



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA
ANABİLİM DALI

**SİĞİR EMBRİYOSUNUN İN VİTRO ÜRETİMİ VE
VİTRİFİKASYONUNDA SİTOKİN (LIF) VE BÜYÜME
FAKTÖRÜNÜN (IGF-1) ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Alper KOÇYİĞİT

**Samsun
Eylül 2014**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

**SIĞIR EMBRİYOSUNUN İN VİTRO ÜRETİMİ VE
VİTRİFİKASYONUNDA SİTOKİN (LIF) VE BÜYÜME
FAKTÖRÜNÜN (IGF-1) ETKİLERİ**

DOKTORA TEZİ

Alper KOÇYIĞIT

**Danışman
Doç. Dr. Mesut ÇEVİK**

**Samsun
Eylül 2014**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Alper KOÇYİĞİT tarafından Doç. Dr. Mesut ÇEVİK Danışmanlığında hazırlanan ‘Sığır Embriyosunun İn Vitro Üretimi ve Vitrifikasyonunda Sitokin (LIF) ve Büyüme Faktörünün (IGF-1) Etkileri’ başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından /..... /..... tarihinde yapılan sınav ile Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında DOKTORA Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

Üye :
(Unvanı, Adı Soyadı, Üniversite)

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

..... / /.....

Prof. Dr. Süleyman KAPLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan tez danıőmanım ve değerli hocam Doç. Dr. Mesut ÇEVİK'e,

Asistanlığım süresince bana destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Muzaffer ÇELEBİ, Yrd. Doç. Dr. Murat SELÇUK, Yrd. Doç. Dr. Hande GÜRLER ve mesai arkadaşlarım Dr. Eser AKAL, Dr. Uğur ŞEN'e,

Tez verilerimin istatistiksel olarak incelenmesinde yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Serhat ARSLAN'a,

Çalıőmamın gerçekleştirilebilmesi için destek sağlayan Ondokuz Mayıs Üniversitesi Rektörlüğü'ne (Proje No: PYO. VET.1904.11.011),

Hayatım boyunca bana destek olan, maddi ve manevi fedakârlıklarını esirgemeyen Babama, Anneme ve Kardeőime,

Zamanımızın büyük bölümünü paylaşmak zorunda kaldığımız tez çalıőmalarım karşısında verdiği destek ve sabrından dolayı sevgili eőime,

Sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

ÖZET

SIĞIR EMBRİYOSUNUN İN VİTRO ÜRETİMİ VE VİTRİFİKASYONUNDA SİTOKİN (LIF) VE BÜYÜME FAKTÖRÜNÜN (IGF-1) ETKİLERİ

Amaç: Sığır embriyolarının in vitro kültür medyumlarına yapılacak IGF-1 ve LIF ilavesinin, embriyo gelişim oranları, TE ve ICM hücre dağılımı ve dondurma sonrası yaşama gücü açısından etkisinin araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot: Çalışmada elde oositler IVM ve IVF basamaklarından geçerek BSA, IGF, LIF, IGF-LIF gruplarında kültüre alındı. Kültür sonrası toplam 217 blastosist diferansiyel boyanarak hücre sayı ortalamaları belirlendi. Diğer yandan aynı deneme gruplarında kültüre alınan 163 blastosist ise vitrifikasyona tabi tutulup çözündürüldükten sonra diferansiyel boyandı. Vitrifikasyon işlemi uygulanan ve uygulanmayan blastosistlerin canlılık oranları ve hücre dağılımları karşılaştırıldı.

Bulgular: Vitrifikasyon uygulanmayan gruplarda en yüksek blastosist oranı LIF ve LIF-IGF gruplarında elde edildi. Vitrifikasyon işlemi sonrası en yüksek re-ekspansiyon oranı IGF ve IGF-LIF gruplarında elde edildi. Hücre sayılarının IGF'in tek başına ve LIF ile beraber kullanıldığı gruplarda en az değişim gösterdiği belirlenmiştir.

Sonuç: İn vitro embriyo üretiminde LIF ve IGF'in hem blastosist gelişimi hem de vitrifikasyon sonrası canlılık oranlarına olumlu etkisinin olduğu görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Blastosist; diferansiyel boyama; IGF-1; in vitro fertilizasyon; LIF; vitrifikasyon

Alper KOÇYİĞİT, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Eylül-2014

ABSTRACT

EFFECTS OF CYTOKINE (LIF) AND GROWTH FACTOR (IGF-I) ON IN VITRO PRODUCTION AND VITRIFICATION OF BOVINE EMBRYOS

Aim: The aim of the study was to evaluate the effects of LIF and IGF-1 during bovine embryo culture on blastocyst development, TE and ICM cell allocation and cryotolerance.

Material and Method: Embryos were transferred into five groups BSA, IGF, LIF, IGF-LIF. At termination of the culture, 217 embryos were stained used the differential staining protocol for determination of cell number. In addition 163 embryos were cultured in the same groups. After a culture period, embryos were cryopreserved by vitrification. After a vitrification and thawing, embryos were stained. Viability and cell allocation of vitrified and non-vitrified embryos were compared.

Results: Embryos in the culture medium containing IGF or IGF-LIF had increased rate and cell counts when compared to embryos cultured in other groups. Blastocyst cell counts were showed minimum variation in IGF and IGF-LIF groups.

Conclusions: This study demonstrates that the addition of LIF and IGF to culture medium markedly improves the developmental potential and cryotolerance of embryos produced in vitro.

Keywords: Blastocyst; differential staining; IGF-1; in vitro fertilization; LIF; vitrification

Alper KOÇYİĞİT, Ph. D. Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, September-2014

SİMGELER VE KISALTMALAR

BSA	: Sığır Serum Albümini
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
FCS	: Fötal Buzağı Serumu
FSH	: Folikül Stimüle Edici Hormon
G	: Gauge
IGF	: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü
IVF	: İn Vitro Fertilizasyon
IVM	: İn Vitro Maturasyon
IVP	: İn Vitro Üretilen
KOK	: Kumulus Oosit Kompleksi
kDa	: Kilodalton
LH	: Luteinleştirici Hormon
LIF	: Lösemi İnhibitör Faktör
PHE	: Penisilamin Hipotaurin Epinefrin
SOF	: Sentetik Oviduct Sıvısı
TCM	: Doku Kültür Medyumu
µm	: Mikrometre
µg	: Mikrogram
µM	: Mikromolar
ng	: Nanogram
mOsm	: miliosmol

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. İn Vitro Embriyo Üretimi	2
2.1.1. Oosit Elde Etme Yöntemleri.....	3
2.1.2. İn Vitro Maturasyon	7
2.1.3. İn Vitro Fertilizasyon.....	8
2.1.4. Sperma Ayırma Yöntemleri	10
2.1.5. Embriyoların Kültürü	12
2.1.6. Embriyo Gelişimini Etkileyen Faktörler	15
2.1.7. Embriyoların Değerlendirilmesi	21
2.2. Embriyoların Dondurularak Saklanması	24
2.2.1. Embriyoların Dondurulma Yöntemleri	24
2.2.2. Kriyobioloji ve Kriyoprotektanlar	28
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1. Ovaryumların Temini.....	33
3.2. Oositlerin Elde Edilmesi	33
3.3. Oositlerin İn Vitro Maturasyonu.....	34
3.4. Oositlerin İn Vitro Fertilizasyonu	35
3.4.1. Spermanın Separasyonu	35
3.5. Embriyoların İn Vitro Kültürü	38
3.6. Embriyoların Vitrifikasyonu	38
3.7. Embriyoların Çözündürülmesi	39

3.8. Embriyoların Değerlendirilmesi.....	40
3.8.1. Blastosistlerin Diferansiyel Boyama Metodu İle Boyanması.....	40
3.9. Verilerin İstatistiksel Analizi	42
4. BULGULAR	43
4.1. İn Vitro Maturasyon Bulguları	44
4.2. İn Vitro Kùltür Bulguları	46
4.3. Vitrifikasyon Sonrası Bulgular	51
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	66
KAYNAKLAR	68
Ek-1 Manipùlasyon Medyumu	80
Ek-2 Maturasyon Medyumu	81
Ek-3 Fertilizasyon Stok Medyumu	82
Ek-4 Sperm Yıkama Medyumu	83
Ek-5 Percoll 10X Solùsyonu	84
Ek-6 Percoll %90 Solùsyonu	85
Ek-7 Kùltür Medyumu	86
Ek-8 Temel Solùsyon	87
Ek-9 Vitrifikasyon Solùsyonları	88
Ek-10 Sùkroz Solùsyonları	89
ÖZGEÇMİŞ	90

1. GİRİŞ

Biyoteknoloji, dünyanın gelişmiş ülkelerinde, başta sağlık olmak üzere tarım, gıda ve hayvancılık sektörleri için yepyeni ve baş döndürücü hızlarla büyüyen bir ilerleme alanı haline gelmiştir. Ülkemizde ise 2001-2013 yıllarındaki stratejileri belirlemek amacıyla oluşturulan Biyoteknoloji ve Biyogüvenlik Özel İhtisas Komisyonu'nun hazırladığı raporda biyoteknolojinin önemine dikkat çekilmiştir. Benzer şekilde TÜBİTAK, Bilim ve Teknoloji Öngörüsü Projesi kapsamında hazırladığı Vizyon 2023 belgesinde biyoteknolojiye önemli bir yer vermiştir (TÜBİTAK, 2004). Bu doğrultuda Bilim Teknoloji Yüksek Kurulu'nun hazırladığı öncelikli alanlar listesinde gıda alanında, biyoteknoloji ilk sırada kendine yer bulmuştur (BTYK, 2010). İçinde bulunduğumuz yüzyılın en önemli bilimsel gelişmelerinin gerçekleştiği bu alanda reproduktif biyoteknoloji önemli bir pay sahibidir. Reproduktif biyoteknoloji, suni tohumlama uygulaması ile alana adım attığı günden bu yana embriyo transferinden, transgenik hayvanlara kadar uzanan geniş bir yelpazede yalnızca üreme problemlerinin çözümünde değil reproduktif kapasitenin ciddi derecede artırılmasına da olanak sağlamaktadır. Reproduktif biyoteknolojideki uygulamalar in vitro embriyo üretimi temeline dayanmaktadır. Kaydedilen ilerlemelere rağmen in vitro embriyo üretiminde başarı şansı % 50 standardını yakalayamamıştır. Özellikle üretilen embriyoların dondurularak saklanmasıdaki başarı oranı daha da düşük seviyededir. Bu durum biyoteknolojinin karakteristik özelliği olan bilimsel gelişmelerle paralel seyreden endüstriyel ilerlemenin önünde engel oluşturmaktadır. Bu çalışma ile sığır embriyolarının in vitro üretiminde ve vitrifikasyonunda LIF ve IGF-1 faktörünün etkinliğinin araştırılarak, ulaşılabilecek sonuçların bu yöntemlerin geliştirilmesi ve sahaya daha etkin yansımaya ışık tutması amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İn Vitro Embriyo Üretimi

Embriyoların dişi genital kanalının dışında üretilmesi in vitro embriyo üretimi (in vitro produced, IVP) olarak adlandırılmaktadır. Embriyoların in vitro ortamda üretilmesi sayesinde canlılığın ilk adımlarını oluşturan fertilizasyon, embriyogenezis gibi temel mekanizmaların daha iyi anlaşılıp, araştırılabilmesi mümkün olmuştur. Bunun yanı sıra reproduktif sorunların çözümü hız kazanırken, hayvan ıslahı uygulamaları büyük bir ivme kazanma potansiyeline sahip olmuştur. İn vivo ortamdaki hormonlardan büyüme faktörlerine kadar birçok faktörün etki mekanizmasının anlaşılabilmesi in vitro embriyo üretimi sayesinde mümkün olmuştur. İn vitro embriyo üretimi; ovaryumların toplanması, oositlerin elde edilmesi, oositlerin in vitro maturasyonu (IVM), mature oositlerin in vitro fertilizasyonu (IVF) ve embriyo kültürü aşamalarını kapsamaktadır (Leibfried, 1999; Gordon, 2003). İn vitro embriyo üretimi basamaklarının her biri sırasıyla bir sonrakinin başarısını etkilemektedir (Hafez, 2000; Gordon, 2003).

İN vitro embriyo üretiminin temel basamağı olan in vitro fertilizasyona ilişkin bilgilerin çoğu memelilerde araştırılmış olmasına karşın, özellikle 1940'lı yıllarda denizkestanelerinde yapılmış çalışmalara dayanmaktadır. Memelilerde fertilizasyonun daha iyi anlaşılması, 1950'li yıllarda spermatozoon kapasitasyonunun tanımlanmasıyla olmuştur. Sonrasında çeşitli türlerde IVF çalışmaları hız kazanmıştır. Tavşanlarda, yavruyla sonuçlanan ilk IVF çalışması 1959 yılında gerçekleştirilmiştir (Chang, 1959). Yine 1968'de, farelerde uterustan elde edilen sperma ile başarılı in vitro fertilizasyon çalışması bildirilmiştir. İn vitro mature edilmiş sığır oositinin ilk başarılı fertilizasyonu 1977 yılında bildirilmiştir (Iritani ve ark., 1977). Ovule olmuş oositin in vitro fertilizasyonu sonucu canlı buzağı elde edilmesi ilk kez 1981'de gerçekleştirilmiştir (Brackett ve ark., 1982). Yine Kanada'da 1983 yılında laparoskopik yöntemle elde edilen oositlerden, in vitro fertilizasyon yoluyla altı adet buzağı elde edildiği bildirilmiştir. İn vitro mature edilmiş oositlerden ilk buzağı, 1986 yılında bildirilmiştir (Hanada ve ark., 1986). Tümüyle in vitro şartlarda üretilmiş embriyolardan ikiz yavrunun elde edildiği çalışma ise 1987 yılında bildirilmiştir (Lu ve ark., 1987). Çiftlik hayvanları arasında ilk olarak IVF çalışmalarında kullanılan hayvan koyun iken, in vitro maturasyon ve fertilizasyon sonucu elde edilen kuzuların doğumunu bildiren çalışmalar çok sonraları gerçekleştirilebilmiştir (Gordon, 2003). Atlarda ilk canlı yavru, in vivo mature olmuş

oositlerin in vitro fertilizasyonu sonucu 1990 yılında gerçekleştirilmiştir (Palmer ve ark., 1990).

Ülkemizde IVF çalışmalarına 1983 yılında tavşanlar, 1985 yılında fareler ve 1997 yılında sığırlar üzerinde başlanmış, ilk olarak 2002 yılında IVP embriyolardan sağlıklı kuzular alınmıştır (Birler ve ark., 1997; Birler ve ark., 2002).

2.1.1. Oosit Elde Etme Yöntemleri

Oositlerin kaynağının ve elde edilme yöntemlerinin embriyo üretiminin başarısını etkileyebildiği bildirilmektedir. Oositler hem canlı hayvanlardan hem de kesim sonrası mezbahadan toplanan ovaryumlardan elde edilebilmektedir (Greve ve ark., 1993).

Oositlerin elde edilmesinde geçmiş yıllarda uterus yıkaması (flushing) yöntemi uygulanarak in vivo ortamda olgunlaşmış oositlerin direk temini gerçekleştirilmiştir (Bavister ve ark., 1992). Fakat bu yöntemde sınırlı sayıda oosit toplanabilmiştir. İlerleyen yıllarda oositlerin ultrasonografi rehberliğinde transvajinal ve laparotomi-endoskopi yardımı ile canlı hayvanların ovaryumlarının yüzeyleindeki foliküllerin aspirasyonu ile elde edilmesi (OPU) yoluna gidilmiştir (Callesen ve ark., 1987). Her iki yöntemin uygulanması konusunda pahalı cihaz ve ekipmanlara ihtiyaç duyulması, teknik destek ve deneyim gereksiniminin bulunması nedeniyle oosit kaynağı olarak mezbahada kesimi gerçekleştirilen sığırların ovaryumları kullanılmaktadır.

Ovaryumların kesimden sonraki 1-2 saat içerisinde işleme alınması ve yaklaşık 30 °C de saklanması gerektiği yaygın bir kanıdır. Ovaryumların taşıma sıcaklığı 30 °C'nin altına düştüğünde, oositlerin nükleer maturasyonu tamamlayamadıkları bildirilmektedir (Gordon, 2003). Ayrıca oositlerde mayotik gelişim iki saat içerisinde başlatılmazsa, oositlerin RNA üretim kapasitelerini kaybettikleri bildirilmektedir (Sirard ve ark., 1996).

İyi kaliteye sahip oositlerin temini birçok parametreye bağlı olarak değişmektedir (Nagai, 2001). Folikül büyüklüğünün, oosit büyüklüğü ve gelişim durumu ile doğru orantılı olduğu belirtilmektedir (Gordon, 2003). Dolayısıyla 2 mm'den küçük çapta olan foliküllerde bulunan oositler mitoz bölünme karakterini kazanmadıklarından ve 8 mm'den büyük çapta olan foliküllerde bulunan oositler atrezi dalgası görünümünde ve olgunlaşma başarısının oldukça düşük olmasından dolayı çalışmalarda aspirasyon için 2-8 mm arası çapta olan foliküller tercih edilmektedir (Sirard ve ark., 1996).

Fertil oositler sadece pubertas döneminde periyodik olarak ovulasyonla ilişkili gonadotropin salınımına sahip dişilerden elde edilmektedir. Farklı yaş gruplarını içeren bir çalışmada 2-10 mm çapındaki foliküllerden toplanan oositlere rutin IVM ve IVF prosedürleri uygulanmış ve sonunda embriyo gelişim oranlarının yaş büyüdükçe arttığı görülmüştür (Yang ve ark., 1998). Pubertasa ulaşmamış dişi hayvanlardan çeşitli yöntemlerle oosit toplanabilse de, bu hayvanlardan elde edilen oositlerin maturasyonu ve devamında yaşayabilir embriyo oluşturabilmeleri için gerekli hormon reseptörlerinin bulunmayışının, maturasyon ve embriyo geliştirme yeteneklerinin sınırlı kalmasına neden olduğu bildirilmiştir (Nagai, 2001; Armstrong, 2001).

Kesimden sonra alınacak ovaryumların mümkün olduğu kadar çevre dokulardan ayrı şekilde alınması gereklidir. Transport medyumu olarak fosfatlı tampon solüsyonu (PBS) ve antibiyotikli serum fizyolojik kullanılmaktadır (Greve ve ark., 1993).

Sığır ovaryumlardan oosit elde etmek amacıyla aspirasyon, folikül diseksiyonu, ovaryum dilimleme ve OPU olmak üzere başlıca dört teknik kullanılmaktadır (Duran, 2000).

Aspirasyon Tekniği

Mezbahadan elde edilen ovaryumların foliküllerinden, uygun enjektör, iğne, pipet, vakumlu aspirasyon iğnesi gibi araçların yardımıyla oositlerin toplanması "Aspirasyon Tekniği" olarak ifade edilen ve yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Ovaryumlardan bu yöntem ile oosit toplamak için çoğunlukla 18 veya 21 G'lik iğneler kullanılmaktadır. Enjektör ile 2-8 mm çapında olan foliküllerden aspirasyon yapılmaktadır. Aspirasyon tekniğinin dezavantajı bu yolla foliküllerden % 30-60 oranında oosit toplanabilmesidir (Kanagawa ve ark., 1995).

Ayrıca aspirasyon yöntemi ile toplanan oositlerin yaklaşık olarak % 43'ü morfolojik olarak normal olmaktadır. Bu teknikte ovaryum başına elde edilen kullanılabilir kalitedeki oosit sayısının 5-8 adet olduğu bildirilmektedir. Dezavantajlarına rağmen, pratik olması ve çok sayıda ovaryumun işlenebilmesine olanak vermesi nedeniyle aspirasyon yöntemi tercih edilmektedir. Araştırmacılar çok sayıda ovaryumun işlenmesinin önemli olduğu ticari embriyo üretimi yapılan laboratuvarlarda, aspirasyon tekniğini, oosit kalitesinin önemli olduğu durumlarda ise diseksiyon yöntemini önermektedirler (Gordon, 2003).

Otomatik vakum sistemimin kullanıldığı durumlarda aspirasyon basıncı 50-130 mmHg arasında tercih edilmektedir (Pieterse ve ark., 1991). İyi kalitede kumulus oosit kompleksi (KOK) toplanmasında iğne çapı ile aspirasyon basıncı arasındaki ilişki önemlidir. Bols ve ark. (1996), aspirasyon basıncı ve iğne çapının sığır oosit morfolojisi ve gelişim kapasitesi üzerine etkisini araştırmışlardır. Kullandıkları 18, 19 ve 21 G'lik iğnelerde beş değişik seviyede (50, 70, 90, 110, 130 mmHg) aspirasyon basıncı denemişlerdir. En yüksek sayıda oosit eldesini en geniş çapa sahip (18 G) iğne kullanımıyla ve en yüksek aspirasyon basıncıyla elde etmişlerdir.

Transilluminasyon aspirasyon tekniği, aspirasyon yönteminde elde edilen oosit sayısının artırılmasına yönelik olarak geliştirilmiştir. Bu yöntemde kortikal foliküllerin görüntülenmesi için, ovaryumun medulla ve korteksinde ışık kaynağı yerleştirilmekte ve bundan dolayı tekniğe ışık geçirgen (transilluminasyon) aspirasyon tekniği (Transillumination-Aspiration Ovary, TAO) adı verilmektedir. Bu teknik ile ovaryum başına elde edilen oosit oranının % 50 oranında artırılabilceği bildirilmektedir (Arav, 2001; Gordon, 2003).

Folikül Diseksiyon Tekniği

Oosit eldesinde kullanılan bir diğer teknik folikül diseksiyon tekniğidir. Foliküllerin diseksiyonunu takiben, parçalayarak oosit toplanmasını esas almaktadır. Folikül diseksiyonunda amaç, öncelikle oositi çevreleyen kumulus hücrelerine zarar vermeden oosit elde edilmesidir. Folikül duvarına sıkıca bağlandığı için aspirasyon yöntemiyle alınması mümkün olmayan kaliteli oositlere diseksiyon tekniğiyle daha yüksek oranda ulaşılabilir (Gordon, 2003).

Ovaryum Dilimleme Tekniği

Ovaryumlara üzerlerindeki foliküllerden geçecek şekilde çeşitli kesitler atılmasına dayanan bir yöntemdir. Bu işlemden sonra ovaryum, yıkama medyumu içerisinde iyice yıkanır ve petri içerisinde toplanan içerik ya direkt olarak stereo mikroskop altında oositler için araştırılır ya da toplanan içerik çöktürme, santrifüj işlemlerine tabi tutulduktan sonra oosit seçim işlemine geçilir. Ovaryum dilimleme tekniği direkt olarak uygulanabildiği gibi, aspirasyon sonrası da yapılabilir. Bu yöntem az sayıda ovaryum temin edilebildiği durumlar için önerilmektedir (Duran, 2000). Foliküler aspirasyon ve dilimleme tekniği bir arada kullanıldığında ovaryum başına 9,2 -

20,3 arasında değişen miktarda iyi kalitede oosit elde edilebildiğini bildirilmiştir (Gordon, 2003).

Ovum Pick-Up (OPU) Tekniği

Canlı hayvanlardan ultrasonografi rehberliğinde (7,5 MHz'lik özel OPU probu) vakumlu aspirasyon sistemi (ovum pick-up, OPU) ile oosit aspire edilebilir (Callesen ve ark., 1987). Bu teknik canlı hayvanların kullanılabilmesi avantajına sahipken, aspirasyon vakumu, hormon tedavisinin yapılp yapılmaması, punksiyon sıklığı, siklusun dönemi ve operatörün deneyimi gibi birçok faktörden etkilenmesi gibi dezavantajlara sahiptir.

Oosit Sınıflandırma ve Seçim

İn vitro embriyo üretiminde iyi kaliteli oositlerin seçimi ve sınıflandırılması yüksek başarı sağlamada önemli bir adımdır. Aspirasyon sonrasında oositler morfolojik olarak değerlendirilmektedirler. Morfolojik sınıflandırmada oositin sitoplazma goruntusu ve oositi çevreleyen hucrerle olan bağı dikkate alınmaktadır. Homojen gorunumlu bir sitoplazma, oositi çevreleyen, bozulmamış ve kompakt yapıda kumulus hucrerleri, mature olmayan oositlerin maturasyon ve embriyonik gelişimlerin en önemli işaretlerindedir (Kanagawa, 1995, Boni ve ark., 2002). Gunumuzde KOK morfolojisi çeşitli yöntemlerle değerlendirilmektedir (Gordon, 2003).

Brackett ve ark. (1993), oositleri dört ayrı gruba ayırarak;

- 1. Kalite;** 4 kattan fazla sayıda kompakt kumulus hucrer katmanı ve ooplazma kumlu görünüme sahip,
- 2. Kalite;** 2-3 katlı kompakt kumulus hucrer katmanı ve ooplazma kumlu veya hafif kumlu gorunumlu,
- 3. Kalite;** 1-2 katlı hafif/düzensiz kompakt kumulus hucrer katmanı ve ooplazma hafif kumlu ya da homojen görünüme sahip,
- 4. Kalite;** ıplak oosit ve homojen/jel gorunumlu ooplazması bulunan oositler olarak nitelendirilmektedir.

Kumulus hucrerleri farklı fonksiyonlara sahip granuloza hucrerlerinin bir alt kumesidir. Oositin gelişimi sırasında besin desteği, zona pellusidanın oluşturulmasına katılma, çeşitli proteinlerin sentezlenmesi gibi görevleri bulunmaktadır. Yapılan alışmalar sıkı ve kalın bir kumulus katı ile çevrili oositlerin daha yüksek gelişim potansiyeline sahip olduklarını göstermiştir (Sirard ve ark., 1996; Gordon, 2003). Ayrıca

kumulus hücrelerinin sitoplazmik maturasyona katkı yaptıkları bildirilmektedir (Khatir ve ark., 1998). Dört ya da daha fazla kumulus hücre katmanına sahip oositlerin olgunlaşma yeteneklerinin çok daha iyi olduğu bilinmektedir (Younis ve ark., 1989).

Oosit değerlendirmede pratik olarak sadece kumululara bakıldığında;

A kalite: etrafında 5-6 sıradan daha fazla kumulus hücreleri bulunan ve homojen yapı gösteren oositler,

B kalite: etrafında 2-4 sıra kumulus hücre bulunan veya az bir kısmında kumulus bulunmayan oositler,

C kalite: etrafında kumulus hücresi bulunmayan oositler,

D kalite: etrafındaki kumulus hücre yığını dejenere durumda olan oositler olarak ayrılmaktadır (Kanagawa, 1995).

Araştırmacılar oosit çapı ile KOK kalitesi arasında da yakın bir ilişki bulunduğunu bildirmektedirler (De Wit ve ark., 2001).

2.1.2. İn Vitro Maturasyon

Maturasyon, diploid (2n) kromozom sayısına sahip olan oositlerin, mayoz bölünme ile kromozom sayılarını haploide (n) indirgemesi ve bu süreçte fertilizasyon yeteneği kazanması olarak tanımlanmaktadır (Xu ve ark., 1985). Oosit maturasyonu nükleer ve sitoplazmik maturasyon olarak iki aşamada gerçekleşmektedir (Bever ve ark., 1997). Nükleer maturasyon, oosit nükleusunun germinal vezikül aşamasından metafaz-2 (M-II) safhasına ulaşması durumudur. Bu gelişim, germinal vezikül yıkılması (Germinal Vesicle Break Down-GVBD), kromozom kondenzasyonu, birinci metafazın iğ iplikçiklerinin oluşumu, homolog kromozomların polar cisimcik vasıtasıyla atılması ve M-II durumuna geçilmesi olgularını kapsar. Ardından da redüksiyon bölünmesiyle birlikte kromozom sayısı haploit duruma gelir (Callesen, 1987).

Nükleer maturasyonunu tamamlayan ve M-II aşamasında olan oositin çapı yaklaşık 110 µm olur. Bu durum in vitro oosit maturasyonunda önemli bir yer tutar. Sığır oositleri 95 µm den küçük çapa sahiplerse mayoza devam edemezler. Bundan dolayı in vitro embriyo elde edilmesi amacıyla toplanan oositlerin 100 µm den büyük olmalarına özen göstermek gerekir (Hyttel ve ark., 2001).

Sitoplazmik maturasyon ise, oositin germinal vezikül (GV) safhasından metafaz-II (M-II) safhasına, olgun bir oosit oluncaya kadar geçirmiş olduğu değişimleri ifade eder. Bu değişimler, oositin normal fertilizasyonu, bölünmeye başlaması ve blastosist safhasına kadar ulaşmasında indirekt olarak etkilidir. Shamsuddin ve ark. (1993), sitoplazmik maturasyonun üç aşamada gerçekleştiğini bildirmişlerdir. İlk aşamada mitokondriler endoplazmik retikulumla yakınlaşmakta, ikinci aşamada lipid damlacıkları ve veziküllerin sayı ve boyut olarak azalmaları ve perifere yönelmeleri gerçekleşmektedir. Üçüncü aşamada ise kortikal granüllerin subplazmalemma bölgesine doğru hareket etmeleri ile sitoplazmik maturasyon tamamlanmaktadır.

Oositlerin olgunlaştırılmasında sıklıkla doku kültür medyumu (TCM-199), Ham's F10 ve F12, Minimum Esansiyel Medyumu (MEM) ve Menezo'nun B2'si gibi doku kültür medyumları kullanılmaktadır (Greve ve ark., 1993). Oositlerin olgunlaştırılmalarında kullanılan bu medyumlar kendi başlarına yeterli olmamaktadır ve bu medyumlara destek olarak serumlar, proteinler, hormonlar ve peptitler, sentetik olarak da inhibin, oksitosin, insülin benzeri büyüme faktörleri (IGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), aktivin kaynakları ilave edilmektedir (Thompson, 1996; Gordon, 2003; Çevik ve ark., 2011).

Sirard ve ark. (1996), IVM'de nükleer olayları izlemiş 18-24. saatte M-II oluşumunun gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Rutin IVM sistemlerinde maturasyon süresi olarak 22-24 saat aralığı kullanılmaktadır.

2.1.3. İn Vitro Fertilizasyon

İn vitro fertilizasyon sperm seperasyonu ve sperm kapasitasyonunu içeren karmaşık bir mekanizmadır (Gordon, 2003). İn vitro fertilizasyonun başarılı olabilmesi için, spermatozoonun kumulus hücrelerinden geçerek ooplazma içine girmesi ve erkek pronukleusun oluşum sürecine kadar olan fizyolojik ve biyokimyasal aşamaları kusursuz bir şekilde tamamlaması gerekmektedir (Leibfried, 1999).

İn vivo ortamda başarılı bir fertilizasyon için, memeli spermatozoasının zona pellusidaya penetre olup oositin plazma membranı ile birleşmesi için gerekli bir dizi hücre dışı olaylar zinciri olan kapasitasyon ve bunu izleyen akrozom reaksiyonu oluşur. Fertilizasyon yeteneklerini kazabilmeleri için spermatozoonlar kapasitasyon denilen fertilizasyon yeteneği olmayan hücreleri potansiyel fertil hücrelere dönüştüren bir dizi

karmaşık değişiklik geçirmek zorundadırlar. Kapasitasyon aşamasından sonra spermatozoa, oosit ve oositin diğer bağımlı bölümlerinden (kumulus hücreleri, zona pellusida) gelecek olan moleküler uyarımlara karşı cevap verebilecek hale gelir ve daha sonra akrozom reaksiyonu gerçekleşir (Fraser, 1998).

Akrozom, spermatozoon nükleusunun anterior kısmını içine alacak şekilde zarla kapatan bir yapıdır ve birçok hidrolize edici enzim içermektedir. Normal bir fertilizasyon için gereken ilk koşul olarak, akrozom reaksiyonu sırasında akrozom içeriği zona pellusidanın tetiklemesiyle serbest bırakılır. Membran reaksiyonu, baştan sona plazma membranı ile dış akrozomal membranın birleşmesini ve vezikülasyonu başlatır. Daha sonra bir çeşit akrozomal içeriğin serbest bırakılması ve iç akrozomal membranın dışa doğru bırakılması olayı meydana gelir. Birbirini takip eden spermatozoon kapasitasyonu ve akrozom reaksiyonu, ineklerde altı saat içinde tamamlanmaktadır (Liebfried, 1999).

İn vitro fertilizasyonda başarı şansını arttırmak için araştırmacılar, hipotaurin, heparin ve epinefrini birlikte kullanmışlar ve bunun sonucunda spermatozoa motilitesi ve fertilizasyon kabiliyetini önemli ölçüde uyarıldığını görmüşlerdir. Hipotaurinin spermatozoa motilitesi üzerinde etkili olduğu fakat epinefrin ve penisilamin ile beraber kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Rosenkranz ve ark., 1995). İn vitro fertilizasyonda BSA destekli olan Tyrode's Lactate (TALP-Tyrod'un Albumin Laktat Medyumu), Modify Defined Medium- Modifiye edilmiş medyumu (mDM), Brackett- Oliphant medyumu (BO), Biggers-Whitten-Whittingham medyumu (BWW), Krebs Ringer bikarbonat medyumu (KRB) gibi temel medyumlar kullanılmaktadır. Ayrıca bu medyumlara fertilizasyonun desteklenmesi amacıyla belirli oranlarda heparin, hipotaurin, oviduktal sıvı, folikül sıvısı, kafein ve kalsiyum iyonları ilave edilmektedir (Bavister ve ark., 1992; Gordon, 2003).

Bazı araştırmacılar ise sperma kaynağına göre in vitro fertilizasyon başarısının % 13-94 arasında değiştiğini bildirmektedirler (Yang ve ark., 1993). Boğalardaki bireysel farklılıklar mevsime, yaşı veya ejakulat kalitesine bağlı olabilmektedir. Ayrıca değişik boğalara ait spermatozoonların içerisinde bulunan dekapasitasyon faktör yoğunlukları da farklı olmakta yani seminal plazma kaynaklı düşük oranda fertilizasyon yeteneği ortaya çıkmaktadır (Yang ve ark., 1993; Abdoon, 2003; Hafez, 2000).

İnkubasyon ısısının fertilizasyon üzerine etkileri araştırılmış ve IVF için en uygun ısı olan 39 °C'de en yüksek fertilizasyon oranlarına ulaşıldığı bildirilmiştir.

Yapılan bir çalışmada 37 °C'deki inkubasyonda % 60,8'lik bir bölünme oranı sağlanırken, bu oran 39 °C'de % 76,7 olarak saptanmıştır (Gordon, 2003).

İn vitro fertilizasyon sürecinde geleneksel olarak % 5 CO₂ inkubasyon ortamı kullanılsa da % 5 CO₂, % 5 O₂ ve % 90 N₂ ortamları gibi değişik atmosferlerle yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. Sonuç olarak ortamın gaz ve nem yoğunluğu fertilizasyon oranını etkilemektedir (Gordon, 2003).

2.1.4. Sperma Ayırma Yöntemleri

İn vitro fertilizasyonda kullanılacak spermanın çeşitli yöntemlerle fertilizasyona hazırlanması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan yöntemler sayesinde, kaliteli spermatozoa sayısını arttırmak, seminal plazma, kriyoprotektan ve diğer maddelerin ortamdan uzaklaştırılması mümkün olmaktadır. Sperma ayırma yöntemleri olarak genellikle, Swim-up, Percoll density gradient ve Glass-wool filtrasyon yöntemi gibi temel yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin sığır IVF laboratuvarlarında en sık kullanılanı percoll gradient tekniğidir (Machado ve ark., 2009).

Percoll Gradient Tekniği

Sperma ayırma yöntemlerinden biri olan Percoll (Polivinilpirolidon, PVP ile kaplı silika parçacıklarının koloidal süspansiyonu) metodu 1980'lerde yaygın olarak kabul görmeye ve başarıyla kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntemde canlı sperm hücrelerinin ölü olanlardan ayrılması temel amaçtır. Ölü sperm hücrelerinin ağırlıklarının canlı olanlardan daha az olmasından yararlanılarak yoğunluklarına göre iki farklı tabakaya ayrılmış ortamda spermayı santrifüj ederek ayırmak mümkündür. Percoll ayırma yönteminin alternatif yöntemlere göre iki önemli avantajı bulunmaktadır.

Bunlardan ilki daha fazla canlı spermatozoonun elde edilebilmesidir. Diğeri ise spermatozoonun seminal plazma, somatik hücreler ile ölü ve morfolojik olarak anormal spermatozoonlardan daha hızlı ayrılmasıdır. Bir diğer dikkat çekici özelliği de motil spermatozoonun fertilizasyon kapasitesini düşürebilen olası serbest oksijen radikallerinden korumasıdır (Parrish ve ark., 1995).

Bu yöntemin sperm-oosit etkileşimini, fertilizasyonu ve embriyo oluşumunu pozitif yönde etkilediği de bildirilmektedir (Machado ve ark., 2009).

Percoll yönteminin sayılan tüm bu avantajlarının yanında, yüksek seviyede endotoksin içermesi gibi bazı dezavantajları da bulunmaktadır (Parrish ve ark., 1995).

Ayrıca Rheingantz ve ark. (2002), IVF sistemlerinden elde edilen blastosistlerin cinsiyet oranında Percoll ile swim-up yöntemlerini karşılaştırdıkları bir çalışmada, swim-up metodu ile elde edilen embriyolarda daha yüksek oranda erkek embriyo elde ettiklerini belirtmektedir.

Swim Up Tekniği

Swim up yöntemi, diğer sperm ayırma yöntemlerine göre bilinen en eski yöntemlerden biridir (Mahadevan ve ark., 1984). Orijinal adı “Sperm Rise” olarak belirtilen bu yöntem kendiliğinden aktif yönelme esasına dayanmaktadır. Swim up yönteminde amaç, motil spermatazoonların, motil olmayan spermatazoonlardan kendiliğinden ayrılmasıdır. Bu yöntemde, motilite bakımından çok iyi ve kaliteli olan spermatazoonlar elde edilirken diğer sperma ayırma yöntemlerine kıyasla elde edilen spermatazoon miktarı çok daha az olmaktadır. Ayrıca işlemin uzun sürmesi ve yoğun ejakülatlarda iyi sonuç alınamaması da bu yöntemin pratik bakımdan kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır (Coscioni ve ark., 2001).

Bazı araştırmacılar sperm yıkama medyumuna 5 mM glisin, 7,5 µM kafein eklenmesinin spermatozoon kalitesini ve embriyo gelişimini arttırdığı belirtilmektedir (Coscioni ve ark., 2001; Gordon, 2003).

Glass-wool filtrasyon Tekniği

Glass-wool filtrasyon yöntemi, seyreltilmiş boğa spermasının cam yünüden oluşan bir katmandan geçirilerek süzülmesi esasına dayanır. Canlı spermatozoonların filtreden geçerken, ölü spermatozoonların bu katmanda tutulması amaçlanır (Paulson ve ark., 1977). IVF uygulamalarında bu yöntem ile elde edilen motil spermatozoon sayısının, swim-up metodundan çok daha fazla olduğu ortaya konmuştur (Gordon, 2003)

Sperma Dozunun Ayarlanması

Sığır oositlerinin in vitro fertilizasyonu için pek çok laboratuvarında, genellikle çok sayıda spermatozoon (1×10^6) ile uzun süreli (20-24 saat) inkubasyon tercih edilmektedir (Hanada ve ark., 1986; Elder ve ark., 2003; Gordon, 2003).

İn vitro koşullarda bir oositin fertilizasyonu için ortamda en az 5000 fertil spermatozoon bulunmalıdır. Ayrıca spermatozoon yoğunluğu, kapasitör ajanların miktarları ve inkubasyon süresi de fertilizasyon ve polispermi oranı üzerinde önemli ölçüde etkili olmaktadır. İn vitro fertilizasyon laboratuvarlarında yaygın olarak oosit

başına 10×10^3 ile 20×10^3 arasında spermatozoon olacak şekilde fertilizasyon ortamı hazırlanmaktadır (Yang ve ark., 1993).

Saeki ve ark. (1995), tarafından yapılan bir çalışmada fertilizasyon medyumuna farklı yoğunluklarda spermatozoon katılmış ve en yüksek fertilizasyon oranı 1×10^6 spermatozoon/ml konsantrasyonu ile elde edilmiştir.

2.1.5. Embriyoların Kültürü

İn vitro fertilizasyondan sonra embriyoların istenilen gelişim dönemine ulaşınca kadar uygun ısı, nem ve gaz ortamında inkube edilmeleri gerekmektedir. Bu işleme embriyo kültürü adı verilir (Kanagawa ve ark., 1995; Gordon, 2003; Feugang, 2009). Embriyo kültüründe en kritik noktalardan biri kültür medyumunun seçilmesidir (Feugang, 2009; Suthar ve ark., 2009).

Bugüne kadar embriyo kültüründe farklı birçok kültür sistemi denenmiştir. Bunlar arasında sığır ovidukt epitel hücreleri (BOEC), kumulus hücreleri veya trofoblastik veziküller, hücre kültürleri, rat karaciğer hücreleri gibi hücrelerle yapılan ko-kültürler kullanılsa da yeni yaklaşımlar daha çok TCM-199, SOF, CR1aa (Charles Rosenkrans), CZB (Chatot Ziomek Bavister Medium), hamster embriyo kültür medyumunu-6 (HECM-6) ve G1.1/G2.2 vb. gibi kimyasal olarak tanımlanmış medyumların kullanılmasından yana olmaktadır (Cooke et al., 2002; Gordon, 2003; Suthar, 2009). Bunların arasında en çok tercih edilen embriyo kültür medyumları düşük oksijen konsantrasyonu (%5) yüksek blastosist verimi sağlayan TCM-199, SOF ve CR1aa medyumlarıdır (Gordon, 2003, Feugang, 2009; Suthar ve ark., 2009).

Kimyasal olarak tanımlanmış medyumlar kan bileşenleri ve hücrelerden arındırılmış ve aynı zamanda kolaylıkla sterilize edilebilmektedirler. Ayrıca geçmişe dönük kalite kontrolü de yapılabilmektedir (Rizos ve ark., 2008).

İn vitro fertilizasyon yoluyla elde edilen embriyoların kültürü için in vivo ve in vitro kültür sistemleri geliştirilmiştir.

İn Vivo Kültür

İn-vivo kültür sisteminde embriyolar senkronize edilmiş aynı ya da farklı yakın türden hayvanların oviduktlarına aktarılırlar (Gordon ve ark., 1990). Genellikle 7 ya da 8 gün süre ile gelişimlerini burada sürdüren embriyolar toplanır ve embriyo transferi ya da

dondurma işlemine geçilir. Bu yöntem günümüzde nadiren kullanılan bir yöntemdir (Gordon, 2003).

Standart (Tekli) Kültür

Bu kültür yöntemi içeriği bilinen kültür medyumları ile gerçekleştirilen in vitro kültür yöntemidir. Bu yöntemde herhangi bir medyum değişimine gerek duyulmamaktadır. Kültür medyumları çeşitli konsantrasyonlarda mineral tuzlar, enerji, antibiyotik ve hormon katkıları ile hazırlanmakla birlikte (SOFaa, KSOM, CR1aa) ticari olarak temin edilen medyumlar da (Quinn's Advantage Medium, QAM) kullanılmaktadır (Cooke ve ark., 2002; Gordon, 2003; Feugang, 2009; Suthar, 2009).

Sıralı (İkili) Kültür Sistemi

Standart kültür sistemlerinde toksik metabolitlerin birikmesi nedeniyle embriyoların olumsuz etkilenmesinin önüne geçmek için kültür medyumun 72. saatte yenilenmesi önerilmektedir. İn vivo ortamda embriyonun oviduktan uterusu göçü sırasında her iki dokuda da kompozisyonun ve gaz ortamının birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple geliştirilecek iki farklı medyum embriyonun ihtiyaçlarına göre ölçeklendirilir (Feugang ve ark., 2009). Örneğin embriyo erken gelişim döneminde piruvat kullanılırken, ikinci aşamada yani kompaktlaşma döneminde glikoz kullanılır. Glikoz blastulasyon, farklılaşma ve büyüme aşamasındaki embriyonun enerji ihtiyacını karşılamaktadır. Ayrıca erken embriyonik gelişim aşamasında aminoasitlerin sınırlı oranda kullanılması gerektiği bildirilmiştir. İkili kültür sisteminde amonyak birikiminin önüne geçilebilmekte ve serumun ortadan kaldırılmasıyla dev yavru riski bertaraf edilebilmektedir. İkili kültür sistemlerine örnek olarak; G1 / G2, KSOM / SOF, SOF1 / SOF2 ve SOF-A / SOF-B medyumları verilebilir (Cooke et al., 2002; Gordon, 2003; Suthar, 2009).

Ko-Kültür Sistemi

Ko-kültür yöntemi çok sık kullanılmayan fakat etkili bir yöntemdir. Bu yöntemde embriyolar, fibroblast, ovidukt epitel ve granuloza gibi farklı tiplerdeki hücreler ile birlikte kültüre edilirler. Bu yöntemde kültüre alınan hücrelerin salgılayacağı büyüme faktörlerinin embriyotrofik etkilerinden embriyonun yararlanmasını sağlamak amaçlanmaktadır. Ko-kültür sistemleri normal kültür amaçlı kullanılmakla birlikte aynı

zamanda kullanılan ticari ya da diğer hazırlanmış medyumların test edilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (Gandolfi ve ark., 1987; Gordon, 2003; Kelly ve ark., 2007).

Mikro Akışkan Sistemler

Mikro akışkan sistemler kültür medyumunun dereceli olarak değiştirilmesi sonucunda embriyo üzerindeki stres faktörlerini ortadan kaldırarak daha başarılı sonuçlar alınması hedeflenerek geliştirilmiştir. Bu sistemde embriyoyu hareket ettirmeksizin ortama kontrollü bir şekilde sıvı akışı sağlanır. Standart sistemlerde embriyoyu saran medyumun hacmi 50 µl iken burada 0,125 µl'dir (Beebe ve ark., 2002).

Mikrokültür Sistemi

Embriyo kültür sistemlerinde bir başka yenilik ise statik ve dinamik kültür sistemleri arasında sınıflandırılan mikrokültür sistemleridir. Mikrokültür sistemleri embriyoyu saran az miktardaki kültür medyumuyla, bunları saran yüksek miktardaki sıvının kombinasyonudur. Embriyo, embriyotrofik büyüme faktörlerini korumak için kendine bir mikro çevre oluşturmaktadır. Ancak en dıştaki yüksek hacimli ortamdan küçük moleküllerin geçişine de izin vermektedir. Bu metot 2000 yılında Gabor Vajta tarafından Well of the Well (WOW) sistemi adıyla geliştirilmiştir. Bu sistemde kültürün gerçekleştirildiği petri kabının tabanına uygun bir cihaz ve ısı yardımıyla kuyucuklar açılarak embriyolar için ayrı bir mikro sistem oluşturulmaktadır (Vajta, 2008).

Perfüzyon Sistemi

Perfüzyon sisteminde ise devamlı sıvı akış konsepti söz konusudur. Diğer sistemlerde inkubasyon sürecinde medyumun üzerini örten mineral yağ burada kullanılmaz. Medyum içeriğinin gaz ortamıyla temasının oldukça az olması ve bazı maddelerin kültür ortamından kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi ve ölçülebilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Fare ve insan embriyo kültürlerinde sıklıkla kullanılıyor olmasına karşın fiyatı ve özel malzemelere olan gereksinimi nedeniyle sığırlarda henüz sınırlı bir kullanım alanı bulabilmiştir (Feugang, 2009).

Embriyo kültüründe kullanılan kültür sistemleri Tablo 1'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 1. Embriyo kültür sistemlerinin karşılaştırılması (Feugang ve ark., 2009)

Sistem	Prensip	Medyum	Manipülasyon	Maliyet	Kaynak
Klasik	Kültür boyunca tek medyum	Drop (50 µL), kuyucuk (500 µl)	+++*	+	Summer ve ark. 2003
Sıralı	Bölünme ve kültür aşamaları için ayrı medyumlar	Drop (50µL), kuyucuk (500 µl)	+++	++	Gardner ve ark., 2005
Mikro kültür	Embriyoyu saran mikro düzeyde medyum	0,06-0,24 µl/embriyo	++	+++	Vajta ve ark., 2000
Perfüzyon	Dereceli değişkenler -medyum içeriği -gaz kompozisyonu -sıcaklık	30-70 µl/dk akış	+	++++	Lim ve ark., 1997
Mikro akışkan	Sürekli medyum akışı	0,125 µl akışkan medyum/embriyo	+	+++++	Glasgow ve ark., 2001

* +; düşük, +++++; yüksek

2.1.6. Embriyo Gelişimini Etkileyen Faktörler

İn vitro embriyo üretimi birbirini doğrudan etkileyen maturasyon, fertilizasyon ve kültür aşamalarını içermekte ve tüm bu aşamalar birçok faktör tarafından etkilenmektedir. Bunların başlıcaları; maternal ve paternal faktörler (tür, donör yaşı, oosit çapı, spermatozoon hasarı vb.), kültür sistemleri (tekli, sıralı vb.), medyumlarının içeriği (hormon, büyüme faktörü, protein kaynakları, su kalitesi, pH, osmolarite vb.) ve inkubasyon koşulları (süre, ısı, ışık, atmosfer vb.) olarak sayılabilmektedir (Leibfried, 1999; Hafez, 2000; Elder ve ark., 2003; Gordon, 2003; Gardner ve ark., 2004)

Transfer amacıyla üretilecek embriyoların genellikle morula aşamasını geçmiş, blastosist aşamasına ulaşmış olması istenir. Kültürlerinin yaklaşık olarak altıncı, yedinci gününde embriyolar; erken blastosist, blastosist veya genişlemiş blastosist aşamasında

olacak ve transfer sonrası gebelik şansı veya dondurulacaksa çözdürme sonrasında yaşam kabiliyetleri daha yüksek olacaktır (Gordon, 2003; Menezo, 2004).

Embriyo kültür medyumlarına erken embriyonik gelişimde önemli yeri olan aminoasitler, büyüme faktörleri, glutatyon, süperoksit dismutaz, taurin, sisteamin ve betamerkaptoetanol gibi antioksidanlar, EDTA veya desferrioksamin gibi şelatörler, vitaminler ve koenzim Q10, sodyum sitrat ve miyoinositol, hiyalüronan ve insülin-transferrin-selenyum (İTS), leptin gibi diğer moleküller ilave edile edilerek daha etkili kültür bileşimleri oluşturulmaktadır (Abdoon, 2003; Gordon, 2003; Rizos ve ark., 2008).

Sığır embriyolarının üretiminde oositlerin in vitro kültürleri 38-39 °C arasında sorunsuz bir biçimde gerçekleşmesine rağmen IVF sonrası in vitro kültürün 38,5-39 °C arasında olması gerekmektedir. İn vitro kültür ortamını 40 °C ve üzeri sıcaklıklarda olması IVF de önemli derecede zararlar ortaya çıkardığı bilinmektedir (Greve ve ark., 1993). Kültürün gerçekleştirileceği inkübatörde gaz kompozisyonununun % 5 CO₂, % 5 O₂ ve % 90 N₂ şeklinde ayarlanması önerilmektedir (Pinyopummintr ve ark., 1994). Özellikle % 20 ve üzerindeki O₂ konsantrasyonları embriyo gelişimini olumsuz etkilemektedir (Abdoon, 2003; Gordon, 2003).

Dondurma öncesi kültür medyumlarına ilave edilen serumun embriyo gelişim oranlarını olumsuz etkilediği, çözdürme sonrası kültüre ilave edildiklerinde ise blastosist canlılığına olumlu etki yaptığı bildirilmiştir (Mucci ve ark., 2006). Serum ilave edilmiş medyumlarda tutulan embriyolarda lipid damlacık hacmi ve sayısında artış gözlenmiştir. Bu lipid artışının hücrelerin donmaya karşı dayanıklılığını azalttığı belirtilmiştir (Abe ve ark., 2002). Ancak dondurma öncesinde iki hücreleri embriyolardan enüklasyon pipeti ile lipid damlacıklarının uzaklaştırılarak kriyotoleransın artırılabilceği de belirtilmektedir (Tominaga, 2000).

Memeli embriyoların kültüre alındıkları medyumların 7,2-7,6 pH aralığında ve osmolaritesinin ise 290-300 mOsm düzeyinde olması gerektiğini bildirilmektedir (Gordon, 2003).

Embriyolar in vitro üretim aşamaları süresince güneş ışığı ya da yapay ışığa maruz kalmaktadırlar. Her iki ışık türüne de maruz kalmanın embriyo gelişimi için olumsuz etkiler yarattığı ve mümkün olduğunca karanlık ortamda çalışılması gerektiği bildirilmektedir (Abdoon, 2003; Gordon, 2003).

İn vitro üretilen blastosistlerin, in vivo ortamda üretilen blastosistlere oranla daha koyu renkli bir sitoplazmaya, daha hassas bir zona pellusida'ya sahip oldukları, hücreler arası iletişim bağlarının zayıf olduğu, metabolizmalarında farklılıklar olduğu ve kromozomal anomalilere daha yatkın oldukları daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Pollard ve ark., 1994; Rizos ve ark., 2008).

Sitokinler

Sitokinlerin memelilerin erken embriyonik dönemlerindeki rolünün araştırılması günümüzde yoğun olarak devam etmektedir (Fukui ve ark., 1994; Han ve ark., 1995; Erickson, 1995; Schäfer, 2003; Neira ve ark., 2010).

Memeli metabolizmasında birçok farklı role sahip olan sitokinler hücreler düzeyinde regülatör proteinlerdir. Çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanır ve hedeflenen hücrelerin davranışını etkilerler (Clemens, 1991; Oppenheim ve ark., 1994).

Sitokinler başlıca şu ana gruplara ayrılmaktadır;

1) Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü, EGF; Platelet orijinli büyüme faktörü, PDGF; insülin benzeri büyüme faktörü-1, IGF-1; İnsülin benzeri büyüme faktörü-2, IGF-2; Sinir büyüme faktörü, NGF; Asidik fibroblast büyüme faktörü, aFGF; bazik fibroblast büyüme faktörü, bFGF; Neurolökin; Amfiregulin; Hepatosit büyüme faktörü, HGF v.b.)

2) Lenfokinler (interlökin-1a, IL-1a; II-1b; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15)

3) Koloni sitimüle eden faktörler (Granülosit/makrofaj koloni sitimüle eden faktör, GM-CSF; Granülosit-CSF; Multi-CSF; Eritropoietin, EPO; Lösemi inhibitör faktör, LIF)

4) Transforme edici büyüme faktörleri (TGF-a; TGF-b)

5) Tümör nekroz faktörleri (TNF-a; TNF-b)

6) Interferonlar (IFN-a; IFN-b; IFN-g)

(Clemens, 1991; Oppenheim ve ark., 1994).

Sitokinler hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak intrasellüler sinyal yollarını tetiklerler. Otokrin, parakrin ve endokrin mekanizmalarla etki gösterirler. Bu mekanizmaların harekete geçmesi çoğunlukla hücre bölünmesiyle sonuçlanır (Clemens, 1991; Oppenheim ve ark., 1994).

İn vivo stimilatör ve inhibitör etkilerinin olduğu bilinen bu moleküllerin, embriyo gelişiminden, yara iyileşmesine kadar uzanan birçok konuyla olan ilişkisine tam olarak açıklık getirilememiştir. Embriyo gelişimi ile ilgili büyüme faktörleri epidermal büyüme faktörü EGF, insülin benzeri büyüme faktörü IGF-1-2, fibroblast büyüme faktörü FGF, trombosit kaynaklı büyüme faktörü PDGF, vasküler endotelial büyüme faktörü VEGF, büyüme farklılaşma faktörü GDG-9 olarak sıralanmaktadır (Erickson, 1995; Gordon, 2003).

Yukarıda adı geçen birçok büyüme faktörü ve sitokinden embriyo kültüründe etkili olarak kullanılmakta olanlara aşağıda yer verilmiştir.

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

İnsülin benzeri büyüme faktörü ailesi peptid yapıda olup, düşük moleküler ağırlıktaki büyüme faktörlerinden biridir. Bu faktör, hücre gelişim ve farklılaşmasını düzenleyip, apoptoza karşı koruyucu bir faktör olarak rol oynamaktadır (Sirisathien ve ark., 2002; Han ve ark., 2003).

Büyüme faktörlerinin (IGF-1, IGF-2, EGF) embriyo çözündürme çalışmalarında kullanılması sonucu embriyo canlılık oranlarında artış olduğu bildirilmiştir (Desai ve ark., 2000). Bu konuda yapılan ko-kültür çalışmaları bizlere büyüme faktörlerinin olumlu etkisi hakkında dolaylı kanıtlar sunmaktadır. Bunlardan biri IGF-1 ve LIF'in embriyotrofik etkilerinin gösterilmesidir (Brackett ve ark., 1997; Desai ve ark., 2000).

Buna ilave olarak IGF-I-II, faktörlerinin serum içermeyen kültürlerde embriyoların blastulasyonunu önemli ölçüde desteklediği bildirilmiştir (Desai ve ark., 2000).

Epidermal Büyüme Faktörü

Epidermal büyüme faktörü (EGF), 6 kDa ağırlığında bir peptid olup mitojenik potansiyele sahiptir. Hücrelerin çoğunda proliferasyonu uyarır. EGF, proteolitik bir bölünme ürünü olan 128 kDa ağırlığında tirozin kinaz aktivitesi gösteren bir hücre yüzey reseptörü ile etki etmektedir. Fare embriyolarında yapılan bir çalışmada embriyonik EGF'nin ise blastosistin inner cell mass (ICM) ve trofoektoderm (TE) hücre tabakalarına etki ettiği bildirilmiştir. Sığır embriyolarının in vitro kültürüne ilave edilen EGF'nin oosit maturasyonu ve embriyo gelişimini olumlu etkilediği bildirilmiştir (Lonergan ve ark., 1996).

Lösemi İnhibitör Faktör

Lösemi inhibitör faktör (LIF), sitokinlerin IL-6 ailesinde yer alan bir faktördür. İki alt reseptöre (LIFr ve gp 130) bağlanmaktadır. Bu faktör 45-56 kDa büyüklüğünde pleiotropik etkili bir glikoproteindir. İlk olarak makrofaj farklılaşmasındaki hematopoetik etkisi ile tanımlanmıştır (Tomida ve ark., 1984). İlerleyen yıllarda çeşitli doku ve hücre gruplarında farklı görevler üstlendiği bildirilmiştir. Sığırlarda embriyo tarafından ve ovidukt epiteli fibroblastlarınca sentezlenen bu faktörün LIFr ve gp130 transkripsiyon faktörleri de blastosistlerde implantasyon öncesi dönemde de salgılanmaktadır (Hilton ve ark., 1991; Reinhart ve ark., 1998; Schäfer, 2003). Uterustan LIF salınımında EGF ve human chorionic gonadotrophin (hCG) ile birlikte p53 geninin aktif rol oynadığı bildirilmektedir (Hu ve ark., 2007). kontrol eden faktörlerden östrojen seviyesiyle doğru orantılı olarak folikül sıvısında varlığı tespit edilen ve blastosistlerin TE hücre tabakasınınca sentezlendiği belirtilen LIF'in yalnızca embriyonik hücre farklılaşmasında değil, oosit maturasyonundan, implantasyona kadar uzanan süreçte rol oynadığı bildirilmiştir (Smith ve ark., 1988; Hilton, 1992; Arici ve ark., 1997, Smith ve ark., 1998).

Blastosist aşamasındaki embriyoların kültürüne ilave edilen LIF'in gelişimi olumlu etkilediği bildirilmiştir. Bu yönde yapılan bir çalışmaya göre LIF, in vitro üretilen sığır embriyoların canlılığını arttırmaktadır (Fry et al., 1992). Eckert ve ark. (1998), tarafından bildirildiği üzere in vitro kültüre edilen embriyolarda mRNA ve LIF/LIFr reseptör sistemlerine spesifik ekspresyon yollarında aksamalar olmaktadır. Bu durum da blastosistteki ICM ve TE hücrelerin gelişimlerinde anormalliklere yol açabilmektedir (Eckert ve ark., 1998; Oshima ve ark., 2003; Rizos ve ark., 2003).

Embriyoların LIF salgılayabilen hücre tipindeki (plasental fibroblast gibi) kültürlerde, LIF salgılayamayan tip hücre kültürlerine oranla daha yüksek blastosist oranlarına ulaştıkları bildirilmektedir. Benzer şekilde embriyo kültürüne yapılacak LIF ilavesinin zonadan çıkma oranını ve implantasyon oranını arttırdığı, blastosist dejenerasyonunu ise azalttığı bildirilmiştir (Kauma ve ark., 1995; Chen ve ark., 1999).

Diğer bir çalışmada sığır embriyoları in vitro kültürü gerçekleştirilen SOF medyumuna LIF ilave edilmesinin blastosist gelişimini olumlu etkilediği bildirilmiştir (Fukui ve ark., 1994; Han ve ark., 1995).

Sığır embriyoları ve plasentasında LIF ve LIF reseptörlerinin gen ekspresyonları tespit edilmiştir. Kültür medyumuna 5 ile 10. günler arasında yapılacak LIF ilavesinin zonadan çıkma oranı ve TE hücre sayısına olumlu etkisi olduğu bildirilmiştir (Yamanaka ve ark., 2001)

Bu faktörün implantasyon öncesi dönemdeki etkilerini diğer sitokinlerle sinerjistik etki ile embriyodaki ICM ve TE hücre farklılaşmasını düzenleyerek, blastosistlerin zonadan çıkma oranına olumlu etkisini ise, proteolitik aktiviteyi destekleyerek gerçekleştirdiği savunulmaktadır (Harvey ve ark., 1995).

Lösemi inhibitör faktör embriyoların yalnızca erken dönem embriyo gelişiminde değil desidualizasyon ve implantasyonunda da önemli rol oynar. Oviduktaki hücrelerce ovulasyonun hemen öncesinde ve fertilizasyon sonrası dördüncü günde yüksek seviyelerde sentezlenen LIF embriyoyu implantasyona hazırladığı bildirilmektedir (Stewart ve ark., 1992; Chen ve ark., 2000).

Yapılan bir çalışmada LIF knockout farelerde uterus dokusunda desidualizasyon şekillenmediği ve bunun sonucunda implantasyonun sağlanamadığı ancak dışarıdan LIF ilavesi ile gebelik elde edilebildiği bildirilmiştir (Stewart ve ark., 1992). Yine benzer şekilde implantasyon öncesi dönemde intraperitoneal yolla anti-LIF ajanların enjeksiyonu ile farelerde implantasyonun engellenebildiği bildirilmiştir (Terakawa ve ark., 2011).

Lösemi inhibitör faktörün implantasyon dönemi etkilerini ise, endometrium epiteline parakrin etki ile IL-1 ve EGF ailesine ait faktörlerin salınımını uyararak ve laminin reseptörleri olan integrinleri eksprese eden sitotrofoblastın jelatinolitik aktivitesini inhibe etmesinin yanında, TE hücre artışı ve invazyonunu destekleyerek gerçekleştirdiği belirtilmektedir (Fry et al., 1992; Bischof ve ark., 1995; Castro-Rendon ve ark., 2006).

Han ve ark., (1995), embriyo kültür medyumuna ilave edilecek 5000 IU/ml dozundaki LIF'in blastosistlerin kriyotoleransını arttırdığını ve zonadan çıkma oranını yükselttiğini bildirmiştir.

Büyüme faktörlerinin dondurma çözündürme işlemi uygulanan embriyolar için de yaşamsal öneme sahip oldukları bilinmektedir. Özellikle embriyolarda kritik az sayıda yer alan ICM hücrelerin kaybının en aza indirilebilmesinin bu faktörler ile mümkün olabileceği bildirilmektedir (Desai ve ark., 2000).

2.1.7. Embriyoların Değerlendirilmesi

Embriyoların kalitelerinin değerlendirilmesi için, bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin tümü, gebelik oranları esas alındığında, eşit derecede güvenilir yöntemlerdir. Günümüze kadar embriyoların değerlendirilmesi amacıyla morfolojik ya da hücresel ölçümlere dayanan çok sayıda skorlama yöntemi geliştirilmiştir. Embriyo kalitesinin değerlendirilmesinde yaygın biçimde kullanılan parametreler; şekil, renk, hücrelerin sayısı ve kompaktlığı, perivitellin boşluğun genişliği, apoptotik ve dejenere hücrelerin sayısı ile veziküllerin sayı ve hacmi olarak sıralanabilir. Sığır embriyolarının çapı yaklaşık olarak zona pellusida ile birlikte 150-190 µm arasında değişmektedir. Sığır embriyolarının kalite değerlendirmesinde en yaygın biçimde kullanılan kriter, embriyoların uygun gelişme aşamalarına ulaşip ulaşmadığının kontrol edilmesidir (Lindner ve ark., 1983; Gardner ve ark., 1999).

Erken bölünme dönemindeki embriyolar, zigot, iki hücreli ve dört hücreli örneklerinde olduğu gibi 16 hücre aşamasına kadar genellikle mevcut sayılabilen hücrelerin sayılarıyla tanımlanırlar. On altı hücreden fazla sayıda hücreye (blastomere) sahip canlı embriyoların yapılan mikroskopik muayeneleri ile ancak mevcut hücrelerin tahmini sayısı ortaya konabilir. Bunun sonucu olarak da, diğer morfolojik kriterlerin kullanılması zorunludur.

Kısaca özetlemek gerekirse embriyolar altı ana gruba ayrılabilir. Farklı gelişme dönemindeki embriyoların gelişim dönemlerine göre listesi aşağıda sıralanmış ve kısaca açıklanmıştır (Gardner ve ark., 1999).

Morula: Hücreler yumağı olarak tanımlanan bu dönemde, bireysel blastomerleri, diğerlerinden ayırt etmek güçtür. Embriyoların hücresel yığını perivitellin boşluğun büyük çoğunluğunu kaplamaktadır.

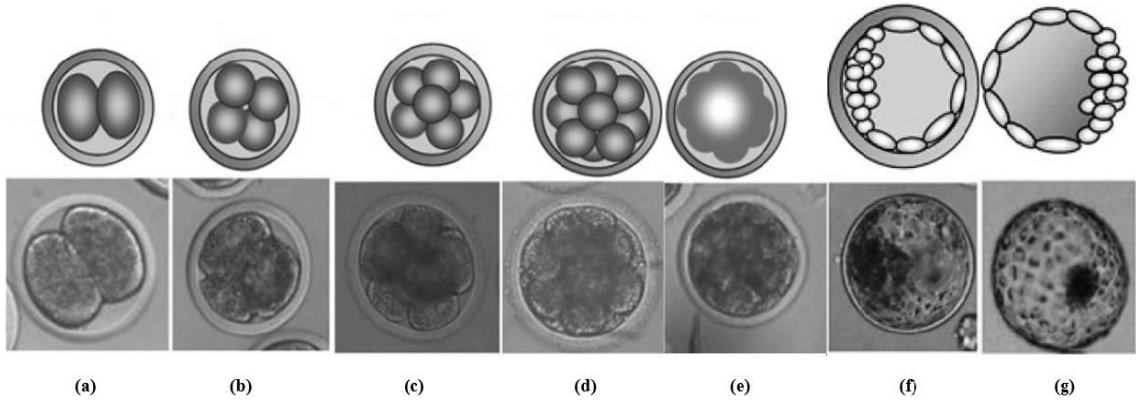
Kompakt Morula: Bireysel blastomerler birleşerek, tek vücut olmuştur ve kompakt bir yığın şekillendirmiştir. Embriyo yığını perivitellin boşluğun yaklaşık %60-70'ini kaplamaktadır.

Erken Blastosist: Bu dönemdeki embriyo, blastosöl olarak adlandırılan sıvı ile dolu bir boşluğa sahiptir ve mühür yüzüğü şeklinde genel bir görünüm gösterir. Embriyo perivitellin boşluğun yaklaşık %70-80'ini kaplar. Trofoblast hücreleri ile iç hücre kitlesi arasındaki görülebilir fark, bu dönemde gözlemlenebilir hal almaya başlar.

Blastosist: Dıştaki trofoblast kat ile daha koyu ve kompakt olan iç hücre yığınının belirgin farkı tam anlamıyla gözlenebilir hale gelir. Perivitellin boşluğun büyük çoğunluğunu dolduran embriyo ile blastosel oldukça göze çarpar bir şekil alır.

Genişlemiş (Expanded) Blastosist: Embriyonun çapı çarpıcı biçimde artarken (1,2-1,5 kat), zona pellusida orijinal kalınlığının yaklaşık 1/3 oranına kadar incelir. Genişlemiş blastosit döneminde iken elde edilen embriyolar sıklıkla kollobe olmuş biçimde görünürler. Bu durum ya tümüyle ya da kısmen blastosel kaybından kaynaklanmaktadır. Buna karşın, zona pellusida nadiren orijinal kalınlığına tekrar dönebilir.

Sarkmış (Hatched) Blastosist: Gelişimin bu döneminde iken elde edilen embriyolar, zona pellusidayı terk etmiş durumdadırlar. Yarıklanmış blastositler, blastoselle iyi biçimde sınırlanmış şekilde küresel görünümündedirler. Bu dönemdeki embriyoların identifikasyonu deneyimsiz uzmanlar için güçtür (Şekil 1).



Şekil 1. Embriyoların gelişim dönemlerine göre görünümü. (a); iki hücre, (b); 4 hücre, (c); 5-8 hücre, (d); 8-16 hücre, (e); morula, (f); blastosist, (g); zonadan çıkmış blastosist (Asgari ve ark., 2012'den uyarlanmıştır)

Embriyo kalitesinin değerlendirilmesinde en iyi kriter transferinden sonra sağlıklı bir yavru alınabilmesi olmakla beraber değerlendirmede bazı alternatifler de mevcuttur. Bunlar; re-ekspansiyon ve hatching oranları, Total, ICM ve TE hücre sayılarının değerlendirilmesi ve metabolik çalışmalardır (Rall, 1992; Kaidi ve ark., 1998; Gardner ve ark., 2004).

Diferansiyel Boyama

Embriyolar hücresel farklılaşma dönemine girdiğinde iki farklı hücre tipi ön plana çıkar. Bunlar iç hücre kitlesi (inner cell mass, ICM) ve trofoektoderm (TE) tabakadır. Embriyoyu çepeçevre saran ve epitelyal tabakasını oluşturan ve TE hücreler blastosel boşluğun şekillenmesi ve implantasyonda rol oynarken, ICM hücreler blastosel boşlukta yer alır. İki hücre tipi arasında temel farklılık, TE hücreler sınırlı bir yönde (multipotent) farklılaşma gösterirken (ekstraembriyonik dokular, plasenta, vitellüs kesesi gibi), ICM hücreler ise hala totipotent karakterde olup sonucunda fetusu oluşturacak dokulara farklılaşırlar (Gardner ve ark., 1975; Van Soom ve ark., 1996).

Nükleer boyama metotları ile bu hücre sayılarının belirlenmesi blastosist kalitesinin değerlendirilmesinde etkili yöntemlerdir (Papaioannou ve ark., 1988).

Monokromotik boyalar ile blastosistlerin toplam hücre sayıları belirlenebilirken, propidyum iyodid (PI) ve bis-benzimid (BISB) gibi iki farklı florokrom boya kullanılarak farklı hücre tabakaları farklı renklerde boyanabilmektedir. Eritilen membranlardan geçen PI, TE hücreleri kırmızı-pembe renge boyarken, BISB ICM hücreleri mavi renge boyamaktadır (Van Soom ve ark., 1996; Thouas ve ark., 2001).

Bu teknik kullanılarak fare, rat, tavşan, insan, sığır, koyun, domuz gibi çok sayıda türe ait blastosist, hücre tabakaları ayırt edilerek boyanmıştır (Handside ve ark., 1984; Papaioannou ve ark., 1988; Hardy ve ark., 1989; Iwasaki ve ark., 1990).

Günümüzde de kullanılan bu yöntemin ısı, ışık gibi fiziksel etkilere çok duyarlı olması, uygulama süresinin uzun olması ve blastosistler için fazla sayıda işlem gerektirmesi, boyama ile blastosistlerin canlılığını kaybetmesi gibi dezavantajları mevcuttur. Bu sebeple daha basit ve hızlı metotların geliştirilmesi için çalışmalar devam etmektedir (Stojkovic ve ark., 1998; Thouas ve ark., 2001)

İn vitro üretilmiş embriyolar ile in vivo olanlar karşılaştırıldığında bunlarda kompaktlaşma oranının ve “tight-junctions” adı verilen bağlantıların sayılarının daha az olduğu gözlemlenmiştir. Tight-junctions denilen bu oluşumların, blastosel formasyonu, blastosist genişlemesi ile TE-ICM hücre popülasyonlarının farklılaşması için mutlak surette gerekli yapılar olduğu bildirilmektedir (Papaioannou ve ark., 1988; Van Soom ve ark., 1996).

2.2. Embriyoların Dondurularak Saklanması

Memeli embriyolarının dondurularak saklanmasını hedefleyen çalışmalar 1950'li yıllara dayanmaktadır. Smith (1952), bu alanda ilk olarak, in vivo fertilize olmuş pronükleer tavşan embriyolarını dondurmıştır. Birçok gelişmiş teknik bu temel çalışmadan köken almaktadır. Whittingham ve ark. (1972), dondurulup çözdürülen moruların transferi sonrası canlı fareler elde etmiştir. Kemirgenlerde edinilen tecrübeyle, kriyoteknoloji endüstriyel kullanıma girmiş ve büyükbaş hayvanlara da uygulanmıştır. Dünyada 1980'den beri, her yıl 100.000'den fazla dondurulmuş embriyo transfer edilmektedir (Veiga ve ark., 2001).

Son yıllarda memeli embriyolarının dondurularak saklanması beşeri ve veteriner hekimlik alanının ortak gündemi olmaya devam etmektedir. Literatürde 2008 yılı itibariyle yalnızca “embriyo kriyoprezervasyonu” başlığı altında 2300'den fazla makale yer almaktadır (Leibo, 2008).

Günümüze kadar yirmiden fazla türe ait dondurulmuş embriyodan milyonlarca canlı yavru elde edilmiş olmasına rağmen kusursuz bir dondurma protokolü henüz tanımlanmış değildir (Leibo, 2008; Saragusty ve ark., 2011).

2.2.1. Embriyoların Dondurulma Yöntemleri

Embriyoların dondurulmasında günümüzde birçok farklı yöntem uygulanmaktadır. Embriyoların elde edildiği tür, gelişim dönemi, dondurulma amacı, farklıklar gösterse de neredeyse tüm kriyoprezervasyon yöntemlerinde iki temel faktör belirleyicidir. Bunlardan biri kriyoprotektan maddeler diğeri de soğutma-çözdürme oranıdır. Embriyoların dondurularak saklanmasında iki temel protokol uygulanmaktadır. Bunlardan biri yavaş dondurma diğeri ise vitrifikasyondur (Gordon, 2003; Vajta ve ark., 2006a).

Geleneksel yavaş dondurma

Bu yöntemde hücreler önce oda ısısında kriyoprotektanlara alıştırıldıktan sonra kademeli olarak (0,2-2 °C/dk) nihai dereceye (-70 °C, -196 °C) ulaşmaya kadar soğutulur. Yavaş veya kontrollü dondurma aynı zamanda standart, geleneksel veya equilibrium (dengeli) dondurma yöntemi olarak da adlandırılır (Rall, 1992; Palasz ve ark., 1996).

Yavaş dondurma sisteminde, diğer dondurma sistemlerine göre daha pahalı ve komplike cihazlar kullanılmaktadır. Bu durum olumsuz olarak algılansa bile daha sistematik olması, hata ve yanılma paylarının daha düşük olması avantaj olarak nitelendirilmektedir. Yavaş dondurmada kullanılan koruyucu maddelerin oranı yaklaşık olarak 1-2 molar civarında olmaktadır.

Kademeli dondurma yöntemlerinde dondurma sırasında soğutma oranının 2 °C'den az olması ile hücrelerde sürekli dehidrasyon gerçekleşmesi sağlanmaktadır. Yani hücrelerdeki ozmotik dengeleme durumu soğutma işlemi sırasında gerçekleşmektedir (Agca, 2000; Massip, 2001; Sağırkaya, 2001).

Soğutma oranının saptanmasında üç önemli faktör kullanılmaktadır. Bunlar membran yapısı, hücre plazma membranının suya ve kriyoprotektana karşı ısıya bağımlı geçirgenliği ve yüzey / hacim oranıdır (Agca, 2000; Massip, 2001; Gordon, 2003).

Sığır blastosistleri yavaş dondurma ile dondurulduktan sonra yavaş olarak çözündürüldükleri takdirde canlılık oranlarında düşme şekillendiği bildirilmiştir. Bu bakımdan yavaş dondurma ile dondurulan blastosistlerin yavaş olarak çözündürülmemeleri gerekir. Embriyo yüklü payetler direkt olarak oda ısısında çözündürülürse payetin ısısı -196 °C'den +37 °C'ye gelmesi için geçen süre uzamaktadır (>196 °C/dk). Ancak payet su banyosunda çözülürse bu süre kısalmaktadır (<4460 °C/dk). Bu bakımdan payetlerin su banyosunda çözündürülmeleri zorunludur aksi halde zona pellusida zarar görebilir (Liebermann ve ark., 2002).

Hızlı dondurma yöntemi

Hızlı dondurma, hücrelerin yüksek dondurma oranlarının uygulanmasından önce kısmen dehidre edildiği işlemi tanımlamaktadır. Bu yöntemde dondurma hızı oldukça yüksek olup yaklaşık olarak 1200-1250 °C / dk düzeyindedir. Bu yöntemde kullanılan kriyoprotektan maddelerin oranı yaklaşık olarak 2-4,5 molar civarındadır. Hücre zarından nüfuz edebilen DMSO, gliserol, propanodiol ve etilen glikol gibi kriyoprotektanlardan en az birisinin 2 ile 4,5 M kadar, hücre zarından nüfuz edemeyen trehaloz, sükroz, galaktoz ve laktoz gibi kriyoprotektanlardan birisinin 0,25 ile 0,5 M kadar karışım oluşturularak kullanılması hızlı dondurma uygulamalarında başarılı sonuçlar vermektedir. Hızlı dondurma yönteminde hücrelerin ozmotik dengeleme medyumlarına kısa süreliğine (30 sn- 3dk) maruz bırakılması gerekmektedir. Bu sistem hücrelerin yüksek molaritedeki kriyoprotektanın toksik etkisini ve ozmotik farklılığın

meydana getirdiđi Őok etkisini en az dűzeye indirgenmesine neden olmaktadır. Kısa ozmotik dengeleme medyumuna maruz bırakılan hűcreler kısmen dehidasyona uđrarlar ve bu aŐamadan sonra hűcreler sıvı azot buharında çok kısa bir sűre azot buharında tutulup direk olarak sıvı azota daldırılarak dondurulurlar. Bu hızlı dondurma yűnteminde, vitrifikasyon yűntemine gűre farklı olarak hűcre dıŐı sıvı donar ve dondurma medyumunun ozmolaritesinde kısmi artıŐ meydana gelir. Hızlı dondurma yűnteminde embriyolar çözme sırasında uygun molariteye sahip özűndűrme medyumları kullanılmadıđı takdirde hűcrelerde buz kristalleri, ani űlűm ve enine dađılarak parçalanma durumu meydana gelebilmektedir (Palasz ve ark., 1996).

Vitrifikasyon yűntemi

Vitrifikasyon hűcrelerin, dokuların veya organların dűŐuk sıcaklıklarda hűcre içerisinde tamamıyla vitrűz ya da camsı bir durumun yaratılmasıyla dondurulmasını ifade eden bir terim olarak kullanılmaktadır. Vitrifikasyon prosedűrű ilk kez fare embriyolarında baŐarıyla gerçekleŐtirilmiŐtir. Gűnűműzde vitrifikasyon, embriyoların özdűrme sonrası alıcı hayvanlara direkt transferine de olanak sađlayan baŐarılı bir kriyoprezervasyon yűntemidir (Rall ve ark., 1985; Vajta, 2000; Zhu ve ark., 2001; Vajta ve ark., 2006b). Geleneksel yavaŐ dondurma yűntemleri ile vitrifikasyon arasındaki en űnemli fark yavaŐ dondurma yűntemlerinde kullanılan kriyoprotektan madde konsantrasyonunun dűŐuk olması ve ısının programlanabilir bir cihaz yardımıyla kontrollű Őekilde dűŐűrűlmesidir (Vajta ve ark., 2006b; Hasler ve ark., 2009).

Vitrifikasyon yűnteminde kriyoprotektan, ozmotik basınç farkı yaratılarak hűcre içerisine alınırken, hűcre içi sıvı hűcre dıŐına çıkar. Bűylelikle dondurma sırasında hűcre içerisinde viskozitenin çok yođun olması ile buz kristalleri Őekillenmez (Vajta, 2000; Sađırkaya, 2001; Bađis ve ark., 2002). Ancak baŐarılı bir vitrifikasyon için viskozitede çok yođun bir artıŐ gerekmektedir. Bunun için ya yűksek sođutma oranları ya da dűŐuk sıcaklık derecelerinde viskoziteyi arttıran ve buz kristallerinin oluŐumunu baskılayan kriyoprotektanların kullanımı gerekmektedir. Vitrifikasyon yűnteminde 0,25 ml'lik payetlerin sıvı azot içerisine direk olarak daldırılması ile elde edilen en yűksek sođutma hızı yaklaŐık olarak 2500 ⁰C/dk'dır. Ancak payetler içerisindeki embriyoların zona pellusidalarında oluŐacak çatlama ve kırılmaları űnlemek amacıyla, yukarıda sűzű edilen sođutma oranının direk olarak uygulanamayacađı yapılan çalıŐmalar ile gűsterilmiŐtir. Bu noktada kriyoprotektanların 5-7 molar gibi yűksek konsantrasyonlarda kullanılması ile

vitrifikasyon sağlanabileceği gösterilmiştir. Bu oran yavaş dondurmadaki konsantrasyonların yaklaşık 2-3 katıdır (Massip ve ark., 1989; Kasai, 1996).

Bu oran çok yüksek olduğundan kullanılacak kriyoprotektanların hücrelerde yaratacağı toksik etkiler çalışmaların başarısı açısından önemli bir rol oynayabilmektedir. Bu nedenle yüksek konsantrasyonlarda kullanılan kriyoprotektanların yaratacağı olumsuz etkileri en az düzeye indirmek amacıyla çeşitli önlemler alınmaktadır. Bu önlemlerin başında, ozmotik dengeleme, zamanının kısaltılması, iki aşamalı ekilibrasyon, kimyasalların toksik etkilerini azaltan sükroz, trehaloz ve formamid gibi bazı kimyasal maddelerin kullanılması gelmektedir. Ayrıca çözündürme sırasında uygulanan çözündürme hızı da tekrar kristalleşme oluşumunun önüne geçilmesi bakımından önemli olmaktadır (Palasz ve ark., 1996; Sağıraya, 2001; Bagis ve ark., 2002).

Yavaş dondurma ile vitrifikasyonla dondurulan evcil hayvan embriolarının in vitro ve in vivo gelişim oranlarının karşılaştırıldığı birçok çalışmada eşit sonuçlar ya da vitrifikasyon lehine sonuçlar bildirilmiştir (Agca, 2000; Kasai, 2002).

Soğutma hızını yükselterek vitrifikasyon yönteminin verimliliğini arttırmak amacıyla kullanılan ekipmanların geliştirilmesi çalışmaları halen devam etmektedir. Vajta ve ark., (1998), tarafından geliştirilen açık çekilmiş payet (OPS) yöntemi de bu amaçla geliştirilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Aynı işlem cam pipetlerin çekilmesiyle de başarılı şekilde uygulanmıştır (Vajta ve ark., 1998; Kong ve ark., 2000). Protein kristallerinin vitrifikasyonu amacıyla başarıyla kullanılan naylon halkalar, embrioların vitrifikasyonu amacıyla modifiye edilerek başarı ile kullanılmıştır. Bu yöntemde naylon halka üzerindeki medyumun toplam hacmi 1 µl'den daha azdır.

Yöntemin en önemli avantajlarından biri çözündürme sonrası geri kazanım oranının diğer yöntemlere oranla yüksek olmasıdır (Lane ve ark., 1999).

Bagis ve ark. (2002), tarafından geliştirilen katı yüzey vitrifikasyonunda (SSV) ise sıvı azot içerisine kısmen batırılmış ve alüminyum folyo ile kaplanmış olan metal cismin üzerine fare embrioları içeren 1-2 µl'lik vitrifikasyon medyum damlalarının damlatılması ile donma hızı daha da arttırılmıştır. Kaidi ve ark. (2001), yavaş dondurma ile dondurulan embriolarda hücre kayıplarının çok ancak vitrifikasyon ile yapılan dondurma çalışmalarında ise çok az olduğunu belirtmiştir. Aynı çalışmada dondurulup çözdürülen blastosistlerin kültürleri sonunda TE hücrelerde kayıp olduğu fakat ICM

hücrelerde herhangi bir hücre kaybına rastlanılmadığı tespit edilmiştir (Bagis ve ark., 2002).

Vitrifikasyon tekniği, diğer dondurma tekniklerine göre daha az maliyetli ve daha pratik olması, komplike alet ve ekipmanlara gerek duyulmaması nedeniyle ön plana çıkmaktadır. Ancak vitrifikasyon metotları arasında büyük farklılıklar bulunması ve kabul gören standart bir yönteminin olmaması, her payet için ayrı zaman harcanması, manipülasyonların beceri gerektirmesi, embriyo kaybetme riskinin fazla olması vitrifikasyonun özellikle embriyo dondurmada, pratik olarak kullanımını sınırlandırmıştır (Vajta, 2000; Zhu ve ark., 2001; Vajta ve ark., 2006a).

Vitrifikasyon tekniği ile yapılan embriyo dondurma çalışmalarının tarihsel gelişimi Tablo 2’de belirtilmiştir.

Tablo 2. Memeli embriyolarının vitrifikasyon tekniği ile dondurulma çalışmaları (Gordon, 2003’den uyarlanmıştır)

Yıl	Tür	Araştırmacı
1985	Fare	Rall and Fahy
1986	Sığır	Massip et al.
1986	Hamster	Critser et al.
1988	Rat	Kono et al.
1989	Tavşan	Smorag et al.
1990	Koyun	Scieve et al.
1994	At	Hochi et al.
1998	Domuz	Kobayashi et al.

2.2.2. Kriyobioloji ve Kriyoprotektanlar

Embriyoların dondurularak saklanmasıdaki amaç, organizmayı o andaki haliyle korumak ve tekrar çözdürüldüğünde yaşamına kaldığı yerden devam etmesini sağlamaktır (Gordon, 2003). Embriyoların iç ısılarının düşürülmesi ile hücre için enzim aktivitesi, hücresel respirasyon, metabolizma, gelişim ve bölünme gibi birçok olay neredeyse tamamen durmaktadır. Bu sayede hücrenin fizyolojik aktivitesi belirgin şekilde

durdurulur ve çok uzun süre yaşama yeteneğine zarar vermeden ve genetik bozukluklara neden olmadan korunabilir (Hasler, 2009).

Hücre biyokimyasında; sıcaklığın 37 °C'den -7 °C'ye düşmesi, tüm enzim reaksiyonlarında duraklamaya yol açar. Sıcaklığı düşerken, hücredeki sıvı bileşenler bazı fiziksel ve kimyasal değişime uğrarlar. Sıcaklığın düşüşü ile su kristaller oluşturur ve ekstraselüler bölümdaki tuzlar için daha az sıvı kalmış olur. Bu yüzden kryoprotektan ajanların yokluğunda molarite yükselir ve hücre pH'ı ve ekstraselüler tuz yoğunluğu büyük değişiklikler gösterir. Tuz konsantrasyonlarının artmasıyla oluşan ozmotik değişiklik suyun hücreden çekilmesiyle sonuçlanır, pasif dehidrasyon ve büzülme oluşur. Hücre hacminde azalmadaki aşırılık, geri dönüşümsüz hasarlara yol açar. Bu durum 'medyum etkileri' olarak adlandırılır ve lipoprotein denatürasyonuna yol açar (Lovelock, 1953). Gametlerdeki soğutma zararı, soğuk şoku stresi, hiperozmotik stres, ozmotik büzülme-şişme sonucu oluşmaktadır. Embriyonun soğuk şokuna maruz kalması sonucu şekillenebilecek hasarlar, zona pellusida da çatlama, denatürasyon, hücre ve endoplazmik retikulumda ozmotik şişme, plazma zarlarında kümeleşme olarak sayılabilir. Bunların sonucunda hücrelerde apoptozis, serbest oksijen radikallerinin oluşumu, ATP sentezinde aksama, fertilitate kaybı şekillenebilir (Edashige ve ark., 1999; Bağış ve ark., 2010).

Özellikle memeli oosit ve embriyoları gibi büyük miktarda su içeren hücreler, başarılı dondurma için yukarıda belirtilen tüm faktörlerden korunmalıdır. Dondurma esnasında oluşan buz kristalleri çözüm sırasında oluşan kristalleşmeden daha zararlı olduğu bildirilmektedir (Leibo ve ark., 1993; Gordon, 2003).

Ayrıca hücredeki küçük porların varlığı potasyum ve sodyum iyonlarının giriş-çıkışını sağlayarak, hücrenin hipoozmotik stres ve koloidal ozmotik hemolize duyarlılığını artırır. Bu durumun önüne geçmek için ortama kademeli olarak kryoprotektanların ilavesi ve embriyoların eksternal kryoprotektan içeren sıvılarla muamele edilmelerini gerektirmektedir.

Diğer yandan dondurma esnasında hücrelerde meydana gelen serbest oksijen radikalleri embriyonun canlılığını olumsuz yönde etkilemektedir. Dondurma öncesi kullanılan EDTA, betamerkaptoetanol (BME) ve glutation'un bu serbest radikallere karşı olumlu etki yaptığı bilinmektedir (Gordon, 2003). Van Soom ve ark. (2002), kültür medyumuna ilave edilecek L-sistein'in oksidatif strese bağlı olarak ICM hücrelerde oluşacak apoptozu azalttığını bildirmiştir.

Vitrifikasyon işleminde hem dondurma hem de çözündürme sırasında embriyoların hücre iskelet sistemleri ve mikrotubuler yapıları da zarar görebilmektedir. Bu sebeple vitrifikasyon öncesinde kültür medyumlarına ilave edilecek çeşitli ajanlarca (Cytochalasin B, Taxol) hücre iskelet sisteminin desteklenmesi embriyonun canlılığına olumlu etkiler yapabileceği bildirilmektedir (Younis ve ark., 1997; Dobrinsky ve ark., 2000).

Dondurmada kullanılan embriyoların gelişim safhası da çok önemlidir. Blastosist dondurmanın zigot dondurmaya oranla daha başarılı olduğu belirtilmiştir. Bunu nedeni olarak kültür ortamında erken safha embriyolarının genomik aktivasyonu geçemediği gösterilmektedir. Ayrıca erken safha embriyoları daha az hücreye sahip olduğu için dondurma esnasında uğrayacakları zarar sebebiyle gelişimlerini sürdüremeyecekleri ifade edilmektedir. Bir başka açıklama ise farklı safhadaki embriyoların farklı metabolik faaliyetlerinden dolayı dondurma hasarına karşı dayanıksız bir eğilim göstereceğidir (Menezo, 2004).

İn vitro yolla üretilen ve özellikle blastosist aşamasına henüz ulaşmamış embriyoların in vivo elde edilenlere oranla kriyoprezervasyona olan duyarlılıkları göz ardı edilmemelidir (Massip, 2001; Gordon, 2003)

ICM / TE hücre oranı blastosist gelişimi için kritik öneme sahiptir. IVP blastosistler in vivo üretilenlere göre daha düşük ICM / TE oranına ve daha az sayıda kompakt ICM hücreye sahiptirler. Kriyoprezervasyonun ICM hücreler üzerine olumsuz etkisi diğer çalışmalarla da bildirilmiştir (Iwasaki ve ark., 1994; Mucci ve ark., 2006; Gomez ve ark., 2008; Trigal ve ark., 2013).

Dondurularak (-196°C'de) saklanan hücrelerde arka planda biriken radyasyondan kaynaklanan DNA kırılması tehdit oluşturmaktadır. Ancak hücre popülasyonunun % 63'ünün dejenere olması için yaklaşık 2000 yıl geçmesi gerektiği hesaplanmıştır (Friedler ve ark., 1988).

Kriyoprotektanlar

Gametlerin başta olmak üzere doku ve hücrelerin dondurulmasında kullanılan kimyasal maddeler, bu biyolojik materyallerin dondurulması ve çözündürülmesi sırasında oluşan ani ısı değişiklikleri sonucunda hücrelerde oluşması olası zararların önlenmesi amacıyla kullanılmaktadırlar. Bu kimyasallar kriyoprotektanlar olarak adlandırılır

(Palasz ve ark., 1996). Kriyoprotektanlar çeşitli özelliklere bağlı olarak hücre içine girebilen ve giremeyen maddeler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadırlar.

Hücre içine girebilen (Permeable) kriyoprotektanlar düşük molekül ağırlığına ve yüksek oranda suda çözünme yeteneğine sahiptirler. Bu maddeler; etilen glikol (EG), methanol, 2,3 bütanediol, 1,2 propanediol, dimetilsulfoksit (DMSO), gliserol, propilen glikol ve bazı diğer alkollerdir. Bu grup içerisinde genellikle daha yoğun olarak kullanılanlar DMSO, etilen glikol ve gliseroldür. Bu maddelerden en az biri dondurma medyumunu içerisinde mutlaka bulunmalıdır. Permeabl kriyoprotektanların en büyük özelliği hücrelerde ozmotik basınç farklılığı yaratarak hücre içerisine giriş yapıp hücre içi sıvı ile yer değiştirmesidir. Bunu sonucunda hücre hacmindeki değişiklikler azalır, hücre içindeki buz kristali oluşumu indirgenir ve hücrenin gördüğü hasar minimum düzeye indirgenmiş olur (Massip, 2001).

Bunlardan ilk olarak DMSO kullanılmış 1970'li yıllarda yerini daha başarılı sonuçların alındığı gliserole bırakmıştır. Takip eden yıllarda ise EG düşük moleküler ağırlığı nedeniyle tercih edilmiştir. DMSO ve gliserol içerdikleri yüksek orandaki tuzların embriyotoksik etkileri ve osmotik basınçlarının yüksek olması nedeniyle yerlerini etilen glikole bırakmıştır. Etilen glikolün molekül ağırlığı (62,11 g/mol), Gliserol'den (92,1 g/mol), Polietilen Glikol'den (PEG) (76,1 g/mol) ve DMSO'dan (78,1 g/mol) daha düşüktür. Etkisini düşük moleküler ağırlığı sayesinde kazandığı yüksek permabilite özelliği sayesinde gerçekleştirmektedir. Gliserol etkisini sitoplazmik membran üzerinde gerçekleştirirken etilen glikol ise hücre membranını korur. Dondurma sırasında hücrenin en çok su içeren lizozom gibi organelleri yıkımlanırsa buradan salınan litik enzimler hücrenin ya da blastomerlerin yıkımlanmasına neden olur (Massip, 2001; Gordon, 2003; Hasler, 2009).

Hücre içine giremeyen (Non Permeable) kriyoprotektanlar, kendi aralarında düşük ve yüksek molekül ağırlıklı olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Düşük molekül ağırlıklı olarak; trehaloz, glikoz, sükröz, galaktoz ve bazı diğer şekerler, yüksek molekül ağırlığa sahip olanlar ise, sodyum hyaluronat, polivinil pirrolidon (PVP), polivinil alkol (PVA), antifiriz protein (AFP), albumin, fikol ve bazı diğer polimerlerdir (Agca, 1994; Sağırkaya, 2001).

Makromoleküller vitrifikasyon çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Non permabl özellikte olan makromoleküller diğer kriyoprotektan maddelerden daha az

toksiktirler ve kombine edilerek kullanılırlar. Ayrıca kriyoprotektanların vitrifiye olabilmek özelliklerini artırır ve çözündürme sürecinde devitrifikasyonu önlerler. Buna ilave olarak zona pellusidada oluşabilecek çatlamalara karşı embriyoyu koruduğu bildirilmektedir. Bu amaçla dextran (70.000 ve 300.000 MW) başarılı şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca polietilen glikol (PEG), PVP, Fikol veya PVA embriyo dondurma çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır (Lane ve ark., 1999; Bağış ve ark., 2010).

Bir diğer kriyoprotektan özellik gösteren şekerler ise hücreye penetre olmadan osmotik basınç farkını kullanarak hücreler arası suyu çekerler ve bu şekilde hücre zarı ve stoplazmayı stabilize ederler (Gordon, 2003; Hasler, 2009).

Farklı kriyoprotektanların suyla oluşturulan medyumlarının vitrifikasyon oluşturabilme özelliklerinin değişken olduğu gösterilmiştir. Bunun da nedeninin her bir kriyoprotektanın su molekülleriyle etkileşimindeki farklılıktan kaynaklandığı bildirilmiştir (Shaw ve ark., 1997).

Bu bilgiler ışığında yapılan tez çalışmasının amacı; sığır embriolarının in vitro kültür medyumlarına yapılacak IGF-1 ve LIF ilavesinin, embriyo gelişim oranları, TE ve ICM hücre dağılımı ve dondurma sonrası yaşama gücü açısından etkisinin araştırılmasıdır.

3. MATERYAL VE METOT

Çalışmada materyal olarak Samsun ilindeki mezbahalarda kesilen sığırlardan, ırk özelliğine bakılmaksızın elde edilen ovaryumlar kullanıldı.

3.1. Ovaryumların Temini

Ovaryum temini için mezbahaya gitmeden önce transfer medyumu olarak % 1 v:v oranında Gentamisin (Sigma G-1397) ilaveli serum fizyolojik hazırlandı. Taşıma medyumu yolculuktan hemen önce 36-38°C'ye ısıtılarak termos içerisine aktarıldı. Yaptığımız ön denemelerde 36-38 °C'lik bir ilk ısıtma ile medyumun dönüş sıcaklığını 30°C altına düşmeden koruyabildiği tespit edilmiş ve takip eden uygulamalarda da belirtilen sıcaklık tercih edilmiştir.

Mezbahada kesimden hemen sonra karkas üzerinden bıçak yardımı ile alınan ovaryumlar termos içerisine konuldu. Deney için yeter sayıda ovaryum yemin edilene işlem tekrarlandı. İlk ovaryumun alındığı saat dikkate alınarak en geç 3 saat içerisinde materyaller laboratuvara getirildi. Laboratuvara ulaştırılan ovaryumların içerisinde bulunduğu taşıma medyumunun sıcaklığı ölçülüp, kayıt edildi. Termostan alınan ovaryumlar yaklaşık 32-35 °C'deki çeşme suyu ile birkaç kez yıkanarak kan ve kalıntılardan temizlendi. Daha sonra aspirasyon işlemi için 37°C'lik serum fizyolojik içerisine alındı.

3.2. Oositlerin Elde Edilmesi

Oositlerin eldesi için folikül aspirasyonu yöntemi tercih edildi. Her oosit eldesi işleminden en az 2 saat önce laboratuvarda manipülasyon medyumu (Ek-1), maturasyon (Ek-2) medyumu ve serum fizyolojik hazırlanarak etüv ve inkübatöre (Sanyo MCO-5M) kaldırıldı.

Aspirasyondan önce 10ml'lik enjektörlere 18 Gauge'luk enjektör iğnesi takıldı ve içerisine 0,5 ml manipülasyon medyumu çekildi. Serum fizyolojik içerisinde bekleyen ovaryumlar tek tek kurutma kağıtları üzerine alınarak yüzeyleri kurulandı. Ovaryumların üzerindeki 2-8 mm çağındaki foliküller aspire edildi (Şekil 2).



Şekil 2. Folikül aspirasyonu yöntemi ile oosit eldesi

Aspire edilen folikül içeriği, oosit seçimi için içerisinde yıkama medyumuna bulunan 100x20 mm'lik petrilere (Greiner, Germany) aktarıldı. Oosit seçim işlemi stereo mikroskop altında yapıldı. Kanagawa'nın (1995) bildirdiği kriterlere göre en az üç katlı sıkı kumulus hücreleri ile çevrili, sitoplazması homojen görünümlü KOK'lar A kalite kabul edilerek çalışmaya alındı. Kısmi veya tamamen kumulus ekspansiyonu gösteren, bir kısmı veya tamamı çıplak, homojen olmayan, karanlık sitoplazmaya sahip oositler kalitesiz veya düşük kaliteli kabul edilerek çalışmaya alınmadılar. Seçilen oositler incelenmiş pastör pipeti (40-50 µm çapında) ile içerisinde yıkama medyumuna bulunan 35x10mm'lik petrilere (Greiner, Germany) aktarıldı. Daha sonra KOK'lar folikül sıvıları ve hücre döküntülerinden arındırılmak üzere 3 kez yıkama medyumuna ile yıkanarak maturasyon işlemine geçildi.

3.3. Oositlerin İn Vitro Maturasyonu

Oositlerin in vitro maturasyonu amacıyla temel medyum olarak M-199 (Sigma M-4530) kullanıldı. Temel medyumuna Na Prüvat, LH, FSH ve EGF ilaveleri yapıldı (Ek-2). Sonrasında 4 kuyulu petrinin (Nunclon, USA) her kuyusuna 500'er µl maturasyon medyumuna konuldu. Kuyuların üzerine kontaminasyon ve buharlaşmayı önlemek amacıyla 300'er µl mineral yağ (Sigma M-8410) ilave edilerek petri inkübatöre kaldırıldı. KOK'lar maturasyon medyumuna aktarılmadan önce hazırlanmış olan medyum en az 2 saat süreyle CO₂'li inkübatörde gazlanmaya bırakıldı.

Folikül aspirasyonu ile elde edilen ve seçimi tamamlanan oositler önce içerisinde maturasyon medyumuna bulunan 35x10mm'lik petrilere birkaç kez yıkandı ve sayıldılar.

Sonrasında inkübatörde bekleyen 4 kuyulu petri alınarak her kuyucuğa en fazla 25 KOK düşecek şekilde aktarım yapıldı. Petri buradan tekrar 38,5 °C'lik ve %5 CO₂ içeren ve %95 oranında neme doyurulmuş inkübatöre kaldırılarak, 22 saat süreyle maturasyon gerçekleştirildi.

Denemeler sonucunda bazı oositler hem kumulus genişlemesine göre hem de Hoechst 33342 ile boyanarak nükleer maturasyon yönünden kontrol edilerek mevcut maturasyon protokolünün güvenilirliği test edildi.

3.4. Oositlerin İn Vitro Fertilizasyonu

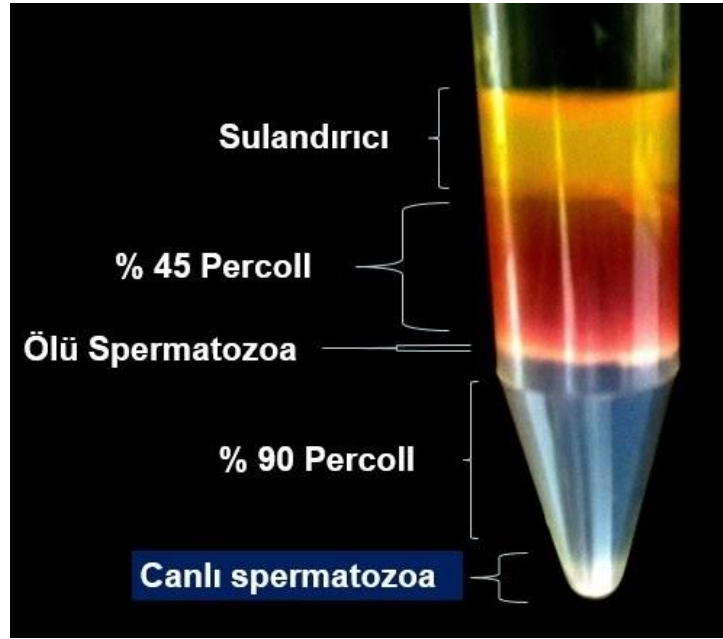
Oositlerin in vitro fertilizasyonu işleminden en az 2 saat önce laboratuvarında bazı medyumlar hazırlandı. İlk olarak +4 °C'de hazır bulunan fertilizasyon stok (Ek-3) ve sperm yıkama stok (Ek-4) medyumuna kullanım gününde BSA, NaPruvat, antibiyotik ilaveleri yapıldı. Daha sonra fertilizasyon medyumuna ile 60 x 15 mm'lik petrilere (Greiner, Germany) 44 µl'lik droplar hazırlandı. Son olarak dropların üzeri mineral yağ ile kaplandı ve artan medyum ile birlikte inkübatöre kaldırıldı.

3.4.1. Spermanın Seperasyonu

Sperma seperasyonu işleminde kullanılmak üzere hazır olarak alınan ticari Percoll solüsyonundan (Sigma P-4937) 80 mM final konsantrasyonuna sahip olacak şekilde 10X Percoll stok solüsyonu hazırlandı (Ek-5). Ayrıca %90'lık Percoll (Ek-6) ve bu solüsyona 1/1 v:v oranında Sperm yıkama medyumuna ilave edilerek % 45'lik Percoll solüsyonu elde edildi. Bu medyumlar 15ml'lik konik tüplere 2'şer ml aktarıldı ve etüve kaldırıldı. Fertilizasyonda kullanılmak üzere PHE stok solüsyonu (Penisilamin 2 mM, Hipotaurin 1 mM, Epinefrin 1 mM) önceden hazırlanarak -18°C'ye kaldırıldı.

Spermanın seperasyonu için Parrish ve ark. (1995) tarafından bildirilen Percoll Gradient yöntemi kullanılmıştır. Sperma kaynağı olarak ise payet tekniği ile dondurulmuş çeşitli firmalara ait boğa sperması kullanıldı. Seperasyon için iki adet payet 36 °C'lik su banyosunda 1 dakika bekletilerek çözündürüldü. Bu sürenin sonunda payetler pens ile hızlı bir şekilde kurutma kâğıdına alınarak kurulandı. Payetlerin iki ucu kesilerek sperma etüvde bekletilen 1,5 ml'lik eppendorf tüpe aktarıldı. Daha sonra 15 ml'lik bir konik tüpe 45°'lik açıyla önce 2 ml % 90'lık Percoll solüsyonu, daha sonra üzerine 2 ml % 45'lik Percoll solüsyonu yavaşça eklenerek seperasyon solüsyonu hazırlandı. Eppendorf

tüpünde bekletilen sperma buradan otomatik pipet yardımı ile alınarak seperasyon solüsyonu üzerine yine 45°lik açıyla ve dikkatlice aktarıldı (Şekil 3).



Şekil 3. Percoll separasyon yönteminde katmaların görünümü

Hazırlanan bu tüp santrifüje yerleştirilerek 700 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Bu sayede ölü spermatozoa iki Percoll katmanı arasında, canlı spermatozoa ise tabanda pelet şeklinde toplandı. Tüpün dip kısmındaki canlı kısım haricindeki artıklar kısımlar pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Bu sırada pelet formunun bozulmamasına dikkat edildi.

Daha sonra etüvde bekleyen sperm yıkama medyumu alınarak tüp içerisine 4 ml aktarıldı. 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Bu sürenin sonun dipte oluşan gevşek yapıdaki pelet haricinde kalan sulandırıcı kısım pipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Kalan kısım 100 µl'lik otomatik pipet ile yavaşça pipetlenerek homojen hale getirildi ve buradan ependorf tüp içerisine alındı. Elde edilen bu spermanın motilite kontrolü ve istenilen yoğunluğa göre doz ayarlaması edilmesi işlemine geçildi. Motilite kontrolü için 10 µl sperma örneği alınarak ısıtma tablası üzerindeki lama aktarıldı. Üzerine lamel kapatılarak ışık mikroskobu ile 200x büyütmede motilite tayini yapıldı. Motil spermatozoon oranı % 60 ve üzeri çıkan örneklerin yoğunluk hesaplamasına gidildi.

Birim hacim spermada bulunan spermatozoon sayısı hemositometrik yöntem ile saptandı (Tekin, 1994). Bunun için sperma, 1/500 oranında Hayem solüsyonuyla

(Na₂SO₄: 5,0 g, NaCl: 1,0 g, HgCl₂: 0,5 g, Bidistile su: 200 ml) sulandırıldı ve Thoma lamında sayılarak, aşağıda belirtilen formüle göre spermatozoa yoğunluğu belirlendi.

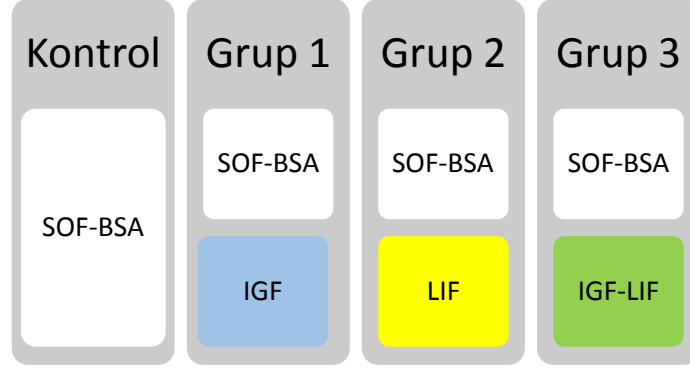
$$\text{Yoğunluk (mm}^3\text{)} = \frac{\text{Sayılan hücre sayısı}}{\text{Sayılan büyük kare sayısı} \times \text{Büyük kare hacmi} \times \text{Sulandırma oranı}}$$

Daha sonra sperma fertilizasyonda kullanılacak spermatozoa yoğunluğu 2×10^6 spermatozoon / ml olacak şekilde fertilizasyon medyumunu ile sulandırarak ayarlandı.

Olgunlaşma ortamında 22 saat bekletilen oositler kumulus hücrelerinin ekspansiyonuna göre değerlendirilip, mature olanlar 2 kez manipülasyon medyumunu ve 2 kez de fertilizasyon medyumunda yıkandıktan sonra her bir droba 12-15 KOK gelecek şekilde droplara aktarıldı. Bu sırada sperm seperasyonu işlemleri tamamlandı. Otomatik pipet yardımıyla her bir droba 2 µl PHE (20 µM penisilamin, 10 µM hipotaurin, 1 µM epinefrin), 2 µl Heparin (5 µg/ml) ve 2 µl sperma ilavesi yapılarak toplam drop hacmi 50 µl olacak şekilde 22 saat süreyle 39°C ve %5 CO₂ ortamında fertilizasyona bırakıldı.

3.5. Embriyoların İn Vitro Kültürü

Embriyoların kültürü 4 farklı deneme grubunda gerçekleştirilmiştir. Kontrol grubu için kültür medyumuna yalnızca 8 mg / ml dozunda BSA ilave edildi. Diğer deney gruplarında BSA ilavesinin yanı sıra Grup 1 için; 100 ng / ml LIF, grup 2 için; 100 ng / ml dozunda IGF, grup 3 için 100 ng / ml dozunda IGF ve kültürün dördüncü günü 100 ng / ml LIF ilave edilmiştir. Medyumlara IGF ilavesi kültürün ilk günü, LIF ilavesi ise dördüncü gün yapılmıştır. (Şekil 4).



Şekil 4. Embriyoların kültüre alındığı deneme grupları

İn vitro kültür işleminin yapılacağı gün deney grubuna göre kültür medyumuna ilaveler yapıldı ve kültür petrisine 50 µl'lik droplar halinde hazırlanarak inkübatöre kaldırıldı (Ek-7). Ayrıca kullanım günü için taze olarak yıkama medyumunu hazırlandı.

Fertilizasyon sonrası 24. saatte, muhtemel fertilize oositler 2 kez manipülasyon medyumunda yıkanarak 1,5 ml'lik eppendorf tüpe alındı. Burada 5 dakika vorteksleme yöntemi (Hyaluronidase enzimi kullanılmaksızın) ile kumuluslarından ayrıldı. İşlem sonrası eppendorf tüp içeriği 35mm'lik petriye aktarılarak embriyolar seçildi. Embriyolar birkaç kez kültür medyumunda yıkanarak her bir drop başına 12-15 adet olacak şekilde 50 µl'lik droplara aktarıldı. Embriyoların kültür işlemi 39 °C, %5 CO₂ ve %5 O₂ ortamında gerçekleştirildi. Deneme gruplarından Grup 1 ve Grup 3'te etkinliğinin belirlenmesi için 100 ng/ml LIF ilavesi hem literatür verileriyle uyumlu olarak hem de 0. gün ilavesi yaptığımız ön denemelerimizdeki bulgulara dayanarak kültürün 4. gününde yapıldı.

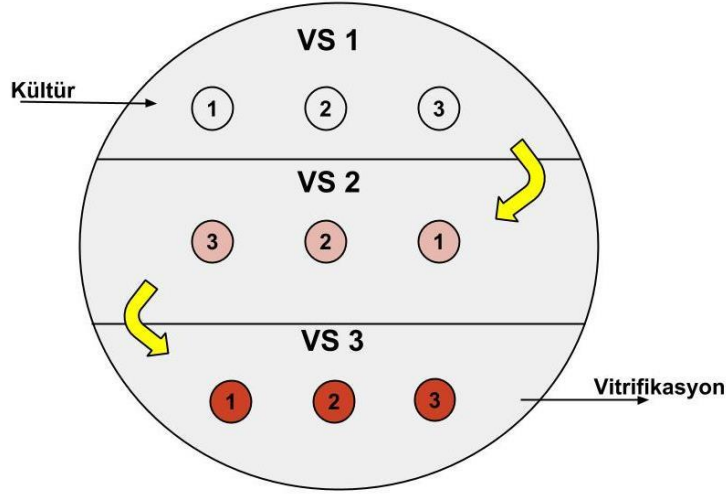
Embriyoların kültürde geçirdikleri süreye uygun gelişim aşamalarına (bölünme, morula, blastosist, expanded blastosist, hatch olma gibi) ulaşım ulaşımadıklarının belirlenmesi amacıyla stereomikroskop morfolojik değerlendirme yapılarak kaydedildi.

3.6. Embriyoların Vitrifikasyonu

Vitrifikasyon işlemi için Temel medyum, vitrifikasyon medyumları ve çözündürme medyumları hazırlanmıştır (Ek-8,9,10).

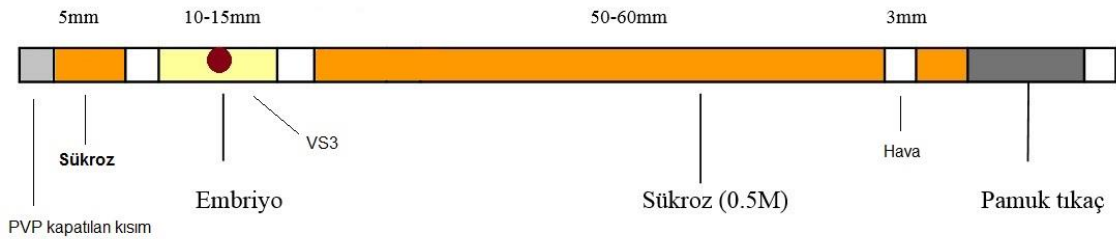
Elde edilen blastosistler kültürün 6. gününde droplardan alınarak temel medyumda iki kez yıkandı. Buradan 50 µl'lik VS1 droplarına aktarılarak, her bir dropta 1'er dakika kalacak şekilde toplam 3 dakika bekletildi. Daha sonra VS2 droplarına

aktarıldı ve burada da 3 dakika bekletildikten sonra, kryoprotektan yoğunluğu en fazla olan VS3 droplarına aktarıldı (Şekil 5).



Şekil 5. Blastosistlerin vitrifikasyon medyumlarında muamelesi

Blastosistler buradaki kalış süreleri 25–30 sn’yi geçmeyecek şekilde tutuldu ve sükröz solüsyonu ile birlikte mikro pipet yardımıyla payete yerleştirildi. Vitrifikasyon dropları arasında geçiş yaparken mümkün olduğu kadar az miktarda medyumun pipete çekilmesine dikkat edildi. Son olarak hızlı bir şekilde payetlerin ağzı PVP (Polyvinyl pyrolidone) ile kapatıldıktan sonra payet 45 derecelik açıyla sıvı azot içerisinde daldırılarak vitrifikasyon işlemi tamamlandı (Şekil 6).



Şekil 6. Embriyoların payetteki yerleşimi

3.7. Embriyoların Çözündürülmesi

Blastosistlerin çözündürülmesi amacıyla payet sıvı azottan bir pens yardımı ile çıkartıldı. Payet havada 10 sn süre ile tutuldu ve 35 °C’deki su banyosu içerisinde alındı. Böylelikle sükrözün tamamen çözünmesi sağlandı. Daha sonra payet çıkarılıp kurulandı ve her iki ucundan kesilerek petri kabına aktarıldı. Stereo mikroskop altında blastosistler

bulunarak 5'er dakika bekletilmek üzere 1 M ve 0,5 M'lık sükröz solüsyonuna aktarıldı. Kademeli şekilde çözündürülen blastosistler buradan alınarak kültür medyumunda birkaç kez yıkandıktan sonra %5 CO₂ , %5 O₂ ve 39⁰C'lik inkübatörde 1 gün süre ile kültüre edildi. Kültür sonucunda yapılan kontrollerde blastosistlerin re-ekspansiyon yetenekleri değerlendirilerek diferansiyel boyama işlemine geçildi.

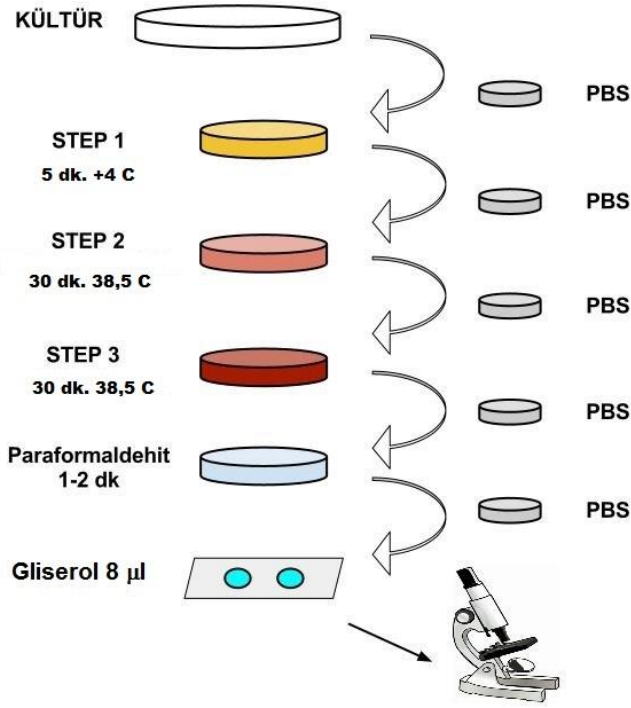
3.8. Embriyoların Değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan blastosistlerden dondurma işlemine tabi tutulmayanlar kültür aşamasının yedinci gününe kadar gelişim aşamalarının kontrolü amacıyla morfolojik değerlendirmeye tabi tutuldu. Dondurulacak blastosistler ise kültürün altıncı gününde vitrifiye edildikten sonra çözündürülüp bir gün kültüre tabi tutulduktan sonra gelişim ve re-ekspansiyon yeteneği açısından değerlendirildi.

3.8.1. Blastosistlerin Diferansiyel Boyama Metodu İle Boyanması

Çalışmada kullanılan faktörlerin etkilerinin değerlendirilebilmesi için dondurma işlemine tabi tutulan ve tutulmayan deney gruplarına ait blastosistler kültürün yedinci gününde ekspanded blastosist aşamasında Van Soom ve ark. (1996), tarafından bildirilen Differential Cell Staining metodu ile boyandı.

Bu işlem için öncelikle Ca⁺² free PBS (Sigma P-4417) hazırlanarak 0,1 mg/ml PVA (Sigma P-8136) ilave edildi. Daha sonra paraformaldehit solüsyonu (PFA, Sigma P-6148) 40 g/L dozunda olacak şekilde PBS içerisinde çözülerek hazırlandı. Filtre edilerek kullanıldı. Boyanacak blastosistler kültür droplarından seçilerek bu işlemde yıkama medyumunu olarak kullanılacak olan PBS solüsyonuna aktarıldı. Boyama işlemi şekil 7'de gösterildiği üzere 3 temel adımda gerçekleştirildi (Şekil 7).



Şekil 7. Diferansiyel boyama işlemi basamakları

Step 1; Stok TNBS (10 mM) solüsyonundan 35mm'lik petriye 50µl'lik droplar hazırlandı.

Step 2; 70 µl PBS üzerine 30 µl stok Anti DiNitroPhenyl (A-DNP-BSA, Sigma D-9656) ilave edildi ve 50 µl'lik droplar hazırlanarak mineral yağ ile kaplandı.

Step 3; 970 µl PBS üzerine 25 µl stok Propidium Iodide (PI, 2 mg/ml) ve 6,5 µl stok bisBenzimide (HXT, 2 mg/ml) ilave edildi. Bu solüsyon ¼ oranında kobay komplement (ICN-55852) ile karıştırıldı ve 50 µl'lik droplar hazırlanarak mineral yağ ile kaplandı.

Blastosistler Step 1'de 4 °C'de 5 dakika tutulduktan sonra her geçişte PBS ile yıkanarak 39 °C, % 5 CO₂ ve % 95 nem koşullarındaki Step 2 ve Step 3'te 30'ar dakika bekletildi. Süre sonunda blastosistler önce 2 dakika PFA droplarına sonra da lam üzerine oluşturulan 8 µl'lik gliserol damlalarına alındı. Her bir gliserol damlasına en fazla 3 blastosist aktarılmasına dikkat edildi. Sonrasında dropların üzerine yavaşça lamel kapatılarak karanlık ortamda floresan mikroskop (Nikon, ECLIPSE, TS100) ile değerlendirme aşamasına geçildi.

Değerlendirme işlemi blastosist fotoğraflarının *ImageJ 1.48o* programına alınarak hücre sayımı yapılması ile son buldu.

3.9. Verilerin İstatistiksel Analizi

Çalışmada dört farklı deneme grubunun, embriyoların in vitro kültürüne ve vitrifikasyonuna etkilerinin ayrı ayrı incelenmesi amacıyla kontrol ve sayımla elde edilen gözlemler değerlendirilmiştir. Verilerin amaca uygun olarak özetlenebilmesi için verilerin dağılımları çarpıklık, basıklık katsayılarından yararlanarak değerlendirilmiş ve verilerin sağa çarpık (basıklık katsayısı >3) dik bir dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Buna göre veri özetlemede verilerin oransal olarak değerlendirilmesi uygun bulunmuştur. Oransal olarak değerlendirmede verilerin frekans dağılımları ve ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanarak tablolar şeklinde özetlenmiştir. Çalışmada kültüre ilave edilen farklı faktörlerin hücre kayıplarına etkilerinin farklılıkları ve muamele grupları arasındaki farklılıklar gruplar arası ve gruplar içi değerlendirilmiştir. İstatistik karşılaştırmalarda verilerin normal dağılım göstermemesi nedeniyle gerçek verilerden değerlendirme ve yorumlamaya imkân veren Genelleştirilmiş Modeller tercih edilmiştir. Buna göre veriler analiz edilerek çözümler GEE (Generalized Estimating Equation) tekniğinde bağlantı fonksiyonu olarak logaritmik ölçek ve dağılım fonksiyonu olarak binomial fonksiyonlar entegre edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda GENMOD testi kullanılmıştır. Gruplar arası farkın önemli bulunduğu durumlarda ve gruplar içi istatistik karşılaştırmalarda Tip III hata fonksiyonu esas alınarak orthogonal polinomlar uygulanmıştır. Tüm analiz ve hesaplamalarda SAS (2009) istatistik analiz programından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

Bu doktora tez çalışmasında, laboratuvar şartlarının kontrolü, deney protokollerinin optimizasyonu ve el becerisinin kazanılması amacıyla IVM (I. Dönem), IVF ve embriyo kültürü (II. Dönem) aşamalarını içeren dönemsel denemelerle başlanmıştır. Bu konuda çalışma yapan tüm laboratuvarlarda olduğu gibi bizim laboratuvarımızda da şartlara en uygun maturasyon medyumunu kompozisyonunun belirlenmesi tez çalışmasının ilk dönemini oluşturmuştur. Bu dönemde aynı zamanda konuyla ilgili olarak tecrübe eksikliği de giderilmiştir.

4.1. İn Vitro Maturasyon Bulguları

Çalışmanın ilk bölümünü oluşturan in vitro maturasyon protokolünün belirlenmesi ve test edilmesi amacıyla toplam bu dönemde lokal mezbahada kesime tabi tutulmuş dişilerden elde edilen 526 adet ovaryum uygun koşullarda laboratuvar ortamına getirilmiştir. Bu ovaryumlardan folikül içermeyen veya kistik folikül içerenler kullanım dışında tutulmuş, 505 tanesinden oosit aspirasyonu gerçekleştirilmiş ve bu işlemde toplam 2115 adet A ve B kalite oosit elde edilmiştir.

İdeal medyum bileşiminin belirlenmesi amacıyla temel maturasyon medyumuna (TCM-199) bazı destekleyici ilaveler yapılmıştır. Maturasyon medyumuna inaktif fetal sığır serumu (FBS), folikül stimüle edici hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve östradiol 17- β (E2) ilaveleri yapılarak beş farklı kombinasyondan oluşan maturasyon grupları oluşturulmuştur. **Grup 1;** % 10 (v/v) FBS, **Grup 2;** 5 μ g/ml LH, 0,5 μ g/ml FSH ve 10 ng/ml EGF, **Grup 3;** FBS, LH, FSH ve EGF; **Grup 4;** 1 μ g/ml E2; **Grup 5;** FBS ve E2.

İn vitro maturasyon aşamasındaki başarı, embriyo üretiminin devam eden sürecindeki in vitro fertilizasyon (IVF) ve kültür (IVC) için temel basamağı oluşturduğundan son derece önemlidir. Yapılan maturasyon denemeleri sonrasında projenin gerçekleştirildiği laboratuvar şartlarına en uygun sonucu veren medyum kompozisyonu kumulus ekspansiyonu ve nükleer maturasyon oranlarına göre belirlenmiştir.

Kumulus hücre ekspansiyonu, oosit kalitesindeki artışla doğru orantılı olarak artış göstermiştir ($P < 0,05$). En üst düzey kumulus ekspansiyon derecesine ulaşma oranı FSH, LH ve EGF ile desteklenmiş medyum grubunda daha yüksek belirlenmiştir (Tablo

3). Medyuma Östradiol 17- β ilavesi kumulus ekspansiyonu üzerinde etkisiz kalmıştır (P > 0,05).

Tablo 3. Kumulus ekspansiyon oranlarının gruplara göre dağılımı, % Ortalama (\pm SE)

Gruplar	Oosit (n)	Maturasyon (%)
FBS	203	71.4 ^{a*}
LH + FSH + EGF	174	87.4 ^a
FBS + LH + FSH + EGF	509	85.5 ^a
E2	145	67.7 ^b
FBS + E2	261	74.7 ^a

* Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir (P < 0,05).

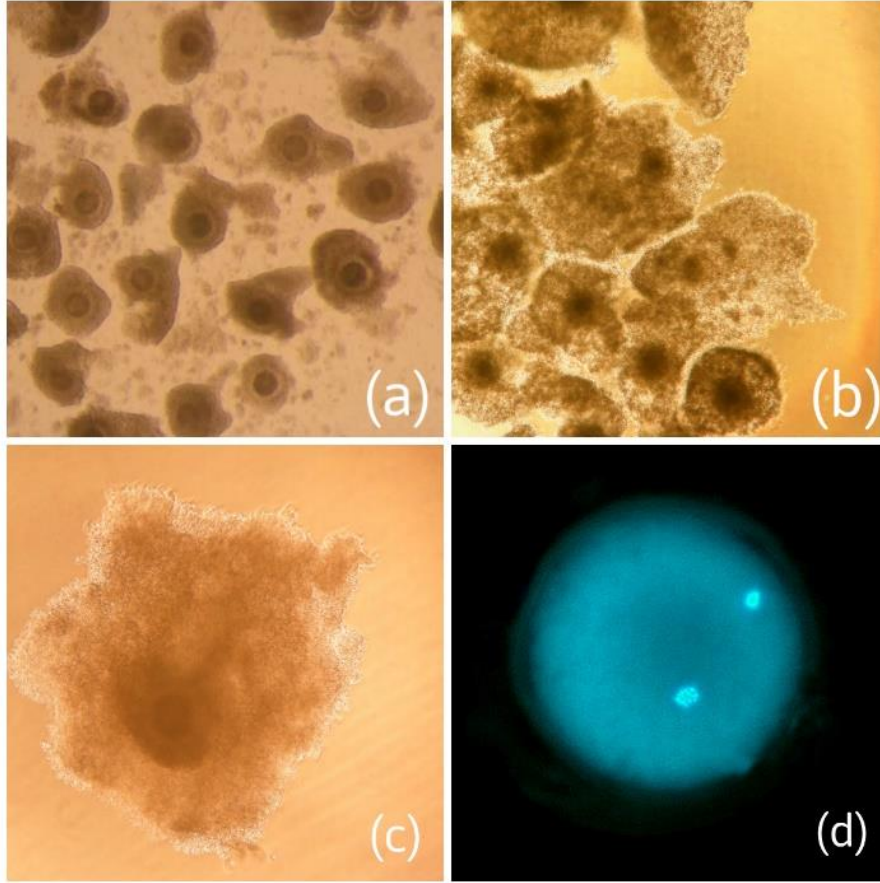
Yapılan değerlendirmeler sonrasında en yüksek Metafaz II oranının TCM–199+FBS grubundan elde edildiği belirlenmekle birlikte, TCM–199+FSH+LH+EGF medyum kombinasyonunda da hem en yüksek kumulus ekspansiyonu ve hem de tatmin edici oranda nükleer maturasyon oranları elde edilmiştir (P < 0,05). Dolayısıyla projenin in vitro fertilizasyon ve devam eden aşamalarında sabit olarak bu maturasyon protokolünün kullanılmasına karar verilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. Oositlerin Nükleer Maturasyon Oranlarının Gruplara Göre Dağılımı, % Ortalama (\pm SE), **DJ**; Dejenere, **CA**; Kromozom dağılımları, **GVBD**; Germinal vezikül yıkımı, **M I**; Metafaz I, **M II**; Metafaz II

Gruplar	Oosit (n)	Nükleer Faz (%)				
		D	CA	GVBD	M I	M II
Grup 1	191	11.5 ^{b*}	0.5 ^a	0.0 ^a	26.2 ^a	61.8 ^a
Grup 2	120	34.2 ^a	0.8 ^a	0.8 ^a	22.5 ^a	41.7 ^a
Grup 3	179	39.1 ^a	0.6 ^a	2.8 ^a	24.0 ^a	33.5 ^a
Grup 4	123	27.8 ^a	0.7 ^a	0.7 ^a	18.3 ^a	33.9 ^a
Grup 5	85	24.7 ^a	1.2 ^a	0.0 ^a	17.7 ^a	56.5 ^a

* Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir (P < 0,05).

Yukarıda belirtilen denemeler sonucunda in vitro maturasyon medyumunu için 5 µg/ml LH, 0,5 µg/ml FSH, 10 ng/ml EGF ilavesi içeren kompozisyon seçilmiş ve tez çalışmasındaki tüm denemelerde bu formülasyon kullanılmıştır (Şekil 8).



Şekil 8. İn vitro maturasyona alınan oositler (a); Aspirasyon sonrası KOK'lar, (b); Maturasyon sonrası KOK'lar, (c); Kumulus genişlemesine göre mature oosit, (d); Metafaz II dönemindeki mature oosit

Tez çalışmasının I. Bölümü olan uygun maturasyon medyumunu kompozisyonu belirlendikten sonra devam eden süreçte tüm denemelerin maturasyonu aynı medyum ile yapılmış ve bu aşamada toplam 26 deneme gerçekleştirilmiştir. Denemeler süresince laboratuvara getirilen toplam 343 adet ovaryumdan 285 tanesi seçilerek aspirasyon işlemine alındı. Bu ovaryumlardan toplam 1809 adet A ve B kalitede oosit elde edildi. Ovaryum başına ortalama 6,46 adet oosit eldesi oranına ulaşıldı. Bu durumla ilgili verilerin istatistiksel değerlendirmesi aşağıdaki Tablo 5'te sunulmuştur.

Tablo 5. Optimize Medyum Kompozisyonu İle Elde Edilen İn Vitro Maturasyon Bulguları

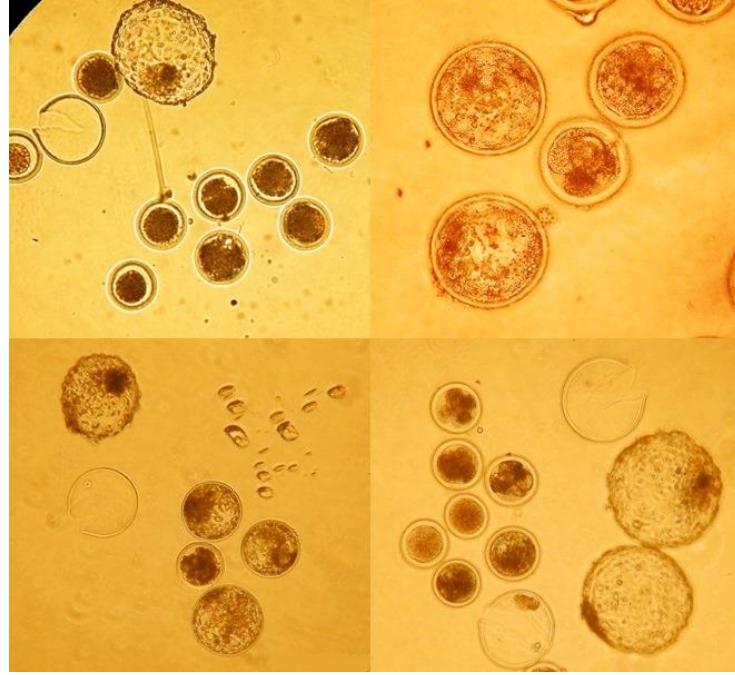
Deney Sayısı	Gelen Ovaryum (n)	Kullanılan Ovaryum (%)	Oosit / Ovaryum (n)	Maturasyon Oranı (%)
26	343	84,85 ± 2,33	6,46 ± 0,3	94,06 ± 0,74

Çalışmaların maturasyon medyumu kompozisyonunun belirlenmesinden sonraki tüm zamanlarında tek bir medyum kompozisyonu ile elde edilen maturasyon oranı % 94,06 olarak elde edilmiştir. Yapılan 26 deneme boyunca % 90,00 maturasyon oranı altına inilmemiştir.

Bu denemelerle deney protokolleri standardize edildikten sonra sırasıyla IVM, IVF ve dört farklı deney grubu için in vitro kültür denemeleri yapıldı. Deney gruplarında gelişimlerinin yedinci günlerindeki toplam 217 blastosistin hücre sayıları nükleer boyama ile belirlenerek ortalamaları hesaplandı. Daha sonra aynı metotla toplam 163 blastosist üretilerek in vitro kültürün altıncı gününde vitrifikasyon işlemi uygulandı. Vitrifikasyon sonrası bir gün süreyle kültüre alınan blastosistler morfolojik ve hücresel açıdan değerlendirilerek, IGF-1 ve LIF'in embriyo kültürü ve vitrifikasyonuna etkileri araştırılmıştır.

4.2. İn Vitro Kültür Bulguları

Çalışmada standardize edilmiş maturasyon medyumu ile maturasyon sonrası elde edilen mature oositler materyal ve metot bölümünde belirtilen prosedürle fertilize edilmişlerdir. İn vitro fertilizasyon sonrası toplam 1313 adet muhtemel zigot her bir grup için en az beş deneme uygulanacak şekilde toplam 33 kez dört farklı grupta BSA, IGF, LIF, IGF+LIF kültüre alındı (Şekil 9).



Şekil 9. Kültürde farklı gelişim aşamalarına ulaşmış blastosistler

Tablo 6'dan de takip edilebileceği üzere, projede farklı kompozisyonlardan oluşan 5 farklı kültür grubuna ait embriyo gelişim oranları yönünden değerlendirildiğinde kültür medyumuna BSA ve Büyüme Faktörleri (EGF ve IGF-I) ilavesinin hem blastosist gelişim oranını ve hem de blastosist hücre sayısını önemli oranda etkilediği tespit edilmiştir ($P < 0,001$).

Tablo 6. Farklı Kültür Gruplarındaki Embriyo Gelişim Oranlarının Dağılımı, % Ortalama (\pm SE)

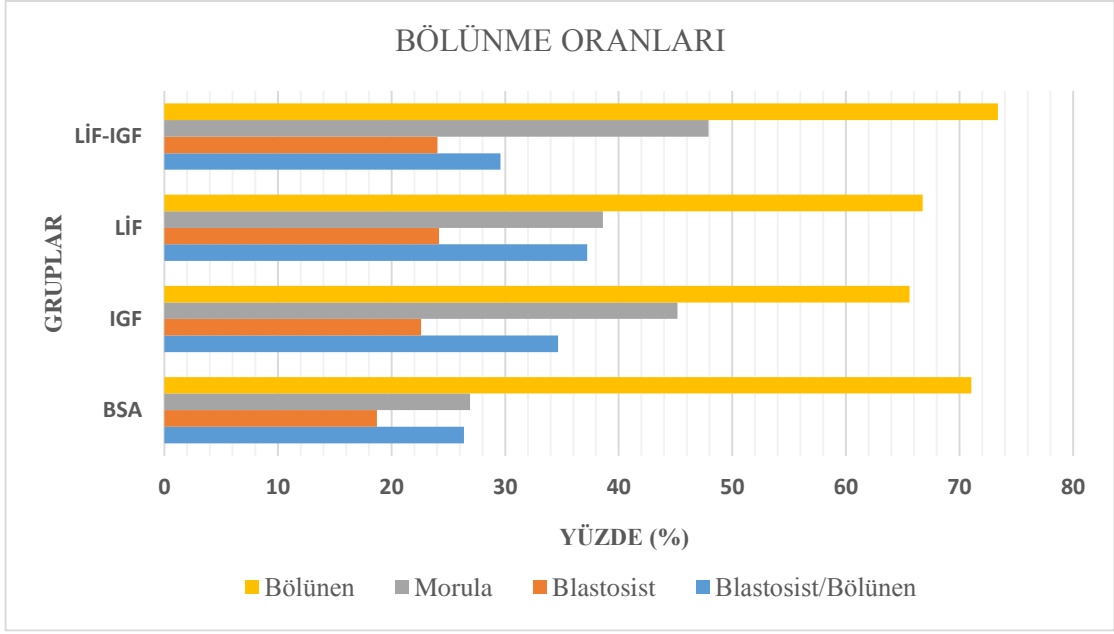
Grup	Blastosist (n)	Bölünme	Morula	Blastosist	Blastosist / Bölünen
BSA	434	71,04 \pm 1,36 ^a	26,9 \pm 3,46 ^{b*}	18,72 \pm 1,23 ^b	26,38 \pm 1,68 ^b
IGF	335	65,61 \pm 2,07 ^a	45,18 \pm 3,51 ^a	22,60 \pm 0,9 ^{ab}	34,65 \pm 1,7 ^{ab}
LIF	295	66,76 \pm 3,91 ^a	38,62 \pm 4,89 ^a	24,17 \pm 2,16 ^a	37,22 \pm 3,51 ^a
IGF/LIF	249	73,39 \pm 1,77 ^a	47,9 \pm 2,15 ^a	24,03 \pm 2,08 ^a	29,6 \pm 3,18 ^{ab}

* Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($P < 0,001$)

Bu zigotların bölünme oranları gruplar arasında önemli bir fark göstermeyerek, sırasıyla BSA; 71,04 , IGF; 65,61 , LIF; 66,76 , IGF-LIF; 73,39 olarak belirlendi ($P > 0,001$). BSA ve IGF+LIF gruplarında diğer gruplara oranla bölünme oranları yüksek bulunmakla birlikte istatistiksel olarak bir önemlilik arz etmemiştir. Farklı kültür gruplarından elde edilen morula oranları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde BSA içeren gruptaki morula oranı, diğer gruplara oranla önemli derecede düşük olarak tespit edilmiştir (%26,9).

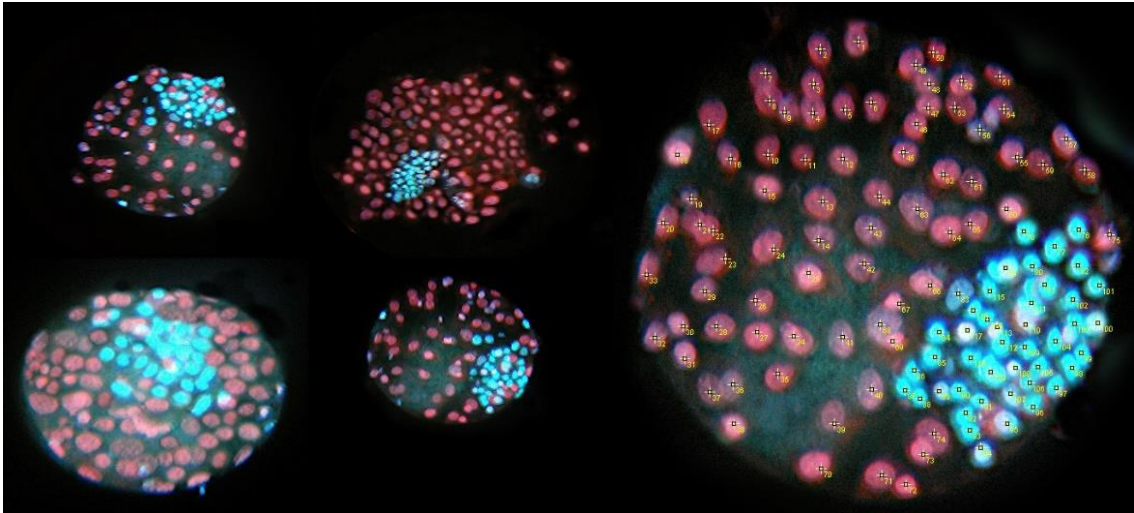
Kültüre alınan embriyoların morulaya ulaşma oranları açısından gruplar arası yapılan değerlendirmeye göre tek başına IGF ilave edilen grup ile IGF+LIF ilavesi yapılan gruplarda oran diğerlerine oranla daha yüksek bulunmuştur ve gruplar arası fark da bu durumda istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ($P < 0,001$). Morula oranlarında olduğu gibi blastosiste ulaşma oranlarında da BSA ilavesi yapılmış olan kültür grubu diğerlerine göre önemli derecede düşük sonuçlar vermiştir (%17,72) (Tablo 6, Şekil 10).

Kültüre alınan embriyoların blastosiste ulaşma oranları açısından gruplar arası yapılan değerlendirmeye göre tek başına LIF ve LIF+IGF grupları diğerlerine oranla daha yüksek ve birbirine oldukça benzer sonuçlar vermişlerdir (%24,17 ve 24,03) ($P < 0,001$) (Şekil 10). Ayrıca, bölünen embriyolar arasında blastosiste ulaşanların oranının istatistiksel olarak belirlendiğinde BSA içeren grup hariç diğerlerinin daha üstün sonuçlar verdiği belirlenmiştir (Şekil 10). Bu oran açısından yapılan değerlendirmede diğerlerine oranla en üstün olan LIF grubundan (% 37,22) elde edilmiştir. Bu parametre açısından da gruplar arası farklılık önemli olarak tespit edilmiştir ($P < 0,001$) (Tablo 6).



Şekil 10. Embriyo gelişim oranlarının gruplara göre dağılımı

Tez çalışmasının elde edilen blastosistlerin morfolojik kalitelerinin belirlenmesi amacıyla kültürün yedinci gününde yapılan diferansiyel boyama uygulamaları sonrasında tüm gruplardan toplam 217 blastosist boyanmış ve hücre sayıları belirlenerek kültür ortamına ilave edilen BSA, IGF-1 LIF'in embriyoların hücresel dağılımına etkisi belirlenmiştir (Şekil 11).



Şekil 11. Diferansiyel boyama metodu ile boyanmış blastosistler ve hücre sayımı

Blastosist kalite değerlendirmesine genel olarak bakıldığında toplam blastosist hücre sayısı, TE ve ICM hücre sayıları açısından tüm uygulama grupları arasında önemli farklılıklar belirlenmiştir. Hücre sayılarının gruplara göre dağılımı Tablo 7 ve Şekil 12’ de verilmiştir. Hücre sayımı sonuçlarında total hücre sayısı gruplar arasında önemli fark göstermiş ve en yüksek ortalama 104,93 hücre sayısı ile IGF grubunda olmakla birlikte benzer değer gösteren gruplarda 95,00-105,00 hücre sayısı bandında değişim göstermiştir. Hem TE hücre sayısı ve hem de ICM hücre sayısı LIF grubunda diğer gruplara oranla önemli ölçüde düşük bulunmuştur (TE: 53,64 , ICM: 23,54) (P < 0,05).

Kültür medyumuna yapılan LIF ilavesinin, embriyo gelişim oranları açısından olumlu yönde etki göstermesine rağmen, blastosist hücre sayısı üzerinde yeterli düzeyde etkinlik gösteremediği tespit edilmiştir. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonrasında LIF grubunda diğer gruplardan farklı olarak en az total hücre sayısı 77,03 olarak belirlenmiştir (P < 0,05). Bir diğer parametre olan ve implantasyon için önemli bir kriter olarak kabul edilen ICM / Total hücre oranları gruplar arasında farklı olup, BSA grubunda 0,37 oran ile en yüksek ve istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (P < 0,05) (Tablo 7) .

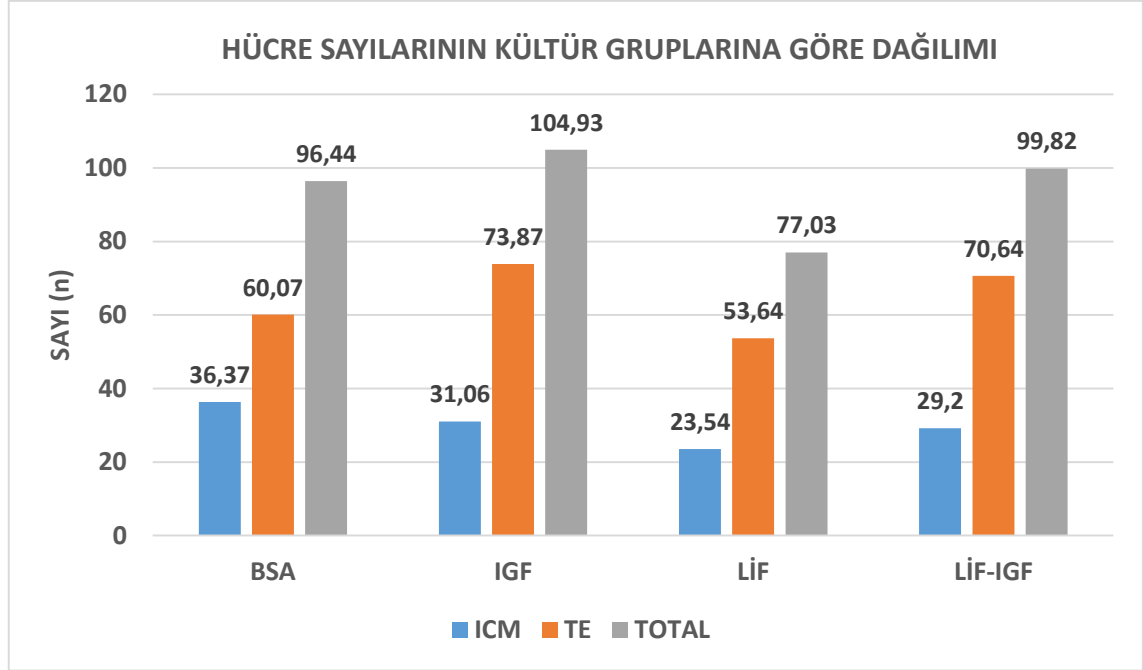
Tablo 7. Blastosist hücre sayısı değişimlerinin kültür gruplarına göre dağılımı, % Ortalama (\pm SE)

Grup	Blastosist (n)	ICM	TE	Total	ICM / Total
BSA	54	36,37 \pm 1,31 ^{a*}	60,07 \pm 1,61 ^b	96,44 \pm 2,33 ^b	0,37 ^a
IGF	65	31,06 \pm 0,82 ^b	73,87 \pm 1,30 ^a	104,93 \pm 1,94 ^a	0,29 ^b
LIF	53	23,54 \pm 0,74 ^c	53,64 \pm 1,14 ^c	77,03 \pm 1,34 ^c	0,30 ^b
LIF-IGF	45	29,20 \pm 0,69 ^b	70,64 \pm 1,02 ^a	99,82 \pm 1,22 ^{ab}	0,29 ^b

* Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir (P < 0,05).

Blastosistlerin diferansiyel yöntemle boyanması sonrası elde edilen sonuçların değerlendirilmesi sonrasında kültür medyumuna büyüme faktörleri ve sitokin ilavesinin özellikle blastosistlerin total hücrelerinin sayısı üzerinde son derece olumlu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir. Aynen embriyo gelişim oranlarında olduğu gibi hücre

dağılımları ve oranları üzerinde de bu ikilinin muhtemelen sinerjik etki göstermek suretiyle etkili olduğu düşünülmektedir (Şekil 12). Lösemi inhibitör faktörün tek başına embriyo kültürüne ilave edildiği grupta blastosist hücrelerinin hem total sayıları ve hem de TE ve ICM sayıları genel olarak bir azalma göstermiştir. Bu durum bize bu aşamada LIF'in yeterince etkili olmadığını göstermektedir.



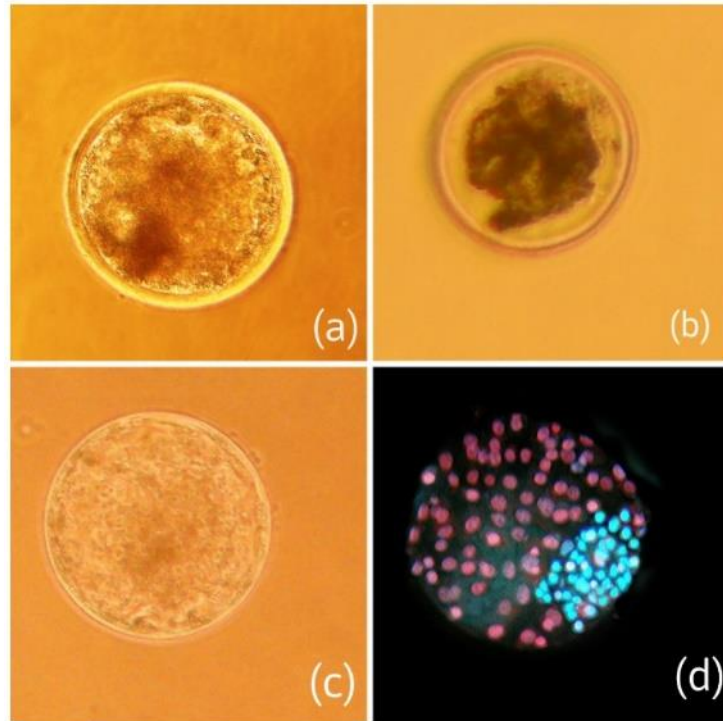
Şekil 12. Blastosist hücre sayısı ortalamalarının gruplara göre dağılımı

4.3. Vitrifikasyon Sonrası Bulgular

Embriyo kültürü boyunca tüm gelişim aşamaları yönünden kontrolleri yapılan ve dondurulmaya uygun görülen toplam 163 adet blastosist (7. günde) klasik vitrifikasyonla dondurma işlemine tabi tutulmuştur. Bunlardan 14 tanesi vitrifikasyon manipülasyonları sırasında kaybedilmiş ve sonucunda 149 tane blastosist normal prosedüre göre çözdürülmüş ve re-ekspansiyon değerlendirmeleri ve hücre sayımlarının yapılması için 1 gün süreli SOFaa+FCS medyumunda kültüre alınmışlardır. Vitrifikasyon uygulamaları sırasında blastosistlerin sık aralıklarla farklı kriyoprotektan oranlarının bulunduğu ortamlara aktarılması sırasında tecrübe ile doğru orantılı olmakla birlikte blastosist kayıpları söz konusu olabilmektedir. Manipülasyon kayıplarının deneme sayısı arttıkça kazanılan beceri ile doğru orantılı olarak azaldığı bildirilmekte olup, bizim

çalışmamızda da aynı şekilde belirli sayıda denemeden sonra kayıp sayısı minimum seviyelere inmiştir. Belirtilen blastosist kayıpları ilk denemelerde şekillenmiştir.

Farklı embriyo kültür gruplarından elde edilmiş olan blastosistlerin, vitrifikasyon sonrası belirtilen süreli (1 gün) kültür işleminin tamamlanması sonrasında, canlılık kontrolleri yapılmış, blastosist dehidrasyonu, kollabe olma gibi kriyoprotektan etkilerinden kurtulabilme, tekrar blastosel boşluk kazanabilme ve gelişime devam edebilme yetenekleri açısından değerlendirilmiştir. Vitrifiye edilmiş blastosistlerin kültürü sonrası yapılan değerlendirmelerde 86 blastosistin dejenere olduğu tespit edilirken, 63 blastosistin ise re-ekspansiyon olduğu belirlenmiştir (Şekil 13). Kontroller sırasında toplam 8 adet blastosistin ise zonadan çıkmış veya çıkma aşamasına (Hatching) gelmiştir. Zonadan çıkma aşamasına geldiği tespit edilen blastosistlerin çoğunluğunun IGF ilavesi içeren gruplarda yer aldığı görülmüştür (Tablo 8). Zaten daha önceki değerlendirmelerde de belirtildiği üzere büyüme faktörü içeren gruplarda kültüre edilen blastosistlerde gelişim daha hızlı ilerlemektedir. Dolayısıyla tespit edilen bu durum da ifade edilenin bir göstergesi olarak kendini göstermektedir.



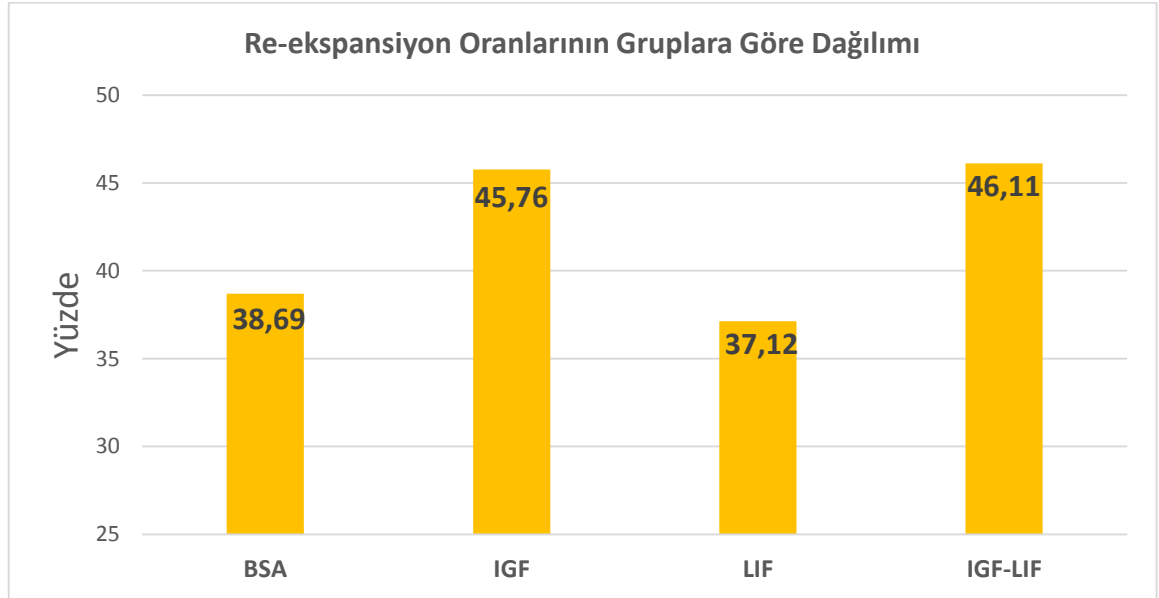
Şekil 13. Vitrifikasyon işlemi öncesi ve sonrasındaki blastosist görünümü, (a); Vitrifikasyon öncesi erken blastosist, (b); Dehidrasyon sonrası kollabe olmuş blastosist, (c); Çözündürme sonrası re-ekspansiyon sonrası boyanmış blastosist

Tablo 8. Vitrifikasyon işlemi sonrası kültürden elde edilen bulgular, % Ortalama (\pm SE)

Grup	Dondurulan Blastosist Sayısı	Boyanan Blastosist Sayısı	Re-ekspansiyon Oranı	Dejenerasyon Oranı
BSA	40	14	38,69 \pm 2,97 ^{b*}	60,59 \pm 7,73 ^b
IGF	39	16	45,76 \pm 2,16 ^a	54,23 \pm 2,16 ^c
LIF	46	16	37,12 \pm 0,3 ^b	62,87 \pm 0,3 ^a
IGF-LIF	38	15	46,11 \pm 3,25 ^a	53,88 \pm 3,25 ^c

* Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($P < 0,001$)

Vitrifikasyon uygulaması sonrası blastosistlerin re-ekspansiyon oranları incelendiğinde IGF ilavesi yapılmış olan gruplarda (IGF: 45,76 ve IGF-LIF: 46,11), IGF içermeyen gruplara oranla (BSA: 38,69, LIF: 37,12) daha yüksek bulunmuştur ($P < 0,001$) (Şekil 14). Bu durum bize sığır embriyo kültürlerine büyüme faktörleri ve sitokin ilavesi yapılmasının, vitrifikasyon işlemi ve sonrasında meydana gelecek hasarlara ve hücre kaybına karşı blastosistleri daha dirençli hale getirdiğini ve destekleyici bir etki yaptığını göstermektedir.



Şekil 14. Vitrifikasyon sonrasında blastosistlerin re-ekspansiyon oranlarının gruplara göre dağılımı

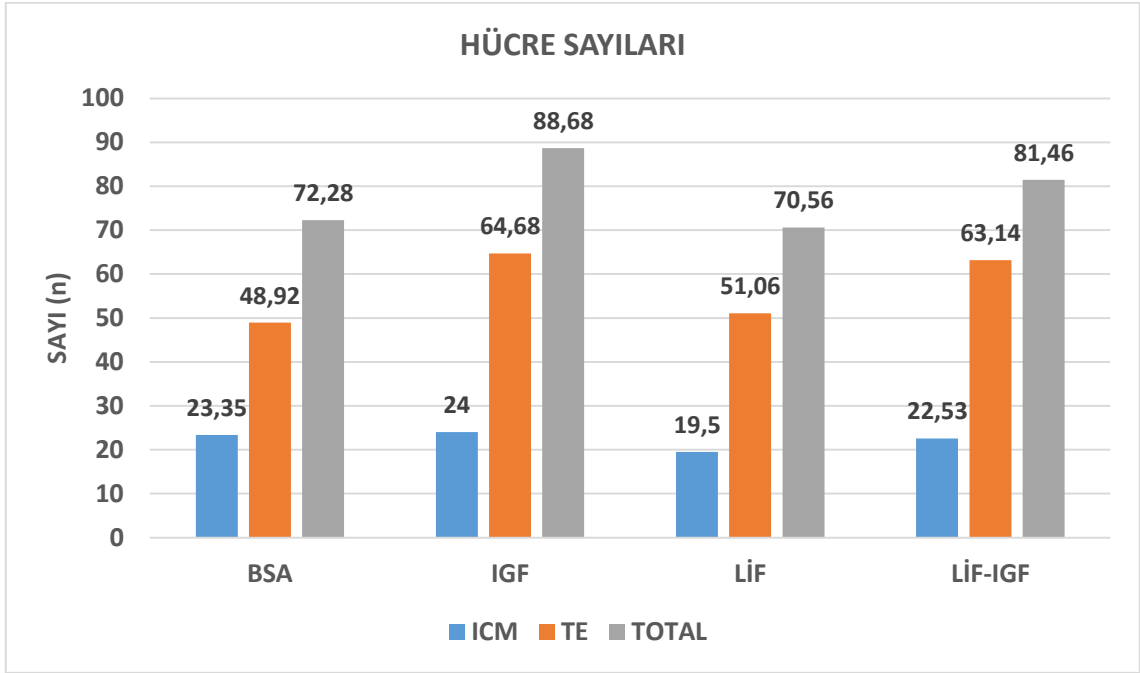
Çalışmada vitrifiye edilmiş sığır blastosistlerinin hücre dağılımlarının belirlenmesi ve oluşan değişimin ortaya konulmasına yönelik olarak canlılık kontrollerinde re-ekspansiyon gösteren toplam 61 adet blastosist diferansiyel boyama yöntemi ile boyanarak total, TE ve ICM hücrelerinin sayıları tespit edilmiştir. Vitrifikasyon yöntemi ile dondurulup-çözündürülmüş blastosistlerde hücre sayımı sonrasında blastosistlerdeki en yüksek total hücre sayısı IGF grubunda bulunan blastosistlerde elde edilmiştir (88,68). Trofoektoderm (TE) hücre sayısı bakımından IGF ve IGF+LIF içeren gruplardaki blastosistler birbirine yakın ve diğerlerinden yüksek bulunmuştur (IGF:64,68 , IGF-LIF:63,14). ICM hücre sayısı LIF grubundaki blastosistlerde diğer gruplara oranla önemli derecede düşük bulunmuştur ($P < 0,05$) (LIF: 19,5) (Tablo 9) (Şekil 15).

Tablo 9. Vitrifikasyon işlemi sonrası blastosist hücre sayılarının gruplara göre dağılımı,% Ortalama (\pm SE)

Grup	Blastosist (n)	ICM	TE	Total	ICM / Total
BSA	40	23,35 \pm 1,32 ^{a*}	48,92 \pm 1,5 ^b	72,28 \pm 2,12 ^c	0,32 ^a
IGF	39	24,00 \pm 1,36 ^a	64,68 \pm 2,37 ^a	88,68 \pm 3,2 ^a	0,26 ^b
LIF	46	19,50 \pm 0,61 ^b	51,06 \pm 0,82 ^b	70,56 \pm 0,72 ^c	0,27 ^b
LIF-IGF	38	22,53 \pm 0,5 ^a	63,14 \pm 1,38 ^a	81,46 \pm 4,45 ^b	0,31 ^a

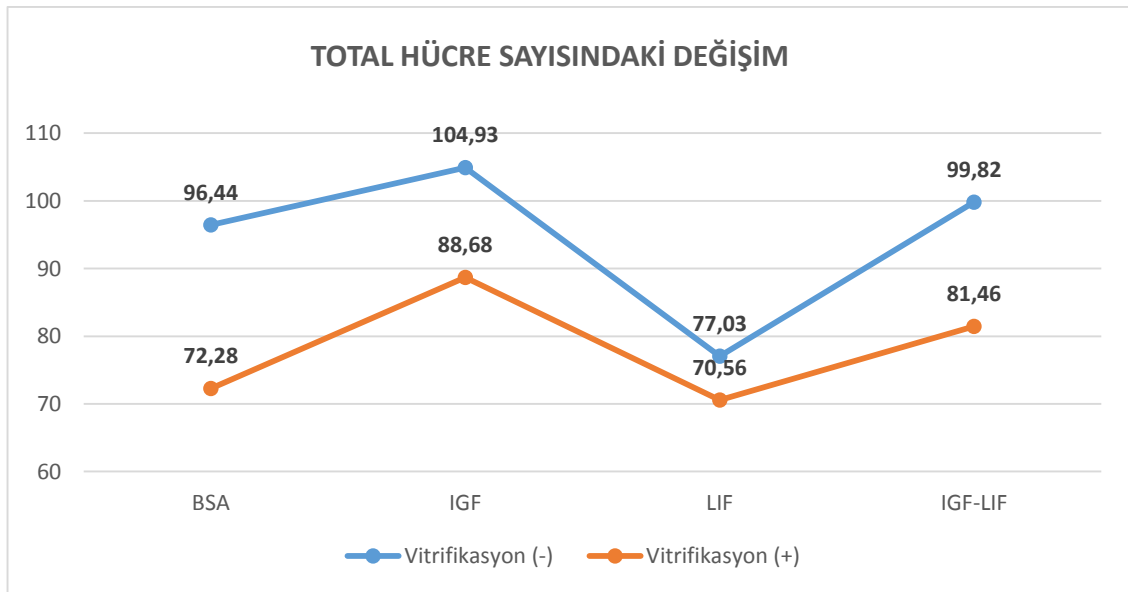
* Aynı sütunda farklı harfler taşıyan gruplar arasındaki fark önemlidir ($P < 0,05$)

Farklı kültür gruplarında kültüre edilmiş ve sonrasında vitrifikasyona tabi tutulmuş sığır blastosistlerinin hücre dağılım oranları yönünden yapılan istatistiksel değerlendirmesinde LIF'in tek başına kullanıldığı kültür grubunda embriyo gelişiminin de diğerlerine oranla daha iyi olmasına rağmen, ICM ve TE hücre sayıları diğerlerinden daha az tespit edilmiştir. Ancak, LIF ve IGF'in kombine kullanıldığı kültür ortamından elde edilen blastosistlerin embriyo gelişim oranlarının ve hücre sayıları parametrelerinin oldukça iyi ve beklenen sonuçları verdiği söylenilebilir. LIF'in en önemli etkisi literatür verilerini de destekler doğrultuda blastosistlerin vitrifikasyon öncesi var olan hücre yapıları ve sayılarının kaybını en düşük düzeylerde tutmuş olmasıdır.



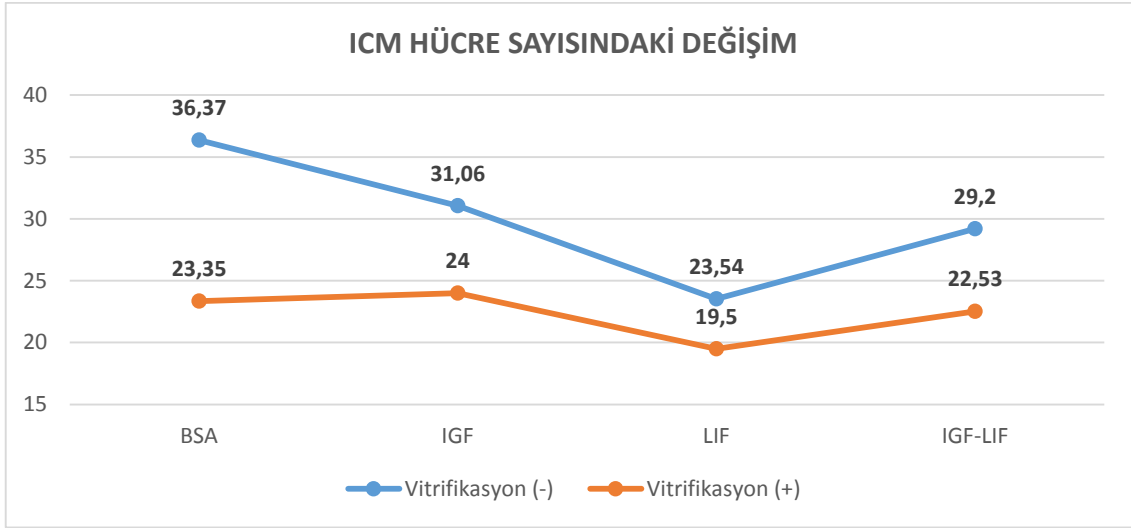
Şekil 15. Vitrifikasyon sonrası blastosist hücre sayısı ortalamalarının gruplara göre dağılımı

Vitrifikasyon işleminin uygulandığı vitrifikasyon (+), (163 adet) ve uygulanmadığı Vitrifikasyon (-), (217 adet) blastosistler total hücre sayılarındaki değişim açısından karşılaştırıldığında en yüksek değişim BSA grubunda gözlenmiştir ($96,44 > 72,28$). En düşük değişim ise LIF grubunda tespit edilmiştir ($77,03 > 70,56$) (Şekil 16).



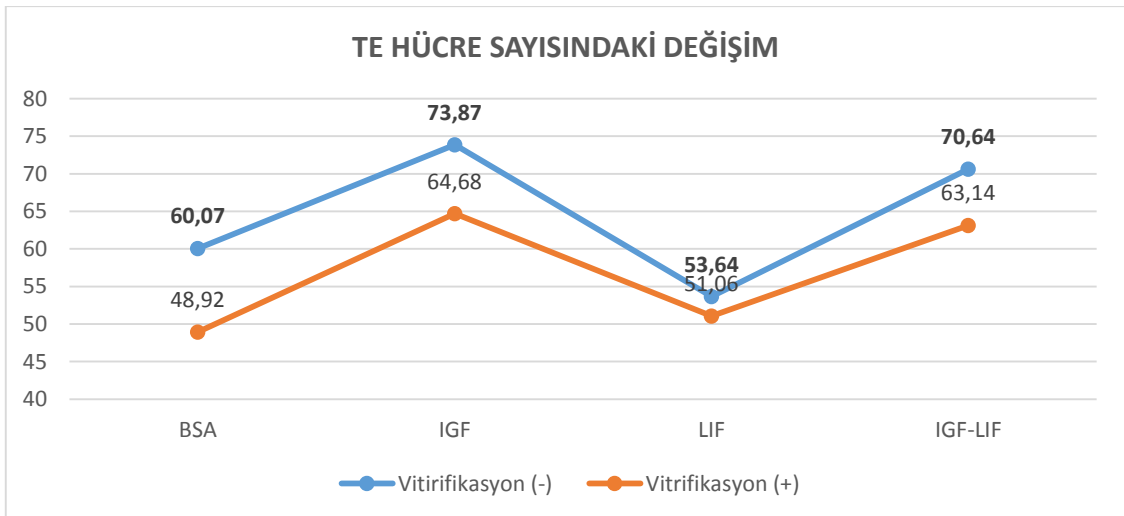
Şekil 16. Vitrifikasyon işleminin total hücre sayısına etkisinin gruplara göre dağılımı

Vitrifikasyon işleminin blastosistlerin ICM hücre sayısına etkilerinin incelenmesi sonucunda vitrifikasyon işleminin uygulanmadığı grup vitrifikasyon (-) ile yapılan karşılaştırmalarda en az değişimin LIF grubunda ($23,54 > 19,5$), en fazla değişim ise BSA ilavelerinin yapılmış olduğu gruplarda ($36,37 > 23,35$) gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 17).



Şekil 17. Vitrifikasyon işleminin ICM hücre sayısına etkisinin gruplara göre dağılımı

Vitrifikasyon işleminin blastosistlerin TE hücre sayısına etkileri de araştırılmış ve bunun sonucunda en az değişim LIF grubunda ($53,64 > 51,06$), en fazla değişim ise BSA grubunda ($60,07 > 48,92$) tespit edilmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. Vitrifikasyon işleminin TE hücre sayısına etkisinin gruplara göre dağılımı

5. TARTIŞMA

Memeli embriyolarının in vitro koşullarda üretilmesi ve dondurularak saklanması çalışmaları reproduktif biyoteknoloji alanında önemli bir yer tutmaktadır. İn vitro embriyo üretiminde çeşitli kültür sistemleri ve medyum kompozisyonları geliştirilmiş olup % 30 ve üzeri oranlarda blastosist elde edilebilmektedir. İn vitro koşullarda elde edilen sığır embriyolarının kültür, dondurma-çözdürme ve transfer sonrası yaşama ve implante olma kabiliyetleri her bir basamakta değişen oranlarda azalmaktadır. Elde edilen blastosistlerin dondurularak saklanması amacıyla birkaç metot kullanılmakta ve değişen oranlarda dondurma sonrası canlılık elde edilmektedir (Tervit, 1981; Palasz ve ark., 1996; Gordon, 2003). Tüm bu gelişmelere rağmen sığır embriyolarının in vitro üretilerek saklanmasına yönelik standardize edilmiş bir yöntem henüz ortaya konmamıştır.

Sunulan tez çalışmasında in vitro embriyo üretimi ve vitrifikasyonunda IGF ve LIF faktörlerinin etkinliği araştırılarak mevcut yöntemlerin geliştirilmesine yönelik yeni bilgilere ulaşılması hedeflenmiştir. Ayrıca, in vitro kültür medyumlarına yapılacak IGF-1 ve LIF ilavesinin, embriyo gelişim oranları ile blastosistlerin kalitesinin ve implante olabilirliğinin en önemli ölçütlerinden olan TE ve ICM hücre dağılımları ve dondurma sonrası blastosistlerin yaşama kabiliyeti üzerine bu faktörlerin etkisi araştırılmıştır.

Sığır ovaryumlarının mezbahadan toplanması ve laboratuvara taşınması sırasında çeşitli medyumlar ve katkı maddeleri kullanılmaktadır (Gordon, 2003). Çalışmamızda mezbahadan toplanan ovaryumların saklanması ve transportu amacı ile % 1 v:v oranında Gentamisin ilaveli serum fizyolojik kullanıldı. 36-38 °C'lik bir ilk ısıtma ile medyumun dönüş sıcaklığını 30°C altına düşmeden koruyabildiği tespit edildi. Kullanılan transport medyumdan kaynaklanan toksikasyon ya da oositlerde morfolojik bozulmalara rastlanmadı. Ovaryumların elde edilmesinden laboratuvara kadar taşınması arasındaki geçen 1-3 saatlik süre göz önüne alındığında, antibiyotik ilaveli serum fizyolojinin ovaryum transportu amacıyla güvenle kullanılabilceği belirlenmiştir.

Konuyla ilgili olarak yapılan çalışmalara bakıldığında ovaryum başına düşen oosit sayısı oranı 5-8 oosit/ovaryum olarak belirtilmektedir (Kanagawa ve ark., 1995; Fry ve ark., 1997; Hafez, 2000). Çalışmamızda 2-8 mm arasındaki foliküllerin aspirasyonu ile ovaryum başına düşen oosit (A kalite) oranı 6,46 olarak tespit edilmiştir.

Elde etmiş olduğumuz bu oosit/ovaryum oranı bir çok literatür verisi ile uyumluluk arz etmektedir. Bu oran Ün ve ark.'nın (2002) elde ettiği orandan (5,11) ve Fry ve ark.'nın (1997) elde ettiği 4,2'lik orandan yüksek bulunmuştur. Oranlar arasındaki bu değişimin aspirasyon yöntemi ve yöntemi uygulayan kişinin beceri farklılıklarına, duyarlılığına ve ovaryum kaynaklarındaki değişikliklere bağlı olduğu düşünülmektedir.

İn vitro embriyo üretimin en temel ve önemli basamaklarından olan in vitro maturasyon sistemlerinde maturasyon oranlarını yükseltmek amacıyla M-199 temel medyumuna çeşitli büyüme faktörleri ve hormonlar ilave edilmektedir (Thompson, 1996; Gordon, 2003). Bu hormonlardan gonadotropik etkili olan FSH ve LH ile birlikte EGF sıklıkla sığır oositlerinin maturasyon sistemlerine kullanılmaktadır (Younis ve ark., 1989; Birler ve ark., 1997). Maturasyon ortamına katılan LH, kumulus hücrelerinin yardımıyla oositin glukoz kullanımını artırmaktadır. FSH'nın ise granuloza hücrelerindeki aromataz aktivitesini canlandırarak foliküler mikro çevrenin androjen karakterden östrojene dönüşmesini sağladığı bildirilmiştir (Eyestone ve ark., 1993). Çalışmamızda ideal medyum bileşiminin belirlenmesi ve maturasyon protokolünün test edilmesi amacıyla ön denemeler yapılmış, A ve B kalitedeki oositlerde kumulus ekspansiyonu ve nükleer maturasyon açısından en yüksek maturasyon oranı LH, FSH ve EGF içeren grupta elde edilmiştir (% 84,7). Yapılan birçok çalışmada görülmüştür ki medyuma EGF ilavesi hem oositlerin maturasyon oranını ve hem de fertilizasyon sonrası embriyoların gelişme potansiyelini arttırmaktadır (Alm ve ark., 2008; Çevik ve ark., 2011). EGF ilavesinin oositin stoplazmik maturasyonunu uyardığı ve kumulus ekspansiyonunun derecesini de arttırdığı bizim yapmış olduğumuz uygulamalarda da kendisini göstermiştir. Çalışmamızda in vitro maturasyon süresi 22 saat olarak ayarlanmıştır. Maturasyon için inkubasyon süresi çeşitli kaynaklarda 17 ile 27 saate kadar değişmekle birlikte ideal sürenin 22-24 saat olduğu bildirilmektedir (Abdoon, 2003, Birler ve ark., 1997; Younis ve ark., 1989).

Bu doğrultuda yürütülen tez çalışmasında A kalite oositler için in vitro maturasyon oranı % 94,06 olarak tespit edilmiştir. Bu maturasyon oranı Lorenzo ve ark.'nın (1994) ve Birler ve ark.'nın (1997) elde ettiği orandan yüksek, Baştan ve ark.'nın (2010) elde ettiği orandan ise düşük bulunmuştur. Genel olarak çalışmamızda elde edilen

maturasyon oranı literatür verileri ile uyumlu düzeydedir (Alm ve ark., 2008; Çevik ve ark., 2011).

Memelilerin normal fizyolojisinde embriyo dış ortamdan korunarak uterus içerisinde gelişir ve implantasyona kadar tüm ihtiyaçlarını bu ortamdan karşılar. İn vitro üretilen embriyoların implantasyon öncesi döneme kadar gelişimini sağlayabileceği çeşitli ortamlar geliştirilmiştir. Çalışmalarda sıklıkla kullanılan kültür medyumlarından biri de SOF medyumudur (Bavister, 1995; Rizos ve ark., 2003; Gardner ve ark., 2004). Sentetik ovidukt sıvısı olarak bilinen bu medyumda ovidukt içeriğinin detaylı analizi sonrasında sıvı bileşimi belirlenmiş ve orjinaline en yakın kompozisyonun oluşturulmasına çalışılmıştır. Bu medyum temel alınarak hazırlanan kültür ortamına embriyonun ihtiyaçlarını karşılamak amacıyla değişen oranlarda BSA veya PVA ilave edilmektedir. Laboratuvarlarda in vitro embriyo üretimi için kullanılan en popüler medyum bileşiminin SOF+BSA olduğu belirtilmektedir (Gardner, 2004). Tez çalışmasında yaptığımız ön denemelerde BSA ilaveli gruplarda PVA ilavesine oranla daha hızlı ve daha yüksek blastosist oranı elde ettiğimiz için kontrol grubunda SOF+BSA kombinasyonu tercih edilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde ko-kültür yapılmayan sistemlerde medyuma EGF ve IGF gibi büyüme faktörleri de katılmakta ve bu sayede blastosist gelişimi desteklenmektedir (Sirisathien ve ark., 2003a). Bu büyüme faktörleri sığırlarda oosit maturasyonunu uyarıcı ve embriyo gelişimini destekleyen bir faktördür. IGF-1'in embriyo gelişimi sırasında preimplantasyon yeteneğini arttırması IGF-1 reseptörlerine yüksek eğilimle gerçekleşmektedir. IGF-1' in kültür medyumlarına eklenmesinin insan, fare ve tavşan embriyolarında hücre proliferasyonunu arttırması ve apoptozu azaltarak preimplantasyon şansını arttırması gibi yararları olduğu belirtilmiştir (Gordon, 2003; Sirisathien ve ark., 2003a).

Tez çalışmasında kontrol grubunun oluşturulması amacıyla SOF medyumuna BSA (8mg / ml) ilave edildi. Deneme grupları ise IGF (100 ng / ml), LIF (100 ng / ml)'in tek başlarına ve kombine ilaveleri yapılarak oluşturuldu. Toplam dört grupta elde edilen bölünme (cleavage) oranları BSA; 71,2, IGF; 65,61, LIF; 66,76, IGF-LIF; 73,39 olarak tespit edilmiştir. Bölünme oranları arasında istatistiksel açıdan gruplararası bir fark bulunmamaktadır. Bölünme oranları sığır embriyolarında 50 ng / ml dozunda IGF-1 ve EGF ilavesini deneyen Sirisathien ve ark.'nın (2003a) çalışması ile benzer bulunmuştur.

Büyüme faktörlerinin bölünme ve gelişime etkisi bu aşamada kendisini göstermiştir. Çalışmada, embriyoların morulaya ulaşma oranlarında BSA grubu diğer gruplara oranla önemli derecede düşük (% 26,9) gelişim göstermiştir. Yani çalışmamızda BSA kültür grubu etkili bir bölünme oranına ulaşmışken, doğru orantılı olarak ileri aşamaya gelişim göstermemiştir. Bu durumun büyüme faktörlerinin eksikliği ile doğrudan ilişkili olduğu düşünülmektedir.

İn vitro kültürdeki embriyolar için en önemli değerlendirme faktörü olan blastosiste ulaşma oranlarında morulaya ulaşma oranına paralel olarak SOF+BSA grubu blastosistler diğer gruptakilere oranla önemli derecede düşük kalmıştır (% 18,72). Rizos ve ark. (2001) tarafından yapılan çalışmada SOF medyumunda blastosiste ulaşma oranı % 31,3 olarak, Neira ve ark. (2010) tarafından % 15, Çevik ve ark. (2014) tarafından ise % 23,9 olarak bildirilmiştir. Bu veriler ışığında kontrol grubunda elde ettiğimiz oran literatüre yakın seyretmiştir. Ancak, büyüme faktörlerinin yokluğuna bağlı olarak bölünme sonrası daha ileri gelişim aşamalarına ulaşım oranı diğer gruplara oranla yetersiz kalmıştır.

Sunulan tez çalışmasında, IGF (22,6) gruplarından elde edilen blastosist oranımız Neira ve ark.'nın (2010) (% 26,0) ve Sirisathien ve ark.'nın (2003a) elde ettiği orandan (% 37,1) düşük seyretmiştir. LIF (24,17) ve IGF-LIF (24,03) gruplarında elde edilen oranları karşılaştırmak için literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Medyuma yalnızca LIF ilavesinin denendiği bir çalışmada blastosist oranı yaptığımız çalışmaya yakın bulunmuştur (28,2) (Sirisathien ve ark.,2003b). Vejlsted ve ark.'nın (2005) çalışmasında ise LIF ilaveli grupta % 38 blastosist oranına ulaşılmıştır. Bu bilgiler ışığında etkinliği araştırılan faktörlerin (LIF ve IGF) kontrol grubuna oranla blastosiste ulaşma oranlarına olumlu etkisi net olarak tespit edilmiştir. LIF'in en önemli etkisinin bölünme için yüksek düzeyde stimülayondan ziyade, in vitro kültür koşullarının olumsuz etkilerine ve blok oluşumlarına karşı embriyoları koruyarak blastosist oluşumuna katkı sağladığı düşünülmektedir. Kültüre LIF ve IGF birlikte katıldığında ise ikilinin olumlu etkileri birlikte ortaya çıkmakta ve daha etkili sonuçlar elde edilebilmektedir. Yapılan bu değerlendirme ile paralel olarak Neira ve ark.'nın (2010) sığır embriyolarında yaptığı çalışmada SOF grubunda % 29,0; SOF+LIF (50 ng/ml) grubunda % 38,0 ve SOF+FCS (% 10) grubunda ise % 38,0 blastosist oranı elde etmişlerdir. Aynı çalışmada SOF temel

medyumuna ilave olarak IGF-1, IGF-II, fibroblast büyüme faktörü (bFGF), transforming büyüme faktörü (TGF-b1), granulosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF) ve LIF kombinasyonu ile % 45 blastosist oranı elde etmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde kültür medyumuna büyüme faktörleri ile kombine edilerek LIF ilave edilmesinin, tek başına kullanılmasından belirgin ölçüde daha yüksek blastosist oranı sağladığı kanısına varılmaktadır. Bu durum çalışmamızda da görüldüğü üzere LIF'in diğer faktörlerle sinerjistik etki göstermesi şeklinde yorumlanabilir.

Embriyoların yaşama kabiliyetlerinin belirlenmesinde morfolojik gözlemler embriyo yaşama derecesi hakkında bilgi verebilen güçlü indikatörler olmakla birlikte, blastosistlerin total hücre sayısı ve ICM / total hücre oranları en geçerli olarak kabul edilen değerlendirmelerdir (Van Soom ve ark., 1996). Embriyoların kalite değerlendirmesinde blastosiste ulaşma oranlarının yanı sıra total ve özellikle diferansiyel (ICM-TE) hücre sayısı önemli bir kriterdir. Van Soom ve ark'nın. (1996) yapmış olduğu bilgilendirmelere göre memelilerde erken embriyonik gelişim sırasında ilk farklılaşma blastosist formasyonudur. Bu formasyonun ürünleri ise ICM ve TE hücrelerinin oluşumudur. Farklılaşma sonrasında oluşan ICM, gelişmekte olan fötusun tüm dokularına farklılaşabilme yeteneğindedir. Diğer bir ürün olan TE hücreleri ise blastosist formasyonu sırasında ortamdaki sıvının vektöryel transportundan, gebeliğin maternal olarak tanınmasından ve implantasyon sırasında uterus endometriyumuna invazyonundan sorumludur. Sığır embriyolarında kötü morfoloji ICM hücre sayısı yeterli olmayan ya da az olan blastosistler ile doğrudan ilişkilidir.

Eckert ve ark. (1998) tarafından bildirildiği üzere in vitro kültüre edilen embriyoların reseptör sistemlerinde ve spesifik ekspresyon yollarında aksamalar olmaktadır. Bu durum da blastosistteki ICM ve TE hücrelerin gelişimlerinde anormalliklere yol açabilmektedir (Eckert ve ark., 1998; Rizos ve ark., 2003; Oshima ve ark., 2003). Ayrıca in vitro kültür koşulları da blastosistin yaşama şansı ve implantasyon başarısını doğrudan etkileyen hücre kompozisyonu etkilemektedir (Koo ve ark., 2002). İmplantasyon öncesi dönemde LIF ve IGF gibi faktörler embriyodaki ICM ve TE hücre farklılaşmasını düzenlemenin yanı sıra apoptozu baskılayarak embriyo canlılığını arttırmaktadır (Fry et al., 1992; Bischof ve ark., 1995; Castro-Rendon ve ark., 2006).

Çalışmamızda in vitro kültürün yedinci gününde diferansiyel metot ile boyanan blastosistlerde total hücre sayısı LIF grubunda önemli derecede düşük bulunmuştur (77,03). IGF'in tek başına kullanıldığı grupta ise önemli derecede yüksek bulunmuştur (104,93). Burada LIF'in tek başına kullanıldığında kontrol grubundan da düşük total hücre sayısına yol açması tek başına hücre bölünmesine olumsuz etkisine işaret olabilecek iken, IGF ile birlikte kullanıldığında yakalanan % 99,82'lik oran IGF'in olumlu etkisine bağlanabilir. Benzer şekilde IGF tek başına 104,93'lük bir total hücre ortalaması sağlarken, LIF ile kombine edildiğinde bu oranın %99,82'ye gerilemesi bu görüşü doğrulamaktadır.

Literatürde çalışmamız bulgularına paralel şekilde LIF ilavesinin kontrol grubuna oranla total hücre sayısını azalttığı çalışmaların yanı sıra aksi yönde bulgularda yer almaktadır. Sirisathien ve ark. (2003b) kültür medyumuna LIF ilavesinin kontrol grubuna oranla total hücre sayısını arttırdığını bildirmiştir (Kontrol;148, LIF;170). Benzer şekilde Neira ve ark. (2010), SOF medyumuna büyüme faktörleri ve LIF ilavesinin total hücre sayısını arttırdığını bildirmiştir (LIF+IGF;154, SOF; 125). Buna karşın çalışmamızdaki sonuçlarla paralel şekilde Vejsted ve ark. (2005), kültür medyumuna LIF ilavesinin total hücre sayısını azalttığını bildirmiştir (Kontrol; 140, LIF; 105). Benzer şekilde Desai ve ark.'da (2000) kontrol grubunda total hücre sayısını ortalama 131, LIF grubunda 129, IGF grubunda ise 172 olarak tespit etmiştir. Burada yapılan çalışmalara bakıldığında blastosistlerin total hücre sayısının bizim çalışmamızda diğerlerine oranla daha düşük olduğu gözlemlenmektedir. Bu durum, hücre sayımını yapıldığı günden kaynaklanmaktadır (7. gün).

TE ve ICM hücre sayılarının deneme grupları içerisinde en düşük seyrettiği grup LIF grubu olmuştur. Literatürde embriyo kültür medyuma yapılacak IGF ve LIF ilavesinin TE hücre sayısında artışa yol açacağı bildirilmesine rağmen denemelerimizde LIF tek başına kullanıldığında TE hücre sayısında önemli derecede azalma tespit edilmiştir. Fakat IGF ve LIF-IGF kombinasyonu ile TE hücre sayısı diğer gruplara oranla önemli derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar ışığında blastosiste ulaşma oranları da göz önüne alındığında LIF'in embriyo kültürüne IGF ile birlikte ilave edilerek muhtemel sinerjistik etkiden yararlanılabileceği düşünülmektedir. Elde edilen bu bulgu ve varılan

sonuç bizim tez çalışmamızın çıkış noktasını ve hipotezimizi doğrudan doğruya desteklemekte, öngörümüzün de yerinde olduğunu da ortaya koymaktadır.

Kültür medyumuna LIF ilavesinde bir diğer önemli nokta ise LIF'in medyuma ilave edilme zamanlamasıdır. Literatürde blastosistteki LIF reseptörlerinin fertilizasyon sonrası 4. günden sonra aktif hale geçtiği bildirilmektedir (Eckert ve ark., 1998; Fry ve ark., 1992; Fukui ve ark., 1994; Han ve ark., 1995; Neira ve ark., 2010; Oshima ve ark., 2003; Sirisathien ve ark., 2003; Stewart ve ark., 1992; Vejlsted ve ark., 2005). Yine in vivo ortamda uterusu LIF ekspresyonu fertilizasyon sonrası 4. günden implantasyona kadar geçen sürede şekillenmektedir. Bu verilere uygun şekilde kültür medyumuna 4. Gün yerine 0. Gün LIF ilave edildiğinde kontrol ve 4. Gün grubuna kıyasla blastosiste ulaşma oranında ciddi bir düşüş belirlenmiştir. Bu durum hem embriyo gelişim oranları açısından ve hem de blastosistlerin hücre oranı ve hücre dağılımları açısından literatür verileri ile uyumlu olarak kendisini göstermiştir (Han ve ark., 1995; Neira ve ark., 2010; Oshima ve ark., 2003; Yamanaka ve ark., 2001). Kültürün 4. Gününde yapılan LIF ilaveleri tüm kriterler açısından başarısız bulunmuştur.

Çalışmada bir diğer önemli basamak ise adı geçen faktörlerin embriyo kültürüne ilavelerinin implantasyon öncesi dönemde blastosistlerin vitrifikasyonuna olan etkilerinin araştırılması olmuştur. Sığır embriyolarının başarıyla dondurulmasında kullanılan yöntem, embriyonun gelişim safhası ve kültüre alındıkları medyumların içeriği çok önemlidir (Menezes, 2004, Bağış ve ark., 2010). İn vitro yolla üretilen embriyoların in vivo elde edilenlere oranla kriyoprezervasyona olan duyarlılıkları araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Massip, 2001; Gordon, 2003). İn vitro yolla üretilen blastosistler in vivo üretilenlere göre daha düşük ICM / TE oranına ve daha az sayıda kompakt ICM hücreye sahiptirler (Gomez ve ark., 2008). Kriyoprezervasyonun ICM hücreler üzerine olumsuz etkisi diğer çalışmalarla da bildirilmiştir (Iwasaki ve ark., 1994; Mucci ve ark., 2006; Gomez ve ark., 2008; Trigal ve ark., 2013). Bu bilgiler ışığında kriyoprezervasyonun özellikle farklılaşmanın ilk ürünü olan hücreler üzerindeki olumsuz etkisini en aza indirmek için bu hücreler üzerinde olumlu etkileri bilinen IGF ve LIF gibi faktörler dondurma öncesinde kültür medyumlarına ilave edilmektedir (Han ve ark., 1995; Desai ve ark., 2000). Han ve ark. (1995), embriyo kültür medyumuna ilave

edilecek LIF'in blastosistlerin kriyotoleransını arttırdığını ve zonadan çıkma oranını (Hatching) yükselttiğini bildirmiştir.

Vitrifikasyon sonrası embriyo canlılığının değerlendirilmesinde önemli bir kriter olan re-ekspansiyon oranları IGF ilavesi yapılmış olan gruplarda (IGF: 45,76 ve IGF-LIF: 46,11), IGF içermeyen gruplara oranla (BSA: 38,69, LIF: 37,12) daha yüksek bulunmuştur. Bu durum bize sığır embriyo kültürlerine büyüme faktörleri ve sitokin ilavesi yapılmasının, vitrifikasyon işlemi ve sonrasında meydana gelecek hasarlara ve hücre kaybına karşı blastosistleri daha dirençli hale getirdiğini ve destekleyici bir etki yaptığını göstermektedir. Tek başına LIF içeren gruptaki re-ekspansiyon oranı, blastosiste ulaşma oranlarındakine paralel olarak düşük kalmıştır. Daha önceki bölümlerde de belirtildiği üzere LIF ve IGF faktörlerinin embriyo kültürüne kombine olarak ilave edilmesi hem embriyo gelişim oranları ve hem de elde edilen blastosistlerin klasik vitrifikasyon yöntemi ile dondurma sonrasında blastosistlerin dondurma işlemine karşı direncini arttırdığı belirgin bir şekilde kendisini göstermiştir.

Çalışmada kullanılan faktörlerin vitrifikasyona tabi tutulan blastosistler üzerindeki etkisini daha spesifik açıdan değerlendirmek için hücre sayısı ortalamaları karşılaştırılmıştır. Vitrikiye edilen ve edilmeyen aynı dönemdeki blastosistlerin total hücre sayısı ortalamaları incelendiğinde vitrifikasyonun beklenildiği üzere ve literatür verileri ile tutarlı bir şekilde (Leibo ve ark., 1993; Iwasaki ve ark., 1994; Han ve ark. 1995; Dobrinsky ve ark., 2000; Vajta, 2000; Massip ve ark., 2001; Rizos ve ark., 2001; Hasler ve ark., 2009; Asgari ve ark., 2012) hücre sayısını azalttığı görülmüştür. Sunulan doktora tez çalışmasında, vitrifikasyon işleminin uygulandığı vitrifikasyon (+) ve uygulanmadığı vitrifikasyon (-) gruplarındaki blastosistlerin total hücre sayılarındaki değişim açısından karşılaştırıldığında en yüksek değişim BSA grubunda gözlenmiştir (96,44 > 72,28). En düşük değişim ise LIF grubunda tespit edilmiştir (77,03 > 70,56). Vitrifikasyon işleminin blastosistlerin ICM hücre sayısına etkilerinin incelenmesi sonucunda ise en az değişimin yine LIF grubunda (23,54 > 19,5), en fazla değişimin ise BSA grubunda (36,37 > 23,35) gerçekleştiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde TE hücre sayısında da en az değişim LIF grubunda (53,64 > 51,06), en fazla değişim ise BSA grubunda (60,07 > 48,92) tespit edilmiştir. Hücre sayı ortalamalarındaki farklar incelendiğinde LIF'in IGF'e oranla hem ICM hem de TE hücrelerindeki kaybı en aza indirmede daha etkili olduğu sonucuna varılabilmektedir. Diğer yandan hücre sayılarının

en düşük seyrettiği grubun LIF grubu olması ortalama farklarının da buna orantılı olarak azalmasına neden olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır.

Çalışmada etkinliği araştırılan IGF ve özellikle LIF'in blastosist gelişimi üzerine etkisini ele alan çalışmalara oranla bu faktörlerin blastosistlerin kriyotoleransına olan etkilerini araştıran çalışma sayısı çok azdır. Han ve ark. (1995), dondurma öncesi kültür medyuma LIF ilavesi ile çözündürme sonrası % 67,5 canlılık oranı elde etmiştir. Aynı çalışmada LIF ilavesi yapılmayan kontrol grubunda çözündürme sonrası canlılık oranı ise % 62,2 olarak belirtilmiştir. Sunmuş olduğumuz tez çalışmamızda ise vitrifikasyon uygulaması sonrası blastosistlerin re-ekspansiyon oranları IGF ilavesi yapılmış olan gruplarda (IGF: 45,76 ve IGF-LIF: 46,11), IGF içermeyen gruplara oranla (BSA: 38,69, LIF: 37,12) daha yüksek bulunmuştur. Bu durum bize sığır embriyo kültürlerine büyüme faktörleri ve sitokin ilavesi yapılmasının, vitrifikasyon işlemi ve sonrasında meydana gelecek hasarlara ve hücre kaybına karşı blastosistleri daha dirençli hale getirdiğini ve destekleyici bir etki yaptığını göstermektedir.

Vitrifikasyon sonrası blastosistlerin hücre sayısındaki değişim açısından çalışmamızı karşılaştırabileceğimiz yeterli literatür verisi bulunamamıştır. Çalışmamızın diğer bir orijinalliği de buradan kaynaklanmaktadır. Vitrifikasyon işleminin blastosist canlılığı ve implantasyon için kritik öneme sahip olan ICM / Total hücre oranı üzerindeki etkisinin incelenmesi sonucu IGF'in tek başına kullanıldığı ve IGF-LIF kombinasyonunun yer aldığı grupta blastosistlerdeki hücre dağılımının ve ICM ve TE hücre oranlarının orantılı durumunun bozulmadığı belirlenmiştir. LIF grubunda da hücre sayıları az olmakla birlikte oranların korunduğu ve hatta vitrifikasyon sonrası en az kaybın bu grupta olduğunu belirtmek yerinde olacaktır. LIF'in en önemli etkisi literatür verilerini de (Han ve ark. 1995; Iwasaki ve ark., 1994; Vajta, 2000) destekler doğrultuda blastosistlerin vitrifikasyon öncesi var olan hücre yapıları ve sayılarının kaybını en düşük düzeylerde tutmuş olmasıdır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. İn vitro fertilizasyonda kullanılacak oositlerin eldesi için aspirasyon yönteminin tek başına ve sorunsuz bir şekilde kullanılabilceği kanısına varılmıştır.
2. Maturasyon medyumunu için TCM-199'un temel medyum olarak kullanılabilceği ve ilave olarak 5 µg/ml LH, 0,5 µg/ml FSH, ve 10 ng/ml EGF'nin yeterli olduğu tespit edilmiştir.
3. Maturasyon medyumuna FBS ve Östradiol ilaveleri yapılmadan da yeterli maturasyon başarısı elde edilebileceği belirlenmiştir.
4. Başarılı bir fertilizasyon için genellikle literatürde 1×10^6 spermatozoon/ml şeklinde yer alan spermatozoon konsantrasyonu yeterli bulunmamış ve çalışmamızda spermatozoon konsantrasyonu 2×10^6 spermatozoon/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Belirlenen bu dozun benzeri çalışmalarda daha etkili olabileceği düşünülmekte ve önerilmektedir.
5. Fertilizasyon işleminde kullanılan sperma kaynağının fertilizasyon başarısını doğrudan etkilediği ve aynı hazırlık ve inkubasyon işlemlerine tabi tutulmasına rağmen bazı boğalara ait spermaların yüksek motiliteye sahip olsalar bile fertilizasyon oranını düşürdükleri tespit edilmiştir. Bu sebeple spermaların araştırmacılar tarafından kendi laboratuvarlarında fertilizasyon testlerine tabi tutulmaları gerektiği düşünülmektedir.
6. Embriyo kültüründe medyuma IGF ilavesi yapılması durumunda blastosist gelişiminin daha hızlı şekillendiği için bu gruplarda kültür zamanından bağımsız olarak da gelişim kontrolü yapılmasına dikkat edilmesi gerektiği düşünülmektedir.
7. İn vitro embriyo üretiminde kültür medyumuna LIF ve IGF ilavesinin blastosiste ulaşma oranını arttırdığı başarıyla kullanılabilceği belirlenmiştir.

8. Embriyoların IGF gruplarında kültüre edildiklerinde daha erken zonadan çıkma eğiliminde oldukları ve aynı dönemde hücre sayımının gerçekleştirilebilmesi için bu duruma dikkat edilmesi gerektiği belirlenmiştir.
9. İn vitro yolla üretilen embriyoların vitrifikasyonunda blastosistlerin çözdüme sonrası canlılığının desteklenmesinde IGF'in re-ekspansiyon oranını arttırdığı LIF'in ise olumlu etkisinin görülebilmesi için IGF ile beraber kullanılmasının gerektiği düşünülmektedir.
10. Çalışmada etkinliği ortaya konulan faktörlerden özellikle LIF'in ya da LIF + IGF kombinasyonundan elde edilen blastosistlerin etkisinin daha objektif olarak ve gözle görülebilir şekilde ortaya konulması için embriyo transferlerinin yapılması ile gebelik ve canlı doğuma kadar uzanan denemelere de tabi tutularak sığır blastosistlerinin vitrifikasyonu ve transferindeki yerinin netleştirilmesi bu alana önemli katkılar sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abdoon SSA. Factors Affecting In Vitro Production Of Bovine Embryos, <http://esarf2.tripod.com/abdoon.htm>, 2014.
- Abe H, Yamashita S, Satoh T, Hoshi H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev.* 2002;61(1):57-66.
- Agca Y. Post-thaw survival and pregnancy rates of intact and biopsied and sexed in vitro produced bovine embryos after vitrification, University of Wisconsin-Madison, Madison, Yüksek Lisans Tezi, 1994;15-88.
- Agca Y. Cryopreservation of oocyte and ovarian tissue. *Ilar Journal.* 2000;41(4):207-220.
- Alm H, Torner H, Kanitz W, Roschlau K. Influence of oocyte recovery method, in vitro fertilization method and serum source on embryonic development of in vitro matured bovine oocytes. *Arch Tierz.* 2008;51(3):224-234.
- Arav A. Transillumination increases oocyte recovery from ovaries collected at slaughter. A new technique report. *Theriogenology.* 2001;55(7):1561-1565.
- Arici A, Oral E, Bahtiyar O, Engin O, Seli E, Jones EE. Leukaemia inhibitory factor expression in human follicular fluid and ovarian cells. *Hum Reprod.* 1997;12(6):1233-1239.
- Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology.* 2001;55(6):1303-1322.
- Asgari V, Hosseini SM, Forouzanfar M, Hajian M, Nasr-Esfahani MH. Vitrification of in vitro produced bovine embryos: Effect of embryonic block and developmental kinetics. *Cryobiology.* 2012;65(3):278-283.
- Bagis H, Odaman H, Sagirkaya H, Dinnyes A. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. *Mol Reprod Dev.* 2002;61(2):173-179.
- Bağış H. Gamet, Embriyo ve Dokuların Dondurulması. Bağış, H., DüNDAR, M. Editör, Modern Biyoteknoloji ve Uygulamaları, 1. Baskı, Kayseri, Erciyes Üniversitesi Matbaası, 2010; 114-140.
- Baştan A, Polat B, Acar DB, Korkmaz Ö, Çolak A. Determination of optimal dose of EGF for bovine oocyte maturation and subsequent in vitro fertilization and culture in two media. *Turk J Vet Anim Sci.* 2010;34(1):33-38.
- Bavister BD, Rose-Hellekant TA, Pinyopummintr T. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology.* 1992;37(1):127-146.
- Bavister BD. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum Reprod Update* 1. 1995;91-148.

- Beebe D, Wheeler M, Zeringue H, Walters E, Raty S. Microfluidic technology for assisted reproduction. *Theriogenology*. 2002;57(1):125-135.
- Bevers MM, Dieleman SJ, Van den Hurk R, Izadyar F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*. 1997;47(1):13-22.
- Birler S, Pabuççuoğlu S, Atalla H, Alkan S, Özdaş ÖB, Bacınoğlu S, Cirit Ü, Zavar İ. In vitro üretilen koyun embriyolarının transferi. *Tr J Vet Anim Sci*. 2002;26: 1421-1426.
- Birler S, Pabuççuoğlu S, Alkan S, Evecen M, İleri İK. In vitro fertilize edilen sığır oositlerindeki pronükleer gelişim üzerinde olgunlaştırma ve fertilizasyon sürelerinin etkisi. *Tr J Vet Anim Sci*. 1997;22:1-15.
- Bischof P, Haenggeli L, Campana A. Effect of leukemia inhibitory factor on human cytotrophoblast differentiation along the invasive pathway. *Am J Reprod Immunol*. 1995;34(4):225-230.
- Bols PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, Vandenheede JMM, de Kruif A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1996;45(5):1001-1014.
- Boni R, Cuomo, A, Tosti E. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biol Reprod*. 2002;66(3):836-842.
- Brackett BG, Zuelke KA. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*. 1993;39(1):43-64.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*. 1982;27(1):147-158.
- Brackett BG, Keskin-tepe L, Simplicio AA, Luvoni GC. Influences of culture components on the development of bovine blastocysts in defined conditions. *Theriogenology*. 1997;47(1):274.
- BTYK,2010,http://www.tubitak.gov.tr/sites/default/files/2211_ongelikli_alanlar_2013_0.pdf, 2014.
- Callesen H, Greve T, Christensen F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. *Theriogenology*. 1987;27(1):217.
- Castro-Rendon WA, Castro-Alvarez JF, Guzman-Martinez C, Bueno-Sanchez JC. Blastocyst-endometrium interaction: intertwining a cytokine network. *Braz J Med Biol Res*. 2006;39(11):1373-1385.
- Çevik M, Koçyiğit A, Şen U, Kuran M. Can Sequential Human Embryo Culture Media be Used in Bovine in vitro Embryo Culture? *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2014;20(1):145-149.

- Cevik M, Sen U, Kocyigit A, Soydan E, Kuran M. Effects of serum, gonadotropins, epidermal growth factor and estradiol 17-beta on cumulus expansion and nuclear maturation of bovine oocytes. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2011;17(6):1009-1014.
- Chang MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature.* 1959;184:455.
- Chen HF, Shew JY, Ho HN, Hsu WL, Yang YS. Expression of leukemia inhibitory factor and its receptor in preimplantation embryos. *Fertil Steril.* 1999;72(4):713-719.
- Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL. Leukemia Inhibitory Factor Can Substitute for Nidatory Estrogen and Is Essential to Inducing a Receptive Uterus for Implantation But Is Not Essential for Subsequent Embryogenesis. *Endocrinology.* 2000;141(12):4365-4372.
- Clemens MJ, Cytokines. 1rd ed. Oxford, Bios Scientific Publishers Ltd, 1991;57-75.
- Cooke S, Quinn P, Kime L, Ayres C, Tyler JP, Driscoll GL. Improvement in early human embryo development using new formulation sequential stage-specific culture media. *Fertil Steril.* 2002;78(6):1254-1260.
- Coscioni AC, Reichenbach HD, Schwartz J, LaFalci VSN, Rodrigues JL, Brandelli A. Sperm function and production of bovine embryos in vitro after swim-up with different calcium and caffeine concentration. *Anim Reprod Sci.* 2001;67(1):59-67.
- De Wit AAC, Kruijff TA. Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for α -amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. *Anim Reprod Sci.* 2001;65(1):51-65.
- Desai N, Lawson J, Goldfarb J. Assessment of growth factor effects on post-thaw development of cryopreserved mouse morulae to the blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2000;15(2):410-418.
- Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biol Reprod.* 2000;62(3):564-570.
- Duran DH. Technical aspect of in vitro embryo production. 1rd ed. Taiwan, Food and Fertilizer Tecnology Center. 2000;1-7.
- Eckert J, Niemann H. mRNA expression of leukaemia inhibitory factor (LIF) and its receptor subunits glycoprotein 130 and LIF-receptor-beta in bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Mol Hum Reprod.* 1998;4(10):957-965.
- Edashige K, Asano A, An TZ, Kasai M. Restoration of resistance to osmotic swelling of vitrified mouse embryos by short-term culture. *Cryobiology.* 1999;38(4):273-280.
- Elder K, Dale B. In-vitro fertilization. 2rd ed. Cambridge, Cambridge University Press. 2003;152-224.
- Erickson RP. Recent advances in developmental genetics: Growth factors and morphogens. *Mol Reprod Dev.* 1995;41(1):109-125.

- Eyestone WH, Boer HA. FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. *Theriogenology*. 1993;39:216.
- Feugang JM, Camargo-Rodríguez O, Memili E. Culture systems for bovine embryos. *Livestock Sci*. 2009;121(2):141-149.
- Fraser LR. Sperm capacitation and the acrosome reaction. *Hum Reprod*. 1998;13(1):9-19.
- Friedler S, Giudice LC, Lamb EJ. Cryopreservation of embryos and ova. *Fertil Steril*. 1988;49(5):743-764.
- Fry RC, Batt PA, Fairclough RJ, Parr RA. Human leukemia inhibitory factor improves the viability of cultured ovine embryos. *Biol Reprod*. 1992;46(3):470-474.
- Fry RC, Niall EM, Simpson TL, Squires TJ, Reynolds J. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*. 1997;47(5):977-987.
- Fukui Y, Matsuyama K. Development of in vitro matured and fertilized bovine embryos cultured in media containing human leukemia inhibitory factor. *Theriogenology*. 1994;42(4):663-673.
- Gandolfi F, Moor RM. Stimulation of early embryonic development in the sheep by co-culture with oviduct epithelial cells. *J Reprod Fertil*. 1987;81(1):23-28.
- Gardner DK, Lane M, Watson, AJ, editors. A laboratory guide to the mammalian embryo. Oxford University Press. 2004;41-78.
- Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. In: Jansen R, Mortimer D, editors. *Toward reproductive certainty: fertility and genetics beyond*. Carnforth, Parthenon Publishing, 1999;378-388.
- Gardner RL, Papaioannou VE. Differentiation in the trophectoderm and inner cell mass. In: Michael B, Arthur EW, editors. *The early development of mammals*. 1rd ed. Edinburgh, Cambridge University Press, 1975;107-132.
- Gómez E, Rodríguez A, Muñoz M, Caamaño JN, Hidalgo CO, Morán E, Díez C. Serum free embryo culture medium improves in vitro survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*. 2008;69(8):1013-1021.
- Gordon I. *Laboratory production of cattle embryos*. 2nd ed. UK, Cabi. 2003;277-302.
- Gordon I, Lu KH. Production of embryos in vitro and its-impact on livestock production. *Theriogenology*. 1990;33(1):77-87.
- Greve T, Madison V, Avery B, Callesen H, Hyttel P. In vitro production of bovine embryos: A progress report and the consequences on the genetic upgrading of cattle populations. *Anim Reprod Sci*. 1993;33(1):51-69.
- Hafez B, Hafez ESE. *Reproduction in farm animals*. 7rd ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2000;431-443.

- Han RN, Post M, Tanswell AK, Lye SJ. Insulin-like growth factor-I receptor-mediated vasculogenesis/angiogenesis in human lung development. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2003;28(2):159-169.
- Han YM, Lee ES, Mogoe T, Lee KK, Fukui Y. Effect of human leukemia inhibitory factor on in vitro development of IVF-derived bovine morulae and blastocysts. *Theriogenology.* 1995;44(4):507-516.
- Hanada A, Enya Y, Suzuki T. Birth of calves by non-surgical transfer of in vitro fertilized embryos obtained from oocytes matured in vitro. *Jpn J Anim Reprod.* 1986;32:208.
- Handyside AH, Hunter S. A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts in situ using polynucleotide-specific fluorochromes. *J Exp Zool.* 1984;231:429-434.
- Hardy K, Handside AH, Winston RML. The human blastocyst: cell number, death and allocation during late preimplantation development in vitro. *Development.* 1989;107:597-604.
- Harvey MB, Leco KJ, Arcellana-Panlilio MY, Zhang X, Edwards DR, Schultz GA. Proteinase expression in early mouse embryos is regulated by leukaemia inhibitory factor and epidermal growth factor. *Development.* 1995;121(4):1005-1014.
- Hasler JF. Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reprod Fertil Dev.* 2009;22(1):119-125.
- Hilton DJ. LIF: lots of interesting functions. *Trends Biochem Sci.* 1992;17(2):72-76.
- Hilton DJ, Gough NM. Leukemia inhibitory factor: a biological perspective. *J Cell Biochem.* 1991;46(1):21-26.
- Hu W, Feng Z, Teresky AK, Levine AJ. p53 regulates maternal reproduction through LIF. *Nature.* 2007;450(7170):721-724.
- Hyttel P, Viuff D, Fair T, Laurincik J, Thomsen PD, Callesen H, Greve T. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. *Reproduction.* 2001;122(1):21-30.
- Iritani A, Niwa K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil.* 1977;50(1):119-121.
- Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *J Reprod Fertil.* 1990;90(1):279-284.
- Iwasaki S, Yoshikane Y, Li X, Watanabe S, Nakahara T. Effects of freezing of bovine preimplantation embryos derived from oocytes fertilized in vitro on survival of their inner cell mass cells. *Mol Reprod Dev.* 1994;37(3):272-275.

- Kaidi S, Bernard S, Lambert P, Massip A, Dessy F, Donnay I. Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biol Reprod.* 2001;65(4):1127-1134.
- Kaidi, S, Donnay I, Van Langendonck A, Dessy F, Massip A. Comparison of two co-culture systems to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification. *Anim Reprod Sci.* 1998;52(1):39-50.
- Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. Manual of bovine embryo transfer. 1st Ed. Japan. Japan Livestock Technology Association. 1995;243-346.
- Kasai M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci.* 1996;42(1):67-75.
- Kasai M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reprod Med Biol.* 2002;1(1):1-9.
- Kauma SW, Matt DW. Coculture cells that express leukemia inhibitory factor (LIF) enhance mouse blastocyst development in vitro. *J Assist Reprod Genet.* 1995;12(2):153-156.
- Kelly JM, Kleemann DO, Rudiger SR, Walker SK. Effects of grade of oocyte-cumulus complex and the interactions between grades on the production of blastocysts in the cow, ewe and lamb. *Reprod Dom Anim.* 2007;42(6):577-582.
- Khatir H, Lonergan P, Mermillod P. Kinetics of nuclear maturation and protein profiles of oocytes from prepubertal and adult cattle during in vitro maturation. *Theriogenology.* 1998;50(6):917-929.
- Kong IK, Lee SI, Cho SG, Cho SK, Park CS. Comparison of open pulled straw (OPS) vs glass micropipette (GMP) vitrification in mouse blastocysts. *Theriogenology.* 2000;53(9):1817-1826.
- Koo DB, Kang YK, Choi YH, Park JS, Kim HN, Oh KB, Son DS, Park H, Lee KK, Han YM. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol Reprod.* 2002;67:487-492.
- Lane M, Bavister BD, Lyons EA, Forest KT. Containerless vitrification of mammalian oocytes and embryos. *Nat Biotechnol.* 1999;17(12):1234-1236.
- Leibfried-Rutledge ML. Factors determining competence of in vitro produced cattle embryos. *Theriogenology.* 1999;51(2):473-485.
- Leibo SP. Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology.* 2008;69(1):37-47.
- Leibo SP, Loskutoff NM. Cryobiology of in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology.* 1993;39(1):81-94.
- Liebermann J, Nawroth F, Isachenko V, Isachenko E, Rahimi G, Tucker MJ. Potential importance of vitrification in reproductive medicine. *Biol Reprod.* 2002;67(6):1671-1680.

- Lindner GM, Wright Jr, RW. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 1983;20(4):407-416.
- Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod*. 1996;54(6):1420-1429.
- Lorenzo PL, Illera MJ, Illera JC, Illera M. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by the addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J Reprod Fertil*. 1994;101(3):697-701.
- Lovelock JE. The mechanism of the protective action of glycerol against haemolysis by freezing and thawing. *Biochim Biophys Acta*. 1953;11(1):28-36.
- Lu KH, Gordon I, Gallagher M, McGovern H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro. *Vet Rec*. 1987;121(11):259-260.
- Machado GM, Carvalho JO, Caixeta ES, Franco MM, Rumpf R, Dode MAN. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*. 2009;71(8):1289-1297.
- Mahadevan M, Baker G. Assessment and preparation of semen for in vitro fertilization. In: Wood C, Trounson A. Editors, *Clinical In Vitro Fertilization*. Berlin, Springer-Verlag, 1984;83-97.
- Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Dom Anim*. 2001;36(2):49-55.
- Massip A, Van Der Zwalm P, Scheffen B, Ectors F. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. *Anim Reprod Sci*. 1989;19(1):117-129.
- Menezo Y. Cryopreservation of IVF embryos: which stage? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;113:28-32.
- Mucci N, Aller J, Kaiser, GG, Hozbor F, Cabodevila J, Alberio RH. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*. 2006;65(8):1551-1562.
- Nagai T. The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*. 2001;55(6):1291-1301.
- Neira JA, Tainturier D, Peña MA, Martal J. Effect of the association of IGF-I, IGF-II, bFGF, TGF- β 1, GM-CSF, and LIF on the development of bovine embryos produced in vitro. *Theriogenology*. 2010;73(5):595-604.
- Oppenheim JJ, Ruscetti FW, Faltynek C. Cytokines. In: Stites DP, Terr AI, Editors, *Basic and Clinical Immunology*, 7th ed. East Norwalk, 1994;105-123.

- Oshima K, Watanabe H, Yoshihara K, Kojima T, Dochi O, Takenouchi N, Komatsu M. Gene expression of leukemia inhibitory factor (LIF) and macrophage colony stimulating factor (M-CSF) in bovine endometrium during early pregnancy. *Theriogenology*. 2003;60(7):1217-1226.
- Palasz AT, Mapletoft RJ. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnol Adv*. 1996;14(2):127-149.
- Palmer E, Bezard J, Magistrini M, Duchamp G. In vitro fertilization in the horse. A retrospective study. *J Reprod Fertil*. 1990;44:375-384.
- Papaioannou VE, Ebert KM. The preimplantation pig embryo: cell number and allocation to trophectoderm and inner cell mass of the blastocyst in vivo and in vitro. *Development*. 1988;102(4):793-803.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 1995;44(6):859-869.
- Paulson JD, Polakoski KL. A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Fertil Steril*. 1977;28(2):178-181.
- Pieterse MC, Vos PLAM, Kruip TA, Wurth YA, Van Beneden TH, Willemsse AH, Taverne MAM. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1991;35(1):19-24.
- Pinyopummintr T, Bavister BD. Effect of gaseous atmosphere on in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. *Theriogenology*. 1994;41(1):276.
- Pollard JW, Leibo SP. Chilling sensitivity of mammalian embryos. *Theriogenology*. 1994;41(1):101-106.
- Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos. *Nature*, 1985;313:573-574.
- Rall WF. Cryopreservation of oocytes and embryos: methods and applications. *Anim Reprod Sci*. 1992;28(1):237-245.
- Reinhart KC, Dubey RK, Mummery CL, van Rooijen M, Keller PJ, Marinella R. Synthesis and regulation of leukaemia inhibitory factor in cultured bovine oviduct cells by hormones. *Mol Hum Reprod*. 1998;4(3):301-308.
- Rheingantz MGT, Deschamps JC, Dellagostin OA, Pimentel AM, Bernardi ML, Saalfeld MH, Pegoraro LMC. Percoll gradient versus swim-up: effect of sperm preparation method on sex ratio of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*. 2002a;57(1):751.
- Rizos D, Clemente M, Bermejo-Alvarez P, de La Fuente J, Lonergan P, Gutiérrez-Adán, A. Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. *Reprod Dom Anim*. 2008;43(s4):44-50.

- Rizos D, Gutierrez-Adan A, Perez-Garnelo S, De La Fuente J, Boland MP, Lonergan P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biol Reprod.* 2003;68(1):236-243.
- Rizos D, Ward F, Boland MP, Lonergan P. Effect of culture system on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. *Theriogenology.* 2001;56(1):1-16.
- Rosenkranz C, Holzmann A. The influence of semen preparation and culture medium on the success of IVF in cattle. *Zentralbl Veterinarmed.* 1995;42(2):139-143.
- Saeki K, Nagao Y, Hoshi M, Nagai M. Effects of heparin, sperm concentration and bull variation on in vitro fertilization of bovine oocytes in a protein-free medium. *Theriogenology.* 1995;43(4):751-759.
- Sağırkaya H. Değişik gelişim dönemlerde bulunan hibrit fare embriyolarının vitrifikasyon yöntemiyle dondurulması. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Bursa, Doktora Tezi, 2001;5-17.
- Saragusty J, Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction.* 2011;141(1):1-19.
- Schäfer-Somi S. Cytokines during early pregnancy of mammals: a review. *Anim Reprod Sci.* 2003;75(1):73-94.
- Shamsuddin M, Larsson B, Rodriguez-Martinez H. Maturation-related changes in bovine oocytes under different culture conditions. *Anim Reprod Sci.* 1993;31(1):49-60.
- Shaw JM, Kuleshova LL, MacFarlane DR, Trounson AO. Vitrification properties of solutions of ethylene glycol in saline containing PVP, Ficoll, or dextran. *Cryobiology.* 1997;35(3):219-229.
- Sirard MA, Blondin P. Oocyte maturation and IVF in cattle. *Anim Reprod Sci.* 1996;42(1):417-426.
- Sirisathien S, Brackett BG. Effect of insulin-like growth factor-I on development and DNA fragmentation of bovine embryos determined by TUNEL staining. *Theriogenology.* 2002;57:686.
- Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Brackett BG. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development in vitro. *Anim Reprod Sci.* 2003a;77(1):21-32.
- Sirisathien S, Hernandez-Fonseca HJ, Bosch P, Hollet BR, Lott JD, Brackett BG. Effect of leukemia inhibitory factor on bovine embryos produced in vitro under chemically defined conditions. *Theriogenology.* 2003b;59(8):1751-1763.
- Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature.* 1988;336:688-690.

- Smith AU. Behaviour of Fertilized Rabbit Eggs exposed to Glycerol and to Low Temperatures. *Nature*. 1952;170:374-375.
- Smith DK, Treutlein HR. LIF receptor-gp130 interaction investigated by homology modeling: Implications for LIF binding. *Protein Sci*. 1998;7(4):886-896.
- Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*. 1992;359(6390):76-79.
- Stojkovic M, Büttner M, Zakhartchenko V, Brem G, Wolf E. A reliable procedure for differential staining of in vitro produced bovine blastocysts: comparison of tissue culture medium 199 and Menezes's B2 medium. *Anim Reprod Sci*. 1998;50(1):1-9.
- Suthar VS, Shah RG. Bovine in vitro embryo production: an overview. *Vet World*, 2009;2(12):478-479.
- Tekin N, Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi. Alaçam E. Editör, Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon, Sun'i Tohumlama, Doğum ve İnfertilite. Konya. Dizgievi, 1994;67-79.
- Terakawa J, Wakitani S, Sugiyama M, Inoue N, Ohmori Y, Kiso Y, Hondo E. Embryo implantation is blocked by intraperitoneal injection with anti-LIF antibody in mice. *J Reprod Dev*. 2011;57(6):700-707.
- Tervit HR. Development and viability of frozen- thawed cattle embryos. *Theriogenology*. 1981;15(4):395-403.
- Thompson JG. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, 1996;45(1):27-40.
- Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod Biomed On*. 2001;3(1):25-29.
- Tomida M, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hozumi M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J Biol Chem*. 1984;259(17): 10978-10982.
- Tominaga K, Shimizu M, Ooyama S, Izaike Y. Effect of lipid polarization by centrifugation at different developmental stages on post-thaw survival of bovine in vitro produced 16-cell embryos. *Theriogenology*. 2000;53(8):1669-1680.
- Trigal B, Muñoz M, Gómez E, Caamaño JN, Martín D, Carrocera S, Díez C. Cell counts and survival to vitrification of bovine in vitro produced blastocysts subjected to sublethal high hydrostatic pressure. *Reprod Dom Anim*. 2013;48(2):200-206.
- TÜBİTAK,2004,http://www.tubitak.gov.tr/tubitak_content_files/vizyon2023/Vizyon2023_Strateji_Belgesi.pdf,2014.

- Ün, M, Küplülü Ş. Mezbahadan toplanan ovaryumlardan elde edilen sığır oositlerinin in vitro maturasyonu ve fertilizasyonu. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2002;5:209-228.
- Vajta G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Anim Reprod Sci.* 2000;60:357-364.
- Vajta G, Nagy ZP. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod Biomed On.* 2006a;12(6):779-796.
- Vajta G, Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology.* 2006b;65(1):236-244.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev.* 1998;51(1):53-58.
- Vajta G, Korösi T, Du Y, Nakata K, Ieda S, Kuwayama M, Nagy ZP. The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reprod Biomed On.* 2008;17(1):73-81.
- Van Soom A, Boerjan M, Ysebaert MT, de Kruif A. Cell allocation to the inner cell mass and the trophectoderm in bovine embryos cultured in two different media. *Mol Reprod Dev.* 1996;45(2):171-182.
- Van Soom A, Yuan YQ, Peelman LJ, De Matos DG, Dewulf J, Laevens H, de Kruif A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. *Theriogenology.* 2002;57(5):1453-1465.
- Veiga A, Boiso I. Assisted Hatching Textbook of Assisted Reproductive Techniques. *Lab Clinic Perspectives.* 2001;159-169.
- Vejlsted M, Avery B, Gjørret JO, Maddox-Hyttel P. Effect of leukemia inhibitory factor (LIF) on in vitro produced bovine embryos and their outgrowth colonies. *Mol Reprod Dev.* 2005;70(4):445-454.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science.* 1972;178(59):411-4.
- Xu KP, Greve T, Smith S, Hyttel P. Chronological changes of bovine follicular oocyte maturation in vitro. *Acta Vet Scand.* 1985;27(4):505-519.
- Yamanaka M, Amano T, Kudo T. Effect of the presence period of bovine leukemia inhibitory factor in culture medium on the development of in vitro fertilized bovine embryos. *Anim Sci J.* 2001;72:285-290.
- Yang X, Jiang S, Foote RH. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Mol Reprod Dev.* 1993;34(1):94-100.

- Yang X, Kubota C, Suzuki H, Taneja M, Bols PEJ, Presicce GA. Control of oocyte maturation in cows-biological factors. *Theriogenology*. 1998;49(2):471-482.
- Younis AI, Keskinetepe L, Simplicii AA, Gould, K, Brackett BG. Effects of EGTA and cytochalasin-B during freezing and vitrification of immature and mature bovine and rhesus monkey (M. Mulatta) oocytes. *Theriogenology*. 1997;47(1):361.
- Younis AI, Brackett BG, Fayer-Hosken RA. Influence of serum and hormones on bovine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Gamete Res*. 1989;23(2):189-201.
- Zhu SE, Zeng SM, Yu WL, Li SJ, Zhang ZC, Chen YF. Vitrification of in vivo and in vitro produced ovine blastocysts. *Anim Biotechnol*. 2001;12(2):193-203.

Ek-1 Manipülasyon Medyumu (10 ml Final Volüm için)

Kimyasal Madde	Katalog No	Miktar
TCM-199	Sigma M-7528	9900 µl
Penicilin/Streptomycin	Sigma P-0781	100 µl (%1 v:v)
L-Glutamine	Sigma G-3126	1 mg (0,1g/L)

Ek-2 Maturasyon Medyumu (10 ml Final Volüm için)

Kimyasal Madde	Katalog No	Miktar
TCM-199	Sigma M-4530	4860 µl
Na-Pruvat	Sigma P-4562	25 µl (5,5mg/ml)
PSA	Sigma A-5955	50 µl
LH	Sigma L-9773	20 µl
FSH	Sigma F-2293	20 µl
EGF	Sigma E-9644	25 µl
F İ L T R A S Y O N		

Ek-3 Fertilizasyon Stok Medyumu (100 ml Final Volüm için)

Kimyasal Madde	Katalog No	Miktar
Water	Sigma W-1503	100 ml
NaCl	Sigma S-5886	666 mg
KCl	Sigma P-5405	23,8 mg
NaHCO ₃	Sigma S-5761	209 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Sigma S-9638	6,2 mg
Pen/Strep	Sigma P-0781	100 µl (%1 v:v)
Phenol Red	Sigma P-0290	1 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma C-7902	30 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma M-2393	10 mg
Na-lactate	Sigma L-7900	112 µl
F İ L T R A S Y O N		
<i>Kullanım günü 5 ml için</i>		
Fert Stok	-	5 ml
BSA(FAF)	Sigma A-6003	30 mg
NaPruvat	Sigma P-4562	50 µl (2,2mg/ml)
Pen/Strep	Sigma P-0781	5 µl (%1 v:v)
Heparin	Sigma H-3149	300 µl (2 µg/ml)
F İ L T R A S Y O N		

Ek-4 Sperm Yıkama Medyumu (100 ml Final Volüm için)

Kimyasal Madde	Katalog No	Miktar
Water	Sigma W-1503	100 ml
NaCl	Sigma S-5886	584 mg
KCl	Sigma P-5405	23 mg
NaHCO ₃	Sigma S-5761	210 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Sigma S-9638	4 mg
Pen/Strep	Sigma P-0781	100 µl (%1 v:v)
Phenol Red	Sigma P-0290	1 mg
Hepes	Sigma H-6147	238 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma C-7902	31 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma M-2393	8 mg
Na-lactate	Sigma L-7900	368 µl
F İ L T R A S Y O N		
<i>Kullanım günü 10 ml için</i>		
SP Stok	-	10 ml
BSA(FAF)	Sigma A-6003	30 mg
NaPruvat	Sigma P-4562	100 µl (2,2mg/ml)
Pen/Strep	Sigma P-0781	10 µl (%1 v:v)
F İ L T R A S Y O N		

Ek-5 Percoll 10X Solüsyonu (100 ml Final Volüm için)

Kimyasal Madde	Katalog No	Miktar
Deiyonize-bidistile H ₂ O	-	100 ml
NaCl	Sigma S-5886	4675 mg
KCl	Sigma P-5405	230 mg
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	Sigma S-9638	35 mg
Hepes	Sigma H-6147	2380 mg

Ek-6 Percoll %90 Solüsyonu (50 ml Final Volüm için)

Kimyasal Madde	Katalog No	Miktar
Percoll	Sigma P-4937	45 ml
Percoll 10X	-	5 ml
CaCl ₂	Sigma C-7902	14,5 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma M-2393	4 mg
NaHCO ₃	Sigma S-5761	104,5 mg
Na-Lactate	Sigma L-7900	184 µl

Ek-7 Kùltür Medyumu (SOF) stok (50 ml Final Volùm için)

Kimyasal Madde	Katalog No	Miktar
Water	Sigma W-1503	50 ml
NaCl	Sigma S-5886	314,7 mg
KCl	Sigma P-5405	26,7 mg
KH ₂ PO ₄	Sigma S-3397	8,1 mg
NaHCO ₃	Sigma S-5761	105,3 mg
Pen/Strep	Sigma P-0781	500 µl (%1 v:v)
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma C-7902	12,5 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma M-2393	5 mg
NaPruvat	Sigma P-4562	1,8 mg
Na-lactate	Sigma L-7900	14 µl
F İ L T R A S Y O N		
<i>Kullanım günü 5ml için</i>		
SOF Stok	-	4,542 ml
Pen/Strep	Sigma P-0781	5 µl (%1 v:v)
NaPruvat	Sigma P-4562	50 µl (2,2mg/ml)
BSA(FAF)	Sigma A-6003	30 mg
F İ L T R A S Y O N		

Ek-8 Temel Solüsyon (1 L Final Volüm için)

Kimyasal Madde	Katalog No	Miktar
Water	Sigma W-1503	1 L
NaCl	Sigma S-5886	8 g
KCl	Sigma P-5405	200 mg
KH ₂ PO ₄	Sigma S-3397	200 mg
Na ₂ HPO ₄	Sigma S-9638	1,150 g
Pen/Strep	Sigma P-0781	1 ml (% 1 v:v)
CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma C-7902	100 mg
MgCl ₂ .6H ₂ O	Sigma M-2393	100 mg
NaPruvat	Sigma P-4562	36 mg
D+Glukoz	Sigma G-7021	1 g
F İ L T R A S Y O N		
<i>Kullanım günü 100ml için</i>		
T.Sol Stok	-	80 ml
FCS	Sigma F-9665	20 ml
NaPruvat	Sigma P-4562	3,3 mg (0,3 M)
Glikoz	Sigma G-7021	99,11 mg (5,5 M)
F İ L T R A S Y O N		

Ek-9 Vitrifikasyon Solüsyonları VS1-2-3 (50 ml Final Volüm için)

Kimyasal Madde	Katalog No	Miktar		
		VS-1	VS-2	VS-3
Gliserol	Sigma G-5516	5 ml	5 ml	10 ml
Etilen Glikol	Sigma 324558	-	5 ml	10 ml
Sükroz	Sigma S-1888	1,7115 g	3,4230 g	5,1345 g
Ksiloz	Sigma X-1500	0,7507 g	1,5013 g	2,2520 g
Polietilen Glikol	Sigma 88440	0,5 g	1 g	1,5 g
Temel Solüsyon	-	50 ml tamamla	50 ml tamamla	50 ml tamamla

Ek-10 Sükroz Solüsyonları S1-2 (5 ml Final Volüm için)

Kimyasal Madde	Katalog No	Miktar	
		S-1 (0,25 M)	S-2 (0,5 M)
Sukroz	Sigma S-1888	0,427 g	0,856 g
Temel Solüsyon	-	5 ml tamamla	5 ml tamamla

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Alper KOÇYİĞİT

Doğum Yeri: Merzifon

Doğum Tarihi: 14.03.1983

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama AD. Doktora Programı (2014), Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2006)

Çalıştığı Kurumlar: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama AD. Araştırma Görevlisi

E-posta: vhalper@gmail.com