çalışmaları, özellikle elden çıkması gereken ve yüksek genetik özelliklere sahip hayvanlardan tekrar yavru alabilmeyi amaçlamaktadır. Ancak in vitro embriyo üretimi uygulaması zor ve başarı oranı düşük bir tekniktir. Bu nedenden dolayı bu alanda yapılan çalışmalar, in vitro embriyo üretiminde başarı oranını yükseltmeye yöneliktir. Sunulan bu tez çalışmasında da embriyo kültür vasatına antioksidan ilavesi yapılarak oksidatif stresi azaltmak, elde edilen embriyo sayısını ve kalitesini artırmak amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda;

- İlave edilen antioksidanların (pentoksifilin ve borik asit) embriyo elde etme oranında istatistiksel açıdan bir artışa neden olmamasına rağmen, çalışma gruplarında sayısal olarak kontrol grubundan daha fazla embriyo elde edilmiştir.
- Çalışmada 330 ovaryumdan 1894 adet oosit elde edildi ve ovaryum başına ortalama 5,73 adet oosit düştüğü belirlendi.
- Çalışmada kullanılan 1384 oositte %87,4 oranında maturasyon elde edildi.
- Çalışmada toplamda %80,9 oranında fertilizasyon sağlandı.
- Borik asit, pentoksifilin ve kontrol grubu için bölünme oranları sırasıyla; %85,87, %67,92 ve %72,5 olarak belirlendi.
- Pentoksifilin grubunda bölünmeden sonra %31,19, borik asit grubunda ise %34,16 oranında kompakt morula elde edildi. Blastosist ise pentoksifilin grubunda hiç elde edilemedi, borik asit grubunda ise %10,97 oranında elde edildi.
- Bölünme sonrası her iki grupta da (pentoksifilinin 4 mmol'ü) hariç kontrol gruplarından daha yüksek oranda morula-blastosist elde edildi. En yüksek morula-blastosist borik asitin 0.04 uygulama dozunda elde edildi. Embriyo gelişim aşamalarının ve kalitelerinin ilave edilen antioksidanların dozuna bağlı olarak değiştiği belirlendi.

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda in vitro fertilizasyon çalışmalarında mezbaha materyali kullanımında elde edilen ovaryum kaynağının çoğunlukla problemlili olması dezavantaj oluşturmaktadır. Kullanılan oositlerin genetik ve karakteristik özellikleri tanımlanamamaktadır. Bu durum da başarı oranında düşüşe neden olmaktadır. İn vitro fertilizasyonda bugüne kadar yapılan çalışmalarda kültür ortamında ovidukt ortamının taklit edilememesinden kaynaklı problemler yaşanmaktadır. Yapılan çalışmalar kültür ortamını ovidukt sıvısına en yakın ortamı oluşturabilmek için yapılmaktadır. Böylelikle elde edilen blastosist oranını artırmak hedeflenmektedir. Yapılan bu çalışma sonucunda da kültür ortamına antioksidan ilavesinin oksidatif stresi azaltarak embriyo gelişimine katkı sağladığı düşünülmektedir. Ancak çalışma sonucunda kullanılan supplementlerin dozunun embriyo gelişimi üzerine etkili olduğu ve yüksek oranda kullanımlarının olumsuzluklar doğurabileceği gözlemlendi. Başarı oranının yükseltilmesi için bu alanda daha fazla çalışma yapılması gerektiği ve farklı antioksidanların doza bağlı olarak in vitro kültür ortamına ilavesinin embriyo gelişimine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Adona PR, Pires PRL, Quetglas MD, Schwarz KRL, & Leal CLV, 2008. Prematuration of bovine oocytes with butyrolactone I: effects on meiosis progression, cytoskeleton, organelle distribution and embryo development. *Anim Reprod Sci*, 108(1-2), 49-65.
- Aerts JM, Bols PE, 2008. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim*, 45,171-9.
- Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, & Gupta S, 2012. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproduction biology and endocrinology*, 10(1), 49.
- Ahmed JA, Dutta D, & Nashiruddullah N, 2015. Recovery of different cumulus oocyte complex (COC) grades from bovine ovaries by aspiration method. *J Ani Res*, 5(3), 631.
- Akyol N, Kızıl SH, & Karaşahin T, 2007. İn vitro sığır embriyosu üretim ve transferi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47(1), 1-8.
- Akyol N, Kızıl SH, Karaşahin T, 2007. İn vitro sığır embriyosu üretim ve transferi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47, 1-8.
- Al Naib, A, Hanrahan JP, Lonergan P, & Fair S, 2011. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriogenology*, 76(1), 161-7.
- Alexander V, 2012. Oocytes and their Maturation. *Genetics & Reproduction, Animal Production Research Centre School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, LE12 5RD, UK: p. 115-40.*
- Ali AA, Bilodeau JF, & Sirard MA, 2003. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59(3-4), 939-49.
- Amber KT, Shiman MI, Badiavas EV, 2014. The use of antioxidants in radiotherapy-induced skin toxicity. *Integr Cancer Ther*, 13, 1, 38-45.
- Arat S, Caputcu AT, Cevik M, Akkoc T, Cetinkaya G, & Bagis H, 2016. Effect of growth factors on oocyte maturation and allocations of inner cell mass and trophectoderm cells of cloned bovine embryos. *Zygote*, 24(4), 554-62.
- Armstrong TA, Spears JW, Lloyd KE, 2001. Inflammatory response, growth, and thyroid hormone concentrations are affected by long-term boron supplementation in gilts. *Journal of animal science*. 79, 6, 1549-56.
- Assey RJ, Hyttel P, Greve T, Purwantara B, 1994. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol Reprod Dev*, 37,335-44.
- Austin CR, & Bishop MWH, 1957. Fertilization in mammals. *Biological Reviews*, 32(3), 296-48.
- Başar MM, & Soysal E, 2019. Sperm motilite bozukluklarına güncel yaklaşım. *Androl Bul*, 21, 22-31 <https://doi.org/10.24898/tandro.2019.70883>
- Başkurt M, Küçüköğlü MS, 2010. Pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde prostanoidler. *Anadolu Kardiyol Derg*, 10, 2, 2-8.
- Bearden HJ, Fuquay JW, 1992. *Applied animal reproduction*. 3rd Ed. Prentice Hall Career and Technology. New Jersey.

- Besenfelder U, Havlicek V, & Brem G, Jozef L, 2012. 9 Endoscopy in Reproduction. Genetics & Reproduction, Animal Production Research Centre School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, LE12 5RD, UK: p.140.
- Birler S, 1997. Sığır oositlerinde morfolojik görünümün in vitro olgunlaştırma ve fertilizasyon üzerine etkileri. İstanbul Üniv Vet Fak Derg, 23, 345-352.
- Birler S, Pabuçcuoğlu S, Atallah H, Aklan S, Özdaş ÖB, Bacınoğlu S, Cirit Ü, Zavar İ, Sönmez MEC, İleri İK, 2002. İn vitro üretilen koyun embriyolarının transferi. Türk Journal Vet Anim Sci, 26, 1421-26.
- Birler S, Pabuçcuoğlu S, İleri K, Aklan S, Evecan M, 1998. Sığır oositlerinin in vitro olgunlaştırılmasında farklı sürelerin etkisi. Türk Journal Vet Anim Sci, 22, 551-57.
- Bo GA, & Mapletoft RJ, 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. Anim Reprod, 10(3), 344-8.
- Boncukoğlu R, Kocakerim MM, Yılmaz EA, Yılmaz TM, 2003. Bor elementinin çevresel açıdan değerlendirilmesi, Atatürk Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü. 25240.
- Bontekoe S, Mantikou E, van Wely M, Seshadri S, Repping S, & Mastenbroek S, 2012. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. Cochrane Database of Systematic Reviews, 7.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice MI, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA, 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. Bio of Reprod, 27, 147-58.
- Brevini TA, Cillo F, Antonini S, Gandolfi F, 2007. Cytoplasmic remodelling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. Anim Reprod Sci, 98,23-38.
- Brunet S, Verlhac MH, 2011 Positioning to get out of meiosis: the asymmetry of division Hum Reprod Update 17, 68-75.
- Callesen H, Greve T, Christensen F, 1987. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. Theriogenology 27, 217.
- Carolan C, Monaghan P, Gallagher M, Gordon I, 1994. Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture in vitro. Theriogenology, 41(5), 1061-8.
- Cetica PD, Dalvit GC, & Beconi MT, 1999. Study of evaluation criteria used for in vitro bovine oocyte selection and maturation. Biocell: official journal of the Sociudades Latinoamericanas de Microscopia Electronica et al, 23(2), 125-33.
- Chang MC, 1958. Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus with special reference to the reproductive phases of the female. Endocrinology, 63(5), 619-28.
- Christianson MS, Zhao Y, Shoham G, Granot I, Safran A, Khafagy A, & Shoham Z, 2014. Embryo catheter loading and embryo culture techniques: results of a worldwide web-based survey. J assi repro gen, 31(8), 1029-36.
- Coban FK, Ince S, Kucukkurt I, Demirel HH, Hazman O, 2015. Boron attenuates malathion-induced oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in rats. Drug Chem Toxicol. 38, 4, 391-9.
- Corrêa GA, Rumpf R, Mundim TCD, Franco MM, & Dode MAN, 2008. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. Anim Reprod Sci 104(2-4), 132-42.

- Çakmak SK, Çakmak A, Gönül M, Kiliç A, Gül Ü, 2012. Pentoxifylline use in dermatology. *Inflamm Allergy Drug Targets*. 11, 6, 422-32.
- Dalvit G, Llanes SP, Descalzo A, Insani M, Beconi M, & Cetica P, 2005. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte in vitro maturation. *Reprod Domest Ani*, 40(2), 93-97.
- de Souza Rocha-Frigoni NA, da Silva Leão BC, Nogueira É, Accorsi MF, & Mingoti GZ, 2015. Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of in vitro culture. *Zygote*, 23(2), 159-68.
- Demirtaş A, Kucukkurt I, Akbel E, Karabag F, Ince S, 2015. The effects of dietary boron compounds in supplemented diet on hormonal activity and some biochemical parameters in rats. *Toxicol Ind Health*. 31, 3, 255-60.
- Devirian TA, Volpe SL, 2003. The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43, 2, 219-31.
- Donnay I, Feugang JM, Bernard S, Marchandise J, Pampfer S, Moens A, Dessy F, 2002. Impact of adding 5.5 mM glucose to SOF medium on the development, metabolism and quality of in vitro produced bovine embryos from the morula to the blastocyst stage. *Zygote* 10(3),189-99.
- Eckhart CD 1998. Boron stimulates embryonic trout growth. *The Journal of nutrition*. 128, 12, 2488-93.
- Eppig JJ, Vivelros MM, Martin-Bivens C, De La Fuente R, 2004. Oocyte maturation and ovulation. In: *The Ovary*. 2nd Ed. Leung PCK and Adash EY eds. Elsevier-Academic Press, Amsterdam et al, p. 113-29.
- Eren M, Güçlü BK, Uyanık F, Karabulut F, 2006. The effects of dietary boron supplementation on performance, carcass composition and serum lipids in Japanese quails. *J Anim Vet Adv*. 5, 12, 1105-8.
- Faber DC, Molina JA, Ohlrichs CO, Vander Zwaag DF, Ferre LB, 2003. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology* 59, 125-38.
- Faheem MS, Carvalhais I, Chaveiro A, & Da Silva FM, 2011. In vitro oocyte fertilization and subsequent embryonic development after cryopreservation of bovine ovarian tissue, using an effective approach for oocyte collection. *Ani Reprod Sci*, 125(1-4), 49-55.
- Feng WG, Sui HS, Han ZB, Chang ZL, Zhou P, Liu DJ, Bao S, Tan JH, 2007. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology*, 67,1339-50.
- Ferreira EM, Vireque AA, Adona PR, Meirelles FV, Ferriani RA, Navarro PA, 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, 71,836-48.
- Feugang JM, Camargo-Rodríguez O, & Memili E, 2009. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Sci*, 121(2-3), 141-9.
- Feugang JM, De Roover R, Moens A, Léonard S, Dessy F, & Donnay I, 2004. Addition of β -mercaptoethanol or Trolox® at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*, 61(1), 71-90.
- Feugang JM, Van Langendonck A, Sayoud H, Rees JF, Pampfer S, Moens A, & Donnay I, 2003. Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. *Zygote*, 11(2), 107-18.

- Fort D, Stover E, Strong PL, Murray FJ, Keen JL, 1999. Chronic feeding of a low boron diet adversely affect reproduction and development in *xenopus laevis*. *J Nutr*, 129, 11, 2055-60.
- Fry RC, Simpson TL, & Squires TJ, 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology*, 49(6), 1077-82.
- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G, 2001. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 55(6), 1341-57.
- Galli C, Duchi R, Crott, G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, & Lazzari G, 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59(2), 599-616.
- Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lazzari G, 2004. Production and quality of bovine oocytes and embryos. *Vet Res Commun*, 28(1) 121-6.
- Garcia-Garcia RM, Ward F, Fair S, O'Meara CM, Wade M, Duffy P, Lonergan P, 2006. Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. *Anim Reprod Sci*, 98(3-4), 233-40.
- Gasparrini B, Boccia L, Marchandise J, Di Palo R, George F, Donnay I, Zicarelli L, 2006. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus Bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cysteine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology*, 65, 275-87.
- Gilchrist RB, Zeng HT, Wang X, Richani D, Smitz J, Thompson JG, 2015. Reevaluation and evolution of the simulated physiological oocyte maturation system. *Theriogenology* 84(4), 656–57. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.03.032.
- Gordon I, 1994. Laboratory production of cattle embryos. CAB International Ltd. Co., Philadelphia USA.
- Gordon I, 2003. Laboratory production of cattle embryos. *Biotechnology in Agriculture Series*. Ed: GORDON I, Ireland, Cab International, p.79-157.
- Gordon I, 2004. In vitro embryo production. In: *Reproductive Technologies In Farm Animals*. Ed: GORDON I, 2nd ed. Ireland, Cab International, p.108-38
- Grøndahl C, 2008. Oocyte maturation. Basic and clinical aspects of in vitro maturation (IVM) with special emphasis of the role of FF-MAS. *Dan Med Bull*, 55,1-16.
- Guerin P, El Mouatassim S, Menezo Y, 2001. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human reproduction update*. 7,2, 175-89.
- Guille JJP, Joenje H, 1991. Biological significance of oxygen toxicity: an introduction. In: Vigo-Pelfrey C ed. *Membrane Lipid Oxidation*. CRC Press Inc, Boca Raton. FL, p. 1–32.
- Güler Ş, 2018. The achievements of in vitro maturation after thawing to the cryopreserved bovine oocytes by different vitrification methods. Yüksek Lisans Tezi. Makü Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur.
- Hafez ESE, 1993. Ovulation manipulation, In vitro fertilization and embryo transfer and genetic engineering. *Reproduction in farm animals*. Ed: Hafez ESE, 6th ed. USA: Philadelphia, p. 461-503.
- Hammam AM, Whisnant CS, Elias A, Zaabel SM, Hegab AO, Abu-El-Naga EM, 2010. Effect of media, sera and hormones on in vitro maturation and fertilization of water buffalos (*Bubalus bubalis*). *J Anim Vet Adv*, 9(1), 27-31.

- Hammermann C, Goldschmidt, Caplan MS, 1999. Amelioration of ischemia-reperfusion injury in rat intestine by pentoxifylline- mediated inhibition of xanthine oxidase. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 29, 69-74.
- Hanada A, Enya Y, Suzuki T, 1986. Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. *Japanese J of Ani Reprod*. 32, 208.
- Hancock JT, Desikan R, & Neill SJ, 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. p. 345-9.
- Hashimoto S, Minami N, Yamada M, & Imai H, 2000. Excessive concentration of glucose during *in vitro* maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after *in vitro* fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. *Mol Reprod Develop*. Incorporating Gamete Research, 56(4), 520-6.
- Hasler JF, 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. *Theriogenology*, 81(1), 152-69.
- Hasler JF, Jennifer P, Barfield, 2017. *In Vitro Fertilization Bioniche Animal Health*. Department of Biomedical Sciences, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA.
- Ho YS, Dey MS, & Crapo JD, 1996. Antioxidant enzyme expression in rat lungs during hyperoxia. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 270(5), 810-18.
- Hoque SM, Kabiraj SK, Khandoker MY, Mondai A, & Tareq KMA, 2011. Effect of collection techniques on cumulus oocyte complexes (COCs) recovery, *in vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. *African Journal of Biotechnology*, 10(45), 9177-81.
- Hosseini SM, Forouzanfer M, Hajian M, Asgari V, Abedi P, Hosseini L, Ostadhosseini S, Moulavi F, Asfahani-Langroodi M, Sadeghi H, Bahramian H, Eghbalsaid SH, Nasr-Esfahani MH, 2009. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? *J Assi Reprod Gen*, 26, 355-64.
- Hunt CD, 1988. Boron homeostasis in the cholecaliferol-deficient chick. *Proceedings of the North Dakota Academy of Science (USA)*.
- Hunt CD, 1996. Biochemical effects of physiological amounts of dietary boron. *Journal of trace elements in experimental medicine*, 9,4, 185-214.
- Hutt KJ, Albertini DF, 2007. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. *Reprod Biomed Online*, 14,758-64.
- Iritani A, & Niwa K, 1977. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *Reproduction*, 50(1), 119-21.
- İnce S, Demirel HH, Erdoğan M, Uğuz C, Agca Y, & Dal G, 2016. Borun ratlarda embriyo morfolojisi üzerine etkisi/The effect of boron on embryo morphology in rats. *Bor Dergisi*, 1(2), 60-5.
- Jeong YW, Park SW, Hossein MS, Kim S, Kim JH, Lee SH, & Hwang WS, 2006. Antiapoptotic and embryotrophic effects of α -tocopherol and L-ascorbic acid on porcine embryos derived from *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Theriogenology*, 66(9), 2104-12.
- Johnson MH, Nasresfahani MH, 1994. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioessays*, 16,1, 31-8.

- Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N, 1995. In vitro fertilization of bovine oocytes. In: Manual of bovine embryo transfer. Japon live technology association, p. 317-46.
- Kandi AM, Rings F, Tesfaye D, Hölker M, Schellander K, 2009. Comparative study on the effects of phenyl boron and boric acid on the development and gene expression (connexin x43 and e-cadherin) of pre-implantation bovine embryos. *Egyptian Journal of Hospital Medicine*. 35.
- Karaşahin T, Arıkan Ş, 2015. The effect of oleic and linoleic acids on in vitro bovine embryonic development and embryo quality. *Turkish J Vet Ani Sci*. 39, 2,154-9.
- Katska L, Smorak Z, 1984. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *Anim Reprod Sci*, 7, 451-60.
- Kaymaz M, 2012. Yardımcı Üreme Teknikleri. Ed: Semecan A, Kaymaz M, Fındık M, Rışvanlı A, Köker A. In *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji*. Medipres Matbaacılık Ltd. Şti., Malatya. p.589-10.
- Kemp PH, 1956. *The Chemistry of Boraks*, Part 1, Borox Consolidated limited, SWI, London.
- Khalili MA, Agha-Rahimi A, Sadeghian F, & Halvaei I, 2017. No cytotoxic effects from application of pentoxifylline to spermatozoa on subsequent pre-implantation embryo development in mice. *Middle East Fertility Society Journal*, 22(2), 132-5.
- Kılıçoğlu Ç, 1985. The in vitro cultivation of mouse ova from one cell to blastocyst. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 32, 301-10.
- Kimura N, Hoshino Y, Totsukawa K, Sato E, 2007. Cellular and molecular events during oocyte maturation in mammals: molecules of cumulus-oocyte complex matrix and signalling pathways regulating meiotic progression. *Soc Reprod Fertil Suppl*. 63,327-42.
- Kobayashi S, 2007. *Manual for ovum pick-up and in vitro fertilization*. Japan International Cooperation Agency.
- Korkmaz M, 2007. *Borun İnsan Sağlığına Etkisi*, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoloji ve Embriyoloji A.D Anabilim Dalı, Manisa.
- Korkmaz Ö, Küplülü Ş, Ağca Y, & Polat IM, 2013. Effect of oocyte quality and activation protocols on bovine embryo development following intracytoplasmic sperm injection. *Turkish J Vet Ani Sci*, 37(1), 26-30.
- Kupka MS, Ferraretti AP, De Mouzon J, Erb K, D'Hooghe T, Castilla JA, & Kreuz-Kinderwunschzentrum SPG, 2014. Assisted reproductive technology in Europe, 2010: results generated from European registers by ESHRE. *Hum reprod*, 29(10), 2099-113.
- Küplülü Ş, & Ün M, 2001. Sığırlarda follikül büyüklüğünün oositlerin in vitro maturasyonu üzerine etkisi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 48(3), 201-5.
- Lanoue L, Taubeneck MW, Muniz J, Hanna LA, Strong PL, Murray FJ, & Keen CL, 1998. Assessing the effects of low boron diets on embryonic and fetal development in rodents using in vitro and in vivo model systems. *Biological trace element research*, 66(1-3), 271-98.
- Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA, 1998. *Text, Atlas of hisyology*. Philadelphia, W.B. Saunders Company. p. 604-6.
- Lequarre AS, Marchandise J, Moreau, Massip A, Donnay I, 2003. Cell cycle duration at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen tension and transcription inhibition. *Biol. Reprod*. 69, 1707-13.
- Lipscomb J, Swartout J, Teuschler L, 2004. *Toxicological Review of boron and compounds*. Agency USEP, editor. Washington DC: EPA, 134.

- Lonergan P, & Fair T, 2016. Maturation of oocytes in vitro. *Annu Review Ani Bio*, 4, 255-68.
- Lonergan P, Rizos D, Ward F, & Boland MP, 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutri Develop*, 41(5), 427-37.
- Loren P, Sánchez R, Arias ME, Felmer R, Risopatrón J, & Cheuquemán C, 2017. Melatonin scavenger properties against oxidative and nitrosative stress: impact on gamete handling and in vitro embryo production in humans and other mammals. *Int J Mol Sci*, 18(6), 1119.
- Lott WM, Anchamparathy VM, McGilliard MI, Mullarky IK, Gwazdauskas FC, 2010. Influence of cysteine in conjunction with growth factors on the development of in vitro-produced bovine embryos. *Reprod Dom Ani*, 46, 585-94.
- Luvoni GC, Keskinetepe L, & Brackett BG, 1996. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. *Mol Reprod Develop*. Incorporating Gamete Research, 43(4), 437-43.
- Maclellan LJ, Whyte TR, Murray A, Fitzpatrick LA, Earl CR, Aspden WJ, Kinder JE, Grotjan HE, Walsh J, Trigg TE, D'occhio MJ, 1998. Super stimulation of ovarian follicular growth with FSH, oocyte recovery and embryo production from zebu (*Bos Indicus*) calves: effects of treatment with a GnRH agonist or antagonist. *Theriogenology*, 49, 1317-29.
- Majerus V, De Rover R, Etienne D, Kaidi S, Massip A, Dessy F, Donnay I, 1999. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology*, 52, 1169-79.
- Makarevich AV, 2012. 8 Quality Assessment of Mammalian Preimplantation Embryos. Jozef Laurinčík et al, 115.
- Meacham SL, Taper LJ, Volpe SL, 1994. Effects of boron supplementation on bone mineral density and dietary, blood, and urinary calcium, phosphorus, magnesium, and boron in female athletes. *Environmental Health Perspectives*, 102, 7, 79.
- Meintjes M, Chantilis SJ, Douglas JD, Rodriguez AJ, Guerami A, Bookout, DM, & Madden JD, 2009. A controlled randomized trial evaluating the effect of lowered incubator oxygen tension on live births in a predominantly blastocyst transfer program. *Hum Reprod*, 24(2), 300-7.
- Meirelles FV, Caetano AR, Watanabe YF, Ripamonte P, Carambula SF, Merighe GK, & Garcia SM, 2004. Genome activation and developmental block in bovine embryos. *Ani Reprod Sci*, 82, 13-20.
- Memili E, First NL, 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, 87-96.
- Mendes JOB Jr, Burns PD, De la Torre-Sanchez JF and Seidel GE Jr, 2003. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. *Theriogenology*, 60, 331-40.
- Mermillod P, Dalbiès-Tran R, Uzbekova S, Thélie A, Traverso JM, Perreau C, Papillier P, Monget P, 2008. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? *Reprod Domest Anim*, 43 Suppl 2, 393-00.
- Mingoti GZ, Castro VC, Méo SC, Barretto LSS, & Garcia JM, 2009. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. *Zygote*, 17(4), 321-8.
- Miyano T, Manabe N, 2007. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. *Soc Reprod Fertil Suppl*, 63, 531-8.
- Monniaux D, Caraty A, Clement F et al, 2009. Ovarian follicular development and ovulation in mammals *Productions Animales* 22, 59-76.

- Moore SG, & Hasler JF, 2017. A 100-year review: Reproductive technologies in dairy science. *J Dairy Sci*, 100 (12), 10314-31.
- Natadisastra M, Kurniawan RH, & Malik DM, 2015. Pentoxifylline as a Therapy for Thin Endometrial Lining in Infertility. *Indonesian Journal of Obstetrics and Gynecology*, 146-50.
- Natarajan R, Shankar MB, & Munuswamy D, 2010. Effect of α -tocopherol supplementation on in vitro maturation of sheep oocytes and in vitro development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. *J assi reprod gen*, 27(8), 483-90.
- Nedambale TL, Du F, Xu J, Chaubal SA, Dinnyes A, Groen W, Tian XC, 2006. Prolonging bovine sperm–oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. *Theriogenology*, 66(8), 1951-60.
- Nielsen F, 2000. The emergence of boron as nutritionally important throughout the life cycle. *Nutrition*, 16, 514-521.
- Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM, Hunt JR, 1987. Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. *The FASEB Journal*, 1, 5, 394-7.
- Numabe T, Oikawa T, Kikuchi T, & Horiuchi T, 2001. Pentoxifylline improves in vitro fertilization and subsequent development of bovine oocytes. *Theriogenology*, 56(2), 225-33.
- Ohnami N, Nakamura A, Miyado M, Sato M, Kawano N, Yoshid, K, & Takahashi Y, 2012. CD81 and CD9 work independently as extracellular components upon fusion of sperm and oocyte. *Biology open*, 1(7), 640-7.
- Otlu A, 2015. Dişi genital sistem histolojisi. Ders sunuları. İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji
- Pandey A, Gupta N, and Gupta SC, 2009. Improvement of in vitro oocyte maturation with lectin supplementation and expression analysis of Cx43, GDF-9, FGF-4 and Fibronectin mRNA transcripts in Buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Assist Reprod Genetics*, 26, 365-71.
- Pasquier C, Franzini E, Abedinzadeh Az, Hakim J, 1990. Protective Effect of Pentoxifylline Against Hydroxyl Radical-Induced Damage to Proteins. In *Pentoxifylline and Analogues: Effects on Leukocyte Function*. Karger Publishers. p. 91-6.
- Perry G, 2017. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter*, 35, 8-24.
- Perry G. 2014. 2013 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transf Newsl*, 32, 14–26.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip TAM, Wurth YA, van Beneden TH et al, 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35, 857-62.
- Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Ferreira CR, Santos GMG et al, 2010. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 74, 1349-55.
- Qi M, Yao Y, Ma H, Wang J, Zhao X, Liu L, & Sun F, 2013. Transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up (OPU) in cattle. *J. Biomim Biomate Tissue Eng*, 18, 118.
- Rocha-Frigoni NA, Leão BC, Dall'Acqua PC, & Mingoti GZ, 2016. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. *Theriogenology*, 86(8), 1897-905.
- Sağırkaya H, Yağmur M, Nur Z, & Soylu MK, 2004. Replacement of fetal calf serum with synthetic serum substitute in the in vitro maturation medium: effects on maturation, fertilization and subsequent development of cattle oocytes in vitro. *Turkish J Ani Sci*, 28(4), 779-84.

- Saleh WM, 2017. Assessment of different methods of bovine oocytes collection, maturation and Invitro fertilization of abattoir specimens. *Iraqi J Vet Sci*, 31(1), 55-65.
- Santi B, Wenigerkind H, Scherthamer W, Modl J, Stojkovic M, Prella K, Holtz W, Brem G, Wolf E, 1998. Comparison of ultrasound-guided vs. laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. *Theriogenology*, 50, 89-00.
- Sirard MA, 2016. Somatic environment and germinal differentiation in antral follicle: the effect of FSH withdrawal and basal LH on oocyte competence acquisition in cattle. *Theriogenology*, 86(1), 54-61.
- Somfai T, Bodó S, Nagy S, Papp AB, Ivancsics J, Baranyai B, & Kovacs A, 2002. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. *Reprod Dom Ani*, 37(5), 285-0.
- Sonjaya H, & Hasbi H, 2019. Potential of embryo production techniques in vitro for improving bali cattle seedstock. In IOP Conference Series, March: IOP Publishing. *Earth and Environmental Science*, 247,1.
- Sovernigo TC, Adona PR, Monzani PS, Guevara S, Barros FDA, Lopes FG, & Leal CLV, 2017. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reprod Dom Ani*, 52(4), 561-9.
- Strejček F, Petrovičová I, 2012. Embryotechnology. Constantine the Philosopher University in Nitra p. 95- 153.
- Sunderam DM, Nera A, Briand L, Topie E, Bencharif D, Tamturier D, 2016. In Vitro Fertilization (IVF). *Avid Sci* (2) 1-26.
- Sunderam S, Kissin DM, Crawford SB, Folger SG, Jamieson DJ, Warner L, & Barfield WD, 2015. Assisted reproductive technology surveillance—United States, 2012. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Surveillance Summaries*, 64(6), 1-29.
- Takahashi M, 2012. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Develop*, 58(1), 1-9.
- Tatemoto H, Ootaki K, Shigeta K, & Muto N, 2001. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O- α -glucoside during in vitro maturation. *Bio repro*, 65(6), 1800-6.
- Tekeli T, 1984. Investigations on in vitro fertilization of rabbit ova. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 31, 186-96.
- Tekeli T, 1992. The effect of EDTA on the development of mouse eggs fertilized in vitro. *SÜ Vet Fak Derg*, 8(1), 25-7.
- Tekeli T, Güler M, Aksoy M, 1990. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. *SÜ Vet Fak Derg*, 6(1), 13-5.
- Thiyagarajan B, & Valivittan K, 2009. Ameliorating effect of vitamin E on in vitro development of preimplantation buffalo embryos. *J assi reprod gen*, 26(4), 217-25.
- Tola EN, 2014. Oksidan ve antioksidan sistemlerin kadın fertilitesine etkileri. *SDU Journal of Health Science Institute/SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5,1.
- Topuzoğlu DB, 2011. Farklı büyüklüklerdeki sığır oositlerinin maturasyonu üzerine insülin benzeri büyüme faktörü-1'in (IGF-1) etkisi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, 82(1), 15-21.
- Tournaye H, Devroey P, Camus M, Van der Linden M, Janssens R, & Van Steirteghem A, 1995. Use of pentoxifylline in assisted reproductive technology. *Hum Reprod*, 10(1), 72-9.

- Tripathi A, Kumar KVP, Chaube SK, 2010. Meiotic Cell Cycle Arrest in Mammalian Oocytes J Cel Physio, 223, 592-00.
- Truong T, & Gardner DK, 2017. Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. Hum Reprod, 32(12), 2404-13.
- Truong TT, Soh YM, & Gardner DK, 2016. Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. Hum Reprod, 31(7), 1445-54.
- Türkez H, Geyikoğlu F, Tatar A, Keleş S, Özkan A, 2007. Effects of some boron compounds on peripheral human blood. Zeitschrift für Naturforschung C. 62,11-12, 889-96.
- Uçkun Z, 2013. Esansiyel bir komponent: bor-borun günlük alımı ve fizyolojik etkileri. J Turkish Sci Rev. 6, 119-23.
- van den Hurk R, Zhao J, 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology, 63,1717-51.
- Van Soom A, Yuan YQ, Peelman LJ, De Matos DG, Dewulf J, Laevens H, & de Kruif A, 2002. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. Theriogenology, 57(5), 1453-65.
- Vincenti L, Starvaggi Cucuzza A, Girgis SM, & Teodoro PL, 1998. IVF in Piedmontese breed: production data related to oocytes characteristics. Edition Fondation Marcel Meirux. In 14th Scientific Meeting of the European Embryo-Transfer Association Vol.14, p. 266.
- Wale PL, & Gardner DK, 2012. Oxygen regulates amino acid turnover and carbohydrate uptake during the preimplantation period of mouse embryo development. Bio of reprod, 87(1), 24-1.
- Wang ZG, Yu SD, & Xu ZR, 2007. Effects of collection methods on recovery efficiency, maturation rate and subsequent embryonic developmental competence of oocytes in holstein cow. Asian-australasian J Ani Sci, 20(4), 496-00.
- Wrenzycki C, 2018. In Vitro Production of (Farm) Animal Embryos. In Animal Biotechnology 1, Cham, Springer, p. 269-304.
- Yılmaz A, 2002. Her Derde Deva Hazinemiz Bor, Tubitak Bilim ve Teknik Dergisi, Ankara. Bilim ve Teknik, 414, 38-48.
- Zarcula SM, Cernescu H, Godja G, and Igna V, 2012. Effects of recovering bovine oocyte methods on quantity and quality of cumulus-oocyte complexes. Adv Res Sci Area- Virtual Conf, 1, 2171-4.
- Zhang LI, Jiang S, Wozniak PJ, Yang X, & Godke RA, 1995. Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development in vitro. Mol Reprod develop, 40(3), 338-44.
- Zhao SJ, Pang YW, Zhao XM, Du WH, Hao HS, & Zhu HB, 2017. Effects of lipopolysaccharide on maturation of bovine oocyte in vitro and its possible mechanisms. Oncotarget, 8(3), 4656.
- Zi XD, Lu H, Yin RH, & Chen SW, 2008. Development of embryos after in vitro fertilization of bovine oocytes with sperm from either yaks (*Bos grunniens*) or cattle (*Bos taurus*). Ani Reprod Sci, 108(1-2), 208-15.

7. EKLER

EK-A: Etik Kurul Belgesi



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
VETERİNER FAKÜLTESİ DENEY HAYVANLARI
ÜRETİM VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
ETİK KURULU (SÜVDAMEK) KARARLARI



Toplantı Tarihi	30.10.2017	Toplantı Sayısı	2017/011	Karar Sayısı	2017/147
<p>S.Ü. Veteriner Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet GÜLER tarafından sunulan "Farklı antioksidanların (Pentoksifilin ve borik asid) in vitro siğir embriyo kültür medyumlarına ilavesinin embriyo gelişimi ve kalitesi üzerine etkileri" başlıklı Tez Projesi başvurusu değerlendirilmiştir.</p> <p>Başvuruda, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Deneysel Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Etik Kurulu (SÜVDAMEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, projenin araştırma etiği açısından "Uygun olduğuna" oy birliği ile karar verilmiştir.</p>					
 Prof. Dr. Oya BULUT Başkan		 Doç. Dr. Çagır ÖZDEMİR Başkan Yardımcısı			
 Prof. Dr. İbrahim AYDIN Üye		 Doç. Dr. Ayşe ER Raportör Üye			
 Doç. Dr. Özlem DERİNBAŞ EKİCİ Üye		Gökhan KILIÇ Konya Doğay ve Hayvanları Koruma Derneği Üyesi (Katılmadı)		Gökhan GÜLER Sivil Üye (Katılmadı)	

EK-B: İzin Belgesi

KONU: DİŞİ ORGAN ÇALIŞMASI

İLGİLİ MAKAMA

ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ FATMA SATILMIŞ'IN ET ENTEGRE TESİSİMİZDEKİ DİŞİ HAYVAN KESİMLERİ
SONRASINDA DİŞİ GENİTAL ORGANLARI ÇALIŞMASI İÇİN KULLANMASINDA TARAFIMIZCA BİR
SAKINCA YOKTUR . GEREĞİNİ BİLGİLERİNİZE SAYGILARIMLA ARZ EDERİM.

Akseker AKSEKER TARIM ET ENTEGRE
TESİSLERİ İÇ. GIDA İTH. İHR. A.Ş.
Çomaklı Mh. 17122 İc. No: 85/1 Konya
Teli: +90 332 221 25 25 Faksi: +90 332 221 25 00
Şirket Merkezi KONYA Ticaret Sic. No: 35387
MERSİS No: 0038047730000013
Mevlana Vergi Dairesi 038 047 7300

Mehmet YAMAN
VETERİNER HEKİMİ
Dip. No: 2675

Mehmet Yaman

EK-C: Laboratuvar Takip Formu

Bilgiyorsa Hayvan Irkı	Çalışma Grubu PTX / BOR		Çalışma Bitiş Tarihi		
	Çalışma Başlangıç Tarihi				
Mezbahane Bilgileri	Problemli Ovaryum Sayısı	Kullanılan Ovaryumlar Aspire Edilen Oosit Sayısı Kalitesi	Maturasyona Alınan Oosit Sayısı	Fertilizasyona Alınan Oosit Sayısı	Kültüre Alınan Oosit Sayısı
Gebirilen Ovaryum Sayısı					
Sperma Adı	Sperma Motilitesi	Çözdürülen Payet Sayısı			
Embriyo Gelişim Aşamaları					
	1. GRUP	2. GRUP	3. GRUP	4. GRUP	
Embriyo Dereceleri					NOT
UFO					
2-4 Hücre					
4-8 Hücre					
16-32 Hücre					
Kompakt morula					
Erken Blastosist					
Blastosist					
Expanded Blastosist					
Dejenerere					
Hatched					
Toplam					

8. ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Ankara ilinin Ayaş ilçesinde doğdu. İlköğretim eğitimini 2004 yılında Fevzi Çakmak İlköğretim Okulu'nda ve lise eğitimini ise 2008 yılında Yavuz Sultan Selim Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ndeki eğitimine başladı. Lisans eğitimi sırasında Erasmus sınavını kazanarak 2011-2012 yılı güz eğitim-öğretim döneminde İntörn programının birinci yarısını İspanya'nın Lugo şehrinde bulunan "UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA FAKULTAD DE VETERINARIA" de tamladıktan sonra Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne döndü ve 2013 yılında eğitimini tamamladı. 2014 yılında Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2014 Ekim ayında Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı ve halen Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmaya devam etmektedir.