

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BLASTOSİST SIVISI ASPIRASYONUNUN İN VİTRO  
SIĞIR EMBRİYOLARINDA DONDURMA SONRASI  
VİYABİLİTEYE ETKİSİ**

Gökçe ONUR ÜNAL

DOĞUM VE JİNEKOLOJİ ANABİLİM DALI  
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ

Bu araştırma TÜBİTAK'ın 2015 yılı 2. dönem 2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası  
Araştırma Burs Programı ile desteklenmiştir.

ANKARA

2017

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Blastosist Sıvısı Aspirasyonunun İn Vitro Sığır Embriyolarında Dondurma Sonrası Viyabiliteye Etkisi” başlıklı tez, bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Gökçe ONUR ÜNAL

Tarih: 05.07.2017

İmza:

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalında  
Gökçe ONUR ÜNAL tarafından hazırlanan  
“Blastosist Sıvısı Aspirasyonunun İn Vitro Sığır Embriyolarında Dondurma Sonrası  
Viyabiliteye Etkisi” adlı tez çalışması  
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 19.07.2017

Prof. Dr. Tayfur BEKYÜREK  
Erciyes Üniversitesi  
Jüri Başkanı

Prof. Dr. M. Rifat MURAL  
Ankara Üniversitesi  
Raportör

Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ  
Ankara Üniversitesi  
Üye

Prof. Dr. Ergün AKÇAY  
Ankara Üniversitesi  
Üye

Doç. Dr. Duygu Baki ACAR  
Afyon Kocatepe Üniversitesi  
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza

Prof. Dr. Mehmet AKAN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür V.

## İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller	xiii
Çizelgeler	xv
Grafikler	xvii
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. İn Vivo Embriyo Gelişimi	3
1.1.1. Oosit Maturasyonu	3
1.1.1.1. Germinal Vezikülün Parçalanması ve Nükleer Maturasyon	8
1.1.1.2. Sitoplazmik Maturasyon	9
1.1.2. Fertilizasyon	10
1.1.3. İmplantasyon Öncesi Embriyo Gelişimi	11
1.1.3.1. Embriyoların Gelişimlerinin ve Kalitesinin Değerlendirilmesi	13
1.2. İn Vitro Embriyo Üretimi	15
1.2.1. İn Vitro Maturasyon	16
1.2.2. İn Vitro Fertilizasyon	20
1.2.3. İn Vitro Embriyo Kültürü	22
1.3. Sığır Embriyolarının Dondurularak Saklanması	25
1.3.1. Kriyoprotektanlar	26
1.3.1.1. Hücre İçine Penetre Olabilen Kriyoprotektanlar	26

1.3.1.2. Hücre İçine Penetre Olmayan Kriyoprotektanlar	27
1.3.2. Dondurma Yöntemleri	27
1.3.2.1. Yavaş Dondurma	27
1.3.2.1.1. Direkt Transfer Yöntemi İle Embriyoların Dondurulması	30
1.3.2.2. Vitrifikasyon	31
1.3.2.3. Hızlı Soğutma Sistemleri	33
1.4. Dondurulan Sığır Embriyolarının Çözdürülmesi	34
1.5. Dondurma Öncesinde Embriyolardan Blastosist Sıvısının Uzaklaştırılması (Suni Kollaps-AC-AS)	36
1.5.1. Blastosist Sıvısının Aspirasyonu	38
1.5.2. Lazer Kullanımı	39
1.5.3. İğne Punksiyonu	40
1.5.4. Pipet Kullanımı	41
1.5.5. Ozmotik Daralma	42
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	44
2.1. Ovaryumların Toplanması	44
2.2. Oosit Eldesi	44
2.3. İn Vitro Oosit Maturasyonu	46
2.4. İn Vitro Fertilizasyon İçin Spermanın Hazırlanması	47
2.5. İn Vitro Fertilizasyon	48
2.6. Fertilizasyondan Sonra Oositlerin Yıkılması	48
2.7. İn Vitro Embriyo Kültürü	49
2.8. Blastosistlerin Morfolojik Derecelendirilmesi	50
2.9. Embriyoların Gruplandırılması	51
2.10. Blastosöl Sıvısının Aspirasyonu	52
2.11. Embriyoların Dondurularak Saklanması	54

2.11.1. Yavaş Dondurma Yöntemi	55
2.11.2. Vitrifikasyon Yöntemi	56
2.12. Embriyoların Çözdürülmesi ve Çözdürme Sonrası Gelişim Kabiliyetlerinin Belirlenmesi	58
2.12.1. Yavaş Dondurma Yöntemiyle Dondurulan Embriyoların Çözdürülmesi	59
2.12.2. Vitrifikasyon Yöntemiyle Dondurulan Embriyoların Çözdürülmesi	60
2.13. Sonuçların Değerlendirilmesi	61
<b>3. BULGULAR</b>	62
<b>4. TARTIŞMA</b>	70
<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	79
<b>ÖZET</b>	81
<b>SUMMARY</b>	82
<b>KAYNAKLAR</b>	83
<b>EKLER</b>	94
<b>Ek-1. Etik Kurul Kararı</b>	94
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	95

## ÖNSÖZ

Dünyada ve ülkemizde sığır üretiminin et ve süt yönünden oldukça önemli bir yeri bulunmaktadır. Gün geçtikçe artan nüfus ile birlikte sığırlardan elde edilen verimin artırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle sığırlarda elde edilen verimin artırılmasına yönelik biyoteknolojik yöntemlerin kullanımı her geçen gün artmaktadır. Bu amaçla; embriyoların transferi, in vitro embriyo üretimi-IVP, embriyoların dondurulması ve embriyoların manipülasyonları gibi yöntemlerle birlikte, klonlama, splitting, cinsiyet tayini, preimplantasyon genetik tanı (PGD) gibi ileri biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır. Sığır embriyolarının in vitro üretimi ile verimi yüksek olan kaliteli anne ve babadan fazla sayıda embriyo elde edilebilmektedir.

Embriyoların dondurularak saklanması ile hem genetik materyalin depolanması hem de dondurulan embriyoların uzak mesafelere transfer edilmesi mümkün hale gelmektedir. Günümüzde in vitro elde edilen embriyoların dondurulması için birçok yöntem geliştirilmiş ve geliştirilmekte olsa da henüz çözdürme sonrası canlılık başarısı in vivo olanlara yetişememiştir. Dondurma sırasında meydana gelen ve dondurmayı olumsuz yönde etkileyen buz kristali oluşumu ve embriyoların toksik karakterdeki kriyoprotektan ajanlara (CPA) maruz kalması bunun sebepleri arasında yer almaktadır. Embriyonun blastosöl çapı genişledikçe dondurmaya olan hassasiyeti artmaktadır. Dondurma öncesinde çeşitli yöntemlerle blastosölün uzaklaştırılmasıyla (*artificial collapse-AC- artificial shrinkage-AS*) çözdürme sonrası viyabilitenin artabileceği insan IVF laboratuvarlarında yapılan çalışmalarla belirtilmiştir. *Artificial collapse* için hipertonic solüsyonlar kullanılarak ozmotik daralma sağlanması, iğne punksiyonu, lazer atışı ve blastosist sıvısının aspirasyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler arasında blastosist sıvısının aspirasyonu ile elde edilen blastosölden implantasyon öncesinde genetik tanı yapılabilme olasılığı yine ilk olarak insan IVF laboratuvarlarında belirlenmiştir. Bu alanda insanlarda yapılan çalışma sayısı oldukça fazla olmasına rağmen sığırlarda *artificial collapse* yöntemi henüz laboratuvarlarda rutin hale gelememiştir. Bu çalışma ile in vitro sığır embriyolarının dondurma tekniklerine blastosist sıvısının

aspirasyonunun eklenmesi ile çözdürme sonrası viyabilite başarısının artırılması ve elde edilen sonuçların Türkiye'deki diğer bilimsel çalışmalara hem öncü olabileceği hem de katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Doktora eğitimim süresince akademik bilgilerinden yararlandığım ve Japonya'ya gitmemde bana yol gösteren, destekleyen ve yanımda olan danışman hocam Prof. Dr. Mustafa KAYMAZ'a ve Ankara Üniversitesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üye ve yardımcılarına teşekkür ederim. Japonya'da tez çalışmamı gerçekleştirirken bana hem akademik hem de sosyal yaşamda hep destek olan teorik-pratik bilgilerinden yararlandığım ve oradayken çalışmamı tamamlamama yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Kei IMAI'ye şükranlarımı sunar ve teşekkür ederim.

Yaşamım boyunca ve doktora eğitimim sürecinde her daim yanımda olan ve bütün zorluklarda beni destekleyip moral sağlayan, sevgili annem Sibel ONUR ve sevgili babam Ali ONUR'a, kardeşim Göksu ONUR'a ve sevgili eşim İsmail ÜNAL'a teşekkür ederim. Ayrıca eğitim-öğretim hayatımda bana değer veren yanımda olan tüm aileme ve dostlarıma şükranlarımı sunarım. Tez çalışmam sırasında ve doktora eğitimim sürecinde hem yurtdışında hem de Türkiye'de her daim yanımda olan beni destekleyen, içinde bulunduğum durumlardan çıkmak için her zaman daha iyi yolların varlığını gösteren ve sevginin sevilmenin değerini hissettiren Veteriner Hekim Murat ULUDAĞ'a şükranlarımı sunar teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmam TÜBİTAK'ın 2015 yılı 2. dönem "2214/A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı" ile desteklenmiştir. Vermiş olduğu destek için TÜBİTAK'a teşekkür ederim.



## SİMGELER VE KISALTMALAR

AC	<i>Artificial Collapse</i>
ART	Yardımcı üreme teknikleri
AS	<i>Artificial Collapse</i>
ATPaz	Adenozin trifosfataz
$\beta$ -ME	Beta-merkaptöetanol
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BL	Blastosist
BMP-15	Kemik morfogenetik proteini-15
BMP-6	Kemik morfogenetik proteini-6
BO	Brackett ve Oliphant
BO-IVC	BO-in vitro kültür solüsyonu
BO-IVM	BO-in vitro maturasyon solüsyonu
BSA	Sığır serum albümin
Ca	Kalsiyum
cAMP	Siklik adenozin 3',5' monofosfat
cGMP	Siklik guanozin 3',5' monofosfat
CLA	Trans-10, cis-12 konjuge linoleik asit
CPA	Kriyoprotektan madde
CR1	<i>Charles Rosenkrans 1</i> solüsyonu
CR1aa	Aminoasitli <i>Charles Rosenkrans 1</i> solüsyonu
CS	Buzağı serumu
D-PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline Solüsyonu
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit

EG	Etilen glikol
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EM	Elektron mikroskop
ET	Embriyo transferi
ETB	Embryo Trans Biotech
Exp Bl	Ekspanded blastosist
FA	Folik asit
FBC	<i>Forced blastocoel collapse</i>
FCS	Fetal buzağı serumu
FF	Foliküler sıvı
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FSH	Folikül uyarıcı hormon
G	Gauge
g	Gram
GL	Gliserol
GDF-9	Büyüme farklılaşma faktörü-9
GESXB	Gliserol - Etilen Glikol - Sukroz - Xylose - BSA
GH	Büyüme faktörü
GV	Germinal vezikül
GVBD	Germinal Vezikülün Parçalanması
Ham's F10a	Ham'ın solüsyonu
hMG	İnsan menopozal gonadotropini
ICM	İç hücre kümesi
ICSI	İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu
IETS	Uluslararası Embriyo Teknolojisi Topluluğu
IGF	İnsulin-benzeri büyüme faktörleri

IP3	İnositol-1, 4, 4-trifosfat
IVC	İn vitro embriyo kültürü
IVP	İn vitro embriyo üretimi
KOK	Kumulus oosit kompleksi
KSOM	<i>Potassium simplex optimization medium</i>
KSOMaa	<i>Potassium simplex optimization medium with aminoacid</i>
L	Litre
LAA	Linoleik asit albümin
LH	Lüteinleştirici hormon
LN <sub>2</sub>	Likit nitrojen
M-199	Doku kültür medyum 199
MAPK	Mitojenle aktive protein kinaz
m-PBS	Modifiye D-PBS
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
M	Molarite
µl	Mikrolitre
MPF	<i>Maturation promoting factor</i> - Olgunlaşmayı teşvik eden faktör
mRNA	Maternal mesajcı RNA
NaCl	Sodyum Klorür
nl	Nanolitre
OPU	<i>Ovum pick-up</i>
OSF	Oosit salgılanan faktörler
OWS	Oosit yıkama solüsyonu
PB	Kutup cisimciği

PBS	<i>Phosphate-buffered saline supplemented</i>
PDE3A	Fosfodiesteraz 3A
PEG	Polietilen glikol
PG	Propilen glikol
PVP	polivinilprolidon
RNA	Ribo nükleik asit
ROS	Reaktif oksijen türlerinin
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
SCNT	Somatik hücre nükleer transferi
SDS	Sperm Dilüsyon Solüsyonu
SOF	Sentetik ovidukt sıvısı
SOFaa	Sentetik ovidukt sıvısı aminoasit
SPSS	İstatistik paket programı
SSV	<i>Solid surface vitrification</i>
SWS	Sperm yıkama solüsyonu
TALP	Tyrodi'nin albumin laktat piruvat
TE	Trofektoderm
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor-beta</i>
WOW	<i>Well of the Well</i>
Xyl	<i>Xylose</i>
ZP	Zona pellusida
ZP3	ZP'nin glikoprotein bileşeni

## ŞEKİLLER

Şekil.1.1. Oogenezinin adımları	4
Şekil.1.2. Sığır oositi	5
Şekil 1.3. Oosit maturasyonu ve fertilizasyonu	9
Şekil 1.4. Erkek ve dişi pronükleusu (Singami)	11
Şekil 1.5. İmplantasyon öncesi embriyo gelişim aşamaları	12
Şekil 1.6 IETS'ye göre embriyo sınıflandırılması	14
Şekil 1.7. IVP sığır blastosist ve ekspanded blastosistler	15
Şekil 1.8. İn vitro maturasyon öncesinde oositlerin kalitelerine göre gruplandırılması	18
Şekil 1.9. IVM damlaları içerisindeki KOK'lar	19
Şekil 1.10. IVM damlaları	20
Şekil 1.11. a. İn vitro maturasyon kültürünün 48. saati b. 6 hücreli embriyo	23
Şekil 1.12. Embriyo kültürün 7. gününde elde edilen embriyolar	23
Şekil 1.13. Yavaş Dondurma Protokolü	29
Şekil 1.14. Yavaş dondurma protokolünde embriyoların payetlere alınması	29
Şekil 1.15. Blastosist yapısı	36
Şekil 1.16. Blastosöl sıvısının aspirasyonu	38
Şekil 1.17. Blastosist sıvısının aspirasyonu	39
Şekil 1.18. AC sonrası insan ekspanded blastosistlerin elektron mikroskop (EM) grid ile dondurulup çözülmesi	40
Şekil 1.19. AC uygulanan insan ekspanded blastosistlerin dondurulması ve çözülmesi	41
Şekil 1.20. AC yapılan insan ekspanded blastosistleri	43
Şekil 2.1 Folikül sıvısı aspirasyonu	45
Şekil 2.2. <i>Laminal flow</i> içerisindeki stereo mikroskoplar ve yıkamada kullanılan petri kapları	45
Şekil 2.3 Oositlerin in vitro maturasyonu	46

<b>Şekil 2.4.</b> IVF sonrası zigotlar	50
<b>Şekil 2.5.</b> IVC kültürün 7. günü embriyolar	50
<b>Şekil 2.6.</b> Blastosist sıvısının aspirasyonu	53
<b>Şekil 2.7.</b> Embriyo aspirasyonu öncesi ve sonrası	54
<b>Şekil 2.8.</b> Programlanabilir dondurma cihazı	56
<b>Şekil 2.9.</b> Dondurma solüsyonlarına transfer edilen embriyolar	57
<b>Şekil 2.10.</b> Saito'ın (1994) belirttiği şekilde embriyonun payete yüklenmesi	57
<b>Şekil 2.11.</b> Embriyoların vitrifikasyon yöntemi ile dondurulması	58
<b>Şekil 2.12.</b> Yavaş dondurma yöntemiyle dondurulan embriyoların çözündürülmesi	60
<b>Şekil 2.13.</b> Embriyoların çözündürülme düzeneği	61
<b>Şekil 3.1.</b> IVF sonrası 27-31. saatlerde bölünmeler	64
<b>Şekil 3.2.</b> IVF sonrası 51-55. saatlerde bölünmeler	64
<b>Şekil 3.3.</b> IVF sonrası elde edilen iyi kalite a) blastosist ve b) ekspanded blastosistler	65
<b>Şekil 3.4.</b> IVF sonrası a. dejenere zigotlar b. UFO ve c. Sağlıksız blastosist ve ekspanded blastosistler	65
<b>Şekil 3.5.</b> a. Vitrifikasyon Yöntemi a1. Aspirasyon öncesi ekspanded blastosist a2. Aspirasyon sonrası ekspanded blastosist b. Yavaş dondurma yöntemi b1. Aspirasyon öncesi ekspanded blastosist b2. Aspirasyon sonrası ekspanded blastosist	69

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge. 1.1.</b> IETS' ye göre embriyoların sınıflandırılması	13
<b>Çizelge. 1.2.</b> Sığır oositlerinin herbir nükleer evrede geçirdikleri ortalama süre (0. Saat in vitro maturasyonun başlangıcıdır)	17
<b>Çizelge 1.3.</b> Farklı kültür solüsyonlarında IVF sonrası sığır embriyolarının blastosist oranları	24
<b>Çizelge 2.1.</b> İn Vitro Maturasyon Solüsyonu Hazırlanması	46
<b>Çizelge 2.2.</b> %90 Percoll Gradient Solüsyonunun Hazırlanması	47
<b>Çizelge 2.3.</b> %45 Percoll Gradient Solüsyonunun Hazırlanması	48
<b>Çizelge 2.4.</b> 10X Sperm TL Stok Solüsyonunun Hazırlanması	48
<b>Çizelge 2.5.</b> İn vitro kültür solüsyonunun hazırlanması	49
<b>Çizelge 2.6.</b> Grupların oluşturulması ve çalışma akışı	51
<b>Çizelge 2.7.</b> İyi kaliteli blastosist/ekspanded blastosistlerin gruplandırılması	52
<b>Çizelge 2.8.</b> Dondurma Protokolü	55
<b>Çizelge 2.9.</b> Modifiye D-PBS + %20 FCS solüsyonu hazırlanması	56
<b>Çizelge 2.10.</b> Yavaş dondurma solüsyonunun hazırlanması	56
<b>Çizelge 2.11.</b> Vitrifikasyon Solüsyonları	58
<b>Çizelge 2.12.</b> β-ME stok solüsyonu hazırlanması	59
<b>Çizelge 2.13.</b> Çözdürme sonrası kültür solüsyonunun hazırlanması	59
<b>Çizelge 2.14.</b> Vitrifikasyon Çözdürme Solüsyonları	61
<b>Çizelge 3.1.</b> Zigotların cleavage kontrolü	62
<b>Çizelge 3.2.</b> Blastosist/ekspanded blastosistlerin cleavage kontrolü	63
<b>Çizelge 3.3.</b> Çözdürülen embriyoların 24-48-72. saatlerdeki yapılan kontrol sonrasındaki toplam hatched oranları	66
<b>Çizelge 3.4.</b> Çözdürülen embriyoların 7 gün takibi sonrasındaki hatched oranları	66
<b>Çizelge 3. 5.</b> Çözdürme sonrasında 24., 48. ve 72. saatlerde blastosist ve ekspanded blastosistlerin viyabilite oranları	67

**Çizelge 3. 6.** Çözdürme sonrasında 7 gün süre takibi sonrasında blastosist ve ekspanded blastosistlerin viyabilite oranları

67





## GRAFİKLER

<b>Grafik 3.1.</b> Zigotların cleavage kontrolü	63
<b>Grafik 3.2.</b> Elde edilen blastosist/ekspanded blastosist oranı	63
<b>Grafik 3.3.</b> Çözdürme sonrasında gruplara göre embriyoların 72. saatteki hatched ve non-hatched oranı	68
<b>Grafik 3.4.</b> Çözdürme sonrasında gruplara göre embriyoların 7 gün sonraki hatched ve non-hatched oranı	68



## 1. GİRİŞ

Günümüzde hayvancılık sektöründe bir taraftan teknoloji gelişirken bir taraftan da üretim açığı artmaktadır. Bu yüzden ihtiyaç duyulan ürünün kaliteli bir şekilde elde edilmesi istenmektedir. Adı geçen ihtiyaçlar; genetiği geliştirilmiş elit ırkların elde edilmesi, sığırlarda et ve süt verimi ya da kombine ırkların üretilmesi, bazı hastalıklara karşı dirençli hayvan yetiştirilmesi, ilaç sektöründe kullanılması için özel protein ve genlerin elde edilmesi örnek olabilir (Kaymaz, 2012). Hayvanlara uygulanan seleksiyon ve ıslah yöntemleri sayesinde kaliteli süt ve et üretimi yapılabilmektedir. Dünyada son 20 yılda ticari olarak yerini alan Embriyo Transfer (ET) uygulamalarının artması ıslah çalışmalarının hızını artırarak başarı şansını yükseltmiştir. Günümüzde üreticinin isteği doğrultusunda, ileri biyoteknolojik yöntemler kullanılarak (embriyonik cinsiyetin belirlenmesi, klonlama ve transgenik üretim gibi) embriyo üretimi yapılabilmektedir (Kaymaz ve ark., 2015).

Sağlıklı fertil bir kadının reproduktif hayatı boyunca ortalama 400 adet oositi ovule olurken (Gougeon, 1996), özellikle inek gibi gebelik ve laktasyon baskısı nedeniyle üretim ömrü nispeten kısa olan çiftlik hayvanlarında ise bu sayı daha da düşmektedir. Canlı yavrular elde edilmesi için atreziye giden oositlerin kurtarılma olasılığı, hem infertil çiftler hem de hayvansal üretim sistemleri için büyük faydalar sağlamaktadır (Lonergan ve Fair, 2016). Süperovulasyon yöntemi ile in vivo embriyo üretiminde bir ineğin reproduktif hayatı boyunca 100'den az sayıda embriyo elde edilirken ovaryumlarda yaklaşık olarak 100000 gamet bulunmaktadır (Hashimoto; 2009). Yıllardır sığır endüstrisine olan ilginin çoğalması, genetik gelişmelerin hızını artırarak, in vitro embriyo üretimi (IVP) ve *ovum pick-up* (OPU) uygulamalarının geliştirilmesini sağlamıştır (Zullo ve ark., 2016).

İmplantasyon öncesi dönemde embriyoların dondurulması, sığır embriyo transfer endüstrisinin önemli bir parçasıdır. Dondurma, taze embriyoların transfer edilemediği ya da istenmediği durumlarda ve genetik kaynakları korumak için çoğu türde oldukça etkili olmaktadır. Aynı zamanda genetik yapıların bir coğrafyadan başka

bir coğrafyaya taşınmasında da etkili bir yoldur (Barfield, 2014; Hinrichs ve Choi, 2016).

Son on yılda sığır endüstrisinde genetiğin iyileştirilmesi amacıyla in vitro embriyo üretim teknolojisinin hızla gelişmesine rağmen, IVP embriyolarının transfer sonrası gebelik oranları in vivo üretilen embriyolardan daha düşüktür (Nishisouzu ve ark., 2017). IVP embriyolar, daha yüksek apoptotik hücre dizinine sahip olmakla birlikte kriyotoleransları ve iç hücre kümesi (ICM) / trofektoderm (TE) oranları in vivo olanlara göre daha düşüktür (Zullo ve ark., 2016). Sığır embriyo üretiminin sorunlarından biri de benzer biçimde in vitro üretilen embriyoların kriyotoleransının in vivo üretilenlere oranla daha düşük olmasıdır (Nunes ve ark., 2014; Schefer ve ark., 2016). Dondurma sırasında hücre dışı ve hücre içinde buz kristallerinin oluşumu, trofektoderm hücreleri arasındaki bağlantılarda hasara ve zona pellusida da yırtıklara neden olmaktadır. Aynı zamanda hücre içerisinde; mitokondri membranı ve kristada, nükleer ve plazma membranında ve sitoplazmada hasarlara sebep olmaktadır. Bu durum toplam hücre sayısının azalmasına, ICM'nin ölümüne ve hücrel artıkların perivitellin boşlukta birikmesine yol açar (Kaidi ve ark., 2001). Bu sebeplerden dolayı yüksek gebelik oranları elde etmek için embriyo dondurma metotlarının geliştirilmesi gerekmektedir (Inaba ve ark., 2011).

İnsan embriyolarında *cryoloop* tekniği kullanılarak yapılan vitrifikasyon çalışmalarında çözme sonrası canlılık oranı, blastosistin gelişim evresine bağlı olup, blastosölün ekspansiyonu (genişlemesi) ile ters orantılı olduğu bildirilmiştir (Mukaida ve ark., 2003). Vanderzwalmen ve ark. (2002)'nin yaptıkları bir çalışmada, trofektoderme bir iğne yardımı ile açılan küçük bir deliğin blastosölde daralmaya (kollapsa) sebep olduğu belirtilmiştir. Vitrifikasyon öncesinde blastosist kavitesinin suni olarak kollabe edilmesi, dondurma sonrasında sığır embriyolarının canlılık oranlarının artırılmasında alternatif bir yöntemdir (Nunes ve ark., 2014). Böylece, blastosöl hacminin azalması ile buz kristali oluşumunun azalması için şans oluşmakta ve çözme sonrası canlılık oranı artabilmektedir. Bu durum vitrifikasyon ya da yavaş dondurma yöntemi ile dondurulan embriyolar için avantaj sağlamaktadır (Barfield, 2014). Blastosist kavitesinin kollapsı mekanik ya da mekanik olmayan

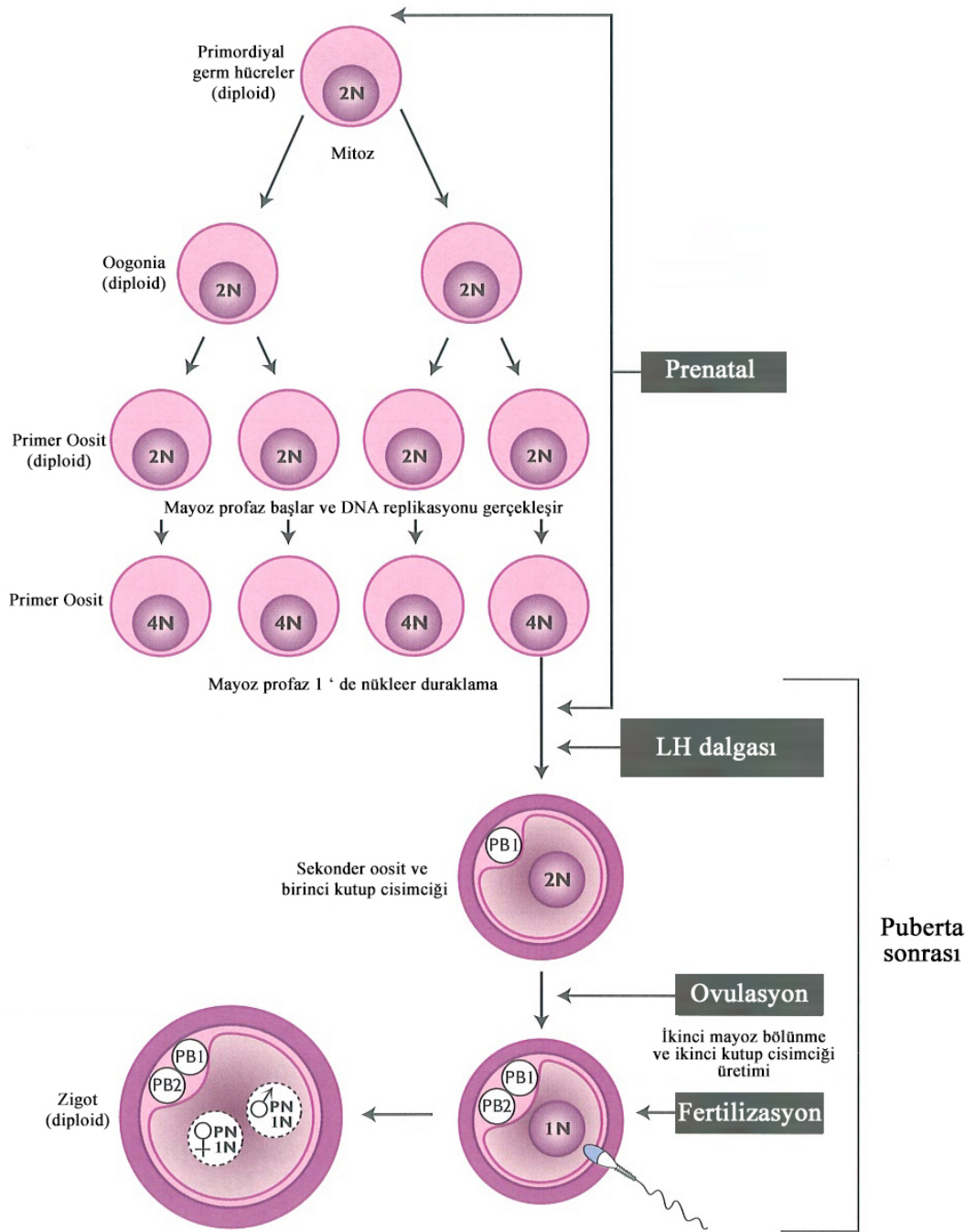
yöntemlerle iğne ve sukroz içeren hiperozmotik solüsyonlar gibi teknikler kullanılarak yapılabilmektedir (Nunes ve ark., 2014).

## 1.1. İn Vivo Embriyo Gelişimi

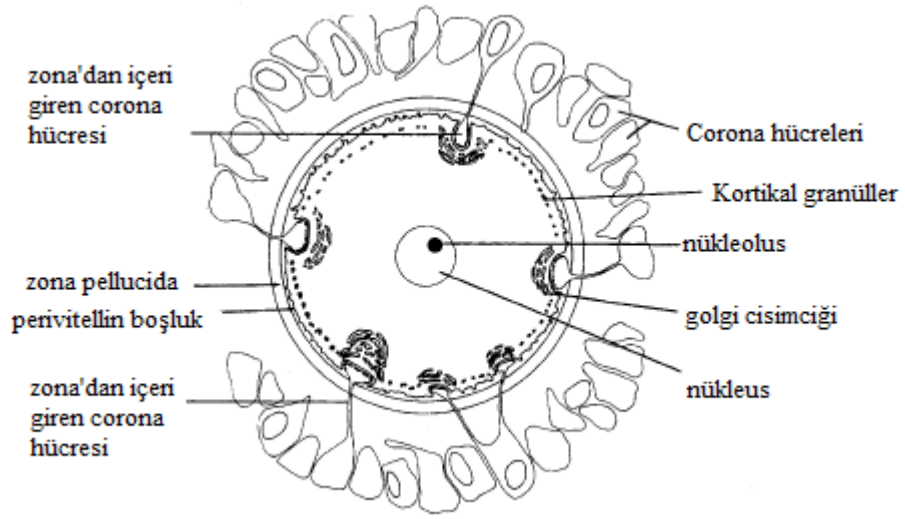
### 1.1.1. Oosit Maturasyonu

Prenatal gelişim sırasında, oogonia mitozise uğrayarak primordiyal hücreden diploid oosite dönüşmektedir. Bu diploid hücre mayoz I'e girmekte ve haploid oositi oluşturarak zigot meydana getirmek için haploid spermatozoon ile fertilize olabilmektedir. Sığırlarda doğumdan kısa süre önce oositler ilk mayotik bölünmenin Profaz aşamasında durmakta ve ovulasyon öncesinde gonadotropin dalgası ile mayoz yeniden başlamaktadır (Şekil 1.1) (Bilodeau-Goeseels, 2012; Moussa ve ark., 2015).

Oositin yüzey alanı ve hacim oranı düşük olup diğer hücelere göre daha büyük bir yapıdadır. Etrafi zona pellusida (ZP) ile sarılıdır ve granuloza hücrelerinin birkaç katmanı kumulus oosit kompleksi (KOK)'ni oluşturur. Corona radiata hücreleri oositin yakınında yer alır, ZP'ye penetre olur ve sitoplazma içerisine uzantılar göndererek oosit membranında bombeli bir şişkinlik (*bulbus*) ile son bulur. Bu işlev ve *gap junction*'ların varlığı, oositin büyüme evresinde kumulus hücreleri ve oosit arasındaki metabolik işbirliğinde oldukça önemli rol oynamaktadır (Şekil 1.2) (Van Soom ve ark., 2002; Massip, 2003). Kumulus hücrelerinin görevlerinden biri de, çeşitli metabolit ve beslenme faktörlerinin oositin içerisine yönlendirerek germinal vezikül parçalanması (GVBD)'a yardımcı olmaktır (Loneragan ve Fair, 2016).



**Şekil 1.1.** Oogenezin adımları. 2N, diploid; N, haploid; PB1, birinci kutup cisimciği; PB2, ikinci kutup cisimciği; PN, pronükleus (Senger, 2005a).



Şekil 1.2. Sığır oositi (Kaymaz, 2012).

Memelilerde neonatal dönemde, ovaryumlarda binlerce primordiyal folikül bir havuz oluşturmakta ve her gün yeni bir folikül primer folikül gelişimi için bu havuzdan ayrılmaktadır. Bu havuzdaki primordiyal foliküllerin çok azı ovulasyonu ve fertilizasyonunu sağlayabilmek için preovulator folikül haline gelebilirler. Bir primordiyal folikül içerisindeki oositin etrafı tek sıra düz granuloza hücreleri ile sarılı olup, mayoz I'in profaz aşamasında (henüz olgun değil) beklemektedir (Eppig ve ark., 1996).

Primordiyal foliküllerin aktivasyonu ya da büyümesi, granuloza hücrelerinin farklılaşması ve proliferasyonu eşliğinde, primer foliküle geçişleri ile olmaktadır. Primer foliküllerde granuloza hücreleri düzden kübik hale geçer ve hücre sayısı artar. Bir sonraki büyüme aşamasında oosit hacim genişlemesine uğrar ve oosit ile granuloza hücreleri arasında ZP meydana gelir (Aerts ve Bols, 2010). Sekonder foliküller iki ya da daha fazla sıra granuloza hücreleri ve ZP'nin küçük parçaları ile karakterize olup bu evrede oosit ile granuloza hücreleri arasında *gap junction*'lar meydana gelir (Fair, 2003; Stroebech ve ark., 2015). Tersiyer foliküller ise içi sıvı dolu antrum/boşluk içeren küçük ve büyük antral foliküller adı verilen daha alt gruplara ayrılmakta ve olgun antral foliküller "Graaf folikülü" olarak adlandırılmaktadır (Aerts ve Bols, 2010). Küçük tersiyer foliküllerde ZP'nin etrafı çok sayıda granuloza hücreleri ile sarılıdır. Aynı zamanda kumulus ooforus oluşurken *gap junction*'lar orta seviyeye

ulaşır. Erken tersiyer folikül çapı yaklaşık 1 mm iken, tersiyer folikülün çapı ise 3 mm kadardır ve içerisindeki oosit 80-110 µm çaptadır. Büyük tersiyer foliküldeki oosit ise 110 µm'den büyüktür (Hyttel, 2011; Stroebach ve ark., 2015).

Sığır oositlerinde mayoz, gebeliğin yaklaşık 82. gününde başlamaktadır (Bilodeau-Goeseels, 2012). Primordiyal foliküllerden preovulatoör folikül gelişimi tahmini olarak 180 gün ve sekonder folikülden tersiyer folikül gelişimi de yaklaşık 30 gün sürmektedir (Lussier ve ark., 1987; Aerts ve Bols, 2010; Fair, 2010). İneklerde antral folikülün gelişimi için ortalama 42 güne ihtiyaç vardır ya da bu süre iki östrus periyoduna karşılık gelmektedir. Bu nedenle folikül gelişim süresinin büyük çoğunluğu pre-antral evrede geçmektedir (Aerts ve Bols, 2010).

Foliküler gelişimin her evresinde büyüme faktörlerinin oldukça önemli yer tuttuğu bilinmektedir. İnsulin-benzeri büyüme faktörleri (IGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve büyüme faktörü (GH) gibi *transforming growth factor-beta* (TGF-β) ailesinin üyeleri preantral foliküllerin gelişiminde oldukça önemli rol oynarlar ve aktivasyonları ile oositin yetkinliğini ve maturasyonunu uyarırlar. Bu faktörler, kinaz aktivitesi ile ilişkili trans-membran reseptörleriyle etkileşime girerler. Oosit tarafından salgılanan faktörler (OSF) ile oositin kendi ortamını düzenleyebilmesine olanak sağlayan parakrin/otokrin halkalarda görev alırlar (Fair, 2010; Ménéz ve Elder, 2011). Ayrıca bu faktörlerden biri olan IGF, gonadotropin aktivitesi üzerine sinerjik bir etkiye sahiptir (Armstrong ve ark., 2000).

Oosit tarafından salgılanan faktörler; TGF-β ailesinin üyelerinden olan büyüme farklılaşma faktörü-9 (GDF-9), kemik morfogenetik proteini-6 (BMP-6) ve 15 (BMP-15)'ten oluşmaktadır (Ménéz ve Elder, 2011; Moussa ve ark., 2015). BMP-15; granuloza hücrelerinin steriyogenezisini, kumulus metabolizmasıyla ilgili olan genlerin ekspresyonunu ve ekspansiyonun kontrolünü ve oosit gelişim yeteneğinin artırılmasını sağlar. BMP-15 *knockout* fareler, subfertil olup ovulasyon ve fertilizasyon oranlarında düşme vardır. BMP-6 ve BMP-15'ten gelen parakrin sinyaller ile KOK'ların kültürleri sırasında ortaya çıkan apoptozis engellenmektedir.

Yapılan çalışmalarda, foliküler sıvı (FF)'da, GDF-9 ve BMP-15 düzeylerinin yüksek olmasının oosit olgunlaşması ve embriyo kalitesi ile önemli derecede ilişkili olduğu gösterilmiştir (Tsafriri ve Dekel, 2011; Moussa ve ark., 2015). Aynı zamanda oosit tarafından üretilen *basic fibroblast growth factor* (bFGF) primordiyal folikül büyümesini uyarılmaktadır (Nilsson ve ark., 2001). Yapılan in vitro çalışmalarda, GDF-9 ve BMP-15'in oositlerde olgunlaşmayı teşvik eden faktör (*Maturation promoting factor*) (MPF) ve mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) aktivitelerini uyarabileceğini ve oosit kalitesini ve gelişim potansiyelini artırabileceği gösterilmiştir (Moussa ve ark., 2015).

Gonadotropinlerin preovulator dalgası ile; mayozisin devam etmesi, ovulatör değişikliklerin gerçekleşmesi (luteinizasyon, kumulus ekspansiyonu ve folikül duvarının rupturu) ve fertile olabilme yeteneği kazanan ovumun salınımı (ovulasyon) tetiklenmektedir. Sığırlarda preovulatör lüteinleştirici hormon (LH) artışı; vasküler değişikliklere, bazal membranın yırtılmasına ve folikül duvarının rupturuna sebep olur. Bu duruma, granuloza ve teka hücreleri, kumulus hücre ekspansiyonu ve luteolizis ile cevap verirken, oosit ise mayozu yeniden başlatır. Sonuç olarak LH'nın hem oositte hem de folikül içinde etki gösterebilmesi için ikincil habercilere; siklik adenozin 3',5' monofosfat (cAMP) ve hücre içi kalsiyum (Ca)<sup>2+</sup>'a ihtiyacı vardır (Tsafriri ve Dekel, 2011; Adams ve Singh, 2015). Siklik guanozin 3',5' monofosfat (cGMP) ve cAMP oositteki mayozun tekrar başlatılmasında birincil baskılayıcılarıdır. Granuloza hücrelerinde üretilen cGMP'nin oosite *gap junction*'lar aracılığı ile girerek cAMP fosfodiesteraz 3A (PDE3A) düzeyini düşük tuttuğu düşünülmektedir. PDE3A'nın düşük konsantrasyonu, oosit içi cAMP seviyesinin yüksek kalmasına sebep olur. Bu da cAMP-bağımlı protein kinaz A'nın uyarılması ile MPF aktivitesini baskılayarak oositi mayozda tutar. Preovulatör LH dalgası, granuloza hücrelerinden cGMP üretimini azaltır ve PDE3A'nın oosite girişinin artmasıyla cAMP seviyesini azaltır. MPF mitoz ve mayoz hücre döngüsünü kontrol eder ve etkili hale geçmesi ile mayoz kaldığı yerden devam eder. Bunlara ek olarak, sitoplazma düzeyinde bazı değişiklikler meydana gelmektedir (Norris ve ark., 2009; Vaccari ve ark., 2009; Bilodeau-Goeseels, 2012; Absalón-Medina ve ark.; 2014; Adams ve Singh, 2015; Lonergan ve Fair, 2016).



Oositin, başarılı bir fertilizasyondan önce mayozu sitoplazmik maturasyon ile birlikte sürdürmesi ve tamamlaması gerekmektedir. Oositin mayozu sürdürme ve tamamlama yeteneği foliküler ve oosit büyümesi sırasında nükleer ve sitoplazmik değişikliklerle birlikte aşamalı olarak ilerlemektedir (Moussa ve ark., 2015).

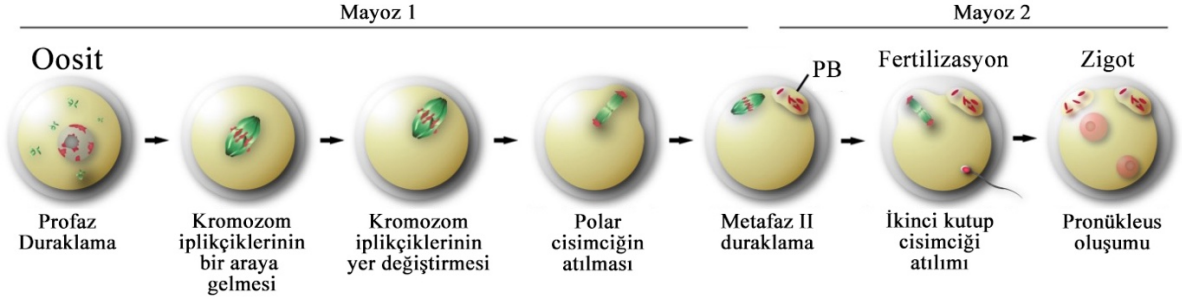
#### **1.1.1.1. Germinal Vezikülün Parçalanması ve Nükleer Maturasyon**

Oosit ile granuloza hücreleri arasındaki bağlantının bozulması, nükleer maturasyonun kendiliğinden gerçekleşmesine neden olur. Ancak bu durumda oosit olgun olmak yerine dejenere olmuş gibi görünmektedir (Ménézo ve Elder, 2011).

Profaz I evresinde beklemekte olan oosit, mayozu tekrar devam ettirdiğinde çekirdeği tekrar görünür hale gelir ve bu germinal vezikül (GV) olarak adlandırılır. Daha sonra germinal vezikülün parçalanması (GVBD) gerçekleştiğinde, diakinezis fazı olarak da adlandırılan dönem, çekirdek sitoplazma ile temas ettikten sonra hızlıca kaybolur. Kromozomlar kompakt formda yoğunlaşarak tetravalent olarak görülür ve ribo nükleik asit (RNA) sentezi durur (Gordon, 1994; Gordon, 2003a; El-Raey ve Nagai, 2014).

Metafaz-I'de çift diploid yapıda olan kromozom, sitoplazmada serbest kalır ve iğ iplikleri ile ekvator da dizilir. Sonrasında oositler kısa bir anafaz I evresine geçerler ve kromozomlar kutuplara göç eder. Telofaz-I'de kutuplarda bulunan kromozomlar nükleer zar ile sarılarak birinci kutup cisimciği (PB) oluşur ve bu perivitellin boşluğa atılır. Oosit bu dönemde ikincil oosit olarak adlandırılır ve kromozomlar tekrar iğ formuna geri dönerler. Mayoz II başladığında oosit metafaz II'ye ilerler ancak spermatozoon penetrasyonu meydana gelmeden mayoz II tamamlanamaz, diğer bir deyiş ile oosit aktivite olmadan gerçekleşmez. Oosit, metafaz-II'de ikinci kez duraklar ve nükleer maturasyon için kısmen yetkin hale gelir (Gordon, 1994; Eppig ve ark., 1996; Gordon, 2003a; El-Raey ve Nagai, 2014). Metafaz-II oluştuğunda ise artık ayrışma tamamlanmıştır. Bu aşamada her bir dişi hücre içerisinde başlangıcın yarısı kadar kromatin bulunur. Oosit fertilizasyona kadar metafaz-II'de tutulur. Başarılı bir

fertilizasyon sonrası mayozis tamamlanır ve ikinci PB oluşur (Şekil 1.3) (El-Raey ve Nagai, 2014).



Şekil 1.3. Oosit maturasyonu ve fertilizasyonu (Anonim 1).

Nükleer maturasyon; mayozun yeniden başlaması ile germinal vezikül aşamasından Metafaz-II plağının şekillenmesine kadar geçen süreci kapsamaktadır (Kaymaz, 2012). Nükleer değişiklikler, kromatin yoğunlaşması, nükleer düzeneğin sarılması ve hücre iskeleti organizasyonu içerirken (Jones, 2004), sitoplazmik değişiklikler ise organellerin modifikasyonu ve yer değiştirmesi, fonksiyonel  $Ca^{+2}$  salınım mekanizmasının oluşumu ve oositteki maternal mRNA'ların üretimi ve birikmesi olaylarını kapsamaktadır. Bu olaylar da, maturasyon ve başarılı bir implantasyon için oositin gelişimde kritik rol oynamaktadır (Albertini ve ark., 2003; Moussa ve ark., 2015).

### 1.1.1.2. Sitoplazmik Maturasyon

Sitoplazmik maturasyon; oositin fertilizasyon, aktivasyon ve implantasyon öncesi embriyo gelişimi için hazırlanması aşamalarını içermektedir (Eppig ve ark, 1996). Sitoplazmik maturasyon genellikle üç süreç altında incelenir. Bunlar; organellerin yeniden dağılımı, hücre iskelet dinamikleri ve moleküler maturasyonudur. Mitokondriler endoplazmik retikuluma yaklaşır; lipit damlaları ve vezikülleri küçülerek sayıları azalır ve merkezden periferik yönelirler. Bu da olgun bir oositin normal fertilizasyon, bölünme ve blastosist gelişim yeteneğini indirekt veya dolaylı olarak değerlendirmek için kullanılabilir. Sitoplazmik maturasyonun tamamlanamaması, fertilizasyon, embriyonik genom aktivasyonu ya da implantasyon sonrası gelişimi engelleyebilmektedir. Sitoplazmik maturasyonun belirlenmesinde,

perivitellin boşluğun artışı, birinci PB'nin atılması ve kumulus hücre ekspansiyonunun görülmesi kanıt olabilmektedir (Macun, 2004; El-Raey ve Nagai, 2014).

### 1.1.2. Fertilizasyon

Spermatozoon başarılı bir şekilde oositi dölleyebilme yeteneğini kazanması için, dişi reproduktif kanalında bir dizi fizyolojik değişikliğe uğramak zorundadır. Bunlar; kapasitasyon, hiperaktivasyon ve akrozom reaksiyonudur. Kapasitasyon, spermatozoonun oositi dölleyebilme yeteneğini kazanması; akrozom reaksiyonu ise, oositin ZP'sini geçebilmek için spermatozoonun baş kısmında gelişen reaksiyondur. Kapasitasyon ve hiperaktivasyon oosite ulaşmadan önce meydana gelirken, akrozom reaksiyonu spermatozoonun kumulus hücreleri ve ZP'ye temas etmesiyle başlar (Kaymaz, 2012; Machaty ve ark., 2012).

Kapasitasyon sırasında, epididimis ve seminal plazma bağlı proteinler spermatozoonun yüzeyinden çıkarak fertilizasyon için gerekli olayların meydana gelmesini sağlar. Ovidukta bulunan proteoglikan ve glikozaminler kapasitasyonda görev almaktadır. Normal koşullarda spermatozoon, düşük bikarbonat ortam olan epididimisten, yüksek bikarbonat ortama sahip olan ovidukta doğru göç etmektedir. Seminolipid, plazma zarının dış yaprağında bulunan spermatozoonlara özgü olan bir glikolipittir ve normalde akrozom reaksiyonunu önlemektedir. Seminolipidin yer değiştirmesi, zar yapısını bozar ve füzojenik hale getirir, bu da spermatozoonun oositin ZP'sine teması sonrasında akrozom reaksiyonunu kolaylaştırmaktadır (Machaty ve ark., 2012). Akrozom reaksiyonu spermatozoonun başındaki akrozomal içeriğin dağılmasına olanak sağlayarak, ZP'ye tutunmasını sağlar. Akrozomal enzimler, erkek gametin oositin plazma membranına erişebilmesi için spermatozoanın zona matrisinde dar bir yarık açmasını sağlar ve fertilizasyonu tetikler. ZP'nin glikoprotein bileşeni (ZP3) hem boğa spermini tanıma bölgesi olarak hem de fizyolojik bir tetikleyici olarak etki ederek, akrozom reaksiyonunu teşvik etmektedir. ZP3 ve spermatozoonun etkileşimi sonucunda sitoplazmik alkalizasyon ve hücre dışı  $Ca^{+2}$ 'nin akışı ikincil habercileri meydana getirir.  $Ca^{+2}$  iyonları, reaksiyonun meydana gelmesinde oldukça

önemlidir. Sitolitik  $Ca^{+2}$ , ATP-bağımlı  $Ca^{+2}$  pompası tarafından aktif olarak akrozomun içerisine transfer edilir. Biriken  $Ca^{+2}$ , inositol-1, 4, 4-trifosfat (IP3) kalsiyum kanalları ile akrozomdan salınır. Kapasitasyon sırasında hücre içi Ca pompasının aktif olduğuna inanılır ve bu kanalın kapasitasyon ve akrozom reaksiyonları sırasında hücre içi Ca iyonlarının düzenlenmesinde rolü olabilir (Gordon, 2003b). Sonuç olarak spermatozoonun oositin içerisine girmesiyle  $Ca^{2+}$  salınımı uyarılır bu da oosit aktivasyonuna, pronükleus oluşumuna sebep olmaktadır (Şekil 1.4) (Suttirojattana ve ark., 2016).

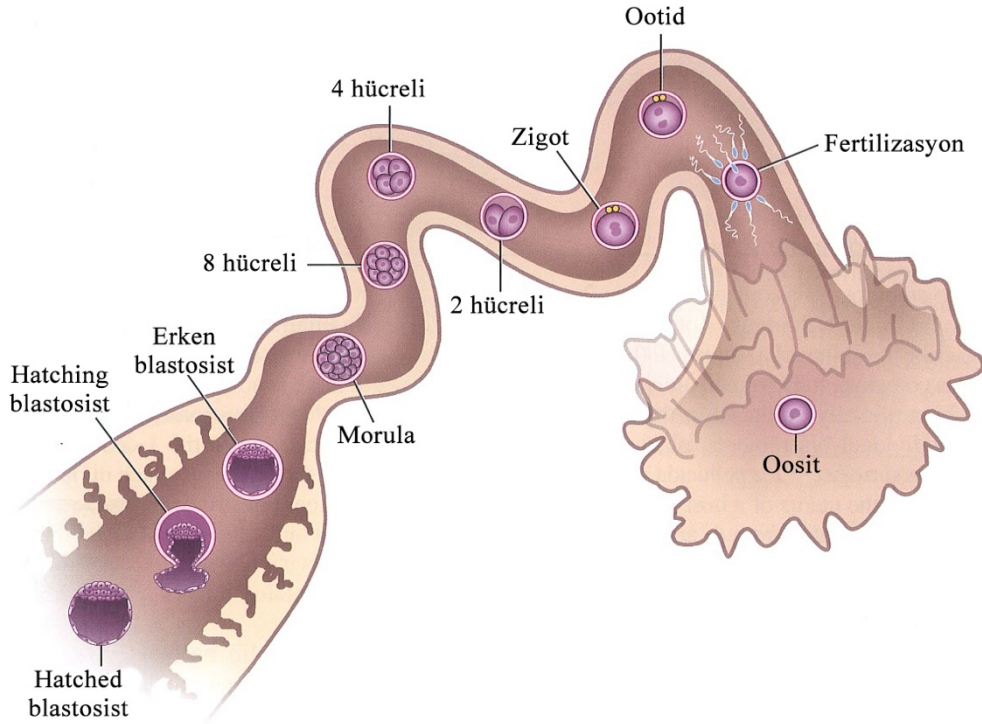


Şekil 1.4. Erkek ve dişi pronükleusu (Singami) (Kaymaz, 2012).

### 1.1.3. İmplantasyon Öncesi Embriyo Gelişimi

Embriyonik gelişim sırasında blastomerler bölünme aşamasına girerler. Fertilizasyon sonrasında ovum 2 hücreli embriyo devamında da 4, 8, 16 ( $2^n$ ) şeklinde bölünmeye devam eder. Blastomerler bölünmeye devam ettikçe sınırları belirsizleşmeye başlar ve üzüm tanesi görünümünde olurlar. Bölünmenin bu aşaması “morula” olarak adlandırılmaktadır. Bu evrede, blastomerlerin birbirleri ile olan bağlantısı gevşektir ve ZP çıkarıldığında kolayca dağılırlar. Embriyonun gelişimi devam ettikçe yaklaşık olarak 32 hücreli evrede hücreler kompaktlaşmaya başlar ve “kompakt morula” adını alır. Böylece trofoblast oluşumunun ön şartı gerçekleşmiş olur. Blastulasyon gerçekleştiğinde embriyo “blastosist” aşamasındadır ve iç hücre kümesi-ICM ve trofektoderm-TE olarak iki farklı hücre grubunu içermektedir. ICM, fetüsün ve plasentanın bir kısmının gelişmesini sağlarken TE, plasentayı ve ekstra embriyonik

membranları oluşturur. Blastosist aşaması; hücre bölünmesi, farklılaşması ve ölümü süreçlerini içerir. Blastosist kavitesi içerisinde bulunan sıvının (blastosöl) oluşumu için farklılaşmış polarize epitel hücreleri ile su taşınmaktadır. Bu sıvı trofoblast hücreleri ile çevrilidir ve embriyonun “*hatching*” ’inden önce ZP’nin incelmesine yardımcı olur. Blastosistin ekspansiyonu, TE’nin bazolateral membranında bulunan  $\text{Na}^+$  -  $\text{K}^+$  - adozin trifosfataz (ATPaz) aktivitesi tarafından düzenlenen etkin bir süreçtir (Gordon, 2003c; Jahnke ve ark., 2015). Zona pellusidanın rupturu sonrasında embriyo ZP’den dışarı çıkarken “*hatching*” ve tamamen çıktıktan sonra “*hatched*” olarak adlandırılır. Fertilizasyon sonrasında ineklerde morulaya kadar olan dönem ovidukta gerçekleşirken, morula aşamasında uterusu inmek üzeredir ya da inmiştir. Zigot fertilizasyon sonrasında 2 hücreli hale 24 saatte, 4 hücreli 36 saatte ve 8 hücreli hale 72 saatte ulaşmaktadır. Embriyonun diğer gelişim aşamaları ise morula 4-7., blastosist 7-12. ve *hatching* 9-11. günlerde meydana gelmektedir (Şekil 1.5) (Kaymaz, 2012; Senger, 2005b).



Şekil 1.5. İmplantasyon öncesi embriyo gelişim aşamaları (Senger, 2005b).

### 1.1.3.1. Embriyoların Gelişimlerinin ve Kalitesinin Değerlendirilmesi

Elde edilen embriyolar, Uluslararası Embriyo Teknolojisi Topluluğu (IETS) tarafından belirlenen, embriyonik gelişim aşamaları ve kalitelerine göre gruplandırılmaktadır (Jahnke ve ark., 2015). Gelişim aşamaları 1'den 9'a kadar; fertilize olmamış, 2-12 hücreli, erken morula, morula, erken blastosist, blastosist, ekspanded blastosist, *hatched* blastosist ve ekspanded *hatched* blastosist olarak sınıflandırılmaktadır. Kalite kodlarına göre; kod 1, çok iyi-güzel; kod 2, iyi; kod 3, sağlıklı; kod 4, ölü-dejenere'dir (Çizelge 1.1) (Wright, 2010).

**Çizelge 1.1.a** IETS'ye göre embriyoların gelişim aşaması (Wright, 2010).

No	Gelişim Aşaması
1	Fertilize olmamış
2	2-12 hücreli
3	Erken Morula
4	Morula
5	Erken Blastosist
6	Blastosist
7	Ekspanded Blastosist
8	<i>Hatched</i> Blastosist
9	Ekspanded <i>Hatched</i> Blastosist

**Çizelge 1.1.b** IETS'ye göre embriyoların kalitesi (Wright, 2010).

Kod	Kalite
Kod 1	Çok iyi-güzel
Kod 2	İyi
Kod 3	Sağlıklı
Kod 4	Ölü-dejenere

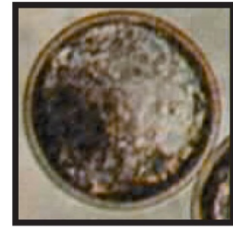
Çok iyi ya da güzel kalite koduna sahip olan embriyolar; boyut, renk ve yoğunluk bakımından aynı olan blastomerleri içerir ve embriyo simetrik ve küresel bir şekle sahiptir. Hücrelerin en az %85'i sağlam, canlı ve yapışkan bir yapıda olmalı ve ZP pürüzsüz ve küre şeklinde olmalıdır. Bu embriyolar ile embriyo transferi yapılabilir ya da dondurulabilir. İyi kalite kodlu embriyolar; embriyonik hücrelerde boyut, renk ve yoğunluk bakımından orta derecede düzensizliğe sahip olmalı ve hücrelerin en az %50'si bozulmamış, canlı ve yapışkan olmalıdır. Ayrıca blastomerlerin içerisindeki az sayıda vakuoller kod 2 olduğunu kanıtlamaktadır ve bu grup embriyolar ET ya da dondurma yapılabilir. Sağlıksız (kod 3) grubuna dahil edilen embriyolarda; embriyonik kütle biçiminde veya tek tek hücrelerin boyut, renk ve yoğunluğunda büyük düzensizlikler bulunur. Blastomerlerin içerisinde büyük sayıda vakuoller yer alır ve embriyonik hücrelerin ancak %25'i sağlıklıdır. Bu kalitedeki embriyolar bir süre kültüre edildikten sonra transfer edilebilir veya dondurulabilir. Ölü ya da dejenere (kod 4) olan embriyolar ise ne transfer edilebilir ne de dondurulabilir özelliktedir. Ölü olanlar aşırı derecede koyu sitoplazmaya sahiptir ve hücre membranları sağlam değildir (Şekil 1.6 ve 1.7) (Wright, 2010; Kaymaz 2012; Jahnke ve ark., 2015).



Siklus günü: 7.5  
Aşama kodu: 6  
Kalite kodu: 1

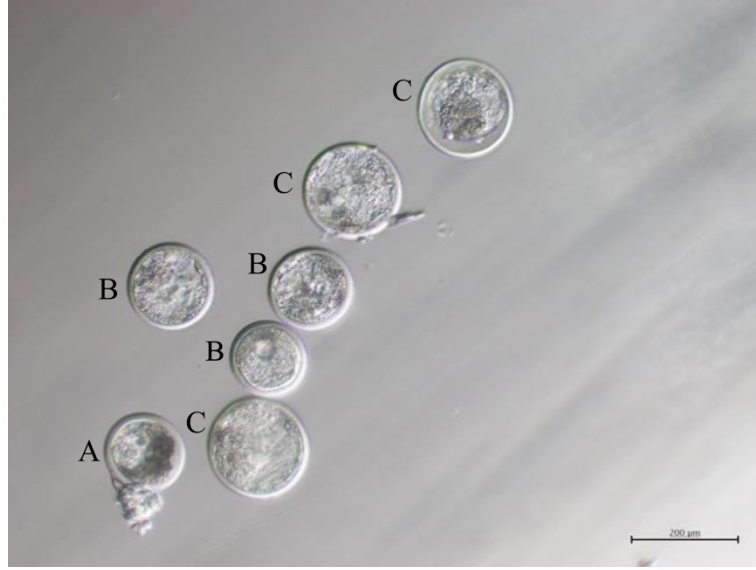


Siklus günü: 7.5  
Aşama kodu: 6  
Kalite kodu: 2



Siklus günü: 7.5  
Aşama kodu: 7  
Kalite kodu: 1

**Şekil 1.6.** IETS'ye göre embriyo sınıflandırılması (Wright, 2010).



**Şekil 1.7.** IVP sığır blastosist ve ekspanded blastosistler A. Erken Blastosist B. Blastosist C. Ekspanded Blastosist (Olympus IX73, *Japan*) (Ankara Üniversitesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı. Onur, 2016).

## 1.2. İn Vitro Embriyo Üretimi

Mezbahadan toplanan oositlerden elde edilen embriyonun taşıyıcı bir ineğe transfer edilmesiyle sığırlarda ilk başarılı embriyo transferi, cerrahi metot kullanılarak 1951 yılında Willet ve ark. tarafından yapılmıştır (Kanagawa ve ark., 1995; Hasler, 2003; Kaymaz, 2012). Embriyo transferi için geliştirilen bu cerrahi metoda alternatif olarak, Japon bilim adamı Suggie, 1964 yılında cerrahi olmayan, Servikal *By-pass* metodunu, geliştirilmiştir. Suggie ile aynı dönemde Mutter ve ark., trans-servikal yöntemi geliştirmesiyle 1970'lerin ortalarına doğru bu yöntem ticari olarak uygulanabilir hale gelmiştir (Kanagawa ve ark., 1995; Betteridge 2003; Kaymaz 2012). Wilmut ve Rowson 1973 yılında, dimetil sülfoksit (DMSO) ile embriyoyu dondurmuş, Hare 1976'da, *Mitchell* karyotiplendirme yöntemini kullanarak embriyoda cinsiyet tayinini gerçekleştirmiştir. Bilton ve Moore (1979), kriyoprotektan olarak gliserolu kullanarak embriyoları dondurmuş ve embriyo *splitting* yönteminin geliştirilmesiyle de Willadsen ve ark. 1981 yılında embriyoyu ikiye keserek identik ikizler elde etmişlerdir. Renard ve ark. 1982'de, embriyoyu payet içerisinde dondurmuştur (Kaymaz, 2012). Kesilerek manüple edilen embriyoların dondurulmasını Lehn-Jensen ve ark. gerçekleştirirken, Hanada 1985 yılında mezbaha materyali kullanarak oositlerde ilk olarak IVF'i



yapmıştır. Massip ve ark. (1987), vitrifikasyon adı verilen yöntemi geliştirmiş ve Prather ve ark., bir adım daha ileri giderek ilk nükleer transferi gerçekleştirmiştir (Kanagawa ve ark., 1995; Betteridge, 2003; Kaymaz, 2012). En önemli gelişme ise, Ian Wilmut ve Keith Campbell ve ark. (1996) tarafından, 6 yaşındaki koyunun meme hücrelerini kullanarak ilk kuzunun (Dolly) elde edilmesi olmuştur. Bu çalışma somatik hücrelerden de klonlama yapılabilirliğini göstererek klonlama tarihinde yeni bir dönem açılmasını sağlamıştır (Arat, 2002).

Ruminant embriolarının in vitro olarak üretilmesi; oositlerin in vitro maturasyonu, in vitro fertilizasyonu ve muhtemel zigotların in vitro kültürü olmak üzere üç adımda gerçekleştirilir. Canlı hayvanlardan *ovum pick up* yöntemiyle veya mezbahadan elde edilen ovaryumlardaki foliküllerden toplanan oositlerin östrus siklusunun hangi evresinde olduğu bilinmemekte ve laboratuvar ortamında fertilizasyon öncesi olgunlaştırılması gerekmektedir. Bunların %90'ı in vitro maturasyonda profaz I'den metafaz II'ye (in vivo olarak ovule oldukları evre) ilerleyerek nükleer maturasyon ve sitoplazmik maturasyonu gerçekleştirirler. İn vitro fertilizasyon adımı sonrasında oositlerin yaklaşık %80'i fertilize olur ve bunlar in vitro kültüre alınarak bölünmeye başlarlar (*cleavage* dönemi). Ancak bu oositlerin sadece %30-%40'ı başarılı bir şekilde blastosist evresine ulaşmaktadır. Sonrasında istenilen özellikte olan embriyo/lar alıcıya transfer edilir ya da gelecekte kullanılmak üzere dondurulabilirler (Rizos ve ark., 2002).

### **1.2.1. İn Vitro Maturasyon (IVM)**

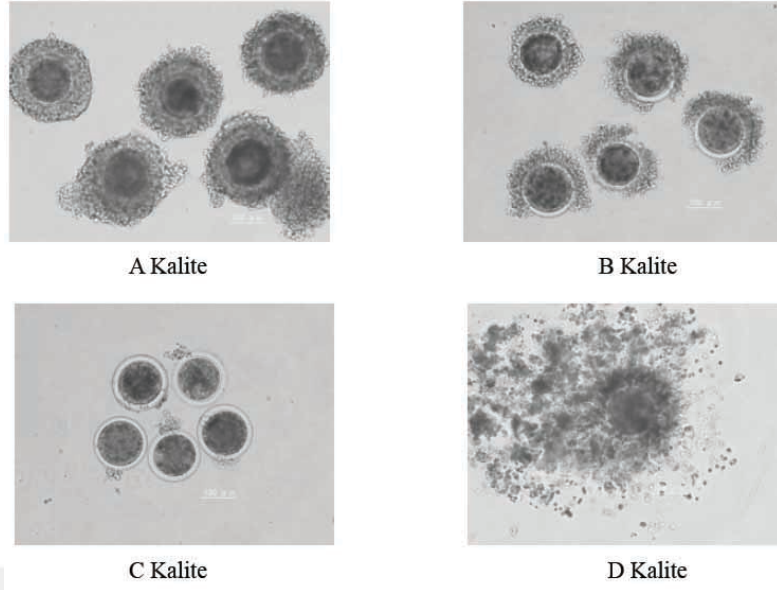
Mezbaha ovaryumlarındaki foliküllerden elde edilen oositler maturasyonun GV aşamasındadır. Bu evredeki oositin en önemli özelliği genetik materyalinin çekirdek sınırları içerisinde olmasıdır (Massip, 2003). Sığır oositlerinin in vitro olarak mayozisi sürdürebilme ve tamamlama yeteneği oositin çapıyla ilgilidir; 110 µm'den daha küçük olan oositlerin, transkripsiyonel olarak aktif olsa da mayozisi devam ettirme yetenekleri azdır (Gordon, 2003d). Graaf foliküllerinden elde edilen oositler uygun koşullarda kültüre edildiklerinde spontan olarak mayozisi tekrar devam

ettirerek metafaz II'ye ulaşırlar (Hashimoto; 2009). Çizelge 1.2'de sığır oositlerinin in vitro kültür koşulları altında her bir aşamada geçirdikleri ortalama süreler verilmiştir.

**Çizelge 1.2** Sığır oositlerinin herbir nükleer evrede geçirdikleri ortalama süre (0. saat in vitro maturasyonun başlangıcıdır) (El-Raey ve Nagai, 2014).

Nükleer Evreler	Zaman Aralığı (saat)
Germinal Vezikül	0-6.6
GVBD	6.6-8
Yoğunlaşma	8-10.3
Metafaz- I	10.3-15.4
Anafaz- I	15.4-16.6
Telofaz- I	16.6-18
Metafaz- II	18-24

Ovaryumlardan aspire edilen olgun olmayan sığır oositleri in vitro maturasyon solüsyonuna alınmadan önce kalitelerine göre gruplara ayrılmaktadır. Oositler bütünlüğü ve ultrayapısal morfolojilerine göre 4 gruba ayrılırlar. Kategorileri I-II ve III olan oositler, sırasıyla azalan derecelerde kumulus hücre sıralarına sahiptir ve ooplazmalarının görünümü ağırlıklı olarak homojendir. Kategori 4 (Grade IV- D Kalite) olan oositlerde ise ooplazma dejenere görünümünde ve kumulus hücreleri kümelenmiş ya da örümcek ağı görünümündedir. Kumulus hücreleri, ZP'nin tamamını kaplayan ya da üç yada daha fazla katlı olarak görülenler kategori I (Grade I- A Kalite) olarak değerlendirilirken, ZP'nin 1/3'ünde fazlasını ya da 2 ya da daha az katlı olanlar ise kategori II (Grade II- B kalite) olarak değerlendirilir. Kategori III (Grade III- C Kalite) ise Grade II'den daha az kumulus hücrelerine sahiptir ya da hiç sahip değildir (Şekil 1.8) (Brackett ve Zuelke, 1993; Kobayashi, 2007).



**Şekil 1.8.** İn vitro maturasyon öncesinde oositlerin kalitelerine göre gruplandırılması. (Kobayashi, 2007).

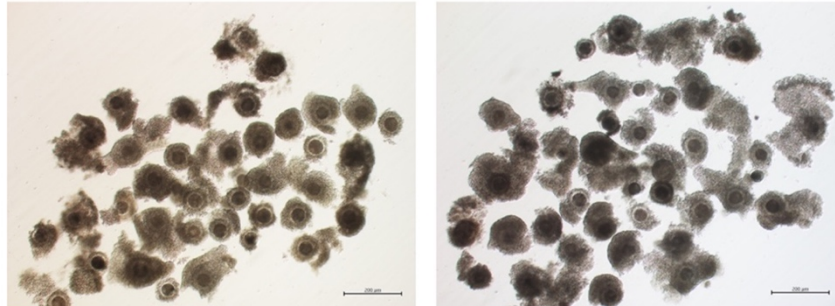
Birçok laboratuvarında sığır oositlerinin in vitro maturasyonunda 30 yıldan fazla bir süredir değişmemiş olan ve laboratuvarında hazırlanan basit bir oosit maturasyon sistemi (defined media-içeriği tanımlı olan) kullanılmaktadır. Kumulus oosit kompleksi (KOK), kompleks bir kültür solüsyonu olan, doku kültür medyum 199 (M-199)'a (bikarbonat ya da HEPES tamponlu); protein kaynağı (sığır serum albümin-BSA, fetal buzağı serumu-FCS), antibiyotik (penisilin, streptomisin, gentamisin), gonadotropin (ya da gonadotropinsiz) (folikül uyarıcı hormon- FSH, LH) ve/veya büyüme faktörlerinin eklenmesi (FGF, IGF) ile mature edilmektedir (Gordon, 2003a; Lonergan ve Fair, 2016). Bunların dışında, Ham's F10a (*Nutrient Mixture F-10 Ham*), SOF (Sentetik ovidukt sıvısı), BO- in vitro maturasyon solüsyonu (BO-IVM) gibi ticari (undefined media-içeriği belli olmayan) birçok stok solüsyonları da kullanılmaktadır (Suthar ve Shah, 2009; Kaymaz, 2012).

Oosit ve embriyo kalitesini artırmak amacıyla biyolojik aktif ajanlar (FSH ve büyüme faktörleri gibi) maturasyon solüsyonuna eklenebilmektedir (Machaty ve ark., 2012). FSH ve LH, granuloza ve kumulus hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak maturasyonu uyarır (Ménézo ve Elder, 2011). Ayrıca FSH direk olarak KOK'ların ekspansiyonu, nükleer ve sitoplazmik maturasyonu uyarmakta ve oositlerin gelişim

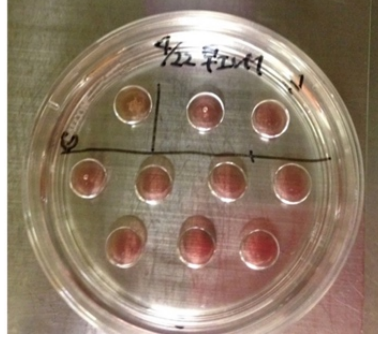
yeteneğini artırmaktadır (Caixeta ve ark., 2013; Wrenzycki ve Stinshoff, 2013). Macun ve Kaymaz (2006)'ın yaptıkları bir çalışmada, in vitro oosit maturasyon vasatına eklenen FSH ve insan menopozal gonadotropini (hMG)'nin oosit maturasyonu üzerindeki etkisi araştırılmış ve FSH kullanımının hMG'ye göre daha başarılı sonuç verdiği bildirilmiştir.

İn vitro embriyo elde etmek için hazırlanan solüsyonlara serum ve BSA'nın eklenmesiyle; koloidal ozmotik düzenleme ve pH'nın düzenlenmesi gibi avantajlar sağlanmaktadır (Hasler ve Barfield, 2015). Bikarbonatın solüsyona katılmasıyla da CO<sub>2</sub> ve bikarbonat arasındaki denge nedeniyle pH'da dengelenmiş olmaktadır. Birçok laboratuvarında 1980'lerin sonundan beri sığır oostilerinin maturasyonu, ineklerin rektal ısısına (38-39.3°C) yakın olduğu için, 38-39°C'de gerçekleştirilmekte ve IVP solüsyonları %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde tutulmaktadır (Gordon, 2003a; Hasler ve Barfield, 2015).

Kumulus oosit kompleksi maturasyon için, üzerleri mineral yağ ya da parafin ile kaplanmış olan petrideki damlalara grup halinde (oosit/5µl) yerleştirilmektedir (Şekil 1.9 ve 1.10) (Imai ve ark., 2002a; Gordon, 2003a; Kaymaz, 2012; Wrenzycki ve Stinshoff, 2013). Kumulus oosit kompleksinin mineral yağ altındaki mikro damlalara yerleştirilmesinin; suyun buharlaşmasını en aza indirmek, mikrobiyal kontaminasyondan koruma, sıcaklık ve gaz değişiminin azaltılması ve kültür sırasında rahat izleme olanağı sağlaması gibi birçok avantajı bulunmaktadır (Gordon, 2003a).



**Şekil 1.9.** IVM damlaları içerisindeki KOK'lar (Olympus IX73, *Japan*) (Ankara Üniversitesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı. Onur, 2016).



**Şekil 1.10.** IVM damlaları (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı, Onur, 2016).

Modifiye SOF ve M-199 maturasyon solüsyonlarına BSA (8 mg/ml) ya da farklı miktarlarda serum (%2 ya da %10) eklenmesiyle yapılan bir çalışmada, blastosistlerin ekspansiyonu, M-199 ve %10 serum solüsyonu ile mature edilen oositlerde diğer solüsyonlara göre daha yüksek bulunmuştur. Ancak embriyoların bölünme ve blastosist aşamasına ulaşma oranlarında bir farklılık bulunamamıştır. Bu çalışma ile oositlerin kültür edildiği ortamın, in vitro üretilen embriyo kalitesi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Russell ve ark., 2006). Nielsen ve ark.'nın 2014 yılında yaptıkları çalışmada ise oositler M-199 ve BO-IVM solüsyonları ile ayrı ayrı mature edildikten sonra SOF ve BO-in vitro kültür solüsyonları (BO-IVC) ile embriyo kültürü yapılmıştır. Blastosist oranları; BO-IVM ve BO-IVC kültürlerinde %37, M-199 ve BO-IVC'de %33, BO-IVM ve SOF'ta %26, son olarak da M-199 ve SOF'ta %28 olarak belirlenirken, her bir grubun sonucu birbirlerinden anlamlı derecede farklı bulunmuştur.

### 1.2.2. İn Vitro Fertilizasyon (IVF)

İn vitro fertilizasyon, laboratuvar koşulları altında erkek ve dişi gametlerin zigot meydana getirmesi amacıyla kapasite edilmiş spermatozoonun olgun KOK'lar ile birlikte inkübe edilmesidir. En ideal spermatozoon konsantrasyonu, en düşük seviyede polispermi ile maksimum fertilizasyon sağlamak için ön deneylerle her bir boğa ırkına göre belirlenmektedir. İnkübasyon süresi, kullanılan IVF tekniğine göre 6 ile 20 saat arasında değişmektedir. Bu süreçte spermatozoon, oositleri çevreleyen kumulus hücre

katmanlarını geçip ZP'ye bağlanarak akrozom reaksiyonu gerçekleştirir ve ZP'ye penetre olur. Spermatozoonun oositin plazma membranına bağlanıp kaynaşmasını takiben, oosit aktivasyonu ve erkek ve dişi pronükleusunun oluşumu sağlanmaktadır (Machaty ve ark., 2012).

Sığır IVF'inde her zaman donmuş spermatozoon kullanılmaktadır. Spermatozoonun fertilizasyon için hazırlanmasında, iyi kalite ve motil spermatozoonun ayrılması amacıyla *Swim-up* ya da *Percoll Gradient* teknikleri gibi migrasyon ve gradient teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Galli ve ark., 2003; Suthar ve Shah, 2009).

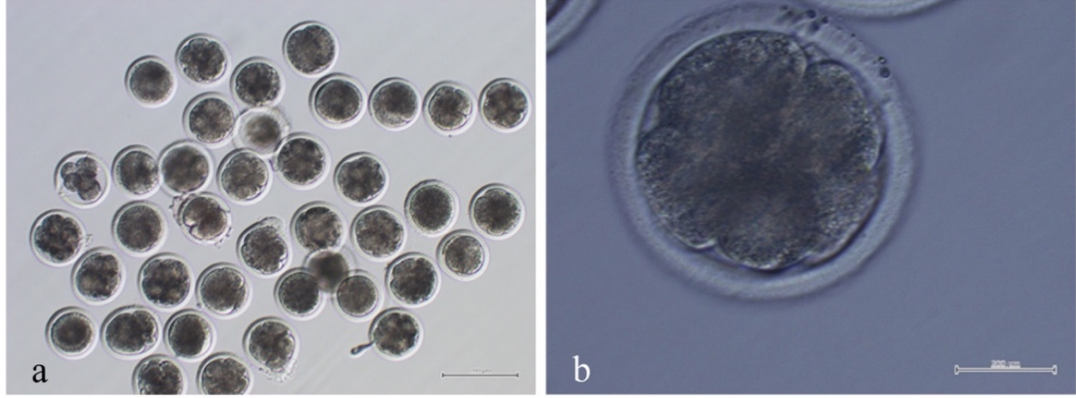
Migrasyon tekniklerinden biri olan *Swim-up*'ta, spermatozoon kendi hareketi ile ilerlemektedir. Çözdürülen spermatozoon üzerine eklenen Tyrode'nin Albumin Laktat Piruvat (TALP) solüsyonu gibi uygun solüsyonlarla, spermatozoonun 30-60 dk süreyle %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilmesi sonucu altta kalan spermatozoonlardan motil olanlar solüsyonun üzerinde yüzmektedir. *Density gradient* santrifüj teknikleri arasında olan *Percoll Gradient* tekniğinin prensibi ise spermatozoonların hareketlerine göre farklı konsantrasyondaki sıvıların kesişim yerlerinde birikmeleri esasına dayanmaktadır ve en fazla tercih edilen tekniktir. *Percoll Gradient* tekniği ile maksimum motil spermatozoon elde edilebilir ve motil spermatozoonlar morfolojik olarak ölü olanlardan ve spermatozoon dışındaki diğer kalıntılardan hızlıca ayrılır. Bu teknikte genellikle %45 ve %90 *Percoll* yoğunluğu kullanılmaktadır. Hazırlanan solüsyonlardan yoğunluğu fazla olan (%90 *Percoll*) tüpün dibine, yoğunluğu az olan ise (%45 *Percoll*) onun üzerine eklenerek en üste de çözdürülen spermatozoon eklenmektedir. Santrifüj işlemi 15-30 dakika yapılmakta ve motilitesi yüksek olan spermatozoonlar tüpün dibine çökmektedir. *Swim-up* tekniği sonrasında az sayıda hücre elde edilmesi dezavantaj oluştururken, *Percoll Gradient* tekniğinin de akrozomal membran hasarına yol açabilmesi ve endotoksin salınım riski bulunması dezavantajdır. İn vitro fertilizasyon işlemi sırasında sıcaklık kapasitasyonun başarısı için oldukça kritik bir faktördür ve sığırlarda fertilizasyon prosedürleri 38,5°C'de yapılmaktadır (Galli ve ark., 2003; Acar, 2008; Kaymaz, 2012; Hasler ve Barfield, 2015).

İn vitro fertilizasyon için kullanılan solüsyonlar kapasitasyonu destekleyen ve geliştiren nitelikte olmalıdır. Spermatozoonların hazırlanmasında genellikle TALP ya da BO (Brackett ve Oliphant) solüsyonları kullanılır. Bu solüsyonlara farklı konsantrasyonlarda heparin eklenerek IVF başarısı artırılmaktadır. Fertilizasyon medyumuna eklenen bir glikozaminoglikan olan heparin, birincil kapasitasyon ajanıdır. İn vitro solüsyonlara eklenen heparin spermatozoonun kapasitasyonu uyarma konusunda, uterusda bulunan diğer bileşenlerden daha etkilidir (Suthar ve Shah, 2009; Hasler ve Barfield, 2015). Heparinin spermatozoon yüzeyinden seminal plazma bileşenlerinin uzaklaştırılmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir. Bunu da proteinlere bağlanıp fosfolipid ve kolesterolün akışını uyararak yapmaktadır. Fizyolojik koşullar altında epididimiste düşük bikarbonat konsantrasyonu varken uterus bikarbonattan zengindir. Bu nedenle, temizlenen spermatozoon, yüksek bikarbonat konsantrasyonları içeren ortamlarda inkübe edilirler. Bu da kapasitasyon ile yakından ilişkili olan protein kinaz A'ya bağımlı protein fosforilasyon basamaklarını uyarmaktadır. Diğer kapasitasyon ajanları ve görevleri ise şunlardır; kafein, bir fosfodiesteraz inhibitörüdür; bikarbonat, lipid yapısındaki protein kinaz A-bağımlı değişimlerini uyarır; adozin, membran reseptörleri ile etkileşim halindedir ve hücre içi cAMP artışını sağlar ve süperoksit anyon, hidrojen peroksit ve nitrik oksit gibi reaktif oksijen türlerinin (ROS) protein tirozin fosforilasyonunu içeren hücre içi mekanizmaları tetiklemek için membran hedeflerini aktive eder. Ayrıca heparin ve kafeinin kombinasyonu ya da kalsiyum iyonofor kullanımı da kapasitasyonun uyarılmasında etkili olabilmektedir (Machaty ve ark., 2012; Hasler ve Barfield, 2015; Stroebech ve ark., 2015).

### **1.2.3. İn Vitro Embriyo Kültürü (IVC)**

Sığır embriyolarının in vitro kültürü (IVC), in vitro embriyo üretiminin son adımıdır ve IVF'in tamamlanmasının ardından zona pellusidaya bağlı olan kumulus hücreleri ZP'den ayrılarak in vitro kültür solüsyonlarına alınır. Bir hücreli potansiyel zigotlar blastosist aşamasına kadar (embriyo transferi ya da dondurulacak süreye kadar) yaklaşık 6-7 gün süre kültürde tutulmaktadır (Şekil 1.11 ve Şekil 1.12) (Machaty ve

ark., 2012; Hasler ve Barfield, 2015). Embriyonun ilk bölünmesi, embriyonik genomik aktivasyonun başlaması ve blastosist kalitesi, embriyonun zamanında gelişimi, *hatching* olma (yarıklanma, ZP'den çıkma) yetenekleri, toplam hücre sayısı gibi parametreler kültür koşullarından etkilenmektedir (Nedambale ve ark., 2006; Zullo ve ark., 2016).



**Şekil 1.11.** a. İn vitro maturasyon kültürünün 48. saati b. 6 hücreli embriyo (Olympus IX73, *Japan*) (Ankara Üniversitesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı. Onur, 2016).



**Şekil 1.12.** Embriyo kültürün 7. gününde elde edilen embriyolar. Dejenere olan ve fertilize olmayanlar ok ile belirtilmiştir. a. Blastosist b. Ekspandé blastosist c. *Hatching* (Olympus IX73, *Japan*) (Ankara Üniversitesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı. Onur, 2016).

Sığırların in vitro embriyo üretiminde ticari (undefined media-içeriği belli olmayan) stok solüsyonu olarak ya da laboratuvarında hazırlanan solüsyonlar (defined media-içeriği tanımlı olan) uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bunlara örnek olarak; M-199, G1.2/G2.2, TALP (Parrish ve ark., 1986), SOF, *Charles Rosenkrans* solüsyonu



(CR1) (Rosenkrans ve ark., 1993), *Potassium simplex optimization medium* (KSOM), KSOM-SOF ve BO-IVC (IVF-*Bioscience*) verilebilir (Nedambale ve ark., 2006; Nielsen ve ark., 2014; Stroebech, ve ark., 2015). *Charles Rosenkrans* solüsyonu gibi solüsyonlar basit bir bileşime sahiptir böylece düşük maliyetle fazla miktarlarda üretilmesi kolaylaşır (Somfai ve ark., 2010). Aşağıda yer alan Çizelge 1.3'te sığır embriyolarının farklı kültür ortamlarındaki blastosist oranları yer almaktadır.

**Çizelge 1.3.** Farklı kültür solüsyonlarında IVF sonrası sığır embriyolarının blastosist oranları (Absalón-Medina ve ark., 2014).

Solüsyon Tipi	Blastosist Oranı (%)	Referans
KSOM	37.1	Felmer ve ark., 2011
SOFaa	34.9	Sanches ve ark., 2012
CR1aa	36.1	Somfai ve ark., 2010
IVD101	37.1	Hoshi, 2003
	21.7	Somfai ve ark., 2010
Gardner (G1/G2)	27.8	Sanches ve ark., 2012

Sığır embriyolarının üretiminde birçok laboratuvarında parafin yağı ya da mineral yağ ile kaplanan geleneksel mikro damlalar (5 µl/embriyo) kullanılmaktadır. Bununla birlikte in vitro embriyo üretiminde, mikro kuyucuklarda ortak bir kültür damlası içerisindeki tekli embriyoların kültürününün (*Well of the Well-WOW*) blastosist aşamasına ulaşımını artırdığı bilinmektedir. IVC sistemlerinin bazıları %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde gerçekleştirilirken, bazıları %5 CO<sub>2</sub>, %5 O<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> atmosferde inkübe edilirler. Ancak embriyoların üç gazlı sistemde daha iyi geliştikleri bildirilmektedir (Vajta ve ark., 2000; Vajta ve ark., 2008; Somfai ve ark., 2010; Hasler ve Barfield, 2015).

Yapılan bir çalışmada, IVP sığır embriyolarında farklı IVC solüsyonlarının (SOM, SOF, KSOM-SOF ve CR1) etkileri karşılaştırılmıştır. SOF ya da KSOM-SOF solüsyonları ile kültüre edilen zigotlar daha fazla oranda blastosiste ulaşmıştır (Nedambale ve ark., 2006). Sağırkaya ve ark.'nın 2006 yılında yaptıkları başka bir

çalışmada, amino asit eklenen KSOM, CR1 ve SOF (KSOMaa, CR1aa, SOFaa) solüsyonlarının in vitro embriyo kültürü karşılaştırıldığında, bölünme oranlarında bir farklılık bulunmasa da blastosist aşamasına ulaşma oranı SOF solüsyonunda daha yüksek bulunmuştur. Sato ve ark. (2016), in vitro elde edilen sığır embriyolarında ROS'ların sebep olduğu hücre hasarını azaltmak amacıyla kültüre bir antioksidant olan folik asit (FA) eklemiştir. Dondurma çözündürme sonrası FA eklenen grubun canlılık oranı daha yüksek olmasına eğilimli olsa da bu farklılık önemli bulunmamıştır.

### **1.3. Sığır Embriyolarının Dondurularak Saklanması**

Dünya çapında hayvan yetiştiriciliğinin iyileştirilmesinde sığır embriyolarının dondurularak saklanması, sığır üretiminin sürekliliğini sağlamak amacıyla yaygın bir teknik haline gelmiştir. Bunun yanında embriyoların dondurularak saklanmasıyla, üretilen embriyoların farklı noktalara transferi bu konuda uluslararası ticaretin de önünü açmıştır. Genetik kaynakların korunması amacıyla da embriyolar farklı yöntemlerle dondurularak saklanabilmektedir. Embriyoların dondurulmasında, geleneksel yavaş dondurma ve vitrifikasyon olmak üzere iki temel yöntem kullanılmaktadır (Imai ve ark., 2002b; Kaymaz, 2012; Min ve ark., 2013; Inaba ve ark., 2016). Her iki yöntemde de soğutma hızı ve solüsyonlarda kullanılan kriyoprotektan konsantrasyonları birbirinden farklıdır (Gupta ve ark., 2015).

Embriyoların dondurularak saklanması, organizmayı o andaki haliyle koruyarak, çözündürüldüğünde gelişimine kaldığı yerden devam etmesini sağlamaktadır. Böylece, genetik kaynaklar kontrol edilebilir ve güvenli bir şekilde saklanabilmektedir. Embriyoların düşük ısılarda korunmasıyla hücresel respirasyon, hücre içi enzim aktivitesi, metabolizma, hücre gelişimi ve bölünmesi gibi birçok olay neredeyse tamamen durmaktadır. Hücrenin fizyolojik aktivitesinin belirgin bir şekilde durdurulmasıyla, genetik bozukluklara neden olmadan ve yaşam yeteneğine hasar vermeden çok uzun süre koruma sağlanabilmektedir. Embriyoların, -196°C'de direkt radyasyona maruz kalmaları dışında yüzlerce yıl süreyle korunabileceği düşünülse de

ticari üreticiler en fazla birkaç yıl süreli korumayı tavsiye etmektedir (Kaymaz, 2012; Rodriquez-Martinez, 2012).

### **1.3.1. Kriyoprotektanlar**

Kriyoprotektan maddeler (CPA), biyolojik bir hücreyi donma hasarından korumak ve hücrenin dehidrasyonunu sağlamak amacıyla dondurma solüsyonuna eklenmektedir (Kaymaz, 2012; Szeptycki ve Bentov, 2016).

Kriyoprotektanların üç temel etkisi vardır; hücre içi ve hücre dışında artmış olan çözülmüş elektrolit yoğunluğunun neden olduğu etkileri hafifletmek, sıcaklık baskısında viskozitenin artmasını sağlamak (buz oluşumunu yavaşlatabilir veya engelleyebilir) ve hücre içi protein yapısını dengelemektir (Szeptycki ve Bentov, 2016).

Vitrifikasyon yönteminde birden fazla kriyoprotektan bileşeni kullanılırken, yavaş dondurma yönteminde genelde sadece bir adet kriyoprotektan kullanılır. Dondurma solüsyonları, tampon solüsyon ile birlikte hazırlanmaktadır. Bunun için geleneksel olarak, “*phosphate-buffered saline supplemented*” (PBS) kullanılır. Pugh ve ark. (1998) tarafından, dondurma solüsyonuna protein eklenmesinin (BSA), dondurma sonrası embriyo canlılığı üzerinde etkili olabileceği belirtilmiştir. Dondurma solüsyonlarında kullanılan kriyoprotektanlar, hücre içine penetre olabilen ve penetre olmayan olarak iki grupta incelenebilmektedir (Gordon, 2003e; Bondioli, 2015).

#### **1.3.1.1. Hücre İçine Penetre Olabilen Kriyoprotektanlar**

Hücre içine penetre olabilen kriyoprotektanlar, hücre membranını geçerek etki ederler. Hücre dışında kristalizasyona sebep olarak hücrenin dehidrasyonunu sağlarlar. Bu kriyoprotektanların molekül ağırlığı düşük olup, suyu taklit edebilen polar bir molekül yapıları vardır. Hücre içi buz kristali oluşumundan kaynaklanan hasarı önlemek için

kriyoprotektanının hücre içerisine geçmesi gerekmektedir. Bu CPA'lara; etilen glikol (EG), gliserol (GL), dimetilsülfoksit (DMSO), asetamid, propilen glikol (PG), polietilen glikol (PEG), izopropil alkol, etanol örnek verilebilir. Sığır embriyolarının geleneksel yavaş dondurma yöntemi kullanılarak dondurulmasında, bu kriyoprotektanlardan EG ya da GL sıklıkla kullanılmaktadır. Vitrifikasyonda ise, EG, GL'nin yanında DMSO, izopropil alkol, asetamid, PG de kullanılmaktadır (Kasai ve Mukaida, 2004; Kaymaz, 2012; Bondioli, 2015; Szeptycki ve Bentov, 2016).

### **1.3.1.2. Hücre İçine Penetre Olmayan Kriyoprotektanlar**

Hücre içine penetre olmayan kriyoprotektanlar, hücre membranını geçemezler ve etkilerini hücre dışında gösterirler. Bu bileşenler dondurma solüsyonunun ozmolaritesine etki ederek membran stabilizasyonunu sağlarlar. Bunlar genellikle şekerler; sukroz, laktoz, galaktoz, trehaloz, glikoz, rafinoz, sorbitol, fikol, dekstran gibi farklı molekül ağırlığındaki şekerler, polimerler; polivinilprolidon (PVP) ve BSA, FCS gibi proteinlerdir (Palasz ve Mapletoft, 1996; Kasai ve Mukaida, 2004; Kaymaz, 2012; Bondioli, 2015; Szeptycki ve Bentov, 2016). Bu kriyoprotektanlar özellikle çözündürme sonrasında hücre membranından su geçişini kontrol etmek amacıyla kullanılırlar. Bu kriyoprotektanlar vitrifikasyon yönteminde yavaş dondurma yöntemine göre daha sık kullanılmaktadır (Bondioli, 2015).

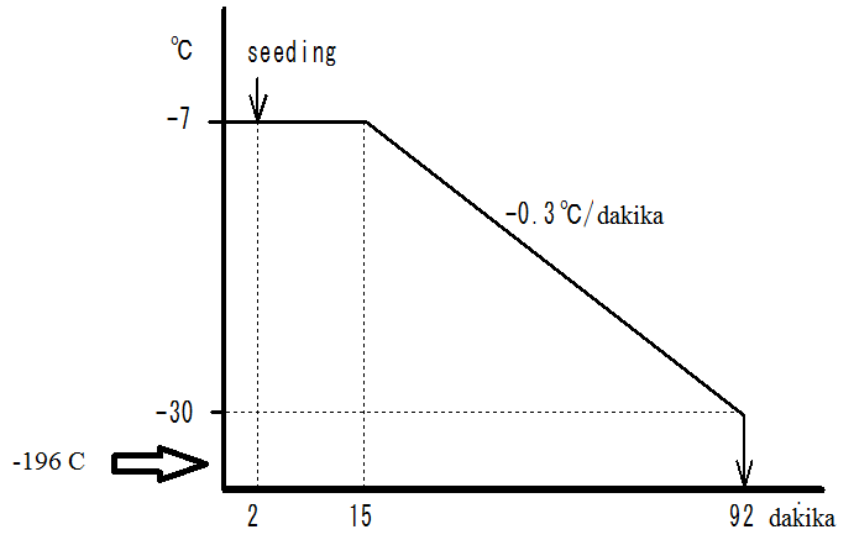
### **1.3.2. Dondurma Yöntemleri**

#### **1.3.2.1. Yavaş Dondurma**

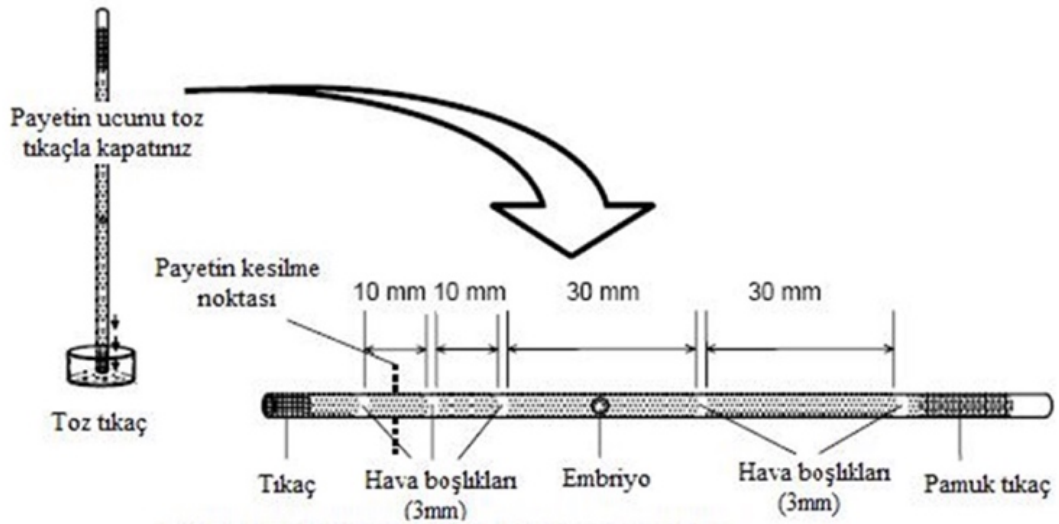
Yavaş dondurma, özellikle ticari olarak üretilen sığır embriyolarının dondurulmasında en fazla kullanılan yöntemdir. Çiftlik koşulları altında yavaş dondurma yöntemi ile dondurulan embriyoların çözündürülmesi ve çözündürme sonrası başarısının nispeten daha fazla olması bu yöntemin tercih sebebini artırmaktadır (Inaba ve ark., 2016).

Polge ve ark. 1949 yılında, yanlışlıkla gliserolün kriyoprotektan özelliğini keşfetmeleriyle yavaş dondurma yönteminin kapısı açılmıştır. Yavaş dondurma yöntemi, düşük konsantrasyonlu kriyoprotektan ile hücreler arası buz kristali oluşturarak ısının yavaşça düşürülmesi ve suyun hücrelerden çekilmesi prensibi ile çalışmaktadır. Dondurma solüsyonları hipertondiktir, hücre ile temas ettikleri anda hücre büzülür sonrasında ise kriyoprotektanlar hücre içerisine girerken hücre yavaşça normal boyutuna gelir. Yavaş dondurma yönteminin en büyük avantajı kimyasal toksisiteye ve ozmotik şoka sebep olan CPA'ların düşük konsantrasyonda kullanılıyor olmasıdır (Arav, 2014; Bondioli, 2015).

Yavaş dondurma yönteminde programlanabilir bir dondurma cihazı kullanılmaktadır. Bu cihaz ile dondurma sırasında sıcaklık,  $-5/-7^{\circ}\text{C}$ 'den  $-30/-35^{\circ}\text{C}$ 'ye düşürülmektedir. Bu yöntemde, CPA ile embriyoların dengelenmesi oda sıcaklığında gerçekleşmekte ve ortalama 10 dakika (dk) sürmektedir. Embriyolar payetlere yerleştirilir ve dakikada  $1-2^{\circ}\text{C}$  düşerek  $-6/-7^{\circ}\text{C}$ 'ye daha önceden soğutulmuş olan programlanabilir dondurma cihazına alınır. Burada yaklaşık iki dakika bekletildikten sonra daha önceden sıvı azot ( $\text{LN}_2$ )'ta soğutulmuş penset ya da pamuklu çubuk yardımıyla buz kristali oluşumu uyarılır buna "*seeding*" işlemi denir. Bu şekilde soğutulan payetlerde süper-soğutma oluşacak ve buz kristali oluştuğunda oldukça kısa bir sürede sıcaklık düşecektir. *Seeding* sonrası dondurma solüsyonları ile buz kristali ve embriyo arasında meydana gelen ozmotik dengeyi sağlamak için sıcaklık birkaç dk (13-15 dk) sabit tutulur. Hücre içinde buz kristali oluşturmadan hücrelerden su çekilmesine izin veren soğutma hızı, membran geçirgenliği ve hücre boyutunun birleşimi ile belirlenmektedir. Bu hız sığırlarda moruladan blastosist evresine kadar  $0.3-0.5^{\circ}\text{C}$ 'dir. Böylece sıcaklık dk'da  $0.3-0.5^{\circ}\text{C}$  düşürülerek  $-30/-35^{\circ}\text{C}$ 'de programın tamamlanmasıyla payetler  $\text{LN}_2$ 'e alınarak, yavaş dondurma protokolü tamamlanır (Şekil 1.13) (Hasler, 2009; Bondioli, 2015; Takayama ve ark. 2016). *Seeding* adımı embriyonun canlılığı için oldukça önemlidir ve dikkatli uygulanmalıdır (Massip, 2001). Yavaş dondurma protokolünde embriyoların payetlere alınması Şekil 1.14'de gösterilmiştir.



Şekil 1.13. Yavaş Dondurma Protokolü (Kaymaz, 2012).



Şekil 1.14. Yavaş dondurma protokolünde embriyoların payetlere alınması (Kaymaz, 2012).

Gupta ve ark. (2015) tarafından, IVP elde edilen morula aşamasındaki sığır embriyolarının, mevsime göre gelişimi ve yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri ile dondurulup çözdürülmelerini takiben canlılıkları karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda sığır morularının dondurulmasında yavaş dondurma yönteminin (1.5M gliserol + 5% (v/v) buzağı serumu-CS ve *Dulbecco's Phosphate Buffer Saline-D-PBS* solüsyonu) vitrifikasyondan daha az başarılı olduğu ancak dondurma yöntemi olarak yavaş dondurma kullanılacaksa mevsimsel olarak kış ve ilkbaharda daha fazla başarı elde edilebileceği bildirilmiştir.

Takayama ve ark. (2016), IVP sığır embriyolarını yavaş dondurma yöntemi ile dondurarak düşük konsantrasyonda EG'nin embriyo canlılığı üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Farklı yoğunluklarda EG kullanılarak üç farklı dondurma solüsyonu hazırlanmıştır (1.2 ya da 1.5 EG + 0.1M sukroz + %20 FCS + D-PBS ve 1.4 G + 0.25 sukroz + %20 FCS + D-PBS). Bunun sonucunda solüsyonda kullanılan kriyoprotektanın çeşidi ya da konsantrasyonunun embriyo canlılığında etkisiz olduğu ancak IVP embriyolarda kullanılan EG konsantrasyonunun azaltılabileceği belirtilmiştir.

Imai ve ark.'nın 1997 yılında yaptıkları çalışmada, in vitro kültür solüsyonuna (CR1 ve %5 CS) farklı yoğunluklarda eklenen linoleik asit albümin (LAA)'nin, dondurulan IVP sığır embriyolarının üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bunun sonucunda LAA'nın embriyoların gelişim yetenekleri üzerinde herhangi bir etkisi olmamasına rağmen yavaş dondurma sonrası canlılık oranlarının arttığı bildirilmiştir. Ancak Miyashita ve ark. (2011)'nin yaptıkları çalışmada, in vitro elde edilen sığır embriyolarının kültür solüsyonuna LAA ve L- karnitin eklendiğinde, blastosist aşamasına ulaşma yeteneklerinin arttığı bildirilirken donma toleransı üzerindeki etkileri doğrulanmamıştır. Block ve ark. (2015) ise, maturasyon solüsyonuna eklenen L- karnitin ve trans-10,cis-12 konjuge linoleik asit (CLA)'in, IVP sığır blastosist ve ekspanded blastosistlerinin gelişimi ve 1.5M etilen glikol ile dondurulma sonrası canlılıkları üzerine etkisini araştırmıştır. L-karnitinin çözündürme sonrası re-expansiyon ve *hatching* oranı üzerinde etkisi bulunmazken, CLA'nın bu oranları azalttığı belirtilmiştir. Hem CLA hem de L-karnitin'nin çözündürme sonrası viyabiliteye ya da embriyo gelişimi üzerine yararlı bir etkisi olmadığı bildirilmiştir.

#### **1.3.2.1.1. Direkt Transfer Yöntemi ile Embriyoların Dondurulması**

Sığır embriyolarının direkt transferinde EG, düşük toksisiteye ve yüksek permeabilitiyeye sahip olması nedeniyle etkili bir kriyoprotektandır (Dochi ve ark., 1995; Massip, 2001). EG'nin moleküler ağırlığı düşüktür ve çözödüren embriyolar izotonik ortama koyulduğunda EG, ozmotik dengeye ulaşmak için embriyoların

şişmesine ya da rupturuna izin vermeden su kadar hızlı hücrelerden dışarı çıkmaktadır. Bu yüzden uterusu herhangi bir ozmotik hasara neden olmadan embriyolar çözündürülüp direk olarak alıcılara transfer edilebilmektedir. Bu sisteme de “direkt transfer” adı verilir ve ET endüstrisinde geleneksel bir model haline gelmiştir (Hasler, 2009). Voelkel ve Hu 1992 yılında yaptıkları çalışma ile, sığır embriyoları için 1.5M konsantrasyonlu EG'nin etkili olduğu bildirilmiştir. Direkt transfer çiftlik şartları altında oldukça pratik bir yöntemdir. Çünkü kriyoprotektanın dilüsyonu için herhangi bir laboratuvar gerecine gerek duyulmamakla birlikte kriyoprotektanların dilüsyonları sırasında oluşma ihtimali olan bütün hataları ortadan kaldırır. İn vivo sığır embriyolarında 1.8M etilen glikol kullanılarak yapılan direkt transferde izotonik solüsyon ile dilüsyon yapılabileceği ancak dilüsyon sırasında sıcaklığın oldukça önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (Dochi ve ark., 2000).

### **1.3.2.2. Vitrifikasyon**

Vitrifikasyon, embriyo dondurma yöntemleri arasında oldukça iyi bilinen bir teknik olup buz kristali oluşturmadan “cam benzeri yapı” oluşturularak suyun katılaştırılmasıdır. Yavaş dondurma metoduna alternatif olarak geliştirilmiştir. Yavaş dondurmaya göre daha ucuz, uygulama süresinin oldukça kısa olması avantajları iken, kullanılan kriyoprotektanların yüksek dozda olması embriyoda toksik etkiye sebep olabilmektedir (Kaymaz, 2012; Min ve ark., 2013).

Vitrifikasyonda kullanılan kriyoprotektanın yoğun olması buz kristali oluşumunu çoğunlukla engellemekte ve  $-196^{\circ}\text{C}$ 'ye kadar ( $>5000^{\circ}\text{C}/\text{dk}$ ) ultra hızlı soğutma gerçekleştirilmektedir. Camlaşma, viskozitenin aşırı artmasıyla şekillenirken bu süreç birçok faktörle kolaylaştırılır. Penetre olabilen ve penetre olmayan yüksek konsantrasyonlu kriyoprotektan solüsyonları kullanılarak soğuma artırılır, çözdürme oranları ve heterojen buz oluşumunu engellemek için hacim azaltılır. Soğuma sırasında yüksek hidrostatik basınç buz oluşumunu engellemektedir. Hücre, tehlikeli sıcaklık alanından hızla geçerken ( $+24^{\circ}\text{C}$ 'ten  $-5^{\circ}\text{C}$ 'ye) hücre hasarı minimuma indirilmektedir. Böylece dondurma ve çözdürme adımları sırasında kristalizasyondan



kaçınarak embriyo direkt olarak likit nitrojen içerisine bırakılabilir (Vanderzwalmen ve ark., 2002; Vajta, 2013; Wong ve ark., 2014; Gupta ve ark., 2015).

Embriyoların vitrifikasyon solüsyonlarına maruz kalma süreleri kısadır. Vitrifikasyon solüsyonları hazırlanırken iki ya da daha fazla kriyoprotektan farklı yoğunluklarda kullanılır ve embriyo adım adım solüsyonlara maruz bırakılarak ekilibrasyon sağlanır. Örneğin; birinci vitrifikasyon solüsyonu (VS1)'na alınan embriyonun burada pipet yardımıyla yıkanarak dengelenmesi sağlanır. Daha sonra yoğunluğu VS1'den daha fazla olan ikinci vitrifikasyon (VS2) solüsyonuna alınarak vitrifiye edilirler. Böylece kriyoprotektanların embriyo üzerindeki toksik etkileri azaltılabilmektedir. DMSO, GL, EG ya da bunların karışımı vitrifikasyonda kullanılan temel kriyoprotektanlardır. Sukroz gibi penetre olamayan bileşenlerin solüsyona eklenmesiyle hücre içerisindeki kriyoprotektan miktarı azaldığı için toksisite de azalmaktadır. Ayrıca suyun hücre içine hızlı hareket etmesi hücrenin şişmesine sebep olur ve sukroz hücrenin aşırı şişmesini önlemektedir. Vitrifikasyon solüsyonları hazırlanırken, iki ya da daha fazla penetre olabilen ve bir tane de penetre olamayan kriyoprotektanlar birlikte kullanılabilir. Buna; %15–20 EG, %15–20 DMSO ve 0.3–0.5 mol/L sucrose gibi ya da GESXB (Gliserol - Etilen Glikol - Sukroz - Xylose - BSA)'den oluşan kombinasyonlar örnek verilebilir (Kanagawa ve ark., 1995; Lane ve ark., 1999; Massip, 2001; Prentice ve ark., 2011; Kaymaz, 2012; Bondioli, 2015).

Vitrifikasyon sırasında hazırlanan kriyoprotektan konsantrasyonu yeterince yüksek değil ya da embriyonun solüsyonlara maruz kalma süreleri az ya da fazla ise hücrede buz kristali oluşabilmektedir (Kasai ve Mukaida, 2004). Özdaş ve ark. (2012)'de yaptıkları çalışmada *in vitro* elde edilen sığır embriyolarının vitrifikasyon yöntemi kullanılarak dondurulması sırasında embriyoların kriyoprotektana maruz kalma süreleri 15, 30, 60, 90 saniye ve gelişim oranları sırasıyla %52,2; %45,3; %22,2; %5 bulunmuştur. Bunun sonucunda vitrifikasyon sırasında hücrelerin CPA'lara maruz kalma sürelerinin önemli olduğu belirtilmiştir. Stinshoff ve ark., 2011 yılındaki çalışmada geleneksel yavaş dondurma ve vitrifikasyon protokollerini karşılaştırılmış ve SOF solüsyonu ile kültüre edilen embriyolarda vitrifikasyon metodunun daha uygun olabileceği bildirilmiştir.

### 1.3.2.3 Hızlı Soğutma Sistemleri

Vitrifikasyon ya da yavaş dondurma sırasında meydana gelen buz kristali oluşumu ve çözündürme sonrasında embriyoların canlılık oranlarının düşük olması sebebiyle vitrifikasyon metotları modifiye edilerek “ultra hızlı dondurma” sağlayan taşıyıcı sistemler oluşturulmuştur. Bunlar en az hacimde solüsyon taşıyarak (örneğin <1 µl) ısı iletimini artırır ve böylece hücrenin çok çabuk soğuması sağlanabilir. Ayrıca bir miktar solüsyon ile birlikte embriyonun sıvı azot ile doğrudan temas etmesi sağlanır. Bu sistemler iki gruba ayrılabilirler; yüzey teknikleri ve boru teknikleri (Kasai ve Mukaida, 2004; Inaba ve ark., 2011; Saragusty ve Arav, 2011; Min ve ark., 2013; Arav, 2014; Wong ve ark., 2014). Boru teknikleri plastik payetlerden oluşmaktadır. Bunlar; *open-pulled straw* (OPS), *closed pulled straw*, *superfine open-pulled straw*, *flexipet-denuding pipette*, *sealed pulled straw*, *CryoTip*, *Cryopette*, *pipette tip*, *high-security vitrification device* ve *Rapid-i*'dir. Yüzey teknikleri ise; *Cryo-E*, *solid yüzey*, *Hemi-straw*, *elektron mikroskop grid*, *nylon mesh*, *minimum drop size teknik*, *Cryotop*, *Cryoloop*, *Cryoleaf*, *Vitri-Inga*, *direct cover vitrification*, *fiber plug*, *vitrifikasyon spatula* ve *plastic blade*'tir. Yüzey yönteminde; kullanılan damla miktarı (0.1 µl) ayarlanabilir ve soğutma oranı yüksektir. Bu sistemlerin yapısı açıktır ve çözündürme solüsyonuna direk olarak maruz kaldıkları için çözündürme oranları yüksektir. Boru tekniğinin ise kapalı sistemler arasında yüksek soğutma oranını elde etme avantajına sahip olması onları hem daha güvenli hem de daha kolay kullanılmasını sağlar (Prentice ve ark., 2011; Arav, 2014).

Herrera ve ark. (2010), OPS ve cryoloop teknikleri kullanılarak dondurulan IVP embriyoların çözündürme sonrası re-ekspansiyon ve *hatching* oranlarını karşılaştırdığında cryoloop tekniğinin OPS ve 0.25 payet tekniklerinden daha etkili olduğu ve embriyonun kriyotoleransının da kullanılan teknikten etkilendiğini bildirmiştir. Koyama ve ark. (2007), embriyolar cryoloop tekniği ile vitrifiye edilmeden önce VS1 solüsyonuna kısa (1 dk) ve uzun (5 dk) süreli maruz bırakılmalarını karşılaştırmıştır. Çözündürme sonrasında kısa ve uzun süre gruplarında embriyo canlılığı sırasıyla %94 ve %94.1 olarak bulunmuş böylece ön dengeleme solüsyonundaki süre uzunluğunun embriyoların re-ekspansiyonunda etkili olmadığı ve

8 hücreli embriyolarda CPA'nın hücreye penetrasyonun yetersiz olabileceği bildirilmiştir.

Hipotermik (+4) ve kriyojenik (-196) sıcaklıklarda etkili olan birçok hücre depolama ortamı, embriyonların güvenli depolanması ve taşınması için 1940'lardan beri geliştirilmiştir. Bunlardan LN<sub>2</sub> kullanımı üreme teknikleri arasında en baskın olanıdır. Ancak dondurma ve çözündürme aşamaları sırasında embriyolarda meydana gelen hasarlar sebebiyle gebelik oranları taze olanlara göre daha düşük olmaktadır. Bu yüzden hipotermik depolama metotlarının fizibilitesi araştırma ihtiyacı duyulmuş ve bu gibi yöntemlerin, canlılıkları yüksek olan ve birkaç gün içinde alıcılara aktarılması planlanan embriyoların üretilmesinde uygulanabilirliği araştırılmaktadır (Ideta ve ark., 2013). Embriyoların 0 ile +10 °C sıcaklıkta PBS içerisinde payetlere yüklenerek kısa periyotlarda (1-2 gün) dondurulması yapılabilmekte ve bu yöntem vitrifikasyon ya da dondurma yöntemleri yerine tercih edilebilmektedir (Gordon, 2003e; Kaymaz, 2012). Yapılan bir çalışmada, %50 FBS (Föetal sığır serumu) içeren PBS ile %50 FBS içeren M-199 solüsyonlarıyla +4°C'de 72 saat süre ile yapılan depolamada, M-199 solüsyonunda daha fazla oranda *hatching* embriyo elde edilmiştir. Bu teknik ile LN<sub>2</sub>'ye gereksinim duyulmadan embriyoların alıcılara transferinin yapılabileceğinin mümkün olduğu gösterilmiştir (Ideta ve ark., 2013).

#### **1.4. Dondurulan Sığır Embriolarının Çözündürülmesi**

Dondurulan sığır embriolarında en iyi viyabilitenin sağlanması için payetlerin hızlı çözündürülmesi gerekmektedir. Bu durumun yavaş bir şekilde gerçekleşmesi, çözündürme sırasında buz kristali oluşturarak embriyoya zarar verecektir. Yavaş dondurma yöntemiyle dondurulan embriyolar çözündürülürken su banyosundan önce payetin havada yaklaşık 30 saniye tutulması ZP hasarını azaltır ve sonrasında 35-37 °C'de ısıtılmış olan su banyosuna aktarılan payet, buz kristalleri çözülünceye kadar su banyosunda bekletilmektedir (Gordon, 2003e; Bondioli, 2015). Vitrifikasyon yönteminde ise sıvı azot tankından çıkarılan payetler 10 saniye havada tutularak, kullanılan vitifikasyon yöntemine göre sıcaklığı 20-30°C'ye ayarlanmış su

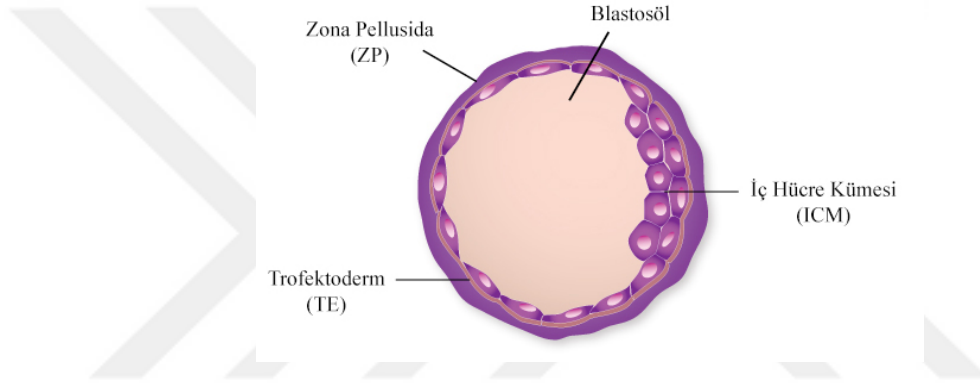
banyosunda çözdürülmektedir (Kaymaz, 2012). Direkt transfer yöntemiyle dondurulan embriyolarda transfer öncesinde kriyoprotektanın uzaklaştırılması gerekmemektedir çünkü EG alıcının uterusuna aktarıldığında dilue olmaktadır (Gordon, 2003e).

Sığır IVP embriyolarının vitrifikasyonu sonrasında meydana gelen, hücre içi ve hücre dışı ortamlar arasındaki kriyoprotektan ve suyun yer değişimi, hücre içinde ve hücre membranında hasara sebep olabilmektedir. Bu da dondurma ve çözdürme adımlarında ozmotik stres ile sonuçlanır. Beta-merkaptoetanol ( $\beta$ -ME) gibi düşük moleküler ağırlığına sahip olan *thiol* bileşikler, hücrelerin oksidatif hasar sonucu ortaya çıkan zararlı etkilerden korunması için etkili olabilirler.  $\beta$ -ME'nin detoksifikasyon etkisi dondurma sonrasında hücrelerin canlı kalmasına yardımcı olur ve özellikle vitrifikasyon sonrasında blastosist dejenerasyonunu önlemektedir (Feugang ve ark., 2004; Nedambale ve ark., 2006). Çözdürme sonrası kültür solüsyonuna  $\beta$ -ME dışında hücre membranını korumak için BSA, LAA gibi maddeler de eklenebilmektedir (Kaymaz, 2012). Vitrikiye edilen sığır blastosistlerinin çözdürülme sonrasında kültür solüsyonuna eklenen  $\beta$ -ME ile canlılık, re-ekspansiyon, *hatching* oranı ve toplam hücre sayısı artmaktadır. Ayrıca  $\beta$ -ME'nin, KSOM ya da CR1 solüsyonlarına kıyasla SOF solüsyonuyla daha olumlu bir etkileşimi olduğu vurgulanmaktadır (Nedambale ve ark., 2006).

Vitrikiye edilen embriyoların çözdürülmesi sırasında çeşitli yoğunlukta dilüsyon solüsyonları kullanılarak CPA'nın hücreden uzaklaştırılması gerekmektedir. Ancak bu durum çiftlik koşulları altında pratik olmamaktadır. Yapılan bir çalışmada kriyolojik vitrifikasyon yöntemiyle vitrikiye edilen sığır embriyolarının payet içerisindeki kriyoprotektan dilüsyonunda tek adım çözdürmenin direkt ET için uygun olduğu bildirilmiştir (Caamaño ve ark., 2015). Blastosist evresindeki embriyoların çözdürme sonrası canlılıkları çoğunlukla re-ekspansiyon yetenekleri ile değerlendirilir. Yapılan bir çalışmada, dondurulan ve vitrikiye edilen sığır blastosistlerinin, çözdürme sonrasındaki re-ekspansiyon kontrolünün dondurulanlarda 24 saatten, vitrikiye edilenlerde 12 saatten önce incelenmemesi önerilmiştir (Inaba ve ark., 2016).

### 1.5. Dondurma Öncesinde Embriyolardan Blastosist Sıvısının Uzaklaştırılması (*Artificial Collapse-AC-AS*)

Memeli blastosisti, küresel ve içi sıvı dolu 50 ile 140 sayıda hücrenin bir araya gelmesinden oluşan, uterusu implante olmamış erken embriyo aşamasıdır. Bu hücreler embriyonun dışını saran TE hücrelerine farklılaşarak plasentayı oluştururken farklılaşmamış olan ve ICM olarak adlandırılan hücreler ise embriyonun gelişiminden sorumludur (Şekil 1.15) (Jensen ve ark., 2014).



Şekil 1.15. Blastosistin yapısı (Anonim 2).

Embriyolar moruladan blastosist aşamasına kadar çeşitli morfolojik değişiklikler geçirmektedir. Erken dönem embriyolar ile karşılaştırıldığında blastosist ve ekspanded blastosistler blastosöl adı verilen içi sıvı dolu kaviteye sahiptirler. Sodyum pompası ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ATPaz- adenozin trifosfataz) aracılığı ile sıvı birikerek blastosist genişler ve ZP ve TE'ye basınç yapar. Blastosist ve ekspanded blastosistlerde blastosöl en fazla sıvıya sahipken morula evresindekilerde sıvının büyük kısmı hücre içinde yer almaktadır (Vanderzwalmen ve ark., 2002; Hur ve ark., 2011). Blastosöl sıvısının bileşimi ve fonksiyonu TE ve ICM'nin lavajı olduğu tahmin edilmekte ancak tam olarak fonksiyonu bilinmemektedir. Blastosöl sıvısı, implantasyon öncesi embriyonun gelişiminde hücre sel sürece destek olmakla birlikte hücre göçü için de kritik bir rol oynamaktadır (Jensen ve ark., 2014).

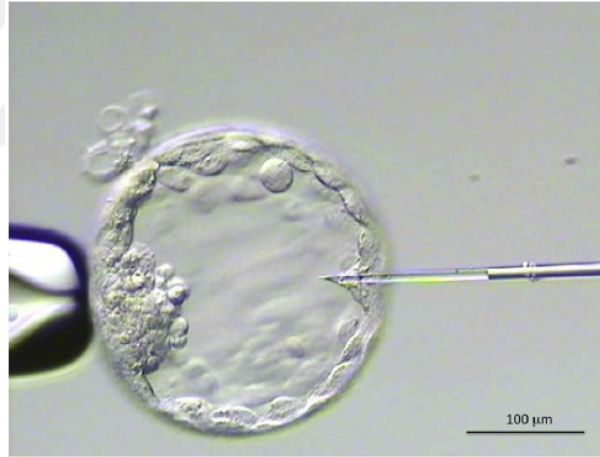
Kriyoprotektan maddeler ile hazırlanan hipertonic dondurma solüsyonuna embriyo transfer edildiğinde, “aquaporin” olarak isimlendirilen su kanallarından ozmoz ile su dışarıya çıkar. Kriyoprotektanların hücre içine girmesiyle hücrel kontraksiyon gerçekleşir ve embriyo büzülür. Hücreler arası sıvı dengesi sağlandıktan sonra embriyonun sıfırın altındaki derecelere maruz kalmasıyla ozmoz ile ikinci bir su kaybı meydana gelir. Ancak blastosist sıvısının hacminin artması hem dondurma hem de çözündürme sırasında dezavantaja sebep olabilmektedir. Blastosöl miktarının artmasıyla hücre içine yetersiz kriyoprotektan girişi, buz kristali oluşma olasılığını artırmaktadır. Embriyo bu dönemde dondurmaya karşı daha duyarlıdır. Bununla birlikte çözündürme sırasında blastosist kavitesinde kalan sıvı da canlılık oranını düşürmektedir (Liebermann ve Conaghan, 2013).

Blastosistlerde dondurma sonrası meydana gelen canlılık kaybının, dondurma prosedürü sırasında oluşan buz kristalinin fiziksel hasara yol açması sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu da muhtemelen kriyoprotektanların (Etilen glikol- Ficoll- Sukroz) yetersiz penetrasyonu ya da soğutma hızının yavaş olması sebebiyle dondurma sırasında blastosölde buz oluşumuna sebep olarak, embriyoya hasar vermektedir. Beşeri alanda yapılan bir çalışmada, blastosist ve ekspanded blastosistin vitrifikasyondaki başarısını artırmak için, blastosölün suni olarak uzaklaştırılması, düşük ısı derecesinde buz kristali oluşumunun azalmasına sebep olduğu, bunun da çözündürme sonrası embriyoların yaşam kabiliyetini artırdığı bildirilmektedir (Vanderzwalmen ve ark., 2002). Beşeri ART (Yardımcı Üreme Teknikleri) uygulamalarında hastadan elde edilen embriyoların dondurulması istendiğinde rutinde blastosöl suni olarak uzaklaştırılmaktadır (Kaymaz ve ark., 2015).

Blastosist sıvısının uzaklaştırılmasında, blastosist sıvısının aspirasyonu, lazer atışı, iğne punksiyonu, pipet kullanımı, ozmotik daralma gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Son ve ark., 2003; Liebermann ve Conaghan, 2013; Barfield, 2014).

### 1.5.1. Blastosist Sıvısının Aspirasyonu

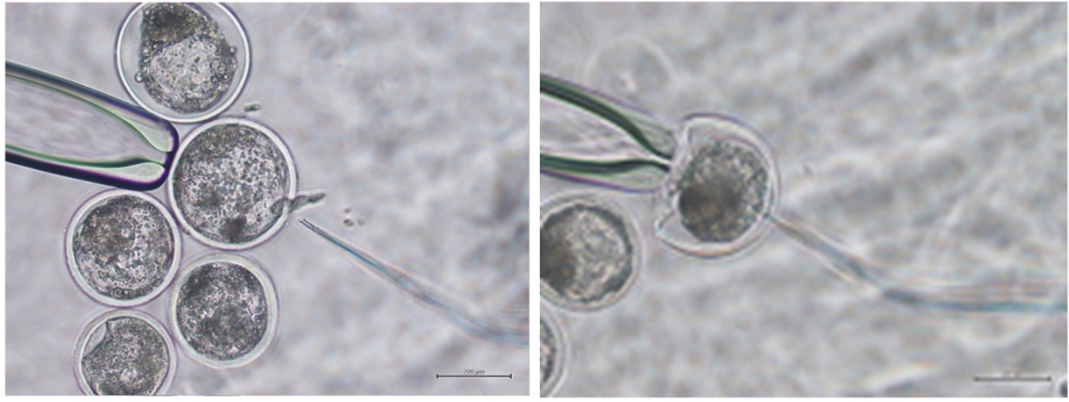
Bazı yazarlar tarafından blastosist sıvısından, insan IVF'inde en iyi embriyonun transfer öncesi seçiminin yapılabilmesi (D'Alessandro et al. 2012) ve implantasyon öncesi genetik tanı (PGD) yani transfer öncesi genetik hastalıkların belirlenmesinin mümkün olduğundan bahsedilmektedir (Palini ve ark. 2013; Jensen ve ark., 2014). Palini ve ark.'nın 2013 yılında yaptıkları çalışmada, insan embriyolarının vitrifikasyonu sırasında toplanan blastosöl sıvısından ilk kez genomik DNA elde edilmiş (Şekil 1.16) ve Jensen ve ark., (2014) ise sığırlarda blastosist sıvısı ve blastosist hücrelerinden ilk proteomik analizi gerçekleştirmişlerdir. Bu çalışmanın, hem insanlarda hem de çiftlik hayvanlarında in vitro fertilizasyon, kök hücre derivasyonu ve kültürü alanlarında elde edilen ilerlemeyi destekleyecek nitelikte olduğundan bahsedilmektedir.



**Şekil 1.16.** Blastosöl sıvısının aspirasyonu (Palini ve ark., 2013).

Chen ve ark. 'nın (2005), farelerde yaptıkları çalışmada, vitrifikasyon öncesi blastosöl sıvısının 0.3-0.5 nl kadar aspirasyonu ile blastosistlerin canlılık oranlarında in vivo'larda olduğu gibi artış tespit edilmiştir. Ayrıca OPS kullanılması ve *microsuction* yapılmasının buz kristali oluşumunu engellediği, böylece vitrifikasyonun kolaylaşmasına olanak sağlayarak vitrifiye edilen blastosistlerdeki mekanik hasarın azaldığı belirtilmiştir. At embriyoları ile yapılan çalışmalarda; Herrera ve ark. (2015), embriyoların blastosöl sıvısının aspirasyonu ile cinsiyetlerini

belirlemiş ve blastosöl sıvısı aspirasyonunun embriyonun canlılığını etkilemediği, bu yöntem ile implantasyon öncesi genetik anomalilerin tespiti ve cinsiyet tayininin yapılabilineceğini bildirmişlerdir. Hinrichs ve Choi, (2016)'nın çalışmasında da vitrifikasyon öncesinde Piezzo Drill ile embriyo kapsülüne delik açılarak blastosölün kollapsı ya da standart spermatozoon enjeksiyon pipeti kullanılarak blastosölün aspirasyonunun, dondurma prosedüründe başarı sağladığını belirtmişlerdir. Şekil 1.17'da expanded blastosistin mikromanipülatör ve ICSI (İntra sitoplazmik sperm enjeksiyonu) pipeti kullanılarak (Olympus IX73, Japan) aspirasyonu gösterilmektedir.



**Şekil 1.17.** Blastosist sıvısının aspirasyonu (Olympus IX73, Japan) (Ankara Üniversitesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı. Onur, 2016).

Sığır IVF ve somatik hücre nükleer transferi (SCNT)'nden elde edilen *hatching/hatched* blastosistlerde yapılan başka bir çalışmada, 29 G (gauge) iğne ile blastosistlerin ICM'si saat 12-6 yönünde sabitlenerek istenilen kalınlıkta ayarlanan pastör pipeti TE hücrelerine doğru itilerek, blastosöl kavitesi daraltılmış ve bu yöntemin her iki grupta da canlılığı artırdığı bildirilmiştir (Min ve ark., 2013).

### 1.5.2. Lazer Kullanımı

Bu yöntem lazer eklentili bir mikroskop kullanılarak yapılmakta ve diğer yöntemlerde olduğu gibi *holding* pipet ya da iğnelere gereksinim duyulmamaktadır. Trofektoderme gönderilen bir lazer atışı blastosölün kollapsına sebep olmaktadır (Barfield, 2014). Mukaida ve ark.'nın (2006), yaptıkları çalışmada, embriyolar lazer ve mikropipet yöntemleriyle kollabe edildikten sonra vitrifiye edilmişlerdir. Farklı yöntemlerle



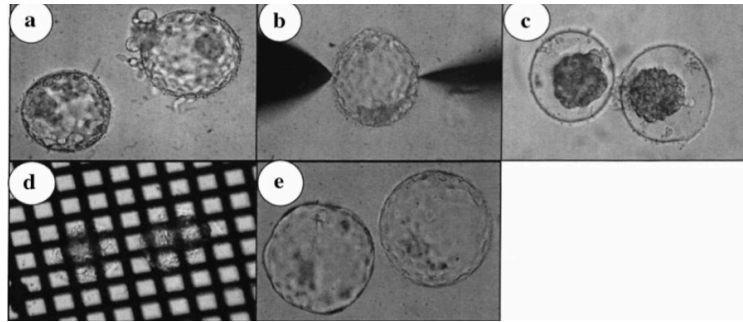
kollabe edilen embriyolarda başarı oranları benzer bulunurken, kollabe edilmeyenlerde bu oran daha az bulunmuştur.

Bu yöntemde tek bir lazer darbesi anlık ısı etkisi ile embriyoda yeterli büyüklükte delik açılmasına olanak sağlamakta ve 1-2 dk içerisinde kollaps gerçekleşmektedir. Ancak bu anlık yüksek ısı trofektoderimde hücre dejenerasyonuna sebep olmaktadır. Lazer atışı kullanımında poresedürden önce iğne hazırlığına ve manipülasyon evresinde blastosistin tutulmasına gerek yoktur (Mukaido ve ark., 2006).

Desai ve ark.'nın (2008), insan ve fare blastosistlerinde yaptıkları çalışmada mekanik olarak (ICSI iğnesiyle) ya da lazer atışı kullanarak vitrifikasyon öncesinde blastosistin kollapsı sağlanmış ve her iki yönteminde expanded blastosistlerde DNA hasarını azalttığı ve çözdüme sonrası re-ekspansiyonu hızlandırdığı bildirilmiştir.

### 1.5.3. İğne Punksiyonu

Son ve ark. (2003), insanlarda yaptıkları vitrifikasyon protokolüne blastosist kollapsını ekleyerek bu durumun canlılık ve *hatching* oranlarına olan etkisini araştırmışlardır. Yapılan bu çalışmada blastosistin kollapsında 29 G iki iğne kullanılarak yapılmış ve suni kollaps yönteminin dondurma protokollerinde kullanışlı olduğu bildirilmiştir (Şekil 1.18).

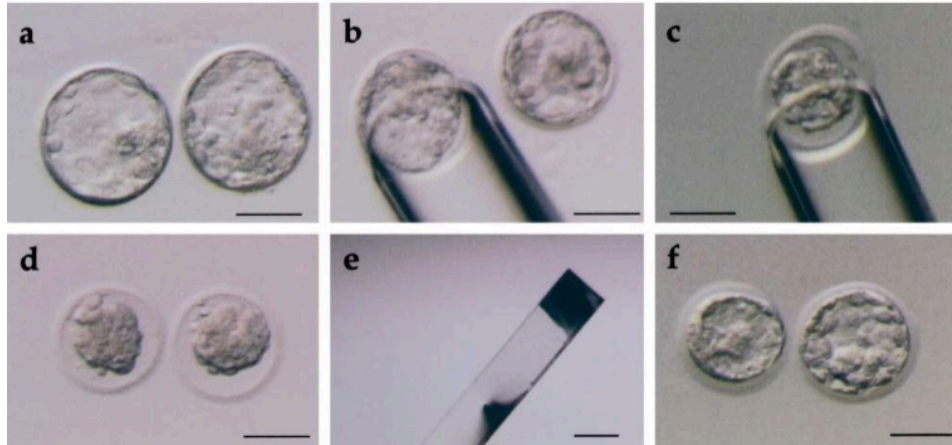


**Şekil 1.18.** AC sonrası insan expanded blastosistlerin elektron mikroskop (EM) grid ile dondurulup çözülmesi a. AC öncesi, b. AC sırasında, c. AC sonrası, d. EM grids yüklenmesi, e. Çözdüme sonrası 18. saatte *hatching*. Orijinal büyüme Q100 (Son ve ark., 2003).

Beşeri taze embriyolarda yapılan başka bir çalışmada ise 29 G iğne ve lazer atışı kullanılarak suni kollaps yapılmış ve her iki yöntemde de %70'ten fazla re-ekspansiyon elde edilmiştir (Hur ve ark., 2011).

#### 1.5.4. Pipet Kullanımı

İnsan ekspanded blastosistlerinin vitrifikasyonunda pipet kullanılarak suni kollapsın klinikte uygulanması basit ve kullanışlı bir dondurma yöntemidir. Bu yöntem ile yapılan bir çalışmada, ilk önce ekspanded blastosistlerin çapından daha küçük çaplı (yaklaşık 140  $\mu\text{m}$ ) cam bir pipet ile blastosöl hacmi daraltılmış sonrasında yaklaşık 100-120  $\mu\text{m}$  çapındaki başka bir pipet ile embriyo pipetlenmiştir. Bu prosedür blastosöl tamamen kollabe olana kadar 2 ya da 3 kez tekrarlanmıştır. Pipetleme sırasında zona ve blastosistin şekli bozulmuş olsa da embriyoların zonası bütün olarak kalmıştır (Şekil 1.19). Beşeri IVF alanında yapılan çalışmada, blastosistin çapından daha küçük çaptaki cam bir pipet kullanılarak ekspanded blastosistlerin suni kollapsı sonucunda; çözdüme sonrası canlılık oranı %91, transfer sonrası gebelik oranı %65 ve implantasyon oranı ise %61 olarak bulunmuştur (Hiraoka ve ark., 2004).



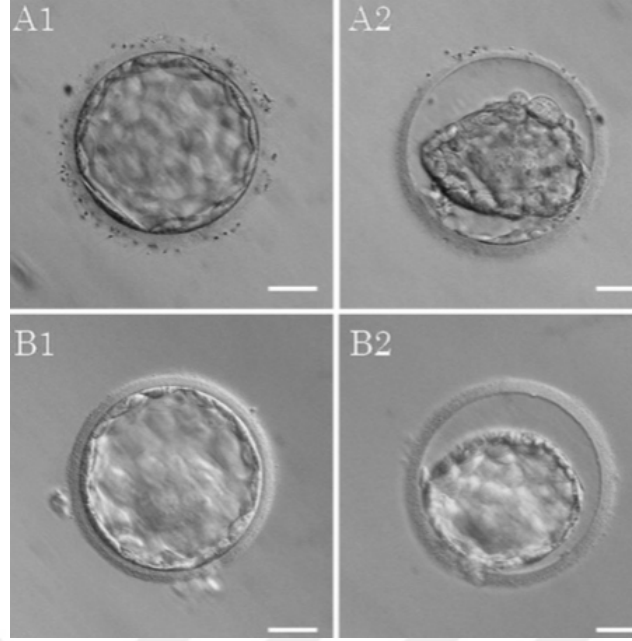
**Şekil 1.19.** AC uygulanan insan ekspanded blastosistlerin dondurulması ve çözdürlmesi. a. AC öncesi b. 140  $\mu\text{m}$  çaplı cam pipet ile AC c. 120  $\mu\text{m}$  çaplı cam pipet ile AC d. AC sonrası e. Dondurma solüsyonu ile *cryotop*'a alınması f. Çözdüme sonrası 3. saat (Hiraoka ve ark., 2004).

### 1.5.5. Ozmotik Daralma

Embriyoların kollapsı, hiperozmotik sukroz solüsyonlarına maruz bırakılması ile de yapılmakta ve bunun için özel ekipmanlara ya da mikromanipülasyon deneyimine ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu yöntem sadece blastosist kavitesinin kollabe etmemekte aynı zamanda da embriyonik hücrelerin dehidrasyonunu da sağlamaktadır (Iwayama ve ark., 2011).

Yedinci gündeki sığır embriyoları yavaş dondurma yöntemi ile dondurulmadan önce iki dakika süreyle 0.5 M sukroz solüsyonuna maruz bırakıldığında, bunun çözdürme sonrası canlılık üzerinde etkisi olmadığını bildirilmiştir (Dode ve ark., 2016). Yapılan bir başka benzer çalışmada vitrifikasyon öncesi embriyolar iki farklı yoğunluktaki (0.125 M ve 0.25 M) hiperozmotik sukroz solüsyonunda beşer dk tutularak blastosistin kollapsı gerçekleştirilmiştir (Nunes ve ark. 2014).

Iwayama ve ark. (2011)'nın yaptıkları çalışmada, in vitro üretilen ve vitrifiye edilip çözdürülen insan embriyolarının lazer atışı ya da hiperozmotik sukroz solüsyonu ile suni kollaps sonrası canlılık ve implantasyon oranları araştırılmıştır. Bunun sonucunda; vitrifikasyon öncesi suni kollapsın embriyoların hızlı gelişimlerine olanak sağlayarak implantasyon oranında yüksek bir artış sağladığını bildirmişlerdir (Şekil 1.20).



**Şekil 1.20.** AC yapılan insan ekspanded blastosistleri a. Lazer atışı ile AC b. Hiperotomik Sukroz Solusyonu ile AC (1) AC öncesi (2) AC sonrası. Ölçüm birimi; 50  $\mu$ m (Iwayama ve ark., 2011).

Tez çalışmasında yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleri ile dondurulan embriyoların çözme sonrası viyabilitelerinin artırılması amacıyla; in vitro olarak elde edilen sığır blastosistlerinde yeni bir teknik olan blastosist sıvısının aspirasyonu dondurma öncesinde uygulanarak, kollabe edilen embriyonun yavaş dondurma ve vitrifikasyon ile dondurulup çözülmesini takiben yaşam kabiliyeti karşılaştırılarak, sığır embriyolarında AC'nin hangi dondurma protokolünde daha etkin olduğunun belirlenmesi amaçlandı.

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Ovaryumların Toplanması

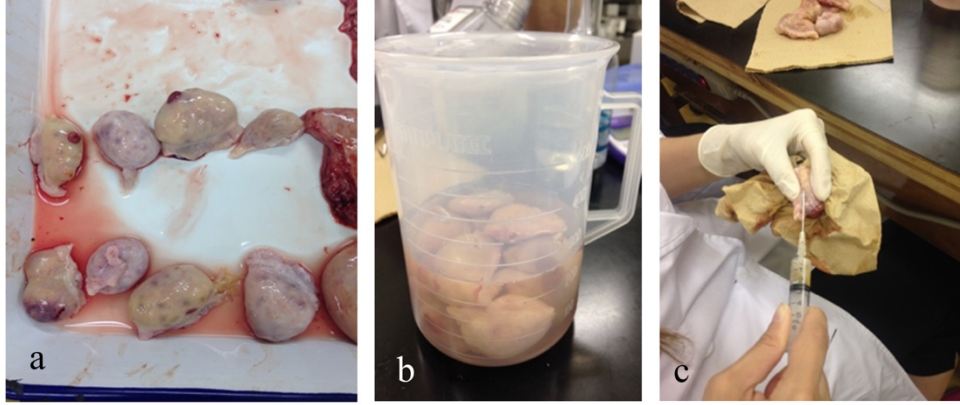
Bu tez çalışması için kullanılan ovaryumlar Japonya'nın Hokkaido Adası sınırlarındaki mezbahadan toplanarak 23-26 °C'de maksimum 4 saat içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. Toplanan ovaryumlar çalışmanın başlamasına kadar 50 µg/ml Gentamisin eklenen %0,9 izotonik NaCl içerisinde muhafaza edildi. Çalışma sürecinde kullanılan kimyasalların tümü GIBCO ve SIGMA üretici firmalarına aittir.

### 2.2. Oosit Eldesi

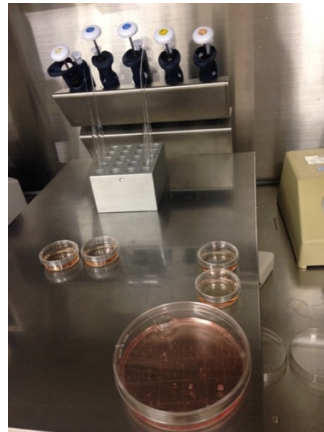
İn vitro embriyo üretim aşamaları Kobayashi'nin (2007), belirttiği şekilde gerçekleştirildi. Laboratuvara getirilen ovaryumlar, steril bir ortamda bir makas yardımıyla çevre dokulardan uzaklaştırıldı. Ovaryumlar kandan ve taşıma solüsyonundan arındırmak amacıyla %0,9'luk NaCl (ya da Laktatlı Ringer) ile üç kez yıkandı ve aspirasyon süresince yine aynı solüsyon içerisinde korunması sağlandı.

İçerisinde KOK bulunan folikül sıvılarının aspirasyon işlemi, ovaryumlar üzerinde bulunan 2-8 mm çapındaki periferik foliküllerden 5 ml'lik enjektör ve 18-19 G iğne kullanılarak yapıldı (Şekil 2.1). Toplanan folikül sıvısı D-PBS ve %3 CS solüsyonu eklenmiş konik tabanlı 50 ml'lik santrifüj tüpünün içerisine alındı. Aspirasyon işleminin tamamlanmasının ardından KOK'ların tüpün dibine çökmesi için falkon tüpleri dik konumda bekletildi ve üstte kalan süpernatant aspire edilerek üzerine tekrar %3 CS'lu D-PBS solüsyonu eklendi. Bu işlem 2 kez tekrar edildikten sonra berrak bir görünüm elde edildiğinde kalan solüsyon (KOK'ları içeren) daha önceden çizilen 90 mm çaplı petri kaplarına aktarılarak stereo mikroskop altında (*Nikon SMZ745, Japan*) incelendi (Şekil 2. 2). KOK'lar Brackett ve Zuelke'nin (1993) tarif ettiği şekilde Grade I, Grade II, Grade III ve Grade IV kalite kodları ile değerlendirildi. Modifiye edilen steril pastör pipeti yardımıyla toplanan oositler D-

PBS ve %10 CS içeren 35 mm'lik petriye alınarak epitel hücrelerden ayrılmasını sağlamak amacıyla yıkandı. Bu yıkama işlemi farklı petrilere aynı solüsyon ile üç kez tekrarlandı.



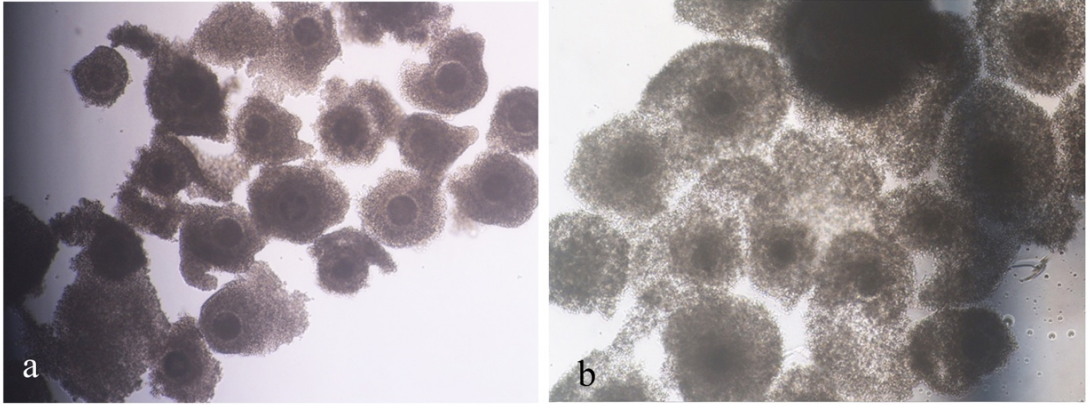
**Şekil 2.1.** Folikül sıvısı aspirasyonu a. Mezbahadan toplanan ovaryumlar b. %0.9 NaCl içerisindeki ovaryumlar c. Foliküllerin aspirasyonu (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).



**Şekil 2.2.** *Laminal flow* içerisindeki stereo mikroskoplar ve yıkamada kullanılan petri kapları (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

### 2.3. İn Vitro Oosit Maturasyonu

Mikroskop altında belirlenen tüm KOK'lar steril pastor pipetleri ile diğer hücrelerden tamamen temizlendikten sonra 35 mm'lik petripler içerisinde Çizelge 2.1'de gösterilen maturasyon vasatına (M199+%5CS) aktarılarak yıkandı. Daha sonra aynı vasat ile iki farklı petride yıkama işlemi tekrar edildi. Kültür damlaları her oosit için 5 µl maturasyon vasatı olacak şekilde ayarlanarak üzeri mineral yağ ile kaplandı. Kültür damlaları 100 µl'lik ölçüde (20 KOK/damla) hazırlanıp en az 2 saat önceden %80 nemli ortamda, 38,5 °C'de, %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatöre yerleştirilerek dengelenmesi sağlandı. Kültür vasatlarına alınan oositler aynı inkübatörde 20-22 saat maturasyon amacıyla kültüre edildi (Şekil 2.3).



**Şekil 2.3.** Oositlerin in vitro maturasyonu a. İn vitro maturasyon öncesinde KOK'lar b. İn vitro maturasyon sonrası KOK'ların ekspansiyonu (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

#### Çizelge 2.1. İn Vitro Maturasyon Solüsyonu Hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (20 ml)
M-199	19 ml
CS	1 ml
FSH	0,02 mg
Gentamisin	20 µl

## 2.4. İn Vitro Fertilizasyon İçin Spermın Hazırlanması

İn vitro fertilizasyon aşamasından önce, motil spermatozoonların seçilmesi için Percoll Gradient Tekniği (%45-90) kullanıldı (Çizelge 2.2, 2.3 ve 2.4). Son aşamada spermatozoon konsantrasyonu  $3 \times 10^6/\text{ml}$  -  $5 \times 10^6/\text{ml}$  arasında olacak şekilde elde edildi (Takahashi ve Kanagawa, 1997; Takayama ve ark., 2016). Donmuş sperm payeti (1-2 payet)  $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$  su banyosunda 30 saniyede çözdürülerek 15 mm'lik santrifüj tüpünde yer alan %45-90 Percoll solüsyonuna aktarıldı. Motilite kontrolü yapıldıktan sonra 2000 rpm'de (*Revolutions per minute* -dakikadaki devir sayısı) 20 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası üstte kalan süpernatant mümkün olduğu kadar aspire edildi. Sperm yıkama solüsyonu (SWS- Brackett and Oliphant Solution + 10mM hypotaurine + 10 u/ml heparin) 6 ml olarak santrifüj tüpüne aktarıldıktan sonra pipetleme yöntemiyle karıştırıldı ve ardından 1800 rpm'de 5 dakika tekrar santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrasında süpernatantın aspirasyonu tamamlanarak thoma lamı ile spermatozoonlar sayıldı. Sperm Dilüsyon Solüsyonu (SDS- BO + 20 mg/ml BSA) ile tekrar dilüe edilerek final spermatozoon konsantrasyonu hazırlandı. Fertilizasyondan üç saat önce kullanılacak olan bütün solüsyonlar %80 nemli ortamda  $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de %5  $\text{CO}_2$ 'li inkübatörde dengelendi.

**Çizelge 2.2.** %90 Percoll Gradient Solüsyonunun Hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (50 ml)
<i>Percoll</i>	45 ml
10X Sperm TL	5 ml
1 M $\text{CaCl}_2$	98,5 $\mu\text{l}$
0.1 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	197 $\mu\text{l}$
DL-laktik asit	184 $\mu\text{l}$
$\text{NaHCO}_3$	0.1045 g
%0.5 Fenol Red	10 $\mu\text{l}$



### **Çizelge 2.3. %45 Percoll Gradient Solüsyonunun Hazırlanması**

Kimyasal	Miktarı (10 ml)
BO	5 ml
% 90 Percoll	5 ml

### **Çizelge 2.4. 10X Sperm TL Stok Solüsyonunun Hazırlanması**

Kimyasal	Miktarı (100 ml)
NaCl	4.675 g
KCl	0.23 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.035 g
HEPES	2.38 g

## **2.5. İn Vitro Fertilizasyon**

Fertilizasyon öncesinde 35 mm'lik ya da 60 mm'lik petri kutusuna 5 µl'lik SDS damlları hazırlanarak üzerleri mineral yağ ile kaplandı. Fertilizasyon için spermatozoonun hazırlanmasından önce hazırlanan damllar %80 nemli ortamda 38,5 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde dengelendi. Elde edilen spermatozoon final konsantrasyonundan 95 µl alınarak daha önceden hazırlanan SDS damllarına eklendi. Maturasyon solüsyonundan çıkarılan KOK'lar ise 10 mg/ml BSA içeren BO solüsyonunda (OWS-Oosit yıkama solüsyonu) iki farklı petride yıkandıktan sonra fertilizasyon damllarına transfer edilerek 6 saat süreyle maksimum nemli ortamda 38,5 °C'de %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatörde tutularak fertilizasyonun tamamlanması beklendi.

## **2.6. Fertilizasyondan Sonra Oositlerin Yıkınması**

Fertilizasyon sürecinden sonra muhtemel zigotlar embriyo kültür medyumunda iki farklı petride iki aşamada yıkılarak kumulus hücrelerinden ve spermatozondan uzaklaşması için pipetleme yöntemi ile denudasyon işlemi yapıldı. Bunun için Zona

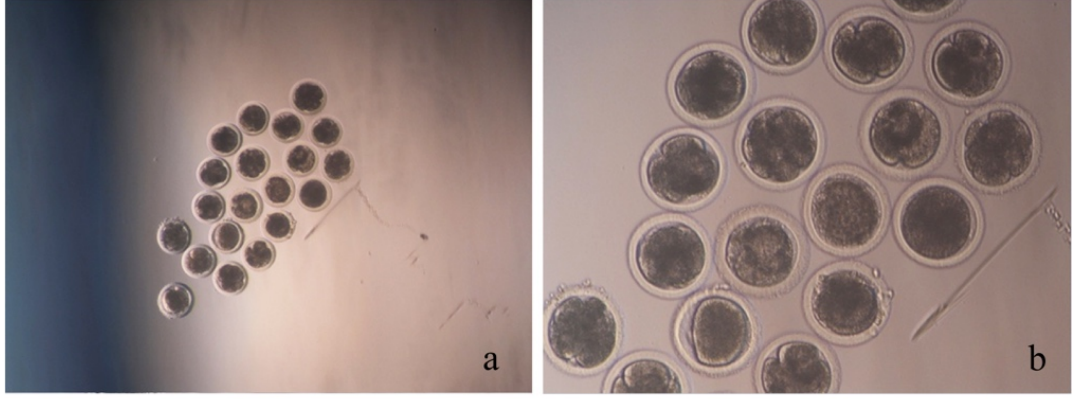
Pellusida'ya zarar vermeden ve kumulusları rahatça temizleyebilecek çapta steril pipet çekildi.

## 2.7. İn Vitro Embriyo Kültürü

Muhtemel zigotlar, denudasyon işleminin tamamlandıktan sonra Çizelge 2.5'te tanımlanan embriyo kültür solüsyonuna (CR1aa + %5 CS) transfer edildi. Aynı zamanda in vitro embriyo kültürü yapılırken 0,25 mg/ml Linoeik asit albümin'de (Sigma) solüsyona eklenerek kullanılabilir şekilde in vitro kültür dropları 100 µl'de 20-22 zigot olacak şekilde ayarlandı ve %5 O<sub>2</sub>, %5 CO<sub>2</sub> ve %90 N<sub>2</sub> içeren üç gazlı inkübatörde 38,5°C de, maksimum nemli ortamda 7-9 gün süreyle kültüre edildi. *Cleavage* (bölünme) kontrolü IVF sonrası 27-31. ve 51-55. saatlerde olmak üzere iki kez yapıldı (Şekil 2.4).

**Çizelge 2.5.** İn vitro kültür solüsyonunun hazırlanması

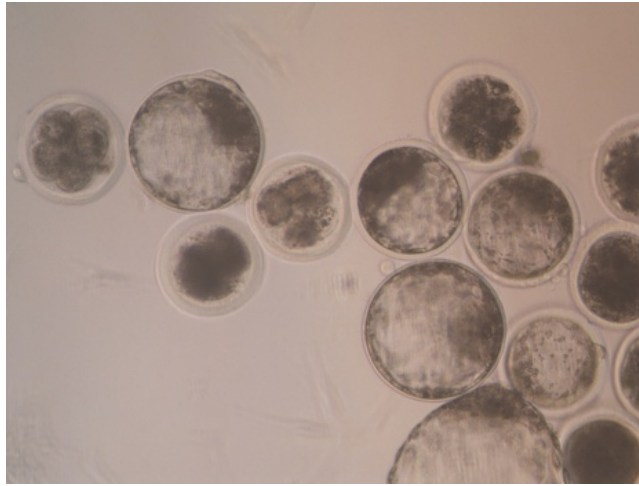
Kimyasal	Miktarı (50 ml)
CR1aa Stok A	38 ml
CR1aa Stok B	10 ml
BME	1 ml
MEM	500 µl
L-glutamik asit	500 µl
CS	2.63 ml
BSA	0.15 g
Antibiyotik	50 µl



**Şekil 2.4.** IVF sonrası zigotlar a. 10X büyütme b. 20X büyütme (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

## 2.8. Blastosistlerin Morfolojik Derecelendirilmesi

Embriyolar, inverted mikroskop (*Nikon Eclipse Ti, Japan*) ile takip edilerek, standart gözlemle gelişim dönemleri ve kalitelerine göre kayıt altına alındı. Kültür sonrası 7-8-9. günlerde elde edilen embriyoların değerlendirilmesi IETS kriterlerine göre (Wright, 2010) yapıldı (Şekil 2.5). Çalışmada bu kriterlere göre çok iyi-iyi kalitedeki blastosist ve expanded blastosist aşamasındaki embriyolar kullanıldı.



**Şekil 2.5.** IVC kültürün 7. günündeki embriyolar (20X büyütme) (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

## 2.9. Embriyoların Gruplandırılması

Kültür damlalarından kalite kodu I olan blastosist ve ekspanded blastosistler seçilerek; 74 adedi blastosöl sıvı aspirasyonu için, 67 adeti ise blastosöl aspirasyonu uygulanmadan sadece dondurulmak üzere gruplandırıldı (Çizelge 2.6 ve Çizelge 2.7). Grup I'deki (n=42) embriyolar blastosist sıvısının aspirasyonu sonrasında vitrifikasyon yöntemi ile, Grup II'deki (n=33) embriyolar ise aspirasyon yapılmadan vitrifikasyon yöntemi ile donduruldu. Grup III'te (n=32) yer alan embriyoların blastosist sıvısının aspirasyonu yapıldıktan sonra yavaş dondurma yöntemi ile dondurulurken Grup IV'deki (n=34) embriyolar ise aspirasyon yapılmaksızın yavaş dondurma yöntemi ile donduruldu.

**Çizelge 2.6.** Grupların oluşturulması ve çalışma akışı

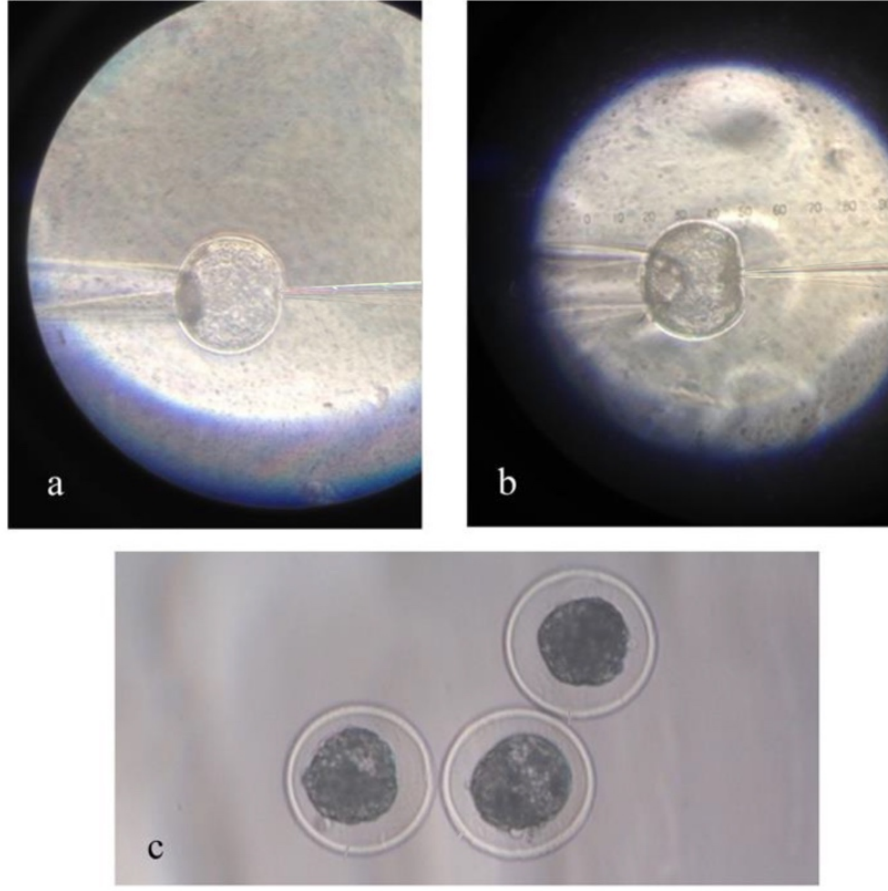
IVM			
IVF			
IVC			
Grup I	Grup III	Grup II	Grup IV
n=42	n=32	n=33	n=34
Grade I		Grade I	
Artificial Callapse (+)		Artificial Callapse (-)	
*Dondurma		*Dondurma	
Çözdürme		Çözdürme	
24 saat IVC		24 saat IVC	
Viyabilite Kontrolü		Viyabilite Kontrolü	

**Çizelge 2.7.** İyi kaliteli blastosist/ekspanded blastosistlerin gruplandırılması

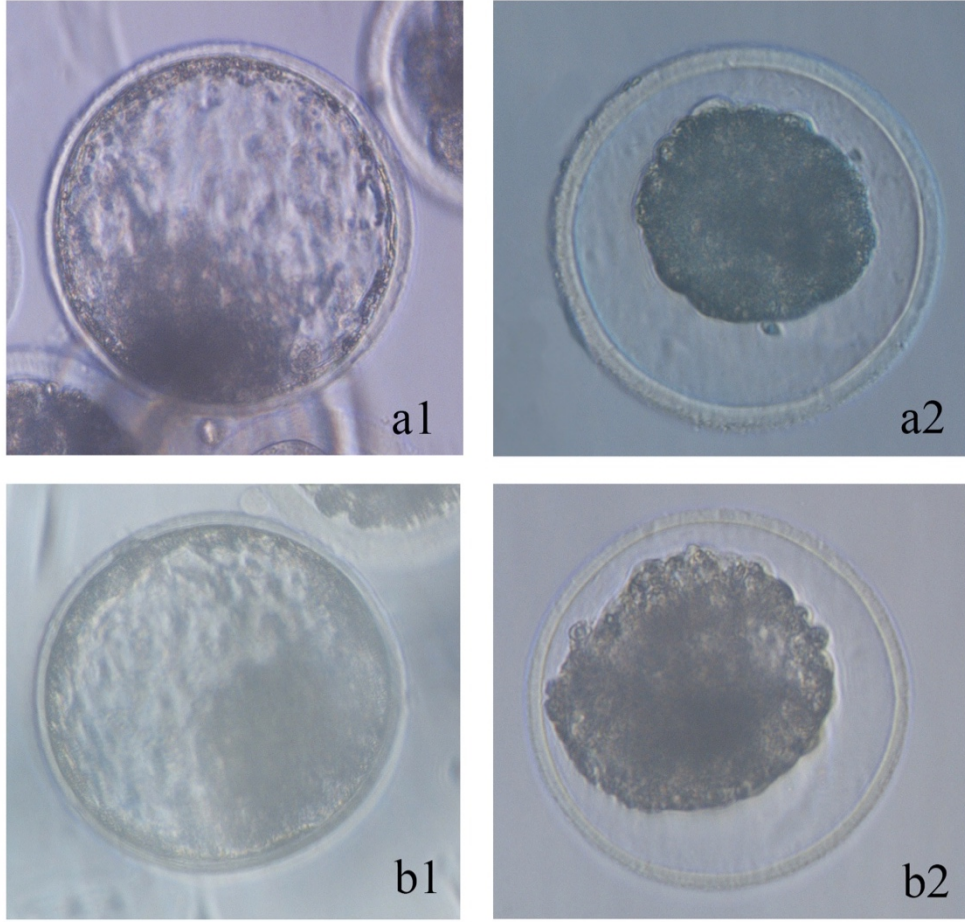
Grup İsimleri	Embriyo sayısı (n)	
Grup I	n=42	Aspire ve vitrifiye edilen embriyolar
Grup II	n=33	Vitrifikasyon kontrol
Grup III	n=32	Aspire ve yavaş dondurma ile dondurulan embriyolar
Grup IV	n=34	Yavaş dondurma kontrol

### **2.10. Blastosöl Sıvısının Aspirasyonu**

Aspirasyon öncesinde blastosist ve ekspanded blastosistler 20 µl m-D-PBS ve %20 FCS içeren damlalara birer birer transfer edildi. Embriyoların blastosist sıvısı, mikromanipülator ve mikroenjeksiyon pipeti yardımıyla (Nikon Co., Japan) aspire edildi. Aspirasyonda kullanılan mikro enjeksiyon pipetleri, kapillar cam pipet mikro pipet çekici (*puller*) (Narishige Co., Japan) ve *microforge* (Narishige Co., Japan) kullanılarak hazırlandı. Aspirasyon sırasında mikromanipülator (Narishige Co., Japan) ve inverted mikroskop (Nikon, Diaphot Phase Contrast Inverted Microscope, Japan) kullanıldı. İç hücre kümesine dokunulmadan trofoblast hücreleri arasından mikroenjeksiyon pipetiyle girilerek embriyonun blastosist sıvısının tümü, blastosist kavitesi tamamen kollabe olana kadar aspire edildi (Şekil 2.6 ve 2.7).



**Şekil 2.6.** Blastosist sıvısının aspirasyonu a ve b. Blastosist Sıvısı Aspirasyonunun okülerden görünümü c. Aspirasyon sonrasında kollabe olan embriyolar (*Nikon, Diaphot Phase Contrast Inverted Microscope, Japan*) (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).



**Şekil 2.7.** Embriyo aspirasyonu öncesi ve sonrası a. Vitrifikasyon Yöntemi a1. Aspirasyon öncesi ekspanded blastosist a2. Aspirasyon sonrası ekspanded blastosist b. Yavaş dondurma yöntemi b1. Aspirasyon öncesi ekspanded blastosist b2. Aspirasyon sonrası ekspanded blastosist (40X büyütme) (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

### 2.11. Embriyoların Dondurularak Saklanması

Kollabe edilen ve edilmeyen blastosist - ekspanded blastosist aşamasındaki embriyolar Çizelge 2.8’de belirtildiği gibi yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemleriyle donduruldu.

**Çizelge 2.8.** Dondurma Protokolü

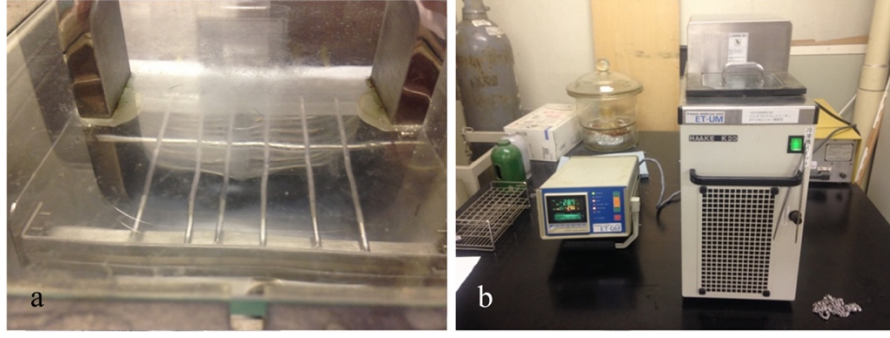
<b>Grup I-II (n=75)</b>	<b>Grup III-IV (n=66)</b>
Vitrifikasyon	Yavaş Dondurma
Çözdürme	Çözdürme
24 saat IVC	24 saat IVC
Viyabilite Kontrolü	Viyabilite Kontrolü

### **2.11.1. Yavaş Dondurma Yöntemi**

Aspirasyon yapılan ve yapılmayan blastosist ile ekspanded blastosistler Hasler (2009) ve Kobayashi (2007)'nin belirttiği gibi programlanabilir embriyo dondurma cihazı (*ET-UM HAAKEK 20, Japan*) kullanılarak donduruldu.

Yavaş dondurma amacıyla (Grup III-aspirasyon yapılan n=32 ve Grup IV-aspirasyon yapılmayan n=34) embriyolar Modifiye D-PBS (m-PBS) + %20 FCS solüsyonundan (Çizelge 2.9) dondurma solüsyonuna (%10 EG+0.1M sukroz+ m-PBS + %20 FCS) aktarıldı. Dondurma solüsyonu içeriği Çizelge 2.10'de belirtildiği gibi oluşturuldu. Embriyolar dondurma solüsyonuna alınarak (Şekil 2.9) 10 dakika içerisinde uygun şekilde 0,25 ml'lik payetlere (IMV-France) yüklendi. Daha sonra payetler isimlendirilerek embriyo dondurma cihazına alındı (Şekil.2.8). Cihaz içerisindeki ısı daha önceden  $-7^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlanarak embriyolar cihaza yerleştirildikten 2 dk sonra *seeding* işlemi  $\text{LN}_2$ 'de soğutulmuş penset ile başlatıldı. Payetlerdeki kristalleşme kontrol edilerek 15 dk sonra sıcaklık dakikada ortalama  $0,3^{\circ}\text{C}$  düşecek şekilde  $-30^{\circ}\text{C}$  dondurma işlemi tamamlandı. Payetler sıvı azot tankına alınarak çözdürülene kadar (24 saat) depolandı.





**Şekil 2.8.** Programlanabilir dondurma cihazı a. Payetlerin *seeding* işlemi için bekletilmesi b. Dondurma cihazı ET-UM HAAKEK 20, Japan (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

**Çizelge 2.9.** Modifiye D-PBS + %20 FCS solüsyonu hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (10 ml)
Modifiye D- PBS	8 ml
FCS	2 ml
BSA (Fraction V)	0.04 g
Antibiyotik	10 µl

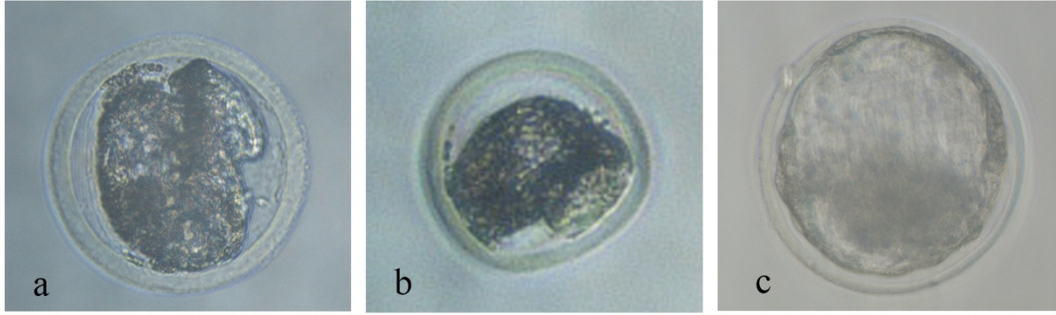
**Çizelge 2.10.** Yavaş dondurma solüsyonu hazırlanması (%10 Etilen Glikol + 0.1 M Sukroz + m-D-PBS + %20 FCS)

Kimyasal	Miktarı (10 ml)
Sukroz	0.3423 g
FCS	0.83 ml
m-DPBS + %20 FCS	10 ml

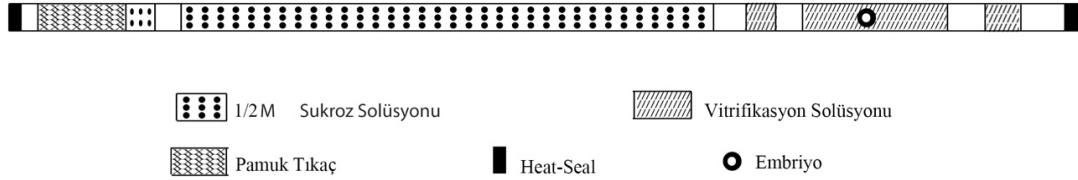
### 2.11.2. Vitrifikasyon Yöntemi

Blastosist aspirasyonu yapılan ve yapılmayan embriyolar (Grup I-aspirasyon yapılan n=42 ve Grup II-aspirasyon yapılmayan n=33) mD-PBS+%20 CS solüsyonundan VS-1'e (Vitrifikasyon Solüsyonu) alındı. Vitrifikasyon işlemi gliserol, etilen glikol, sukroz, xyloz, polietilen glikol (PEG) kriyoprotektanları kullanılarak oda ısısında

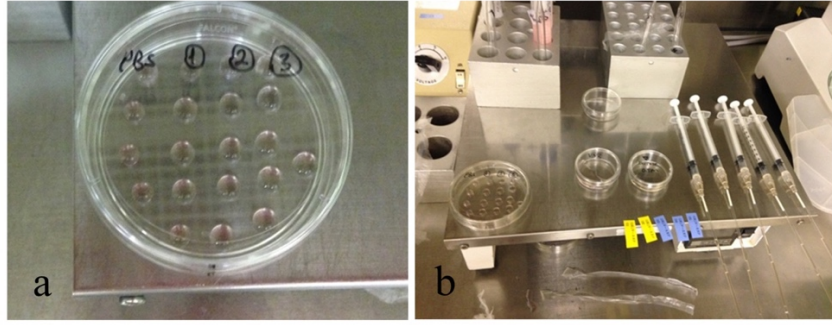
Saito'nun (1994) belirttiği şekilde yapıldı (Çizelge 2.11). VS-1'e aktarılan embriyolar burada petrinin farklı noktalarında en az 5 defa pipetlenerek (yıkılarak) 5 dakika süreyle bekletildi ve sürenin sonunda VS-2'ye transfer edilerek yine 5 dakika süreyle bu solüsyonun içerisinde bekletildi (Şekil 2.9). Aynı yıkama işlemi burada da uygulandı. Embriyolar VS-3'e aktarıldıktan sonra süratle pipetlenerek 1 dakika içerisinde payete yüklendi (Şekil 2.10). Payetin açık olan kısmı ısı işlemi ile kapatılarak embriyolar isimlendirildi (Şekil 2.11). Payet sıvı azota alınarak vitrifikasyon işlemi tamamlandı. Payetler sıvı azot tankına alınarak çözdürülene kadar (24 saat) depolandı.



**Şekil 2.9.** Dondurma solüsyonlarına transfer edilen embriyolar a.VS1 solüsyonu b.VS2 solüsyonu, c. Yavaş dondurma solüsyonu (20X büyütme) (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).



**Şekil 2.10.** Saito'nun (1994) belirttiği şekilde embriyonun payete yüklenmesi.



**Şekil 2.11.** Embriyoların vitrifikasyon yöntemi ile dondurulması a. Vitrifikasyon solüsyonlarının yer aldığı damlalar b. Vitrifikasyon düzeneği. (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

**Çizelge 2.11.** Vitrifikasyon Solüsyonları

Adımlar	İçerik	Embriyonun maruz kalma süresi
VS1	%10 GL + 0.1M Sukroz + 0.1M Xyl + %1 PEG	5 dakika
VS2	%10 GL + %10 EG + 0.2M Sukroz + 0.2M Xyl + %2 PEG	5 dakika
VS3	%20 GL + %20 EG + 0.3M Sukroz + 0.3M Xyl.+ %3 PEG	1 dakika

**GL:** Gliserol, **Xyl:** Xylose, **PEG:** Polietilen Glikol, **EG:** Etilen Glikol

## 2.12. Embriyoların Çözdürülmesi ve Çözdürme Sonrası Gelişim Kabiliyetlerinin Belirlenmesi

Embriyolar dondurma prosedürüne uygun şekilde çözdürüldükten sonra kültür solüsyonu ile hazırlanan (%20 FCS + 0.1 mM  $\beta$ -ME + M-199) (Çizelge 2.12 ve 2.13) 25  $\mu$ l'lik damlalara birer embriyo yerleştirilerek %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 38,5 °C'de, maksimum nemli ortamda inkübe edildi. Embriyoların gelişimi (*re-ekspansiyonu*, *hatching* ve *hatched*) 24-48-72. saatlerde ve birinci haftada inverted mikroskop (*Nikon Eclipse Ti, Japan*) altında takip edildi.

**Çizelge 2.12.**  $\beta$ -ME stok solüsyonu hazırlanması

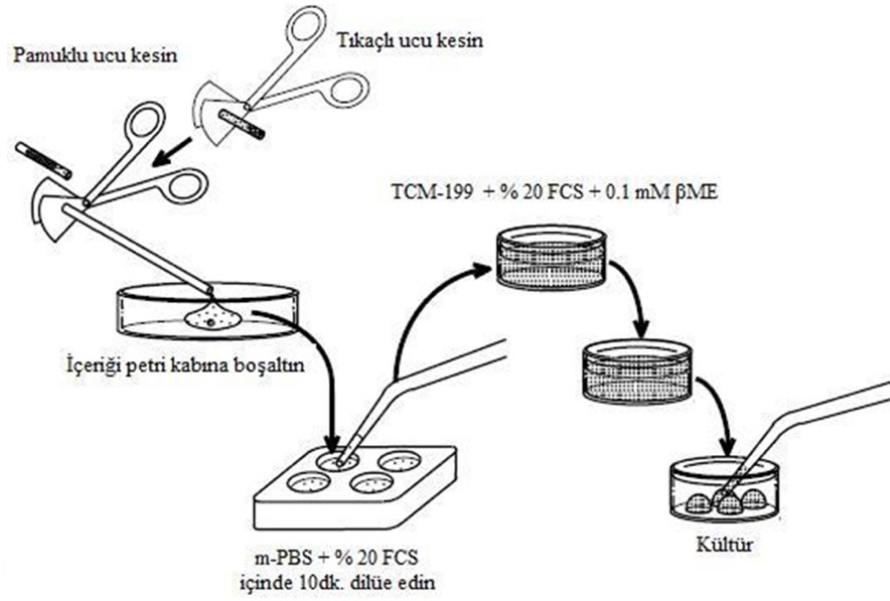
Kimyasal	Miktarı (10 ml)
M-199	10 ml
$\beta$ -ME	7 $\mu$ l

**Çizelge 2.13.** Çözdürme sonrası kültür solüsyonunun hazırlanması

Kimyasal	Miktarı (10 ml)
M-199	7.9 ml
$\beta$ -ME stok solüsyon	100 $\mu$ l
FCS	2 ml
Antibiyotik	10 $\mu$ l

### 2.12.1. Yavaş Dondurma Yöntemiyle Dondurulan Embrioların Çözdürülmesi

Sıvı azot tankında korunan payetler, iki aşamalı olarak 10 sn süreyle havada ve 20 sn süreyle 30 °C'lik su banyosunda çözdürüldü. Payetin ucu kesilerek embriyo 90 mm'lik petriye boşaltıldı. Stereo mikroskop altında bulunan embriyo, içerisinde mD-PBS + %20 FCS bulunan 38,5 °C'deki petriye aktarıldı ve 10 dakika süreyle burada yıkanarak bekletildi. Sonrasında içerisinde kültür solüsyonu (%20FCS + 0,1 mM  $\beta$ -ME + M-199) bulunan iki farklı petride yıkanarak kültür damlalarına alındı ve %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde 38,5 °C'de, maksimum nemli ortamda inkübe edildi (Şekil 2.12) (Kaymaz, 2012). Embrioların gelişimi 24-48-72. saatlerde ve birinci haftada inverted mikroskop altında takip edildi.



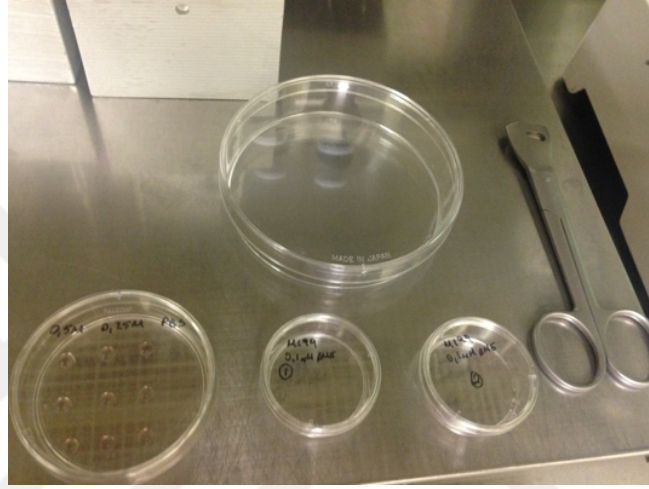
Şekil 2.12. Yavaş dondurma yöntemiyle dondurulan embriyoların çözdürülmesi (Kaymaz, 2012).

### 2.12.2. Vitrifikasyon Yöntemiyle Dondurulan Embriyoların Çözdürülmesi

Vitrifiye edilen embriyolar  $20^{\circ}\text{C}$ 'lik su banyosunda payetlerdeki sukroz solüsyonu çözülene kadar tutuldu ve payetteki embriyo 90 mm'lik petriye alınarak stereo mikroskop altında bulundu. Sonrasında embriyolar içerdiği toksik orandaki sukrozdan arındırılmak üzere oda ısısında bulunan çözdürme solüsyonlarına aktarıldı. Çizelge 2.14'te belirtildiği gibi, ilk olarak 5 dakika süre ile 0.5M sukroz + D-PBS + %20 FCS solüsyonunda yıkandı ve daha sonra daha az konsantrasyondaki 0.25M sukroz + D-PBS + % 20FCS solüsyonunda 5 dakika süreyle yıkanarak bekletildi (Şekil 2.13). Embriyo sukrozdan arındırıldıktan sonra %20FCS + 0,1 mM  $\beta$ -ME + M-199 içeren kültür solüsyonuna alındı. Embriyoların gelişimi 24-48-72. saatlerde ve birinci haftada inverted mikroskop altında takip edildi.

**Çizelge 2.14.** Vitrifikasyon Çözdürme Solüsyonları

Adımlar	İçerik	Maruz kalma süresi
1)	0,5M sukroz + D-PBS + %20 FCS	5 dakika
2)	0,25M sukroz + D-PBS + %20 FCS	5 dakika



**Şekil 2.13** Embrioların çözdürülme düzeneği (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

### 2.13. Sonuçların Değerlendirilmesi

Elde edilen tüm değişkenler önemlilik testlerine geçilmeden önce parametrik test varsayımlarından normallik ve varyansların homojenliği yönünden test edildi. Değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü, ki-kare yöntemi ile yapıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi ve SPSS (istatistik paket programı) 14.01 paket programından yararlanıldı.

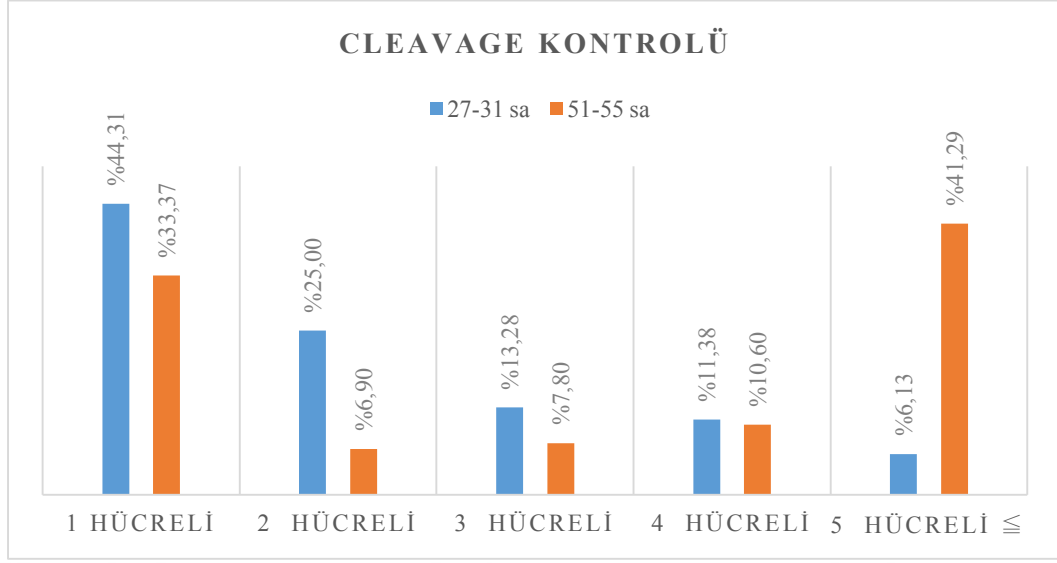
### 3. BULGULAR

Bu çalışmada in vitro koşullarda üretilen sığır embriyolarından blastosist sıvısının aspirasyonu yapıldıktan sonra, embriyoların vitrifikasyon ve yavaş dondurma metotlarıyla dondurulup çözülmesini takiben viyabilitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Sunulan tez çalışmasında in vitro elde edilen sığır embriyolarının IVF sonrası 27-31. ve 51-55. saatlerdeki *cleavage* kontrolü Çizelge 3.1’de, Grafik 3.1’de ve Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’de verilmiştir. Çalışmada toplamda 51-55. saat *cleavage* kontrolü sonrasında 896 adet oositten 597 adedi bölünme göstermiştir. Çalışmada 597 adet 5 hücreli ve 5 hücreden büyük aşamadaki zigotlardan 271 adet BL ve Exp-BI elde edildi (%45,39). Bunların 141 adeti (%52,02) iyi kaliteli (*good*) olarak değerlendirilerek çalışmada kullanıldı (Çizelge 3.2 ve Grafik 3.2).

**Çizelge 3.1.** Zigotların *cleavage* kontrolü

Hücre Sayısı	27-31 sa.		51-55 sa.	
	n	%	n	%
1 hücreli	397 (896)	44,31	299 (896)	33,37
2 hücreli	224 (499)	44,88	62 (597)	10,88
3 hücreli	119 (499)	23,84	70 (597)	11,72
4 hücreli	102 (499)	20,44	95 (597)	15,91
5 hücreli $\leq$	55 (499)	11,02	370 (597)	61,97

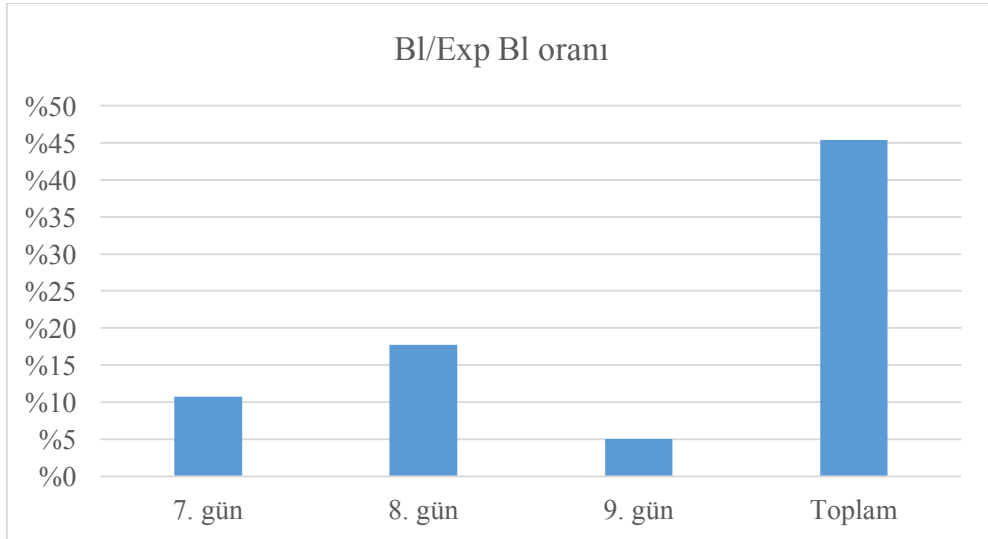
**Grafik 3.1.** Zigotların *cleavage* kontrolü



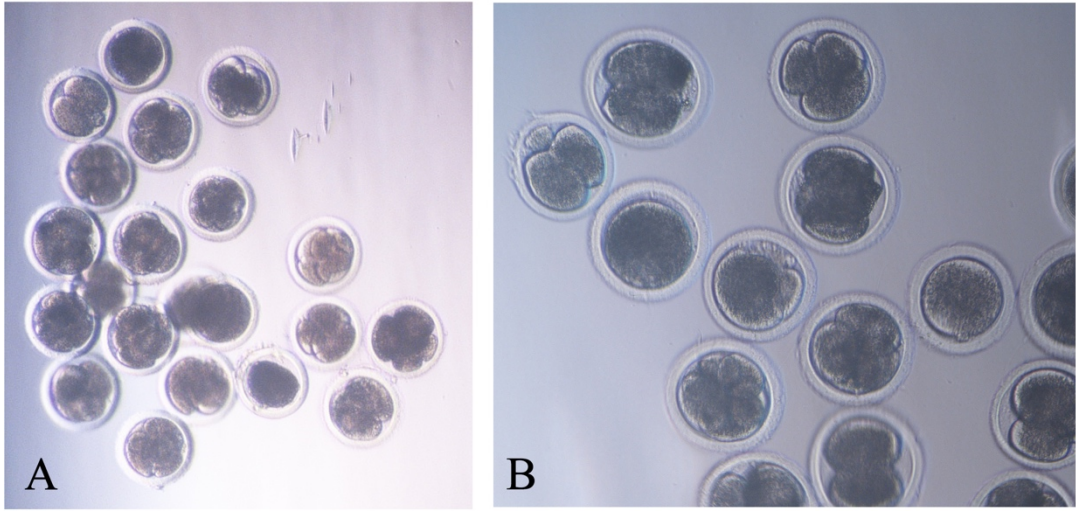
**Çizelge 3.2.** Blastosist/ekspanded blastosistlerin *cleavage* kontrolü

Bl-Exp Bl	n	%
7. gün	96 (597)	16,08
8. gün	142 (597)	23,79
9. gün	33 (597)	5,5
Toplam	271 (597)	45,39

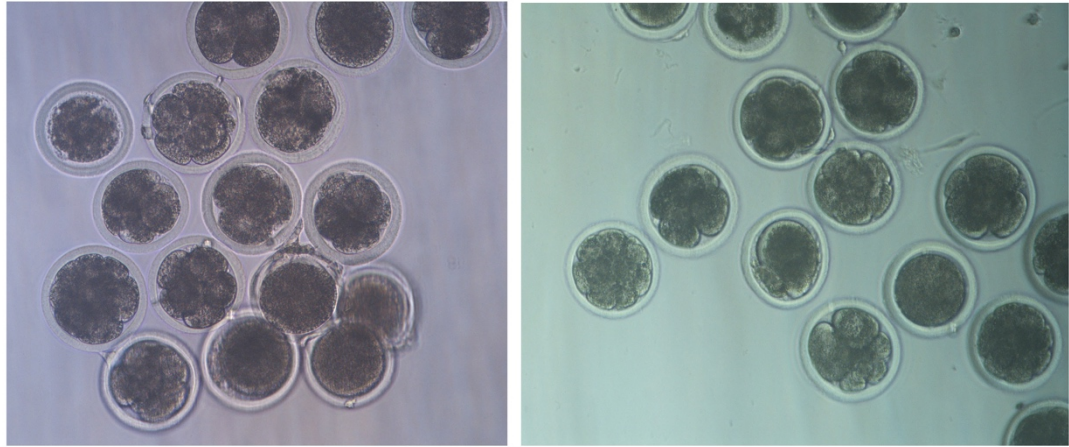
**Grafik 3.2.** Elde edilen blastosist/ekspanded blastosist oranı





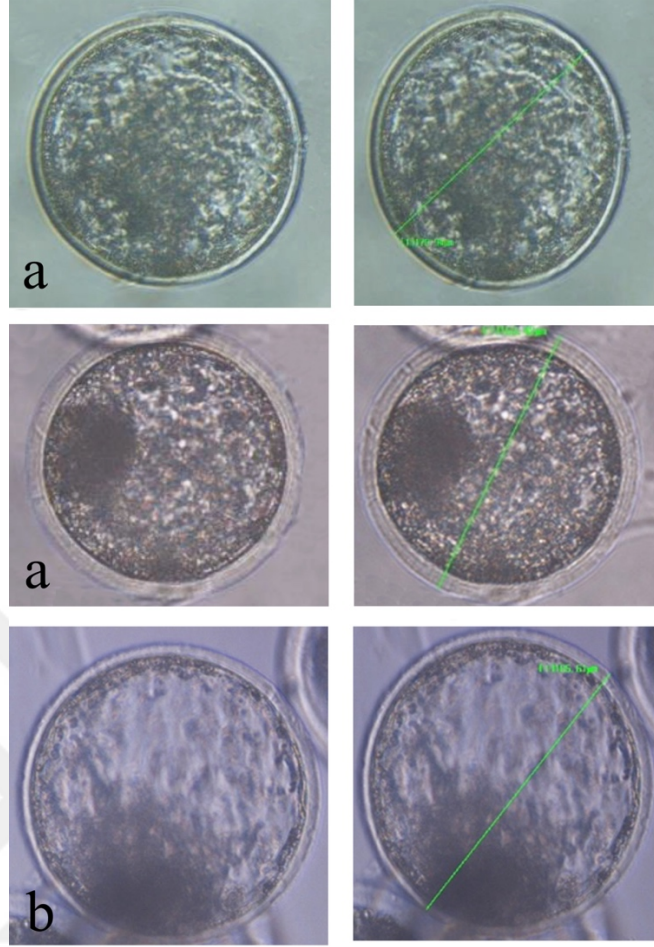


**Şekil 3.1.** IVF sonrası 27-31. saatlerde bölünmeler A. 10X büyütme B. 20X büyütme (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

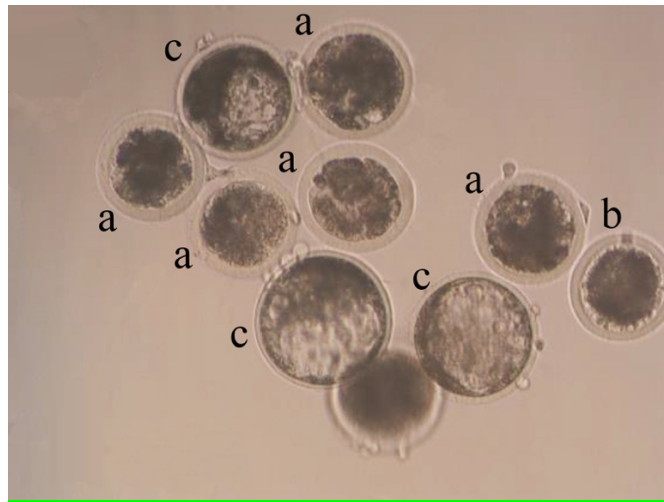


**Şekil 3.2.** IVF sonrası 51-55. saatlerde bölünmeler (20X büyütme) (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

Elde edilen iyi kaliteli blastosist ve ekspanded blastosistler (n=141) (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4) dört gruba ayrıldı. Bütün gruplarda çözündürme sonrası embriyoların canlılık oranları, 24-48-72. saatlerde ve 7 gün süre ile aynı saatte inverted mikroskop altında kontrol edildi. Çözdürülen embriyoların *hatched* oranlarınının 3 günlük takibi Çizelge 3.3'te, 7 gün süre ile takibi ise Çizelge 3.4'te verilmiştir. Embriyoların toplam *hatched* oranı ekspanded blastosistlerde (%48,44; %55,50) blastosistlere (%7,69; %15,40) göre daha başarılı bulundu (p=0,004 ve p=0,006).



**Şekil 3.3.** IVF sonrası elde edilen iyi kalite a) blastosist ve b) ekspanded blastosistler (40X büyütme) (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).



**Şekil 3.4.** IVF sonrası a. dejenere zigotlar b. UFO ve c. Sağlıksız blastosist ve ekspanded blastosistler (20X büyütme) (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

**Çizelge 3.3.** Tüm dondurma protokollerine göre çözdürülen embriyoların 24-48-72. saatlerdeki yapılan kontrol sonrasındaki toplam *hatched* oranları

	Dondurulan	Hatched	(%)
Blastosist	13	1	7.69
Ekspanded Blastosist	128	62	48.44

P=0,004

**Çizelge 3.4.** Tüm dondurma protokollerine göre çözdürülen embriyoların 7 gün takibi sonrasındaki *hatched* oranları

	Dondurulan	Hatched	(%)
Blastosist	13	2	15,40
Ekspanded Blastosist	128	71	55,50

P=0,006

Çözdürme sonrası 24-48 ve 72. saatlerde embriyoların canlılığı kontrol edilerek *hatched* oranı Çizelge 3.5’de ve Grafik 3.3’te de belirtildiği şekilde; Grup I’de %28,57; Grup II’de %39,39; Grup III’te %71.88 ve Grup IV’te %41,18 bulundu. Yapılan istatistik değerlendirmeler sonucuna göre *hatched* oranında Grup I-II ve IV arasında önemli bir farklılık bulunmazken Grup III’ün *hatched* oranı diğer gruplardan önemli bir şekilde yüksek bulundu ( $p=0.002$ ). Grup III’te yer alan embriyolar çözdürme sonrası 7 gün incelendiğinde ise *hatched* oranı (%78,10), Grup I (%31), Grup II (%48,50) ve Grup IV’ten (%55,90) önemli bir şekilde yüksek bulundu ve Grup I-II-IV arasındaki farklılığın ise önemsiz olduğu tespit edildi ( $p<0,001$ ) (Çizelge 3.6 ve Grafik 3.4). Embriyoların çözdürme sonrası *hatching* ve *hatched* şekilleri Şekil 3.5’te gösterilmiştir. Sunulan tez çalışmasında sığırlarda yavaş dondurma protokolüne blastosist sıvısının aspirasyonunun (AC) eklenmesi ile çözdürülen embriyoların canlılığının arttığı ve AC’nin başarıyla uygulanabileceği tespit edildi.

**Çizelge 3. 5.** Çözdürme sonrasında 24., 48. ve 72. saatlerde blastosist ve ekspanded blastosistlerin viyabilite oranları.

	Embriyo Sayısı		Çözdürme sonrası hatched sayıları			Hatched embriyo toplamı	
			24.	48.	72.	(N)	(%)
<i>Grup I</i>	<b>42</b>	(AC+Vit)	4	6	2	12	28,57 <sup>b</sup>
<i>Grup II</i>	<b>33</b>	(Vit)	3	5	5	13	39,39 <sup>b</sup>
<i>Grup III</i>	<b>32</b>	(AC+SF)	6	11	6	23	71,88 <sup>a</sup>
<i>Grup IV</i>	<b>34</b>	(SF)	2	7	5	14	41,18 <sup>b</sup>

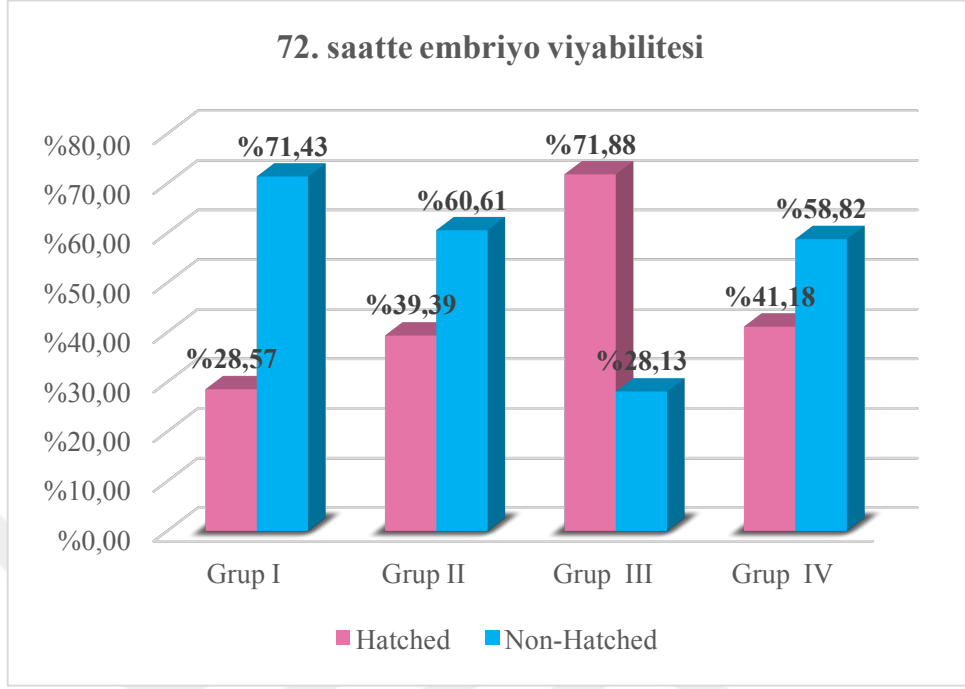
a,b: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiki açıdan önemlidir (P=0,002).

**Çizelge 3. 6.** Çözdürme sonrasında 7 gün süre takibi sonrasında blastosist ve ekspanded blastosistlerin viyabilite oranları.

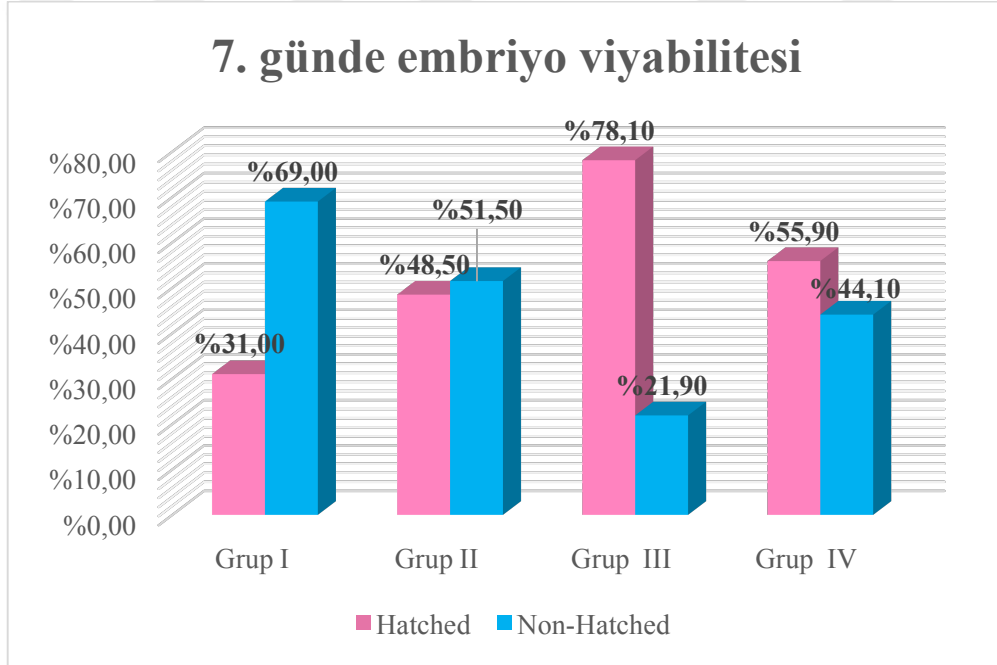
	Embriyo Sayısı		Çözdürme sonrası re-ekspanded ve hatched sayıları							Hatched embriyo toplamı	
			24.sa	48.sa	72.sa	96.sa	5. gün	6. gün	7. gün	(N)	(%)
<i>Grup I</i>	<b>42</b>	(AC+Vit)	4	6	2	1	0	0	0	<b>13</b>	31,00 <sup>b</sup>
<i>Grup II</i>	<b>33</b>	(Vit)	3	5	5	2	0	1	0	<b>16</b>	48,50 <sup>b</sup>
<i>Grup III</i>	<b>32</b>	(AC+SF)	6	11	6	2	0	0	0	<b>25</b>	78,10 <sup>a</sup>
<i>Grup IV</i>	<b>34</b>	(SF)	2	7	5	3	0	0	2	<b>19</b>	55,90 <sup>b</sup>

a,b Aynı sütundaki farklı harfler taşıyan veriler arası farklılık önemlidir (p <0,001).

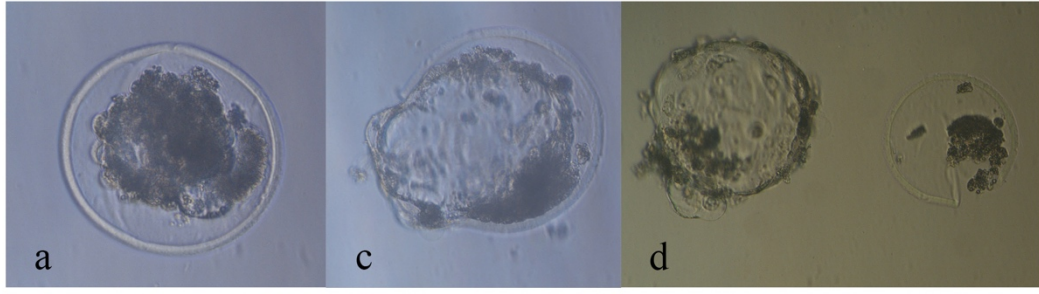
**Grafik 3.3.** Çözdürme sonrasında gruplara göre embriyoların 72. Saatteki hatched ve non-hatched oranı



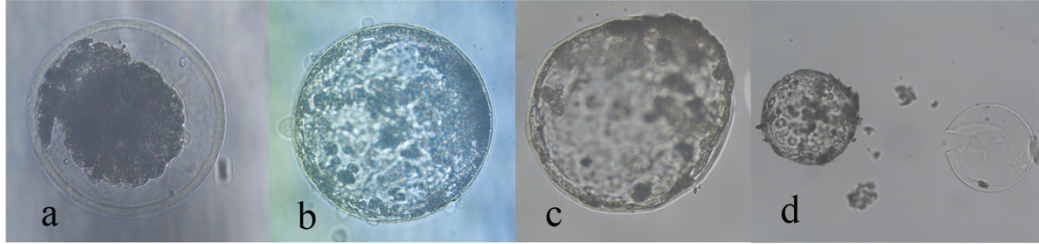
**Grafik 3.4.** Çözdürme sonrasında gruplara göre embriyoların 7 gün sonraki hatched ve non-hatched oranı



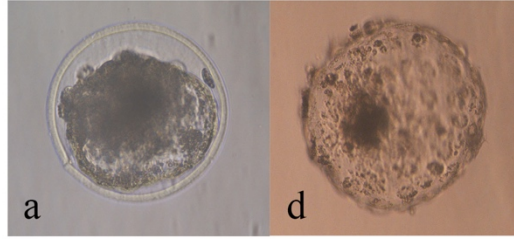
### Grup 1



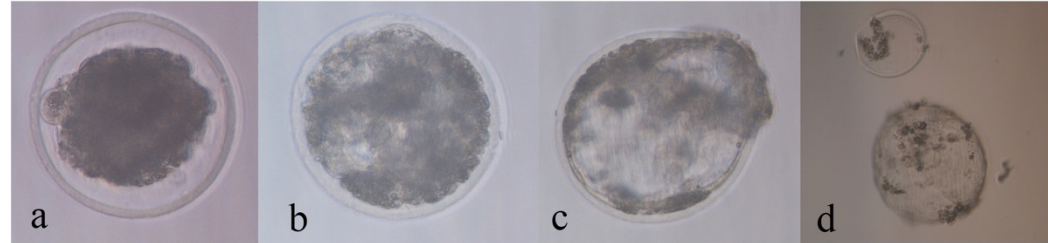
### Grup 2



### Grup 3



### Grup 4



**Şekil 3.5.** Grup I-II-III-IV embriyoların çözdürme sonrası 24-48-72. saatlerdeki viyabilitesi a. Embriyonun çözdürüldüğü an b. Re-ekspansiyonu c. *hatching* d. *hatched* (40X büyütme) (Rakuno Gakuen Üniversitesi, Hayvan Reprodüktif Biyoloji ve Teknoloji Laboratuvarı. Onur, 2016).

#### 4. TARTIŞMA

Yeni üretim tekniklerinin geliştirilerek test edilmesi, IVP sığıır embriyolarından elde edilen sonuçların iyileştirilmesinde oldukça önemlidir. Günümüzde sığıır embriyo üretimi için in vitro teknikler iyi bir şekilde kurulmuş olsa da, oosit olgunlaşması ve kaliteli embriyo eldesi henüz optimal şartlara ulaşmamıştır (Imai ve ark., 2002b; Rodriguez Martinez, 2012; Pryor ve ark., 2015).

Günümüzde IVP embriyolarının gelişim sırasındaki kinetik ve morfolojileri incelenerek iyi kaliteli olanların belirlenmesi için çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla Takayama ve ark. (2015), sığıırlarda OPU-IVF ile elde edilen embriyolara IVF sonrası 27., 31. ve 55. saatlerde *cleavage* kontrolü yapmıştır. Bunun sonucunda 27. saatte 2 hücreli, 31. saatte 2 hücreli ve normal bölünmeye sahip olan ve 55. saatte 8 ve daha fazla bölünme gösterenlerde blastosist oranlarının en yüksek (%82,1) olduğu gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında ise bu araştırmadan göz önüne alınarak embriyoların *cleavage* kontrolü 27-31. saatlerde ve 51-55. saatlerde gerçekleştirildi ve 5 hücreli ve daha fazla bölünmeye sahip olan zigotlar 51-55. saatlerde daha yüksek olduğu tespit edildi. Ancak çalışmada elde edilen toplam blastosist oranı Takayama ve ark. (2015)'dan daha düşük bulundu. Oluşan bu farklılığın oositlerin elde edilme yönteminden ve kalitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Punyawai ve ark. (2015)'nın yaptıkları bir çalışmada, IVF sonrasında kültüre yerleştirilen sığıır zigotlarının *cleavage* kontrolü 48. saatte yapılmış olup  $\geq 5$  hücre sayısına ulaşanların oranı %60, blastosist oranları ise; 7-8-9. günlerde sırasıyla %32, %9.3 ve %2 olup, toplam blastosist oranı %43,3 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ise ilk *cleavage* kontrolünün yapıldığı 27-31. saatlerde tespit edilen 5 hücreli ve daha fazla hücreli olan zigotların *cleavage* oranı Punyawai ve ark. (2015)'dan daha düşük bulunurken ikinci kontrolün yapıldığı 51-55. saatlerde gözlenen oran ve elde edilen toplam blastosist oranı benzer bulundu. Bu farklılığın *cleavage* kontrol saatinin ve in vitro maturasyonda kullanılan solüsyonların farklı oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmada 7. günde elde edilen embriyo oranı Punyawai ve ark. (2015)'nın çalışmasından daha az bulunurken 8 ve 9. günlerde elde edilen embriyo

oranı daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın sebebinin IVP adımları sırasında kullanılan solüsyon, kültür şartları ve uygulayıcı farklılığı ile birlikte oositin elde edildiği mezbaha materyalinin kalitesinden de kaynaklandığı kanısına varılmıştır.

Imai ve ark. (2002b), IVP sığır embriolarında kriyotoleransın ve farklı faktörlerin embrioların gelişim yeteneği üzerindeki etkisini araştırmıştır. Çalışmada M-199, %5 CS ve kumulus hücreleri ile kültüre edilen zigotların *cleavage* oranı %80,5 ve toplam elde edilen blastosist oranı %38.8 olarak belirtilmiştir. Aynı çalışmada CR1aa, %5 CS ve kumulus hücreleri ile kültüre edilen zigotların *cleavage* ve toplam blastosist oranı sırasıyla %76,1; %46.4 ve aynı solüsyonda kumulus hücreleri olmadan kültüre edilen zigotların *cleavage* ve toplam blastosist oranı %80; %49,1 olarak tespit edilmiştir. Böylece IVM-IVF oositlerin kültüründe kumulus hücreleri olmadan CR1aa solüsyonunda kültürün M-199'a göre daha başarılı olduğu gösterilmiştir. Sugimura ve ark.'nın 2013 yılında yaptıkları bir çalışmada, in vitro maturasyonda CR1aa solüsyonu ile kültüre edilen KOK ya da oositlerde >4 hücreli embriyo oranı %72.7 bulunurken 7. gündeki Exp B1 oranı %24 bulunmuştur. Aynı çalışmada WOW sistemi ile kültüre edilen embriolarda bu oranlar sırasıyla, %71.2, %24.8 olarak tespit edilmiştir. Çalışmalardaki *cleavage* oranlarının tez çalışmasından yüksek olmasının sebebinin *cleavage* kontrol saatlerinin farklılığı, uygulayıcı farklılığı ve kullanılan materyalin kalitesinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Imai ve ark. (2002b)'nın, M-199, %5 CS ve kumulus hücreleri ile birlikte kültüre edilen zigotların blastosist oranı bu çalışmadan düşük olmasının sebebinin kullanılan kültür solüsyonunun farklı olması kanaatine varıldı. Ancak aynı yöntem ile maturasyon yapılan gruptaki sonucun bu çalışmadan daha yüksek bulunması hem uygulayıcı farklılığı hem de kullanılan oositin kalitesinden kaynaklandığı düşünüldü. Kullanılan mezbaha materyalinin kalitesi; çalışmanın yapıldığı mevsim, hayvanların taşıdıkları hastalık, hayvanların kesim sebebi (özellikle infertilite sebepleri), hayvanların beslenme şekilleri ve kesim sırasında siklusun hangi evresinde oldukları gibi sebeplerden etkilendiği düşünülmektedir.

Yapılan bir çalışmada, CR1aa ve IVD101 kültür solüsyonlarını farklı oksijen yüzdelerinde inkübe ederek, %5 O<sub>2</sub>'de CR1aa solüsyonunda >4 hücreli embriyo oranı



ve 7. gündeki blastosist oranı %50.8 ve %80 olarak bulunmuştur. IVD101 solüsyonu ile kültüre edilenlerde ise bu oranların %52.9 ve %95 olduğu bildirilmiştir (Somfai ve ark., 2010). Farklı sıralı ve iki aşamalı kültür sistemlerinin araştırıldığı bir çalışmada, KSOM+%0.4 BSA ve KSOM+%5 FBS solüsyonlarında kültüre edilen muhtemel zigotların 7. gündeki blastosist oranı %37 olarak bulunmuştur (Felmer ve ark., 2011). Yapılan başka bir çalışmada G1/G2 ve SOFaa kültür solüsyonlarının karşılaştırılmış ve *cleavage* oranı G1/G2 ile kültüre edilen embriyolarda %68,2 bulunurken aynı oran SOFaa solüsyonunda %54,5 bulunmuştur. G1/G2 ve SOFaa solüsyonlarından elde edilen blastosist oranları ise sırasıyla %29,5 ve %32'dir (Sanches ve ark., 2012). Yeni in vitro kültür sistemlerinin araştırıldığı bir çalışmada ise, *Embryo Trans Biotech* (ETB) sistemlerinden olan BO-IVM, BO-IVF ve BO-IVC solüsyonlarını kullanılarak elde edilen embriyoların kontrol grubundaki *cleavage* ve canlılık oranları arasında bir fark bulunmamıştır (sırasıyla, %80.5 ve % 48.4; %81.3 ve %42.9) (Pryor ve ark., 2015). Çalışmada ikinci kontrolün yapıldığı 51-55. saatlerde gözlenen oran ise, Sanches ve ark. (2012)'nin SOFaa solüsyonu ile elde ettikleri sonuç ve Somfai ve ark. (2010)'nin sonuçlarından daha yüksek bulunurken diğer çalışmalardan daha düşük bulundu. Oluşan bu farklılığın *cleavage* kontrol saatinin farklı oluşu ve çalışmalarda in vitro maturasyonda için ticari solüsyonların kullanılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca çalışmada 27 ile 31. saatler arasında yapılan *cleavage* kontrolünde 2, 3 ve 4 hücreli zigot oranları, 51 ile 55. saatler arasındaki kontrole göre daha yüksek bulundu. Ancak 5 hücreli ve daha fazla sayıda hücreye sahip olan zigotların oranı ilk kontrolde düşük bulunurken ikinci kontrolde yüksek olduğu görüldü. Bunun sebebinin zigotlarının çoğunluğunun 31. saate kadar 4 hücreli hale gelebildiği ve 51-55. saatler arasında ise ilk kontrolde bölünenlerin bölünmeye devam ederek 5 ve daha fazla hücreli hale geldiklerini gösterebilmektedir. *Cleavage* kontrolü sonrasında bölünme oranlarının diğer çalışmalardan farklı olmasının, kontrolün diğer çalışmalarda 48. saatte ve bir kez yapılmış olmasından kaynaklanabileceği kanısına varıldı.

Memeli oosit ve embriyolarının uzun süreli korunması amacıyla yavaş dondurma ve vitrifikasyon yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Yavaş dondurma yöntemi uzun sürmesi, buz kristali oluşturması ve dondurma cihazına ihtiyaç

duyulması sebebiyle daha fazla zaman ve para gerektirmektedir. Vitrifikasyon ise embriyolarda hızlı soğutma ve çözme oranlarına sahip olması nedeniyle yavaş dondurma yönteminin dezavantajı olan buz kristali oluşumunu önlemektedir. Ayrıca dondurma sırasında kullanılan solüsyonun hacminin azaltılması vitrifikasyon olasılığını artırmaktadır. Bu sebeple minimum hacim taşıyıcı sistemler ile kullanılan miktar  $<1 \mu\text{l}$ 'ye düşürülmekte böylece hızlıca soğuma sağlanabilmektedir (Yu ve ark., 2010; Inaba ve ark., 2011; Zhao ve ark., 2012).

Düşük konsantrasyonda etilen glikol kullanımının dondurma üzerindeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, 1,5 M EG kullanarak yavaş dondurma yöntemiyle dondurulup çözdürülen embriyoların 72 saat sonraki re-ekspansiyon ve *hatching* oranının %76,3 ve %63,2 olduğu tespit edilmiştir (Takayama ve ark., 2016). Başka bir çalışmada, yavaş dondurma yöntemi ile dondurulup çözdürülen blastosistlerin viyabilitesi incelenmiş ve çözme sonrası 24-48-72. saatlerdeki viyabilite oranları sırayla %59, %45, %41 olarak bulunmuştur (Imai ve ark., 2002b). Güney Kore'de 2008 yılında yapılan bir çalışmada ise, klasik yavaş dondurma yöntemiyle dondurulup çözdürülen embriyoların canlılık oranı 24. saatte %74,6; 48. saatte ise %53,3 olarak tespit edilmiştir (Lim ve ark., 2008). Tez çalışmasında yavaş dondurma kontrol grubunda (Grup IV) elde edilen *hatching/hatched* oranı aspire ve yavaş dondurma ile dondurulan gruptan (Grup III) önemli bir şekilde düşük bulundu ve diğer dondurma grupları arasındaki farklılık anlamlı bulunmadı. Grup III'ün 72 saat sonraki *hatching/hatched* oranı Lim ve ark. (2008)'nin çalışması dışındaki diğer çalışmalardan yüksek bulunurken, yavaş dondurma kontrol grubu sonucu bütün diğer çalışmalardan daha düşüktür. Böylece blastosist sıvısı aspirasyonunun yavaş dondurmada çözme sonrası canlılığı artırdığı kanısına varıldı. Lim ve ark (2008)'nin çalışmasındaki farklılığın ise, *hatched* oranı değerinin farklı saatte alınması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca Grup IV sonucunun diğer çalışmalardan düşük olmasının sebebinin, kullanılan ovaryum kalitesi, uygulayıcı farklılığı, IVM-IVF-IVC adımları sırasında kullanılan yöntem farklılıklarından kaynaklanabileceği düşünüldü.

Inaba ve ark.'nın 2016 yılında, sığır blastosistlerinde dondurma yönteminin re-ekspansiyon hızı ve trofektodermdaki DNA fragmentasyonuna etkisinin inceledikleri

çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki EG, DMSO ve sukroz ile *cryotop* kullanılarak vitrifiye edilen embriyoların çözdürme sonrası 24. saatteki viyabiliteleri %86.5 bulunurken, geleneksel yavaş dondurma da bu oran %49.6 bulunmuştur. Akkoç ve ark. (2011), *solid surface vitrification* (SSV) tekniği ile klasik vitrifikasyon tekniği karşılaştırarak çözdürme sonrası canlılık oranı 24 saat sonra sırasıyla %82.6 ve %34.8 olarak tespit etmiştir. Çalışmada uygulanan vitrifikasyon protokolü Akkoç ve ark. (2011)'nın çalışmasıyla benzer olup *hatched* oranı daha yüksek bulunurken diğer kontrol gruplarında elde edilen *hatched* oranı, Inaba ve ark. (2016)'dan daha düşük bulundu. Oluşan bu farklılığın uygulayıcı, kültür sırasında kullanılan solüsyon ve tekniklerin farklı oluşundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca vitrifikasyon sırasında kullanılan SSV tekniği ve *cryotop* gibi minimum hacim kullanımına olanak veren sistemlerin, klasik 0,25 ml'lik payet ile vitrifiye edilenlere göre daha başarılı olduğu bu sayede, dondurma sırasında embriyonun maruz kaldığı solüsyonun hacmi ne kadar az olursa o kadar az toksisiteye maruz kaldığı ve başarı şansının arttığı düşünülmektedir.

İnsan IVF laboratuvarlarında dondurma sırasında blastosist sıvısı yüzünden dehidrasyonun yetersiz olması nedeniyle buz kristali oluşabileceği bildirilmiştir. Bastosöl hacmi ekspanded blastosistlerde daha fazla olduğu için erken aşamadaki blastosistlerle karşılaştırıldığında dondurmaya daha duyarlıdır. Lazer atışı, mikropipetleme, mikro iğne ile punksiyon, blastosöl aspirasyonu ve ozmotik şok gibi yöntemler blastosist kavitesinin kollapsı için kullanılabilir (Iwayama ve ark., 2011; Palini ve ark., 2013). Palini ve ark. 2013 yılında blastosist sıvısından ilk DNA izolasyonunu gerçekleştirilerek, bu şekilde PGD'nin yapılabilme ihtimalini ortaya çıkarmışlardır. Herrera ve ark. (2015), at embriyoları ile yaptıkları bir çalışmada blastosist sıvısı ile cinsiyet tayini gerçekleştirmişlerdir. Hinricks ve Choi'nin 2016'da yaptıkları çalışmada ise atlarda mikromanipülatör kullanılarak yapılan blastosist kollapsı dondurma protokolünde başarı ile uygulanmıştır. Jensen ve ark. (2014)'ı da blastosist hücreleri ve blastosist sıvısından proteomik analizi gerçekleştirmişlerdir.

Vanderzwalmen ve ark.'nın 2002 yılında insan IVF laboratuvarında yaptıkları bir çalışmada, vitrifikasyon sonrası çözdürülen morula, erken blastosist ve blastosist

ekspanded blastosist canlılık oranları sırayla %54,5; %58,5 ve %20,3 bulunmuştur. Vitrifikasyon öncesi blastosöl kavitasinin punksiyonu sonrasında çözdüme oranı ise %70,6'ya yükselirken aynı şekilde gebelik oranı da %4,5'ten %20,5'e çıkmıştır. Böylece dondurma öncesinde ekspanded blastosistlerde sıvının azaltılmasının embriyoların yaşam yeteneğini artırdığı gösterilmiştir. Keskin-tepe ve ark. (2009), insanlarda yaptıkları benzer bir çalışmada, uygulanan biyopsi yöntemine bakılmaksızın (blastomer biyopsisi ya da ICSI pipeti ile blastosölün kollapsı) vitrifikasyon yönteminin yavaş dondurma yöntemine göre daha iyi olduğunu bildirilmiştir. Yavaş dondurulan ve biyopsi yapılan embriyolarda canlılık oranı %71, biyopsi yapılmayanlarda %83 bulunurken vitrifiye edilen ve biyopsi yapılanlarda %95 ve biyopsi yapılmayanlarda %97 olarak bulunmuştur. Tez çalışmasında ise yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak yavaş dondurma yöntemine blastosöl aspirasyonun eklenmesi ile çözdüme sonrası canlılık oranının vitrifikasyon göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir.

Feng ve ark. 2010 yılında mikro cam pipet kullanarak *artificial collapse* sonrasında dondurdukları insan ekspanded blastosistlerinin çözdüme sonrası canlılık (%95,3), implantasyon (%38) ve doğum (%44,6) oranları artırılmıştır. Ayrıca *artificial collapse* uygulanan yeni doğan bebeklerde herhangi bir anomali tespit edilememiştir. Levi-Setti ve ark.'nın (2016) yaptıkları çalışmada ise, injeksiyon pipeti ile TE hücrelerden girerek ekspanded blastosistlerin kollapsını gerçekleştirdikten sonra vitrifiye etmişlerdir. Bunun sonucunda *artificial collapse* yapılan embriyoların canlılık oranı %97,8 olup implantasyon, gebelik ve doğum oranları kontrol grubundan yüksek bulunmuştur. Lewi-Setti ve ark. (2016) ve Feng ve ark. (2010)'nın çalışmalarında kullanılan AC yöntemi benzer olsa da bu çalışmada *artificial collapse* sonrası vitrifiye edilen embriyolarının çözdüme sonrası canlılık oranı diğerlerinden düşük bulundu. İnsan IVF'inde *artificial collapse* sonrası vitrifiye edilen embriyoların çözdüme sonrası canlılık oranının bu çalışmadan yüksek olmasının sebebi kullanılan materyal türünün farklı olması, oositlerin in vivo olarak elde edilmesi, embriyoların dondurulmasında kullanılan payet sistemlerinin farklılığı ve uygulanan *artificial collapse* yöntemlerinin farklılığından kaynaklandığı düşünüldü.

Çapları 300 µm'den büyük olan at embriyolarının dondurulma sonrasında gebelik oranları oldukça düşük olmaktadır. Bu nedenle at ekspanded blastosistlerine vitrifikasyon öncesinde blastosöl kollapsı uygulanmış ve bu yöntemin uygun çaplı bir pipet kullanılarak yapıldığı takdirde vitrifikasyonda başarı sağlayacağı bildirilmiştir (Choi ve ark., 2011). Bartolac ve ark. (2015), blastosöl kollapsı yapılan domuz embriyolarının vitrifiye edilip çözdürülmesi sonucunda viyabilite oranı kontrol grubundakilerden daha düşük bulunmuştur. Böylece domuzlarda vitrifikasyon öncesinde uygulanan AC'nin başarıyı artırmadığını bildirmiştir. Vitrifikasyon öncesinde suni kollaps uygulamasının insanlarda ve domuz haricindeki hayvan türlerinde de başarıyla uygulanabilirliği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak dondurma öncesi artificial collapse yöntemi henüz insanlarda olduğu gibi hayvanlarda rutin olarak uygulanamamaktadır. Bu çalışmada, aspirasyon sonrası vitrifiye edilen embriyoların dondurulmasında elde edilen sonuçlara göre minimum hacim içeren payet sistemlerinin kullanılmasıyla daha yüksek viyabilite elde edilebileceği kanısına varıldı.

Barfield ve Seidel'in 2013 yılında yaptıkları çalışmada, IVP sığır embriyolarının blastosist sıvısının aspirasyonu sonrasında geleneksel yavaş dondurma yöntemiyle dondurulmuş ve EG, galaktoz ve %18 Fikol kriyoprotektanları ile iki adımda, OPS (*open pulled straw*) yöntemiyle vitrifiye edilmiştir. Çözdürülen embriyoların 24 saat kültürleri sonucunda her iki yöntemin çözdürme sonrası viyabiliteleri incelendiğinde bu oran, toplam kollabe edilen %50,5; toplam kollebe edilmeyen %26,3 olarak tespit edilmiştir. Yazarlar tamamen ekspande olan ve *hatched* blastosistlerin (%45.9), blastosist ve ekspanded blastosistlere (%30) göre çözdürme sonrası canlılıklarının daha iyi sonuç verdiğini belirtmiştir. Çalışmada ise, 72. saatteki embriyoların toplam *hatched* oranı ekspanded blastosistlerde, blastosistlere oranla önemli derecede yüksek bulunmuştur. Bu sonuç, Barfield ve Seidel (2013)'in çalışması ile benzerlik göstermektedir. Barfield ve Seidel (2013)'in yaptıkları çalışmada dondurma yöntemine bakılmaksızın AC'nin etkin olduğu belirtilirken, bu çalışmada AC'nin yavaş dondurma yönteminde daha başarılı olduğu tespit edildi. Çalışmalarda AC için uygulanan yöntem ve yavaş dondurma yöntemi benzer ancak vitrifikasyonda kullanılan kriyoprotektanlar ve payet sistemi farklıdır. Çalışmalar arası

oluşan bu farklılığın vitrifikasyonda kullanılan tekniklerin farklı olmasından, kullanılan embriyolar arasında *hatched* embriyoların da bulunmasından, çözdüreme sonrasında viyabilite incelenmesinin sadece 24. saatte yapılmış olması ve uygulayıcı farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

IVP sığır embriyolarında yapılan bir çalışmada Ha ve ark., (2014), mikromanipülatör yardımıyla blastosist kavitesinin punksiyonu sonrasında embriyoları iki adımda vitrifiye ederek plastik payette *inner surface*'e yerleştirmiş ve punksiyon yapılan grupta 24. saatteki *hatched* oranı %62.9 olarak bulunurken punksiyon yapılmayan grupta bu oran %37.1 olarak bulunmuştur. Nunes ve ark. 2014 yılında IVP sığır embriyolarını iki farklı sukroz solüsyonu (0.125 ve 0.25 M) ya da mikromanipülatör yardımıyla iğne punksiyonu yöntemlerini kullanarak AC yapmış ve vitrifikasyon yöntemiyle dondurmuşlardır. Çözdüreme sonrası 24 saatteki re-ekspansiyon oranları sukroz ve iğne punksiyonu ile AC yapılan embriyolarda kontrol grubuna göre daha düşük bulunmuştur (sırayla %51.6, %27.6, %86.1). Çalışmada vitrifikasyon kontrol ve yavaş dondurma kontrol grubu, 72 saat sonra yapılan viyabilite oranları Ha ve ark. (2014)'nın çalışması ile benzer bulunurken Nunes ve ark. (2014)'dan daha düşük bulunmuştur. Aspirasyon sonrası vitrifiye edilen grup (Grup I), Nunes ve ark. (2014) ile benzer bulunurken Ha ve ark. (2014)'nın çalışmasından farklı bulundu. Ancak bu çalışmada aspire edilen ve yavaş dondurulan embriyoların çözdüreme sonrası canlılık oranının diğer çalışmalardan daha fazla olduğu tespit edildi. Vitrifikasyon sonucundaki farklılıkların kollaps için kullanılan yöntemin, viyabilite kontrol saatinin, vitrifikasyon solüsyonlarının farklılığı ve blastosistin payete yüklenme şekli olduğu düşünüldü. Ayrıca aspirasyon sırasında az da olsa zona pellusidaya zarar verildiği için vitrifikasyon sırasında hücre içine daha fazla kriyoprotektan girişinin olması, viyabiliteyi olumsuz etkileyebileceği kanısına varıldı. Bununla birlikte *artificial collapse* için blastosöl aspirasyonunun daha etkili bir yöntem olabileceği düşünüldü.

Tutt ve ark. (2016) çalışmalarında, IVP sığır expanded blastosistlerin blastosist sıvısı aspirasyonunu ICSI pipeti ve holding pipeti kullanarak yapmıştır. Embriyolar M-199, %20 FCS içerisinde 0.5M sukroz, DMSO ve EG bulunan

vitrikasyon solüsyonu ile dondurulup çözdürülmesini takiben 48 saat sonraki re-ekspansiyon oranları karşılaştırılmıştır. Kontrol grubundaki re-ekspansiyon ve *hatched* oranı (%73,5; %30,9) aspirasyon grubundan (%61,5; %19,8) önemli derecede fazla bulunmuştur. Bu çalışmadan farklı olarak, tez çalışmasındaki vitrikasyon gruplarının *hatching/hatched* oranı kendi aralarında karşılaştırıldığında aradaki fark önemsiz bulundu. Bu farklılığın kullanılan vitrikasyon solüsyonlarından kaynaklandığı düşünüldü. Ayrıca kullanılan AC yöntemi iki çalışmada da aynı olmasına rağmen, yavaş dondurma yöntemi ile elde edilen sonuç, Tutt ve ark. (2016)'nın sonucundan daha yüksektir. Bu farkın ise uygulanan dondurma yöntemi farklılığından kaynaklandığı kanısına varıldı. Min ve ark. (2013)'nin çalışmasında, in vitro olarak üretilen ve somatik hücre nükleer transferi yapılan sığır *hatching* ve *hatched* blastosistler 29-G iğne ile tutularak özel olarak çekilerek hazırlanan pastör pipetleri ile *forced blastocoel collapse* (FBC)'ın vitrikasyon öncesinde etkili bir uygulama olduğu belirlenmiştir. FBC sonrası *cryotop* ile vitrikiye edilip çözdürülen IVP embriyolarda canlılık oranı %81.9 olarak bulunmuştur (Min ve ark., 2013). Çalışmadaki vitrikasyon kontrol (Grup II) ve aspire-vitrikiye edilen embriyoların (Grup I) çözdürme sonrası sonuçları Min ve ark. (2013)'dan farklı bulunmuştur. Bu farklılığın ise kullanılan embriyoların *hatching* ya da *hatched* aşamasında oluşundan ve aynı şekilde vitrikasyon prosedürü farklılığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çalışmada embriyoların çözdürme sonrası bir hafta incelenmesini takiben Grup III'te bulunan embriyoların canlılık oranı diğer üç gruptan önemli derecede farklı bulunurken, bu gruplar arasında önemli bir farklılık bulunmadı ( $p < 0.001$ ). Embriyoların viyabilitesinin 7 gün takibinin 3 gün takip edilenlere oranla daha yüksek bulunmasının 3. günden sonra da embriyoların gelişimlerinin devam ettiğini düşündürmektedir. Bu çalışmada, sığır embriyolarının blastosöl aspirasyonu sonrasında yavaş dondurma yöntemi ile dondurulmasının çözdürme sonrası viyabiliteyi olumlu etkilediği ve vitrikasyondan daha başarılı olduğu kanısına varıldı.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, in vitro koşullarda üretilen sığır blastosist sıvısının aspirasyonu yapıldıktan sonra dondurulup çözdürülmesini takiben embriyoların viyabilitesi incelenerek, *artificial collapse* metodunun dondurma çözdürme sonrası viyabiliteye etkisinin incelenmesi amaçlandı. Buna göre;

- IVP sığır blastosist ve ekspanded blastosistlerde vitrifikasyon ve yavaş dondurma yöntemleri öncesinde blastosist sıvısının aspirasyonunun, çözdürme sonrasında embriyoların viyabilitesi üzerindeki etkisi ve optimal koşullar sağlandığında, klasik içeriği tanımlı solüsyonlar kullanılarak düşük maliyette sığır embriyolarının in vitro yolla üretiminin gerçekleştirilebileceği belirlendi.

- Çalışmaya göre, aspire edilen embriyoların yavaş dondurma yöntemiyle dondurulup çözdürüldükten sonra embriyo viyabilitesinin vitrifikasyon yöntemine göre yüksek olduğu belirlenirken, aspirasyon için seçilen embriyonun ekspanded blastosist aşamasında olması, çözdürme sonrasında viyabiliteyi olumlu etkilediği görüldü.

- Zigotların in vitro kültürü sırasındaki ilk bölünmelerinin takibinin iki aşamalı olarak 27-31 ve 51-55. saatlerde yapılmasının, kullanılacak embriyonun seçiminde önemli olabileceği saptandı. *Artificial collapse*'ın yavaş dondurma protokolü ile birlikte uygulanması ile ilgili fazla çalışma bulunmamakla birlikte yapılan tez çalışmasının sonucuna göre, *artificial collapse*'ın yavaş dondurma da rahatlıkla kullanılabilmesi ve başarılı sonuçlar elde edilebileceği kanısına varıldı.

- Günümüzde embriyoların dondurulmasında vitrifikasyon yöntemi geliştirilmiş ve hala geliştirilmeye devam etmesine rağmen çözdürme sonrası başarısı henüz yavaş



dondurma sonuçlarını yakalayamamıştır. Bu nedenle klasik vitrifikasyon tekniğinden uzaklaşarak minimum hacim sağlayan taşıma sistemlerinin tercih edilmesi önerilmekte ve böylece çözündürme sonrası viyabilitenin artırılacağı düşünülmektedir.

- Blastosist sıvısının aspirasyonu ile embriyoya minimum hasar verilerek, embriyonun kriyotoleransının artırılacağı kanısına varıldı. Blastomer biyopsisi ya da *splitting* yöntemlerine ihtiyaç duyulmadan embriyoya minimum hasar vererek elde edilen aspirasyon sıvısından hem in vivo hem de in vitro embriyolarda implantasyon öncesinde genetik tanı ve cinsiyet tayini gibi genetik analizler yapılarak, gelecekte embriyo seleksiyonunun ve hatta, hayvan ıslahında kullanılan genomik seleksiyonun bu dönemde daha kolay ve rutin bir hale gelebileceği düşünülmektedir.

- Bununla birlikte aspirasyon yapılan ve dondurulup çözdürülen embriyoların uterusu transferi sonrası gebelik oranlarına bakılarak yöntemin çiftlik koşullarında uygulamaya geçebilmesine katkı sağlanabileceği düşünülmektedir.

## ÖZET

### **Blastosist Sıvısı Aspirasyonunun İn Vitro Sığır Embriyolarında Dondurma Sonrası Viyabiliteye Etkisi**

Bu çalışmada in vitro koşullarda üretilen sığır embriyolarından blastosist sıvısının aspirasyonu yapıldıktan sonra, embriyoların vitrifikasyon ve yavaş dondurma metotlarıyla dondurulup çözülmesini takiben viyabilitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmada lokal mezbahalardan toplanan ovaryumlardan elde edilen oositlerde maturasyon, fertilizasyon ve embriyo kültürü yapılmasını takiben zigotların *cleavage* kontrolü IVF sonrası 27-31. saatlerde ve 51-55. saatler olmak üzere iki kez inverted mikroskop altında kayıt alındı. Embriyonik kültürün 7-8-9. günlerinde oluşan toplamda 597 adet 5 hücreli ve 5 hücreden büyük aşamadaki zigotlardan 271 adet BL ve Exp-BI elde edildi (%45,39). Bunların 141 adeti (%52,02) iyi kaliteli (*good*) olarak değerlendirilerek çalışmada kullanıldı. Embriyolar; aspire ve vitrifiye edilen embriyolar (Grup I), vitrifikasyon kontrol (Grup II), aspire ve yavaş dondurma ile dondurulan embriyolar (Grup III) ve yavaş dondurma kontrol (Grup IV) olmak üzere dört gruba ayrıldı. Aspirasyon gruplarında yer alan BI/Exp BI'nin blastosöl sıvısı, özel olarak hazırlanan kağıllar cam pipet ile mikromanipülatör ve inverted mikroskop kullanılarak yapıldı. Embriyonun iç hücre kümesine dokunulmadan trofoblast hücreleri arasından mikroenjeksiyon pipetiyle girilerek blastosist sıvısının tümü blastosist kavitesi tamamen kollabe olana kadar aspire edildi. Bütün gruplarda çözülme sonrası embriyoların canlılık oranları, 24-48-72. saatlerde ve 7 gün süre ile takip edildi. Yapılan istatistik değerlendirmeler sonucunda, her iki yöntem ile dondurulan embriyoların 3 gün ve 7 gün takiplerinde toplam *hatched* oranı expanded blastosistlerde blastosistlere göre daha başarılı bulundu ( $p=0,004$  ve  $p=0,006$ ). Çözülme sonrasında embriyoların 24-48 ve 72. saatlerdeki toplam *hatching-hatched* oranı incelendiğinde; Grup I (%28,57), Grup II (%39,39) ve Grup IV (%41,18) arasında önemli bir farklılık bulunmazken, Grup III (%71,88) diğer gruplardan önemli bir şekilde yüksek bulundu ( $p=0,002$ ). Çözülme sonrası 7 gün süre ile incelenen embriyoların *hatching-hatched* oranı Grup III (%78,10)'te diğer gruplardan önemli bir şekilde yüksek bulundu (Grup I-%31; Grup II-%48,50; Grup IV-%55,90) ve Grup I,II ve IV arasındaki farklılığın ise önemsiz olduğu tespit edildi ( $p<0,001$ ). Yapılan çalışmada, blastosist sıvısı aspirasyonunun yavaş dondurmada rahatlıkla kullanılabileceği ve başarılı sonuçlar elde edilebileceği sonucuna varıldı. Aspirasyon için embriyo seçiminde embriyonun expanded blastosist aşamasında olması, çözülme sonrası viyabiliteyi olumlu etkilediği kanısına varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** İnek, Blastosist, *Artificial Collapse*, Embriyo Dondurma

## SUMMARY

### **Effect of Artificial Collapse Method on Freezed-Post Thawed Bovine Blastocysts Viability.**

The aim of this study is to investigate the viability of in vitro produced embryos, which will be frozen and thawed by using slow freezing and vitrification methods after blastocyst fluid aspiration.

In this study, oocytes were obtained from slaughter house ovaries using standard techniques. Cleavage checked was done 27-31 hours and 51-55. hours after IVF under the inverted microscope. Blastocysts or expanded blastocysts were obtained from 5-cell  $\leq$  zygotes at 7-8-9 days post fertilization (45,39%). Good embryos were used in the study and four groups were formed; Group I-vitrification aspirated, Group II-vitrification control, Group III-slow freeze aspirated and Group IV-slow freeze control. Embryos at 7-8-9<sup>th</sup> days were aspirated using micromanuplator attached to the inverted microscope. For aspiration, capillary glass pipettes prepared with micropipette puller. Microinjection pipette was entered the blastocyst cavity through trophoblast cells without damaging inner cell mass and blastocoel fluid were aspirated until the collapse of blastocyst cavity. After thawing, embryo viability was checked for 24-48-72<sup>nd</sup> hours and 7 days. As a result of the statistical evaluations, the total hatched ratio of frozen embryos in both methods that following 3 days and 7 days after thawing was found to expanded blastocysts were more successful than blastocysts ( $p = 0,004$  and  $p = 0,006$ ). When embryo viability was examined for 3 days, there was no significant difference was found between Group I (28,57%), Group II (39,39%), Group IV (41,18%) but Group III (71,88%) was found significant difference from other groups ( $p=0,002$ ). While embryo viability was examined for 7 days, the rates of hatched embryos of slow freeze aspirated group (Group III) (78,10%) was significantly higher ( $p<0,001$ ) than vitrification aspirated groups (Group I) (31%), vitrification control (Group II) (48,50%) and slow freeze control (Group IV) (55,90%). There was no difference between vitrification control, vitrification aspirated and slow freeze control groups. In the current study, it has been concluded that blastocyst fluid aspiration can be easily used in slow freezing method and successful results can be obtained. Viability is positively effected after thawing when embryo is in expanded blastocyst stage at the selection of the embryo for aspiration.

**Keywords:** Bovine, Blastocyst, Artificial Collapse, Embryo Freezing

## KAYNAKLAR

- ABSALÓN-MEDINA VA, BUTLER WR, GILBERT RO (2014). Preimplantation embryo metabolism and culture systems: Experience from domestic animals and clinical implications. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **31**(4): 393-409.
- ACAR DB (2008). Sığır oositlerinde intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI), ICSI sonrası oositlerin aktivasyonu ve gelişim aşamalarının değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Ankara.
- ADAMS GP ve SINGH J (2015). Chapter 24: Ovarian Follicular and Luteal Dynamics in Cattle In: *Bovine Reproduction* Ed: R. M. Hopper. John Willey and Sons, Inc p.:219-244.
- AERTS JMJ, BOLS PEJ (2010). Ovarian follicular dynamics: A review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in Domestic Animals*, **45**(1): 171-179.
- AKKOC T, TASKIN C, CAPUTCU TA, ARAT S, BAGIS H (2011). The effect of solid surface vitrification (SSV) versus classic vitrification technique on survive rate of in vitro produced bovine blastocysts. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **10**(22): 2885-2891.
- ALBERTINI DF, SANFINS A, COMBELLES CM (2003). Origins and manifestations of oocyte maturation competencies. *Reproductive BioMedicine Online* **6**: 410-415.
- ANONİM 1. Erişim Adresi: <http://www.mpibpc.mpg.de/15190278/research> Erişim Tarihi: 04/07/2017.
- ANONİM 2. Erişim Adresi: <http://www.newhopefertility.com/about-us/embryology/oocyte-embryo-grading/> Erişim Tarihi: 01/07/2017.
- ARAT S (2002). Klonlama. *Bilim Teknik Dergisi*, **414**:10-12.
- ARAV A (2014). Cryopreservation of oocytes and embryos. *Theriogenology*, **81**(1): 96-102.
- ARMSTRONG DG, GUTIERREZ CG, BAXTER G, GLAZYRIN AL, MANN GE, WOAD KJ, HOGG CO, WEBB R (2000). Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, **165**: 101-113.
- BARFIELD JP (2014). Improving post-thaw viability of bovine embryos by collapsing the blastocoele prior to cryopreservation. p: 46-49. Erişim Adresi: [https://www.researchgate.net/profile/Emiliana\\_Oliveira\\_Santana\\_Batista/publication/276277646\\_Using\\_information\\_on\\_circulating\\_levels\\_of\\_anti-Mullerian\\_hormone\\_AMH\\_to\\_enhance\\_embryo\\_production\\_and\\_fertility\\_in\\_cattle/links/5554f37a08ae6fd2d821ba96/Using-information-on-circulating-levels-of-anti-Mullerian-hormone-AMH-to-enhance-embryo-production-and-fertility-in-cattle.pdf#page=52](https://www.researchgate.net/profile/Emiliana_Oliveira_Santana_Batista/publication/276277646_Using_information_on_circulating_levels_of_anti-Mullerian_hormone_AMH_to_enhance_embryo_production_and_fertility_in_cattle/links/5554f37a08ae6fd2d821ba96/Using-information-on-circulating-levels-of-anti-Mullerian-hormone-AMH-to-enhance-embryo-production-and-fertility-in-cattle.pdf#page=52).
- BARFIELD JP, SEIDEL GE (2013). 136 Blastocoele collapse improves post-thaw survival of slow frozen and vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, **26**(1): 181.

- BARTOLAC LK, LOWE JL, KOUSTAS G, SJOEBLOM C, GRUPEN CG (2015). A comparison of different vitrification devices and the effect of blastocoele collapse on the cryosurvival of in vitro produced porcine embryos. *Journal of Reproduction and Development*, **61**(6): 525-531.
- BETTERIDGE KJ (2003). A History of Farm Animal Embryo Transfer and Some Associated Techniques. *Animal Reproduction Science*, **79**(3): 203-244.
- BILODEAU-GOESEELS, S. (2012). Bovine oocyte meiotic inhibition before in vitro maturation and its value to in vitro embryo production: does it improve developmental competence?. *Reproduction in Domestic Animals*, **47**(4): 687-693.
- BLOCK J, ZOLINI AM, CARRASCAL-TRIANA E, RUIZ A, HANSEN PJ, TORRES CAA (2015). 34 Effects of l-carnitine and trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid supplementation during maturation on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*. **28**(2):147-147.
- BONDIOLI K (2015). Chapter 77: Cryopreservation of Bovine Embryos. In: *Bovine Reproduction* Ed: R. M. Hopper. John Willey and Sons, Inc. p.:718-722
- BRACKETT BG, ZUELKE KA (1993). Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, **39**(1): 43-64.
- CAAMAÑO JN, GÓMEZ E, TRIGAL B, MUÑOZ M, CARROCERA S, MARTIN D, DIEZ C (2015). Survival of vitrified in vitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology*, **83**(5): 881-890.
- CAIXETA ES, MACHADO MF, RIPAMONTE P, PRICE C, BURATINI J (2013). Effects of FSH on the expression of receptors for oocyte-secreted factors and members of the EGF-like family during in vitro maturation in cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, **25**(6): 890-899.
- CHEN SU, LEE TH, LIEN YR, TSAI YY, CHANG LJ, YANG YS (2005). Microsuction of blastocoele fluid before vitrification increased survival and pregnancy of mouse expanded blastocysts, but pretreatment with the cytoskeletal stabilizer did not increase blastocyst survival. *Fertility and Sterility*, **84**: 1156-1162.
- CHOI, Y. H., VELEZ, I. C., RIERA, F. L., ROLDÁN, J. E., HARTMAN, D. L., BLISS, S. B, BLANCHARD TL, HAYDEN SS, HINRICHS K (2011). Successful cryopreservation of expanded equine blastocysts. *Theriogenology*, **76**(1): 143-152.
- D'ALESSANDRO A, FEDERICA G, PALINI S, BULLETTI C, ZOLLA L (2012). A mass spectrometry-based targeted metabolomics strategy of human blastocoele fluid: a promising tool in fertility research. *Molecular BioSystems*, **8**(4): 953-958.
- DESAI N, SZEPTYCKI J, SCOTT M, ABDELHAFEZ FF, GOLDFARB J (2008). Artificial collapse of blastocysts before vitrification: mechanical vs. laser technique and effect on survival, cell number, and cell death in early and expanded blastocysts. *Cell Preservation Technology*, **6**(3): 181-190.
- DOCHI O, IMAI K, TAKAKURA H (1995). Birth of calves after direct transfer of thawed bovine embryos stored frozen in ethylene glycol. *Animal Reproduction Science*, **38**:179-185.

- DOCHI O, IMAI K, GOTO Y, SHIMOHIRA I (2000). Effect of one-step dilution procedures on the viability of bovine embryos frozen-thawed in ethylene glycol. *Journal of Rakuno Gakuen University, Natural Science*, **25**(1): 53-58.
- DODE MEB, STEINHAUSER CB, PRYOR JH, COLLARES TV, DESCHAMPS JC, LOONEY CR, FORREST D (2016). Survival of 7 day in vitro produced bovine embryos exposed to 0.5 M sucrose prior to slow cool freezing. *Animal Reproduction*, **13**(3): 693-693.
- EL-RAEY M, NAGAI T (2014). Different aspects of cattle oocyte in vitro maturation: review. *Journal of Reproduction and Infertility*, **5**(1): 1-13.
- EPPIG JJ, O'BRIEN M, WIGGLESWORTH K (1996). Mammalian oocyte growth and development in vitro. *Molecular Reproduction And Development*, **44**(2): 260-273.
- FAIR T (2010). Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. *Reproduction, Fertility and Development*, **22**(1): 13-20.
- FAIR T (2003). Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Animal Reproduction Science*, **78**(3): 203-216.
- FELMER RN, ARIAS ME, MUNOZ GA, RIO JH (2011) Effect of different sequential and two-step culture systems on the development, quality, and RNA expression profile of bovine blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, **78**(6):403-14.
- FENG GX, ZHANG B, SHU JH, ZHOU H, ZHOU L, GAN XY, LIU Y (2010). Effects of artificial shrinkage of blastocoels before vitrification on pregnancy outcome. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, **45**(11): 838-842.
- FEUGANG JM, DE ROOVER R, MOENS, A, LÉONARD S, DESSY F, DONNAY I (2004). Addition of  $\beta$ -mercaptoethanol or Trolox® at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*, **61**(1): 71-90.
- GALLI C, DUCHI R, CROTTI G, TURINI P, PONDERATO N, COLLEONI S, LAGUTINA I, LAZZARI G (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, **59**(2): 599-616.
- GORDON I (1994) . Chapter 2: oocyte recovery and maturation In: *Laboratory Production of Cattle Embryos* (1<sup>st</sup> Ed). Ed: I. Gordon. CABI Publishing, Cambridge, USA, p.: 30-142.
- GORDON I (2003a). Chapter 4: Maturing the oocyte. In: *Laboratory Production Of Cattle Embryos* (2<sup>nd</sup> Ed), CABI Publishing, Cambridge, USA, p.: 112-157.
- GORDON I (2003b). Chapter 5: Capacitating bovine sperm. In: *Laboratory Production of Cattle Embryos* (2<sup>nd</sup> Ed), CABI Publishing, Cambridge, USA, p.: 158-175.
- GORDON I (2003c). Chapter 7: Culturing and evaluating the early bovine embryo. In: *Laboratory Production of Cattle Embryos* (2<sup>nd</sup> Ed), Ed: I. Gordon. CABI Publishing, Cambridge, USA, p.: 220-276.

- GORDON I (2003d). Chapter 3: Recovering the Bovine Oocyte. In: *Laboratory Production of Cattle Embryos* (2<sup>nd</sup> Ed), CABI Publishing, Cambridge, USA, p.: 79-111
- GORDON I (2003e). Chapter 8: Preservation of embryos and oocytes. In: *Laboratory Production of Cattle Embryos* (2<sup>nd</sup> Ed), CABI Publishing, Cambridge, USA, p.: 277-302.
- GOUGEON A (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: Facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, **17**:121–55.
- GUPTA A, SINGH J, ANZAR M (2015). Effect of cryopreservation technique and season on the survival of in vitro produced cattle embryos. *Animal Reproduction Science*, **164**: 162-168.
- HA AN, PARK HS, JIN JI, LEE SH, KO DH, LEE DS, WHITE KK, KONG IK (2014). Postthaw survival of in vitro-produced bovine blastocysts loaded onto the inner surface of a plastic vitrification straw. *Theriogenology*, **81**(3): 467-473.
- HASHIMOTO S (2009). Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. *Journal of Reproduction and Development*, **55**(1): 1-10.
- HASLER JF (2003). The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Animal Reproduction Science*, **79**(3): 245-264.
- HASLER JF (2009). Synthetic media for culture, freezing and vitrification of bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, **22**: 119-125.
- HASLER JF, BARFIELD JP (2015). Chapter 81: In Vitro Fertilization. In: *Bovine Reproduction* Ed: R. M. Hopper, John Willey and Sons, Inc. p.:758-770
- HERRERA EY, DE FRUTOS C, LAGUNA-BARRAZA R, GUTIERREZ-ADAN A, RIZOS D (2010). 88 Effect of vitrification procedure on survival rate of bovine embryos produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, **23**(1): 149-150.
- HERRERA C, MORIKAWA MI, CASTEX CB, PINTO MR, ORTEGA N, FANTI T, GARAGUSO R, FRANCO MJ, CASTAÑARES M, CASTAÑEIRA C, LOSINNO L, MIRAGAYA MH, MUTTO AA (2015). 317 sex determination of equine embryos by PCR using blastocoele fluid. *Reproduction, Fertility, and Development*, **27**(1): 247-248.
- HINRICHS K, CHOI YH (2016). Micromanipulation of equine blastocysts to allow vitrification. *Reproduction, Fertility and Development*, **28**(8), 1092-1096.
- HIRAOKA K, HIRAOKA K, KINUTANI M, KINUTANI K (2004). Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Human Reproduction*, **19**(12): 2884-2888.
- HOSHI H. (2003) In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, **59**(2): 675–85.
- HUR YS, PARK JH, RYU EK, YOON HJ, YOON SH, HUR CY, LEE WD, LIM JH (2011). Effect of artificial shrinkage on clinical outcome in fresh blastocyst transfer cycles. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, **38**(2): 87-92.

- HYTTEL P (2011). Chapter 1: Electron microscopy of mammalian oocyte development, maturation and fertilization. In: *Oocyte Maturation and Fertilization: A Long History For a Short Event*. p.: 1-37.
- IDETA A, AOYAGI Y, TSUCHIYA K, KAMIJIMA T, NISHIMIYA Y, TSUDA S (2013). A simple medium enables bovine embryos to be held for seven days at 4 C. *Scientific reports*, **3**: 1173.
- IMAI K, KOBAYASHI S, GOTO Y, DOCHI O, SHIMOHIRA, I (1997). Cryopreservation of bovine embryos obtained by in-vitro culture of IVM-IVF oocytes in the presence of linoleic acid albumin. *Theriogenology*, **1**(47): 347.
- IMAI K, MATOBA S, DOCHI O, SHIMOHIRA I (2002b). Different factors affect developmental competence and cryotolerance in in vitro produced bovine embryo. *Journal of Veterinary Medical Science*, **64**(10): 887-891
- IMAI K, KOBAYASHI S, KANEYAMA K, KOJIMA T, NAGAI T (2002a). Effects of butyrolactone-I on GVBD in bovine oocytes and subsequent maturation, fertilization and development in vitro. *Journal of Reproduction and Development*, **48**(3): 249-255.
- INABA Y, AIKAWA Y, HIRAI T, HASHIYADA Y, YAMANOUCHI T, MISUMI K, OHTAKE M, SOMFAI T, KOBAYASHI S, SAITO N, MATOBA S, KONISHI K, IMAI K (2011). In-straw cryoprotectant dilution for bovine embryos vitrified using Cryotop. *Journal of Reproduction and Development*, **57**(4): 437-443.
- INABA Y, MIYASHITA S, SOMFAI T, GESHI M, MATOBA S, DOCHI O, NAGAI T (2016). Cryopreservation method affects DNA fragmentation in trophectoderm and the speed of re-expansion in bovine blastocysts. *Cryobiology*, **72**(2): 86-92.
- IWAYAMA H, HOCHI S, YAMASHITA M (2011). In vitro and in vivo viability of human blastocysts collapsed by laser pulse or osmotic shock prior to vitrification. *Journal of Assisted Reproduction And Genetics*, **28**(4): 355-361.
- JAHNKE M, WEST JK, YOUNGS CR (2015). Chapter 79: Evaluation of In Vivo-Derived Bovine Embryos In: *Bovine Reproduction* Ed: R. M. Hopper. John Wiley and Sons, Inc. p.:733-748.
- JENSEN PL, GRØNDAHL ML, BECK HC, PETERSEN J, STROEBECH L, CHRISTENSEN ST, YDING ANDERSEN C (2014). Proteomic analysis of bovine blastocoel fluid and blastocyst cells. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, **60**(3): 127-135.
- JONES KT (2004). Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction*, **10**: 1–5
- KAIDI S, BERNARD S, LAMBERT P, MASSIP A, DESSY F, DONNAY I (2001). Effect of conventional controlled-rate freezing and vitrification on morphology and metabolism of bovine blastocysts produced in vitro. *Biology of Reproduction*, **65**(4): 1127-1134.
- KANAGAWA H, SHIMOHIRA I, SAITOH N (1995). Manual of bovine embryo transfer. *Japan Livestock Technology Association*, 1-44.
- KASAI M, MUKAIDA T (2004). Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification. *Reproductive BioMedicine Online*, **9**(2): 164-170.



- KAYMAZ M (2012). Bölüm 6: Yardımcı üreme teknikleri. In: Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. Eds: A. Semacan, M. Kaymaz, M. Fındık, A. Rışvanlı, A. Köker. Medipres, Malatya, p.: 695-811.
- KAYMAZ M, ONUR G, ÖZDEMİR M, KARAKAŞ K, PİR YAĞCI İ (2015). Reprodüktif Sürü Sağlığında Yardımcı Üreme Teknolojilerinin Kullanımı. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Science Obstetrics and Gynecology Special Topics*, **1**(1): 86-99.
- KESKİNTEPE L, SHER G, MACHNICKA A, TORTORIELLO D, BAYRAK A, FISCH J, AGCA Y (2009). Vitrification of human embryos subjected to blastomere biopsy for pre-implantation genetic screening produces higher survival and pregnancy rates than slow freezing. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **26**(11-12): 629-635.
- KOBAYASHI S (2007). Manual for Ovum Pick-Up and In Vitro Fertilization. *Japan International Cooperation Agency*, Japan.
- KOYAMA H, SUGULLE AH, DOCHI O (2007). 80 Effect of pre-equilibration time on the survival rate of in vitro-fertilized bovine embryos after vitrification. *Reproduction, Fertility and Development*, **20**(1): 120-121.
- LANE M, SCHOOLCRAFT WB, GARDNER DK, PHIL D (1999). Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*, **72**(6): 1073-1078.
- LEVI-SETTI PE, MENDUNI F, SMERALDI A, PATRIZIO P, MORENGHI E, ALBANI E (2016). Artificial shrinkage of blastocysts prior to vitrification improves pregnancy outcome: analysis of 1028 consecutive warming cycles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **33**(4): 461-466.
- LIEBERMANN J, CONAGHAN C (2013). Artificial collapse prior blastocyst vitrification: Improvement of clinical outcomes. *Journal of Clinical Embryology*, **16**(1): 107-118. Erişim Adresi: <http://embryologists.com/jce161-artificial-collapse-prior-blastocyst-vitrification/>
- LIM KT, JANG G, KO KH, LEE WW, PARK HJ, KIM JJ, KANG SK, LEE BC. (2008). Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. *Animal Reproduction Science*, **103**(3): 239-248.
- LONERGAN P, FAIR T (2016). Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review Of Animal Biosciences* **4**: 255-268.
- MACHATY Z, PEIPPO J, PETER A (2012). Production and manipulation of bovine embryos: Techniques and terminology. *Theriogenology*, **78**(5): 937-950.
- MACUN HC (2004). Sığır oositlerinin in vitro maturasyonuna follikül uyarıcı hormon ve insan menopozal gonadotropininin etkisi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi. Ankara.
- MACUN HC, KAYMAZ M (2006). Sığır oositlerinin in vitro maturasyonuna follikül uyarıcı hormon ve insan menopozal gonadotropininin etkisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **53**: 25-29.

- MASSIP A (2001). Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reproduction in Domestic Animals*, **36**(2): 49-55.
- MASSIP A (2003). Cryopreservation of bovine oocytes: current status and recent developments. *Reproduction Nutrition Development*, **43**(4): 325-330.
- MENEZO YJ, ELDER K (2011). Chapter 3: The enhancers of oocyte competence. In: *Oocyte Maturation and Fertilization: A Long History For a Short Event*. p.: 64-70.
- MIN SH, LEE E, SON HH, YEON JY, KOO DB (2013). Forced collapse of the blastocoel enhances survival of cryotop vitrified bovine hatching/hatched blastocysts derived from in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Cryobiology*, **66**(2): 195-199.
- MIYASHITA S, INABA Y, SOMFAI T, GESHI M, NAGAI T, KOYAMA H, DOCHI O. (2011). 165 The effects of l-carnitine and linoleic acid albumin supplementation on the development and cryosurvival of bovine in vitro-matured/in vitro-fertilized embryos in in vitro culture medium. *Reproduction, Fertility and Development*, **24**(1): 194-195.
- MOUSSA M, SHU J, ZHANG XH, ZENG F (2015). Maternal control of oocyte quality in cattle “a review”. *Animal Reproduction Science*, **155**: 11-27.
- MUKAIDA T, NAKAMURA S, TOMIYAMA T, WADA S, OKA C, KASAI M, TAKAHASHI K (2003). Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Human Reproduction*, **18**(2): 384-391.
- MUKAIDA T, OKA C, GOTO T, TAKAHASHI K (2006). Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Human Reproduction*, **21**(12): 3246-3252.
- NEDAMBALE TL, DU F, YANG X, TIAN XC (2006). Higher survival rate of vitrified and thawed in vitro produced bovine blastocysts following culture in defined medium supplemented with  $\beta$ -mercaptoethanol. *Animal Reproduction Science*, **93**(1): 61-75.
- NIELSEN JMK, WRENZYCKI C, HYTTEL P, POPPICH T, F, STRØBECH L (2014). 234 New culture media affects blastocyst development and gene expression levels in in vitro-produced bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, **27**(1): 206-207.
- NILSSON E, PARROTT JA, SKINNER MK, (2001) Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* **175**: 123–130.
- NISHISOUZU T, ABE A, MATOBA S, DOCHI O, OKAMURA K (2017). 100 Factors affecting pregnancy rates in the transfer of in vitro-produced japanese black cattle embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, **29**(1): 157-158.
- NORRIS RP, RATZAN WJ, FREUDZON M, MEHLMANN LM, KRALL J, MOVSESIAN MA, WANG H, NIKOLAEV VO, JAFFE LA (2009). Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, **136**(11): 1869-1878.

- NUNES GB, ACCORSI MF, LEÃO BCS, ROCHA-FRIGONI, NAS, MINGOT GZ (2014). Effects of artificial collapse of blastocoele prior to vitrification on survival of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction*, **11**(3): 491-491.
- ONUR G (2016). Kişisel IVF laboratuvar arşivi.
- ÖZDAŞ ÖB, CİRİT Ü, DEMİR K, BACINOĞLU S, BARAN A, PABUCCUOĞLU S, İREZ T, ALKAN S, AK K (2012). In vitro elde edilen sığır embriolarının dondurulmasında vitrifikasyon medyumuna maruz kalma sürelerinin çözünme sonrası gelişim üzerine etkisi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **38**(1): 29-36.
- PALASZ AT, MAPLETOFT RJ (1996). Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, **14**(2): 127-149.
- PALINI S, GALLUZZI L, DE STEFANI S, BIANCHI M, WELLS D, MAGNANI M, BULLETTI C (2013). Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reproductive Biomedicine Online*, **26**(6): 603-610.
- PARRISH JJ, SUSKO-PARRISH JL, LEIBFRIED-RUTLEDGE ML, CRITSER ES, EYESTONE WH, FIRST NL (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, **25**: 591-600.
- POLGE C, SMITH AU, PARKES AS (1949). Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, **164**(4172): 666.
- PRENTICE JR, SINGH J, DOCHI O, ANZAR M (2011). Factors affecting nuclear maturation, cleavage and embryo development of vitrified bovine cumulus-oocyte complexes. *Theriogenology*, **75**(4): 602-609.
- PRYOR JH, HASLER JF, STRØBECH L, AVERY B, HASHEM N, MENGES S, LONG CR, SHEWFELT G, LOONEY CR (2015). 86 improved bovine embryo production using novel in vitro culture systems. *Reproduction, Fertility and Development*, **28**(2): 172-172.
- PUGH PA, ANKERSMIT AEL, MCGOWAN LT, TERVIT HR (1998). Cryopreservation of in vitro-produced bovine embryos: effects of protein type and concentration during freezing or of liposomes during culture on post-thaw survival. *Theriogenology*, **50**(3): 495-506.
- PUNYAWAI K, ANAKKUL N, SRIRATTANA K, AIKAWA Y, SANGSRITAVONG S, NAGAI T, IMAI K, PARNPAI R (2015). Comparison of Cryotop and micro volume air cooling methods for cryopreservation of bovine matured oocytes and blastocysts. *Journal of Reproduction and Development*, **61**(5): 431-437.
- RIZOS D, WARD F, DUFFY P, BOLAND MP, LONERGAN P (2002). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, **61**(2): 234-248.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ H (2012). Assisted reproductive techniques for cattle breeding in developing countries: a critical appraisal of their value and limitations. *Reproduction in Domestic Animals*, **47**(s1): 21-26.

- ROSENKRANS CF, ZENG GQ, MCNAMARA GT, SCHOFF PK, FIRST NL (1993). Development of bovine embryos in vitro as affected by energy substrates. *Biology of Reproduction*, **49**(3): 459-462.
- RUSSELL DF, BAQIR S, BORDIGNON J, BETTS DH (2006). The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. *Molecular Reproduction and Development*, **73**(10): 1255-1270.
- SAĞIRKAYA H, MISIRLIOĞLU M, KAYA A, FIRST NL, PARRISH JJ, MEMILI E (2006). Developmental and molecular correlates of bovine preimplantation embryos. *Reproduction*, **131**(5): 895-904.
- SAITO N, IMAI K, TOMIZAWA M (1994). Effect of sugars addition on the survival of vitrified bovine blastocysts produced in vitro. *Theriogenology*, **41**: 1053–1060.
- SANCHES BV, PONTES JH, BASSO AC, FERREIRA CR, PERECIN F, SENEDA MM. (2012) Comparison of synthetic oviductal fluid and G1/G2 medium under low-1 oxygen atmosphere on embryo production and pregnancy rates in Nelore (*Bos indicus*) cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. **48**(1): 1–3
- SARAGUSTY J, ARAV A (2011). Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction*, **141**(1): 1-19.
- SATO S, DOCHI O, IMAI K (2016). 137 Effect of the addition of folic acid to maturation and culture media on development of the bovine blastocyst and its survival rate after freeze-thawing. *Reproduction, Fertility and Development*, **29**(1): 177-177.
- SCHEFER L, SCHWARZ KL, PASCHOAL DM, FERNANDES H, CASTRO FC, LEAL CLV (2016). Influence of cGMP pathway on lipid content in bovine oocytes matured in vitro. *Animal Reproduction*, **13**(3): 706-706.
- SENGER PL (2005a). Chapter 8: Reproductive cyclicity- The follicular phase. In: *Pathways to Pregnancy and Parturition* (2nd revised Ed). Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd., p.: 164-187.
- SENGER PL (2005b). Chapter 13: Early embryogenesis and maternal recognition of pregnancy. In: *Pathways to Pregnancy and Parturition* (2nd revised Ed),. Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd., p.: 284-303.
- SOMFAI T, INABA Y, AIKAWA Y, OHTAKE M, KOBAYASHI S, KONISHI K, NAGAI T, IMAI K (2010). Development of bovine embryos cultured in CR1aa and IVD101 media using different oxygen tensions and culture systems. *Acta Veterinaria Hungarica*, **58**(4): 465-474.
- SON WY, YOON SH, YOON HJ, LEE SM, LIM JH (2003). Pregnancy outcome following transfer of human blastocysts vitrified on electron microscopy grids after induced collapse of the blastocoele. *Human Reproduction*, **18**(1): 137-139.
- STINSHOFF H, WILKENING, S, HANSTEDT A, BRUNING K, WRENZYCKI C (2011). Cryopreservation affects the quality of in vitro produced bovine embryos at the molecular level. *Theriogenology*, **76**(8): 1433-1441.

- STROEBECH L, MAZZONI, G, PEDERSEN HS, FREUDE KK, KADARMIDEEN HN, CALLESEN H, HYTTEL P (2015). In vitro production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. *Animal Reproduction*, **12**(3): 465-472.
- SUGIMURA S, TOMONORI AKAI I, HASHIYADA Y, AIKAWA Y, OHTAKE M, MATSUDA H, KOBAYASHI S, KOBAYASHI E, KONISHI K, IMAI K (2013). Effect of embryo density on in vitro development and gene expression in bovine in vitro-fertilized embryos cultured in a microwell system. *Journal of Reproduction and Development*, **59**(2): 115-122.
- SUTHAR VS, SHAH RG (2009). Bovine in vitro embryo production: An overview. *Veterinary World*, **2**(12): 478-479.
- SUTTIROJPATTANA T, SOMFAI T, MATOBA S, NAGAI T, PARNPA R, GESHI M (2016). The effect of temperature during liquid storage of in vitro matured bovine oocytes on subsequent embryo development. *Theriogenology*, **85**(3): 509-518.
- SZEPTYCKI J, BENTOV Y (2016). Chapter 9. Cryopreservation of Embryos and Gametes: Past, Present, and Future. In *Cryopreservation in Eukaryotes*. InTech.
- TAKAHASHI Y, KANAGAWA H (1997). Effects of glutamine, glycine and taurine on the development of in vitro fertilized bovine zygotes in a chemically defined medium. *Journal of Veterinary Medical Science*, **60**(4): 433-437.
- TAKAYAMA M, DOCHI O, IMAI K (2015). 164 Effects of kinetics and morphology on early embryonic development in bovine OPU-IVF embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, **28**(2): 212-213.
- TAKAYAMA M, SATO S, NISHIMURA Y, IMAI K, DOCHI O (2016). 49 Successful cryopreservation using low ethylene glycol concentration for in vitro-produced bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, **29**(1): 132-132.
- TSAFRIRI A, DEKEL N (2011). Chapter 2: Intra- and intercellular molecular mechanisms in regulation of meiosis in murid rodents. In: *Oocyte Maturation and Fertilization: A Long History For a Short Event*. p.: 38-63
- TUTT DA, LYONS RE, HOLLAND MK (2016). 92 Does blastocentesis affect cryopreservation survival of in vitro-produced bovine embryos? *Reproduction, Fertility and Development*, **29**(1): 153-154.
- VACCARI S, WEEKS JL, HSIEH M, MENNITI FS, CONTI M (2009). Cyclic gmp signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. *Biology of Reproduction*, **81**(3): 595-604.
- VAJTA G. (2013). Vitrification in human and domestic animal embryology: work in progress. *Reproduction, Fertility and Development*, **25**(5): 719-727.
- VAJTA G, PEURA TT, HOLM P, PALDI A, GREVE T, TROUNSON AO, CALLESEN H (2000). New method for culture of zona-included or zona-free embryos: The Well of the Well (WOW) system. *Molecular Reproduction and Development*, **55**(3): 256-264.

- VAJTA G, KOROSI T, DU Y, NAKATA K, IEDA S, KUWAYAMA M, NAGY ZP (2008). The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. *Reproductive Biomedicine Online*, **17**(1): 73-81.
- VAN SOOM A, TANGHE S, DE PAUW I, MAES D, DE KRUIF A (2002). Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reproduction in Domestic Animals*, **37**(3): 144-151.
- VANDERZWALMEN, P, BERTIN G, DEBAUCHE CH, STANDAERT V, VAN ROOSEDAAL E, VANDERVORST M, BOLLEN N, ZECH H, MUKAIDA T, TAKAHASHI K, SCHOYSMAN R (2002). Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Human Reproduction*, **17**(3): 744-751.
- VOELKEL SA, HU YX (1992). Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, **37**(1): 23-37.
- WONG KM, MASTENBROEK S, REPPING S (2014). Cryopreservation of human embryos and its contribution to in vitro fertilization success rates. *Fertility and Sterility*, **102**(1): 19-26.
- WRENZYCKI C, STINSHOFF H (2013). Maturation environment and impact on subsequent developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, **48**(s1): 38-43.
- WRIGHT JM (2010). Photographic illustrations of embryo developmental stage and quality codes. In: *Manual of the International Embryo Transfer Society* (4th ed.) Eds: D.A. Stringfellow, M.D. Givens. IETS, Champaign, IL, USA. p.: 141–144.
- YU XL, DENG W, LIU FJ, LI YH, LI XX, ZHANG YL, ZAN LS (2010). Closed pulled straw vitrification of in vitro–produced and in vivo–produced bovine embryos. *Theriogenology*, **73**(4): 474-479.
- ZHAO XM, DU WH, DONG WANG, HAO HS, TONG QIN, YAN LIU, ZHU HB (2012). Controlled freezing and open-pulled straw (OPS) vitrification of in vitro produced bovine blastocysts following analysis of ATP content and reactive oxygen species (ROS) level. *Journal of Integrative Agriculture*, **11**(3): 446-455.
- ZULLO G, DE CANDITIIS C, PERO ME, ALBERO G, SALZANO A, NEGLIA G, CAMPANILE B, GASPARRINI B (2016). Crocetin improves the quality of in vitro produced bovine embryos: Implications for blastocyst development, cryotolerance, and apoptosis. *Theriogenology*, **86**(8): 1879-1885.

Ek-1



T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 53184147 – 50.04.04 / 19214  
Konu : Etik Kurul Kararı hk.

21 Mart 2014

Prof.Dr.Mustafa KAYMAZ  
Veteriner Fakültesi  
Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

İlgi: 18/03/2014 tarihli ve 2014-42 dosya numaralı başvurunuz.

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna başvurusunu yapmış olduğunuz, “İn vitro gelişim ve dondurma çözdürme sonrasında kültüre edilen sığır embriyolarının Time-Lapse Monitoring yöntemiyle değerlendirilmesi.” başlıklı çalışmanız Etik Kurulumuzca incelenmiştir. Başvurunuz 15 Şubat 2014 tarihli Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliğinin, 8 inci maddesinin sekizinci fıkrasının (k) bendi kapsamında ele alınmış olup, çalışmanız Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu iznine tabi değildir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr.Oğuz SARİMEHMETOĞLU  
A.Ü. HADYEK Başkanı

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

Adı : Gökçe  
Soyadı : ONUR ÜNAL  
Doğum Yeri ve Tarihi : Altındağ, 08.09.1988  
Uyruđu : T.C.  
Medeni durumu : Evli  
İletişim Adresi ve Telefonu : Gazi Mahallesi Polatlı cad. No:165-4  
Yenimahalle, Ankara. 05059614135  
E-posta : gokceonur88@gmail.com

### II- Eğitim

Doktora: Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü (devam)  
Lisans: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi (2006-2011)  
Lise: Cumhuriyet Süper Lisesi (2002-2006), ANKARA  
Orta Okul - İlkokul: Gazi İlköğretim Okulu (1994-2002), ANKARA  
Yabancı Dili: İngilizce

### III- Ünvanları

Veteriner Hekim

### IV- Mesleki Deneyimi

2011, Veteriner Hekim, Bastet Veteriner Kliniđi, ANKARA.

### V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- 1- International Embryo Transfer Society
- 2- Türk Veteriner Jinekoloji Derneđi
- 3- Ankara Bölgesi Veteriner Hekimler Odası



## **VI- Bilimsel İlgi Alanları**

### **A- Yurtiçi dergilerdeki yayınlar**

1- Mustafa KAYMAZ, İlknur Pir YAĞCI, Kübra KARAKAŞ, **Gökçe ONUR** (2015). Veteriner klinikte hormonların teşhis yöntemleri. *Turkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences-Obstetrics and Gynecology-Special Topics*, **1(2)**: 134-146.

2- Mustafa KAYMAZ, **Gökçe ONUR**, Melih ÖZDEMİR, Kübra KARAKAŞ, İlknur Pir YAĞCI (2015). Reprodüktif sürü sağlığında yardımcı üreme teknolojilerinin kullanımı. *Turkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences-Obstetrics and Gynecology-Special Topics*, **1(1)**: 86-99.

### **B-Uluslararası bildiriler**

1- Kübra KARAKAŞ, Hasan ALKAN, **Gökçe ONUR**, Doğukan ÖZEN, Mustafa KAYMAZ, Hakkı IZGUR (2015). 154 Evaluation of Embryo Recovery Rate and Embryo Transfer in Angora Goats. *Reproduction, Fertility and Development*, **27(1)**: 168.

### **C- Uluslararası katılımlı bildiriler**

1- **Gökçe ONUR**, Kübra KARAKAŞ, Mustafa KAYMAZ. Sığır embriyolarında cinsiyetin belirlenmesi. VI. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, 15-18 Ekim 2015, FETHİYE p:202.

2- Kübra KARAKAŞ, Hasan ALKAN, **Gökçe ONUR**, Selahattin Halit ERGİN, Mehmet Eray ALÇIĞIR, Mustafa KAYMAZ. 4 yaşlı kangal ırkı bir köpekte dev meme tümörü. VI. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, 15-18 Ekim 2015, FETHİYE p:200.

3- Kübra KARAKAŞ, Hasan ALKAN, **Gökçe ONUR**, Doğukan ÖZEN, Mustafa KAYMAZ, İsmail Hakkı İZGÜR. Ankara Keçilerinde Embriyo Transfer Uygulamaları. VI. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, 15-18 Ekim 2015, FETHİYE p:118.

4- Kübra KARAKAŞ, Hasan ALKAN, **Gökçe ONUR**, Doğukan ÖZEN, Mustafa KAYMAZ, İsmail Hakkı İZGÜR . Ankara Keçilerinde klasik süperovulasyon uygulamasının embriyo eldesi üzerine etkileri. Uluslararası Katılımlı Küçükbaş Hayvancılık Kongresi, 16-18 Ekim 2014, KONYA p:248

5- Halit KANCA, Eray ALÇIĞIR, Hasan ALKAN, Kübra KARAKAŞ, **Gökçe ONUR**. Bir Kedide Parsiyel Mol Hidatiforma Bağlı Gebelik Kaybı. V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, 31 Ekim - 3 Kasım 2013, ANTALYA p:74.

6- **Gökçe ONUR**, Kübra KARAKAŞ, Hasan ALKAN, Bahattin Taylan KOÇ, Çiğdem OĞUZOĞLU, Halit KANCA. Üçüz Gebe Bir Keçide Sınır Hastalığı (Border Disease) Nedeniyle İki Fötüsün Maserasyonuna Bağlı Güç Doğum Olgusu. V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, 31 Ekim - 3 Kasım 2013, ANTALYA p:202.

7- Hatice Esra CANATAN, İrem ERGİN, Mert POLAT, Murat Onur YAZLIK, Eren KUTER, Dilan ŞEKER, **Gökçe ONUR**. İdrar Kesesi Retrofleksiyonu ile Seyreden Vaginal Prolapsus. V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi, 31 Ekim - 3 Kasım 2013, ANTALYA p:192.

## **VII- Bilimsel Etkinlikleri**

### **A- Aldığı Burslar**

2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için), 2015/2 TÜBİTAK BİDEP.

### **B-Görev Aldığı Sonuçlanmış Projeler**

1- Farklı Siklus Dönemlerindeki Köpeklerde AMH Ekspresyonunun İmmuno histokimyasal, RT-PCR Metotlarıyla Belirlenmesi 01/06/2015-01/06/2017.

### **C- Görev Aldığı Devam Eden Projeler**

2- Blastosentezin Vitriyifiye Edilen Sığır Blastosistlerinin Viyabilitesi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi (Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi- BAP).

#### **D- Verdiği Seminerler**

1-Dünyada, Ülkemizde Embriyo Transferi ve Embriyo Üretiminde Yeni Yaklaşımlar, 2014.

2-Sığır Embriyolarında Cinsiyetin Belirlenmesi, 2014.

#### **E- Katıldığı Kongre ve Bilimsel Toplantılar**

1- 1.Veteriner Bilimleri Öğrenci Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 14 – 16 Eylül 2010 ANKARA.

2- IV. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 4 Kasım-7 Kasım 2010 Belek/ANTALYA.

3- XVII. FECAVA (Federation of European Companion Animal Veterinary Associations) Avrupa ve VI. KHVHD Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 7-10 Eylül 2011 İSTANBUL.

4- I. Veteriner Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 24-25 Kasım 2011 ANKARA.

5- V. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 31 Ekim - 3 Kasım 2013 ANTALYA.

6- 41st Annual Meeting of the IETS (International Embryo Technology Society), 10-13 Ocak 2015 Versailles, FRANCE.

7- VI. Veteriner Doğum ve Jinekoloji Kongresi (Uluslararası Katılımlı), 15-18 Ekim 2015 FETHİYE.

#### **VIII- Diğer Bilgiler**

##### **A- Katıldığı Kurslar**

1- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası - Ankara Üniversitesi (2013) ANKARA

2- Farelerde Embriyo Manipülasyonları ve Transgenik Fare Üretiminde Kullanılan Yöntemler Uygulamalı Eğitimi – Tübitak Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü (2014) GEBZE

3. Olympus marka IX73, DP22 model ve Eppendorf marka Transferman +R modellerinden oluian, Mikromanipülatör Sistemli Inverteed Araştırma Mikroskop Sistemi cihazına ilişkin kullanıcı eğitim programı (2016) ANKARA

4. Rakuno Gakuen Üniversitesi Süt bilimi yüksek lisans okulunda araştırma öğrencisi (2016) JAPAN

