

İNEKLERDE İN VİTRO FERTİLİZASYON (DERLEME)

(In Vitro Fertilization In The Bovine) (A Review).

Mustafa GÜNDOĞAN*

SUMMARY

This review includes the description, importance, technique and the made researchs of the in vitro fertilization in breeding bovine.

The fecundation mature oocytes out side the female tract is called in vitro fertilization (IVF). The advantage of this technique is that the more embryos can be produced with rather low cost.

A considerable progress has been given by recent studies on oocyte, sperm and embryo. It may become possible to order in an IVF- laboratory embryos, that have been cultured in vitro from oocyte up to the morula or blastocyststage.

Key Words: In vitro Fertilization, bovine.

ÖZET

Bu derleme, inek yetiştiriciliğinde in vitro fertilizasyonun tanımı, önemi, tekniği ve yapılan çalışmaları kapsamaktadır.

In vitro fertilizasyon, olgun oositlerin dişi genital kanalının dışında döllenenmesidir. Bu tekniğin önemli bir avantajı, embriyoların çok sayıda oldukça düşük bir maliyetle üretilebilmesidir.

Son günlerde oosit, spermatozoid ve embriyo üzerinde daha fazla çalışılması bu alanda belirgin bir ilerleme sağlamıştır. Oositlerden morula veya blastosist safhalarına in vitro olarak kültür edilebilen embriyolar, bir in vitro fertilizasyon laboratuvarında sipariş imkanı bulabilecektir.

Anahtar Kelimeler: İn vitro fertilizasyon, inek.

* : Yard. Doç. Dr. A.K.Ü. Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, AFYON

GİRİŞ

Büyük ölçüdeki hayvansal verim açığını kapatma çabaları ve önlemleri içerisinde sığır yetiştiriciliği önemli bir yer tutmaktadır. Hayvansal verimliliğin devamı temelde buzağı verimine bu da en uygun zamanda ve en ucuz yöntemler kullanılarak gebeliğin sağlanmasına bağlıdır. Bu derlemede, verim kabiliyeti yönünden yüksek değerdeki hayvanların üretiminde in vitro fertilizasyon tekniğinin aşamaları, önemi ve yapılan çalışmalar üzerinde durulmuştur.

Sahip olunan modern tekniklerin birbiriyle ilişkisine önem verilmesi, herşeyden önce evcil hayvan potansiyelinin artırılması ile ilgili olan, her iki ovaryum eşey hücre populasyonlarının kullanılması, sun'i tohumlama tekniklerinde dondurulmuş sperma kullanımının pahalı olması, değerli erkek damızlıklardan elde edilerek uzun süre saklı kalan dondurulmuş spermadan çok etkili olarak faydalanılması, ihracatta embriyo transplantasyon tekniklerinin daha fazla talep edilmesi ve preovarian adhesyonlar gibi sonradan oluşmuş bazı tip infertil dişi hayvanlardan bir çok yavru elde edilmesi ve dolayısıyla yüksek verim değerlerine sahip hayvanlardan da daha uzun süre ve yüksek oranda hatta gebelik esnasında dahi bu hayvanların gametlerinden yararlanılması aynı zamanda hem erkek hem de dişi gametlerin fertilitelerini tayin etmede yaygın olarak kullanılan bir teknik olması gibi özelliklerden dolayı bu tekniğin kullanılması ve imkanlarının genişletilmesi hedeflenmektedir. Eğer bilgiler üreme metodları içerisinde yapılan çalışmalardan toplanarak pratiğe uyarlanmaya çalışılırsa hayvan üretimi ve ıslahı üzerinde önemli bir etkiye sahip olacaktır. Yapılan çalışmaların olumlu ve etkili sonuçlar vermesi, bu tekniğin öneminin belirtilmesine yetecektir. Ayrıca in vitro fertilizasyon, genetik mühendisliği tekniklerinin uygulanmasında değerli bir ek teknolojidir.

İn vitro fertilizasyon, dişi genital organların dışında olgun veya olgunlaştırılan oositlerin, kapasitasyona uğramış veya uğratılmış spermatozoitlerle karşılaşarak fertilize olmasıyla embriyoların oluşması ve devamında uygun alıcılara gelişmiş dönemdeki embriyoların transfer edilmesi veya saklanması kapsayan bir tekniktir (1, 3, 4, 5, 12, 14). Bu tekniğin ilk uygulaması 1959' da tavşanlarda başarılı ve ilk yavru alınmıştır. Embriyoların ilk dondurulması ise ilk 1972 yılında fare embriyolarında gerçekleştirilmiştir. Bu tarihlerden itibaren in vitro fertilizasyon tekniği, fare, rat, hamster, kedi, kobay, koyun, sincap, insan ve ineklerde uygulanmaktadır (3, 5, 12, 13, 21, 25).

İn vitro fertilizasyon tekniği, gametlerin elde edilmesi, in vitro olgunlaştırılması, in vitro fertilizasyon, embriyoların kültürü ve alıcılara nakli veya saklanması gibi aşamaları içermektedir (11, 12, 23, 25).

1. GAMETLERİN İN VİTRO OLGUNLAŞTIRILMASI

Ne ovaryum içinde oluşan oosit şekillerinin tamamı ne de testisler içinde sakın duran erkek gametler fonksiyonel değildirler. Onların, fertilizasyon olaylarına katılabilecek gelişmeyi gösterdikten sonra doğal salıverilmeleri veya daha ileri olgunlaşma aşamalarından geçmeleri gerekmektedir. Spermatozoitlerin fonksiyon kazanabilmeleri için epididimal kanalda pek çok kıvrımlar boyunca yavaş geçiş esnasında tamamlanan testikuler olgunlaşma dönemine ve ejakulasyondan sonraki dönemde dışı genital kanalda gerçekleşen olgunlaşma (Kapasitasyon) dönemi geçirmeleri gerekmektedir. Oositlerin ise ovaryum içindeki gelişim ve ovaryumdan salındıktan sonra fallopian tüp içindeki olgunlaşma dönemine ihtiyaçları vardır. Bu teknik epididimal ya da ejakule edilen spermatozoitler ile ovuma veya oositlere in vitro müdahaleyi içermektedir. Gametler elde edildikten sonra taze PBS (Phosphate Buftered Saline) içine alınır (Tablo 1). Bu medyumun pH' sı 7.3-7.4 ve sıcaklığı 38.5-39.0 °C olmalıdır (1, 11, 12, 13, 14, 21).

Tablo 1. İn vitro olgunlaşma için gametlerin tutulduğu PBS medyumunu.

Soluysan A	gr/lit(x10)	Soluysan A	gr/lit(x10)
NaCl	80.0	CaCl ₂ .2H ₂ O	0.67
KCl	2.0	veya	
Na ₂ HPO ₄ .6H ₂ O	0.67	CaCl ₂ .6H ₂ O	1.0
veya		MgCl ₂ .6H ₂ O	1.0
NaHPO ₄	11.5		
KH ₂ PO ₄	2.0		

Hazırlanışı: 100 ml Sol. A, 10 ml Sol. B ve 890 ml su ile 1000 ml PBS hazırlanmış olur.

A- OOSİTLERİN KÜLTÜRÜ

Oositlerin olgunlaşma fizyolojisinde folliküler çevre şartları önemli olmasına rağmen yapılan bir çok araştırmada ovaryumdan müdahaleyle sun'i olarak elde edilen oositlerin in vitro koşullarda folliküler ortamın sağlanması ile fonksiyonlarını devam ettirebildikleri bildirilmektedir (6, 9, 18, 20, 27, 29).

Genç memelilerin ovaryumlarındaki eşey hücre popülasyonunun kullanımının daha fazla artırılması, üreme gücünün kaynağının artırılmasında başlıca imkandır. Diğer memelilerde olduğu gibi sığırlarda da östrus zamanında kendiliğinden ovule edilen oositlerin sayısı, ovaryumdaki oositlerin binlercesinin normalde sadece bir tanesidir.

Sığırlarda değişik fotal ve postnatal safhalarda eşey hücre popülasyonu mevcuttur. Antral follüküllerin sayısı postnatal yaşın 2. ayından 8-10. yılına kadar sabit kalır ve sonra yavaşça azalır. Follükül ve eşey hücrelerinin postnatal popülasyonundaki değişikliklere göre oositlerin kullanımının artırılması amaçlanan müdahalelerde prepuberal hayvanlar kullanılabilir (5, 13, 18, 21, 24, 30).

Buzağı ya da inek oositleri, kesimden veya cerrahi müdahaleler ya da laparoskop yardımıyla follüküler antrum içeriğinin aspirasyonu ya da ovulasyondan sonra oviduct veya fallopian tüpün yıkanmasıyla mekanik olarak elde edilirler. Bunun yanında, in vitro fertilizasyon gibi yöntemlerde kullanılmak üzere gebe ineklerden oositlerin toplanabileceği yapılan çalışmalarda (11, 16, 22) bildirilmektedir.

Aspirasyon zamanında genellikle follüküler oositler henüz olgunlaşmamıştır. Nükleusun fertilizasyon için olgunlaşmasına müsaade etmek amacıyla belli bir süre oositler kültüre edilirler. Bunun için elde edilen oosit cumulus kompleksi hücreleri metafaz 1 veya 2' ye 38.5-39 °C' de plastik petri kutularında uygun medyum içinde inkube edilerek geliştirilirler. Olgunlaştırma medyumu olarak Medium-199 kullanılmaktadır (Tablo 2). Bu medyum % 5 CO₂ içeren ortamda, pH' sı 7.3-7.4, sıcaklığı 38.5-39.0 °C ve osmolaritesi 270-290 mosm olmalıdır. Petri kutularına 50, 100 veya 400 µl'lik hacimlerde konan oositler medyum içinde 24 saat inkube edilerek olgunlaştırılırlar. Laboratuvarda büyük graaf follüküllerinden direkt olarak elde edilen oositler ovule olmuş bir ovum' un tam çapına ulaşmış olup, stoplazmik olgunlaşmanın da önemli bölümü tamamlanmıştır. Eğer oositler HCG ile in vivo uyarıdan 24 saat sonra follüküllerden toplanıp in vitro fertilizasyona tabi tutulursa normal blastosistler şekillenmektedir. Parçalanma, patlama veya aspirasyon yoluyla follüküler içerikten elde edilen oositler in vitro olarak olgunlaştırılır. Oositleri olgunlaştırma solüsyonu, orantılı miktardaki basit tuz solüsyonuna serum albumini, aminoasit, vitamin, hormon (FSH, LH) katılmasıyla hazırlanır (6, 11, 16, 17, 26).

Tablo 2. Oosit yıkama medyumu Medium 199.

	mg/100ml
NaCl	666.0
KCl	23.8
NaHCO ₃	16.8
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	6.2
Sodium Lactate	112.1
MgCl ₂ .6H ₂ O	10.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	29.4
HEPES	240.0
Phenol Red	1.0
Sodium Pyruvate	5.5
Bovine Serum Albumin	300.0
Glucose	100.0

Ovulasyon öncesi follikül içindeki ostrojenik çevre, oositlerin fonksiyonel olgunlaşmasında sinerjik etkiye sahip olduğundan follikül sıvısı homologlarını ihtiva eden solüsyonun modifiye edilerek kullanımı, kültür periyodu ile orantılı olarak oositlerin olgunlaşma oranını arttırmaktadır (2, 7, 8, 20, 21, 26).

B- SPERMATOZOİTLERİN OLGUNLAŞMASI

Ovulasyonda ovum'un aksine spermatozoitler, epididymis'e girmeden önce mayoz bölünmeyi tamamlamışlardır. Tohumlamayla dişi genital yoluna bırakıldıktan sonra spermatozoitin en son olgunlaşması gerçekleşmekte ve fertilizasyon için fonksiyonel duruma gelmektedir. Spermatozoitlerin oositleri dölleme yeteneğine ulaşabilmeleri için kapasitasyona uğramaları gerekmektedir. Kapasitasyon ya daha önce tohumlanmış diğer bir dişiden spermatozoitleri geri alarak veya uygun kapasitasyon sıvısında swim-up işlemi ile bir saat inkube edilerek kazandırılır .Bu teknik epididymal ve ejakule edilen spermatozoitlerin her ikisinde birlikte denenmekte ve spermatozoitler uygun konsantrasyondaki bir fizyolojik medyumla karıştırılarak uygun inkubasyon şartları altında kapasitasyon gelişmekte ve spermatozoid motiliteleri in vitro olarak arttırılmaktadır. Kapasitasyon medyumunu, osmolaritesi 290-310 mosm olan modifiye Ca^{+2} -içermeyen Tyrode medyumundan oluşur (Tablo 3). Bu medyum maksimum nemli, % 5 CO_2 içeren ortamda, pH' sı 7.3 -7.4 ve 38.5 °C sıcaklıkta ekilibre edilir. Ortalama 0.25 ml' lik payet için 1 ml kapasitasyon medyumunu konik test tüplerine konur. Motil spermatozoid kapsayan tüpler 45° açıda 1 saat inkube edildikten sonra 500 devirde 7-10 dk santrifüj edilir. Böylece kapasitasyon kazandırılmış olur. Burada amaç, spermatozoid yüzeyinden seminal plazma elementlerinin uzaklaştırılması ve akrozom reaksiyonunu meydana getiren vezikülasyon değişikliklerinin uygun yönde gelişmesini sağlamaktır. Bu değişiklikler, cumulus hücrelerinin ilavesiyle ya da folliküler sıvının katılmasıyla ilerletilebilir. Fakat reaksiyonun akış zamanı kesinlikle in vivo ortamdakinden daha hızlı değildir (1, 5, 7, 11, 12, 19).

Tablo 3. Kapasitasyon Medyumu. Modifiye Ca^{+2} içermeyen Tyrode solüsyonu.

	mg/100ml
NaCl	654.5
KCl	20.0
NaHCO ₃	210.0
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	6.2
Sodium Lactate	112.1
MgCl ₂ .6H ₂ O	10.0
HEPES	120.0
Sodium Pyruvate	11.0
Bovine Serum Albumin	600.0
Glucose	250.0

II. İN VİTRO FERTİLİZASYON

Memelilerde fallopian tüp içerisinde fertilizasyon normal olarak gerçekleşmektedir. Memeli ovumunun vücut dışında fertilizasyonuna ilişkin belli bir çerçeve içindeki bu konu bilim adamları için uzun bir araştırma hedefi olmuştur.

Memelilerde in vitro fertilizasyon çalışmalarına ilk tavşan ve kobaylarda başlanmıştır. İlk çalışmalarda spermatozoid kapasitasyonu, in vivo olarak tohumlamadan 12 saat sonra tohumlanan dişilerin uterusundan geri alınma yoluyla sağlanmıştır. Ovumlar ise az miktardaki Locke solüsyonu içerisinde, graaf follikülü içeriğinin 30-120 dk inkube edilmesi ile elde edilmiştir. Fertilizasyon ise in vitro ortamda cam tüpler içerisinde karışımın salınıp inkubator araç olarak kullanılması ile sağlanmıştır. Ancak ilk çalışmalarda (Tablo 4), inek ve koyunlarda olumlu sonuçlar alınamamıştır (3, 5, 11, 18, 23, 25).

Tablo 4. Çeşitli türler üzerindeki ilk IVF çalışmalarının sonuçları.

Türler	İVF	Canlı Yavru Alınması
Tavşan	+	+
Rat	+	+
Fare	+	+
Hamster	+	-
Kobay	+	-
İnek	?	-
Koyun	?	-
İnsan	+	+

- İn vitro fertilizasyon için gerekli kriterler şunlardır;
- Gonadlarda gametlerin nükleer ve stoplazmik olgunlaşmaları,
 - Erkek ve dişi genital organlarda fertil olan gametlerin gelişmeleri,
 - Yeterli motiliteye sahip fertilize olabilir spermatozoitlerin yeterli sayıda olması,
 - Fertilize olabilen 1. polar kısma sahip ovum.

Fertilizasyon kültürüne edilmiş oositleri ve kapasitasyona uğramış spermatozoitleri kapsayan 46 .uL hacmindeki damlalarının modifiye Tyrode solusyonu içinde karşılaştırdıktan bir kaç saat sonra meydana gelir. Bu medyum maksimum nemli, CO₂ içeren atmosferde, pH' sı 7.7-7.8 ve 38.5-39.0 °C sıcaklıkta 1 saat ekilibre edilir. 5-10'lu gruplar halindeki oositlerin üzerine 2-5 µl hacminde 1-1.5 milyon/ml'deki spermatozoid süspansiyonu ilave edilir. Petri kutuları maksimum nemli, % 5 CO₂ içeren atmosferde ve 38.5-39.0 °C sıcaklıktaki inkubatörde 18-20 saat inkube edildikten sonra steoro mikroskop altında bölünmelere bakılıp morfolojik olarak normal olanlar (simetri, renk, blastomerlerin varlığı...) in vitro kültür edilirler. Kültür için taze % 20 SS ihtiva eden M-199 kullanılır (Tablo 2). Her 44-48 saatte 45 µl hacimdeki medyum taze medyum ile değiştirilir. Oluşan düzenli blastomere sahip embriyolar 10-20' li gruplar halinde maksimum nemli, % 5 CO₂ içeren atmosferde ve 38.5-39.0 °C sıcaklıktaki kültüre edilirler. Oluşan embriyolar genellikle alıcılara transfer edilmeden önce gelişimi için bir süre in vitro olarak kültüre edilirler. Embriyolar bir alıcının uterusuna transfer edilmesinden önce gelişmenin blastosist ya da morula safhasında olmalıdırlar. Bu ya yeni fertilize olmuş embriyonun pH' sı 7.8 ve osmolaritesi 290-310 mosm olan fertilizasyon medyumunu yani Modifiye Tyrode solusyonu (Tablo 5) içinde kültürü ile ya da uygun ortamdaki sıcak bir yere transfer ile yapılabilmektedir. İnekler için seçilen taşıyıcı hayvan koyundur. Yüzlerce 1 veya 2 hücreli embriyo taşıyıcı bir koyunun oviduct'una transfer edilip 6 gün sonra tekrar elde edilerek alıcılara transfer ya da dondurma için değerlendirilebilmektedir (3, 12, 13, 14, 25).

Tablo 5. Modifiye Tyrode Solüsvonu.

	mg/100ml
NaCl	666.0
KCl	73.8
NaHCO ₃	209.0
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	6.2
Sodium Lactate	112.1
MgCl ₂ .6H ₂ O	10.0
CaCl ₂ .2H ₂ O	29.4
HEPES	240.0
Phenol Red	1.0
Sodium Pyruvate	5.5
Bovine Serum Albumin	600.0
Glucose	100.0

Embriyoların erken kültüründe sığır oviduct epitel hücreleri ile kompoze edilen kültürler kimyasal olarak tanımlanan kültürden daha olumlu sonuçlar vermiştir. Bununla beraber bazı durumlarda in vitro fertilizasyon cumulus oophorus ve corona radiata hücrelerinin varlığı ile artmaktadır. Gelecekte embriyoların toplu üretimi için daha makbul bir metodu, bu tekniğin geliştirilmesi sağlayacaktır (7, 8, 20, 26, 27).

Yapılan çalışmalarda (15, 19, 28, 29) toplanan folliküler oositler olgunlaştırılıp kültür edildikten sonra kapasite olmuş spermatozoitlerle karşılaştırılarak in vitro fertilizasyona tabi tutulup değerlendirilmiş ve östrus siklusunun 7. günündeki (Östrus=0. gün) alıcılara ipsilateral olarak transfer edilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

İn vitro fertilizasyonun gerçekleşmesinde ve başarıya ulaşmada birçok faktör etkili olup, dikkate alınması gerekmektedir. Bunlar (3, 5, 11, 13, 23, 25);

1. Spermatozoitlerin gelişme durumu ve yoğunluğu: Ejekulasyondan sonra veya epididimisten elde edilen spermatozoitlerin kültür medyumunda ya da dişi genital kanalında kapasitasyonu esnasında miktarları azalmaktadır.

2. Ovum'un gelişme durumu: Ovaryum oositlerinin inkubasyonu esnasında ovumun etrafındaki sıvı ve follikül hücrelerinin varlığı veya yokluğu.

3. Tercih edilen medyumlar: Bu medyumların osmolaritesi 290-310 mosm ve pH' sı 7.4-7.6 olmalıdır.

4. Fertilizasyon esnasındaki spermatozoid süspansiyonunun yoğunluğu ve hacmi: Bu değerler $1.2 \times 10^6/ml$ ve 40-100 μl olmalıdır. Spermatozoid oranı fazla olmasına rağmen ovuma penetre olabilen miktar azdır.

5. Gametlerin kültürü ve sonra karışımın yapıldığı yer ile zaman arasındaki ilişki: Spermatozoid süspansiyonunun preinkubasyon periyodu, follikül sıvısının varlığı, yokluğu ve miktarı etkiler.

6. Spermatozoitlerin motilitesi: Motilite in vitro olarak ovuma penetrasyonda temel rol oynamaktadır.

7. Isı: İn vitro manipulasyonlar esnasında ısıdaki minimum dalgalanmalar bile spermatozoitlerin kümelenmesine neden olur.

8. Işık: Kültür sistemi, mikroskopta periyodik kontroller istisna, karanlıkta tutulmalıdır.

9. Aseptik ön tedbirler: Mikroorganizma, kan ve hücre süspansiyonlarının kontaminasyonundan sakınılmalıdır.

10. Yaşlı gametler: Fertilizasyon yaşlı gametlerle yapıldığında ya embriyo gelişmez ya da yaşama gücünden yoksun embriyolar oluşur.

11. Stres: Normal in vivo fertilizasyonda olduğu gibi in vitro fertilizasyonda da başarıya ulaşmada stres önemli bir etkiye sahiptir.

III. EMBRİYOLARIN KÜLTÜRÜ VE SAKLANMASI

Fertilizasyondan sonra gebeliğin şekillenebilmesi için embriyoların transferinde, transfer edilecek yere uygun olabilmesi açısından, 2 hücreli dönemden 8 hücreli ve blastosit devresine gelişmelerini sağlamak amacıyla kültür edilmeleri gerekmektedir.

Embriyoların gelişimi için kültür koşullarının implantasyon öncesi tubal ve uterus sıvılarının temel bileşenlerini ihtiva etmesi gerekir.

Embriyoların kültür için değişik kültür medyumları kullanılmakla beraber ilk çalışmalarda (5, 11, 17, 18, 21) embriyolar in vivo ortamda kültür edilmekteydi. Yapılan çalışmalarda (2, 9, 10, 18, 30) embriyolar ineklerde başlıca kesimle geri alınmış veya laparotomiyle TC 199 gibi bir medyum kullanılıp verici genital kanalından yıkanarak ya da modifiye tuzlu fosfat-bufter ile nonşirurjikal yıkanma yoluyla elde edilmiştir.

Embriyoların kültürü için çeşitli kültür medyumları kullanılmaktadır. Elde edilen 1, 2-4 veya 8 hücreli embriyolar belli sürelerde uygun kültür medyumlarında kültür edildiklerinde 12, 16, 20 (erken morula), 32 (morula), 64 (geç morula), erken blastosist ve blastosist dönemlerine geliştirilir. İneklerde embriyoların gelişim süreleri ve dönemleri Tablo 6' da verilmiştir. Blastosist devresine gelişen embriyolar ya alıcılara ipsilateral olarak hemen transfer edilirler ya da daha sonra transfer için uygun tekniklerle dondurularak saklanırlar. Embriyolar -120 °C' den düşük ısılarda saklandıklarında morfolojik değişimler durmaktadır. Memeli embriyoları için nitrojen likit' de yaşama süreleri tahminen yaklaşık 30.000 yıl civarındadır (11, 14).

Tablo 6. inek embriyolarının gelişim süreleri ve dönemleri.

Östrüstan sonraki günler	Embriyoların gelişme dönemi
0-2	1 Hücreli
1-3	2 Hücreli
2-3	4 Hücreli
3-5	8 Hücreli
4-5	16 Hücreli
5-6	Morula
5-7	Geç Morula
7-8	Erken Blastosist
7-9	Blastosist
8-10	Genişlemiş Blastosist
9-11	Sarkmış Blastosist

Embriyolar kültüre edildikten sonra bir seri halindeki cryprotectanların yoğunlukları içinde taşınırlar. Daha sonra lastik uyarlayıcılarla şırıngaya bağlanan payetlere sırasıyla medyum-hava-medyum + embriyo - hava - medyum aspire edilir. Payetlerin her iki ucu tıkaçla kapatılarak adlandırma için etiketlenir. Tıkaç olarak ya ısıtılıp preslenir ya da PVA(Polyvinyl alcohol) veya PVP (Polyvinyl pyrrolidone) ile doldurulur. İki ucuda kapatılan payetler değişik soğutma metodları uygulanarak dondurma işlemi için hazırlanır (11, 14). Soğutma işlemi için değişik metodlar uygulanmakta olup bunlar;

-Yavaş soğutma derecesi dakikada 0.5-1.6 °C

-Hızlı soğutma derecesi dakikada 17-30 °C

-Soğutma derecesi dakikada -1 °C'den -7 °C' ye değiştirilir.

-Soğutma derecesi dakikada 0.3 °C' den -35 °C' ye değiştirilir.

-Soğutma derecesi dakikada 0.1 °C' den -38 °C'ye değiştirilir.

Payetler dondurucuya yerleştirilir ve -6 °C' de 10 dk. bekletilir. Bu esnada pensler Nitrojen likitte soğutulur. Payetler, buz kristalleri formunu alana kadar soğutulur ve penslerle embriyoların yanından sımsıkı tutularak programlanabilen soğutucunun içine yerleştirilip soğutma metodu uygulanır. Termos şişesi nitrojen likit ile doldurulur. Dondurulmuş embriyoları bulunduran payetler dondurucudan çıkarılır ve nitrojen likit içerisine daldırılır. Payetler aliminyum gobletlere yüklenir ve Nitrojen likit içinde -196 °C' de saklanır. Bu şekilde embriyolar uzun süre muhafaza edilmektedir (11, 14, 25).

Dondurulmuş embriyolar kullanılacağı zaman çıkarılır ve çözülür. Çözme işlemi için 20 °C' deki oda sıcaklığında 6-10 sn tutulup yıkama suyuna daldırılır. Yıkama suyunun sıcaklığı ise 35-37 °C' ye ayarlanır. Böylece çözünen embriyo gerek transfer için gerekse değerlendirme için kullanılabilir (11, 12, 14).

SONUÇ

Ovulasyon, fertilizasyon ve embriyonik gelişme fizyolojisi arasındaki bağların in vitro taklit edilmesi olan in vitro fertilizasyon tekniği ile bazı infertil hayvanlardan ve genetik yönden üstün verimli hayvanlardan daha fazla oranda yararlanılması ve daha ekonomik olması dolayısıyla bu teknik üzerindeki çalışmaların ilerletilerek yapılmasına ihtiyaç vardır.

LİTERATÜR LİSTESİ

1. ALAÇAM, E., DEVECİ, H., DİNÇ, D. A. ve Ark.(1990). Theriogenoloji Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon Sun'i Tohumlama Obstetrik ve Infertilite. Nurol Matbaacılık A. Ş., Ankara.
2. ALM, H, KAUFFOLD, P, MKAROWA, SN. et all.(1990). Effect of granu losa Cells on İn Vitro Maturation. Fertilization and Cleavage. Archiv -Fur -Experimentelle -Veterinarmedizin. 44: 1, 83-91.
3. ARTHUR,G. H., NOAKES, D.E., PEARSON, H. et All. (1996). Veterinary Reproduction & Obstetrics. W. B. Saunders Company Philadelphia.
4. AYTUĞ CN.(1984). Topkim Sığırcılık Seminerleri. Topkapı İlaç Premiks San. ve Tic. A.Ş. İstanbul
5. BEARDEN, H. J. and FUQUAY, J. W. (1992). Applied Animal Reproduction. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
6. BERG, U. and BREM, G.(1989). In Vitro Production of Bovine Blastocysts by In Vitro Maturation and Fertilization of Oocytes and Subsequent in Vitro Culture Zuchthygiene. 24: 3, 134-139.
7. BOCCART C, MERMİLLOD P, MASSİP A. et all.(1991). In Vitro Production of Cattle Embryos by Culture with Oviduct Cells After İn Vitro Maturation and Fertilization. Annalesde-Medecine Veterinaire. 136: 5, 365-371.
8. BOTTCHEr, M., BLOTTNER, S., KRUGER, S. et all (1990). Effect of the Cumulus Oophorus on the Fertilization of Cattle Oocytes Matured in vitro. Archiv-fur-Experimentelle- Veterinarmedizin, 44: 1, 53-57.
9. ECTORS, F. J., ZWALMEN, P. V., TOVATİ, K. et all (1988). Procurement of Blastocysts after Maturation and Fertilization in vitro of Bovine Oocytes: İnitial Results. Annales-de-Medecine Veterinaire, 132: 6, 517-519.
10. GARDL, E.(1989). İn Vitro Production of Cattle Embryos. Anim. Breed. Abst, 057-07188
11. GORDON. İ. (1994). Laboratory Production of Cattle Embryos. Biotechnology in Agriculture No. 11. CAB İnternational UK.
12. HAFEZ, E. S. E.. (1985). Reproduction in Farm Animals. Lea & Febiger, Philadelphia.
13. HUNTER, R.H.F. (1980). Physiology and Technology of Reproduction in Female Domestic Animals. Academic Press. A Subsidiary of Harcourt Brace Jovanovich Publishers. London.

14. İLERİ,İ. K., AK, K., PABUÇÇUOĞLU, S. Ve Ark. (1994). Evcil Hayvanlarda Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İ. Ü. Vet. Fak. Ders Notları, No: 23.
15. KATSKA, L., SMOROG, Z., BAK, M. et all. (1991). A Calf Bom From The Embryo Obtained İn Vitro. Medycyna-Weterynaryna. 47: 4, 169-171.
16. KONIG ,İ., GOTZE, M., TORNER, H. et all. (1990). Results of A Pilot Trial İnvolving The Collection of Oocytes From the Ovaries of Slaughtered Cows For İn Vitro Maturation and Fertilization. Monatshefte -fur -Veterinarmedizin. 45: 4, 138-141.
17. KRUIP, TA.M., PIETERSE, M.C., BENEDER, T.H. et all (1991). A New Method For Bovine Embryo Production: A Potantiel Altemative to Superovulation. Veterinary Record, 128: 9, 208-210.
18. LAMBERT, R.D., SIRARD, M.A., BERNARD, C. et all (1986). İn Vitro Fertilization of Bovine Oocytes Matured İn Vivo and Collected at Laparoscopy. Theriogenology. 25: 1, 117-133.
19. LENGWINAT, T., BLOTTNER, S., WERSUHN,A. Et all. (1990). A Comparison of the Pregnancy Rate, Using Fersh or Frozen Bull Semen, After İn Vitro Maturation and Fertilization of Non-ovulated Cattle Oocytes. Monatshefte fur Veterinarmedizin, 45: 10, 345-347.
20. LIU, J.M., JIN, Z.O., ZHAO, X.X. et All (1991). The Development of Bovine Follicular Oocytes Matured in Different Culture Media. Veterinary Research Communications, 15: 4, 257-260.
21. MC DONALD, L E. and PINEDA, M.H.(1989). Veterinary Endocrinology and Reproduction. Lea & Febiger, Philadelphia.
22. MINOIA, P, MATTEUZZI, A., DELL'AQUILA, M. E. Et All (1988). Morphological Observations on Follicular Oocytes Recovered During Pregnancy in Cattle. Problematiche di Biologica, Fisiopatologia e Clinica Della Riproduzione Animale; 59- 70.
23. MORROW, D.A. (1980). Current Terapy in Theriogenology. W.B. Saunders Company Philadelphia.
24. MYLNE, J., MCKELVEY, W., BROADBENT, P. Et All (1992). Salvage of Bovine Oocytes. Veterinary Record, 130:3.
25. SALISBURY, G. W. and VANDEMARK, N. L. (1961). Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle. W. H. Freeman & Company.
26. SUSS, U., KASSNER, J., WUTHRICH, K. Et All. (1990). Cumulus Expansion, İn Vitro Fertilization and Embryonic Development After İn Vitro Maturation of

Bovine Oocytes in The Presence of Follicle Stimulating or Luteinizing Hormone. *Reproduction in Domestic Animals*, 25: 1, 3-13.

27. SUZUKI, T., SINGLA, S. K., SUJATA, J. Et All. (1991). Cleavage Capability of Water Buffalo Follicular Oocytes Classified By Cumulus Cells and Fertilized İn Vitro. *J. of Veterinary Medical Science*, 53: 3, 475-478.
28. TAKADA, N., OHISA, N., NUMABE, T. Et All. (1991). Production Twin Calves By Transfer of Embryos Produced İn Vitro. *Veterinary Record*, 128: 13, 307.
29. VAJTA, G., BARANDI, Z., VARGA, Z. Et. All (1991). Pregnancy After İn Vitro Fertilization of Bovine Oocytes. *Magyar-Allatorvosok-Lapja*, 46: 2, 87-90.
30. XU, K. P., HILL, B. and BETTERIDGE, K. J. (1992). Application of İn Vitro Fertilisation Techniques to Obtain Calves From Valuable Cows After Slaughter. *Veterinary Record*, 130: 10, 204-206.