



MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ZOOTEKNİ ANABİLİM DALI

ARI SÜTÜ VE BUZAĞI SERUMUNUN SIĞIR OOSİTLERİNİN
VİTRİFİKASYONU VE OLGUNLAŞMASI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ZELİHA NECLA AKSU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Antakya / HATAY

ARALIK – 2010

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	III
ÇİZELGELER DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	V
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	4
2.1. Dişi Üreme Sisteminin Anatomisi.....	4
2.2. Üremenin Endokrinolojik Kontrolü	4
2.3. Oogenesis, Folikülogensis	5
2.4. <i>In Vivo</i> Oosit Olgunlaşması.....	6
2.4.1. Nükleer Olgunlaşma	6
2.4.2. Sitoplazmik Olgunlaşma.....	7
2.5. <i>In Vitro</i> Oosit Olgunlaştırma.....	7
2.6. Arı Sütünün Seruma Alternatif Olarak Oosit Olgunlaştırmada Kullanılması....	9
2.7. Oosit Dondurma	11
2.7.1. Dondurma Mekanizması.....	11
2.7.2. Dondurma Yöntemleri	12
2.7.2.1. Yavaş Dondurma	12
2.7.2.2. Vitrifikasyon	13
2.7.3. Kroyoprotektanlar.....	16
2.7.4. Oositin Mayotik Devresi	19
2.7.5. Soğuk Zararı	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Arı Sütünün Temini.....	21
3.1.2. Ovaryumların Laboratuara Getirilmesi	21
3.1.3. Oositlerin Elde Edilmesi	23
3.2. Yöntem	24

3.2.1. Olgunlaştırma İçin Kullanılacak Optimum Arı Sütü Seviyesinin Belirlenmesi	24
3.2.2. <i>In Vitro</i> Oosit Olgunlaştırma	25
3.2.3. Oositlerin Boyanması	26
3.2.4. Oositlerin Nükleer Olgunlaşmasının İncelenmesi	27
3.2.5. Oositlerin Vitrifikasyonla (OPS, Open Pulled Straw) Dondurulması	27
3.2.6. Oositlerin Çözdürülmesi	29
3.2.7. <i>In Vitro</i> Fertilizasyon	29
3.2.8. Kullanılan Çözelti ve Kültür Ortamlarının Hazırlanması	31
3.2.8.1. Arı Sütü	31
3.2.8.2. PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)	32
3.2.8.3. Oosit Arama Ortamı	32
3.2.8.4. Kontrol Olgunlaştırma Ortamı	33
3.2.8.5. Arı Sütü İlaveli Olgunlaştırma Ortamları	33
3.2.8.6. Fertilizasyon için Kullanılan Ortamları	33
3.2.8.7. Vitrifikasyon için Kullanılan Ortamları	35
3.2.8.8. Çözdürme Ortamı	35
3.2.9. İstatistik Analizler	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	36
4.1. Arı Sütünün Kimyasal Yapısı	36
4.2. Arı Sütü Seviyesi	37
4.3. AS3 ve AS4 Bulguları	37
4.4. Gonadotropinlerin Eklenmesi	38
4.5. AS4 ve AS5 Bulguları	38
4.6. Kümüls Genişlemesi	40
4.7. Olgunlaşmamış Oositlerin Vitrifikasyonu ile Elde Edilen Bulgular	41
4.8. Olgunlaştırılmış Oositlerin Vitrifikasyonu ve Fertilizasyonu ile Elde Edilen Bulgular	42
4.9. Tartışma	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	47
KAYNAKLAR	49

TEŞEKKÜR.....	55
ÖZGEÇMİŞ	56

ÖZET**ARI SÜTÜ VE BUZAĞI SERUMUNUN SIĞIR OOSİTLERİNİN
VİTRİFİKASYONU VE OLGUNLAŞMASI ÜZERİNE ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

Bu çalışmayla amaçlanan; seruma alternatif olarak düşünülen arı sütünün oosit olgunlaştırmada kullanılarak, olgunlaştırılan oositlerin OPS vitrifikasyon yöntemiyle dondurulduktan sonra canlı kalma oranlarını ve fertilizasyon yeteneklerinin araştırılmasıdır.

Çalışmanın materyalini Antakya Belediyesi'ne ve özel bir kişiye ait iki farklı mezbahaneye kesim için getirilen Siyah-Beyaz Alaca sığırlara ait ovaryumlardan elde edilen oositler oluşturmaktadır. Oositler morfolojik olarak sınıflandırılmışlar ve kaliteli olanlar *in vitro* olgunlaştırma ortamına (TCM-199 + % 10 (v/v) FBS + % 0,625 (w/v) arı sütü (AS5) + % 1,25 (w/v) arı sütü (AS4) + FSH (5 µg/ml) + LH (5 µg/ml) + 50 IU/mL penisilin / 50 µg/mL streptomisin) aktararak, 38°C sıcaklıkta %5 CO₂ li atmosferde 22-24 saat inkübe edilmişlerdir. Oositler ters mikroskop (Olympus, CKX41) altında X40 oranında büyütülerek nükleer olgunlaşmaları incelenmiş ve ters mikroskoba (Olympus, CKX41) bağlı floresan ışık kaynağı ve UV filtre kullanılarak olgunlaşmalar tespit edilmiştir. Olgunlaştırma ortamlarına ilave edilen arı sütünün kontrol grubunda kullanılan seruma alternatif olabilecek ölçüde oositlerin olgunlaşması (K: % 77,8, AS4: % 64,5 ve AS5: % 74,5) üzerine etkili olduğu görülmüştür (P>0,05). Ortama ilave edilen arı sütü dondurulmuş olgunlaşmayan oositlerin olgunlaşma oranlarını olumlu yönde etkilemiş (HYC+K: % 71,4 HYC+V: % 54,3 AS5+K: % 61,2 AS5+V: % 60,8) fakat tespit edilen bu etki istatistiki olarak önemli bulunmamıştır. Ayrıca arı sütü vitrifikasyon sonrası fertilizasyonu (AS5+K: % 54,7 ve AS5+V: % 62,5) olumlu şekilde etkilemektedir.

Sonuç olarak, arı sütü sığır oositlerinin olgunlaştırılması ve fertilizasyonunda seruma alternatif olma potansiyeline sahiptir. Ancak, arı sütünün oosit vitrifikasyonu açısından daha detaylı araştırılmasına ihtiyaç vardır.

2010, 56 sayfa

Anahtar Kelimeler: Arı sütü, serum, sığır oosit olgunlaşma, vitrifikasyon

ABSTRACT**EFFECTS OF ROYAL JELLY AND FETAL BOVINE SERUM ON THE MATURATION AND VITRIFICATION OF BOVINE OOCYTES**

Aim of this study was to explore the fertilization abilities and survival rates of oocytes matured using royal jelly and cryopreserved using OPS vitrification.

Oocytes, collected from the ovaries of Black-White cattles slaughtered in two different slaughterhouses in Antioch. COC's were assessed morphologically prior to maturation and only oocytes with compact, non-atretic cumulus investment and evenly granulated cytoplasm were selected for maturation. Selected oocytes were matured in bicarbonate-buffered Medium 199 with Earle's salts supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum or 0,625 % (w/v) honeybee royal jelly (RJ5) and 1,25% (w/v) honeybee royal jelly (RJ4) in the presence of FSH (5µg/ml), LH (5µg/ml) and antibiotics (50 IU/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin sulphate) under a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 38 °C for 22-24 h.

Nuclear maturations of oocytes evaluated under inverted microscope at X40 zoom (Olympus, CKX41). Also, maturation rates evaluated using fluorescent beam source and UV filters. Findings indicated that royal jelly inclusion to maturation medium has been shown to be an alternative in terms of maturation rate (C: 77,8%, RJ4: 64,5% and RJ5: 74,5%). Royal jelly inclusion to maturation medium did not significantly effect vitrified immature oocytes maturation rates (HYC+C: 71,4% HYC+Vitrification: 54,3% RJ5+C: 61,2%, RJ5+V: 60,8%), but tended to improve oocyte maturation after vitrification. Also, fertilization rates following vitrification-thawing were improved (RJ5+C: 54,7% and RJ5+V: 62,5%) when royal jelly included maturation medium.

In conclusion, royal jelly has the potential of being an alternative to the serum for maturation and fertilization on cattle oocytes. However, its required to make detailed researches on effect of royal jelly on oocyte vitrification.

2010, 56 pages

Keywords: Royal jelly, serum, cattle oocyte, maturation, vitrification

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACTH	Adrenocorticotrophic Hormone
AS	Arı Sütü
BSA	Bovine Serum Albumin
CAP	Kapasitasyon Ortamı
CPS	Close Pulled Straw
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EG	Etilen Glikol
EGF	Epidermal Growth Factor
FCS	Fetal Calf Serume
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GH	Growth hormone
GL	Gel Loading
GMP	Glass Micro Pipette
GV	Germinal Vesicle
GVBD	Germinal Vesicle Break-Down
HM	Holding Medium
HYC	Hyclone
IVF	In-vitro Fertilizasyon
K	Kontrol
KOK	Kümüls Oosit Kompleksi
LH	Lutein Hormone
M I	Metafaz I
M II	Metafaz II
MDS	Mikro Damlacık sistemi
OPS	Open Pulled Straw
P/S	Penisilin Streptomisin
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PROH	Propilen Glikol
PVA	Polivinil Alkol
PVP	Polivinil Prolidin
SK	Sulandırma Katsayısı
SM	Sükroz Medyum
SSV	Solid Surface Vitriification
TRH	Thyrotrophin Releasing Hormone
TSH	Thyroid Stimulating Hormone
W2	Washing Medium

ÇİZELGELER DİZİNİ**Sayfa**

Çizelge 2.1. Bazı vitrifikasyon yöntemlerinin karşılaştırılması.....	16
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan arı sütü grupları	25
Çizelge 3.2. Denemede kullanılan olgunlaştırma ortamları.....	25
Çizelge 3.3. Deneme planı	28
Çizelge 3.4. Arı sütünün yapısı	31
Çizelge 3.5. PBS Stokları.....	32
Çizelge 3.6. Fertilizasyon için kullanılan stok solüsyonlar.....	34
Çizelge 3.7. Fertilizasyon için kullanılan çalışma solüsyonları.....	34
Çizelge 4.1 Arı sütünün kimyasal yapısı.....	36
Çizelge 4.2. Serum ve arı sütünün sığır oositleri kümülüs hücrelerinin genişlemesi üzerine etkileri.....	41
Çizelge 4.3. Dondurulmuş oositlerin arı sütlü ve serumlu ortamlarda olgunlaşması ..	41
Çizelge 4.4. Arı sütlü ve serumlu ortamlarda olgunlaşmış oositlerin dondurulması ve fertilizasyonu	42

ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa**

Şekil 2.1. Arı sütünün doğal yolla üretimi	10
Şekil 3.1. Mezbahanedeki ovaryumların alınması	22
Şekil 3.2. Laboratuara getirilen ovaryumlar	22
Şekil 3.3. Aspire edilmemiş ovaryum	23
Şekil 3.4. Ovaryumların aspirasyonu	24
Şekil 3.5. Olgunlaştırma için seçilen kümülüs oosit kompleksleri	26
Şekil 3.6. Olgunlaştırma için seçilmeyen kümülüs oosit kompleksleri	26
Şekil 3.7. OPS vitrifikasyonda kullanılan modifiye payetler.....	29
Şekil 3.8. Hemocytometer (Thoma Lamı)	30
Şekil 4.1. Arı sütünün sığır oositlerinin olgunlaşması üzerine etkileri.....	37
Şekil 4.2. Gonadotropinlerin arı sütü ortamlarında olgunlaşan oositlerin üzerine etkileri.....	38
Şekil 4.3. Arı sütünün sığır oositlerinin olgunlaşması üzerine etkileri	39
Şekil 4.4. Floresan boyamada görülen (a) M-I ve (b,c) M-II aşamasındaki oositler.....	39
Şekil 4.5. Kümülüsü genişlemiş oosit.....	40
Şekil 4.6. Kümülüsü genişlememiş oosit	40
Şekil 4.8. Döllenen oosit	43
Şekil 4.9. İkiye bölünmüş embriyo	43

1.GİRİŞ

Yardımcı üreme teknikleriyle ilgili çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. *In vitro* olgunlaştırma, fertilizasyon ve *in vitro* kültür gibi yardımcı üreme tekniklerinin hızla gelişmesi doku ve organların dondurulması tekniğinin de ortaya çıkmasına ve gelişmesine olanak sağlamıştır. Özellikle *in vitro* embriyo üretimi için istenilen zamanda oosit elde etmenin en uygun yolu oositlerin dondurularak depolanmasıdır. 1949 yılında Polge ve ark., kryoprotektan olarak gliserol kullanarak, sperma dondurmuştur. Bu önemli gelişmeyle birlikte hücre, doku, organ ve organizmaların dondurularak korunmasını inceleyen bilim dalı olan kriyobiyoloji ile ilgili çalışmalar ve araştırmalar hız kazanmıştır. Embriyo dondurulması da ilk olarak 1977 yılında Whittingham tarafından fare embriyolarının dondurulmasıyla yapılmıştır. Oositlerin dondurulması üzerine ilk çalışmalar, fare ve hamster oositlerinin dondurulmasıyla başlamıştır (Martino ve ark., 1996). Vitrifikasyon, geleneksel yavaş dondurmaya alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmış ve memelilerde embriyoların dondurulması için ilk kez Rall ve Fahy (1985) tarafından kullanılmıştır. Sığır embriyolarını vitrifikasyonla dondurulması ilk olarak 1987 yılında gerçekleşmiştir (Massip ve ark., 1987). Vajta ve ark. (1998), modifiye payet sistemi (OPS) yöntemiyle, Lane ve ark. (1999), kryolop yöntemiyle, Dinnyes ve ark. (2000), katı yüzey vitrifikasyon (SSV) yöntemiyle, Papis ve ark. (2000), mikro damlacık tekniğiyle (MDS) ve Kuwayama ve ark. (2005), kryotop tekniğiyle, blastosist elde etmişlerdir.

Oosit dondurmaya ilgili çeşitli teknikler geliştirilmiş olsa dahi, embriyo dondurma kadar yaygın kullanılmamaktadır. Fakat oosit dondurma özellikle ıslah açısından embriyo dondurmaya göre daha avantajlı olan bir yöntemdir. Embriyo dondurmaya saf gen kaynakları korunamamaktadır. Üstün genotipli hayvanlardan alınan oositlerin dondurulmasıyla, bu hayvanlardan elde edilecek yavru sayısı arttırılmakta, bu genlerin ileriki generasyonlara aktarılması daha daha kolay olmaktadır. Büyükbaş hayvanlarda yılda bir yavru alınabilmektedir. Bu da elde edilen yavru sayısını sınırlamaktadır. Ayrıca çeşitli hastalıklar, infertilite gibi durumlar da yavru alımını tamamen sıfırlayabilmektedir. Oosit dondurmaya bu sorunların önüne geçilebilmesi mümkündür. *In vitro* çalışmalar için mezbahanedен alınan oositlerin ömrü kısadır ve dejenere oldukları için kullanılamama durumları vardır. Toplanan oositlerin

dondurulmasıyla istenilen zamanda oosit temini mümkün olabilecektir. Oosit dondurmanın buna benzer pek çok faydası ve avantajı olduğu halde uygulamada bazı problemler yaşanmaktadır.

Oosit dondurmada kullanılan yöntemler; geleneksel yavaş dondurma (slow freezing) ve hızlı dondurma vitrifikasyondur (vitrification). Geleneksel bir yöntem olan yavaş dondurmada, çok pahalı cihazlara gereksinim duyulmaktadır. Vitrifikasyon ise daha az ekipmanla ve daha kısa zamanda yapılabilmektedir (Sağırkaya ve Bağış, 2003).

Kroyoprezervasyon sonrası oositlerin hayatta kalmasını etkileyen iki faktör vardır; Bunlar, morfolojik ve biyofiziksel faktörlerdir (Ledda ve ark., 2007). En önemli biyofiziksel faktör, kroyoprezervasyon sırasında hücre içi buz kristallerinin oluşması (Mazur ve ark., 2005) ve ozmotik zarardır (Pedro ve ark., 1997). Bu zararları azaltabilmek için kullanılan kriyoprotektanların çeşidi ve bunlara maruz kalma sürelerini iyi ayarlamak gerekmektedir (Wani ve ark., 2004). Morfolojik faktörler ise; oositin kalitesi, alınan hayvanın özellikleri, oositin mayotik bölünmenin hangi safhasında olduğu gibi faktörlerdir.

Oositler, implantasyon öncesi embriyolara göre dondurulma sırasında soğuk hasarı denilen zarardan daha çok etkilenmektedirler. Dondurma sırasında özellikle plazma membranı zarar görmektedir (Arav ve ark., 1993). Bunun en önemli sebebi, dondurma sırasında oluşan hücre içi buz kristallerinin hücreye geri dönüşümsüz olarak zarar vermesidir. Bu zararın olmaması için en uygun yöntem vitrifikasyon tekniğidir. Vitrifikasyon sırasında buz kristallerinin oluştuğu -5 ve -15 derecedeki sıcaklıklar çok çabuk geçilerek hızlı bir şekilde dondurma sağlanır. Ayrıca kriyoprotektanlara maruz kalma süresi de kısa olduğu için bunların toksik etkisi en aza indirgenir. Dondurma ve çözündürme sırasında hücre içinde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla çeşitli kimyasal maddeler kullanılmaktadır. Bu kimyasallara kriyoprotektan denilmektedir (Sağırkaya ve Bağış, 2003).

Oositlerin dondurulması ve çözündürüldükten sonra tekrar gelişimini devam ettirebilmeleri, öncelikle oositin kalitesine, daha sonra da dondurma için kullanılmakta olan değişik koruyucuların uygun miktar ve oranda kullanılmasına bağlıdır (Checura ve Seidel, 2007). Halen yürütülen *in vitro* fertilizasyon (IVF) çalışmalarında optimum şartlar, kullanılan kimyasal maddeler ve etkileri, uygulanabilecek teknikler tam olarak kesinlik kazanmamış olup her geçen gün yapılan çalışmalar ile yeni gelişmeler

sağlanmaktadır (Pabuççuoğlu ve Birler, 2007). *In vitro* embriyo üretiminin günümüzdeki en önemli sorunu, embriyo kültürü için kullanılan ortamların kimyasal içeriğinin tam olarak belirlenememiş olmasıdır. Yapılan çalışmalarda kültür ortamlarına serum ilave edilmesinin, oosit olgunlaşması ve blastosist üretimini olumlu yönde etkilediği fakat elde edilen embriyoların kalitesinin çok iyi olmadığı bildirilmiştir (Carolan ve ark., 1995; Van Langendonck ve ark., 1996).

Gardner ve Lane (1999), serumun olumsuz etkisinin özellikle normal olmayan blastosel formasyonunda, anormal mitokondri yapılanmasında, düşük hücre sayısı ve embriyo metabolizmasındaki anormalliklerle ortaya çıkmakta olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, serumdan kaynaklanan sebeplerle olgunlaşan oositlerde yağ damlaları birikmekte ve bu damlalar vitrifikasyon sonucunda oositlerin zarar görmesine neden olmaktadır (Gardner, 1994).

Yapılan bu çalışmanın amacı; sığır oositlerinin olgunlaştırma evrelerinde kullanılan ve protein kaynağı olan seruma alternatif olarak arı sütü proteininin kullanılmasının sağlanmasıdır. Ayrıca, bu çalışmada oosit olgunlaştırılması sırasında seruma alternatif olarak kullanılan arı sütünün, olgunlaşan oositlerin vitrifikasyonu ile oluşacak zararlara hangi oranda etkileyeceği belirlenecektir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Oosit kriyoprezervasyonu, son zamanlarda hızla gelişen ancak daha etkili olabilmesi için çok daha fazla çalışma ve araştırmaya ihtiyaç duyulan yardımcı üreme tekniklerinden birisidir. Oosit kriyoprezervasyonunu tam olarak anlayabilmek için, dişi üreme sistemi (anatomi, hormonal kontrol), oosit olgunlaşması, dondurma yöntemleri ve diğer faktörler hakkında da yeterli bilgiye sahip olmak gerekmektedir.

2.1. Dişi Üreme Sistemi Anatomisi

Dişi üreme sistemi ovaryum, uterus, serviks, vajina ve vulvadan oluşur. Ovaryumun, oosit ve iki temel hormon olan östrojen ve progesteron üretimi gibi iki temel fonksiyonu vardır. Ovaryumdan sonra huni biçiminde olan infundibulum başlar ve burada ovidukt vardır. Ovulasyon olduğunda oosit infundibulum tarafından oosit kanalına gönderilir. Ovidukt aynı zamanda fallop tüp olarak da bilinir. Burada canlı sperm mevcut ise döllenme gerçekleşir. Oositin burada döllenme için bekleyeceği süre kısadır. Eğer döllenme gerçekleşmezse oosit dejenere olur. Embriyo oviduktan uterus boynuzuna taşınır. Burada fetal gelişim başlar ve bununla birlikte fetüsün besinini sağlayan ve koruyan plasenta da gelişir. Serviks; çiftleşme sırasında spermin girişini ve doğum sırasında yavrunun çıkışını kolaylaştırır. Bunun için mukus salgısı salgılanır (Ball ve Peters, 2004).

2. 2. Üremenin Endokrinolojik Kontrolü

Dişi üreme sistemi sayısız hormon salgılayan endokrin bezleri tarafından kontrol edilir. Bu salgılar glandüler hücreler tarafından üretilir ve kan ve lenf sistemleri aracılığıyla vücudun çeşitli bölgelerine iletilir (Gordon, 2003).

Dişi üreme sisteminin en önemli hormonlarından olan östrojen, graff folikül tarafından üretilir. Ve çeşitli fonksiyonları vardır (Gordon, 2003).

1. Cinsiyet organlarının gelişimi ve işlevi

2. Östrus döneminin başlaması

3. Prepubertal düve ve postpartum ineklerin cinsel aktivitelerinin başlaması

Progesteron, corpus luteum tarafından salgılanır östrojenin salgılanmasını baskılayarak, folikül gelişimini durdurur. Progesteron döllenmiş oositin yerleşebilmesi için uterusu hazırlar ve gebeliğin devamını sağlar (Gordon, 2003).

Ovaryumdan salgılanan hormonlar direk olarak hipofiz ön lobundan salgılanan GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) ın etkisi altındadır. FSH ve LH hipofizden salgılanır ve kan yoluyla ovaryuma gelir. FSH folikül gelişimini ve işlevini sağlar. LH ise ovulasyon sırasında folikülün yırtılmasına ve corpus luteumun oluşmasına yardım eder. Ayrıca protein hormonu olan prolaktin, thyrotrophin releasing hormone (TRH), thyroid stimulating hormone (TSH) gibi hormonlarda dişi üreme sisteminde etkileri olan hormonlardır. Bunların dışında Growth hormone (GH), Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) hormonları da üreme sistemini dolaylı olarak etkilemektedir (Ball ve Peters, 2004).

2. 3. Oogenesis ve Folikülogenesis

Ovaryumlardan oosit üretilmesi olayına oogenesis denir. Oogenesis ovum oluşumunu ve gelişimini ifade eder. Oogenesis çoğalma, büyüme ve olgunlaşma dönemlerini kapsar. Spermatogenesis gibi sürekli değildir, döngüseldir. Oosit gelişiminin olduğu bu döngüye, ineklerde östrus siklusu denir. 20-21 gün uzunluğundadır. Bu döngüde ovaryumda iki yapı oluşur; folikül ve corpus luteum (Anonim, 2010).

Folikülogenesis; folikül oluşumunu ve gelişimini ifade eder. Primer folikülden preantral, antral ve en sonunda olgun yani Graff foliküle dönüşünceye kadar olan devreyi kapsar. Ovulasyondan sonra folikül, corpus luteuma dönüşür (Çelik ve Yıldırım, 2010).

2. 4. *İn vivo* Oosit Olgunlaşması

Dişi eşey hücreleri doğumdan önce çoğalır ve doğuma kadar çoğalmasını tamamlar. Doğduktan sonra sayısında artış olmaz sadece büyürler. İneklerde oosit oluşumu gebelik döneminde gerçekleşir. Gebelik sırasında birinci mayoz bölünmesinin diyakinez aşamasına gelir. Bu aşamada mayoz bölünme durur. Pubertaya ulaştınca tekrar mayoz bölünme başlar. Mayoz bölünmenin başlamasıyla primer oosit oluşur, çevresi folikülle sarılır ve zona pellusida meydana gelir. Primer oositin çevresindeki folikül hücre sayısı artar, zona pellusida kalınlaşır bu durumdaki folikül sekonder foliküldür. Daha sonra tersiyer foliküle ve en sonunda da en olgun devre olan Graff foliküle dönüşür. Graff folikülün zamanla büyümesiyle primer oosit de kümülüs oosit kompleks şeklinde folikül içinde mayozun birinci devresini geçerek sekonder oosite dönüşür. Sekonder oosit de mayozun ikinci aşamasını geçerek polar cisimciğini atar ve olgunlaşarak fertilizasyona hazır hale gelir (Anonim, 2010).

Olgunlaşma, oogenesis ve follkülogenesis olgusunun bir evresidir. Olgunlaşma, oositlerin fertilizasyon öncesi diploid olan ($2n$) kromozom sayılarını haploide (n) indirecek bir mayoz bölünme sürecini geçirmeleri ve bu bölünmeyle paralel seyreden bir organel reorganizasyonu ile fertilizasyon yeteneğini kazanmaları olarak açıklanmaktadır. Olgunlaşmamış oositler, fertilizasyon yeteneği olmayan, çekirdeğinde diploid sayıda ($2n$) kromozam taşıyan oositlerdir. Fertilize olabilmeleri için bir olgunlaşma periyodu geçirmeleri gerekmektedir. Oositlerin olgunlaşması, kromozom sayılarını yarıya indirecek iki mayoz bölünme (çekirdek olgunlaşması) ve bölünme sonrası dönemde ihtiyacı olan enerjinin üretimi için organel reorganizasyonunu (sitoplazma olgunlaşması) içermektedir (Ün ve Küplülü, 2005).

2.4.1. Nükleer Olgunlaşma

Nükleer olgunlaşmada çekirdeğin yıkımlanması (Germinal Vesicle Break-Down-GVBD), iğ oluşumu ve kutup hücrelerinin atılması olayları görülür (Küplülü ve Ün, 2001). Çekirdek olgunlaşması da denilir. Kromozomlar kutuplara doğru çekilerek iğ iplikçikleri oluşur. Nükleer olgunlaşma, her türe özgü bir sürede (sığırlarda 24-48

saat, insanda 16-28 saat gibi) tamamlanmakta, durması veya duraksamasının ise oositin dejenere olmasına yol açmaktadır. Başka bir tanımla, oositin Germinal Vezikül (GV) döneminden Metafaz-II (MII) dönemine geçmesi demektir. Primer oosit iki mayoz bölünme geçirerek olgunlaşır. İlk bölünmede iki hücre oluşur. Bunlardan ilki, stoplazmaya sahip olan gerçek oosit hücresidir. Diğeri ise stoplazması zayıf fakat bazı organelleri bulunan polar cisimciğidir. Birinci polar cisimciğini atan oosit ikinci metafaza geçmeye hazırlanır. Kromozomlar tekrar ekvatora toplanır. Oosit sırasıyla Metafaz-I (MI), Anafaz-I ve Telofaz-I aşamalarını geçirerek, birinci kutup hücrelerini atarak oosit-II adını alır. İkinci mayozun tamamlanması spermatozon penetrasyonu ile gerçekleşir. Bu aşamada ovulasyonla atılan oosit bir spermatozoidin zona pellusidaya tutunması ile ikinci kutup hücrelerini atar ve ovum adını alarak çekirdek olgunlaşmasını tamamlar. İkinci polar cisimin atılması sonucunda haploid kromozoma sahip olgun bir oosit elde edilmiş olur (n=30) (Anonim, 2010; Küplülü ve Ün, 2001; Akyol, 2006; Ün ve Küplülü, 2005) .

2.4.2. Sitoplazmik Olgunlaşma

Sitoplazmik olgunlaşmada ise oositin GV döneminden MII' ye kadar geçen süredeki yapısal değişiklikler söz konusudur. Bu değişimler, oositin normal fertilizasyonu, bölünmeye başlaması ve blastosist safhasına kadar ulaşmasında indirekt olarak etkilidir. Sitoplazma olgunlaşmasında, sitoplazma içerisinde yer alan organellerde yer değiştirme, farklı fonksiyon kazanma, sayılarında değişiklik gibi olaylar gözlenir ve çekirdek maturasyonu ile eş zamanlı şekillenir ve döllenebilme yeteneğinin kazanılmasında çekirdek olgunlaşmasının tamamlayıcısı olduğu belirtilmektedir (Shamsuddin ve ark., 1993; Ferreire ve ark., 2009).

2.5. *In vitro* Oosit Olgunlaşması

Oositlerin aspire edildikleri follüküllerin büyüklükleri, kümülüs hücrelerinin varlığı, kümülüs-oosit komplekslerinin morfolojisi, oosit büyüklüğü, ovaryum kaynağı (canlı hayvan ya da mezbaha materyali), ovaryumların alındıkları hayvanların yaşı,

vücut kondüsyonları, östrus aşaması ve gebelik durumu gibi faktörler sığırlarda oositlerin *in vitro* olgunlaşma başarısını indirekt olarak etkilemektedir.

Thompson (1997), oositlerin aspire edildikleri folliküllerin büyüklüklerinin artmasının olgunlaşma başarısını olumlu etkilediğini bildirmiş, Sirard ve Blondin (1996), 2 mm'den küçük ve 6 mm'den büyük folliküllerden ve elde edilen oositlerin olgunlaşma başarısının yüksek olduğunu belirtmiştir. Shamsuddin ve ark., (1993) ile Sirard ve Blondin (1996), kümülüs-oosit komplekslerinin morfolojisinin *in vitro* maturasyon üzerine çok etkili olduğunu bildirmiş ve bu durumun kümülüs hücrelerinin oositin besin köprüsü olmasına bağlamışlardır.

In vitro olgunlaşma, *in vivo* olgunlaşmadan daha hızlı seyreder. İnek oositlerinden *in vitro* olarak embriyo elde edilmesi genellikle mezbahaneden toplanan ovaryumların alınmasıyla gerçekleşmektedir (Küplülü ve Ün, 2001).

Oositlerin daha iyi oranlarda fertilize olabilmeleri ve embriyoların daha sonraki gelişimlerini garantileyebilmek için olgunlaşma ortamlarının yapısı oldukça önemlidir. Bu nedenle oositin gerek sitoplazmik ve gerekse kromozomal olgunlaşmayı destekleyebilmek için aminoasitler, mineral maddeler, vitaminler, proteinler, enerji maddeleri ve çeşitli hormonlar ile insülin, epitel büyümeyi uyarıcı faktör (EGF) gibi gelişimi destekleyici faktörlerin ortamda bulunması gerekmektedir. Olgunlaştırma amacıyla kullanılan ortamlar, sığır oositlerinin ikinci metafaza ulaşmasını sağlamakta, aynı zamanda normal fertilizasyon gerçekleştirebilecek yeteneğe ulaşmasına ve embriyo oluştuktan sonra gösterdiği gelişim performansına da etki etmektedir (Akyol, 2006).

Oosit olgunlaştırmak amacıyla, hormonlardan daha çok FSH ve LH kombinasyonu kullanılmaktadır (Galli ve ark., 2003). LH oositin gelişimine pek etkisi olmamakla birlikte erken embriyonik gelişimi için gerekmektedir. Nakagawa ve Leibo (1997) tek başına LH'nin kullanıldığı durumlarda maturasyon oranının önemli düzeyde arttığını vurgulamıştır. Kültür ortamına katılan LH oositin besinsel çevresini değıstirmektedir. Olgunlaştırma ortamına katılan FSH erken embriyonik gelişim aşamasında, mayotik gelişimde ve fertilizasyonda etkili olmaktadır (Eyestone ve Boer 1993). Östrojen ve progesteron FSH ve LH ile birlikte kullanılmaktadır ve olgunlaşmayı olumlu yönde etkilemektedir (Anonim, 2010).

Embriyo kültüründe, ortamda protein olmaması durumunda istenmeyen değışik türde metabolik aktiviteler ve gelişim yeteneğinin düşmesi gibi olumsuzluklar gözlenir.

In vitro fertilizasyon protokollerinde en çok kullanılan protein kaynağı sığır serumu ve sığır serum albuminidir (BSA). Protein kaynağı olarak kullanılan maddeler, kullanılan ortamlara değişik besin maddelerini, hormonları, büyüme faktörlerini, proteinleri ve yağ asitlerini birlikte sağlayan en önemli unsurlardır. Potansiyel olarak serum, oosit ve embriyo için gerekli olan birçok besin maddesini içermekle birlikte hücre kültürü için kullanıldığında toksik etkileri olduğu bildirilmektedir (Maurer, 1992). Toksik etkilerin ortaya çıkma sebebi olarak, serum elde edilirken uygulanan işlemlerin (pıhtılaştırma) serumda bulunan bazı maddelerin kimyasal yapısında değişiklikler oluşturması olarak açıklanmıştır. Serum kullanımının granüloza ve teka hücrelerinin lüteinizasyonuna sebep olduğu ve östrojen üretimine zarar verdiği bildirilmektedir (Allegrucci ve Hunter, 2003). Buzağılardan, atlardan ve insanlardan elde edilen serumlar embriyo kültürü ortamlarında besin maddeleri sağlaması amacı ile kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda kültür ortamlarına Buzağı Serumu (FCS) ilave edilmesi blastosist üretimini olumlu yönde etkilediği fakat elde edilen embriyoların kalitesinin çok iyi olmadığı bildirilmektedir. (Van Langendonck ve ark., 1996; Carolan ve ark., 1995). Gardner ve Lane (1999) serumun olumsuz etkisinin özellikle normal olmayan blastosel formasyonunda, anormal mitokondri yapılanmasında, düşük hücre sayısı ve embriyo metabolizmasındaki anormalliklerle ortaya çıkmakta olduğunu bildirmişlerdir. *In vitro* embriyo üretiminde serum kullanılarak elde edilen embriyoların transfer edilmesi durumunda ortaya çıkan diğer bir önemli sorunda doğan yavruların anormal derecede büyük olmasıdır (Thompson ve ark., 1995; Sinclair ve ark., 1998). Bu duruma serum içerisindeki hangi spesifik faktör yada faktörlerin sebep verdiği belirlenmiş değildir. Ancak serumda yer alan büyüme faktörleri, serbest radikaller, amonyak ve progesteron gibi maddelerin bu duruma sebep verebileceği bildirilmiştir (Young ve ark., 1998).

2.6. Arı Sütünün Seruma Alternatif Olarak Oosit Ogunlaştırılmasında Kullanılması

Arılar bal, propolis ve arı sütü gibi önemli ürünleri insanların ihtiyaçlarına sunmaktadırlar. Arı sütü ana işçi arılar tarafından arı embriyolarının beslenmesi amacı ile üretilmekte olan doğal bir üründür. Arı sütü kimyasal içeriği bakımından oldukça besleyici bir yapıda olup beyaz krem renginde ekşimtrak tatta protein, karbonhidrat,

değişik yağ asitleri (kısa zincirli) ve mineral maddeler bakımından zengin bir üründür (Schmidt ve Buchmann, 1992) .



Şekil 2.1. Arı sütünün doğal yolla üretimi

Arı sütünün yapısında değişik doğal hormonlar, vitamin A, B, C, D ve E oldukça zengin miktarda mevcut olup tüm esansiyel aminoasitleri de içeren 20 den fazla amino asit bulunmaktadır. Yaşamın temel taşı olan proteinlerin arı sütünde buldukları oranlar insanlardan elde edilen serumlardaki proteinlerde bulunan oranlara paralel olarak bulunmaktadır. Bu özellik, oositlerin veya embriyoların arı sütündeki maddelerden kültür ortamında kullanılması durumunda kolayca faydalanılabileceğini göstermektedir. Arı sütünün önemli özellikleri arasında vücutta zarar gören hücre ya da dokuları normaleştirici ve tamir edici olması, seksüel kapasitesiyi artırması, hastalıklara direnci artırması, antioksidatif etkisi ile serbest radikallerin hücre üzerinde oluşturduğu anormallikleri gidermesi, metabolizmayı stimüle etmesi gibi özellikler yer almaktadır. Arı sütünde royalisin ve jellenies gibi antibiyotik özelliğe sahip maddeler mevcut olup bakteriyel kontaminasyonlara karşı etkili olduğu bildirilmektedir (Fujivara ve ark., 1990; Fontana ve ark., 2004).

Arı sütü, üreme ile ilgili değişik konularda denemek üzere kullanılmıştır. Yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar arı sütü içerisindeki steroid yapıdaki maddelerin östrojen reseptörlerine bağlanarak östrojenik aktivitelerin ortaya çıkmasına sebep olduğunu bildirmektedir (Mishima ve ark., 2005). Koyunlarda yapılmış olan bir senkronizasyon denemesinde progesteronla birlikte arı sütü kullanımının kızgınlığı ve gebelik oranlarını arttırdığı bildirilmiştir (Kridli ve ark., 2003). Ayrıca, fare

morularının dondurulmasında kullanılan koruyucular arasına arı sütü eklenmesinin canlılık oranlarını arttırdığı bildirilmiştir (Visintin ve ark., 2000).

2.7. Oosit Dondurma

2.7.1. Dondurma Mekanizması

Hücrelerin dondurulmasında suyun biyolojik formunun değişimi (transformasyon) söz konusudur. Yani dondurma, suyun biyolojik olarak kristalleşmesi, şekil değiştirmesi ile gerçekleşir. Hücrelerin dondurulma işlemi sırasında ekstrasellüler solüsyon kendiliğinden veya etkime (seeding) ile -5 ila -100 °C' de kristalleşir. Ancak intrasellüler ortam hücre membranının etkisiyle henüz donmamıştır. Söz konusu oluşum sırasında ekstrasellüler suyun buzlaşması nedeniyle ortamda bulunan maddelerin yoğunluğunda artış oluşur. Bu durum kimi kimyasal maddelerin hücre içinde ve dışında farklı yoğunlukta bulunmalarına yol açar. Meydana gelen farklı yapı ya da denge nedeniyle bir kısım sıvının hücre dışına çıkması (dehidrasyon) ile bu kez de hücre içinde bulunan bir kısım erimiş maddelerin yoğunluğunda yükselme meydana gelir ve hücre içerisinde de kristaller oluşur. Açıklanmaya çalışılan oluşumlar hücrelerin dondurulmasında olduğu gibi çözdürülmesinde de (ters yönde ve dekrizalizasyon halinde) soğutma hızının etkisine bağlı olarak az ya da çok meydana gelir (Bucak ve Tekin 2007).

Hücre membran bütünlüğü ve normal yapısı hücrenin metabolik fonksiyonları için mutlak gereklidir. Normal vücut ısısında hücre membran yapısı lamelli, iki sıralı fosfolipit yapısında ve dizilmiş proteinlerden oluşur. Ortamın ısı değişimleri (özellikle düşme) direk sözkonusu membran yapısını etkilemesi (soğuk şoku) ile birlikte metabolik olaylarda azalma, sapma, düşme, intrasellüler iyon ve molekül kayıplarına yol açar (Bucak ve Tekin, 2007) .

2.7.2. Dondurma Yöntemleri

Oosit dondurmada kullanılan yöntemler; geleneksel yavaş dondurma (slow freezing), hızlı dondurma vitrifikasyon (vitrification) yöntemleridir. Geleneksel bir yöntem olan yavaş dondurmada, çok pahalı ve komplike cihazlara gereksinim vardır. Vitrifikasyonda ise buz kristallerinin hiç şekillenmediği vitroz ya da camsı bir durum yaratılarak, hücrelerin, dokuların ve organların direkt olarak sıvı azot içerisine daldırılmasıyla dondurulmaları sağlanmaktadır (Sağırkaya ve Bağış, 2003).

2.7.2.1. Yavaş Dondurma

Geleneksel yavaş dondurmayla ilgili ilk çalışmalar Whittingham ve ark. (1972) tarafından yapılmıştır. Embriyoları düşük konsantrasyonlu (1–2 mol/L) hücre zarından geçebilen kriyoprotektanlarla yavaş bir şekilde soğutmuş ve daha sonra sıvı nitrojenle dondurmuştur (0,3–0,5°C/min). Bu metod daha sonra Mazur (1990) tarafından geliştirilmiş ve şu anda kullanılan haline dönüştürülmüştür. Geleneksel yavaş dondurmada hücre içi buz kristallerinin oluşumunu engellemek ve ozmotik hasarı en aza indirmek için sıcaklık düşüşü yavaş olmaktadır (Friedler ve ark.,1988). Burada hücre içindeki su tamamen dehidre edilir. Bu yöntemde seeding denilen uygulama yapılır. Buna göre; hücre içine nüfuz eden düşük molekül ağırlıktaki kriyoprotektanlar kullanılarak donma ve çözme sırasında hücre içi buz kristallerinin oluşumu engellenir. Hücre içeriği kriyoprotektanlarla dengelenerek sıcaklığın 0°C'nin altına düştüğü durumlarda buz kristallerinin gelişimi, spesifik buz çekirdeklerini oluşturan proteinlerce başlatılır ve bu şekilde ani ve hızlı soğumayla birlikte kendiliğinden ve kontrolsüz biçimde buz çekirdeklenmesinin şekillendiği dönemde hızlı dondurmanın zararlı etkilerini önlenmiş olur. Seeding geleneksel yöntemle kryoprozervasyonda çözme sonrası oositlerin canlılığı için gereklidir ve bu sıcaklıkların çok dikkatli geçilmesi gerekmektedir. Bu küçük buz kristallerinin hücreye geri dönüşsüz zarar verecek olan büyük buz kristallerine dönmemesi için sıcaklık dakikada en fazla 2°C düşürülür (Chen ve Yang, 2009; Çetin, 2004; Sağırkaya ve Bağış, 2003) .

Ancak bu yöntemde hücreler, kryoprotektanlar olarak adlandırılan oositleri dondurma ve çözme işlemleri sırasında soğuk şokundan koruyan maddelerin toksik etkisine uzun süre maruz kalmakta ve dondurma sırasında intrasellüler buz kristalizasyonu oluşumundan dolayı zona pellusidada kırılma, hücre membranları ve iskelette bozulma ve metabolik bozukluklar meydana gelmektedir. Geleneksel yöntemle dondurulmuş sığır embriyosundan ilk buzağı Wilmot ve Rowson (1973) tarafından elde edilmiştir.

2.7.2.2. Vitrifikasyon

Son yıllarda vitrifikasyon oosit dondurmada yavaş dondurmaya alternatif olarak kullanılmaya başlanmıştır (Moussa ve ark., 2005; Hurt ve ark., 1999;)

Fiziksel olarak vitrifikasyon bir solüsyonun buz kristaline dönüşmeden düşük sıcaklıkla dondurulmasıdır. Vitrifikasyon yöntemi yüksek oranda kryoprotektanlarla konsantre (% 40 ve daha yüksek) edilmiş dolayısıyla viskozitesi artırılmış vitrifikasyon solüsyonunda (kryoprotektan solüsyonu) ve buz kristalizasyonunu önlemek için hızlı dondurma (soğutma) oranları (15,000-30,000°C/dakika) uygulanarak hücrelerin cam benzeri bir yapıda dondurulması işlemidir (Uysal, 2007). Önceleri 0,25 ml lik payetlerin direk sıvı azot içerisine daldırılmasıyla dakikada 2500°C/dk ısı düşüşü sağlanmaktaydı. Fakat bu şekilde zonada kırılmalar oluşmuyor ve bunu önlemek için kriyoprotektanlar kullanılmıştır. Vitrifikasyon, yavaş dondurmada oluşan zararları önlemek için geliştirilmiş bir yöntemdir (Vajta, 2000). Yapılan çalışmalarda, vitrifikasyonun dondurma sırasında sıcaklığın yavaş düşürülmesi sonucu oluşan buz kristalleri, ozmotik zarar, kriyoprotektanların toksik etkisi, soğuk zararı zona kırılması, intraselular organellerin yapısal değişiklikleri hücrenin iskelet yapısında bozukluklar oluşması gibi sonuçları elemine ettiği bildirilmiştir. Yavaş dondurmanın tersine oositlerin kısa sürede gerçekleştirilen dehidrasyonundan hemen sonra intrasellüler ve ekstrasellüler buz kristal formasyonunu önlemek için oositleri bulduran payetler hemen sıvı azota daldırılmaktadır. Vitrifikasyon pahalı aletlere, zaman ve işçiliğe ihtiyaç olmadan oositlerin - 196°C'daki sıvı azota daldırılarak kolayca dondurulabildiği en son teknolojidir (Uysal, 2007).

Vitrifikasyonda soğutma ve ısıtma hızları yüksek olduğu için kriyoprotektanlara maruz kalma süresi de azaldığından bunların toksik etkisi giderilmiş olmaktadır. Ayrıca oositler için geri dönüşümsüz zarar veren +15 ve -15 derece arasındaki sıcaklıklar çabuk geçildiği için buradaki zarar önlenmiş olur (Tucker ve Liebermann, 2007; Vajta, 2000).

Vitrifikasyonun da çeşitli yöntemleri geliştirilmiştir. Hücrelerin vitrifikasyonu ilk olarak 0,25 ml'lik payetlerde yapılmışken, daha sonraları yüksek termal ileticiliği olan cam mikropipetlerde (GMP), açık payetlerde (OPS) ve son yıllarda gel loading tip (GL-tip), cryoloop ya da cryotoplar içerisinde mikrodamlalarda dondurulmaktadır (Uysal., 2007). Ayrıca katı yüzey vitrifikasyonu (SSV) (Begin ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2009; Gupta ve ark., 2007), kapalı payet istemi (CPS) (Chen ve ark., 2000) ve elektron mikroskop ızgaraları yöntemleri de başarıyla uygulanmıştır (Martino ve ark., 1996).

Drosophila melanogaster embriyolarının vitrifikasyonunda elektron mikroskop ızgarasının (electron microscope grid) taşıyıcı araç olarak başarıyla kullanılmasının ardından (Mazur ve ark., 1992), Park ve ark. (1999), sığır oosit ve embriyolarının da vitrifiye edilebileceğini göstermişlerdir.

Kryotop metodu son zamanlarda yaygınlaşmış bir metottur. Bu yöntemle yapılan hemen hemen tüm çalışmalarda yavaş dondurmaya göre in vitro gelişim, gebelik ve doğum oranları açısından çok daha yüksek başarılar elde edilmiştir. İnsan oositi üzerine yapılan bir çalışmada % 89,2 oositlerde canlılık oranı elde edilmiş ve embriyo transferi sonucunda % 56,5 oranında gebelik elde edilmiştir (Lucena ve ark., 2006).

Chen ve ark. (2000), yaptığı bir çalışmada OPS, CPS ve grid yöntemlerinin karşılaştırılmasıyla; oositlerin canlılık oranları, mayotik iğlerin gördüğü zararlar ve fertilizasyon yetenekleri test edilmiştir. Yapılan bu çalışmanın sonucunda kullanılan vitrifikasyon yöntemlerinin üçünde de yüksek canlılık oranları elde edilmiştir. Bu çalışmada CPS yöntemiyle dondurulan oositlerde daha yüksek canlılık oranı elde edilmiştir.

Dinnyes ve ark. (2000) tarafından geliştirilen katı yüzey vitrifikasyonunda (SSV) ise sıvı azot içerisine kısmen batırılmış ve alüminyum folyo ile kaplanmış olan metal cismin üzerine oositleri içeren 1-2 µl'lik vitrifikasyon solüsyon damlalarının damlatılmasıyla donma hızı daha da artırılmıştır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada (Bağış ve ark., 2002), pronükleer dönemdeki fare embriyolarına SSV ile vitrifiye edilip

çözündürüldükten sonra pronükleer DNA mikroenjeksiyonu yöntemi ile gen transferi yapılmış ve transfer işlemi sonucunda transgenik yavru fare elde edilmiştir. Bu yöntemle çeşitli hayvanların oosit ve embriyolarının başarı ile dondurulduğu değişik çalışmalarda bildirilmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada keçi oositleri SSV ve cryolop yöntemleriyle dondurulmuş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. SSV yöntemi teknikte biraz daha zor olduğu için uygulamada güçlük çıkabilmektedir (Begin ve ark., 2002).

OPS yönteminde içerisinde oosit bulunan vitrifikasyon solüsyonundan 1µl alınarak sıvı nitrojene daldırılır (Vajta ve ark., 1998). Bu yöntemde normal 0.25 ml'lik payetler orta kısımlarından sıcak bir yüzey üzerinde ısıtılmış ve daha sonrasında her iki uçtan çekilerek payetin uzaması ve orta kısmın incilmesi sağlanmıştır. Payetler orta kısımdaki en ince noktadan jilet ya da benzeri bir kesici ile kesilerek vitrifikasyon işlemi için hazır hale getirilmiştir. İçerisinde embriyo ya da oositlerin bulunduğu 1-2 µl'lik vitrifikasyon damlacıkları payetin dar ucunun yaklaştırılması sonucunda kapiller çekim etkisiyle payet içerisine alınmış ve direkt olarak sıvı azot içerisine daldırılmıştır. Böylece, dakikada 20.000°C'nin üzerinde bir soğutma hızına ulaşılmış ve sıvı azotta dondurma işleminden önce vitrifikasyon solüsyonu içerisinde bekleme süresi bakımından da 30 saniyenin altına inilmiştir (Sağırkaya ve Bağış, 2003).

Kuleshova ve ark. (1999), OPS yöntemiyle insan oositi dondurmuş ve gebelik elde etmişlerdir. Diğer vitrifikasyon yöntemleriyle ilgili çalışmlar yapılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Kong ve ark. (2000), glass micropipettes (GMP) yöntemiyle fare blastosisti dondurmuştur.

Bütün bu yöntemlerin ortak özelliği düşük volümlü solüsyonların alınması ve dondurma sırasında ısının çok hızlı bir şekilde düşürülmesidir. Çizelge 2.1.' de bazı vitrifikasyon yöntemlerinin dondurma ve çözündürme sırasındaki ısı oranları ve alınan solüsyon volümü verilmektedir.

Çizelge 2.1. Bazı vitrifikasyon yöntemlerinin karşılaştırılması

Vitrifikasyon yöntemleri	Volüm (µL)	Soğutma oranı (°C/dk)	Isıtma oranı (°C/dk)
0,25likpayetler (RallveFahy,1985)	25	2500	1300
OPS (Vajta ve ark. 1998)	1	16700	13900
Cryotop (Kuwayama ve ark2005)	0.1	23000	42100
Cryotip (Kuwayama ve ark.2005)	1	12000	24000

2.7.3. Kriyoprotektanlar

Kriyoprotektanlar dondurma ve çözündürme uygulamaları sırasında hücrelerde oluşabilecek zararları önlemek amacıyla kullanılan kimyasal maddeler olarak tanımlanmaktadır (Polge ve ark., 1949). Kriyoprotektanlar hücrenin dondurulmasında oluşan soğuk şoku zararına, intrasellüler kristal oluşumuna, çözüm esnasında dekristalizasyona ve gelişen membransel destabilizasyona karşı koruyucu amaçlı olarak kullanılır. Kriyoprotektanların en önemli özellikleri, düşük moleküler ağırlığa sahip olmaları ve toksik etkilerinin ancak belirli oranlarda katıldıklarında oluşmasıdır. Hücre dondurma ortamındaki kriyoprotektanların toksisitesini azaltmak için, hücrelerin kriyoprotektanlara maruz kalma süresinin kısaltılması ve iki veya daha fazla kriyoprotektan karışımı kullanılması gerekmektedir (Bucak ve Tekin, 2007).

Kriyoprotektan maddeleri, hücre membranından nüfuz edilebilme özelliklerine göre iki gruba ayrılır (Sağırkaya ve Bağış., 2003; Anchamparuty, 2007; Bucak ve Tekin, 2007)

1- Hücre zarından geçebilen, yani hücre içerisine nüfuz edebilen, Permeabl kriyoprotektanlar

2- Hücre zarından geçemeyen, yani hücre içerisine nüfuz edemeyen, Permeabl olmayan kriyoprotektanlar.

Hücre zarından geçebilme özelliğine sahip kryoprotektan olarak gliserol, etilen glikol, Dimetilsülfoksit (DMSO) 1,2 propanediol, 2,3 bütanediol, propilen glikol ve diğer bazı alkolleri örnek olarak sayılabilir. Hücre içerisine nüfuz edebilen kriyoprotektanlar düşük moleküler ağırlığa sahiptirler. Koruyucu etkileri donma esnasında ortamdaki elektrolit yoğunluğunu azaltmaları, dehidrasyonu düzenleyip protein yapılarını korumaları ve düşük sıcaklıkların yarattığı ozmotik büzüşmeyi azaltmaları ile oluşmaktadır. Donmanın gerçekleşmesinden önce, ozmotik basınç farkından dolayı, hücreler içerisindeki sıvı kriyoprotektan maddeler ile yer değiştirir ve böylece hem hücre hacmindeki değişiklikler azaltılarak hem de hücreler içerisindeki buz kristallerinin oluşumu minimum düzeye indirilerek dondurma işlemi sırasında hücrelerin zarar görmesi minimum düzeye indirilir (Sağırkaya ve Bağış., 2003).

Hücre içine nüfuz edemeyen kriyoprotektanlar ise, kendi aralarında iki ayrı gruba ayrılabilir. Bunlar; hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı (glukoz, sükroz, rafinoz, galaktoz ve diğer bazı şekerler) ve yüksek molekül ağırlıklı (polivinil alkol; PVA, polivinil pirrolidon; PVP ve diğer bazı polimerler) kriyoprotektanlardır (Sağırkaya ve Bağış, 2003).

Hücre içine nüfuz edemeyen düşük molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar donma işlemi süresince şekillenen buz kristalleri oluşumunu azaltan etkilerini, soğutmadan önce hücreleri dehidre ederek gösterirler (Sağırkaya ve Bağış, 2003).

Hücre içine nüfuz edemeyen yüksek molekül ağırlıklı kriyoprotektanlar ise, hücrelerin dondurulması ve çözündürülmesi sırasında oluşan buz kristallerinin şekil ve büyüklüklerini zararsız olacak biçimde değiştirerek etkilerini gösterirler. Bu kriyoprotektanlar, membranların sıvı ve katyonlara karşı permeabilitesinde artış yaparak, ozmotik strese karşı hücre membranları esnek hale getirir. Ayrıca, hücrede donma/çözünme esnasında gelişen lipit peroksidasyonunu azaltmaya çalışırlar. Bunlar, makromoleküller ve sakkaritler olarak ikiye ayrılır. Makromoleküllerinden en çok kullanılanları şunlardır: Polietilen glikol, ficoll, BSA, dekstran, mannitol ve polivinilpirrolidon, glukoz, sükroz, trehaloz ve rafinozdur (Sağırkaya ve Bağış, 2003; Çetin, 2004).

1990'lı yıllara kadar vitrifikasyon mediumunda kriyoprotektan olarak DMSO, ve gliserol kullanılırken, daha sonraları bunun yerini düşük toksisiteli olmalarından dolayı 1,2-propanediol, propilen glycol, ethylene glikol (EG) ve sukroz almıştır (Park ve ark.,

1999). Vitrifikasyon solusyonunda EG ilk kez Miyamoto ve Ishibashi (1978) tarafından kullanılmıştır. Etilen glikolün molekül ağırlığı (67,07g/mol) gliserol (92,10g/mol), propilen glikol (76,10 g/mol) ve DMSO (78,13 g/mol) ile karşılaştırıldığında daha düşüktür ve oositler için yüksek ölçüde permeabildir. EG solusyonu genellikle sukroz, glukoz, fruktoz, sorbitol, trehaloz veya rafinoz gibi şekerlerle kombine edilerek kullanılır. Sukroz ve trehaloz gibi en çok tercih edilen disakkaridlerin molekül ağırlıkları büyük olduklarından hücre içine penetre olmazlar ve kombine edildikleri diğer kriyoprotektanların solusyon içindeki miktarının düşürülmesini sağlayarak toksisiteyi azaltırlar. Ayrıca sukroz katıldığı ortamda ozmotik buffer olarak rol oynar ve oositler üzerindeki ozmotik hasarı azaltır (Uysal, 2007).

Porcu ve ark. (2001), yaptığı bir çalışmada oositlerde 1,5 M PROH ve 0,2 M sükrözlü vitrifikasyon ortamıyla yapılan çalışmada dondurma çözündürme sonrası

% 59 canlılık oranı elde edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada sükröz oranı yüksek olan 0,3 M kriyoprotektana 15 dakika maruz bırakılan oositlerde % 82 canlılık elde edilmiştir (Fabbri ve ark., 2001). Rall ve Fahy (1985), 8 hücreli fare embriyolarını yavaş dondurma yöntemiyle % 20,25 DMSO, % 15,5 asetamit ve % 10 propilen glikol ve % 6 polietilen glikol kullanarak dondurma gerçekleştirmişler ve başarılı olmuşlardır.

Ali ve Shelton (1993), 300 kriyoprotektan kombinasyonunu test ederek en uygun ve en düşük toksisiteye sahip solusyonları oluşturmak için çalışmışlar yapmışlar ve bu şekilde 14 vitrifikasyon solüsyonu formüle etmişlerdir. Chen ve ark. (2000), ise bu formüllerden 5,5 M EG ve 1,0 M sükröz kullanarak insan oositi dondurmuş ve yavaş dondurmayla yüksek canlılık oranı elde etmiştir.

EG düşük toksisitesi ve hücre membranından kolayca geçebilme yeteneğinden dolayı önemli bir kriyoprotektandır ve oosit olgunlaşmasını pozitif yönde etkilemektedir (Çetin ve Baştan, 2006). Ama genelde kriyoprotektanlar karıştırılarak kullanılır ve toksik etki azaltılmış olur.

Checura ve Seidel, (2007), yaptıkları çalışmada in vitro koşullarda olgunlaştırılmış oositler dondurulup çözözüldükten sonra fertilizasyona alınmış ve daha sonra kültür edilmiştir. OPS yönetiminin kullanıldığı bu çalışmada vitrifikasyon solüsyonlarına makromoleküller eklenmiştir (BSA, Ficoll, PVP, and PVA) Çalışmanın sonucunda solüsyonlara makromoleküllerin eklenmesi uygun görülmüştür. Makromoleküllerinin eklendiği solüsyonda diğer eklenmeyen solüsyona göre daha

yüksek blastosist oranı elde edilmiştir. Makromoleküllerinin toksiteyi azalttığını ve soğuk zararının bu şekilde engellenebileceğini bildirmişlerdir (Checura ve Seidel, 2007).

2.7.4. Oositin Mayotik Devresi

Oositlerin kriyoprezervasyondan sonra canlı kalma durumunu etkileyen önemli faktörlerden biri de oositin mayotik evresindeki gelişimlerdir. MII safhasındaki oositlerde soğuk zararı genelde mikrotübüllerde ve mikrofilamentlerde görülmektedir. olgun oositler bu sebepten dolayı olgunlaşmamış oositlere göre daha hassastırlar. Fakat daha yüksek embriyo elde edilmektedir. MII dönemindeki oositlerde oluşan mayotik iğlerin gördüğü zararı engellemek için bazı araştırmacılar, GV döneminde oositlerin dondurulmasını uygun bulmuşlardır (Kuleshova ve Lopata, 2003).

2.7.5. Soğuk Zararı

Tek bir hücre olan oosit çok hücreli olan embriyoya göre çevresel etkilere daha çok duyarlı olduğu için oosit dondurma embriyo dondurmaya göre daha zordur. Oositte bulunan zona pellusida geçirgenliği azalttığı için kriyoprotektanların ve suyun geçişi zor olmaktadır bu da oosit dondurmaya zorlaştırmaktadır. Kriyoprotektan ve suyun hücrede yer değiştirmesini zorlaştıran bir diğer özellik ise düşük yüzey hacmine sahip olmasıdır (Leibo, 1981)

Oositlerdeki soğutma zararlar, hiperozmotik stres, soğuk şoku stresi, ozmotik büzüşme-şişme sonucu oluşmaktadır. Hiperozmotik çevrenin yaratılmasında ortam pH'sı, sellüler dehidrasyonda artış, hücre membranı protein-lipit kompleksinin zayıflaması önemli yer tutar. Donma esnasında, oosit ve embriyoda oluşan koyu lipit damlacıklarının soğuk şoku hasarıyla ilgili olduğu düşünülmektedir. Oosit zararı ise, sitoplazmanın ve sitoplazmik membranın fazla oranda lipit içermesinden dolayı donma-çözünme işlemine duyarlı olmasından kaynaklanmaktadır. Donma işleminde etkili en önemli faktör hücrede oluşan ozmotik strestir. Donma sırasında hiperozmotik ortam

oluşmasına rağmen, çözüm esnasında kristalizasyonun ortadan kalkmasıyla bu ortam azalmaktadır. Ozmotik stres, intra/ekstrasellüler ortamdaki ozmotik farktan ileri gelmektedir. Bu ozmotik farklılığın hesaplanması, hücreden hangi oranda suyun uzaklaştırılmasında önemlidir. Suyun uzaklaştırılma oranı ise doğrudan ortama katılacak kryoprotektan yoğunluğuyla ilişkilidir. Kryoprotektanların ilavesi ortamın hiperozmotik olmasına, hücre membranından içeriye girmesiyle hücrede dehidrasyonun şekillenmesine neden olmaktadır. Kryoprotektanların uzaklaştırılmasında hücreler tekrar şişmekte ve izozmotik hacme ulaşmaktadır. Bu tekrarlanan değişimler kritik noktaları geçtiğinde, hiperozmotikliğe bağlı geri dönüşümsüz membran yıkımı oluşur. Bu durumun önüne geçmek için ortama kademeli olarak kryoprotektanların ilavesi ve oosit/embriyoların permeabl olmayan kryoprotektan içeren sıvılarla muamele edilmelerini gerektirmektedir (Bucak ve Tekin, 2007).

Mazur ve ark. (1990), ortaya attığı iki faktör hipotezine göre; hızlı soğutma zararı, hücrede şekillenen kristalleşmeyle ilgilidir. Yavaş soğutma zararı ise hücrenin kryoprotektanlara uzun süre maruz kalmasında ya da aşırı büzüşmesinde oluşmaktadır.

Bu çalışmada önemli bir protein kaynağı olan arı sütünün; oosit olgunlaştırmada seruma alternatif olabileceği düşünülerek, oosit olgunlaştırılmasına, dondurulmasına ve fertilizasyona etkileri araştırılacaktır.

3.MATERYAL VE YÖNTEM

Araştırmanın materyalini Antakya Belediyesi'ne ait mezbahaneye ve özel bir mezbahaneye kesim için getirilen Siyah-Beyaz Alaca olan sığır ovaryumlarından elde edilen oositler oluşturmuştur.

3.1. Materyal

3.1.1. Arı Sütünün Temini

Çalışmanın ilk bölümünde, fakültemizde mevcut olan kovanlardan veya Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni bölümü arılarından arı sütleri toplanarak, kimyasal içeriklerini (karbonhidrat, protein, yağ asitleri, vitaminler ve mineral maddeler) belirlemek amacı ile depolanmış ve oosit olgunlaştırmada arı sütlerinin değişik oranları kullanılarak en uygun oran ve buna uygun protokoller belirlenmesi hedeflenmiştir.

3.1.2. Ovaryumların Laboratuara Getirilmesi

Mezbahannede kesilen sığırlardan, kesimden hemen sonra bir bıçak yardımı ile alınan üreme organı üzerine bulunan ovaryumlar bir makas ile kesilmiş, üzerindeki fazla yağ ve dokular alınarak, içerisinde 35-39 °C' de fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) bulunan termos içerisine konulmuşlardır.



Şekil 3.1. Mezbahanede ovaryumların alınması

En fazla 5-6 saat içerisinde laboratuara getirilmişlerdir. Ovaryumlar, önceden hazırlanmış saf su (38°C) ile iyice yıkanmışlar ve içerisinde PBS olan steril cam bir behere alınarak 38°C etüve bırakılmışlardır.



Şekil 3.2. Laboratuara getirilen ovaryumlar

3.1.3. Oositlerin Elde Edilmesi

Mezbahaneden alınan ovaryumlardan oositler çeşitli şekillerde elde edilir. Bu yöntemler;

Aspirasyon Tekniği: Pratik oluşu için en çok kullanılan yöntemdir. 18 veya 21 G'lik iğne takılı 5 veya 10 ml 'lik enjektörlerle 2-8 mm çapındaki foliküllerden sıvının çekilmesiyle oosit elde edilmiştir. Ovaryum üzerindeki oositlerin % 30-60 'ı alınmış ve oositlerin morfolojik olarak uygun olanları denemelerde kullanılmıştır. Daha sonra oosit arama ortamında biriktirilen KOK'lar (Kümüllüs Oosit Kompleks), mikroskop yardımı ile morfolojik olarak değerlendirilmeye alınmış ve sadece sitoplazması düzgün olan, zona pellusida içini kaplayan, atretik olmayan kümülüs hücrelerine sahip olan ve etrafında yeterince kümülüs hücresi bulunan oositler olgunlaştırma için seçilmişlerdir. Seçilen bu oositler, üç kez arama ortamında yıkanmışlardır. Oositlerin olgunlaştırılacakları 4-gözlü kültür kaplarının her gözüne iki ayrı gruptan 500 µl' lik olgunlaştırma ortamı hazırlanmıştır. Daha sonra 2 saat süreyle 39 °C' de, havada % 5 CO₂ ve % 95 maksimum nemli atmosferde bu ortam gazlanmıştır.



Şekil 3.3. Aspire edilmemiş ovaryum



Şekil 3.4. Ovaryumların aspirasyonu

3.2. Yöntem

3.2.1. Olgunlaştırma İçin Kullanılacak Optimum Arı Sütü Seviyesinin Belirlenmesi

Arı sütünün literatürde mevcut olan kimyasal içerik değerlerine göre aşağıdaki oranlarda arı sütü içeren kültür ortamları hazırlanmıştır (Schmidt ve Buchmann,1992). Kontrol (K), Arı sütü 1 (AS1; % 10 Arısütü), Arı sütü 2 (AS2; % 5 Arı sütü), Arı sütü 3 (AS3; % 2.5 Arı sütü), Arı sütü 4 (AS4; % 1.25 Arı sütü), Arı sütü 5 (AS5; % 0.625 Arı sütü)

Hazırlanan ortamların (6 ortam) tümü için aynı anda yeterli miktarda oosit aspire edilemediğinden dolayı (mezbahada kesilen dişi hayvan sayısının az olması sebebiyle) öncelikle Çizelge 3.1. de gösterilen gruplar sırası ile kullanılmıştır. Elde edilen ilk bulgular, AS1 ve AS2 gruplarında bulunan oositlerin olgunlaştırma işlemi sonunda kümülüs açılımı göstermediği ve olgunlaşma gerçekleşmediğinden dolayı elimine edilerek çalışmalar diğer gruplar üzerinde yoğunlaştırılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan arı sütü grupları

Deneme Grupları
Kontrol vs AS1
Kontrol vs AS2
Kontrol vs AS3
Kontrol vs AS4 ve AS5

Oosit olgunlaştırma amacı ile değişik seviyelerde arı sütü içeren olgunlaştırma ortamları aşağıdaki şekilde hazırlanmışlardır. Hazırlanan ortamların test edilmesi amacı ile hücre kültüründe kullanılan TCM 199 ortamları içerisine %10 oranında serum (HYCLONE), FSH (5µg/ml) ve LH (5µg/ml) ilave edilerek kontrol grupları oluşturulmuştur.

3.2.2. *In Vitro* Oosit Olgunlaştırma

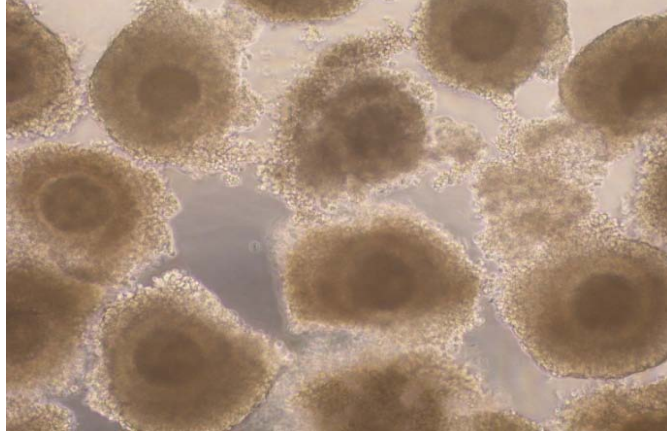
Oositlerin olgunlaşması için arı sütü içeren grup ve kontrol grubu olmak üzere; iki ayrı grup oluşturulmuştur. Olgunlaştırıldıktan sonra bu gruplar kendi aralarında ikiye ayrılarak, 4 grup elde edilmiştir. Kontrol gurubundan ve arı sütlü gruplardan, daha önce test edilen çeşitli arı sütlü ortamlar içinde en uygun olarak kabul edilen AS5 kullanılmıştır.

Hücre kültüründe kullanılan TCM 199 ortamları içerisine % 10 oranında buzağı serumu (HYCLONE) veya % 0,625 arı sütü bulunan iki grup oluşturulmuştur.

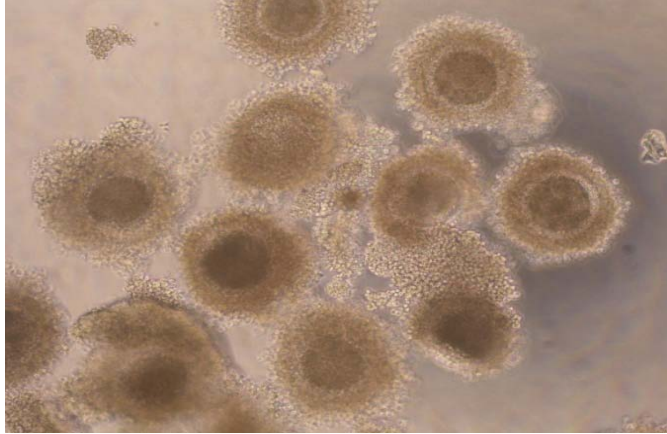
Çizelge 3.2. Denemede kullanılan olgunlaştırma ortamları

HYC	TCM 199 + % 10 Hyclone Serum (HYC)
AS5	TCM 199 + % 0,625 Arı sütü (AS5)

Morfolojik olarak normal kabul edilen oositler bikarbonat tamponlu ve ısıtılarak gazlanmış 500 µl olgunlaştırma ortamı içeren gözlere alınarak 39 °C'de, havada % 5 CO₂ ve % 95 nemli atmosferde ortalama 22 saat süreyle olgunlaştırılmışlardır.



Şekil 3.5. Olgunlaştırma için seçilen kümülüs oosit kompleksleri



Şekil 3.6. Olgunlaştırma için seçilmeyen kümülüs oosit kompleksleri

3.2.3. Oositlerin Boyanması

Oositlerin nükleer olgunlaşmaya erişip erişmediklerini tespit etmek amacı ile floresan boyama (Hoechst H33258) metodu tercih edilmiştir.

Floresan Metodu : 2 ng/ml floresan bis-benzimid boya (Hoechst H33258) PBS içersinde hazırlanmış ve kullanımdan önce 1 ile 5 oosit, 15 µl boya içeren solusyon

içersine alınmış ve 10 dak. süre ile inkübatör içersinde bırakılmıştır. Boyama işleminin sonunda oositler boya içermeyen 50 µl PBS damlalarında yıkanmış ve bir petri içersindeki 10 µl damlaya alınarak incelenmiştir.

3.2.4. Oositlerin Nükleer Olgunlaşmasının İncelenmesi

Hazırlanan lamlardaki oositler ters mikroskop (Olympus, CKX41) altında X40 oranında büyütülerek nükleer olgunlaşmaları incelenmiştir. Aynı şekilde mevcut ters mikroskopa (Olympus, CKX41) ait floresan ışık kaynağı ve UV filtre kullanılarak olgunlaşmalar tespit edilmiştir. Oositlerin MI, MII aşamalarına ulaşp ulaşmadıklarına bakılmıştır. Yürütülen bazı denemelerde, oositler kümülüs ekspansiyonu açısından da değerlendirilmiştir. Oositler kümülüs ekspansiyonu açısından Gordon (2003) tarafından belirtilen kriterle göre, 1.sınıf gözle görülebilir genişleme sağlayamayanlar, 2. sınıf kısmi genişleme yapanlar ve 3. sınıfta tamamen ekspansiyon gerçekleştirenler olarak üç grupta değerlendirilmiştir.

3.2.5. Oositlerin Vitrifikasyonla (OPS, Open Pulled Straw) Dondurulması

Önceki çalışmalarda uygun olarak belirlenen arı sütü konsantrasyonunun (AS5) bu dönem içersinde aspirasyon sonrası dondurulmuş oositlerin, olgunlaştırılması, olgunlaşmış oositlerin vitrifikasyonu ve fertilizasyonu üzerindeki etkilerin araştırılması hedeflenmiştir. Hazırlanan ortamların test edilmesi amacı ile hücre kültüründe kullanılan TCM 199 ortamları içersine % 10 oranında serum (HYCLONE) veya % 0,625 arı sütü ile L-glutamin (100 µg/ml, Sigma, G3126) ve 20 µl sodyum pirüvat (22 µg/ml, Sigma, S8636) 100µl (100 IU/100µg) antibiyotik (P/S) ve FSH (1µg/ml, Folltropin V) ilave edilerek iki grup oluşturulmuştur (Çizelge 3.3.).

Aspirasyondan sonra olgunlaştırılmadan dondurulan oositler, çözdürüldükten sonra kontrol ve arı sütlü olgunlaştırma ortamlarına alınmış ve olgunlaştıktan sonra fertile edilmişlerdir. Arı sütlü ve serumlu ortamlarda olgunlaştırılan oositlerin bir kısmı da vitrifikasyon yöntemiyle payetlerde (Vajta ve ark., 1998) dondurulmuş ve çözdürüldükten sonra fertilizasyona alınmıştır. Serumlu ve arı sütlü ortamda

olgunlaştırılan diğer grup ise karşılaştırma yapılabilmesi için dondurulmadan fertilizasyona alınmıştır.

Çizelge 3.3. Deneme planı

HYC –Kontrol	TCM 199 + % 10 Hyclone Serum (HYC)+ 100µl (P/S) FSH (1µg/ml)
HYC-Vitrifikasyon	TCM 199 + % 10 Hyclone Serum (HYC)+ 100µl (P/S) FSH (1µg/ml)
AS5 –Kontrol	TCM 199 + % 0.625 Arı sütü (AS5) + 100µl (P/S) FSH (1µg/ml)
AS5-Vitrifikasyon	TCM 199 + % 0.625 Arı sütü (AS5) + 100µl (P/S) FSH (1µg/ml)

Bütün solüsyonlar vitrifikasyona başlamadan 30-40 dakika önce laboratuvar sıcaklığa getirilerek, solüsyonlar kültür kaplarına aşağıdaki şekilde doldurulmuşlardır.

1. Göz: 800 µl (HM)
2. Göz : 800 µl (HM)
3. Göz : (VS1)
4. Göz : (VS2)

Ayrıca bir termos içersine sıvı azot hazırlanmış ve yine bu metod için özel olarak geliştirilen OPS payetler dondurmaya başlamadan önce deneme bilgilerine göre etiketlenmişlerdir. Olgunlaştırılmış oositler, sırası ile 1. göze, 2. göze ve 3. göze bırakılmışlardır. Bu sırada 4. gözden küçük bir volüm (20 µl) alınarak kültür kabı üzerinde bir damla hazırlanmış ve 3. gözden alınan oositler sırası ile bu damla içersine bırakılmış ve daha sonra bu damladan 2 µl volüm oositi de içerecek şekilde alınıp kültür kabı üzerinde bir yere bırakılmıştır. Önceden hazırlanmış olan OPS payetleri belli bir açı ile bu damlaya yaklaştırılmış ve oluşan kapılar güç ile bu damlanın ve oositin payet içersine yerleşmesi sağlanmıştır. Oositi içeren payetler direkt olarak sıvı azot içersine bırakılarak vitrifikasyon sağlanmıştır.



Şekil 3.7. OPS vitrifikasyonda kullanılan modifiye payetler

3.2.6. Oositlerin Çözdürülmesi

Sıvı azot içinden alınan payetler, 37 °C'deki suda 10 sn bekletilerek çözdürülmüştür. Çözünen payetler kurulanmış ve kapatılmış kısmı, bir makas yardımı ile kesilerek içeriği Çözdürme 1 ortamına alınmıştır. Burada 1,5 dk kadar bekletilen oositler stereo mikroskop altında Çözdürme 2 ortamına alınmıştır. Çözdürme 2'de 5 dk bekletilen oositler, son basamak için Çözdürme 3 ortamına aktarılmışlardır.

3.2.7. *In Vitro* Fertilizasyon

Dört gruptan oluşan oositler, W2 solüsyonunda üç kez yıkandıktan sonra, fertilizasyon solüsyonundan hazırlanan ve üzeri mineral yağla kapatılmış 45 µl'lik damlacıklar içerisine alınmıştır.

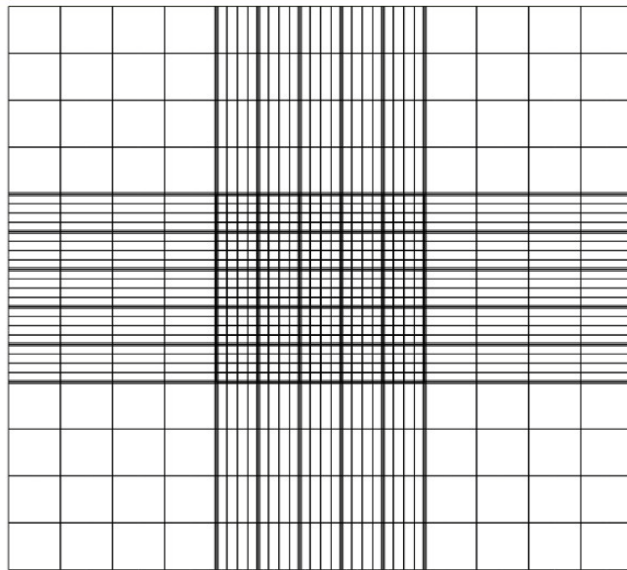
Spermlerin hazırlanması

Motil spermatozoonların ayrılması ve kapasite edilmesi için yüzdürme tekniği kullanılmıştır (Parrish ve ark., 1986). Bu yöntemde, 4 ayrı falkon (15 ml) tüp içerisine, herbir tüpte 1 mL olacak şekilde CAP (kapasitasyon) ortamı hazırlanmış ve yaklaşık 2 saat süre ile inkübatör içerisinde gazlanmaya bırakılmışlardır. Farklı boğalara ait iki adet payet azot tankından çıkarılarak yaklaşık 15-20 sn havada bırakılmış ve 38°C sıcaklıktaki su içerisinde 30 sn kadar bekletilerek çözülmüşlerdir. Çözülen payetlerden

100 µl alınarak dört adet eppendorf tüpün dip kısmında çökelti oluşturacak biçimde otomatik pipet aracılığıyla yavaşça bırakılmış ve falkon tüpler tekrar inkübatöre alınarak 40-60 dakika kadar inkübatör içerisinde, motil spermelerin ayrışması sağlanmıştır. İnkübasyon süresi sonunda kapasitasyon için bekletilen tüplerin herbirinden (dipteki tortu bozulmadan) yaklaşık 700-800 µL alınarak 15 mL'lik tüp içerisinde 10 dk süresince, 38°C ve 2000 d/dk (180 g)'da santrifüj edilmişlerdir. Daha sonra dipte kalan pelet ile birlikte 200 µL'lik kısım kalacak biçimde, üzerindeki ortam pipet ile alınarak atılmış ve kalan pelet yaklaşık 2 mL CAP ile tekrar karıştırılarak ikinci defa santrifüj edilmiştir. İkinci kez tekrarlanan santrifüj işleminin ardından falkon tüpün dibinde oluşan pelet ile birlikte yaklaşık 100-200 µL kadar bırakılarak, üstteki kısım peleti sarsmadan dikkatlice alınarak atılmıştır.

Tüp içerisinde kalan 100-200 µL'lik sperm çözeltisinden 10 µL alınarak, 90 µL su içerisinde öldürülmüş ve bu karışım içerisinde de 10 µL alınarak hemocytometer yardımı ile sperm konsantrasyonu aşağıdaki formül kullanılarak belirlenmiştir;

Konsantrasyon = N x SK x 50.000 (N: Hemasitometre'de sayılan sperm miktarı SK: Sulandırma katsayısı)



Şekil 3.8. Hemocytometer (Thoma Lamé)

Konsantrasyonu belirlenen sperma, 1.000.000-1.750.000 sperm/mL olacak biçimde seyreltilerek, oositlerin bulunduğu fertilizasyon damlalarına bırakılmış ve 18-20 saat süresince inkübatör (% 5 CO₂ ve 38°C ± 0,5°C) içerisinde bekletilerek fertilizasyon sağlanmıştır.

18-20 saat sonra inkübatörden alınarak, deneme gurubundaki zigotların döllenmeleri incelenmiştir.

3.2.8. Kullanılan Çözelti ve Kültür Ortamlarının Hazırlanması

3.2.8.1. Arı Sütü

Tahta bir kaşık yardımıyla toplanan arı sütü, etrafı ışık almayacak şekilde alüminyum folyo ile kaplanmış olan bir universal cam tüp içerisinde -20 °C'de depolanmıştır. Kullanırken yine bir tahta kaşık yardımıyla 10 gr. arı sütü tartılıp, 20 ml saf su içerisinde çözülmüştür. Bu karışım 1 ml olarak aliquotlara ayrılmış ve -20 °C'de depolanmıştır. Arı sütünün kimyasal yapısı içerisinde bulunan maddelerin yaklaşık olarak aşağıdaki oranlarda olduğu bildirilmektedir (Çizelge 3.4.).

Çizelge 3.4. Arı sütünün yapısı (Schmidt and Buchmann, 1992)

	Su	Protein	Karbonhidrat	Yağ	Mineral
% Ortalama	65	15	12	5	1

Arı Sütü (AS) = % 65 Su + % 15 Protein + % 12 Karbonhidrat + % 5 Yağ + % 1 Mineral

Stok olarak kullanılacak arı sütü aşağıdaki gibi hazırlanmıştır.

Stok: 20 ml Saf Su + 10 g AS (Filtre edililerek 1 ml veya 0,5 ml aliquotlar olarak depolanmıştır).

Yaklaşık olarak;

1 ml aliquot AS = 75 mg Protein + 60 mg karbonhidrat (25 mg fruktoz + 25 mg glukoz + 10 mg d ğer) + 2 , 5mg yağlar + 0, 5 mg min eraller) içermekte olduğu varsayılmıştır.

3.2.8.2. PBS (Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi)

PBS hazırlanırken ilk aşamada stok A ve stok B çözeltisi hazırlanmaktadır.

Çizelge 3.5. PBS Stokları

Stok-A 1 lt çift distile su içerisinde		Stok-B 1 lt çift distile su içerisinde	
NaCl	80,0 g	CaCl ₂ .2H ₂ O	13,25 g
KCl	2,0 g	MgCl ₂ .6H ₂ O	10,00 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g		
KH ₂ PO ₄	2,0 g		

Stok-A ve stok-B çözeltileri hazırlandıktan sonra, Stok-A'dan 100 ml ve stok-B'den 10 ml alınarak 890 ml çift distile su ilave edilerek 1000 ml'ye tamamlanır. Bu karışım, 121 °C'de 20 dakika otoklavda sterilize edildikten sonra, +4 °C'de depolanmalıdır. Hazırlanmış olan PBS çözeltisi içerisinde kullanımdan önce antibiyotik ilave edilerek, ovaryumların taşınması için kullanılmıştır.

3.2.8.3 Oosit Arama Ortamı

100 ml Hepes tamponlu kültür ortamı (Sigma, M2154) çözeltisine 1 ml penisilin-streptomisin ve 10 mg L-glutamin (100 µg/ml, Sigma, G3126) ilave edilerek stok hazırlanmış ve +4 °C'de depolanmıştır. Kullanımdan hemen önce ise stoktan 19 ml alınarak 1 ml Fötal Calf Serum (FCS) (% 5 v/v, Sigma, F4135, (sıcaklıkla inaktive edilmiş) ilave edilerek filtre (Millipore 0,22) edilmiş ve kullanılmıştır.

3.2.8.4. Kontrol Olgunlaştırma Ortamları

9 ml bikarbonat tamponlu olgunlaştırma ortamı (Sigma, M4530) içerisine 1 ml HYCLONE, 100 µl penisilin (50 IU/ml)-streptomisin (50 µg/ml), L-glutamin (100 µg/ml, Sigma, G3126) ve 20 µl sodyum pirüvat (22 µg/ml, Sigma, S8636) ve 25 µl FSH (5 µg/ml) ve 125 µl LH (5 µg/ml) ilave edilmiştir. Bu karışım kullanım öncesi 38 °C' de, havada % 5 CO₂ içeren maksimum nemli atmosferde yaklaşık 2 saat gazlanmıştır.

3.2.8.5. Arı Sütü İlaveli Olgunlaştırma Ortamları

Olgunlaştırma Ortamları

Arı sütü 1 (AS1; % 10 Arı sütü): 9ml TCM 199 + 1ml stok arı sütü + FSH (5µg/ml) + LH (5µg/ml) + 100µl (P/S)

Arı sütü 2 (AS2; % 5 Arı sütü): 5ml AS1 + 5ml TCM 199 + FSH (5µg/ml) + LH (5µg/ml) +100 µl (P/S)

Arı sütü 3 (AS3; % 2,5 Arı sütü): 5ml AS2 + 5ml TCM 199 + FSH (5µg/ml) + LH (5µg/ml) + 100 µl (P/S)

Arı sütü 4 (AS4; % 1,25 Arı sütü): 5 ml AS3 + 5 ml TCM 199 + FSH (5µg/ml)+ LH (5µg/ml) + 100 µl (P/S)

Arı sütü 5 (AS5; % 0,625 Arı sütü): 5 ml AS4 + 5ml TCM 199 + FSH (5µg/ml)+ LH (5µg/ml) +100 µl (P/S) Olgunlaştırma için uygun bulunan ve kullanılan arı sütlü ortam AS5 tir.

3.2.8.6. Fertilizasyon İçin Kullanılan Ortamlar

Aşağıdaki şekilde hazırlanan stok ortamlarından (Çizelge 3.6.), denemelerin yapılacağı günlerde çalışma solusyonları (Çizelge 3.7.) hazırlanarak kullanılmışlardır.

Çizelge 3.6. Fertilizasyon için kullanılan stok solüsyonlar

	W2 (Yıkama)	FRT(Fertilizasyon)	CAP(Kapasitasyon)
NaCl (mg)	3330	3330	3225
KCl (mg)	119	119	100
NaHCO ₃ (mg)	84	1045	1050
NaHPO ₄ (mg)	23,85	23,85	23,85
Na Lactate (mL)	1,5	1,5	1,5
MgCl ₂ .6H ₂ O (mg)	50	50	50
CaCl ₂ .2H ₂ O (mg)	147	147	--
HEPES (mg)	1200	1200	600
Phenol Red (mg)	5	5	--
ddH ₂ O (mL)	500	500	500

(iki ay süresince +4°C 'de muhafaza edilebilir)

Çizelge 3.7. Fertilizasyon için kullanılan çalışma solüsyonları

	W2*	FRT*	CAP*
NaPiruvat (mg)	2,75	2,75	2,75
Glukoz (mg)	25	25	62,5
Albumin (mg)	150 (FV)1	300 (FAF)2	300 (FV)
pH	7,4	7,8	7,4
Osmo (mOsm)	290-310	280-290	290-310

* 50 mL stok içerisine katılacak miktarlar

1: Fraksiyon V, 2: Fatty acid free (Ortamlar bir hafta süresince kullanılmıştır)

3.2.8.7. Vitrifikasyon İçin Kullanılan Ortamları

Holding Medium (HM) (20 % FBS, (ısı ile inaktive edilmiş) içeren Hepes-TCM 199)

Sukroz Medium (SM; 4,56 g sukroz + 16 ml TCM 199 + 4 ml FBS) (Sukroz + HM)

Etilen glikol (EG)

Dimetil sulfoxide (DMSO)

Vitrifikasyon solüsyonu 1 (VS1): HM 850 µl, EG 75 µl, DMSO 75 µl

Vitrifikasyon solüsyonu 2 (VS2): SM 670 µl, EG 165 µl, DMSO 165 µl

3.2.8.8. Çözdürme Ortamı

özdürme1: 800 µl HM, 400 µl SM

özdürme2: 800 µl HM, 400 µl SM

özdürme3: 800 µl HM, 200 µl SM

3.2.9. İstatistik Analizler

Bu çalışmayla elde edilen veriler uygun çevirmeler (yüzde olgunlaşma, yarıklanma, arcsine-transformasyon) yapıldıktan sonra one-way ANOVA veya uygun veriler için Ki Kare ile analiz edilmiştir. Sonuçlar evirme yapılmamış ortalamalar \pm s.e.m. olarak sunulmuştur.

4.ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1.Arı Sütünün Kimyasal Yapısı

Çalışma başlamadan önce arı sütü içeriği analiz ettirilmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir.

Çizelge 4.1 Arı sütünün kimyasal yapısı

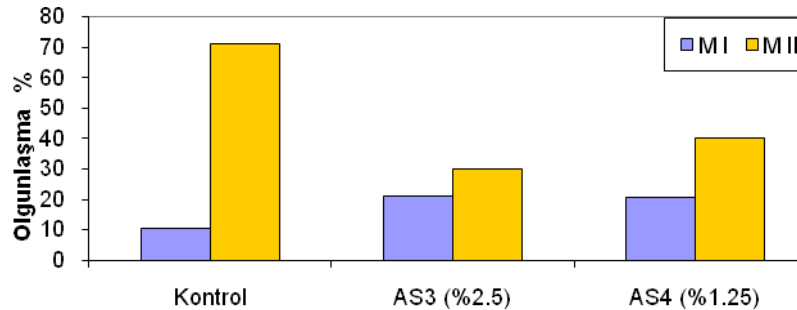
Bileşim	
Su (%)	65,5
Ham Protein (%)	13,1
Karbonhidrat (%)	14,5
Fruktoz (%)	6,8
Gluktoz (%)	5,3
Sukroz (%)	1,6
Diğer (%)	0,8
Lipid (%)	3,7
C12:0 (mg/100g)	10,06
C16:0 (mg/100g)	11,67
C16:4 (mg/100g)	12,93
C18:0 (mg/100g)	13,19
C18:3 (mg/100g)	14,43
Kül (%)	1
K (mg/g)	7500
Mg (mg/g)	500
Na (mg/g)	700
Ca (mg/g)	350
Bilinmeyenler (%)	2,3
Vitamin	
Thiamin (mg/g)	12
Riboflavin (mg/g)	5
Niacin (mg/g)	50
Pentotenik asit	200
Inositol (mg/g)	150
Biotin (mg/g)	0,5
Vitamin C (mg/g)	6
pH	3,5

4.2. Arı sütü Seviyesi

Oosit olgunlaştırma için kullanılabilir optimum arı sütü oranlarının belirlenebilmesi için bir seri deneme yapılmış olup metod kısmında hazırlanan arı sütleri azalan oranlarda (AS1: % 10, AS2: % 5, AS3: % 2,5, AS4: % 1,25 ve AS5: % 0,625) TCM 199 içerisine ilave edilerek oositlerin gelişimleri incelenmiştir. Arı sütü oranı yüksek olan ortamlarda bulunan oosit hücrelerinin gelişimlerinin (kümülsü açılımı görülmemiş) tamamlanmadığı görülerek daha düşük dozların etkileri belirlenmiştir.

4.3. AS3 ve AS4 Bulguları

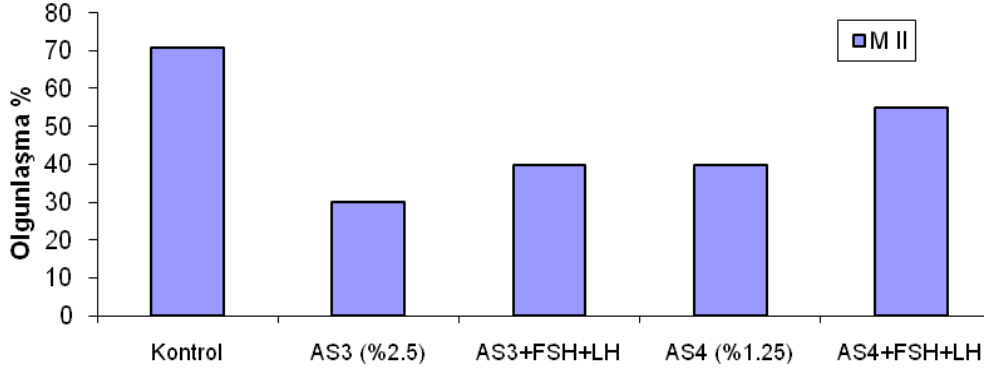
Olgunlaştırma süresinin sonunda incelen oositlerden bir kısmının MI aşamasına ulaştığı fakat daha ileriki aşamalara geçemediği görülmüştür. MI aşamasına ulaşan oosit oranları Kontrol: % 10,4, AS3: % 21,2 ve AS4: % 20,9 olarak tespit edilmiştir. Bu sonuca göre arı sütü grubundaki oositlerden, MI aşamasında kalıp ilerlemeyen oosit oranı kontrol grubuna göre daha yüksektir. Sonuçlar, arı sütü grubunda bulunan oositlerin MI aşamasına ulaştığını, fakat daha ileriki aşamalara geçmelerinde problemler olduğunu göstermektedir. Çekirdek olgunlaşmasında MII aşamasına ulaşan oositlerin oranı ise şöyledir; (Kontrol: % 70,8, AS3: % 30 ve AS4: % 40) buna göre oosit olgunlaştırmada kullanılan AS3 ve AS4 seviyesindeki arı sütü, kontrol grubuna göre olgunlaşma oranını önemli ölçüde ($P < 0,01$) düşürmüştür (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. Arı sütünün sığır oositlerinin olgunlaşması üzerine etkileri

4.4. Gonadotropinlerin Eklenmesi

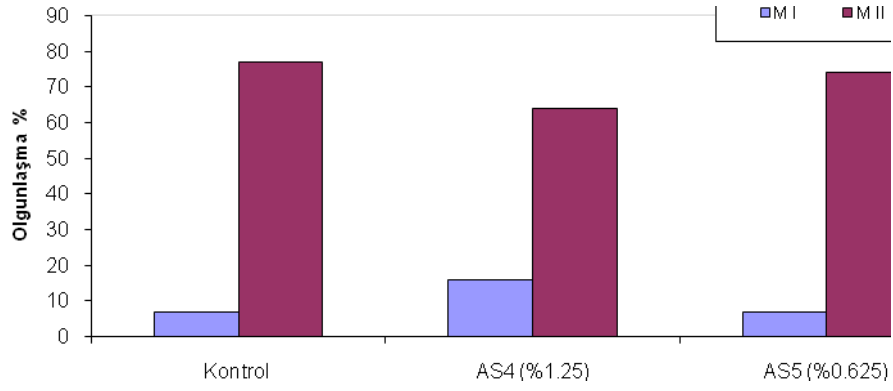
Aynı arı sütü seviyeleri kullanılarak yapılan oosit olgunlaştırma ortamlarına FSH (5 mg/ml) ve (5 mg/ml) LH ilave edildiğinde oositlerde olgunlaşma oranı artmıştır. AS3 grubundan MII aşamasına ulaşan oosit oranı % 40 tır. AS4 grubundan MII aşamasına ulaşan oosit oranı ise % 55 olmuştur. Olgunlaştırma ortamlarına FSH ve LH in katılması oositlerin MII aşamasına ulaşma oranını önemli ($P<0,05$) ölçüde arttırmıştır.



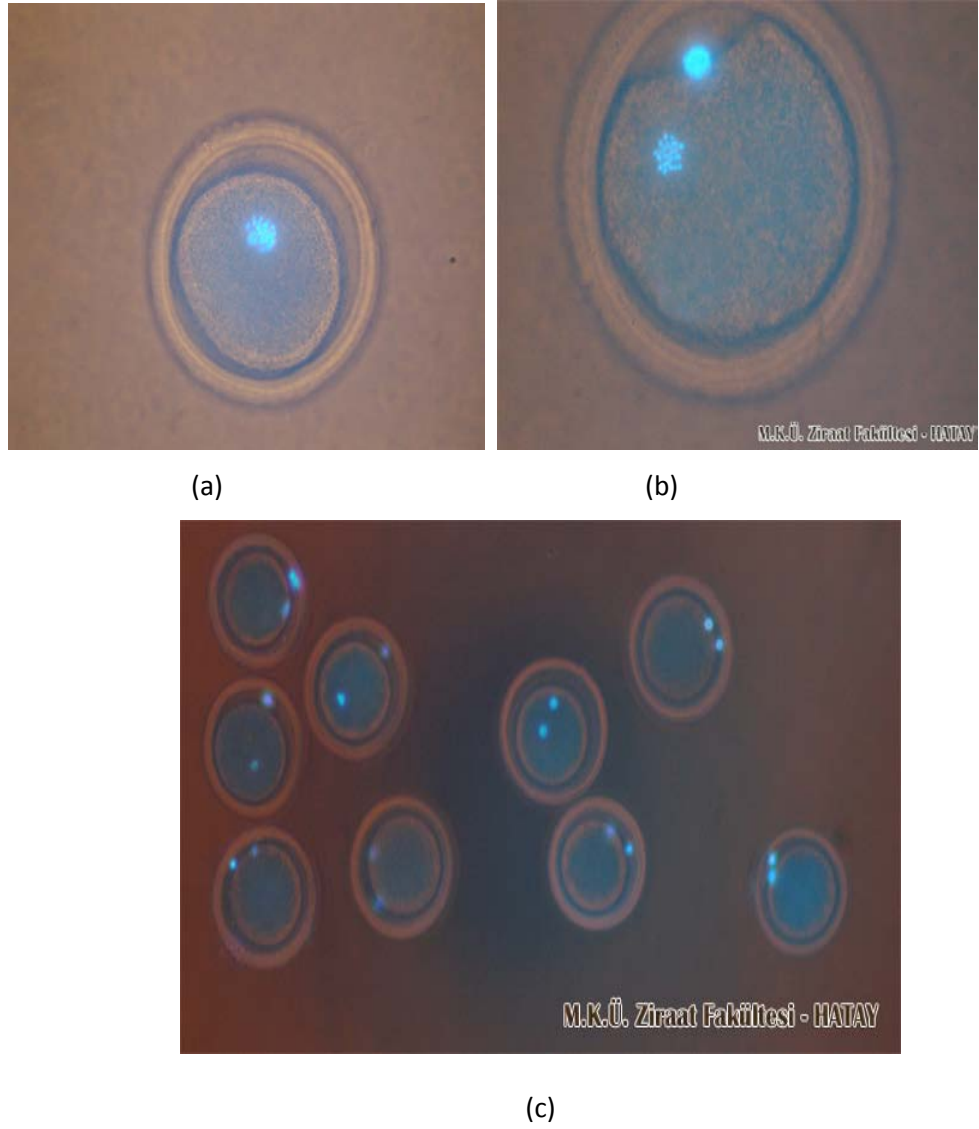
Şekil 4.2. Gonadotropinlerin arı sütlü ortamlarda olgunlaşan oositlerin üzerine etkileri

4.5. AS4 ve AS5 Bulguları

Çalışmada elde edilen ilk bulgulardan faydalanılarak, sığır oositlerinin olgunlaştırılması üzerine arı sütünün etkilerini incelemek amacı ile AS4 ve AS5 ile çalışmalar gerçekleştirilmiş ve sonuçlar, Şekil 4.3. üzerinde gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmadan elde edilen bulgular, olgunlaştırma ortamlarına ilave edilen arı sütü oranlarının (AS4: % 1,25 Arı sütü ve AS5: % 0,625 Arı sütü) kontrol grubunda kullanılan seruma alternatif olabilecek ölçüde (Kontrol: % 77,8, AS4: % 64,5 ve AS5: % 74,5) oositlerin olgunlaşmasını sağladığını göstermiştir ($P>0,05$).



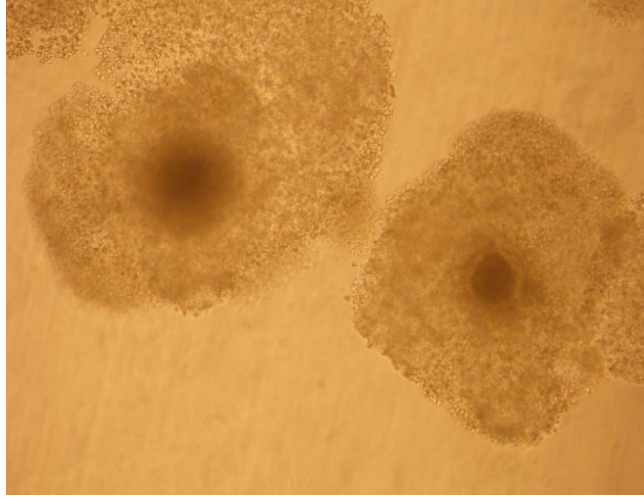
Şekil 4.3. Arı sütünün sığır oositlerinin olgunlaşması üzerine etkileri.



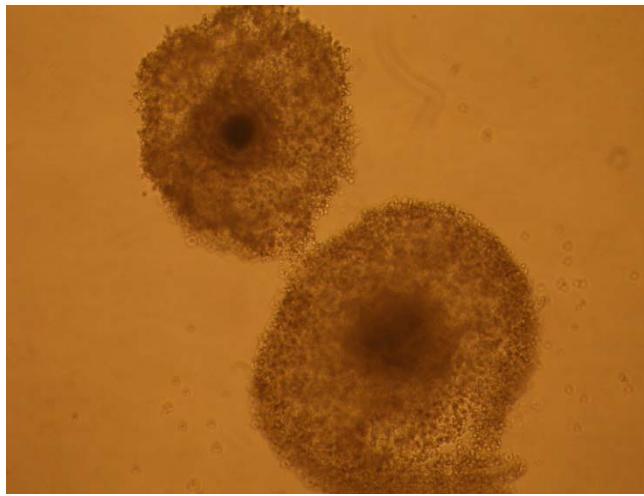
Şekil 4.4. Floresan boyamada görülen (a) M-I ve (b,c) M-II aşamasındaki oositler

4.6. Kümülüs Genişlemesi

Serum ve arı sütü içeren ortamlarda gelişen oositlerin kümülüs hücrelerinin genişlemesi incelenmiş ve Çizelge 4.5. te sonuçlar verilmiştir. Yapılan bu çalışma sonucunda, olgunlaştırma ortamlarına ilave edilen arı sütü (AS4: % 1,25 ve AS5: % 0,625) kontrol grubunda kullanılan seruma oranla özellikle 3. sınıf kümülüs hücreleri genişlemelerinin olumsuz olarak etkilenmekte olduğu belirlenmiştir (Kontrol: % 72,6, AS4: % 59,6 ve AS5: % 63,8).



Şekil 4.5. Kümülüsü genişlemiş oosit



Şekil 4.6. Kümülüsü genişlememiş oosit

Çizelge 4.2. Serum ve arı sütünün sığır oositleri kümülüs hücrelerinin genişlemesi üzerine etkileri

Sınıf	FBS	AS4	AS5	P
1	14,3±3,20	23,8±4,01	13,7±3,08	ÖD
2	13,1±2,34	16,5±3,25	22,5±3,65	ÖD
3	72,6±1,83	59,6±1,78	63,8±1,55	0,05

P > 0,05 (Ki Kare), ÖD: Önemli değil

4.7. Olgunlaşmamış Oositlerin Vitrifikasyonu İle Elde Edilen Bulgular

Aspirasyon sonrası dondurulmuş oositlerin deneme gruplarındaki farklı ortamlarda olgunlaştırılması ile ilgili sonuçlar Çizelge 4.6.'da sunulmuştur. Vitrifikasyon yöntemi ile dondurma işleminin serum içeren gruplarda olgunlaşma oranlarını önemli olarak düşürmekte olduğu görülmektedir. Ortama arı sütü ilave edilmesinin istatistikî olarak önemli olmamakla birlikte dondurulmuş oositlerin gelişimlerini olumlu yönde etkileme eğiliminde olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3. Dondurulmuş oositlerin arı sütlü ve serumlu ortamlarda olgunlaşması

	HYC+K	HYC+V	AS5+K	AS5+V
Oosit Sayısı	91	94	113	92
Metafaz-I	15,3±1,4 ^a	25,5±1,7 ^b	15,9±1,5 ^a	15,2±1,6 ^a
Metafaz-II	71,4±4,0 ^a	54,3±2,9 ^b	61,2±2,8 ^b	60,8±3,0 ^b
Bilinmeyen *	5,5±0,5	7,4±0,8	6,1±1,0	9,2±0,4

* Aşamasına karar verilemeyen oositleri içerir

** Aynı satırdaki farklı harfler istatistiki olarak farklıdır

Oositlerin vitrifikasyonu sonucunda olgunlaşmanın en önemli parametresi olan M-II dönemine ulaşan oositlerin oranında istatistiki olarak önemli azalmalar görülmüştür. Aynı şekilde M-I aşamasına ulaşan oosit oranları vitrifikasyon işlemi ile artmıştır. Elde edilen bu sonuç, dondurma işleminin oositler üzerinde yapmış olduğu zararlı etkiden kaynaklanmakta olup oosit gelişimi yavaşlamakta, gelişimler daha erken safhalarda sona ermektedir.

4.8. Olgunlaştırılmış Oositlerin Vitrifikasyonu ve Fertilizasyonu ile Elde Edilen Bulgular

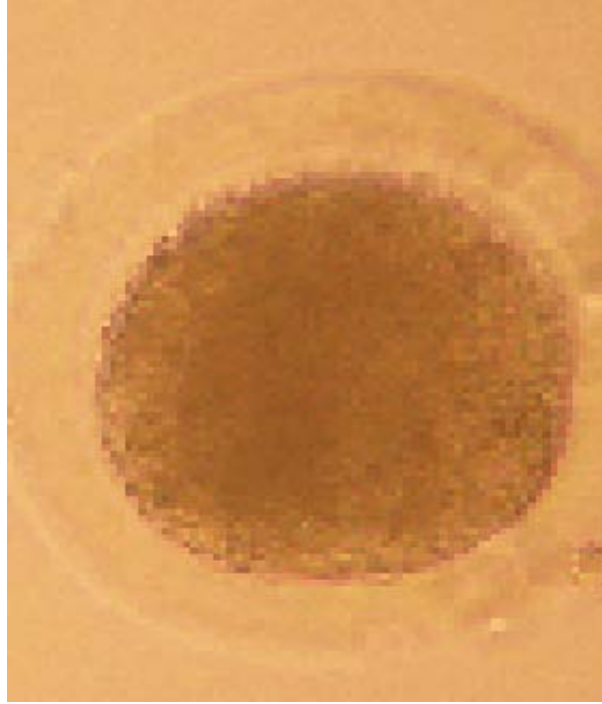
Yapılan bir diğer çalışmada, arı sütlü ve serumlu ortamlarda olgunlaştırılan oositler, OPS vitrifikasyon yöntemiyle dondurulup çözdürüldükten sonra fertilizasyona alınmışlardır. Serumlu kontrol grubundan, dondurulmadan fertilizasyona alınan 101 oositte yaklaşık % 79’unda bölünme gerçekleşmiştir. Serumun kullanıldığı diğer grupta, dondurulup çözdürüldükten sonra fertilizasyona alınan 120 oositte yaklaşık % 87’sinde bölünme gerçekleşmiştir. AS’li kontrol grubunda bulunan 116 oositte % 63’ü bölünmüştür. AS’li vitrifikasyon grubunda ise 114 oositte yaklaşık % 71’inde bölünme gerçekleşmiştir.

Oositlerin olgunlaştırma döneminde kullanılan serumlu ve arı sütlü ortamların dondurulma sonrası fertilizasyon üzerine etkileri Çizelge 4.4’de verilmiştir

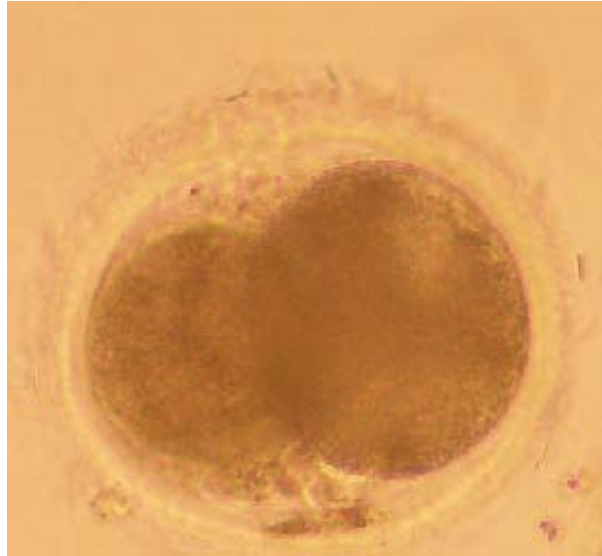
Çizelge 4.4. Arı sütlü ve serumlu ortamlarda olgunlaşmış oositlerin dondurulması ve fertilizasyonu

	HYC-K	HYC-V	AS5-K	AS5-V
Oosit Sayısı	101	120	116	114
% Bölünme (Gün 2*)	79±4,2 (38/30)	72,3±3,7 (47/34)	54,7±3,4 (42/23)	62,5±3,0 (40/25)

*Fertilizasyon 0. gün olarak alınmıştır.



Şekil 4.8. Döllenmemiş oosit



Şekil 4.9. İkiye bölünmüş embriyo

4.9. Tartışma

Nakagawa ve Leibo (1997), tek başına LH'in kullanıldığı durumlarda olgunlaşma oranının önemli düzeyde arttığını vurgulamıştır. Kültür ortamına katılan LH, oositlerin besinsel çevresini değiştirmekte ve kümülüs hücreleri yardımıyla oositin besin maddesi kullanımını arttırmaktadır. Olgunlaştırma ortamına katılan FSH, erken embriyonik gelişim aşamasında daha etkili olurken, mayotik gelişimde ve fertilizasyonda da etkili olduğu oranda etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Eyestone ve Boer, 1993). Tez kapsamında yapılmış olan çalışmada kullanılan gonadotropinler (FSH ve LH) paralel sonuçlar üretmiş olup, olgunlaşma oranını önemli ölçüde arttırmıştır (AS3 % 40, AS4 % 55).

Sığır oositlerinin olgunlaşması için kullanılan ortamlara kızgınlık gösteren sığırlardan elde edilen serum ilavesinin olgunlaşma oranlarını önemli ölçüde arttırmakta olduğu bildirilmektedir (Sanbuissho ve Threlfall, 1990). Ayrıca, Lim ve ark. (1994) tarafından yürütülen bir çalışmada olgunlaşma ortamlarına ilave edilen serumun (FBS), özellikle fertilizasyon sonrası blastosiste ulaşma oranlarını önemli ölçüde etkilemekte olduğunu gösterilmiştir. Oosit olgunlaştırma ortamlarına % 0,625 oranında ilave edilen arı sütü seviyesi, serum (HYC) ilave edilen gruplara yakın oranlarda (Kontrol: % 77,8 ve AS5: % 74,5) oositlerin olgunlaşmasını sağlamıştır. % 10 serum (FBS) katılan oosit olgunlaştırma ortamlarıyla yapılan bazı çalışmalarda; Greve ve ark, (1991), %80 olgunlaşma elde etmişlerken, Younis ve ark. (1989), %59,2 olgunlaşma, %24,8 fertilizasyon oranı elde etmişlerdir. Tez kapsamında yürütülen çalışmalarda elde edilen sonuçlar Greve ve ark. nın (1991), elde ettikleri sonuca yakın, Younis ve ark. nın (1989), elde ettikleri olgunlaşma ve fertilizasyon sonuçlarından daha yüksek oranlarda bulunmuştur.

Yapılan tez çalışmasında, arı sütlü ortamlarda gelişen oositlere ait kümülüs hücrelerinin (K; % 72,6, AS4; % 59,6 ve AS5; % 63,8) daha az genişleme sağladığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.) Ancak, arı sütü ilavesinin çekirdek olgunlaşmasında Metefaz II aşamasına ulaşan sığır oositlerinin oranını (K; %77,8, AS5; %74,7) kontrol grubuna göre düşük olmakla birlikte istatistiki olarak önemli ölçüde ($P>0,05$) etkilemediği tespit edilmiştir.

Vitrifikasyon sırasında ortaya çıkan zararlar, donma işlemi sırasında oluşan hücre içi buz kristallerinin hücre zarına vermiş olduğu zararlarla olmaktadır. Oosit hücresine ait sitoplazmik lipid: protein oranı donma sonrası yaşama gücünü etkileyen en önemli faktörlerdendir (Leibo, 1995). Arı sütü ilk defa fare embriyolarının dondurulmasında (Visintin ve ark., 2000) hücre içi koruyucu olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Ayrıca, köpek spermasının sulandırılmasında kullanılan arı sütünün çözülme sonrası yaşama oranlarını arttırdığı bildirilmiştir (Kong ve ark., 2001). Sitoplazmik lipid oranının yüksek olması oosit veya embriyonun donma ve çözülme sonrası yaşama gücünü azaltmaktadır. Arı sütü içerisinde bulunan ve onun önemli özellikleri arasında olan zarar gören hücre ya da dokuları normalleştirici ve tamir edici etkisinin olması, vitrifikasyon sonrası oosit hücresinde oluşması muhtemel hasarları giderebilmesine imkan vermektedir. Tez kapasamında elde edilen sonuçlar, vitrifikasyon işleminin oositler olgunlaşmadan uygulandığında, oosit hücresinin çözülme sonrası olgunlaşma döneminde arı sütü ortamların olumlu bir etkisinin olabileceğini göstermektedir (Çizelge 4.3.). Vitrifikasyon sonrası oosit hücresinde oluşan hasarların giderilmesinde arı sütü içerisinde bulunan maddelerin (collagen gibi) bu olumlu etkinin açıklanmasında etkili olacağı düşünülmektedir. Vitrifikasyon işlemi, oositler farklı (arı sütü veya serum) ortamlarda olgunlaştıktan sonra uygulandığında, fertilizasyon oranlarının arı sütü uygulaması ile önemli oranda azaldığını göstermiştir. Ancak, sadece arı sütü ortamlar incelendiğinde arı sütünün vitrifikasyon sonrası fertilizasyonu (AS5-K: %5 4,7±3,4 ve AS5-V: % 62,5±3,0) olumlu şekilde etkilemekte olduğunu işaret etmektedir. Elde edilen bu sonuç arı sütünün zarar gören hücreleri tamir edici etkisinin olabileceğini göstermektedir (Taniguchi ve ark., 2003).

Moussa ve ark. (2005), at embriyolarını yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemiyle dondurmuş ve iki grup arasında önemli bir fark olmadığını göstermişlerdir (% 42-% 46). Fakat vitrifikasyon daha pratik bir yöntem olduğu için yavaş dondurmaya alternatif olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Oosit dondurmaya ilgili çeşitli yöntemler geliştirildiği gibi, bazı çalışmalarda ise oositin hangi mayotik evresinin, dondurma için en uygun dönem olduğu hakkında bilgi vermektedir. Yapılan bir çalışmada, oositlerin GV dönemindeyken en yüksek bölünme oranına sahip olduklarını göstermiştir (Magnusson ve ark., 2008)

Vieirara ve ark. (2002), sığır oositlerini olgunlaştırmadan dondurmuş ve çözdürüldükten sonra olgunlaştırıp, fertilizasyona almışlar; fertilizasyon sonrası bölünme oranlarını % 49 olarak elde edilmişlerdir. Yürütülen tez çalışmasında aspirasyondan sonra dondurulan oositlerin MII 'ye ulaşma oranları yaklaşık olarak, HYC: % 54,3, AS5: % 60,8 dir. Bu oositler fertilizasyona alınmamışlardır. Fertilizasyona alınan oositler ise olgunlaştırıldıktan sonra dondurulmuş ve fertile edilmişlerdir. Elde edilen sonuçlar, Vieirara ve ark. (2002), buldukları sonuçtan daha yüksek bölünme gerçekleştiğini göstermiştir (yaklaşık olarak, HYC: % 72, AS5 % 62).

Oosit olgunlaştırmada arı sütü kullanımı ile ilgili literatüre ulaşamadığı için karşılaştırmalı bir değerlendirme yapılamamaktadır. Ancak, çalışmalar sırasında elde edilen bulgular, oosit olgunlaştırma ortamlarına seruma alternatif olarak arı sütü ilave edilmesinin olgunlaşma sırasında kullanılabilir ve vitrifikasyonla oluşabilecek zararları önleyebilecek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada arı sütünün sığır oositlerinin olgunlaştırılmasında, dondurulmasında ve bunların devamında fertilizasyonunda seruma alternatif olarak kullanılabilirliği incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar ve öneriler şöyledir:

a. Arı sütü seviyesi belirlemeyle ilgili yapılan çalışmalar sonucunda AS1 ve AS2 de hiç kümülüs ekspansiyonu görülmemiş ve çalışmaların başında elemine edilmişlerdir. AS3 ve AS4 ile yapılan çalışmalar sonucunda bunlarda da istenilen olgunlaşma oranları elde edilmemiş fakat ortama eklenen FSH ve LH olgunlaşma oranlarını önemli ölçüde arttırmıştır. Olgunlaştırma için en uygun arı sütü seviyesinin AS5 (% 0,625) olduğu görülmüştür.

b. Serumlu ve arı sütlü iki olgunlaştırma ortamında olgunlaştırılan oositler karşılaştırıldığında kontrol grubunda kullanılan seruma alternatif olabilecek ölçüde (Kontrol: % 77,8, AS4: % 64,5 ve AS5: % 74,5) oositlerin olgunlaşmasını sağladığını göstermiştir ($P>0,05$).

c. Arı sütlü ortamlarda gelişen oositlere ait kümülüs hücrelerinin (K; % 72,6, AS4: % 59,6 ve AS5: % 63,8) daha az genişleme sağladığı tespit edilmiştir

d. Aspirasyondan sonra vitrifiye edilen oositlerde kontrol grubunda vitrifikasyonun olgunlaşma oranını düşürdüğü tespit edilmiştir. (HYC K: % $71,4 \pm 4,0$, HYC V % $54,3 \pm 2,9$, AS5 K: % $61,2 \pm 2,8$, AS5 V: % $60,8 \pm 3,0$). Fakat arı sütü vitrifikasyonla ortaya çıkan zararları azalttığı ve istatistiki olarak önemli olmasa da kontrol grubuna göre vitrifikasyondan sonra olgunlaşma oranını arttırdığı tespit edilmiştir.

e. Vitrifikasyon işlemi, oositler farklı (arı sütü veya serum) ortamlarda olgunlaştırıldıktan sonra uygulandığında, fertilizasyon oranlarının arı sütü uygulaması ile önemli oranda azaldığını göstermiştir. Ancak sadece arı sütlü ortamlar incelendiğinde arı sütünün vitrifikasyon sonrası fertilizasyonu (AS5-K: % $54,7 \pm 3,4$ ve AS5-V: % $62,5 \pm 3,0$) olumlu şekilde etkilemekte olduğunu işaret etmektedir. Elde edilen sonuçlar arı sütünün zarar gören hücreleri tamir edici etkisinin olabileceğini göstermektedir.

Sonuç olarak; Oosit olgunlaştırma ortamlarına eklenen serumun dezavantajlarına karşın arı sütünün serum yerine kullanılabilmesi daha sonraki çalışmalar için alternatif oluşturacaktır. Oosit olgunlaşma sırasında ihtiyaç duyulan protein kaynağı olarak arı sütünün kullanılabilme imkanının olabileceği tespit edilmiştir.

Arı sütünün, vitrifikasyon esnasında oluşabilecek zararları önleyebilme potansiyeline sahip olması ve oosit olgunlaştırmada seruma alternatif olarak kullanılabilmesinden dolayı, oosit olgunlaştırma ortamlarına serum yerine arı sütünün eklenebileceği önerilmektedir. Ancak, elde edilen sonuçlar bu konuda daha çok araştırmaya ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Ali, J., Shelton, J.N., 1993. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **J.Reprod Fertil**, 99:471-7.
- Allegrucci, C., M. G. Hunter , 2003. Interaction of bovine granulosa and theca cells in a novel serum-free co-culture system. **Reproduction**, 126 (4): 527-538.
- Akyol, N., 2006. Sığırlarda in vitro oosit maturasyonu. **Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg**, 46 (1) 59 – 69
- Anchamparuty, V., 2007. Vitrification of bovine oocytes. **PhD Thesis**. Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University
- Anonim, 2010. Sığır Embriyosu Üretimi. **www.lalahanet.blogspot.com**
- Arav, A., Shehu, D., Mattioli, M., 1993. Osmotic and cytotoxic study of vitrification of immature bovine oocytes. **J. Reprod. Fert**, 99: 353-358.
- Bağış, H., Odaman, H., Sağırkaya, H., Dinnyes, A., 2002. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. **Mol. Reprod. Dev**, 61: 173-179
- Ball, P.J.H., Peters, A.R. 2004. **Reproduction in cattle**.
- Begin, I., Bhatia, B., Baldassarre, H., Dinnyes, A., Keefer, C.L., 2002. Cryopresevation of goat oocytes and in vivo derived 2- to 4-cell embryos using the cryoloop (CLV) and solid-surface vitrification (SSV) methods. **Theriogenology**, 59, 1839-1850
- Blum, M.S., Novak, A.F., Taber, S., 1959. 10-Hydroxy-delta 2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. **Science** 21;130 (3373): 452-3.
- Bucak, M.N., Tekin N., 2007. Kryoprotektanlar ve gamet hücrelerinin dondurulmasında kryoprotektif etki. **Ankara Üniv Vet Fak Derg**, 54, 67-72
- Carolan, C., Lonergan, P., Van Langendonck, A., Mermillod, P., 1995. Factors affectin bovine embryo development in synthetic oviduct fluid following oocyte maturation and fertilization in vitro. **Theriogenology**, 43: 1115-1128.
- Checura, C.M., Seidel, G.E., 2007. Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes. **Theriogenology**, 67, 919-930
- Chen, S.U., Lien, Y.L., Chao, K.H., Lu, H.F., Ho, H.N., Yang, Y.S., 2000. Cryopreservation of mature human oocytes by vitrification with ethylene glycol in straws. **Fertil Steril**, 74:804-8.
- Chen, S.U., Yang, Y.S., 2009. Slow freezing or vitrification of oocytes: Their effects on survival and meiotic spindles, and the time Schedule for clinical practice. **Taiwan J Obstet Gynecol**, 48
- Çelik, Ö., Yıldırım ,A., 2010. Folikülogenezinin moleküler temelleri. **İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi**, 17: (1) 59-63
- Çetin, Y., 2004. İmmatür sığır oositlerinin vitrifikasyon tekniği ile Etilen Glikol ve DMSO kullanılarak payetlerde dondurulması. **Doktora Tezi**, Ankara Üniversitesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı.
- Çetin, Y. Bastan, A., 2006. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws Animal Reproduction. **Science**, 92 :29-36
- Dinnyes, A., Dai, Y., Jiang, S., Yang, X., 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. **Biol Reprod**, 63:513-8
- Dobrinsky, J.R., 1996. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, 45, 17-26

- Eyestone, W.H., Boer, H.A. 1993. FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. **Theriogenology**, 39: 216.
- Fabbri, R., Porcu, E., Marsella, T., Rocchetta, G., Venturoli, S., Flamigni, C. 2001. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. **Hum. Reprod.** 16, 411-416
- Ferreira, E.M., Vireque, A.A., Adona, P.R., Meirelles, F.V., Ferriani, R.A., Navarro, P.A.A.S., 2009. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, 71, 836–848
- Flamigni, C., 2001. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. *Hum Reprod*, 16:411–6. Gardner, D.K., Lane, M. 1999. Embryo culture systems. (Ed.: Trounson, A., and Gardner, D.K., CRS Press, New York) **In Handbook of in vitro fertilization**, 85- 114
- Fontana, R., Mendes, M.A., Souza, B.M., Konno, K., Cesar, L.M., Malaspina, O., Palma, M.S., 2004. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees (*Apis mellifera*). **Peptides**, 25: 919-28.
- Friedler S, Giudice L, Lamb E. 1988 Cryopreservation of embryos and ova. **Fertil Steril**
- Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., Kobayashi, K. A., 1990. potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. **J Biol Chem.** 265 (19):11333-7
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagtina, I., Lazzari, G. 2003. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, 59, 599-616
- Gardner, D.K., 1994. Mammalian embryo culture in the absence of serum or somatic cell support. **Cell. Biol. Int.**, 18: 1163-1170
- Gardner, D.K., Lane, M. 1999. Embryo culture systems. **In Handbook of in vitro fertilization.** (Ed.: Trounson, A., and Gardner, D.K., CRS Press, New York), 85-114
- Gordon, I., 2003. **Laboratory Production of Cattle embryos.** CAB International, Cambridge
- Greve T. Madison V., 1991. In vitro fertilization in cattle: a review. **Rep. Nutr Dev**, 31, 147-154
- Gupta, M.K., Uhm, S.J., Lee, H.T. 2007. Cryopreservation of immature and in vitro matured porcine oocytes by solid surface vitrification. **Theriogenology**, 67, 239-248
- Hurt, A.E., Squires, E.L., Seidel, G.E. 1999. Vitrification of equine and bovine oocytes in an ethylene glycol, ficoll and sucrose using open pulled straws. **Theriogenology**
- Kasai, M., 1996. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Anim. Reprod. Sci**, 42, 67–75.
- Kong, I.K., Lee, S.I., Cho S.G., 2000. Comparison of open pulled straw (OPS) vs. glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. **Theriogenology** ,53: 1817–26.
- Kridli R. T., Husein M. Q., Humphrey W. D. 2003. Effect of royal jelly and GnRH on the estrus synchronization and pregnancy rate in ewes using intravaginal sponges, **Small Ruminant Research**, 49: 25-30
- Kuleshova, L., Gianaroli, L., Ferraretti, A., 1999. Birth following vitrification of a small number of human oocytes: case report. **Hum Reprod**, 14: 3077–9.

- Kuleshova, L.L., Lopata, A., 2003. Vitrification can be more favorable than slow cooling. **Fertil Steril**, 79, (5):1255
- Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., Leibo, S.P., 2005. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. **Reprod Biomed Online**, 11:300–8.
- Küplülü, Ş., Ün, M., 2001. Sığırlarda folikül büyüklüğünün ositlerin in vitro maturasyon üzerine etkisi. **Ankara Üni. Vet.Fakültesi Dergisi**, 48, 201-205
- Lane, M., Bavister, B.D., Lyons, E.A., Forest, K.T., 1999. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. **Nat Biotechnol**, 17:1234–6
- Ledda, S., Bogliolo, L., Succu, S., Ariu, F., Bebbere, D., Leoni, G.G., Naitana, S. 2007. Oocyte cryopreservation: oocyte assessment and strategies for improving survival **Reproduction, Fertility and Development**, 19(1):13-23
- Leibo, S. P. 1981. Preservation of ova and embryos by freezing. 127-139 in: Brackett BG, Seidel GE Jr, Seidel SM, editors. **New Technologies in Animal Breeding**. New York: Academic, 127-139
- Lim, J.M., Okitsu, O., Okuda, K., Niwa, K., 1994. Effects of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. **Theriogenology** 41:1091-1098
- Lucena, E., Bernal, D.P., Lucena, C., Rojas, A., Moran, A., Lucena, A., 2006. Successful ongoing pregnancies after vitrification of oocytes. **Fertility and Sterility**, 85: 108–11
- Magnusson, V., Beringui, F. W., Demarchi G. M., Yamada C., Trevisan T.L.M., Davila A., Mayra E.O., Visintin J.A., 2008. Bovine oocyte vitrification : Effect of ethylene glycol concentrations and meiotic stages. **Animal Science Rep**, 9: 265-273
- Martino, A., Songsasen, N., Leibo, S.P., 1996. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biol. Reprod**, 54: 1059-1069.
- Massip, A., Mermillod, P., Dinnye's, A., 1995. Morphology and biochemistry of invitro produced bovine embryos: implications for cryopreservation. **Hum. Reprod**, 10, 3004–3011.
- Massip A, Van Der Zwalmen P, Ectors F., 1987. Regent progress in cryoproservation off cattle embriyos. **Theriogenology**, 27:69-79.
- Maurer, R.R., 1992. **Animal Cell Culture: A Practical Approach** Ed: Freshney, R.I., Oxford University Press, Oxford, 15-46.
- Mazur, P., 1990. Equilibrium, quasi- equilibrium, and nonequilibrium freezing of mammalian embryos. **Cell Biophysics**, 14, 53-92
- Mazur, P., Cole, K., Hall, W., Scheuders, P., Mahowald, A., 1992. Cryobiological Preservation Of Drosophila Embryos. **Science**, 258: 1932-193
- Mazur, P., Irina L.P. Seki, S., Kleinhans, F.W., Edashige, K. 2005. Effects of hold time after extracellular ice formation on intracellular freezing of mouse oocytes. **Cryobiology**, 51(2):235-9.
- Mcgann, L.E., 1978. Differing action of penetrating and nonpenetrating agents. **Cryobiology**, 15, 382-390.
- Mcwilliams, R.B., Gibbons, W.E., Leibo, S.P., 1995. Osmotic and physiological responses zygotes and human oocytes to mono-and disaccharides. **Hum Reprod**, 10, 1163-1171.

- Mishima, S., Kazu-Michi, S.K.M., Isohama, Y., Kuratsu, N., Araki, Y., 2005. Inoue M Miyat T. Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. **Journal of Ethnopharmacology** 101: 215–220
- Miyamoto, H., Ishibashi, T., 1978. The protective action of glycols against freezing damage of mouse and rat embryos. **J Reprod Fertil**, 54,427–432
- Moussa, M., Bersinger, I., Doligez, P., Guignot, F., Duchamp, G., Vidament, M., Mermillod, P., Bruyas, J.F. 2005. In vitro comparisons of two cryopreservation techniques for equine embryos: Slow-cooling and open pulled straw (OPS) vitrification. **Theriogenology**, 64 : 1619–1632
- Nakagawa, A., Leibo, S.P., 1997. Influence of luteinizing hormone on nuclear maturation of bovine oocytes in vitro. **Theriogenology**, 47(1): 198.
- Pabuççuoğlu, S., Birler, S., 2007. **İn Vitro Koyun Embriyo Üretimi Kurs Kitapçığı.**
- Palasz, A.T., Mapletoft, R.J., 1996. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances, **Biotechnol Adv**, 14, 127–149.
- Park , S. P., Kim, E. Y., Kim, D. I., Park, N. H., Won, Y. S., Yoon, S. H., Chung, K. S., Lim, J. H., 1999. Simple, efficient and successful vitrification of bovine blastocysts using electron microscope grid. **Human Reprod.**, 14: 2838-2843.
- Papis, K., Shimizu, M., Izaike, Y., 2000. Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. **Theriogenology** ,54: 651–8.
- Parrish, J.J., Susko-Parrish, J.L., Leibfried-Rutledge, M.L., Crister, E.S., Eyestone, W.H., First, N.L., 1986. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen **Theriogenology**, 25: 591-600
- Pedro, P.B., Zhu, S.E., Makino, N., Sakurai, T., Edashige, K., Kasai, M. 1997. Effects of Hypotonic Stress on the Survival of Mouse Oocytes and Embryos at Various Stages. **Cryobiology**, 150-158
- Polge, C., Smith, A., Parkes, A., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, 164-166
- Porcu, E., Fabbri, R., Damiano, G., 2001. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. **Mol Cell Endocrinol**, 169:33–7.
- Rall, W.F., Fahy, G.M., 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196°C by vitrification. **Nature**, 313: 573-575
- Rall, W.F., 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, 24: 387-402
- Sağırkaya, H., Bağış, H., 2003. Memeli embriyolarının kryoprozervasyonu. **Uludag Univ. J. Fac. Vet. Med**, 1-2-3:127-135
- Sanbuissho, W.R. Threlfall., 1990. The influence of serum and gonadotropins on in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes. **Theriogenology**, 34
- Schimdt, J.O., Buchmann, S.L., 1992. Other Products of the Hive. **In the Hive and The honey Bee** Ed: Graham, J.M Dadant and Sons, Hamilton, IL.927-988.. 1324.
- Shamsuddin, M., Larsson, G., Rodriguez-Martinez, H., 1993. Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. **Anim Reprod Sci**, 31:49-60
- Shelton, A., J.N. 1993. Design of vitrification solutions for the cryopreservation of embryos. **J Reprod Fertil**, 99:471–7.
- Sinclair, K.D., McEvoy, T.G., Carolan, C., Maxfield, E.K., Martin, C.A., Young, L.E., Wilmut, I., Robinson, J.J., and Broadbent, P., 1998. Conceptus growth and development following in vitro culture of ovine embryos in media supplemented with bovine sera. **Theriogenology**, 49: 218

- Sirard, M.A., Blondin, P., I 1996. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Anim Reprod Sci.**, 42: 17-42
- Taniguchi, Y., Kohno, K., Inoue, S.I., Koya-Miyata, S., Okamoto, I., Arai, N., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M., 2003. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. **International Immunopharmacology**, 1313-1324.
- Thompson, J.G., Gardner, D.K., Pugh, P.A., McMillan, W.H., and Tervit H.R., 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. **Biology of Reproduction**, 53 1385-1391
- Thompson, J.G., 1997. Comparison between in vivo derived and in vitro produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reprod. Fertil Dev**, 9,341-354
- Tucker, M., Liebermann, J., 2007. **Vitrification in Asisted Reproduction**, 322, London
- Uysal, O., 2007. Sığır embriyolarının vitrifikasyonu. **Veteriner Hekimler Derneği Dergisi**, 78,45-50
- Ün, M., Küplülü, Ş., 2005. Mezbahadan toplanan ovaryumlardan elde edilen sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonu ve fertilizasyonu. **Ankara Üniv Vet Fak Derg**, 52: 93-98,
- Vajta, G., Booth, P.J., Holm, P., Greve, T., Callesen, H., 1997. Successful vitrification of early stage bovine *in vitro* produced embryos with the open pulled straw (OPS) method. **Cryo-Letters**, 18: 191–195.
- Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., 1998. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Mol Reprod Dev** , 51: 53–8.
- Vajta, G., 2000. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, 60-61,357-364
- Van Langendonck, A., Auquier, P., Donnay, I., Massip, A., Dessy, F., 1996. Acceleration of *in vitro* bovine embryo development in the presence of fetal calf serum. **Theriogenology**, 45: 194-194
- Vieira, D., Mezzalana, A., Barbieri, D.P., Lehmkuh, R.C., Rubin, M.I.B, Vajta, G. 2002. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Criobiology**, 91-94
- Visintin, http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-95962000000400009&script=sci_arttext-back#back J.A., Garcia J.F., Pantano, T., Assumpcao, M. E. O. A. 2000. Cryopreservation of mouse morulae in glycerol, sucrose and honeybee royal jelly. **Braz. J. Vet.Res. Anim. Sci**, 37
- Wani, N.A., Maurya., Misra, A.K., Saxena, V.B., Lakhchaura, B.D., 2004. Effect of cryoprotectants and their concentration on *in vitro* development of vitrified-warmed immature oocytes in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, 831-842
- Whittingham, D.G., Leibo, S.P., Mazur P. 1972. Survival of mouse embryos froze to -196°C and -269°C. **Science** ,178: 411–4.
- Whittingham, D.G., 1977. Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. In *The Freezing of Mammalian Embryos*. **Elsevier**, 97-127.
- Wilmut I., Rowson L. E. A. 1973. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. **Vet.Rec.**, 92: 686–690.

- Young, L.E., Sinclair, K.D., Wilmut, I. L., 1998. Offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproduction**. 3: 155-63
- Younis, A.I., Bracket, B.G., 1989. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, 189-201
- Zhang, J., Nedamble, T.L., Yang, M., Li, J., 2009. **Animal Rep. Science**, 110, 46-55

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her aşamasında fikirleriyle bana yol gösteren ve çalışmalarına ışık tutan danışman hocam Sayın; Yrd.Doç.Dr. Ali Galip Önal' a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Ayrıca her türlü laboratuvar ve diğer çalışmalarımda benden yardımını hiç esirgemeyen değerli hocam Sayın; Yrd.Doç.Dr. Yusuf Ziya Güzey' e çok teşekkür ederim.

Desteklerinden dolayı Sayın; Doç.Dr. Ahmet Şahin' e ve Sayın; Doç.Dr. Ahmet Koç'a teşekkür ederim.

Her koşulda desteklerini hissettiğim, motivasyon kaynağım sevgili dostlarıma çok teşekkür ediyorum.

Bugünlere gelmemde en büyük katkıya sahip, başta rahmet ve saygıyla andığım sevgili BABAM ve her zaman yanımda olan sevgili ANNEM olmak üzere, tüm aileme, maddi manevi her türlü desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Ankara'da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Şanlıurfa'nın Suruç İlçesi'nde tamamladım. 1999 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Hayvansal Üretim Bölümü 'nde lisans eğitimime başladım. 2005-2007 yılları arasında Hatay'da özel bir şirkette ziraat mühendisi olarak görev yaptım. 2007 yılında MKÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladım.