

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OLEİK VE LİNOLEİK ASİDİN İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO
GELİŞİMİ VE KALİTESİNE ETKİLERİ**

TAHİR KARAŞAHİN

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN: Prof. Dr. ŞEVKET ARIKAN

Haziran 2012 KIRIKKALE

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**OLEİK VE LİNOLEİK ASİDİN İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO
GELİŞİMİ VE KALİTESİNE ETKİLERİ**

TAHİR KARAŞAHİN

**FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN: Prof. Dr. ŞEVKET ARIKAN

Haziran 2012 KIRIKKALE

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Fizyoloji (Veteriner) Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri üyeleri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29/05/2012

Prof. Dr. A. Arzu YIĞIT
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nazmi ÇETİN
Erciyes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Prof. Dr. Şevket ARIKAN
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Doç. Dr. Hakan KALENDER
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

Yrd. Doç. Dr. Nurgül ATMACA
Kırıkkale Üniversitesi, Veteriner Fakültesi
Üye

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
İçindekiler	III
Önsöz	VI
Simgeler ve Kısaltmalar	VII
Şekiller	X
Çizelgeler	XII
ÖZET	1
SUMMARY	3
1.GİRİŞ	5
1.1. İn Vitro Fertilizasyon	5
1.2. İn Vitro Embriyo Üretiminin Tarihçesi	5
1.2.1. İlk İn Vitro Fertilizasyon Çalışmaları	5
1.2.2. Sığırlarda İlk İn Vitro Fertilizasyon Çalışmaları	6
1.2.3. Türkiye’de Yapılan İn Vitro Fertilizasyon Çalışmaları	7
1.3. Sığırlarda İn Vitro Embriyo Üretimi	7
1.3.1. Oositlerin Elde Edilmesi	8
1.3.1.1. Aspirasyon Yöntemi	8
1.3.1.2. Dilimleme Yöntemi	8
1.3.1.3. Diseksiyon ve Patlatılma Yöntemi	9
1.3.1.4. Ovum Pick Up (OPU)	9
1.3.2. Oositlerin Değerlendirilmesi	10
1.3.2.1. Follikül Büyüklüğü ve Oosit Kalitesi	12
1.3.3. İn Vitro Maturasyon	12
1.3.3.1. İn Vitro Maturasyona Etki Eden Faktörler	13
1.3.3.2. İn Vitro Maturasyonda Sıcaklık, Nem, Çevresel Gaz Bileşenleri ve Zaman	14
1.3.4. İn Vitro Fertilizasyon	15
1.3.4.1. Sperma Hazırlama Yöntemleri	17

1.3.4.2. Fertilizasyon Medyumları	18
1.3.4.3. Fertilizasyon Süresi, Isısı ve Spermatozoon Sayısı	18
1.3.4.4. İn Vitro Fertilizasyon Ölçütleri	19
1.3.5. İn Vitro Kültür	19
1.3.5.1. Embriyo Kültür Sistemleri	21
1.3.5.1.1. İn Vivo Kültür Sistemleri	21
1.3.5.1.2. İn Vitro Kültür Sistemleri	22
1.3.5.1.3. Ko-kültür İçeren Kültür Sistemleri	22
1.3.5.2. İn Vitro Kültür Ortamının Gaz Bileşenleri	23
1.3.5.3. İn Vitro Kültür Ortamında Isı ve Işık	23
1.3.5.4. İn Vitro Kültür Ortamında pH	24
1.4. Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Lipit Peroksidasyonu	24
1.5. Yağ Asitleri	28
2. GEREÇ VE YÖNTEM	32
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde ve Medyumlar	32
2.1.1. Ovaryum Taşıma Solüsyonu	33
2.1.2. Oosit Toplama ve Yıkama Solüsyonu	33
2.1.3. İn Vitro Maturasyon Solüsyonu	34
2.1.4. İn Vitro Fertilizasyon Solüsyonu	34
2.1.5. İn Vitro Kültür Solüsyonu	36
2.2. Ovaryumların Toplanması	38
2.3. Oosit Toplanması ve Değerlendirilmesi	38
2.4. Oositlerin İn Vitro Maturasyonu	38
2.5. Spermatozoon Hazırlanması ve İn Vitro Kapasitasyonu	39
2.6. İn Vitro Kültür	40
2.7. Gelişen Embriyoların Değerlendirilmesi	40
2.8. İstatistiksel Değerlendirme	40
3. BULGULAR	41
3.1. İn Vitro Maturasyon Bulguları	44
3.2. İn Vitro Fertilizasyon Bulguları	45
3.3. Kırk sekizinci Saatte Bölünme Bulguları	46

3.4. Morula-Blastosist Olma Bulguları	48
4.TARTIŞMA VE SONUÇ	56
KAYNAKLAR	61
EKLER	76
ÖZGEÇMİŞ	77

ÖNSÖZ

İn vitro embriyo elde edilmesi konusundaki çalışmalar yıllardır devam eden bir süreçtir. Özellikle biyoteknoloji alanında elde edilen yeni bilgiler in vitro embriyo üretimindeki olumsuzlukların giderilmesinde önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda kullanılmaya başlayan antioksidan maddelerde in vitro embriyo üretimde sayı ve kalitenin artmasını sağlamaktadır. Yaptığımız çalışmada antioksidan özelliği olan oleik ve linoleik asidin in vitro embriyo gelişimindeki rolleri incelenmiştir.

Bu tez konusunu seçmemde yol gösteren ve çalışmam esnasında olumlu yönlendirme ve eleştirileri ile bana destek olan, danışman hocam Prof. Dr. Şevket ARIKAN'a, tez çalışmamı hoşgörleriyle yardımcı olan Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Arzu YİĞİT ve Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Hakan KALENDER'e, tez çalışmam sırasında bana yardımcı olan Enstitümüzün değerli Müdürü Muharrem SATILMIŞ, Enstitü Teknik Koordinatörü Dr. Sedat Hamdi KIZIL ve mesai arkadaşım Oğuz BÜYÜKKAYAER'e, ayrıca her zaman ilgi ve desteğini gördüğüm Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Yrd. Doç Dr. Numan AKYOL'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
<	Küçüktür
ARE	Antioksidan cevap elemanı
ark.	Arkadaşları
BME	β-merkaptolanol
BO	Brackett ve Oliphant
BSA	Sığır serum albumin
C18:1	Oleik asit
C18:2	Linoleik asit
CDM	İçeriği tanımlanmış medyum
CH ₃	Metil grubu
CO ₂	Karbon dioksit
COC	Kumulus oosit kompleksi
-COOH	Karboksil grubu
CR1aa	Charles Rosekrans 1 amino asitli medyumu
DNA	Deoksiribo nükleik asit
D-PBS	Dulbecco'nun fosfat tamponlu solüsyonu
ECS	Östrustaki inek serumu
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
EGF	Epidermal büyüme faktörü
FCS	Fötal buzağı serumu
FSH	Folikül uyarıcı hormon
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
hCG	Kadın koryonik gonadotropini
HECM-6	Amino asitli hamster embiyo kültür medyum 6
HEPES	N-2-hidroksietil-piperazin-N'-2-etano sülfonik asit
HIS	Yüksek iyonik direnç
IFNs	Interferon tau
IGF-1	Insulin büyüme faktörü 1

IU	İnternasyonal ünite
IVC	İn vitro kültür
IVF	İn vitro fertilizasyon
IVM	İn vitro maturasyon
IVP	İn vitro üretim
KSOM	Optimize edilmiş modifiye medyum
LH	Luteinleştirici hormon
LAA	Linoleik asit-albümin
LAA	L-askorbik asit
LE	L-Ergothiyonin
MEM	Esansiyel olmayan amino asit
ml	Mililitre
mM	Milimol
MPF	Maturasyonu destekleyici faktör
mRNA	Mesajcı RNA
mSOF	Modifiye sentetik ovidukt sıvısı
N ₂	Azot
NO	Nitrik oksit
O ₂	Oksijen
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
OH [·]	Hidroksil
ONOO ⁻	Nitrit peroksit
OPU	Ovum pick up
OVA	Ovalbümin
OWS	Oosit yıkama solüsyonu
PBS	Fosfat tamponlu solüsyon
PMSG	Gebe kısrak serum gonadotropini
RNA	Ribo nükleik asit
RNS	Reaktif nitrojen türleri
ROS	Serbest oksijen radikalleri
Rpm	Dakikada dönme sayısı
SDS	Sperm sulandırma solüsyonu

SOF	Sentetik ovidukt sıvısı
SWS	Sperm yıkama solüsyonu
t10, c12 CLA	Trans-10, cis-12 oktadekadienoik asit
TALP	Tyrodé's albümin laktat piruvat
TCM-199	Doku kültür medyumu 199
µg	Mikrogram
µM	Mikromol

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.1	İn vitro embriyo üretimi aşamaları	7
Şekil 1.2	Kalite sınıflandırmasına göre COC görünümleri	11
Şekil 1.3	Fertilizasyonun şematik görünümü	17
Şekil 1.4	Embriyo bölümleri	20
Şekil 1.5	Sığır embriyolarının koyun oviduktunda <i>in vivo</i> kültürü	21
Şekil 3.1	A kalite oosit	42
Şekil 3.2	B kalite oosit	42
Şekil 3.3	C kalite oosit	43
Şekil 3.4	Dejenere oosit	43
Şekil 3.5	Mature olmuş oositler	44
Şekil 3.6	Çift polar cismi atılmış fertilize oosit	45
Şekil 3.7	İn vitro fertilizasyon anı (zona pellusida penetrasyonu)	45
Şekil 3.8	İki hücreli embriyo	46
Şekil 3.9	Dört hücreli embriyo	46
Şekil 3.10	Linoleik, oleik ve kontrol gruplarında deneme tekrarlarına göre 48. saat genel bölünme bulguları	47
Şekil 3.11	Linoleik, oleik ve kontrol gruplarında deneme tekrarlarına göre 48. saat bölünme bulguları	48
Şekil 3.12	Morula aşaması	49
Şekil 3.13	Blastosist aşaması	49
Şekil 3.14	Linoleik, oleik ve kontrol gruplarında deneme tekrarlarına göre genel morula-blastosist olma bulguları	50
Şekil 3.15	Linoleik, oleik ve kontrol gruplarında deneme tekrarlarına göre morula-blastosist olma bulguları	51
Şekil 3.16	İnkübasyonun yedinci gününde linoleik asit (10 µM) grubunda gelişen embriyolar	51

Şekil 3.17	İnkübasyonun yedinci gününde linoleik asit (100 μ M) grubunda gelişen embriyolar	52
Şekil 3.18	İnkübasyonun yedinci gününde linoleik asit (1000 μ M) grubunda gelişen embriyolar	52
Şekil 3.19	İnkübasyonun yedinci gününde oleik asit (10 μ M) grubunda gelişen embriyolar	53
Şekil 3.20	İnkübasyonun yedinci gününde oleik asit (100 μ M) grubunda gelişen embriyolar	53
Şekil 3.21	İnkübasyonun yedinci gününde oleik asit (1000 μ M) grubunda gelişen embriyolar	54
Şekil 3.22	İnkübasyonun yedinci gününde kontrol grubunda gelişen embriyolar	54

ÇİZELGELER

		Sayfa
Çizelge 1.1	Memelilerde in vitro fertilizasyon çalışmalarının kilometre taşları	6
Çizelge 1.2	Oosit kalitesinin morfolojik sınıflandırılması	10
Çizelge 1.3	Oosit kalitesinin morfolojik sınıflandırılması	11
Çizelge 2.1	D-PBS solüsyonunun hazırlanması	33
Çizelge 2.2	TCM-199 medyumu hazırlanması	34
Çizelge 2.3	BO stok A solüsyonu hazırlanması	34
Çizelge 2.4	BO Stok B solüsyonu hazırlanması	35
Çizelge 2.5	BO solüsyonu hazırlanması	35
Çizelge 2.6	OWS (oosit yıkama solüsyonu)	36
Çizelge 2.7	SDS (sperm sulandırma solüsyonu)	36
Çizelge 2.8	SWS (sperm yıkama solüsyonu)	36
Çizelge 2.9	CR1aa stok A solüsyonu hazırlanması	37
Çizelge 2.10	CR1aa stok B solüsyonu hazırlanması	37
Çizelge 2.11	CR1aa solüsyonunun hazırlanması	37
Çizelge 3.1	Elde edilen ovaryum ve oositler	41
Çizelge 3.2	Maturasyon ve dejenerasyon sonuçları	44
Çizelge 3.3	Deneme gruplarında bulunan 48. saat bölünme sonuçları	46
Çizelge 3.4	Linoleik ve oleik katkılı deneme gruplarında bulunan 48. saat bölünme sonuçları	47
Çizelge 3.5	Deneme gruplarında bulunan morula-blastosist sonuçları	49
Çizelge 3.6	Linoleik ve oleik katkılı deneme gruplarında bulunan morula-blastosist sonuçları	50

OLEİK VE LİNOLEİK ASİDİN İN VİTRO SIĞIR EMBRİYO GELİŞİMİ VE KALİTESİNE ETKİLERİ

ÖZET

Bu çalışma, doymamış yağ asitlerinden oleik asit (18:1 cis-9- oktadekadienoik asit) ve linoleik asidin (18:2 (*n*-6), 9,12- oktadekadienoik asit) sığır embriyolarının *in vitro* gelişimi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla gerçekleştirildi. Çalışmada kullanılan ovaryumlar, Ankara iline bağlı Çubuk ilçe mezbahasından temin edildi. Toplanan 198 adet ovaryumdan aspirasyon yöntemiyle, 1304 adet oosit elde edildi. Ancak bu oositlerden A ve B kalitede olduğuna karar verilen 1124 adedi çalışmada kullanıldı.

Maturasyon, kapasitasyon, fertilizasyon ve embriyo kültürü işlemleri %5 CO₂ ve %95 nem içeren 38,5 °C'lik inkübatör ortamında gerçekleştirildi. Maturasyon medyumu olarak doku kültür medyumu 199 (TCM-199) kullanıldı. Bu medyumdan 100 µL'lik maturasyon mikrodamları hazırlandı. Damlaların üzeri mineral yağ ile kapatıldı. Her mikrodamlaya ortalama 18'er adet oosit yerleştirildi. Oositler, maturasyon amacıyla 22 saat süreyle inkübe edildi. Kumulus ekspansiyonu görülen oositler mature kabul edildi.

Spermatozoonların kapasitasyonu amacıyla heparin (5 U/mL) ve kafein (2 mM) içeren Brackett ve Oliphant (BO) medyumu kullanıldı. Spermatozoonlar 25000/oosit olacak şekilde doze edildi. Oosit ve spermatozoonlar fertilizasyon amacıyla 6 saat inkübe edildi. Ardından Charles Rosecrans (CR1aa) embriyo kültür medyumu ile yıkanan oositler, oleik asit (10 µM, 100 µM ve 1000 µM) ve linoleik asit (10 µM, 100 µM ve 1000 µM) içeren CR1aa medyumunda inkübasyona kaldırıldı. Inkübasyonun 48. saatinde ilk bölünme kontrolü yapıldı. Fertilizasyonu takip eden 168. saatte ise morula-blastosist aşamasına gelen embriyolar tespit edildi. Verilerin istatistiksel analizi khi-kare yöntemiyle yapıldı. Zigotun bölünme oranları; kontrol grubu için %53,64, linoleik asit için %62,59 (10 µM), %50,00 (100 µM) ve %58,55 (1000 µM), oleik asit için ise %62,25 (10 µM), %64,29 (100 µM) ve

%71,70 (1000 μ M) olarak bulundu. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada, 1000 μ M oleik asidin diğer deneme gruplarına göre daha etkili olduğu görüldü ($p<0,01$). Bölünme oranları ortalaması ise linoleik asitte %57,11, oleik asitte %66,16 olarak bulundu.

Zigotun morula-blastosist evresine ulaşma oranları, kontrol grubunda %13,25, linoleik asit için %23,13 (10 μ M), %11,81 (100 μ M) ve %21,05 (1000 μ M), oleik asit için ise %25,17 (10 μ M), %28,57 (100 μ M) ve %34,59 (1000 μ M) olarak bulundu. Morula-blastosist evresine ulaşma ortalaması ise linoleik asitte %18,74, oleik asitte %29,53 olarak hesaplandı.

Sonuç olarak, Oleik asitin her üç dozunun zigotun bölünme oranını ve ortalamalarını, morula-blastosist evresine ulaşma oranını ve ortalamalarını arttırdığı ve *in vitro* embriyo kültüründe antioksidan olarak kullanılabilceği kanısına varıldı. Oleik asidin 1000 μ M'lik dozunun en iyi sonucu verdiği görülmüştür. Linoleik asit ile yapılan karşılaştırmalarda oleik asidin anılan parametreler yönünden daha etkili olduğu saptandı.

Anahtar sözcükler: Oleik asit, Linoleik asit, Embriyo, Sığır, Bölünme, Morula-blastosist.

THE EFFECTS OF OLEIC AND LINOLEIC ACID ON DEVELOPMENT AND QUALITY OF IN VITRO BOVINE EMBRYOS

SUMMARY

The objectives of this study were to examine effects of unsaturated fatty acids oleic acid (18:1 *cis*-9-octadecenoic acid) and linoleic acid (18:2 (*n*-6) 9,12-oktadekadienoik asit), on *in vitro* bovine embryo development. All of the ovaries were collected from Cubuk slaughterhouse in Ankara. A total of 1304 oocytes were collected from 198 ovary by aspiration methods, but only 1124 oocytes evaluated as A and B quality were used.

Maturation, capacitation, fertilization and embryo culture were performed under 5% CO₂ and 95% air in 38.5 °C incubator. TCM-199 was used as maturation medium. Maturation microdrops (100 µL) were prepared using this medium. Drops were covered by mineral oil then 18 oocytes were put into the each drop. Oocytes were then cultured for 22 hours in the incubator. Oocytes having cumulus expansion were accepted as matured.

Brackett and Oliphant (BO) medium containing (5 U/mL) heparin and (2 mM) caffeine was used for spermatozoa capacitation. Number of spermatozoa was adjusted to 25000/oocytes for final concentration. Oocytes and spermatozoa were incubated together for 6 hours in the incubator for fertilization. After washing the oocytes in Charles Rosenkrans1 amino asit (CR1aa) they were incubated in CR1aa medium containing oleic acid (10 µM, 100 µM, 1000 µM) and linoleic acid (10 µM, 100 µM, 1000 µM). Oocytes were inspected for cleavage incubation after first 48 hours and cleaved. Morula-blastocyst stages were observed 168 hours after the fertilization. Data were analysed by chi-square test. Cleavage rates of zygotes were calculated as 53.4% for control group, 62.59% (10 µM), 50.00% (100 µM), 58.55% (1000 µM) for linoleic acid and 62.25% (10 µM), 64.29% (100 µM) and 71.70% (1000 µM) for oleic acid. Comparing the other groups, 1000 µM oleic acid was

more effective ($p < 0.01$) than other experimental groups. The average cleavage rates were 57.11% and 66.16% for linoleic acid and oleic acid respectively.

The morula-blastocyst rates were 13.25% for control group, 23.13% (10 μM), 11.81% (100 μM), 21.05% (1000 μM) for linoleic acid; 25.17% (10 μM), 28.57% (100 μM) and 34.59% (1000 μM) for oleic acid. The average morula-blastocyst rates were calculated as 18.74% for linoleic acid and 29.53% for oleic acid.

As a result, It has turned out that all three doses of oleic acid increased the ratio and averages of zygote cleavage and reaching to morula-blastocyte stage respectively and it was concluded that it can be used as an antioxidant in invitro embryo culture. The best result was obtained from the dose of 1000 μM oleic acid. By comparing to linoleic acid, it was deduced that oleic acid is more effective regarding aforementioned parameters.

Key words: Oleic acid, Linoleic acid, Embryo, Bovine, Cleavage, Morula-blastocyst.

1.GİRİŞ

1.1. İn Vitro Fertilizasyon

İn vitro fertilizasyon, kapasite olmamış spermatozoonların laboratuvar ortamında kapasite edilmeleri ve kapasitasyonu gerçekleştirilen bu spermatozoonlarla da dişi gamet hücresi olan oositlerin fertilize edilmesi işlemi olarak tanımlanmaktadır (Bavister, 1993).

1.2. İn Vitro Embriyo Üretiminin Tarihçesi

Günümüzde dişi genital ortamına ihtiyaç duyulmadan, *in vitro* embriyo üretimi başarıyla gerçekleştirilmektedir. *İn vitro* ortamda üretilen embriyodan ilk memeli yavru, tavşanlardan elde edilmesinin ardından sonraki yıllarda, follikül-oosit fizyolojilerinin daha iyi anlaşılması ve spermatozoonların dölleme kabiliyetlerinin aydınlatılması ile birlikte *in vitro* embriyo üretimi alanındaki gelişmeler hız kazanmıştır (Gordon 2003).

1.2.1. İlk İn Vitro Fertilizasyon Çalışmaları

Memelilerde fertilizasyon olayının daha iyi anlaşılması, 20. yüzyılın ortalarında sperma kapasitasyon mekanizmasının anlaşılmasıyla mümkün olmuştur. Memelilerde *in vitro* fertilizasyon çalışmalarının kilometre taşları Çizelge 1.1'de özetlenmiştir.

Çizelge 1.1. Memelilerde *in vitro* fertilizasyon çalışmalarının kilometre taşları (Gordon, 1994, 2003).

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

1.2.2. Sığırlarda İlk İn Vitro Fertilizasyon Çalışmaları

Sığırlarda ilk başarılı *in vitro* maturasyon işlemi α -amilaz enzimi içeren kültür ortamında gerçekleştirilmiştir. *İn vitro* mature edilmiş sığır oositinin başarılı ilk fertilizasyonu Iritani ve Niwa (1977) tarafından, ilk buzağı ise Brackett ve arkadaşları (1982) tarafından gerçekleştirilmiştir. İlerleyen yıllarda, IVF yönteminde geliştirilen yeni teknikler kullanılarak çalışmalar devam etmiştir. Bunlardan bir tanesi de laparoskopik yöntemle elde edilen oositlerin *in vitro* fertilizasyona tabi tutulması ve bunlardan yavru elde edilmesidir (Lambert ve ark., 1983). *İn vitro* olarak mature edilmiş oositlerden ilk buzağı ise 1986 yılında, Japonya'da elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada embriyolar, blastosist aşamasına kadar tavşan oviduktunda *in vivo* olarak kültüre edilmiş ve transferden önce dondurulup çözdürülmüştür (Hanada ve ark., 1986). Bütünüyle *in vitro* prosedürlerin

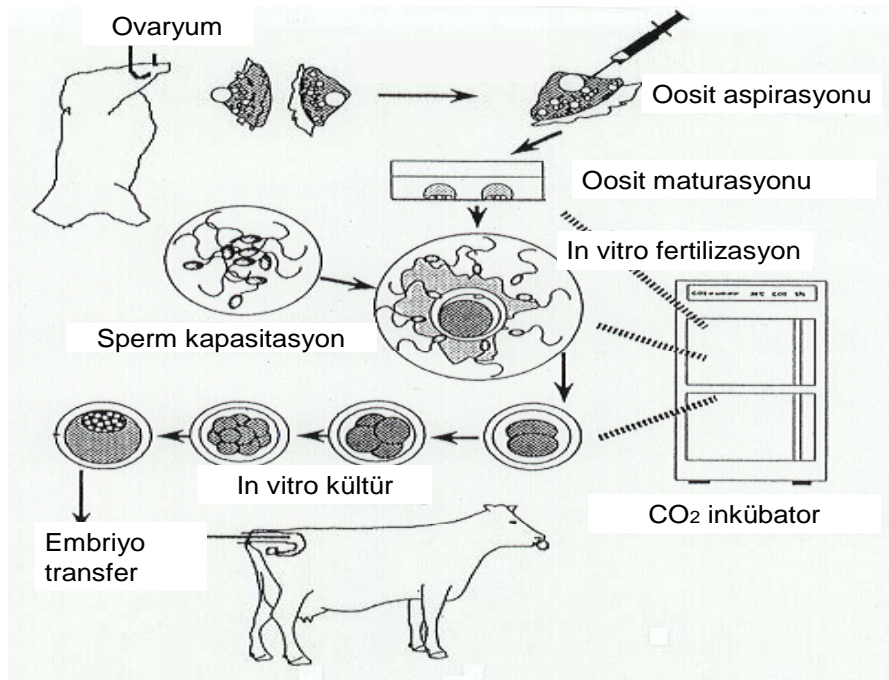
kullanıldığı (*in vitro* maturasyon, *in vitro* fertilizasyon ve *in vitro* kültür) ilk gebelik ise, Lu ve arkadaşları (1987) tarafından Dublin'den bildirilmiş olup bu gebelikten ikiz buzağı elde edilmiştir.

1.2.3. Türkiye'de Yapılan İn Vitro Fertilizasyon Çalışmaları

Ülkemizde ise *in vitro* embriyo üretimi konusundaki ilk çalışmalar 1984 yılında başlamıştır (Tekeli, 1984). Ülkemizde IVF konusundaki çalışmalar 1985 yılında fareler (Kılıçoğlu, 1985) ve 1997 yılında sığırlar üzerinde (Birler, 1997) yapılmıştır. *İn vitro* ilk yavru 2001 yılında koyunlardan (Birler ve ark., 2002) alınmış ve Türkiye'nin ilk IVF buzağısı 2007 yılında doğmuştur (Akyol ve ark., 2007).

1.3. Sığırlarda İn Vitro Embriyo Üretimi

İn vitro embriyo üretimi yardımcı üreme tekniklerinden birisi olup, oositlerin ovaryumlardan toplanması, maturasyonu, fertilizasyonu ve kültüre edilmesinin ardından morula veya blastosist aşamasında embriyo üretilmesidir (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *İn vitro* embriyo üretimi aşamaları (Imai, 2005).

1.3.1. Oositlerin Elde Edilmesi

In vitro fertilizasyon çalışmaları sığır oositlerinde de uygulanmıştır (Iritani ve Niwa, 1977; Brackett ve ark., 1982; Hamano ve ark., 1992). Bu çalışmaların temel kaynağını mezbahalardan elde edilen ovaryumlar oluşturmaktadır. Oositlerin ovaryumlardan elde edilmesi amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler; aspirasyon, ovaryum dilimleme, folliküllerin diseksiyonu ve ovum pick up (OPU) yöntemidir.

Ovaryumlardan follikül aspirasyonu, fazla sayıda ovaryum bulunması durumunda tercih edilen bir yöntemdir. Follikül diseksiyonu ve patlatılması yöntemi ise sayısı bir ikiyi geçmeyen damızlık değeri yüksek hayvanlar için kullanılan bir yöntemdir.

1.3.1.1. Aspirasyon Yöntemi

Aspirasyon yöntemi; ovaryum üzerindeki folliküllerin ucuna 18 gaugelik iğne takılmış beş veya on mililitrelik enjektörler kullanılarak aspire edilmesi işlemidir. Bu yöntemin kullanıldığı durumlarda; ovaryum başına 8-12 adet oosit toplandığı ve bunların % 45-50 kadarının gelişime uygun kalitede olduğu bildirilmiştir (Katska ve Smorak, 1984). Yapılan diğer çalışmalarda da ovaryum başına ortalama 9-10 adet oosit elde edildiği bildirilmiştir (Akyol ve ark., 2007). Elde edilen follikül sıvısı 90 mm. çapa sahip petriyer içerisine konularak oositler, stereo mikroskop altında sınıflandırılır (Akyol ve ark., 2005b).

1.3.1.2. Dilimleme Yöntemi

Dilimleme yöntemi; ovaryum üzerinde bulunan follikül duvarına bistürü ucuyla kesitler atılmasıdır. İşlem sırasında follikül sıvısının petriyer içerisine akması sağlanır. Petriyer kutusu içerisinde biriken sıvı, stereo mikroskop altında taranarak oositler tespit edilir. Literatürde bu yöntemle her ovaryumdan ortalama 16-24 oosit toplanabildiği

ve bu oositlerin % 60-65 kadarının gelişime uygun kalitede olduğu belirtilmektedir (Katska ve Smorak, 1984).

1.3.1.3. Diseksiyon ve Patlatılma Yöntemi

Bu yöntemde; folliküller önce ovaryumdan diseksiyon yöntemiyle ayrılırlar. Ayrılan bu folliküller yıkama solüsyonu içerisinde patlatılarak oositler açığa çıkarılır. Bu yöntem kullanılarak her ovaryumdan yaklaşık olarak 32-44 arası oosit elde edilebildiği bildirilmektedir (Hamano ve Kuwayama, 1993; Carolan ve ark., 1994). Aynı yöntemi kullanan başka bir araştırma grubu ise ovaryum başına 55-60 civarında oosit elde ettiklerini ve bunlarında % 70-75 kadarının gelişime uygun kalitede olduğu belirtilmiştir (Xu ve ark., 1992a, 1992b).

1.3.1.4. Ovum Pick Up (OPU)

Sığır ovaryumlarından ultrason rehberliğinde oositlerin toplanması işlemidir. Yöntem, içerisine konveks prob ve aspirasyon iğnesi yerleştirilmiş özel ataçman vasıtasıyla transvaginal olarak girilerek, ovaryumlarda bulunan folliküllere punksiyon yapılması ve içerisindeki immature oositlerin aspirasyonla toplanması şeklinde uygulanmaktadır. Elde edilen immature oositler, *in vitro* embriyo elde etme sürecine alınarak embriyolar üretilmektedir (Akyol ve ark., 2008).

Oositlerin elde edilmesi için yukarıda bahsedilen yöntemlerden başka yöntemlerde kullanılmıştır. Bu yöntemlerden bir tanesi' de yüksek genetik kapasiteye sahip hayvanlardan paralumbar laparoskopi yapılarak folliküllerdeki oositler *in vivo* olarak aspire edilmek suretiyle elde edilmesidir (Lambert ve ark., 1983; Lambert ve ark., 1986; Armstrong ve ark., 1991; Armstrong ve ark., 1992). Yine bu teknoloji vasıtasıyla hem pubertaya ulaşmamış olan hem de gebe olan sığırlardan oositler toplanmış ve *in vitro* olarak embriyo üretimi gerçekleştirilmiştir (Maclellan ve ark., 1998; Santi ve ark., 1998). Diğer bir yöntemde ise üç ila dokuz haftalık buzağılarda FSH uygulaması yapılarak süperovulasyon programı uygulanmış, oluşan folliküller laparoskopik yöntemle aspire edilmiş ve elde edilen

oositlerden *in vitro* olarak buzağı elde edilmiştir (Armstrong ve ark., 1991; Armstrong ve ark., 1992; Armstrong ve ark., 1993; Stubbings ve ark., 1993; Majerus ve ark., 1999).

1.3.2. Oositlerin Değerlendirilmesi

Oosit kalitesinin değerlendirilmesi, belirlenmesi ve kalite sınıflandırmasının yapılması; oositlerin maturasyonu, fertilizasyonu ve oluşan embriyoların yaşama şansını etkilemektedir. Birçok araştırmacı, oositleri sınıflandırma şemaları oluşturmuştur. Oositlerin sınıflandırılmasında oositin yoğunluğu, çevresindeki kumulus hücrelerinin sayısı ve diğer bazı morfolojik faktörler önemlidir (Shioya ve ark., 1988; Madison ve ark., 1992). Bazı araştırmacılara göre oosit, kumulus hücreleri ve oosit sitoplazması birlikte değerlendirmeye alınır. Bu sınıflandırmada birden dörde kadar kullanılarak dört farklı sınıflandırma yapılır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Oosit kalitesinin morfolojik sınıflandırılması (Gordon, 2003).

Kalite	Açıklama
1	Homojen yapıda ooplazma, çok katmanlı kumulus yapısı, total Kumulus Oosit Kompleksi (COC) açık ve şeffaf.
2	Çok katmanlı kumulus yapı, homojen yapıda ooplazma, kaba görünüm, zonada koyuluk, total COC biraz daha koyu ve daha az şeffaf.
3	Daha az kumulus yapı, koyu kümeleri ile ooplazma düzensiz, total COC koyu ve 1-2 sıralı.
4	Genişlemiş kumulus yapı, dağınık kumulus hücreleri, ooplazma, total COC koyu ve düzensiz.

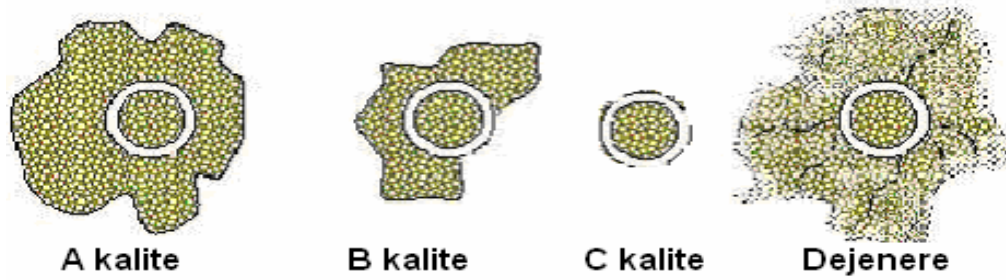
Sadece kumulus hücrelerinin morfolojik durumuna bakılarak A, B, C ve D şeklinde de sınıflandırma yapılmaktadır. Bu sınıflandırmaya göre dördüncü grup çok düşük *in vitro* maturasyon yeteneğindedir. Homojen görünümlü bir sitoplazma, oositi çevreleyen bozulmamış ve kompakt yapıda kumulus hücreleri, oositin mature olmasında, fertilizasyonunda ve kaliteli bir embriyo haline gelmesinde en önemli

kriterlerdir. Bu yöntemle yapılan sığır oosit sınıflandırması çizelgede (Çizelge 1.3) verilmiştir (Brackett ve Zuelka, 1993; Kanagawa ve ark., 1995).

Çizelge 1.3. Oosit kalitesinin morfolojik sınıflandırılması (Gordon, 2003).

Kalite	Açıklama
A kalite	Etrafında 5-6 sıradan daha fazla kumulus hücresi bulunan homojen yapı gösteren oositler.
B kalite	Etrafında 2-5 sıra kumulus hücresi bulunan veya az bir kısımda kumulus bulunmayan oositler.
C kalite	Etrafında kumulus hücresi bulunmayan oositler.
D kalite	Etrafındaki kumulus hücre yığını dejenere durumda olan oositler.

Bazı araştırmacılar ise sitoplazması homojen görünüşte, zona pellusidaya sıkıca tutunmuş ve kompakt yapıda kumulusa sahip oositleri “gelişime uygun”, heterojen stoplazmalı ve ekspansive olmuş kumulus hücrelerine sahip oositleri de “gelişime uygun olmayan oositler” olarak nitelendirmektedirler (Younis ve ark., 1989). Kumulus oosit kompleksi görünümüne göre yapılan sınıflandırma da şekilde (Şekil 1.2) görülmektedir.



Şekil 1.2. Kalite sınıflandırmasına göre COC görünümleri (Akyol, 2006).

Oositlerin sınıflandırmasını farklı bir yöntem daha kullanılmıştır. Bu sınıflandırmada ise oositlerin fertilizasyon sonrası 3. ve 5. günlerdeki kalite durumları incelenmekte, bölünme hızı ve morula-blastosiste ulaşma durumuna göre oositler A, B veya C kalite diye adlandırılmaktadır (Carvalhais ve ark., 2009).

1.3.2.1. Follikül Büyüklüğü ve Oosit Kalitesi

In vitro sığır embriyosu çalışmalarında (IVM/IVF/IVC) kullanılacak olan oositlerin büyük çoğunluğu 2-6 mm. çapındaki folliküllerden aspirasyon yöntemiyle elde edilmektedir. Sığırlarda veziküler folliküllerin büyüklüğüne bakılarak oositlerin bölünmenin hangi aşamasında oldukları belirlenebilmektedir (Tan ve Lu, 1990). Eğer oositler 1-2 mm çapında veya daha küçük folliküllerden aspire edilecek olurlarsa, maturasyon ve fertilizasyon oranları daha büyük folliküllerden elde edilenlere kıyasla oldukça düşük kalmaktadır (Fuhrer ve ark., 1989). Büyüklüğü 6 mm den fazla olan folliküllerden toplanan oositlerin *in vitro* kültüründen 2-6 mm çaptaki oositlerin *in vitro* kültüre kıyasla daha kaliteli embriyo elde edildiği bildirilmiştir (Gordon, 1994).

Kanada'da yapılan bir çalışmada, sığır oositlerinin *in vitro* gelişim kabiliyetleri araştırılmış ve follikül büyüklüğünün oositlerin morfolojisi veya atretik olup olmamasından daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Blondin, 1993). Yapılan bir klonlama çalışmasında, çapları 1-5 mm ve 6-8 mm olan folliküllerden elde edilmiş oositler kullanılmış ve bunlardan sırasıyla %21, %42 oranında morula/blastosiste ulaşma oranı tespit edilmiştir (Barnes ve ark. 1993).

1.3.3. İn Vitro Maturasyon

Sığır oositlerinin maturasyon süreci, nükleer ve sitoplazmik maturasyon olmak üzere iki farklı evreden geçerek fertilizasyona hazır hale gelmektedir. Sığır oositlerinin nükleer maturasyonu, oosit çekirdeğinin germinal vezikül aşamasından metafaz II aşamasına geçmesi olayıdır (Mayes, 2002). Oositin ilk mayoz bölünmesi germinal vezikülün yıkılmasında, kromozom kondenzasyonu ve ilk polar cismin atılmasının ardından metafaz II aşamasına geçilmesini kapsamaktadır. Bu aşamalar sonunda kromozom sayısı redüksiyon bölünmesiyle birlikte haploit ($n=30$) duruma gelir (Akyol, 2006).

Sitoplazmik maturasyon ise oositin germinal vezikül aşamasından metafaz II aşamasına ulaşması sırasında olgun bir oosit oluncaya kadar geçirmiş olduğu ultrastrüktürel değişimleri ifade eder. Bu değişimler oositin fertilizasyonu,

bölünmenin başlaması ve blastosist safhasına ulaşmasında indirekt olarak etkilidir. Maturasyonu destekleyici faktör (MPF), mayoz kilitlenmesi, folliküler apoptozis, inhibitörler, folliküler sıvı, oositin *in vitro* maturasyonunu etkileyen diğer faktörler arasındadır (Akyol, 2006). Fertilizasyonun ardından ikinci mayoz bölünme gerçekleşir ve metafaz II tamamlanır (Gordon, 1994).

Sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonu sırasında kullanılan maturasyon medyumunun içeriği ve kullanılan maturasyon yöntemi, *in vitro* fertilizasyon ve embriyo gelişimini etkilemektedir (Brackett ve ark., 1989; Angelika ve ark., 1997). Sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonunda kullanılan kültür medyumları, basit ve kompleks olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Basit kültür sistemleri genellikle bikarbonat tamponlu fizyolojik tuzlara ilave piruvat, laktat ve glukoz katılmasıyla hazırlanan medyumlardır. Basit medyumlar genellikle antibiyotik, serum veya albüminle desteklenirler. Kompleks medyumlarda ise temel unsurların yanında amino asitler, vitaminler ve diğer bazı maddeler bulunmaktadır (Gordon, 1994).

Sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonunda kullanılan çok sayıda ticari maturasyon medyumunu bulunmaktadır. Sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonu için en yaygın biçimde kullanılan maturasyon medyumunu, doku kültür medyumunu (TCM 199)'dur (Suzuki ve ark., 1996). İçerisinde laktat, piruvat, amino asitler, vitaminler, HEPES (N-2-hidroksietil-piperazin-N'-2-etanosülfonik asit) ve sodyum bikarbonat bulunmaktadır (Gordon, 1994). Ham's F10, Menezo-B2 maturasyon medyumları da kompleks yapı kültür medyumlarıdır (Xu ve ark., 1987; Brackett ve ark., 1989).

1.3.3.1. İn Vitro Maturasyona Etki Eden Faktörler

Sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonuna etki eden birçok faktör vardır. Bu faktörler;

- a) Oosit vericisinin fizyolojik durumu.
- b) Östrus siklusu ve folliküler dalgalanma.
- c) Follikül büyüklüğü.
- d) Kumulus oosit kompleksi.
- e) Oosit kalitesi.
- f) Maturasyon süresi.
- g) Sıcaklık, nem ve çevresel gaz bileşenleri.

- h) Maturasyon ortamlarının ozmotik değeri.
- 1) Maturasyon ortamına katılan maddeler, olarak sıralanabilir.

Maturasyon ve kültür medyumlarına serum, hormon, büyüme faktörleri ve özel kimyasal maddelerin ilavesi, oositlerin maturasyon kabiliyetini artırmaktadır. Kültür ortamları içerisine serum ve/veya sığır serum albümini (BSA) katılması oositlerin mature olmalarında yardımcı olmaktadır (Ocana ve ark., 1999; Gomez ve Diez, 2000). *In vitro* kültür medyumlarına protein kaynağı olarak fetal buzağı serumu (FCS), östrus döneminde bulunan veya süperovule edilen sığırlardan elde edilen serum ilavesi de yapılabilmektedir (Zuelka ve Brackett, 1990; Gordon, 1994).

In vitro maturasyon medyumuna (TCM 199) içerisine katılan etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)'nın oositlerin maturasyonu ve embriyo gelişimini desteklediği yönünde bildirimler bulunmaktadır (Gardner ve Lane, 1996). Yapılan araştırmalarda bazı hormon ve büyüme faktörlerinin *in vitro* maturasyon medyumuna ilavesinin oosit maturasyonunu olumlu yönde etkilediği bildirilmektedir (Lu ve ark., 1987; Baştan ve ark., 2010). Maturasyon amacıyla kullanılan kültür solüsyonlarına luteinleştirici hormon (LH) ilavesinin oosit kalitesinin artmasında ve embriyo gelişiminde önemli etkileri olmaktadır (Brackett ve ark., 1989; Zuelka ve Brackett, 1990; Zuelka ve Brackett, 1993). Maturasyon medyumuna follikül uyarıcı hormon (FSH) katılmasının da oositlerin maturasyonu, fertilizasyonu ve embriyo gelişiminde olumlu etkileri olduğu bildirilmektedir (Eyestone ve Boer, 1993).

1.3.3.2. İn Vitro Maturasyonda Sıcaklık, Nem, Çevresel Gaz Bileşenleri ve Zaman

In vitro embriyo üretimi alanında yapılan araştırmalar, bikarbonat/CO₂ tamponlu çevre ortamı oluşturulduğunda en iyi sonuçların alındığını göstermektedir (Staigmiller ve ark., 1984). Yüksek oksijen konsantrasyonu, oosit maturasyonunu bloke etmektedir. Oositlerin iyi bir şekilde mature edilebilmeleri ve yüksek konsantrasyona sahip oksijenin etkisini azaltmak için ortamda %5 CO₂, %5 O₂ ve %90 N bileşimi kullanılmaktadır (William, 1990; Bavister, 1993). *In vitro* kültür

ortamlarında %20 oksijen oranı yüksek kabul edilmekte ve %5 ile %10 arasındaki oksijen miktarının en uygun maturasyon ortamını sağladığı belirtilmektedir (Pinyopummitr ve Bavister, 1995; Takahashi ve ark., 1996).

In vitro embriyo üretim sistemlerinde en uygun ısının sağlanması oositlerin maturasyonu, fertilizasyonu ve embriyo gelişimi açısından önemli olan bir diğer olgudur. *In vitro* maturasyon amacıyla önceleri 37°C civarında bir ısı kullanılmaktaydı. Düşük sıcaklık seviyelerinde mayoz iğ iplikçiklerinin oluşumu durmaktadır. Daha sonra 39°C'ye yakın sıcaklıklarda gerçekleştirilen maturasyon işlemlerinde iğ iplikçiklerinin yapısının korunduğu ve maturasyon oranının bu sıcaklık seviyesinde optimum olduğu belirlenmiştir. İnkübatör ortamında, maturasyon medyumunun buharlaşmaması ve pH değerinin değişmemesi amacıyla nemin %95'in üzerinde olması gerekmektedir (Nagai, 2001).

Maturasyon sırasında oosit içerisinde, bir takım nükleer olaylar meydana gelmektedir. Oositlerin primer oosit formundan sekonder oosit formuna geçmesi için yaklaşık olarak 18-24 saatlik bir zaman dilimine ihtiyaç duyulmaktadır (Sirard ve ark., 1989; Birler ve ark., 1998). *In vitro* maturasyona alınan immature sığır oositlerinde; 0-6,6 saatleri arasında germinal vezikül oluşumu, 6,6-8,0 saatleri arasında germinal vezikülün kırılması, 8,0-10,3 saatleri sırasında kromozom dekonzasyonu, 10,3-15,4 saatleri arasında birinci metafaz, 15,4-16,6 saatleri arasında birinci anafaz, 16,6-18,0 saatleri arasında birinci telofaz ve 18,0-24,0 saatleri arasında ikinci metafaz aşamaları gerçekleşmektedir (Sirard ve ark., 1989).

Germinal vezikülün kırılması ve birinci polar cisimciğin atılması, kumulus hücrelerinin genişlemesi ile yakından ilişkilidir. Sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonunda maturasyon süresi olarak, 18-24 saatlik periyotların en uygun zaman dilimi olduğu belirtilmektedir (Suzuki ve ark., 1996; Birler ve ark., 1998).

1.3.4. İn Vitro Fertilizasyon

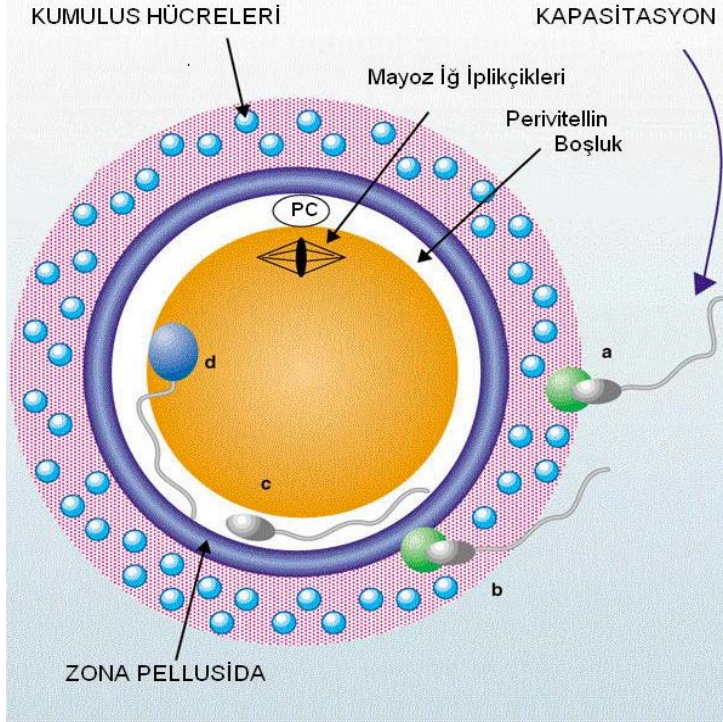
Fertilizasyon, oosit ile spermatozoonun çekirdeklerinin kaynaşmasıyla oluşan ve oositten embriyoya geçişin sinyallerini taşıyan kompleks olaylar zinciridir (Gordon, 2003). Bu prosedürün başarılı bir şekilde sonuçlanması için erkek ve dişiye ait gametlerin optimum kondüsyona sahip olmaları gerekmektedir. Fertilizasyon;

kapasitasyona ulaşmamış spermatozoonların laboratuvar şartlarında kapasite edilmesi ve dişi gamet hücresi olan oositlerin, kapasite edilmiş bu spermatozoonlarla fertilize edilmesi olarak ta tanımlanmaktadır (Özdaş, 2001).

Spermatozoonun dişi üreme kanalına bırakılmasının ardından, ovidukta kadar olan yolculuğu boyunca, önemli maturasyonel değişimlere uğrayarak kapasite olur ve ovumu dölleme yeteneği kazanır. Bütün memeli türlerinde, spermatozoon dişi genital kanalına bırakıldığı anda fertilizasyon yapabilme yeteneğinde değildir. Bundan dolayı fertilizasyona hazırlık sürecinin geçirilmesi gerekmektedir (Akyol, 2005a). Bu süreç, maturasyonun başlangıçtaki membransel değişimleri (kapasitasyonu) ve ardından akrozom reaksiyonunu kapsar. Kapasitasyon, spermatozoonların dış membranında morfolojik olarak gözlemlenebilen, akrozom reaksiyonunun oluşmasına imkân sağlayan biyokimyasal değişiklikleri içerir. Kapasitasyon işleminde uterus, ovidukt ve ovulasyon esnasında folliküler sıvı görev almaktadır (Moor, 1996). Kapasitasyon prosedürü başarılı bir *in vitro* fertilizasyonun gerçekleşmesi için en önemli etkidir. Geçmiş yıllarda bu sorunun aşılması için spermatozoon kapasitasyonu üzerine birçok fertilizasyon çalışması yapılmıştır (Gordon, 2003).

Boğa spermatozoonları ilk olarak tavşan uterusu ve sığır oviduktu kullanılarak kapasite edilmişlerdir (Iritani ve Niwa, 1977). Yüksek konsantrasyondaki solüsyonlarda kapasite edilen boğa spermatozoonlarının ovule olmuş oositlerle fertilizasyonu gerçekleştirilmiş ve ilk buzağı elde edilmiştir (Brackett ve ark., 1982).

Kapasitasyona etki eden en önemli faktörlerin başında genital organdaki O_2 yoğunluğu gelmektedir. Memelilerin genital kanalında bulunan sıvılardaki O_2 miktarı ovulasyon zamanı dışında oldukça düşüktür. Ovulasyon sırasında bu miktarın artması ile oluşan serbest oksijen radikalleri spermanın kapasitasyonu ve canlılığı açısından büyük öneme sahiptir (Akyol, 2005b). Fertilizasyon işlemi Şekil 1.3'de şematize edilmiştir.



Şekil 1.3. Fertilizasyonun şematik görünümü (Akyol, 2005b).

1.3.4.1. Sperma Hazırlama Yöntemleri

Spermanın hazırlama yöntemi, başarılı bir *in vitro* fertilizasyonun gerçekleşmesi açısından son derece önemlidir. Eğer sperma taze elde edilmiş ise etrafındaki seminal plazmadan kurtulması için yıkanması gerekmektedir. Dondurulmuş sperma kullanılacaksa, etrafında bulunan kriyoprotektanların uzaklaştırılması için yıkanmalıdır. Spermanın yıkanması işlemi 1800 rpm devirde, 5-10 dakika süreyle 2-3 kez gerçekleştirilir. Her yıkama işleminden sonra, süpernatantın (seminal plazma veya kriyoprotektanlar) uzaklaştırılması gerekmektedir. Yapılan işlemlerden sonra elde edilen boğa sperması, preinkübasyon medyumuna içerisine alınır (Lu ve ark., 1987). Spermatozoonların uygun motilitede elde edilmesi amacıyla sperma hazırlama yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın kullanılanları; swim-up, percoll density gradient, sephadex ve BO medyumuna ile direkt yıkama yöntemleridir. Bu yöntemlerin yanı sıra, hyaluronik asit ve spermatozoonların filtrasyonu esasına dayalı metotlarda vardır (Sağırkaya ve ark., 2004, Akyol, 2005b). Swim-up yönteminde esas amaç, hareketli sperm hücrelerinin hareketsiz olanlardan ayrılmasını sağlamaktır. Percol separasyon yönteminde ise temel amaç, canlı sperm

hücrelerinin, ölü olanlardan ayrılmasıdır. Ölü sperm hücrelerinin ağırlıklarının canlı olanlardan az olması nedeniyle, yoğunlukları farklı oluşturulmuş iki tabakada bunları ayırmak mümkündür (Yağmur, 2005). Bütün tekniklerde ana amaç motil spermatozoon oranını artırmaktır.

1.3.4.2. Fertilizasyon Medyumları

Fertilizasyon amacıyla kullanılan medyumun, oosit ve spermatozoonların penetrasyonunu sağlayacak biçimde bir bileşime sahip olması gerekmektedir. *İn vitro* fertilizasyon amacıyla, hem taze hem de dondurulmuş sperma kullanılabilir. Fakat en fazla kullanılan dondurulmuş spermadır. *İn vitro* fertilizasyon amacıyla taze sperma kullanılacaksa uzun bir kapasitasyon süresi gereklidir (Akyol, 2005b).

Taze boğa sperması kullanıldığı durumlarda, Brackett ve Oliphant medyumunu gibi HIS medyumunu kapasitasyon amacıyla kullanılmaktadır. HIS medyumunu donmuş boğa spermasının kapasitasyonu amacıyla da kullanılabilir (Brackett ve ark., 1982). Bazı araştırmacılar boğa spermasının *in vitro* kapasitasyonu amacıyla TALP (Tyrode's albümin laktat piruvat) medyumunu kullanmaktadırlar (Jaakma ve ark., 1997). Boğa spermalarının *in vitro* fertilizasyonu amacıyla çeşitli medyum katkıları kullanılmaktadır. Bunlar; heparin, kafein, epinefrin, penisilamin, taurin, hipotaurin, BSA, lipozomlar gibi birçok kimyasal maddeden ibaret olup, kapasitasyona yardım amacıyla kullanılmaktadır (Akyol, 2005a).

1.3.4.3. Fertilizasyon Süresi, Isısı ve Spermatozoon Sayısı

İn vivo şartlarda dişi genital kanalındaki sekretorik ve kimyasal aktiviteler spermatozoonların kapasitasyon ve fertilizasyon yeteneklerini belirleyen en önemli unsurlardır. *İn vitro* kapasitasyon ve fertilizasyonun başarısına medyumun heparin yoğunluğu ve spermatozoonların heparine maruz kalma süresi etki eder (Akyol, 2005b). Yaklaşık olarak 4 saatlik bir süre kapasitasyon için yeterli olmaktadır. Bazı araştırmacılar ise 15-20 saate kadar bir süre önermektedirler (Gordon, 1994). Bazı

araştışıcılar 25°C derecede ve 4-8 saatlik inkübasyonla en iyi fertilizasyon şartlarının sağlandığını bildirmektedir (Chen ve ark., 1992). Sığır oositinin *in vitro* fertilizasyonunda oosit başına 10000-20000 spermatozoon gerekmektedir (Brackett ve ark., 1982, Lambert ve ark., 1986).

1.3.4.4. İn Vitro Fertilizasyon Ölçütleri

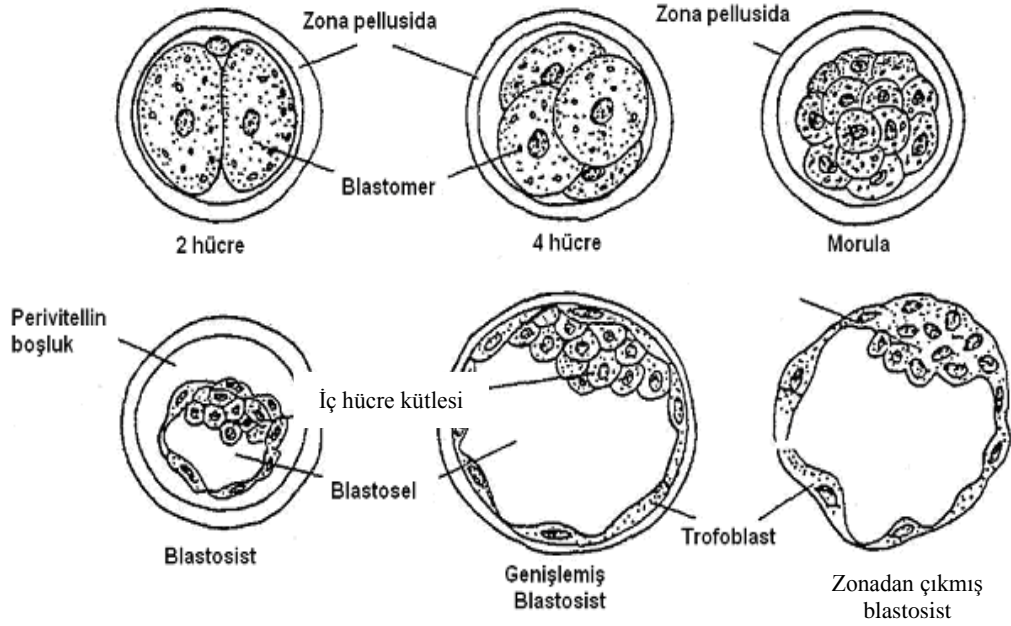
İn vitro fertilizasyonun başlayıp başlamadığı mikroskop bakışıyla belirlenebilmektedir (Shioya, 1999). Bu kriterler;

- a) Ooplazma içerisinde spermatozoon kuyruğunun görölmesi.
- b) Spermatozoon başının ooplazma içerisinde görölmesi.
- c) Erkek ve dişi pronükleusların ooplazma içerisinde varlığı.
- d) Birinci ve ikinci polar cisimlerin saptanması.
- e) Zona pellusida veya perivitellin boşlukta spermatozoon varlığı.
- f) İkinci mayoz bölünmenin telafaz aşamasının tespiti.

1.3.5. İn Vitro Kültür

İn vitro kültür; oositlerin *in vitro* maturasyonu ve fertilizasyonunun ardından oluşan embriyoların morula-blastosist aşamasına kadar kültüre edilmeleridir (Şekil 1.4), (Gordon, 2003). Sığır embriyolarının *in vitro* kültüre edilmesi için kültür ortamının, oviduktun sahip olduğu çevresel faktörlere sahip olması gerekmektedir. Embriyolar erken blastosist aşamasına kadar oviduktta gelişimlerini sürdürürler ve uterusu doğru bir yolculuğa devam ederler (Gordon, 1994).

İdeal bir embriyo gelişimi için *in vitro* kültür ortamının; içerdikleri gaz bileşenleri, kullanılan medyumların kimyasal yapısı, ortamın pH'sı, enerji ve protein miktarları bakımından *in vivo* şartlara benzerlik göstermesi gerekmektedir.



Şekil 1.4. Embriyo bölümleri (Kanagawa, 1995).

Çiftlik hayvanlarında *in vitro* embriyo üretimi hayvancılık ve biyomedikal araştırmalar için çok önemlidir. Kültür sistemleri ve medyum dizaynında, embriyoların ihtiyaç duyduğu maddeleri tam olarak bilememekteyiz (Feugang ve ark., 2009). Embriyoların *in vitro* ortamlarda blastosist aşamasına kadar gelmesinde ve kalitesinde, oositlerin orijini ve fertilizasyon sonrası kültür ortamının içeriği çok önemlidir (Feugang ve ark., 2009; Blanco ve ark., 2011). *In vitro* sığır embriyolarında blastosiste ulaşma oranı yaklaşık olarak % 40 civarındadır (Blanco ve ark., 2011).

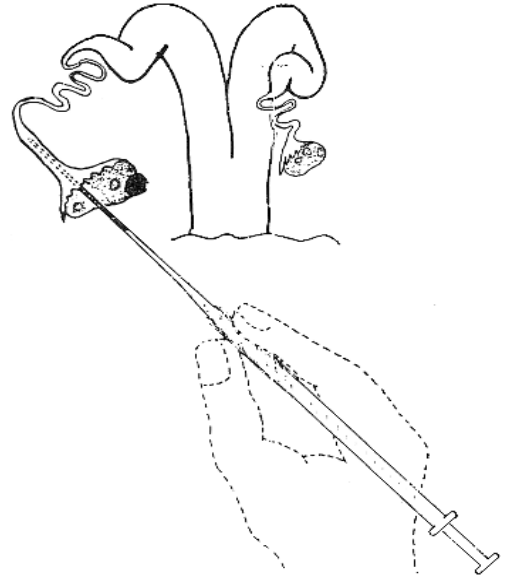
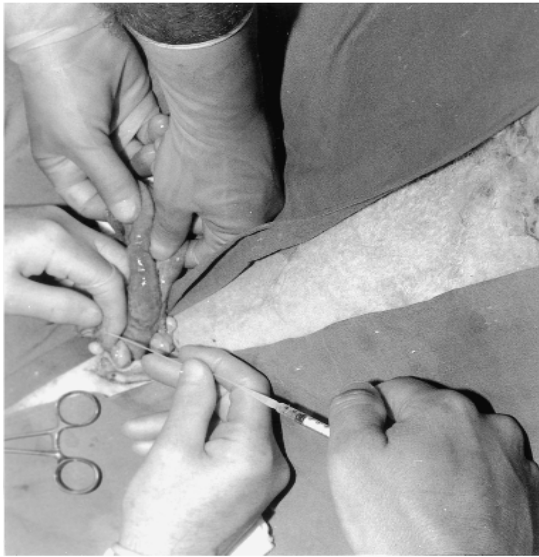
In vitro kültür solüsyonları, içerisinde protein varlığı ve yokluğuna göre üç katagoride sınıflandırılabilir. Birincisi, içeriği net olarak bilinmeyen FCS ilavesi yapılan medyumlar, ikincisi yarı tanımlı olarak nitelendirilen BSA ilaveli kültür medyumları ve üçüncüsü ise içeriği tamamen tanımlanmış ve sentetik olarak üretilen medyumlardır. *In vitro* kültür sistemlerinin içeriğinin tanımlanması yapılacak olan maddelerin etkinliğinin araştırılmasını kolaylaştıracaktır (Tetzner ve ark., 2011).

1.3.5.1. Embriyo Kültür Sistemleri

Sığır embriyolarının *in vitro* kültürü amacıyla kullanılan üç farklı kültür sistemi vardır. Birincisi, *in vivo* kültür ortamlarıdır. İkincisi, *in vitro* kültür ortamlarıdır. Diğer kültür sistemi ise ko-kültür içeren kültür sistemleridir (Gordon, 2003).

1.3.5.1.1. İn Vivo Kültür Sistemleri

Sığır oviduktları boğa spermalarının taşınması, kapasitasyonu ve sekonder yapıdaki oositlerin fertilizasyonu için ideal bir ortamdır. Ancak tavşan oviduktları *in vitro* sığır embriyolarının kültüründe en sık ve yaygın kullanılan bir ortam olmuştur (Lambert ve ark., 1986). Her ovidukta beş ila yirmi arasında embriyo bırakılmaktadır. Bu yöntemde fallop tüpleri bağlanmakta ve bırakılan embriyoların geri kazanılma oranının %70 olduğu bildirilmektedir (Boland, 1984).



Şekil 1.5. Sığır embriyolarının koyun oviduktunda *in vivo* kültürü (Gordon, 2003).

In vivo kültür sırasında embriyoların rahim içerisine geçmelerini engellemek için uterusla tuba uterina arası bağlanır. Koyun oviduktlarında sadece koyun embriyoları için değil, diğer türlerin embriyoları içinde iyi bir kültür ortamı oluşturmaktadır. Koyun oviduktu sığır embriyolarının blastosist aşamasına kadar kültür ortamı olarak rahatlıkla kullanılabilir (Lu ve ark., 1988). Koyun

oviduktları gerek yapısının büyük olmasından gerekse koyunların östrus sikluslarının kolay bir şekilde kontrol edilebildiğinden (Şekil 1.5), tavşan oviduktlarına göre daha fazla tercih edilirler (Westhusin ve ark., 1989). Bazı araştırmacılar sığır oviduktlarının sığır embriyolarının *in vivo* kültürü için en uygun ortam olduğunu söylemektedirler (Xu ve ark., 1987). Fare, keçi ve sığır embriyoları; dört günlük döllenmiş tavuk yumurtasının amniyon kesesinde de gelişmelerini sürdürebilmektedirler (Blakewood ve ark., 1993).

1.3.5.1.2. İn Vitro Kültür Sistemleri

Bu sistem fertilize olan oosit, kumulus hücrelerinden uzaklaştırıldıktan sonra somatik hücre desteği içermeyen basit kültür sistemleridir. Ticari olarak üretilen *in vitro* kültür sistemlerinin temel amacı, *in vivo* ortamın sunmuş olduğu bütün gerekleri yerine getirmek için en iyi ortamın oluşturulmasıdır. İlk sentetik kültür medyumu koyun oviduktlarının biyokimyasal analizleri sonucu elde edilen ve üretilen sentetik ovidukt sıvısıdır (SOF). En fazla kullanılan *in vitro* kültür medyumları arasında TCM 199, CR1aa, 11 amino asitli hamster embriyo kültür medyumu (HECM-6), optimize edilmiş modifiye medyumu (KSOM) ve içeriği tanımlanmış medyum (CDM)'dir. *In vitro* embriyo kültür medyumlarında enerji kaynağı olarak genelde piruvat, glikoz, laktat, protein kaynağı olarakta FCS veya BSA kullanılmaktadır (Gordon, 2003).

1.3.5.1.3. Ko-kültür İçeren Kültür Sistemleri

Kültür medyumları içerisine çeşitli hücreler katılmaktadır. Bu amaçla en fazla; ovidukt epitelyum hücreleri, granuloza hücreleri, rat karaciğer hücreleri, uterus ve testis hücreleri kullanılmaktadır. Menezo veya TCM 199 kültür medyumları içerisine %10 serum ve/veya %1 BSA eklendikten sonra bu hücreler petri tabanına tabaka yapılacak tarzda yerleştirilirler ve %5 CO₂ içeren ortam ve 38,5°C de inkübe edilirler (Goto ve ark., 1992).

1.3.5.2. İn Vitro Kültür Ortamının Gaz Bileşenleri

Sığır embriyolarının *in vitro* kültürü için kullanılacak olan gaz miktarının değişik oranlarda olduğu bazı araştırmacılar tarafından dile getirilmiştir (Gordon, 2003). Yapılan araştırmalar sonucunda memeli oviduktunda oksijen miktarının %10'nun altında olduğu görülmüştür. *İn vitro* kültür için oksijen konsantrasyonunun atmosferik oksijen miktarından düşük olması gerekmektedir. Somatik hücre desteği olmadığı durumlarda oksijen konsantrasyonunun %5'in altında olması gerektiği bildirilmektedir (Nagao ve ark., 1994).

Embriyolar, *in vitro* kültürü boyunca karbon kaynağı olarak CO₂'ye ihtiyaç duymaktadırlar. Ayrıca CO₂, alkaliye kayma eğiliminde olan kültür ortamlarının pH'ının stabilize edilmesinde büyük öneme sahiptir (Gordon, 1994). Zhang ve arkadaşları (2003) memeli embriyolarının *in vitro* kültürü için %5 CO₂ gazını kullanmışlar ve başarılı sonuçlar almışlardır. Bazı araştırmacılar ise %5 CO₂, %5 O₂ ve %90 N₂ gaz karışımını aynı amaca yönelik olarak başarıyla kullanmışlardır (Çevik ve ark., 2009).

1.3.5.3. İn Vitro Kültür Ortamında Isı ve Işık

İn vitro kültür ortamı için en uygun ısının 38-39°C arasında olduğu belirtilmektedir (Gordon, 1994). Embriyolar 40,5°C'lik bir sıcaklıkta 30-60 dakika arasında tutulduklarında bölünme ve blastosiste ulaşma oranlarında herhangi bir etkinin olmadığı, sıcaklığın 41,5°C'ye çıkarılması ve bu derecede 30-60 dakika süreyle muhafaza edilmesi durumunda ise embriyo gelişiminin önemli ölçüde zarar gördüğü belirtilmektedir (Ju ve ark., 1999). Sekiz, 16 hücreli dört günlük embriyolara uygulanan 40°C ve 80 dakikalık bir sıcaklık embriyo gelişimini olumsuz etkilemiş, 41°C ve 9 saatlik bir sıcaklık uygulaması ise apoptozisi bloke etmiştir (Paula-Lopes ve Hansen, 2002).

Sığır embriyo ve zigotları ışıktan ve ultraviyole ışıktan olumsuz yönde etkilenmektedirler (Gordon, 1994). Yapılan bir çalışmada direkt floresan ışığına maruz kalan embriyolarda gelişme oranı %33,8, sarı filtreyle zararlı etkileri

azaltılmış floresan lamba altında ise %41 gelişme oranı gösterdiği gözlenmiştir (Bunch ve ark., 1999).

1.3.5.4. İn Vitro Kültür Ortamında pH

İn vitro kültür medyumlarının pH'sı embriyoların gelişimi üzerinde oldukça etkili bir faktördür (William, 1990). Medyumların pH'ının kontrolü amacıyla ortama bikarbonat ilavesi yapılabilir. Ayrıca *in vitro* kültürde medyumların pH'ının kültür kabini içerisindeki CO₂'nin yardımı ile de dengelendiği bildirilmiştir (Evecen, 1999). *İn vitro* kültür ortamında 7,2 ile 7,6 arasında bir pH'ının olmasının embriyo gelişimi için uygun olduğu bildirilmiştir (Gordon, 1994).

1.4. Serbest Oksijen Radikalleri, Antioksidanlar ve Lipit Peroksidasyonu

Serbest oksijen radikalleri (ROS) dış orbitalarında bir veya daha fazla eşlenmemiş elektron içeren moleküler yapılar olarak tanımlanır (Şimşek, 1999). Atomlarda elektronlar "orbital" adı verilen uzaysal bölgede ve çift olarak bulunurlar. Moleküllerin çoğu çift elektronlu, az sayıdaki moleküller ise tek yani eksik elektronludur. Eksik elektronlu bu moleküller bulabilecekleri herhangi bir elektron ile iletişime girerek, bu molekülden ya bir elektron alır veya ona bir elektron verirler. Fizyolojik veya patolojik reaksiyonlar sırasında başka moleküllerle kolayca elektron alışverişine girip onların yapısını bozan bu moleküllere serbest oksijen radikalleri ismi verilmektedir (Durmuş ve Ünsaldı, 2005). Oksidan ajanlara karşı organizmada bulunan veya diyetle alınan antioksidanların tedavide ve korumada yer aldığı uzun yıllardır bilinmektedir (Şimşek, 1999).

Hücrede, normal metabolik yollardaki enzimatik reaksiyonlarda, sürekli şekilde serbest radikaller oluşmaktadır. Bazen bu serbest radikal ara ürünler, oksijenle etkileşerek serbest oksijen radikalleri oluşturmaktadır (Cetica ve ark., 2001). Hücrede oluşan reaktif oksijen türleri, "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinen mekanizmalarla ortadan kaldırırlar. Bazı durumlarda hücresel savunma mekanizmasıyla ortadan kaldırılardan daha fazla

reaktif oksijen türleri oluşabilir. Organizmada hücrel savunma mekanizması vasıtasıyla ortadan kaldırıldandan daha fazla reaktif oksijen türlerinin meydana gelmesi “oksidatif stres” olarak tanımlanır (Correa ve ark., 2008).

Serbest oksijen radikalleri, reaktif nitrojen türleri (RNS) ve sülfür merkezli radikaller, oksidan sınıfına girer. Ancak tüm reaktif türleri radikal değildir. Canlı organizma için önemli olan yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücrel kaynakları ve etkileri ile serbest radikaller, atomik yörüngelerinde eşleşmemiş elektron bulundurarak, bağımsız olarak varolabilen moleküllerdir (Antmen, 2005).

Serbest oksijen türlerinin birçok formu ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} , NO , $ONOO^-$) vardır. Bu oksijen türlerinin üreme üzerine hem yararlı hem de zararlı etkileri olabilmektedir (Roy ve ark., 2008). Düşük konsantrasyondaki serbest oksijen radikalleri zona pellüsidanın sperm bağlama yeteneğini arttırabilmektedir (de Lamirande ve ark., 1997). Sığırlarda süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) *in vitro* sperm kapasitasyonu ve akrozom hareketi için gereklidir. Diğer taraftan yüksek H_2O_2 konsantrasyonu boğa spermasının *in vitro* motilitesini azaltmaktadır (O’Flaherty ve ark., 1999). Yüksek yoğunluktaki H_2O_2 fertilizasyon ve embriyo gelişim kabiliyetini azaltabilmektedir (Velez-Pardo ve ark., 2007). Kültür ortamına katılan antioksidan maddelerin oositlerin maturasyonunu ve kaliteli embriyo sayı ve oranlarını arttırdığı belirtilmektedir (Lott ve ark., 2010).

In vivo embriyo üretimindeki embriyoların kalitesinin *in vitro* üretilen embriyolara oranla daha iyi olduğu morfolojik, fizyolojik ve kimyasal olarak ispatlanmıştır (Lonergan ve ark., 2002; Livingston ve ark., 2009). *In vitro* embriyo gelişiminin yeterli olmamasının sebeplerinden biri ve belki de en önemlisi serbest oksijen radikalleridir (Livingston ve ark., 2009). Serbest oksijen radikallerinin üretimi hücrelerin normal fizyolojik olayları sonrasında ortaya çıkmaktadır (Dröge, 2002).

Oksidatif stres, ortamdaki serbest oksijenin yanında hasarlı embriyo gelişimiyle de direkt ilişkilidir. Oksidatif stres sonrası embriyo ve embriyo ortamından kaynaklanan fazla miktardaki serbest oksijen radikalleri, hücrelerin içerdiği moleküllerde değişimlere yol açarak, embriyonun gelişimini baskı altına almaktadır (Bucak ve ark., 2009). Salınan serbest oksijen radikalleri, embriyo metabolizmasında, gelişiminde ve implantasyonunda önemli derecede etki

göstermektedir. Embriyoda meydana gelen hasarlar, yüksek oranda salınan serbest oksijen radikalleri tarafından oluşturulmakta ve bu serbest radikaller, hücre membranını geçerek hücrenel moleküllerin yapısını (lipit, protein, nükleik asit) değiştirerek embriyonun gelişiminin durmasına veya dejenere olmasına neden olabilmektedir. *İn vivo* ortamlarda ROS'un meydana getirebileceği zararlı etkilere karşı antioksidan sistemler devreye girmektedir (Guerin ve ark., 2001). *İn vitro* şartlarda ise embriyonun kendi içerdiği antioksidan sistemleri dışında oksidatif strese karşı koruyucu bir mekanizması olmadığından oksidatif stresi önleyici tedbirler alınması gerekmektedir (Bucak ve ark., 2009).

Aerobik metabolizma, serbest radikaller veya reaktif oksijen türleri olarak adlandırılan (hidroksil radikalleri, süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve nitrik oksit) prooksidant moleküllerin üretimi ile ilişkilidir. Prooksidanlar ve antioksidanlar arasında hücre içi hemostazinin devamının sağlanması açısından kompleks bir ilişki söz konusudur. Prooksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bu denge bozulduğundan itibaren oksidatif stres oluşmaya başlamaktadır. Serbest radikaller, üreme kanallarına çift yönlü olarak etki etmektedirler. Serbest radikaller, oositler, sperma ve embriyoların yaşadıkları mikro çevrede etkilidirler. Bu mikro çevre, oosit kalitesi, sperma oosit birleşmesi, implantasyon ve erken embriyonik gelişim üzerine oldukça etkilidir. Oksidatif stres, başarılı bir gebeliğin oluşumunu belirleyen, implantasyon ve erken embriyonik gelişim üzerine etki etmektedir. Burada, sitokinler, hormonlar ve diğer stres faktörleri arasında serbest oksijen radikallerinin oluşumunda kompleks ve karşılıklı bir ilişki söz konusudur (Agarwal ve ark., 2006).

Kusurlu embriyoların gelişiminde oksidatif stresin etkisini göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Serbest oksijen radikallerinin kaynağı, embriyo metabolizması sonrası (enzimatik mekanizma) ve/veya çevreden kaynaklanmaktadır. Her bir serbest oksijen radikali gelişim düzeyi, türlere ve kültür ortamının yapısına göre farklılık göstermektedir. Antioksidanlar yalnız başlarına oksidatif stresten embriyoları korumak için yeterli olmayabilir, ayrıca seçilen antioksidanlar ve bu antioksidanların dozları kültür ortamları için çok önemlidir (Öztürkler ve ark., 2010).

Oksidatif stres *in vitro* embriyoların gelişiminde birçok şekilde etkisini göstermektedir. Membran lipitlerinin peroksidasyonu, amino asitlerin ve nükleik

asitlerin oksidasyonu, apoptozis ve nekrozis *in vitro* embriyo gelişimini etkileyen en önemli faktörler arasında sıralanabilir (Ali ve ark., 2003, Kitagawaa ve ark., 2004).

İnfertil kadınlar üzerinde yapılan bir araştırmada esansiyel yağ asitleri ile infertilite arasında bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Doymamış yağ asitleri ile bazı antioksidan maddelerin beraber kullanıldığında oksidatif stresi azaltıcı yönde etki ettiğini ve omega-3 yağ asitleri ile antioksidanların infertilite probleminin çözümünde birlikte kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Mehendale ve ark., 2009).

Oksijen konsantrasyonunun sığır embriyolarına olan etkisi net değildir, fakat reaktif oksijen radikallerinin lipid peroksidasyonuna ve enzimlerin inaktivasyonuna neden olduğu, bununda hücrelerin zarar görmesine sebep olduğu bildirilmektedir (Fujitani ve ark., 1997). Sığırlarda *in vitro* embriyo gelişimini olumsuz yönde etkileyen en önemli faktörlerin başında oksidatif stres gelmektedir. Ortamda şekillenen serbest oksijen radikalleri hücrede oksidatif stres meydana getirmektedir. Bu durum hücresel fonksiyonların azalmasına veya tamamen durmasına neden olmaktadır. Çoğu memeli hücresi, etkili antioksidan enzimleri (katalaz, superoksit dismutaz vb.) içermektedir. Fakat bu endojen antioksidan sistemler, embriyoların kültür ortamı inkübasyonunda yeterli gelmemektedir (Bucak ve ark., 2009).

Embriyoların doğal gelişim ortamı, fertilizasyonu ve blastosist aşamasına ulaşması oviduktta gerçekleşmektedir. *İn vivo* ortamda, oviduktta bulunan epitelyum hücreleri, embriyo için gerekli olan fiziko-kimyasal mikro çevreyi en iyi şekilde düzenlemektedir. *İn vitro* ortamlar, ovidukt ortamının aksine embriyoların, toksik metabolitler ve oksidatif strese maruz kalmasını engelleyememektedir (Ali ve ark., 2003). *İn vitro* kültür ortamlarına, ovidukt orijinli embriyotropik faktörlerin katılması, *in vitro* embriyo gelişimini *in vivo* ortamlardaki gibi desteklemekte ve uyarmaktadır (Mermillod ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalarda serbest oksijen radikalleri etkilerini, mitokondrinin fonksiyonunu bozarak, DNA, RNA ve proteinleri zarara uğratarak gösterdiği tespit edilmiştir (Comporti ve ark., 1989). Yine serbest oksijen radikallerinin oosit-sperma birleşmesini engelledikleri de tespit edilmiştir (Aitken ve ark., 1993). Oosit ve embriyoları *in vitro* kültür boyunca oksidatif stresten korumak için antioksidan özelliği olan maddelerin kültür ortamlarına katılması gerektiği bildirilmektedir (Johnson ve ark., 1994). *İn vitro* kültür maturasyon medyumlarına ilave edilen

antioksidan maddeler; kültür ortamında fazla miktarda bulunan serbest oksijen radikallerinin ve ortaya çıkan oksidatif ürünlerin etkisini gidermek amacıyla kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (Gasparrini ve ark., 2006; Bucak ve ark., 2009; Block ve ark. 2009).

1.5. Yağ Asitleri

Yağlar, bir gliserol molekülü ve üç yağ asidi molekülünün esterleşmesiyle oluşan organik bileşiklerdir. Bir yağ asidi molekülü, bir ucunda metil grubu (CH₃), diğer ucunda da suda çözünebilen karboksil grubu (-COOH) bulunan uzun zincirli organik asittir. Yapısal formüllerini oluşturan karbon zincirleri arasındaki bağ durumuna bağlı olarak doymuş veya doymamış yağ asitleri olarak adlandırılırlar. Yapısında tek çift bağ bulunduranlar tekli doymamış, iki veya daha fazla çift bağ bulunduranlar ise çoklu doymamış yağ asitleri olarak adlandırılırlar. Linoleik (C18:2) ve oleik (C18:1) asit ise doymamış yağ asitleridirler (Şirin ve Kuran, 2004).

Hücre kültür sistemleri için omega-3, omega-6, ve omega-9 ailesine bağlı olan yağ asitlerinin kullanılması önemlidir. Bunlar hücre kültürü sistemlerinde heterolog proteinlerin biyotransformasyonu için gereklidir. Yağ asitleri; prostaglandinler, prostasiklinler, fosfolipitler, glikolipitler, tromboksanlar ve vitaminlerin prokürsörüdürler. Yağ asitleri hücre membranı gibi hücrenin önemli unsurlarına katılırlar (McEvoy ve ark., 2000).

Yapılan çalışmalarda yağ asitlerinin normal oosit maturasyonu, fertilizasyonu ve embriyo gelişiminde olumlu yönde etki ettiği görülmüştür (Khandoker ve Tsujii, 1999; Kim ve ark., 2001). Hayvanların beslenmesinde çoklu doymamış yağ asitleri, üreme performansını olumlu yönde etkilemektedir (Şirin ve Kuran, 2004; Marei ve ark., 2009). Süt sığırlarına yüksek yağlı diyetlerin yedirilmesi, yüksek blastosist oranları ve iyi kalitede gelişmiş embriyo elde edilmesine yol açmaktadır. Bu etkilerin yumurta gelişimi üzerine yağ asitlerinin doğrudan etkisinden dolayı olabileceği bildirilmektedir (Marei ve ark., 2009).

Yağlar, ovaryum folliküllerinin boyut ve sayısını etkileyebilmektedir. Sığırlarda yapılan çalışmalarda, yağ asitlerinin farklı boyutlardaki folliküllerin sayısını artırdığı görülmüştür. Follikül büyüklüğündeki en fazla artış, linoleik asitçe zengin yağların kullanılması sonucunda görülmüştür (Ryan ve ark., 1992). Ayrıca

yağ ilavesinden kaynaklanan follikül sayısındaki artış, dominant follikülün boyutunda da artışa yol açmıştır (Homa ve ark., 1992).

Preimplantasyon döneminde embriyonik ölüm oranlarının büyük çoğunluğu gebeliğin ilk 8-17. günleri arasında olmaktadır. Bu dönemdeki embriyonik ölüm oranı %40 civarındadır (Thatcher ve ark., 2001). Bu dönemde meydana gelebilecek olan embriyonik kayıplar; embriyonun trophektoderm kısmında bulunan hücreler tarafından salınan interferon tau (IFNs) nun uterustan PGF2 α salınımını baskılamasıyla önlenmekte ve embriyo yaşamına devam edebilmektedir (Hernandez-Ledezna ve ark., 1993; Robinson ve ark., 2006;). Preimplantasyon öncesi embriyonun kalitesi ve uterus hücreleri ile iletişim kurması, gebeliğin devam etmesi açısından son derece önemlidir (Fouladi-Nashta ve ark., 2007).

Gebeliğin başarısı, gebeliğin anne tarafından tanınmasına bağlıdır. Embriyo bunu, interferonu zamanında üretip korpus luteumun yıkımına engel olarak sağlar. İnterferon, uterustan PGF2 α 'nın sentezini engelleyerek gebeliğin devamında rol oynamaktadır (Thatcher ve ark., 2001). İnterferon, endometriumda oksitosin reseptörlerinin oluşmasını engellemektedir. Düşük östradiol konsantrasyonları, erken embriyonik ölümleri ve korpus luteumun yıkımını geciktirerek erken doğumu engeller. Düşük linolenik asit içeriğine sahip rasyonlarla beslenen sığırlarda, progesteron sentezindeki azalmaya paralel olarak embriyonun gelişimi gecikebilmektedir (Şirin ve Kuran, 2004). Omega-3 uçucu yağ asitlerinin koyunların rasyonlarına katılması sonrası oositlerin kalitelerinin arttığı gözlenmiştir. Aynı çalışmada elde edilen oositlerin, dondurma çözündürme sonrası yaşama kabiliyetlerinin arttığı ve omega-3 uçucu yağ asitleriyle beslenmeyen koyunların oositlerine göre bütünlüğünü koruduğu gözlenmiştir (Zeron ve ark., 2002).

Sığır ve domuz oositleri yüksek düzeyde yağ asidi içerir. Örneğin mature olmuş bir sığır oositinde ortalama 63 μ g yağ asidi bulunur. Bunun %25'lik bir kısmını fosfolipitler oluşturur (McEvoy ve ark., 2000). Yağ asitleri, sığır oositlerinin maturasyonu ve embriyoların uterusu implantasyonundan önceki gelişimi boyunca enerji kaynağı olarak kullanılmaktadır (Kim ve ark., 2001).

İn vitro fertilizasyon yöntemiyle üretilen insan embriyoları üzerinde yapılan bir çalışmada; 4 hücre dönemini geçen embriyolarda, linoleik ve oleik asit oranlarının arttığı tespit edilmiştir (Haggarty ve ark., 2006).

Rat embriyolarında yapılan bir çalışmada, kültür medyumuna doymamış yağ asitleri (oleik, linoleik ve arahidonik) ilavesinin, embriyo gelişimini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiştir (Khandoker ve Tsujii, 1999). Linoleik ve oleik asit dâhil, yağ asitlerinin antioksidan özelliği olduğu araştırmalar sonucu tespit edilmiştir (Titov ve ark., 2005; Fagali ve Catala, 2008; Wang ve ark., 2009).

Yapılan bir başka çalışmada; hücre kültüründe meydana gelen oksijenden kaynaklanan toksisite riski, oleik ve linoleik asitle önlenmeye çalışılmıştır. Oleik asit kullanımı hücrelerin gelişimini olumlu yönde etkilerken, linoleik asit kullanımı hücrelerin gelişiminde önemli bir fark oluşturmamıştır (Kinter ve ark., 1996).

Sığır embriyolarının dondurma-çözündürme sonrası kültür ortamlarına konjuge linoleik asidin türevi olan trans-10, cis-12 oktadekadienoik asit (t10, c12 CLA) ilavesinin, embriyoların canlılık oranlarını artırdığı görülmüştür (Pereira ve ark., 2007). Linoleik asidin, dondurma-çözündürme sonrası serum içeren kültür medyumlarına ilavesi sonrası, morula aşamasındaki embriyoların gelişim oranlarının arttığı görülmüştür (Hochi ve ark., 1999).

Linoleik asit, hem normal memeli sağlığı ve gelişimi için gerekli hem de metabolizma için antioksidan özellik göstermektedir. Poliansature yağ asitlerinin etkileri hücreden hücreye farklılık göstermektedir (Wang ve ark., 2009). Kültüre edilen endotel hücrelerinde, linoleik asit; süperoksit ve nitrik oksit ürünlerini ortaya çıkarırken, hücre içi kalsiyum miktarını artırır (Saraswathi ve ark., 2004). Tam aksine, insülin salgılayan hücre hatlarında ve birincil normal insan fibroblastlarında, linoleik asit; oksidatif strese karşı hücreleri korumaktadır (Beeharry ve ark., 2003; Beeharry ve ark., 2004).

In vitro embriyo morfolojik ve fizyolojik özellikleri bakımından canlı hayvanlardan elde edilen *in vivo* embriyolardan oldukça farklıdır (Gaja ve ark., 2010). Bundan dolayı araştırmacılar *in vitro* kültür ortamlarını zenginleştirmek ve eksiklerini gidermek amacıyla bu ortamlara; amino asitler (Wirtu ve ark., 2004), hormonlar (Kreeger ve ark., 2005), karbonhidratlar (Wirtu ve ark., 2004) ve yağ asitleri (Hochi ve ark., 1999) ilave etmişlerdir.

Gerekli ortamı sağlayamayan ve kusurlu embriyo oluşturan yetersiz kültür, *in vitro* embriyo üretiminin başarısını azaltmaktadır. Embriyonun zayıf yaşama kabiliyeti, düşük gebelik oranları ile sonuçlanmakta ve *in vitro* üretilen sığır

embriyolarının kullanım alanını daraltmaktadır (Enright ve ark., 2000). *In vitro* embriyo üretiminde, serum veya sentetik polimerleri içeren kültür medyumları ile ortaya çıkan tutarsız sonuçlar, bu maddelere alternatif yeni maddelerin ortama ilavesinin gerektiğini ortaya koymaktadır (Khurano ve Niemann, 2000).

Yapılan referans taramasında *in vitro* embriyo bölünme ve gelişimi üzerine oleik ve linoleik asidin karşılaştırmalı etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya ulaşılamamış olup ancak bazı araştırmacılar, linoleik asit-albümin' in (LAA) *in vitro* embriyo gelişimi ve bölünme oranları üzerine etkisini incelemişlerdir (Hochi ve ark., 1999; Tominaga ve ark., 2000). Tominaga ve ark. (2000) oositlerin spermayla muamelesinden sonraki 72. saatte gelişen embriyoları, LAA katılan ve katılmayan CR1aa kültür medyumunda 4 gün süreyle kültüre etmişlerdir. Elde edilen embriyolar dondurulmuş ve dondurma sonrası embriyolar kültür ortamına alınarak yaşama oranları karşılaştırılmıştır. LAA katılan grubun dondurulup çözündürüldükten sonra LAA katılmayan kontrol grubuna göre daha iyi gelişme oranı elde edildiği görülmüştür.

Yapılan literatür taramalarında, kültür medyumlarına katılan yağ asitlerinin embriyo üzerine etkinlikleri konusunda yeterli çalışmanın olmadığı tespit edilmiş, bu nedenle mevcut çalışmada, uçucu yağ asitlerinden oleik ve linoleik asidin, *in vitro* ortamda sığır embriyo gelişimi ve kalitesine etkileri çalışılarak bu konudaki boşluğun doldurulması amaçlanmıştır. Bu çalışmada, yağ asitlerinden oleik asit ve linoleik asidin sığır embriyolarının *in vitro* gelişimi üzerine etkilerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Yapılan bu çalışma oleik ve linoleik asidin embriyo bölünme ve embriyo gelişim üzerine etkilerinin beraberce araştırıldığı ilk çalışma olması bakımından önemlidir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Madde ve Medyumlar

1. Sodyum klorür (SIGMA S5886)
2. Kanamisin sülfat (VETAŞ, Kanovet)
3. KCl (SIGMA P5405)
4. KH_2PO_4 (SIGMA P5655)
5. Na_2HPO_4 (FLUKO 71505)
6. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA M2393)
7. CaCl_2 (SIGMA C7902)
8. Na Piruvat (SIGMA P4562)
9. Glukoz (SIGMA G6152)
10. Sığır serum albumini (SIGMA A7030)
11. Penisilin-streptomisin (PAA P11-010)
12. TCM-199 (GIBCO12340-030)
13. Fötal buzağı serumu (SIGMA F9665)
14. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA C7902)
15. Fenol kırmızısı (SIGMA P0290)
16. NaHCO_3 (SIGMA S5761)
17. 0.22 μm enjektör filtresi (MILLIPORE, Ireland)
18. Kafein (SIGMA C4144)
19. Heparin (Nevparin 5000 iu/mL, Mustafa Nevzat)
20. Hemikalsiyum laktat (SIGMA L2000)
21. BME (SIGMA B6766)
22. MEM (SIGMA M7145)
23. Linoleik asit (SIGMA L9530)
24. Oleik asit (SIGMA O1008)

2.1.1. Ovaryum Taşıma Solüsyonu

Mezbahadan alınan ovaryumların laboratuvara getirilmesi için % 0,9'luk NaCl solüsyonu hazırlandı. Bunun için 90 g NaCl hassas terazide tartılıp, ultra saf suyla (1000 mL) çözdürüldü. Mezbahaya gidileceği zaman solüsyondan 300 mL alınarak ultra saf suyla 3 litreye tamamlandı ve içerisine 125 mg/L kanamisin sülfat ilavesi yapıldı. Hazırlanan solüsyon, 37°C benmariye kaldırıldı.

2.1.2. Oosit Toplama ve Yıkama Solüsyonu

Elde edilen oositlerin toplanması ve yıkanması amacıyla Dulbecco'nun modifiye fosfat tampon solüsyonu (D-PBS) (Çizelge 2.1) kullanıldı. Mineral tuzlar ana solüsyona hızla katıldığında oluşan bulanıklığı önlemek için mineral tuzlar, önce başka bir kaba konan ultra saf su içerisinde eritildi. Ardından mineral tuzların oluşturduğu bu solüsyon, dört beş defada ve yavaş yavaş ana solüsyona ilave edildi.

Çizelge 2.1. D-PBS solüsyonunun hazırlanması.

Kimyasal Madde	Miktarı g/L	
NaCl	8,00	D-PBS
KCl	0,20	
KH ₂ PO ₄	0,20	
Na ₂ HPO ₄	1,15	
MgCl ₂ 6H ₂ O*	0,10	
CaCl ₂ *	0,10	
Na Piruvat	0,036	
Glukoz	1,00	
BSA	3,00	
Penisilin	100,000IU	
Streptomisin	0,10	

*Mineral Tuzlar.

2.1.3. İn Vitro Maturasyon Solüsyonu

Solüsyonlar büyük oranda, Enstitü bünyesinde bulunan Embriyo Transferi Laboratuvarında hazırlandı. Oositlerin maturasyonu amacıyla %10 FCS+2µg/mL FSH katkılı TCM-199 medyumunu kullanılmıştır. TCM-199 medyumunun içeriği Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. TCM-199 medyumunu hazırlanması.

Kimyasal Madde	Miktarı
TCM-199	45 mL
FCS	5 mL
FSH*	5 µl
Penisilin-Streptomisin	50 µl

*2 µg/ML

2.1.4. İn Vitro Fertilizasyon Solüsyonu

Oositlerin fertilizasyonu amacıyla Bracket&Oliphant medyumunu ve dondurulmuş eşit motiliteye sahip boğa spermaları ile direkt sperm yıkama metodu kullanılmıştır. Bütün kültür periyotlarında %5 CO₂, %95’in üzerinde nem içeren 38,5°C’deki inkübatörden yararlanılmıştır. Uzun süre muhafaza edilemediği için BO medyumunu stok A ve stok B solüsyonları şeklinde hazırlandı. Stok A ve stok ve B solüsyonları buzdolabında +4 °C de bir ay boyunca muhafaza edilerek kullanıldı. Bu solüsyonların içeriği Çizelge 2.3 ve 2.4 de verilmiştir.

Çizelge 2.3. BO stok A solüsyonu hazırlanması.

Kimyasal Madde	Miktarı	Açıklama
NaCl	4,3092 g	
KCl	0,1974 g	
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,2171 g	
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	0,0840 g	Yazılı miktarların 10 katı tartılarak 10 mL’ye tamamlanıp bundan 1 mL kullanıldı.
MgCl ₂ 6H ₂ O	0,0697 g	
Fenol Kırmızısı**	100 µL	%0,5 solüsyon
	Ultra saf su ile 500 mL ye tamamlandı.	

** 0,005 g tartılıp USS ile 1 mL’ye tamamlandı.

Stok A solüsyonu hazırlanırken 500 mL’lik mezüre öncelikle 100 mL ultra saf su eklendi. NaCl, KCl ve CaCl₂H₂O yavaş yavaş solüsyona ilave edilerek karıştırıldı. Mineral tuzlar olan NaH₂PO₄2H₂O ve MgCl₂6H₂O ise normal katılacak miktarlarının 10 katı tartılarak 15 mL’lik mezüre kondu ve ultra saf su ile 10 mL’ye tamamlandı. Bu solüsyondan 1 mL alınarak yavaş bir şekilde dairesel hareketlerle çalkalanarak ana solüsyona ilave edildi. Kimyasal maddelerin tamamı katıldıktan sonra solüsyon, ultra saf su ile 500 mL’ye tamamlandı.

Çizelge 2.4. BO Stok B solüsyonu hazırlanması.

Kimyasal Madde	Miktarı	Açıklama
NaHCO ₃	2,5873 g	
Fenol Kırmızısı**	40 µL	%0,5 solüsyon
	Kullanılacak kadarı alınıp CO ₂ ile muamele edildi.	
	Ultra saf su ile 200 mL ye tamamlandı.	

** 0,005 g tartılıp USS ile 1 mL’ye tamamlandı.

Stok B solüsyonu hazırlanırken 250 mL’lik mezüre öncelikle 100 mL ultra saf su kondu. Bunun içerisine NaHCO₃ ve fenol kırmızısı ilave edildi. Kimyasal maddelerin tamamı katıldıktan sonra ultra saf su ile 200 mL’ye tamamlandı. Bu solüsyon kullanımı öncesi sarı renge dönüşünceye kadar CO₂ ile muamele edildi. BO stok solüsyonlarının yapılmasının ardından BO solüsyonu hazırlandı (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.5. BO solüsyonu hazırlanması

Kimyasal Madde	Miktarı
STOK-A	76 mL
Na Pirüvat	0,01375 g
Antibiyotik*	100 µL
STOK-B	24 mL

* 100 IU/mL Penisilin + 100 µg/mL streptomisin.

BO solüsyonu hazırlandıktan sonra stoklanmamış ve hazırlandığı gün kullanılmıştır (Çizelge 2.5). BO solüsyonunun hazırlanmasının ardından oosit yıkama solüsyonu (OWS), sperm sulandırma solüsyonu (SDS) ve sperm yıkama

solüsyonu (SWS) hazırlandı (Çizelge 2.6, 2.7 ve 2.8). Bu solüsyonlar, hazırlandıktan sonra 0,22 µm çapa sahip filtreler yardımıyla filtre edildi.

Çizelge 2.6. OWS (oosit yıkama solüsyonu).

Kimyasal Madde	Miktarı
BO Medyum	40 mL
BSA	0,40 g

Çizelge 2.7. SDS (sperm sulandırma solüsyonu).

Kimyasal Madde	Miktarı
BO Medyum	10 mL
BSA	0,20 g

Çizelge 2.8. SWS (sperm yıkama solüsyonu).

Kimyasal Madde	Miktarı	Açıklama
BO Medyum	50 mL	
Kafein	0,1942 g	
Heparin*	50 µL	5000 U/mL stoktan

* 5 U/mL SWS olacak şekilde katıldı.

2.1.5. İn Vitro Kültür Solüsyonu

Sperma ile fertilizasyona tabi tutulan oositler, bu sürenin sonunda, CR1aa kültür ortamında gelişmeye bırakıldılar. CR1aa kültür solüsyonunun yapımı için önce, stok A ve stok B solüsyonları hazırlanmıştır (Çizelge 2.9 ve 2.10). CR1aa stok A solüsyonu için öncelikle 500 mL'lik mezüre 100 mL ultra saf su kondu. Bütün kimyasal maddeler sırayla tartılarak bu suya ilave edildi ve yavaş yavaş erimleri sağlandı. Ardından solüsyon ultra saf su ile 380 mL'ye tamamlandı. CR1aa stok B solüsyonu için 100 mL'lik mezüre 25 mL ultra saf su kondu ve tartılan hemikalsiyum laktat ultra saf su içerisinde eritildi. Daha sonra, solüsyon ultra saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Çizelge 2.9. CR1aa stok A solüsyonu hazırlanması.

Kimyasal Madde	Miktarı	Açıklama
NaCl	3,3515 g	
KCl	0,1155 g	
Na Piruvat	0,0220 g	
NaHCO ₃	1,1005 g	
Fenol Kırmızısı*	1 mL	%0,5 solüsyon
	380 mL'ye tamamlandı	

*0,01 g tartılıp USS ile 2 mL'ye tamamlandı.

Çizelge 2.10. CR1aa stok B solüsyonu hazırlanması.

Kimyasal Madde	Miktarı
Hemikalsiyum laktat	0,2998 g
	100 mL'ye tamamlandı

Çizelge 2.11. CR1aa solüsyonu hazırlanması.

Kimyasal Madde	Miktarı (75 mL için)
Stok A	57 mL
Stok B	15 mL
BME	1,5 mL
MEM	0,75 mL
L-Glutamin*	0,75 mL
BSA	0,225 g
Antibiyotik**	75 µL
FCS (%5)***	3,75 mL
Filtrasyon	

* L-Glutamin 0,01 g tartılıp 5 mL. tamamlandı.

** 100 IU/mL Penisilin + 100 µg/mL streptomisin.

*** FCS katılmadan önce aynı miktar medyum uzaklaştırıldı.

CR1aa stok solüsyonlarının yapılmasının ardından sperma muamelesinin yapılacağı gün CR1aa kültür solüsyonu hazırlandı (Çizelge 2.11). CR1aa kültür solüsyonunun hazırlanması sırasında CR1aa stok A ve stok B solüsyonları 100 mL'lik mezüre Çizelge 2.11'de verilen miktarları eklendi. Bu karışımın üzerine 1,5 mL beta merkaptto etanol (BME) ve 0,75 mL non essential amino acid (MEM) ilavesi yapıldı. BSA solüsyona ilave edilip yavaş yavaş eriyerek solüsyona karışımı

sağlandı. Fötal buzağı serumu ilavesi yapılmadan önce, aynı miktarda solüsyon uzaklaştırılarak solüsyon içerisine FCS ilavesi yapıldı. Fötal buzağı serumu ilavesinden sonra solüsyon filtre edilerek kültür için mikro damlalar hazırlandı.

2.2. Ovaryumların Toplanması

Ankara ili Çubuk ilçesinde bulunan özel bir mezbahadan toplanan ovaryumlar, 25-30°C'deki %0,9'luk serum fizyolojik ortamında, azami iki saat içerisinde, laboratuvara ulaştırıldı. Ovaryumlar, hayvanların kesimini takip eden 15-20 dakikalık süre içerisinde, taze taşıma solüsyonu ile yıkanarak taşıma ortamına alındı (Hamano ve ark., 1992).

2.3. Oosit Toplanması ve Değerlendirilmesi

Laboratuvara getirilen ovaryumların yüzeyinde bulunan 2-8 mm çapa sahip folliküllerin aspirasyon işlemi literatürde belirtilen şekilde (Kızıl ve ark., 2011) gerçekleştirildi. Aspirasyon yöntemiyle elde edilen oositler, 90 mm' lik tabanı çizgili petrilere alındı.

Oositlerin seçimi ve kalite değerlendirmesi literatüre (Brackett ve Zuelka, 1993) göre yapıldı. Fosfat tamponlu solüsyon içerisine toplanan oositlerin seçimi stereo mikroskop altında yapıldı. Elde edilen oositlerden kalite sınıflandırmasına göre yalnız A ve B kalite sınıfına giren oositler maturasyon sürecine alındı.

2.4. Oositlerin İn Vitro Maturasyonu

Oositlerin maturasyonu amacıyla TCM-199 medyumu kullanıldı. Oositlerin *in vitro* maturasyon işlemi, %5 CO₂, %95'in üzerinde nem içeren 38,5°C ısıya sahip inkübatörde, 20-22 saatte gerçekleştirildi. Oositler 20-22 saatlik inkübasyon periyodunun ardından, stereo mikroskop altında incelendi ve kumulus ekspansiyonu görülen oositler mature olmuş oosit olarak kabul edildiler (Takagi ve ark., 1992).

2.5. Spermatozoon Hazırlanması ve İn Vitro Kapasitasyonu

İn vitro fertilizasyon işleminde Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Suni Tohumlama Laboratuvarında üretilen ve içerisinde 175×10^5 spermatozoon bulunan, 0,25 mL'lik ticari payetlerde dondurulmuş Holstein Fresian ırkı boğa spermaları kullanıldı. *İn vitro* fertilizasyonda farklılığa meydan vermemek için, bir boğadan aynı gün alınarak dondurulan, eşdeğer motiliteye sahip spermalar fertilizasyon amacıyla tercih edildi. Spermaların kapasitasyonu işleminde BO medyumu kullanıldı. Kapasitasyon işlemleri ve uygun spermatozoon yoğunluğunun elde edilmesinde, Kanagawa ve ark. (1995)'nin önerdiği yönteme göre hazırlanan fertilizasyon vasatı kullanıldı.

Oosit yıkama solüsyonundan 35 mm çapındaki petri kutuları içerisine 5 µL'lik dörder adet mikro damlalar hazırlandı. Ardından mikro damlaların üzerine, 4 mL mineral yağ ilavesi yapılarak fertilizasyon damlacıkları hazırlandı. Ayrıca, dört adet petri içerisine oosit yıkama solüsyonundan 2,5 mL kondu ve üzerine 2 mL mineral yağ ilavesi yapıldı. Hazırlanan bu damlacıklar inkübatöre kaldırıldı.

Oositlere her bir oosit başına 25000 kadar spermatozoon düşecek şekilde sperma muamelesi yapıldı. Öncelikle dondurulmuş-çözdürülmüş spermaların etrafındaki kriyoprotektanların uzaklaştırılmasında kullanım amacıyla sperma yıkama solüsyonu (BO solüsyon + 10 mM kafein + 4 U/mL heparin) hazırlandı. Beş adet sperma payeti 37°C'deki su içerisinde bir dakika bekletilerek çözdürüldü. Çözdürülen spermalar, 15 mL'lik santrifüj tüpleri içerisine boşaltıldı. Bu spermaların üzerine 6 mL sperm yıkama solüsyonu ilave edilerek, 1800 rpm devirde 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra çıkarılan tüplerin içerisinde, sifonlama yöntemi ile süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Santrifüj işlemi bir kez daha tekrar edildi. Süpernatant kısmı ikinci kez uzaklaştırıldıktan sonra tüpe 1,1 mL sperm yıkama solüsyonu ilave edildi. Spermatozoonların sayımı amacıyla bir tüp içerisine, 4950 µL %5 NaCl solüsyonu ilave edildi. Bu solüsyonun üzerine, içinde spermaları bulduran solüsyondan 50 µL ilave edildi. Spermatozoonların bulunduğu solüsyon vorteks yardımıyla karıştırıldı. Spermatozoonların yoğunluğu, thoma lamında, iki büyük karede sayılarak tespit edildi. Oosit başına 25000 kadar spermatozoon düşecek şekilde sperma yıkama solüsyonuna sperma dilüsyon solüsyonundan gerekli hesaplamalar doğrultusunda ilaveleri yapıldı. Hazırlanmış olan bu solüsyonundan

daha önceden oosit yıkama solüsyonundan hazırlanmış olan 5 µL'lik damlalar üzerine, 95 µL ilave edilerek tekrar inkübatöre yerleştirildi. Elde edilen oositler, oosit yıkama vasatı içerisinde yıkandıktan sonra, her bir damlanın içerisinde ortalama 18'er adet oosit bırakıldı. Hazırlanan numune fertilizasyonun gerçekleşmesi için 5-6 saat süreyle inkübatöre kaldırıldı.

2.6. İn Vitro Kültür

İn vitro fertilizasyonun ardından, oositlerin etrafını saran kumulus hücreleri, pipetleme işlemiyle kısa sürede (10-15 dakika) uzaklaştırıldı (Kanagawa ve ark., 1995). Kumulus hücreleri uzaklaştırılan ve fertilize olan oositler 3 gruba ayrıldı. Birinci grup linoleik asidin 10, 100 ve 1000 µM dozlarını ihtiva eden CR1aa kültür droplarına alındı. İkinci grup oleik asidin 10, 100 ve 1000 µM dozlarını ihtiva eden CR1aa kültür droplarına alındı. Son grup ise kontrol grubu olarak kullanılarak herhangi bir ilave yapılmadan CR1aa kültür droplarının içerisinde alındı. Her 100 µL damla içerisinde ortalama 18'er adet fertilizasyona tabi tutulmuş oositler konuldu. Bunlar kültüre edilerek iki deneme ve bir kontrol grubu oluşturuldu.

2.7. Gelişen Embriyoların Değerlendirilmesi

Embriyoların ilk gelişme kontrolleri inkübasyonun 48. saatinde, bölünmelerinin kontrolü amacıyla yapıldı. Embriyoların bölünüp bölünmedikleri, bölünmüş ise kaç hücreli oldukları stereo mikroskop altında incelendi. Bölünme kontrolü sırasında embriyoların pozisyonları değiştirilerek, bölünmüş bütün embriyoların gözlenmesi sağlandı. Kültürün yedinci gününde, morula-blastosiste ulaşma oranları bakımından embriyoların kontrolleri tekrar yapıldı.

2.8. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada her bir grup için toplam 9 tekrar yapıldı. İstatistiksel değerlendirme açısından çalışmada, her bir grup başına 100'den fazla oosit kullanıldı. Elde edilen sonuçların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında ki-kare testi uygulandı.

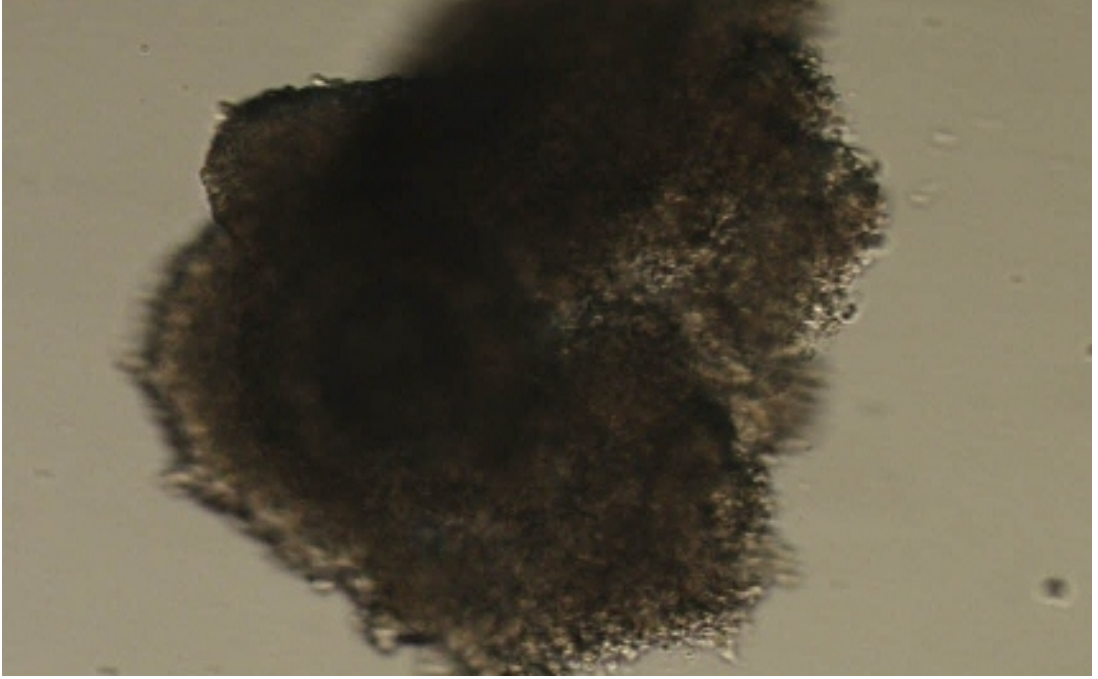
3. BULGULAR

Yapılan çalışmada uygun şartlar altında mezbahadan getirilen toplam 198 adet ovaryum kullanıldı. Getirilen bu ovaryumlardan toplam 1304 adet oosit elde edildi. Ovaryum başına ortalama 6,59 adet oosit elde edildi. Bu oositlerin 1124 adedi A+B kalitede, 92 adedi C kalitede, 88 adet dejenere durumdaydı. Ovaryum başına ortalama, 5,68 adet A+B kalite, 0,46 adet C kalite, 0,44 adet dejenere oosit elde edilmiş oldu.

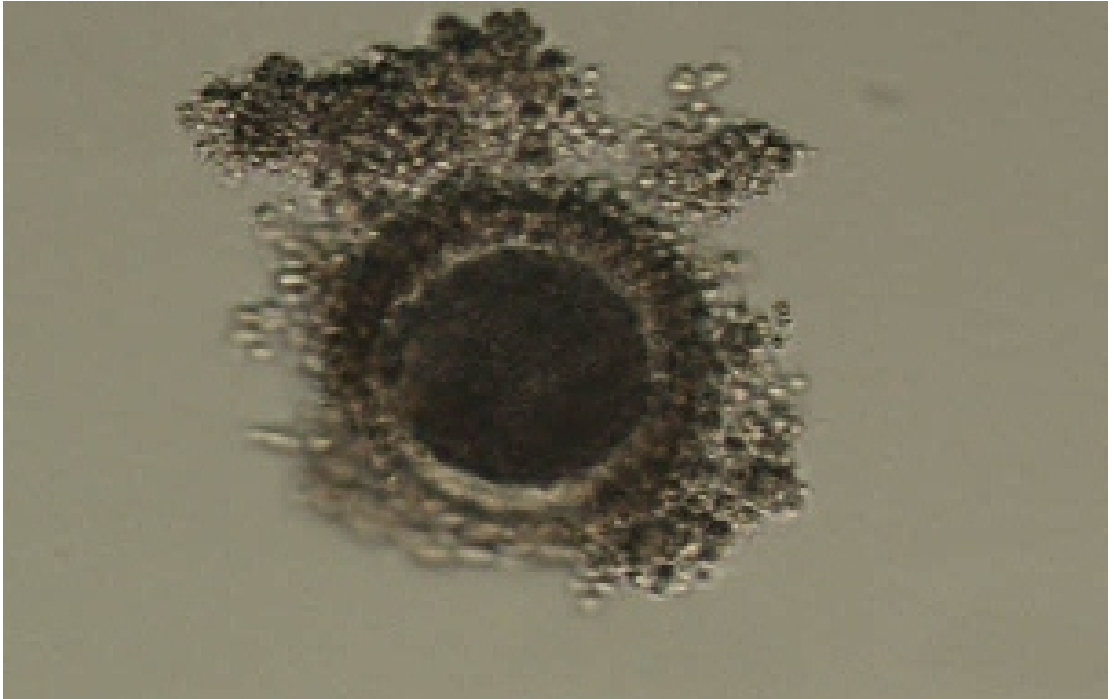
Ovaryumlardan elde edilen oositlerin morfolojik değerlendirmeleri yapıldı. A kalitedeki oositler seçilirken, en az 4 veya daha fazla sayıda kumulus hücre sırasına, kumulus hücrelerinin oositi sıkıca çevrelemelerine ve oositlerin homojen yapıda bir plazmaya sahip olmalarına dikkat edildi (Şekil 3.1). B kaliteye sahip oositlerin ise birkaç sıra kumulus hücrelerine sahip olması, A kalite oositlere göre daha gevşek bir yapıda olması ve ooplazmalarının koyu granüller içermesine dikkat edildi (Şekil 3.2). Etrafında kumulus hücresi olmayan oositler C kalite olarak değerlendirildi (Şekil 3.3). Kumulus hücrelerinin yapılarının bozulduğu belirlenen oositler, dejenere olarak kabul edildi (Şekil 3.4). A+B kaliteye sahip olan 1124 adet oosit, embriyo elde edilme sürecine dâhil edildi. Bu oositlerden 443 adedi linoleik grubu, 464 adedi oleik grubu ve 151 adedi ise kontrol grubu için kullanıldı (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Elde edilen ovaryum ve oositler.

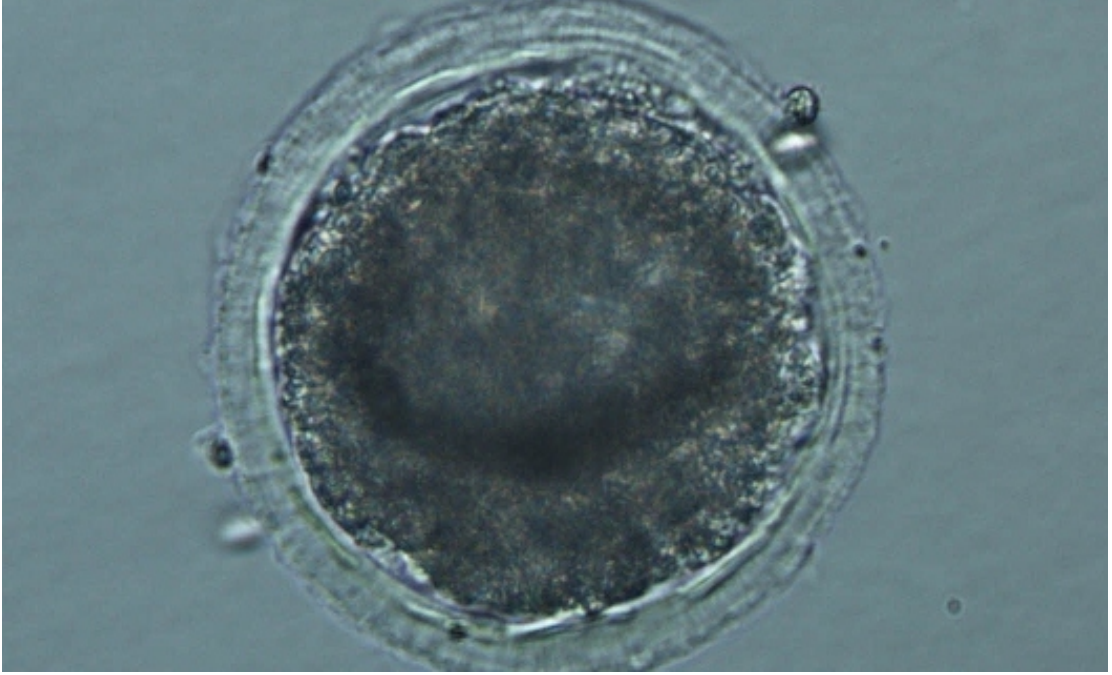
	Elde edilen toplam sayı	Ovaryum başına oosit sayısı
Ovaryum sayısı	198	
A+B kalite oosit	1124	5,68
C kalite oosit	92	0,46
Dejenere oosit	88	0,44
Genel	1304	6,59



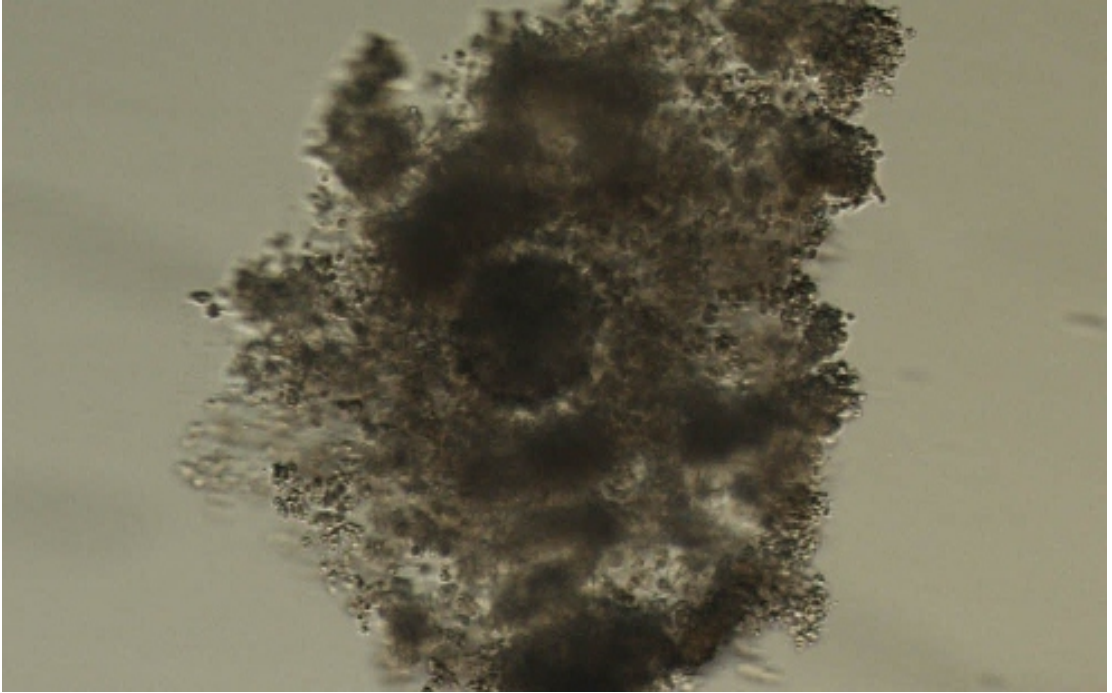
Şekil 3.1. A kalite oosit (X100)



Şekil 3.2. B kalite oosit (X100)



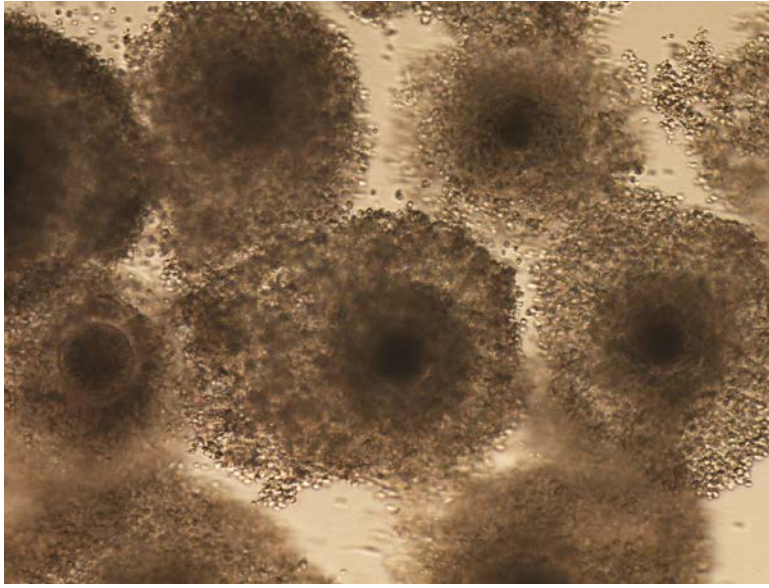
Şekil 3.3. C kalite oosit (X100)



Şekil 3.4. Dejenere oosit (X100)

3.1. İn Vitro Maturasyon Bulguları

Maturasyona alınan 1124 adet oositten 1058 adedinin mature olduğu tespit edildi (Şekil 3.5). Böylece maturasyon oranı %94,13 olarak gerçekleşmiş oldu. Maturasyon sürecine alınan oositlerden 44 adedinin dejenere olduğu gözlemlendi. Dejenerasyon oranı %3,91 olarak gerçekleşmiş oldu. Diğer 22 adet oositte ise maturasyon bulgusu gözlenmedi. Maturasyon bulgusu gözlenmeyen oositlerin oranı %1,96 olarak gerçekleşmiş oldu (Çizelge 3.2).



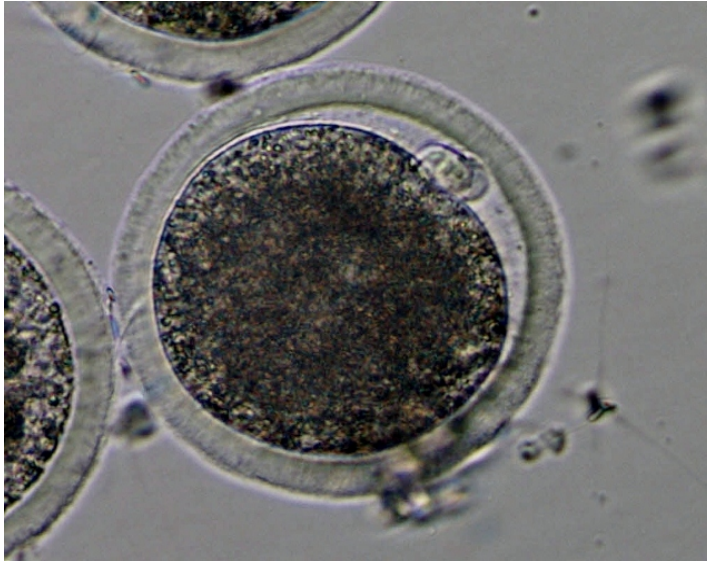
Şekil 3.5. Mature olmuş oositler (X100)

Çizelge 3.2. Maturasyon ve dejenerasyon sonuçları.

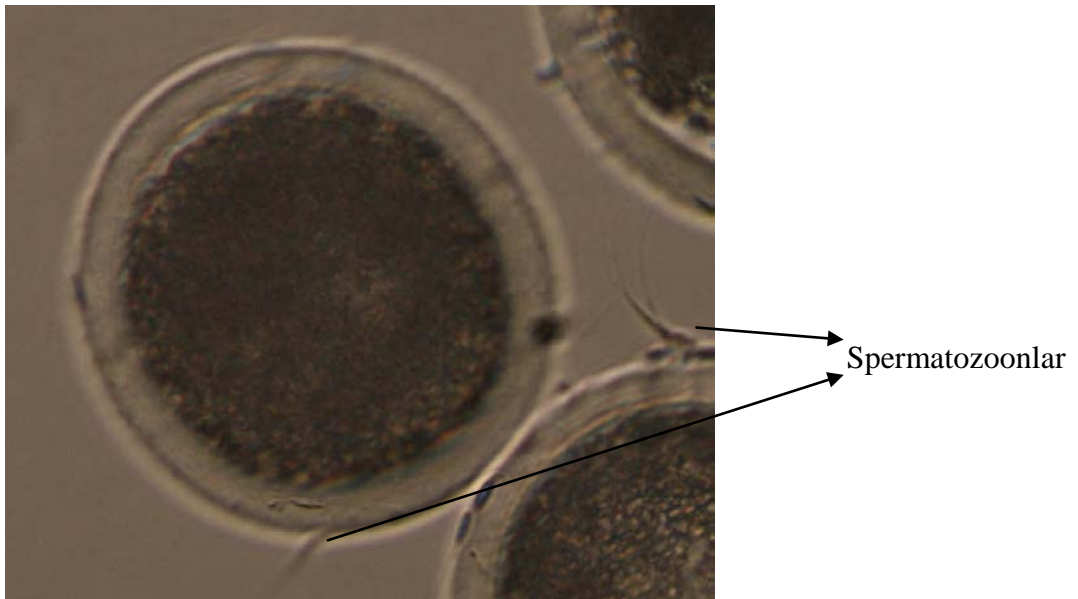
PARAMETRE	
Maturasyona alınan oosit sayısı	1124
Mature olan oosit sayısı	1058
Maturasyon oranı	%94,13
Dejenere olan oosit sayısı	44
Dejenerasyon oranı	%3,91
Mature olmayan oosit sayısı	22
Mature olmayan oosit oranı	%1,96

3.2. İn Vitro Fertilizasyon Bulguları

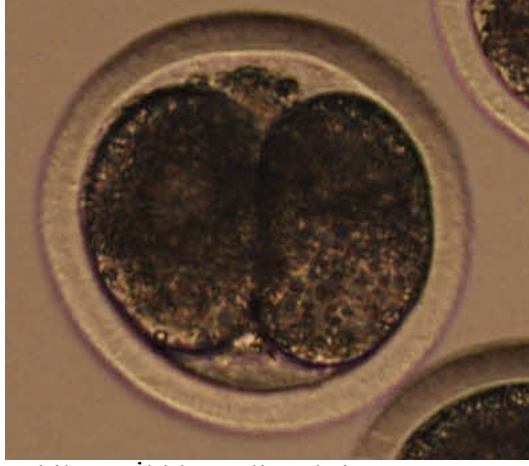
Mature olan 1058 adet oosit fertilizasyon sürecine alındı (Şekil 3.7). Yaklaşık olarak 5-6 saatlik bir fertilizasyon periyodunun ardından bazı oositlerde 2. polar cismin varlığı tespit edildi (Şekil 3.6). Embriyoların fertilizasyon kültürüne alınışından itibaren 48. saatten sonra yapılan mikroskobik incelemelerde, iki ya da daha çok sayıda bölünme gösteren 641 adet oositin fertilize oldukları kabul edildi (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).



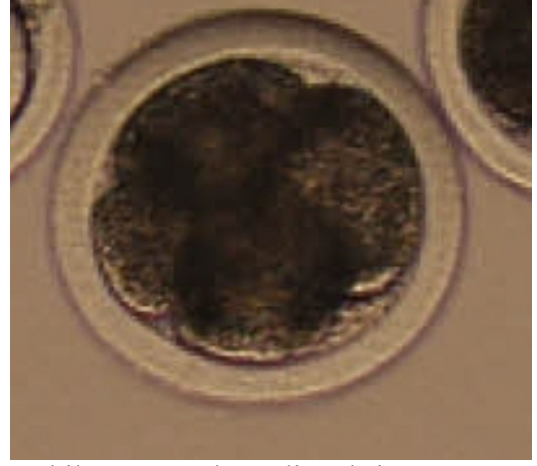
Şekil 3.6. Çift polar cismi atılmış fertilize oosit (X200)



Şekil 3.7. İn vitro fertilizasyon anı (zona pellusida penetrasyonu) (X200)



Şekil 3.8. İki hücreli embriyo (X100)



Şekil 3.9. Dört hücreli embriyo (X100)

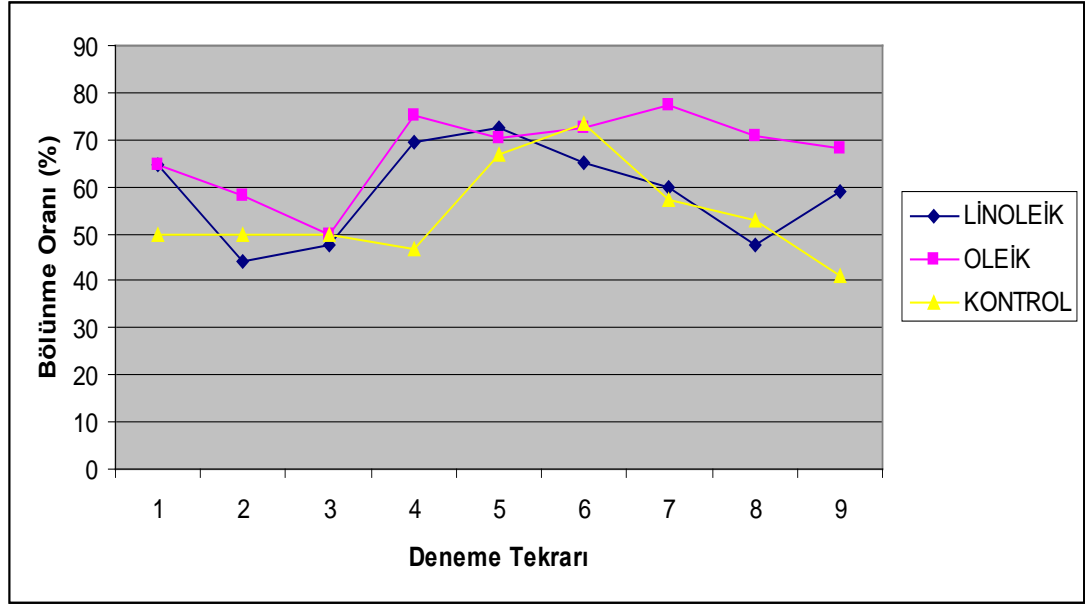
3.3. Kırk Sekizinci Saatte Bölünme Bulguları

Linoleik asit çalışma grubunda, inkübasyonun 48. saat kontrolünde, fertilizasyon aşaması sonrasında kültüre alınan 443 adet oositten 253 (%57,11) adet oositin bölünmüş olduğu tespit edildi (Çizelge 3.3). Oleik asit çalışma grubunda ise kültüre alınan 464 adet oositten 307 (%66,16) adedinin bölünmüş olduğu görüldü. Kontrol grubunda ise kültüre alınan 151 adet oositten 81 (%53,64) adedinin bölündüğü belirlendi (Şekil 3.10).

Çizelge 3.3. Deneme gruplarında bulunan 48. saat bölünme sonuçları.

ÖZELLİK				
Kültür medyumuna katılan deneme grupları	Linoleik	Oleik	Kontrol	GENEL
Tekrar sayısı	9	9	9	9
Kültüre alınan oosit (n)	443	464	151	1058
Bölünen oosit (n)	253	307	81	641
Bölünme oranı (%)	57,11 ^b	66,16 ^a	53,64 ^b	60,57

a,b, Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler birbirinden istatistiksel olarak farklıdır p<0,01.



Şekil 3.10. Linoleik, oleik ve kontrol gruplarında deneme tekrarlarına göre 48. saat genel bölünme bulguları.

İnkübasyonun 48. saat kontrollerinde linoleik asidin 10, 100 ve 1000 mikromollük dozlarının kullanıldığı Grup 1’de sırasıyla %62,59, %50,00 ve %58,55 oranlarında bölünme bulguları elde edilmiş olup grup içi karşılaştırmada, bölünme oranları açısından istatistiksel önemle bir fark olmadığı ($p > 0,05$) tespit (Çizelge 3.4).

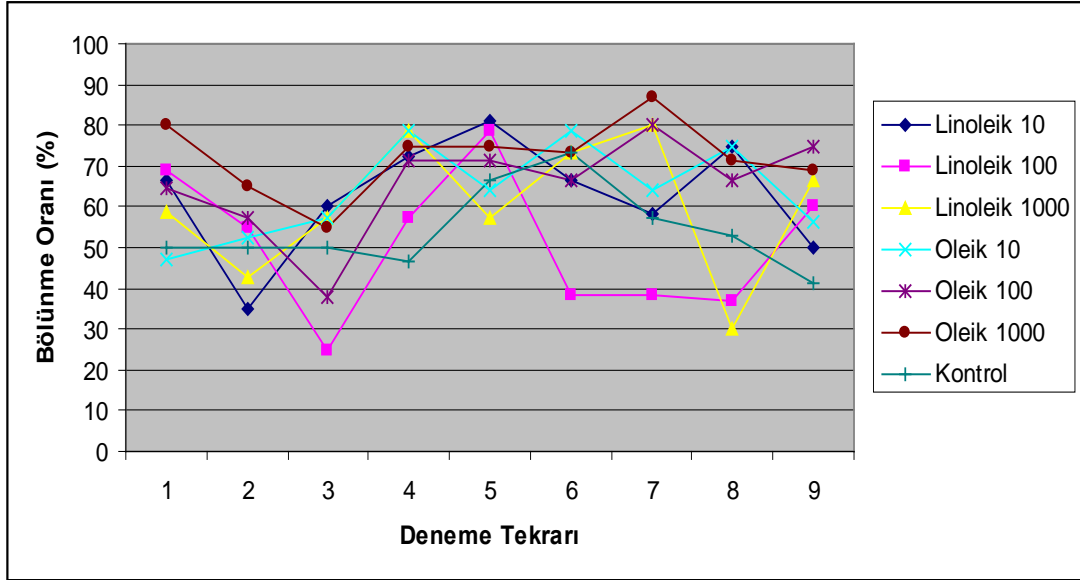
Çizelge 3.4. Linoleik ve oleik katkılı deneme gruplarında bulunan 48. saat bölünme sonuçları.

ÖZELLİK				
Kültür medyumuna katılan deneme grupları miktarı μM	Tekrar sayısı	Kültüre alınan oosit sayısı (n)	Bölünen oosit sayısı (n)	Bölünme oranı (%)
Linoleik 10	9	147	92	62,59(92/147) ^{ab}
Linoleik 100	9	144	72	50,00(72/144) ^c
Linoleik 1000	9	152	89	58,55(89/152) ^{bc}
Oleik 10	9	151	94	62,25(94/151) ^{ab}
Oleik 100	9	154	99	64,29(99/154) ^{ab}
Oleik 1000	9	159	114	71,70(114/159) ^a
Kontrol	9	151	81	53,64(81/151) ^{bc}

a,b,c, Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler birbirinden istatistiksel olarak farklıdır $p < 0,01$.

Yine aynı dönem kontrollerinde ise oleik asidin 10, 100 ve 1000 mikromollük dozlarının kullanıldığı Grup 2’de sırasıyla %62,25, %64,29 ve %71,70

oranlarında bölünme bulguları elde edilmiş olup, grup içi karşılaştırmada bölünme oranları açısından önemli bir fark olmadığı ($p > 0,05$) tespit edildi (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Linoleik, oleik ve kontrol gruplarında deneme tekrarlarına göre 48. saat bölünme bulguları.

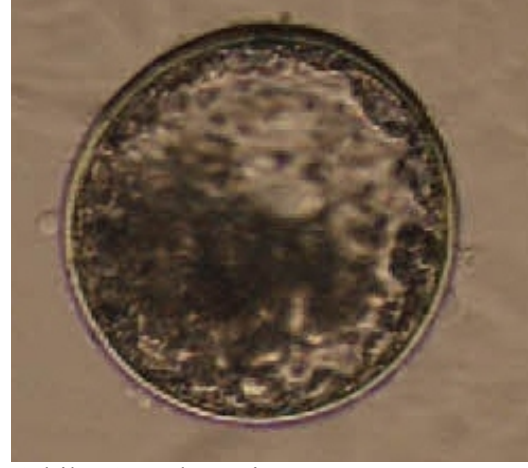
Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada; CR1aa kültür medyumuna katılan oleik asit (1000 μ M) grubunun kontrol grubuna kıyasla bölünmüş embriyo oranında artışlara yol açtığı tespit edildi ($p < 0,01$). CR1aa kültür medyumuna katılan oleik asit (1000 μ M) grubunda diğer deneme gruplarına göre en yüksek bölünme oranı görüldü. CR1aa kültür medyumuna katılan linoleik asit (100 μ M) grubunun da diğer deneme gruplarına göre en düşük bölünme oranı sağladığı tespit edildi.

3.4. Morula-Blastosist Olma Bulguları

Fertilize oositlerin embriyo kültür sürecine alınmalarını takip eden 168. saatte yapılan mikroskopik incelemelerinde, morula-blastosist aşamasına gelen embriyolar ve gelişme oranları kayıt altına alındı (Şekil 3.12 ve 3.13).



Şekil 3.12. Morula aşaması (X100)



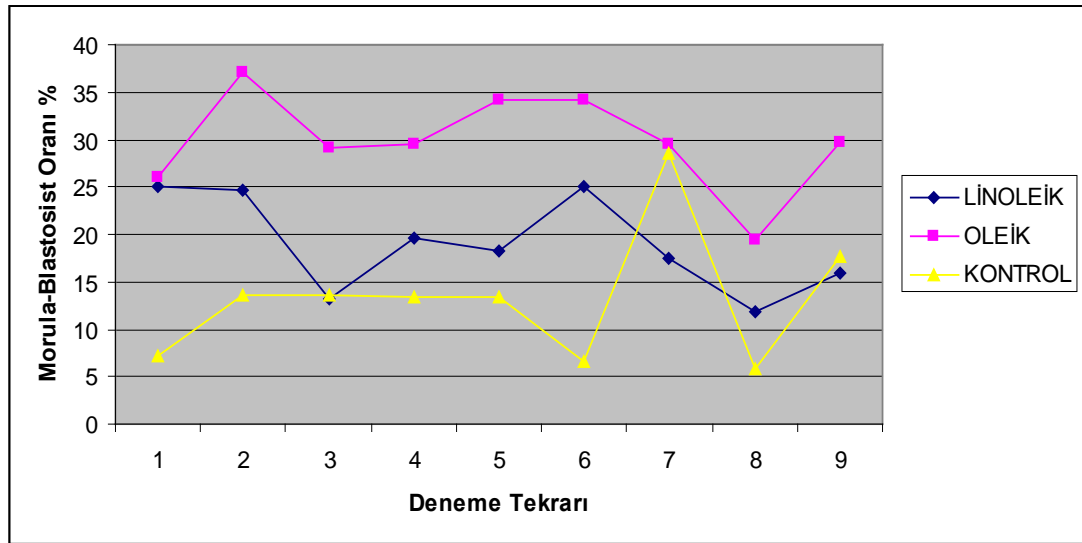
Şekil 3.13. Blastosist aşaması (X100)

Linoleik çalışma grubunda kültüre alınan 443 adet embriyodan 83 adet morula-blastosist elde edildi. Morula-blastosiste ulaşma oranı %18,74 olarak tespit edildi. Oleik çalışma grubunda kültüre alınan 464 adet embriyodan 137 adedinin morula-blastosist aşamasına ulaşmış olduğu ve morula-blastosist oranının %29,53 olarak gerçekleştiği görüldü. Kontrol grubunda kültüre alınan 151 adet embriyodan 20 adedi morula-blastosist aşamasına ulaştı ve morula-blastosist oranı %13,25 olarak gerçekleşti (Çizelge 3.5). Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada; CR1aa kültür medyumuna katılan oleik asidin kontrol ve linoleik asit gruplarına göre morula-blastosiste ulaşma oranı açısından önemli düzeyde artış ($p<0,001$) sağladığı tespit edildi (Şekil 3.14).

Çizelge 3.5. Deneme gruplarında bulunan morula-blastosist sonuçları.

ÖZELLİK				
Kültür medyumuna katılan deneme grupları	Linoleik	Oleik	Kontrol	GENEL
Tekrar sayısı	9	9	9	27
Kültüre alınan oosit sayısı(n)	443	464	151	1058
Morula-blastosist sayısı(n)	83	137	20	240
Kültüre alınan oositten morula-blastosist oranı (%)	18,74(83/443) ^b	29,53(137/464) ^a	13,25(20/151) ^b	22,68
Bölünme aşamasından morula-blastosist oranı (%)	32,81(83/253) ^b	44,63(137/307) ^a	24,69(20/81) ^b	37,44

a,b, Aynı satırda farklı harflerle gösterilen değerler birbirinden istatistiksel olarak farklıdır $p<0,001$.



Şekil 3.14. Linoleik, oleik ve kontrol gruplarında deneme tekrarlarına göre genel morula-blastosist olma bulguları.

Linoleik asidin 10 (Şekil 3.16), 100 (Şekil 3.17) ve 1000 (Şekil 3.18) mikromollük dozlarının kullanıldığı Grup 1’de sırasıyla %23,13, %11,81 ve %21,05 morula-blastosist oranları elde edilmiş olup, grup içi karşılaştırmada morula-blastosiste ulaşma oranları açısından önemli bir fark olmadığı ($p > 0,05$) tespit edilmiştir (Şekil 3.15, Çizelge 3.6).

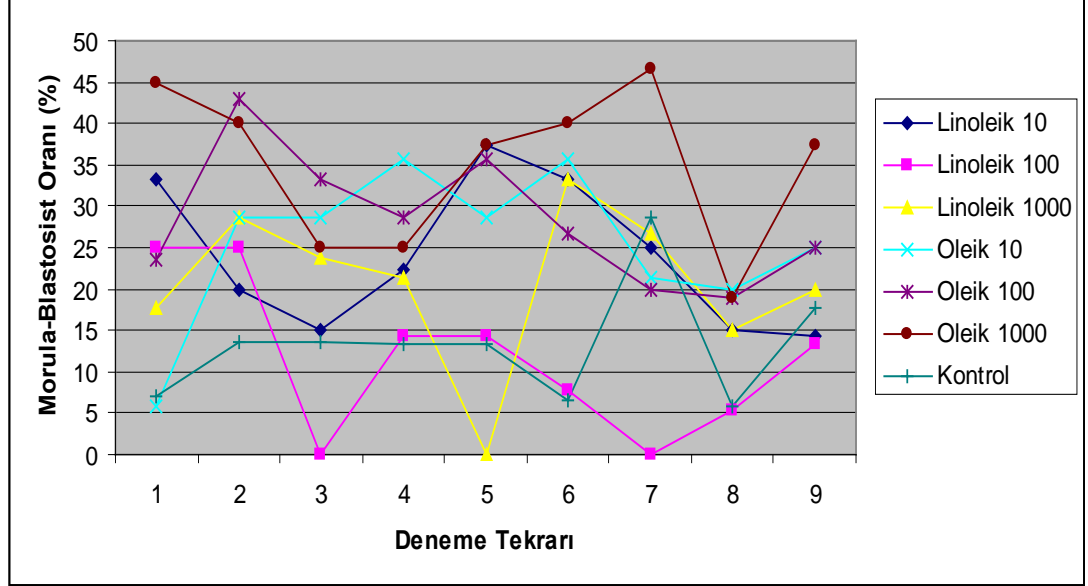
Çizelge 3.6. Linoleik ve oleik katkılı deneme gruplarında bulunan morula-blastosist sonuçları.

ÖZELLİK				
Kültür medyumuna katılan deneme grupları (μM)	Oosit sayısı(n)	Morula-blastosist sayısı(n)	Kültüre alınan oositlerden morula-blastosist oranı (%)	Bölünme aşamasından morula-blastosist oranı (%)
Linoleik 10	147	34	23,13(34/147) ^{ab}	36,96(34/92) ^{ab}
Linoleik 100	144	17	11,81(17/144) ^d	23,61(17/72) ^{bc}
Linoleik 1000	152	32	21,05(32/152) ^{bc}	35,96(32/89) ^{ab}
Oleik 10	151	38	25,17(38/151) ^{ab}	40,43(38/94) ^a
Oleik 100	154	44	28,57(44/154) ^{ab}	44,44(44/99) ^a
Oleik 1000	159	55	34,59(55/159) ^a	48,25(55/114) ^a
Kontrol	151	20	13,25(20/151) ^{cd}	24,69(20/81) ^{bc}

a,b,c,d, Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen değerler birbirinden istatistiksel olarak farklıdır $p < 0,001$.

Oleik asidin 10 (Şekil 3.19), 100 (Şekil 3.20) ve 1000 (Şekil 3.21) mikromollük dozlarının kullanıldığı Grup 2’de sırasıyla %25,17, %28,57 ve %34,59 oranlarında morula-blastosist bulguları elde edilmiş olup, grup içi karşılaştırmada

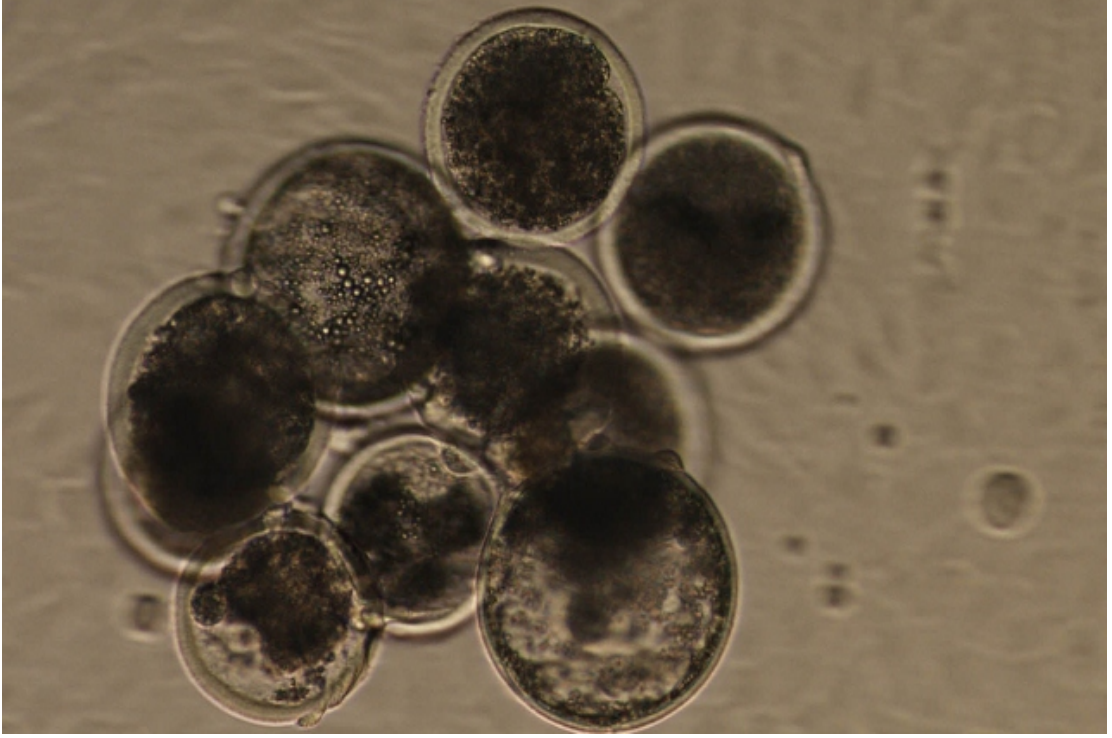
morula-blastosiste ulaşma oranları açısından önemli bir fark olmadığı ($p > 0,05$) tespit edildi (Şekil 3.15, Çizelge 3.6).



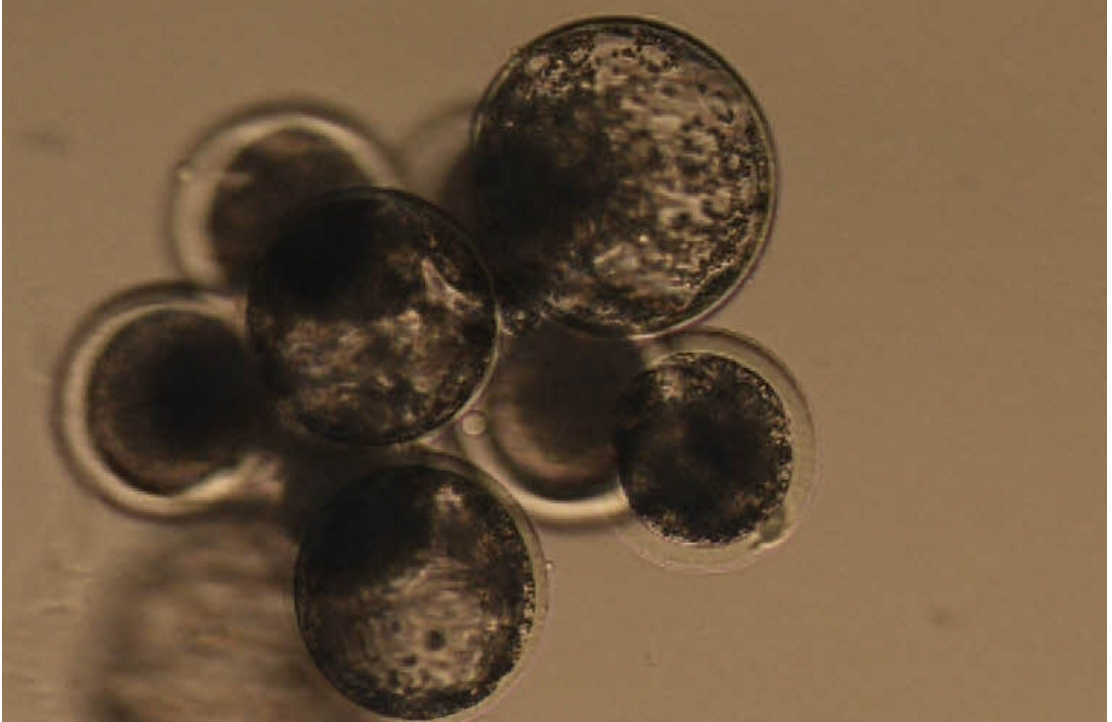
Şekil 3.15. Linoleik, oleik ve kontrol gruplarında deneme tekrarlarına göre morula-blastosist olma bulguları.



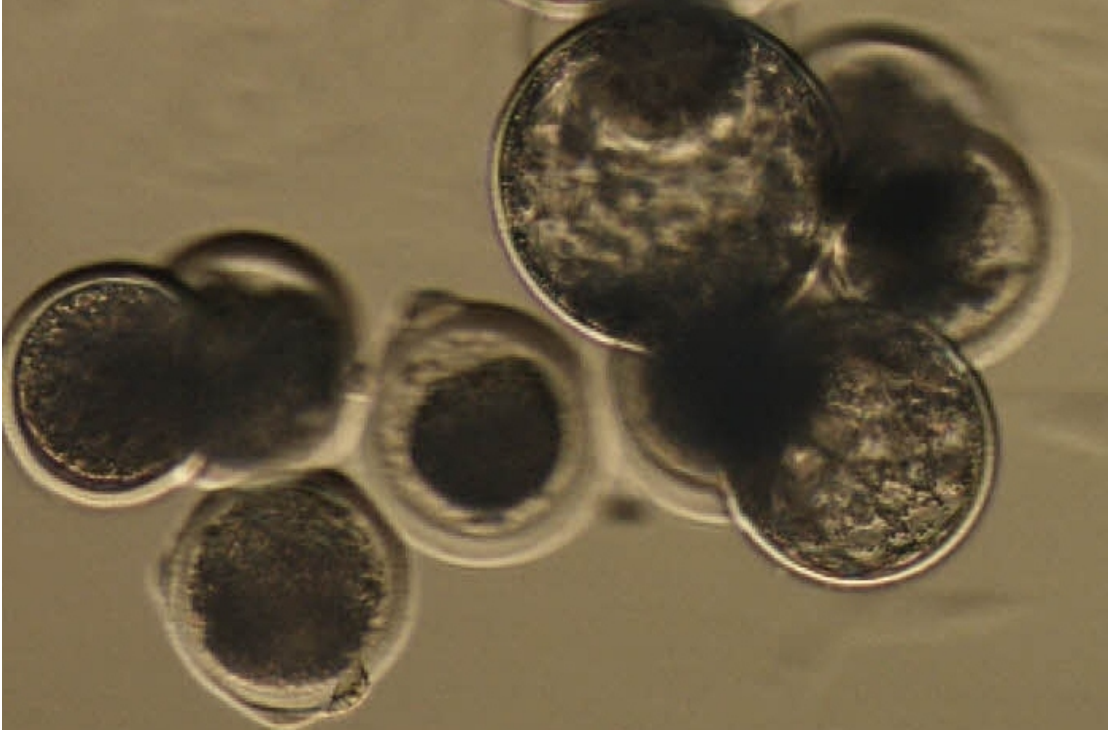
Şekil 3.16. İnkübasyonun yedinci gününde linoleik asit (10 μ M) grubunda gelişen embriyolar (X100)



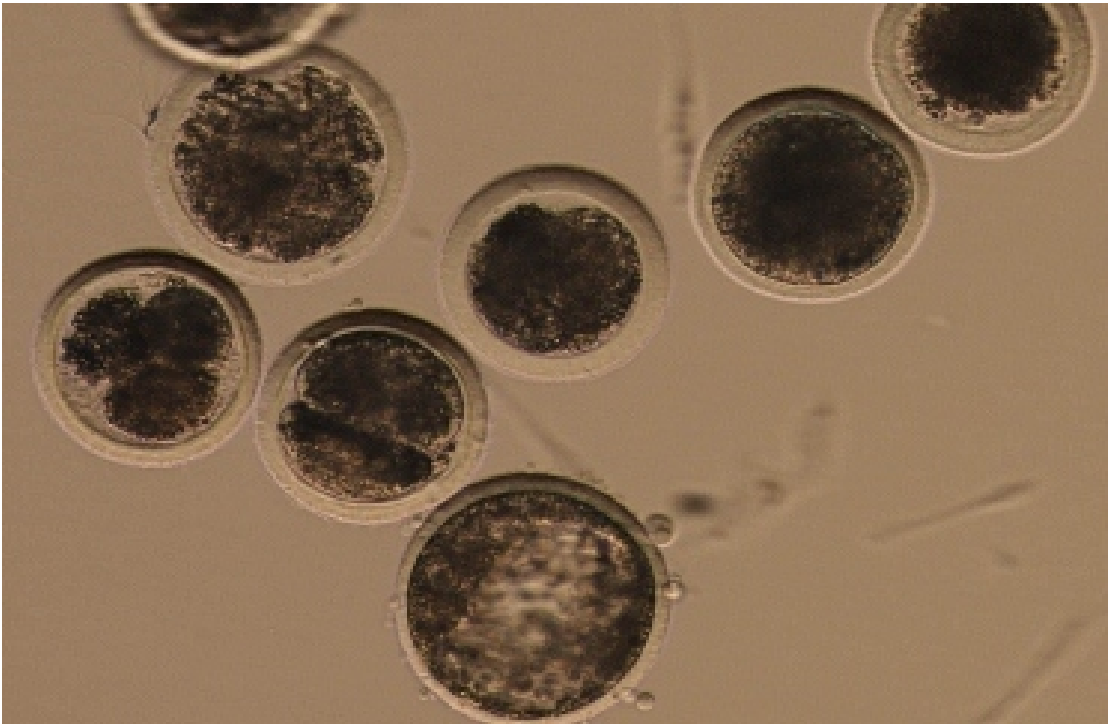
Şekil 3.17. İnkübasyonun yedinci gününde linoleik asit (100 µM) grubunda gelişen embriyolar (X100)



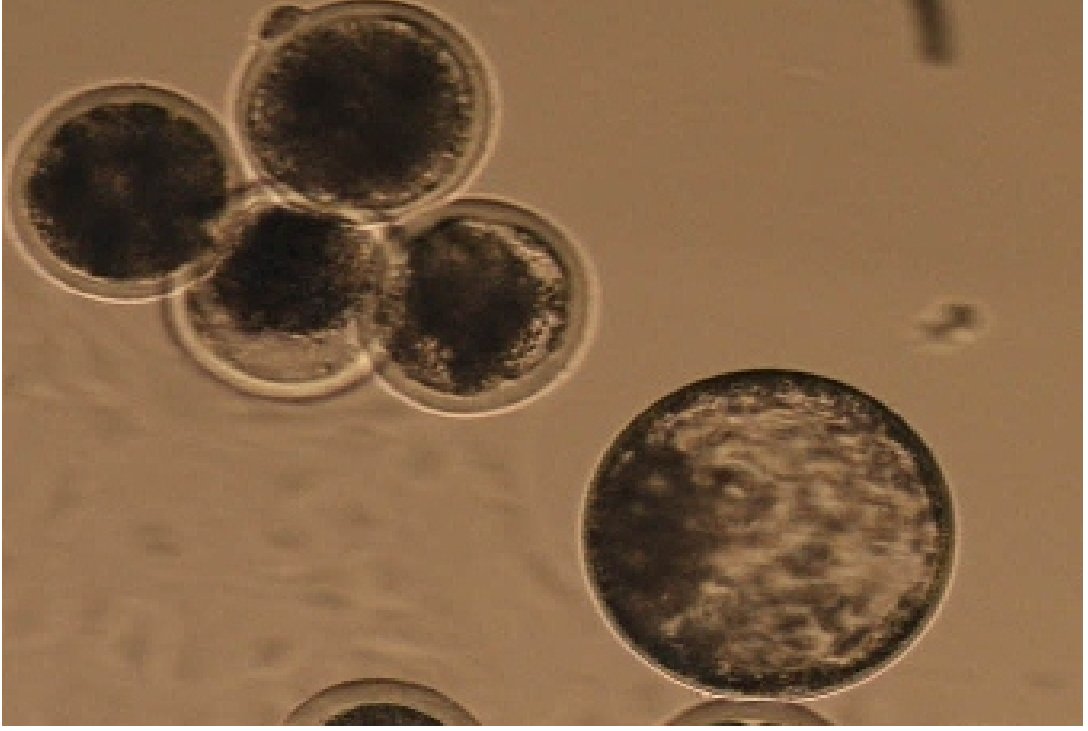
Şekil 3.18. İnkübasyonun yedinci gününde linoleik asit (1000 µM) grubunda gelişen embriyolar (X100)



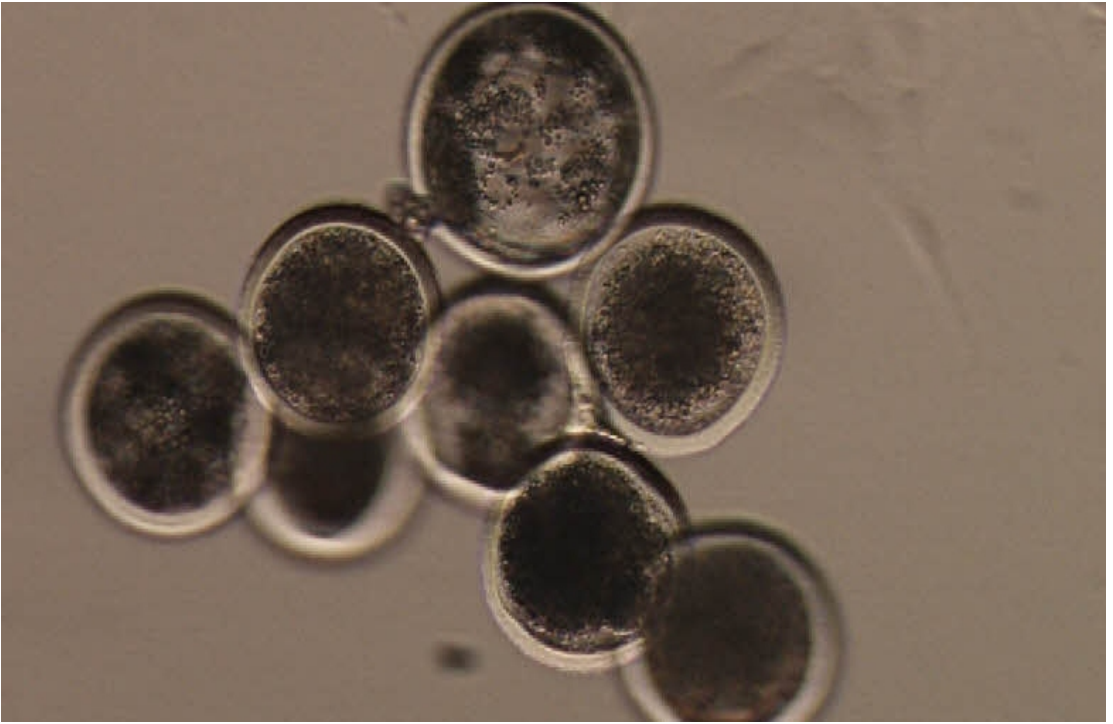
Şekil 3.19. İnkübasyonun yedinci gününde oleik asit (10 µM) grubunda gelişen embriyolar (X100)



Şekil 3.20. İnkübasyonun yedinci gününde oleik asit (100 µM) grubunda gelişen embriyolar (X100)



Şekil 3.21. İnkübasyonun yedinci gününde oleik asit (1000 µM) grubunda gelişen embriyolar (X100)



Şekil 3.22. İnkübasyonun yedinci gününde kontrol grubunda gelişen embriyolar (X100)

Gruplar arasında yapılan karşılaştırmada; CR1aa kültür medyumuna katılan oleik asit grubunun üç dozunun (10, 100 ve 1000 μM), kontrol grubu ve linoleik asit grubunun bir (100 μM) dozuna göre morula-blastosiste ulaşma oranı açısından önemli oranda artışlar ($p<0,001$) sağladığı gözlemlendi. Linoleik asit grubunun en düşük dozunun (10 μM) kontrol grubuna göre morula-blastosiste ulaşma oranı açısından önemli oranda artışlar ($p<0,001$) sağladığı görüldü. Oleik asit grubunun en yüksek dozunun (1000 μM) gruplar arasında en yüksek morula-blastosiste ulaşma oranı sağladığı tespit edildi. Linoleik asit (100 μM) uygulamasının ise en düşük oranda morula-blastosiste ulaşma oranı sağladığı belirlendi.

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Kültür ortamında bulunan çeşitli faktörlerin embriyoların gelişimini, morfolojisini ve gen ekspresyonunu olumlu veya olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir. Bu faktörler, kültür medyumu ile ilgili olanlar (kültür medyumunun kompozisyonu ve fizikokimyasal özellikleri) ve/veya kültür ortamlarının oksijen konsantrasyonu ve ışığa maruz kalma gibi bazı çevresel etkenlerdir (Gyu-jin ve ark., 2007; Takenaka ve ark., 2007; Feugang ve ark., 2009). Kültür ortamının koşullarında serbest oksijen radikallerinin oluşması, embriyo hücrelerinin fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Guerin ve ark., 2001). Kültür medyumlarının kondisyonu kültür ortamına katılan antioksidan maddelerin etkinliği ile yakından ilgilidir (Feugang ve ark., 2003; Feugang ve ark., 2004). Sığır oositlerinin *in vitro* maturasyonu, fertilizasyonu ve kültüründe kullanılan temel vasatlara, oosit ve embriyoların gelişim kabiliyetlerini artırmak amacıyla çok sayıda farklı katkı maddeleri ilave edilmektedir. Sunulan çalışmada ise, antioksidan özelliği olan doymamış yağ asitlerinden oleik asit ve linoleik asidin embriyo kalitesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yapılan çalışmada, ovaryum yüzeyindeki 2-8 mm çaptaki folliküllerden aspirasyon yöntemi kullanarak, oositler elde edildi. Mevcut veriler iyi kalitede oosit elde etme oranı bakımından; benzer yöntemi kullanan bazı araştırma sonuçlarından düşük (Gordon, 1994; Akyol ve ark., 2007; Faheem ve ark., 2011), bazı araştırma sonuçlarından yüksek (Yağmur, 2005) ve bazı bildirimlerle benzerlik (Hajian ve ark., 2010) göstermektedir. Sığır oositlerinin maturasyonu, fertilizasyonu ve embriyo gelişiminde oosit kaynağının en önemli belirleyici faktör olduğu bildirilmektedir (Rizos ve ark., 2002a; Rizos ve ark., 2002b; Hajian ve ark., 2010). Çalışmada kullanılan oositlerin yerel mezbahadan elde edilmiş olması, oositlerin toplandığı hayvanların çoğunun kondüsyonlarının iyi olmaması ve oosit elde etmek için sadece follikül aspirasyon yönteminin kullanılmış olmasının oosit sayısının düşük olmasına yol açabileceği düşünülmektedir. Buna rağmen toplanan iyi kalite oosit sayısının kabul edilebilir ve tatmin edici düzeyde *in vitro* embriyo üretimi sağladığı görülmektedir.

Elde edilen maturasyon bulguları daha önce yapılan bazı çalışmaların (Akyol ve ark., 2007; Faheem ve ark., 2011) bulgularıyla uyumluluk göstermiştir. Ovaryum

başına elde edilen oosit sayısının düşük olmasına rağmen maturasyon oranının yüksek çıktığı gözlemlendi. Maturasyon medyumuna literatürde belirtilen (Gırıtharan, 1999; Macun ve Kaymaz, 2006; Mondadori ve ark., 2008) miktarlardan daha az seviyede FSH katılmasına rağmen, elde edilen maturasyon sonuçlarının bu araştırmacıların sonuçlarından yüksek çıktığı gözlemlendi. Burada maturasyon ortamına alınan oositlerin kalitelerinin iyi olmasının, maturasyon ortamına katılan FSH miktarının kumulus hücrelerinin ekspansiyonu için yeterli olduğu ve oositlerin maturasyon oranını arttırdığı kanaatine varılmıştır.

Mevcut çalışmada elde edilen dejenerasyon sonuçları, daha önce yapılan çalışmalarda (Ocana ve ark., 1999, Akyol ve ark., 2007) elde edilen dejenerasyon bulgularından biraz yüksek olduğu gözlemlendi. Bu çalışmada elde edilen dejenerasyon bulgularının sunulan çalışmalara kıyasla yüksek olmasını, ovaryumların alındığı hayvanların reproduktif farklılığına ve araştırmacıların çalışmalarında *in vitro* maturasyon kültürüne bazı ilave maddelerin katmış olmalarına bağlamak mümkündür.

In vitro kültür ortamlarına oleik asitin katılmasıyla ilgili herhangi bir literatür bilgisine ulaşılammıştır. Linoleik asitte ise sığır embriyoları üzerine çok az sayıda çalışmaya rastlanılmış olup, buradaki çalışmalarda da kültür medyumunu olarak SOF kullanılmış ve daha çok embriyoların dondurma ve çözündürme aşamasında etkileri araştırılmıştır.

Mevcut çalışmada, oleik asit deneme grubunun linoleik asit deneme ve kontrol gruplarına göre daha iyi oranda fertilizasyon oranı sağladığı gözlemlendi. Linoleik ve oleik asidin ortalama fertilizasyon oranları açısından bakıldığında, oleik asidin linoleik aside göre daha etkili olduğu ve bu etkinin istatistiksel bakımdan önemli olduğu tespit edildi ($p < 0,01$). Mingoti ve ark. (2011) sentetik olan ve doğal katkılı *in vitro* kültür medyumlarını denedikleri çalışmalarında sentetik maddelerin ilavesinin embriyo gelişimini artırmadığını tespit etmişlerdir. Yapılan bir çalışmada (Darwich ve ark., 2010) mSOF kültür medyumuna ilave edilen linoleik asit, linolenik asit ve oktadekadienoik asitin embriyo bölünme, dondurma öncesi ve dondurma sonrası embriyo gelişim oranlarına etkisi araştırılmıştır. Linolenik ve oktadekadienoik asitin bölünme oranları üzerine etkilerinin olmadığı bildirilmiştir. Elde edilen bölünme sonuçlarının bu araştırmacıların sentetik ve doğal katkılı kültür

solüsyonuyla yaptıkları çalışmalarda buldukları sonuçlardan daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada özellikle oleik asitin tüm deneme gruplarından elde edilen bölünme sonuçlarının, embriyo bölünmesini olumlu yönde etkilediği ve bu olumlu etkinin embriyonun kalitesi üzerine de yansıdığı belirlenmiştir.

Yapılan çalışmada oleik asitin düşük (10 μM), orta seviyedeki (100 μM) ve yüksek konsantrasyondaki (1000 μM) dozlarının sığır embriyolarının bölünme oranlarını artırdığı ve elde edilen bölünme oranlarının, Arias-Alvares ve ark. (2011)'nın, antioksidan özellik gösterdiği bilinen leptin hormonunun hem düşük konsantrasyondaki (10 ng/mL) hem de yüksek konsantrasyondaki (100 ng/mL) çalışmalarından elde ettiği bölünme sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle yüksek yoğunluktaki oleik asit miktarında en yüksek seviyede bölünme oranı elde edilmiş olup, oleik asit dozunun yükseldikçe antioksidan kapasitenin arttığı ve bu sayede oksidatif stresin önüne geçildiği kanısına varılmıştır. Linoleik asidin her üç dozuyla elde edilen sonuçlar Arias-Alvares ve ark. (2011)'nin elde ettiği sonuçlardan düşük kalmıştır. Linoleik asidin düşük (10 μM) miktarlarının embriyo gelişimini olumlu yönde etkilediği, kullanılan miktarın artırılması ile bölünme oranlarının azaldığı gözlenmiş olup bunun sebebi olarak linoleik asidin tek başına oksidatif stresi engelleme yeteneğinin düşük olduğu ve antioksidan özelliğinin oleik aside göre daha az olduğu kanısına varılmıştır.

Dışarıdan kültür ortamlarına katılan antioksidan maddelerin zayıf kalitedeki embriyoların bile blastosist aşamasına kadar gelme şansını artırdığı belirtilmektedir (Hosseini ve ark., 2009). Fakat antioksidan maddelerin dondurma-çözündürme sonrası kültür medyumlarına ilavesinin embriyo kültüründe etkili olmadığı bazı araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Hosseini ve ark., 2009). Antioksidanların *in vitro* kültür ortamlarına ilavesiyle yapılan çalışmaların bazılarında embriyo gelişiminde olumlu etki alındığı, bazılarında ise herhangi bir etkinin olmadığı belirtilmiştir (Feugang ve ark., 2004, Hosseini ve ark., 2009). Yapılan çalışmada, *in vitro* kültür ortamlarına gerek oleik asit 10, 100, 1000 μM ve gerekse linoleik asidin 10 ve 1000 μM ' lük dozları kontrol grubuna göre *in vitro* sığır embriyolarının morula-blastosist aşamasına gelme şansını ve embriyo kalitesini artırdığı tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz morula blastosist sonuçları (linoleik asit 100 μM hariç)

Block ve ark. (2009) BSA ilaveli ve ilavesiz antioksidan özelliği olan hyaluronan ilave ederek elde ettiği sonuçlardan yüksek bulunmuştur. Yapılan araştırmada oleik asitle morula-blastosiste ulaşma oranlarının, çalışmalarında linoleik asit, linolenik asit ve oktadekadienoik asiti kullanan Darwich ve ark., (2010)'nın elde ettiği morula-blastosiste ulaşma oranlarından genel olarak yüksek olduğu fakat, linoleik asitle elde edilen morula-blastosiste ulaşma oranlarının ise aynı araştırmacıların sonuçlarından bir miktar düşük kaldığı gözlenmiştir. Linoleik asit kullanarak yaptığımız çalışmada elde edilen düşük sonuçların en önemli nedenlerinden birinin oosit kaynağının farklılığı olduğu düşünülmektedir. Farklılığının diğer bir nedeninin de anılan araştırmada linoleik asidi yaptığımız çalışmada kullanılan CR1aa kültür medyumundan farklı olarak SOF kültür medyumunun kullanılmış olması gösterilebilir.

Yaptığımız çalışmada seçilen antioksidan özellik gösterdiği bilinen gerek oleik asidin, gerekse linoleik asidin Öztürkler ve ark. (2010) tarafından L-Ergothiyonin ve L-askorbik asit kullanılarak yapılan çalışmalarda elde edilen morula-blastosiste ulaşma sonuçlardan yüksek olduğu belirlenmiştir. Burada ki farklılığın en önemli sebebinin, oleik ve linoleik asidin antioksidan özelliklerinin L-Ergothiyonin ve L-askorbik asit' ten daha belirgin olması ve embriyoları oksidatif strese karşı daha iyi koruması olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmada kültür ortamına katılan hem oleik asitin hem de linoleik asidin düşük dozlarının tek başlarına antioksidan özellik gösterdiği ve embriyo gelişiminde olumlu yönde etki ettiği gözlenmiştir.

Oleik asit deneme grubunun, linoleik asit deneme ve kontrol gruplarına göre daha iyi oranda morula-blastosiste ulaşma oranı sağladığı gözlenmiştir. Linoleik ve oleik asidin ortalama morula-blastosist oranları açısından bakıldığında, oleik asidin linoleik asite göre üstün olduğu ve bu üstünlüğün istatistiksel açıdan önemli olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,001$). Elde edilen sonuçlar oleik asitin morula-blastosiste ulaşma oranını arttırırken embriyoların kalitelerini de olumlu yönde etkilediğini göstermiştir. Burada oleik asidin kültür ortamında meydana gelen antioksidan maddelerin etkisini azalttığı söylenebilir.

Sonuç olarak, yapılan çalışmanın sonuçları kültür medyumlarına katılan doymamış yağ asitlerinden 1000 μ M oleik asit içeren grubun, gerek 48. saatteki bölünme oranları, gerekse morula-blastosiste ulaşma oranları bakımından diğer

deneme gruplarına göre daha iyi sonuçlar verdiğini ve elde edilen embriyoların daha kaliteli olduğunu göstermiştir. Kırk sekizinci saatte bölünme ve morula-blastosiste ulaşma oranları bakımından, oleik asit ve linoleik asit deneme gruplarının (100 µM linoleik asit içeren deneme grubu hariç) kontrol grubuna göre daha iyi sonuçlar verdiği gözlenmiştir. Oleik asitin, hem bölünme aşamasında hem de morula-blastosiste aşamasında embriyoların gelişimini ve kalitesini arttırdığı gözlendi. Linoleik asidin ise düşük miktarlarda kültür medyumlarına katılmasının bölünme ve morula-blastosiste ulaşma oranlarını arttıracadığı kanısına varıldı. Dışarıdan kültür ortamlarına katılan antioksidan maddelerin embriyo gelişimini ve serbest oksijen radikallerine karşı dayanıklılığı artırmaktadır. Daha sonra yapılacak olan çalışmalarda kültür ortamlarına katılacak olan oleik asit ve linoleik asit dâhil doymamış yağ asitlerinden yararlanılabileceği düşünölmektedir.

KAYNAKLAR

- AGARWAL A, GUPTA S, SIKKA S (2006). The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 18: 325-332.
- AKYOL N, SULU N (2005a). Östrustaki inek serumu ve ftal buzağı serumunun *in vitro* embriyo elde edilmesine etkisi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 45: 1-8.
- AKYOL N (2005b). Sığırlarda *in vivo* ve *in vitro* fertilizasyon (derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 45: 53-61.
- AKYOL N (2006). Sığırlarda *in vitro* oosit maturasyonu (derleme). *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 46: 59-69.
- AKYOL N, KIZIL SH, KARAŞAHİN T (2007). *n vitro* sığır embriyosu üretim ve transferi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 47: 1-8.
- AKYOL N, KIZIL SH, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M, HASHIYADA Y (2008). Sığırlarda ovum pick-up (OPU) tekniği kullanılarak *in vitro* embriyo retimi. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 48: 1-11.
- AITKEN R.J, BUCKINGHAM D, HARKISS D (1993). Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoon. *Journal of Reproduction and Fertilization*, 97: 441-450.
- ALİ AA, BILODEAU JF, SIRARD MA (2003). Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. *Theriogenology*, 59: 939-949.
- ANGELIKA ES, TERESA KW, LAWRENCE CS (1997). Effects of inhibin and activin A during *in vitro* maturation of bovine oocytes in hormone and serum free medium. *Biology of Reproduction*, 56: 1559-1564.
- ANTMEN ŐE (2005). Beta talesemide oksidatif stres. Yüksek lisans tezi. ukurova niversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı.
- ARIAS-ALVARES M, BERMEJO-ALVAREZ P, GUITERREZ-ADAN A, RIZOS D, LORENZO PL, LONERGAN P (2011). Effect of leptin supplementation during *in vitro* oocyte maturation and embryo culture on bovine embryo development and gene expression patterns. *Theriogenology*, 75: 887-896.

- ARMSTRONG DT, HOLM P, IRVINE B, PETERSAN BA, STUBINGS RB, MCLEAN D, STEVENS GF, SEAMARK RF (1991). Laparoscopic aspiration and *in vitro* maturation of oocytes from calves. *Theriogenology*, 35: 182.
- ARMSTRONG DT, HOLM P, IRVINE B, PETERSAN BA, STUBINGS RB, MCLEAN D, STEVENS GF, SEAMARK RF (1992). Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology*, 38: 667-668.
- ARMSTRONG DT (1993). Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, 39: 7-24.
- BARNES F, ENDEBROCK M, LOONEY C, POWELL R, WESTHUSIN M, SHEPHERD D (1993). Embryo cloning in cattle: The use of *in vitro* matured oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 97: 317-320.
- BAŞTAN A, POLAT B, ACAR DB, KORKMAZ Ö, ÇOLAK A (2010). Determination of optimal dose of EGF for bovine oocyte maturation and subsequent *in vitro* fertilization and culture in two media. *Türk Journal Veterinary Animal Science*, 34: 33-38.
- BAVISTER BD (1993). Culture of preimplantation embryos: Facts and artifacts. *Human Reproduction*, 1: 91-148.
- BEEHARRY N, LOWE JE, HERNANDEZ AR, CHAMBERS JA, FUCASSI F, CRAGG PJ, GREEN IC (2003). Linoleic acid and antioxidants protect against DNA damage and apoptosis induced by palmitic acid. *Mutation Research*, 530: 27-33.
- BEEHARRY N, CHAMBERS JA, GREEN IC (2004). Fatty acid protection from palmitic acid-induced apoptosis is lost following PI3-kinase inhibition. *Apoptosis*, 9: 599-607.
- BİRLER S (1997). Sığır oositlerinde morfolojik görünümün *in vitro* olgunlaştırma ve fertilizasyon üzerine etkileri. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 23: 345-352.
- BİRLER S, PABUÇCUOĞLU S, İLERİ K, AKLAN S, EVECAN M (1998). Sığır oositlerinin *in vitro* olgunlaştırılmasında farklı sürelerin etkisi. *Türk Journal Veterinary Animal Science*, 22: 551-557.
- BİRLER S, PABUÇCUOĞLU S, ATALLAH H, AKLAN S, ÖZDAŞ ÖB, BACINOĞLU S, CİRİT Ü, ZAVAR İ, SÖNMEZ MEC, İLERİ İK (2002). *In vitro* üretilen koyun embriyolarının transferi. *Türk Journal Veterinary Animal Science*, 26: 1421-1426.
- BLAKEWOOD EG ve ZHANG L (1993). The use of chick embryo amniotic fluids for the *in vitro* culture of early stage mammalian embryos. *Theriogenology*, 39: 189.

- BLANCO MR, DEMYDA S, MORENO MM, GENERO E (2011). Developmental competence of *in vivo* and *in vitro* matured oocytes: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 6: 155-165.
- BLOCK J, BONILLA L, HANSEN PJ (2009). Effect of addition of hyaluronan to embryo culture medium on survival of bovine embryos *in vitro* following vitrification and establishment of pregnancy after transfer to recipients. *Theriogenology*, 71: 1063-1071.
- BLONDIN P (1993). The influence of oocyte and follicular morphology on developmental competence following *in vitro* maturation in cows. *Biology of Reproduction*, 48: 125.
- BOLAND MP (1984). Use of the rabbit oviducts as a screening tool for the viability of mammalian eggs. *Theriogenology*, 21: 127-137.
- BRACKETT BG, BOUSQUET D, BOICE ML, DONAWICK WJ, EVANS JF, DRESSEL MA (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, 27: 147-158.
- BRACKETT BG, YOUNIS AI, FAYRER-HOSKEN RA (1989). Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. *Fertility and Sterility*, 52: 319-324.
- BRACKETT BG ve ZUELKA KA (1993). Analysis of factor involved in the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 39: 43-64.
- BUCAK MN, SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, KIZIL SH, AKYOL N, TAŞDEMİR U (2009). *İn vitro* sığır embriyolarının gelişiminde antioksidanların etkisi. V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, Elazığ, 01-04 Ekim, sayfa 64.
- BUNCH TJ, WANG S, HOLYOAK GR, BUCH TD (1999). Bovine embryo development *in vitro* after exposure to fluorescent light. *Journal of Animal Science*, 77: 98.
- CAROLAN C, MONAGHAN P, GALLAGHER H, GORDON I (1994). Effect of recovery method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology*, 41: 1061-1068.
- CARVALHAIS I, FAHEEM M, HABIBI A, GERALDO A, AGRICOLA M, CHAVEIRO A, MOREIRA DE SILVA F (2009). Effects of bovine oocyte quality on kinetics of nuclear maturation and embryonic development after *in vitro* fertilization. *Reproduction, Fertility and Development*, 22: 322-323.

- CETICA PD, PINTOS LN, DALVIT GC, BECONI MT (2001). Antioxidant enzyme activity and stress in bovine oocyte *in vitro* maturation. IUBMB Life Jan, 51: 57-64.
- CHANG MC (1951). Fertilizing capacity of spermatozoon deposited into the fallopian tube. Nature, 168: 697-698.
- CHEN HB, LU KH, POLGE C (1992). *In vitro* fertilization (IVF) of bovine oocytes with frozen-thawed sperm after storage at different temperatures and periods of time. Proceedings of the Twelfth International Congress of Animal Reproduction, 2: 629-631.
- COMPORTI M (1989). Three models of free radical induced cell injury. Chemical Biology Interact, 72: 1-56.
- CORREA GA, RUMPF R, MUNDIM TCD, FRANCO MM, DODE MAN (2008). Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. Animal Reproduction Science, 104: 132-142.
- ÇEVİK M, SAĞIRKAYA H, TAŞ A, AKKOÇ T, BAGIŞ H, ARAT S (2009). Comparing *in vitro* development of bovine oocytes cultured in G1.3/G2.3 sequential culture media and CR1aa Medium. Journal of Animal and Veterinary Advances, 8: 1185-1189.
- DARWICH AA, PERREAU C, PETIT MH, PAPILLIER P, DUPONT J, GUILLAUME D, MERMILLOD P, GUIGNOT F (2010). Effects of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and AMPK α phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 93: 30-36.
- DE LAMIRANDE E, JIANG H, ZINI A, KODAMA H, GAGNON C (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. Reviews of Reproduction, 2: 48-54.
- DRÖGE W (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. Physiological Reviews, 82: 47-95.
- DURMUŞ AD ve ÜNSALDI E (2005). Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve kırık iyileşmesi. Doğu Anadolu Bölgesi Araştırmaları Dergisi, 3: 20-27.
- ENRIGHT BP, LONERGAN P, DINNYES A, FAIR T, WARD FA, YANG X, BOLAND MP (2000). Culture of *in vitro* produced bovine zygotes *in vitro* vs *in vivo*: Implications for early embryo development and quality. Theriogenology, 54: 659-673.
- EVECEN M (1999). Fare embriyolarının *in vitro* kültüründe farklı BSA oranlarının gelişime etkisi. Doktora tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'i Tohumlama Anabilim Dalı.

- EYESTONE WH and BOER HA (1993). FSH enhances developmental potential of bovine oocytes matured in chemically defined medium. *Theriogenology*, 39: 216 (Abstract).
- FAGALI N and CATALA A (2008). Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH* techniques. *Biology Chemistry*, 137: 56-62.
- FAHEEM MS, CARVALHAIS I, CHAVEIRO A and MOREIRA DA SILVA F (2011). *In vitro* oocyte fertilization and subsequent embryonic development after cryopreservation of bovine ovarian tissue, using an effective approach for oocyte collection. *Animal Reproduction Science*, 125: 49-55.
- FEUGANG JM, VAN LANGENDONCK A, SAYOUD H, REES JF, PAMPFER S, MOENS A, DESSY F, DONNAY I (2003). Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. *Zygote*, 11: 107-118
- FEUGANG JM, DE ROOVER R, MOENS A, LEONARD S, DESSY F, DONNAY I (2004). Addition of beta-mercaptoethanol or trolox at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocyst and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. *Theriogenology*, 61: 71-90.
- FEUGANG JM, CAMARGO-RODRIGUEZ O, MEMILÌ E (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livestock Science*, 121: 141-149.
- FOULADI-NASHTA AA, GUITERREZ CG, GONG JG, GARNSWORTHY PC, WEBB R (2007). Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating. *Biology of Reproduction*, 77: 9-17.
- FUHRER F, MAYR B, SCHELLANDER K, KALAT M, SCHLEGER W (1989). Maturation competence and chromatin behaviour in growing and fully grown cattle oocytes. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 36: 285-291.
- FUJITANI Y, KASAI K, OHTANI S, NISHIMURA K, YAMADA M, UTSUMI K (1997). Effects of oxygen concentration and free radicals on *in vitro*-produced bovine embryos. *Journal Animal Science*, 75: 483-489.
- GAJA A, MENG CL, SATO M, NAKAJIMA T, KUBOTA C, KOJIMA T (2010). γ -LA supplementation to IVC for IVP bovine embryos. *Asian Australian Journal of Animal Science*, 23: 25-32.

- GARDNER DK ve LANE M (1996). Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical factors. *Human Reproduction*, 11: 2703-2712
- GASPARRINI B, BOCCIA L, MARCHANDISE J, DÍ PALO R, GEORGE F, DONNAY I, ZICARELLI L (2006). Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus Bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cysteine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology*, 65: 275-287.
- GIRITHARAN G (1999). Bovine *in vitro* embryo production and oocyte preservation. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of master of science in the faculty of graduate studies. Department of Animal Science. The University of British Columbia. University of Peradeniya, Sri Lanka.
- GOMEZ E and DÍEZ C (2000). Effects of glukoz and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 58: 23-37.
- GORDON I (1994). Laboratory production of cattle embryos.
- GORDON I (2003). Laboratory production of cattle embryos. *Biotechnology in Agriculture Series No. 27*. Typeset by AMA DataSet Ltd, UK. Printed in the UK by Cromwell Pres, Trowbridge.
- GOTO K, IWAI Y, TAKUMA Y, NAKANISHI Y (1992). Co-culture of *in vitro* fertilized bovine embryos with different cell monolayers. *Journal Animal Science*, 70: 1449-1453.
- GUERIN P, MOUATASSIM SE, MENEZO Y (2001). Oxidative stres and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroindings. *Human Reproduction Update*, 7: 175-189.
- GYU-JIN R, BALASUBRAMANIAN S, DONG-SIK K, WOO-JIN S, SANG-RAE C, JUNGONG K, MOHANA KB, SANG-YOUNG C (2007). Influence of *in vitro* oxygen concentrations on preimplantation embryo development, gene expression and production of Hanwoo calves following embryo transfer. *Molecular Reproduction and Developmnet*, 74: 486-496 (Abstract).
- HAGGARTY P, WOOD M, FERGUSON E, HOAD G, SRIKANTHARAJAH A, MILNE E, HAMILTON M, BHATTACHARYA S (2006). Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos. *Human Reproduction*, 21: 766–773.
- HAJIAN M, HOSSEINI SM, ASGARI V, OSTADHOSSEINI S, FOROUZANFAR M, NASR ESFAHANI MH (2010). Effect of culture system on developmental competence, cryosurvival and DNA-Fragmentation of *in vitro* bovine blastocysts. *Royan Institute International Journal of Fertility and Sterility*, 5: 21-26.

- HAMANO S, KOIKEDA A, KUWAYAMA M, NAGAI T (1992). Full-term development of *in vitro* matured, vitrified and fertilized bovine oocytes. *Theriogenology*, 38: 1085-1090.
- HAMANO S and KUWAYAMA M (1993). *In vitro* fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method. *Theriogenology*, 39: 703-712.
- HANADA A, ENYA Y, SUZUKI T (1986). Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. *Japanese Journal of Animal Reproduction*. 32: 208 (Abstract).
- HERNANDEZ-LEDEZMA JJ, MATHIALAGAN N, VILLANUEVA C, SIKES JD, ROBERTS RM (1993). Expression of bovine trophoblast interferons by *in vitro* derived blastocysts is correlated with their morphological quality and stage of development. *Molecular Reproduction Development*, 36: 1-6.
- HOCHI S, KIMURA K, HANADA A (1999). Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of *in vitro* produced bovine morulae. *Theriogenology*, 52: 497-504.
- HOMA ST, BROWN C.A (1992). Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. *Journals of Reproduction Fertility*, 94: 153-160.
- HOSSEINI SM, FOROUZANFER M, HAJIAN M, ASGARI V, ABEDI P, HOSSEINI L, OSTADHOSSEINI S, MOULAVI F, ASFAHANI-LANGRROODI M, SADEGHI H, BAHRAMIAN H, EGHBALSAIED SH, NASR-ESFAHANI MH (2009). Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? *The Journal of Assisted Reproduction Genetics*. 26: 355-364.
- IMAI K. Embryo transfer technology for domestic animal (2005). Japan International Cooperation Agency National Livestock Breeding Center.
- IRITANI A and NIWA K (1977). Capacitation of bull spermatozoon and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, 50: 119-121.
- JAAKMA U, ZHANG BR, LARSSON B, NIWA K, RODRIQUEZ-MARTINEZ H (1997). Effects of sperm treatments on the *in vitro* development of bovine oocytes in semidefined and defined media. *Theriogenology*, 48: 711-720.
- JOHNSON MH and NASR-ESFAHANI MH (1994). Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*? *Bioassays*, 16: 31-38.

- JU JC, PARKS JE, YANG XZ (1999). Thermotolerance of IVM-derived bovine oocytes and embryos after short-term heat shock. *Molecular Reproduction and Development*, 53: 336-340.
- KANAGAWA H, SHIMOHIRA I, SAITOH N (1995). *Manuel of bovine embryo transfer*. National Livestock Breeding Center, MAFF, JICA, Japan.
- KATSKA L ve SMORAK Z (1984). Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. *Animal Reproduction Science*, 7: 451-460.
- KHANDOKER MAM and TSUJII H (1999). Effect of exogenous fatty acids on *in vitro* development of rat embryos. *Asian Australian Journal of Animal*, 12: 169–173.
- KHURANO NK and NIEMANN H (2000). Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54: 741-756.
- KILIÇOĞLU Ç (1985). The *in vitro* cultivation of mouse ova from one cell to blastocyst. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 32: 301-310.
- KINTER M, SPITZ DR, ROBERTS RJ (1996). Oleic acid incorporation protects cultured hamster fibroblasts from oxygen-induced cytotoxicity. *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients*, 126: 2952-2959.
- KIM JY, KINOSHITA M, OHNISHI M, FUKUI Y (2001). Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. *Reproduction*, 122: 131–138.
- KITAGAWAA Y, SUZUKIB K, YONEDAA A, WATANABEA T (2004). Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, 62: 1186-1197.
- KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M (2011). Etilen glikol ile direkt transfer metoduna göre dondurulan *in vivo* sığır embriyolarının transferi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17: 721-724.
- KREEGER PK, FERNANDES NN, WOODRUFF TK, SHEA D (2005). Regulation of mouse follicle development by follicle-stimulating hormone in a three-dimensional *in vitro* culture systems is dependent on follicle stage and dose. *Biology of Reproduction*, 73: 942-950.
- LAMBERT RD, BERNARD C, RIOUX JE, EELAND R, D'AMOURS D, MONTREUIL A (1983). Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology*, 20: 149-161.

- LAMBERT RD, SIRARD MA, BERNARD C, BELAND R, RIOUX JE, LECLERC P, MENARD DP, BEDOYA M (1986). *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* and collected at laparoscopy. *Theriogenology*, 25: 117-133.
- LIVINGSTON L, RICH K, MACKENZIE S, GODKIN JD (2009). Glutathione content and antioxidant enzyme expression of *in vivo* matured sheep oocytes. *Animal Reproduction Science*, 116: 265-273.
- LONERGAN P, RIZOS D, NORD F, BOLAND MP (2002). Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, 41: 427-437.
- LOTT WM, ANCHAMPARUTHY VM, MCGILLIARD ML, MULLARKY IK, GWAZDAUSKAS FC (2010). Influence of cysteine in conjunction with growth factors on the development of *in vitro*-produced bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, 46: 585-594 (Abstract).
- LU KH, GORDON I, GALLAGHER M, MCGOVERN H (1987). Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *Veterinary Record*, 121: 159-160.
- LU KH, GORDON I, MCGOVERN H, GALLAGHER M (1988). Production of cattle embryos by *in vitro* maturation and fertilization of follicular oocytes and their subsequent culture *in vivo* in sheep. *Theriogenology*, 29: 272 (Abstract).
- MACLELLAN LJ, WHYTE TR, MURRAY A, FITZPATRICK LA, EARL CR, ASPDEN WJ, KINDER JE, GROTTJAN HE, WALSH J, TRIGG TE, D'OCCHIO MJ (1998). Super stimulation of ovarian follicular growth with FSH, oocyte recovery and embryo production from zebu (*Bos Indicus*) calves: effects of treatment with a GnRH agonist or antagonist. *Theriogenology*, 49: 1317-1329.
- 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
- MADISON V, AVERY B, GREVE T (1992). Selection of immature bovine oocytes for developmental potential *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, 27: 1-11.
- MAJERUS V, DE ROVER R, ETIENNE D, KAIDI S, MASSIP A, DESSY F, DONNAY I (1999). Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology*, 52: 1169-1179.
- MAREI WF, WATHES DC, FOULADI-NASHTA AA (2009). The effect of linolenic acid on bovine oocyte maturation and development. *Biology of Reproduction*, 81: 1064-1072.

- MAYES M (2002). The meiotic arrest of bovine oocytes. Departement des sciences animales Faculte des sciences de l'agriculture et de l'alimentation Universitelaval Quebec. Doktora tezi. De l'Univerite Laval, Quebec –Canada.
- MCEVOY TG, COULL GD, BROADBENT PJ, HUTCHINSON JS, SPEAKE BK (2000). Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. *Journal of Reproduction and Fertility*, 118: 163–170.
- MEHENDALE SS, KILARI BAMS AS, DESHMUKH CS, DHOREPATIL BS, NIMBARGI VN, JOSHI SR (2009). Oxidative stress-mediated essential polyunsaturated fatty acid alterations in female infertility. *Human Fertility*, 12: 28-33 (Abstract).
- MERMILLOD P, SCHMALTZ B, PERREAU C, TSIKIS G, MARTINOT E, CORDOVA A, LOCATELLI Y (2010). Early development of ruminant embryos, autonomous process or the result of a positive dialog with surrounding maternal tissues. *Acta Scientia Veterinariae*, 38: 521-533.
- MINGOTI GS, DIAS CAIADO CASTRO VS, MEO SC, SA BARRETTO LS, GARCIA JM (2011). The effectes of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine in vitro procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Animal*. 47: 361-367.
- MONDADORI RG, NEVES JP, GONÇALVES PBD (2008). Protein kinase C (PKC) role in bovine oocyte maturation and early embryo development. *Animal Reproduction Science*, 107: 20-29.
- MOOR HDM ve AKHONDI MA (1996). *In vitro* maturation of mammalian spermatozoon. *Journal of Reproduction and Fertility*, 1: 54-60.
- NAGAI T (2001). The improvement of *in vitro* maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, 55: 1291-1301.
- NAGAO Y, SAEKI K, HOSHI M, KAINUMA H (1994). Effects of oxygen concentration and oviductal epithelial tissue on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured in protein-free medium. *Theriogenology*, 41: 681-687.
- OCANA JMQ, PINEDO MM, MORENO MM (1999). The effect of different sera and bovine serum albumin fraction (BSA) on *in vitro* maturation of immature bovine oocytes. *Archivos de Zootechnica*, 48: 167-174.
- O'FLAHERTY C, BEORLEGUI N, MECONI MT (1999). Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology*, 52: 289-301.

- ÖZDAŞ ÖB (2001). *İn vitro* fertilizasyon yöntemi ile elde edilen fare embriyolarının gelişimine farklı potasyum konsantrasyonlarının ilavesi. Doktora tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Sun'ı Tohumlama Ana Bilim Dalı.
- ÖZTÜRKLER Y, YILDIZ S, GÜNGÖR Ö, PANCARCI ŞM, KAÇAR C, ARI UÇ (2010). The effects of L-Ergothionine and L-Acorbic acid on the *in vitro* maturation (IVM) and development (IVC) of sheep oocytes. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16: 757-763.
- PAULA-LOPES FF and HANSEN PJ (2002). Heat shock induced apoptosis to preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. Biology of Reproduction 66, 1169-1177.
- PEREIRA RM, BAPTISTA MC, VASQUES MI, HORTA AEM, PORTUGAL PV, BESSA RJB, CHAGAS E, SILVA J, SILVA PEREIRA M, MARQUES CC (2007). Cryo-survival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans-10 cis-12* conjugated linoleic acid (*10t, 12c* CLA). Animal Reproduction Science, 98: 293–301.
- PINYOPUMMITR T and BAVISTER BD (1995). Optimum gas atmosphere for *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization of bovine oocytes. Theriogenology 44: 471-477.
- RIZOS D, LONERGAN P, BOLAND MP, ARROYA-GARCIA R, PNTADO B, DE LA FUENTE J, GUTIERREZ-ADAN A (2002a). Analysis of differential Messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst. Biology of Reproduction, 66: 589-595.
- RIZOS D, WARD F, DUFFY P, BOLAND MP, LONERGAN P, (2002b). Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocyst quality. Molecular Reproduction and Development, 61: 234-248.
- ROBINSON RS, FRAY MD, WATHES DC, LAMMING GE, MANN GE (2006). *In vivo* expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. Molecular Reproduction and Development, 73: 470-474.
- ROY. M, GAUVREAU D, BILODEAU JF (2008). Expression of superoxide dismutases in the bovine oviduct during the estrous cycle. Theriogenology, 70: 836-842.
- RYAN DP, SPOON RA, WILLIAMS GL (1992). Ovarian follicular characteristics, embro recovery, and embryo viability in heifers fed high-fat diets and treated with FSH. Journal of Animal Science, 70: 3505.

- SAĞIRKAYA H, YAĞMUR M, NUR Z, SOYLU MK (2004). Replacement of fetal calf serum with synthetic serum substitute in the *in vitro* maturation medium: Effects on maturation, fertilization and subsequent of cattle oocytes *in vitro*. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 28: 779-784.
- SANTI B, WENIGERKIND H, SCHERTHNER W, MODL J, STOJKOVIC M, PRELLE K, HOLTZ W, BREM G, WOLF E (1998). Comparison of ultrasound-guided vs. laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. Theriogenology, 50: 89-100.
- SARASWATHI V, WU G, TOBOREK M, HENNIG B (2004). Linoleic acid-induced endothelial activation: role of calcium and peroxynitrite signaling. Journal of Lipid Research. 45: 794-804.
- SHIOYA Y, KUWAYAMA M, FUKUSHIMA M, IWASAKI S, HANADA A (1988). *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured *in vitro*. Theriogenology, 30: 489-496.
- SHIOYA Y (1999). *In vitro* fertilization in cattle. National Livestock Breeding Centre press. Shrakawa, Japan.
- SIRARD MA, FLORMAN HM, REIBFRIED-RUTLEDGE ML, BARNES FL, SIMS ML, FIRST NL (1989). Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. Biology of Reproduction, 40: 1257-1263.
- STAIGMILLER RB and MOOR RM (1984). Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. Gamet Research 9; 221.
- STUBBINGS RB, WOSIK C, ARMSTRONG DT (1993). Ovarian response in calves to multiple versus a single subcutaneous injection of follitropin. Theriogenology, 38: 321 (Abstract).
- SUZUKI T, BOEDIONO A, TAKAGI M, SAHA S VE SUMATRI C (1996). Fertilization and development of frozen-thawed germinal vesicle oocytes by a one-step dilution method *in vitro*. Cryobiology, 33: 515-524.
- ŞİMŞEK F (1999). Serbest oksijen radikalleri, antioksidanlar ve lipid peroksidasyonu. Türkiye Klinikleri Pediatri, 8: 42-47.
- ŞİRİN E ve KURAN M (2004). Rasyondaki yağ asitlerinin ruminantlarda üreme fonksiyonları üzerine etkisi. IV. Zootečni bilim kongresi, Isparta, 1-4 Eylül, 54-60.

- TAKAGI Y, MORI K, TAKAHASHI T, SUGAWARA S, MASAKI J (1992). Differences in development of bovine oocytes recovered by aspiration or by mincing. *Journal of Animal Science*, 70: 1923-1927.
- TAKAHASHI Y, HISHINUMA M, TANAKA H, KANAGAWA H (1996). Development of *in vitro* matured/fertilized bovine embryos in a chemically defined medium: Influence of oxygen concentration in the gas atmosphere. *Journal of Veterinary Medical Science*, 58: 897-902.
- TAKENAKA M, HOIRUCHI T, YANAGIMACHI R (2007). Effects of light on development of mammalian zygotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 14289-14293.
- TAN SJ and LU KH (1990). Effects of different oestrous cycle stages of ovaries and sizes of follicles on generation of IVF early bovine embryos. *Theriogenology*, 33: 335 (Abstract).
- TEKELİ T (1984). Investigations on *in vitro* fertilization of rabbit ova. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 31: 186-196.
- TETZNER TAD, SARAIVA NZ, PERECIN F, MEO NICIURA SC, FERREIRA CR, OLIVEIRA CS, GARCIA JM (2011). The effects of ovalbumin as a protein source during the *in vitro* production of bovine embryos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40: 2135-2141.
- THATCHER WW, GÜZELOĞLU A, MATTOS R, BINELI M, HANSEN TR, PRU JK (2001). Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology*, 56: 1435-1450.
- TITOV VN, LISISTVN DM, RAZUMOVSKII SD (2005). Methodological issues and diagnostic value of determination of lipid peroxidation in low density lipoproteins. Oleic acid as a biological antioxidant (Literature Review). *Klinicheskaia Laboratornaia Diagnostika*, 4: 3-10.
- TOMINAGA K, HAMADA Y, YABUUE T, ARIYOSHI T (2000). Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of *in vitro* produced bovine embryo at the 16-cell stage. *Journal of Veterinary Medicine Science*, 62: 465-467.
- VELEZ-PARDO C, MORALES AT, DEL RIO MJ, OLIVERA-ANGEL M (2007). Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kappaB and p53 activation in bovine embryos. *Theriogenology*, 67: 1285-1296.
- WANG R, JONATHAN TK, THEODORE LG, DENNIS LB, HENDRIK L (2009). Activation of the antioxidant response element by specific oxidized metabolites of linoleic acid. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81: 53-59.


- WESTHUSIN ME, SLAPAK JR, FULLER DT, KRAEMER DC (1989). Culture of agar-embedded one and two cell bovine embryos and embryos produced by nuclear transfer in the sheep and rabbit oviduct. *Theriogenology*, 31: 291 (Abstract).
- WILLIAM RB and SHAPIRO SS (1990). Quality control in the *in vitro* laboratory. *Theriogenology*, 33: 23-31.
- WIRTU G, POPE CE, DAMIANI P, MILLER F, DRESSER BL, SHORT CR, GODKE RA, BAVISTER BD (2004). Development of *in vitro* derived bovine embryos in protein-free media: effects of amino acids, glucose, pyruvate, lactate, phosphate and osmotic pressure. *Reproduction, Fertility and Development*, 15: 439-449.
- XU KP, HEIER R, GREVE T (1987). Dynamic changes of estradiol concentration in two culture systems for bovine oocyte maturation *in vitro*. *Theriogenology*, 27: 297 (Abstract).
- XU KP, HILL B, BETTERIDGE KJ (1992a). Application of *in vitro* fertilization techniques to obtain calves from valuable cows after slaughter. *Veterinary Record*, 130: 204-206.
- XU KP, YADAV DR, KING WA, BETTERIDGE KJ (1992b). Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and culture *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*, 31: 249-252.
- YAĞMUR M (2005). İneklerde embriyo kültür medyumuna ilave edilen protein kaynaklarının embriyonik gelişim üzerine etkileri. Doktora Tezi. Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı.
- ZERON Y, SKLAN D, ARAV A (2002). Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 61: 271-278.
- ZHANG M, LUA KH, SEIDEL GE (2003). Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*, 60: 1657-1663.
- ZUELKA KA and BRACKETT BG (1990). Luteinizing hormone enhanced *in vitro* maturation of bovine oocytes with and without protein supplementation. *Biology of Reproduction*, 43: 784-787.
- ZUELKA KA and BRACKETT BG (1993). Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell enclosed and denude oocytes after *in vitro* maturation with luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*, 48: 815-820.

T.C.
TARIM VE KÖYİŞLERİ BAKANLIĞI
Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
BAŞVURU DEĞERLENDİRME FORMU

Evrak Kayıt	: 509
Geliş Tarihi	: 15.04.2011
Karar Tarihi ve Sayısı	: 29.04.2011/56
Araştırma Yürütücüsü	: Tahir KARAŞAHİN
Hayvan türleri ve sayıları: (Mezbahada kesimi yapılan dişilerden alınan ovaryumlar)	

Araştırma daha önce yapılmış mı?	Evet <input type="checkbox"/>	Hayır <input checked="" type="checkbox"/>
Araştırma için seçilen hayvan türü uygun mu?	Evet <input type="checkbox"/>	Hayır <input type="checkbox"/>
Araştırma için öngörülen hayvan sayıları yeterli mi?	Evet <input checked="" type="checkbox"/>	Hayır <input type="checkbox"/>
Mümkün olan en az sayıda hayvan kullanımı amaçlanmış mıdır?	Evet <input checked="" type="checkbox"/>	Hayır <input type="checkbox"/>
Hayvanlar için optimum şartlar sağlanmış mıdır?	Evet <input checked="" type="checkbox"/>	Hayır <input type="checkbox"/>
Araştırmacı / ların deney hayvanı sertifikası / yetkisi var mı?	Evet <input checked="" type="checkbox"/>	Hayır <input type="checkbox"/>
Araştırma protokolünde hayvanlara en az ağrı ve acı verecek önlemler alınmış ve bu konudaki standartlar gözetilmiş mi?	Evet <input checked="" type="checkbox"/>	Hayır <input type="checkbox"/>
Araştırmada çevre ve/veya iş sağlığını tehdit edecek kimyasal, biyolojik radyoaktif maddelerin bulaşması riski var mıdır?	Evet <input type="checkbox"/>	Hayır <input checked="" type="checkbox"/>
Araştırma sonunda hayvanlara yapılacak işlemler konusunda gerçekçi tespitler yapılmış mıdır?	Evet <input checked="" type="checkbox"/>	Hayır <input type="checkbox"/>
Hayvanlara ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?	Evet <input type="checkbox"/>	Hayır <input type="checkbox"/>
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi yapılacak ise en uygun yöntem seçilmiş midir?	Evet <input type="checkbox"/>	Hayır <input type="checkbox"/>
Araştırma sonunda hayvanlar ağrısız ve acısız ötenazi edildi ise atıkların imhası için gerekli önlem alınmış mıdır?	Evet <input type="checkbox"/>	Hayır <input type="checkbox"/>
Açıklamalar: Proje, Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Araştırma komitesinde tartışılmış ve kabul edilmiştir. Enstitünün "Deney Hayvanı Üretici, Kullanıcı ve Tedarikçi Kuruluşlara Mahsus Çalışma İzni" mevcuttur.		


Tarafımızdan değerlendirilen bu çalışma Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Çalışma Yönergesi'nde belirtilen ilkelere uygun bulunmuştur.


Dr. Umut TAŞDEMİR
Kurul Başkanı

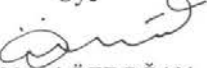

Dr. P. Barbaros TUNCER
Üye


Halil EROL
Üye


Selahattin ŞEN
Üye


Vedat KARAKAŞ
Başkan Vekili


İlkay DEMİRHAN
Üye


Dr. Neval ÖZDOĞAN
Üye


Mustafa KÖYLÜOĞLU
Üye

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Tahir

Soyadı: KARAŞAHİN

Doğum yeri ve tarihi: Ilgın/Konya-1975

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

Adres: Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Lalahan Mamak 06852

ANKARA

Telefon: 03128651196-239

E-posta: tahirkarasahin@gmail.com

II- Eğitimi

Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 1996

Konya Fatih Teknik ve Endüstri Meslek Lisesi, Torna-Tesviye Bölümü 1991

Konya-Ilgın Argıthanı Ortaokulu 1988

Konya-Ilgın Argıthanı Cumhuriyet İlkokulu 1985

Yabancı dili: İngilizce

III- Ünvanları

Veteriner Hekim 1996

IV- Mesleki Deneyimi

2004- Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü, Embriyo Transferi Şubesi, Veteriner Hekim.

2002-2003- Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müdürlüğü, Veteriner Hekim.

V- Bilimsel İlgil Alanları

Aldığı Kurslar:

1. Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, Sığırlarda Recto-Vaginal Metotla Suni Tohumlama Kursu, Mayıs 2004 Ankara.
2. Japan International Cooperation Agency 2005, Embryo Transfer Technology for Domestic Animal Kursu (3 ay süre ile), National Livestock Breeding Center Fukushima Japan.
3. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Araştırma Yönetimi Kursu, Kasım 2006 Ankara.
4. İn Vitro Koyun Embriyo Üretimi ve Embriyo Manipulasyonları Kursu Temmuz 2007, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı İstanbul.
5. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Etkili İletişim Kursu, Haziran 2008 Ankara.
6. Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Memeli Embriyolarında Dondurma Teknolojileri Kursu, Kasım 2008 Kocaeli.
7. Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, Sığırlarda Embriyo Toplanması Dondurulması Kursu, Mayıs 2009 Ankara.

Verdiği Kurslar

1. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sığırlarda Embriyo Transferi Kursu Ekim 2004 Ankara.
2. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sığırlarda Embriyo Transferi Kursu Ekim 2005 Ankara.
3. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sığırlarda Embriyo Transferi Kursu Ekim 2006 Ankara.
4. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sığırlarda Embriyo Transferi Kursu 05-09 Kasım 2007 Ankara.
5. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sığırlarda Embriyo Transferi Kursu 05-09 Ekim 2008 Ankara.

6. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sığırlarda Embriyo Transferi Kursu 13-17 Ekim 2008 Ankara.
7. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sığırlarda Embriyo Transferi Kursu 10-15 Mayıs 2009 Ankara.
8. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sığırlarda Embriyo Transferi Kursu 05-09 Ekim 2009 Ankara.
9. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sığırlarda Embriyo Transferi Kursu 04-08 Ekim 2010 Ankara.
10. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Sığırlarda Embriyo Transferi Kursu 10-14 Ekim 2011 Ankara.

Projeleri

1. AKYOL N, KIZIL SH, KARASHAHİN T, SATILMIŞ M. ‘Sığırlarda ovum pick-up tekniği kullanılarak in vitro embriyo üretimi’ TOVAG proje no104V129.
2. ‘Türkiye yerli evcil hayvan genetik kaynaklarından bazılarının in vitro korunması’ TOVAG Proje no: 106G005.
3. AKSU DA, AĞCA C, AKSU S, BAĞIŞ H, AKKOÇ T, ÇAPUTÇU AT, ARAT S, TAŞKIN AC, KIZIL SH, KARASHAHİN T, AKYOL N, SATILMIŞ M, SAĞIRKAYA H, ÜSTÜNER B, NUR Z, AĞCA Y. ‘Modern biyoteknolojik yöntemler kullanılarak dondurulmuş koç sperması ve cinsiyeti belirli inek embriyosu üretimi’ TOVAG Proje no:107G027.
4. BUCAK MN, SATILMIŞ M, KIZIL SH, KARASHAHİN T, AKYOL N, TAŞDEMİR U. Sığır Embriyolarının İn Vitro Gelişiminde Kültür Medyumlarına Katılan Antioksidanların Etkisi TOVAG Proje no:107O884.
5. AKYOL N, KIZIL SH, KARASHAHİN T. İneklerde süperovulasyon aralığı kısaltılması, elde edilen embriyo sayı ve kalitesinin artırılmasına yönelik çalışmalar. Ağustos 2002-Ocak 2005. TAGEM-HAYSÜD.
6. KIZIL SH, AKYOL N, KARASHAHİN T. Yedi günlük in vitro inek embriyolarının vitrifikasyonla dondurulması. Eylül 2002- Eylül 2004. Proje no: TAGEM-HAYSÜD / 01 / 09 / 03 / 05.
7. AKYOL N, KIZIL SH, KARASHAHİN T. Sığır embriyolarının in vitro üretimi ve transferi. Ekim 2003- Ekim 2004. TAGEM-HAYSÜD.

8. AKYOL N, KIZIL SH, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M. ‘Sığırlarda ovum pick-up tekniği kullanılarak in vitro embriyo üretimi’ TAGEM-HAYSÜD Ağustos 2005-Aralık 2006.
9. KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M. ‘Embriyo transferi çalışmaları’ TAGEM 2004.
10. KARAŞAHİN T, AKYOL N, KIZIL SH, SATILMIŞ M. ‘Cinsiyet tayini yapılan sığır embriyolarından elde edilen gebelik oranlarının araştırılması’ TAGEM Proje no: 07/01/01/03, 2006.
11. KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M. ‘Vitrikiye sığır embriyolarından elde edilen gebelik oranlarının araştırılması’ TAGEM Proje no: 07/01/01/03, 2006.
12. KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T. ‘Etilen glikol ile direkt transfer metoduna göre dondurulan inek embriyolarından elde edilen gebelik oranlarının araştırılması’ TAGEM Proje no: 03/01/01/06.
13. SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, KIZIL SH, AKYOL N. ‘Vitrikiye edilmiş sığır embriyolarında direkt transfer imkanlarının araştırılması’ TAGEM Proje no: 08/01/01/01, 2007.
14. DURSUN Ş, KIRBAŞ M, KÖSE M, BÜLBÜL B, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M, AKBULUT NK, TEKE BE, ERDEM H. ‘Yetiştirici şartlarında embriyo transferinin uygulanabilirliğinin araştırılması’ TAGEM 2010.
15. KARAŞAHİN T, ARIKAN Ş. ‘Kültür ortamına katılan bazı antioksidan maddelerin in vitro embriyo gelişim ve dondurma üzerine etkisi’ TAGEM 2011.
16. KARAŞAHİN T, BÜYÜKKAYAER O, SATILMIŞ M, ÜNAY E, AKÇADAĞ Hİ. ‘Çankırı ili Akkaraman koyunu halk elinde ıslahı’. TAGEM 2011.
17. SATILMIŞ M, BÜYÜKKAYAER O, KARAŞAHİN T, ÜNAY E, EROL H. ‘Ankara ili Akkaraman koyunu halk elinde ıslahı’. TAGEM 2011.
18. ÜNAY E, ÜNLÜSOY İ, SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T. ‘Çorum ili Akkaraman koyunu halk elinde ıslahı’. TAGEM 2011.

Verdiği konferans ve seminerler:

- 1- Embriyonik kök hücreler, Aralık 2008

Katıldığı kongre ve sempozyumlar:

- 1- II. Veteriner Jinekoloji Kongresi, Uluslararası Katılımlı, 2-5 Kasım 2006 ANTALYA.
- 2- Laboratuar Hayvanları Bilimi ve Deneysel Araştırmalar Sempozyumu 15-16 Ekim 2009 KIRIKKALE – ANKARA.
- 3- IV. Veteriner Jinekoloji Kongresi, Uluslararası Katılımlı, 4-7 Kasım 2010 ANTALYA.
- 4- VI. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi, Uluslararası Katılımlı, 18-22 Mayıs 2011 ANTALYA.
- 5- 3rd East Mediterranean ICLAS Symposium and XV. ICLAS General Assembly 13-15 June 2011 İSTANBUL .
- 6- 15th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction 15-17 September 2011 ANTALYA.

VI. Yayınları

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- AKYOL N, KIZIL SH, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M (2007). Sığır embriyolarının in vitro üretim ve transferi. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi. 47:1 1-8.
- 2- KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M (2007). 7 günlük in vitro sığır embriyolarının vitrifikasyonla dondurulması. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi. 47:2 1-5.
- 3- AKYOL N, KIZIL SH, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M, HASHİYADA Y (2008). Sığırlarda ovum pick-up (OPU) tekniği kullanılarak in vitro embriyo üretimi. Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi. 48:1 1-11.
- 4- KARAŞAHİN T (2012). Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 9 (1): 65-71.

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- BUCAK MN, SATILMIŞ M, KIZIL SH, KARAŞAHİN T, AKYOL N (2010). Sığır embriyolarının in vitro gelişiminde kültür medyumlarına katılan antioksidanların etkisi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 16 (1): 69-74,
- 2- KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M (2011). Etilen glikol ile direkt transfer metoduna göre dondurulan in vivo sığır embriyolarının transferi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 17 (5): 721-724,
- 3-TAŞDEMİR U, SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, KIZIL SH, KAYMAZ M, IMAI K (2012). The effect of single epidural plus intramuscular injection of FSH on superovulatory response in Anatolian Black cow. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 59: 211-216.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- 1- KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T (2004). İn vivo sığır embriyolarının Etilen glikol ile direkt transfer metoduna göre dondurulması. III. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi 30Eylül- 2Ekim, Manavgat-ANTALYA.
- 2- KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T (2004). İn vitro sığır embriyolarının vitrifikasyonla dondurulması. III. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi 30Eylül- 2Ekim, Manavgat- ANTALYA.
- 3- AKYOL N, KIZIL SH, KARAŞAHİN T (2005). İn vitro sığır embriyosu üretimi ve transferi. XIV. Biyoteknoloji Kongresi, 31 Ağustos-2 Eylül 2005 ESKİŞEHİR. 244-248.
- 4- AKYOL N, KIZIL SH, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M, HASHİYADA Y (2006). Sığırlarda Ovum pick-up tekniği kullanılarak in vitro embriyo üretimi. II. Uluslararası katılımlı Doğum ve Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım, Belek ANTALYA. 70-71.
- 5- AKYOL N, KIZIL SH, KARAŞAHİN T (2006). İneklerde süperovulasyon aralığının kısaltılması. II. Uluslararası katılımlı Doğum ve Jinekoloji Kongresi, 2-5 Kasım, Belek ANTALYA. 176-177.
- 6- KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M (2006). Vitrifiye edilen in vivo sığır embriyolarının saha koşullarında taşıyıcılara transferleri. II. Uluslar

arası katılımlı Doğum ve Jinekoloji Kongresi, 2-5Kasım, Belek ANTALYA. 178-179.

7- BUCAK MN, SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, KIZIL SH, AKYOL N, TAŞDEMİR U (2009). İn vitro sığır embriyolarının gelişiminde antioksidanların etkisi. V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 1-4 EKİM 2009, Elazığ.

8- BÜLBÜL B, GÖK K, KIZIL SH, KIRBAŞ M, ÇAMLIDAĞ A, SATILMIŞ M, KÖSE M, SEĞMENOĞLU MS, KARAŞAHİN T, AKBULUT NK, KARA U, TEKE BE, KARAKOZAK E (2009). Siyah alaca ineklerde farklı oranlarda LH içeren iki FSH preparatına verilen Süperovulasyon cevabının karşılaştırılması. V. Ulusal Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Kongresi, 1-4 EKİM 2009, ELAZIĞ.

9- KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M, AKYOL N, KIZIL SH (2010). Cinsiyet tayini yapılan sığır embriyolarından elde edilen gebelik oranlarının araştırılması. IV. Uluslararası Katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 72-73. 4-7 Kasım 2010 Belek ANTALYA.

10- SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, AKYOL N, KIZIL SH, TAŞDEMİR U, BUCAK MN, DEMİRHAN İ (2010). Farklı süperovulasyon protokollerinin embriyo eldesi üzerine etkisiIV. Uluslararası Katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 76-77. 4-7 Kasım 2010 Belek ANTALYA.

11- KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M (2010). Direkt transfer metodu ile dondurulan sığır embriyolarından elde edilen gebelik oranlarının araştırılması. IV. Uluslararası Katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 70-71. 4-7 Kasım 2010 Belek ANTALYA.

12- KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M, AKYOL N, KIZIL SH, BİLGİN A (2010). Farklı ırkların süperovulasyon programlarına verdikleri cevapların araştırılması. IV. Uluslararası Katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 200-201. 4-7 Kasım 2010 Belek ANTALYA.

13- KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M, AKYOL N, KIZIL SH (2010). Vitriyifiye edilen in vivo sığır embriyolarından yetiştirici koşullarında elde edilen gebelik oranlarının araştırılması. IV. Uluslararası Katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 202-203. 4-7 Kasım 2010 Belek ANTALYA.

- 14- SATILMIŞ M, KIZIL SH, KARAŞAHİN T, AKYOL N, TAŞDEMİR U (2010). Dört-yedi uterus yıkaması uygulanan Yerli Kara ineklerde östrus ve gebe kalma oranları. IV. Uluslararası Katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 210-211. 4-7 Kasım 2010 Belek ANTALYA.
- 15- KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M (2010). Esmer ırkı düvelerde ilk süperovulasyon cevapları. IV. Uluslararası Katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 212-213. 4-7 Kasım 2010 Belek ANTALYA.
- 16- SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, AKYOL N, KIZIL SH, TAŞDEMİR U, BUCAK MN, DEMİRHAN İ (2010). Farklı FSH dozlarının embriyo kalitesi üzerine etkisi IV. Uluslararası Katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 246-247. 4-7 Kasım 2010 Belek ANTALYA.
- 17- BUCAK MN, SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, KIZIL SH, AKYOL N, TAŞDEMİR U (2010). Sığır embriyolarının in vitro gelişiminde CR1aa ve SOF kültür mediumlarının etkisi. IV. Uluslararası Katılımlı Veteriner Jinekoloji Kongresi. 4-7 Kasım 2010 Belek ANTALYA.
- 18- KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M, KIZIL SH, AKYOL N, TAŞDEMİR U (2011). Yerli Kara düvelerde farklı FSH preparatlarının embriyo kalitesi üzerine etkisi. VI. Uluslararası Katılımlı Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 52. 18-22 Mayıs 2011 Belek ANTALYA.
- 19- KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M, TAŞDEMİR U, KIZIL SH, AKYOL N (2011). Yerli Kara düvelerde progesteron uygulama süresinin embriyo kalitesi üzerine etkisi. VI. Uluslararası Katılımlı Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 138-139. 18-22 Mayıs 2011 Belek ANTALYA.
- 20- KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M, AKYOL N, KIZIL SH, BİLGİN A (2011). Farklı gelişme dönemlerindeki in vivo embriyoların cinsiyetlerinin belirlenmesi. VI. Uluslararası Katılımlı Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 144-145. 18-22 Mayıs 2011 Belek ANTALYA.
- 21- KIZIL SH, SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, AKYOL N, TAŞDEMİR U, BÜYÜKKAYAER O (2011). Süperovule edilen Yerli Kara düvelerde tabii ve suni tohumlamanın embriyo sayısı ve kalitesi üzerine etkisi. VI. Uluslararası Katılımlı Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 46-47. 18-22 Mayıs 2011 Belek ANTALYA.

22- SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, KIZIL SH, TAŞDEMİR U, BÜYÜKKAYAER O, AKÇADAĞ HI, DEMİRHAN İ (2011). Yerli Kara düve ve ineklerde epidural boşluğa uygulanan FSH'nın embriyo kalitesi üzerine etkisi. VI. Uluslararası Katılımlı Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 56-57. 18-22 Mayıs 2011 Belek ANTALYA.

23- SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, KIZIL SH, AKYOL N, BUCAK MN (2011). Vitriyfe edilen sığır embriyolarında direkt transfer imkanlarının araştırılması. VI. Uluslararası Katılımlı Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 140-141. 18-22 Mayıs 2011 Belek ANTALYA.

24- KIZIL SH, SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, AKYOL N (2011). Esmer ırkı düvelerden elde edilen in vivo embriyoların vitrifikasyonu. VI. Uluslararası Katılımlı Reprodüksiyon ve Suni Tohumlama Bilim Kongresi. 146-147. 18-22 Mayıs 2011 Belek ANTALYA.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

1- KARAŞAHİN T, AKYOL N, KIZIL SH, SATILMIŞ M (2011). The effect of different FSH dosage on development of in vitro bovine embryo. 3rd East Mediterranean International Council for Laboratory Animal Science Symposium. 120. 13-15 June 2011 İSTANBUL.

2- SATILMIŞ M, KARAŞAHİN T, KIZIL SH, AKYOL N, BUCAK MN (2011). Use of Charles Rosencrans (CR1aa) as embryo culture medium on development of in vitro bovine embryos. 3rd East Mediterranean International Council for Laboratory Animal Science Symposium. 120. 13-15 June 2011 İSTANBUL.

3- KIZIL SH, AKYOL N, KARAŞAHİN T, SATILMIŞ M, GÖK K. Investigation of pregnancy rates obtained from vitrified holstein embryos. Reoroduction in Domestic Animals. The 15th Annual Conference of the European Society for Domestic Animal Reproduction (ESDAR) ANTALYA-TURKEY. 15-17 September 2011. Page 118.

VII. Diğer Bilgiler

Deney hayvanı kullanım sertifikası: 19-06-2007 Lalahan Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu. Ankara.